

Photochemische Oberflächenmodifizierung für die Bioanalytik auf Kunststoffträgern

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von

Daniela M. Dankbar

Tag der mündlichen Prüfung:	15.07.2005
Dekan:	Prof. Dr. S. Laufer
Erster Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Gauglitz
Zweiter Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Oberhammer

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Günter Gauglitz, für die ausgesprochen freundliche Unterstützung meiner Arbeit und die exzellenten Arbeitsbedingungen.

Ich danke allen Kollegen des Arbeitskreises für die gute Zusammenarbeit und die Freundschaft, die mir in den drei Jahren entgegengebracht wurde. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Goran Markovic für die Unterstützung bei den RfS-Messungen, Herrn Dr. Nicolae Leopold und Frau Dr. Tina Mutschler für die Durchführung der Ellipsometrie- und AFM-Untersuchungen, sowie Frau Nina Käppel und Herrn Dr. Günther Proll für die enge und freundschaftliche Zusammenarbeit in verschiedenen Projekten.

Ein herzlicher Dank geht an Prof. Brian MacCraith und seine Arbeitsgruppe im Optical Sensors Laboratory an der Dublin City University in Dublin (Irland), an der ich die Arbeiten mit Antikörpern durchführen durfte. Insbesondere danke ich Helen McEvoy und Scott Spillman für ihre ausgesprochen nette Unterstützung im Labor.

Ich danke allen Projektpartnern des Verbundprojekts „nanoMAP“ (Fkz. 0312001 B), in dessen Rahmen Teile dieser Arbeit entstanden sind, sowie dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Finanzierung dieses Projekts.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) möchte ich für die finanzielle Förderung (Graduiertenstipendium) innerhalb des DFG-Graduiertenkollegs „Quantitative Analyse und Charakterisierung pharmazeutisch und biochemisch relevanter Substanzen“ danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Martin Mehlmann. Durch seine stetige Unterstützung und in unzähligen fruchtbaren Diskussionen inner- und außerhalb der Arbeitszeit hat er mich in meiner Arbeit wesentlich vorangetrieben.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die meine Interessen stets gefördert haben. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Für Martin

Was wir am nötigsten brauchen

Ist ein Mensch

Der uns zwingt

Das zu tun

Was wir können

Ralph Waldo Emerson

(1803 – 1882)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	HINTERGRUND UND MOTIVATION	1
1.2	ZIELSETZUNG UND GLIEDERUNG	3
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	5
2.1	GRUNDLAGEN DER SPEKTROSKOPIE: ABSORPTION UND FLUORESZENZ	5
2.2	PHOTOCHEMIE DER PHOTOLINKER	9
2.2.1	<i>Benzophenone</i>	10
2.2.2	<i>Anthrachinone</i>	15
2.2.3	<i>Phenylazide</i>	16
2.2.4	<i>Diazirine</i>	17
2.2.5	<i>Diazoverbindungen</i>	18
2.3	BIOMOLEKULARE GRUNDLAGEN	19
2.3.1	DNA	19
2.3.1.1	Aufbau und Struktur der DNA	19
2.3.1.2	Amplifikation von DNA: Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.3.2	<i>Antikörper</i>	22
2.3.3	<i>Biomolekulare Wechselwirkung</i>	24
2.4	DNA-MIKROARRAY-TECHNOLOGIE	26
2.4.1	<i>DNA-Chip-Herstellung</i>	26
2.4.2	<i>Probendosierung</i>	28
2.4.3	<i>Oberflächenchemie</i>	31
2.4.4	<i>Detektion</i>	39
2.5	OBERFLÄCHENCHARAKTERISIERUNG	41
2.5.1	<i>Kontaktwinkel</i>	41
2.5.2	<i>Ellipsometrie</i>	42
2.5.3	<i>Atomkraftmikroskopie (AFM)</i>	44
3	EXPERIMENTELLER TEIL	47

3.1	MATERIALIEN.....	47
3.1.1	Chemikalien	47
3.1.2	Pufferlösungen.....	48
3.1.3	Trägermaterialien.....	49
3.2	GERÄTE UND METHODEN	50
3.2.1	Array-Printing.....	50
3.2.2	Oberflächenbehandlung.....	51
3.2.3	Fluoreszenzdetektion und Datenauswertung	51
3.2.4	Oberflächencharakterisierung.....	53
3.2.5	RfFS	54
3.3	SYNTHESEN	55
3.3.1	Synthese von Photolinker-DNA	55
3.3.2	Synthese von Photodextran.....	57
3.3.3	Synthese von Amino-Photodextran	58
3.3.4	Synthese von Biotin-Photodextran	58
3.3.5	Biotinylierung der Antikörper.....	59
3.4	DNA-ARRAYS	59
3.4.1	DNA-Arrays auf Kunststoff-Slides.....	59
3.4.2	DNA-Arrays auf dem NanoWellSlide (NWS)	60
3.4.3	DNA-Arrays auf Glasoberflächen	61
3.5	ANTIKÖRPER-ARRAYS.....	63
3.5.1	Photoimmobilisierung von Antikörpern mit Photodextran.....	63
3.5.2	Immobilisierung biotinylierter Antikörper auf Avidin-Schichten.....	63
3.5.3	Antikörper-Bindungs-Assay	64
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	65
4.1	DIREKTE PHOTOIMMOBILISIERUNG: OPTIMIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG.....	67
4.1.1	Charakterisierung der Photolinker	67
4.1.1.1	Experimentelles Konzept	68
4.1.1.2	Vergleich der Kunststoffsubstrate	70
4.1.1.3	Einfluss der gespotteten DNA-Konzentration.....	72
4.1.1.4	Einfluss der Bestrahlungsdauer	72

4.1.1.5	Vergleich der Photolinker.....	73
4.1.2	<i>Oberflächen-Charakterisierung</i>	75
4.1.2.1	Schichtaufbau: Ellipsometrie	75
4.1.2.2	Topographie: Atomic Force Mikroskopie (AFM)	78
4.2	INDIREKTE PHOTOIMMOBILISIERUNG: PHOTODEXTRAN	82
4.2.1	<i>Photodextrane: Synthese und Anwendungen</i>	83
4.2.1.1	Photodextran	83
4.2.1.2	Amino-Photodextran	84
4.2.1.3	Biotin-Photodextran	85
4.2.2	<i>Charakterisierung des Photodextrans</i>	86
4.2.2.1	Optimierung der DNA-Konzentration	86
4.2.2.2	Optimierung der Photodextran-Konzentration	88
4.2.2.3	Regeneration	91
4.2.3	<i>Methodenvergleich anhand eines DNA-Arrays</i>	92
4.3	VOM PLANAREN MIKROARRAY ZUR MIKROFLUIDISCHEN PLATTFORM: DAS NANOWELLSLIDE (NWS)	98
4.3.1	<i>Das NWS im nanoMAP-Konzept: Modulare Applikations-Plattform</i>	98
4.3.2	<i>Das NWS und seine Komponenten: Entwicklung und Anpassung</i>	99
4.3.2.1	Anforderungen an das NWS.....	99
4.3.2.2	Erstes Testmuster	100
4.3.2.3	Prüfung der Testmuster	101
4.3.2.4	Redesign und endgültiges Format.....	104
4.3.3	<i>Charakterisierung des NWS und der Oberflächenchemie: Kalibration der DNA-Hybridisierung</i>	105
4.3.4	<i>Validierung des NWS: Detektion von PCR-Produkten</i>	108
4.4	EINSATZ DER PHOTOIMMOBILISIERUNG IN DER BIOSENSORIK: REFLEKTOMETRISCHE INTERFERENZSPEKTROSKOPIE (RIFS)	111
4.4.1	<i>Präparation von Topas-Schichten auf Glastransducern</i>	111
4.4.2	<i>RIFS auf Photobiotin-beschichtetem Topas</i>	113
4.4.3	<i>RIFS auf Biotin-Photodextran</i>	114
4.5	PHOTOIMMOBILISIERUNG VON ANTIKÖRPERN	120
4.5.1	<i>Photoimmobilisierung von Antikörpern über Photodextran</i>	121

4.5.2	<i>Immobilisierung biotinylierter Antikörper an Avidin-Schichten</i>	125
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	131
6	LITERATUR	137
7	ANHANG	145
7.1	ABKÜRZUNGEN	145
7.2	NUKLEOTIDSEQUENZEN DER VERWENDETEN DNA-OLIGONUKLEOTIDE	146
7.3	AKADEMISCHE LEHRER	147
7.4	LEBENS LAUF	148

1 Einleitung

1.1 Hintergrund und Motivation

Die biomolekulare Erkennung spielt eine zentrale Rolle in dem weiten und stetig wachsenden Feld der Bioanalytik. Die hochspezifischen Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und Antigenen, zwischen Proteinen und Liganden oder zwischen komplementären DNA-Molekülen werden dafür eingesetzt, ein tieferes Verständnis für die Vorgänge in biologischen Systemen (z. B. Mechanismen zellulärer Signaltransduktion oder Expression, kinetische oder thermodynamische Bindungsstudien) zu erhalten. Daneben werden bioanalytische Untersuchungsmethoden auch für diagnostische Anwendungen eingesetzt.

Ein durch die Affinitätsreaktion zweier Bindungspartner erfolgtes Bindungsereignis kann mit Hilfe verschiedenster Methoden detektiert werden. Sehr verbreitet ist der Einsatz von Biosensoren, die auf dem Prinzip der Kopplung von biomolekularer Erkennung und Signalverarbeitung basieren. Neben elektrochemischen (z. B. Mikroelektroden) und akustischen (z. B. SAW, surface acoustic wave) Methoden werden häufig optische Verfahren angewendet. Hierzu gehören einerseits fluorometrische und colorimetrische Methoden, bei denen die Verfolgung der Bindungsereignisse durch eine „Markierung“ der Moleküle ermöglicht wird, und andererseits markierungsfreie Methoden wie die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR), Interferometrie oder Ellipsometrie. Das Bindungsereignis kann entweder in homogener (flüssiger) Phase stattfinden oder an der Phasengrenze fest/flüssig detektiert werden. Für heterogene Nachweisverfahren, insbesondere für den Einsatz von Biosensoren, ist eine Anbindung von biomolekularen Sonden an die (Sensor-)Oberfläche unumgänglich.

Die Immobilisierung von Biomolekülen auf entsprechende Trägermaterialien ist somit ein entscheidender Arbeitsschritt bei der Herstellung von Probenträgern und Biosensoren. Für eine uneingeschränkte Einsetzbarkeit der immobilisierten Sondenmoleküle ist idealerweise eine stabile und gerichtete Anbindung unter vollständiger Aufrechterhaltung der biomolekularen Funktionen erwünscht. Adsorptive Beschichtungen weisen einen sehr geringen Stabilitätsgrad auf, dennoch werden sie aufgrund ihrer Einfachheit häufig eingesetzt. Dagegen ist eine kovalente Anbindung höchst stabil und die Molekülausrichtung über eine geeignete Synthesplanung steuerbar, allerdings ist der synthetische Aufwand meist sehr hoch. Eine Alternative mittlerer Stabilität bietet die Anbindung von Biomolekülen

über Affinitätsreaktionen; ein prominentes Beispiel ist die Wechselwirkung von Avidin und Biotin.

Die Wahl der Immobilisierungsmethode hängt stark von der Anwendung sowie vom verwendeten Trägermaterial ab. Die traditionell häufigsten Trägermaterialien für biologische Anwendungen sind Glas (SiO_2), Silizium und Metalle (insbesondere Gold). Glas- und oxidierte Silizium-Oberflächen besitzen funktionelle Si-OH-Gruppen und können durch Silanisierung auf einfache Weise chemisch modifiziert werden. Auch auf Goldoberflächen ist eine Anbindung von Molekülen über Thiolgruppen sehr einfach möglich, wobei durch Selbstanordnung (SAM, self-assembled monolayers) eine höchst gerichtete und stabile Schicht gebildet werden kann.

In jüngerer Zeit lässt sich ein starker Trend hin zu Trägermaterialien aus Kunststoffen feststellen. Für spezielle Anwendungen, insbesondere wenn eine strukturierte (dreidimensionale) Oberfläche benötigt wird (z. B. Kavitäten, mikrofluidische Kanäle, etc.), stellen thermoplastische Polymere ein geeignetes Substratmaterial dar, da sie durch Spritzgussverfahren in jede gewünschte Form gebracht werden können, während Glas- und Metallsubstrate aufwendig und kostenintensiv über lithographische Verfahren bearbeitet werden müssten. Auf diese Weise lassen sich schnell und besonders kostengünstig Träger herstellen, die als Einmalartikel ("disposables") in vielen Bereichen der Biochip-Technologie und der Biosensorik Anwendung finden. Zudem lassen sich die chemischen, physikalischen und vor allem die optischen Eigenschaften von Kunststoffen durch die Wahl des geeigneten Materials sowie durch Additive definieren.

Kunststoffoberflächen haben allerdings den Nachteil, dass sie in chemischer Hinsicht vergleichsweise inert sind. Viele Kunststoffe weisen lediglich ein aliphatisches CH-Gerüst ohne funktionelle Gruppen auf; andere Kunststoffe tragen wenig reaktive Gruppen wie Carbonsäureester oder Amidbindungen, die für die Anbindung von Sondenmolekülen ungeeignet sind. Die Immobilisierung von Biomolekülen kann hier zwar durch Adsorption (hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen) an die Substratoberfläche erfolgen, jedoch ist eine definiertere und stabilere kovalente Anbindung wünschenswert, mit der auch dreidimensionale und andere komplexe Oberflächenstrukturen realisiert werden können. Eine Funktionalisierung der Kunststoffoberfläche ist beispielsweise durch Plasmabehandlung möglich, um so funktionelle Gruppen auf der Oberfläche zu generieren, oder durch das Aufdampfen einer Goldschicht, um die Anbindung der Biomoleküle über Thiole zu ermöglichen. Diese Methoden sind jedoch aufwendig und haben eine Veränderung der Kunststoffoberfläche und ihrer physikalischen und optischen Eigenschaften zur Folge.

Eine kovalente Anbindung von Biomolekülen auf Kunststoffsubstraten ist dennoch möglich, greift man auf photochemische Methoden zurück. Dazu werden sog. *Photolinker*

(heterobifunktionelle photoaktivierbare Crosslinker) verwendet, um die Biomoleküle kovalent, parallel und gerichtet auf dem Kunststoffträger zu fixieren. Die Photoreaktion wird durch UV-Bestrahlung ausgelöst, wobei im Wellenlängenbereich oberhalb von 300 nm gearbeitet werden muss, um eine photolytische Zersetzung der Biomoleküle zu vermeiden. Da die Photolinker in einer photoinduzierten, radikalischen Reaktion mit dem Substrat reagieren, ist das Vorhandensein funktioneller Gruppen nicht erforderlich. Aufgrund der Möglichkeit der parallelen Immobilisierung verschiedener Sonden gleichzeitig eignet sich dieses Verfahren hervorragend für die Herstellung von Mikroarrays.

1.2 Zielsetzung und Gliederung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und Optimierung einer geeigneten und angepassten Oberflächenchemie zur Anbindung von Biomolekülen auf Kunststoffträgern, beruhend auf photochemischen Verfahren. Exemplarisch wurden die Untersuchungen an DNA-Oligonukleotiden durchgeführt, da diese synthetisch zugänglich und kommerziell in hoher Reinheit verfügbar sind. Außerdem zeichnet sich die DNA/DNA-Wechselwirkung durch hohe und definierte Spezifität aus. Mit der Herstellung von DNA-Mikroarrays auf Kunststoffträgern sollte gleichzeitig eine spezielle Anwendungsmöglichkeit der entwickelten Oberflächenchemie sowie ihr Potential zur Parallelisierbarkeit aufgezeigt werden.

Zielsetzung

Der Inhalt dieser Arbeit knüpft an erste Voruntersuchungen zur prinzipiellen Durchführbarkeit einer *direkten Photoimmobilisierung* im Rahmen der Diplomarbeit „Parallele photoinduzierte Immobilisierung von DNA-Oligonukleotiden auf Kunststoffträgern zur Herstellung von DNA-Mikroarrays“ [1] an.

Ausgehend von der Möglichkeit, DNA-Oligonukleotide mit Hilfe von Photolinkern gerichtet an Kunststoffoberflächen anzubinden, sollten in der vorliegenden Arbeit die bestehenden Methoden charakterisiert und optimiert, verschiedene Photolinker und Kunststoff-Substrate miteinander verglichen sowie Untersuchungen zur eingesetzten DNA-Konzentration und zur Bestrahlungsdauer durchgeführt werden. Darüber hinaus sollten neue Methoden der Photoimmobilisierung erarbeitet werden, die auf einer *indirekten Photoimmobilisierung* unmodifizierter DNA-Sonden mit Hilfe eines photoaktiven Dextran-Polymers basieren.

Ferner sollten weitere Einsatzmöglichkeiten und Anwendungsbeispiele der Immobilisierungsmethode demonstriert werden. Dabei sollte eine neu entwickelte mikrofluidische Plattform, das NanoWellSlide, zum Einsatz kommen, um das Potential von Kunststoffträgern in der

Bioanalytik zu demonstrieren. Desweiteren sollte die Methode der Photoimmobilisierung auch für biosensorische Applikationen demonstriert werden. Abschließend sollte gezeigt werden, dass die Photoimmobilisierung nicht auf DNA-Oligonukleotide beschränkt ist, sondern auch auf andere Biomoleküle, wie z. B. Antikörper, übertragbar ist.

Gliederung

In einem einführenden *theoretischen Teil* werden die photochemischen und biomolekularen Grundlagen behandelt, die Technologie der DNA-Mikroarrays besprochen sowie Methoden zur Oberflächencharakterisierung eingeführt. Der *experimentelle Teil* beinhaltet neben Material- und Gerätebeschreibungen insbesondere die Synthesen der Photolinker-Konjugate sowie die Durchführung der biomolekularen Bindungs-Assays. Das Kapitel *Ergebnisse und Diskussion* gliedert sich in zwei Hauptteile. Die Abschnitte 4.1 und 4.2 beschreiben die Entwicklung, Charakterisierung und Optimierung zweier Methoden der Photoimmobilisierung, der *direkten* Photoimmobilisierung von Oligonukleotiden einerseits und der *indirekten* Photoimmobilisierung über Photodextrane andererseits. In den darauf folgenden Abschnitten werden beispielhafte Anwendungen der Photoimmobilisierung dargestellt, beginnend mit der Entwicklung und Anwendung des NanoWellSlides (4.3), dem Einsatz der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie RIfS (4.4) und schließlich der Photoimmobilisierung von Antikörpern (4.5).

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Grundlagen der Spektroskopie: Absorption und Fluoreszenz

Absorption

Die relative transmittierte Intensität I_T/I_0 eines monochromatischen Lichtstrahles der eingestrahlten Intensität I_0 nimmt in einer ideal verdünnten Lösung eines absorbierenden Stoffes exponentiell mit seiner Weglänge d (in cm) und der Konzentration c (in mol/l) ab. Das *Lambert-Beer-Gesetz* fasst dies in einen quantitativen Zusammenhang:

$$I_T = I_0 \cdot e^{-\alpha \cdot c \cdot d} = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot d} \quad (1)$$

bzw. für die Extinktion:

$$E = \lg \frac{I_0}{I_T} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (2)$$

wobei α der molare und ε der molare dekadische Extinktionskoeffizient genannt wird. Der Extinktionskoeffizient ist eine stoffspezifische Größe, die naturgemäß stark von der Wellenlänge abhängt, aber auch von anderen Größen wie beispielsweise der Temperatur.

Fluoreszenz

Trifft Strahlung geeigneter Wellenlänge auf ein Molekül, so kann sie absorbiert werden. Unter gewissen Voraussetzungen emittiert dieses Molekül wieder ein Photon gleicher oder geringerer Energie (Rotverschiebung). Man spricht im allgemeinen Fall von Luminiszenz, die sich je nach Natur des Prozesses in Fluoreszenz (10^{-10} bis 10^{-7} s nach Anregung) und Phosphoreszenz ($> 10^{-3}$ s unter Interkombination) unterscheiden lässt. Die Gesamtheit der Vorgänge ist im *Jablonski-Termschema* (Abb. 1) verdeutlicht [2,3].

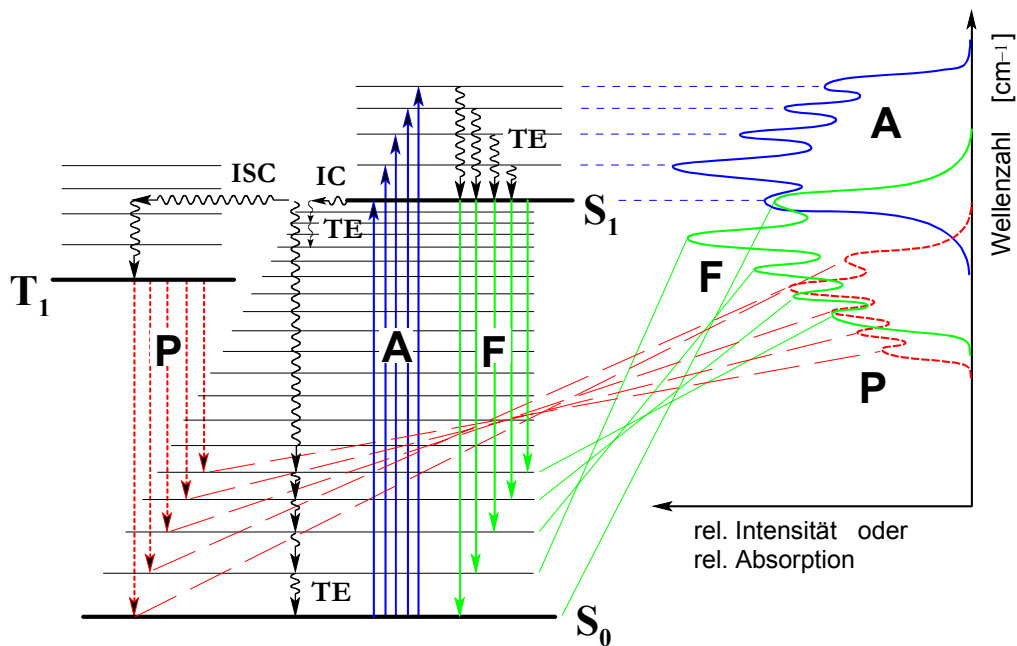


Abb. 1: links: Jablonski-Termschema zur Darstellung von Absorption (A), Fluoreszenz (F) und Phosphoreszenz (P); rechts: resultierende Spektren.

Jablonski-Termschema

Bei Raumtemperatur befinden sich fast alle Moleküle im Schwingungsgrundzustand ($\nu = 0$) des elektronischen Singulett-Grundzustandes (S_0). Durch Absorption elektromagnetischer Strahlung kann ein Molekül in einen höherenergetischen Zustand angeregt werden. Im UV/Vis-Bereich ($\lambda = 200 \dots 700 \text{ nm}$) finden elektronische Übergänge in angeregte Schwingungs- ($\nu' = 1, 2, 3, \dots$) und Rotationszustände¹ ($J = 1, 2, 3, \dots$) eines höheren elektronischen Zustands S_1, S_2 statt (etwa 10^{-15} s). Aus dem angeregten Zustand kann das Molekül schnell (ca. 10^{-12} s) in den Schwingungsgrundzustand des ersten angeregten elektronischen Zustands ($S_1, \nu' = 0$) relaxieren (*vibratorische Relaxation* oder *thermische Equilibration*, TE). Die dabei freiwerdende Energie wird z. B. durch Stöße als Wärmeenergie an die Umgebung abgegeben. Kann diese Relaxation z. B. in Gasen nicht stattfinden, so kann das Molekül die absorbierte Strahlung spontan wieder emittieren, und man spricht von Resonanzfluoreszenz.

Der S_1 -Zustand ist relativ langlebig (etwa 10^{-10} bis 10^{-7} s); von hier aus können verschiedene Prozesse stattfinden:

¹ Die Rotationszustände sind der Übersichtlichkeit halber in Abb. 1 nicht dargestellt.

Strahlungslose Desaktivierung: Unter innerer Umwandlung (internal conversion, IC) kann das Molekül in einen höheren angeregten Schwingungs- und Rotationszustand des elektronischen Grundzustandes S_0 übergehen und durch thermische Equilibrierung in den Schwingungsgrundzustand ($\nu = 0$) relaxieren.

Fluoreszenz: Durch Abgabe elektromagnetischer Strahlung kann das Molekül in verschiedene Schwingungszustände ($\nu = 0, 1, 2, \dots$) des elektronischen Grundzustands S_0 zurückfallen. Die dabei freiwerdende Strahlung ist gegenüber der Anregungsstrahlung rotverschoben, d. h. zu höheren Wellenlängen und niedrigeren Energien (vgl. Abb. 1 rechts).

Photoreaktion: Das elektronisch „aktivierte“ Molekül kann chemische Reaktionen eingehen. Ein Beispiel dafür sind die sog. *Photolinker*, die in Kap. 2.2 beschrieben werden.

Interkombination (intersystem crossing, ISC): Mit geringer Wahrscheinlichkeit, da es sich um einen „verbotenen“ Übergang handelt (Spinumkehr), findet durch innere Umwandlung ein Übergang in den elektronischen Triplett-Zustand T_1 statt. Dieser ist sehr langlebig (bis zu einigen Sekunden), und es können wiederum verschiedene Prozesse stattfinden. Zu den erlaubten Prozessen gehören die strahlungslose Desaktivierung und die Photoreaktion. Es kann jedoch auch der (verbotene) Übergang in den Singulett-Grundzustand unter Emission elektromagnetischer Strahlung stattfinden (*Phosphoreszenz*). Das erhaltene Emissionsspektrum ist dem Fluoreszenzspektrum meist sehr ähnlich, erscheint jedoch gegenüber diesem rotverschoben (vgl. Abb. 1).

Fluorophore

Moleküle, die stark fluoreszierende Eigenschaften besitzen, nennt man Fluorophore. Sie werden häufig in der Bioanalytik eingesetzt, da insbesondere im langwelligen Bereich eine stark reduzierte Hintergrundstrahlung zu erwarten ist (die Rayleighstreuung nimmt reziprok zu λ^4 mit steigender Wellenlänge ab), was besonders empfindliche Messungen erlaubt. Für den Einsatz von Fluorophoren in analytischen Testverfahren sind verschiedene Faktoren ausschlaggebend; dazu zählen neben Stabilitätskriterien wie thermische Stabilität und Lichteinheit auch spektroskopische Faktoren wie Extinktionskoeffizient, Stokes-Shift und Quantenausbeute.

Der *Extinktionskoeffizient* eines Stoffes beschreibt quantitativ seine Fähigkeit, Licht bei einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren. Er erreicht bei geeigneten Fluorophoren Werte von $\epsilon > 50000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Als Beispiel sei der in der Bioanalytik häufig eingesetzte Cyaninfarbstoff Cy5 genannt (Abb. 2). Er besitzt am Absorptionsmaximum ($\lambda = 649 \text{ nm}$) einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten von sogar $\epsilon = 250000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

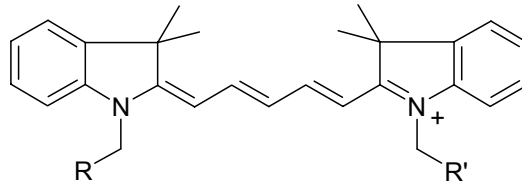


Abb. 2: Fluoreszenzfarbstoff Cy5.

Die Wellenlängendifferenz zwischen Absorptions- und Fluoreszenzmaximum wird durch den *Stokes-Shift* wiedergegeben. Ein großer Stokes-Shift vereinfacht die Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht mit Filtern. Das Emissionsmaximum von Cy5 liegt bei $\lambda = 666 \text{ nm}$, so dass sich ein Stokes-Shift von 17 nm ergibt.

Nicht jedes absorbierte Photon führt jedoch zur Fluoreszenz. Das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Lichtquanten wird durch die *Quantenausbeute* Φ beschrieben, die einen Wert zwischen 0 und 1 annehmen kann. Die Quantenausbeute ist unabhängig von der Wellenlänge der Anregungsstrahlung, da alle beteiligten Prozesse vom niedrigsten Schwingungsniveau des angeregten elektronischen Zustandes ablaufen.

Die *Fluoreszenzintensität* I_F ist direkt proportional zur eingestrahlten Intensität I_0 und zur Quantenausbeute des Fluorophors:

$$I_F \sim \Phi \cdot (I_0 - I_T) = I_0 \cdot \Phi \cdot \left(1 - 10^{-\varepsilon(\lambda_i) \cdot c \cdot d}\right) \quad (3)$$

Mit der Näherung $\varepsilon \cdot c \cdot d \ll 1$ für verdünnte Proben ergibt sich eine direkte Proportionalität der Fluoreszenzintensität zur Konzentration des Fluorophors:

$$I_F \sim I_0 \cdot \Phi \cdot \varepsilon(\lambda_i) \cdot c \cdot d \quad (4)$$

Dieser proportionale Zusammenhang ermöglicht die Konzentrationsbestimmung von Fluorophoren bzw. fluoreszenzmarkierten Molekülen durch Fluoreszenzmessungen.

Obwohl das Fluoreszenzspektrum in seiner Form unabhängig von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichts ist, wird die *Fluoreszenzintensität* durch die eingestrahlte Wellenlänge bestimmt, da der Extinktionskoeffizient des Fluorophors von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichts abhängt. Eine absolute Bestimmung der Fluoreszenzintensität ist allerdings selten möglich, da mit spektroskopischen Methoden lediglich ein kleiner Teil des Fluoreszenzlichts eingefangen und detektiert wird. Daher wird die Fluoreszenzintensität meist in willkürlichen Einheiten (arbitrary units, a.u.) angegeben.

2.2 Photochemie der Photolinker

Photoreaktive Crosslinker (kurz: Photolinker) sind heterobifunktionelle Moleküle, die neben einer chemischen Funktionalität zusätzlich eine photoaktivierbare funktionelle Gruppe besitzen. Diese kann durch Bestrahlung mit Licht, meist im UV-Bereich, zu einer Kopplungsreaktion mit einem Substratmolekül angeregt werden [4]. In typischen thermochemischen Prozessen jedoch ist diese Gruppe vergleichsweise unreaktiv. Diese Eigenschaften machen die Photolinker zu wertvollen Synthesebausteinen im Bereich der Kopplungschemie.

Bekannte photoreaktive Verbindungen, die in der Bioanalytik eingesetzt werden (Abb. 3), sind Benzophenone (a), Anthrachinone (b), Phenylazide (c), Diazirine (d) und bestimmte Diazoverbindungen (e). Diese Verbindungen reagieren über unterschiedliche Reaktionswege und sind daher für verschiedene Substratgruppen und Anwendungen geeignet.

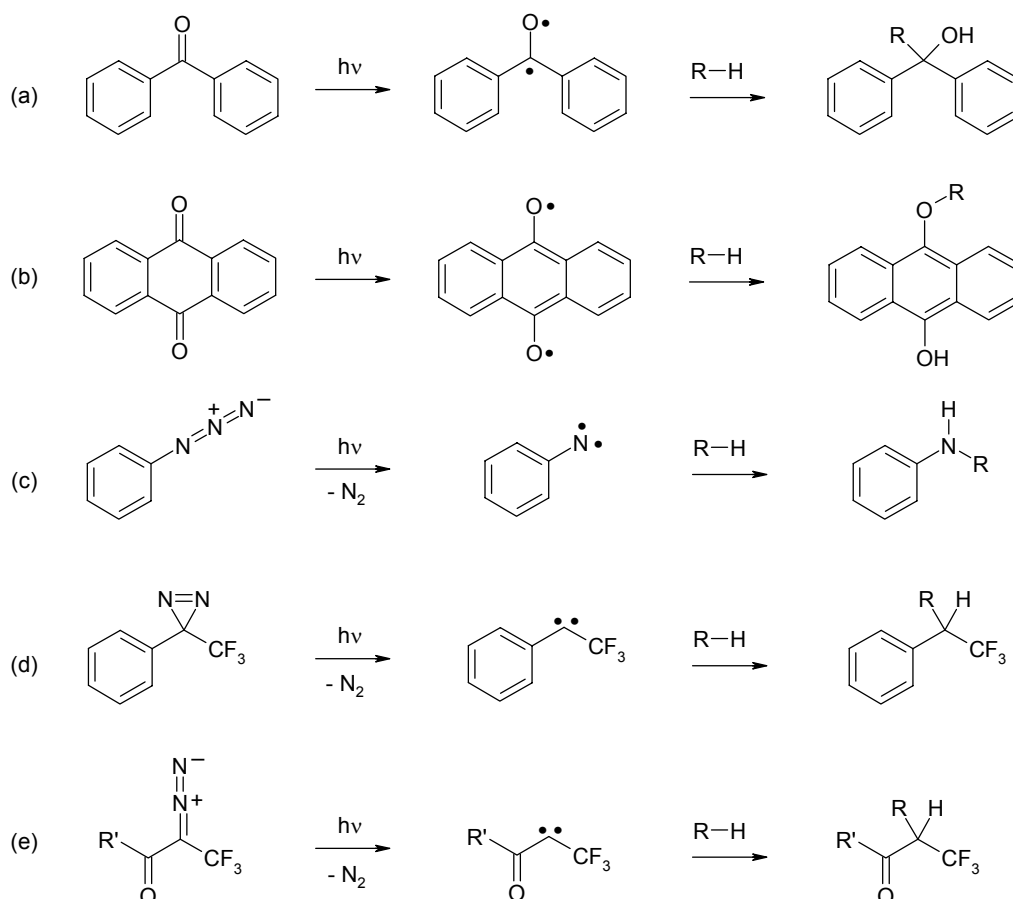


Abb. 3: Übersicht über die Photoreaktionen bekannter Photolinker.

Beispielsweise werden Benzophenone und Anthrachinone durch UV-Bestrahlung in einen diradikalischen Tripletzustand angeregt, der bevorzugt mit aktivierten CH-Gruppen reagiert,

während die bei der Bestrahlung von Phenylaziden entstehenden Nitrene um ein vielfaches reaktiver sind und unspezifisch in die chemischen Bindungen von Substratmolekülen insertieren können. Den Nitreten ähnlich reagieren auch Carbene, die durch Photolyse von Diazirinen oder Diazoverbindungen entstehen. Zu den Insertionsreaktionen der Carbene und Nitrene zählen vor allem die Insertion in CH- und NH-Bindungen und die Addition an Doppelbindungen.

Die einzelnen Photolinker und deren Reaktionen werden im Folgenden ausführlich diskutiert.

2.2.1 Benzophenone

Benzophenonderivate sind synthetisch leicht zugänglich und einfach in der Handhabung. Benzophenon selbst ist im UV-Bereich anregbar; in Ethanol liegt der $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei 333 nm ($\epsilon_{\max} = 148 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und der $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei 252 nm ($\epsilon_{\max} = 17600 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [5].

Photochemische Reaktionen

Die gut untersuchten Mechanismen der Photoreaktion von Benzophenon sind im folgenden Schema dargestellt.

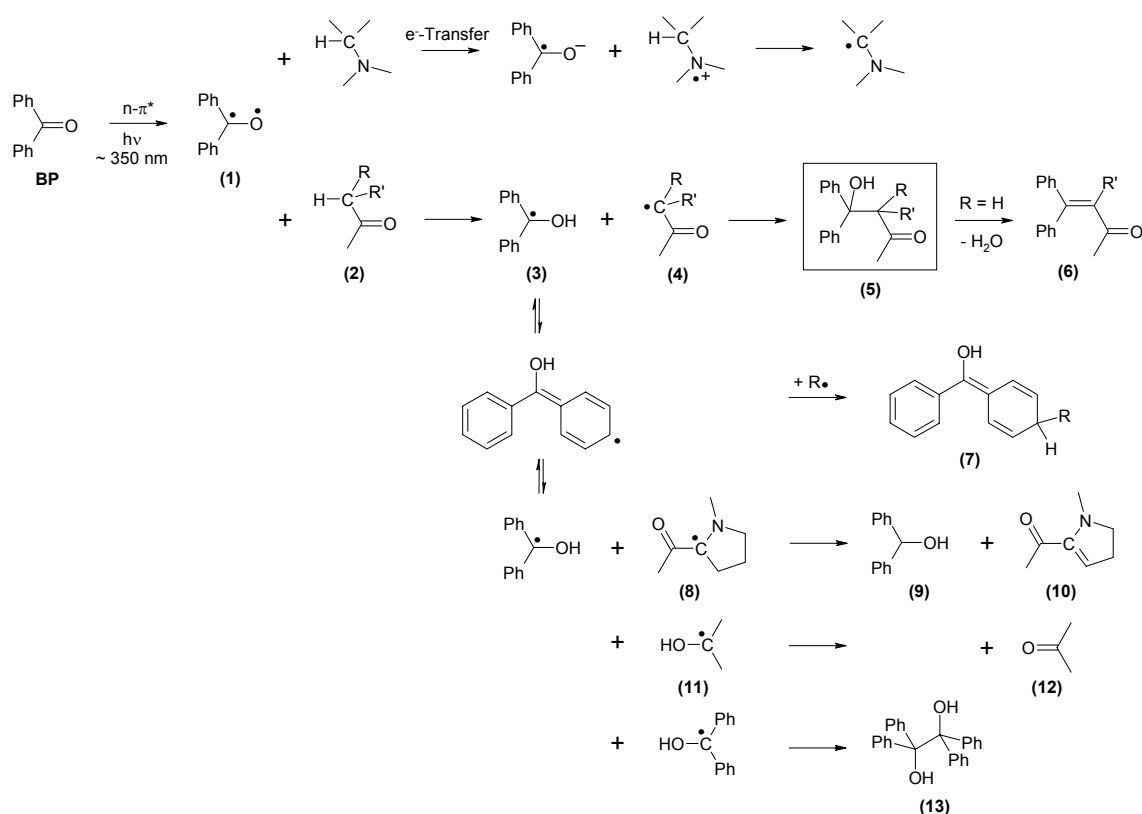


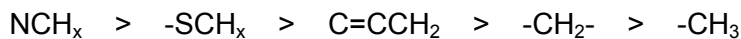
Abb. 4: Reaktionswege der Photoreaktion von Benzophenon (nach [6]).

Bei UV-Bestrahlung mit geeigneter Wellenlänge wird ein Elektron aus einem nichtbindenden sp^2 -ähnlichen n -Orbital des Carbonyl-Sauerstoffatoms in das antibindende π^* -Orbital der Carbonylgruppe angeregt. Im resultierenden diradikalischen Triplett-Zustand (1) besitzt das elektronenarme Sauerstoffatom elektrophilen Charakter und wechselwirkt daher mit schwachen CH- σ -Bindungen (2), was zu einer Wasserstoff-Abspaltung führt, um das halbbesetzte n -Orbital aufzufüllen. Befinden sich Amine oder ähnliche Heteroatome in der Nähe der aktivierten Carbonylgruppe, so findet zunächst eine Elektronenübertragung statt, bevor das Proton der direkt benachbarten Alkylgruppe abgespalten wird und ein Radikal-1,2-Shift auftritt (oberer Reaktionspfad). Die so entstandenen Ketyl(3)- und Alkyl(4)-Radikale können schließlich unter Ausbildung einer neuen C-C-Bindung rekombinieren (5). Neben diesem erwünschten Reaktionsprodukt (in Abb.4 eingerahmt) sind mögliche, meist unerwünschte Nebenreaktionen dargestellt. Hierzu gehören die Weiterreaktion des Produkts zu konjugierten Verbindungen (6), Reduktion des Benzophenons zu Diphenylmethanol (9) durch einen zweiten H-Transfer auf das Ketylradikal unter Dehydrierung bzw. Oxidation des Substratmoleküls (z. B. Prolin (8) zu Dehydroprolin (10) oder eines sekundären Alkohols (11) zum Keton (12)) sowie Dimerisierung zweier Ketylradikale zu einem Benzopinacol (13). Außerdem kann, besonders bei der Laser-Blitzlicht-Photolyse, die Rekombination des

Radikals über die 2- bzw. 4-Position des Phenylrings stattfinden, wodurch farbige Verbindungen (7) entstehen.

Steht für das angeregte Molekül (1) kein H-Donor geeigneter Geometrie zur Verfügung, so relaxiert es wieder zurück in den Grundzustand. Dieser Relaxationsprozess stellt einen der Hauptvorteile dieses Photophors dar. Während die lichtinduzierte Aktivierung anderer photoreaktiver Verbindungen irreversibel ist (z. B. durch Abspaltung von N_2), oder Radikalfänger notwendig sind, um das Ausgangsmolekül zu regenerieren, findet bei Benzophenon eine einfache elektronische Relaxation statt. Hierdurch bleiben die photoaktivierbaren Bindungseigenschaften erhalten, so dass das Molekül viele Male angeregt werden kann, bis sich schließlich ein geeigneter Reaktionspartner findet. Aufgrund dieser Eigenschaft und seiner besonderen Spezifität werden vor allem Benzophenone zur bindungsstellenspezifischen Markierung (site-specific labeling) von Proteinen verwendet [6,7,8].

Ohne Berücksichtigung bevorzugter Orientierungen findet sich folgende Reihenfolge in der Reaktivität von aktiviertem Benzophenon mit CH-Bindungen:



Insertionen in vinyliche oder aromatische CH-Bindungen werden nicht beobachtet.

Einen quantitativen Zusammenhang liefern die Ratenkonstanten der Wasserstoff-Abspaltungsreaktion. Einige repräsentative Werte sind in Tab. 1 zusammengestellt. Die Werte wurden gerundet und besitzen lediglich repräsentativen Charakter, da sie von den Reaktionsbedingungen (Lösungsmittel, Temperatur) abhängig sind.

Substrat	k_r [$10^6 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
R- <u>CH</u> ₃	300
R- <u>CH</u> ₂ -R	70
R ₃ <u>C</u> H	90
Ph- <u>CH</u> ₃	40
<u>CH</u> ₃ OH	30
CH ₃ - <u>CH</u> ₂ -OH	80
(CH ₃) ₂ <u>CH</u> -OH	1

Tab. 1: Ratenkonstanten der H-Abspaltungsreaktion von Benzophenon bei RT [4]. Das jeweils abgespaltene H-Atom ist unterstrichen.

Für biologische Anwendungen ist diese Substratspezifität insofern ein großer Vorteil, als dass Benzophenon nicht mit Wasser reagieren kann, welches die Grundlage biologischer Systeme darstellt und als Lösungsmittel für biologische Untersuchungen dient.

Substituenteneinflüsse

Substituenten an den Phenylgruppen des Benzophenons können die Photochemie maßgeblich beeinflussen. So wird die Wasserstoffabspaltung durch elektronenziehende Gruppen begünstigt, während Elektronendonatoren sowie aromatische und konjugierte Systeme (Delokalisation) eine partielle Verschiebung des elektronischen Übergangs von $n \rightarrow \pi^*$ nach $\pi \rightarrow \pi^*$ verursachen. Der letztere Triplett-Zustand ist wesentlich weniger reaktiv bezüglich der Wasserstoffabspaltung. Die Quantenausbeute Φ variiert von 0,05 bis 0,4 mit höheren Werten für den einfachen $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang.

Eine besondere Reaktion tritt auf, wenn sich Substituenten in 2-Stellung des Phenylringes befinden. Hier kann das entstehende Ketylradikal intramolekular reagieren. Beispielsweise wird ein Ester der 2-Benzoylbenzoesäure unter Ausbildung eines kondensierten Lactonsystems gespalten:

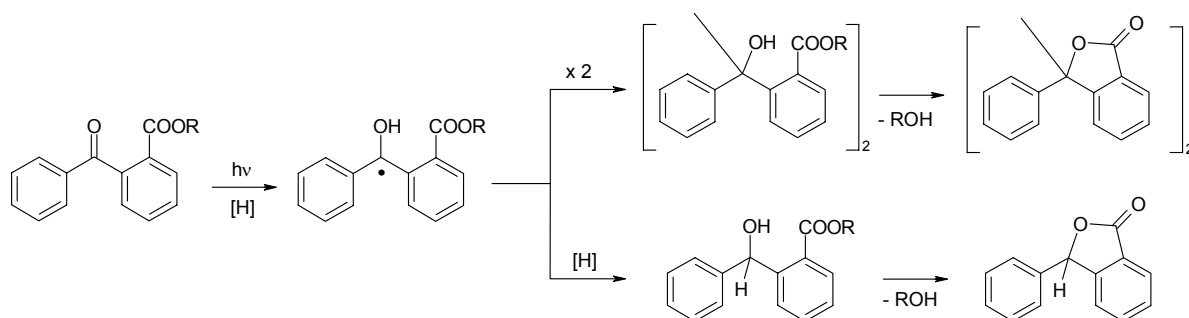


Abb. 5: Photochemische Reaktion von 2-Benzoylbenzoesäureestern [9].

Diesen Reaktionsverlauf macht man sich bei der Verwendung von 2-Benzoylbenzoesäure als photolabile Schutzgruppe für Alkohole und Thiole zunutze.

Reaktion in fester Phase

Ein spezieller Fall liegt vor, wenn die Reaktion nicht in Lösung abläuft, sondern das Benzophenon in fester Phase vorliegt [10]. Hier muss zunächst eine Zwei-Photonen-Anregung stattfinden, bevor die Photoreaktion ablaufen kann. Für ein besseres Verständnis der stattfindenden Prozesse bei der Anregung von Benzophenon muss das Termschema von Benzophenon (Abb. 6) herangezogen werden.

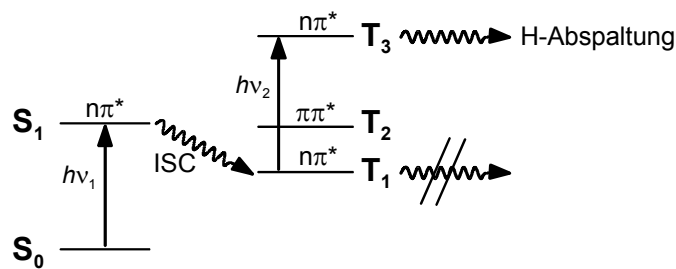


Abb. 6: Termschema von Benzophenon und Zweiphotonenanregung [10].

Bei Anregung mit elektromagnetischer Strahlung findet zunächst ein $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang ($\lambda = 338 \text{ nm}$) in den niedrigsten angeregten Singulettzustand S_1 statt. Dieser Zustand wird sehr schnell unter Interkombination (intersystem crossing, ISC, vgl. Kap. 2.1) in einen Triplettzustand T_1 umgewandelt; die Quantenausbeute dieser Umwandlung liegt nahezu bei 1 (Benzophenon zeigt keine Fluoreszenz). In Lösung kann aus diesem Triplettzustand Wasserstoff abgespalten werden, in fester Phase wird dies jedoch nicht beobachtet. Die Lebensdauer des T_1 -Zustands liegt bei etwa 10 ms, und in fester Phase ist die Beweglichkeit der Moleküle zu gering, als dass das angeregte Diradikal mit einem Bindungspartner wechselwirken kann, bevor es zurück in den Grundzustand relaxiert (Phosphoreszenz). Hierzu muss das Molekül erst in einen höheren Triplettzustand T_3 angeregt werden ($\lambda = 317 \text{ nm}$), aus dem nun irreversible Photochemie stattfinden kann. Um die Photoreaktion des Benzophenons in fester Phase auszulösen, ist demnach eine hohe Strahlungsintensität erforderlich.

Die Tatsache, dass die Diffusion bei irreversiblen photochemischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt, wird durch verschiedene Untersuchungen belegt, bei denen die Temperaturabhängigkeit der Photoreaktion von Benzophenon in festen Matrices (Ethanol-Glas, PMMA, PVA, PC, PS) untersucht wurde [10,11]. Dabei weist vor allem die Änderung der Reaktionskinetik von einer einfachen Exponentialfunktion bei niedrigen Temperaturen zu einem nicht-exponentiellen Zusammenhang oberhalb der Glas temperatur auf diesen Zusammenhang hin. Auch physiologische Matrices haben einen Einfluss auf die Kinetik der Photoreaktion, wie anhand von Ionenkanälen untersucht wurde [12].

Sauerstoff

Ein weiterer Faktor, der die Photoreaktion beeinflussen kann, ist die Anwesenheit von Sauerstoff. Der diradikalisch vorliegende Sauerstoff liegt in einem Triplett-Grundzustand vor und kann die Relaxation ($T \rightarrow S$ -Übergang) des Benzophenons beschleunigen, so dass die Photoreaktion unterbunden wird. Für genaue Untersuchungen der Photochemie des Benzophenons ist daher der Ausschluss von Sauerstoff unerlässlich.

2.2.2 Anthrachinone

Anthrachinon besitzt ein chinoides System und kann daher schon im sichtbaren Bereich angeregt werden. Die Absorptionsbanden liegen in Cyclohexan bei 370 – 420 nm (breite Feinstrukturbande mit $\epsilon_{\max} = 110 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 321 nm ($\epsilon_{\max} = 4800 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und 251 nm ($\epsilon_{\max} = 54000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [5]. Die Photochemie des Anthrachinons erscheint in seiner Diradikalbildung zunächst ähnlich der des Benzophenons, zeigt jedoch entscheidende Unterschiede.

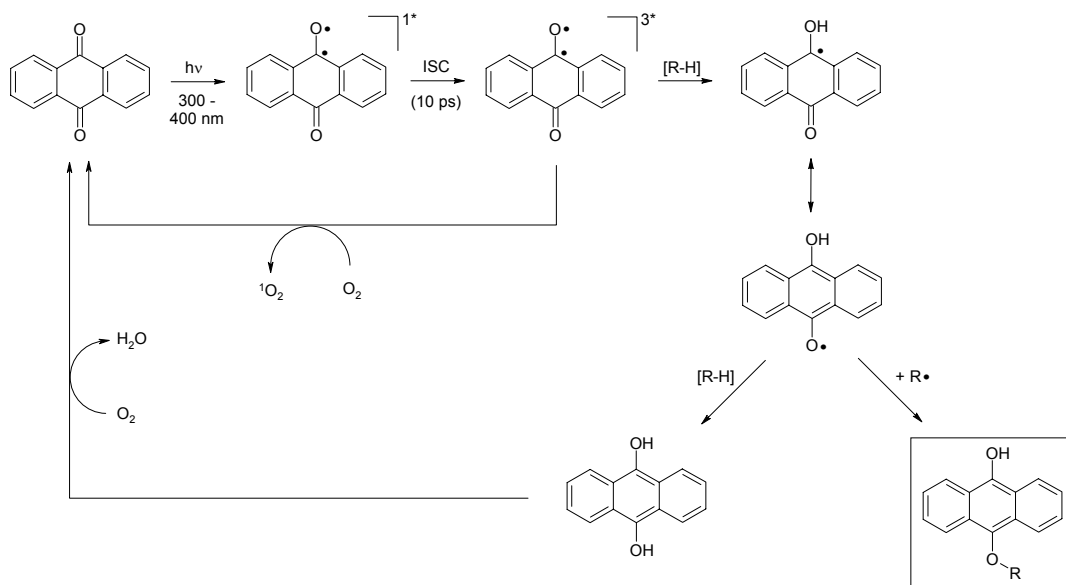


Abb. 7: Reaktionswege der Photoreaktion von Anthrachinon [13].

Die Anregung führt zunächst in einen angeregten Singulettzustand S_1 (in Abb. 7 mit 1^* bezeichnet), der sehr schnell über Interkombination (ISC) in einen Triplettzustand T_1 (3^*) relaxiert. Aus diesem Triplettzustand findet nun die Photoreaktion statt, beginnend mit einer Wasserstoffübertragung vom Substratmolekül auf das Anthrachinonmolekül. Das Anthrachinonradikal ist mesomeriestabilisiert und kann nun mit dem Substratradikal unter Ausbildung einer neuen kovalenten Bindung rekombinieren (erwünschtes Produkt, in Abb. 7 eingerahmt), oder aber unter Abspaltung eines weiteren Wasserstoffatoms aus dem Substrat zum Anthrahydrochinon reduziert werden (unerwünschtes Nebenprodukt). Natürlich finden ähnlich dem Benzophenon weitere Nebenreaktionen statt, die hier aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt sind.

Vergleich zu Benzophenon

Im Vergleich zu Benzophenon treten beim Anthrachinon verschiedene Unterschiede auf. Ist z. B. bei der Photoreaktion Sauerstoff anwesend, so hat dieser zwar die gleiche desaktivierende Wirkung auf den Triplettzustand des angeregten Anthrachinons wie beim Benzophenon, jedoch findet zusätzlich eine Regenerierung des als unerwünschtes Nebenprodukt entstandenen Anthrahydrochinon statt, indem dieses durch Sauerstoff wieder zurück zum Anthrachinon oxidiert wird.

Die gebildeten kovalenten Bindungen sind in ihren chemischen Eigenschaften und ihrer Stabilität verschieden. Bei der Photoreaktion des Anthrachinons bildet sich ein Arylether, während beim Benzophenon ein tertiärer Alkohol entsteht.

Wie bereits oben erwähnt findet bei Anthrachinonderivaten im Bereich von 300 – 400 nm (einem Bereich, in dem keine Schädigung des biologischen Materials auftritt) eine wesentlich stärkere Absorption statt als bei Benzophenonderivaten. Die Ausbeuten der Photoreaktion dürften damit beträchtlich höher sein.

Die photochemische Inertheit gegenüber Wasser und der Einfluss von Substituenten auf das photochemische Verhalten entsprechen denen des Benzophenons. Anthrachinon ist damit ebenfalls ein für biologische Systeme gut geeignetes Crosslinking-Reagenz.

2.2.3 Phenylazide

Phenylazide (oder allgemein Arylazide) sind zwar synthetisch nicht so leicht zugänglich und weniger gut handhabbar wie Benzophenon- oder Anthrachinonderivate, da sie bei Erhitzen explosionsfähig und an Luft nicht lange stabil sind, sie stellen jedoch die allgemein gebräuchlichste Form photosensitiver Verbindungen dar.

Phenylazide benötigen UV-Anregung im Bereich von etwa 250 nm, was in biologischen Proben zu irreversiblen Strahlungsschäden führen würde. Um dies zu umgehen, werden für die Anwendung auf biologische Komponenten Nitrophenylazide verwendet, die bei Wellenlängen um 350 nm angeregt werden können [14].

Bei Photoaktivierung wird unter Stickstoffabspaltung ein hochreaktives Nitren gebildet, welches schnell mit der chemischen Umgebung reagiert [4]. Das entstehende Nitren besitzt ein Elektronensextett und ist aufgrund seines Elektronendefizits sehr reaktiv. Es insertiert unspezifisch in chemische Bindungen, bevorzugt in aktive CH- und NH-Bindungen. Außerdem kann eine Addition an Doppelbindungen stattfinden.

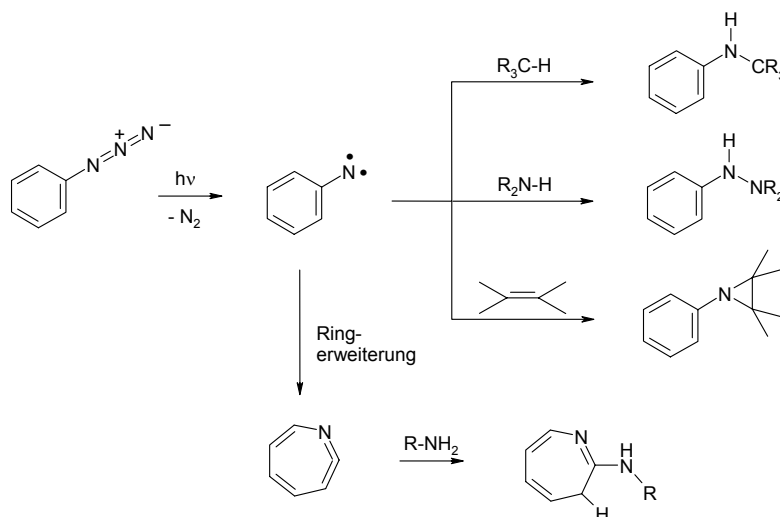


Abb. 8: Photoreaktion von Phenylaziden.

Es ist zahlreich belegt, dass Phenylnitren-Zwischenstufen eine Ringerweiterungsreaktion durchlaufen können (vgl. Abb. 8) [15]. Das entstehende Dehydroazepin reagiert bevorzugt mit Nucleophilen, insbesondere mit Aminen, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit wesentlich geringer ist als beim reaktiven Nitren [16]. Diese meist ungewollte Ringerweiterungsreaktion kann durch Verwendung von perfluorierten Phenylaziden unterbunden werden. Durch Substitution der phenylischen H-Atome mit Fluor wird die Aktivierungsenergie der Ringerweiterungsreaktion erhöht und damit die Effizienz der Nitreninsertion gesteigert. Perfluorierte Phenylazide sind jedoch nur schwer zugänglich.

2.2.4 Diazirine

Diazirine sind synthetisch schwer zugänglich und kommerziell nur selten verfügbar. Sie sind jedoch leichter handhabbar als Azide, da sie unter normalen Laborbedingungen gelagert und verarbeitet werden können (Lichtschutzmaßnahmen sind aufgrund geringer Extinktionskoeffizienten nicht notwendig) [14].

Diazirine können bei 350 nm angeregt werden und bilden dabei unter Stickstoffabspaltung hochreaktive Carben-Zwischenstufen, die wie die Nitrene bevorzugt Insertionsreaktionen in CH- und NH-Bindungen und Additionen an Doppelbindungen eingehen. Insertionen in CC- oder SH-Bindungen wurden ebenfalls beobachtet.

Insbesondere bei den 3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirinen kann dabei zunächst eine Umlagerung in ein lineares Diazo-Derivat stattfinden, welches seinerseits durch Photolyse Stickstoff abspaltet und zum Carben weiterreagiert [4] (vgl. Abb. 9).

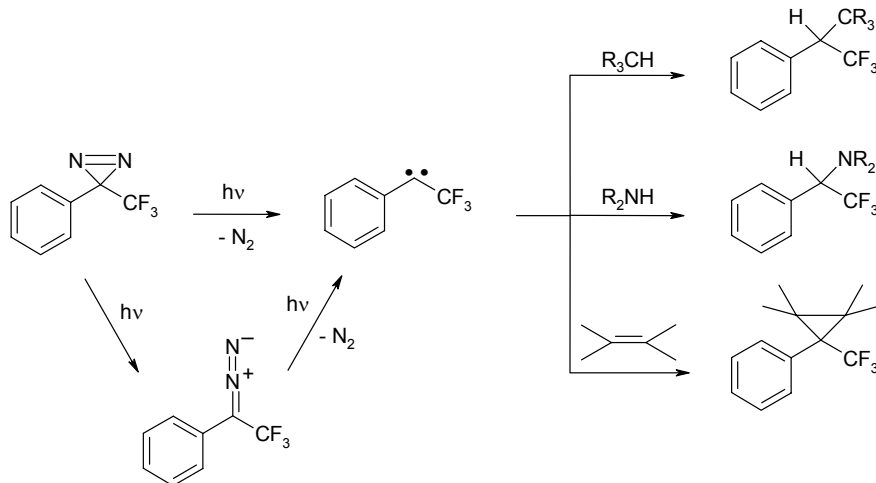


Abb. 9: Photoreaktion von Diazirinen.

Stehen dem reaktiven Carben keine geeigneten Substratmoleküle zur Verfügung, so reagiert es mit jeder anderen ihm zur Verfügung stehenden Spezies, einschließlich Wasser. Die Crosslinking-Effizienz bleibt demnach vergleichsweise niedrig, solange für die Photoaktivierung kein Kontakt zwischen Photolinker und Substrat hergestellt wird. Eine Möglichkeit besteht in der Entfernung des Lösungsmittels vor Bestrahlung der Probe [14].

2.2.5 Diazoverbindungen

Bestimmte Diazoverbindungen, wie z. B. das in Abb. 3 dargestellte trifluormethylsubstituierte Diazoketon, können bei Bestrahlung ($\lambda \approx 350$ nm) Stickstoff abspalten und hochreaktive Carbene bilden, ähnlich wie die Diazirine (vgl. Kap. 2.2.4). Aufgrund ihrer Reaktivität sind Diazoverbindungen jedoch weniger für das Photo-Crosslinking geeignet.

Eine spezielle Form photoreaktiver Diazoverbindungen stellen Diazopyruvate dar. Sie besitzen einen einzigartigen Kopplungsmechanismus, müssen jedoch mit Wellenlängen um 300 nm angeregt werden. Das bei Stickstoffabspaltung entstehende Ketocarbon lagert sich zu einem Keten um (Wolff-Umlagerung), welches mit Nucleophilen wie z. B. Aminen unter Ausbildung einer Amidbindung weiterreagiert:

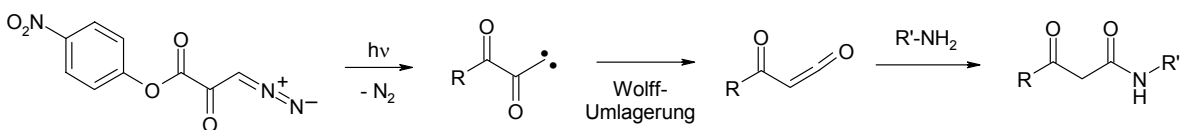


Abb. 10: Photoreaktion von Diazopyruvaten [4].

2.3 Biomolekulare Grundlagen

2.3.1 DNA

2.3.1.1 Aufbau und Struktur der DNA

Jede Zelle unseres Körpers enthält in ihrem Zellkern eine Kopie unserer Erbinformation. Diese Information ist in Form eines biomolekularen Polymers, der Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid, DNA), gespeichert. Zelluläre DNA-Moleküle können aus mehreren Millionen Monomeren bestehen. Neben der DNA kommt noch eine niedermolekulare Variante der Nukleinsäure, die Ribonukleinsäure (RNA), vor, die in der Regel aus hunderten bis tausenden Monomeren besteht. Die RNA spielt bei der Transkription und Translation der DNA in Proteine eine Rolle.

Die Grundbausteine der DNA sind die Nukleotide. Sie bestehen aus einer Pentose, der Desoxyribose, die in 5'-Position mit einem Phosphatrest verestert ist, und einer heterocyclischen Base, die die Hydroxylgruppe der Ribose in 1'-Position ersetzt (Abb. 11).

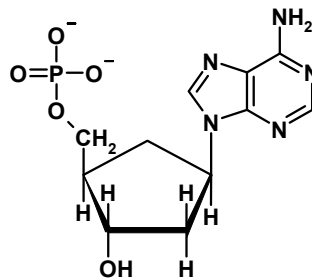


Abb. 11: Chemische Struktur eines Nukleotids, dem Grundbaustein der DNA
(hier: Adenosinmonophosphat, AMP).

Die natürlich vorkommende DNA besteht aus vier verschiedenen Nukleotiden, die sich allein in der Nukleinbase unterscheiden. In Abb. 12 sind die chemischen Strukturen der Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) sowie der Pyrimidinbasen Cytosin (C) und Thymin (T) gezeigt. Die ebenfalls dargestellte Nukleinbase Uracil (U) kommt lediglich in der körpereigenen RNA (Ribonukleinsäure) vor und ersetzt dort das Thymin.

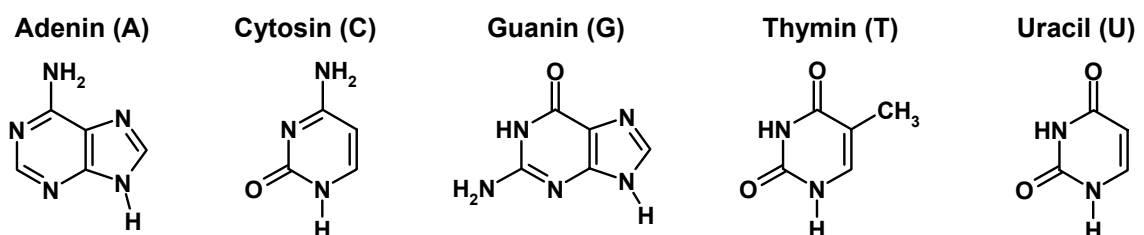


Abb. 12: Chemische Strukturen der Nukleinbasen.

Die einzelnen Nukleotide sind in der DNA über Phosphatester an der 3'-Position der Desoxyribose zu einer Nukleinsäurekette verküpft. Jeweils zwei dieser DNA-Ketten bilden einen DNA-Doppelstrang, in dem die Zucker-Phosphat-Stränge das Rückgrat bilden und die Nukleinbasen nach innen gerichtet sind. Der Doppelstrang wird über Wasserstoffbrücken zusammengehalten, die zwischen jeweils einer Purinbase auf der einen Seite und einer Pyrimidinbase auf der anderen Seite gebildet werden. Die beiden DNA-Stränge sind gegenläufig, d. h. das 3'-Ende des einen Strangs fällt mit dem 5'-Ende des Gegenstrangs zusammen.

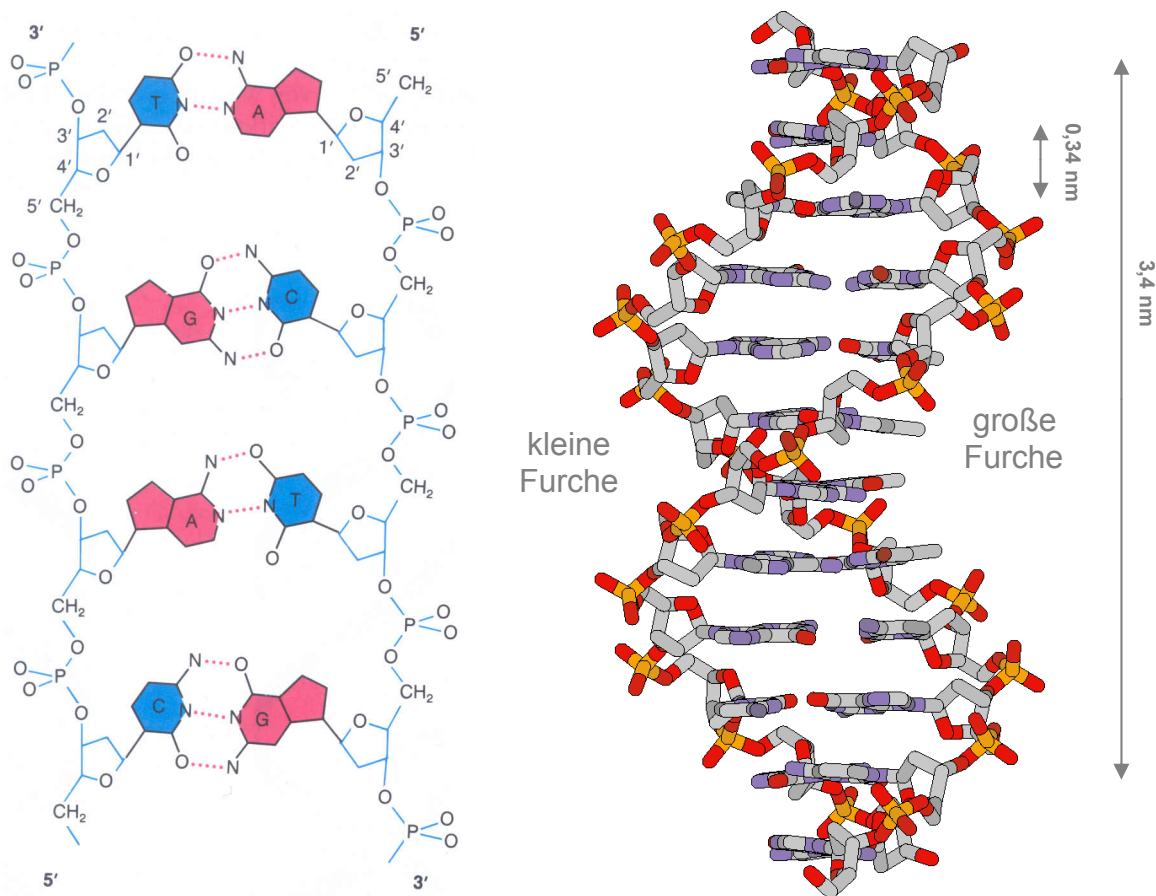


Abb. 13: Zwei Darstellungen der DNA-Doppelhelix. In der entwundenen Struktur (links) erkennt man das Zucker-Phosphat-Rückgrat und die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen (aus [17]). Die rechte Abbildung zeigt den Ausschnitt einer 360°-Windung der Doppelhelix mit großer und kleiner Furche.

Bei der Doppelstrang-Bildung treten aufgrund ihrer chemischen Konstitution nur ganz bestimmte Basenpaarungen auf, nämlich A und T, die zwei Wasserstoffbrücken-Bindungen ausbilden können, sowie C und G mit drei Wasserstoffbrücken (vgl. Abb. 13 links). Diese Basen-Komplementarität ist für biochemische Prozesse von entscheidender Bedeutung und wird in der Bioanalytik ausgenutzt, indem komplementäre und nicht-komplementäre DNA-Stränge über ihre Bindungsaffinität unterschieden werden können.

Der DNA-Doppelstrang besitzt eine ausgeprägte Sekundärstruktur. Die Polynukleotidstränge sind in einer schraubenförmigen Anordnung umeinander gewunden, so dass man auch von einer Doppelhelix spricht. Diese räumliche Anordnung wurde bereits 1953 von Watson und Crick postuliert [18] und ist in Abb. 13 rechts dargestellt. Die benachbarten Basen eines jeden Stranges liegen dabei dicht übereinander gestapelt in parallelen Ebenen in einem Abstand von 0,34 nm. Eine volle 360°-Windung der Doppelhelix besteht aus 10 Basenpaaren und beträgt somit 3,4 nm.

2.3.1.2 Amplifikation von DNA: Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die komplementäre Struktur des DNA-Doppelstrangs lässt sich für die Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA nach dem biologischen Vorbild der Replikation ausnutzen. Dabei wird ein DNA-Einzelstrang (oder ein denaturierter Doppelstrang) als Matrize verwendet, an den der komplementäre Gegenstrang mit Hilfe des Enzyms Polymerase aus einzelnen Nucleotiden synthetisiert wird. Diese werden als Nucleosidtriphosphate eingesetzt, die durch Abspaltung der Phosphatreste in Monophosphate umgewandelt werden und so die für die Synthese notwendige Bindungsenergie liefern.

Voraussetzung für die PCR ist ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende als Ansatzpunkt für die Polymerase. Dieser Abschnitt wird künstlich geschaffen, indem man dem Reaktionsansatz DNA-Fragmente, sog. *Primer* von ca. 20 Nucleotiden Länge, hinzufügt. Diese binden an den zu amplifizierenden Einzelstrang (*Annealing*) und können nun von der Polymerase verlängert werden (*Extension*). Anschließend wird der entstandene Doppelstrang durch Temperaturerhöhung in seine Einzelstränge gespalten (*Denaturierung*), und der Zyklus kann von neuem beginnen. Gibt man in den PCR-Ansatz zwei Arten von Primern, von denen einer an den Matrizenstrang und der andere an den Gegenstrang binden kann, so wird bei jedem Zyklus der zwischen den beiden Primern befindliche DNA-Abschnitt verdoppelt, so dass die PCR zu einer exponentiellen Amplifikation führt. Verwendet man darüber hinaus temperaturstabile DNA-Polymerase, wie man sie aus Organismen kennt, die in heißen Quellen leben (Taq-Polymerase), so ist es möglich, die Reaktion ohne Unterbrechung ablaufen zu lassen [19].

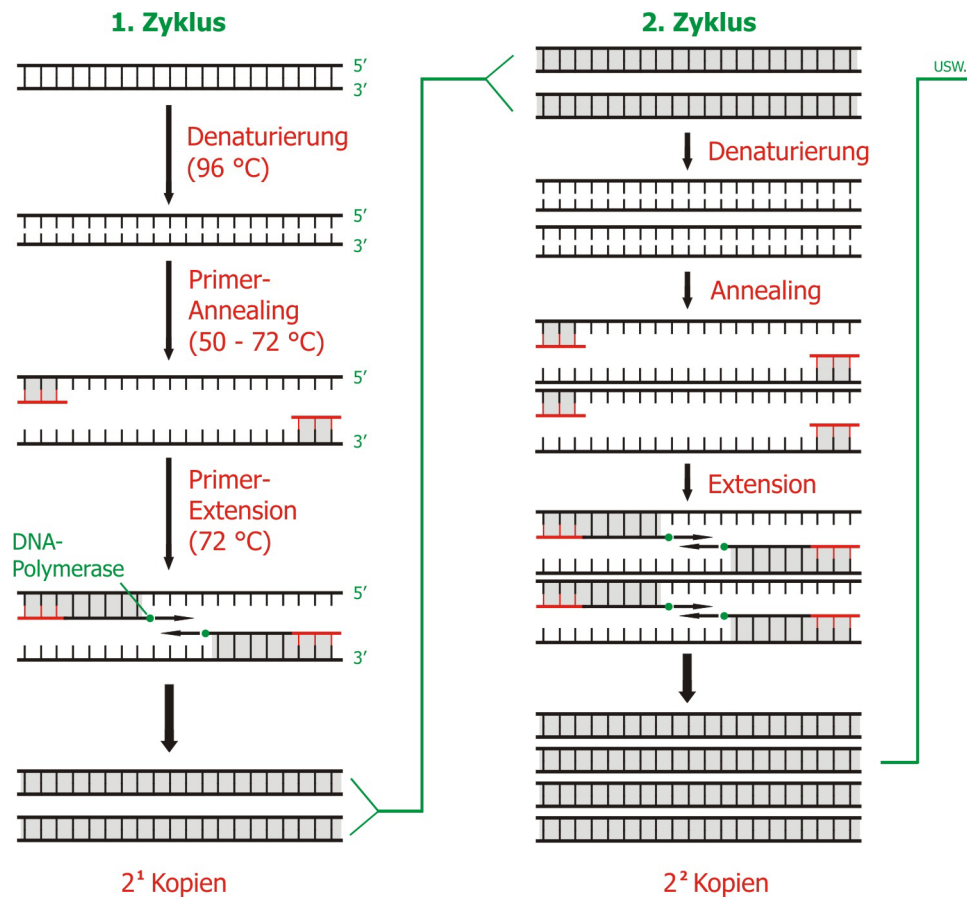


Abb. 14: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Theoretisch können mit Hilfe der PCR aus einem einzelnen DNA-Abschnitt unter optimalen Bedingungen binnen weniger Stunden bis zu 10^{12} identische Moleküle erzeugt werden, die dann einem diagnostischen Nachweis oder anderen analytischen Methoden zur Verfügung stehen. Für die meisten Anwendungen liegt jedoch nach 30 – 40 Zyklen ausreichend Produkt zur weiteren Analyse vor. Da jeder amplifizierte DNA-Strang ein Primer-Oligonukleotid enthält, eröffnet sich die einzigartige Möglichkeit, durch Verwendung modifizierter Primer (z. B. mit Biotin oder Fluoreszenzmarkern) die PCR-Produkte mit einer für die Aufreinigung bzw. Detektion geeigneten Markierung zu erhalten.

2.3.2 Antikörper

Antikörper sind Proteine, die vom Immunsystem der Wirbeltiere zur Infektionsabwehr gebildet werden. Sie spielen damit eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung makromolekularer Fremdstoffen (Antigene) im Körper. Sie sind einzigartig unter den Proteinen, da sie jeweils eine hohe Spezifität gegenüber dem Antigen aufweisen. Dies macht sie zu wirkungsvollen Werkzeugen in der biomolekularen Analytik.

Antikörper, die in ihrer Gesamtheit und als Stoffklasse auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet werden, sind eine der Haupt-Proteinkomponenten des Blutes und machen etwa 20% (m/m) aller Plasmaproteine aus [20].

Die einfachsten Antikörper-Moleküle sind Y-förmige Strukturen mit zwei identischen Antigen-Bindungsstellen. Die Grundstruktur eines Antikörpermoleküls enthält vier Polypeptidketten, zwei identische leichte Ketten (L-Ketten) aus jeweils ca. 220 Aminosäuren und zwei identische schwere Ketten (H-Ketten) aus jeweils ca. 450-600 Aminosäuren. Diese vier Ketten werden sowohl durch nicht-kovalente Wechselwirkungen als auch über kovalente Bindungen (Disulfid-Brücken) zusammengehalten.

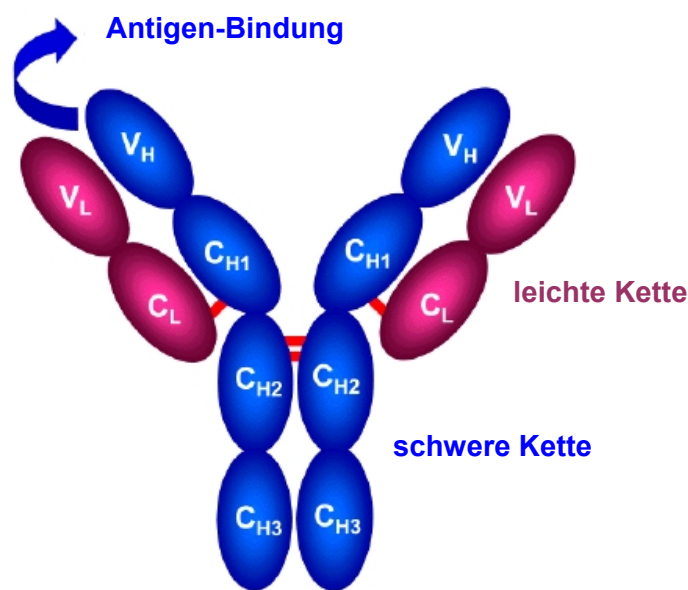


Abb. 15: Struktur eines IgG Antikörpers.

Sowohl die H- als auch die L-Ketten beinhalten so genannte variable (V) und konstante (C) Regionen. An den N-terminalen Enden von leichter und schwerer Kette, den variablen Domänen, befinden sich die Antigen-Bindungsstellen. In jeder V-Region gibt es drei Bereiche mit hypervariabler Aminosäuresequenz (complementarity determining regions, CDR) [21]. Diese sechs CDRs, die aus ca. 50 Aminosäuren bestehen, bilden die Region des Antikörpers, an welcher das Antigen gebunden wird (Paratop). Der entsprechend komplementäre Bereich des Antigens, die spezifisch durch das Paratop erkannt wird, heißt antigene Determinante oder Epitop.

Es gibt fünf verschiedene Klassen von Antikörpern: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, die sich im Wesentlichen durch die H-Ketten unterscheiden (α , β , γ , ϵ und μ). Die Hauptklasse der Immunglobuline sind die IgG-Antikörper. Sie werden während der sekundären Immunantwort massenweise produziert. Es sind die einzigen Antikörper, die über die Plazenta von der

Mutter auf den Fötus übertragen werden. Einige Eigenschaften der wichtigsten Antikörperklassen sind in Tab. 2 aufgeführt.

	Antikörperklasse				
	IgM	IgD	IgG	IgA	IgE
H-Kette	μ	δ	γ	α	ϵ
L-Kette	κ oder λ	κ oder λ	κ oder λ	κ oder λ	κ oder λ
Zahl der 4 Ketten Einheiten	5	1	1	1 oder 2	1
Anteil am Gesamt-Ig im Blut	10 %	< 1 %	75 %	15 %	< 1 %
Molekulargewicht	950 kDa	180 kDa	150 kDa	160 kDa	190 kDa

Tab. 2: Eigenschaften verschiedener Antikörper-Klassen.

2.3.3 Biomolekulare Wechselwirkung

Biochemische Makromoleküle (Proteine, Nucleinsäuren) können in bestimmten Regionen des Moleküls, der Bindungsstelle oder Bindungstasche, makro- oder niedermolekulare Moleküle binden. Die Gleichgewichtskonstanten der Bildung eines solchen Komplexes sind häufig sehr hoch. Weitere besondere Kennzeichen sind die Selektivität und die Reversibilität dieser Wechselwirkung. Verantwortlich dafür ist eine nicht-kovalente Bindung zwischen den Biomolekülen, die durch unterschiedlich starke, attraktive Kräfte zustande kommt (Tab. 3).

	Abstandsabhängigkeit	Bindungsstärke	
		im Vakuum	in Wasser
elektrostatische Wechselwirkung	$\sim r^{-2}$	340 kJ/mol	12,5 kJ/mol
Wasserstoffbrücken-Bindung	$\sim r^{-6}$	17 kJ/mol	4 kJ/mol
van-der-Waals-Wechselwirkung	$\sim r^{-10}$	0,4 kJ/mol	0,4 kJ/mol
hydrophobe Wechselwirkung	(keine diskrete Abhängigkeit)	–	–

Tab. 3: Attraktionskräfte biomolekularer Wechselwirkung (nach [20]).

Abgesehen von den elektrostatischen oder Coulomb-Kräften ($\sim r^{-2}$) zeigen alle Attraktionskräfte eine sehr starke Abhängigkeit vom Abstand r der wechselwirkenden Zentren. Eine effektive Wechselwirkung findet daher nur über eine Distanz von maximal 0,1 – 0,3 nm statt. Daneben sind auch repulsive Kräfte zu berücksichtigen, da zur Durchdringung der Elektronenhüllen der beteiligten Moleküle eine Anregung in unbesetzte Orbitale notwendig ist (Pauli-Prinzip). Die Repulsionskräfte hängen mit ca. r^{-9} bis r^{-12} noch sehr viel stärker als die attraktiven Kräfte von der Distanz ab. Die Bindung von Biomolekülen setzt daher komplementäre Raumstrukturen der Wechselwirkungsflächen voraus, um gleichzeitig attraktive Kräfte zu maximieren und repulsive zu minimieren. Die Abhängigkeit der Bindungsenergie von der Raumstruktur der Biomoleküle ist die Grundlage für die Selektivität biomolekularer Erkennung.

Die hohe Affinität der Wechselwirkung und die damit verbundene hohe Bindungsenergie kommt durch den kumulativen Beitrag solcher attraktiver Kräfte über die gesamte Wechselwirkungsfläche zustande. Wesentliche Beiträge zur Gesamt-Bindungsenergie liefern dabei Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen. Die Wasserstoffbrückenbindung, bei welcher sich die Elektronenpaare zweier elektronegativer Atome ein Proton teilen, spielt bei der inter- und intramolekularen Wechselwirkung von biologischen Makromolekülen eine zentrale Rolle [22]. Der große Einfluss der hydrophoben Wechselwirkung wird mit dem Entropiegewinn durch Verlust der Orientierung der Wassermoleküle, die aus der Bindungstasche verdrängt werden, erklärt und kann bis zu 50 % der freien Energie der Bindung beitragen.

Beispielsweise bei der Wechselwirkung komplementärer DNA-Stränge (Hybridisierung) tragen die verschiedenen Bindungsarten mit unterschiedlichen Beiträgen zur Bildung des Doppelstrangs bei. Die Ausbildung der Doppelhelix wird im Wesentlichen durch van-der-Waals-Bindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den übereinander angeordneten Basenpaaren stabilisiert. Dahingegen spielen für die Ausbildung der Basenpaarungen die Wasserstoffbrückenbindungen eine zentrale Rolle (vgl. Kap. 2.3.1.1), so dass eine einzige Basenfehlstelle bereits die Ausbildung des Doppelstrangs stören und die Bindungsenergie je nach Art der Fehlstelle um einen wesentlichen Beitrag absenken kann.

Durch die nicht-kovalenten Attraktionskräfte ist die Bindungsenergie der Wechselwirkungen von den dielektrischen Eigenschaften des Umgebungsmediums abhängig. Typischerweise handelt es sich dabei um wässrige Lösungen mit hoher relativer Dielektrizitätszahl (ca. 80). Dadurch werden Ladungen und Dipole stark abgeschirmt und die Netto-Bindungsenergie der Wechselwirkung solcher Zentren verringert. So sinkt die Bindungsenergie einer ionischen Bindung auf unter 5 % im Vergleich zur Bindungsenergie im Vakuum, die einer

Wasserstoffbrückenbindung auf unter 25 % (vgl. Tab. 3). Dagegen führt die ausgeprägte Orientierung von Wassermolekülen verstärkt zu entropischer Stabilisierung der Komplexe [23]. Tragen insbesondere Coulomb-Kräfte wesentlich zur Bindungsenergie bei, so haben auch Ionenstärke und pH-Wert Einfluss auf die Affinität. Diese Eigenschaften lassen sich für eine beschleunigte Dissoziation von Biomolekül-Bindungen verwenden (Regeneration). Gleichfalls können Substanzen, welche die Hydratisierung und damit die Struktur von gelösten Makromolekülen stören (chaotrope Reagenzien), zur Dissoziation beitragen.

2.4 DNA-Mikroarray-Technologie

Ein großer Anteil der DNA-Analyseverfahren beruht auf der Hybridisierungsdiagnostik, d. h. der Verfolgung der spezifischen Wechselwirkung zweier DNA-Stränge hinsichtlich ihrer Komplementarität. Ein hilfreiches Instrument dazu bietet die DNA-Mikroarray-Technologie [24]. Auf sog. DNA-Chips ist eine Vielzahl verschiedener DNA-Sonden, rasterförmig angeordnet in einem Mikroarray, auf der Oberfläche immobilisiert. DNA-Mikroarrays zeichnen sich durch ihren hohen Parallelisierungs- und Miniaturisierungsgrad aus. Die Forderung nach *Parallelisierung* wird verständlich, wenn man berücksichtigt, dass es für die Sequenzanalyse durch Hybridisierung (sequencing by hybridization, SBH) eines lediglich 8 Nukleotide enthaltenden Oligomers erforderlich ist, ein Array aus 65536 (4^8) verschiedenen Sonden-Oligonukleotiden auf der Chipoberfläche zu immobilisieren. Die Notwendigkeit der *Miniaturisierung* ist dadurch gegeben, dass die über PCR oder Enzymverdau erhaltenen DNA-Produkte in Volumina von 100 μl oder weniger vorliegen, die über das gesamte Mikroarray verteilt werden müssen.

Die Anwendungsgebiete der DNA-Chips reichen von der Genexpressionsanalyse bis zur Untersuchung von Mutationen und Polymorphismen [25].

2.4.1 DNA-Chip-Herstellung

Ein Punkt von zentraler Bedeutung ist die Herstellung solcher DNA-Mikroarrays, insbesondere die (kovalente) Anbindung der DNA an das Trägermaterial. Hierzu existieren zwei prinzipielle Ansätze, die *in-situ-Synthese* von Oligonukleotiden auf der Chipoberfläche und die *postsynthetische Immobilisierung* (vgl. Abb. 16).

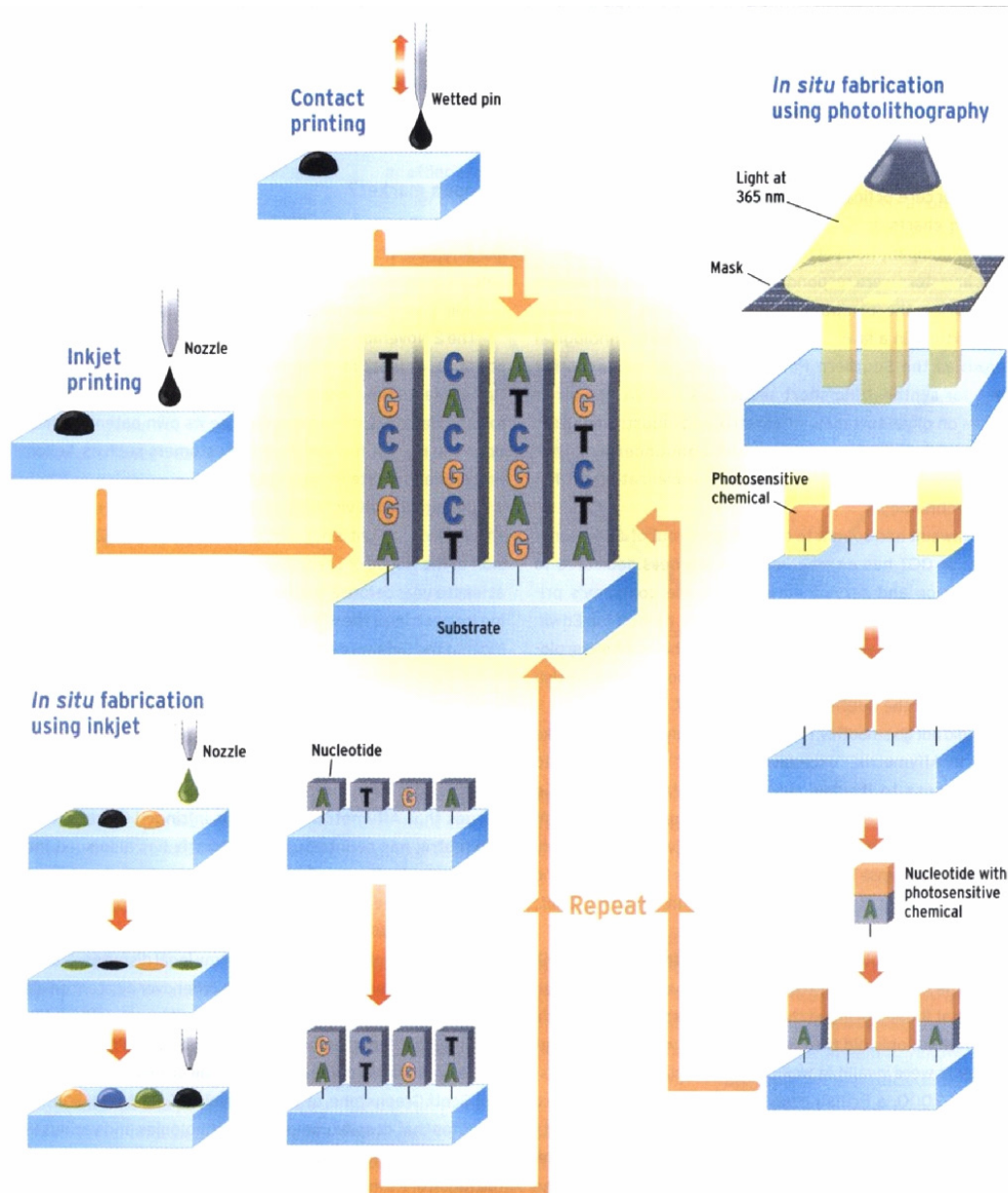


Abb. 16: Verfahren zur DNA-Chip-Herstellung (aus [26]).

In-situ-Synthese

Bei der In-situ-Synthese von Oligonukleotiden verwendet man meist photolabile Schutzgruppen (photolithographische Verfahren). Die DNA-Moleküle werden unter Bestrahlung durch Lochmasken orts aufgelöst entschützt und in einem darauf folgenden Kopplungsschritt synthetisch verlängert. Eine Einschränkung dieser Methode liegt sicherlich in der Länge und Reinheit der DNA-Sonden. Durch das sequenzielle Aufbringen unterschiedlicher Lochmasken und die nachfolgenden Syntheseschritte können Oligonukleotide von ca. 20 – 25 Nukleotiden Länge aufgebaut werden. Selbst bei einer sehr hohen Kopplungseffizienz von 99% pro Kopplungsschritt bedeutet dies, dass immerhin noch etwa 20% der Moleküle nicht der gewünschten Sequenz entsprechen. Mit dieser Methode

können jedoch sehr hohe Probedichten erzeugt werden; kommerziell erhältliche Chips enthalten bis zu 620.000 Oligonukleotid-Spots pro cm^2 (z. B. Affymetrix-Chip).

Alternative in-situ-Synthesemethoden über orts aufgelöste Probenaufgabe sind ebenfalls bekannt, sie erreichen jedoch keine derart hohe Orsauflösung.

Postsynthetische Immobilisierung

Bei der postsynthetischen Immobilisierung der DNA-Moleküle werden diese mittels eines miniaturisierten Probenabgabesystems auf die (modifizierte) Chipoberfläche gebracht und anschließend auf der festen Phase immobilisiert. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass die DNA vor ihrer Immobilisierung aufgereinigt werden kann, wodurch eine nahezu hundertprozentige Reinheit der Sonden auf der Oberfläche erreicht wird. Außerdem können neben synthetischen Oligonukleotiden auch andere DNA-Sonden wie z. B. PCR-Produkte oder längere DNA-Fragmente auf der Oberfläche immobilisiert werden.

2.4.2 Probendosierung

Aufgrund der großen Anzahl von Sonden und des räumlichen Abstands der Sondenspots auf Mikroarrays kann die Probenaufgabe meist nicht mehr manuell erfolgen (durch manuelles Pipettieren erhält man günstigstenfalls etwa 0,2 μl -Spots von etwa 1 mm Durchmesser). Für die mechanische Probendosierung stehen zwei Dosierprinzipien zur Verfügung, die Pin-Tool-Technologie, bei der die Flüssigkeit durch Oberflächenkontakt aufgebracht wird, und kontaktfreie Methoden wie z. B. Ink-Jet- oder Druckpuls-Verfahren.

Pin-Tool-Verfahren

Bei dem Pin-Tool-Verfahren (oder auch Pin-Printing) wird die Probenlösung mit einer Spitze ("solid pin" bzw. "ring&pin") oder Kapillare ("quill pin") aufgenommen und ein kleiner Tropfen auf der Oberfläche abgesetzt. Die Spotgröße wird durch das Wechselspiel von Kohäsion der Flüssigkeit und Adhäsion auf der Oberfläche sowie durch die an der Kapillare auftretenden Kapillarkräfte bestimmt und ist damit begrenzt. Mit solchen Pin-Printern erreicht man Tropfendurchmesser von 50 – 500 μm [27], wobei die Reproduzierbarkeit der Spots von vielen Parametern, wie z. B. relativer Luftfeuchte oder Pufferzusätzen, beeinflusst wird [28]. Der Vorteil dieser Methode liegt in ihrem hohen Parallelisierungsgrad. Mit kommerziellen Geräten können bis zu 384 verschiedene Proben gleichzeitig gedruckt werden.

Kontaktfreie Methoden

Das Funktionsprinzip des Ink-Jet-Verfahrens wurde von Tintenstrahldruckern übernommen. Hierbei werden aus einer Düse durch eine piezoelektrisch gesteuerte Pumpe kleine Flüssigkeitstropfen herausgeschossen. Die Beschleunigung der Flüssigkeitstropfen kann ferner durch eine Thermopumpe (Bubble-Jet) oder eine Magnetpumpe erzeugt werden. Erfolgt die Tropfenbildung pneumatisch über einen (piezogetriebenen) Pulsgeber, so spricht man von Druckpuls-Verfahren.

Diese Methoden sind aufgrund der kontaktlosen Probenabgabe unabhängig von Oberflächeneigenschaften und damit wesentlich präziser bzgl. des dosierten Probenvolumens als die Pin-Tool-Verfahren. Man erreicht mit den derzeitig erhältlichen Geräten reproduzierbar große Tropfenvolumina von 10 – 500 pl (Spotdurchmesser: 25 – 100 μm), wodurch einerseits eine feinere Rasterung ermöglicht und andererseits die Vergeudung teurer Substanzen vermieden wird. Die Möglichkeit zur Parallelisierung ist jedoch aufgrund der technischen Anforderungen eingeschränkt. Das Dosiersystem mit dem zurzeit höchsten Parallelisierungsgrad ist der TopSpot[®] (Abb. 17) der Firma HSG-IMIT (Villingen-Schwenningen), das nach dem Druckpuls-Prinzip arbeitet.



Abb. 17: Links: TopSpot[®]-Druckmodul; rechts: 24-Medien-Druckkopf (oben), bei dem die Probenlösung über selbstbefüllende Kapillare (mitte) zum Düsenarray (unten) geleitet wird.

Mit den standardisierten TopSpot[®]-Druckköpfen im 4×6- bzw. 4×24-Format (Rasterabstand: 500 μm) können 24 bzw. 96 verschiedene Probenlösungen *gleichzeitig* dosiert werden (vgl. Abb. 18).

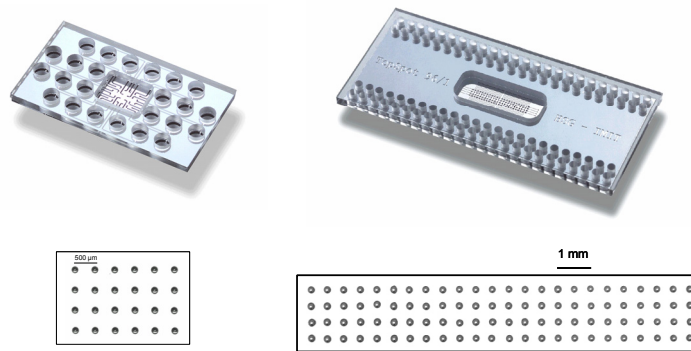


Abb. 18: TopSpot®-Druckköpfe und Probenarrays: 24 Medien (links), 96 Medien (rechts).

Darüber hinaus sind Sonderanfertigungen wie ein 24-Medien-Druckkopf zur Befüllung von Nanotiterplatten (2x12 Düsen im Abstand von 750 µm) und ein 96-Medien-Druckkopf zur Bepottung des NanoWellSlides (8x12 Düsen im Abstand von 2,25 mm, Abb. 59) verwendbar.

Die Kavitäten des Druckkopfs werden manuell befüllt und in die Dosiereinheit eingesetzt. Die Flüssigkeit wird über ein selbstbefüllendes Kapillarsystem in den Düsenraum geleitet. Durch eine Kühlplatte mit integrierter Temperatursteuerung wird gewährleistet, dass die Probenflüssigkeit nicht verdunstet (Abb. 19). Durch Auslösen eines Druckpulses, der von einem High-Performance-Piezostack auf einen Stößel übertragen wird, kann nun ein Tropfenarray ausgestoßen und auf die direkt darunter befindliche Substratoberfläche aufgebracht werden.

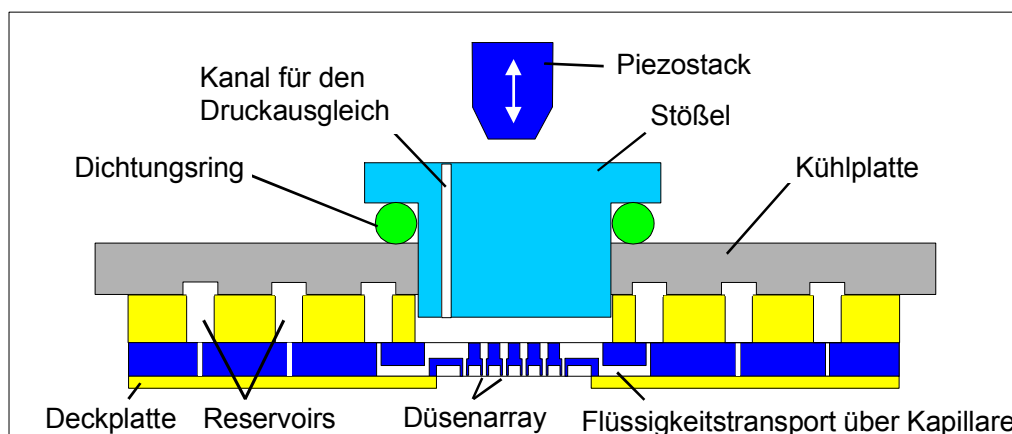


Abb. 19: Schematischer Aufbau der Druckkammer des TopSpot®.

2.4.3 Oberflächenchemie

Eine leistungsfähige und angepasste Oberflächenchemie ist der Schlüssel zur Herstellung funktionsfähiger Mikroarrays. Die jeweils angewandte Methode richtet sich nicht nur nach dem Oberflächenmaterial und der Funktionalisierung der DNA-Sonden, sondern auch nach den Anforderungen der Anwendung und der Detektionsmethode.

Um unspezifische Wechselwirkungen mit der Substratoberfläche möglichst gering zu halten, wird diese häufig mit Polymeren modifiziert. Dieses Vorgehen ermöglicht ferner eine gezielte Anpassung von funktionalen Oberflächeneigenschaften [29]. Für die Modifikation von Biosensor-Oberflächen ist das Polymer Dextran, ein Baustein der Agarose, sehr erfolgreich eingesetzt worden [30]. Es bietet neben hoher Hydratisierung auch den Vorteil erheblicher Flexibilität, was sich für die Untersuchung von Affinitätsreaktionen als günstig erweist, da auf diese Art eine möglichst „biologische“ Umgebung geschaffen wird. Ein anderes, in diesem Zusammenhang gut untersuchtes Polymer ist Polyethylenglycol (PEG) [31]. Seine außerordentlichen Eigenschaften sind auf den effektiven Ausschluss anderer Polymere in wässriger Umgebung zurückzuführen, bedingt durch die hohe Dynamik der Polymerketten. Das hohe Ausschlussvolumen von PEG hat außerdem ein komplexes Lösungsverhalten des Polymers in Wasser zur Folge und weist eine insgesamt schwache Immunogenität auf. Die Effizienz biomolekularer Wechselwirkungen hängt dabei stark von der Länge der verwendeten Polymerketten ab [32].

Die häufigsten Oberflächenmaterialien für biologische Anwendungen sind Glas (SiO_2), Silizium, Metalle (insbesondere Gold) und Kunststoffe (Polymere). Glas- und oxidierte Silizium-Oberflächen besitzen funktionelle Si-OH-Gruppen und können somit auf einfache Weise chemisch modifiziert werden. Auch auf Goldoberflächen ist eine Anbindung von Molekülen über Thiolgruppen sehr einfach möglich. Dagegen sind Kunststoffoberflächen vergleichsweise chemisch inert. Die Immobilisierung von Biomolekülen kann zwar auch über Adsorption (hydrophobe Wechselwirkungen) an der Substratoberfläche erfolgen, jedoch ist meist eine definiertere und stabilere kovalente Anbindung wünschenswert, mit der auch dreidimensionale und andere komplexe Oberflächenstrukturen realisiert werden können.

Glasoberflächen

Glas wird vorwiegend als Material für optische Transducer verwendet. Auf Glasoberflächen lassen sich beispielsweise durch Silanisierung (z. B. mit 3-Glycidylxypropyl-trimethoxysilan, GOPTS, vgl. Abb. 20) reaktive funktionelle Gruppen (in diesem Fall ein Epoxid) einführen, die mit den Sondenmolekülen unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren.

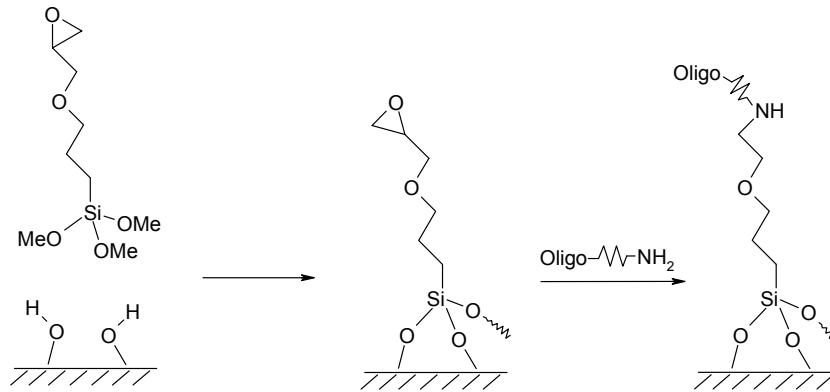


Abb. 20: Silanisierung von Glasoberflächen mit GOPTS und Anbindung aminofunktionalisierter DNA [33].

Statt eines aminofunktionalisierten Biomoleküls können auch funktionalisierte Polymere (s. o.) angebunden werden, an welche wiederum Biomoleküle immobilisiert werden können.

Goldoberflächen

Goldoberflächen sind weitgehend inert gegenüber Korrosion und Oxidation. Die besondere Eigenschaft von Gold ist seine ausgesprochene Thiophilie. Verschiedenste Verbindungen, die über eine Thiolgruppe verfügen, können so spezifisch und kovalent als Thiolat auf die Goldoberfläche gebunden werden. Die gebundenen Moleküle ordnen sich dabei zumeist regelmäßig auf der Oberfläche an – man spricht von “self-assembled monolayers“ (SAM). Diese Schichten sind eingehend untersucht [34] und werden in vielen Bereichen, insbesondere in der Bioanalytik, eingesetzt.

Polymeroberflächen

Kunststoffe (Polymere) sind als Werkstoffe weit verbreitet. Einige Beispiele handelsüblicher Thermoplaste (durch Wärme verformbare Kunststoffe) sind in Tab. 4 zusammengestellt.

Insbesondere die Formbarkeit der Kunststoffe (z. B. über Spitzgussverfahren) und die Modifizierbarkeit ihrer chemischen, physikalischen und optischen Eigenschaften machen sie zu einem wertvollen und vor allem preisgünstigen Arbeitsmaterial für vielerlei Anwendungen. Die chemische Inertheit der Kunststoffe ist in vielen Bereichen wünschenswert, erschwert jedoch die chemische Modifikation hinsichtlich der Immobilisierung von Biomolekülen. In den letzten Jahren sind jedoch verschiedene Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen auf Kunststoffoberflächen entwickelt worden, von denen einige vorgestellt werden sollen.

Kunststoff	Chem. Struktur	Markenname	Eigenschaften
Polymethylmethacrylat (PMMA)		Plexiglas, Acrylglas	transparent, stabil, UV-beständig, nahezu spannungsfrei, ausgezeichnete optische Eigenschaften, Verwendung als Kunstglas
Polycarbonat (PC)		Makrolon, Lexan	transparent, hohe mechanische Festigkeit und Wärmeformbeständigkeit, verwendbar bei niedrigen und hohen Temperaturen (-90 – 135 °C), Verwendung als Kunstglas
Polyvinylchlorid (PVC)		Simona	chemisch sehr beständig, ausgezeichnete dielektrische Eigenschaften, am häufigsten verwendeter technischer Kunststoff (billig)
Polyethylen (PE)		RCH 500/1000	in Deutschland und Europa meistproduzierter Kunststoff, Hart-PE ist wenig durchlässig für Wasserdampf, relativ hohe Diffusion von Gasen und Aromastoffen, hervorragender Isolator
Polypropylen (PP)		Hostalen, Simona	höhere Härte und Steifigkeit als PE, reibungsfest, hitzebeständig, hervorragende dielektrische Eigenschaften, widerstandsfähig gegenüber Chemikalien, versprödet bei Temperaturen um 0 °C
Polystyrol (PS)		(PS)	hart und formstabil, spröde, gute dielektrische Eigenschaften, weit verbreiteter Massenkunststoff (billig)
Polytetrafluorethylen (PTFE)		Teflon	hohtemperaturbeständig (-200 – 250 °C), niedrigster Reibungskoeffizient aller Kunststoffe, hohe Wärme-dehnung, geringe Druck- und Verschleißfestigkeit
Polyamid (PA)		Nylon, Perlon, Ertalon	sehr variable Eigenschaften vom harten und zähen PA 6.6 bis zum weichen flexiblen PA12, Material für Kunstfasern, beständig gegen Alkohole und wässrige (verdünnte) Laugen
Cycloolefin-Polymer (COP) aus Norbornen		Zeonex, Zeonor	glasähnliche Transparenz, ausgezeichnete optische Eigenschaften, exzellente Formstabilität, hohe Hitze-resistenz, stabil gegen Säuren und Laugen sowie polare Lösemittel, geringe Feuchtigkeitsabsorption
Cycloolefin-Copolymer (COC) aus Norbornen und Ethylen		Topas	glasähnliche Transparenz, ausgezeichnete optische Eigenschaften, exzellente Formstabilität, hohe Hitze-resistenz, stabil gegen Säuren und Laugen sowie polare Lösemittel, geringe Feuchtigkeitsabsorption

Tab. 4: Handelsübliche Kunststoffe (Thermoplaste) und ihre Eigenschaften.

Physisorption (Adsorption)

Biomoleküle können zwar über hydrophobe Wechselwirkungen auf Kunststoffoberflächen adsorbieren, jedoch ist diese Wechselwirkung sehr unspezifisch und undefiniert. Häufig wird bei der Adsorption die biologische Wirkung des Biomoleküls verändert oder sogar vollständig eingebüßt (z. B. Denaturierung von Proteinen). Da die Adsorptionseigenschaften eines Moleküls nicht nur von seiner Struktur und den Oberflächeneigenschaften (z. B. Oberflächenladung) abhängen, sondern auch von der chemischen Umgebung

(Lösungsmittel, Konzentration, pH-Wert insbesondere bei Proteinen, Temperatur), kann bei der späteren Anwendung unerwünschte Desorption auftreten [35].

Chemische Oxidation

Bestimmte Kunststoffe lassen sich unter verschärften chemischen Bedingungen oxidieren. Ein Beispiel hierfür ist die Oxidation von Polystyrol mit Kaliumpermanganat in verdünnter Schwefelsäure. Auf der so erhaltenen Carboxy-Oberfläche kann z. B. aminofunktionalisierte DNA über NHS-Carbodiimid-Chemie immobilisiert werden [36].

Plasmaverfahren

Eine chemische Modifikation von Kunststoffoberflächen kann auch mit Plasmaverfahren erreicht werden. Dabei wird das Polymermaterial einem Plasma ausgesetzt (z. B. Argon- oder Sauerstoff-Plasma), welches auf der Oberfläche je nach Art des Plasmas reaktive Gruppen erzeugt (z. B. ungesättigte Bindungen, Carboxylgruppen). Diese können zu einer definierten Funktionalität umgesetzt werden (z. B. durch Pfropfpolymerisation mit Acrylsäure) [37].

Copolymerisation mit Biomolekülen

Die Verankerung der Biomoleküle kann bereits bei der Polymerisation erfolgen. Dazu werden während des Polymerisationsprozesses Biomoleküle mit ungesättigten Gruppen zugesetzt [38]. Die Polymerisation muss demnach unter für die Biomoleküle unschädlichen Bedingungen stattfinden. Damit die Biomoleküle für die Analyte erreichbar sind, muss das Polymer gelartige Eigenschaften besitzen, d. h. es muss vom verwendeten Lösungsmittel durchdrungen werden können. Dies kann durch entsprechende Quervernetzung erreicht werden. Der Vorteil dieser Methode ist der Erhalt dreidimensionaler Strukturen, die eine wesentlich höhere „Oberflächenbeladung“ zulassen, wodurch wiederum die Signalintensität enorm gesteigert wird.

Photoimmobilisierung

Ein Großteil der auf Kunststoffen basierenden biologischen Analyseplattformen wird durch photoinduzierte Immobilisierung von Biomolekülen hergestellt. Die Photoimmobilisierung ist ein sehr einfaches und schnelles Verfahren und erfordert geringen technischen Aufwand. Ein erheblicher Vorteil liegt in der Möglichkeit der Parallelisierung. In Bezug auf die Herstellung von Mikroarrays bedeutet dies, dass nach Aufbringen der verschiedenen Sonden *in einem Schritt* alle Sondenmoleküle *gleichzeitig* und *in gleichem Maße* (bzgl. Ausbeute, Bioverfügbarkeit, Orientierung) immobilisiert werden können.

Die Methode wurde von dem als Pfropf(co)polymerisation ("graft polymerization") bekannten Funktionalisierungsverfahren für Kunststoffe abgeleitet. Bei der Pfropfpolymerisation werden auf vorgefertigte Polymere (Hauptketten) durch radikalische Polymerisation zusätzlich längere Seitenketten „aufgepfropft“. Als Pfropfmaterial werden häufig Acrylmonomere verwendet, da sie sich sehr leicht radikalisch polymerisieren lassen (das gebildete Acyrlradikal wird durch die Estergruppe stabilisiert) [39]. Die Polymerisation wird entweder durch Radikalstarter oder (häufiger) photochemisch induziert. Als Photoinitiatoren dienen häufig Benzophenonderivate, die durch H-Abspaltung vom Polymersubstrat ein Startradikal erzeugen. Die photoinduzierte Pfropfpolymerisation mit Benzophenon als Radikalstarter ist eingehend untersucht [40].

Ausgehend von der Photofunktionalisierung durch Pfropfung liegt der Schritt zur Photoimmobilisierung von (Bio-)Molekülen nahe. Dazu werden heterobifunktionelle Moleküle eingesetzt, die eine photoaktivierbare Funktion besitzen (Photolinker, vgl. Kap 2.2). Die zweite funktionelle Gruppe ist „thermoreaktiv“, d. h. über eine thermochemische Reaktion aktivierbar¹. Eine Übersicht über verschiedene reaktive Zentren ist in Tab. 5 dargestellt.

Die verwendete funktionelle Gruppe des Photolinkers hängt vom jeweiligen Substrat ab. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide beispielsweise sind häufig mit einer Amino- oder Thiolgruppe modifiziert und können demnach mit Photolinkern modifiziert werden, die eine NHS-Estergruppe oder eine Maleinimid-Funktion tragen.

¹ Der Begriff der Thermoreaktion wird hier verwendet, um diese „gewöhnlichen“ chemischen Reaktionen von den Photoreaktionen zu unterscheiden.

funktionelle Gruppe	reagiert mit	resultierende Bindung
NHS-Ester 	Amin $\text{H}_2\text{N}-\text{R}'$	Amid
Iodoacetamid 	Thiol (Sulfhydrylgruppe) $\text{HS}-\text{R}'$	Thioether
Maleinimid 	Thiol (Sulfhydrylgruppe) $\text{HS}-\text{R}'$	Thioether
Hydrazid 	Carbonyl 	Hydrazone
Amin $\text{R}-\text{NH}_2$	Carbonsäure 	Amid
Arginin (Guanidinderivat) 	Diketon 	Imidazolderivat

Tab. 5: Thermoreaktive funktionelle Gruppen der Photolinker (R) und ihre Reaktion mit dem Substrat (R') [4].

Bei der direkten Photoimmobilisierung von Biomolekülen (z. B. DNA) sind je nach Reihenfolge der Reaktionsschritte und je nach Ausrichtung des Photolinkers vier Strategien denkbar [14]:

- (A) Das Biomolekül wird thermochemisch mit einem Photolinker modifiziert. Das Konjugat wird anschließend auf die Kunststoffoberfläche gebracht und dort durch UV-Bestrahlung photoimmobilisiert.
- (B) Der Photolinker wird zunächst auf der Polymeroberfläche photoimmobilisiert, so dass eine „Photofunktionalisierung“ der Oberfläche stattfindet. Anschließend wird das Biomolekül an die auf der Oberfläche erzeugten funktionellen Gruppen thermochemisch angebunden.
- (C) Der Photolinker wird zunächst durch UV-induzierte Photoreaktion an das (unmodifizierte) Biomolekül gekoppelt. Anschließend wird das funktionalisierte

Biomolekül thermochemisch an die Kunststoffoberfläche angebunden, die ebenfalls reaktive Gruppen trägt.

- (D) Die Polymeroberfläche wird zunächst über thermochemische Reaktion mit Photolinkern modifiziert. Anschließend können Biomoleküle über eine Photoreaktion an die mit aktiven Photolinkern belegte Oberfläche gekoppelt werden.

Zur Verdeutlichung sind diese vier Strategien in Abb. 21 für die Beispielanwendung der DNA-Immobilisierung schematisch dargestellt.

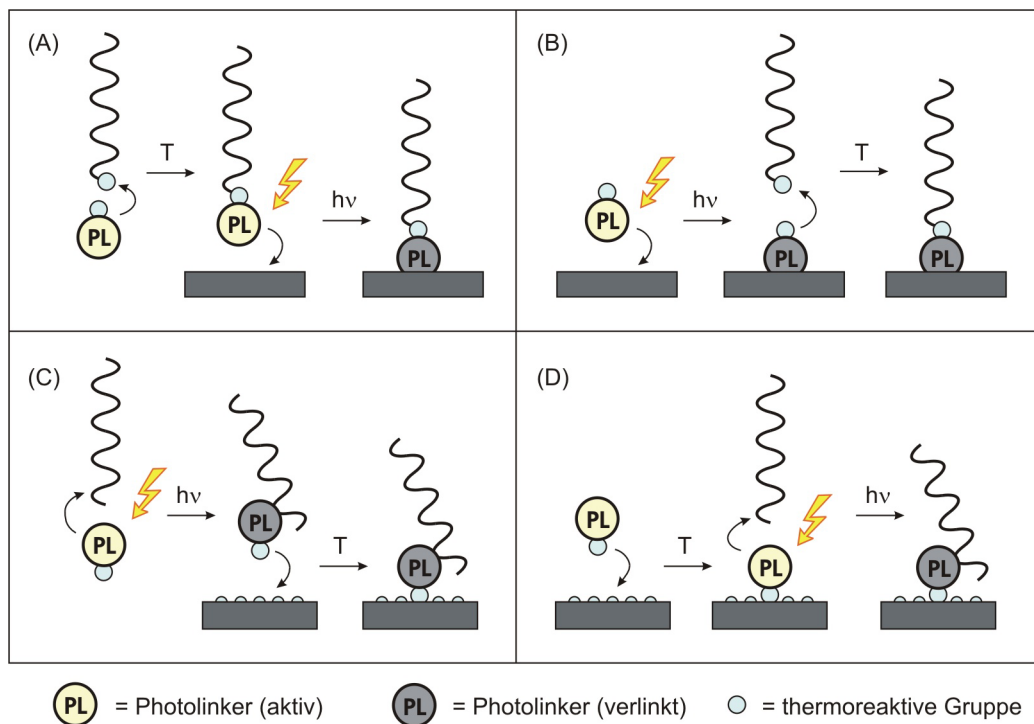


Abb. 21: Mögliche Strategien zur Photoimmobilisierung von DNA (schematisch).

In den Strategien A und B wird die thermochemische Gruppe verwendet, um den Photolinker an das DNA-Molekül zu koppeln, und die photoreaktive Gruppe reagiert mit dem Substrat. Somit wird das Zusammenspiel einer unspezifischen Photoreaktion des Photolinkers einerseits sowie einer unmodifizierten, unreaktiven Substratoberfläche andererseits genutzt. Für die photoinduzierte Immobilisierung von Biomolekülen nach den Strategien A und B gibt es zahlreiche Anwendungen (eine Übersicht wird in [14] gegeben). Die am häufigsten verwendeten Photolinker sind dabei Benzophenone [32,41], Anthrachinone [13], Phenylazide [42,43,44,45] und Diazirine [46,41]. Neben der Immobilisierung von Biomolekülen findet Strategie A auch Anwendung bei der Photoimmobilisierung von Polymeren, z. B. von Phenylazid-modifiziertem Polyethylenglycol (PEG) [47].

In den Strategien C und D ist die Ausrichtung des Photolinkers genau entgegengesetzt: Die unspezifische Photoreaktion findet mit dem Biomolekül statt, während die thermoreaktive Gruppe mit der Oberfläche zur Reaktion gebracht wird. Dies setzt voraus, dass die Substratoberfläche auf chemischem Wege modifizierbar ist, was bei den meisten Polymeren nicht der Fall ist. Darüber hinaus ist die dritte Alternative (C) insofern unlogisch, dass die meisten Biomoleküle entweder bereits funktionelle Gruppen tragen oder diese einfacher (und definierter) auf thermochemischem Wege eingeführt werden können. Insbesondere Strategie D kann jedoch dann verfolgt werden, wenn bereits bei der Polymerisation photoinduzierbare Gruppen in das Polymer eingebracht werden (Copolymerisation), oder die Polymeroberfläche nach bereits oben erwähnten Methoden (Adsorption von z. B. BSA [48], Oxidation, Plasmaverfahren) vorher modifiziert bzw. aktiviert wird. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass Strategie D nichtsdestoweniger erfolgreich für die Photoimmobilisierung auf anderen Substratoberflächen wie Glas [46,49] oder Gold [50] eingesetzt wird. Ein Nachteil dieser Methode ist dennoch die undefinierte Orientierung des Biomoleküls und ein möglicher Verlust seiner biologischen Aktivität. Allerdings kann diese Strategie auch dazu eingesetzt werden, um Substratoberflächen, die womöglich unerwünschte Eigenschaften besitzen, mit einem Polymer unter kovalenter Anbindung zu beschichten und so gezielt die Oberflächeneigenschaften zu modifizieren [51].

Eine spezielle Anwendung stellt die Photoimmobilisierung von Biotin dar. Das dazu verwendete photoaktivierbare Biotin (sog. *Photobiotin*) ist eine Verbindung aus Biotin, einem Photolinker und einem Spacer zwischen den beiden funktionellen Gruppen. Es gibt verschiedene Arten von Photobiotin-Molekülen, die sich hauptsächlich in der Art des Photolinkers unterscheiden. Meist werden Phenylazide [52], Diazirine [53] oder sogar Fluoreszein [54] als photoreaktive Komponente eingesetzt. Kommerziell erhältliches Photobiotin (Abb. 22) trägt ein Nitrophenylazid als photoreaktive Gruppe.

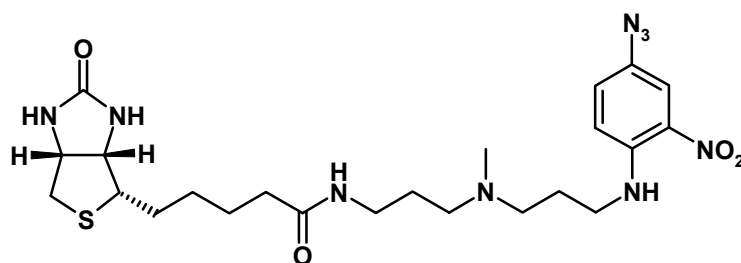


Abb. 22: Chemische Struktur von Photobiotin.

Photobiotin wird durch UV-Bestrahlung auf die Oberfläche immobilisiert, so dass anschließend Streptavidin über eine Affinitätsreaktion an die biotinylierte Oberfläche angebunden werden kann. Da Streptavidin 4 Bindungsstellen für Biotin aufweist, kann an die

freien Bindungsstellen jede Art von Sondenmolekül immobilisiert werden, das einen Biotin-Anker trägt.

Eine weitere Anwendung von Photolinkern zur Immobilisierung von Biomolekülen ist der Einsatz photoreaktiver Polymere. Hierbei werden (Bio-)Polymere verwendet, die mit Photolinkern modifiziert wurden. Bei Bestrahlung können die Photolinker-Funktionen sowohl an die Oberfläche als auch an das Target-Molekül binden. Dieser Ansatz wurde mit dem Photolinker Diazirin bereits am Beispiel von photoreaktivem BSA (T-BSA) zur Immobilisierung von Peptiden [55] oder Dextran [56,57] gezeigt. Auch Dextran selbst kann als photoreaktives Polymer fungieren. Ein mit Diazirin modifiziertes Dextran („OptoDex“ [58]) wurde bereits erfolgreich in der Biosensorik eingesetzt [59].

2.4.4 Detektion

Der Nachweis von Affinitätsreaktionen kann allgemein über Strahlungsmessung (Colorimetrie, Fluorimetrie, Radiometrie) oder die Verfolgung der Änderung physikalischer Eigenschaften der Oberfläche (SPR, optische Schichtdicke o. ä.) erfolgen.

Die einzige Methode zur absoluten Quantifizierung ist dabei die Radiometrie, d. h. die Messung radioaktiver Strahlung der markierten Sonden¹. Sie ist jedoch aufgrund der nötigen Strahlenschutzmaßnahmen sehr aufwendig.

Die Fluorimetrie, d. h. die Messung der Fluoreszenzintensität der Probe, ist dagegen sehr weit verbreitet, da sie eine sehr sensitive und schnelle Methode ist und außerdem keinen großen präparativen und instrumentellen Aufwand benötigt. „Fluoreszenzmarker“ (Fluorophore, die an die nachzuweisenden Biomoleküle angebunden werden) sind in zahlreicher Vielfalt erhältlich. Als Detektor wird hierzu ein Fluoreszenzreader benötigt, wie z. B. der Fluoreszenzscanner BioScan.

Eine besondere Alternative stellen die sog. markierungsfreien Methoden dar, d. h. Messverfahren, für die keine Markermoleküle notwendig sind. Eine direkt-optische Methode ist die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS), bei der eine Änderung der optischen Schichtdicke über das Reflexionsspektrum detektiert werden kann.

¹ DNA-Moleküle werden üblicherweise mit ³²P, Proteine mit ¹²⁵I markiert.

Fluoreszenzdetektion im BioScan

Der BioScan ist ein Fluoreszenzreader, bei dem die Oberfläche einer Probe (z. B. Objektträger, Nanotiterplatte) mit einem Laserstrahl in einem 2D-Scan zeilenweise abgerastert und die emittierte Fluoreszenz in einem Photomultiplier detektiert wird. Die Anregung und die Detektion erfolgt dabei von derselben Seite ("epi-mode").

Der schematische Aufbau des Geräts ist in Abb. 23 dargestellt. Das Fluoreszenzlicht wird (zusammen mit der Anregungsstrahlung) oberhalb der Probe mit einer Linse gebündelt und an einem dichroitischen Strahlenteiler aufgespalten, wobei die Anregungsstrahlung bereits reduziert wird. Durch die zusätzliche abbildende Optik, bestehend aus einem Kantenfilter und einem Emissionsfilter, wird das Anregungslicht komplett gesperrt. Die Anordnung ermöglicht somit ein sehr hohes Nutzsignal-zu-Hintergrund-Verhältnis. Da jedoch bei diesem Aufbau in jedem Bildpunkt des Fluoreszenzbildes die *Gesamt*fluoreszenz der Probe erfasst wird, die bei Bestrahlung des einen Punktes entsteht, kann es zu Verzerrungen der tatsächlichen Fluoreszenzintensität aufgrund von Mehrfachreflexionen kommen.

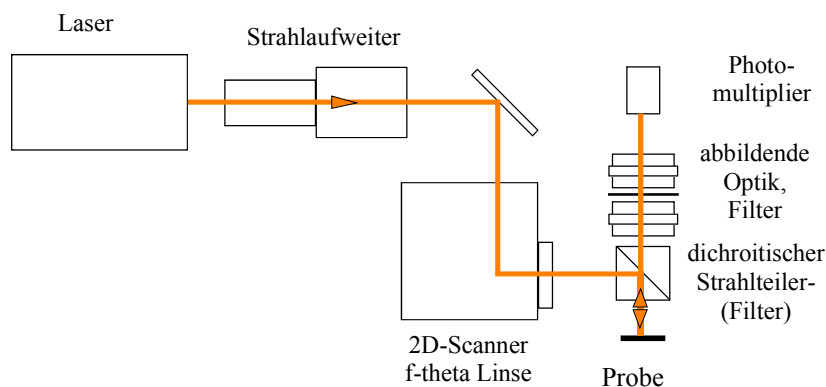


Abb. 23: Schematischer Aufbau des Fluoreszenzscanners BioScan.

Direkt-optische Detektion mit RlFS

Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie RlFS ist eine markierungsfreie, direkt-optische Detektionsmethode, die auf der Mehrfachreflexion (Weißlichtreflexion nach Fabry-Pérot [60]) an dünnen Schichten beruht. Mit ihr können zeitaufgelöst Bindungsvorgänge an der Sensoroberfläche beobachtet werden. Das RlFS-Prinzip ist in Abb. 24 dargestellt.

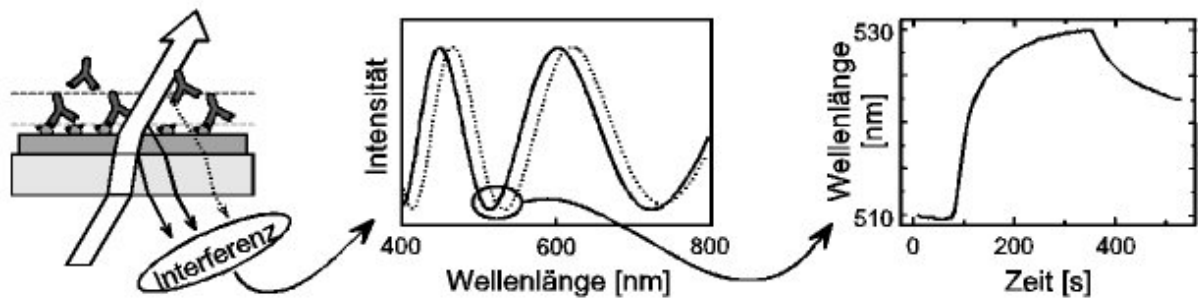


Abb. 24: Prinzip der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS); links: symbolischer Strahlengang im RIfS-Transducer; mitte: Verschiebung des Interferenzspektrums bei Änderung der Schichtdicke; rechts: resultierende Bindungskurve bei zeitaufgelöster Messung.

Weißlicht wird von der Rückseite eingestrahlt und das reflektierte Licht spektral detektiert. Durch eine Überlagerung der an den verschiedenen Phasengrenzen partiell reflektierten Teilstrahlen erhält man ein charakteristisches Interferenzspektrum. Durch Bindungsvorgänge an der Oberfläche verändert sich die optische Schichtdicke des Systems, was zu einer Verschiebung des Reflexionsspektrums führt (bei Zunahme der optischen Schichtdicke verschiebt sich das Spektrum zu höheren Wellenlängen). Beobachtet man die Lage eines Extrempunktes des Interferenzspektrums während des Bindungsvorgangs, so können aus dessen Verschiebung Informationen über den Bindungsvorgang gewonnen werden [61]. Eine ausführliche Diskussion über die Theorie der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie findet sich in [62].

2.5 Oberflächencharakterisierung

2.5.1 Kontaktwinkel

Kontaktwinkel bilden sich im Dreiphasensystem fest-flüssig-gasförmig aus und sind Ausdruck für die Benetzbarkeit des Festkörpers durch die aufliegende Flüssigkeit [63,64,65]. Der Kontaktwinkel beschreibt den Bereich, den die flüssige Phase an der Dreiphasengrenze einnimmt. Ein großer Kontaktwinkel Θ bedeutet dabei eine geringe Benetzbarkeit der Festkörperoberfläche bzw. eine geringe Auflagefläche des Tropfens. Mit Wasser als Flüssigkeit ist der Kontaktwinkel gleichzeitig ein Maß für die Hydrophobizität der Oberfläche.

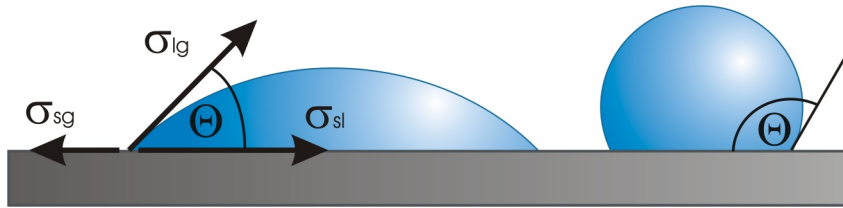


Abb. 25: Kontaktwinkel eines auf einer Festkörperoberfläche aufliegenden Wassertropfens;
links: hydrophile Oberfläche (kleiner Kontaktwinkel), rechts: hydrophobe Oberfläche (großer Kontaktwinkel).

Mathematische Beschreibung

Der Kontaktwinkel einer Flüssigkeit an einer Oberfläche wird bestimmt durch die Oberflächen- oder Grenzflächenspannungen σ_{ij} an den Zweiphasengrenzen. Die Grenzflächenspannung ist ein Maß für die Energie, die benötigt wird, um die Grenzfläche zwischen den zwei Phasen zu vergrößern. Sie wird als Vektor dargestellt, der ausgehend vom Dreiphasenkontakt in die Richtung der Grenzfläche zeigt.

Die Grenzflächenspannung zwischen Festkörper und Gasphase σ_{sg} nimmt meist sehr kleine Werte an. Die Grenzflächenspannung zwischen Festkörper und Flüssigkeit σ_{lg} wird durch das Zusammenspiel von Kohäsion (Wechselwirkung der Flüssigkeitsmoleküle untereinander) und Adhäsion (Wechselwirkung der Flüssigkeitsmoleküle mit den Festkörpermolekülen) bestimmt: Überwiegt die Adhäsion, ist $\sigma_{lg} < 0$, überwiegt dagegen die Kohäsion, ist $\sigma_{lg} > 0$. Die Oberflächenspannung zwischen Flüssigkeit und Gasphase σ_{lg} nimmt stets positive Werte an. Der Zusammenhang zwischen den Grenzflächenspannungen und dem Kontaktwinkel wird durch die Young-Gleichung beschrieben:

$$\frac{\sigma_{sg} - \sigma_{sl}}{\sigma_{lg}} = \cos \Theta \quad (5)$$

Es lassen sich somit die Grenzflächenspannungen aus Kontaktwinkelmessungen bestimmen. Dazu wird häufig die Methode des aufliegenden Tropfens eingesetzt, die auf der geometrischen Vermessung der Form eines auf der Festkörperoberfläche aufliegenden Flüssigkeitstropfens beruht.

2.5.2 Ellipsometrie

Die Ellipsometrie ist ein optisches Messverfahren zur zerstörungsfreien Untersuchung von Oberflächen und dünnen Schichten. Mit Hilfe polarisierter Strahlung können Schichtdicke und Brechungsindex dünner Filme bzw. der komplexe Brechungsindex kompakter Proben bestimmt werden. Grundlage des Verfahrens ist die Korrelation des Polarisationszustandes

des reflektierten Lichtes mit der optischen Schichtdicke. Der Vorteil dieser Methode ist, dass Polarisationszustände gemessen werden, wodurch diese Methode unempfindlich gegenüber Intensitätsschwankungen der Lichtquelle ist.

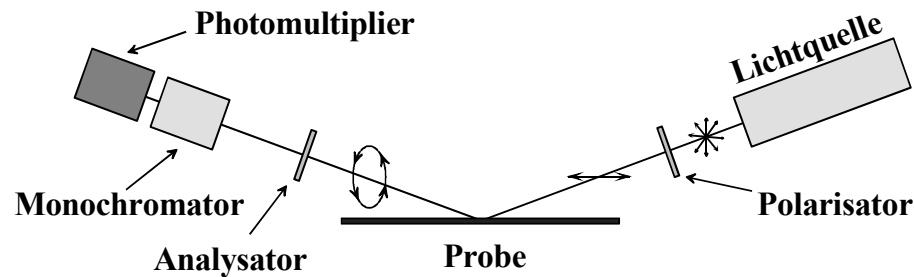


Abb. 26: Schematischer Aufbau eines Ellipsometers.

Die Ellipsometrie basiert auf der Bestimmung des Polarisationszustandes von polarisiertem Licht nach Reflexion oder Transmission relativ zum ursprünglichen Polarisationszustand. Die mit diesem Messverfahren bestimmten Größen sind die so genannten ellipsometrischen Winkel Ψ und Δ (bzw. $\tan \Psi$ und $\cos \Delta$), die den Polarisationszustand und die Phasenverschiebung der polarisierten Teilstrahlen wiedergeben. Über die Definition des *ellipsometrischen Verhältnisses* sind die ellipsometrischen Winkel mit den Reflexionskoeffizienten nach Fresnel verknüpft:

$$\tan \Psi \cdot e^{i\Delta} = \frac{R_p}{R_T} \quad (6)$$

Diese Gleichung wird auch als *fundamentale Gleichung der Ellipsometrie* bezeichnet [66]. Die Reflexionskoeffizienten des parallel zur Einfallsebene polarisierten Lichts (R_p) und des transversal polarisierten Lichts (R_T) stehen mit den Winkeln des einfallenden und des transmittierten Lichtstrahls (α bzw. β) und den Brechungsindizes der Medien n_1 und n_2 in folgender Beziehung:

$$R_T = \frac{n_1 \cdot \cos \alpha - n_2 \cdot \cos \beta}{n_1 \cdot \cos \alpha + n_2 \cdot \cos \beta} \quad R_p = \frac{n_2 \cdot \cos \alpha - n_1 \cdot \cos \beta}{n_2 \cdot \cos \alpha + n_1 \cdot \cos \beta} \quad (7)$$

Diese *Fresnel-Gleichungen* beschreiben das Verhalten von Reflexion und Transmission an Grenzflächen nicht-absorbierender Medien für linear polarisiertes, monochromatisches Licht.

Bei der Untersuchung von Schichtsystemen müssen Mehrfachreflexionen berücksichtigt werden. Da durch eine ellipsometrische Bestimmung bei einer Wellenlänge und einem Winkel maximal zwei unbekannte Größen ermittelt werden können, müssen entsprechend mehr Δ - bzw. Ψ -Werte für die Berechnung herangezogen werden. Hierfür ergeben sich folgende Möglichkeiten:

- Messung mit monochromatischer Lichtquelle unter mehreren Einfallswinkeln (variable angle ellipsometry, VAE)
- Messung bei einem festen Einfallswinkel in spektraler Auflösung (spectroscopic ellipsometry, SE)
- sowohl Winkel und Wellenlänge werden variiert (variable angle spectroscopic ellipsometry, VASE)

Das ellipsometrische Verhältnis ergibt sich hier als Funktion der Brechungsindices der verschiedenen Medien und der Dicke des Filmes. Da eine analytische Lösung der Gleichungen nicht möglich ist, erfolgt die Berechnung der gesuchten Größen über nicht-lineare Regression [67].

2.5.3 Atomkraftmikroskopie (AFM)

Die Atomkraftmikroskopie ist eine Methode zur Untersuchung feinsten topographischer Oberflächenstrukturen. Sie liefert dreidimensionale Bilder von Oberflächen und kann dabei molekulare Strukturen auflösen. Als Weiterentwicklung der Rastertunnelmikroskopie hat sie den methodischen Vorteil, dass auch elektrisch nicht-leitende Proben untersucht werden können.

Bei der Atomkraftmikroskopie wird die Kraft gemessen, die zwischen einer scharfen Spitze und der Probenoberfläche herrscht. Diese Kraft wird durch das Lennard-Jones-Potential beschrieben, das den empirisch gefundenen Potentialverlauf zwischen zwei Teilchen wiedergibt:

$$E_{\text{pot}}(r) = 4E_{\text{eq}} \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (8)$$

Dabei ist E_{eq} das Potential am Gleichgewichtsabstand σ . Das Lennard-Jones-Potential berücksichtigt sowohl die Attraktionskräfte bei $r > \sigma$ als auch die repulsiven Kräfte bei $r < \sigma$.

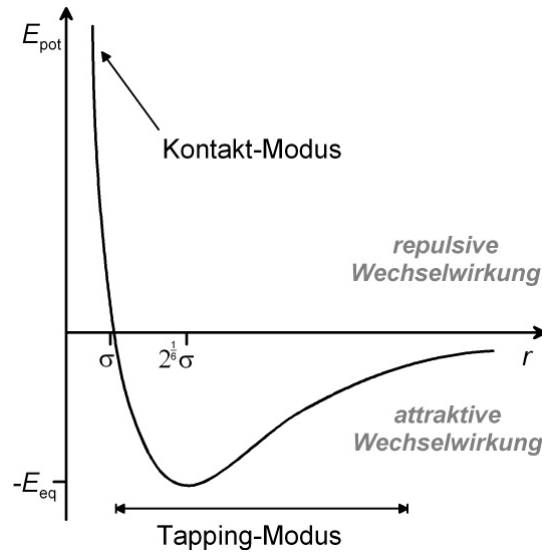


Abb. 27: Empirisches Zweiteilchenpotential nach Lennard-Jones.

Die starke Abstandsabhängigkeit der Abstoßungskräfte ($\sim r^{-12}$) machen diese zu einer extrem empfindlichen Abstandssonde. Beim Abtasten der Oberfläche mit einer feinen Spitze an einer beweglichen Zunge (Cantilever) wird die Kraft der Spitze in einer nachgeschalteten Servo-Anordnung konstant gehalten, während die Verbiegung des Cantilevers, die sich aufgrund der Oberflächenstruktur ständig verändert, z. B. mit Hilfe eines Laserstrahls registriert wird.

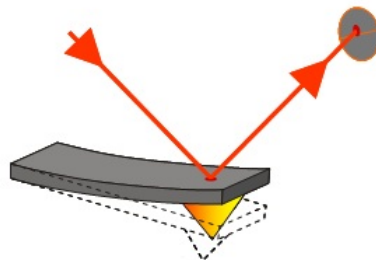


Abb. 28: Atomkraftmikroskopie: Bestimmung der Cantilever-Auslenkung mit Hilfe eines Laserstrahls.

Die Abrasterung der Oberfläche kann dabei im *Kontakt-Modus* oder im *Tapping-Modus* erfolgen (s. a. Abb. 27). Im Kontakt-Modus wird die AFM Spitze in physikalischen Kontakt mit der Oberfläche gebracht, bis die Cantileververbiegung den vorgegebenen Wert erreicht hat, d. h. bis eine bestimmte Kraft zwischen Oberfläche und Spitze wirkt. Während der Abtastung der Oberfläche wird eine veränderte Krafteinwirkung über die Laseroptik registriert und die AFM-Spitze mit Hilfe eines Piezoelements nachgeregelt. Dagegen wird im Tapping-Modus der Cantilever mit der integrierten AFM-Spitze über das Piezoelement zu einer Schwingung nahe seiner Resonanzfrequenz angeregt und über die zu untersuchende Oberfläche gerastert. Während des Rasterns wird die Probenoberfläche von der Spitze jeweils im Amplitudenminimum einer Schwingung kurz berührt. Die dabei auftretende Wechselwirkung

führt zu einer gewissen Dämpfung der Cantileveramplitude, die charakteristisch für einen bestimmten Abstand zwischen z-Piezoelement und Oberfläche ist. Das Piezoelement regelt die Höhe der AFM-Spitze derart nach, dass eine vorgegebene Amplitude konstant gehalten wird.

Im Kontakt-Modus wie auch im Tapping-Modus kann man durch Auftragen der Höhe des z-Piezoelementes in Abhängigkeit der lateralen Position ein dreidimensionales Bild der Oberflächentopographie erhalten. Zwar wird dabei die (theoretisch mögliche) atomare Auflösung nur selten erzielt, jedoch hat die Atomkraftmikroskopie den entscheidenden Vorteil, dass man sowohl an Luft als auch in Lösung arbeiten kann. So können mittels AFM Studien an oberflächen-gebundenen Biomolekülen, wie z. B. DNA, in molekularer Auflösung durchgeführt werden [68,69].

3 Experimenteller Teil

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Standardchemikalien

Die Standardchemikalien, Biochemikalien und Lösemittel wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Fa. Sigma-Aldrich (Seelze) bzw. Merck (Darmstadt) bezogen.

Wasser

Für alle Anwendungen wurde ausschließlich Reinstwasser verwendet. Die Wasseraufbereitung wurde mit einer Purelab classic der Fa. ELGA LabWater (Siershahn) durchgeführt.

Detergenzien

Als Detergenzien wurden nicht-ionische Tenside verwendet. Für die NanoWellSlide-Anwendungen wurde Triton X-100 (Polyethylenglycol-*tert*-octylphenylether) von der Fa. ICN Biomedicals Inc. (Aurora/OH, USA) verwendet. Für die Untersuchungen mit Antikörpern wurde Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-monolaurat) von der Fa. Sigma-Aldrich (Seelze) verwendet.

Aminodextran

Das Aminodextran (AmdexTM, MW = 170.000 g/mol, 66 Aminogruppen/Dextran) wurde von der Firma Helix Research Co. (Eugene/OR, USA) synthetisiert.

DNA

Die DNA-Oligonukleotide wurden von der Fa. IBA (Göttingen) bezogen. Die Oligonukleotide wurden in HPLC-reinem Zustand in 0,1 mM Lösung geliefert und bei -20 °C gelagert.

Proteine

Die Proteine Avidin und Streptavidin sowie Bovine Serum Albumin (BSA) und Ovalbumin (OVA) wurden von der Fa. Sigma-Aldrich (Seelze) bezogen.

Die anti-BSA IgG Antikörper wurden freundlicherweise vom Biotechnology Department der Dublin City University zur Verfügung gestellt.

Photolinker

Die Photolinker 4-Benzoylbenzoesäure (BBS) und 5-Azido-2-nitrobenzoesäure (ANBS) wurden von der Fa. Aldrich (Steinheim) bezogen. Anthrachinon-3-carbonsäure (AQS) wurde von der Fa. Fluka (Buchs, CH) bezogen. p-(3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzoesäure (TDBS) wurde von der Fa. Bachem (Bubendorf, CH) bezogen.

Biotin

Photobiotin (N-(4-Azido-2-nitrophenyl)-N'-(3-biotinylaminopropyl)-N'-methyl-1,3-propan-diamin, Acetat) wurde von der Fa. Sigma-Aldrich (Seelze) bezogen.

Zur Biotinylierung der Antikörper wurde EZ-Link™ NHS-LC-Biotin (Succinimidyl-6-(biotinamido)hexanoat) der Fa. Pierce (Rockford/IL, USA) verwendet.

Für die Herstellung biotinylierten Photodextrans wurde Succinimidyl-6-(biotinamido)hexanoat der Fa. Sigma-Aldrich (Seelze) verwendet.

3.1.2 Pufferlösungen

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

8,76 g (150 mmol) Natriumchlorid und 1,36 g (10 mmol) Di-Kaliumhydrogenphosphat werden in 1 L H₂O gelöst und mit KOH auf pH 7,4 eingestellt.

PBST = PBS-Puffer mit Detergenz-Zusatz von 0,1 % (w/v) Tween 20

Der Puffer wurde für DNA- und Antikörperlösungen verwendet.

Borat-Puffer

3,81 g Natriumtetraborat-Decahydrat, (Na₂B₄O₇·10 H₂O) werden in 100 mL H₂O gelöst und mit HCl auf pH 8,5 eingestellt.

Der Puffer wurde für Kupplungsreaktionen verwendet.

Citrat-Puffer (SSC) 20x

175,3 g NaCl und 88,2 g Natriumcitrat (tribasisch, Dihydrat) werden in 1 L H₂O gelöst und mit HCl auf pH 7 eingestellt.

Der Puffer wurde in 2x-Konzentration für die Oberflächenblockung verwendet.

NaCl-Phosphat-EDTA-Puffer (SSPE) 20x

21,04 g NaCl, 2,76 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 0,744 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat werden in 100 mL H_2O gelöst und mit HCl/KOH auf pH 7,7 eingestellt.

SSPET = SSPE-Puffer mit Detergenz-Zusatz von 0,1 % (w/v) Triton X-100 (bei 20x-Konz.)

Der Puffer wurde in 4x- bis 5x-Konzentration als Hybridisierungspuffer verwendet.

Regenerations- und Reinigungslösung SDS

Eine Lösung von 20 % SDS in H_2O wird mit H_2O auf 0,5 % verdünnt und mit konzentrierter HCl auf pH 1,8 (Regeneration) bzw. pH 2 (Reinigung) eingestellt.

3.1.3 Trägermaterialien

Kunststoffträger

Die Kunststoffträger aus Polymethylmetacrylat (PMMA), Polystyrol (PS) und Topas wurden von der Fa. microParts (Dortmund) zur Verfügung gestellt. Die 1 mm dicken Slides wurden mittels Spritzgusstechnik aus geschwärztem Kunststoffmaterial hergestellt und mit einer Wafersäge in ein einheitliches Format von 20 x 20 mm gebracht. Vor der Verwendung wurden sie mit H_2O und 2-Propanol (PS und Topas) bzw. Tickopur (PMMA) 15 min im Ultraschallbad gereinigt.

Die NanoWellSlides (NWS) wurden von der Fa. microParts (Dortmund) hergestellt. Sie wurden aus geschwärztem Topas mittels Spritzgusstechnik hergestellt. Zur Deckelung wurde eine transparente Adhäsionsfolie verwendet.

RfS-Transducer

Für die reflektometrischen Untersuchungen wurden 10 x 10 x 1 mm große Glasplättchen aus D263-Glas verwendet, auf die eine optische Vergütungsschicht von 45 nm Ta_2O_5 und 20 nm SiO_2 aufgebracht war. Die Plättchen wurden von der Fa. Mikroschichtoptik GmbH (MSO Jena) gefertigt.

3.2 Geräte und Methoden

3.2.1 Array-Printing

TopSpot®

Für die parallele Probendosierung wurde ein modifizierter TopSpot/E der Fa. HSG-IMIT (Villingen) verwendet. Über die integrierte Temperatursteuerung wurde der Druckkopf auf eine Solltemperatur von 5 °C oberhalb des Taupunkts von Wasser gekühlt, um einerseits die Verdunstung der Lösungen aus dem Druckkopf möglichst gering zu halten, andererseits die Kondensation von Wasser aus der Umgebungsluft zu verhindern. Auf einem xy-Tisch konnten Objektträger, Kunststoff-Slides und NanoWellSlides passgenau eingespannt und justiert werden.

MicroDrop

Für die Untersuchungen zur Oberflächen-Charakterisierung mittels Ellipsometrie und AFM sowie für die RfS-Messungen wurde eine gleichmäßige und dichte Belegung der Topas-Oberfläche mit DNA-Spots benötigt. Dazu wurde mit Hilfe einer piezogesteuerten MicroDrop-Mikropipettier-Anlage der Fa. Microdrop Technologies GmbH (Norderstedt) ein dichtes Array aus ca. 1000 Spots (35 x 35) auf einen Bereich von etwa 3 mm x 3 mm gespottet. Es wurde eine Mikrodosierpipette mit 70 µm Innendurchmesser verwendet, mit der Tropfenvolumina von 50 bis 500 pL erzeugt werden können. Die Slides wurden während des Dosiervorgangs auf 40 °C geheizt, um ein schnelles Eintrocknen der Spots zu gewährleisten.

Für die Ellipsometrie- und AFM-Messungen wurden BP-DNA-Lösungen (1 µM) verwendet. Für die Ellipsometriemessungen wurden zwei nebeneinander liegende Arrays gespottet, um den ovalen Messspot vollständig abzudecken.

Für die RfS-Messungen wurden 4 Arrays leicht versetzt direkt übereinander gespottet, so dass eine nahezu flächige Beschichtung der Oberfläche erreicht wurde.

Pin-Printer

Für die Antikörper-Arrays wurde ein Pin-Printer Modell MicroSys PA Series der Fa. Genomic Solutions verwendet. Der Durchmesser des Quill-Pins betrug 150 µm. Alle Slides wurden bei 50% relativer Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur bedruckt.

3.2.2 Oberflächenbehandlung

UV-Bestrahlung

Die Bestrahlung der Kunststoffträger wurde in einem UVP Ultraviolet Crosslinker, Modell CL-1000 M ($\lambda_{em} = 302 \text{ nm}$) durchgeführt. Die 5 UV-Entladungsröhren (je 8 Watt) lieferten eine Strahlungs-Flächenleistung von etwa $3600 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Über ein Eingabefeld konnte die Bestrahlungsdauer bzw. die Gesamt-Strahlungsleistung vorgegeben werden.

Für die Arbeiten mit Antikörpern wurde eine UV-Handlampe Typ UV-H 253 der Fa. Panacol-Elosol (Oberursel) verwendet. Der Metallhalogenidstrahler war mit einer Filterscheibe (Blaufilter, 320 bis 450 nm) ausgestattet und lieferte eine UV-A-Strahlungsleistung von 30 W bzw. 3 W bei 315 bis 400 nm. Die Kunststoffträger wurden in einem Abstand von 10 cm zur Filterscheibe bestrahlt.

Plasmabehandlung

Für die Plasmabehandlung der Topas-Plättchen wurde ein 100-E Plasma System der Fa. TechnicsPlasma GmbH (Kirchheim) verwendet. Die Oberflächen wurden 5 min unter Sauerstoff-Plasma (0,8 bar O_2 -Druck, 300 W Leistung) verascht.

Spincoating

Zur Präparation der Topas-Schichten wurde ein Spincoater des Typs Convac 1001 der Fa. Convac (Wiernsheim) verwendet. Zur Topas-Beschichtung der Glimmer-Plättchen für die AFM-Messungen bzw. der Interferenzglas-Slides für die RfS-Messungen wurde eine Lösung von 5 % (w/v) Topas in Toluol auf das Substrat aufgebracht und 90 s lang im Spincoater bei 2500 U/min geschleudert.

3.2.3 Fluoreszenzdetektion und Datenauswertung

BioScan

Für die Fluoreszenzdetektion wurde ein BioScan-Prototyp der Fa. Perkin Elmer / Applied Biosystems (Überlingen) verwendet. Der Aufbau dieses Geräts ist in Abb. 23 schematisch dargestellt. Der Prototyp enthielt ausschließlich Filterkomponenten, die speziell für die Detektion von Cy5 als Fluoreszenzfarbstoff ausgerichtet waren (He-Ne-Laser zur Anregung bei $\lambda = 639 \text{ nm}$, Kantenfilter EFLP 665 nm, Emissionsfilter IF 670 nm). Die Anregungsstrahlung wurde durch einen dichroitischen Strahlenteiler bereits auf 5 % reduziert

und mit Hilfe des Kantenfilters und des Emissionsfilters auf unter 0,0001 % gesperrt. Die numerische Apertur des BioScan beträgt 0,24 und die Kollektionseffizienz damit etwa 1 %.

Die Ansteuerung des BioScan wurde über die dazugehörige PC-Software vorgenommen. Die Messungen wurden mit den Standardparametern (Photomultiplier-Spannung 1000 V, Auflösung 20 µm entsprechen 1000*1000 Punkte pro Bild, 1-fach Oversampling, Vorschubgeschwindigkeit 150 mm/s, Abtastfrequenz 12.500 kHz) durchgeführt.

Die Fluoreszenzintensitäten an jedem Rasterpunkt wurden in Form eines 12 Bit-Graustufenbildes zusammengefasst. Damit die Fluoreszenzbilder von der Auswertesoftware FiPS für die quantitative Auswertung eingelesen werden konnten, musste das Dateiformat zunächst mit dem Programm ImageTool vom 2048 Byte Header (flf) in ein Tiff-Bildformat (tif) umgewandelt werden.

GMS Fluorescence Scanner

Für die Arbeiten mit Antikörpern wurde ein GMS 418 Array Scanner der Fa. Genetic Microsystems (Woburn/MA, USA) verwendet. Die Ansteuerung und Bildverarbeitung wurde mit der dazugehörigen Software vorgenommen. Die erhaltenen Bilddaten wurden direkt in einem 16 Bit Tiff-Graustufenbild abgespeichert und mit der Software FiPS ausgewertet.

Visualisierung und Auswertung der Fluoreszenzbilder

Mit der Software ImageTool wurden die Fluoreszenzbilder einerseits visualisiert und andererseits in ein Tiff-Dateiformat umgewandelt. Das Programm ImageTool wurde an der University of Texas, Health Science Center at San Antonio, entwickelt. Die in dieser Arbeit abgebildeten Fluoreszenzbilder sind in jeweils optimierter Helligkeits-/Kontrast-Einstellung dargestellt.

Die Auswertung der Arrays wurde mit Hilfe der Fluorescence Imaging and Processing Software „FiPS“ der Fa. LaVision BioTec GmbH (Bielefeld) durchgeführt. Dabei wurde die ungefähre Größe und Lage der Spots vorgegeben und die Spot-Erkennung und -Auswertung vom Programm übernommen. Durch Integration der relativen Fluoreszenz über die Spotfläche wurde schließlich die integrale relative Fluoreszenzintensität eines jeden Spots (*Spotfluoreszenz*) erhalten.

Datenauswertung

Die Datenauswertung wurde mit Microsoft Excel und Origin durchgeführt. In den in dieser Arbeit gezeigten Diagrammen zur Fluoreszenzauswertung ist zumeist die Spotfluoreszenz

dargestellt und die Anzahl n der Messwerte (Spots) angegeben, die jeweils für die Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichungen herangezogen wurden.

3.2.4 Oberflächencharakterisierung

Kontaktwinkel

Zur Messung der statischen Kontaktwinkel wurde eine Cam 200 der Fa. KSV (Helsinki, Finnland) verwendet. Die Auswertung wurde mit der dazugehörigen KSV-Software vorgenommen.

Bei der Bestimmung der Kontaktwinkel von Wasser auf Kunststoffoberflächen wurde nach der statischen Methode des aufliegenden Tropfens gearbeitet. Dazu wurde mit einer Spritze ein kleiner Wassertropfen auf der Oberfläche abgesetzt und das Tropfenprofil mit einer Kamera aufgenommen. Die Form des Tropfens wurde mit Hilfe der KSV-Software polynomisch angepasst und daraus der Kontaktwinkel bestimmt.

AFM

Für die AFM-Messungen wurde ein Multimode SPM-Gerät der Fa. Digital Instruments (Santa Barbara/CA, USA) verwendet. Alle Messungen wurden im Tapping-Modus durchgeführt.

Ellipsometrie

Die Ellipsometriemessungen der DNA-Schichten (Abschnitt 4.1.2.1) wurden direkt auf Topas-Plättchen mit einem Minsearch Ellipsometer ELX-02-C enhanced der Fa. DRE (Ratzeburg) durchgeführt, einem polarisationsmodulierten Ellipsometer mit einem HeNe-Laser als Lichtquelle. Bei der Messung wurde die Ellipse, welche durch den E-Feldvektor nach der Reflexion beschrieben wird, ausgewertet, wobei zwischen der harmonischen Analyse des Intensitätsprofils oder einem Algorithmus zur Minimumsuche gewählt werden konnte.

Zur Schichtdickenbestimmung der Topas-Schichten für die RfS-Messungen (Abschnitt 4.4.1) wurden Siliziumplättchen als Substrat verwendet und diese mit einem Spektralellipsometer ES4G der Fa. Sopra vermessen. Dieses spektroskopische Ellipsometer arbeitet in einem Wellenlängenbereich von 230 – 930 nm und besitzt als Detektoreinheit einen Doppelmonochromator mit Prisma und Gitter. Durch einen rotierenden Polarisator wird eine sinusförmige Intensitätsmodulation erzeugt, deren Intensitäten für 1/8-Intervalle integriert und über Fourieranalyse ausgewertet wurden [70].

3.2.5 RfS

Messaufbau

Die RfS-Messungen wurden an einem Einzelplatz-Aufbau durchgeführt. Als Lichtquelle wurde eine 5 V/10 W Halogenlampe mit integriertem Reflektor der Fa. Oshino Lamps (Nürnberg) verwendet. Über eine Faseroptik aus PMMA-Polymerlichtleitern (Durchmesser 1 mm) der Fa. microParts GmbH (Dortmund) wurde das Licht senkrecht auf den Transducer geführt. Das reflektierte Licht wurde in derselben Faser gesammelt und über einen Y-Faserkoppler geleitet, um schließlich in einem Diodenzeilenspektrometer MCS 410 der Fa. Zeiss (Jena) detektiert zu werden. Der optische Aufbau ist in Abb. 29a dargestellt. Zwischen Transducer und Lichtfaser wurde ein Tropfen Glycerin gebracht, um den Brechungsindexsprung zwischen Lichtleiter und Luft zu minimieren und störende Reflektivitäten zu beseitigen [71].

Die Messungen wurden im Durchfluss durchgeführt. Zur Probenhandhabung wurde ein ASIA Fließinjektionsanalyse(FIA)-System von der Fa. Ismatec (Wertheim-Mondfeld) mit zwei Peristaltikpumpen, einem Scherventil, einem Auswahlventil sowie einem Autosampler verwendet. Der schematische Aufbau ist in Abb. 29b gezeigt.

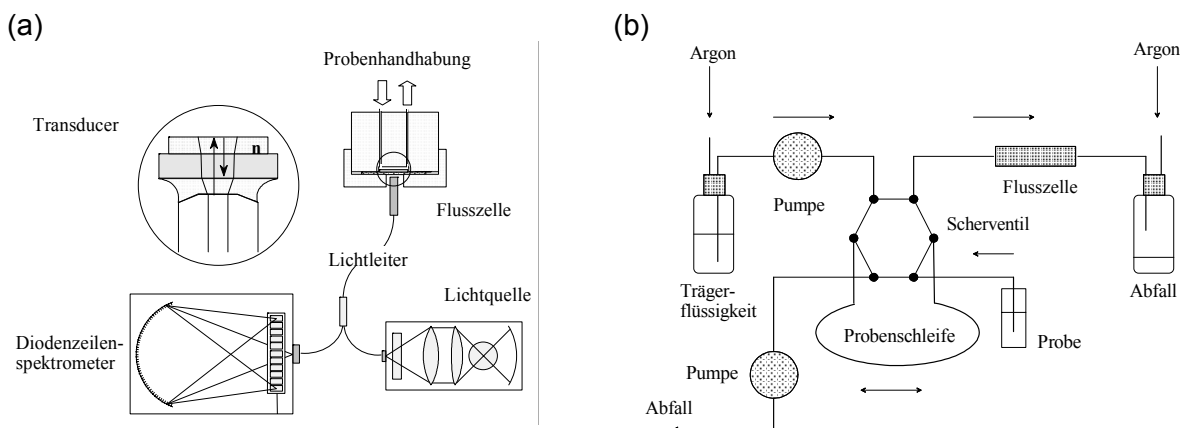


Abb. 29: Experimenteller Aufbau für die RfS-Messungen;

(a) schematischer Aufbau der optischen Komponenten; (b) Probenhandhabung mit dem FIA-System.

Durchführung der Messungen

Die Ansteuerung der Fluidik-Anlage und des Diodenzeilenspektrometers wurde über das Programm „Measure“ von G. Krauss durchgeführt. Zunächst wurde durch Spülen mit PBS eine Basislinie aufgenommen. Während dieses Schrittes wurde die Probenschleife mit der Blockungslösung (BSA, 1 mg/mL in PBS) geladen. Anschließend erfolgte die Injektion der

Lösung über die Flusszelle. Danach erfolgte ein kurzer Spülschritt mit Puffer, während die Probenschleife mit Streptavidinlösung (50 µg/mL in PBS) geladen wurde. Diese wurde anschließend in die Flusszelle injiziert, und nach einem weiteren kurzen Spülschritt erfolgte schließlich die Regeneration mit SDS (0,5 %, pH 1,8).

Datenauswertung

Zur Auswertung der Interferenzspektren wurde das Programm „IFZ“ von A. Brecht und G. Kraus verwendet. Jedes Spektrum wurde durch Aufsummieren von 14 Einzelmessungen mit einer Integrationszeit von je 30 ms mit dem Diodenzeilenspektrometer erstellt. Das gemessene Reflexionsspektrum $I(\lambda)$ wurde mit dem Dunkelsignal $I_z(\lambda)$ korrigiert und auf ein Referenzspektrum $I_r(\lambda)$, dem Reflexionsspektrum eines unbeschichteten Glastransducers, referenziert. Das korrigierte Interferenzspektrum $I_k(\lambda)$ ergibt sich wie folgt:

$$I_k(\lambda) = \frac{I(\lambda) - I_z(\lambda)}{I_r(\lambda) - I_z(\lambda)} \quad (9)$$

An ein ausgewähltes Extremum des korrigierten Interferenzspektrums zwischen 500 und 600 nm wurde eine Parabel angepasst, um so die Verschiebung des Extremums zeitaufgelöst zu beobachten.

3.3 Synthesen

3.3.1 Synthese von Photolinker-DNA

Die Modifikation der aminofunktionalisierten DNA mit verschiedenen Photolinkern wurde nach einem DNA-Labeling-Protokoll für aminoreaktive Farbstoffe von Molecular Probes durchgeführt. Der Photolinker wurde zunächst mit NHS/DCC in DMF voraktiviert und der NHS-Aktivester anschließend in Borat-Puffer (pH 8,5) mit der aminofunktionalisierten DNA umgesetzt.

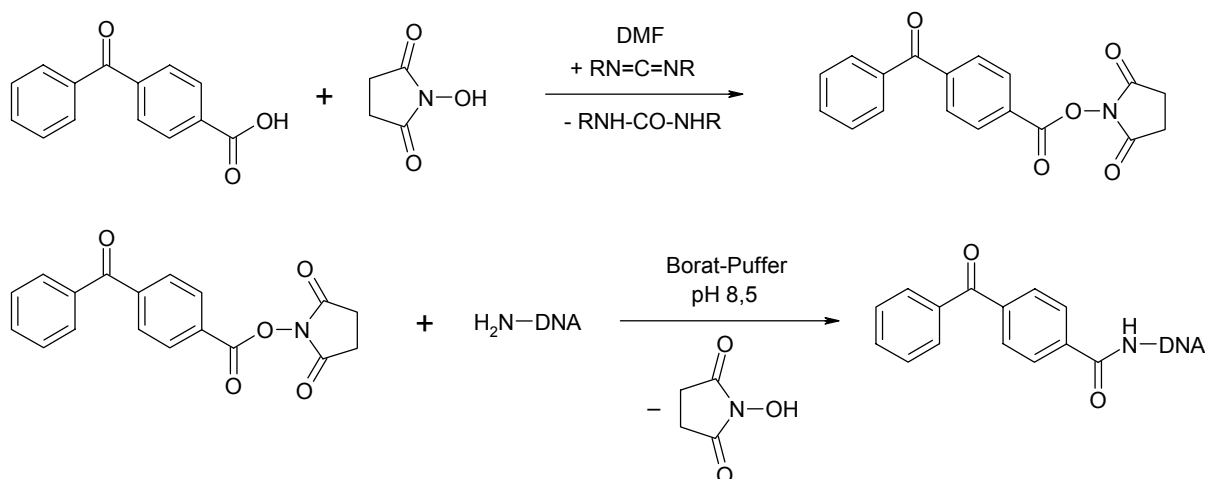


Abb. 30: Kopplung des Photolinkers an aminofunktionalisierte DNA am Beispiel des Benzophenon-Derivats.

Aktivierung des Photolinkers

6,8 mg (33 μ mol) DCC und 2,8 mg (24 μ mol) NHS wurden in 100 μ L DMF (wasserfrei) gelöst und die Lösung im Eisbad gekühlt. 22 μ mol Photolinker (5 mg BBS, 5,6 mg AQS, 4,6 mg ANBS oder 5,1 mg TDBS) wurden ebenfalls in 100 μ L DMF (wasserfrei) gelöst und gekühlt. Beide Lösungen wurden vereinigt und über Nacht auf dem Rütteltisch umgesetzt. Das ausgefallene Harnstoff-Derivat wurde abzentrifugiert (12.000 U/min, 5 min) und die überstehende Lösung abdekantiert.

Die DMF-Lösung des Photolinker-Aktivesters (110 mM) wurde jeweils frisch hergestellt und gleich weiterverwendet.

Umsetzung des aktivierten Photolinkers mit aminofunktionalisierter DNA

50 μ L einer 100 μ M DNA-Lösung (NH₂-DD1b23) wurden in 200 μ L Borat-Puffer (pH 8,5) gelöst und 1 μ L der DMF-Lösung des aktivierten Photolinkers zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mindestens eine Stunde auf dem Rütteltisch umgesetzt. Die Reinigung erfolgte über Ethanol-Fällung.

Ethanolfällung

Zum Reaktionsgemisch wurde ein Zehntel des Volumens einer 3M NaCl-Lösung und das Zweieinhalbfache des Volumens kaltes, absolutes Ethanol zugegeben. Die Lösung wurde gut gemischt, über Nacht bei -20°C gekühlt und die ausgefallene DNA anschließend 30 min abzentrifugiert (12.000 U/min). Die überstehende Lösung wurde abgenommen und der Niederschlag zweimal mit kaltem 70 % Ethanol gewaschen.

Die gefällte DNA wurde in 50 μL H_2O gelöst und damit die Ausgangskonzentration der 100 μM DNA-Stammlösung wiederhergestellt (ein geringer Verlust durch die Ethanolfällung wurde vernachlässigt). Eine Abtrennung der nicht umgesetzten DNA war nicht notwendig, da diese bei der Photoimmobilisierung nicht störte.

3.3.2 Synthese von Photodextran

Aktivierung des Photolinkers

61,8 mg (0,3 mol) DCC und 25,4 mg (0,22 mol) NHS wurden in 500 μL DMF (wasserfrei) gelöst und die Lösung im Eisbad gekühlt. 45,2 mg (0,2 mol) BBS wurden ebenfalls in 500 μL DMF (wasserfrei) gelöst und gekühlt. Beide Lösungen wurden vereinigt und über Nacht auf dem Rütteltisch umgesetzt. Das ausgefallene Harnstoff-Derivat wurde abzentrifugiert (12.000 U/min, 5 min) und die überstehende Lösung abdekantiert.

Die DMF-Lösung des BBS-Aktivesters (0,2 M) wurde jeweils frisch hergestellt und gleich weiterverwendet.

Umsetzung von AMD mit aktiviertem Photolinker

50 mg AMD (enthalten 20 μmol NH_2 -Funktionen) wurden in 1 mL H_2O gelöst, alle 30 min mit je 50 μL BBS-Aktivester-Lösung in DMF versetzt und die Lösung zwischendurch gerührt (Rütteltisch). Es wurden insgesamt $10 \times 50 \mu\text{L} = 500 \mu\text{L}$ DMF-Lösung zugegeben (entsprechen 100 μmol Photolinker) und das Reaktionsgemisch anschließend noch 1 Stunde gerührt. Die ausgefallenen Nebenprodukte wurden abzentrifugiert (12.000 U/min, 10 min) und die Lösung abdekantiert. Um den hohen Anteil an DMF zu entfernen, wurde die Lösung bis zur Trockne lyophilisiert und in 500 μL H_2O wieder gelöst. Die Aufreinigung erfolgte über Methanolfällung.

Methanolfällung

Die umgesetzte Dextranlösung wurde mit 1 % des Volumens 6N HCl und 250 % des Volumens Methanol versetzt, kräftig gerührt und mindestens 1 Stunde bei -20°C gekühlt. Das ausgefallene Dextran wurde abzentrifugiert (12.000 U/min, mindestens 10 min) und die überstehende Methanol/Wasser-Lösung entfernt. Der Niederschlag wurde zweimal mit je 200 μL Methanol gewaschen und anschließend nochmals in 500 μL H_2O gelöst und lyophilisiert, da das Dextran so eine flockige Beschaffenheit bekam und sich besser dosieren ließ.

3.3.3 Synthese von Amino-Photodextran

Die Synthese von Amino-Photodextran unterscheidet sich von der des Photodextrans durch einen geringeren Umsetzungsgrad der Aminofunktionen des AMD mit Photolinkern. Dies wurde erreicht, indem BBS-Aktivester in deutlich geringerer Menge zugesetzt wurde. Eine niedrig konzentrierte BBS-Aktivester-Lösung wurde nach der Vorschrift in Abschnitt 3.3.1 erhalten.

Umsetzung von AMD mit aktiviertem Photolinker (BBS)

10 mg AMD (enthalten 4,4 μmol NH_2 -Funktionen) wurden in 200 μL H_2O gelöst und mit 40 μL BBS-Aktivester-Lösung in DMF (entsprechen 4,4 μmol Photolinker) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt (Rütteltisch), anschließend die ausgefallenen Nebenprodukte abzentrifugiert (12.000 U/min, 10 min) und die Lösung abdekantiert. Die Aufreinigung erfolgte über Methanolfällung (s. Abschnitt 3.3.2).

3.3.4 Synthese von Biotin-Photodextran

Aktivierung des Photolinkers

Eine konzentrierte BBS-Aktivester-Lösung wurde nach der Vorschrift in Kap. 3.3.2 hergestellt.

Umsetzung von AMD mit aktiviertem Photolinker und mit Biotin-Aktivester

50 mg AMD (enthalten 20 μmol NH_2 -Funktionen) wurden in 500 μL H_2O gelöst. Unter ständigem Rühren (Rütteltisch) wurden in 30-minütigem Abstand zunächst 50 μL einer 0,2 M Lösung von Biotin-NHS-Ester in DMF (wasserfrei) und anschließend 50 μL BBS-Aktivester-Lösung zugegeben. Dies wurde solange wiederholt, bis insgesamt $2 \times 50 \mu\text{L} = 100 \mu\text{L}$ Biotin-X-NHS (entsprechen 20 μmol Biotin) und $3 \times 50 \mu\text{L} = 150 \mu\text{L}$ BBS-NHS (entsprechen 30 μmol Photolinker) zugegeben wurden. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend über Nacht gerührt. Die ausgefallenen Nebenprodukte wurden abzentrifugiert (12.000 U/min, 10 min) und die Lösung abdekantiert. Um den hohen Anteil an DMF zu entfernen, wurde die Lösung bis zur Trockne lyophilisiert und in 500 μL H_2O wieder gelöst. Die Aufreinigung erfolgte über Methanolfällung (s. Abschnitt 3.3.2).

3.3.5 Biotinylierung der Antikörper

Die Biotinylierung der Antikörper wurde gemäß dem Biotinylierungs-Protokoll für EZ-Link™ NHS-LC-Biotin (Pierce) durchgeführt.

100 µL einer Lösung von 3 mg/mL anti-BSA in PBS wurden mit 7,5 µL einer frisch bereiteten DMF-Lösung von 1 mg/mL NHS-LS-Biotin versetzt und 2 Stunden auf Eis inkubiert. Die Reaktionslösung wurde in einer 12stündigen Dialyse (Dialyseschlauch: Pierce SnakeSkin® Pleated Dialysis Tubing, 10.000 MWCO) in 2 L PBS aufgereinigt. Die Konzentration der erhaltenen Antikörperlösung wurde durch Absorptionsmessung bestimmt.

3.4 DNA-Arrays

Die DNA-Arrays wurden hauptsächlich auf Kunststoff-Slides hergestellt, zum einen durch Modifizierung der DNA-Sonden mit Photolinker und anschließender Photoimmobilisierung, zum anderen durch indirekte Photoimmobilisierung mit Hilfe von Photodextran. Als Referenz wurden DNA-Arrays auch nach herkömmlichen Protokollen [1] auf Dextran-modifizierten Glas-Slides hergestellt.

3.4.1 DNA-Arrays auf Kunststoff-Slides

Im Folgenden ist die Herstellung von DNA-Arrays mit optimierten Konzentrationen und Bestrahlungszeiten dargestellt. Für einige Experimente wurden diese Parameter variiert.

a) Direkte Photoimmobilisierung von Photolinker-DNA

Auf ein gereinigtes Kunststoff-Slide (aus PMMA, PS oder Topas) wurden mit dem TopSpot (24-Medien-Druckkopf) Lösungen von Photolinker-DNA (vgl. Abschnitt 3.3.1) in H₂O (5 µM) gedruckt. Die eingetrockneten Arrays wurden 30 min unter UV-Licht bestrahlt und anschließend 15 min mit Wasser im Ultraschallbad gereinigt.

b) Indirekte Photoimmobilisierung von DNA über Photodextran

Eine Lösung aus DNA und Photodextran (vgl. Abschnitt 3.3.2) in H₂O (DNA: 5 µM, PD: 0,3 mg/mL) wurde mit Hilfe des TopSpot auf ein Kunststoff-Slide gedruckt und anschließend 30 min durch UV-Bestrahlung immobilisiert. Die ungebundenen Komponenten wurden durch Reinigung im Ultraschallbad (15 min in SDS, 5 min in Wasser) entfernt.

c) Immobilisierung von DNA auf Amino-Photodextran

Ein Kunststoff-Slide wurde zunächst flächig mit Amino-Photodextran beschichtet. Dazu wurde eine Lösung aus 1 mg/mL Amino-Photodextran in H₂O auf ein Slide aufgebracht, mit einem Deckgläschen zugedeckt und die Ränder mit PDMS versiegelt¹. Die Slides wurden 60 min im UV-Crosslinker bestrahlt und anschließend mit Aceton, 2-Propanol und Wasser gereinigt. Die nun folgende Umfunktionalisierung der Aminogruppen sowie die Anbindung der DNA-Oligonukleotide wurde gemäß dem Protokoll für Glasoberflächen durchgeführt (s. Abschnitt 3.4.3).

Blockung der Oberfläche

Die Kunststoff-Slides mit den DNA-Arrays wurden mit einer Lösung aus 1 mg/mL BSA in 2x SSC und 0,1 % SDS geblockt. Dazu wurde ein Tropfen der Blockungslösung auf ein Slide gegeben und dieses mit einem zweiten, umgedrehten Slide abgedeckt (Sandwich-Verfahren). Nach 30 min Inkubation in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre wurden die Slides mit PBS und H₂O abgespült und unter Stickstoff trockengeblasen.

Hybridisierung

Das geblockte Kunststoff-Slide wurde mit einer Lösung von 1 µM DNA (Cy5-DD1a23) in PBS im Sandwich-Verfahren 30 min lang unter Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen und mit Stickstoff trockengeblasen. Die Fluoreszenz wurde direkt im Anschluss im BioScan ausgelesen.

3.4.2 DNA-Arrays auf dem NanoWellSlide (NWS)

Array-Printing und Deckelung

Vor Verwendung wurde das NWS 15 min mit einer 1:1-Mischung (v/v) aus 2-Propanol und Wasser im Ultraschallbad gereinigt.

Mit dem TopSpot (96-Medien-Druckkopf, Spezialanfertigung) wurden die Sonden (Photolinker-DNA oder DNA/Photodextran-Mischung) in die Kavitätenböden des NWS gedruckt. Eine visuelle Druck-Kontrolle wurde durchgeführt, um eventuelle Randtreffer frühzeitig zu erkennen; diese Spots wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

¹ Eine Versiegelung der Slides war notwendig, um eine Verdunstung der Reaktionslösung während der UV-Bestrahlung zu verhindern.

Das bedruckte NWS wurde 30 min im UV bestrahlt und anschließend 15 min mit 2-Propanol/Wasser im Ultraschallbad gereinigt. Die mikrofluidischen Strukturen wurden mit einer transparenten Adhäsionsfolie gedeckelt, aus der zuvor der Bereich der Befüllports ausgestanzt wurde.

Blocken der Kanäle

Die Kanäle wurden mit einer Lösung aus 1 mg/mL BSA, 0,1 % SDS und 0,1 % Triton in 2x SSC-Puffer befüllt und mindestens 30 min unter Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre inkubiert. Die Lösung wurde anschließend über den Vakuumpport abgezogen.

Hybridisierungs-Assay

Eine DNA-Lösung in 5x SSPET-Puffer wurde in die Kanäle appliziert und mindestens 30 min unter Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre inkubiert. Am Vakuumpport wurde die Probenlösung abgezogen und die Kanäle zweimal mit 5x SSPET-Puffer gewaschen.

Für die Detektion der PCR-Produkte wurde im Anschluss an die Hybridisierung eine Lösung von 5 µg/mL Streptavidin-Cy5 in 5x SSPET-Puffer in die Kanäle appliziert und 30 min unter Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre inkubiert. Die Lösung wurde über den Vakuumpport abgezogen und die Kanäle zweimal mit 5x SSPET-Puffer gewaschen.

Fluoreszenzdetektion

Das NWS wurde im BioScan ausgelesen. Da lediglich ein Bereich von 2 x 2 cm erfasst werden konnte, wurden zwei Fluoreszenzbilder erstellt, um alle Fluoreszenzspots detektieren zu können.

3.4.3 DNA-Arrays auf Glasoberflächen

Aktivierung und Silanisierung der Glas-Slides

Die Glas-Slides wurden 20 min im Ultraschallbad in einem Gemisch aus zwei Teilen konzentrierter Schwefelsäure und einem Teil Wasserstoffperoxid-Lösung (30%) gereinigt, mit Wasser gewaschen und unter Stickstoff getrocknet. Jedes Slide wurde mit etwa 300 µL GOPTS beschichtet und eine Stunde abgedeckt stehengelassen, danach mit trockenem Aceton gewaschen und unter Stickstoff getrocknet.

Dextran-Beschichtung der Glasslides

Eine Lösung von 100 mg AMD in 300 μL H_2O wurde auf ein silanisiertes Glasplättchen aufgetragen und dieses mit einem zweiten abgedeckt (Sandwichverfahren). Die Slides wurden über Nacht in einer mit Wasserdampf gesättigten Kammer gelagert und anschließend mit Wasser gereinigt und unter Stickstoff getrocknet.

Umfunktionalisierung der Dextranschicht

Auf die Glasplättchen wurde festes Glutarsäureanhydrid (GA) gegeben und dieses im Sandwichverfahren bei 70 °C im Ofen zwei Stunden lang aufgeschmolzen. Das überschüssige GA wurde mit Wasser abgespült und die Slides unter Stickstoff getrocknet.

Aktivierung der Oberfläche

Die carboxyfunktionalisierten Glasslides wurden mit einer Lösung aus 23 mg NHS (1 M) und 62 mg DCC (1,5 M) in 200 μL DMF (wasserfrei) beschichtet und im Sandwichverfahren mindestens vier Stunden in einer mit DMF gesättigten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Slides mit DMF gespült und unter Stickstoff getrocknet.

DNA-Array-Printing

Die frisch aktivierten Slides wurden direkt im Anschluss mit den DNA-Arrays aus aminofunktionalisierten DNA-Sonden bedruckt. Dazu wurde das Glasslide auf einer Heizplatte auf ca. 40 °C vorgeheizt. Mit dem TopSpot wurden die Arrays sehr zügig aufgedruckt und das Slide schnell wieder erhitzt. Diese Prozedur wurde fünfmal wiederholt; dabei wurden die Prints jeweils auf die gleiche Stelle gesetzt. Zum Schluss wurde das Slide noch einmal 10 min bei 40 °C erhitzt.

Desaktivierung der Oberfläche

Die verbleibenden Aktivesterguppen auf der Oberfläche wurden mit Ethanolamin desaktiviert, indem die Oberfläche mit einer 1 M Lösung von Ethanolamin-hydrochlorid in H_2O (pH 8) bedeckt und 10 min in einer Reaktionskammer inkubiert wurde. Die Oberfläche wurde anschließend mit Wasser gewaschen und unter Stickstoff getrocknet.

Hybridisierungs-Assay

Die Blockung der Oberfläche und die Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierter Proben-DNA wurde wie auf den Kunststoff-Slides (vgl. Abschnitt 3.4.1) durchgeführt.

3.5 Antikörper-Arrays

Die Arbeiten mit Antikörpern wurden im Optical Sensors Laboratory an der Dublin City University (Irland) durchgeführt. Dort standen für die experimentelle Durchführung andere Gerätschaften zur Verfügung. Für die Sondenaufgabe wurde ein MicroSys Pinprinter statt des TopSpot verwendet, für die UV-Bestrahlung eine UV-Handlampe statt des UVP Crosslinkers und für die Fluoreszenzdetektion ein GSM-Fluoreszenzscanner statt des BioScan.

Als Trägermaterialien standen Kunststoff-Slides aus Zeonor und PMMA zur Verfügung. Diese wurden vor ihrer Verwendung 10 min im Ultraschallbad in H₂O gereinigt, mit 2-Propanol und H₂O abgespült und unter Stickstoff getrocknet.

3.5.1 Photoimmobilisierung von Antikörpern mit Photodextran

Auf ein gereinigtes Kunststoff-Slide wurde mit Hilfe des Pinprinters eine Konzentrationsreihe aus anti-BSA-Antikörper (Konzentration 0,9 – 900 µg/mL in PBST) unter Zusatz von Photodextran (0,3 mg/mL) in Form eines Arrays (je 3 gleiche Spots) gespottet. Die Arrays wurden 60 min mit UV-Licht bestrahlt und anschließend mit H₂O gereinigt.

3.5.2 Immobilisierung biotinylierter Antikörper auf Avidin-Schichten

Die Beschichtung der Kunststoffoberflächen mit Avidin wurde nach zwei verschiedenen Strategien durchgeführt.

Photoimmobilisierung von Avidin mit Photodextran (Strategie A)

Auf ein gereinigtes Kunststoff-Slide wurden 100 µL einer Lösung aus 10 µg/mL Avidin und 0,3 mg/mL Photodextran in PBS aufgegeben und mit einem Deckgläschen zugedeckt (Sandwich-Verfahren). Die Ränder dieses Sandwichs wurden mit frisch zubereiteter PDMS-Polymerisationslösung versiegelt¹ und das Slide 60 min unter UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurde das Slide mit PBS und H₂O abgespült.

¹ Eine Versiegelung der Slides war notwendig, um eine Verdunstung der Reaktionslösung während der UV-Bestrahlung zu verhindern.

Immobilisierung von Biotin-Photodextran und Anbindung von Avidin (Strategie B)

Auf ein gereinigtes Kunststoff-Slide wurden 100 μL einer Lösung aus 0,3 mg/mL Biotin-Photodextran in PBS aufgegeben und mit einem Deckgläschen zugedeckt. Die Ränder des Sandwichs wurden mit PDMS-Polymerisationslösung versiegelt, das Slide 60 min unter UV-Licht bestrahlt und anschließend mit PBS und H_2O abgespült.

100 μL einer Lösung von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Avidin in PBS wurden auf das Kunststoff-Slide gegeben, mit einem Deckgläschen gedeckelt und unter Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre 60 min inkubiert. Anschließend wurde das Slide mit PBS und H_2O abgespült.

Array-Printing

Auf ein Avidin-beschichtetes Slide wurde mit Hilfe des Pinprinters eine Konzentrationsreihe aus biotinyliertem anti-BSA-Antikörper (Konzentration 0,3 – 900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBST) in Form eines Arrays (je 3 gleiche Spots) gespottet. Die Arrays wurden 12 Stunden unter 75 % Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend mit PBS und H_2O gereinigt.

3.5.3 Antikörper-Bindungs-Assay

Blockung der Oberfläche

Die fertigen Antikörper-Arrays aus den Abschnitten 3.5.1 und 3.5.2 wurden zunächst mit Ovalbumin blockiert, um unspezifische Bindung des BSA zu verhindern. Dazu wurden die Slides in einer Lösung von 5 % (w/v) Ovalbumin in PBS bei 37 °C für eine Stunde inkubiert und anschließend mit PBS und H_2O gereinigt.

Bindung von Cy5-BSA

Eine Lösung von 0,1 mg/mL Cy5-BSA und 2 % Ovalbumin in PBS wurde auf die geblockten Kunststoff-Slides gegeben und im Sandwich-Verfahren für 30 min unter Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre inkubiert. Die Slides wurden anschließend mit PBST und H_2O abgespült, mit Stickstoff trockengeblasen und die Fluoreszenz im GSM-Fluoreszenzscanner ausgelesen.

4 Ergebnisse und Diskussion

Den Ausgangspunkt dieser Arbeit stellte ein photochemisches Verfahren dar, mit dem DNA-Oligonukleotide gerichtet an Kunststoffoberflächen immobilisiert werden konnten. In diesem Verfahren wurden heterobifunktionelle photoaktivierbare Crosslinker, sog. *Photolinker*, verwendet. Sie wurden zunächst an DNA-Oligonukleotide gekoppelt und in Arrayform auf die Kunststoffoberfläche gedruckt. Durch UV-Bestrahlung wurden die Photolinker in einer photolytischen Reaktion mit der sonst chemisch relativ inerten Polymeroberfläche zur Reaktion gebracht. Hierdurch wurde eine direkte kovalente Anbindung der DNA an das Kunststoffsubstrat geschaffen. Erste Voruntersuchungen zur prinzipiellen Durchführbarkeit dieser *direkten* Immobilisierung wurden im Rahmen der Diplomarbeit „Parallele photoinduzierte Immobilisierung von DNA-Oligonukleotiden auf Kunststoffträgern zur Herstellung von DNA-Mikroarrays“ [1] durchgeführt.

Davon ausgehend wurde nun die Methode der *direkten* Photoimmobilisierung optimiert und charakterisiert (Kap. 4.1). Dazu wurden verschiedene Photolinker und Kunststoff-Substrate miteinander verglichen sowie umfangreiche Untersuchungen zur eingesetzten DNA-Konzentration und zur Bestrahlungsdauer durchgeführt. Gleichzeitig wurden die erhaltenen DNA-Schichten mittels Ellipsometrie und AFM charakterisiert.

Darüber hinaus wurden neue Methoden der Photoimmobilisierung entwickelt (Kap. 4.2). Diese Methoden basieren nicht auf der Modifizierung der DNA-Sonden mit dem Photolinker, sondern auf einer *indirekten* Photoimmobilisierung unmodifizierter DNA-Sonden mit Hilfe eines photoaktiven Dextran-Polymers. Hier werden nun neben dem Kunststoff-Substrat auch die DNA-Sonden selbst über die Photoreaktion des Photolinkers gebunden (vgl. Abb. 31).

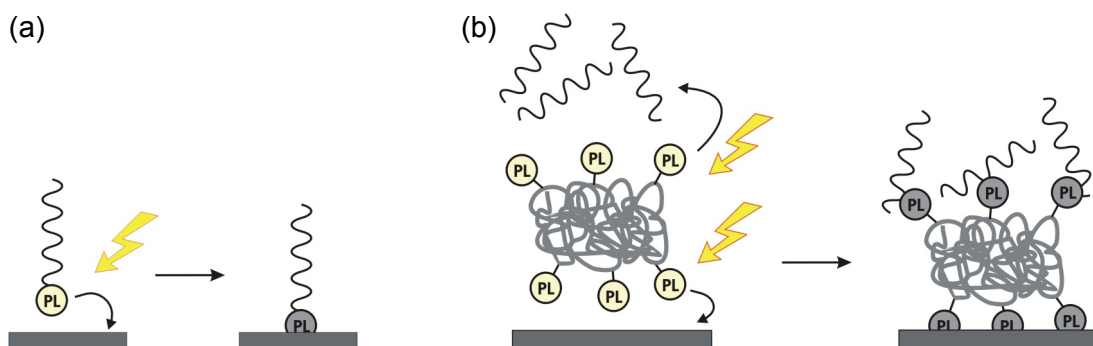


Abb. 31: Schematische Darstellung von (a) direkter und (b) indirekter Photoimmobilisierung von DNA.

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Methode der Photoimmobilisierung nicht nur für die Herstellung planarer DNA-Mikroarrays geeignet ist, sondern auch auf andere Systeme

übertragbar ist. Die Vielseitigkeit des Verfahrens wurde anhand verschiedener Einsatzmöglichkeiten dargestellt:

- die Anwendung auf einer neu entwickelten mikrofluidischen Plattform (Kap. 4.3),
- die Verwendung für biosensorische Systeme (Kap. 4.4),
- die Immobilisierung von Antikörpern (Kap. 4.5).

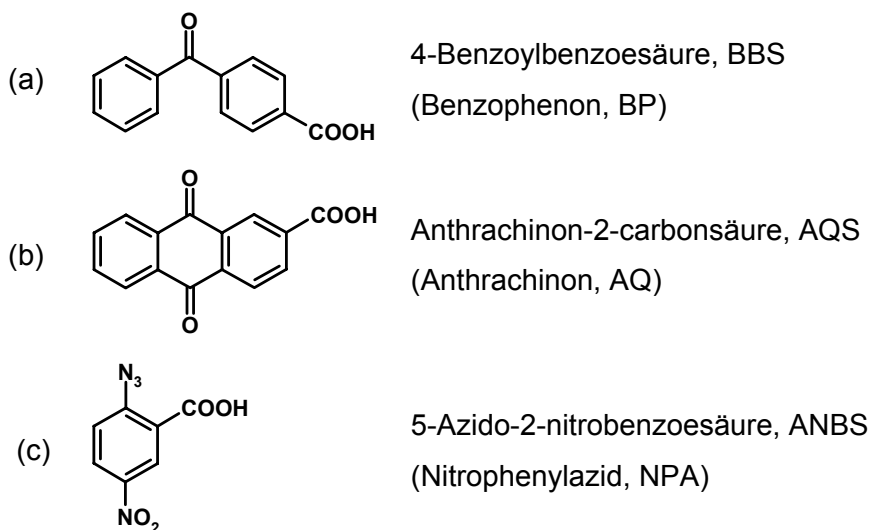
4.1 Direkte Photoimmobilisierung: Optimierung und Charakterisierung

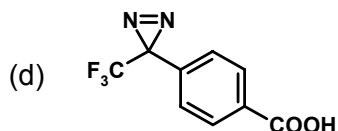
Die direkte Photoimmobilisierung ist eine einfache und schnelle Methode zur Anbindung von DNA-Oligonukleotiden oder anderen Biomolekülen auf Kunststoffoberflächen. Die DNA-Oligonukleotide werden dafür mit einem Photolinker modifiziert; dies kann entweder schon während der Oligonukleotid-Synthese geschehen oder durch post-synthetische Modifizierung. Die modifizierte DNA kann z. B. in Form von Arrays auf das Kunststoff-Substrat aufgebracht und durch UV-Bestrahlung direkt und kovalent an die Oberfläche gebunden werden. Dies ist möglich, da die Photolinker durch UV-Bestrahlung in einer Photoreaktion mit der sonst chemisch relativ inerten Polymeroberfläche reagieren, indem sie durch die Photoaktivierung reaktive Zwischenstufen wie Diradikale, Nitrene oder Carbene bilden (vgl. Kap. 2.2).

In diesem Abschnitt werden Untersuchungen zur Bindungseffizienz verschiedener Photolinker auf unterschiedlichen Kunststoffen diskutiert sowie die Oberflächen-Charakterisierung der erzeugten DNA-Schichten mittels Ellipsometrie und AFM vorgestellt.

4.1.1 Charakterisierung der Photolinker

Um die Eigenschaften unterschiedlicher Photolinker hinsichtlich ihrer Bindungseffizienz auf verschiedenen Kunststoffsubstraten zu testen, wurden aus der Liste der zur Verfügung stehenden Photolinker (vgl. Kap. 2.2) die folgenden vier Spezies ausgewählt:





p-(3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzoesäure, TDBS
(Trifluormethyl-phenyldiazirin, TPD)

Die Photolinker unterscheiden sich lediglich in ihrer Photochemie. Bei UV-Bestrahlung werden die Benzophenon- und Anthrachinon-Derivate (a und b) in diradikalische Triplettzustände angeregt, die unter Wasserstoffabspaltung aus dem Substrat zu Ketylradikalen reagieren, wodurch im Substrat ebenfalls ein Radikal generiert wird. Die beiden Radikale können schließlich unter Ausbildung einer kovalenten Bindung rekombinieren (Kap. 2.2.1 und 2.2.2). Dagegen spalten die Phenylazide und Diazirine (c und d) unter UV-Bestrahlung irreversibel Stickstoff ab. Dabei wird ein hochreaktives Nitren bzw. Carben gebildet, welches z. B. in die CH-Bindungen des Polymersubstrats insertieren kann (Kap. 2.2.3 und 2.2.4). Alle vier Photolinker lassen sich bei Wellenlängen > 300 nm aktivieren, so dass die DNA durch die UV-Bestrahlung nicht zerstört wird.

4.1.1.1 Experimentelles Konzept

Die Charakterisierung der Photolinker wurde anhand von DNA-Arrays auf Kunststoffoberflächen durchgeführt. DNA-Moleküle weisen gegenüber anderen Biomolekülen verschiedene Vorteile auf. DNA-Oligonukleotide lassen sich synthetisch herstellen und sind damit einfach zugänglich und in hoher Reinheit verfügbar. Sie besitzen definierte Eigenschaften insbesondere hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften bei der Affinitätsbindung komplementärer DNA-Stränge (Hybridisierung). Auch zeigen DNA-Moleküle nur geringe unspezifische Wechselwirkungen mit hydrophoben Kunststoffoberflächen, so dass die kovalente Immobilisierung über Photolinker nicht durch adsorptive Bindungen überlagert wird.

Versuchsplanung

Mit Hilfe der Photolinker wurden DNA-Arrays hergestellt, indem die DNA gerichtet und direkt auf die Kunststoffoberfläche immobilisiert wurde. Dazu wurden in einer thermochemischen Reaktion zunächst die Photolinker über ihre Carboxylgruppe an das 5'-Ende eines aminofunktionalisierten 23mer DNA-Oligonukleotids (NH₂-DD1b23, siehe Anhang) gekoppelt (vgl. Abb. 30, S. 56). Die erhaltene Photolinker-DNA wurde mit Hilfe des TopSpot in Arrayform auf Kunststoffslides gedruckt. Die Kunststoff-Slides wurden mit UV-Licht bestrahlt, wodurch die kovalente Anbindung der DNA an das Kunststoffsubstrat erzielt wurde.

Die so hergestellten DNA-Arrays wurden in einem Hybridisierungs-Assay prozessiert (Abb. 32). Dazu wurden die Slides zunächst mit BSA-Lösung geblockt, um unspezifische

Bindung der Proben-DNA an die Kunststoffoberfläche zu verhindern. Anschließend wurden die DNA-Arrays mit komplementärer, fluoreszenzmarkierter Proben-DNA (Cy5-DD1a23) hybridisiert. Dabei wurde durch hohe Konzentrationen des Komplementärstrangs einerseits und lange Inkubationszeiten andererseits eine vollständige Hybridisierung aller oberflächengebundenen DNA-Sonden gewährleistet.

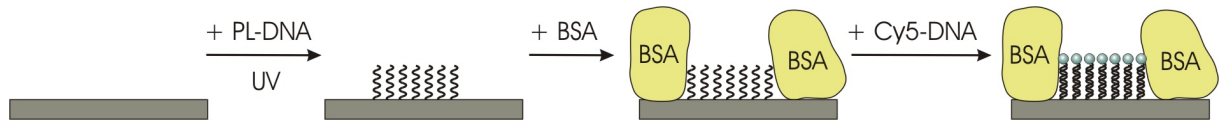


Abb. 32: Schematische Darstellung der Photoimmobilisierung, Oberflächen-Blockung und Hybridisierung.

Um die Bindungseigenschaften der Photolinker eingehend zu studieren, wurden in einer Versuchsreihe verschiedene Parameter bei der Arrayherstellung variiert.

Untersucht wurden insgesamt:

- vier Photolinker (BP – AQ – NPA – TPD)
- drei Kunststoffsubstrate (Topas – PMMA – PS, vgl. Tab. 4, S. 33)
- sechs Konzentrationen der gespotteten Photolinker-DNA (0,3 – 1 – 3 – 10 – 30 – 100 μM)
- fünf Bestrahlungszeiten (5 – 10 – 15 – 30 – 60 min)

Auswertung der Fluoreszenzmessungen

Die Kunststoff-Slides mit den prozessierten DNA-Arrays wurden im Fluoreszenzreader BioScan ausgelesen. In Abb. 33 ist beispielhaft ein solches DNA-Array gezeigt, bei dem die verschiedenen Konzentrationen spaltenweise und die verwendeten Photolinker zeilenweise arrangiert sind.

Bei der Auswertung der Fluoreszenzbilder wurde die Fluoreszenzintensität eines jeden Spots über die Spotfläche integriert. Die so erhaltene *Spotfluoreszenz* ist direkt proportional zu der Menge an gebundenem (fluoreszenzmarkiertem) DNA-Gegenstrang und bildet damit auch ein Maß für die *Oberflächenbeladung* der DNA-Sonden. Im Vergleich der Oberflächenbeladung nach Photoimmobilisierung mit verschiedenen Photolinkern auf unterschiedlichen Kunststoff-Substraten kann somit die *Bindungseffizienz* der Photolinker abgeleitet werden. Diese Abschätzung muss jedoch kritisch betrachtet werden, da lediglich diejenigen DNA-Sonden erfasst werden, die in einem „hybridisierfähigen“ Zustand an der Oberfläche vorliegen.

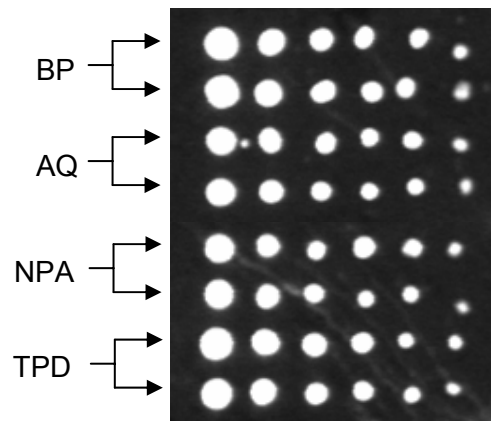


Abb. 33: Fluoreszenzbild eines hybridisierten DNA-Arrays auf Topas; die Sonden-DNA wurde mit verschiedenen Photolinkern (zeilenweise BP, AQ, NPA und TPD) modifiziert und in einer Konzentrationsreihe (spaltenweise 0,3 – 100 μM) gespottet.

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Einflüsse des Kunststoffmaterials, der gespotteten DNA-Konzentration und der Bestrahlungsdauer auf die verwendeten Photolinker diskutiert.

4.1.1.2 Vergleich der Kunststoffsubstrate

Trägt man die Spotfluoreszenz gegen die gespottete DNA-Konzentration für die verschiedenen Kunststoff-Substrate gegeneinander auf (Abb. 34), so erkennt man, dass auf Topas-Oberflächen mit Abstand die höchsten Bindungssignale erhalten wurden, und zwar unabhängig davon, welcher Photolinker verwendet wurde. Im Vergleich dazu lagen die Bindungssignale der PS-Substrate um etwa eine Größenordnung darunter und die der PMMA-Substrate meist im Bereich dazwischen, so dass sich folgende Reihenfolge der Kunststoff-Substrate in ihrer Eignung für die Photoimmobilisierung ergibt:

Topas > PMMA > PS

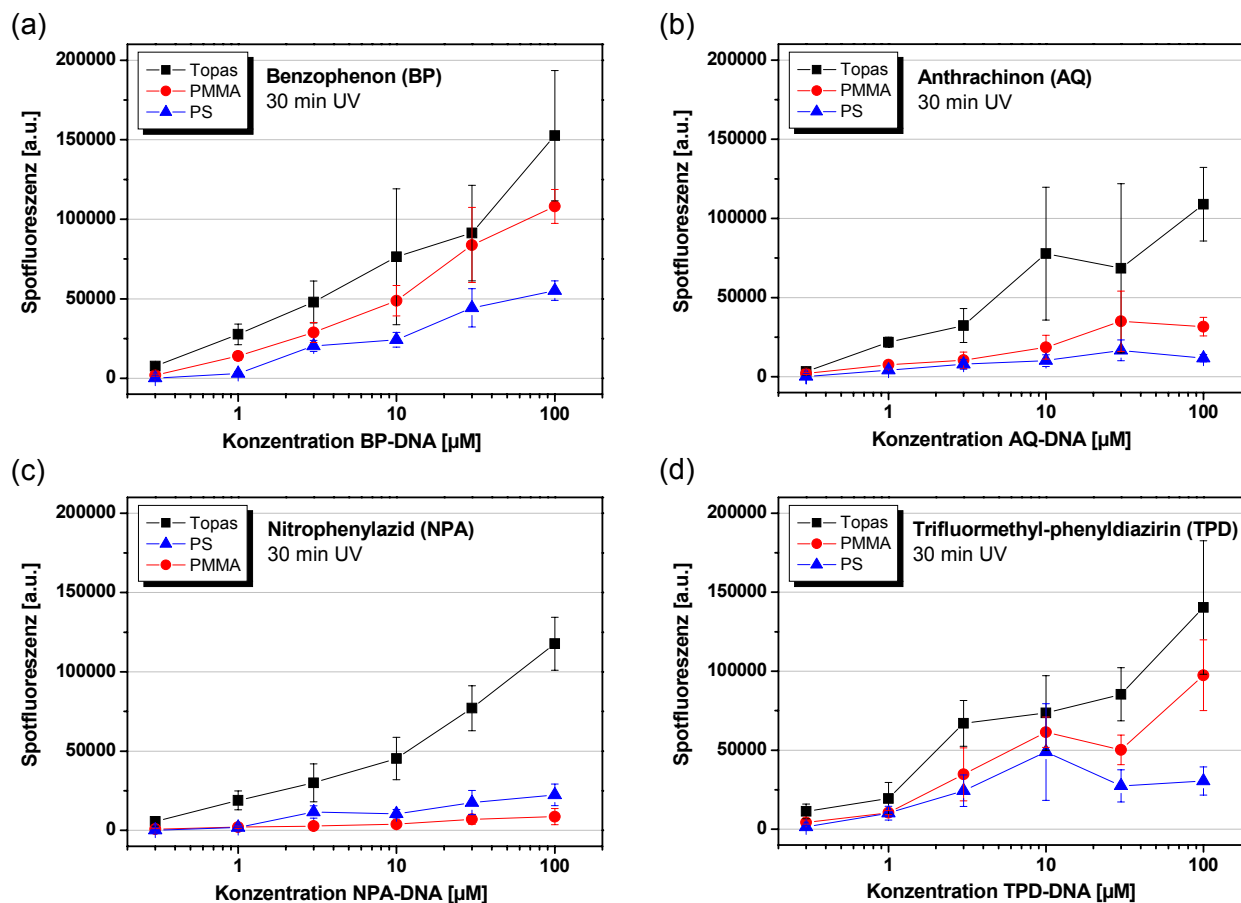


Abb. 34: Konzentrationsabhängige Oberflächenbeladung (Bindungseffizienz) der vier Photolinker Benzophenon BP (a), Anthrachinon AQ (b), Nitrophenylazid NPA (c) und Trifluormethyl-phenyldiazirin TPD (d) auf verschiedenen Kunststoff-Substraten (Topas ■, PMMA ● und PS ▲).

Ein weiterer wichtiger Faktor zur Bewertung der Kunststoffsubstrate ist die *Eigenfluoreszenz* des Materials, denn eine geringe Hintergrundfluoreszenz trägt zu einer niedrigen Nachweisgrenze bei. Bei der Eigenfluoreszenz der Kunststoffe im untersuchten Wellenlängenbereich ($\lambda_{\text{exc}} = 639 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 670 \text{ nm}$) zeigte sich folgende Abstufung:

$$\text{Topas (24)} < \text{PS (58)} < \text{PMMA (76)}^1$$

Verglichen mit der Eigenfluoreszenz von Glas (12) liegen die Werte der Kunststoff-Substrate um ein mehrfaches höher, jedoch weist Topas mit Abstand die niedrigste Eigenfluoreszenz aller untersuchten Kunststoffe auf.

¹ Werte sind relative Fluoreszenz-Mittelwerte, gemessen auf transparenten Kunststoff-Slides im Fluoreszenzreader BioScan [1].

4.1.1.3 Einfluss der gespotteten DNA-Konzentration

Allgemein nimmt die Oberflächenbeladung der Photolinker-DNA mit steigender Konzentration der gespotteten DNA zu. Dabei findet man in erster Näherung einen logarithmischen Zusammenhang (vgl. Abb. 34). Einen Bezug zur Adsorptionsisotherme nach Langmuir lässt sich daraus jedoch nicht direkt ableiten, da in die Auswertung auch die variierende Größe der Spots eingeht¹.

Eine „maximale Oberflächenbeladung“ scheint selbst bei den sehr hohen DNA-Sonden-Konzentrationen von 100 μM nicht erreicht zu werden. Dagegen nimmt die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit hohen Beladungsdichten ab, was man an den größeren Standardabweichungen erkennen kann. Dies kann sowohl auf eine inhomogene Oberflächenanbindung zurückzuführen sein als auch auf Inhomogenitäten beim TopSpot-Printing². Infolgedessen ist eine DNA-Sonden-Konzentration von etwa 3 μM für diese Anwendung optimal, da hiermit noch hinreichend hohe Beladungsdichten bei hoher Reproduzierbarkeit erreicht werden können.

4.1.1.4 Einfluss der Bestrahlungsdauer

Der Einfluss der Bestrahlungsdauer auf die Bindungseffizienz der Photolinker lässt sich aus den Diagrammen in Abb. 35 ersehen. Während die Photolinker Benzophenon und Anthrachinon nach etwa 30 min die höchsten Bindungswerte aufweisen, reagieren das Nitrophenylazid und das Diazirin wesentlich schneller (15 min). Dies lässt sich auf die unterschiedlichen Reaktionsmechanismen der Photolinker zurückführen (vgl. Abschnitt 2.2). Benzophenon und Anthrachinon werden durch Bestrahlung in einen Triplett-Zustand angeregt, der nur bei Vorliegen eines geeigneten Reaktionspartners unter Wasserstoff-Abspaltung zu einem sehr reaktiven Ketylradikal weiterreagiert. Liegt kein Bindungspartner vor, so relaxiert das Molekül wieder in den Grundzustand und kann erneut angeregt werden. Im Gegensatz dazu findet bei UV-Bestrahlung von Aziden und Diazirinen eine irreversible Aktivierung durch N_2 -Abspaltung statt, und das gebildete hochreaktive Nitren oder Carben reagiert sehr schnell und unspezifisch mit dem nächstbesten Bindungspartner.

¹ Es wurde nicht der Mittelwert sondern die gesamte Fluoreszenz (Integral) eines Spots ausgewertet.

² Die Einheitlichkeit der mit dem TopSpot abgegebenen Tropfenvolumina ist bei hohen Konzentrationen nicht mehr gegeben.

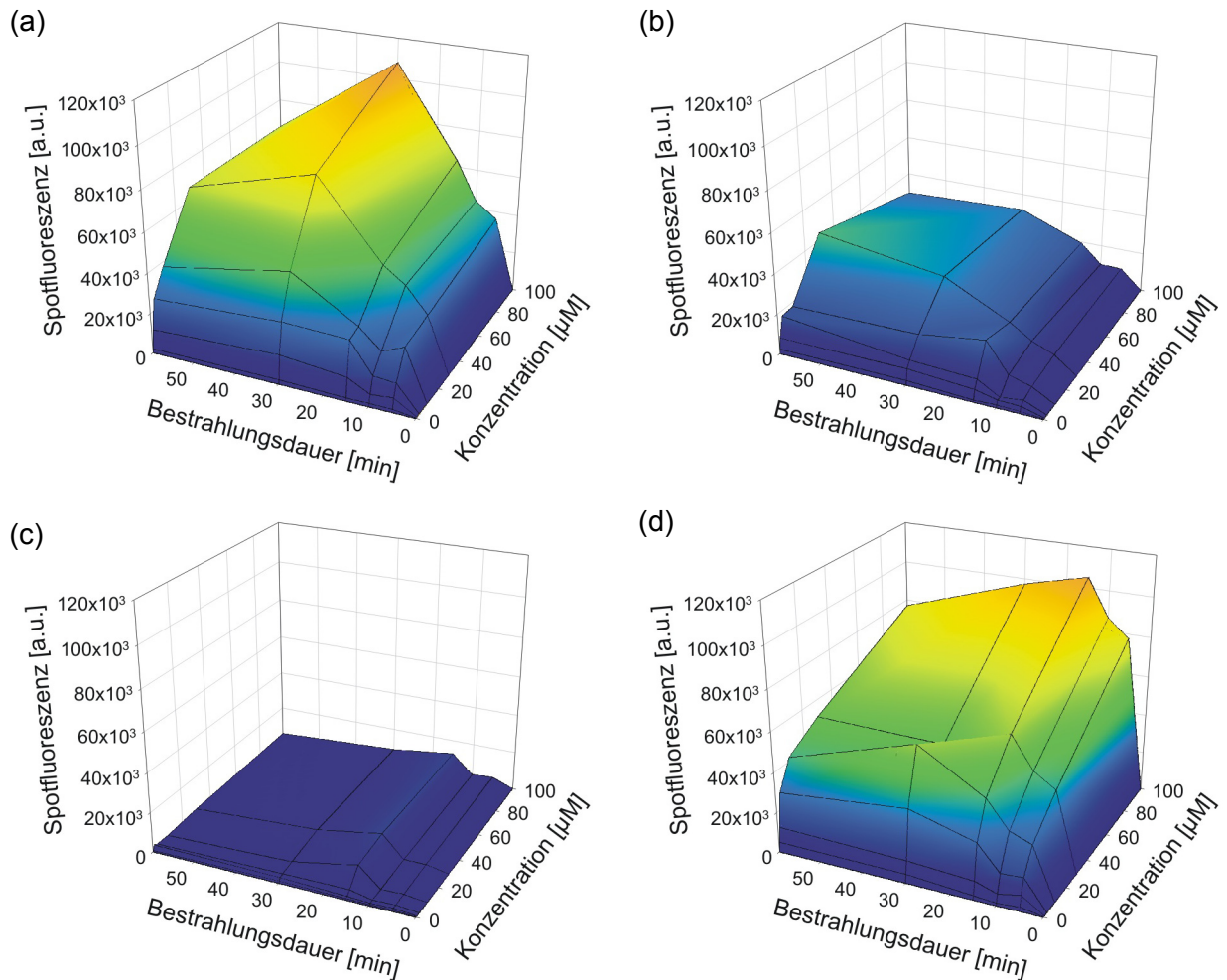


Abb. 35: Abhängigkeit der Oberflächenbeladung von Bestrahlungsdauer und gespotteter DNA-Konzentration für die vier Photolinker Benzophenon BP (a), Anthrachinon AQ (b), Nitrophenylazid NPA (c) und Trifluormethyl-phenyldiazirin TPD (d) (auf PMMA).

Bei längeren Bestrahlungszeiten gehen die Bindungsraten wieder leicht zurück, was auf eine einsetzende Photozersetzung der DNA-Oligonukleotide zurückgeführt werden kann. Somit lässt sich als optimale Bestrahlungsdauer für Benzophenon und Anthrachinon-Derivate 30 min und für Phenylazide und Diazirine 15 min angeben.

4.1.1.5 Vergleich der Photolinker

Aus den oben gezeigten Messungen der Spotfluoreszenz (Abb. 34 und Abb. 35) ist lediglich eine qualitative Abschätzung der Bindungseffizienz der Photolinker möglich, da die gespotteten DNA-Konzentrationen nicht den Umsetzungsgrad der DNA mit Photolinker

berücksichtigen. Aus früheren Experimenten ist jedoch bekannt, dass der Umsetzungsgrad zwischen 40 % und 65 % liegt¹.

Das Benzophenon-Derivat (a) weist auf allen Oberflächen die höchste Bindungseffizienz auf. Das Diazirin (d) liefert ebenfalls sehr hohe Oberflächenbeladungen mit DNA, insbesondere bei kurzen Bestrahlungszeiten. Das Anthrachinon- und das Phenylazid-Derivat (b und d) liefern lediglich auf Topas-Substraten eine höhere Oberflächenbeladung, während auf PMMA- und PS-Oberflächen nur sehr geringe Werte erhalten werden.

Die Bindungseffizienz der Photolinker ist also nicht nur abhängig vom Substratmaterial, sondern auch die Bestrahlungszeiten und die gespotteten Konzentrationen müssen berücksichtigt werden (vgl. Abschnitte 4.1.1.3). Allgemein lässt sich jedoch folgende Reihenfolge der Photolinker-Effizienz finden:

$$\text{BP} \geq \text{TPD} > \text{AQ} > \text{NPA}$$

Schlussfolgerungen

Die Photolinker Benzophenon und Diazirin lieferten die höchsten Bindungsraten auf allen untersuchten Oberflächen, während Anthrachinon und Nitrophenylazid nur auf Topas-Substraten hinreichende Bindungseffizienzen zeigten. Aufgrund der einfacheren Handhabbarkeit (Stabilität, Lichtehtheit) war Benzophenon als Photolinker vorzuziehen und wurde daher für alle weiteren Untersuchungen unter Berücksichtigung der optimierten Konzentration und Bestrahlungsdauer verwendet.

Topas wies als Slidematerial herausragende Eigenschaften auf, da sowohl die Bindungseffizienz aller Photolinker am höchsten ist, als auch die optischen Eigenschaften (Hintergrundfluoreszenz) optimal sind. Aus diesem Grund wurde die neu entwickelte mikrofluidische Plattform, das NanoWellSlide, aus geschwärztem Topas-Material abgeformt (vgl. Kap. 4.3).

¹ Die DNA wurde nach der Umsetzung mit dem Photolinker lediglich über Ethanol-fällung aufgereinigt und dabei die nicht umgesetzte DNA im Reaktionsprodukt belassen. Der Umsetzungsgrad wurde einmalig über HPLC bestimmt und lag für BP-DNA bei 41 %, für AQ-DNA bei 65 % und für NPA-DNA bei 43 % [1].

4.1.2 Oberflächen-Charakterisierung

Die durch direkte Photoimmobilisierung mit DNA modifizierten Kunststoffoberflächen wurden mit verschiedenen oberflächensensitiven Methoden charakterisiert. Der Schichtaufbau während eines Assay-Ablaufs wurde über Ellipsometriemessungen verfolgt. Die hydrophilen Eigenschaften der Schichten wurden durch Kontaktwinkelmessungen bestimmt. Die Topographie der DNA-Spots wurde mit Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM) untersucht.

Aufgrund der Ergebnisse aus Kap. 4.1.1 wurden alle folgenden Untersuchungen auf Topas als Substratmaterial durchgeführt. Als Photolinker wurde Benzophenon verwendet.

4.1.2.1 Schichtaufbau: Ellipsometrie

Mit Hilfe der Ellipsometrie wurde die Schichtdickenänderung der DNA-Schichten während eines Hybridisierungs-Assays verfolgt. In diesem Zusammenhang wurde auch geprüft, welchen Einfluss eine Vorbehandlung der Kunststoffoberfläche mit Sauerstoff-Plasma auf die Schichtdicken und Signalintensitäten hat.

Präparation der Topas-Slides

Für die Messreihe wurde ein Teil der untersuchten Topas-Slides mit Sauerstoff-Plasma vorbehandelt. Durch die Plasmabehandlung wurde das aliphatische CH-Gerüst des Kunststoffes radikalisch oxidiert und hydrophile Gruppen wie Carboxyl- und Carbonylgruppen generiert. Der Kontaktwinkel von Wasser änderte sich von anfänglichen $93^\circ \pm 2^\circ$ auf unter 5° (Detektionslimit¹). Die Unterschiede in der Hydrophilie ließen sich auch am Druckbild der DNA-Arrays erkennen (Abb. 36). Die DNA-Spots auf hydrophoben Oberflächen erscheinen klein und zentriert, während die Spots auf hydrophilen Substraten ineinander verlaufen sind.

Die für die Ellipsometriemessungen benötigte sehr dichte Anordnung von DNA-Spots wurde mit Hilfe der Mikropipettier-Anlage MicroDrop erreicht, wobei der etwa 3 x 5 mm große Messbereich mit BP-DNA-Lösung in einem dichten Array aus etwa 50-80 nm großen Spots belegt wurde.

¹ Der Wassertropfen breitete sich derart auf der Oberfläche aus, dass eine Kontaktwinkelmessung nicht mehr möglich war.

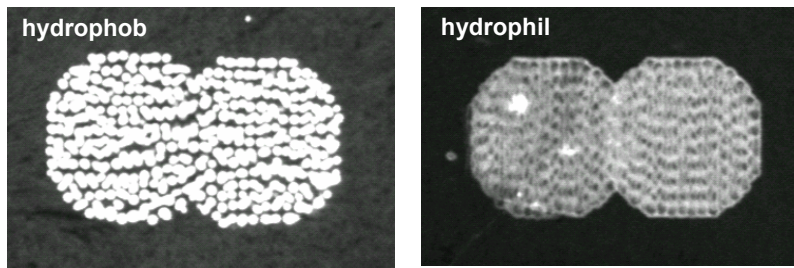


Abb. 36: Fluoreszenzbilder der 3 x 5 mm großen Messbereiche, aufgenommen nach Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierter Proben-DNA.

Ellipsometrie-Messungen

Ausgangspunkt der Messreihe bildete das reine Kunststoffmaterial der Topas-Slides, dessen Brechungsindex mit 1,53 vorgegeben wurde. Nach jedem Präparationsschritt wurde eine Ellipsometrie-Messung durchgeführt und die Schichtdicke nach dem Cauchy-Modell simuliert. Der Brechungsindex wurde für alle Schichten konstant gehalten, da die erwarteten Schichtdicken weit unter 100 nm lagen. In diesem Bereich korrelieren die zu simulierenden Parameter Schichtdicke und Brechungsindex sehr stark und können nicht mehr unabhängig voneinander bestimmt werden. Als Wert für den Brechungsindex wurde 1,44 angenommen, ein üblicher Wert für biologische Schichten im eingetrockneten Zustand [72,73,74].

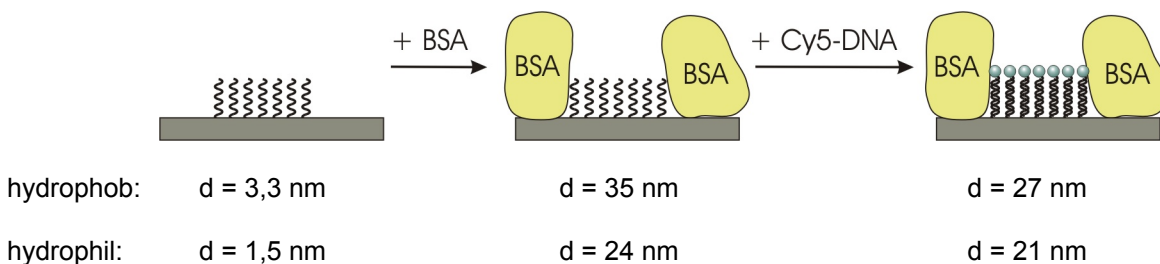


Abb. 37: Änderung der Schichtdicke während eines Hybridisierungs-Assays.

Die erste Messung wurde nach Photoimmobilisierung der Sonden-DNA (DD1b23) aufgenommen. Auf der hydrophoben Oberfläche wurde eine mehr als doppelt so große Schichtdicke festgestellt wie auf den hydrophilen Slides. Dabei ist der Wert von 3,3 nm der hydrophoben Slides lediglich ein Mittelwert über die gesamte Messfläche, welche, wie in Abb. 36 zu erkennen ist, nicht vollständig mit DNA belegt ist. Aus den Fluoreszenzbildern lässt sich eine Belegung von etwa 50 % abschätzen, d. h. für die Schichtdicke der DNA-Spots ergibt sich ein Wert von ca. 7 nm. Dieser Wert stimmt sehr gut mit der Länge eines 23mers von etwa 7,8 nm (angenommener Basenabstand: 0,34 nm [18]) überein, was auf eine dichte Belegung der Oberfläche mit DNA-Oligonukleotiden hinweist. Der Kontaktwinkel der hydrophoben Slides nahm von $93^\circ \pm 2^\circ$ auf $30^\circ \pm 2^\circ$ ab, was ebenfalls auf eine hohe Oberflächenkonzentration hydrophiler DNA-Moleküle schließen lässt. Dagegen lässt die

geringere Schichtdicke der DNA-Schicht auf hydrophilen Slides von 1,5 nm auf eine wesentlich geringere Oberflächenbeladung mit DNA schließen.

Anschließend wurden die Oberflächen mit BSA (Bovin Serum Albumin) geblockt, wodurch die Schichtdicke beträchtlich anstieg. Das Protein Albumin ist mit einem Molekulargewicht von ca. 66 kDa erheblich größer als ein 23mer Oligonukleotid mit ca. 7,5 kDa und verursacht daher eine wesentlich größere Schichtdickenänderung. Das BSA adsorbiert unspezifisch auf quasi allen Oberflächen, jedoch bevorzugt auf hydrophoben Substraten, was den höheren Wert von 35 nm auf dem hydrophoben Topas-Slide im Vergleich zu 24 nm auf dem hydrophilen Slide erklärt.

Im letzten Schritt wurden die DNA-Arrays mit komplementärer, fluoreszenzmarkierter DNA (Cy5-DD1a23) hybridisiert. Eine Fluoreszenzmarkierung der Proben-DNA war zwar für die markierungsfreie Methode der Ellipsometrie nicht notwendig, wurde jedoch dennoch beibehalten, um eine Kontrollmessung im BioScan durchführen zu können (s. Abb. 36). Die Ellipsometrie-Messungen zeigen eine Abnahme der Schichtdicke, was zunächst paradox erscheint, da immerhin die Proben-DNA an die oberflächen-gebundenen DNA-Sonden bindet, wie durch die Fluoreszenzbilder belegt wird. Jedoch kann die Abnahme damit erklärt werden, dass die lediglich adsorptiv gebundenen BSA-Moleküle teilweise wieder abgelöst bzw. durch die Proben-DNA von den DNA-Bindungsstellen an der Oberfläche verdrängt werden. Die weiterhin sehr hohen Werte von 27 bzw. 21 nm zeigen, dass die Schichtdicke immer noch durch das BSA bestimmt wird.

Fluoreszenz-Messungen

Die in Abb. 36 beispielhaft gezeigten Fluoreszenzmessungen wurden auf jeweils 3 hydrophoben und 3 hydrophilen Topas-Slides durchgeführt. Die mittlere Fluoreszenzintensität und die Standardabweichung innerhalb des Messbereichs sind in Abb. 38 dargestellt. Die hohe Beladungsdichte auf hydrophoben Slides ist durch die höheren Fluoreszenzwerte belegbar; im Mittel liegt die Fluoreszenzintensität etwa doppelt so hoch wie auf hydrophilen Slides. Durch die unvollständige Oberflächenbelegung mit DNA-Sonden auf hydrophoben Slides (einzelne Spots) ergibt sich eine hohe Varianz, während die gleichmäßigere Belegung der Oberfläche auf den hydrophilen Slides (ausgebreitete, verlaufene Spots) in den niedrigeren Standardabweichungen zu erkennen ist. Dahingegen ist eine von Slide zu Slide reproduzierbare Oberflächenbeladung nur auf hydrophoben Oberflächen zu erreichen (die relative Abweichung der 3 Slides liegt bei 18 %), während die Beladungen auf hydrophilen Slides stark schwanken (74 %).

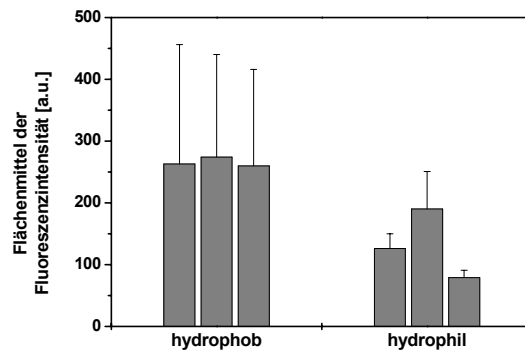


Abb. 38: Mittlere Fluoreszenzintensitäten innerhalb des Messbereichs von 3 hydrophoben und 3 hydrophilen Topas-Slides.

Schlussfolgerungen

Mit der Auswertung der Ellipsometrie-Messungen unter Berücksichtigung der Fluoreszenzbilder konnten zwei Fragestellungen beantwortet werden, zum einen die Änderung der Schichtdicke während eines Hybridisierungs-Assays und zum anderen der Einfluss einer Hydrophilisierung der Oberfläche durch Plasmaveraschung. Die Schichtdicken der DNA-Spots ließen auf eine dichte Oberflächenbeladung auf unvorbehandelten, hydrophoben Topas-Slides und auf eine wesentlich geringere, wenn auch flächige Beladung auf hydrophilisierten Slides schließen. Die Fluoreszenzbilder zeigten eine unvollständige Belegung (einzelne Spots) auf hydrophoben Oberflächen und eine flächige Belegung (verlaufene Spots) auf hydrophilen Substraten. Die Reproduzierbarkeit der Oberflächenbeladung war auf hydrophoben Slides wesentlich besser als auf hydrophilen Slides. Auf beiden Kunststoffsubstraten wurde eine sehr starke unspezifische Bindung von BSA festgestellt, welche allerdings auf hydrophilen Slides etwas geringer war.

Die Verwendung unvorbehandelter, hydrophober Kunststoff-Slides ist demnach zweckmäßig, da hierbei hohe und reproduzierbare Beladungsdichten erreicht werden. Eine Hydrophilisierung der Topas-Substrate ist lediglich angebracht, wenn eine gleichmäßige Oberflächenbelegung bei der Herstellung dichter Arrays erwünscht wird. Die unspezifische Bindung von BSA konnte durch hydrophilere Substrate nur in geringem Maße vermindert werden.

4.1.2.2 Topographie: Atomic Force Mikroskopie (AFM)

Um die Oberflächenstruktur immobilisierter DNA auf Kunststoffen zu untersuchen, wurden AFM-Messungen auf Topas-Oberflächen durchgeführt.

Präparation der Oberflächen

Zunächst wurde ein unbehandeltes, gereinigtes Topas-Slide (Spritzguss-Werkstück) untersucht (Abb. 39a). Hierbei zeigte sich eine ausgeprägte Rillenstruktur, die durch Spritzgussartefakte zu erklären ist. Es musste festgestellt werden, dass die Spritzguss-Teile durch ihre Unebenheit für oberflächentopographische Untersuchungen von DNA-Strukturen völlig ungeeignet waren. Daher wurde im Folgenden durch Spincoating eine dünne Topasschicht auf Glimmer aufgebracht, einem Material, das eine Ebenheit auf atomarer Ebene aufweist. Somit war auch die aufgeoatete Kunststoffschicht äußerst eben (Abb. 39b) und für weitere Untersuchungen geeignet.

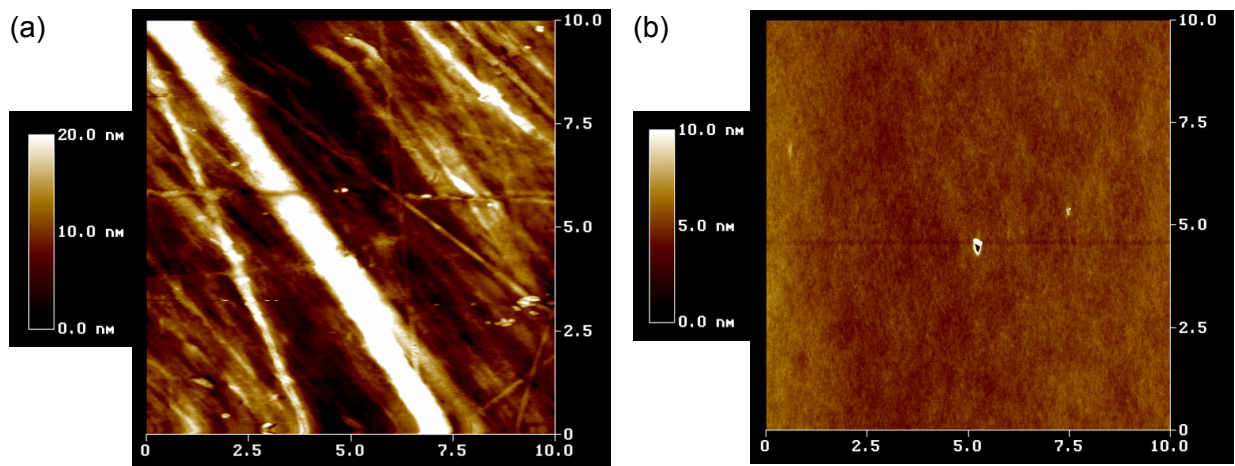


Abb. 39: AFM-Aufnahmen von Topas-Oberflächen; (a) Spritzguss-Slide, (b) Topas-Schicht auf Glimmer erhalten durch Spincoating; Ausschnitte von $10 \times 10 \mu\text{m}$.

Auf einer solchen auf Glimmer aufgezogenen Topas-Schicht wurde BP-DNA immobilisiert. Dazu wurden mit Hilfe der MicroDrop-Mikropipettier-Anlage winzige Spots (Durchmesser ca. $50\text{-}80 \mu\text{M}$) einer BP-DNA-Lösung aufgebracht und durch UV-Bestrahlung immobilisiert. Die ungebundene DNA wurde durch Waschen mit Wasser entfernt. Das erhaltene Array wurde im AFM untersucht.

AFM-Messungen

Von der Oberfläche wurden AFM-Bilder in verschiedenen Ausschnittvergrößerungen aufgenommen. Dabei wurde der Fokus der Aufnahmen auf den Rand eines DNA-Spots gelegt.

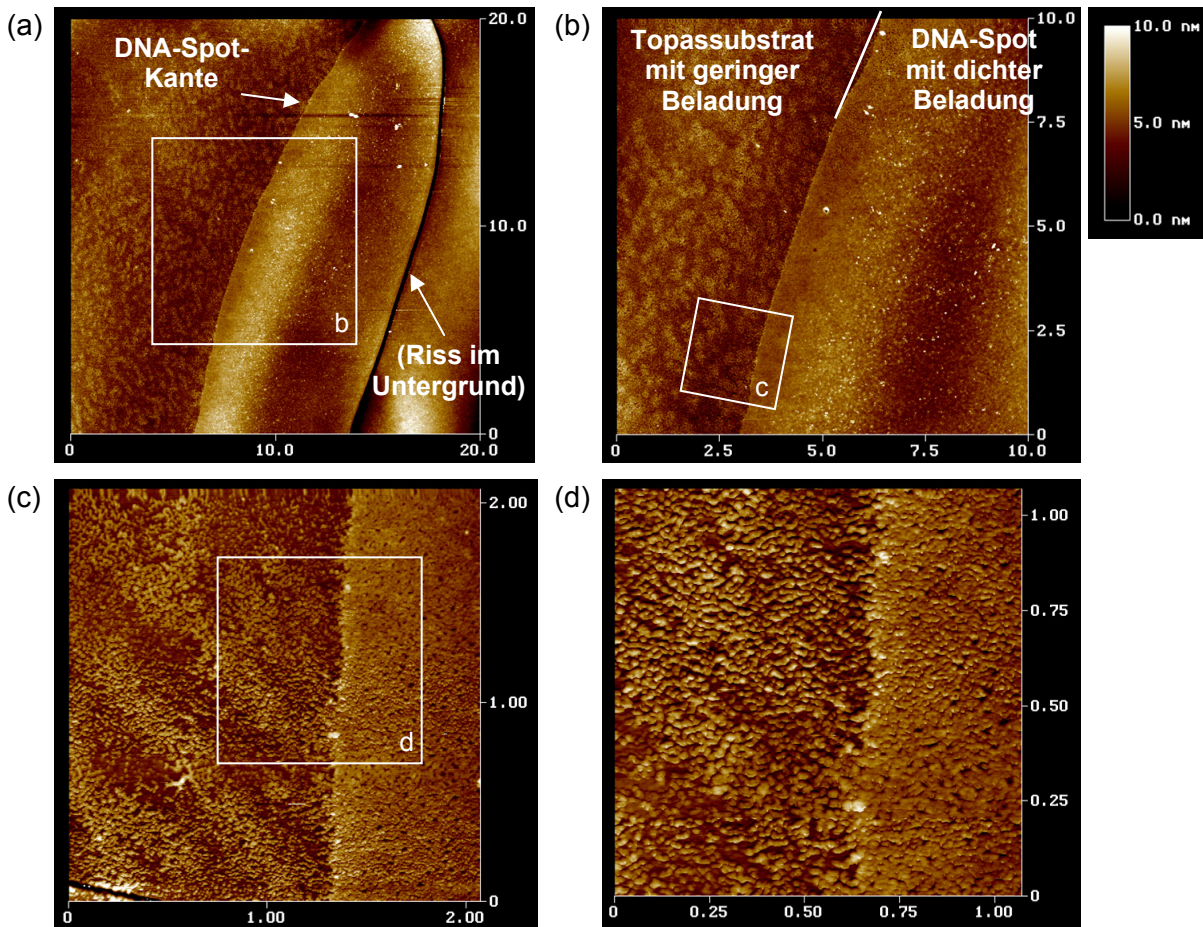


Abb. 40: AFM-Aufnahmen eines DNA-Spots auf Topas;
Ausschnitte von (a) $20 \times 20 \mu\text{m}$, (b) $10 \times 10 \mu\text{m}$, (c) $2 \times 2 \mu\text{m}$ und (d) $1 \times 1 \mu\text{m}$.

Die rechte Hälfte der Bilder zeigt eine sehr dichte und homogene Beladung der Oberfläche mit DNA-Sonden. (Das Artefakt am rechten Bildrand in Abb. 40a wurde als Riss im Glimmer-Substrat identifiziert.) In der Mitte der Bilder zieht sich die DNA-Spot-Kante senkrecht durch das Bild. In der linken Bildhälfte lassen sich besonders in Abb. 40a und b weniger dichte Strukturen erkennen, die nach außen hin abflachen und nach etwa 5 – 10 μm enden. Hier scheinen auch außerhalb des eigentlichen Spots DNA-Sonden immobilisiert worden zu sein, wenn auch in wesentlich geringerer Dichte. Dies kann damit erklärt werden, dass bei dem Spotting-Prozess der auf die Oberfläche auftreffende Tropfen durch den Aufschlag kurzzeitig abgeflacht wird und dabei auch außerhalb des eigentlichen Spots DNA-Sonden auf der Oberfläche verbleiben können. Erst während des anschließend einsetzenden Eintrocknungsprozesses haben die DNA-Sonden Zeit, sich im Bereich des Spots auf der Oberfläche anzuordnen, so dass sich eine dichte Struktur, d. h. eine hohe Oberflächenbeladung, innerhalb des Spots mit einer scharf umrissenen Domänengrenze am Rande des Spots ausbilden kann. Diese Domänengrenze lässt sich in den Ausschnitt-Vergrößerungen (Abb. 40c und d) gut erkennen.

Schlussfolgerungen

Die über ein kontaktfreies Printing-Verfahren auf Kunststoffoberflächen erhaltenen DNA-Spots zeichnen sich durch eine definierte Domänengrenze am Rande des Spots aus. Außerhalb der Spotgrenze ist noch ein 5 – 10 µm breiter Bereich geringfügig mit DNA-Sonden belegt, was durch den Spottingprozess erklärt werden kann. Innerhalb des Spots findet sich eine dichtgepackte Struktur, die auf eine dichte und homogene Belegung der Spotfläche mit DNA-Oligonukleotidsonden schließen lässt. Hiermit werden die Ergebnisse der Ellipsometriemessungen (vgl. Abschnitt 4.1.2.1) bestätigt.

4.2 Indirekte Photoimmobilisierung: Photodextran

Für bestimmte Anwendungen ist eine Anbindung der Sondenmoleküle über (Bio-)Polymere wünschenswert. Für die Modifikation von Oberflächen in der biomolekularen Interaktionsanalyse wird das Polymer Dextran sehr erfolgreich eingesetzt [30,75].

Dextran ist ein Polysaccharid aus D-Glucose-Einheiten, welche α -1,6-glycosidisch verknüpft sind. Wird ein Teil der Hydroxylgruppen des Dextrans zu Aminogruppen umfunktionalisiert, so erhält man Aminodextran (Abb. 41) [29].

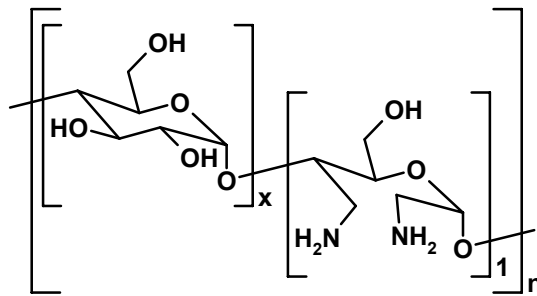


Abb. 41: Struktur von Aminodextran.

Aminodextran wird sehr häufig für die Oberflächenmodifizierung eingesetzt. Seine einzigartige Hydrogel-Struktur bildet ein 3-dimensionales Netzwerk in wässrigen Medien. Die funktionellen Aminogruppen erlauben sowohl eine einfache Anbindung des Dextrans an die Oberfläche als auch die Ankopplung von Sondenmolekülen. Damit weist Aminodextran drei entscheidende Vorteile für bioanalytische Anwendungen auf:

1. Durch die hohen Schichtdicken können wesentlich mehr Sondenmoleküle (> 1 Monolage) immobilisiert werden als in planaren Schichten.
2. In wässriger Lösung bildet sich ein Hydrogel, das geringe unspezifische Wechselwirkungen mit Biomolekülen zeigt.
3. Die chemische Struktur entspricht der des natürlich vorkommenden Dextrans, jedoch mit einer anderen Verknüpfung, so dass dieses Dextran nicht biologisch abgebaut werden kann und gleichzeitig biokompatibel ist.

Für bioanalytische Anwendungen auf Kunststoffoberflächen liegt es daher nahe, die Vorteile und die der photochemischen Immobilisierung mit denen des Dextrans zu kombinieren. Diese Überlegung führt zur Entwicklung des *Photodextrans*.

4.2.1 Photodextrane: Synthese und Anwendungen

Photodextrane sind Dextrane, die Photolinker-Gruppen tragen, über welche das Biopolymer an eine Substratoberfläche angebunden werden kann. Ausgehend von Aminodextran wurden 3 verschiedene Photodextran-Derivate hergestellt (Abb. 42). Ein reines *Photodextran* (PD) mit einem hohen Photolinker-Anteil wurde erhalten, indem die Aminofunktionen weitgehend mit Photolinkergruppen umgesetzt wurden. Wird dagegen lediglich ein Teil der Aminogruppen mit Photolinkerfunktionen modifiziert, so erhält man ein heterobifunktionelles Dextran, d. h. ein Dextran, das neben den Photolinkern noch weitere funktionelle Gruppen trägt. Auf diese Weise konnte *Amino-Photodextran* (Amino-PD) synthetisiert werden, welches sowohl Photolinker- als auch Aminofunktionen trägt. Desweiteren wurden die Aminogruppen teilweise zu Photolinker-Funktionen und teilweise zu Biotin-Funktionen umgesetzt, so dass *Biotin-Photodextran* (Biotin-PD) erhalten wurde, ein weiteres heterobifunktionelles Dextran.

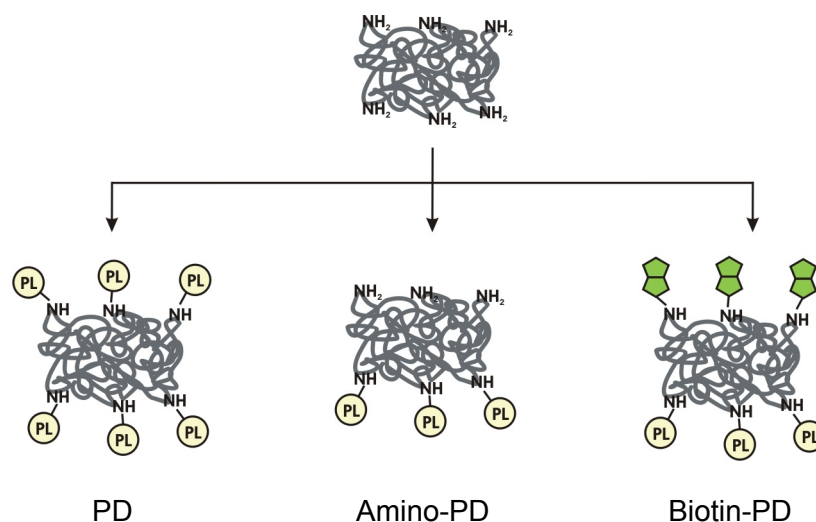


Abb. 42: Umsetzung von Aminodextran zu Photodextran (PD), Amino-PD und Biotin-PD.

Je nach Photodextran-Typ erfolgt die Anbindung der Biomolekül-Sonden (DNA, Antikörper etc.) über unterschiedliche Mechanismen.

4.2.1.1 Photodextran

Mit Hilfe des Photodextrans können Biomoleküle in einer einstufigen Reaktion auf dem Substrat immobilisiert werden. Dazu werden die Biomolekül-Sonden und das Photodextran gleichzeitig auf die Oberfläche gegeben. Durch UV-Bestrahlung wird die Photoreaktion

ausgelöst, wobei die Photolinker sowohl mit dem Substrat als auch mit den Biomolekül-Sonden reagieren.

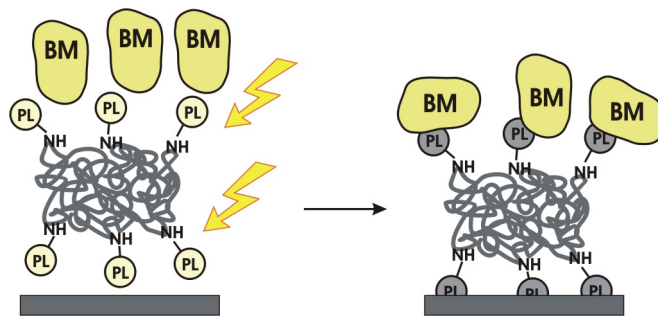


Abb. 43: Einstufige Photoimmobilisierung von Biomolekülen (BM) über Photodextran.

Die Anbindung der Biomoleküle wird somit über eine unspezifische Photoreaktion erreicht, d. h. es erfolgt keine Kontrolle über die Orientierung der Biomoleküle. Der Vorteil dieser Methode liegt jedoch darin, dass die zu immobilisierenden Moleküle keine funktionellen Gruppen tragen müssen und dass verschiedene Molekülspezies gleichermaßen gebunden werden. Darüber hinaus ist diese Einstufen-Reaktion mit geringem präparativen Aufwand verbunden.

Eine ausführliche Charakterisierung von Photodextran wurde anhand der Immobilisierung von DNA sowohl auf planaren Kunststoffsubstraten (Kap. 4.2.2) als auch auf dem NanoWellSlide (Kap. 4.3.3) durchgeführt. Weiterhin wurde Photodextran zur Photoimmobilisierung von Antikörpern eingesetzt (Kap. 4.5).

4.2.1.2 Amino-Photodextran

Beim Amino-Photodextran erfolgt die Anbindung an die Oberfläche in zwei Schritten. Zunächst wird das Amino-PD auf das Kunststoff-Substrat aufgegeben und durch UV-Bestrahlung immobilisiert. Im zweiten Schritt werden die Biomoleküle über funktionelle Gruppen (Carboxyl, Carbonyl) über die verbleibenden Aminogruppen an das Dextran gebunden. Alternativ kann die Immobilisierung auch in umgekehrter Reihenfolge stattfinden, also einer Bindung der Biomoleküle an das Dextran mit anschließender Photoimmobilisierung des Konjugats.

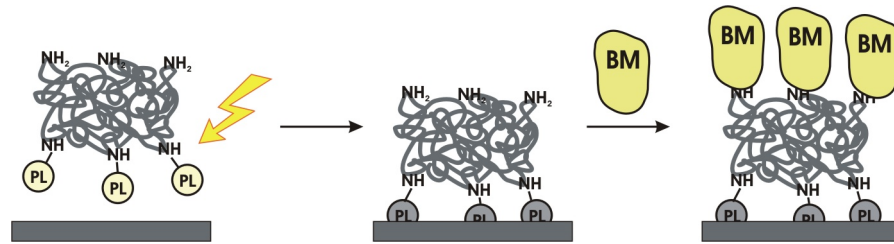


Abb. 44: Photoimmobilisierung von Aminodextran und anschließende Anbindung von Biomolekülen.

Im Gegensatz zur ersten Methode kann hier unter gewissen Voraussetzungen eine gerichtete Immobilisierung der Biomoleküle erreicht werden. Beispielsweise kann bei der Immobilisierung von DNA-Sonden die Anbindung über amino-reaktive Gruppen erfolgen, die am 3'- oder 5'-Ende des Oligonukleotids angebracht sind. Hingegen ist bei der Immobilisierung von Proteinen eine Kontrolle der Orientierung nur selten realisierbar, da sie über eine Vielzahl von reaktiven Gruppen verfügen.

Auf die Verwendung von Amino-Photodextran zur DNA-Immobilisierung wird bei einem Methodenvergleich (Kap. 4.2.3) kurz eingegangen.

4.2.1.3 Biotin-Photodextran

Bei der Verwendung von Biotin-Photodextran wird die Anbindung des Biomoleküls über die Affinitätsreaktion zwischen Avidin und Biotin erreicht. Das Biotin-Photodextran wird zunächst auf das Kunststoff-Substrat aufgetragen und photoimmobilisiert. Die so präparierte Oberfläche wird nun mit Avidin inkubiert, welches über eine Affinitätsreaktion an die Biotin-Reste bindet. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, so dass an die verbleibenden Bindungsstellen biotinylierte Biomoleküle gebunden werden können.

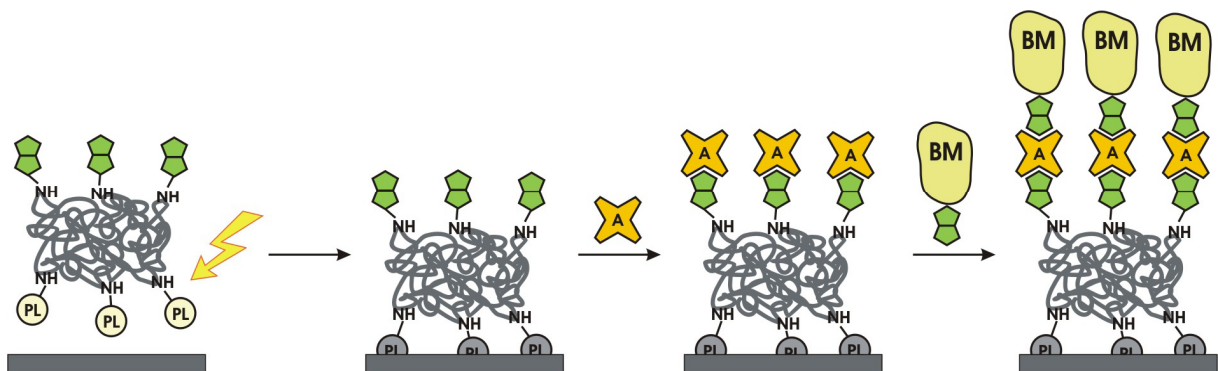


Abb. 45: Photoimmobilisierung von Biotin-PD und Anbindung biotinylierter Biomoleküle über Biotin/Avidin-Affinitätsreaktion.

Bei dieser Methode müssen die Biomolekül-Sonden zuvor biotinyliert werden. Erfolgt die Biotinylierung spezifisch an einer bestimmten Stelle des Biomoleküls (z. B. bei der DNA-Oligonukleotid-Synthese am 3'- oder 5'-Ende), so kann mit dieser Methode eine gerichtete Immobilisierung des Biomoleküls erreicht werden. Die Ausnutzung der Affinitäts-Wechselwirkung zwischen Biotin und Avidin zur Anbindung von Proben oder Sonden ist weit verbreitet, so dass hiermit eine Schnittstelle zu vielen Anwendungen in der Bioanalytik geschaffen wird.

Die Anwendung von Biotin-Photodextran wurde auf dem Biosensor-System RlfS (Kap. 4.4) sowie zur Immobilisierung von Antikörpern (Kap. 4.5) demonstriert.

4.2.2 Charakterisierung des Photodextrans

Die Eigenschaften und das Verhalten der Photodextran-Immobilisierung wurden anhand der Photoimmobilisierung von DNA-Oligonukleotiden untersucht. Das verwendete Photodextran war mit Benzophenon als photoreaktiver Komponente modifiziert. Die DNA-Sonden wurden mit dem Photodextran gemischt und in Arrayform auf Topas-Slides gedruckt. Die durch UV-Bestrahlung immobilisierten DNA-Sonden wurden anschließend mit komplementärer, fluoreszenzmarkierter Proben-DNA hybridisiert.

Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften des Photodextrans wurden zunächst Parameter wie DNA-Sonden-Konzentration und Photodextran-Konzentration variiert sowie die Regenerierbarkeit der Dextranschicht untersucht. Im Anschluss daran wurde die Leistungsfähigkeit der Photodextran-Immobilisierung im Vergleich zu anderen Immobilisierungs-Strategien anhand eines DNA-Arrays getestet (Kap. 4.2.3).

4.2.2.1 Optimierung der DNA-Konzentration

In einem ersten Versuch wurde untersucht, welche Konzentration der Sonden-DNA für die Photoimmobilisierung geeignet ist. Dabei galt es, ein Optimum aus hoher Oberflächenbeladung, geringer unspezifischer Wechselwirkung und geringem Probenverbrauch zu finden.

Arrays mit verschiedenen DNA-Sonden-Konzentrationen

Es wurden 4 verschiedene DNA-Konzentrationen untersucht (1 μM , 3 μM , 10 μM und 30 μM) und die Konzentration des Photodextrans konstant gehalten. Aus Vorversuchen war bekannt, dass Dextranlösungen in Konzentrationen von über 2 mg/mL aufgrund der zu

hohen Viskosität mit dem TopSpot nicht druckbar sind, daher wurde zunächst mit einer (sehr hohen) Dextran-Konzentration von 1 mg/mL begonnen. Zur Kontrolle unspezifischer Immobilisierung¹ wurde Aminodextran in gleicher Konzentration verwendet. Die Lösungen aus Dextran und DNA (DD1b23) in verschiedenen Konzentrationen wurden in 4x6-Arrays auf Topas-Slides gedruckt. Die Arrays wurden im UV bestrahlt und nach Blockung der Oberfläche mit komplementärer, fluoreszenzmarkierter DNA (Cy5-DD1a23) hybridisiert.

Abb. 46 zeigt beispielhaft das Fluoreszenzbild eines Arrays, in welchem reihenweise die 4 verschiedenen DNA-Konzentrationen gedruckt wurden. In der linken Hälfte des Arrays wurde Photodextran gespottet und in der rechten Hälfte Aminodextran als Kontrolle unspezifischer Immobilisierung.

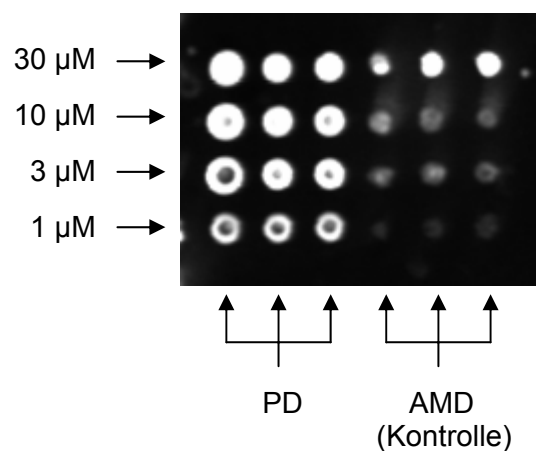


Abb. 46: Fluoreszenzbild eines Arrays zur Ermittlung der optimalen DNA-Konzentration.

Unspezifische Immobilisierung

Man erkennt bereits im Fluoreszenzbild eine deutliche unspezifische Bindung der Proben-DNA an die AMD-Spots, d. h. hier liegen vermutlich DNA-Sonden auf der Oberfläche vor, die nicht über Photolinker gebunden wurden. Diese unspezifische Immobilisierung ist jedoch im Vergleich zur spezifisch immobilisierten DNA-Menge gering und gewinnt erst bei höheren DNA-Konzentrationen an Bedeutung, wie auch in der quantitativen Auswertung in Abb. 47 zu sehen ist. Ein Auslöser für die unspezifische Anbindung der DNA könnte eine Photoreaktion der DNA selbst mit der Oberfläche sein.

Optimale DNA-Konzentration

Während sich die Fluoreszenzsignale bei DNA-Konzentrationen von 3 bis 30 µM kaum ändern, was auf eine maximale Ausschöpfung der Photolinker-Bindungsstellen schließen

¹ Mit „unspezifischer Immobilisierung“ wird hier die Anbindung von DNA-Sonden an die Oberfläche bezeichnet, die nicht über Photolinker stattfindet.

lässt, liegt das Signal bei der geringsten untersuchten Konzentration (1 μM) deutlich darunter. D. h. die Oberflächenbelegung erreicht bei einer gespotteten DNA-Sonden-Konzentration von 3 μM bereits ihren maximalen Wert. Bei höheren Konzentrationen kann darüber hinaus auch eine verstärkte unspezifische Immobilisierung festgestellt werden. Um also den Probenverbrauch und die unspezifische Wechselwirkungen gering zu halten und trotzdem eine maximale Oberflächenbeladung zu erhalten, wurde im Folgenden mit DNA-Konzentrationen von wenigen μM gearbeitet.

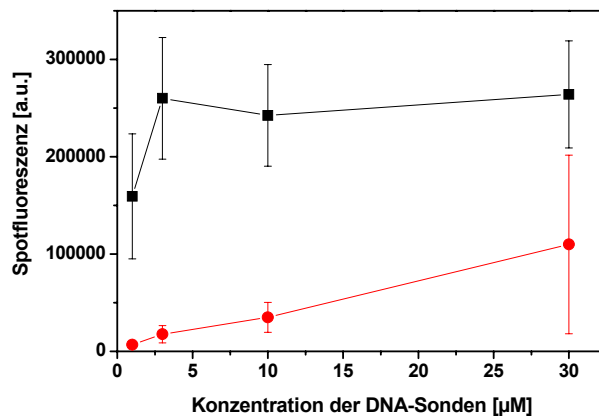


Abb. 47: Auswertung der optimalen DNA-Sonden-Konzentration bei Immobilisierung über Photodextran (■) und Kontrolle unspezifischer Anbindung über AMD (●). ($n = 15$)

Die mittlere Spotfluoreszenz lag bei allen untersuchten DNA-Konzentrationen sehr hoch (mehrere 100.000 a.u.); im Vergleich dazu lagen die Spotfluoreszenzen bei der direkten Immobilisierung deutlich darunter (unter 100.000 a.u. bei vergleichbarer DNA-Konzentration, vgl. Abb. 34). Die hohe Oberflächenbeladung wird durch die Hydrogel-Struktur des Dextrans erreicht, in dessen 3-dimensionalem Polymer-Netzwerk wesentlich mehr Sondenmoleküle angebonden werden können als auf einer planaren, 2-dimensionalen Oberfläche.

4.2.2.2 Optimierung der Photodextran-Konzentration

Arrays mit verschiedenen Photodextran-Konzentrationen

Um die Konzentration an gespottetem Photodextran zu optimieren, wurden in einem Array verschiedene Konzentrationen (0,03 – 1 μM) Photodextran bei einer konstanten DNA-Konzentration (5 μM) gespottet.

Gleichzeitig wurden Kontrollspots aufgebracht, die lediglich Photodextran und keine Sonden-DNA enthielten („Blank“). Hiermit wurde die unspezifische Bindung der

fluoreszenzmarkierten Proben-DNA an das Dextrangerüst überprüft. Überdies wurden wiederum Kontrollspots aus Sonden-DNA und Aminodextran zur Prüfung unspezifischer Immobilisierung einbezogen. Die Kontroll-Spots wurden lediglich in der höchsten Dextran-Konzentration (1 mg/mL) gedruckt.

In einem Versuch, die unspezifischen Bindungen aus den ersten Versuchen (vgl. Abschnitt 4.2.2.1) zu vermindern, wurden die Slides nach UV-Bestrahlung mit SDS-Reinigungslösung im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde ein Hybridisierungs-Assay durchgeführt.

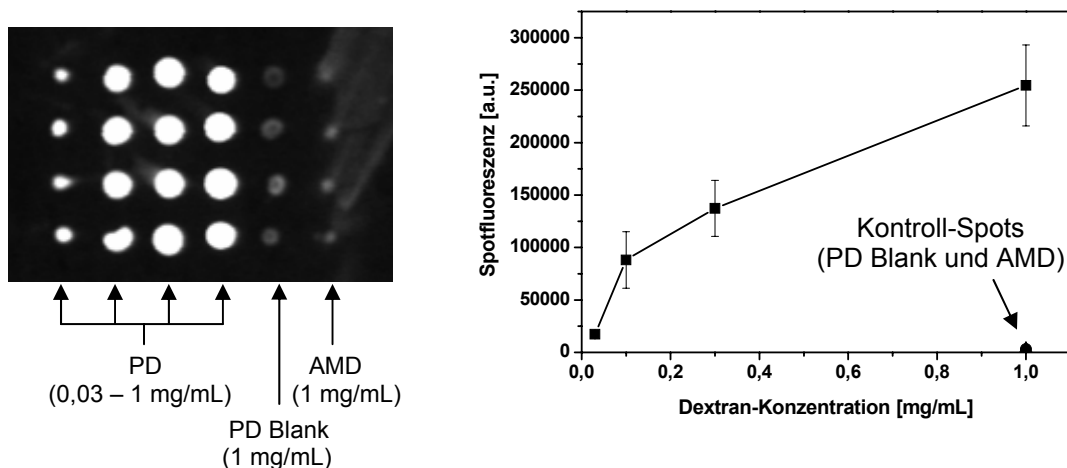


Abb. 48: Variation der Photodextran-Konzentration bei konstanter DNA-Sonden-Konzentration (5 μ M);
links: Array mit 4 verschiedenen PD-Konzentrationen und Kontroll-Spots;
rechts: quantitative Auswertung der Spotfluoreszenz. (n = 16)

Einfluss der Photodextran-Konzentration

Die Oberflächenbeladung nimmt mit steigender Photodextran-Konzentration stetig zu (Abb. 48), und im Gegensatz zur DNA-Konzentration wird im untersuchten Konzentrationsbereich keine maximale Oberflächenbeladung erreicht. Dies liegt an der einzigartigen Struktur des Photodextrans. Durch seine Photolinker-Gruppen können nicht nur DNA-Sonden, sondern auch andere Dextran-Moleküle gebunden werden. Somit besteht die Möglichkeit, mit entsprechend hohen Dextrankonzentrationen durch Quervernetzung sehr hohe Schichtdicken zu erzeugen.

Unspezifische Wechselwirkungen

Eine unspezifische Bindung der fluoreszenzmarkierten Proben-DNA an das Photodextran fand in sehr geringem Ausmaß statt. Der Wert betrug etwa 1 % des spezifischen Bindungssignals.

Das Ausmaß der unspezifischen Immobilisierung der Sonden-DNA (AMD-Kontrolle) konnte durch den Reinigungsschritt mit SDS von etwa 10 % (quantitative Auswertung der Werte aus Abb. 47 bei einer DNA-Konzentration von 5 μM) auf 1 % (vgl. Abb. 48) beträchtlich verringert werden.

Mehrfach-Prints

Die Oberflächenbeladung der Sonden in einem Array lässt sich nicht nur durch die eingesetzte Konzentration der gespotteten Lösungen beeinflussen, sondern auch durch die Aufbringung mehrerer Prints übereinander. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurde das oben beschriebene Array mehrfach auf jeweils ein und dieselbe Stelle des Kunststoffträgers aufgedruckt. Bis zu 3 Prints wurden übereinander gedruckt; dabei wurden die Spots zwischen den Prints eintrocknen gelassen.

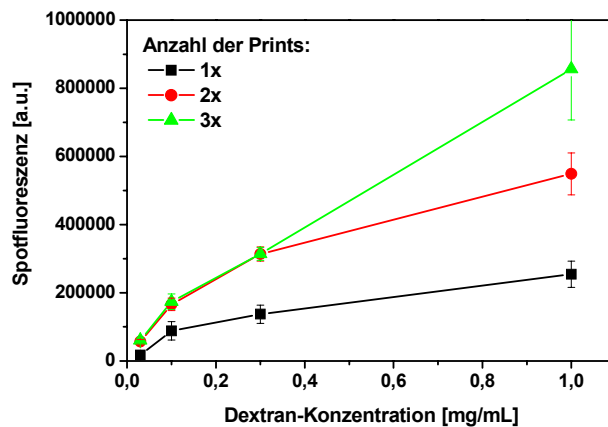


Abb. 49: Einfluss von Mehrfach-Prints auf die Oberflächenbeladung.

Wie in Abb. 49 zu erkennen ist, kann man mit doppelten Prints die Bindungskapazität um mehr als das Doppelte steigern, während dieser Anreicherungseffekt bei Dreifach-Prints lediglich bei sehr hohen Dextran-Konzentrationen noch zu steigern ist. Das Aufbringen von mehr als drei Prints übereinander hat zu keiner weiteren Verbesserung geführt (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass die Oberflächenbeladung bei 2x-Prints um mehr als den zu erwartenden Betrag ansteigt, lässt sich damit erklären, dass während des zweiten Print-Vorgangs durch erneutes Anfeuchten der bereits eingetrockneten Spots eine Reorganisation aller Sonden ermöglicht wird, so dass eine effektivere Anbindung erreicht werden kann.

Schlussfolgerungen

Je höher die Photodextran-Konzentration der gedruckten Lösung gewählt wird, desto höher ist die Bindungskapazität der erhaltenen Spots. Eine maximale Beladung wird im Rahmen

der Möglichkeiten (maximal druckbare Dextran-Konzentration, s. o.) nicht erreicht. Unspezifische Wechselwirkungen können mit einem SDS-Reinigungsschritt vor der Hybridisierung auf 1 % reduziert werden. Mit doppelten Prints erreicht man wesentlich höhere Oberflächenbeladungen.

4.2.2.3 Regeneration

Anhand der Arrays aus Kap. 4.2.2.2 wurde die Möglichkeit einer Regeneration der DNA-Arrays zur Wiederverwendung untersucht. Dazu wurde das Slide verschiedenen, unterschiedlich energischen Behandlungsmethoden nacheinander ausgesetzt. Nach jedem Behandlungsschritt wurde ein Fluoreszenzbild des Slides aufgenommen, aus welchem ausschnittsweise ein Array in Abb. 50 dargestellt ist.

Im Anschluss an die erste Hybridisierung (Abb. 50a) wurde das Topas-Slide zunächst 15 min im Ultraschallbad mit Wasser behandelt (b). Damit konnte die fluoreszenzmarkierte Proben-DNA von Spots mit niedrigeren Dextran-Schichtdicken (gespottete Dextrankonzentration 0,03 - 0,3 mg/mL, Spalten 1-3 des gezeigten Arrays) bereits fast völlig entfernt werden. Jedoch blieben hohe Rückstände bei sehr dicht beladenen Spots (1 mg/mL, Spalte 4) zurück. Auch unspezifisch an das Dextrangerüst gebundene Proben-DNA konnte dadurch nicht entfernt werden (Spalte 5).

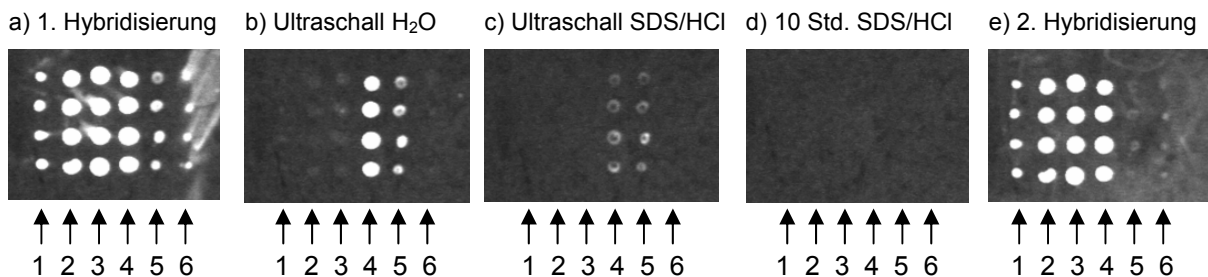


Abb. 50: Hybridisierung, Regeneration und zweite Hybridisierung eines Photodextran/DNA-Arrays. Alle Bilder sind in gleicher Helligkeitsstufe dargestellt. Die Spalten 1 bis 4 entsprechen Photodextrankonzentrationen von 0,03 bis 1 mg/mL bei 5 μ M DNA, Spalte 5 enthält nur Photodextran (1 mg/mL), Spalte 6 enthält AMD (1 mg/mL) und DNA.

Daraufhin wurde das Slide 15 min mit SDS/HCl (0,5 %, pH 2) im Ultraschallbad behandelt (Abb. 50c). Hierdurch konnte sämtliche spezifisch gebundene Proben-DNA entfernt werden. Lediglich an den Spots mit hohen Dextranbeladungen (1 mg/mL) ließen sich Rückstände unspezifisch gebundener Proben-DNA feststellen. Die Unspezifität dieser Bindung ließ sich aus der Tatsache ableiten, dass sowohl an den Spots mit DNA-Sonden (Spalte 4) als auch an denen ohne DNA-Sonden (Spalte 5) die gleichen Signalintensitäten auftraten.

Erst durch eine Behandlung mit SDS/HCl über 10 Stunden konnte schließlich sämtliche Proben-DNA vollständig von der Oberfläche entfernt werden (d) und anschließend neue DNA hybridisiert werden (e).

Die Fluoreszenzbilder der Arrays wurden ausgewertet (Abb. 51), so dass diese Zusammenhänge noch einmal quantitativ nachvollzogen werden konnten. Auffallend ist wiederum die mangelhafte Regeneration durch einfache Ultraschallbehandlung mit Wasser. Auch die schlechte Regenerierbarkeit der Spots mit hoher Dextranbeladung ist deutlich erkennbar. Dies kann mit einer Einschränkung der Diffusion innerhalb des Hydrogels mit steigender Schichtdicke erklärt werden. Für niedrigere Dextran-Konzentrationen ist dagegen eine kurze Regeneration mit SDS im Ultraschallbad ausreichend.

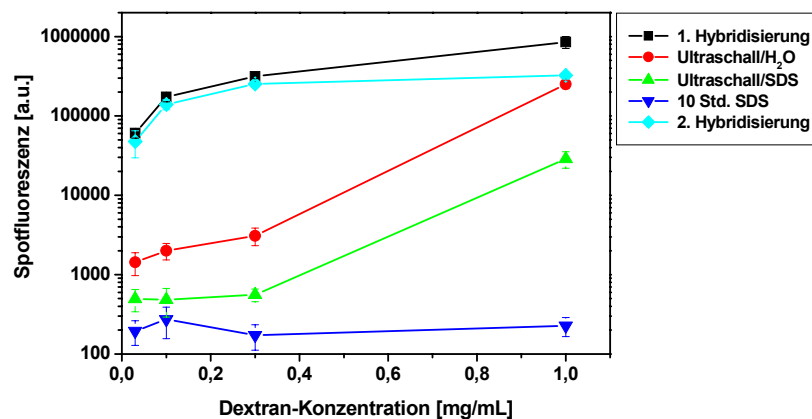


Abb. 51: Quantitative Auswertung der Regeneration am Beispiel der 3x-Prints. ($n = 20$)
Der Übersichtlichkeit halber sind die Intensitäten logarithmisch dargestellt.

Als sehr positiv ist zu bewerten, dass bei der 2. Hybridisierung – trotz der vorangegangenen energischen Regenerationsbedingungen von 10 Stunden Behandlung mit SDS bei pH 2 – die ursprünglichen Signalintensitäten nahezu wieder erreicht wurden. Damit konnte die besonders hohe Stabilität der biofunktionellen Schicht gezeigt werden.

4.2.3 Methodenvergleich anhand eines DNA-Arrays

Um die Leistungsfähigkeit der Photodextran-Immobilisierung im Vergleich zur direkten Photoimmobilisierung einerseits und zur Glas-Oberflächenchemie andererseits zu demonstrieren, wurde ein DNA-Array hergestellt, das exemplarisch aus drei verschiedenen Oligonukleotid-Sequenzen bestand, welche

- (I) komplementär (DD1b23),

- (II) fast komplementär mit einer Basenfehlstelle (SNP¹, DD2b23) sowie
- (III) nicht komplementär (DD2a23)

zur fluoreszenzmarkierten Proben-DNA (Cy5-DD1a23) waren.

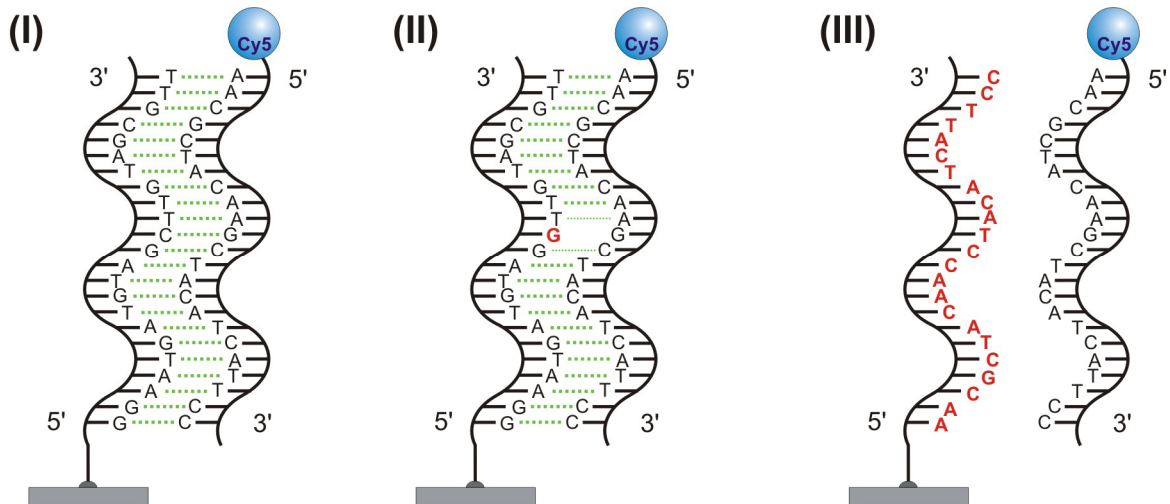


Abb. 52: Drei verschiedene DNA-Sonden: (I) komplementär, (II) mit Basenfehlstelle (SNP) und (III) nicht-komplementär zur fluoreszenzmarkierten Proben-DNA.

Mit diesen Oligonukleotid-Sonden wurden auf Topas-Slides DNA-Arrays nach drei verschiedenen Immobilisierungsmethoden hergestellt:

- (A) Direkte Photoimmobilisierung der mit Photolinker modifizierten DNA (vgl. Kap. 4.1);
- (B) Indirekte Photoimmobilisierung unmodifizierter DNA mit Photodextran;
- (C) Photoimmobilisierung von Amino-Photodextran, Umfunktionalisierung mit Glutarsäure und Anbindung aminofunktionalisierter DNA.

Hierbei führt die Methode (A) zu einer planar auf der Kunststoffoberfläche immobilisierten DNA-Schicht (Monolage), während mit den Methoden (B) und (C) eine Hydrogelschicht aus Dextran erhalten wird, an welche die DNA gebunden wird. Ferner werden mit den Methoden (A) und (C) die DNA-Sonden gerichtet an das Substrat gebunden, während bei Methode (B) eine ungerichtete Immobilisierung durch unspezifische Photoreaktion stattfindet. Die dadurch entstehenden Unterschiede wurden anhand eines Hybridisierungs-Assays ermittelt. Die erhaltenen Fluoreszenzwerte nach Hybridisierung der Arrays mit fluoreszenzmarkierter DNA sind in Abb. 53 gegenübergestellt.

¹ SNP = single nucleotide polymorphism (Einzelbasenaustausch)

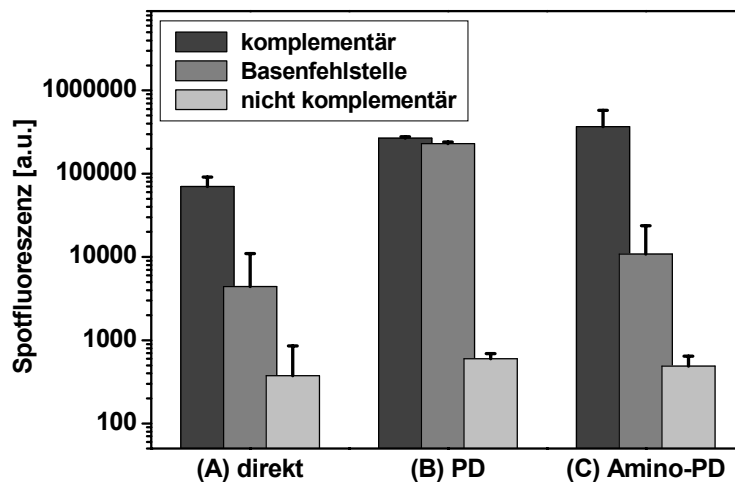


Abb. 53: Untersuchung der Hybridisierung verschiedener DNA-Komplementaritäten bei unterschiedlichen Immobilisierungsmethoden.

SNP-Diskriminierung

Der auffallendste Unterschied zwischen gerichteter und ungerichteter Immobilisierung der DNA-Sonden zeigt sich in der Erkennung der Basenfehlstelle. Bei der gerichteten Immobilisierung – sei es durch Photoimmobilisierung der mit Photolinker modifizierten DNA (A) oder durch thermochemische Immobilisierung der aminofunktionalisierten DNA (C) – findet eine Anbindung der DNA-Sonde am 5'-Ende statt, während bei der indirekten Photoimmobilisierung (B) die Anbindung über eine (radikalische) Photoreaktion an einer beliebigen Stelle des DNA-Strangs erreicht wird. Durch diese Photoreaktion kann also die Spezifität der Hybridisierung („Stringenz“) beeinträchtigt werden, so dass Basenfehlstellen im Gegenstrang nicht mehr richtig erkannt werden können. Dieser Fall ist in Abb. 53 zu erkennen: Zwar ist eine Diskriminierung der SNP-Sequenzen auf Photodextran-Schichten Dank sehr geringer Standardabweichungen immer noch möglich, jedoch werden nicht die sonst typischen Unterschiede in der Signalintensität von mehreren Größenordnungen beobachtet. In Kap. 4.3.3 wird dieses Phänomen anhand von Kalibrationskurven, die auf dem NanoWellSlide erhalten werden konnten, noch einmal diskutiert.

Ein spezieller Fall der SNP-Diskriminierung ergibt sich bei den Amino-Photodextran-Schichten (s. Abb. 54). Hier konnte eine Stringenz der Hybridisierung erst durch Behandlung des hybridisierten Arrays im Ultraschallbad (5 min) erreicht werden. Vermutlich konnte die relativ dicke Hydrogelschicht durch einfaches Abspülen der Slides nicht ausreichend ausgewaschen werden. Ein vergleichbares Verhalten wurde bei ungerichtet immobilisierter DNA mit Photodextran nicht beobachtet; hier nahmen alle Bindungssignale gleichermaßen ab (Daten nicht gezeigt).

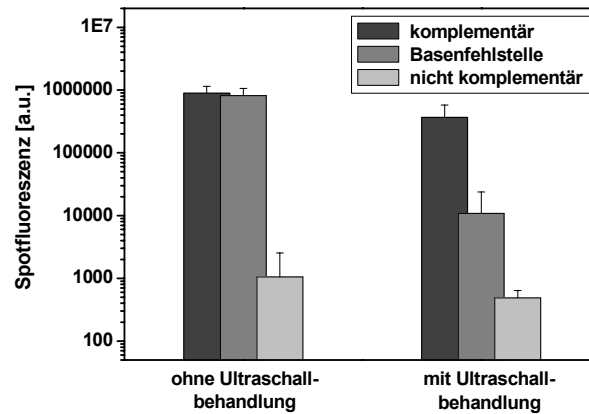


Abb. 54: SNP-Diskriminierung auf Amino-Photodextran-Schichten vor und nach Ultraschallbehandlung.

Bindungskapazität

Über direkte Photoimmobilisierung lässt sich theoretisch maximal eine Monolage an DNA-Sonden auf die 2-dimensionale Kunststoffoberfläche aufbringen, während mit Dextran-Schichten sehr hohe Oberflächenbeladungen erhalten werden können. Durch die zahlreichen Photolinkergruppen der Polymermoleküle können diese untereinander quervernetzen und so in mehreren Lagen auf die Oberfläche anbinden. Innerhalb des dreidimensionalen Netzwerks des Hydrogels lässt sich eine Vielzahl von DNA-Sonden anbinden. Daher liegen die maximalen Werte der Dextranschichten um das vier- bis fünf-fache höher als bei direkt immobilisierten DNA-Sonden.

Standardabweichungen und Signalbereich

Auffallend sind die sehr geringen Standardabweichungen der Photodextran-Schichten (B). Mit dieser Methode lassen sich also sehr gleichmäßige Spots mit reproduzierbarer Oberflächenbeladung herstellen.

Die Aminodextranschichten (C) zeichnen sich dagegen durch einen großen Signalbereich aus, der vor allem durch ein hohes Maximalsignal bei komplementärer Wechselwirkung bestimmt wird, welches vermutlich auf eine hohe Dextranschichtdicke zurückgeführt werden kann. Die Werte der nicht-komplementären Wechselwirkung werden dagegen hauptsächlich durch die Hintergrundfluoreszenz des Kunststoffsubstrats (vgl. Abschnitt 4.1.1.2) und die unspezifische Bindung an die Kunststoff- bzw. Dextranoberfläche bestimmt.

Vergleich von Kunststoff- und Glassubstraten

Die Verwendung von Amino-Photodextran auf Kunststoffen sowie Aminodextran (AMD) auf Glas bietet die Möglichkeit, Kunststoff- und Glassubstrate direkt miteinander zu vergleichen.

Auf Kunststoffen wird eine Aminodextranschicht erzeugt, indem Amino-Photodextran aufgegeben und durch UV-Bestrahlung photoimmobilisiert wird (vgl. Abb. 44). Auf Glassubstraten dagegen ist die kovalente Anbindung von Aminodextran etwas aufwendiger. Hier muss zunächst eine Silanisierung der Glasoberfläche durchgeführt werden, um auf der Oberfläche reaktive Gruppen einzuführen (z. B. Epoxid unter Verwendung von GOPTS, vgl. ersten Reaktionsschritt in Abb. 20.). Diese können anschließend mit den Aminofunktionen des AMD umgesetzt werden.

Die Aminogruppen der so hergestellten AMD-Schichten können nun mit Glutarsäure zu Carboxylgruppen umfunktionalisiert werden, um schließlich aminofunktionalisierte DNA-Oligonukleotide anbinden zu können. Diese Reaktionsschritte können auf Topas- und Glassubstraten gleichermaßen durchgeführt werden¹. Abb. 55 zeigt die Bindungssignale, die an DNA-Arrays auf Topas- und Glassubstraten erhalten wurden.

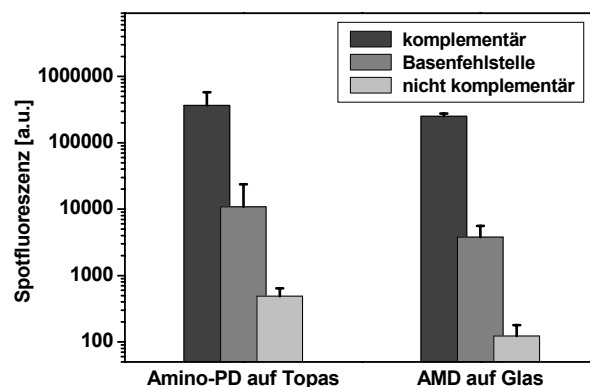


Abb. 55: Vergleich von Topas- und Glassubstraten; hier wurden die DNA-Arrays auf AMD-Schichten immobilisiert.

Die durch Photoimmobilisierung auf Kunststoffoberflächen hergestellten Dextranschichten weisen sehr ähnliche Eigenschaften auf wie die auf Glasoberflächen. Es lassen sich lediglich geringe Unterschiede im Signalbereich feststellen. Durch die Verwendung von photoreaktivem Dextran lassen sich auf Kunststoffoberflächen höhere Schichtdicken erzeugen, die durch Quervernetzung der Dextranmoleküle über die Photolinkerfunktionen entstehen. Die Fluoreszenzsignale sind aufgrund der höheren Oberflächenbeladung auf

¹ Ermöglicht wird dies durch die herausragende Stabilität von Topas-Kunststoff gegenüber polaren Lösungsmitteln wie Aceton und DMF.

Topas höher als auf Glas. Dagegen weisen Glassubstrate im Vergleich zu Kunststoffen eine äußerst geringe Eigenfluoreszenz auf (vgl. Abschnitt 4.1.1.2), weshalb die Bindungssignale bei nicht-komplementärer Wechselwirkung sehr niedrig sind.

Schlussfolgerungen

Durch die Verwendung von Dextranschichten lassen sich wesentlich höhere Oberflächenbeladungen erreichen als mit direkt auf die Kunststoffoberfläche immobilisierten DNA-Sonden. Insbesondere die Verwendung von Amino-Photodextran führt zu sehr hohen Bindungskapazitäten, jedoch ist die Herstellung wesentlich aufwendiger als durch direkte oder indirekte Photoimmobilisierung.

Die indirekte Photoimmobilisierung von DNA über Photodextran hat den Vorteil, dass bei diesem Verfahren keine Funktionalisierung der DNA notwendig ist, so dass die Immobilisierung in einem Schritt erfolgen kann. Der Nachteil der Photodextran-Immobilisierung ist ein Verlust der Spezifität der DNA-Sonden: Basenfehlpaarungen können nur noch in geringem Ausmaß diskriminiert werden.

Mit Hilfe der Photoimmobilisierung lassen sich DNA-Oligonukleotid-Arrays auf Kunststoffen herstellen, die denen auf Glassubstraten in nichts nachstehen. Bei der Verwendung von Photodextranen lassen sich durch Quervernetzung der Polymermoleküle sogar höhere Oberflächenbeladungen erzielen. Glassubstrate zeichnen sich lediglich durch ihre geringe Eigenfluoreszenz gegenüber den Kunststoffsubstraten aus.

4.3 Vom planaren Mikroarray zur mikrofluidischen Plattform: Das NanoWellSlide (NWS)

4.3.1 Das NWS im nanoMAP-Konzept: Modulare Applikations-Plattform

Im Rahmen des Projekts nanoMAP¹ wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Boehringer Ingelheim microParts GmbH (Dortmund) ein mikrofluidisches Kunststoff-Slide, das NanoWellSlide (NWS), entwickelt. Es dient als Detektionsmodul innerhalb des nanoMAP-Gesamtprozesses (Abb. 56). Auf der nanoMAP-Plattform konnte beispielhaft ein Genotypisierungs-Assay mit anschließender PCR durchgeführt werden [76].

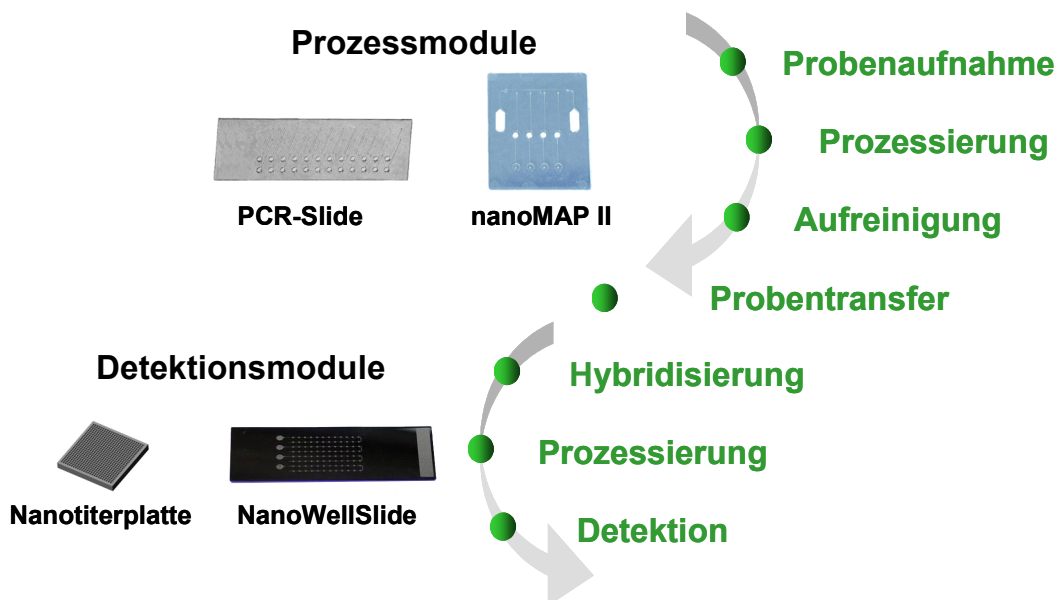


Abb. 56: nanoMAP-Prozessablauf: Der obere Teil beschreibt die Probenprozessierung, die auf einem der Prozessmodule (PCR-Slide oder nanoMAP II) durchgeführt wird. Anschließend werden die Proben auf eines der Detektionsmodule (Nanotiterplatte oder NanoWellSlide) übertragen und ausgelesen.

Das NWS kann sowohl als ein mikrofluidisches Array als auch als eine mikrofluidische Nanotiterplatte aufgefasst werden. Es ist damit eine konsequente Weiterentwicklung der Nanotiterplatte (NTP), einer bereits zuvor entwickelten hochparallelen, miniaturisierten Plattform mit 623 Nanoliterkavitäten (70 nL) auf einer Fläche von 2 x 2 cm. Auf der NTP konnten bereits verschiedene homogene und heterogene Assays in miniaturisiertem Maßstab etabliert werden [77,78,79].

¹ „nanoMAP – Modulare Applikations-Plattform mit integrierter Nanoliterdosierung für die hochparallele Probenanalytik“, BMBF-Förderkennzeichen 0312001 B

Im Folgenden ist die Entwicklung des NWS und seiner Komponenten dargestellt. Eine Charakterisierung des NWS in Kombination mit der Oberflächenchemie erfolgte durch DNA-Hybridisierungs-Assays. Zur Validierung des NWS wurden PCR-Produkte detektiert, die mit Hilfe eines der miniaturisierten Prozessmodule, dem PCR-Slide, erhalten wurden.

4.3.2 Das NWS und seine Komponenten: Entwicklung und Anpassung

4.3.2.1 Anforderungen an das NWS

Zu Beginn der Entwicklung wurden die Anforderungen an das NWS wie folgt festgelegt:

- Das NWS sollte kostengünstig hergestellt werden können, so dass es als Einmal-Artikel verwendet werden kann.
- Das NWS sollte Nanoliterkavitäten enthalten, die über mikrofluidische Kanäle miteinander verbunden sind, welche eine Selbstbefüllung über Kapillarkräfte aufweisen sollten.
- Auf dem NWS sollten mehrere Kanalstrukturen vorhanden sein, um parallel verschiedene Proben gleichzeitig untersuchen zu können.
- Jeder Kanal sollte einen Einlass für die Probenaufgabe (Befüllport) und einen vakuum-adressierbaren Auslass für die Probenentnahme aufweisen.
- Auf den Boden der Nanoliter-Kavitäten sollten Sondenmoleküle mit herkömmlichen Printern aufgebracht und anschließend kovalent angebunden werden können.
- Die Kanäle auf dem NWS sollten zunächst offen sein, um die Sondenmoleküle aufgeben zu können, und anschließend mit einer Deckelungsfolie verschlossen werden können, die nur die Befüll- und Auslassports offen lässt. Die Folie sollte transparent sein, um eine Fluoreszenzauslesung der Nanowells zu gestatten.
- Das NWS sollte eine Temperaturstabilität bis mindestens 60 °C aufweisen, um eine temperaturabhängige stringente DNA-Hybridisierung zu ermöglichen.
- Das NWS sollte Standardformate aufweisen, sowohl in seinen äußeren Dimensionen als auch in seinen Kavitätenstrukturen, um mit herkömmlichen bioanalytischen Geräten kompatibel zu sein.

Diese Anforderungen wurden in einem ersten Testmuster umgesetzt.

4.3.2.2 Erstes Testmuster

Ausgehend von den oben aufgeführten Vorgaben wurde ein erster Prototyp des NWS entworfen und einige Musterplatten gefertigt (Abb. 57). Diese Testmuster wurden aus zugesägten Topas-Platten hergestellt, in welche die Kanal- und Kavitätenstrukturen mit einer Mikrofräse eingebracht wurden.

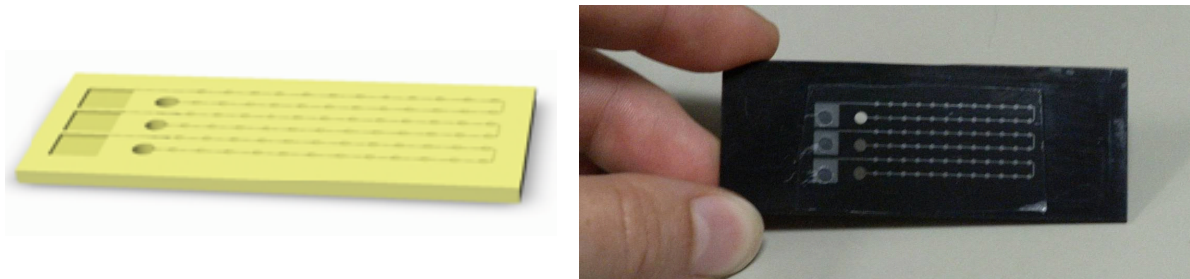


Abb. 57: Erstes Design eines NanoWellSlides (links) und Testmuster aus gefrästem Topas (rechts).

Das NWS-Testmuster erfüllte bereits die meisten der oben aufgeführten Anforderungen. Als Kunststoffmaterial wurde Topas gewählt, ein Polymer mit geringer Eigenfluoreszenz und herausragenden optischen Eigenschaften (vgl. Tab. 4). Vor allem aber die überragenden Ergebnisse bei der Sondenbindung über Photolinker (vgl. Kap. 4.1.1) führten zu der Entscheidung, Topas als Substratmaterial zu verwenden. Um bei einer Fluoreszenzdetektion ein Übersprechen der nebeneinander liegenden Nanowells zu verhindern, wurde geschwärztes Material verwendet.

Auf dem Slide waren 3 Kanalstrukturen aufgebracht, bei denen je 24 Nanowells über einen mikrofluidischen Kanal verbunden waren. Als Rastermaße für die Kavitäten wurden Mikrotiterplatten-Standardmaße gewählt, so dass eine Befüllung mit standardisierten Dosier- und Pipettier-Systemen möglich war: Die Befüll- und Auslassports waren in einem Abstand von 4,5 mm (384er Mikrotiterplatte) und die Nanowells in einem Abstand von 2,25 mm (1536er Mikrotiterplatte) angeordnet. Die Nanowells hatten ein Volumen von je 70 nL, jeder Kanal fasste ca. 2,5 μL , und die Befüllports konnten mit je 4 μL gefüllt werden. Die Nanowells wurden in einer runden, flachen Form gestaltet, um eine möglichst große Fläche für die Aufbringung und Auslesung der Sonden-Spots zu sicherzustellen.

Die Selbstbefüllung der mikrofluidischen Kanäle wurde auf zwei Arten bewirkt: Zum einen wurde die Kanalgeometrie derart konstruiert, dass eine Befüllung ohne Einschluss von Luftblasen möglich war, wie anhand eines Fluoreszenzbildes in Abb. 58 gezeigt ist. Zum anderen wurde zur Deckelung des NWS eine Folie gewählt, die eine hydrophile Klebeschicht aufwies. Über diese hydrophile Schicht wurde der kapillare Transport der Flüssigkeit entlang des Kanals gewährleistet, denn lediglich auf dem äußerst hydrophoben Topasmaterial (Kontaktwinkel von Wasser $> 90^\circ$) konnten keine Kapillarkräfte wirksam werden.

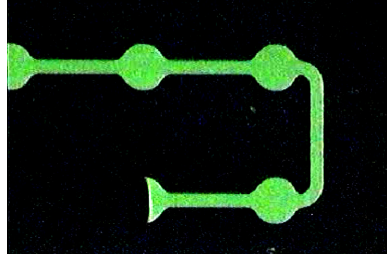


Abb. 58: Fluoreszenzbild zur Visualisierung der luftblasenfreien Befüllung des NWS.

4.3.2.3 Prüfung der Testmuster

Auf den gefertigten Testmustern wurden simulierte Prozessabläufe durchgeführt, um die Handhabbarkeit des Slides zu analysieren. Das NWS wurde insbesondere hinsichtlich der Temperaturstabilität und Selbstbefüllung getestet.

Prozessabläufe zur Vorbereitung des NWS

Bevor auf dem NWS ein Assay durchgeführt werden konnte, mussten in den Kavitätenböden zunächst Sonden vorgelegt werden, die durch Photoimmobilisierung angebunden werden konnten. Anschließend musste das Slide gedeckelt werden, bevor die Probenlösungen appliziert werden konnten.

In einem ersten Schritt mussten die Sonden in die Kavitätenböden gespottet werden. Zu Beginn der Untersuchungen wurde dies mit Hilfe eines MicroDrop-Pipettierroboters durchgeführt. Diese sequenzielle Sondendosierung hat jedoch den Nachteil, dass bei vielen verschiedenen Sonden der Zeitaufwand stark ansteigt. Außerdem war die Reproduzierbarkeit der Spots sehr schlecht. Die Kavitätenböden mussten mittig bedruckt werden, damit sich ein homogener Spot bilden konnte; bei Randberührung zog sich der Tropfen in die Ecken des Nanowells und trocknete dort inhomogen ein.

Eine wesentlich genauere und reproduzierbare Sondaufgabe konnte mit dem TopSpot erreicht werden. Dazu wurde ein speziell auf das Rastermaß der Nanowells angepasster 96-Medien-Druckkopf (8 x 12 Düsen im Abstand von 2,25 mm) hergestellt. Mit Hilfe dieser Druckköpfe konnten Sondenspots präzise in die Kavitätenböden aufgedruckt werden. Alle 96 Nanowells des NWS konnten in einem einzigen Druckvorgang mit bis zu 96 verschiedenen Sonden bespottet werden.

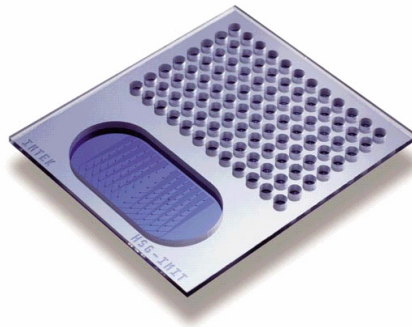


Abb. 59: 96-Medien-Druckkopf für die Sondendosierung auf das NWS mit TopSpot®.

Der nächste Prozessschritt war die Sondenimmobilisierung, die über photochemische Verfahren (Photoimmobilisierung) entsprechend der entwickelten Protokolle vorgenommen wurde.

Weiterhin musste das NWS mit einer Deckelungsfolie laminiert werden. Zunächst wurde die Folie lediglich über den Bereich der Nanowells und der Auslassöffnung geklebt, so dass die Befüllports komplett frei blieben. Dies führte jedoch zu Verunreinigungen zwischen den verschiedenen Kanälen, da die Flüssigkeit am Rand der Folie entlang kapillarisierte. Das Problem wurde behoben, indem die Folie auf das gesamte Slide aufgeklebt wurde, nachdem zuvor die Bereiche der Befüllports ausgestanzt wurden.

Temperaturstabilität und Dichtigkeit

Um eine stringente Hybridisierung auf dem NWS durchführen zu können, musste das Slide Temperaturen von bis zu 60 °C standhalten. Die für das NWS und die Folie verwendeten Kunststoffe waren bis zu dieser Temperatur stabil, jedoch stellte sich die Frage nach der Dichtigkeit eines gedeckelten und versiegelten Slides.

Um dies zu untersuchen, wurde ein mit hydrophiler Folie laminiertes NWS mit Fluoreszenzlösung befüllt, die Öffnungen mit Folie versiegelt und das Slide eine Stunde im Ofen auf 60 °C erwärmt.

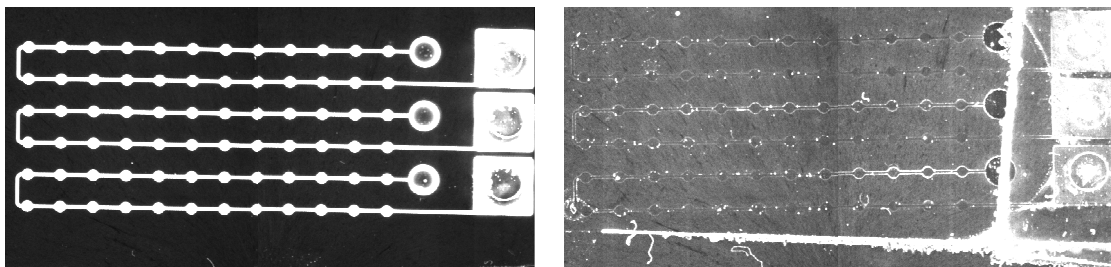


Abb. 60: Fluoreszenzbild eines mit Fluoreszenzlösung befüllten NWS direkt nach der Befüllung (links) und nach einer Stunde bei 60 °C (rechts, aufgehellt).

Nach der Temperaturbehandlung war die Lösung in den Kanälen eingetrocknet, während am äußeren Folienrand eine starke Fluoreszenz zu erkennen war. Das lässt vermuten, dass die Lösung durch die hydrophile Schicht zwischen der Folie und dem Slide nach außen diffundiert und am Folienrand verdunstet ist. Außerdem warf die Folie an einigen Stellen Blasen, was ebenfalls auf eine unzureichende Versiegelung hindeutete. Die Undichtigkeiten konnten auch nicht durch Druckaufgabe mithilfe eines angepassten PDMS-Stempels während der Erwärmung eingedämmt werden.

Die hydrophile Folie hat sich damit als ungeeignet für Anwendungen mit Temperature Aufgabe herausgestellt. Für alle weiteren Versuche wurde daher eine hydrophobe, unbeschichtete Adhäsionsfolie verwendet.

Selbstbefüllung der Kanäle

Wurde das NWS mit einer hydrophoben Folie laminiert, so konnte eine Selbstbefüllung wässriger Medien rein über Kapillarkräfte nicht mehr gewährleistet werden. Daher musste auf Detergenzien zurückgegriffen werden. Mit geringen Zusätzen von Triton X-100 konnte die Selbstbefüllung der Kanäle wiederhergestellt werden. Dabei ließen sich starke Unterschiede in der Geschwindigkeit der Befüllung je nach Triton-Konzentration feststellen, wie anhand der Befülldauer der Kanäle gezeigt wurde (Abb. 61). Mit zunehmender Detergenz-Konzentration nahm die Geschwindigkeit der Befüllung zu. Waren die Kanalwände jedoch einmal mit Detergenz belegt, so ließen sich die Kanäle auch mit geringsten Triton-Zusätzen zügig wiederbefüllen.

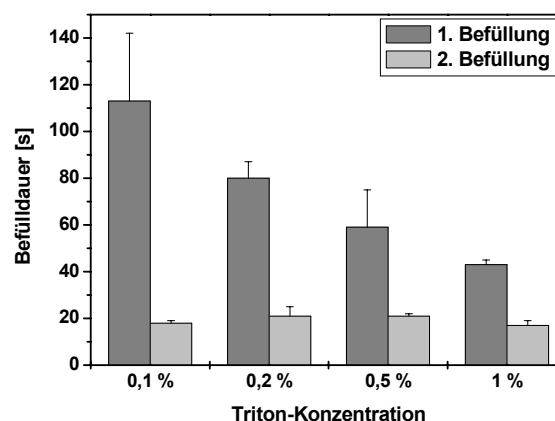


Abb. 61: Befülldauer der mikrofluidischen Kanäle in Abhängigkeit von der Triton-Konzentration.

4.3.2.4 Redesign und endgültiges Format

Die Erfahrungen aus den Materialtests wurden beim Redesign des NWS einbezogen. Statt einer hydrophilen wurde nun eine hydrophobe Deckelungsfolie verwendet, was den Zusatz von Detergenz zu den Probenlösungen notwendig machte.

Darüber hinaus wurde die Kanalgeometrie überarbeitet, indem die Kanaltiefe vermindert wurde, um das benötigte Probenvolumen von 2,5 auf 1,5 μL pro Kanal zu reduzieren. Jedes Nanowell hatte damit ein Volumen von etwa 35 nL. Die Befüllports wurden in einer runden, tropfenartigen Form gestaltet, um einen Verlust der Probenlösung in den Ecken zu vermeiden. Das Fassungsvermögen wurde damit gleichzeitig auf 2,3 μL reduziert. Der Probenauslass wurde verkleinert und mit einem Kapillarstopp versehen, um ein Auslaufen der Probenlösung zu unterbinden. Die Gesamtbemäßung des NWS wurde an das Objektträger-Format (26 x 76 mm) angepasst. In diesem endgültigen Format wurden NWS über Spritzguss in großer Stückzahl hergestellt (Abb. 62).

Weiterhin wurde ein auf die neue Slidegeometrie angepasster Vakuumport gefertigt, mit dem die Probenlösung aus den gefüllten Kanälen über den Auslassport auf der Unterseite des NWS entfernt werden konnte. Der Vakuumport wurde über eine Wasserstrahlpumpe betrieben.

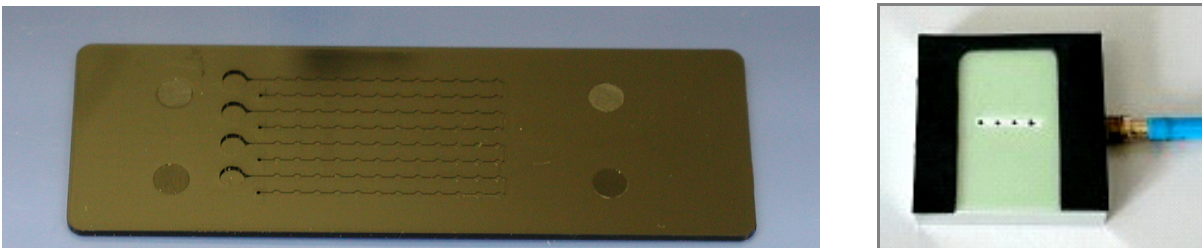


Abb. 62: NWS (Spritzguss) im endgültigen Design (links) und formatangepasster Vakuumport (rechts).

Das NWS in seiner endgültigen Form zeichnet sich durch zahlreiche Vorzüge aus:

- parallele Untersuchung von bis zu 4 verschiedenen Proben auf je 24 Merkmale
- kapillare Selbstbefüllung der mikrofluidischen Kanäle
- einfache Handhabung bei Befüllung, Prozessierung und Entfernung der Proben
- geringer Probenverbrauch von < 2 μL pro Kanal
- Standard-Formate (Kavitäten in MTP-Formaten, Slide im Objektträger-Format)
- kostengünstiger Herstellungsprozess durch Spritzguss

- Kunststoffmaterial mit hervorragenden optischen Eigenschaften, geringer Hintergrundfluoreszenz und optimalen Bindungseigenschaften
- angepasste Oberflächenchemie zur Sondenbindung über Photolinker

Das NWS stellt damit eine einzigartige Analyseplattform für die Applikation bioanalytischer Testverfahren dar. Ihre Anwendbarkeit wird im Folgenden am Beispiel von Hybridisierungs-Assays gezeigt.

4.3.3 Charakterisierung des NWS und der Oberflächenchemie: Kalibration der DNA-Hybridisierung

Um die Durchführbarkeit von DNA-basierten Assays auf dem NWS zu demonstrieren, wurde ein Hybridisierungs-Assay durchgeführt. Dabei wurde folgender Prozessablauf gewählt:

1. Printing der DNA-Arrays mit dem TopSpot
2. UV-Bestrahlung zur Photoimmobilisierung der DNA-Sonden, anschließend Reinigung
3. Deckelung des NWS mit transparenter Adhäsionsfolie
4. Vorbehandlung/Blockung der Kanal-Innenwände mit detergenzhaltiger BSA-Lösung, anschließend Abziehen der Lösung am Vakuumport
5. Applikation der Probenlösung und Inkubation, anschließend Abziehen der Lösung und Waschen der Kanäle am Vakuumport
6. Auslesen der Fluoreszenzintensität im BioScan

Das NWS zeichnet sich neben einfacher Handhabung und geringem Probenverbrauch vor allem dadurch aus, dass mehrere Proben gleichzeitig auf einem Slide prozessiert werden können. Dieser Vorteil wurde genutzt, um eine Kalibrierkurve für die DNA-Hybridisierung zu erstellen. Hierbei wurden 12 verschiedene DNA-Konzentrationen im Bereich von 0,1 bis 500 nM auf drei Slides untersucht.

Überdies wurde der Vorteil des NWS ausgenutzt, jede Probe auf mehrere unterschiedliche Merkmale untersuchen zu können. Dazu wurden drei verschiedene SONDENSEQUENZEN (DD1b23, DD2b23 und DD2a23, s. Anhang) immobilisiert, um die DNA-DNA-Wechselwirkungen von komplementären Sequenzen, Sequenzen mit Basenfehlstelle (SNP) sowie nicht-komplementären Sequenzen zu untersuchen (vgl. Abb. 52). Diese SONDENSEQUENZEN wurden darüber hinaus jeweils auf zwei verschiedene Arten immobilisiert, zum einen durch direkte Photoimmobilisierung der mit Photolinker modifizierten DNA (vgl. Kap. 4.1), zum anderen durch indirekte Photoimmobilisierung der unmodifizierten Oligonukleotide über

Photodextran (vgl. Kap. 4.2). Damit ergeben sich 6 verschiedene „Sonden“, die in jedem Kanal mit je 4 Replikas aufgebracht wurden.

Die so vorbereiteten Slides wurden wie oben beschrieben prozessiert und die erhaltenen Fluoreszenzwerte in Abb. 63 dargestellt. Die Kalibrationskurven wurden über eine Logistikfunktion modellfrei angepasst, da bei stopped-flow-Messungen eine Kinetik 1. Ordnung aufgrund der Diffusionsvorgänge in den Kanälen nicht mehr angenommen werden kann¹.

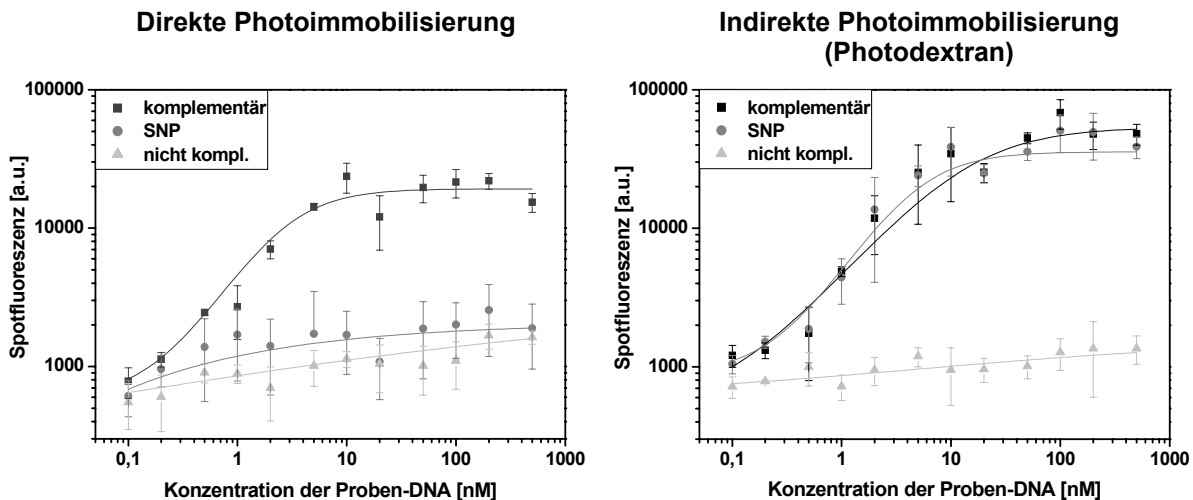


Abb. 63: Kalibrierkurven für den Nachweis von DNA, die über einen Hybridisierungs-Assay auf 3 NWS erhalten wurden. Links sind die Werte der direkt immobilisierten DNA-Spots dargestellt, rechts die Werte der Photodextran-Spots. ($n = 4$)

SNP-Diskriminierung

Der deutlichste Unterschied zwischen den Kalibrierkurven der durch direkte Immobilisierung einerseits und indirekte Immobilisierung über Photodextran andererseits erhaltenen Spots zeigt sich in der Diskriminierung der Basenfehlstelle (SNP). Die Bindungssignale der Wechselwirkung bei Basenfehlpaarung liegen bei direkt immobilisierten DNA-Sonden erwartungsgemäß deutlich unterhalb der komplementären Signale, während bei Photodextran-Spots kein signifikanter Unterschied erkennbar ist. Dieses Phänomen wurde bereits in Kap. 4.2.3 diskutiert und ist auf die ungerichtete, radikalische Anbindung der DNA-Sonden bei der Photodextran-Immobilisierung zurückzuführen.

¹ Eine exakte theoretische Betrachtung unter Berücksichtigung der Diffusionsvorgänge und der Kanalgeometrie ist sehr aufwendig und wurde nicht durchgeführt, da hier nur der quantitative Zusammenhang von Interesse ist. Eine Studie zur stopped-flow-Auswertung findet sich in [89].

Maximalsignal und Signaldynamik

Weiterhin sind signifikante Unterschiede in den Maximalsignalen erkennbar. Die mit Photodextran-Spots erhaltenen höchsten Signale liegen um etwa das 2,5-fache höher als die der direkt immobilisierten DNA-Spots. Der Zusammenhang mit der Beladungsdichte wurde bereits ebenfalls in Kap. 4.2.3 dargelegt. An dieser Stelle lässt sich nunmehr der Einfluss der Oberflächenbeladung auf die *Signaldynamik*¹ analysieren. Während bei einer niedrigeren Oberflächenbeladung, welche durch direkte Photoimmobilisierung erhalten wird (Monolage), die Signaldynamik bereits bei einem sehr hohen Wert von 97 % lag, stieg sie bei Verwendung von Photodextran-Schichten sogar auf 99 % an.

Diskriminierung unspezifischer Bindung

Nicht weniger ausschlaggebend als die Signaldynamik ist bei der Untersuchung von DNA-DNA-Wechselwirkungen die Diskriminierung zwischen spezifischer (komplementärer) und unspezifischer (nicht-komplementärer) Wechselwirkung. Die *Diskriminierungsrate*, d. h. der Faktor zwischen nicht-komplementären und komplementären Bindungssignalen, die im Sättigungsbereich bestimmt wurde, ließ sich durch Verwendung von Dextranschichten von 15 auf 42 steigern.

Arbeitsbereich

Eine quantitative Bestimmung von DNA durch Array-Hybridisierung ist nur in begrenztem Umfang möglich, da der *Arbeitsbereich*², d. h. der Konzentrationsbereich, in dem eine quantitative Bestimmung sinnvoll ist, für Hybridisierungsereignisse in einem sehr engen Konzentrationsbereich liegt. Eine quantitative Bestimmung ist überdies häufig nicht erforderlich, da in den meisten Array-Anwendungen lediglich eine Ja/Nein-Aussage erwünscht wird. Jedoch kann durch eine angepasste Oberflächenchemie, insbesondere durch Verwendung von Hydrogel-Schichten, der Arbeitsbereich beeinflusst werden, wie in diesem Vergleichsexperiment gezeigt werden konnte. Für direkt immobilisierte DNA-Sonden lag der Arbeitsbereich zwischen 0,5 und 13 nM und konnte durch Verwendung von

¹ Die Signaldynamik beschreibt den Bereich des Signals zwischen dem Minimalsignal (Nullwert) und dem Maximalsignal. Sie wurde hier aus dem Logistik-Fit berechnet nach $(A_2 - A_1)/A_2$, mit A_1 und A_2 als unterer bzw. oberer Asymptote.

² Der Arbeitsbereich kann aus der Logistik-Fit berechnet werden und beschreibt den Konzentrationsbereich, in welchem das Signal zwischen 10 und 90 % (innerhalb des dynamischen Signalbereichs) liegt.

Photodextran auf einen wesentlich größeren Bereich von 1,3 – 141 nM ausgedehnt und damit quantitative Aussagen erleichtert werden.

4.3.4 Validierung des NWS: Detektion von PCR-Produkten

Um die Leistungsfähigkeit des NWS und seiner Komponenten anhand von „Realproben“ zu demonstrieren und gleichzeitig die Kompatibilität mit anderen Modulen der nanoMAP-Plattform zu zeigen, wurden auf dem PCR-Slide eine PCR durchgeführt und die Probenlösungen auf das vorbereitete NWS übertragen, um die PCR-Produkte dort über einen Hybridisierungs-Assay nachzuweisen (Abb. 64). Diese Arbeit wurde in Kooperation mit dem IMTEK (Freiburg) durchgeführt [80].

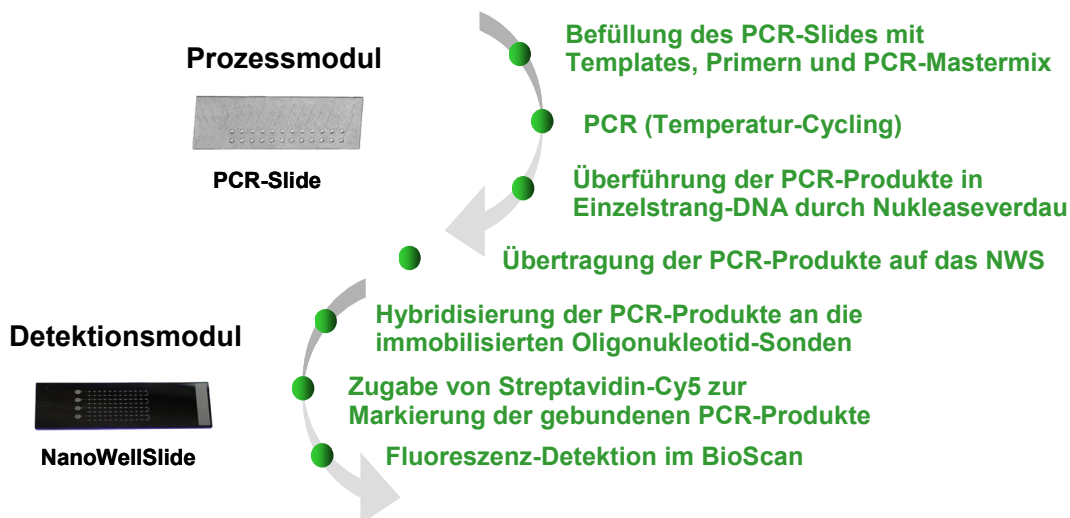


Abb. 64: Durchführung und Detektion der PCR anhand des nanoMAP-Prozessablaufs.

Als Matrizenstrang für die PCR wurde ein Expressionsvektor pcDNA3 gewählt, der mit einem Raf-Gen kloniert wurde. Es wurde sowohl der klonierte Vektor als auch der Leervektor prozessiert. In der PCR wurde lediglich der Ausschnitt des Vektors amplifiziert, an dem die Klonierung erfolgte. Dazu wurden die PCR-Primer derart konzipiert, dass für beide Amplifikationen der gleiche 5'-Primer verwendet werden konnte, während der 3'-Primer auf die zu amplifizierende Sequenz angepasst wurde. Der klonierte Vektor wurde mit einem Raf-spezifischen 3'-Primer umgesetzt, so dass das PCR-Produkt von 659 Nukleotiden einen Großteil des Raf-Gens enthielt. Dem Leervektor wurde ein Vektor-spezifischer 3'-Primer zugesetzt, so dass lediglich ein sehr kurzer Ausschnitt des pcDNA-Vektors (135 Nukleotide) erhalten wurde.

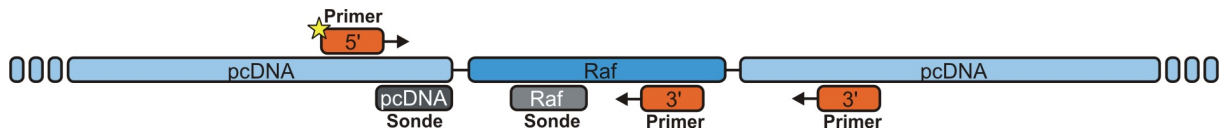


Abb. 65: Design der PCR-Primer und Hybridisierungs-Sonden am pcDNA-Vektor mit klonierter Raf-Sequenz.

Durchführung der PCR auf dem PCR-Slide

Auf dem PCR-Slide wurden 3 verschiedene Proben prozessiert:

- der mit dem Raf-Gen klonierte Vektor (pcDNA+Raf),
- der Leervektor ohne Raf-Gen (pcDNA),
- eine Negativkontrolle ohne Matrizenstrang (non-template control, NTC).

Dabei wurde der PCR-Reaktionsmischung, die aus den Primern, der Polymerase und den 4 Nucleotiden (Desoxyribonucleotid-Triphosphate, dNTPs) bestand, spezielle Biotin-markierte dUTPs zugesetzt, die in die PCR-Produkte eingebaut wurden. Dies ermöglichte eine Detektion der PCR-Produkte mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem Streptavidin.

Das PCR-Slide wurde ebenfalls für die Aufarbeitung der PCR-Produkte verwendet. Im Anschluss an die PCR wurde T7 5'-Exonuklease zur Reaktionslösung in die Kavitäten des PCR-Slides gegeben [81]. Durch die Exonuklease wurden die DNA-Stränge in ihre einzelnen Nucleotide aufgespalten. Durch Modifikation des 5'-Primers mit Thiophosphat war dieser gegen den Exonukleaseverdau geschützt und verblieb somit als Einzelstrang in der Reaktionslösung.

Detektion der PCR-Produkte auf dem NWS

Auf dem NWS wurden zwei verschiedene DNA-Sonden über Photodextran immobilisiert. Eine Raf-Sonde war spezifisch für einen Bereich des Raf-Gens, während die pcDNA einen Bereich des Expressionsvektors erfasste, der in beiden Templates vorkam (vgl. Abb. 65). Zur Kontrolle unspezifischer Wechselwirkungen wurden auch Photodextran-Spots einbezogen, die keine DNA-Sonden enthielten (PD Blank).

Jede der drei PCR-Proben wurde in einen Kanal des NWS appliziert und für die Hybridisierung inkubiert. Anschließend wurden die hybridisierten Arrays mit einer Lösung aus Cy5-markiertem Streptavidin inkubiert, welches an die biotinylierten dUTPs binden konnte. Die Fluoreszenzspots wurden ausgelesen und in Abb. 66 dargestellt.

Ergebnisse der PCR-Untersuchungen

Wie erwartet erhielt man für die PCR-Produkte des klonierten Vektors sowohl Bindungssignale an den pcDNA-Sonden als auch an den Raf-Sonden, wohingegen die Leervektor-Sequenzen lediglich an die pcDNA-Sonden gebunden haben. Bei der Negativkontrolle waren wie erwartet keine Bindungssignale zu sehen. Eine unspezifische Bindung an die Photodextran-Spots trat ebenfalls nicht auf. Diese Ergebnisse wurden durch den Projektpartner IMTEK sowohl über Kapillarelektrophorese als auch durch weitere Array-Experimente verifiziert [82].

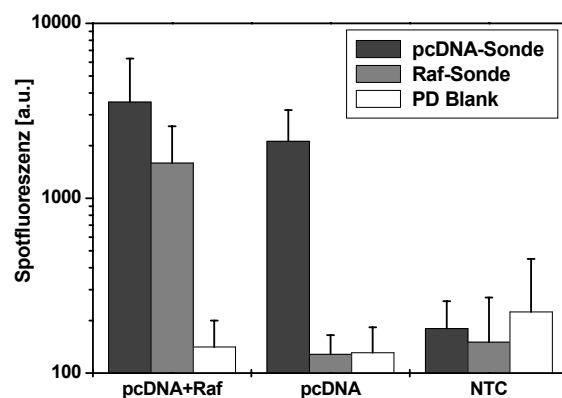


Abb. 66: Ergebnisse der Untersuchung der PCR-Produkte pcDNA+Raf (klonierter Vektor), pcDNA (Leervektor) und der Negativkontrolle (non-template control NTC) auf dem NWS über einen zweistufigen Hybridisierungs-Assay. ($n = 6$)

Es konnte somit gezeigt werden, dass das NWS ein wertvolles Instrument für die parallele Untersuchung von PCR-Produkten ist, insbesondere in Kombination mit dem formatangepassten Modul des PCR-Slides im Rahmen des nanoMAP-Konzepts.

4.4 Einsatz der Photoimmobilisierung in der Biosensorik: Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS)

Wie auch in vielen anderen Bereichen, so findet auch in der Biosensorik ein starker Trend hin zu Einmal-Transducern aus Kunststoff-Materialien statt. Im Bereich der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) bestehen bereits Ansätze, dieses Verfahren vom konventionellen Interferenzglas auf Vollplastik-Transducer zu übertragen [83]. Um nun zu zeigen, dass die entwickelte Photolinker-Chemie für biosensorische Anwendungen geeignet ist, wurde beispielhaft die Affinitätswechselwirkung zwischen Streptavidin und photoimmobilisiertem Biotin (Photobiotin) auf Kunststoff-beschichtetem Interferenzglas untersucht. Dabei wurden Photolinker nicht nur für die Sonden-Immobilisierung verwendet, sondern auch zur Fixierung der Kunststoffschicht auf dem Glastransducer eingesetzt.

4.4.1 Präparation von Topas-Schichten auf Glastransducern

Um mit RIfS auf Kunststoffoberflächen arbeiten zu können, mussten zunächst herkömmliche Glastransducer mit einer Kunststoffschicht (Topas) über ein Spincoating-Verfahren beschichtet werden.

Untersuchung der Schichtdicke

Beim Spincoating wird die resultierende Schichtdicke vor allem durch die Konzentration der Kunststofflösung und durch die Umdrehungszahl des Spincoaters beeinflusst. In Vorversuchen wurden diese Parameter variiert und die erhaltenen Topasschichten ellipsometrisch vermessen. Die so bestimmten Schichtdicken sind in Tab. 6 zusammengefasst. Wie erwartet nahm die Schichtdicke mit höherer Umdrehungszahl sowie geringerer Konzentration der Topaslösung ab.

	2500 U/min	4000 U/min
5 %	310 nm (3,79)	238 nm (2,59)
10 %	734 nm (6,66)	598 nm (7,65)

Tab. 6: Topas-Schichtdicken bei verschiedenen Topas-Konzentrationen in Toluol sowie bei verschiedenen Umdrehungszahlen des Spincoaters, bestimmt durch Ellipsometriemessung (RMSE in Klammern).

Neben den in Tab. 6 gezeigten Topasschichten wurden auch Schichten mit 20 % (w/w) Topas in Toluol hergestellt, deren Oberflächen jedoch zu starke Unebenheiten aufwiesen und die daher ellipsometrisch nicht vermessen werden konnten. Aus diesem Grund wurden sie auch nicht für die RfS-Messungen verwendet.

Ausgehend von diesen Untersuchungen konnten nun gezielt verschiedene Topas-Schichtdicken für die RfS-Messungen hergestellt werden.

Stabilisierung der Schichten

Aufgrund der geringen adsorptiven Wechselwirkungen zwischen hydrophiler Glasoberfläche und hydrophober Kunststoffschicht wies der Schichtaufbau durch Spincoating eine sehr geringe mechanische Stabilität auf. Um die Kunststoffschicht durch eine kovalente Anbindung zu fixieren, wurde der Glastransducer zuvor mit dem Photolinker Benzophenon modifiziert (Abb. 67). Nach dem Spincoating wurde der Transducer mit UV-Licht bestrahlt und die Polymerschicht somit durch den Photolinker kovalent an die Glasoberfläche gebunden. Die so hergestellten Kunststoff-Schichten wiesen eine hohe mechanische Stabilität auf.

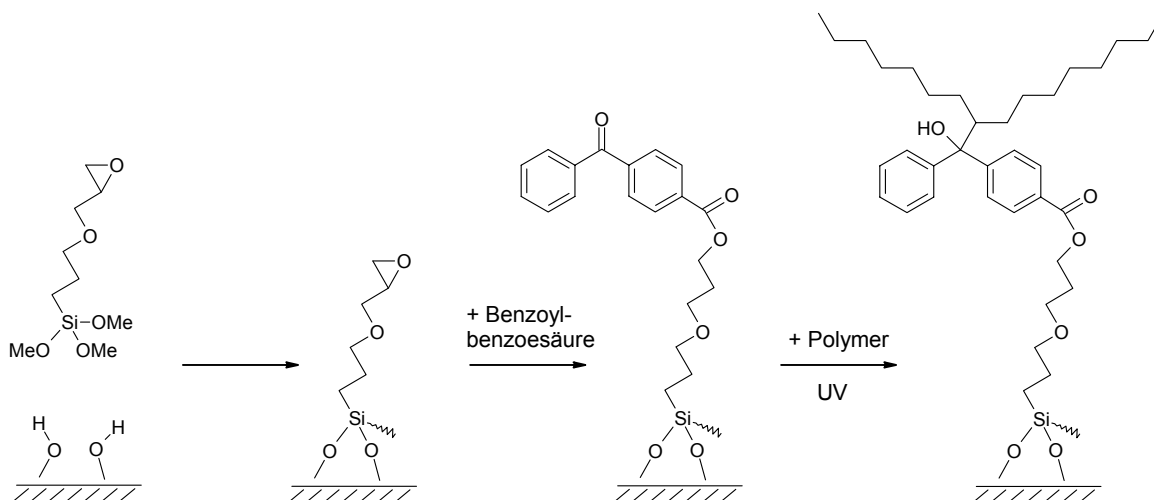


Abb. 67: Modifizierung von Glastransducern mit Photolinkern und Photolinking von Polymerschichten.

Der Einsatz der Polymerschicht als reine Interferenzschicht hat keine entscheidenden Vorteile gegenüber der Verwendung herkömmlicher Glastransducer mit definierten optischen Eigenschaften und wurde hier nur zur Demonstration der Oberflächenchemie eingesetzt. Jedoch können auch Polymerschichten selbst als sensorische Schichten eingesetzt werden, wie z. B. molekular geprägte Polymere (MIPs) oder mikroporöse Schichten. Für derartige Anwendungen bietet sich mit der photolinker-unterstützten Anbindung der Polymerschicht eine optimale Methode zur Stabilisierung von Schichtsystemen, die durch Spincoating oder ähnliche Methoden erhalten wurden.

4.4.2 RlFS auf Photobiotin-beschichtetem Topas

Für die RlFS-Untersuchungen wurde die Bindung von Streptavidin an oberflächengebundenes *Photobiotin* untersucht, da das Molekulargewicht eines Proteins wie Streptavidin mit 60.000 g/mol wesentlich höher ist als das der bisher untersuchten DNA-Oligonukleotide mit etwa 7.000 g/mol, so dass ein wesentlich größeres Signal der Schichtdickenänderung zu erwarten ist (s. a. Ergebnisse der Ellipsometrieuntersuchungen an DNA-Schichten, Kap. 4.1.2.1). *Photobiotin* ist ein kommerziell erhältliches Biotin-Derivat, welches eine Nitrophenylazid-Gruppe als photoreaktive Komponente enthält (Abb. 22).

Die ersten Untersuchungen wurden auf Topasschichten von 310 nm durchgeführt. Diese Schichtdicke wurde gewählt, da sie der Schichtdicke eines Glas-RlFS-Transducers (300 nm SiO₂) am nächsten kam. Die Topas-Schicht wurde flächig mit Photobiotin funktionalisiert. Dazu wurde ein Tropfen einer hochkonzentrierten Photobiotinlösung (1 mg/mL) manuell auf den Messbereich des Transducers aufgetragen, bei 60 °C eingetrocknet und durch UV-Bestrahlung immobilisiert. Anschließend wurde der Transducer in das RlFS-Gerät eingesetzt und sowohl die Oberflächenblockung mit BSA als auch die Bindungskurve von Streptavidin online verfolgt.

Quantitative Auswertung der Bindungssignale

In den in Abb. 68 gezeigten Bindungskurven ist die Änderung der optischen Schichtdicke $\Delta(nd)$ gegen die Zeit aufgetragen. Man erkennt für die Photobiotinschicht (durchgezogene Bindungskurve) ein hohes Bindungssignal sowohl für BSA (1,9 nm) als auch für Streptavidin (3,1 nm). Eine Oberflächen-Blockung mit BSA ist für Kunststoffoberflächen unabdingbar zur Vermeidung unspezifischer Bindung des Analyten, wie man an der starken Bindung von BSA an die Oberfläche erkennen kann. Auch die spezifische Bindung von Streptavidin ist erwartungsgemäß sehr hoch, da die Oberfläche maximal mit Photobiotin belegt wurde und Streptavidin in hoher Konzentration (50 $\mu\text{g/mL}$) aufgegeben wurde. Greift man auf den radiometrisch bestimmten Wert von 1,75 nm/(ng/mm²) zurück, der die Höhe des Bindungssignals mit der Menge an gebundenem Protein in Verbindung setzt [84], so erhält man eine mittlere Oberflächenbeladung von 1,1 ng/mm² für BSA sowie 1,8 ng/mm² für Streptavidin.

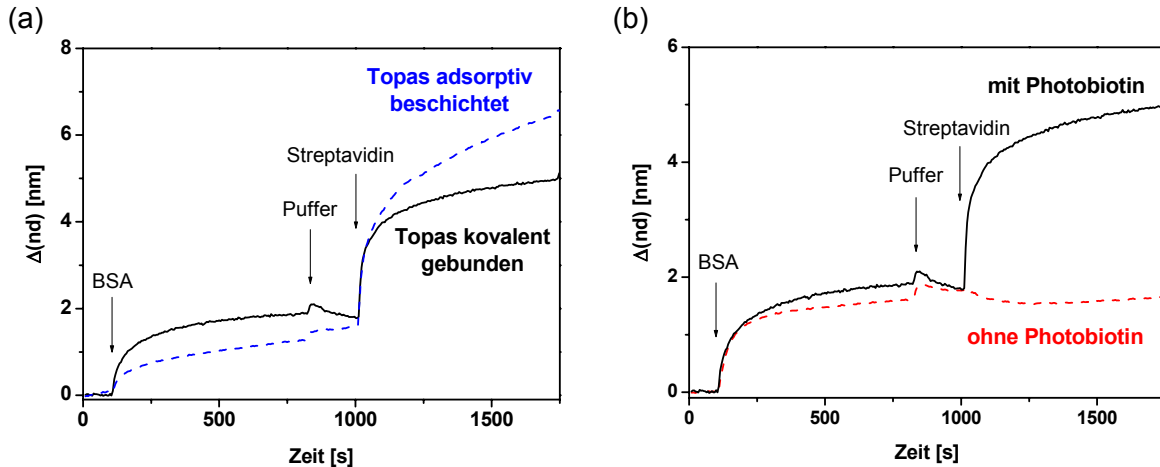


Abb. 68: RfS-Bindungskurven von BSA und Streptavidin an Photobiotin (durchgezogene Kurven);
 (a) Vergleich kovalent gebundener Topas-Schicht mit adsorptiv gebundener Topas-Schicht;
 (b) Positiv- vs. Negativkontrolle auf Transducern mit und ohne Photobiotin.

Stabilität der Topas-Schichten

In Abb. 68a sieht man den Vergleich zweier RfS-Messungen, die zum einen auf kovalent gebundenen Topas-Schichten und zum anderen auf rein adsorptiv gebundenen Topas-Schichten erhalten wurden. Zwar konnten mit beiden Schichten Messungen durchgeführt werden, jedoch zeigte sich auf ungebundenen Topas-Schichten eine Drift im Bindungssignal. Nach der Messung hatte sich die Polymerschicht schließlich sichtbar vom Transducer gelöst, was vermuten lässt, dass dieser Ablösevorgang bereits während der Messung zu einem verfälschten Bindungssignal geführt hat. Die über Photolinker kovalent auf dem Glatransducer fixierten Kunststoff-Schichten zeigten dieses Verhalten nicht. Sie ließen sich mehrfach regenerieren und wiederverwenden und wiesen bei der Handhabung eine sichtbar höhere mechanische Stabilität auf.

Kontrolle unspezifischer Bindung von Streptavidin

Die Spezifität der Bindung von Streptavidin wurde anhand eines Topas-beschichteten Transducers getestet, der nicht mit Photobiotin modifiziert wurde (Abb. 68b). Eine unspezifische Bindung des Streptavidins an die (mit BSA belegte) Kunststoffoberfläche trat nicht auf, d. h. die Blockung mit BSA war vollständig.

4.4.3 RfS auf Biotin-Photodextran

Auf Topas-beschichteten RfS-Transducern wurde ebenfalls der Einsatz von Dextranschichten untersucht. Dazu wurde biotinyliertes Photodextran (*Biotin-Photodextran*,

vgl. Abschnitt 4.2.1.3) verwendet, welches durch UV-Bestrahlung auf den Topasschichten photoimmobilisiert wurde.

Vergleich von Biotin-Photodextran und Photobiotin

Um die Bindungseigenschaften von Dextranschichten mit denen flächig immobilisierter Sonden direkt vergleichen zu können, wurde eine hohe Topas-Schichtdicke von 734 nm gewählt, so dass der Einfluss der zusätzlichen Dextranschicht auf die Gesamtschichtdicke gering blieb. Weiterhin sollte eine reproduzierbare Schichtdicke erhalten werden, daher wurden die Schichten mit Hilfe der MicroDrop-Anlage aufgebracht. Die Konzentrationen der Biotin-Photodextran-Lösung und der Photobiotinlösung wurden so gewählt, dass sie vergleichbare Mengen an Biotinfunktionen (ca. 5 nmol/mL) enthielten.

In Abb. 69a ist die Bindungskurve von BSA und von Streptavidin an die Biotin-Photodextran-Schicht (durchgezogene Linie) gezeigt. Im Vergleich mit der Bindungskurve von direkt auf die Kunststoffoberfläche gebundenem Photobiotin findet man eine wesentlich geringere Bindung von BSA an die Oberfläche, d. h. die Kunststoffoberfläche wird bereits durch das Dextran teilweise vor unspezifischer Bindung abgeschirmt. Bei der spezifischen Bindung von Streptavidin kann man ein hohes Bindungssignal an das biotinylierte Dextran feststellen, während keine nennenswerte Bindung von Streptavidin an die Photobiotin-Schicht stattfindet. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Konzentration des Photobiotins für eine flächige Immobilisierung zu gering war, während beim Biotin-Photodextran der Volumeneffekt des Dextrans ausgenutzt werden konnte.

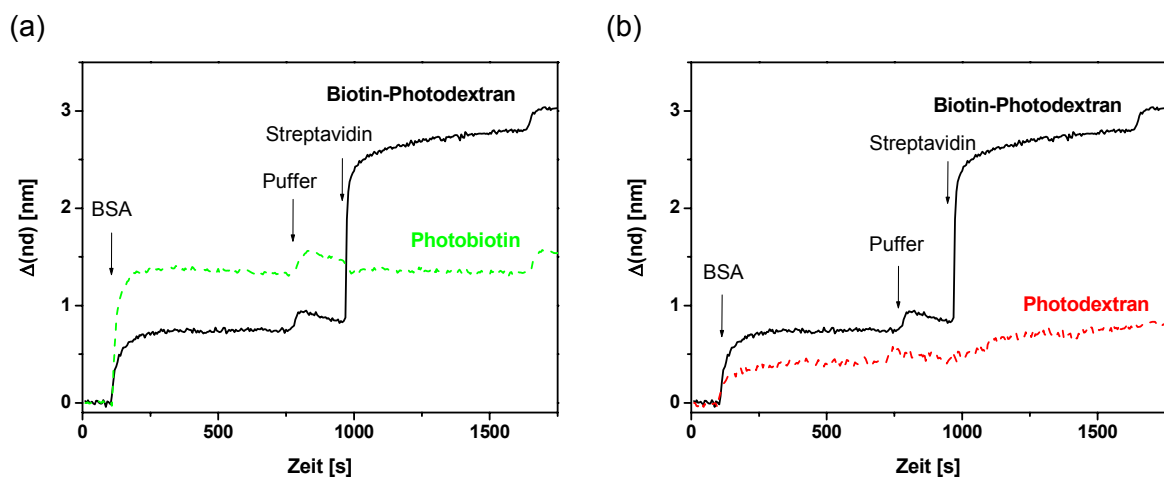


Abb. 69: RfS-Bindungskurven auf Biotin-Photodextran-Schichten (durchgezogene Kurven);

(a) Vergleich von dextrangebundenem und direkt immobilisiertem Biotin gleicher Oberflächenkonzentration;

(b) Kontrolle unspezifischer Bindung von Streptavidin an nicht-biotinyliertes Photodextran.

Kontrolle unspezifischer Bindung von Streptavidin an Dextran

Um die Dextranschicht auf eine mögliche unspezifische Bindung von Streptavidin zu überprüfen, wurde ein RfS-Transducer mit nicht-biotinyliertem Photodextran modifiziert. Abb. 69b zeigt die Bindungskurven von Streptavidin an biotinyliertes und nicht-biotinyliertes Photodextran, wobei ein sehr geringes Bindungssignal durch unspezifische Wechselwirkung erkennbar ist.

Stabilität und Kinetik der Biotin/Avidin-Wechselwirkung

Die Affinitätsbindung zwischen Biotin und Avidin ist für ihre hohe Stabilität bekannt und wird daher standardmäßig für die Immobilisierung von Sondenmolekülen eingesetzt [85]. Sie sollte daher durch den Regenerationsschritt mit SDS (0,1 %, pH 1,8), der nach jeder Bindungsmessung durchgeführt wurde, nicht zerstört werden. Dies wurde anhand der Messungen, die in Abb. 70 dargestellt sind, kontrolliert. Dabei wurde ein mit Photobiotin (a) bzw. Biotin-Photodextran (b) belegter Transducer nach der Streptavidinbindung online regeneriert und das Messprotokoll ein weiteres Mal durchgeführt.

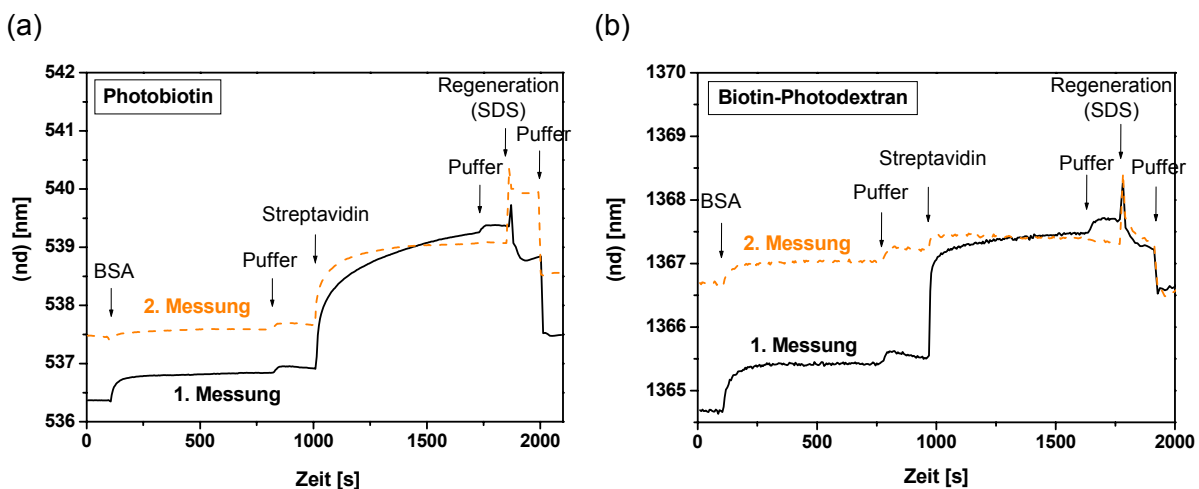


Abb. 70: Kontrolle der Streptavidinbindung an Photobiotin (a) und Biotin-Photodextran (b) auf Regenerierbarkeit.

Auf den Photobiotinschichten erkennt man auch bei der 2. Messung eine Bindung von Streptavidin. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die Biotin-Bindungsstellen an der Oberfläche nach der ersten Messung noch nicht vollständig belegt waren, wie man aus dem stetig ansteigenden Bindungssignal der ersten Messung erkennen kann. Auf den Biotin-Photodextran-Schichten ist die Kinetik der Streptavidinbindung wesentlich schneller, so dass bereits innerhalb der ersten Messung nahezu alle Biotin-Bindungsstellen belegt und somit in einer wiederholten Bindungsphase nur ein sehr geringes Bindungssignal detektiert wurden.

Die Ergebnisse wurden durch Fluoreszenzmessungen bestätigt, indem die Bindungsstudien mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin durchgeführt wurden. Es konnten auch nach Regeneration der Oberfläche hohe Fluoreszenzsignale detektiert werden.

Einfluss der Dextran-Schichtdicke

Für die direkte Immobilisierung von Photobiotin auf das Kunststoffsubstrat konnte ein sehr hohes Bindungssignal festgestellt werden, wenn die Konzentration der aufgetragenen Lösung und damit auch die Oberflächenbeladung maximal war (vgl. Abb. 68), während bei niedrigen gespotteten Konzentrationen kein Bindungssignal erhalten wurde. Dies ist auf eine unterschiedliche Dichte an Biotin-Bindungsstellen auf der Oberfläche zurückzuführen.

Eine Änderung der gespotteten Konzentration führt dagegen bei Photodextran zu einem vollkommen gegenteiligen Effekt. Im Gegensatz zu Photobiotin, das lediglich eine einzelne photoreaktive Gruppe pro Molekül besitzt und das somit bei Photoimmobilisierung maximal eine Monolage auf der planaren Kunststoffoberfläche belegen kann, tragen die Polymerketten des Biotin-Photodextrans zahlreiche Photolinkerfunktionen. Diese Eigenschaft befähigt das Photodextran zur Quervernetzung, indem die Photolinkergruppen nicht nur an die Kunststoffoberfläche, sondern vielmehr an bereits immobilisierte Dextranmoleküle binden können, so dass sich ein dichtes Netzwerk quervernetzter Dextrane ausbilden kann. Das Auftragen höherer Konzentrationen von Photodextran auf die Oberfläche führt folglich zu höheren Dextranschichtdicken. Der Schichtdickenzuwachs wird darüber hinaus noch durch das Quellverhalten des Dextrans in Pufferlösung (bis zu Faktor 10 gegenüber Luft [70]) verstärkt.

Mit zunehmender Dextranschichtdicke und damit einer höheren Anzahl von Biotin-Bindungsstellen sollte auch im RfS-Signal eine höhere Schichtdickenänderung bei Streptavidinbindung detektiert werden. Jedoch wurde festgestellt, dass die Änderung des RfS-Signals (Extremwertverschiebung) bei höheren Schichtdicken *geringer* wird statt wie erwartet zunimmt [29]. Dies kann auf eine höhere Heterogenität bzw. Dichtegradienten innerhalb der Schicht zurückgeführt werden. Anhand unterschiedlich präparierter Dextranschichten, die durch Spotten von 30 µg/mL bzw. 300 µg/mL sowie durch manuelle Aufgabe von 1 mg/mL Biotin-Photodextran erhalten wurden, wurde dieses Phänomen demonstriert. Die Bindung von Streptavidin wurde mit RfS verfolgt und die Extremwertverschiebung in Abb. 71 aufgetragen. Dabei wurde fluoreszenzmarkiertes Streptavidin verwendet, um als Referenzmethode die Fluoreszenzdetektion einsetzen zu

können¹. Die mittlere Fluoreszenzintensität innerhalb des Messbereichs ist ebenfalls in Abb. 71 dargestellt.

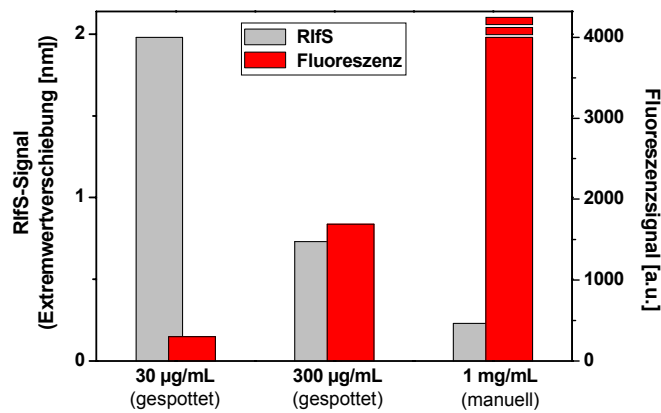


Abb. 71: RfS- und Fluoreszenz-Signale der Streptavidinbindung an Biotin-Photodextran-Schichten mit unterschiedlicher Schichtdicke (Fluoreszenz: Sättigung bei 4000 a.u.).

Mit zunehmender Dextran-Konzentration nahm das RfS-Signal bei Streptavidinbindung ab. Die sehr hohen Signale der Fluoreszenzmessungen zeigten dagegen eine zunehmende Bindung von Streptavidin, was auf eine hohe Anzahl von Biotin-Bindungsstellen auf der Oberfläche und damit auf eine hohe Dextranschichtdicke schließen ließ.

Neben der Abnahme des RfS-Signals bei hohen Schichtdicken konnte auch eine Umkehrung der Bindungssignale bei Streptavidinbindung („negative Schichtdickenänderung“) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Das Phänomen einer Modulation des Interferenzsignals tritt ebenfalls bei höheren Schichtdicken auf und wurde bereits ausführlich charakterisiert [29].

Schlussfolgerungen

Der Aufbau des Schichtsystems ist von entscheidender Bedeutung für die Reflektometrische Interferenzspektroskopie. Der Einsatz von Photodextran für RfS-Messungen ist nur angebracht, wenn die Dextranschichtdicke einerseits kontrolliert und andererseits gering gehalten werden kann, da die RfS-Bindungssignale mit zunehmender Dextranschichtdicke abnehmen. Demzufolge wäre für den Einsatz in der Reflektometrie ein Photodextran optimal,

¹ Leider war eine verlässliche Bestimmung der erhaltenen Dextranschichtdicke mit Hilfe der Ellipsometrie nicht möglich, da bei der Anpassung der ellipsometrischen Messwerte sehr unterschiedliche Ausgabewerte je nach Wahl der Startparameter erhalten wurden.

welches nur wenige Photolinkerfunktionen trägt und daher ein geringes Potential zur Quervernetzung aufweist. Weiterhin kann der Vernetzungsgrad möglicherweise über die Bestrahlungsdauer kontrolliert werden (vgl. Kap. 4.1.1.4).

4.5 Photoimmobilisierung von Antikörpern

Die Methode der Photoimmobilisierung wurde in den bisherigen Untersuchungen lediglich zur Anbindung von DNA-Molekülen sowie von Biotin eingesetzt. Dass die Photoimmobilisierung ein universell einsetzbares Verfahren zur Biomolekül-Anbindung darstellt, soll nun anhand der Immobilisierung von Proteinen demonstriert werden.

Für viele Anwendungen wird eine Anbindung von Proteinen an Polymeroberflächen durch eine einfache adsorptive Wechselwirkung erreicht. Die meisten Proteine besitzen hydrophobe Bereiche, die durch die hydrophoben Aminosäuren Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan gebildet werden. Diese Gruppen können über hydrophobe Wechselwirkungen an Polymeroberflächen adsorbieren. Die adsorptive Bindung von BSA an Kunststoffoberflächen, die in den vorhergehenden Untersuchungen zur Blockung der Oberfläche und zur Unterbindung der unspezifischen Adsorption der Analyt-Moleküle ausgenutzt wurde, zeigt dies in eindrücklicher Weise (siehe auch [86,87]). Da sich hydrophobe Aminosäuren in Proteinen im Inneren zusammenlagern, spielen sie eine gewisse Rolle bei der Stabilisierung der Proteinstruktur. Eine Bindung dieser Gruppen an eine Oberfläche geht daher mit strukturellen Änderungen (Denaturierung) einher, was einen Verlust der Funktionalität des Proteins zur Folge haben kann. Darüber hinaus kann das Protein auch direkt mit der Bindungstasche auf der Oberfläche zu liegen kommen und somit eine Wechselwirkung mit dem Analyten verhindern. Neben einem möglichen Funktionalitätsverlust ist die mangelnde Stabilität einer adsorptiven Bindung ein weiterer Nachteil. Adsorptiv gebundene Proteine können durch Änderung der Lösungsmitelegenschaften (z. B. durch Zusatz von Detergenzien oder pH-Änderung) leicht wieder gelöst werden. Aus diesen Gründen ist eine kovalente Immobilisierung des Proteins ohne Funktionalitätsverlust sehr wünschenswert.

Eine kovalente Anbindung von Proteinen an Kunststoffoberflächen kann durch Photoimmobilisierung erreicht werden. Allerdings würde für die direkte Photoimmobilisierung ein mit Photolinker modifiziertes Protein auf eine unbehandelte Kunststoffoberfläche gegeben, wobei eine adsorptive Bindung des Proteins nicht verhindert werden könnte. Die direkte Photoimmobilisierung von Proteinen liefert demzufolge lediglich einen Stabilitätsgewinn, verhindert jedoch nicht einen möglichen Funktionalitätsverlust. Es wurde daher der Weg der indirekten Photoimmobilisierung über Photodextrane eingeschlagen, da die Kunststoffoberfläche durch das Dextran teilweise abgeschirmt wird. Beispielhaft wurde der IgG-Antikörper anti-BSA auf Kunststoffoberflächen immobilisiert und der Nachweis der Ankopplung durch Affinitätsreaktion mit fluoreszenzmarkiertem BSA durchgeführt.

Es wurden drei verschiedene Strategien zur indirekten Photoimmobilisierung von Antikörpern untersucht, die einstufige und kovalente Immobilisierung von unmodifizierten Antikörpern über Photodextran (Kap. 4.5.1, Abb. 72) sowie zwei Ansätze zur Immobilisierung biotinylierter Antikörper an Avidin-beschichtete Oberflächen über Biotin/Avidin-Affinitätsbindung (Kap. 4.5.2). Eine Avidinbeschichtung der Oberfläche wurde einerseits durch Photoimmobilisierung von Avidin über Photodextran erreicht (Abb. 76), andererseits durch Photoimmobilisierung von Biotin-Photodextran und Affinitätsbindung von Avidin an die Biotin-Funktionen (Abb. 77).

In diesem Abschnitt soll die prinzipielle Durchführbarkeit der Antikörper-Immobilisierung über Photodextrane gezeigt und kurz die Möglichkeiten einer Optimierung aufgezeigt und diskutiert werden.

4.5.1 Photoimmobilisierung von Antikörpern über Photodextran

Die einfachste Methode der Photoimmobilisierung von Antikörpern an Kunststoffoberflächen ist die einstufige Anbindung über Photodextran. Dazu werden die Antikörper mit Photodextran gemischt und auf die Oberfläche gespottet. Bei Bestrahlung mit UV-Licht binden die Photolinker-Gruppen des Photodextrans sowohl an die Oberfläche als auch gleichzeitig an die Antikörper (Abb. 72).

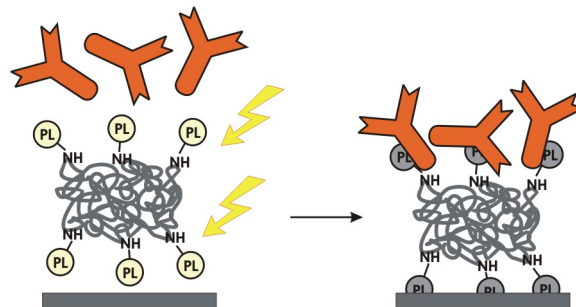


Abb. 72: Einstufige Photoimmobilisierung von Antikörpern über Photodextran.

Der Nachteil dieser Methode ist die Unspezifität der radikalischen Bindung des Photolinkers an das Antikörper-Molekül. Bei der Immobilisierung von DNA führte dies zu einem Verlust der Spezifität (vgl. Kap. 4.2.3). Im Gegensatz zur DNA jedoch, bei der das gesamte Molekül als „Bindungsstelle“ fungiert, machen die Antigen-Bindungsstellen eines Antikörpers lediglich einen kleinen Bereich des Moleküls aus, so dass die Chance sehr gering ist, dass ausgerechnet dieser Teil des Moleküls durch den Photolinker gebunden wird. Es wird daher lediglich ein geringer Verlust der Antigenizität erwartet.

Um eine optimale Konzentration der gespotteten Antikörper zu bestimmen, wurde eine Konzentrationsreihe von 0,3 – 900 µg/mL Antikörper bei gleichbleibender Photodextran-Konzentration (0,3 mg/mL) in einem Array auf die Kunststoff-Slides gespottet und mit Cy5-markiertem BSA inkubiert. Die spezifische Affinitätsbindung von BSA an die immobilisierten Antikörper wurde als Kriterium für die Oberflächenbeladung der Antikörper angenommen.

Oberflächenblockung

Da BSA als Antigen fungierte und daher nicht mehr als Blockungsreagenz verwendet werden konnte, musste ein neues Protokoll für die Blockung der Kunststoffoberfläche entwickelt werden. Als mögliche Blockungsreagenzien wurden Milchpulver und Ovalbumin untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass für eine ausreichende Blockung der Oberfläche gegen die unspezifische Bindung von BSA wesentlich höhere Konzentrationen an Milchpulver bzw. Ovalbumin notwendig waren als bei den DNA-Untersuchungen¹. Auch mit Konzentrationen von mehreren mg/mL ließ sich die unspezifische Bindung von Cy5-BSA an die Kunststoffoberfläche nicht unterdrücken, und es wurden hohe Hintergrundsignale detektiert, die die spezifischen Bindungssignale an die Antikörper-Bindungsstellen überlagerten (Daten nicht gezeigt). Erst mit einer Milchpulver- bzw. Ovalbumin-Konzentration von 50 mg/mL wird die Kunststoffoberfläche ausreichend gegen unspezifische Bindung geblockt (Abb. 73). Die Bindung von BSA an die Kunststoffoberfläche (Blank) ist hier im Vergleich zu den spezifischen Bindungssignalen (PD & AK) um mehrere Größenordnungen geringer.

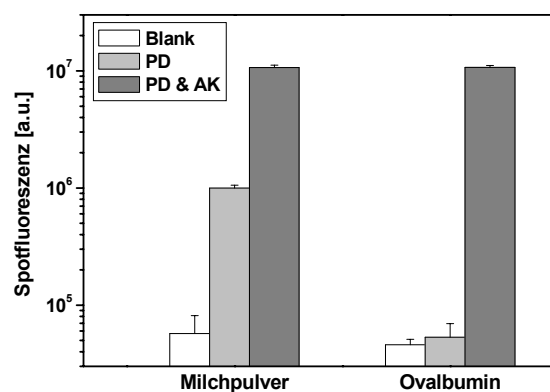


Abb. 73: Vergleich von Milchpulver und Ovalbumin als Reagenzien zur Oberflächenblockung; gezeigt sind die Fluoreszenzsignale durch Bindung von Cy5-markiertem BSA an die Kunststoffoberfläche (Blank), die Photodextranschicht (PD) und an die über Photodextran immobilisierten Antikörper (PD&AK), jeweils nach Blockung mit 50 mg/mL Milchpulver bzw. Ovalbumin. (n = 3)

¹ Bei den DNA-Untersuchungen wurden die Kunststoffoberflächen mit einer Konzentration von 1 mg/mL BSA geblockt.

Allerdings treten bei Blockung mit Milchpulver starke Bindungssignale von BSA an die Photodextranschicht (PD) auf. Offensichtlich kann durch die Milchproteine zwar die Kunststoffoberfläche, nicht aber die Dextranschicht gegen die unspezifische Bindung von BSA abgeschirmt werden. Dagegen findet durch Ovalbumin eine vollständige Blockung aller unspezifischen Bindungen statt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für alle folgenden Untersuchungen Ovalbumin zur Blockung der Oberfläche verwendet.

Kunststoff-Substrate

In weiterführenden Untersuchungen wurden zwei verschiedene Kunststoff-Substrate, PMMA und Zeonor¹, verglichen. Auf beide Kunststoff-Slides wurden Antikörper-Arrays mit verschiedenen Antikörper-Konzentrationen gespottet; anschließend wurde die Oberfläche mit Ovalbumin geblockt und mit Cy5-BSA inkubiert.

Beispielhaft sind zwei der erhaltenen Fluoreszenzbilder in Abb. 74 dargestellt. Besonders bei den Zeonor-Oberflächen fällt eine stärkere Verunreinigung mit fluoreszierenden Partikeln auf, die sich auch durch intensive Reinigung der Slides nicht entfernen ließ und zu Fehlern in der quantitativen Auswertung führen kann. Die Form der Spots weist einen starken „Donut-Effekt“ auf, d. h. eine hohe Konzentration am Spotrand und geringere Belegung im mittleren Bereich. Dieser Effekt lässt sich allerdings durch Optimierung der Puffer-Konzentration sowie der Detergenz-Zusätze optimieren, so dass eine homogenere Oberflächenbelegung erreicht werden kann.

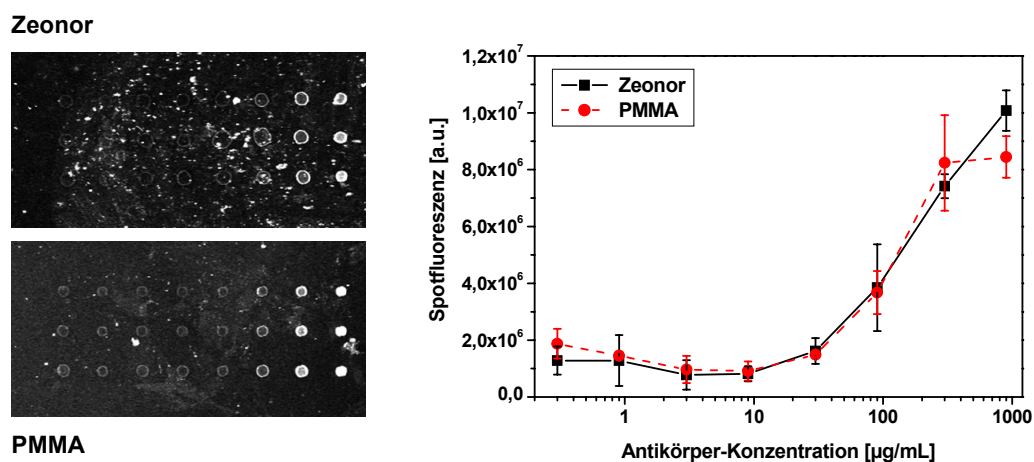


Abb. 74: Vergleich der Oberflächenbeladung auf Zeonor (■) und PMMA (●) bei verschiedenen Antikörper-Konzentrationen. (n = 3)

¹ Zeonor ist ein Cycloolefin-Polymer (COP) aus Norbornen, das in seinen optischen, physikalischen und chemischen Eigenschaften sehr dem COC-Polymer Topas ähnelt, vgl. Tab. 4.

Eine quantitative Auswertung der Slides (Abb. 74) zeigt, dass trotz augenscheinlicher Unterschiede der beiden Slides die Werte für die Spotfluoreszenz kaum voneinander abweichen. Lediglich bei höheren Konzentrationen sind geringe Unterschiede zu erkennen, die jedoch darauf zurückzuführen sind, dass hier bereits der Sättigungsbereich des Fluoreszenzdetektors erreicht wurde.

Es ist festzustellen, dass nur mit gespotteten Antikörper-Konzentrationen oberhalb von 30 µg/mL eine signifikante Oberflächenbeladung erzielt werden konnte.

Anteil adsorptiv gebundener Antikörper

Da die Photodextran/Antikörper-Mischung auf eine unvorbehandelte (ungeblockte) Kunststoffoberfläche aufgegeben wurde, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der Antikörper über adsorptive Wechselwirkung mit dem Kunststoffsubstrat und nicht über das Photodextran immobilisiert wurde. Um den Anteil an adsorptiv gebundenen Antikörpern festzustellen, wurden verschiedene Kontrollspots in das Array einbezogen. Im Vergleich zu den regulären Spots, die Antikörper und Photodextran (AK & PD) enthielten, wurde das Photodextran einerseits durch Aminodextran ersetzt (AK & AMD), andererseits ganz weggelassen und nur der Antikörper in gleicher Konzentration gespottet (AK).

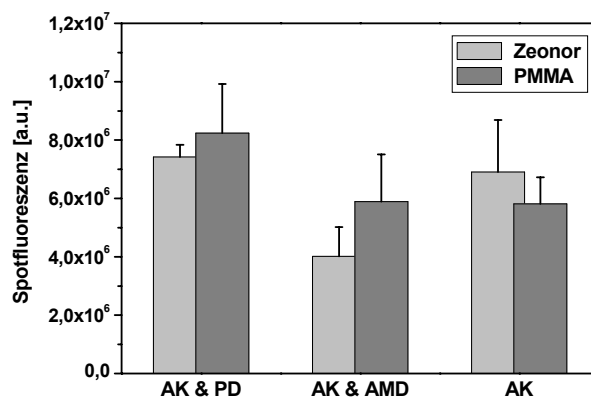


Abb. 75: Vergleich kovalenter (AK & PD) und adsorptiver (AK & AMD und AK) Immobilisierung der Antikörper. (n = 3)

Aus dem Diagramm in Abb. 75 wird ersichtlich, dass die Mengen an adsorptiv gebundenem Antikörper (AK) nur wenig geringer sind als die von kovalent über Photolinker gebundenem Antikörper (AK & PD). Dagegen fällt die adsorptive Bindung des Antikörpers zumindest auf Zeonor-Substraten geringer aus, wenn Aminodextran zugesetzt wird (AK & AMD). Das Dextran scheint somit die Oberfläche zumindest teilweise vor unspezifischer Adsorption des Antikörpers abzusichern. Insgesamt lässt sich jedoch bei der Photodextran-Immobilisierung ein immer noch sehr hoher Anteil von über 50 % adsorptiv gebundener Antikörper vermuten.

Der Anteil adsorptiv gebundener Antikörper ließe sich in einem zweistufigen Immobilisierungsprozess verringern, bei welchem zunächst die Oberfläche mit Photodextran vorbeschichtet wird (kurze UV-Bestrahlung zur Anbindung des Photodextrans an die Oberfläche), anschließend die Antikörper-Lösung aufgespottet wird und die Antikörper durch längere UV-Bestrahlung über die verbleibenden Photolinker-Funktionen gebunden werden. Dabei ließe sich zwischen den beiden Schritten zusätzlich ein Blockungs-Schritt einfügen.

4.5.2 Immobilisierung biotinylierter Antikörper an Avidin-Schichten

Eine weitere Möglichkeit der Antikörper-Immobilisierung ist die Ausnutzung der Affinitätsbindung zwischen Avidin und Biotin. Dabei kann ein Antikörper, der mit einem Biotin-Molekül modifiziert wurde, über diese Affinitätsbindung auf eine mit Avidin beschichtete Oberfläche immobilisiert werden.

Die Immobilisierung biotinylierter Antikörper an Avidin-beschichtete Substrate ist eine weit verbreitete Methode. Insbesondere auf Kunststoffsubstraten wird jedoch die Avidin-Beschichtung oft durch adsorptive Wechselwirkungen erreicht, was wiederum die Nachteile einer adsorptiven Bindung wie mangelnde Stabilität und Funktionalitätsverluste mit sich bringt. Es wurden daher Strategien untersucht, die Anbindung von Avidin an die Kunststoffoberfläche über eine kovalente Bindung (Strategie A) oder eine Affinitätsbindung (Strategie B) zu erreichen. Beiden Strategien lag ein Photoimmobilisierungs-Schritt zugrunde, der mit Photodextran bzw. Biotin-Photodextran durchgeführt wurde.

Strategie A: Photoimmobilisierung von Avidin über Photodextran

Eine kovalente Anbindung von Avidin an die Kunststoffoberfläche konnte erreicht werden, indem Avidin zusammen mit Photodextran auf die Oberfläche gegeben und bestrahlt wurde. Anschließend konnten Arrays aus biotinylierten Antikörpern gespottet werden, die über Biotin/Avidin-Affinitätsbindung an der Oberfläche immobilisiert wurden.

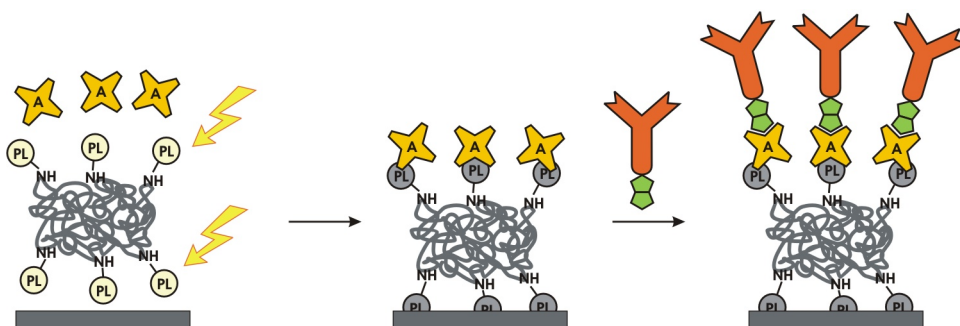


Abb. 76: Photoimmobilisierung von Avidin über Photodextran und Anbindung biotinylierter Antikörper über Biotin/Avidin-Affinitätsbindung.

Strategie B: Photoimmobilisierung von Biotin-Photodextran

Die Kunststoffoberfläche wurde zunächst mit biotinyliertem Photodextran beschichtet und dieses durch UV-Bestrahlung kovalent gebunden. Anschließend wurde Avidin aufgegeben, das über Affinitätsbindung an die Biotin-Funktionen des Dextrans binden konnte. Da Avidin über 4 Bindungsstellen für Biotin verfügt, konnten die biotinylierten Antikörper an die verbleibenden Bindungsstellen des Avidins angehängt und so auf der Oberfläche immobilisiert werden.

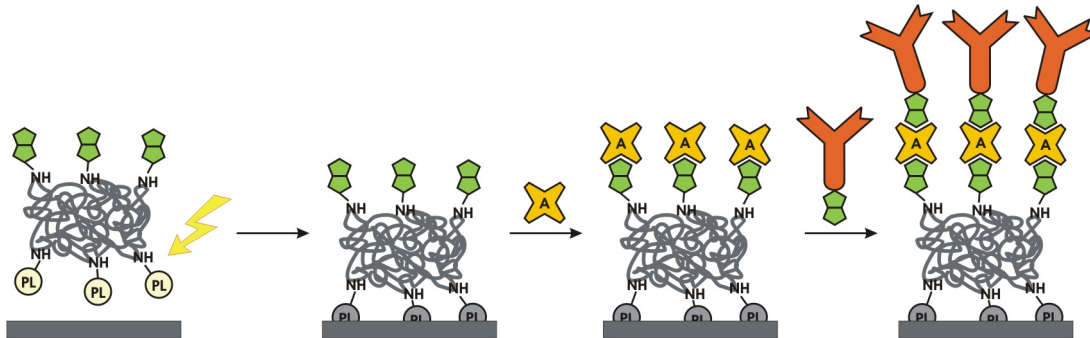


Abb. 77: Photoimmobilisierung von Biotin-Photodextran und Immobilisierung biotinylierter Antikörper über Biotin/Avidin/Biotin-Komplex.

Durchführung

Sowohl Zeonor- als auch PMMA-Slides wurden flächig beschichtet, zum einen über Photoimmobilisierung von Avidin (Strategie A), zum anderen mit Biotin-Photodextran und Avidin (Strategie B). Nach beiden Strategien wurde eine Avidin-beschichtete Dextranoberfläche erhalten, auf welche ein Antikörper-Array gespottet wurde, das den biotinylierten Antikörper in verschiedenen Konzentrationen enthielt. Durch Inkubation der gespotteten Arrays unter Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre wurde gewährleistet, dass die biotinylierten Antikörper an die Bindungsstellen des Avidins binden konnten. Die Oberfläche wurde anschließend mit Ovalbumin geblockt und schließlich mit Cy5-markiertem BSA inkubiert. Die Affinitätsbindung von BSA an den anti-BSA-Antikörper wurde im Fluoreszenz-Scanner detektiert.

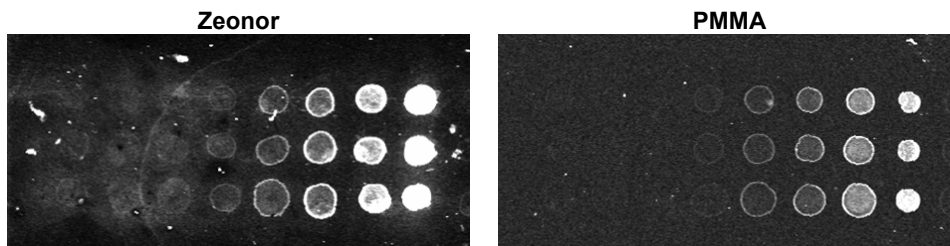


Abb. 78: Arrays biotinylierter Antikörper auf Avidin-beschichteten Zeonor- und PMMA-Slides.

Schon bei der Aufnahme der Fluoreszenzbilder wurden extrem hohe Fluoreszenzsignale festgestellt, die weit über den Sättigungsbereich des Fluoreszenzdetektors hinausgingen.

Daher wurde die Verstärkung des Detektors auf 60 % zurückgesetzt, um eine maximale Signaldynamik zu gewährleisten¹.

Reproduzierbarkeit der Messungen

Um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Messungen zu erhalten, wurden jeweils gleiche Antikörper-Arrays auf zwei gleichartigen Slides hergestellt und die erhaltenen Messwerte separat ausgewertet. Es ließen sich dabei Unterschiede in den Messwerten von bis zu 50 % feststellen. Dies war zum einen auf den optischen Aufbau des Fluoreszenz-Scanners zurückzuführen, der eine exakte Positionierung der Kunststoff-Slides im Fokus der Detektionsoptik für reproduzierbare Fluoreszenzmessungen nicht erlaubte². Zum anderen wird eine reproduzierbare Handhabung der Slides durch die hohe Anzahl manueller Verfahrensschritte (Probenaufgabe, Inkubation, Spülschritte etc.) behindert.

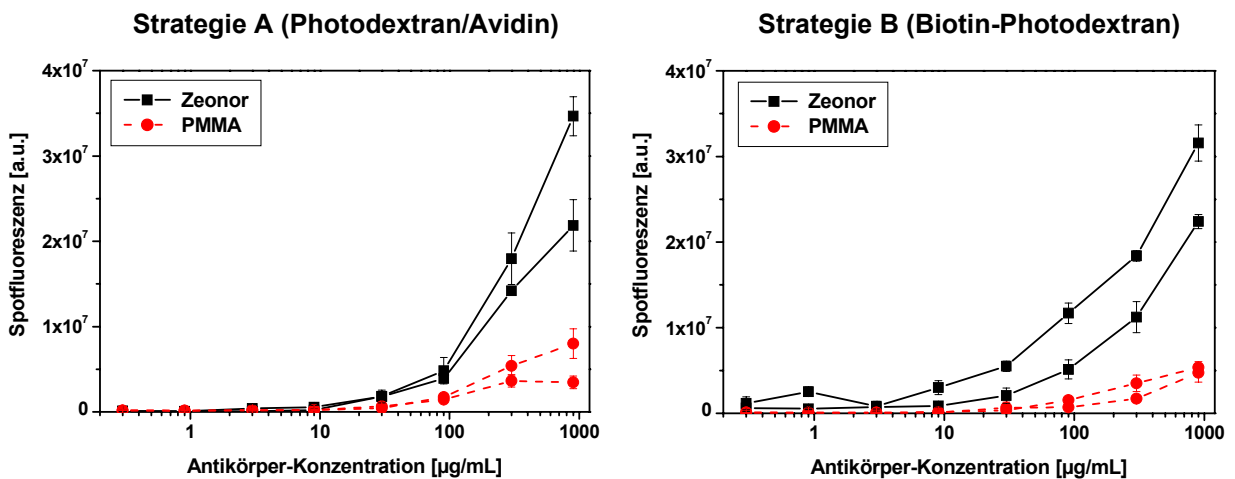


Abb. 79: Ergebnisse der konzentrationsabhängigen Antikörper-Immobilisierung auf Zeonor (■) und PMMA (●);

links: nach Photoimmobilisierung von Avidin mit Photodextran;

rechts: nach Affinitätsbindung von Avidin an photoimmobilisiertes Biotin-Photodextran.

Es wurden jeweils zwei Arrays separat gemessen und ausgewertet. (n = 3)

Bei all den Unterschieden sind dennoch grundlegende Tendenzen in Abb. 79 zu erkennen. Innerhalb eines jeden Arrays sind die Abweichungen sehr gering. Der grundsätzliche Kurvenverlauf ist bei allen separat ausgewerteten Arrays wiederzuerkennen. Darüber hinaus befinden sich die Kurven gleichartiger Arrays in den gleichen Größenordnungsbereichen,

¹ Alle in Kap. 4.5.2 gezeigten Ergebnisse wurden aus Fluoreszenzaufnahmen erhalten, die mit 60 % Detektorverstärkung aufgenommen wurden.

² Dies zeigten Mehrfach-Messungen desselben Slides, die zu unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten führten.

was einen Vergleich sowohl der Kunststoffsubstrate als auch der Strategien zur Avidin-Beschichtung erlaubt.

Vergleich der Kunststoff-Substrate

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der einstufigen Photoimmobilisierung der Antikörper mit Photodextran (vgl. Kap. 4.5.1, Abb. 74) lassen sich hier nun signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kunststoff-Substraten feststellen. Die auf Zeonor-Slides um ein Vielfaches höher liegenden Bindungssignale lassen auf eine wesentlich höhere Oberflächenbeladung mit Antikörpern schließen. Dieses Ergebnis ist unabhängig davon, nach welcher Strategie die Avidin-Oberfläche erhalten wurde, und deckt sich mit den Ergebnissen aus Kap. 4.1.1 (vgl. Abb. 34a: Dort wurde die Bindungseffizienz der Photolinker auf unterschiedlichen Kunststoff-Substraten systematisch über direkte Photoimmobilisierung von DNA bestimmt, und mit Benzophenon als Photolinker ließen sich auf Topas¹ wesentlich höhere Oberflächenbeladungen erreichen als auf PMMA.).

Vergleich der Strategien A und B (Art der Avidin-Beschichtung)

Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Strategien zur Beschichtung der Oberfläche mit Avidin lässt sich nicht feststellen. Sowohl durch Photoimmobilisierung von Avidin mit Photodextran (Strategie A) als auch über die Verwendung von Biotin-Photodextran (Strategie B) lassen sich gleich hohe Bindungssignale beobachten, d. h. die Oberflächenbeladung mit Antikörpern hängt nur von der Antikörper-Konzentration ab, nicht jedoch, über welche Strategie die Avidin-Beschichtung erhalten wurde.

Anteil adsorptiv gebundener Antikörper

Zur Kontrolle ungerichteter Anbindung der Antikörper an die Oberfläche über adsorptive Wechselwirkungen wurde neben biotinylierten Antikörpern (Biotin-AK) auch unmodifizierte Antikörper (AK) gespottet. Wie in Abb. 80 zu erkennen ist, lagen die Signale, die durch adsorptive Anbindung des Antikörpers erhalten wurden, auf beiden Kunststoff-Substraten etwa gleich hoch, jedoch machte der Anteil adsorptiver Anbindung auf Zeonor-Substraten weniger als 20 % des spezifischen Bindungssignals aus, während die unspezifische Anbindung auf PMMA-Slides bei über 60 % lag. Bei einer Kontrolle unspezifischer Bindung von BSA an die geblockte Dextranschicht, die keine Antikörper enthielt, konnte hingegen keine unspezifische Bindung des Proteins festgestellt werden.

¹ Topas und Zeonor sind strukturell eng verwandt, vgl. Tab. 4, Kap. 2.4.3.

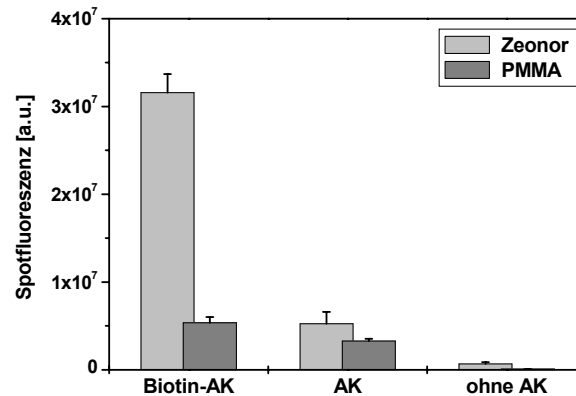


Abb. 80: Nachweis adsorptiver Anbindung von nicht-markiertem Antikörper (AK) an die Oberfläche im Vergleich zu biotinyliertem Antikörper (Biotin-AK) sowie unspezifische Bindung von BSA an die geblockte Dextranschicht (ohne AK).

Offenbar wird die Kunststoffoberfläche allein durch die Dextranschicht nicht ausreichend vor unspezifischer Bindung von Proteinen abgeschirmt. Dies wird erst durch die Blockung der Oberfläche mit Ovalbumin erreicht, die in den durchgeführten Untersuchungen die unspezifische Bindung des Antigens BSA unterbinden sollte und daher erst nach der Antikörper-Immobilisierung durchgeführt wurde. Indem man diesen Blockungsschritt bereits vor Auftragung des Antikörper-Arrays durchführt, ließe sich die unspezifische Immobilisierung der Antikörper verhindern. Das ist vor allem von Bedeutung, wenn eine gerichtete Immobilisierung der Antikörper erzielt werden soll.

Vergleich zur Photoimmobilisierung von Antikörpern

Prinzipiell konnten mit der Immobilisierung biotinylierter Antikörper Bindungssignale erzielt werden, die um ein Vielfaches höher lagen als bei Photoimmobilisierung der Antikörper mit Photodextran (vgl. Kap. 4.5.1). Dies kann man aus einem Vergleich der Diagramme in Abb. 74 (max. Bindungssignal 10^7 a. u.) mit denen in Abb. 79 (max. Bindungssignal $3 \cdot 10^7$ a. u. bei nur 60 % Detektorverstärkung) ableiten. Die höheren Bindungssignale auf Avidin-Schichten liegen zum einen in der größeren Ausdehnung der Antikörper-Spots begründet¹, die hier auf eine bereits mit Dextran beschichtete und damit hydrophilere Oberfläche gedruckt wurden, während die nicht-biotinylierten Antikörper zusammen mit Photodextran auf nicht vorbehandelte, hydrophobe Kunststoff-Slides gespottet wurden. Zum anderen ließen sich auch sehr hohe Beladungsdichten erzielen. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die biotinylierten Antikörper durch die längere Inkubationszeit in

¹ Die Spotgröße steht in direktem Zusammenhang mit den ermittelten Signalen der Spotfluoreszenz, da diese der über die gesamte Spotfläche integrierten Fluoreszenzintensität entspricht.

feuchter Atmosphäre bessere Möglichkeiten zur Bindung an die Avidin-Bindungsstellen hatten, während die Photoimmobilisierung in eingetrocknetem Zustand und damit bei geringer Molekülbeweglichkeit erfolgte.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene photochemische Immobilisierungsmethoden von Biomolekülen auf Kunststoffträgern eingehend charakterisiert und optimiert sowie unterschiedliche Einsatzmöglichkeiten der Photoimmobilisierung dargestellt. Es wurden dazu *Photolinker* verwendet, die in einer UV-induzierten Photoreaktion eine kovalente Bindung mit dem Kunststoffsubstrat eingehen können. Zum einen wurden dafür die Biomoleküle mit dem Photolinker modifiziert und anschließend über die Photoreaktion *direkt* auf die Kunststoffoberfläche immobilisiert. Zum anderen wurden mit Photolinkern modifizierte Biopolymere (*Photodextrane*) eingesetzt, mit denen auch unmodifizierte Biomoleküle in einer Photoreaktion gebunden und so *indirekt* über das Photodextran auf die Kunststoffoberfläche immobilisiert werden konnten.

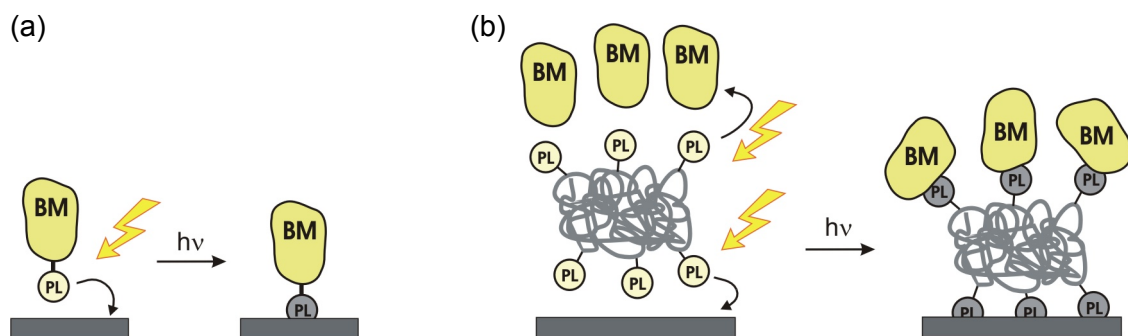


Abb. 81: Schematische Darstellung der (a) direkten und (b) indirekten Photoimmobilisierung von Biomolekülen.

Die Anwendungsmöglichkeiten direkter und indirekter Photoimmobilisierung wurden neben dem Einsatz für die Herstellung von DNA-Mikroarrays auch auf dem *NanoWellSlide*, einer mikrofluidischen Plattform für die parallele Probenanalyse, sowie in einem Biosensorsystem für die Reflektometrische Interferenzspektroskopie RIfS gezeigt. Darüber hinaus konnte anhand von Antikörper-Arrays gezeigt werden, dass die Photoimmobilisierung nicht nur auf die Anbindung von DNA-Oligonukleotiden beschränkt ist, sondern auch zur Immobilisierung anderer Biomoleküle verwendet werden kann.

Direkte Photoimmobilisierung

Anhand der *direkten* Photoimmobilisierung, d. h. der Anbindung von Molekülen an die Kunststoffoberfläche über die radikalische Photoreaktion eines Photolinkers, wurden verschiedene Photolinker und Kunststoffsubstrate miteinander verglichen und die gespottete Konzentration sowie die Bestrahlungsdauer für verschiedene Photolinker optimiert. Dazu wurden als Modellanwendung DNA-Arrays hergestellt, indem die Oligonukleotidsonden mit

dem Photolinker modifiziert, in einem Array auf die Kunststoffoberfläche gespottet und durch UV-Bestrahlung immobilisiert wurden. Die so hergestellten DNA-Arrays wurden mit komplementärer, fluoreszenzmarkierter DNA hybridisiert und die Fluoreszenzintensität der Spots in einem Fluoreszenzreader detektiert.

Die Photolinker Benzophenon und Trifluormethyl-phenyldiazirin zeichneten sich durch hohe Bindungseffizienzen aus, während Anthrachinon und Nitrophenylazid lediglich auf Topas-Kunststoffen höhere Bindungsraten aufwiesen. Von den untersuchten Kunststoffen konnten auf Topas, einem Cycloolefin-Copolymer, mit allen Photolinkern die höchsten Bindungssignale erhalten werden. Topas zeichnete sich gegenüber Polystyrol und Polymethyl-methacrylat außerdem durch eine niedrige Eigenfluoreszenz und hohe Lösemittelstabilität aus. Die Untersuchung verschiedener Konzentrationen der gespotteten Photolinker-DNA-Lösung wies auf einen logarithmischen Zusammenhang zwischen gespotteter Sondenkonzentration und Oberflächenbeladung hin. Auch bei sehr hohen DNA-Konzentrationen wurde keine Maximalbeladung erreicht, jedoch ließ die Reproduzierbarkeit der Spots deutlich nach, so dass eine Konzentration im mikromolaren Bereich als optimal für diese Anwendung angesehen werden konnte. Eine Bestrahlungsdauer von 15 min war für die Photolinker Trifluormethyl-phenyldiazirin und Nitrophenylazid sowie 30 min für Benzophenon und Anthrachinon optimal. Längere Bestrahlungszeiten führten zu niedrigeren Ausbeuten, was vermutlich auf eine photolytische Zersetzung der DNA-Sonden zurückgeführt wurde.

Oberflächencharakterisierung

Die durch Photoimmobilisierung erhaltenen DNA-Arrays auf Topas-Slides konnten mittels Ellipsometrie und AFM charakterisiert werden. Sowohl die Untersuchungen der Schichtdicken als auch der Topographie wiesen auf eine dichte Belegung der Oberfläche mit DNA-Sonden hin.

Mit Hilfe von Ellipsometriemessungen konnte der Schichtaufbau der Bioschicht während eines Hybridisierungs-Assays verfolgt werden. Die Schichtdicke der DNA-Spots ließ auf eine dichte Oberflächenbeladung mit Oligonukleotidsonden schließen. Im weiteren Assayverlauf wurde die Schichtdicke hauptsächlich durch oberflächen-adsorbierte BSA-Moleküle (Bovin Serum Albumin) bestimmt, die zur Blockung der hydrophoben Kunststoffoberfläche eingesetzt wurden. Eine in diesem Zusammenhang getestete Vorbehandlung des Kunststoffmaterials mit Sauerstoff-Plasma führte zu einer stark hydrophilen Oberfläche, die wesentlich gleichmäßiger mit DNA-Spots belegt werden konnte. Die adsorptive Bindung von BSA konnte geringfügig gemindert werden, jedoch nahm auch die Effizienz der Photoimmobilisierung und damit die Oberflächenbeladung mit DNA-Sonden stark ab.

Mit AFM-Aufnahmen konnte die Topographie der DNA-Spots auf Kunststoffoberflächen erfasst werden. Die Spots zeichneten sich durch eine dichte und homogene Belegung mit DNA-Oligonukleotidsonden innerhalb der Spotfläche und definierte Domänengrenzen am Rande der Spots aus. Durch den kontaktfreien Spotting-Prozess wurde außerdem die Kunststoffoberfläche außerhalb der Spots geringfügig mit DNA-Sonden belegt.

Photodextran

Mit Hilfe von *Photodextran*, einem mit Photolinkerfunktionen modifizierten Biopolymer, konnten Biomoleküle *indirekt* auf Kunststoffoberflächen photoimmobilisiert werden. Die Methode zeichnete sich dadurch aus, dass weder die Biomoleküle modifiziert, noch die Kunststoffoberflächen vorbehandelt werden mussten. Die Biomoleküle wurden einfach mit Photodextran gemischt und auf die Oberfläche gegeben, so dass bei UV-Bestrahlung Biomoleküle und Oberfläche über das Photodextran quervernetzt wurden. Je nach Modifikation des Photodextrans konnten mit Amino-Photodextran und Biotin-Photodextran auch aminofunktionalisierte bzw. biotinylierte Dextranschichten erhalten werden, an welche die Biomoleküle kovalent bzw. durch Affinitätsreaktion angebunden werden können.

Die Methode der indirekten Photoimmobilisierung wurde für die Herstellung von DNA-Mikroarrays optimiert. Bei der Variation der DNA-Sonden-Konzentration zeigte sich, dass bereits im unteren mikromolaren Bereich eine maximale Oberflächenbeladung mit DNA-Sonden erreicht werden konnte. Dahingegen wurden mit zunehmenden Konzentrationen des Photodextrans immer höhere Schichtdicken erzeugt, was auf einer Quervernetzung des Photodextrans beruhte. Die erhaltenen DNA/Dextran-Schichten wiesen eine gute Regenerierbarkeit auf. Durch Behandlung mit SDS-Lösung (0,5 %, pH 2) konnte die komplementäre, hybridisierte Proben-DNA vollständig entfernt und die DNA-Arrays für eine erneute Hybridisierung wiederverwendet werden.

Anhand eines DNA-Arrays mit drei exemplarischen Sondensequenzen wurde ein Methodenvergleich der verschiedenen Immobilisierungsstrategien durchgeführt. Dazu wurden komplementäre, fast-komplementäre (mit einer Basenfehlstelle) und nicht-komplementäre DNA-Sequenzen untersucht, die über direkte und indirekte Photoimmobilisierung in Arrays aufgebracht und mit DNA-Gegenstrang hybridisiert wurden. Dabei zeigte sich, dass eine Diskriminierung der Basenfehlstelle mit indirekt immobilisierten DNA-Sonden nur noch in geringem Maße möglich war, da durch die radikalische Photoreaktion bei der Immobilisierung ein Teil der hohen Spezifität der DNA-Sonden verloren ging. Jedoch ließ sich mit Photodextranen im Vergleich zu direkt immobilisierten Sonden sowohl die Oberflächenbeladung als auch die Reproduzierbarkeit der Spots um ein Vielfaches steigern.

NanoWellSlide (NWS)

Im Rahmen des Projekts nanoMAP wurde in Zusammenarbeit mit der Boehringer Ingelheim microParts GmbH eine mikrofluidische Arrayplattform zur parallelen Probenanalyse entwickelt. Das NanoWellSlide (NWS) ist ein aus Topas-Kunststoff abgeformtes Slide im Objektträger-Format mit vier Probenkanälen, die sich durch Kapillarkräfte selbst befüllen und über einen formatangepassten Vakuumport wieder entleert werden können. Über einen mikrofluidischen Kanal sind jeweils 24 Nanowells miteinander verbunden, so dass auf dem NWS vier verschiedene Proben auf je 24 Merkmale gleichzeitig untersucht werden können.

In den Funktionstests zeichnete sich das NWS durch einfache Handhabung bei Befüllung, Prozessierung und Entfernung der Proben sowie den sehr geringen Probenverbrauch von $< 2 \mu\text{L}$ pro Kanal aus. Die an Standardformate angepassten Dimensionen und Rasterformate des NWS ermöglichten das Bedrucken der Nanowells mittels herkömmlicher Probendosiersysteme (z. B. TopSpot) sowie das Auslesen des NWS mit Fluoreszenzreadern wie dem BioScan.

Auf dem NWS wurde eine Kalibrierung des Hybridisierungsassays unter Berücksichtigung der Komplementarität von Sonden- und Proben-DNA durchgeführt. Dabei konnten die Ergebnisse aus vorhergehenden Untersuchungen bestätigt und präzisiert werden, insbesondere im Hinblick auf einen Methodenvergleich zwischen direkter und indirekter Photoimmobilisierung.

Das NWS wurde anhand von Realproben validiert. Dazu wurde auf einer nanoMAP-Prozessplattform eine PCR parallel und im Mikroliter-Maßstab durchgeführt und die erhaltenen PCR-Produkte auf dem NWS detektiert. Damit konnte die Durchführung eines kompletten nanoMAP-Prozessablaufs demonstriert werden.

Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS)

Mit der Untersuchung der Bindung von Streptavidin an oberflächengebundenes Biotin mit der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) konnte gezeigt werden, dass die Methode der Photoimmobilisierung auch in der Biosensorik mit Erfolg eingesetzt werden kann, um Biomoleküle auf Kunststoff-Transducern zu immobilisieren. Dabei wurden zwei Methoden demonstriert, zum einen die direkte Photoimmobilisierung unter Verwendung von *Photobiotin*, zum anderen die Photoimmobilisierung von *Biotin-Photodextran*.

Für die Untersuchungen wurden RIfS-Transducer verwendet, die eine Topasschicht als Interferenzschicht trugen. Durch Variation der Parameter beim Spincoating-Prozess konnte die Polymer-Schichtdicke gezielt eingestellt werden. Die Topasschicht wurde mit Hilfe von

Photolinkern kovalent auf dem Glastransducer angebunden, was zu einer deutlichen Stabilisierung des Schichtsystems führte.

Sowohl mit direkt immobilisiertem Biotin als auch mit Dextranschichten konnte die Bindung von Streptavidin an die Oberfläche und die damit verbundene Schichtdickenänderung verfolgt werden. Bei einem Vergleich zwischen direkter und indirekter Photoimmobilisierung des Biotins konnten mit Dextranschichten wesentlich höhere Bindungssignale erhalten werden. Durch RfS-Messungen mit variierenden Dextranschichten wurde weiterhin gezeigt, wie wichtig eine Optimierung der Schichtdicke für die RfS-Messung war, da die Bindungssignale besonders bei höheren Schichtdicken keinen linearen Zusammenhang mit der Schichtdickenänderung mehr zeigten.

Photoimmobilisierung von Antikörpern

Nachdem die Methode der Photoimmobilisierung für die Anbindung von DNA-Molekülen ausführlich untersucht und charakterisiert worden ist, konnte auch ihre Anwendung zur Herstellung von Antikörper-Arrays demonstriert werden. Als Test-Antikörper wurde anti-BSA verwendet, das über verschiedene Strategien mit Hilfe von Photodextranen auf Kunststoffoberflächen immobilisiert wurde. Die direkte Photoimmobilisierung wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht, da hierbei eine adsorptive Bindung der Antikörper an die hydrophobe Kunststoffoberfläche nicht zu kontrollieren war. Indessen wurden die unmodifizierten Antikörper indirekt über Photodextran immobilisiert. Weiterhin wurden mit Hilfe von Photodextranen Avidin-beschichtete Oberflächen hergestellt, an welche biotinylierte Antikörper über Biotin/Avidin-Affinitätsbindung angebunden werden konnten. Die Avidin-Schichten wurden über zwei verschiedene Strategien erhalten, einerseits durch indirekte Photoimmobilisierung von Avidin mit Photodextran und andererseits mit Hilfe von Biotin-Photodextran, an welches das Avidin über Affinitätsreaktion gebunden wurde. Der Erfolg der Immobilisierung wurde durch Antigen-Bindung mit fluoreszenzmarkiertem BSA kontrolliert.

Da BSA nun nicht mehr zur Blockung der Kunststoffoberflächen eingesetzt werden konnte, mussten zunächst neue Verfahren zur Oberflächenblockung ermittelt werden. Dabei zeigte sich, dass eine ausreichende Abschirmung der Kunststoffoberfläche gegen die unspezifische Bindung von BSA nur mit sehr hohen Konzentrationen an Blockungsreagenz (5 % Ovalbumin oder Milchpulver) erreicht werden konnte. Eine zufriedenstellende Blockung der Dextranschichten konnte allerdings nur mit Ovalbumin erzielt werden.

Sowohl über Photoimmobilisierung der Antikörper als auch über Biotin/Avidin-Affinitätsbindung ließen sich Antikörper-Arrays herstellen, die mit steigender Konzentration der gespotteten Antikörperlösung zunehmend hohe Oberflächenbeladungen aufwiesen. Dabei konnten auf Avidin/Dextran-Schichten wesentlich höhere Oberflächenbeladungen bei

gleicher Antikörper-Konzentration erreicht werden, und auch die adsorptive Anbindung der Antikörper wurde durch die bereits bestehende Dextranschicht wirksamer unterdrückt. Einen Unterschied zwischen den beiden Verfahren zur Avidinbeschichtung konnte nicht festgestellt werden.

Als Kunststoffsubstrate wurden Polymethyl-methacrylat und Zeonor (ein Cycloolefin-Polymer) untersucht. Ein Unterschied zwischen beiden Kunststoffen konnte lediglich bei den Avidin/Dextran-Schichten festgestellt werden, wobei auf Zeonor höhere Bindungsraten erzielt werden konnten.

Fazit und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass die Photoimmobilisierung ein ideales Verfahren zur Anbindung von Biomolekülen auf Kunststoffträgern ist. Das Verfahren ist schnell, unkompliziert und erfordert ein Mindestmaß an präparativem und apparativem Aufwand. Aufgrund der Möglichkeit der parallelen Immobilisierung verschiedener Sonden gleichzeitig eignet es sich hervorragend für die Herstellung von Mikroarrays. Die Methode der Photoimmobilisierung birgt neben der Parallelisierung außerdem das Potential zur Miniaturisierung und zur Automatisierung, jeweils wichtige Kriterien für den Einsatz bioanalytischer Verfahren.

Je nach Einsatzgebiet können verschiedene Strategien der Photoimmobilisierung zum Einsatz kommen. Wird eine flächig mit Analytmolekülen beschichtete Oberfläche benötigt, so können die Sondenmoleküle direkt und gerichtet über den Photolinker angebunden werden. Dagegen können Hydrogel-Oberflächen mit hohen Oberflächenbeladungen sehr einfach über indirekte Photoimmobilisierung mit Photodextran erzeugt werden, wobei eine vorherige Modifizierung der Sondenmoleküle nicht notwendig ist. Für die Sondenimmobilisierung über Affinitätsbindung lassen sich Avidin-Oberflächen unter Verwendung von Photobiotin oder Biotin-Photodextran herstellen.

Die Photoimmobilisierung kann überall dort mit Erfolg eingesetzt werden, wo eine kovalente Anbindung von (Bio-)Molekülen an Oberflächen aufgrund fehlender funktioneller Gruppen auf thermochemischem Wege nicht möglich ist. Die Anwendungsgebiete sind dabei nicht auf bioanalytische Verfahren beschränkt, sondern auch in anderen Bereichen wie z. B. zur Beschichtung von Implantaten einsetzbar.

6 Literatur

- [1] D. Dankbar, Parallele photoinduzierte Immobilisierung von DNA-Oligonukleotiden auf Kunststoffträgern zur Herstellung von DNA-Mikroarrays, Diplomarbeit, Tübingen (2002).
- [2] G. Gauglitz, „Praktische Spektroskopie“, Attempto Verlag, Tübingen (1983).
- [3] A. Jablonski, Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren, *Z. Physik* **94** (1935), 38.
- [4] Greg T. Hermanson, “Bioconjugate techniques”, Academic Press, San Diego/Cal. 1996.
- [5] UV-Atlas organischer Verbindungen, Vol. I-V, Verlag Chemie, Weinheim (1971).
- [6] G. Dormán, G. D. Prestwich, Benzophenone photophores in biochemistry, *Biochemistry* **33** (1994), 5661-5673.
- [7] M. Ploug, Identification of specific sites involved in ligand binding by photoaffinity labeling of the receptor for the urokinase-type plasminogen activator, *Biochemistry* **37** (1998), 16494-16505.
- [8] N. K. Tyagi, R. K. H. Kinne, Synthesis of photoaffinity probes [2'-iodo-4'-(3''-trifluoromethyldiazirinyloxy)phenoxy]-D-glucopyranoside and [(4'-benzoyloxy)phenoxy]-D-glucopyranoside for the identification of sugar-binding and phlorizin-binding sites in the sodium/D-glucose cotransporter protein, *Anal. Biochem.* **323** (2003), 74-83.
- [9] P. B. Jones, M. P. Pollastri, N. A. Porter, 2-Benzoylbenzoic acid: A photolabile mask for alcohols and thiols, *J. Org. Chem.* **61** (1996), 9455-9461.
- [10] C. Bräuchle, D. M. Burland, G. C. Bjorklund, Hydrogen abstraction by benzophenone studied by holographic photochemistry, *J. Phys. Chem.* **85** (1981), 123-127.
- [11] K. Horie, H. Ando, I. Mita, Photochemistry in polymer solids: (8) Mechanism of photoreaction in poly(vinyl alcohol), *Macromolecules* **20** (1987), 54-58.
- [12] S. Ding, R. Horn, Slow photo-cross-linking kinetics of benzophenone-labeled voltage sensors of ion channels, *Biochemistry* **40** (2001), 10707-10716.

- [13] T. Koch, N. Jacobsen, J. Fensholdt, U. Boas, M. Fenger, M. H. Jakobsen, Photochemical immobilization of anthraquinone conjugated oligonucleotides and PCR amplicons on solid surfaces, *Bioconjugate Chem.* **11** (2000), 474-483.
- [14] H. Sigrist, A. Collioud, J.-F. Clémence, H. Gao, R. Luginbühl, M. Sängler, G. Sundarababu, Surface immobilisation of biomolecules by light, *Opt. Eng.* **34** (1995), 2339-2348.
- [15] J. Brunner, New photolabeling and crosslinking methods, *Annu. Rev. Biochem.* **62** (1993), 483-514.
- [16] K. L. Buchmüller, B. T. Hill, M. S. Platz, K. M. Weeks, RNA-tethered phenyl azide photocrosslinking via a short-lived indiscriminant electrophile, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003), 10850-10861.
- [17] H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell, „Molekulare Zellbiologie“, 2. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin/New York (1996).
- [18] J. D. Watson, F. H. C. Crick, Molecular structure of nucleic acids, *Nature* **171** (1953), 737-738.
- [19] F. Lottspeich, H. Zorbas (Hrsg.), „Bioanalytik“, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin (1998).
- [20] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, „Molekularbiologie der Zelle“, 3. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1995).
- [21] C. P. Price, D. J. Newman (Eds.), „Principles and Practice of Immunoassay“, Second Edition, Stockton Press, New York (1997).
- [22] A. R. Fersht, The hydrogen bond in molecular recognition, *Trends Biochem. Sci.* **12** (1987), 301-304.
- [23] J. Israelachvili, H. Wennerström, Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions, *Nature* **379** (1996), 219-225.
- [24] M. J. O'Donnell-Maloney, D. P. Little, Microfabrication and array technologies for DNA sequencing and diagnostics, *Genet. Anal.: Biomol. Eng.* **13** (1996), 151-157.
- [25] R. Wünschiers, T. Zinn, S. Borzner, Herstellung und Verwendung von DNA-Mikroarrays, *CLB Chemie in Labor und Biotechnik* **52/7** (2001), 260-266.
- [26] S. K. Moore, IEEE Spectrum, März 2001.
- [27] M. Seidel, Herstellung eines Biochips mit einem Mikrodosierroboter, Diplomarbeit, Stuttgart (1999).

- [28] M. K. McQuain, K. Seale, J. Peek, S. Levy, F. R. Haselton, Effects of relative humidity and buffer additives on the contact printing of microarrays by quill pins, *Anal. Biochem.* **320** (2003), 281-291.
- [29] J. Piehler, Modifikation von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern, Dissertation, Tübingen (1997).
- [30] S. Löfas, B. Johnson, A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* (1990), 1526-1528.
- [31] J. M. Harris, "Poly(ethylene glycol) chemistry: Biotechnical and biomedical applications", Plenum Press, New York (1992).
- [32] X. Liu, H. Wang, J. Herron, G. D. Prestwich, Photopatterning of antibodies on biosensors, *Bioconjugate Chem.* **11** (2000), 755-761.
- [33] M. Eggers, M. Hogan, D. Ehrlich, M. Hollis, B. Kosicki, T. Powdrill, K. Beattie, S. Smith, R. Varma, R. Gangadharan, A. Mallik, B. Burke, D. Waalace, A microchip for quantitative detection of molecules utilizing luminescent and radioisotope reporter groups, *BioTechniques* **17/3** (1994), 516-524.
- [34] R. G. Nuzzo, B. R. Zegarski, L. H. Dubois, Fundamental studies of the composition of organosulfur compounds on Au(111). Implications for molecular self-assembly on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987), 733-740.
- [35] P. Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, in: R. H. Burdon, P. H. Knippenberg (Hrsg.), "Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology", Vol. 15, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985), 297-328.
- [36] N. Zammattéo, C. Girardeaux, D. Delforge, J.-J. Pireaux, J. Remacle, Amination of polystyrene microwells: Application to the covalent grafting of DNA probes for hybridization assays, *Anal. Biochem.* **236** (1996), 85-94.
- [37] E. T. Kang, K. L. Tan, K. Kato, Y. Uyama, Y. Ikada, Surface modification and functionalization of polytetrafluoroethylene films, *Macromolecules* **29** (1996), 6872-6879.
- [38] A. V. Vasiliskov, E. N. Timofeev, S. A. Surzhikov, A. L. Drobyshev, V. V. Shick, A. D. Mirzabekov, Fabrication of microarray of gel-immobilized compounds on a chip by copolymerization, *BioTechniques* **27** (1999), 592-606.

- [39] M. Schulz, H. Matuschewski, H. Wenschuh, T. A. Thiele, M. Ulbricht, U. Schedler, Funktionalisierte Polymeroberflächen, *CLB Chemie in Labor und Biotechnik* **51/3** (2001), 84-86.
- [40] H. Ma, R. H. Davis, C. N. Bowman, A novel sequential photoinduced living graft polymerization, *Macromolecules* **33** (2000), 331-335.
- [41] J.-F. Clémence, J. P. Ranieri, P. Aebischer, H. Sigrist, Photoimmobilization of a bioactive laminin fragment and pattern-guided selective neuronal cell attachment, *Bioconjugate Chem.* **6** (1995), 411-417.
- [42] P. Guire, Photochemical immobilization of enzymes and other biochemicals, *Method. Enzymol.* **44** (1976), 280-288.
- [43] P. Nahar, N. M. Wali, R. P. Gandhi, Light-induced activation of an inert surface for covalent immobilization of a protein Ligand, *Anal. Biochem.* **294** (2001), 148-153.
- [44] P. Nahar, A. Naqvi, S. F. Basir, Sunlight-mediated activation of an inert polymer surface for covalent immobilization of a protein, *Anal. Biochem.* **327** (2004), 162-164.
- [45] A. Naqvi, P. Nahar, Photochemical immobilization of proteins on microwave-synthesized photoreactive polymers, *Anal. Biochem.* **327** (2004), 68-73.
- [46] A. Collioud, J.-F. Clémence, M. Sängler, H. Sigrist, Oriented and covalent immobilization of target molecules to solid supports: Synthesis and application of a light-activatable and thiol-reactive cross-linking reagent, *Bioconjugate Chem.* **4** (1993), 528-536.
- [47] Y. S. Park, J. Won, Y. S. Kang, Preparation of poly(ethylene glycol) brushes on polysulfone membranes for olefin/paraffin separation, *Langmuir* **16** (2000), 9662-9665.
- [48] H. Gao, E. Kislig, N. Oranth, H. Sigrist, Photolinker-polymer-mediated immobilization of monoclonal antibodies, F(ab')₂ and F(ab') fragments, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **20** (1994), 251-263.
- [49] N. Kanoh, S. Kumashiro, S. Simizu, Y. Kondoh, S. Hatakeyama, H. Tashiro, H. Osada, Immobilization of natural products on glass slides by using a photoaffinity reaction and the detection of protein–small-molecule interactions, *Angew. Chem.* **155** (2003), 5742-5745.

- [50] E. Delamarche, G. Sundurababu, H. Biebuyck, B. Michel, C. Gerber, H. Sigrist, H. Wolf, H. Ringsdorf, N. Xanthopoulos, H. J. Mathieu, Immobilization of antibodies on a photoactive self-assembled monolayer on gold, *Langmuir* **12** (1996), 1997-2006.
- [51] O. Prucker, C. A. Naumann, J. Rhe, W. Knoll, C. W. Frank, Photochemical attachment of polymer films to solid surfaces via monolayers of benzophenone derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999), 8766-8770.
- [52] C. R. Sabanayagam, C. L. Smith, C. R. Cantor, Oligonucleotide immobilization on micropatterned streptavidin surfaces, *Nucleic Acids Res.* **28/8** (2000), e33.
- [53] P. Reichmut, H. Sigrist, M. Badertscher, W. E. Morf, N. F. de Rooij, E. Pretsch, Immobilization of biomolecules on polyurethane membrane surfaces, *Bioconjugate Chem.* **13** (2002), 90-96.
- [54] M. A. Holden, S.-Y. Jung, P. S. Cremer, Patterning enzymes inside microfluidic channels via photoattachment chemistry, *Anal. Chem.* **76** (2004), 1838-1843.
- [55] H. Gao, M. Snger, R. Luginbhl, H. Sigrist, Immunosensing with photo-immobilized immunoreagents on planar optical waveguides, *Biosens. Bioelectron.* **10** (1995), 317-328.
- [56] N. Bari, M. Rapp, H. Sigrist, H. J. Ache, Covalent photolinker-mediated immobilization of an intermediate dextran laxer to polymer-coated surfaces for biosensing applications, *Biosens. Bioelectron.* **13** (1998), 855-860.
- [57] N. Bari, M. Rapp, Covalent bound sensing layers on surface acoustic wave (SAW) biosensors, *Biosens. Bioelectron.* **16** (2001), 979-987.
- [58] I. Caelen, H. Gao, H. Sigrist, Protein density gradients on surfaces, *Langmuir* **18** (2002), 2463-2467.
- [59] K. Lnge, F. Bender, A. Voigt, H. Gao, M. Rapp, A surface acoustic wave biosensor concept with low flow cell volumes for label-free detection, *Anal. Chem.* **75** (2003), 5561-5566.
- [60] E. Hecht, „Optik“, 2. Auflage, Addison-Wesley, Bonn (1989).
- [61] A. Brecht, G. Gauglitz, W. Nahm, Interferometric measurements used in chemical and biochemical sensors, *Analisis* **20/3** (1992), 135-140.
- [62] G. Gauglitz, W. Nahm, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **341** (1991), 279-283.
- [63] M. J. Schwuger, „Lehrbuch der Grenzflchenchemie“, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (1996).

- [64] H.-D. Dörfler, „Grenzflächen und Kolloidchemie“, VCH Verlags-GmbH, Weinheim (1994).
- [65] H. Lechner, „Die Kontaktwinkelmessung: Ein Verfahren zur Bestimmung der freien Grenzflächenenergie“, Krüss GmbH Rosenheim (1984).
- [66] R. M. A. Azzam, N. M. Bashara, „Ellipsometry and polarized light“, North-Holland Publishing, Amsterdam (1988).
- [67] D. W. Marquardt, An algorithm for least-squares estimation of non-linear parameters, *Soc. Ind. Appl. Math. J.* **11** (1963), 431.
- [68] A. Schaper, J. P. P. Starink, T. M. Jovin, The scanning force microscopy of DNA in air and in n-propanol using new spreading agents, *FEBS Letters* **355** (1994), 91-95.
- [69] C. M. Niemeyer, M. Adler, B. Pignataro, S. Lenhert, S. Gao, L. Chi, H. Fuchs, D. Blohm, Self-assembly of DNA-streptavidin nanostructures and their use as reagents in immuno-PCR, *Nucleic Acids Res.* **27/23** (1999), 4553-4561.
- [70] T. Mutschler, Charakterisierung bio- und chemosensitiver Schichten mit Ellipsometrie und AFM, Dissertation, Tübingen (2004).
- [71] A. Brecht, Interferenzspektroskopische Untersuchungen von Affinitätsreaktionen, Dissertation, Tübingen (1993).
- [72] R. M. Ostroff, D. Maul, G. R. Bogart, S. Yang, J. Christian, D. Hopkins, D. Clark, B. Trotter, G. Moddel, Fixed polarizer ellipsometry for simple and sensitive detection of thin films generated by specific molecular interactions: applications in immunoassays and DNA sequence detection, *Clinical Chemistry* **44/9** (1998), 2031-2035.
- [73] T. M. Herne, M. J. Tarlov, Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997), 8916-8920.
- [74] D. E. Gray, S. C. Case-Green, T. S. Fell, D. J. Dobson, E. M. Southern, Ellipsometric and interferometric characterization of DNA probes immobilized on a combinatorial array, *Langmuir* **13** (1997), 2833-2842.
- [75] S. Löfas, Dextran modified self-assembled monolayer surfaces for use in biointeraction analysis with surface plasmon resonance, *Pure and Applied Chemistry* **67/5** (1995), 829-834.
- [76] R. M. Kaack, D. M. Dankbar, B. Müller-Chorus, A. Jung, M. Daub, Modulare Plattform mit integrierter Nanoliterdosierung, *Laborwelt* **6/2** (2005), 10-14.

- [77] U. Schobel, I. Coille, A. Brecht, M. Steinwand, G. Gauglitz, Miniaturization of a homogeneous fluorescence immunoassay based on energy transfer using nanotiter plates as high-density sample carriers, *Anal Chem.* **73** (2001), 5172-5179.
- [78] M. Seidel, G. Gauglitz, Miniaturization and parallelization of fluorescence immunoassays in nanotiter plates, *Trends Anal. Chem.* **22/6** (2003), 385-394.
- [79] M. Seidel, D. Dankbar, G. Gauglitz, A miniaturized heterogeneous fluorescence immunoassay on gold-coated nano-titer plates, *Anal. Bioanal. Chem.* **379/7-8** (2004), 904-912.
- [80] R. M. Kaack, A. Jung, H. M. Wenz, R. Zengerle, M. Daub, PCR-slide: A modular and cascable platform for DNA sample processing with integrated nanolitre dosage, *Proc. of MEMS* (2004).
- [81] T. T. Nikiforov, R. B. Rendle, M. L. Kotewicz, Y. H. Rogers, The use of phosphorotioate primers and exonuclease hydrolysis for the preparation of singlestranded PCR products and their detection by solid-phase hybridization, *PCR Methods and Applications* **3** (1994), 285-291.
- [82] R. M. Kaack, PCR-Slide: A modular and cascable platform for DNA sample processing with integrated nanoliter dosage, Dissertation, Freiburg (2005).
- [83] R. Frank, B. Möhrle, D. Fröhlich, G. Gauglitz, A label-free detection method of biochemical interactions with low- cost plastic and other transparent transducers, *SPIE Proceedings of Opto Ireland, "Optical Sensing and Spectroscopy"* (2005).
- [84] C. Hänel, Parameteroptimierung für zwei Verfahren zur markierungsfreien Analyse biomolekularer Wechselwirkungen, Dissertation, Tübingen (2003).
- [85] J. L. Guesdon, T. Ternynck, S. Avrameas, The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques, *J. Histochem. Cytochem.* **27** (1979), 1131-1139.
- [86] K. L. Prime, G. M. Whitesides, Self-assembled organic monolayers: Model systems for studying adsorption of proteins at surfaces, *Science* **252** (1991), 1164-1167.
- [87] R. J. Green, J. Davies, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, Surface plasmon resonance for real time in situ analysis of protein adsorption to polymer surfaces, *Biomaterials* **18** (1997), 405-413.
- [88] H. M. Schmitt, A. Brecht, J. Piehler, G. Gauglitz, An integrated system for optical biomolecular interaction analysis, *Biosens. and Bioelectron.* **8/12** (1997), 809-816.

- [89] A. Schütz, Einsatz der reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) zur markierungsfreien Affinitätsdetektion für das Hochdurchsatzscreening, Dissertation, Tübingen (2000).

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

AFM	Atomkraftmikroskopie (engl.: atomic force microscopy)
AK	Antikörper
ANBS	5-Azido-2-nitrobenzoesäure
anti-BSA	IgG-Antikörper gegen BSA
AQ	Anthrachinon (engl.: anthraquinone)
AQS	Anthrachinon-2-carbonsäure
a.u.	willkürliche Einheiten (engl.: arbitrary units)
BBS	4-Benzoylbenzoesäure
BM	Biomolekül
BP	Benzophenon
BSA	Albumin aus Rinderserum (Bovin Serum Albumin)
CDR	komplementaritäts-bestimmender Bereich (engl.: complementarity determining regions) bei Antikörpern
DCC	N,N-Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
FIA	Fließinjektionsanalyse
GOPTS	3-Glycidylxypropyl-trimethoxysilan
Ig	Immunglobulin
MIP	molekular geprägtes Polymer (engl.: molecular imprinted polymer)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NPA	Nitrophenylazid
NTC	Negativkontrolle (engl.: non-template control)
OVA	Ovalbumin
PC	Polycarbonat

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PD	Photodextran
PDMS	Polydimethylsiloxan, Polydimethoxysilan
PEG	Polyethylenglycol
PMMA	Polymethyl-methacrylat
Proben-DNA	DNA-Oligonukleotide, die eine „DNA-Probe“ repräsentieren und über z. B. Hybridisierungs Assay (z. B. Hybridisierungs-Assay) nachgewiesen werden
PS	Polystyrol
RMSE	Wurzel des mittleren Fehlerquadrats der gemessenen und berechneten Werte (engl.: root mean square error)
RT	Raumtemperatur
SAM	engl.: self-assembled monolayers
SBH	DNA-Sequenzanalyse durch Hybridisierung (engl.: sequencing by hybridization)
SNP	Einzelbasenaustausch (engl.: single nucleotide polymorphism)
Sonden-DNA	DNA-Oligonukleotide bekannter Sequenz, die z. B. auf einem Mikroarray immobilisiert und für den Nachweis von DNA-Proben eingesetzt werden
TDBS	p-(3-(Trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl)benzoesäure
TPD	Trifluormethyl-phenyldiazirin

7.2 Nukleotidsequenzen der verwendeten DNA-Oligonukleotide

Die Nukleotidsequenzen sind gemäß der Konvention 5' → 3' dargestellt.

DD1a23:	AAC GCT ACA AGC TAC ATC ATT CC
Cy5-DD1a23:	5'-fluoreszenzmarkiertes (Cy5) Oligonukleotid DD1a23
DD1b23:	GGA ATG ATG TAG CTT GTA GCG TT
NH ₂ -DD1b23:	5'-aminofunktionalisiertes Oligonukleotid DD1b23
DD2a23:	AAC GCT ACA ACC TAC ATC ATT CC
DD2b23:	GGA ATG ATG TAG GTT GTA GCG TT

7.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer[†], M. Brendle, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, F. Gönnerwein, W. Göpel[†], P. Grathwohl, G. Häfelinger, M. Hanack, D. Hoffmann, V. Hoffmann, G. Jung, W. Koch, B. Koppenhöfer, K.-A. Kovar, D. Krug, N. Kuhn, H. Liebich, E. Lindner, M. E. Maier, H. A. Mayer, H.-J. Meyer, U. Nagel, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, H. Pommer, V. Schurig, E. Schweda, F. F. Seelig, B. Speiser, J. Strähle, W. Voelter, K. Werner, K.-P. Zeller, C. Ziegler.

7.4 Lebenslauf

Name	Daniela M. Dankbar	
Geburtsdatum	14.04.1977	
Geburtsort	Neuenkirchen	
Schulbildung	1983-1986	Marien-Grundschule Hauenhorst
	1986-1987	Johannesschule Mesum
	1987-1996	Emsland-Gymnasium Rheine
Abschluss	03.06.1996	Allgemeine Hochschulreife
Studium	1996-2002	Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Diplomprüfung	Dezember 2001	
Diplomarbeit	Januar – Juni 2002, unter Anleitung von Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Tübingen	
	Titel: "Parallele photoinduzierte Immobilisierung von DNA-Oligonukleotiden auf Kunststoffträgern zur Herstellung von DNA-Mikroarrays"	
Promotion	Juli 2002 – Juli 2005, unter Anleitung von Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Tübingen	
	Titel: "Photochemische Oberflächenmodifizierung für die Bioanalytik auf Kunststoffträgern"	