

Entwicklung eines Mikroarray-Sensors zur Fluoreszenzanregung durch Wellenleitermoden

DIPLOMARBEIT

Vorgelegt von

Sabir Okba

Angefertigt am

Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz

Fachhochschule Wiesbaden
Fachbereich Ingenieurwissenschaften – Studienbereich
Physik

Referent: Prof. Dr. Uwe Langbein
Koreferent: Dipl. Ing. Bernhard Menges

Tag der Einreichung 17 Juni 2008

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbstständig unter der Anleitung des Referenten und Koreferenten durchgeführt und nur die angegebenen Referenzen und Hilfsmittel benutzt zu haben.

Wiesbaden, den 17. Juni 2008

„*Wenn der Blick an heiteren Tagen
Sich zur Himmelsbläue lenkt,
Beim Siroc der Sonnenwagen
Purpurrot sich niedersenkt,
Da gebt der Natur die Ehre,
Froh an Aug' und Herz gesund,
Und Erkennt der Farbenlehre
Allgemeinen, ew'gen Grund*“

J.W.v.Goethe

Inhaltverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Motivation	1
1.2 Mikroarray Technologie und Evaneszentfeldsensorik	2
1.3 Zielsetzung	3
2 Theoretische Grundlagen	4
2.1 Einleitung	4
2.2 Die Maxwell-Gleichungen	5
2.4 Ebene Wellen an der Grenzfläche zwischen zwei Medien	7
2.5 Wellenleitermoden	10
2.6 Anregungsmechanismen	13
2.6.1 Gitterkopplung	13
2.7 Sensitivität der Wellenleitersensoren	15
2.7.1 Sensitivität in Bezug auf Änderungen der Brechungsindex des Deckmediums	16
2.7.2 Sensitivität zur Adlayer Anordnung	17
2.8 Theoretische Grundlagen der Oberflächenplasmonen	19
2.9 Fluoreszenzlicht	22
2.9.1 Quantenausbeute der Fluoreszenz	23
2.10 Thermo-responsive Hydrogele	24
2.11.1 Vernetzungsreaktion und Oberflächenanbindung	24
3 Technologien und Messverfahren	27
3.1 Schichtpräparation für WaMS-Messung	27
3.1.1 Reinigung des Substrates	27
3.1.2 Filmpräparation von Polystyrol (PS)	27
3.1.3 Das Stufenprofilometer (α -stepper)	29
3.1.4 Das Heißprägen	29
3.1.5 Prägen eines Gitters in Polystyrol-Wellenleiter mit	30

___ Polymethylmethacrylat (PMMA)-Substraten _____	30
3.1.6 Prägen von Gittern in Polystyrol mit Glas-Substraten _____	31
3.1.7 Gittercharakterisierungen _____	32
3.1.8 Beschichtung des Wellenleiter-Sensors _____	33
3.2 Schichtpräparation für SPR-Messung _____	34
3.3 Wellenleitermoden – Spektroskopie _____	34
3.4 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR) und _____	36
Optischen Wellenleiter-Spektroskopie (OWS) _____	36
3.7 SPR-Imaging _____	39
3.8 Optische Wellenleiter-Fluoreszenzspektroskopie (OWFS) _____	40
3.9 CCD-Kamera _____	40
3.10.1 Vergleich zwischen CCD - und CMOS - Kamera _____	42
<i>4 EXPERIMENTELLER TEIL _____</i>	<i>45</i>
4.1 Strukturierung des Hydrogels _____	45
4.2 Schichtcharakterisierung _____	49
4.2.1 Messungen im trockenen Zustand _____	49
4.2.2 Quellverhalten des Hydrogels _____	51
4.3 Fluoreszenzanregung durch Wellenleitermode _____	55
<i>5 Zusammenfassung _____</i>	<i>58</i>
<i>Literatur _____</i>	<i>60</i>
Danksagung _____	63
<i>Lebenslauf _____</i>	<i>64</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip eines Biosensors. _____	1
Abbildung 2: Konzept eines Mikroarrays, basierend auf einem integriert optischen _____	3
Abbildung 3: Dreischichtsystem eines unsymmetrischen Wellenleiters. _____	4
Abbildung 4: Reflexion und Brechung einer ebenen Welle an der Grenzfläche. _____	7
Abbildung 5: Ausbildung eines evaneszenten Feldes durch Totalreflexion. _____	8
Abbildung 6: Goos-Hänchen Verschiebung und effektive Dicke in einem Wellenleiter. _____	9
Abbildung 7: Skizze zur Definition des effektiven Brechungsindex. _____	10
Abbildung 8: Feldverteilung für die ersten TE - und TM - Moden in einem _____	12
Abbildung 9: Modenkarte eines planaren Wellenleiters. _____	13
Abbildung 10: Prinzipielle Funktionsweise der Gitteranregung. _____	14
Abbildung 11: Prinzip von der Sensitivität des evaneszenten Feldes. _____	15
Abbildung 12: Theoretische Sensitivität eines Wellenleiters bezüglich einer _____	17
Abbildung 13: Theoretische Sensitivität eines Wellenleiters bezüglich einer _____	18
Abbildung 14: (a) Schematische Darstellung der Totalreflexion des sich ausbildenden _____	19
Abbildung 15: Anregung von Oberflächenplasmonen der Kretschmann Konfiguration. _____	19
Abbildung 16: Reflektivität in Abhängigkeit vom Einfallswinkel bei Anregung von _____	20
Abbildung 17: Dispersionsrelationen von Licht im Prisma und von Oberflächen- _____	21
Abbildung 18: Thermoschema eines Moleküls. _____	22
Abbildung 19: Stockesverschiebung der Absorption und Emission des Chromophore _____	23
Abbildung 20: Die Änderung des Volumens und der Festigkeit eines Hydrogels bei _____	24
Abbildung 21: (a) Monomer N-Isopropylacrylamid. (b) Monomer 4 _____	25
Abbildung 22: Allgemeine Reaktionsgleichung für die Polymerisationen. _____	25
Abbildung 23: Jablonski- Diagramm des Benzophenones [22]. _____	26
Abbildung 24: Schematische Darstellung der Kopplung von Benzophenon an Verbindungen mit CH- Gruppen. _____	26
Abbildung 25: Experimenteller Aufbau der Schleuderbeschichtung. _____	28
Abbildung 26: Schichtdickenmessung. α -stepper der Firma „Tencor“. _____	29
Abbildung 27: Strukturformel von Polymethylmethacrylat. _____	30
Abbildung 28: Das Präge-Setup. _____	30
Abbildung 29: CAD Modell der neuen Prägevorrichtung. _____	31
Abbildung 30: AFM Bilder des Gitters. (a) Masterstruktur, (b) Probe mit _____	32
Abbildung 31: Schematische Darstellung der Oberflächenanbindungen des Hydrogels. _____	34
Abbildung 32: Wirkung des Adlayers auf den effektiven Brechungsindex. _____	35
Abbildung 33: Experimenteller Aufbau eines Wellenleitermodenspektrometers. _____	35
Abbildung 34: Schematische Darstellung eines SPR-Messplatzes in Kretschmann- _____	36
Abbildung 35: Darstellung des SPR/OWS-Messprinzips. _____	37

Abbildung 36: SPR/OWS Simulation mit ATSSOS des trockenen Hydrogels. Die	37
Abbildung 37: SPR/OWS Simulation mit ATSSOS des gequollenen Hydrogels. Die	38
Abbildung 38: Prinzip des SPR-Imaging. Die Probe wird mit einem parallelen und	39
Abbildung 39: Ein typischer Aufbau für OWFS-Messungen [26].	40
Abbildung 40: Prinzip eines CCD-Sensors . Die entstehenden Ladungen der einzelnen	41
Abbildung 41: Standardobjektiv.	42
Abbildung 42: Fluoreszenzaufnahmen von sechs verschiedenen Konzentrationen mit	43
Abbildung 43: Schematische Darstellung der Polymerstrukturierung.	45
Abbildung 44: Modenspektrum eines Wellenleiters mit den Parametern aus Tabelle 5.	46
Abbildung 45: Mit Multiwave errechnete Brechungsindex-Dicken-Abhängigkeit des Wellenleiters.	46
Abbildung 46: Mit Multiwave errechnete Brechungsindex-Dicken- Abhängigkeit.	47
Abbildung 47: Erzeugte Strukturen durch UV-Belichtung mit Maske einer P(NIPAAm-co-MABP)-Schicht.	48
Abbildung 48: Aufgenommenes Bild des hergestellten Mikroarray mittels SPR-Imaging.	48
Abbildung 49: SPR- Messplatz.	49
Abbildung 50: Messdaten und Simulation mit dem Schichtsystem mittels Wispal.l	50
Abbildung 51: Messdaten und Simulation mit Wispall des trocknen Poly(NIPAAm)-Films mit 1% Benzophenon. Die Anregung ist mit TM-polarisiertem Licht erfolgt.	50
Abbildung 52: Messdaten und Simulation mit Wispall eines trocknen Poly(NIPAAm)-Films	51
Abbildung 53: Messdaten und Simulation mit Wispall	52
Abbildung 54: Temperaturabhängige Quellungsmessung.	52
Abbildung 55: Messdaten des Poly(NIPAAm) bei (A) 34°C, (B) 36°C, (C) 38°C.	53
Abbildung 56: Brechungsindex und Dicke in Abhängigkeit von der Temperatur.	54
Abbildung 57: Resonanzminimum und Dicke in Abhängigkeit von der Temperatur.	54
Abbildung 58: Messdaten SPR-Messung. Die Parameter sind: $n(\text{Substrat}) = 1.845$,	56
Abbildung 59: Vergleich der Reflektivität mit dem Fluoreszenzsignal der TM-Polarisation	57

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Verwendete Polystyrollösungen</i>	27
<i>Tabelle 2: Eigenschaften des verwendeten Lösungsmittels.</i>	28
<i>Tabelle 3: Parameter zum Prägen von Gittern in Polystyrol mit Polymethylmethacrylat-Substraten.</i>	31
<i>Tabelle 4: Die zusammengefassten Ergebnisse zum Prägen von Gittern mit Glas-</i>	32
<i>Tabelle 5: Parameter für den in dieser Arbeit eingesetzten Sensor.</i>	37
<i>Tabelle 6: Parameter für den in dieser Arbeit eingesetzten Sensor.</i>	38
<i>Tabelle 7: Parameter des eingesetzten Wellenleitersensors.</i>	45
<i>Tabelle 8: Berechnete effektive Brechungsindizes von unterschiedlichen Moden.</i>	47
<i>Tabelle 9: Berechnete effektiven Brechungsindex von unterschiedlichen Moden aus dem Kopplungswinkel und mit Polymerlösung.</i>	47

1 EINLEITUNG

1.1 Motivation

Die molekularen Wechselwirkungen von Biomolekülen stehen seit vielen Jahren im Interesse der Forschung z. B. in der Medizin oder Lebensmittelkontrolle. Durch den Einsatz von evaneszenten optischen Sensoren wie Oberflächenplasmonen oder Wellenleitersensoren zur Fluoreszenzanregung können sehr hohe Sensitivitäten erreicht werden [1-2-3].

Biosensoren stellen eine Schnittstelle zwischen Technik und Biologie dar. Mit ihnen werden komplexe Stoffe (Analyt) in einer Lösung nachgewiesen. So kann man beispielsweise ein Umweltgift im Abwasser nachweisen oder mit einem DNA-Mikrochip den Aufbau von DNA-Sequenzen analysieren. Ein Biosensor kann im Allgemeinen als Vorrichtung definiert werden, die aus einem biologischen Erkennungssystem, Biorezeptor genannt, und einem Signaltransformationssystem besteht [4].

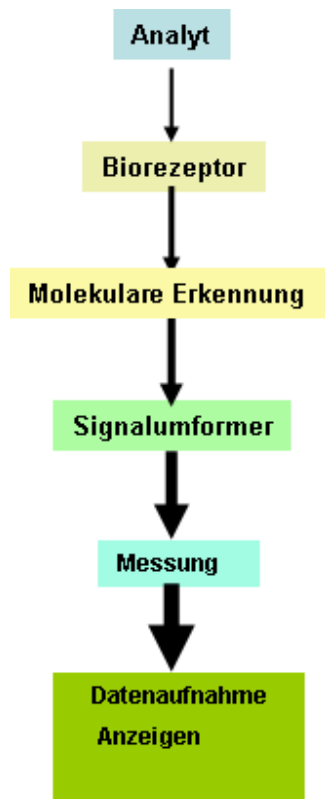


Abbildung 1: Prinzip eines Biosensors.

Die optischen Biosensoren können durch ihren Biorezeptor und ihre Signaltransformationssystem eingestuft werden. Ein Biorezeptor ist ein Biomolekül (z.B. ein Antikörper, ein Enzym, ein Protein oder eine Nukleinsäure) oder ein lebendes biologisches System, (z.B. Zellen, Gewebe oder vollständige

1 EINLEITUNG

Organismen), das eine biochemische Einheit für die Erkennung verwendet. Die gängigsten Formen an, die verwendet werden, basieren auf 1) Antikörper/Antigen Interaktionen, 2) Nukleinsäureinteraktionen, 3) enzymatischen Interaktionen, und 4) zellulären Interaktionen (d.h. Mikroorganismen, Proteine). Die Signalumwandlung schließt folgende Techniken ein:

1) optische Messtechniken (d.h. Fluoreszenz-, Absorption- und Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie, usw.) 2) elektrochemische und 3) masseempfindliche Techniken (z. B. akustische Oberflächenwelle, Mikrowaage, etc.) [5].

Für eine erfolgreiche Implementierung müssen die optischen Biosensoren hohe Sensitivität und Selektivität besitzen. Ein Sensor mit hoher Selektivität spricht nur auf einen bestimmten Analyten an und hohe Sensitivität ist erforderlich, um sehr kleine Analytmengen zu detektieren.

1.2 Mikroarray Technologie und Evaneszentfeldsensorik

Trotz des enormen Erfolges der Mikroarray Technologie, die auf Pionierarbeiten der achtziger Jahre basiert, ist die Anwendung von Mikroarrays in der Biosensorik relativ neu. 1999 wurde einer der ersten Biosensoren, der auf Mikroarray Technologie basiert, im Bereich der Klimaanalyse vorgestellt. Er wurde zuerst für immunologischen ligandbindenden Proben demonstriert und wurde dann schnell von der Genomik Gemeinschaft weiterentwickelt [6].

Die Analyse von flüssigen oder gasförmigen Proben kann man mittels Photometer, Spektrometer, Fluorometer und Refraktrometer durchführen. Durch die Suche nach einem miniaturisierten Detektionssystem für Gase oder Flüssigkeiten, hat sich eine Vielzahl neuer analytischer Möglichkeiten eröffnet. Die Evaneszentfeldsensorik z. B. ist eine Analysverfahren, das das evaneszente Feld eines Wellenleiters nutzt. Das elektromagnetische Feld eines Lichtwellenleiters weist im Fall der Totalreflexion im niederbrechenden Medium einen exponentiell abfallenden Feldanteil auf [7]. Diesen außerhalb des Wellenleiters geführten Anteil der Feldverteilung nennt man evaneszentes Feld (von lateinisch *evanescere*: abnehmen, verschwinden). Die Eindringtiefe in das Umgebungsmedium ist abhängig von der Brechzahlverteilung und der Geometrie des Wellenleiters. Im Prinzip erlaubt die Methode, dass die Wechselwirkung nur in direkter Umgebung der Oberfläche des Wellenleiters detektiert wird. Diese Methode und andere Messprinzipien, wie integriert optische Verfahren, das Mach-Zender-Interferometer oder das Phasendifferenz-Interferometer reagieren sehr sensitiv auf kleinste Änderungen an der Sensoroberfläche [8]. Damit können photometrische und fluoreszenzoptische Messverfahren miniaturisiert werden.

Abbildung 2 zeigt das Konzept eines solchen Sensors. Ein Wellenleiter wird auf ein Glassubstrat aufgebracht. Das Licht wird durch ein Gitter in den Wellenleiter eingekoppelt. Mit Hilfe des evaneszenten Feldes wird Fluoreszenz angeregt. Das Fluoreszenzlicht wird durch eine CCD Kamera detektiert, die unter den Wellenleiter gesetzt wird.

1 EINLEITUNG

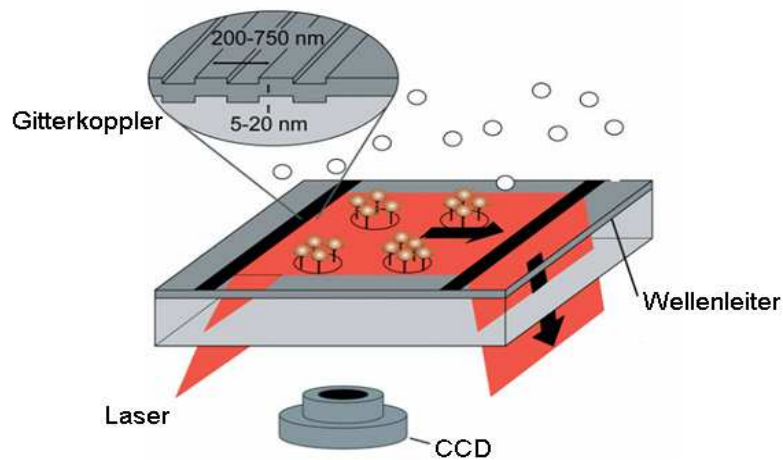


Abbildung 2: Konzept eines Mikroarrays, basierend auf einem integriert optischen Wellenleiter-Sensor [9].

1.3 Zielsetzung

Im Rahmen der Arbeit soll ein Mikroarray auf einen Wellenleiter-Sensor zur Fluoreszenzanregung entwickelt werden. Die Mikroarrays sollen aus Hydrogelen hergestellt werden. Hydrogele sind polymere Netzwerke, die in Wasser quellen, sich aber nicht auflösen. Die Eigenschaften von Gelen sind abhängig von der Wechselwirkung zwischen Netzwerk und umgebender Flüssigkeit. Die Fähigkeit von Hydrogelen Wasser auf zu nehmen ist auf hydrophile Gruppen in der Polymerkette abzuleiten. Es wurde in dieser Arbeit mit Poly(N-Isopropylacrylamid) gearbeitet. Dieses Polymer zeigt in Wasser einen scharfen Phasenübergang bei etwa $T_G = 32 \text{ °C}$. Der Grund für diesen scharfen Phasenübergang ist die Balance von hydrophilen und hydrophoben Gruppen im Polymer. Die Vernetzung ist in der Polymerchemie ein vielgenutztes Mittel, um Polymere mit verbesserten Materialeigenschaften zu realisieren. Eine Vernetzung von Hydrogelen durch Bestrahlung mit UV-Licht bietet eine Vielzahl von Vorteilen, wie z.B. die Möglichkeit der Herstellung sehr definierter Polymerfilme auf Oberflächen, die durch selektive Bestrahlung gezielt strukturiert werden können. Die Charakterisierung des hergestellten Mikroarrayhydrogele erfolgt mittels Wellenleiter-Spektroskopie (WaMS), Oberflächenplasmonen-Spektroskopie (SPR), Optische Wellenleiter-Fluoreszenz-Spektroskopie (OWFS) und SPR-Imaging.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

In diesem Kapitel wird ein kurzer Überblick der Theorie des optischen Wellenleiters gegeben, um einen Hintergrund in dieser Arbeit zur Verfügung zu stellen. Eine ausführliche Beschreibung der Theorie der Wellenleiter-Optik kann in [10-11-12] gefunden werden.

2.1 Einleitung

Ein optischer Wellenleiter ist eine Struktur, die fähig ist, das Licht zu führen. Es gibt verschiedene Arten von optischen Wellenleitern wie z.B. die optische Faser, die in der Nachrichtentechnik benutzt wird. In der integrierten Optik sind planare optische Wellenleiter von Interesse.

Im einfachsten Fall eines planaren Wellenleiters wird ein Substrat mit einem dünnen Film eines hochbrechenden Materials beschichtet (gewöhnlich mit einer Dicke, die von mehreren hundert Nanometern bis zu einigen zehn Mikrometern reicht)(Abb. 3). Man kann sich das Deckmedium und das Substrat als Halbraum vorstellen.

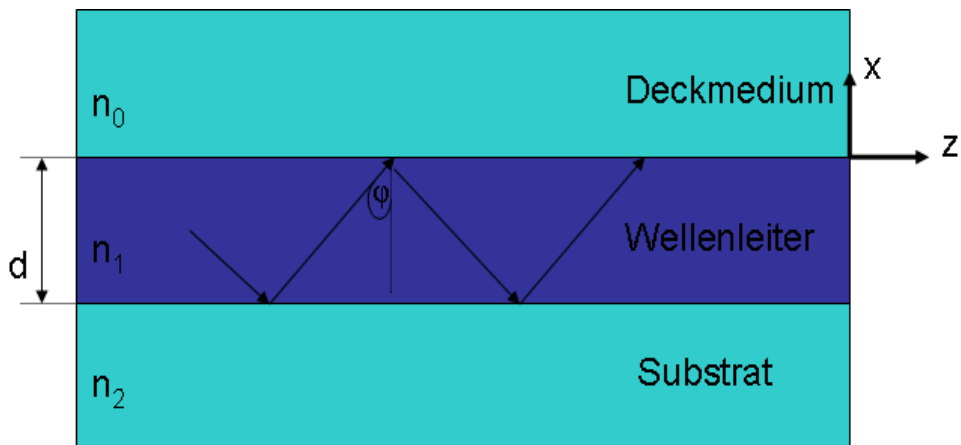


Abbildung 3: Dreischichtsystem eines unsymmetrischen Wellenleiters.

Das Brechzahlprofil hat dabei die Form:

$$n(x) = \begin{cases} n_0; & x > 0 \\ n_1; & 0 \leq x \leq -d \\ n_2; & x < -d \end{cases} \quad (2.1)$$

wobei weiter gilt $n_1 > n_2 > n_0$.

Die Wellenleitung im Wellenleiter kann nur dann erfolgen, wenn an beiden Grenzflächen Wellenleiter – Substrat und Wellenleiter – Deckmedium die Welle mit dem Ausbreitungswinkel φ Totalreflexion erfährt.

In der unteren gesamten Überlegung betrachten wir die Einfallsebene, die (x,z) Ebene, die durch den Ausbreitungsvektor des einfallenden Strahls und

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

die Flächennormale aufgespannt wird. Wegen der Translationssymmetrie in y-Richtung $\partial/\partial y=0$, unterscheidet man zwei Fälle von elektromagnetischen Wellen:

- TE - Polarisation (TE: transversal elektrisch): Das elektrische Feld ist senkrecht zur Einfallsebene und besitzt nur eine E_y - Komponente ($E_x = E_z = H_y = 0$).
- TM – Polarisation (TM: transversal magnetisch): Das elektrische Feld ist parallel zur Einfallsebene und das magnetische Feld besitzt nur eine H_y – Komponente ($E_y=H_x=H_z=0$).

2.2 Die Maxwell-Gleichungen

Von den Maxwellschen Gleichungen kann die gesamte Theorie der elektromagnetischen Strahlung abgeleitet werden. Im Folgenden sollen Ausdrücke zur Quantifizierung der elektromagnetischen Felder in einem Wellenleiter abgeleitet werden. Für die Herleitung der Wellengleichung für Lichtleiter werden folgende Vereinfachungen angenommen:

- Die Medien sind isotrop.
- Die Materialien sind diamagnetisch.
- Es gibt keine freien Ladungsträger.
- Die Medien sind elektrische Isolatoren.

Die Maxwell-Gleichungen für monochromatische elektromagnetische Wellen nehmen die folgende Gestalt an:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E}(\vec{r}) = 0 \quad (2.2a)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H}(\vec{r}) = -j\epsilon_0 \epsilon_r \omega \vec{E}(\vec{r}) \quad (2.2b)$$

$$\nabla \vec{H}(\vec{r}) = 0 \quad (2.2c)$$

$$\nabla \times \vec{E}(\vec{r}) = j\omega \mu_0 \vec{H}(\vec{r}) \quad (2.2d)$$

$\vec{H}(\vec{r})$ Magnetische Feldstärke ($A \ m^{-1}$)

$\vec{E}(\vec{r})$ Elektrischer Feldvektor ($V \ m^{-1}$)

ϵ_r Permittivitätszahl

ω Kreisfrequenz

$\epsilon_0 \approx 8,85 \cdot 10^{-12} \ (A \ s \ V^{-1} \ m^{-1})$ Elektrische Feldkonstante

$\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \ (V \ s \ A^{-1} \ m^{-1})$ Magnetische Feldkonstante

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Aus den Maxwell-Gleichungen kann man die zeitfreien Helmholtzgleichungen herleiten:

$$\left(\nabla^2 - \frac{\omega^2}{c^2} \epsilon_r \right) \vec{E}(\vec{r}) = 0 \quad (2.3a)$$

$$\left(\nabla^2 + \frac{\omega^2}{c^2} \epsilon_r \right) \vec{H}(\vec{r}) = 0 \quad (2.3b)$$

Die einfachsten Lösungen dieser Gleichungen sind periodische Felder der Form:

$$\vec{A}(\vec{r}, \omega) = \vec{A}_0 e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r})} \quad (2.4)$$

\vec{A}_0 ist die Amplitude, \vec{k} der Wellenzahlvektor und ω die Kreisfrequenz der monochromatischen elektromagnetischen Welle.

Die Intensität ist der zeitliche Mittelwert des Betrages des Poyntingschen Vektors:

$$I := \langle S \rangle = \frac{c^2 \epsilon_0}{2} |\vec{E}_0 \times \vec{B}_0| = \frac{c \epsilon_0}{2} E_0^2 \quad (2.5)$$

Mit der Lichtgeschwindigkeit

$$c = \frac{1}{\sqrt{\epsilon \mu}} \quad (2.6a)$$

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

$$c = \frac{1}{\sqrt{\epsilon_0 \mu_0}} \quad (2.6b)$$

und damit kann man den absoluten Brechungsindex n als das Verhältnis der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum c_0 zu der in Materie c definieren:

$$n := \frac{c_0}{c} = \sqrt{\frac{\epsilon \mu}{\epsilon_0 \mu_0}} \quad (2.6c)$$

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.4 Ebene Wellen an der Grenzfläche zwischen zwei Medien

Die Strahlführung in einem optischen Wellenleiter kann mit Totalreflexion des Strahles an den beiden Grenzflächen beschrieben werden.

Licht, das von einem Medium mit dem Brechungsindex n_1 unter dem Winkel φ_1 zur Einfallsebene auf ein anderes Medium mit dem Brechungsindex n_0 trifft, wird zum Teil unter dem Winkel φ_0 gebrochen (Abb.5).

Snelliussches Brechungsgesetz

$$\frac{\sin \varphi_1}{\sin \varphi_0} = \frac{c_1}{c_0} = \frac{n_0}{n_1} \quad (2.7)$$

Der andere Teil des Lichts wird nach dem **Reflexionsgesetz** reflektiert.

$$\varphi_1 = \varphi_1' \quad (2.8)$$

Die Anteile der reflektierten und transmittierten Strahlung ergeben unter Einbeziehung von Übergangsbedingungen an der Grenzfläche der Medien die **Fresnelschen Gleichungen**.

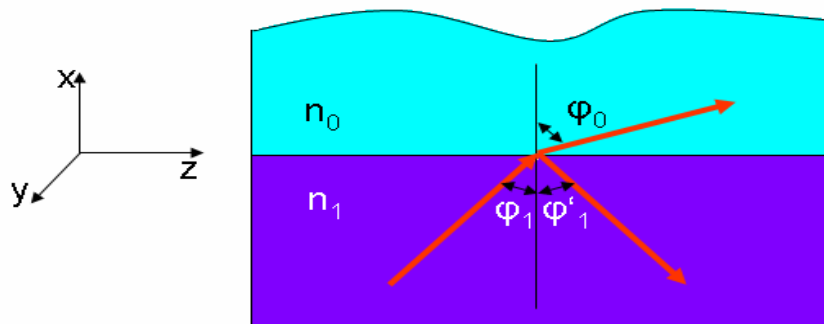


Abbildung 4: Reflexion und Brechung einer ebenen Welle an der Grenzfläche.

Dabei muss bei der einfallenden Strahlung zwischen senkrecht \perp (TE) und parallel \parallel (TM) zur Einfallsebene polarisiertem Licht unterschieden werden.

Wegen der Verknüpfung zwischen \vec{E} und \vec{B} durch die Maxwellgleichungen reicht völlig aus nur das \vec{E} -Feld zu betrachten. Für dielektrische Medien gilt:

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

$$r_{\perp} = \left(\frac{E_{0r}}{E_{0i}} \right)_{\perp} = \frac{n_1 \cos \varphi_1 - n_0 \cos \varphi_0}{n_1 \cos \varphi_1 + n_0 \cos \varphi_0} \quad (2.9a)$$

$$t_{\perp} = \left(\frac{E_{0t}}{E_{0i}} \right)_{\perp} = \frac{2n_1 \cos \varphi_1}{n_1 \cos \varphi_1 + n_0 \cos \varphi_0} \quad (2.9b)$$

$$r_{\parallel} = \left(\frac{E_{0r}}{E_{0i}} \right)_{\parallel} = \frac{n_0 \cos \varphi_1 - n_1 \cos \varphi_0}{n_0 \cos \varphi_1 + n_1 \cos \varphi_0} \quad (2.9c)$$

$$t_{\parallel} = \left(\frac{E_{0t}}{E_{0i}} \right)_{\parallel} = \frac{2n_1 \cos \varphi_1}{n_0 \cos \varphi_1 + n_1 \cos \varphi_0} \quad (2.9d)$$

r_{\perp} und r_{\parallel} kennzeichnen die Amplitudenreflexionskoeffizienten, t_{\perp} und t_{\parallel} die Amplitudentransmissionskoeffizienten.

Im Fall $n_1 > n_0$ und ab einem Winkel $\varphi_1 = 90^\circ$ tritt der Strahl nicht mehr ins angrenzende Medium, sondern wird ins Medium n_1 zurückreflektiert. Man spricht von **Totalreflexion**.

$$\sin \varphi_1 \leq \frac{n_0}{n_1} = \sin \varphi_G \quad (2.10)$$

φ_G wird als Grenzwinkel der Totalreflexion bezeichnet. Bei der Totalreflexion bildet sich im optisch dünneren Medium ein exponentiell abfallendes Feld aus, das sogenannte **evaneszente Feld**. Die Eindringtiefe des evaneszenten Felds in das Umgebungsmedium beträgt ca. eine halbe Wellenlänge. Sie nimmt mit steigendem Einfallswinkel ab und nimmt zu, je geringer der Unterschied zwischen den Brechungsindizes n_0 und n_1 ist. Die in das Umgebungsmedium geführte Lichtleistung kann zur Anregung und Detektion von Prozessen an der Grenzfläche genutzt werden.

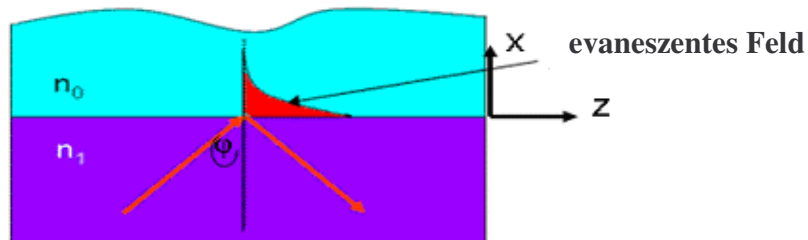


Abbildung 5: Ausbildung eines evaneszenten Feldes durch Totalreflexion.

Der Exponentialfaktor, mit dem die Amplitude abfällt, lautet:

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

$$\exp\left(-k_0 n_1 \cdot \frac{\sqrt{\sin^2 \varphi_1 - \sin^2 \varphi_G}}{\sin \varphi_G} x\right) \quad (2.11)$$

Wie schon erwähnt, werden an den Grenzflächen Bedingungen an das \vec{E} - und \vec{H} -Feld gestellt, die dafür verantwortlich sind, dass die Felder bei Totalreflexion nicht abrupt auf Null abfallen, sondern exponentiell in das dünnere Medium abklingen. Dies führt darüber hinaus zu einer lateralen Verschiebung der reflektierten Welle (Goos-Hänchen-Verschiebung). Im strahlen-optischen Bild erscheint die Grenzschicht wegen des Eindringens des Feldes in die umgebende Schicht verbreitert und man spricht von der effektiven Dicke d_{eff} der Grenzschicht.

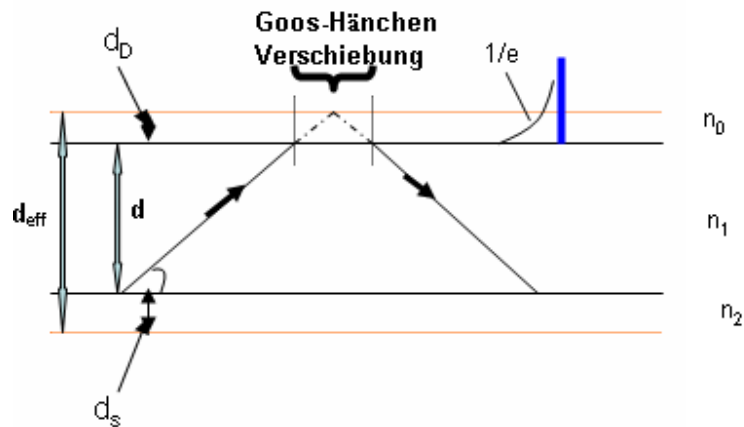


Abbildung 6: Goos-Hänchen Verschiebung und effektive Dicke in einem Wellenleiter.

Die Eindringtiefen d_s der Eindringtiefe im Substrat und d_D der Eindringtiefe im Deckmedium lauten:

$$d_D = \left(\frac{\lambda_0}{4 \cdot \pi \cdot n_1}\right) \cdot \left(\sin(\varphi)^2 - \left(\frac{n_0^2}{n_1^2}\right)\right)^{-\frac{1}{2}} \quad (2.12a)$$

$$d_s = \left(\frac{\lambda_0}{4 \cdot \pi \cdot n_1}\right) \cdot \left(\sin(\varphi)^2 - \left(\frac{n_2^2}{n_1^2}\right)\right)^{-\frac{1}{2}} \quad (2.12b)$$

Die Eindringtiefe im optisch dünneren Medium gibt an, wann das evaneszente Feld auf den 1/e-ten Teil abgeklungen ist.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.5 Wellenleitermoden

Zur Betrachtung der Wellenleitung im Wellenleiter muss man die Phasenbeziehungen der elektromagnetischen Welle betrachten. Die Phase Φ der Welle ändert sich entlang der Ausbreitungsrichtung im Wellenleiter gemäß:

$$\Phi(z) = z\beta = zn_1k_z = zn_1 \cos \varphi \quad (2.13)$$

Dabei ist β die Ausbreitungskonstante und k_z die Wellenzahl in z-Richtung im freien Raum. Um Wellenleitung im Wellenleiter zu erhalten, muss sich die Phase der geführten Welle in x-Richtung nach den Reflexionen an beiden Grenzflächen und einem zurückgelegten Weg von $\Delta_x = 2d$ um ein Vielfaches von 2π verändern. Längs des Weges $\Delta_x = 2d$ ergibt sich eine Phasenänderung von:

$$2dn_1k_x = 2dn_1k \cos \varphi \quad (2.14)$$

Zusätzlich gibt es Phasensprünge durch die Totalreflexionen an den Grenzflächen Wellenleiter-Deckmedium Φ_D und Wellenleiter-Substrat Φ_S . Diese Phasen sind abhängig von der Polarisation der Welle. Diese Phasenbeziehungen führen zu der charakteristischen Gleichung (2.15) für Wellenleiter.

$$2dn_1k \cos \varphi_m - \Phi_D - \Phi_S = 2m\pi, \quad (2.15)$$

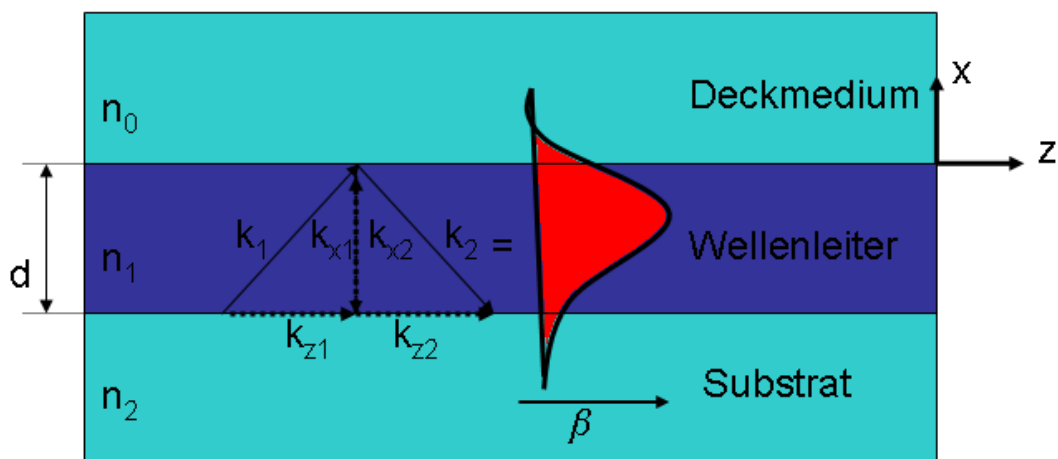


Abbildung 7: Skizze zur Definition des effektiven Brechungsindex.

Die Lösung der Gleichung (2.15) ergibt diskrete Winkel φ_m , unter denen sich Wellen im Wellenleiter ausbreiten können, und die dazugehörigen Ausbreitungskonstanten β_m . Aus der Tatsache, dass die Phasensprünge

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

polarisationsabhängig sind, folgt, dass für die beiden Polarisationen unterschiedliche geführte Wellen existieren (TE- und TM-Moden).

Als Lösungsansatz für die geführten Moden wird folgendes angenommen:

$$\vec{E}(x, z, t) = \vec{E}(x) \exp(i(\omega t - \beta z)) \quad (2.16)$$

Durch Einsetzen von (2.16) in (2.3a) ergibt sich die Wellengleichung:

$$\nabla^2 \vec{E} + (k_0^2 n^2(x) - \beta^2) \vec{E} = 0 \quad (2.17)$$

Die Wellengleichung in den Schichten $j = 1, 2, 3$ lautet dann

$$\frac{\partial^2 \vec{E}_j(x)}{\partial x^2} + (k_0^2 n_j^2 - \beta^2) \vec{E}_j(x) = 0 \quad (2.18)$$

Man führt weiterhin folgende Abkürzungen ein:

$$u^2 = k_0^2 n_1^2 - \beta^2 \quad (2.19a)$$

$$v^2 = \beta^2 - k_0^2 n_2^2 \quad (2.19b)$$

$$w^2 = \beta^2 - k_0^2 n_0^2 \quad (2.19c)$$

Für die drei Medien gelten dann die Gleichungen:

$$\frac{\partial^2 \vec{E}_0(x)}{\partial x^2} - v^2 \vec{E}_0(x) = 0 \quad (2.20a)$$

$$\frac{\partial^2 \vec{E}_1(x)}{\partial x^2} + u^2 \vec{E}_1(x) = 0 \quad (2.20b)$$

$$\frac{\partial^2 \vec{E}_2(x)}{\partial x^2} - w^2 \vec{E}_2(x) = 0 \quad (2.20c)$$

Durch Umformung und Lösen der Gleichungen erhält man die sogenannten Modengleichungen für TE- und TM-Moden.

Die Modengleichung für TE-Moden lautet:

$$\tan(ud) = \frac{u(v+w)}{u^2 - vw} \quad (2.21a)$$

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

TM-Modengleichung :

$$\tan(ud) = \frac{\frac{u}{n_2^2} \left(\frac{v}{n_1^2} + \frac{w}{n_0^2} \right)}{\frac{u^4}{n_2^2} - \frac{v}{n_1^2} \cdot \frac{w}{n_0^2}} \quad (2.21b)$$

Die Modengleichungen haben nur diskrete Lösungen, zu denen die jeweiligen Wellenleitermoden gehören. Jede Mode lässt sich durch eine Ausbreitungskonstante β bzw. einen effektiven Brechungsindex n_{eff} beschreiben.

$$\beta_m = k_z = k_1 \sin \varphi_m = k_0 n_{\text{eff},m} \quad (2.22)$$

Die Gleichung (2.22) stellt die Definitionsgleichung für den effektiven Brechungsindex $n_{\text{eff},m}$ mit $n_0, n_2 < n_{\text{eff}} < n_1$ dar. Er ist definiert als das Verhältnis der Ausbreitungskonstanten β_m der Mode im Medium zur Vakuumsausbreitungskonstanten k_0 . φ_m ist der Ausbreitungswinkel der Mode im Wellenleiter. Das Feld für die TE-Moden in einem Wellenleiter besteht aus drei Schichten und lässt sich folgendermaßen darstellen als:

$$E_{y1}^m = E_{\text{max}} \cdot \cos(\theta) \cdot \exp(-w_m x) \dots \dots \dots x > 0 \quad (2.23a)$$

$$E_{y2}^m = E_{\text{max}} \cdot \cos(u_m x - \theta) \dots \dots \dots -d \leq x \leq 0 \quad (2.23c)$$

$$E_{y3}^m = E_{\text{max}} \cdot \cos(u_m d + \theta) \cdot \exp((x + d) v_m) \dots \dots \dots x < -d \quad (2.23b)$$

Hier ist E_{max} die maximale Feldamplitude und θ ist ein Maß für die Lage des Maximums.

In Abbildung 8 sind die transversalen Feldverläufe der ersten drei Moden in einem Schichtwellenleiter skizziert. Es gilt, dass das Evaneszentfeld umso schneller abklingt, je kleiner die Modenzahl m und je größer der Brechungsindexunterschied sind.

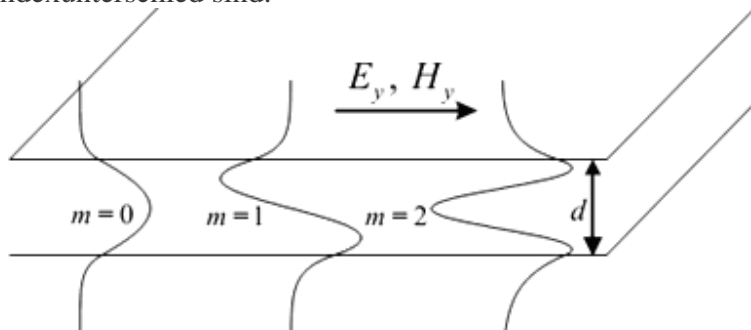


Abbildung 8: Feldverteilung für die ersten TE - und TM - Moden in einem Schichtwellenleiter.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Abbildung 9 zeigt die Modenkarte für in dieser Arbeit den verwendeten Wellenleiter.

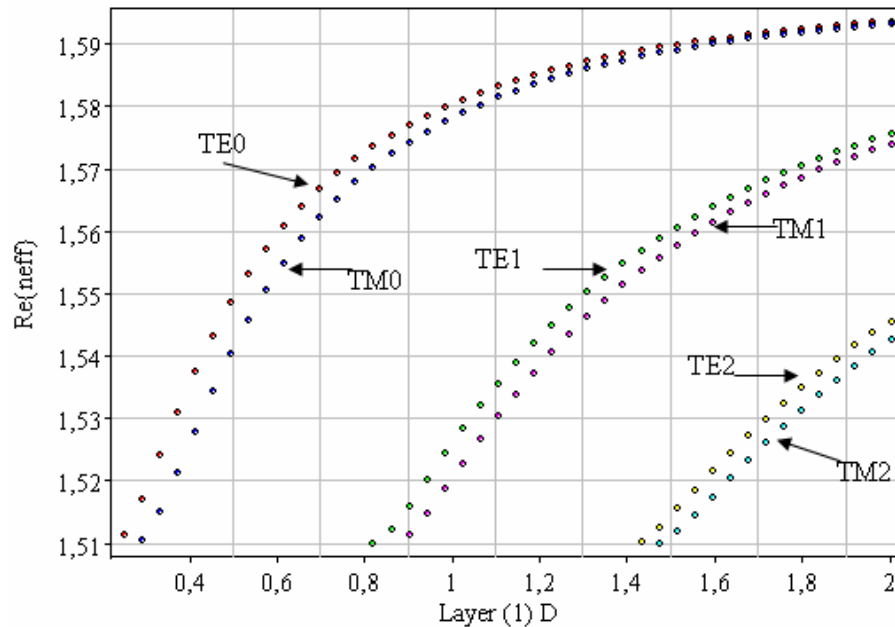


Abbildung 9: Modenkarte eines planaren Wellenleiters. Dargestellt ist der effektive Brechungsindex über der Dicke des wellenleitenden Mediums. Verwendete Kennwerte: $n_{\text{substrat}}=1.51$, $n_{\text{wl}}=1.6$, $n_{\text{superstrat}}=1.00$ an $\lambda=633\text{nm}$. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm "ATSOS" das vom Ingenieurbüro Doos [13] entwickelt wurde.

2.6 Anregungsmechanismen

Wegen der Totalreflexion innerhalb des Wellenleiters muss die Wellenzahl einer geführten Mode β größer sein als die Wellenzahlen propagierender Wellen in Deckmedium und Substrat. Daher ist es nicht ohne weiteres möglich, eine propagierende Welle im Deckmedium an eine Wellenleitermode zu koppeln. Prinzipiell existieren drei Methoden um Wellenleitermoden anzuregen. Dies ist zum einen die Stirnflächenkopplung, durch die jedoch die selektive Anregung von Moden nur schwer zu realisieren ist. Die anderen zwei Methoden sind Prismen- und Gitterkopplung. Auf Stirnflächenkopplung und Prismenkopplung wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

2.6.1 Gitterkopplung

Ein typischer Gitterkoppler besteht im Wesentlichen aus einem Schichtwellenleiter, in den das Koppelgitter eingebracht ist. An einer periodisch modulierten Struktur kann zu einem Lichtwellenvektor nach dem Floquet-Bloch-Theorem ein ganzzahliges Vielfaches q der Wellenzahl der Modulation addiert oder subtrahiert werden (Beugung am Gitter) [14].

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

$$k_g = \frac{2\pi}{g} \quad (2.24)$$

mit g : Gitterkonstante.

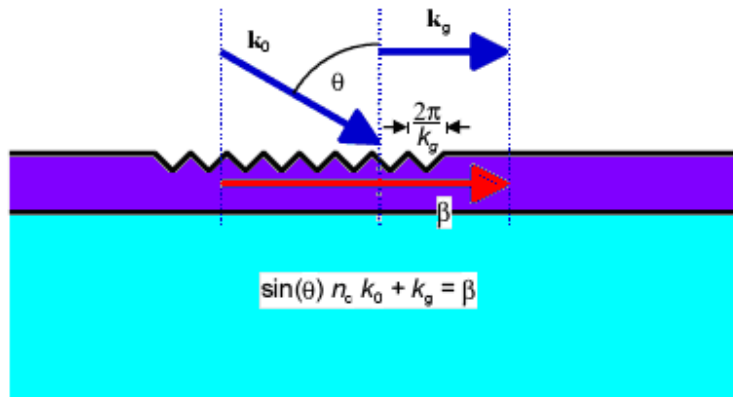


Abbildung 10: Prinzipielle Funktionsweise der Gitteranregung.

Die Kopplung in den Wellenleiter erfolgt nach der Bedingung:

$$\sin(\theta_m) k_0 n_0 + q k_g = \beta q \quad (2.25)$$

Der effektive Brechungsindex der angeregten Mode lässt sich dabei folgendermaßen berechnen:

$$n_{\text{eff}}^m = \sin(\theta_m) n_0 + q \frac{\lambda}{g} \quad (2.26)$$

n_0 ist der Brechungsindex des Mediums, aus dem die Welle auf das Gitter fällt, θ_m ist der Winkel, unter dem die Welle auf das Gitter fällt, t und q steht für die zur Kopplung verwendete Beugungsordnung (in der Regel $q=\pm 1$). Das Licht kann beim gleichen Winkel θ_m auch wieder auskoppeln. Um möglichst viel Licht ein- aber wenig auszukoppeln kann die Form des Gitters variiert werden (geblaste Gitter).

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.7 Sensitivität der Wellenleitersensoren

Die Sensitivität von Wellenleiter-Sensoren wird aus der Störungstheorie abgeleitet. Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes im Deckmedium der Wellenleiter liegt im Bereich 30-100 nm. Dieses evaneszente Feld reagiert auf zwei Arten von Änderungen im Deckmedium: entweder ändert sich der Brechungsindex im Deckmedium oder es wird ein dünner Adlayer d_{ad} mit einem spezifischen Brechungsindex n_{ad} an der Oberfläche des Wellenleiters aufgebracht.

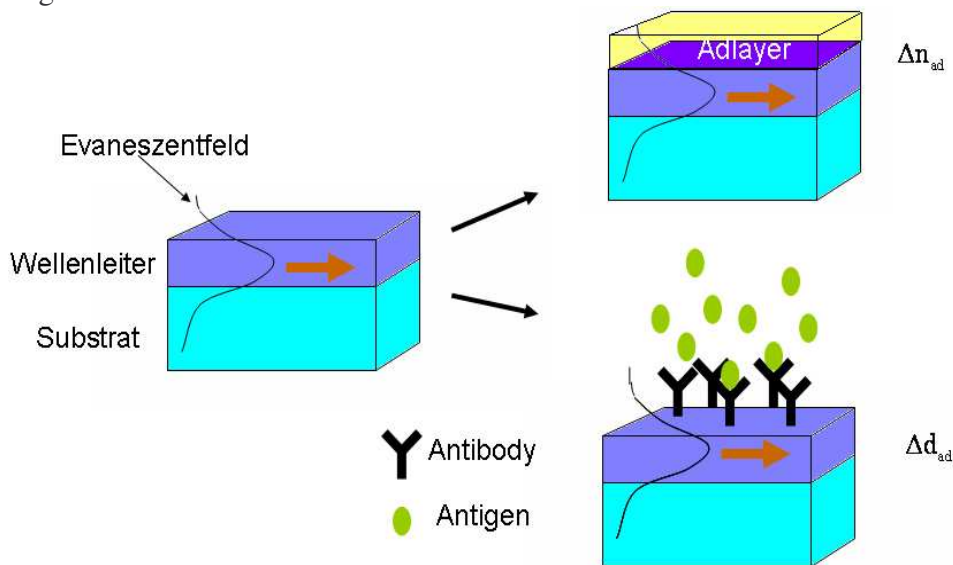


Abbildung 11: Prinzip von der Sensitivität des evaneszenten Feldes.

In vielen Fällen treten beide Phänomene gleichzeitig auf. Während im ersten Fall der Sensor als reines Refraktometer funktioniert, kann er im zweiten Fall als Werkzeug für die Überwachung der Adsorption bzw. Anbindung eines Biomoleküls an der Oberfläche des Wellenleiters benutzt werden. Treten nun

dadurch irgendwelche Veränderungen an der Oberfläche eines Wellenleiters auf, wird die Phasengeschwindigkeit v_p der geführten Mode entsprechend verringert [15-16].

$$v_p = \frac{c}{n_{eff}} \quad (2.27)$$

Der effektive Brechungsindex eines Wellenleiters hängt von folgenden Parametern ab:

$$n_{eff} = n_{eff}(\lambda, n_0, n_1, n_2, d, n_{ad}, d_{ad}, \text{Polarisation}) \quad (2.28)$$

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Es werden nur Änderungen auf der Wellenleiteroberfläche betrachtet, keine Diffusionsprozesse in die Wellenleiterschicht, welche eine Änderung in n_1 verursachen. Die Grundgleichung für Änderungen im n_{eff} wird folglich gegeben durch:

$$\Delta n_{\text{eff}} = \left(\frac{\partial n_{\text{eff}}}{\partial d_{\text{ad}}} \right) \Delta d_{\text{ad}} + \left(\frac{\partial n_{\text{eff}}}{\partial n_0} \right) \Delta n_0 \quad (2.29)$$

2.7.1 Sensitivität in Bezug auf Änderungen der Brechungsindex des Deckmediums

Durch die Störungstheorie erster Ordnung wurde die Änderung des effektiven Brechungsindex der geführten Welle im Bezug auf die Änderungen der Brechungsindex des Deckmediums abgeleitet. Hier soll nur das Ergebnis dargestellt werden.

Unter Annahme einer effektiven Wellenleiterdicke von:

$$d_{\text{eff}} = d + d_D + d_S \quad (2.30)$$

die Änderungen des Brechungsindex im Deckmedium werden nach [15] gegeben:

$$\frac{\partial n_{\text{eff}}}{\partial n_{\text{ad}}} = \left(\frac{n_0}{n_{\text{eff}}} \right) \left(\frac{n_1^2 - n_{\text{eff}}^2}{n_1^2 - n_0^2} \right) \left(\frac{d_{D,S}}{d_{\text{eff}}} \right) \left[2 \left(\frac{n_{\text{eff}}}{n_0} \right) - 1 \right]^\rho \quad (2.31)$$

wobei $\rho = 0$ für TE und $\rho = 1$ für TM steht. Diese Gleichung kann durch numerische Iteration gelöst werden. Abbildung 12 zeigt die Sensitivität $\frac{\partial n_{\text{eff}}}{\partial n_0}$

in Bezug auf die Wellenleiterdicke für die ersten zwei TE – und TM Moden (0 und 1). Die zugehörige Modenkarte ist in Abbildung 10 dargestellt. Man sieht, dass die TM Mode eine höhere Sensitivität für die gegebenen Parameter besitzt und eine Wellenleiterdicke von 480 bis 500 nm für TM_0 optimal ist.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

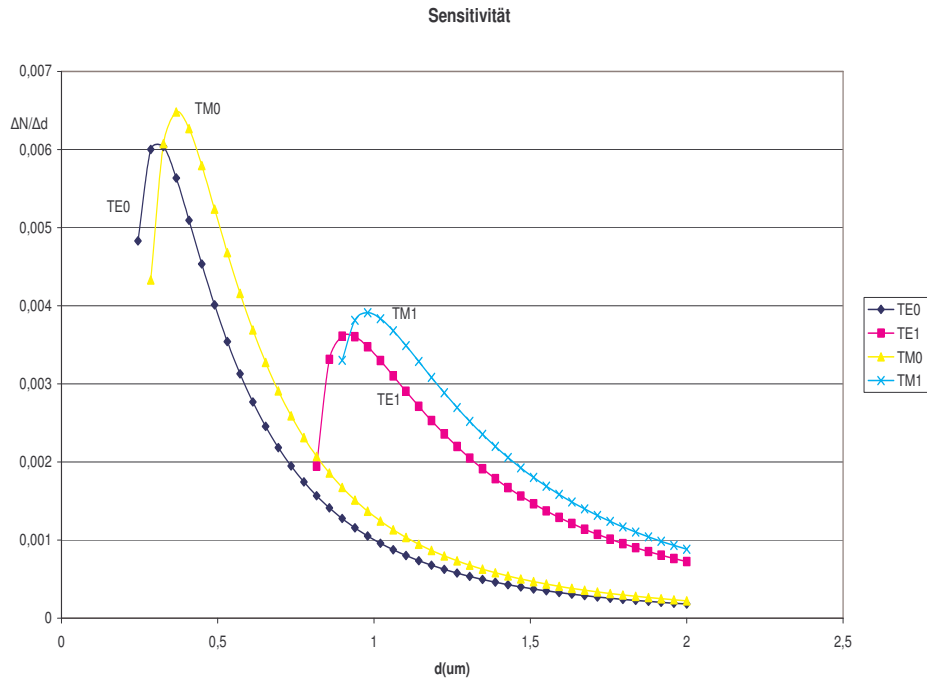


Abbildung 12: Theoretische Sensitivität eines Wellenleiters bezüglich einer Brechungsindexänderung im Deckmedium gegen Wellenleiterdicke (simuliert mit Excel). Simulationsparameter, die für die Herstellung der Sensoren in dieser Arbeit benutzt wurden: $n_0=1.33$ und 1.4 , $n_1=1.6$, $n_2=1.51$ an $\lambda=633$ nm.

2.7.2 Sensitivität zur Adlayer Anordnung

Im Folgenden wird angenommen, dass die Moleküle ein homogenes Adlayer bilden und $d_{ad} \ll \lambda$. Wieder kann die ausführliche Ableitung in der Tiefenhaler Lukosz Arbeit gefunden werden [15] und hier wird nur das Resultat gegeben:

$$\frac{\partial n_{eff}}{\partial d_{ad}} = \left(\frac{n_1^2 - n_{eff}^2}{n_{eff} \cdot d_{eff}} \right) \left(\frac{n_{ad}^2 - n_0^2}{n_1^2 - n_0^2} \right) \left[\frac{\left(\frac{n_{eff}}{n_c} \right)^2 + \left(\frac{n_{eff}}{n_{ad}} \right)^2 - 1}{\left(\frac{n_{eff}}{n_c} \right)^2 + \left(\frac{n_{eff}}{n_1} \right)^2 - 1} \right]^p \quad (2.32)$$

In Abbildung 13 ist die Sensitivität $\partial n_{eff}/\partial d_{ad}$ gegen die Wellenleiterdicke für die ersten zwei TE – und TM – Moden aufgetragen. Die TM Moden zeigen eine höhere Sensitivität als die TE Moden und Wellenleiter mit 480-490 nm Dicke sind optimal, wenn ein hohe Sensitivität in Bezug auf die Adlayer-änderungen gewünscht sind.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

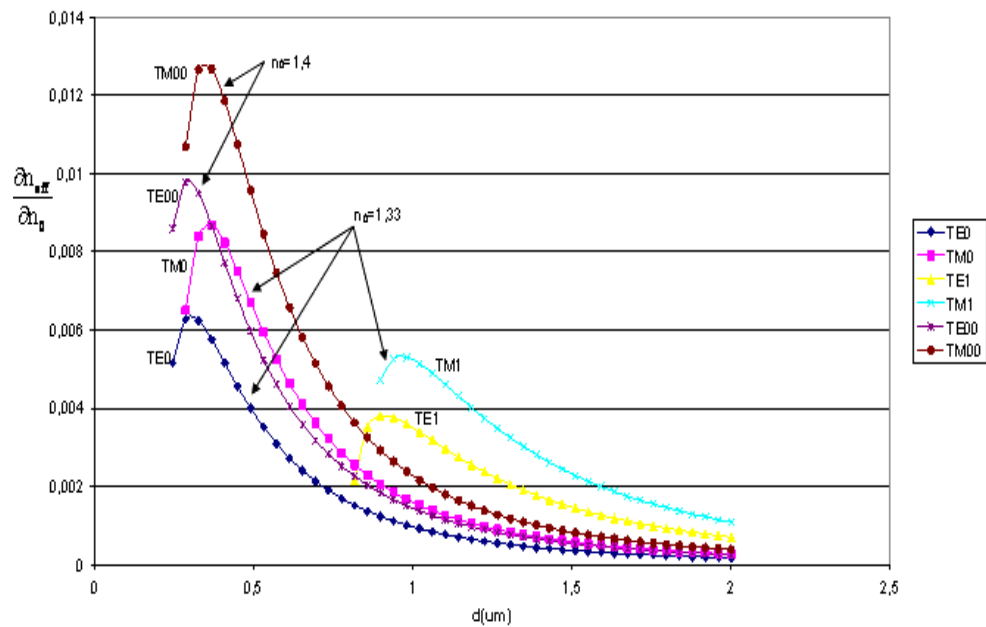


Abbildung 13: Theoretische Sensitivität eines Wellenleiters bezüglich einer Adlayeränderung im Deckmedium gegen Wellenleiterdicke (simuliert mit Excel). Die benutzten Parameter sind: $n_0=1.00$, $n_1=1.6$, $n_2=1.51$, $n_{ad}=1.4$ bzw. 1.33 , $d_{ad}=50 \text{ nm}$ an $\lambda=633 \text{ nm}$.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.8 Theoretische Grundlagen der Oberflächenplasmonen

Fällt TM-polarisiertes Licht unter den Bedingungen der totalen Reflexion auf ein Prisma, dessen Unterseite mit einem dünnen Metallfilm beschichtet ist, kann das Phänomen der Oberflächenplasmonen beobachtet werden.

Totalreflexion tritt auf, wenn eine Lichtwelle auf ein Prisma mit einem Winkel, der größer als der kritische Winkel ist, trifft. In diesem Fall wird das gesamte eingestrahlte Licht reflektiert. Obwohl bei diesem Fall keine Energie transmittiert wird, dringt das elektrische Feld, das sogenannte evaneszente Feld, in das optisch dünnere Medium hinein [17].

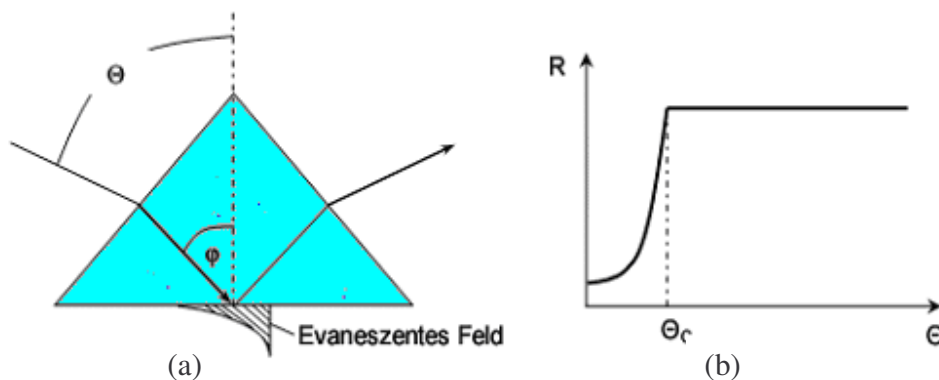


Abbildung 14: (a) Schematische Darstellung der Totalreflexion des sich ausbildenden evaneszenten Feldes. (b) Reflektivität in Abhängigkeit vom Einstrahlwinkel.

Wird auf der Unterseite des Prismas ein dünner Metallfilm (ca. 50 nm dicke Goldschicht) aufgebracht, so wechselwirkt oberhalb der Totalreflexionskante das evaneszente Feld mit dem freien Elektronengas im Metall. Bei einem bestimmten Winkel koppeln Photonen des evaneszenten Felds mit den Elektronen und regen ein Plasmon an. In der Reflexionskurve tritt daher beim Kopplungswinkel ein Minimum auf, bei dem die gesamte Energie der Photonen auf die Metallelektronen übertragen wird [17].

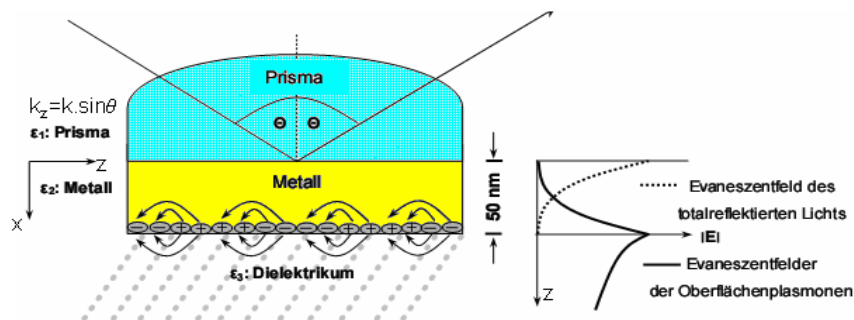


Abbildung 15: Anregung von Oberflächenplasmonen der Kretschmann Konfiguration.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

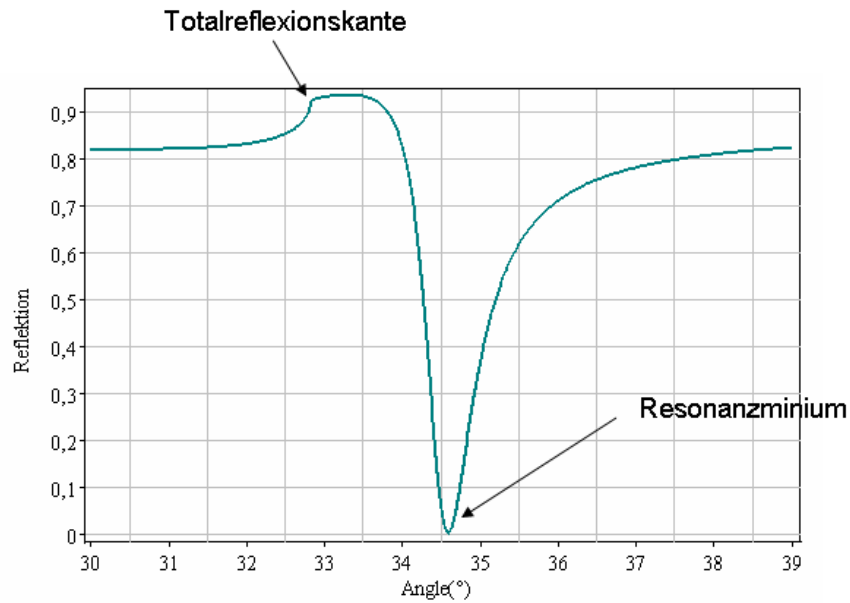


Abbildung 16: Reflektivität in Abhängigkeit vom Einfallswinkel bei Anregung von Oberflächenplasmonen. Schichtsystem $\epsilon(\text{substrat})=2.24$, $\epsilon(\text{Gold})=1.33-j12.34$, $\epsilon(\text{Luft})=1$.

Da die Amplitude eines elektromagnetischen Feldes, das von den Plasmonschnwingungen erzeugt wird, exponentiell mit dem Abstand zur Grenzfläche abfällt, wird es ebenfalls als Evaneszentfeld bezeichnet. Bei der Anregung von Oberflächenplasmonen durch Licht müssen Impuls- und Energieerhaltung gelten, also müssen sich die Dispersionskurven von anregendem Licht und Plasmonen schneiden, damit Photonen und Plasmonen mit gleicher Energie und gleichem Impuls existieren können.

Für die Ausbreitung von Licht in einem Medium (in diesem Fall das Prisma) mit der dielektrischen Funktion ϵ_1 gilt nach Maxwellgleichungen:

$$\omega = k \cdot c \cdot \sqrt{\frac{1}{\epsilon_1}} \rightarrow k = \frac{\omega}{c} \cdot \sqrt{\epsilon_1} \quad (2.33)$$

Mit dem Betrag des Wellenvektors k_z in Ausbreitungsrichtung der Oberflächenplasmonen z und dem Einstrahlwinkel θ gilt:

$$\omega = \frac{k_z \cdot c}{\sin \theta} \cdot \sqrt{\frac{1}{\epsilon_1}} \rightarrow k_z = \frac{\omega}{c} \cdot \sqrt{\epsilon_1} \cdot \sin \theta \quad (2.34)$$

Verbunden mit den Oberflächenplasmonen sind zwei Evaneszentfelder, die von den Grenzflächen entlang der z -Achsen. Die dielektrische Funktion ϵ_3 des Prismas und der Realteil der dielektrischen Funktion des Metalls $\epsilon_{2,\text{re}}$ gehen in die Dispersionsrelation des Oberflächenplasmons ein.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

$$\omega = k_x \cdot c \cdot \sqrt{\frac{1}{\epsilon_3} + \frac{1}{\epsilon_{2, \text{re}}}} \rightarrow k_x = \frac{\omega}{c} \cdot \sqrt{\frac{\epsilon_1 \cdot \epsilon_3}{\epsilon_{2, \text{re}} + \epsilon_3}} \quad (2.35)$$

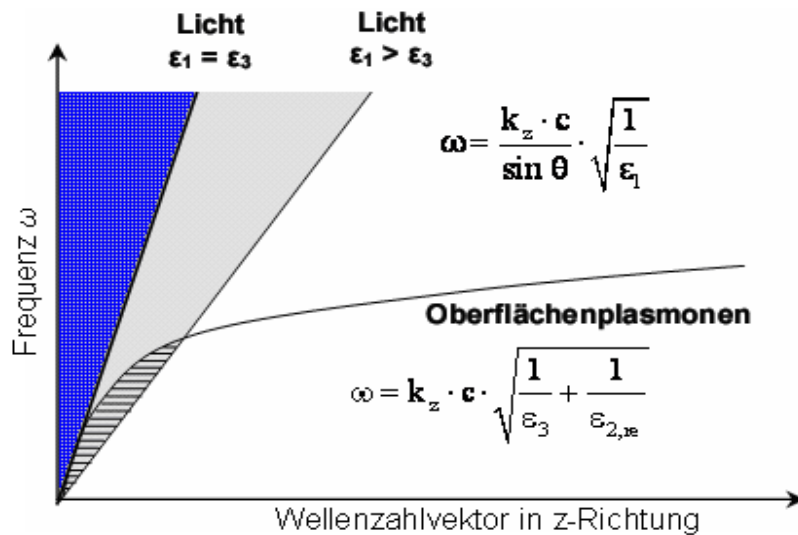


Abbildung 17: Dispersionsrelationen von Licht im Prisma und von Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche Metall-Dielektrikum.

Um die Notwendigkeit der Verwendung eines hochbrechenden Prismas zu erklären, werden zwei Fälle betrachtet:

1 Fall: $\epsilon_1 \leq \epsilon_3$

In diesem ist die Steigung der Dispersionskurve der Oberflächenplasmonen für jeden Einfallswinkel kleiner als die des Lichtes. Die Lichtgerade und die Oberflächendispersionskurve schneiden sich nicht (Abb.17).

2 Fall: $\epsilon_1 > \epsilon_3$

Hier schneiden sich die Dispersionskurven innerhalb des schraffierten Bereiches von Abbildung 17 je nach Einfallswinkel und ϵ_1 . Bei genügend großem Betrag des Realteils der Dielektrizitätskonstanten des Metalls $\epsilon_{2, \text{re}}$ ist eine Anregung der Oberflächenplasmonen und möglich.

Da der Wellenzahlvektor des Lichtes im Umgebungsmedium gering ist, ist eine direkte Anregung beim Einstrahlen durch das Umgebungsmedium nicht möglich. Damit ist die Notwendigkeit der Verwendung des hochbrechenden Prismas gegeben.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.9 Fluoreszenzlicht

Der Begriff Lumineszenz umfasst alle Phänomene, die mit der Aussendung von Licht elektronisch angeregter Moleküle und Atome zu tun haben. Bei der Photolumineszenz erfolgt die elektronische Anregung eines Moleküls vom Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_1 durch Absorption eines Photons.[18] Die aufgenommene Energie wird durch unterschiedliche Prozesse wieder abgegeben, wie es in Abbildung 19 dargestellt ist. Die Fluoreszenz und andere Elektronenübergänge werden gewöhnlich im *Perrin-Jablonski*-Diagramm skizziert. Die Fluoreszenz findet spontan statt und in einem Zeitraum von 10^{-9} s. Es handelt sich um einen spinerhaltende Übergang vom angeregten Singulettzustand S_1 in den Singulettzustand S_0 . Neben der Fluoreszenz wird ein strahlungslos Übergang durch interne Konversion (IC) stattfinden, der eine Zerfallszeit von etwa 10^{-14} s hat. Zum Anderen kann

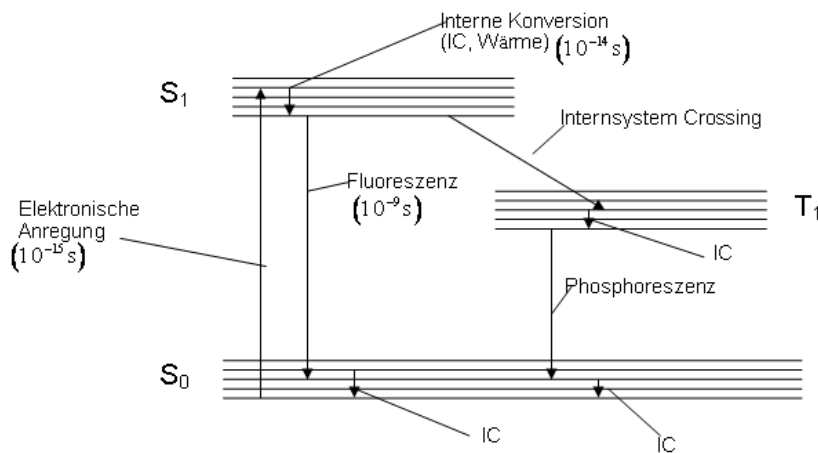


Abbildung 18: Thermisches Schema eines Moleküls.

ein Übergang vom S_1 -Zustand in den Triplettzustand- T_1 erfolgen (*Inter-System-Crossing*). Dies ist auch ein strahlungsloser Prozess zwischen zwei elektronischen Zuständen, aber mit unterschiedlicher Multiplizität. Ein Elektron kann vom Triplettzustand T_1 entweder strahlend durch Phosphoreszenz oder nicht strahlend durch Inter-System-Crossing in den Grundzustand S_0 relaxieren [19]. Die Fluoreszenzphotonen haben eine größere Wellenlänge als das absorbierte Licht (Abb. 20). Die Wellenzahldifferenz des Absorptions- und des Fluoreszenzmaximums wird als *Stokes Shift* bezeichnet.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

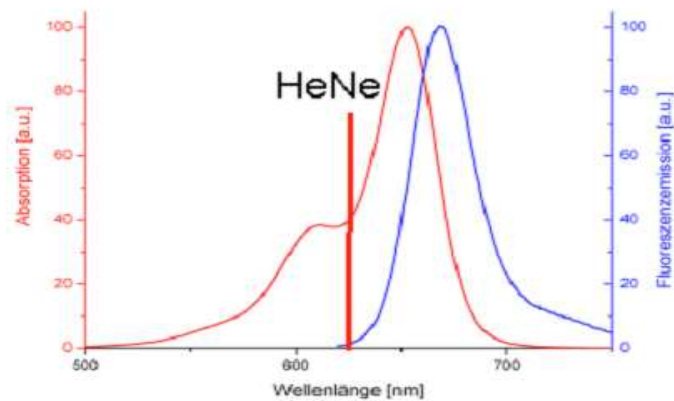


Abbildung 19: Stokesverschiebung der Absorption und Emission des Chromophore Alexa Fluor® 647 cadaverine.

2.9.1 Quantenausbeute der Fluoreszenz

Die Quantenausbeute Φ ist eine physikalische Größe und wird verwendet um Fluoreszenzsignale zu quantifizieren. Sie ist definiert als das Umkehrverhältnis der Anzahl von absorbierten Photonen n_a zu emittierten Photonen n_e [19].

$$\Phi = \frac{n_e}{n_a} \quad (2.36)$$

Die Quantenausbeute hängt vom absorbierenden Medium ab und beschreibt die Umwandlungseffizienz. Ein guter Farbstoff zeichnet sich durch eine möglichst hohe Effizienz bei der Umwandlung von Anregungsphotonen in Emissionsphotonen aus. Eine Substanz, die nicht fluoresziert, hat die Fluoreszenzquantenausbeute Null.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.10 Thermo-responsive Hydrogele

Stimuliresponsive Hydrogele sind Polymere, die auf eine geringe chemische oder physikalische Änderung mit einer relativ großen und scharfen chemischen oder physikalischen Eigenschaftsänderung reagieren (Abb. 20) [20].

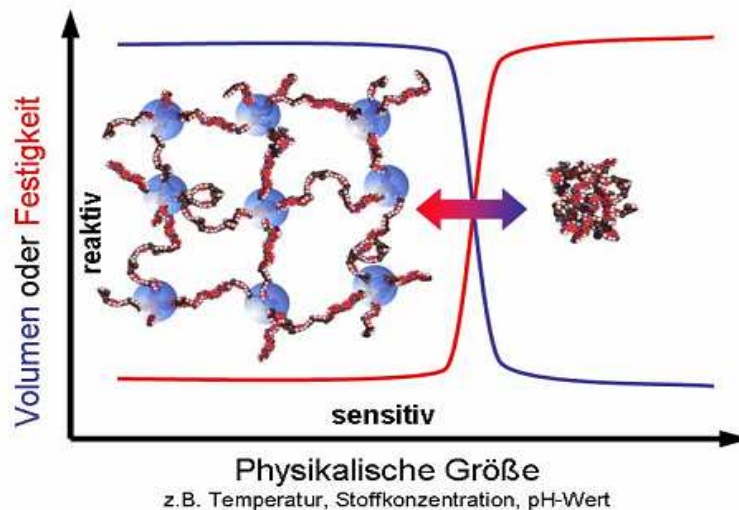


Abbildung 20: Die Änderung des Volumens und der Festigkeit eines Hydrogels bei Änderung der äußeren Einflussgröße, wie z.B. Temperatur, Stoffkonzentration oder pH-Wert [20].

Poly(N-Isopropylacrylamid) (Poly(NIPAAm)) Hydrogele sind polymere Netzwerke, die in Wasser quellen, sich aber nicht auflösen. Die Eigenschaften von solchen Gelen sind abhängig von der Wechselwirkung zwischen Netzwerk und umgebender Flüssigkeit [21]. Die Fähigkeit von diesen Hydrogelen Wasser aufzunehmen ist auf hydrophile Gruppen in der Polymerkette abzuleiten. Poly(NIPAAm) ist eines der am besten untersuchten Polymere, welches in Wasser einen scharfen Phasenübergangstemperatur (T_G) zeigt. Bei Temperaturen unterhalb der Phasenübergangstemperatur ist das Polymer hydrophil, nimmt daher große Mengen an Wasser auf. Beim Überschreiten dieser Temperatur wird das Poly(NIPAAm) hydrophob, d.h. es kollabiert. Der Phasenübergangstemperatur bestimmt den Übergang vom hydrophil nach hydrophob. Diese Eigenschaft wird als „smart“ oder „intelligent“ bezeichnet. Alle diese Übergänge im Polymersystem sind reversibel [22].

2.11.1 Vernetzungsreaktion und Oberflächenanbindung

Die Vernetzung ist in der Polymerchemie ein vielgenutztes Mittel, um Polymere mit verbesserten Materialeigenschaften zu realisieren. Man unterscheidet zwei Arten von Vernetzung [22]. Es gibt chemische und physikalische Vernetzung. Bei physikalisch vernetzten Polymeren sind die Polymer-

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

ketten durch physikalische Bindungen aneinander gebunden. Da physikalische Netzwerke nur eine geringe Stabilität besitzen, sind sie für die meisten Anwendungen nicht so wichtig. Bei chemisch vernetzten Polymeren findet die Vernetzung der Ketten über kovalente Bindungen statt. Es gibt verschiedene Methoden der chemischen Vernetzung. Mit Hilfe von bestimmten Monomeren (Netzwerkbildnern) können Hydrogele direkt aus der Monomerlösung polymerisiert und vernetzt werden. Bei speziell modifizierten Polymeren (UV-aktive Gruppen) kann die Vernetzung photochemisch durch UV-Strahlung geschehen. Das erfolgt durch freie radikalische Vernetzungspolymerisation. In dieser Arbeit wurde ein bifunktionelles Co-Monomer (4-Methacryloyloxybenzophenon, MABP) in die Polymerisation eingebracht, welches als Vernetzer für die Polymerketten dient.

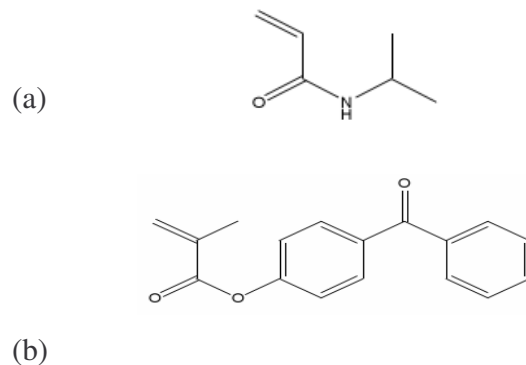


Abbildung 21: (a) Monomer N-Isopropylacrylamid. (b) Monomer 4-Methacryloyloxybenzophenon

Eine Vernetzung durch Bestrahlung mit UV-Licht bietet eine Vielzahl von Vorteilen, wie z.B. die Möglichkeit der Herstellung sehr definierter Polymerfilme auf Oberflächen, die durch selektive Bestrahlung gezielt strukturiert werden können. Der MABP Co-Monomer ist ein Photovernetzer und basiert auf Benzophenoneinheiten.

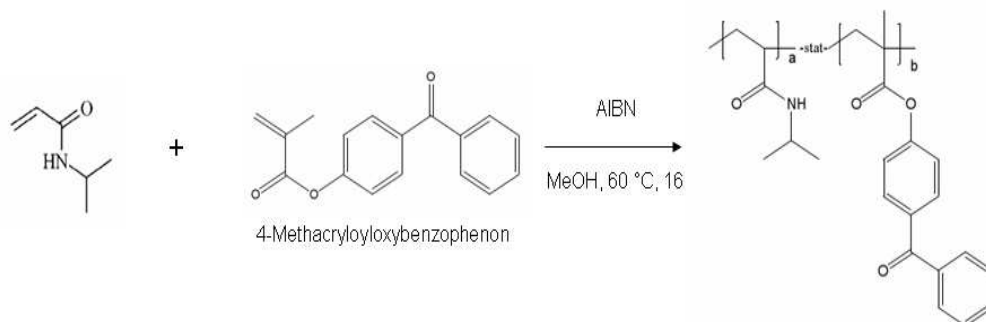


Abbildung 22: Allgemeine Reaktionsgleichung für die Polymerisationen.

Durch Anregung mit einer Wellenlänge von $\lambda=365$ nm wird das Benzophenon in den ersten angeregten Zustand S_1 aus dem Grundzustand S_0 angeregt. Vom

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

angeregten Singulettzustand S_1 findet interkombination (intersystemcrossing) zum Triplettzustand T_2 statt. Danach kehren die Elektronen in den Triplettzustand T_1 zurück, wo sich unter konstanter Bestrahlung eine stationäre Konzentration an Biradikalen aufbaut (Abb. 23).

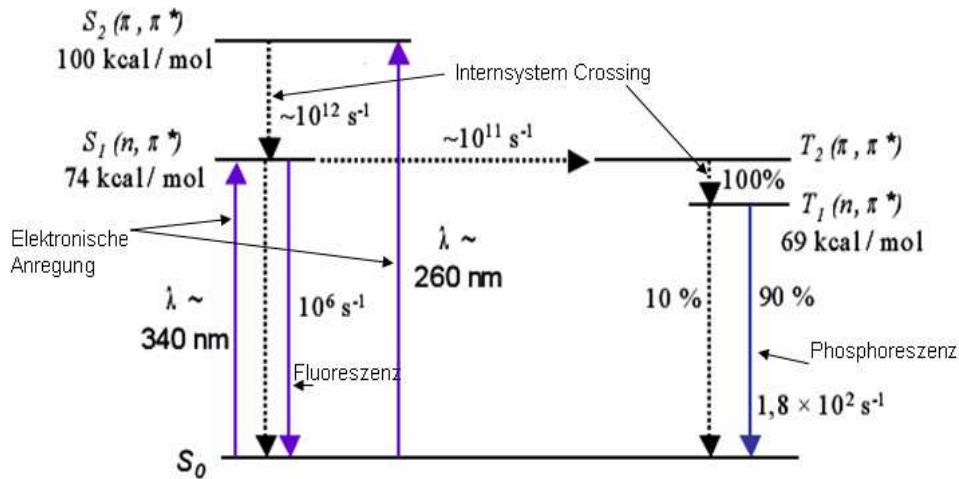


Abbildung 23: Jablonski-Diagramm des Benzophenones [22].

In Anwesenheit von aliphatischen CH-Gruppen kann das entstehende Biradikal ein Wasserstoffatom abstrahieren und wird zu einem Ketylradikal. Beide zurückbleibenden Kohlenstoffradikale rekombinieren, was zu einer Vernetzung des Polymerfilms führt. (Abb.24).

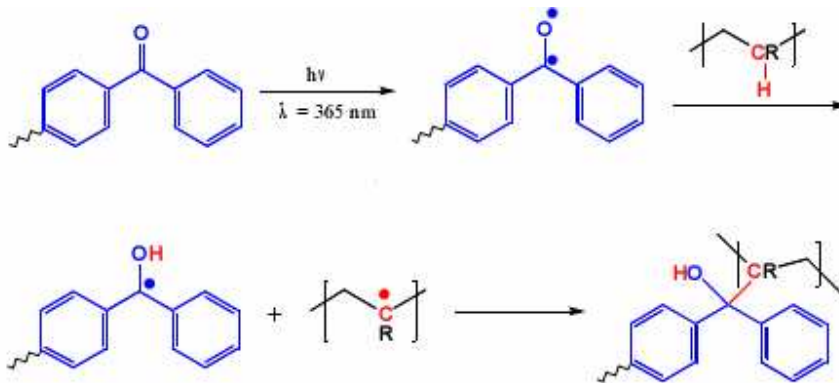


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Kopplung von Benzophenon an Verbindungen mit CH-Gruppen [22].

Da der Polymerfilm auf einen Polystyrol-Wellenleiter, der ein CH-Gruppe besitzt, aufgebracht werden soll, kann diese Reaktion auch zwischen einem Benzophenon, welches an eine Polymerkette gebunden ist, und einer CH-Gruppe des Polystyrols stattfinden. Die Reaktion führt dann zu einem oberflächengebundenen Polymernetzwerk.

3 TECHNOLOGIEN UND MESSVERFAHREN

Die in dieser Arbeit verwendeten Technologien und Messverfahren sollen in diesem Kapitel diskutiert werden. Alle Prozesse wurden in der Flowbox durchgeführt, um die Verschmutzung des Sensors zwischen den einzelnen Prozessschritten zu vermindern.

3.1 Schichtpräparation für WaMS-Messung

3.1.1 Reinigung des Substrates

Als Substrat wurden BK7 und LaSFN9 Gläser mit einer Abmessung von 76 mm x 26 mm x 1,5mm verwendet und PMMA-Substrate, die eine Größe von 25 mm x 25 mm haben. Um die Glassubstrate gründlich zu reinigen wird dabei folgende Prozedur verwendet:

- Mechanische Reinigung mittels Schwamm und handelsüblichem Spülmittel
- 15 Minuten Ultraschallbad in Hellmanex (Glasreiniger von der Firma Hellma)
- Gründliches Spülen mit Reinstwasser
- 10 Minuten abspülen in Ethanol
- Trockenblasen mit Stickstoff

Für die PMMA-Substrate reicht es aus, diese mit Ethanol abzuspolen und mit einem optischen Tuch abzuwischen.

3.1.2 Filmpräparation von Polystyrol (PS)

Es wurden verschiedene Polystyrolösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt. Für alle Lösungen wurde Polystyrolgranulat mit einem Molekulargewicht von 280.000 g/mol und Toluol als Lösungsmittel verwendet Tabelle 1. Auf einer Feinwaage wurden Polystyrolgranulat und Toluol eingewogen und mit einem Magnetrührer 40 min lang gerührt. Um die ungelösten Reste zu entfernen wurde über einen Spritzenfilter mit 0,2 µm filtriert.

Tabelle 1: Verwendete Polystyrolösungen

Probe	PS IV	PSV
Schichtdicke	für 500 nm	für 1000nm
Polystyrol	0,7063 g	1,0965 g
Toluol	9,9906 g	8,9102 g
Summe	10,6969 g	10,0065 g
Gew. %	6,6 %	10,96%

3 TECHNOLOGIEN UND MESSVERFAHREN

Tabelle 2: Eigenschaften des verwendeten Lösungsmittels.

Lösungsmittel	M [g/mol]	ρ [g/cm ³]	T _s [°C]	η_{sv} [10^{-3} N·s/m ²]	δ [J ^{1/2} /cm ^{3/2}]
Toluol	92.13	0.867	111	0.55	18.2-18.3

M: Molekulargewicht, ρ : Dichte bei 20°C, T_s: Siedpunkt, η_{sv} : Viskosität bei 20°C, δ : Löslichkeitsparameter.

Beim Spin-Coating (Schleuder-Beschichten) wird der zu beschichtende Träger auf einem Drehteller fixiert. Auf den Träger wird Polystyrollösung aufgebracht, die sich durch Drehen des Tellers gleichmäßig verteilt (Abb. 25).

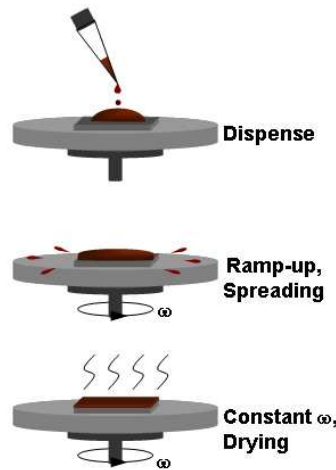


Abbildung 25: Experimenteller Aufbau der Schleuderbeschichtung.

Wenn das Lösemittel verdunstet, bildet sich ein fester Film. Durch die gezielte Wahl von Molekulargewicht, Lösungskonzentration, Rotationsgeschwindigkeit und -dauer lassen sich unterschiedlich dicke Schichten herstellen. Spin-Coating eignet sich für die Herstellung von Filmen sehr geringer bis mittlerer Dicke (~ 3 nm bis ~ 30 μ m). Wenn die Lösungskonzentration zu hoch ist, ist eine gleichmäßige Verteilung der Lösung auf dem Substrat nicht mehr möglich. Nach dem Spin-Coating Prozess wird die Proben für 20min bei Raum-temperaturen im Vakuum getrocknet, um vorhandene Lösemittelreste zu entfernen.

3 TECHNOLOGIEN UND MESSVERFAHREN

3.1.3 Das Stufenprofilometer (α -stepper)

Das Stufenprofilometer der Firma „Tencor“ ist ein Präzisionsmessinstrument, mit dem die Schichtdicke und die Oberflächenrauigkeit von Polymerfilmen gemessen werden kann. Bei diesem mechanischen Messverfahren tastet eine durch Schrittmotoren bewegte Nadel die Probe ab. Diese Nadel ist mit einem kapazitiven Messfühler verbunden, dessen Werte direkt in eine Höheninformation umgerechnet werden.

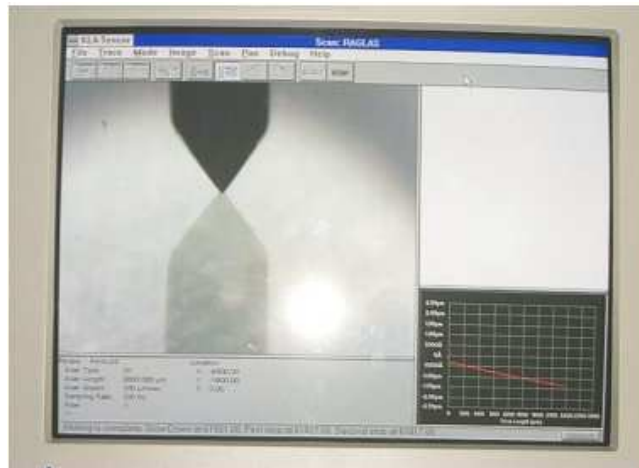


Abbildung 26: Schichtdickenmessung, α -stepper der Firma „Tencor“.

Zur Schichtdickenmessung muss mit einer Nadel ein Kratzer in die Probe gemacht werden. Die Polymerfilme werden bis auf das Substrat eingeritzt, ohne die Substratoberfläche dabei zu beschädigen. Anschließend wird das Stufenprofil aufgenommen. Die Schichtdicken werden an zehn verschiedenen Stellen der Filme gemessen und die mittlere Schichtdicke hieraus bestimmt. Die Standardabweichung liefert die Schichtdickenschwankung.

3.1.4 Das Heißprägen

Beim Heißprägesystem werden mittels Temperatur und Druck Gitter von einer Masterstruktur direkt auf einen Polymerfilm-Sensor übertragen. In dieser Arbeit wird die Prägetechnik auf dem Polystyrol-Wellenleiter angewendet. Als Substrate dienen Glas (BK7) und Polymethylmethacrylat (PMMA). Die Vorteile dieses Verfahrens sind der geringe Zeitaufwand und die Reproduzierbarkeit.

3.1.5 Prägen eines Gitters in Polystyrol-Wellenleiter mit Polymethylmethacrylat (PMMA)-Substraten

Die Glasübergangstemperatur T_G des Polymers Polymethylmethacrylat (PMMA) beträgt 110°C . Seine Strukturformel ist in der Abbildung 27 dargestellt.

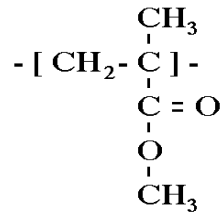


Abbildung 27: Strukturformel von Polymethylmethacrylat.

Das Prägeverfahren wird wie folgt durchgeführt:

Die Oberfläche der Maserstruktur wird zuerst mit Dimetyldichlorsilan DMDS silanisiert, um die Haftung beim Prägen zu vermindern. Die Masterstruktur und die Polymer-Substrate (PMMA) werden mit Ethanol gereinigt. Mittels Spincoaten wird das Polystyrol auf die Substrate gebracht. Die Masterstruktur wird auf einer Heizplatte über die Glasübergangstemperatur erhitzt. Nun wird die Probe in die Prägeapparatur eingelegt und über der Heizplatte fixiert. Wenn die Masterstruktur die Prägetemperatur erreicht hat, wird die Probe mit einer Gewichtskraft von 140 N darauf gepresst. Nach dem Prägen wird die Masterstruktur nicht sofort von der Probe entfernt. Dies geschieht von selbst ca. 10-15s später nach dem Abkühlen.

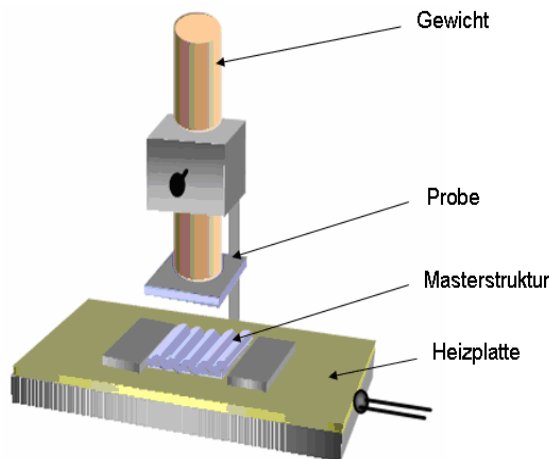


Abbildung 28: Das Präge-Setup.

3 TECHNOLOGIEN UND MESSVERFAHREN

Das Prägen mit PMMA Substraten hat mehrere Vorteile. So muss z.B. nur der Stempel erhitzt werden und es reicht eine kurze Prägezeit aus um eine Struktur in den Wellenleiter zu prägen. Bei dieser Arbeit wird ein Glasmaster mit Gitter als Masterstruktur benutzt. Das Gitter wurde im Institut mittels optischer Holographie auf dem Glasmaster hergestellt. Das Silanisieren der Masterstruktur für das Prägen wird in der Arbeit von Michael Flockert [24] ausführlich beschrieben. Nach mehreren Versuchen wurden die Prägetemperatur und die Prägezeit bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Parameter zum Prägen von Gittern in Polystyrol mit Polymethylmethacrylat-Substraten.

Material	Prägetemperatur (°C)	Prägezeit (s)	Gewichtskraft (N)
Gitter: $\lambda=653\text{nm}$ Amplitude=200nm	160	10	140

Die Temperaturen und Prägezeiten sind materialabhängig. Die Prägetemperatur muss über der Glastemperatur T_G der Polymere liegen. Nach Ablauf der Prägezeit klebt die Masterstruktur nach dem Anheben noch am Substrat fest. Aufgrund der Schwerkraft löst sich beim Abkühlen die Probe von selbst ab. Bei dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass eine Gewichtskraft von 140 N völlig ausreicht um die Struktur zu übertragen.

3.1.6 Prägen von Gittern in Polystyrol mit Glas-Substraten

Das Prägen von Gittern in Polystyrol mit Glas-Substraten erfolgt ähnlich wie bei PMMA-Substraten, der wesentliche Unterschied ist, dass die Masterstruktur und das Substrat beheizt werden müssen. Dafür wurde in diesem Projekt eine neue Heißprägevorrichtung entwickelt (Abb. 29).

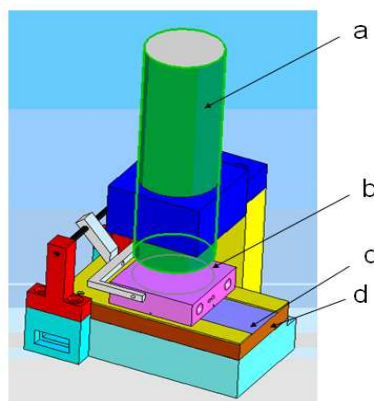


Abbildung 29: CAD Modell der neuen Prägevorrichtung. a) Gewicht b) Masterstruktur c) Prägeprobe d) Heißplatte .

3 TECHNOLOGIEN UND MESSVERFAHREN

Es wurden verschiedene Prägetemperaturen und Prägezeiten getestet, um das Gitter in den Wellenleiter mit Glas-Substrat optimal aufzubringen. Die besten Prägeergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Die zusammengefassten Ergebnisse zum Prägen von Gittern mit Glas-Masterstruktur mit $g = 563\text{nm}$ in Polystyrol-Wellenleiter mit Glas-Substrat.

Material	Prägetemperatur (°C)	Prägezeit (min)	Gewichtskraft (N)
Gitter: $g=653\text{nm}$ Amplitude= 200nm	220	4	140

3.1.7 Gittercharakterisierungen

Die Charakterisierung der geprägten Gitter erfolgt mit Hilfe von Rasterkraftmikroskopie (AFM) und Beugungsreflex-Verfahren. Die AFM Bilder der Masterstruktur und der Probe wurden am Max-Planck-Institut für Polymerforschung aufgenommen. Das Gitter wurde im Institut holographisch hergestellt. Aus solchen Aufnahmen kann man die Qualität des geprägten Gitters sehen und mit Masterstruktur vergleichen.

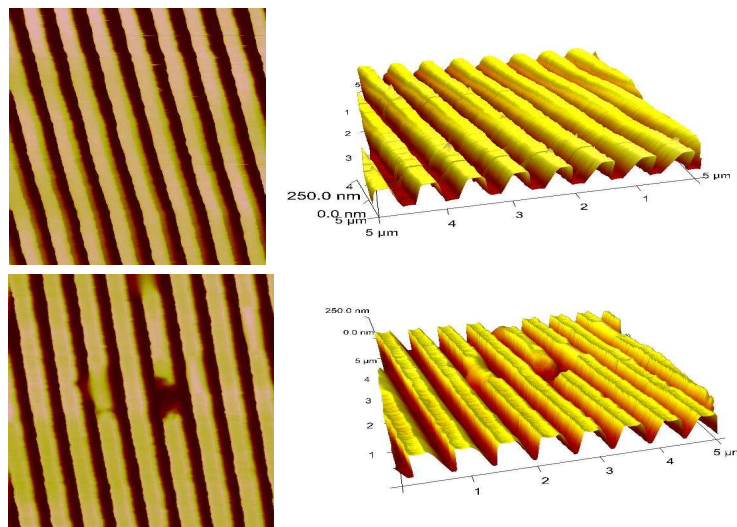


Abbildung 30: AFM Bilder des Gitters. (a) Masterstruktur, (b) Probe mit Polymethylmethacrylat-Substraten.

Abbildungen 30 zeigen, dass das Prägeverfahren realisierbar ist. Durch das Prägen wurde das Gitter der Masterstruktur auf den Wellenleiter mit demselben Profil übertragen. Die Amplitude beträgt ungefähr 200 nm.

3 TECHNOLOGIEN UND MESSVERFAHREN

Die Gitterkonstante kann man aus den AFM Bildern prinzipiell bestimmen. Dies geschieht im Wesentlichen über das Beugungsreflex-Verfahren. Fällt ein Laser-Strahl auf einen Wellenleiter mit Gitter, welches auf einem Goniometer befestigt ist, werden dabei die reflektierten Strahlen unter einen bestimmten Winkel an den Strukturebenen konstruktiv interferieren.

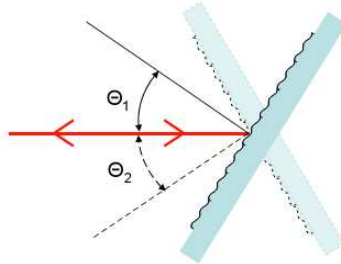


Abbildung 28: Gitterkonstanten-Bestimmung über das Beugungsreflex-Verfahren.

Bestimmt man diesen Winkel in beide Drehrichtungen, kann man aus der Gleichung (4.37a) die Gitterkonstante g bestimmen:

$$g = \frac{\lambda_{\text{HeNe}}}{2 \sin \Delta\theta} \quad (4.37a)$$

mit

$$\Delta\theta = \frac{\theta_1 - \theta_2}{2} \quad (4.37b)$$

In unserem Fall wurden folgende Winkel ermittelt: $\theta_1=34,68^\circ$, $\theta_2=-33,78$
Dies ergibt folgende Gitterkonstante: $g=563\text{nm}$. $\Delta g=\pm 0,3\text{nm}$.

3.1.8 Beschichtung des Wellenleiter-Sensors

Die Hydrogelschicht wird durch Spin-Coating auf den hergestellten Wellenleiter-Sensor aufgetragen. Auch hier kann man die Schichtdicke über Gewichtskonzentration des Polymers, verwendetem Lösemittel, Rotationsgeschwindigkeit und Zeit einstellen. Nach dem Spin-Coating werden die Proben für 20 min im Vakuum getrocknet. Anschließend werden die Proben im Crosslinker für eine Stunde mit einer Wellenlänge von $\lambda = 365 \text{ nm}$ bestrahlt. Eine schematische Darstellung der Schichtpräparation ist in Abbildung 31 dargestellt.

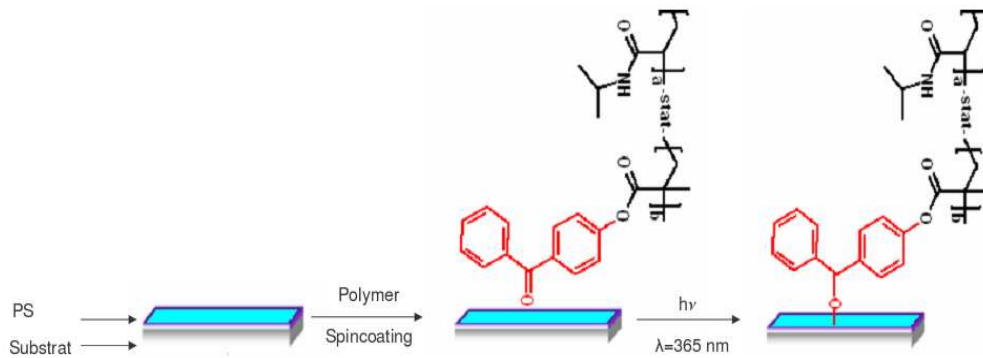


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Oberflächenanbindungen des Hydrogels.

3.2 Schichtpräparation für SPR-Messung

Zunächst werden auf gereinigte LaSFN9-Substrate ($n = 1,845$) mit einer Hochvakuumbedampfungsanlage (Firma Edwards, Modell Auto 306) eine Chromschicht, Dicke $d_{\text{Chrom}} = 2 \text{ nm}$, und eine Goldschicht, Dicke $d_{\text{Gold}} = 50 \text{ nm}$, aufgedampft. Dann wird mittels Spin-Coating eine Polystyrolschicht der Konzentration 5 mg/ml auf die Goldschicht aufgetragen. Mit dieser Konzentration und bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 3000 U/s erzeugt man eine Schichtdicke im Bereich von ca. 30 nm , die in diesem Fall nicht als Wellenleiter dient, sondern als Haftvermittler des Polymerfilms. Danach werden die Polymerfilme durch Aufschleudern der Lösung hergestellt und für 20 min im Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet, um vorhandene Lösemittelreste zu entfernen. Die Anbindung der Polymerketten an die Oberfläche sowie das Vernetzen wurden mit einem UV Strataliner 2400 der Firma Stratagene mit 75 Watt bei einer Wellenlänge von $\lambda = 365 \text{ nm}$ durchgeführt. Die Bestrahlungsdauer lag bei einer Stunde, was $6,28 \text{ J/cm}^2$ entspricht.

3.3 Wellenleitermoden – Spektroskopie

Der effektive Brechungsindex einer Mode n_{eff} ist von allen Schichten, in denen die Mode propagiert, abhängig. In einem aus drei Schichten bestehend System besteht kann man den effektiven Brechungsindex der geführten Mode verändern, indem man einen Adlayer aufbringt (Abb. 32). Mit Hilfe von Wellenleitermoden-Spektroskopie kann man das Spektrum geführter Moden messen. Da diese Methode auf der Polarisierbarkeit des Lichts basiert, kann man durch das Messen von zwei geführten Moden (TE- und TM-Mode) den Brechungsindex und die Schichtdicke des Wellenleiters bzw. des Adlayers bestimmen.

3 TECHNOLOGIEN UND MESSVERFAHREN

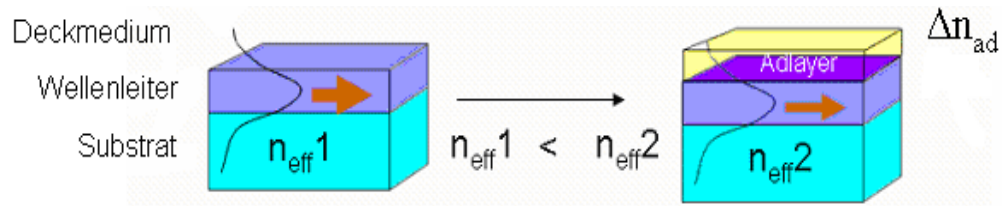


Abbildung 32: Wirkung des Adlayers auf den effektiven Brechungsindex.

Bei der Wellenleitermodenspektroskopie wird nur der Wellenleiterchip mit einem Goniometer von einem Winkel $-\varphi$ bis zum Winkel $+\varphi$ gedreht. Die Anregung der Moden erfolgt durch polarisiertes Laserlicht von einem HeNe-Laser (Firma Uniphase, 5mW, $\lambda=632,8\text{nm}$) mit einem geprägten Gitter. Dabei propagieren die Moden durch das System und bei geringer Streuung koppeln die Moden an den Stirnflächen des Wellenleiters wieder aus, was über Photodioden aufgenommen werden kann. Man kann aus den Koppelwinkeln zweier Moden den Brechungsindex und die Schichtdicke eines isotropen Films bestimmen. Die Polarisationssebene kann man durch die Verwendung eines Fresnel-Rhombus drehen.

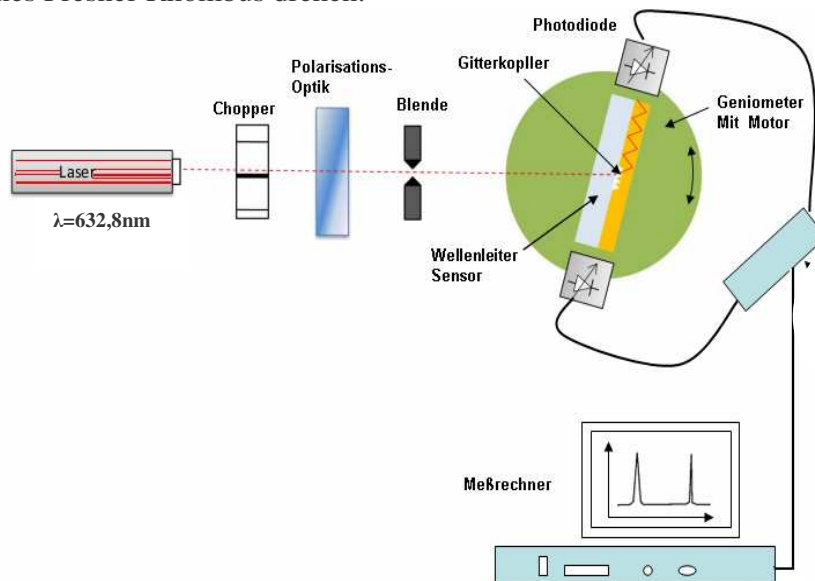


Abbildung 33: Experimenteller Aufbau eines Wellenleitermodenspektrometers.

Wenn das Kopplungsgitter in der Mitte des Sensors liegt, kann man eine Anregung der Moden in beiden Propagationsrichtungen des Wellenleiters realisieren. Da in dieser Arbeit ein Mikroarray auf den Wellenleiter aufgebracht ist, wurde der Kopplungsgitter nicht in der Mitte des Wellenleiters geprägt. Das mit der Photodiode detektierte Signal wird in einem Lock-in-Verstärker (Firma Signal Recovery, Modell 7265) gemessen.

3 TECHNOLOGIEN UND MESSVERFAHREN

Der Lock-in-Verstärker vergleicht die Frequenz mit der Chopperfrequenz und das Licht, das nicht mit dieser Frequenz moduliert ist, wird herausgefiltert.

3.4 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR) und Optischen Wellenleiter-Spektroskopie (OWS)

Oberflächenplasmonen sind Schwingungen der quasifreien Elektronen eines Metalls, die an der Grenzfläche zwischen einem Metall und einem Dielektrikum angeregt werden können. Die Anregungsbedingungen hängen stark von den optischen Eigenschaften des Systems ab. Werden nun diese Eigenschaften geändert, führt dies zur Veränderung der Anregungsbedingungen. Man nutzt dieses Messverfahren um eine sensitive Untersuchung von Prozessen nahe der Metalloberfläche zu ermöglichen [17].

Ein typischer Messaufbau für SPR-Messungen in Kretschmann-Konfiguration ist in Abbildung 34 gezeigt.

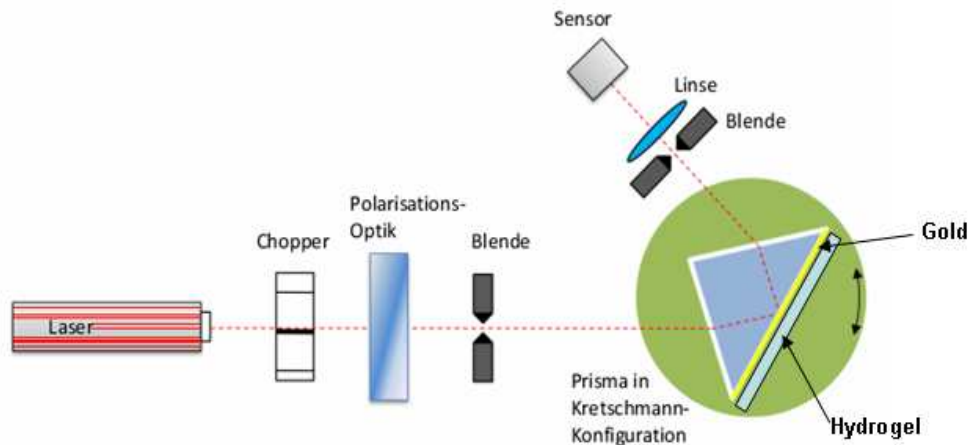


Abbildung 34: Schematische Darstellung eines SPR-Messplatzes in Kretschmann-Konfiguration.

Die zu vermessende Probe wird auf eine Goldschicht von ca. 50 nm Dicke aufgebracht, welche auf einen hochbrechenden Objektträger aus LaSFN9-Glas (Brechungsindex $n=1,8449$) aufgedampft wurde. Das Substrat wird dann an die Basis eines LaSFN9-Glasprismas angedrückt. Durch das Prisma wird monochromatisches Licht eines He/Ne-Lasers mit einer Wellenlänge von 632,8 nm und einer linear, transversalmagnetischen Polarisation eingestrahlt. Detektion der aus dem Prisma reflektierten Lichtintensität mit einer Photodiode und Veränderung des Einfallwinkels θ mit einem Zweikreisgoniometer ergibt winkelabhängige Intensitäten $I(\theta)$.

Ein Nachteil der SPR-Spektroskopie liegt darin, dass man den Brechungsindex und die Schichtdicke einer dünnen Schicht nicht unabhängig voneinander bestimmen kann. Für dickere Proben existiert das Problem nicht, da zusätzlich zu den Oberflächenplasmonen optische Wellenleitermoden angeregt werden können („Optical Waveguide Spectroscopy“ – OWS) [22].

3 TECHNOLOGIEN UND MESSVERFAHREN

In diesem Fall erscheinen zusätzliche Minima in den winkelabhängigen Aufnahmen der reflektierten Intensität. Für jede gemessene Mode kann ein Parameter unabhängig bestimmt werden.

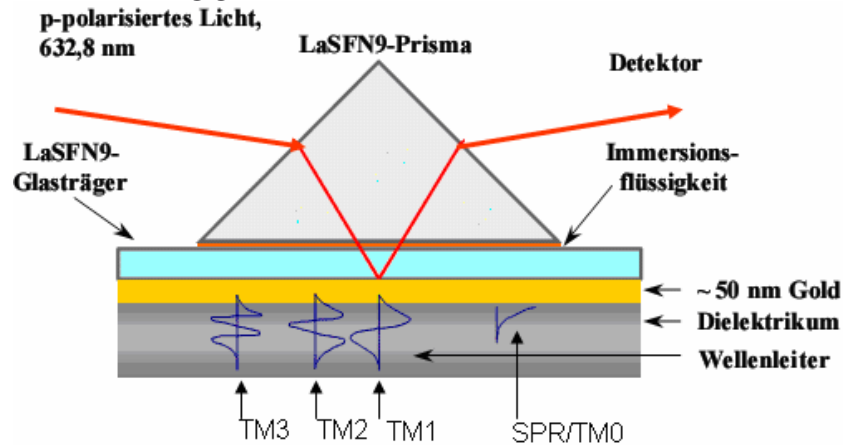


Abbildung 35: Darstellung des SPR/OWS-Messprinzips.

Die Einkopplung sowie die Feldverteilungen der SPR/TM0-, TM1-, TM2-Moden sind in Abbildung 34 dargestellt.

Tabelle 5: Parameter für den in dieser Arbeit eingesetzten Sensor. Das Hydrogel ist in diesem Fall in trockenem Zustand.

Nr.	Material	n	k	d/um
0	---	1.845	0.0	5.0
1	---	3.3	3.1	0.0020
2	---	0.25	3.3	0.05
3	---	1.496	0.0	0.4
4	---	1.0	0.0	5.0

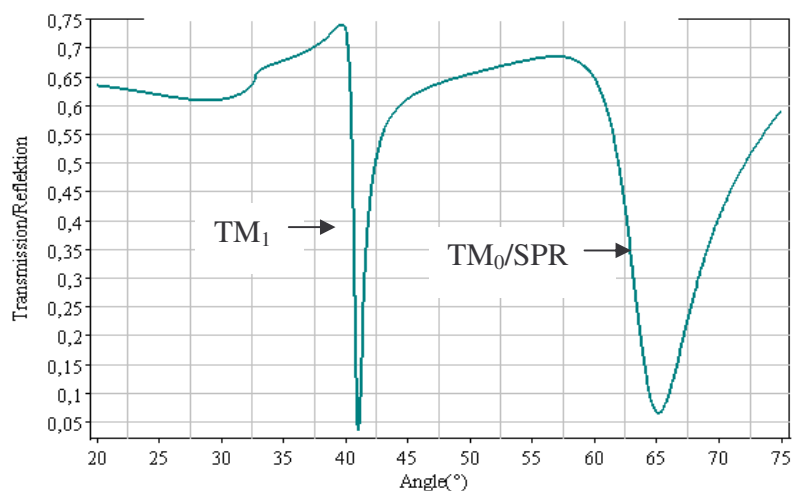


Abbildung 36: SPR/OWS Simulation mit ATSOS des trockenen Hydrogels. Die Schichtsysteme sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

3 TECHNOLOGIEN UND MESSVERFAHREN

Tabelle 6: Parameter für den in dieser Arbeit eingesetzten Sensor. Das Hydrogel ist in diesem Fall in gequollenem Zustand.

Nr.	Material	n	k	d/um
0	---	1.845	0.0	10.0
1	---	3.3	3.1	0.0020
2	---	0.25	3.3	0.05
3	---	1.344	0.0	4.0
4	---	1.33	0.0	10.0

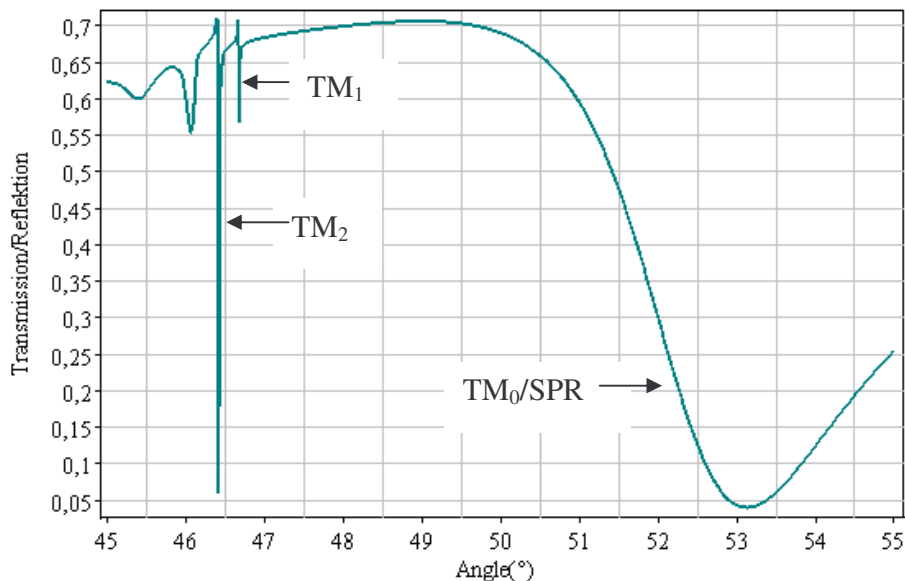


Abbildung 37: SPR/OWS Simulation mit ATSOS des gequollenen Hydrogels. Die Schichtsysteme sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Das Oberflächenplasmon ist nur in einem Bereich von ca. zweihundert Nanometern nahe der Goldoberfläche sensitiv. Die Wellenleitermoden reagieren aber auf Änderungen der optischen Eigenschaften im gesamten Film. Sie sind abhängig von der Schichtdicke und dem Brechungsindex des aufgetragenen Films, was eine detaillierte Charakterisierung dieses Films erlaubt. Die Wellenleitermode der höchsten Modennummer mit dem Reflexionsminimum beim niedrigsten Einfallswinkel reagiert am sensitivsten auf Änderungen der Schichtdicke des Films, wohingegen die Mode des niedrigsten Einfallswinkels, die TM_1 -Mode, am empfindlichsten auf Veränderungen des Brechungsindex im Film reagiert. Man kann diesen Sensitivitätsunterschied mit der Feldverteilungen der Moden im Film erklären. Bei der TM_1 -Mode ist die Feldverteilung in der Mitte der Schicht am höchsten, wohingegen die höheren Moden zunehmend höhere Feldintensitäten an beiden Grenzflächen des Films aufweisen.

3.7 SPR-Imaging

In den vergangenen Jahren hat sich der Schwerpunkt von SPR-Imaging Messungen eindeutig von der Charakterisierung ultradünner Filme hin zur Detektion von Mikroarrays verschoben. So konnten mit dem SPR-Imaging Wechselwirkungen zwischen DNA/DNA, DNA/Protein oder Protein/Protein abgebildet werden [25].

Das SPR-Imaging beruht grundsätzlich ebenfalls auf der Anregung der Oberflächenplasmonen. Der wichtigste Unterschied zur „klassischen“ SPR besteht lediglich in der Detektion mit einem Arraydetektor. Das SPR-Imaging ist eine label-freie Detektionsmethode, die eine hohe Empfindlichkeit besitzt. Das Prinzip des SPR-Imaging ist in Abbildung 35 schematisch dargestellt [25].

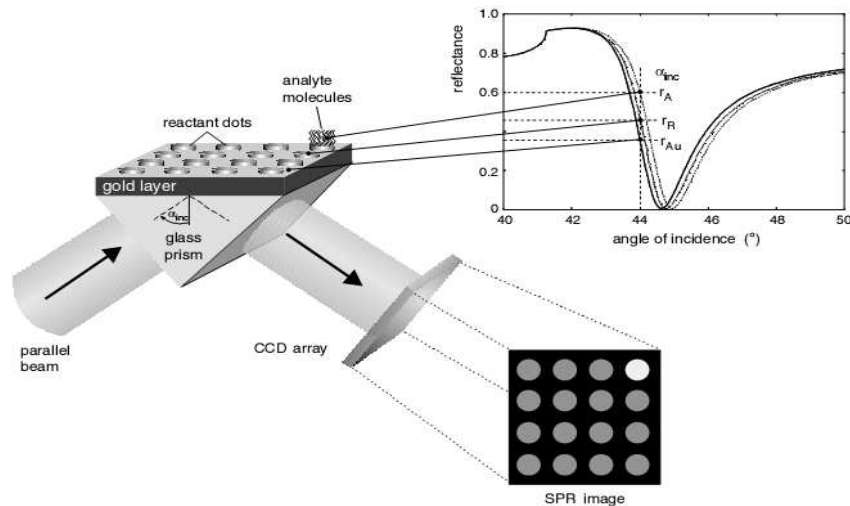


Abbildung 38: Prinzip des SPR-Imaging. Die Probe wird mit einem parallelen und monochromatischen Lichtstrahl unter dem Winkel α beleuchtet. Der CCD-Detektor erfasst die Verteilung der reflektierten Intensität [25].

Das SPR-Imaging in Array-Anwendungen erfolgt über die Verwendung von CCD-Kameras, wobei paralleles monochromatisches Licht unter einem konstanten Winkel α auf ein Prisma eingestrahlt wird und die Intensität des reflektierten Lichts orts aufgelöst mit Hilfe einer CCD-Kamera detektiert wird. Da Einfallswinkel und Wellenlänge konstant sind, führt eine Verschiebung der Plasmonenresonanz zu einer Veränderung der reflektierten Intensität. Da die Grenzflächeneigenschaften direkt den Einflüssen der Umgebung unterliegen, führen Änderungen in Nähe der Metallschicht zu einer Verschiebung der Resonanzfrequenz. Aus der Lage bzw. der Verschiebung der Resonanzfrequenz lassen sich Rückschlüsse auf Adsorptionsprozesse nahe der Metalloberfläche ziehen. Mit dem SPR-Imaging lassen sich Unterschiede im Brechungsindex von weniger als 0,0001 oder Schichtdickenänderungen von rund 1nm flächenaufgelöst abbilden. Damit können Bindungsereignisse

3 TECHNOLOGIEN UND MESSVERFAHREN

zwischen Biomolekülen mit einer lateralen Auflösung von wenigen Mikrometern erfasst werden.

3.8 Optische Wellenleiter-Fluoreszenzspektroskopie (OWFS)

Ein normaler SPR-Aufbau in Kretschmann Konfiguration dient als Basis für die OWFS-Messung. Ein Standardaufbau für dies ist in Abbildung 39 dargestellt.

Das Fluoreszenzlicht, das durch Wellenleiternmoden angeregt wird, wird mit Hilfe einer Linse gebündelt und durch Filter selektiv von einem Photomultiplier detektiert. Der verwendete Filter ist ein Notchfilter (Firma Laser2000, $\lambda = 632,8\text{nm}$, $>OD6$), kombiniert mit einem Bandpassfilter (Firma Andover Coporation, $\lambda = 670\text{ nm}$, $\Delta = 10\text{nm}$, 55% Transmission).

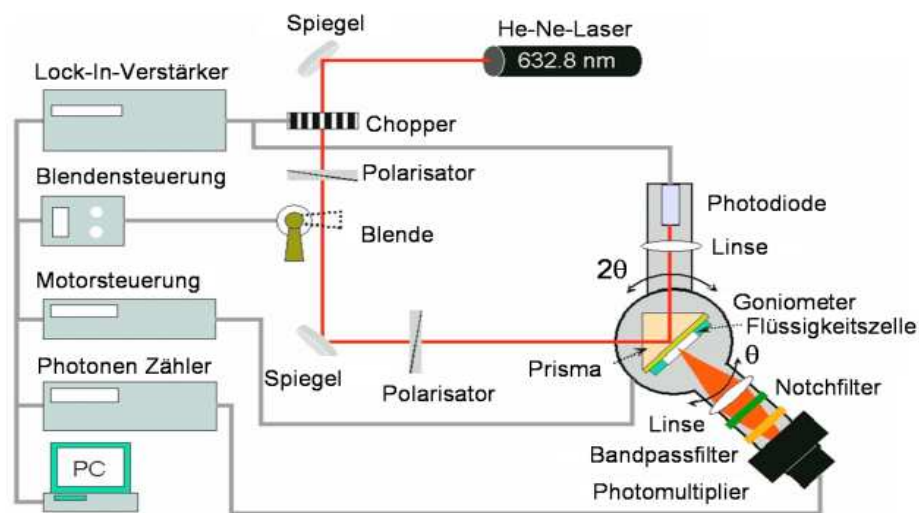


Abbildung 39: Ein typischer Aufbau für OWFS-Messungen [26].

3.9 CCD-Kamera

Die CCD (Charge Coupled Device) Kamertechniken eignen sich sehr gut als Auslesesystem für Mikroarrays. Dabei wird die Fluoreszenzemission von jedem Punkt auf der Chipoberfläche des Arrays erfasst und zu einem Bild zusammengesetzt. Der Emissionsstrahl wird detektiert und Pixel für Pixel wird ein Bild der Fluoreszenzemission aufgebaut. Kamerasysteme ermöglichen die gleichzeitige Aufnahme von größeren Bereichen der Chipoberfläche oder sogar des gesamten Array im Bereich von einigen Quadratmillimetern bis zu einigen Quadratzentimetern [27].

Eine 8 – Bit Kamera bietet hohe Bildwiederholraten, aber die Untersuchungen mit solchen Kameras haben gezeigt, dass das Signal – Rausch – Verhältnis nicht ausreichend ist und die Ortsauflösung von kleinen Messpunkten schlecht

3 TECHNOLOGIEN UND MESSVERFAHREN

ist. Eine gekühlte CCD-Kamera mit 12-16 Bit bietet dagegen ein hohe Sensitivität und Bildwiederholrate im Bereich weniger Sekunden und ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis.

Die Hauptaufgabe des Sensors einer CCD Kamera ist das aufgenommene Bild in verwertbare Signale umzuwandeln. Deshalb bestehen die CCD-Chips aus lichtempfindlichen Elementen, die aus der Beleuchtungsstärke ein elektrisches Signal erzeugen. Dabei handelt es sich um angeordnete Halbleiterelemente, die als Pixel bezeichnet werden. Der Sensor wandelt das einfallende Licht in Ladungsträger um und speichert diese während der Belichtungszeit. Die Sensorelemente werden durch Schieberegister verbunden [27].

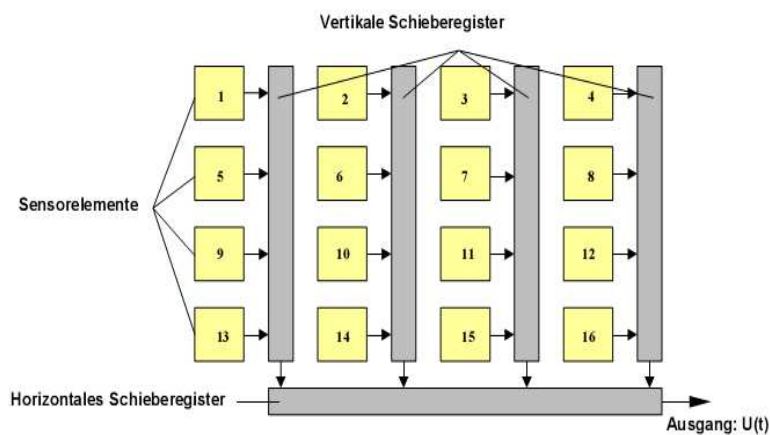


Abbildung 40: Prinzip eines CCD-Sensors . Die entstehenden Ladungen der einzelnen Pixel werden nach der Belichtungszeit zeilenweise erst in das vertikale und dann in das horizontale Schieberegister transportiert und ausgelesen [27].

Die CCD-Chips werden durch die Anzahl der Pixel, die Pixelgröße, die Chipgröße und den Dunkelstrom charakterisiert. Die Anzahl der Sensorelemente bestimmt die Auflösung des Bildes, z. B. 1392 x 1040 Pixel. Die Pixelgröße gibt die tatsächliche Größe eines Elementes, z. B. 6.45 μm x 6.45 μm . Die Größe der lichtempfindlichen Fläche hängt von der Chipgröße ab. Da Elektronen durch thermische Anregung im Sensorelement erzeugt werden können, entsteht ein Signal ohne Lichteinfall, der sogenannte Dunkelstrom, der in das Signal-Rausch-Verhältnis einfließt. Dieses Verhältnis ist bei CCD-Chips geringer im Vergleich zu CMOS-Chips (Complementary Metal Oxide Semiconductor).

Die einfallende Lichtmenge auf ein Kamerapixel wird durch einen Analog-Digital-Wandler digitalisiert und als eine Zahl, dem so genannten Grauwert (Einheit: Counts), in einem Datenregister abgespeichert. Der Grauwert hängt linear von der eingefallenen Lichtmenge ab.

Eine gute Abbildungsqualität ist erforderlich, um Messpunkte von Mikroarrays auflösen zu können. Das gewählte Objektiv sollte eine große nume-

3 TECHNOLOGIEN UND MESSVERFAHREN

rische Apertur besitzen, damit viel Licht von der Fluoreszenzemission detektiert werden kann. Der Abbildungsmaßstab sollte so gewählt werden, dass etwas Spielraum für die Justage von Kamera und Mikroarray bleibt. Ein anderes Kriterium bei der Wahl von Objektiven ist die Lichtstärke, die durch die Blendenzahl festgelegt ist. Mit der Blende kann man die ausgestrahlte Fluoreszenz - Lichtmenge regulieren. Die Blende wird durch die Blendenzahl charakterisiert [27].

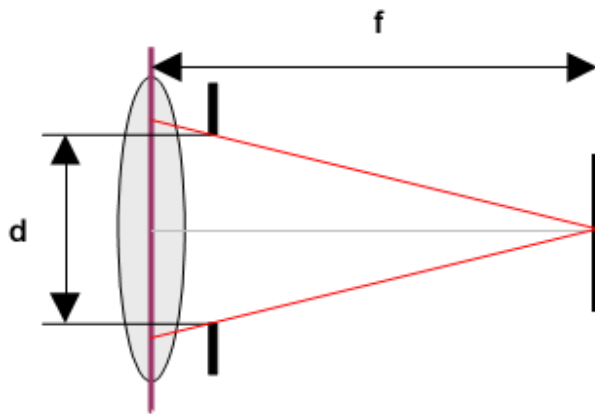


Abbildung 41: Standardobjektiv.

Mit kleiner Blendenzahl können große Lichtmengen eingefangen werden. Bei der Auswahl der Objektivs ist darauf zu achten, dass die Größe des entstehenden Bildes, zum verwendeten Sensorformat passt.

Da auf das Kameraobjektiv verschiedene Fremdlichter auftreffen, muss das Setup mit einer optischen Gehäuseabdichtung geschützt werden. Streulicht vom Substratmaterial tritt als weiteres Störsignal auf. Durch Filter kann das Streulicht und das Anregungslicht effektiver blockiert werden, während die Fluoreszenzemission den Filter mit hoher Transmission passieren kann.

3.10.1 Vergleich zwischen CCD - und CMOS - Kamera

In der Literatur [28] findet man einen Vergleich zwischen CCD - und CMOS - Kameras für Verwendung in einem Mikroarray Biosensor. Unterschiedliche Konzentrationen des fluoreszierenden Farbstoffes Cy5 in Glycerin wurden mit den beiden Detektionssystemen abgebildet. Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde für jedes der beiden Systeme verglichen.

Die benutzte CCD – Kamera hat folgende Daten:

Kodak KAF-1000 CCD-Sensor 24,6 mm x 24,6 mm

Pixelfeld 1024 x 1024

Pixel Abmessung 16 μm x 16 μm / 16 Bit / Peltiergekühlt

3 TECHNOLOGIEN UND MESSVERFAHREN

Die CMOS – Kamera hat folgende Daten:

SV-Micro, sound Vision Inc

Bildbereich 8,64 mm x 10,8 mm

Die fluoreszierende Lösung besteht aus Antikörpern (Kaninchen Anti-SEB, Sigma , 263 ug / ml in Phosphat – Puffer), markiert mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy5 (4:1 Farbstoff / Protein – Verhältnis), gemischt in 100% Glycerin in unterschiedlichen Konzentrationen. In der Abbildung 42 ist der Vergleich zwischen CCD - und CMOS - Kameras auf der Basis von Mikroarrays dargestellt.

a)

b)

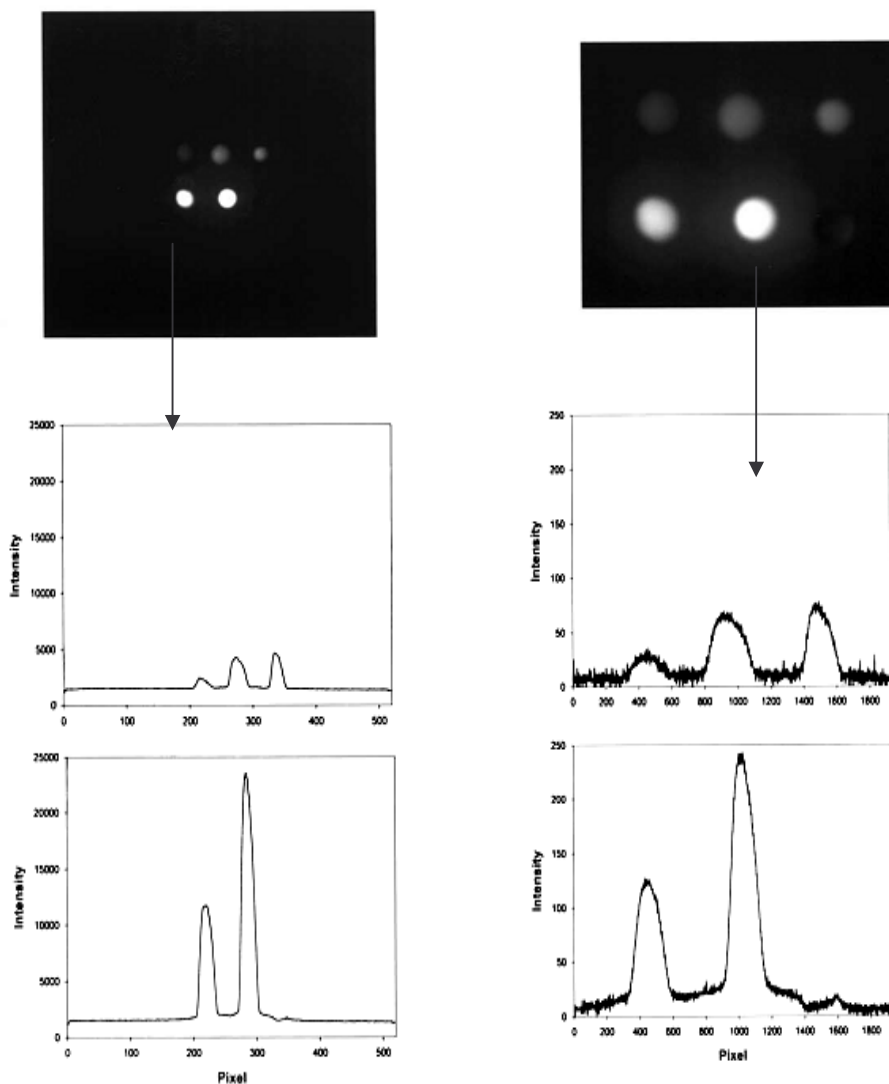


Abbildung 42: Fluoreszenzaufnahmen von sechs verschiedenen Konzentrationen mit der CCD – und CMOS – Kamera. a) CCD – Bilder (0.025s Belichtungszeit), b) CMOS – Bilder (1.5s Belichtungszeit). Die Konzentrationen sind 50, 100 und 200 nM Cy5 (obere Reihe) und 900, 800 und 0 nM (untere Reihe) [30].

3 TECHNOLOGIEN UND MESSVERFAHREN

Da das Rausch-Signal sich mit der Belichtungszeit erhöht, ist dies eine Begrenzung der Empfindlichkeit des Detektionssystems. Trotz der Rausch - Signalprobleme der CMOS war dieses in der Lage, 50nM Cy5 aufzulösen. Aber die CMOS – Kameras haben eine niedrigere Empfindlichkeit als die CCD – Kameras. Die CCD – Kamera hatte ein erheblich besseres Signal-Rausch - Verhältnis als die CMOS – Kamera. Allerdings gibt es Experimente, die keine maximale Sensitivität erfordern, für die der Einsatz von CMOS – Kameras besser wäre, weil die CMOS - Kamera keinen Framegrabber braucht, 10% billiger als die CCD Kamera ist und man in einer Fläche von 8,64 x 10,8 mm das Bild 1:1 aufnehmen kann [28].

4 EXPERIMENTELLER TEIL

4.1 Strukturierung des Hydrogels

Wie bereits in Abschnitt 2.10.1 erwähnt, kann man der Polymerfilm durch eine Maske mit UV-Licht bestrahlen, um ein Struktur zu erzeugen. Mittels Maske werden nur die bestrahlten Teile vernetzt. Nach der Extraktion in Wasser gehen alle unbelichteten Stellen verloren. Diese Methode wurde genutzt um Mikroarrays auf Basis von Hydrogelen herzustellen.

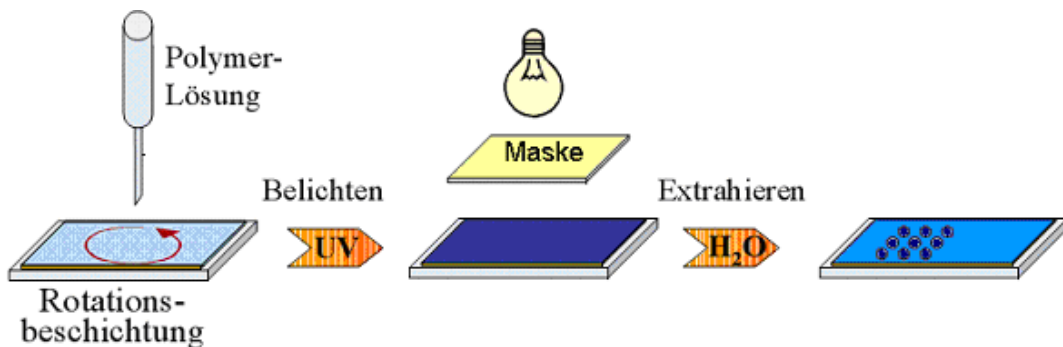


Abbildung 43: Schematische Darstellung der Polymerstrukturierung.

Um zu zeigen, dass die Benzophenon-Polymere für diese Methode geeignet sind, werden erste Tests durchgeführt. Zunächst wird das Polymer mit Hilfe eines Wellenleiters charakterisiert. Der Wellenleiter für WaMS-Messung kann vier Moden (TE₀, TE₁, TM₀, TM₁) führen und dadurch sind zwei Parameter unabhängig bestimmbar (isotroper Brechungsindex und Schichtdicke). Vor der Immobilisierung des Polymerfilms wird eine WaMS-Messung durchgeführt, um die Parameter des Wellenleiters ($d_{\text{Wellenleiter}}$, $n_{\text{Wellenleiter}}$) zu erhalten

Tabelle 7: Parameter des eingesetzten Wellenleitersensors.

Schichtsystem	Dicke(nm)	Brechungsindex
Luft	∞	1
Wellenleiter	1079	1,582
Substrat-PMMA	∞	1,482

4 EXPERIMENTELLER TEIL

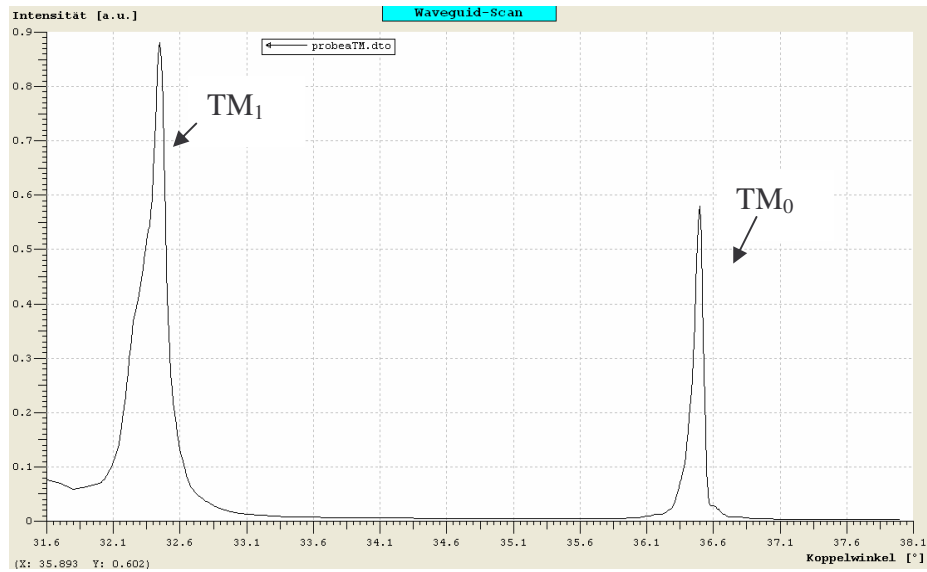


Abbildung 44: Modenspektrum eines Wellenleiters mit den Parametern aus Tabelle 5.

Nach dem Berechnen der effektiven Brechungsindizes mittels Gleichung (2.35) wird die Schichtdicke und der Brechungsindex mit dem Programm Multiwave ermittelt. Das Programm benötigt die Schichtparameter und die effektiven Brechungsindizes der Wellenleitermoden des Sensors. Das Programm errechnet anhand der eingegebenen Daten eine Brechungsindex-Dicken-Abhängigkeit für den Wellenleiter (Abb.45).

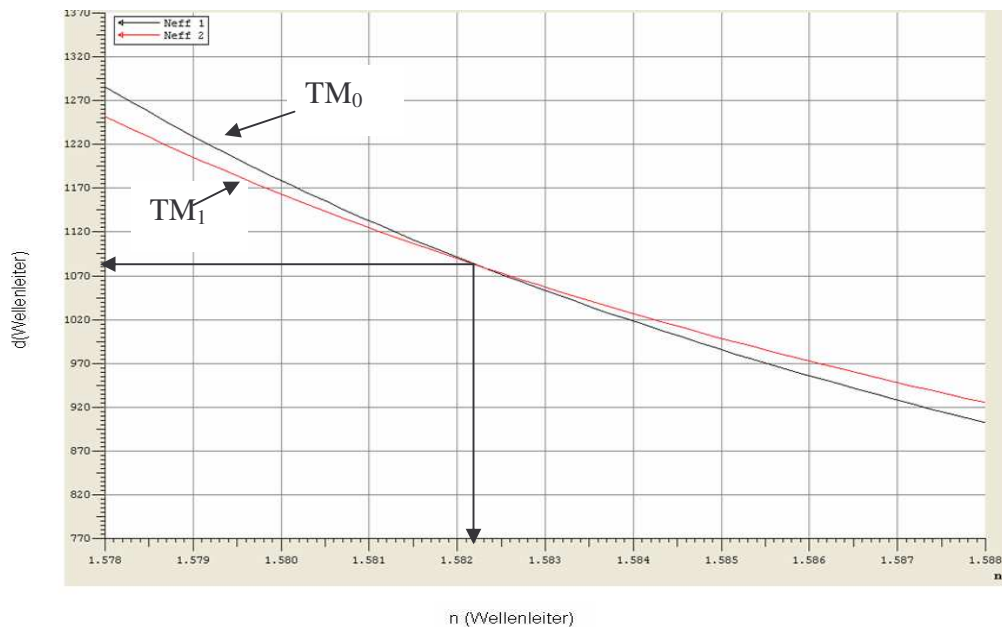


Abbildung 45: Mit Multiwave errechnete Brechungsindex-Dicken-Abhängigkeit des Wellenleiters. Es werden ein Brechungsindex von $n_{\text{Poly}} = 1.5823$ und eine Dicke von $d_{\text{Poly}} = 1085\text{nm}$ ermittelt.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 8: Berechnete effektive Brechungsindizes von unterschiedlichen Moden aus den gemessenen Kopplungswinkeln.

Moden Nr.	TM0	TM1	TE0	TE1
Kopplungswinkel[°]	36,48	32,425	36,614	32,8
Neff	1,563	1,504	1,5651	1,51

Eine zweite Messung, nach der Immobilisierung des Polymerfilms, ergibt dann n_{Polymer} , n_{Polymer} .

Tabelle 9: Berechnete effektiven Brechungsindex von unterschiedlichen Moden aus dem Kopplungswinkel und mit Polymerlösung.

Moden Nr.	TM0	TM1	TE0	TE1
Koppelwinkel[°]	36,71	33,502	36,77	33,637
Neff	1,566	1,52	1,567	1,522

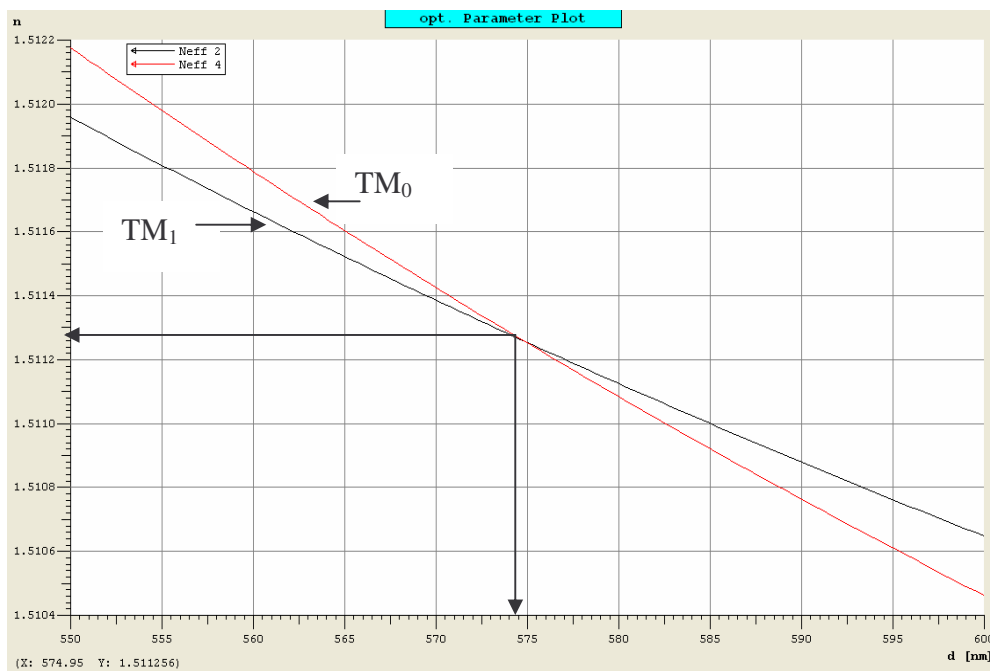


Abbildung 46: Mit Multiwave errechnete Brechungsindex-Dicken- Abhängigkeit. Es werden ein Brechungsindex von $n_{\text{Poly}}=1.51123$ und eine Dicke von $d_{\text{Poly}}=5745\text{nm}$ ermittelt.

Nach der Belichtung werden durch die Extraktion mit Wasser nicht vernetzte Bestandteile entfernt und die Strukturen erneut getrocknet (Abb. 47). Die Anbindung der Polymerketten an die Oberfläche, sowie das Vernetzen wird mit einem UV Strataliner 2400 der Firma Stratagene mit 75 Watt bei einer

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Wellenlänge von 365 nm durchgeführt. Die Bestrahlungsdauer lag bei einer Stunde, was $6,28 \text{ J/cm}^2$ entspricht.

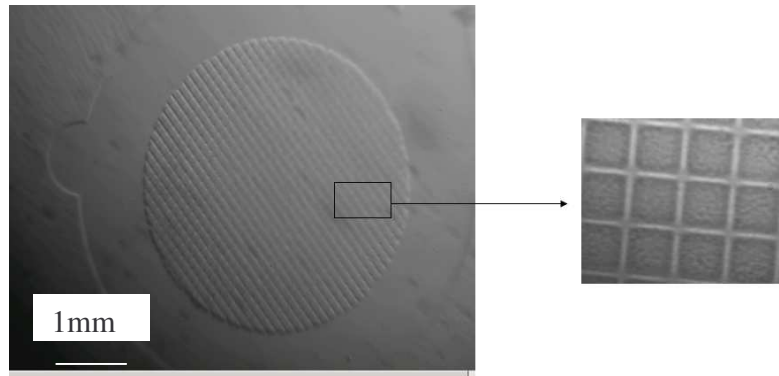


Abbildung 47: Erzeugte Strukturen durch UV-Belichtung mit Maske einer P(NIPAAm-co-MABP)-Schicht.

Ein zweiter Test wird mittels SPR-Imaging durchgeführt. Hierzu werden Mikroarrays aus Poly(NIPAAm)-Film hergestellt. Für dieses Experiment erfolgt die Präparation der Schichten wie in Abschnitt 3.2 beschrieben. In Abbildung 48 ist eine Aufnahme des hergestellten Mikroarrays zu sehen.

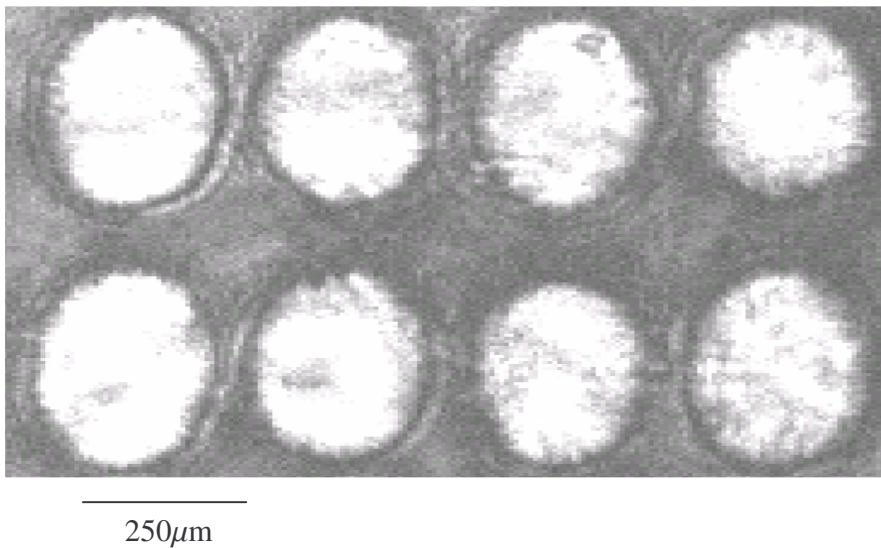


Abbildung 48: Aufgenommenes Bild des hergestellten Mikroarray mittels SPR-Imaging. Die Mikroarrays haben einen Durchmesser von $250 \mu\text{m}$ und eine Dicke von 100 nm .

Diese Tests zeigen, dass es möglich ist, mit Benzophenon-Photopolymeren Strukturen im μm Bereich zu erzeugen.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

4.2 Schichtcharakterisierung

Der Messplatz für SPR/OWS-Messungen ist in Abbildung abgebildet. Ein SPR-Aufbau in Kretschmann-Konfiguration dient als Basis für den Aufbau. Der Laserstrahl (Firma Uniphase, HeNe-Laser, 5mW, $\lambda=632,8$ nm) wurde mit Hilfe eines Choppers (Frequenz=1155) moduliert. Man kann durch das Verwenden von zwei Polarisatoren die Intensität und die Polarisation des Laserstrahls einstellen. Das einfallende Lichtstrahl wird an der Basis eines hochbrechenden 90° Prisma (LaSFN9, $n=1,845$) reflektiert und mit einer Sammellinse auf eine Photodiode fokussiert, welche an den Lock-in-Verstärker angeschlossen ist.

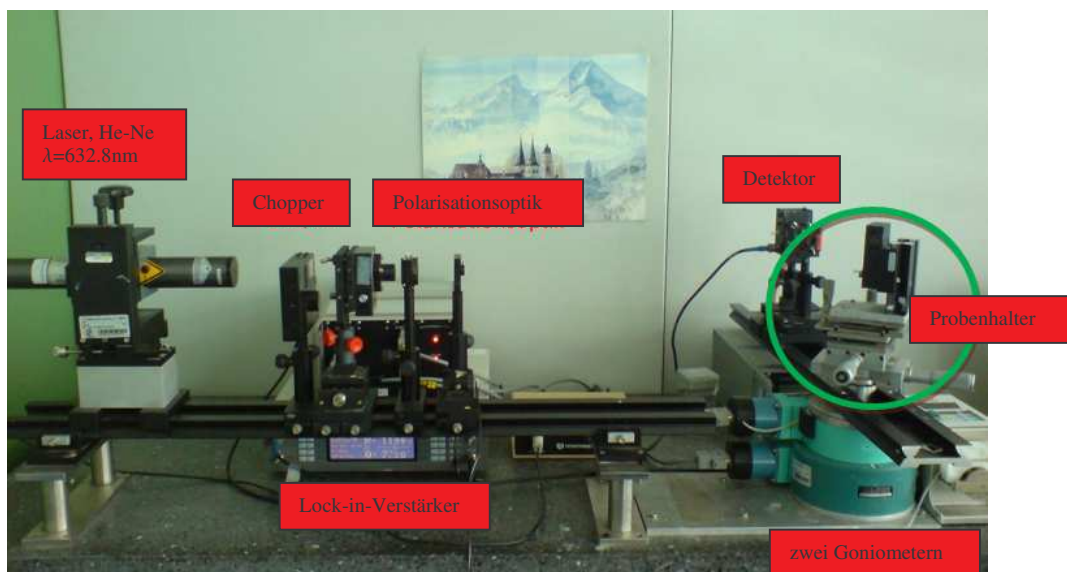


Abbildung 49: SPR- Messplatz.

4.2.1 Messungen im trockenen Zustand

Vor der Immobilisierung des Polymerfilms wird eine Referenzmessung des vollständigen Winkelspektrums durchgeführt, um die Parameter des Substrats und Deckmediums (d_{Chrom} , ϵ_{Chrom} , d_{Gold} , ϵ_{Gold} und d_{PS} , ϵ_{PS}) zu erhalten (Abb.50). Die aufgenommenen SPR-Spektren werden mit Hilfe des Programms Wispall-Fit [30], der Schichtdicke und dem Brechungsindex ausgewertet.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

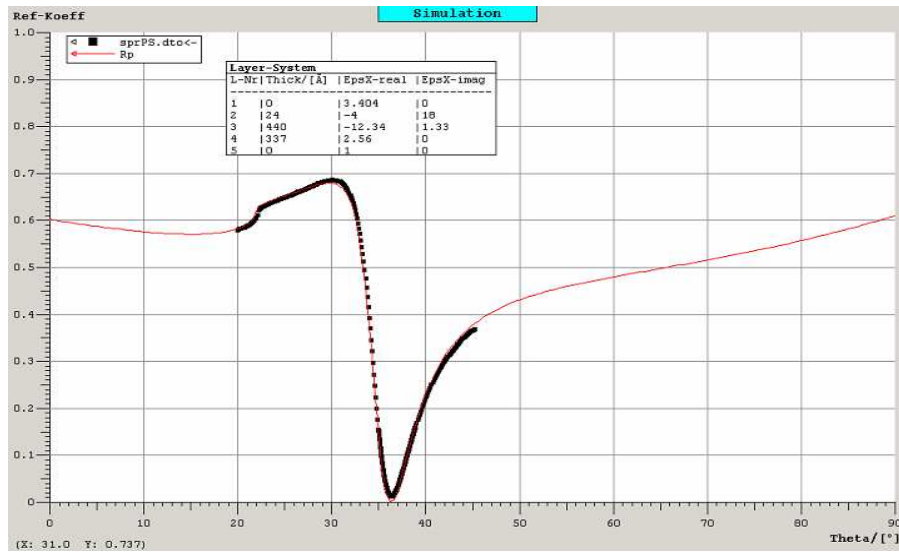


Abbildung 50: Messdaten und Simulation mit dem Schichtsystem mittels Winspall das aus LaSFN9-Substrat ($\epsilon = 3.404$), Chrom ($d_{\text{Chrom}}=2.4\text{nm}$, $\epsilon_{\text{Chrom}} = -4+i18$), Gold ($d_{\text{Gold}}=44\text{nm}$, $\epsilon_{\text{Chrom}} = -12.34+i1.33$) und Polysytrol ($d_{\text{PS}}=33.7\text{ nm}$, $\epsilon_{\text{PS}}=2.56$) besteht.

Eine zweite Messung, nach der Immobilisierung des Polymerfilms, ergibt dann d_{Polymer} , $\epsilon_{\text{Polymer}}$, bestimmt in trockenem Zustand unter der Annahme, dass alle anderen ϵ - und d - Werte konstant geblieben sind (Abb.51). Für jede Schicht wird ein homogener Brechungsindex bzw. eine feste Dielektrizitätskonstante ϵ angenommen.

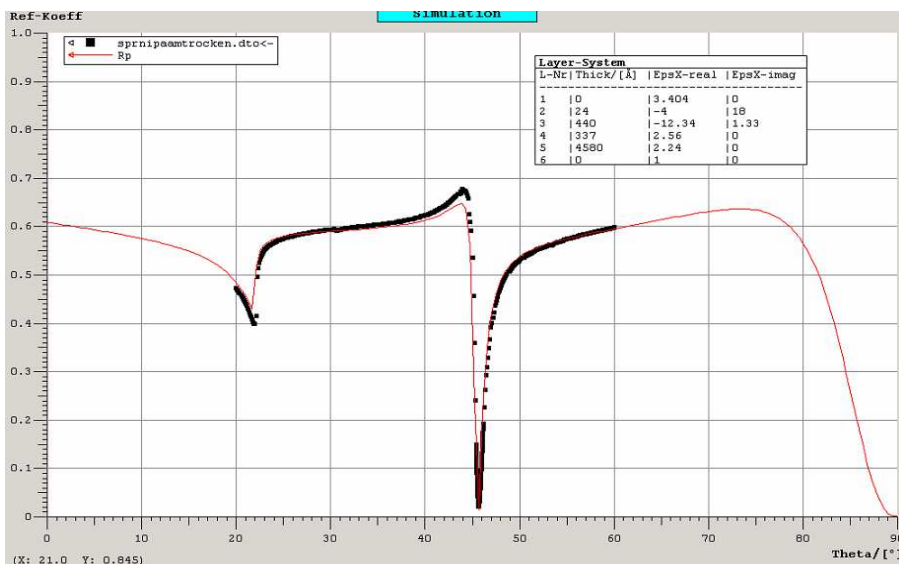


Abbildung 51: Messdaten und Simulation mit Winspall des trocknen Poly(NIPAAm)-Films mit 1% Benzophenon. Die Anregung ist mit TM-polarisiertem Licht erfolgt.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

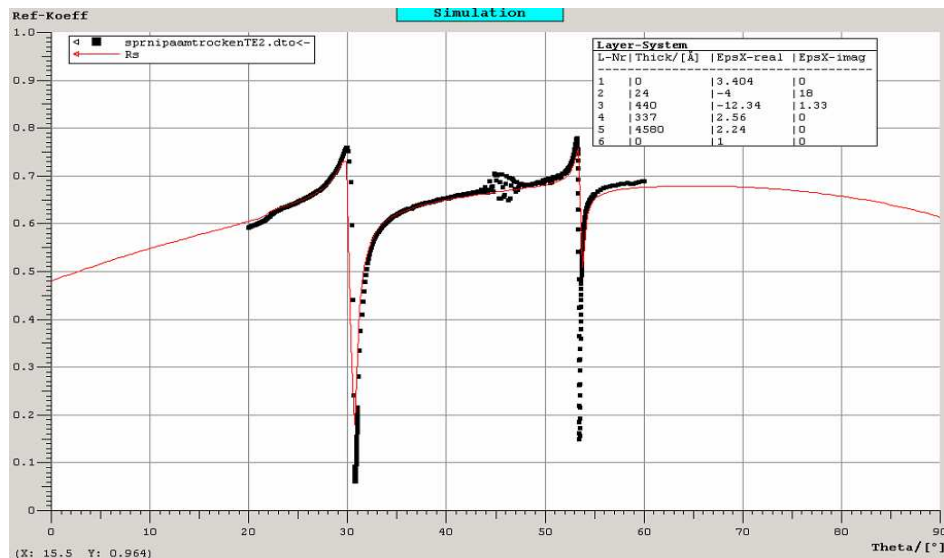


Abbildung 52: Messdaten und Simulation mit Winspall eines trocknen Poly(NIPAAM)-Films mit 1% Benzophenon . Die Anregung ist mit TE-polarisiertem Licht erfolgt.

Die gute Übereinstimmung der Reflexionsminimum mit dem Winspall-Fit, lassen auf eine sehr homogene Schicht schließen. Die Parameter des Polymerfilms im trocken Zustand ($d_0 = 458 \text{ nm}$, $\epsilon = 2.24$) wurden aus dem Winspall-Fit übernommen.

4.2.2 Quellverhalten des Hydrogels

In diesem Abschnitt geht es um die Charakterisierung des Temperaturverhaltens des Hydrogels. Für die Schichtdickenmessungen wird die Probe in eine Durchflusszelle eingebaut. Der Winkelbereich der Spektren liegt zwischen $40 - 75^\circ$. Der Probenhalter ist mit einer Heizvorrichtung und einem Pletier-Element ausgestattet. Die Temperatur kann mit Hilfe eines in den Aufbau integrierten Fühlers direkt in der Messzelle gemessen werden.

Die aufgenommen SPR-Spektren werden mit Hilfe des Programms Winspall, der Schichtdicke und dem Brechungsindex ausgewertet. Aus der erhaltenen Schichtdicken in gequollenem Zustand kann der Quellungsgrad des Hydrogels berechnet werden. In diesem Zustand hat es eine Dicke von $d = 2344.83 \text{ nm}$ (Abb. 53).

4 EXPERIMENTELLER TEIL

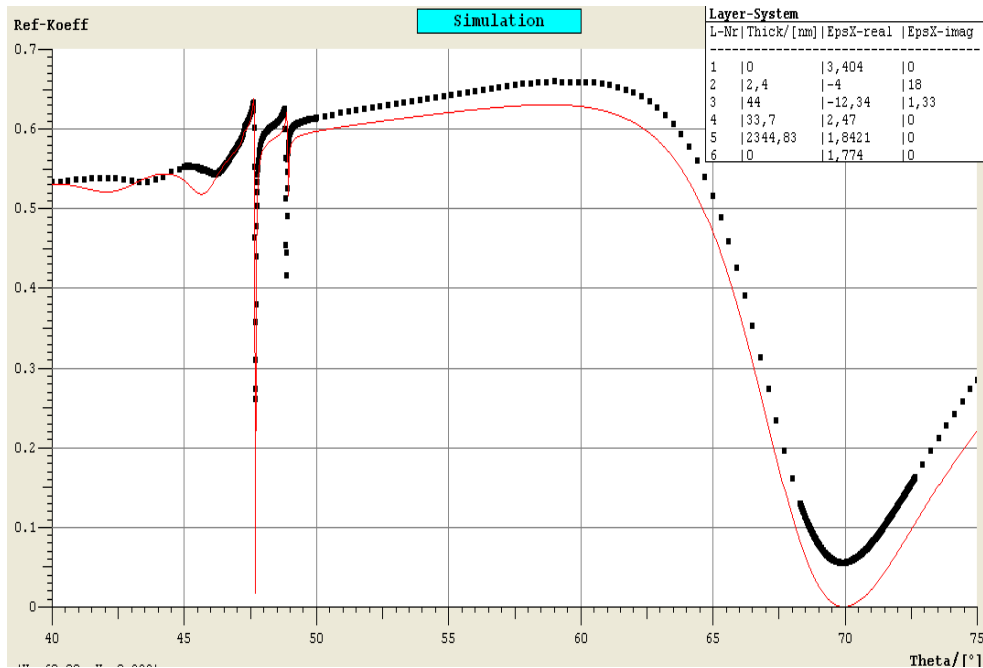


Abbildung 53: Messdaten und Simulation mit Winspall des gequollenen Poly(NIPAAM)-Films. Die Anregung ist mit TM-polarisiertem Licht erfolgt.

Die nächsten Messungen werden in einem Temperaturbereich von 19 °C bis 41°C in Abständen von 3°C durchgeführt. Nach einer Temperaturerhöhung wird eine Wartezeit von 25 min eingehalten, damit sich das System im thermischen Gleichgewicht befindet.

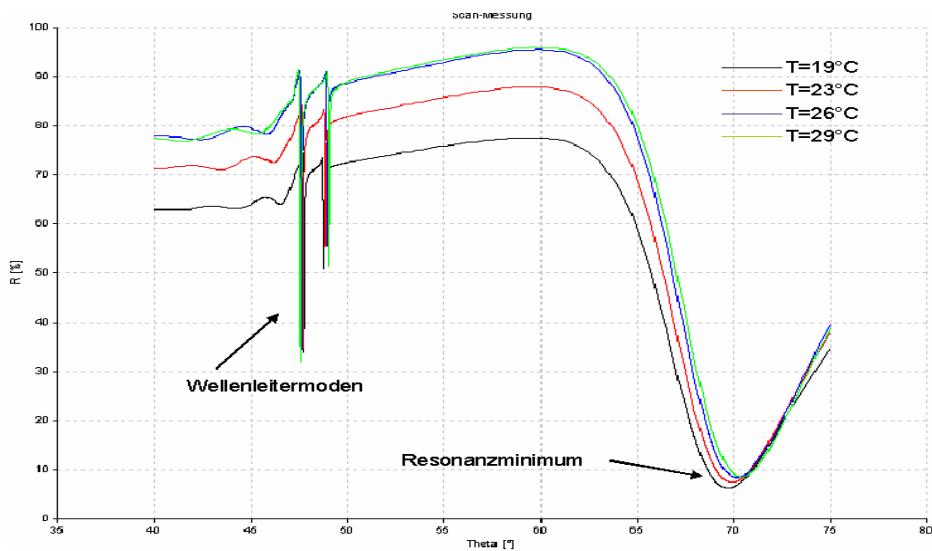


Abbildung 54: Temperaturabhängige Quellungsmessung.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

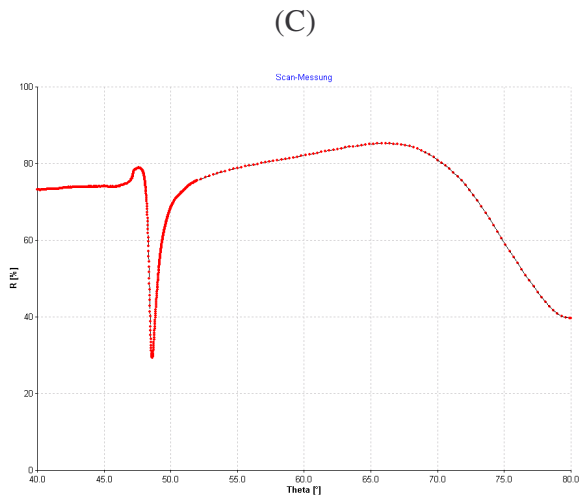
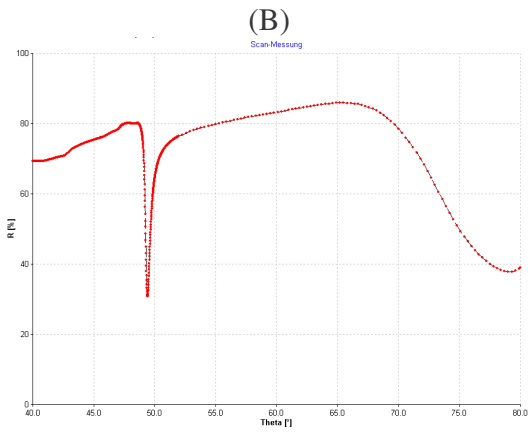
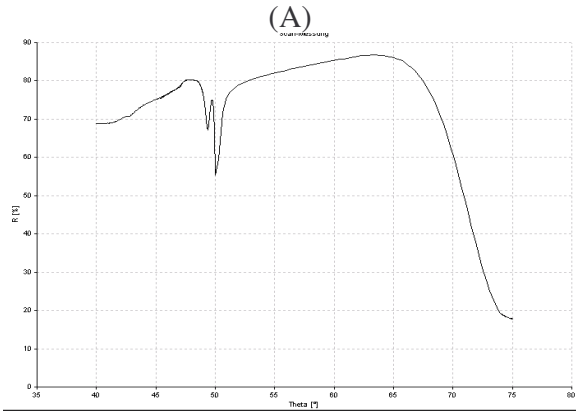


Abbildung 55: Messdaten des Poly(NIPAAm) bei (A) 34°C, (B) 36°C, (C) 38°C.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Die Spektren in Abbildung 55 zeigen bei niedrigen Temperaturen zwei Wellenleitermoden, die sich während des Kollabierens umwandeln, bis im entquollenen Zustand nur noch die Totalreflexionskante und eine Wellenleitermode vorhanden sind. Das Resonanzminimum verschiebt sich über einen großen Winkelbereich von fast 10° und wandert mit einem scharfen Sprung von 70° auf 80° .

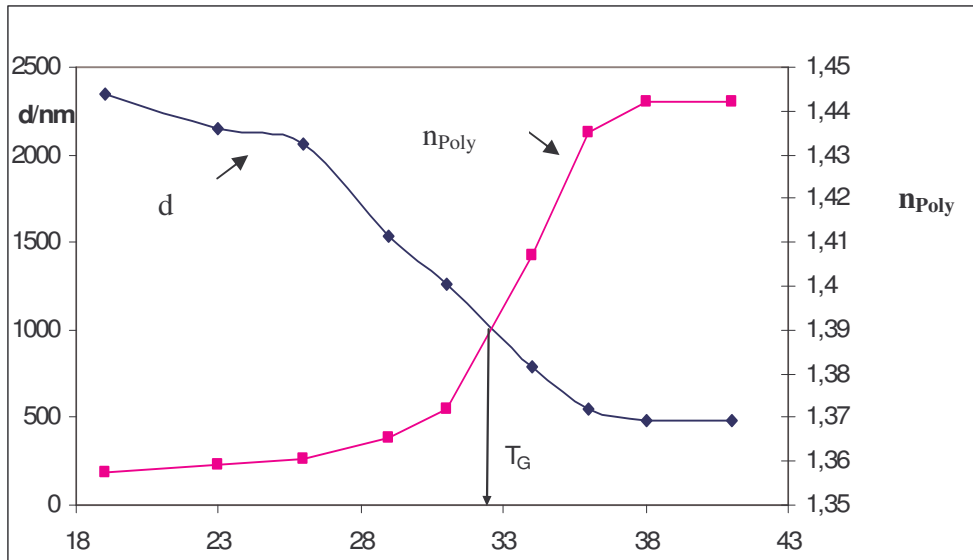


Abbildung 56: Brechungsindex und Dicke in Abhängigkeit von der Temperatur.

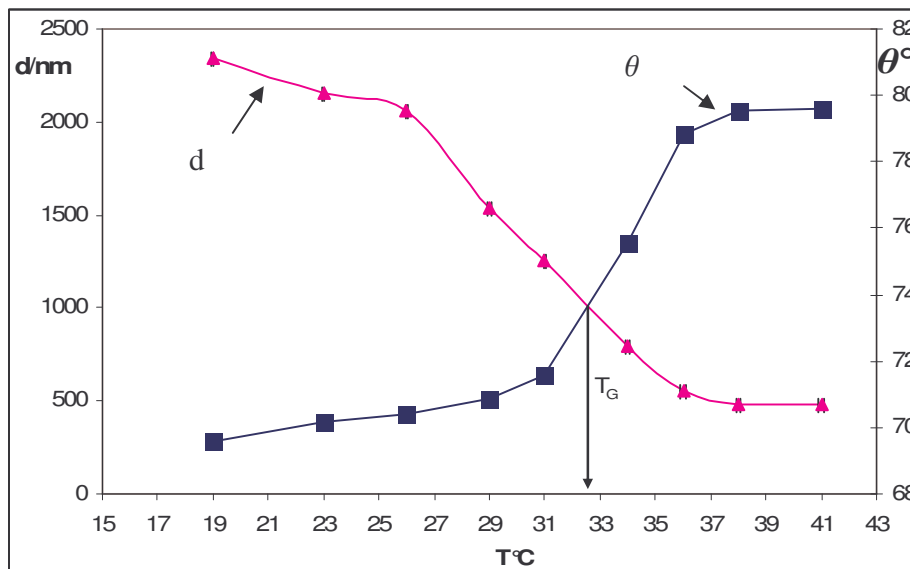


Abbildung 57: Resonanzminimum und Dicke in Abhängigkeit von der Temperatur.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Schichtdicke und Brechungsindex zeigen einen scharfen Übergang. Der Brechungsindex weist jeweils vor und nach dem Sprung konstante Werte auf, wogegen die Schichtdicke anfangs stetig sinkt und erst nach dem Übergang konstant bleibt (Abb.56-57). Unterhalb der kritischen Temperatur liegt der Polymerfilm gequollen vor. Das aufgenommene Wasser bewirkt eine hohe Schichtdicke, aber einen niedrigen Brechungsindex. Eine Temperaturerhöhung bis zur kritischen Temperatur führt zum plötzlichen Kollabieren und führt zu einer sprunghaft sinkenden Schichtdicke durch die Abgabe des Wassers und einen stark ansteigenden Brechungsindex. Oberhalb des Phasenübergangs liegt die Schicht entquollen vor. Dieser Zustand wird durch eine geringe Schichtdicke und einen hohen Brechungsindex charakterisiert. Den Wendepunkt der Kurven stellt die mit SPR-Spektroskopie ermittelte Phasenübergangstemperatur $T_G \sim 32^\circ\text{C}$ dar.

4.3 Fluoreszenzanregung durch Wellenleitermode

Die Fluoreszenzmessung am Poly(NIPAAm)-Film wird in diesem Abschnitt dargestellt. Da die Hydrogele als Sensoren dienen, welche mit Fluoreszenz-techniken ausgelesen werden können, werden diese mit OWFS untersucht. Weiterhin sollte die Diffusion eines Fluoreszenzfarbstoffs in das Hydrogel und die Anbindung an das Polymernetzwerk gezeigt werden.

Der Hydrogelfilm wird wie im Technologie-Teil beschrieben hergestellt. Allerdings handelt es sich in diesem Fall bei dem Haftvermittler nicht um das Polystyrol, sondern um das entsprechende BP-Thiol, welches aus 5 mM Ethanollösung über Nacht auf der aufgedampften Goldschicht immobilisiert wird.

In dieser Arbeit wird mit dem Antikörper anti-Maus (IgG), markiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 647, gearbeitet. Es wird eine Lösung der Konzentration $100 \mu\text{g/ml}$ verwendet.

Bei dem Experiment wird das trockene Hydrogel mit einer Dicke von $d_{\text{poly}} = 300\text{nm}$ mit Acetat-Pufferlösung ($\text{pH} = 5$) gequollen und dann die Lösung des EDC-Ammoniak-Ester hinzugegeben. Der EDC-Ammoniak-Ester soll in das Hydrogele hineindiffundieren und dort anbinden. Nach 20 Minuten wird die Lösung mit anti-maus (IgG) hinzu gegeben. Der Antikörper sollte in das Hydrogel hineindiffundieren und an EDC-Ammoniak-Ester anbinden. Dann sollen ungebundene Antikörper durch Spülen mit Pufferlösung heraus gewaschen werden und es soll weiterhin ein Fluoreszenzsignal detektierbar sein.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

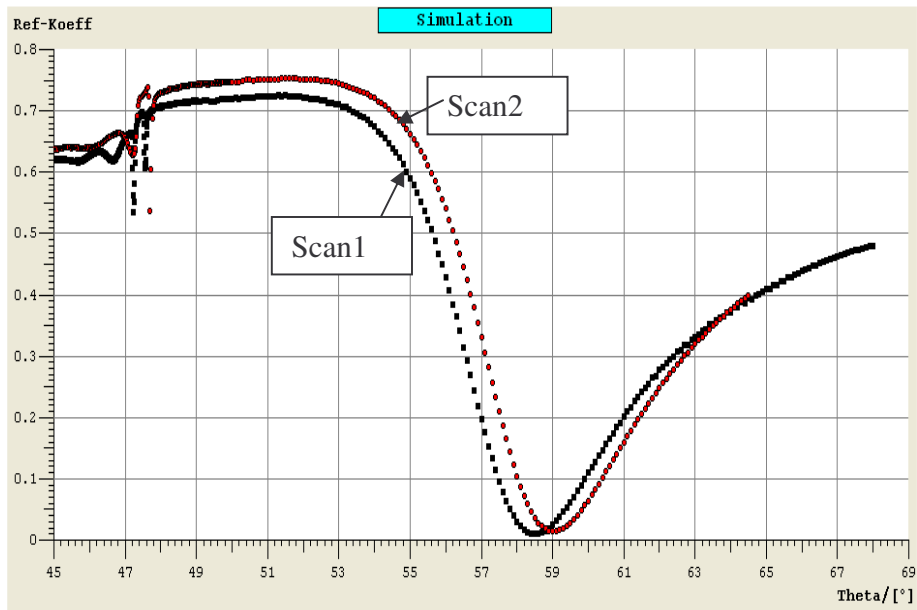


Abbildung 58: Messdaten SPR-Messung. Die Parameter sind: $n(\text{Substrat}) = 1.845$, Chrom ($n = 3.1 + i3.3$, $d = 2$ nm); Gold ($n = 0.25 + i3.36$); Scan1). Vor der Anbindung des Antikörpers betragen Brechungsindex und Dicke des Hydrogels ($n = 1,344$, $d = 3000$ nm), nach der Anbindung des Antikörpers ($n = 1,3482$; $d = 3000$ nm).

Die aufgenommenen SPR-Spektren werden mit Hilfe des Programms Winspall, der Schichtdicke und dem Brechungsindex ausgewertet.

Abbildung 58 zeigt SPR-Scans vor (Scan1) und nach (Scan2) der Anbindung des Antikörpers an das Hydrogel. Man sieht, wie die Wellenleitermoden und das Plasmon shiften. In diesem Fall erfolgt durch die zwei Wellenleitermoden eine Fluoreszenzanregung. In Abbildung 59 ist das detektierte Fluoreszenzlicht dargestellt. Bei diesen Messungen erscheinen die Fluoreszenzsignale bei dem Winkel der zugehörigen Mode. Dabei besitzen die Fluoreszenzsignale zwar eine ähnliche Breite wie die jeweils zugehörigen Mode aber die Form von Emissionsbanden (Maxima statt Minima). Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass die Fluoreszenzsignale leicht zu kleineren Winkeln verschoben sind. dies liegt daran, dass die Maxima der Fluoreszenz bei der maximalen Feldverstärkung auftreten, die Minima der Reflektivität hingegen nicht.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

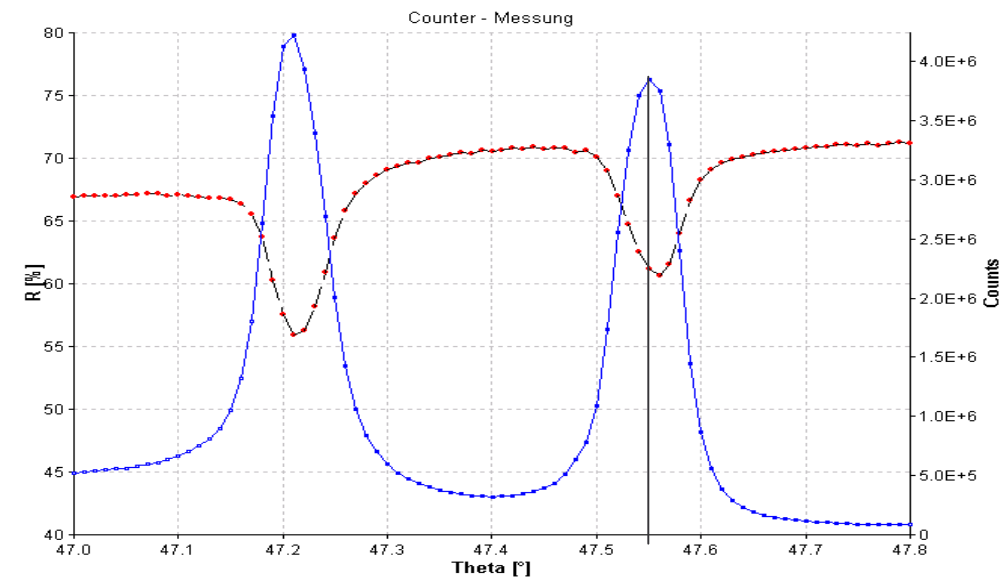


Abbildung 59: Vergleich der Reflektivität mit dem Fluoreszenzsignal der TM-Polarisation eines Poly(NIPAAm)-Films mit einer Schichtdicke von $3\mu\text{m}$ in Kretschmann-Konfiguration. Die Messung ist in der Pufferlösung durchgeführt.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mikroarray auf einem Wellenleiter-Sensor zur Fluoreszenzanregung entwickelt. Die Mikroarrays wurden aus Poly(N-Isopropylacrylamid) Hydrogelen hergestellt. Die Charakterisierung der hergestellten Mikroarray-Hydrogele erfolgte mittels Wellenleiter-Spektroskopie (WaMS), Oberflächenplasmonen-Spektroskopie (SPR), Optische Wellenleiter-Fluoreszenzspektroskopie (OWFS) und SPR-Imaging.

Zuerst wurden Polystyrol-Wellenleiter untersucht. Mit Hilfe Heißprägetechnik wurden Beugungsgitter zur Anregung von Wellenleitermoden hergestellt. Beim Heißprägesystem werden mittels Hitze und Druck Beugungsgitter von einer Masterstruktur direkt in den Polystyrol-Wellenleiter übertragen. Die Haupteigenschaften des Verfahrens liegen in seiner Schnelligkeit und Reproduzierbarkeit. Die Charakterisierung der geprägten Beugungsgitter erfolgte mittels der Atomic-Force-Microscopy (AFM) Technik und Beugungsreflex-Verfahren. Die AFM Bilder haben gezeigt, dass das Prägeverfahren realisierbar ist. Durch das Prägen wurde das Gitter der Masterstruktur auf den Wellenleiter mit demselben Profil übertragen. Die Amplitude beträgt ungefähr 200 nm. Mit dem Beugungsreflexverfahren konnte man die Gitterkonstante des hergestellten Beugungsgitters bestimmen.

Mit Hilfe von Wellenleitermoden-Spektroskopie kann man das Spektrum geführter Moden messen. Da diese Methode auf der Polarisierbarkeit des Lichts basiert, kann man durch das Messen von zwei geführten Moden (TE- und TM-Mode) den Brechungsindex und die Schichtdicke des Wellenleiters bzw. des Adlayers bestimmen. Das wurde in dieser Arbeit genutzt, um die aufgetragenen Hydrogele auf Polystyrol-Wellenleitern zu charakterisieren.

Mittels SPR-Messung wurde die Übergangstemperatur T_G des Hydrogeles bestimmt und sein Quellverhalten beobachtet. Die Übergangstemperatur liegt in Bereich zwischen 32°-33°C.

Eine Vernetzung von Hydrogelen durch Bestrahlung mit UV-Licht bietet eine Vielzahl von Vorteilen, wie z.B. die Möglichkeit der Herstellung sehr definierter Polymerfilme auf Oberflächen, die durch selektive Bestrahlung gezielt strukturiert werden können. Mit Hilfe von bestimmten Monomeren (Netzwerkbildnern) können Hydrogele direkt aus der Monomerlösung polymerisiert und vernetzt werden. Bei speziell modifizierten Polymeren (UV-aktive Gruppen) kann die Vernetzung photochemisch durch UV-Strahlung geschehen. Das erfolgt durch freie radikalische Vernetzungspolymerisation. In dieser Arbeit wurde ein bifunktionelles Co-Monomer (4-Methacryloyloxybenzophenon, MABP) in die Polymerisation eingebracht, welches als Vernetzer für die Polymerketten diente. Durch Anregung mit einer Wellenlänge von $\lambda=365$ nm wird das Benzophenon in den ersten angeregten Zustand S_1 aus dem Grundzustand S_0 angeregt. Vom angeregten Singulettzustand S_1 findet Interkombination (inter-system crossing) zum Triplettzustand T_2 statt. Danach kehren die Elektronen in den Triplettzustand T_1 zurück, wo sich unter konstanter Bestrahlung eine stationäre Konzentration an Biradikalen aufbaut. In Anwesenheit von aliphatischen CH-Gruppen kann

5 Zusammenfassung

das entstehende Biradikal ein Wasserstoffatom abstrahieren und wird zu einem Ketylradikal. Beide zurückbleibenden Kohlenstoffradikale rekombinieren, was zu einer Vernetzung des Polymerfilms führt. Da der Polymerfilm auf einen Polystyrol-Wellenleiter, der ein CH-Gruppe besitzt, aufgebracht wurde, fand diese Reaktion auch zwischen einem Benzophenon, welches an eine Polymerkette gebunden ist, und einer CH-Gruppe des Polystyrols statt. Die Reaktion führte dann zu einem oberflächengebundenen Polymernetzwerk. Die SPR-Imaging-Bilder haben die gezeigt, dass es möglich ist, Mikroarray-Hydrogele herzustellen.

Im Anschluss wurde Fluoreszenzmessungen durchgeführt. In dieser Arbeit wurde mit dem Antikörper anti-Maus (IgG), markiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 647, gearbeitet. Es wurde Lösung der Konzentration $100 \mu\text{g/ml}$ verwendet.

Bei dem Experiment wurde das trockene Hydrogel mit einer Dicke von $d_{\text{poly}} = 300\text{nm}$ mit Acetat-Pufferlösung ($\text{pH} = 5$) gequollen und dann die Lösung des EDC-Ammoniak-Ester hinzugegeben dort an. Der EDC-Ammoniak-Ester sollte in das Hydrogel hineindiffundieren und dort anbinden. Nach 20 Minuten wurde die Lösung mit anti-Maus (IgG) hinzugegeben. Der Antikörper sollte in das Hydrogel hineindiffundieren und an den EDC-Ammoniak-Ester anbinden. Dann sollten ungebundene Antikörper durch Spülen mit Pufferlösung heraus gewaschen werden und es sollte weiterhin ein Fluoreszenzsignal detektierbar sein.

Literatur

- [1] Thorsten Liebermann, Wolfgang Knoll. "Surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy", *Colloids and Surfaces*, 171 (2000) 115 - 130.
- [2] H.M. Grandin, B Städler. „Waveguide excitation fluorescence microscopy: A new tool for sensing and imaging the biointerface“ *Biosensors and Bioelectronics*, 21(2006) 1476 - 1482.
- [3] Chris Row Taitt, George P. Anderson. "Evanescent wave fluorescence biosensors“ *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (2005) 2470 – 2487.
- [4] Martin Halter, "3D Micro and Nanostructured Surfaces for Proteomics", Dissertation Swiss Federal Institute of technology zurich, 2006.
- [5] Stefan Busse, „Untersuchung Molekularer Erkennungsreaktionen mit einem Integriert - optischen Mach – Zender – Interferometer“. Dissertation, Chemie.Fachbereich Pharmazie der Johannes Gutenberg – Universität Mainz,2000.
- [6] Marta Bally, Martin Halter, "Optical microarray biosensing techniques", *Surface and Interface Analysis*. 38 (2006) 1442 – 1458.
- [7] Albrecht Brandenburg, Mikrooptische Detektionssysteme für die Bioanalytik, zur Veroffentlichung angenommen: 11. Julie 2001.
- [8] K. Cottier, M Wiki. „, Label-free highly sensitive detection of (small) molecules by wavelength interrogation of integrated optical chips „, *Sensors and Actuators B* 91 (2003) 241 – 251.
- [9] Gert L. Duvenesck, Andreas P.Abel, "Planar waveguides for ultra – high sensitivity of the analysis of nucleic acids", *Analytica Chimica Acta* .469 (2002) 49 -61.
- [10] P. k. Tien, "Integrated optics and new wave phenomena in optical waveguides", Bell Telephone Laboratories, Holmdel, New Jersey 07733, 1977.
- [11] Pchi Yeh.Optical Waves in Layered Media. John Wiley & Sons,Inc., 1988.
- [12] W. Karthe and R.Müller. Integrierte Optik. Akademischer Verlagsgesellschaft Geest & Portig K.-G.,1991.
- [13] Ingenieurburo Doos Tabarz. Die β Version des Programms wurde von Dip.Ing Andreas Unger zur Verfügung gestellt

Literatur

- [14] Maximilian Kreier, "Oberflächenplasmonen-artige Resonanzen auf metallischen Gittern". Dissertation, Fachbereich Physik Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2000.
- [15] W. Lukosz and K. Tiefenthaler, "Sensitivity of integrated optical grating and prismcouplers as Biochemical sensors", *Sensors and Actuators*, 15(1988) 273 -284.
- [16] W. Lukosz, "Principels and sensitivities of integrated optical and surface plasmon sensors for direct affinity sensing and immunosensing", *Biosensors & Bioelectronics* 6 (1991) 215 - 225.
- [17] Wolfgang Knoll. "Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves". *Annual Review of Physical Chemistry*, 49(1): (1998) 569 - 638.
- [18] Michael Seidel. "Entwicklung und Miniaturisierung heterogener Fluoreszenz-Bioassays basierend auf FRET in Nanoliterkavitäten aus Kunststoff". Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2003.
- [19] Thomas Susdorf, Photophysikalische Charakterisierung von Pyrromethen-Laserfarbstoffen in verschiedenen Festkörperpolymeren, Dissertation an der Fakultät Physik der Universität Regensburg, 2006.
- [20] DC Denis Seifert, „Synthese und Charakterisierung von sensitiven vernetzungsfähigen Blockcopolymeren mittels RAFT“. Dissertation, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden, 2000.
- [21] Patrick W. Beines, Iris Klosterkamp, Bernhard Menges, Ulrich Jonas and Wolfgang Knoll, "Responsive Thin Hydrogel Layers from Photo-Cross-Linkable Poly(N-Isopropylacryamide) Terpolymers", *Langmuir*, 23 (2007) 2231 - 2238.
- [22] Patrick Beines, Synthese und Charakterisierung einer Hydrogelmatrix für die Multianalyt-Sensorik, Dissertation am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2007.
- [23] Doene Demirgoez, "Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy and Microscopy Studies for Biomolecular Interaction Studies". Dissertation am Fachbereich Chemie. Pharmazie der JohannesGutenberg-Universität Mainz, 2005.

Literatur

- [24] Michael Flockert. "Herstellung und Charakterisierung eines gittergekoppelten Hybrid-Moden-Sensors". Diplomarbeit, Fachbereich Ingenieurwissenschaften Fachhochschule Wiesbaden, 2008.
- [25] Gerald Steiner, "Surface Plasmon resonance imaging", Anal Bioanal Chem (2004) 379:328-331.
- [26] Christoph Hoffman, "Evaneszente Fluoreszenz-Spektroskopie an 3-D funktionalisierten Polymer-Wellenleitersensoren", Masterthesis, Studienbereich Physik Fachhochschule Wiesbaden, 2008
- [27] Michael Stelzl, „Einsatz von Bildverarbeitungssystemen in der Produktionsautomatisierung am Beispiel der Glasindustrie“. Diplomarbeit an der FH Wiesbaden Fachbereich Physikalische Technik. 2001
- [28] Joel P. Golden, Frances S. Ligler, "A comparison of imaging methods for use in an array Biosensor", Biosensors and Bioelectronics 17 (2002) 719- 725
- [29] Winspall, Am Max-Planck-Institut wurde das Programm vom Herren Andreas Schiller entwickelt

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle all denen meinen Dank ausdrücken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Prof. Wolfgang Knoll für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit am MPIP zu absolvieren.

Ich danke meinem Korreferenten Dipl. Ing. Bernhard Menges für die freundliche Betreuung und die gute Zusammenarbeit.

Ich möchte mich bei Herren Prof. Uwe Langbein für die Betreuung und die freundliche Unterstützung bei meiner Diplomarbeit bedanken.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern der Knoll-Gruppe des MPI-P für die herzliche Aufnahme und das angenehme Arbeitsklima welches jederzeit offene Diskussion ermöglicht.

Ein besonderer Dank gilt letztlich meine Frau Brigitte für die ständige Rückenstärkung und Motivation während meiner Diplomarbeit,

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sabir Okba
Geburtsdatum: 01-01-1975
Geburtsort: Meknes in Marokko
Telefon: 06131/6270833
Familienstand: Verheiratet, 3 Kinder

Schulbildung

1982-1987 Grundschole in Meknes
1987-1991 Kollege in Meknes
1991 – 1994 Gymnasium (Abitur) in Meknes

Hochschulausbildung

1994-1999 Universität Moulay Ismail in Meknes
(La Licence en Physique)
1999-2000 Goethe Institut (Erlernen der deutschen Sprache)
in Meknes
2001-2002 Sprachkurs (deutsch) an der TU in Duisburg
2003-2008 FH Wiesbaden, Fachbereich Physikalische Technik
2007-2008 Berufspraktikumssemester und Diplomarbeit an
Max-Planck-Institut für Polymerforschung
„Entwicklung eines Mikroarray-Sensors zur Fluoreszenzanregung durch
Wellenleitermoden“

Praktische Tätigkeiten

2004-2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Wirbelsäulensimulator im Mechanik-Labor
Tutor (Mechanik)

Fremdsprachen

arabisch	Muttersprache
französisch	fließend in Wort und Schrift
deutsch	fließend in Wort und Schrift
englisch	Grundkenntnisse