



universität
wien

DISSERTATION

Titel der Dissertation

Modellierung von Bioanalyten durch Polymere und deren
Verwendung zur Strukturierung von Oberflächen – Anwendung von
Zellen-Replicae in der Chemosensorik

angestrebter akademischer Grad

Doktor/in der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Mag. Miroslava Polreichová
Matrikel-Nummer:	9905126
Dissertationsgebiet (lt. Studienblatt):	Doktoratsstudium der Naturwissenschaften (Chemie)
Betreuerin / Betreuer:	O. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Dickert

Wien, am 17. 2. 2010

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum vom Mai 2008 bis März 2010 am Lehrstuhl für Chemosensoren und optische Molekülspektrometrie am Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie der Universität Wien unter der Leitung von O. Univ. Prof. Dr. F. L. Dickert.

Mein besonderer Dank gilt Herrn O. Univ. Prof. Franz Ludwig Dickert für die interessante Themenstellung meiner Dissertation, die kompetente Betreuung der Arbeit und vor allem seine Diskussionsbereitschaft, sowie hervorragende Arbeitsbedingungen.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Abteilung bedanken, insbesondere bei Herrn Ao. Prof. Peter Lieberzeit und Mag. Alexander Biedermann für die hilfsreiche Unterstützung bei technischen Problemen und Fragen aller Art.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	5
1.1. Einleitung.....	5
1.2. Aufbau von Chemosensoren.....	6
1.3. Anforderungen an Chemosensoren	7
1.4. Anwendungsgebiete	8
1.5. Aufgabenstellung.....	9
2. Theoretische Grundlagen massensensitiver Messtechnik	11
2.1. Die Piezoelektrizität	11
2.2. Der Schwingquarz (QCM)	13
2.3. Die Prinzipien der massensensitiven Detektion	16
2.4. Molekulares Prägen.....	18
2.5. Rasterkraftmikroskop (AFM).....	20
3. Experimenteller Teil.....	25
3.1. Elektrodendesign	25
3.2. Erstellen der Elektroden	26
3.3. Sensitive Schichten.....	28
3.3.1. Polyurethan.....	28
3.3.2. Polyacrylat.....	32
3.3.3. Coating.....	33
3.4. Silikone.....	34
3.5. Aufbau der Messapparatur	36
3.5.1. Netzwerkanalysator	37
3.5.2. Oszillatorschaltung	38
3.5.3. Messzelle	39
3.5.4. Messprogramm	41
3.6. Fluoreszenzmikroskopische Messungen	42

3.7. Quantitative Bestimmung von Zellen.....	42
4. Hefesensor	45
4.1. Hefen	45
4.2. Hefe in Biotechnologie und Industrie	46
4.3. Zellzyklus bei Hefen.....	47
4.4. Synthetische Hefemaster	50
4.4.1. Hefestempel.....	51
4.4.2. Polymer.....	51
4.4.3. Silikonmaster	53
4.5. AFM-Untersuchungen.....	57
4.6. Hefechip.....	60
4.7. Messungen mit einfachen Hefesensoren	64
4.8. Andere Polymersysteme	69
4.9. Messung von Hefezellen in verschiedenen Phasen des Teilzyklus.....	70
4.10. Querselektivität zwischen den synchronisierten Hefezellen	72
4.11. Silikonmaster für sich teilende Hefezellen.....	75
4.12. Querselektivität bei den Hefesensoren	82
4.13. Auswaschen von Kavitäten in der sensitiven Schicht	85
4.14. Temperaturabhängigkeit bei Messungen mit Hefesensoren	89
4.15. Monitoring von sich teilenden Hefezellen in realer Matrix	90
4.16. Resümee - Hefesensor	95
5. Bakteriensensor	97
5.1. Bakterien.....	97
5.2. Escherichia Coli.....	98
5.3. Aufbereitung von Bakterienzellen.....	102
5.4. Synthetische Bakterienstempel.....	103
5.5. Gravimetrische Bakterienchips	108
5.6. Prägung mit synthetischen Bakterienstempeln.....	110
5.7. Querempfindlichkeit des Bakteriensensors	115
5.8. Resümee - Bakteriensensor	117

6. Zusammenfassung	119
6.1. Deutsche Zusammenfassung	119
6.2. Englische Version der Zusammenfassung	120
7. Anhang.....	123
7.1. Chemikalien.....	123
7.2. Geräte.....	123
7.2. Polymerbasis für Silikonzellen und Masterzellen	123
7.3. Abkürzungen	124
8. Literaturverzeichnis	127

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Einleitung

Die Herstellung biomimetischer Oberflächen¹ mittels molekularer Prägung findet heutzutage breite Anwendung in der Sensorik. Die Vorteile dieser Methode sind neben der Möglichkeit zur Miniaturisierung die hohe Selektivität und Sensitivität, die den Nachweis spezifischer Wechselwirkungen zwischen Analyt und Imprint möglich machen. In dieser Studie wurde mit einem derartigen Erkennungsprozess die spezifische Identifikation von Hefezellen in unterschiedlichen Zellzyklusstadien ermöglicht. In Gegensatz zu den klassischen Antikörpern, bietet dieser Methode eine bessere Stabilität weshalb sie auch in Gebieten wie Biotechnologie, Medizin und Umweltmonitoring verbreitete Anwendung findet.

Die Kombination von räumlicher und elektronischer Komplementarität ermöglicht eine enzymanaloge Erkennung, mit deren Hilfe eine selektiv quantitative Erfassung von Analyten ermöglicht wird. Die mannigfaltigen Möglichkeiten von solchen Schlüssel-Schloss Reaktionen machen diese Art der Sensorprägung zu einer zukunftssträchtigen Analysenmethode.

Die chemische Zusammensetzung der sensitiven Schicht ist von großer Wichtigkeit, da sowohl physikalische Prozesse auf der Oberfläche als auch im sensitiven Film das Ergebnis beeinflussen. Idealerweise wird die sensitive Schicht direkt on-chip² generiert, was sich für Massenproduktion bei diversen technologischen Prozessen eignet.

Bei dem verwendeten Sensor handelt es sich um ein massensensitives Bauteil (quartz micro balance), wobei die Analyt-Adsorption oder -Absorption an der Quarzoberfläche zu einer Änderung der Frequenz führt.

1.2. Aufbau von Chemosensoren

Ein Chemosensor stellt einen miniaturisierten Messwertfühler dar. Von IUPAC³ wird er definiert als „*small devices capable of continuously recognizing concentrations of chemical constituents in liquids or gases and converting this information in real-time to an electrical or optical signal*“.

Das Funktionsprinzip zeigt dann die Abbildung (1).

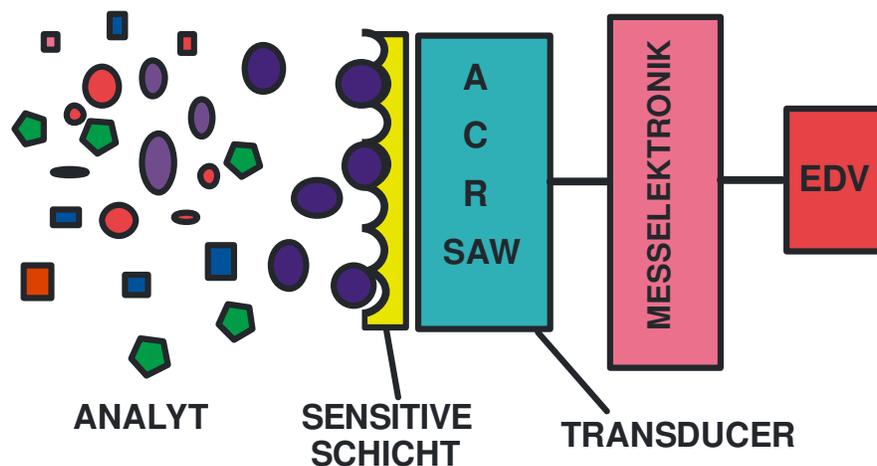


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Funktionsprinzipien eines Chemosensors.

Ein Chemosensor^{4,5} besteht im Prinzip aus drei wesentlichen Elementen, nämlich einer chemisch sensitiven Schicht, die mit dem Analyten im Gleichgewicht steht, einem Transducer und einer elektronischen Datenverarbeitungseinheit. Die selektive Schicht fungiert dabei als ein Rezeptor, der das Erkennungssystem für die jeweilige chemische Substanz bildet. Der Analyt muss aus einer komplexen Matrix selektiv und sensitiv herausgefiltert werden, wobei die Reversibilität dieses Vorgangs eine Grundvoraussetzung im Hinblick auf die Wiederverwendbarkeit ist. Der Rezeptor dient auch als vorgeschalteter chemischer Verstärker. Der Transducer wandelt dann die chemische Information in eine dazu proportionale Größe um. Die wesentlichen Transducerprinzipien sind: optische Absorption, Widerstand, Kapazität, Potential oder Masse. Auf Grund neuer

innovativer Materialien kann die biomimetische Strategie⁶ hier große Fortschritte erzielen.

1.3. Anforderungen an Chemosensoren

Die Anforderungen an ein Chemosensor^{7,8}, in meiner Arbeit handelte es sich um einen massensensitiven Sensor, sind ziemlich hoch. Die Entwicklung von neuen Sensorsystemen erfordert ein interdisziplinäres Zusammenwirken verschiedener Fachrichtungen. Besonders das Zusammenspiel von Chemie und Elektronik ist für Untersuchungen von neuen Sensorschichten auf neuen Bauteilen von entscheidender Bedeutung.

- ❖ Hohe Selektivität bezüglich eines bestimmten Analyten oder einer Analytgruppe
- ❖ Hohe Sensitivität, um die geringsten Signaländerungen (bis ppb Bereich) mit einem hohen Signal-Rausch Verhältnis detektieren zu können
- ❖ Reversibilität und Reproduzierbarkeit der Messeffekte
- ❖ schnelles Ansprechverhalten
- ❖ Linearer Zusammenhang zwischen dem erhaltenen elektrischen Signal und der Analytkonzentration über einen weiten Arbeitsbereich
- ❖ Langzeitstabilität der sensitiven Schicht
- ❖ Chemische und mechanische Stabilität des Bauteils
- ❖ Geringer Drift des Sensorsignals, respektive Unabhängigkeit von den äußeren Bedingungen, wie Druck, Temperatur, Feuchte...
- ❖ Miniaturisierbarkeit
- ❖ Kompatibler Ausgang für die verwendete Elektronik

- ❖ Kostengünstig in Herstellung, Betrieb und Wartung
- ❖ Leichte Kalibrierbarkeit, sowie leichte Bedienbarkeit – selbst von Laien

1.4. Anwendungsgebiete

Es gibt eine Reihe von Chemosensoren⁹, die am Markt erhältlich sind. Zu den kommerziell gebräuchlichsten Chemosensoren gehört die Lambdasonde^{10,11}, welche das Treibstoff-Luftverhältnis in Kraftfahrzeugen regelt. Bekannt ist auch der Taguchi-Sensor, mit dem aus beschädigten Leitungen ausströmendes Gas detektiert werden kann. Daneben auch die pH-Elektrode, die Clark-Elektrode¹² zur Messung der Sauerstoffkonzentration und die ionenselektiven Elektroden oder ionenselektive Feldeffekttransistoren¹³ (ISFET), die zur Bestimmung von Alkali- und Erdalkalimetallen im Blut herangezogen werden, zu den Chemosensoren zählen. Neben den Chemosensoren stehen die Biosensoren, die mit biologischen Komponenten ausgestattet sind. Biosensoren basieren auf der direkten räumlichen Kopplung eines immobilisierten biologisch aktiven Systems mit einem Signalumwandler (Transducer) und einem elektronischen Verstärker. Für die Erkennung der zu bestimmenden Substanzen nutzen Biosensoren biologische Systeme wie Antikörper, Enzyme, Organellen und Mikroorganismen. Die Biosensoren werden vor allem in der Biotechnologie eingesetzt. Die Chemosensoren auf der Basis von QCM (quartz micro balance) bieten einige Vorteile gegenüber anderen analytischen Nachweisstrategien. Vor allem sind die Miniaturisierung und leistbare Herstellungskosten, sowie Anwendung von mehrdimensionaler Analytik zu erwähnen. Messungen können in flüssigen oder gasförmigen Phasen durchgeführt werden, wobei auch Analyte in sehr komplexen Matrizen detektiert werden können. Wegen den schnellen Ansprechzeiten eignen sich die Chemosensoren für Online-Monitoring, der in diversen technologischen sowie lebensmitteltechnologischen Bereichen, bei umweltrelevanten Fragestellungen oder im klinischen Alltag zu Nutze kommt.

Durch die Verwendung von molekular geprägten Polymeren (MIP) kombiniert mit elektrogravimetrischen Signalumwandlern werden sensitive und selektive Nachweisstrategien für anorganische, organische Analyte, sowie Bioanalyte. Es wurden zahlreiche Publikationen über die Herstellung und mögliche Anwendungen von Chemosensoren auf Prinzip von MIP-Strategien: für die Detektion von polyzyklischen aromatischen Kohlenstoffen^{14,15,16} (PAHs), für die Überwachung von Motorölen^{17,18,19} oder für die Viren, Bakterien, Blutzellen²⁰ oder verschiedene Enzyme^{21,22,23,24} oder Peptide wie Insulin²⁵.

1.5. Aufgabenstellung

Die label-free Detektion von Mikroorganismen²⁶ nahm in letzten Jahren an Bedeutung zu. Die Entwicklung von geeigneter sensitiver Schicht für biologische Systeme und Moleküle ist nicht nur in Medizin, sondern auch für die Anwendung in Biotechnologie und Prozesskontrolle von Interesse. Durch die Kombination von biomimetisch geprägten Oberflächen mit massesensitiven Transducern erhält man ein robustes und miniaturisiertes System. Die Methode des molekularen Prägens kann prinzipiell für verschiedenste Analyte angewendet werden – von den kleinsten Molekülen bis hin zu großen Mikroorganismen, die bis zu einigen Mikrometern groß sind. Modellierung von Bioanalyten durch Polymere und deren Verwendung zur Strukturierung von Oberflächen: Die Schnellanalytik von Bioanalyten kann mit massesensitiven Sensoren durchgeführt werden. Hierzu verwendet man strukturierte Oberflächen, die selektiv Zellen aus der Lösung anreichern können. Vorteilhaft ist bei dieser Strategie, dass kein Labelling notwendig ist, da die massesensitive Detektion ein generelles Verfahren darstellt. Entscheidend ist hierfür die Optimierung der Selektivität, die über die Geometrie der Biopartikel und die Wechselwirkung zwischen Schicht und Analyt erreicht werden kann.

Engpass bei einem derartigen Vorgehen ist die Variabilität und Degradation von Bioanalyten. Zellen unterliegen einem Wachstumsprozess und infolge der Nährlösung laufen unterschiedliche Veränderungen ab. Hervorzuheben sind insbesondere der Mitosestatus, Knospungen und die Bildung von Dimeren wie dem M-Zustand. Zur Standardisierung sind deshalb Plastik-Zellen von Interesse, die in eindeutiger Weise einen definierten Typus charakterisieren. Zu deren Herstellung werden Polymere mit den jeweiligen Zellen über eine Stempel-methode strukturiert und die Hohlräume mit einem anderen Polymer ausgegossen. Mit diesem synthetischen Stempel können dann standardisierte Prägungen durchgeführt werden. Das Problem bei dieser Methode ist die Trennung von Stempel und Oberfläche, was durch Variation der Polymere erreicht werden soll. Insbesondere ist hierbei das Ausmaß der Wasserstoffbrückenbindungen entscheidend.

2. Theoretische Grundlagen massensensitiver Messtechnik

Massensensitive Sensoren beruhen auf der Veränderung der Masse einer Schicht und damit verbunden der Frequenz in Gegenwart eines Analyten. Der Transducer liefert dann ein elektrisches Signal, der der Analytmasse proportional ist, die sich in die chemisch sensitive Schicht einlagert.

In dieser Arbeit wurde als massensensitiver Transducer ein Schwingquarz, oder QMB (Quartz Micro Balance) mit einer Resonanzfrequenz $10 \text{ MHz} \pm 10 \text{ kHz}$ verwendet. Ihre Funktionsweise beruht auf der Fähigkeit unter dem Einfluss von elektrischen Wechselfeldern mechanische Schwingungen auszuführen. Durch Masseänderung werden die Schwingungsfrequenzen von Quarzen beeinflusst und in Kombination mit einer geeigneten chemisch sensitiven Schicht detektiert.

2.1. Die Piezoelektrizität

Bestimmte Kristalle, wie Quarz²⁷ (SiO_2), lassen sich auch rein mechanisch durch eine Druck-, Zug- oder Schubspannung, also ohne ein äußeres elektrisches Feld, polarisieren. Dazu wird eine dünne Platte senkrecht zu einer so genannten polaren Achse des Kristallgitters aus einem größeren Einkristall herausgeschnitten.

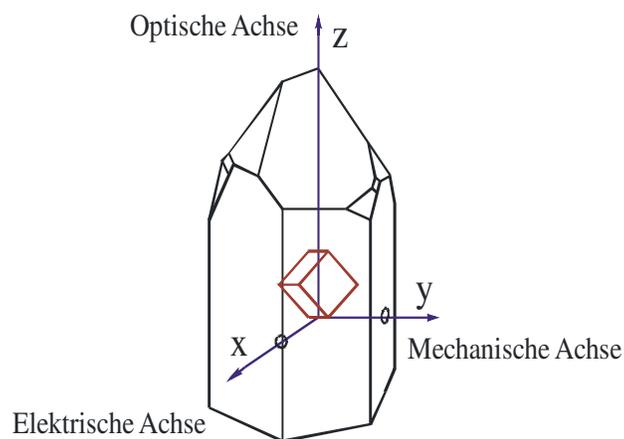


Abbildung 2: Querschnitt eines Quarzkristalls: die kristallographischen Achsen z (optische Achse), x (elektrische Achse) und y (mechanische Achse).

Komprimiert man eine Quarzplatte in Richtung dieser polaren Achse, so verschieben sich die positiven Silizium- und die negativen Sauerstoff-Ionen aus ihren Normallagen im Kristallgitter so, dass ihre Ladungsschwerpunkte nicht mehr zusammenfallen und dadurch Dipole entstehen. Im Inneren der Kristalle kompensieren sich die Ladungen dieser Dipole, nur auf der einen Grenzfläche entsteht ein Überschuss an positiver und auf der gegenüberliegenden Seite ein Überschuss an negativer Ladung (longitudinaler piezoelektrischer Effekt). Eine geringere Polarisation zeigt der senkrecht zur polaren Achse auftretende transversale piezoelektrische Effekt. Der umgekehrte piezoelektrische Effekt, für massensensitive Bauteile wichtige Phänomen, ist die Elektrostriktion. Dieser Effekt tritt auf, wenn eine Spannung über zwei Elektroden (entlang der x-Achse) an dieses Material angelegt wird. Die Deformation des Kristalls erfolgt dann in Richtung der y-Achse. Die Elektrostriktion wird zur Anregung einer akustischen Welle im Quarzkristall ausgenutzt.

Quarz kristallisiert in hexagonalen Säulen mit meist pyramidalen Enden. Er liegt in zwei Modifikationen vor, bei Normalbedingungen liegt SiO_2 als α -Quarz vor, und wandelt sich bei 573°C in die β -Modifikation um. In der Abbildung (2) wird ein idealisierter Quarzkristall mit seinen kristallographischen Achsen gezeigt.

Der mathematische Zusammenhang zwischen elektrischem Feld und der mechanischen Deformation wird durch folgende Gleichung wiedergegeben:

$$E = \delta \frac{\Delta x}{x}$$

E..... elektrische Feldstärke

x..... Auslenkung, mechanische Deformation

δ piezoelektrische Konstante

Gleichung 1

Die Größe δ ist die piezoelektrische Konstante. Sie ist stoffspezifisch und von der Orientierung der wirkenden Kraft in Bezug auf die verschiedenen Kristallrichtungen abhängig. Typische Werte für d weisen 10^9 bis 10^{11} V/m auf.

2.2. Der Schwingquarz (QCM)

Schwingquarze, oder Quarz-Mikrowaage (englisch Quartz Micro Balance), sind fein geschliffene Quarzplättchen, auf deren Oberflächen Elektroden angebracht werden. Legt man an einen Schwingquarz über die angebrachten Elektroden ein elektrisches Feld an, so tritt dieses bei bestimmten Frequenzen mit den erzeugten mechanischen Schwingungen in Resonanz. Die Resonanzfrequenz ist von verschiedenen Faktoren abhängig: Temperatur, dem kristallographischen Schnitt, Elastizität des verwendeten Materials, der bewegten Masse, den elektrischen Charakteristika der umgebenden Elektronik und von der Viskosität der Umgebung. Für die jeweiligen Eigenschaften des Schwingquarzes ist die Wahl des kri-

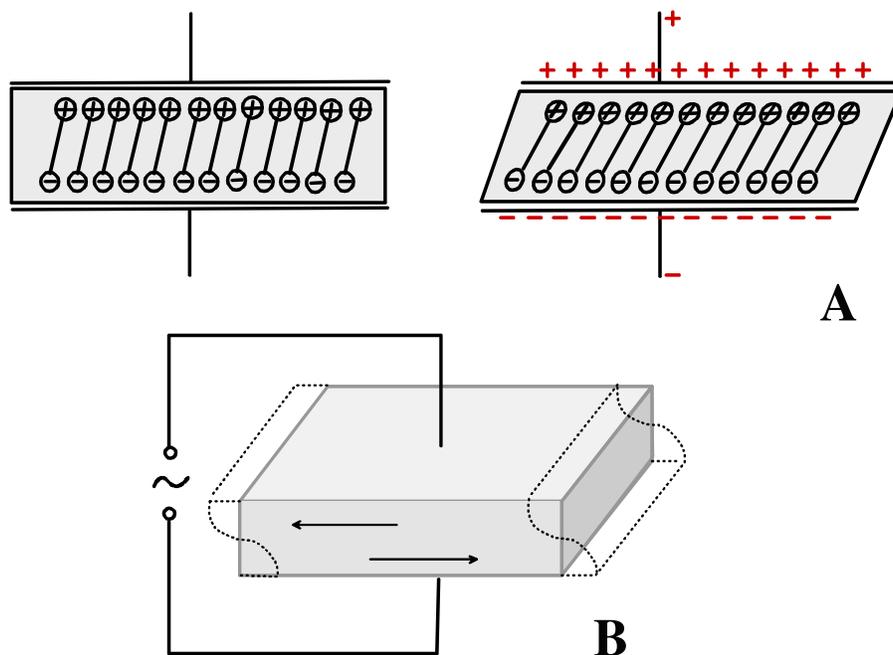


Abbildung 3: Dipolmoment: schematische Darstellung des Dipolcharakters eines Schwingquarzes. (A) Durch Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes – als Gleichspannung wird der Quarzkristall deformiert. (B) Durch die Anlegung von Wechselspannung wird Scherdeformation des Materials erzielt.

stallographischen Schnittes sehr wichtig. Dadurch ergeben sich verschiedene Schwingungsmoden: Oberflächen-, Dicken-, Flächenscher- und Dickenscherschwingung – siehe Abbildung (3).

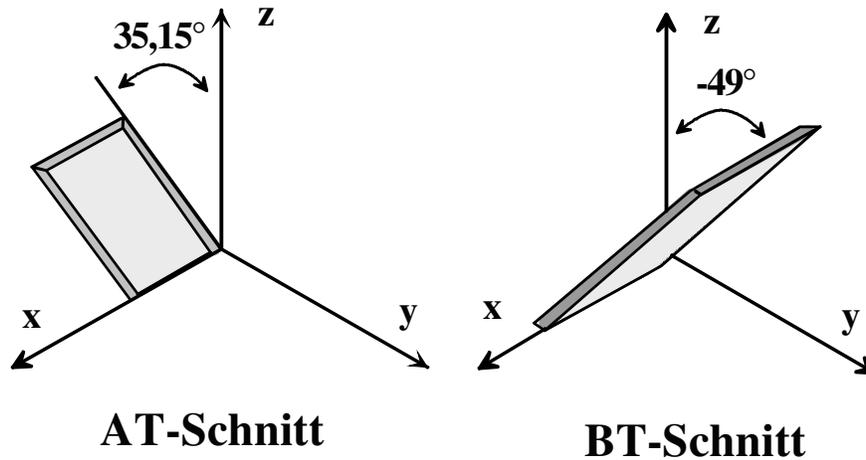


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines AT-cut und BT-cut Quarzkristalles: die AT und BT-Schnitte haben eine sehr geringe Temperaturabhängigkeit.

Die meisten kommerziell erhältlichen Schwingquarze sind AT-cut Quarze (Abbildung 4). Dieser Schnittwinkel garantiert eine bevorzugte Anregung der Dickenscherschwingungsmode (TSM, Thickness Shear Mode). Die AT-cut Schwingungsform weist minimale Temperaturabhängigkeit der Resonanzfrequenz und gute elektrische Anregbarkeit auf.

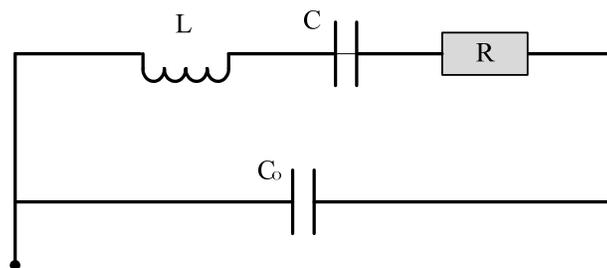


Abbildung 5: Ersatzschaltbild eines QMB-Resonators.

Ist der Schwingquarz unbeladen, lässt sich bei geringer Dämpfung und Belastung das Modell von Butterworth und van Dyke²⁸ näherungsweise anwenden. Die dynamische Kapazität C entspricht der elastischen Nachgiebigkeit des Quarzes, die

Induktivität L der trägen Masse des Quarzes. Der Widerstand R charakterisiert dann die Dämpfung, und C_0 beschreibt letztendlich die statistische Kapazität, welche hauptsächlich durch Anschlüsse, angebrachte Goldelektroden und Kabel verursacht wird. Diese elektrischen Eigenschaften eines Schwingquarzes können durch sein Ersatzschaltbild dargestellt werden – siehe Abbildung (5).

$$f_s = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}}$$

$$f_p = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}} \sqrt{1 + \frac{C}{C_0}}$$

Gleichung 2: Serielle und parallele Resonanz

Für den Quarz ergeben sich zwei Eigenfrequenzen – die serielle Resonanz f_s und die parallele Resonanz f_p . Der mathematische Zusammenhang wird in den obenliegenden Gleichungen (2) zusammengefasst.

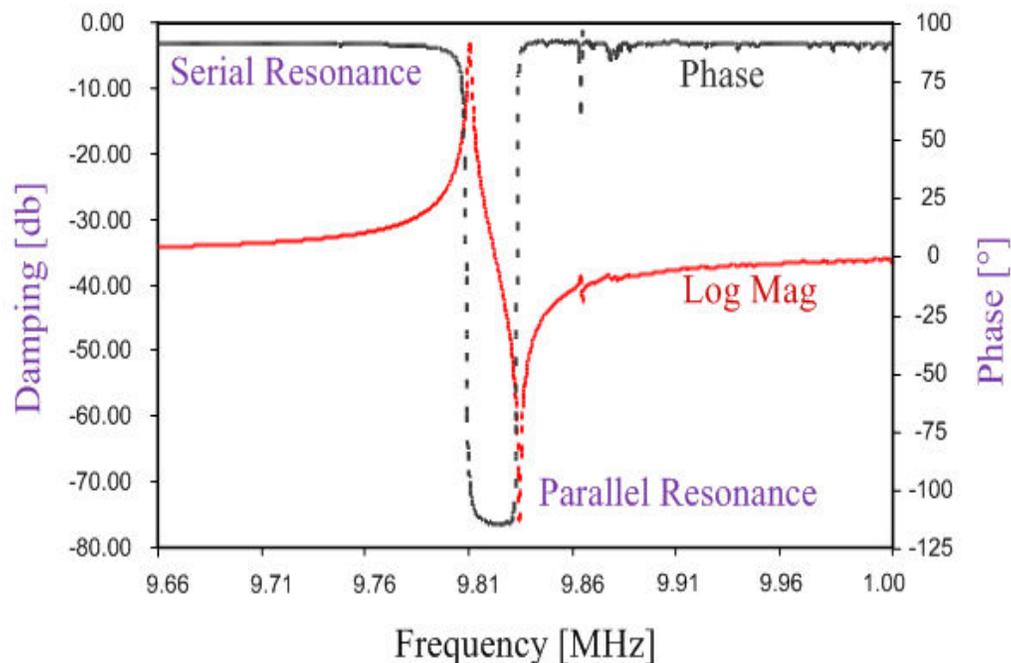


Abbildung 6: Das Dämpfungs- und Phasenspektrum eines 10 MHz Resonators

Durch das Anlegen von variabler Wechselspannungsfrequenz an ein AT-cut Schwingquarzes mit aufgebrachtten Goldelektroden mittels eines Netzwerkanalysators, erhält man ein Dämpfungsspektrum. In der Abbildung (6) sind neben den beiden Resonanzen – serielle und parallele Resonanz - auch die Nebenresonanzen, nämlich die Twist und die asymmetrische Schwingung, die bei höheren Frequenzen auftreten, aufgezeichnet. Diese können durch geeignete Wahl der Geometrie und der Durchmesser der Elektroden weitgehend unterdrückt werden.

2.3. Die Prinzipien der massensensitiven Detektion

Zur Berechnung der Massenbeladung der Elektrodenoberflächen von QMB im Vakuum oder an Luft wird die Sauerbrey-Gleichung²⁹ herangezogen. Diese Gleichung beschreibt die direkte Proportionalität zwischen Frequenzänderung der Resonanzfrequenz und der absorbierten Masse. Diese ist aber nur für starre und sehr dünne Schichten gültig.

Aus der Gleichung (3) ist es ersichtlich, dass das Quadrat der Grundfrequenz (f_0) als Proportionalitätskonstante in den Zusammenhang zwischen der Frequenzänderung³⁰ (Δf) und der Massenänderung (Δm) eingeht. Das bedeutet, dass eine Steigerung der Grundfrequenz eine erhebliche Erhöhung der Sensitivität mit sich bringt.

$$\frac{\Delta f}{f_0} = - \frac{\Delta m}{m} = - \frac{\Delta m}{Ad\rho}$$

ΔfFrequenzänderung

f_0Grundfrequenz

dDicke des Quarzes

ΔmMassenänderung

ρDichte der Schicht

AElektrodenfläche

Gleichung 3: Sauerbrey-Gleichung

Die Nachweisgrenzen eines 10 MHz Schwingquarzes liegen etwa im ng-Bereich. Für die Flüssigphasenmessungen müssen zusätzliche Terme, welche die Wechselwirkungen des Sensors mit einer Flüssigkeit berücksichtigen, eingeführt werden. Diese Korrekturterme beziehen die Viskosität und die Dichte der benetzten Flüssigkeiten ein – siehe Gleichung (4). Es gibt da auch andere Einflüsse auf das Sensorsignal, die da eine Rolle spielen, wie die Temperaturabhängigkeit der Viskosität der Flüssigkeit^{31,32}, die den Analyt enthält, sowie ionische Effekte, die durch die Verwendung von Puffersalzen entstehen.

$$\Delta f = -cf_0^2 \Delta m - cf_0^{\frac{3}{2}} (\Delta \eta \Delta \rho)^{\frac{1}{2}}$$

Δf Frequenzänderung

ρDichte der Flüssigkeit

ηViskosität der Flüssigkeit

Δm Massenänderung

f_0Resonanzfrequenz

c $-2,26 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{Hz}\cdot\text{g}$

Gleichung 4: Sauerbrey-Gleichung für flüssige Phase

Die technischen Daten der verwendeten Schwingquarze bezüglich der Eigenfrequenz, Frequenzauflösung oder der Nachweisgrenze befinden sich in der Tabelle

Eigenfrequenz	10 MHz
Resonatordicke	0,167 mm
Resonatoroberfläche	0,24 cm²
Frequenzauflösung	+/- 0,1 Hz
Massensensitivität	951 Hz/μg
Nachweisgrenze	0,6 ng
Schichtdickeneffekt	40 nm/kHz

Tabelle 1: Physikalische Eigenschaften der verwendeten Schwingquarze.

(1). Bei einer Grundfrequenz von 10 MHz und einer Fläche von $0,55 \text{ mm}^2$ beträgt die Massensensitivität des Schwingquarzes $0,42 \text{ Hz/ng}$. Somit können etwa 10 ng Substanz pro cm^2 Elektrodenfläche bei einem Rauschen von etwa $0,1 \text{ Hz}$ aufgelöst werden. Bei homogener Beschichtung beträgt die Frequenzerniedrigung etwa $950 \text{ Hz}/\mu\text{g}$ oder 34 Hz/nm Schicht bei einer Substanzdichte von 1 g/cm^3 .

2.4. Molekulares Prägen

Molekulares Prägen stellt ein Verfahren für die Herstellung von chemisch sensitiven Schichten dar, die sowohl für die Flüssigphasenmessung als auch die Gasphasenmessung verwendet werden. Die Grundlage für diese Methode stammt von G. Wulff³³ und K. Mosbach³⁴ aus den 70igern, die hoch quervernetzte organische Polymere für die spezifischen Imprints verwendeten. Mit der Host-Guest Chemie werden Hohlräume und Ringsysteme generiert, in die sich Analytmoleküle einlagern können. Für solche Materialien kommen Cyclophane³⁵, Calixarene³⁶ oder Cyclodextrine³⁷ zum Einsatz.

Zur Herstellung der chemisch sensitiven Schichten mit der soft-lithographischen Strategie werden vorpolymerisierte Polymere mit einem Stempel mit aufgetragenem Templat (deutsch Schablone, Vorlage) versehen. Das Polymer polymerisiert aus, und der Stempel kann entfernt werden. Nach Entfernung des Templates entstehen im Polymer Kavitäten, die eben der Größe und Form des verwendeten Templates entsprechen. Lässt man als Templat ein Analyt mit dem Polymer auspolymerisieren, und anschließend durch Herauswaschen oder Verdampfen entfernen, so erhält man einen spezifischen Abdruck, der eine selektive Wiedereinlagerung des Analyten erlaubt. Somit entsteht eine selektive Prägung³⁸, die dem Schlüssel-Schloss-Prinzip ähnlich ist.

Die folgende Darstellung (7) soll einen für chemische sowie biologische Anwendungen relevanten Prägevorgang veranschaulichen. Als Analyt nimmt man eine entsprechende organische Verbindung oder eben ein Mikroorganismus³⁹ wie in

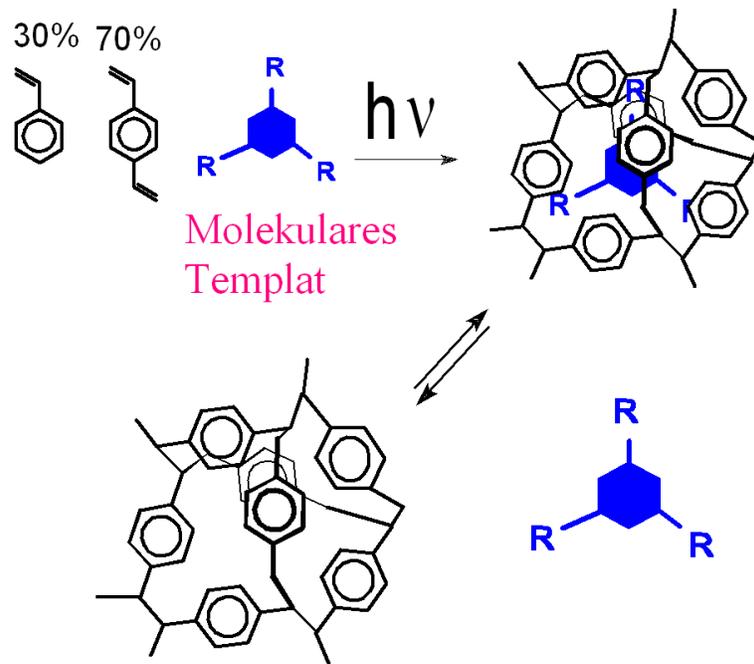


Abbildung 7: Schematische Darstellung für molekulare Prägung von organischen Molekülen.

dieser Arbeit Bakterien und verschiedene Hefegattungen, die auf einen glatten Stempel aufgebracht werden. Auf den Transducer wird eine polymerisierende Schicht aufgetragen. Der Stempel mit dem Templat wird dann in die Oberfläche des Transducers mit wenig Druck gedrückt und fixiert. Nach dem Auspolymerisieren wird der Stempel abgelöst und die Template, also Prägemoleküle oder -bakterien, von der oberflächengeprägten Polymerschicht entfernt. Die Wechselwirkungen zwischen dem Analyt und der Sensorschicht können recht unterschiedlich sein, von Adsorption und Absorption bis hin zur Chemisorption. Da für die sensorische Anwendungen natürlich die Reversibilität der Wechselwirkung zwischen dem Analyt und der Sensorschicht eine wichtige Bedingung ist,

kommen nur Ad- und Absorptionsmechanismen in Frage, also selektive nicht-kovalente Erkennungsprozesse.

2.5. Rasterkraftmikroskop (AFM)

Atom-Kraft Mikroskopie (Abbildung 8), auf Englisch Atomic Force Microscopy (AFM), ist eine der SPM-Techniken⁴⁰ (Scanning Probe Microscopy). Bei allen SPM-Techniken wird eine Oberfläche mit einem Scanner Punkt für Punkt abgetastet, wobei daraus ein Bild erstellt wird. Das erste SP-Mikroskop wurde von Gerd Binnig und Heinz Rohrer⁴¹ 1981 vorgestellt: Rastertunnelmikroskop (STM, englisch Scanning Tunneling Microscope). Das Raster-Tunnel-Mikroskop⁴² verwendet als Analyse-Methode den Tunnelstrom. Der Tunnelstrom ist exponentiell von der Elektroden-Distanz abhängig. Auf Grund der Steilheit der e-Funktion wird auch die Auflösung höher, das heißt, je näher die Spitze zur Probenoberfläche ist, umso höher die Auflösung erreicht wird. Mit Hilfe eines piezoelektrischen Stellelements wird subatomare Positionsgenauigkeit erreicht: Eine Sonde aus Platin/Iridium oder Wolfram in z-Richtung auf 1 bis 2 nm an die Oberfläche einer elektrisch leitenden Probe herangeführt. Bei diesem Abstand überlappt sich die Elektronenwolke des Atoms an der Sondenspitze mit der des Atoms an der gegenüberliegenden Probenoberfläche. Durch Anlegen einer geringen Spannung zwischen Sonde und Probe können die Elektronen den geringen Abstand zwischen beiden Atomen, welcher für die Elektronen eine Potentialbarriere darstellt, durchtunneln. Es entsteht ein Tunnelstrom, dessen Stärke empfindlich vom Abstand zwischen Sonde und Probe und damit vom Höhenrelief der abgetasteten Oberfläche abhängt. Eine Abbildung der Probenoberfläche kann erzeugt werden, indem die Sonde rasterartig in x- und y-Richtung über die Probenoberfläche mit subatomarer Rasterweite geführt wird.

Neben den AFM-Methoden werden SNOM (Scanning Near Field Optical Microscopy), STM (Scanning Tunneling Microscopy), MFM (Magnetic Force

Microscopy) und EFM (Electrostatic Force Microscopy) verwendet. Bei der MFM werden durch die Verwendung von magnetisierenden Spitzen magnetische Domänen untersucht, also lokale Veränderungen der magnetischen Kräfte auf den ferromagnetisch beschichteten Kantilever. Bei der EFM-Methode können zusätzlich elektrostatische Wechselwirkungen untersucht werden, da elektrostatische Kräfte einen Stromfluss zwischen der Probe und Spitze verursachen. SNOM verwendet einen Saphirkristall, über den ein Laserstrahl eingebracht wird und die Reflexion an der Oberfläche der Probe gemessen wird.

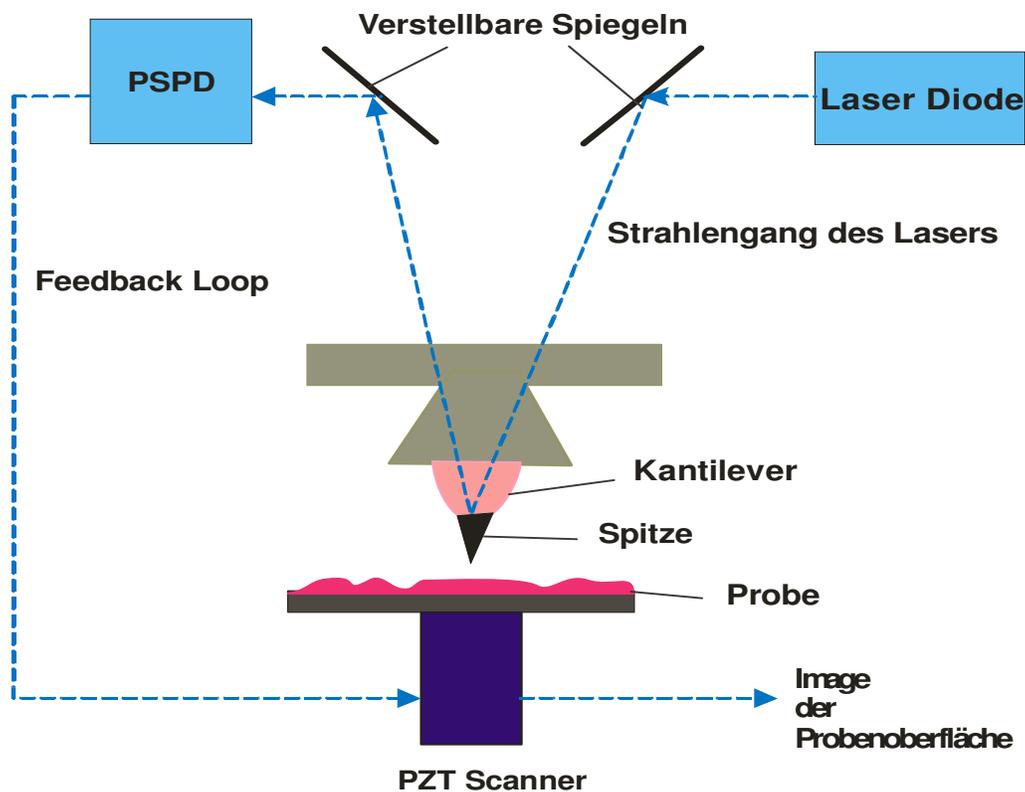


Abbildung 8: Schematische Darstellung des AF-Mikroskopes.

AFM hat verglichen mit herkömmlichen Mikroskopen entscheidende Vorteile bei der Erforschung biologischer⁴³ und physikalischer Fragestellungen. Mit dieser Technik können strukturelle Eigenschaften der Probe mit der Auflösung bis zum atomaren Bereich abgebildet und vermessen werden. Ein weiterer Vorteil von AFM liegt in der Möglichkeit, sich die Proben auch unter nahezu nativen

Bedingungen, also in Flüssigkeit, anschauen zu können. Damit gehört AFM zu den am häufigsten angewandten Techniken für die Biologie, Biochemie oder Medizin zur Oberflächenanalyse von Proteinen und Zellen unter physiologischen Bedingungen.

Bei den AFM-Methoden werden Contact-Mode, Noncontact-Mode und Tapping Mode unterschieden. Eine Erweiterung der Tapping Mode AFM stellt Phase-Imaging dar. Mittels Non-Contact und Tapping Mode können vor allem elastische Proben analysiert werden, da die Spitze hier nicht im mechanischen Kontakt mit der Probenoberfläche steht. Im Contact Mode rastert die Spitze über die Oberfläche der Probe, wobei sie die abstoßenden Coulombkräfte der Festkörper erfährt. Bei einer harten Feder und einer relativ weichen Probe kann sich die Oberfläche verformen. Zusätzlich treten noch anziehende van der Waals-Kräfte und Kapillarkräfte, die durch den vorhandenen Feuchtigkeitfilm in der Umgebungsluft entstehen, auf. Bei dem Non-Contact Mode handelt es sich um eine dynamische Methode verglichen mit Contact Mode. In diesem Fall wird der Kantilever zu Schwingungen angeregt, wobei die Frequenz der Anregung etwas oberhalb der Resonanzfrequenz des Kantilevers gewählt wird. Die Spitze rastert über die Probenoberfläche berührungsfrei, die Entfernung sind etwa 10 bis 100 Angström. Bei der Annäherung an die Oberfläche wirken van der Waals-Kräfte und Kapillarkräfte, beides sind attraktive Kräfte und bewirken, dass die Amplitude der Schwingung gedämpft wird. Die Dämpfung lässt sich dann über die Photodioden nachweisen.

Alle in dieser Arbeit abgebildeten AFM-Bilder wurden mittels Contact Mode⁴⁴ durchgeführt: Die Probenoberfläche wurde mit einem flexiblen Kantilever, an dessen Ende eine Spitze befestigt wurde, abgescannt. Der Kantilever ist ein Balken aus Siliziumnitrid, 100-500 μm lang und 0,5-5 μm dick. Die Spitze hat ein Endradius von 2-20 nm. Durch Abrastern der Probenoberfläche in x- und y-Richtung wird die Spitze systematisch über ein Feld mit konstanter Kraft geführt. An der Rückseite des Kantilevers wird ein Laserstrahl reflektiert, der auf einen

Photodetektor gelenkt wird. Der Laserstrahl liefert Daten über die Verbiegung und Verdrillung des Kantilevers. Dieser Wert wird in einen feedback loop eingespeist und mit einem Sollwert verglichen. Die Abweichungen durch die Verbiegung erzeugt, liefern das Signal zur Steuerung des z-Piezos: Über die Feedback-Schleife wird das am Segment-Detektor gemessene Signal wieder auf das Basissignal rückgestellt und damit die Sollkraft hergestellt. Durch die Ermittlung der x-, y-Position und des Regelsignals des z-Piezos während der Messung kann ein topographisches Bild aufgebaut werden. Die Messung kann sowohl in Gas-, als auch in Flüssigphase durchgeführt werden.

3. Experimenteller Teil

3.1. Elektrodendesign

Für die Messung in der Flüssigphase⁴⁵ werden zur Minimierung von Leitfähigkeitseffekten zwei unterschiedlich große Elektroden verwendet. Der Grund für die Beeinflussung der Resonanzfrequenz durch die Ionenstärke der Lösung liegt in der unterschiedlichen Ablenkung der Feldlinien. Man benutzt duales Elektroden-Design, was bedeutet, dass eine Elektrode als Referenzelektrode dient (Abbildung 9, 10). Nach Differenzbildung der beiden Signale der selektiven und unselektiven Seite kann eine vollkommene Unabhängigkeit der Sensorantwort von unselektiven Frequenzerniedrigungen gewährleistet werden. Dies können neben Temperatur und Leitfähigkeitseffekten auch unselektive Adsorptionen des Analyten in die Schicht sein.

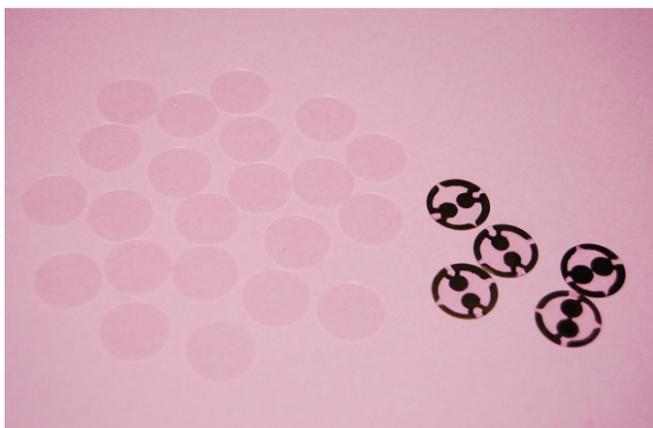


Abbildung 10: Ein Beispiel für Standardelektrodendesign: Goldelektroden auf der oberen Seite des Schwingquarzes sind in dunkler Farbe, kleineren Elektroden werden auf die untere Seite gebracht; im Bild sind sie durch die hellere Farbe gekennzeichnet.



Abbildung 9: Vergleich von kommerziell erhältlichem Schwingquarz mit aufgedampften Goldelektroden mit dem verwendeten Quarz. Beide Quarze weisen Resonanzfrequenz von 10 MHz auf.

Die verwendeten Schwingquarze weisen eine Grundfrequenz von 10 MHz (± 10 kHz) auf, wobei der Durchmesser 15,5 mm und die Dicke von 160 μm auf. Es

wurden durchsichtige Quarzplättchen ohne kommerziell aufgedampfte Elektroden verwendet.

3.2. Erstellen der Elektroden

Die Goldelektroden werden mittels Siebdruckverfahren auf den Schwingquarz über eine Schablone aufgebracht (Abbildung 11). Für die Herstellung geeigneter Geometrie der Elektroden werden diese im Designer-Programm optimiert und später auf ein spezielles Papier, das mit Öl imprägniert wird, gedruckt. Dieses wird auf eine Photofolie gelegt und mit UV-Licht für 5 bis 15 Minuten belichten lassen. Ein Sieb mit Maschenweite von 41 μm wird auf ein Metallrahmen der Maßen 10x10 cm festgeklebt. Über das Material wird UV Photolack dünn bezogen und für 20 Minuten lang in einer abgedunkelten Kammer trocknen gelassen. Für die Entwicklung wird der Photolack auf einem UV-Belichtungstisch für 40 Minuten bestrahlt und danach mit destilliertem Wasser gewaschen.

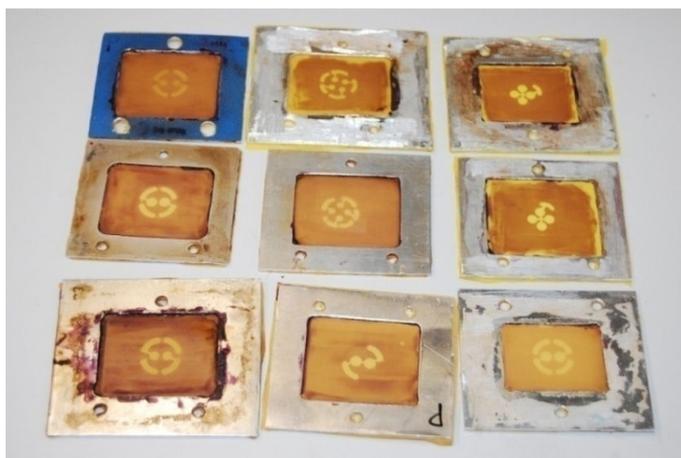


Abbildung 11: Schablonen zum Beschichten der Schwingquarze mit Elektrodenpaste.

Zum Aufbringen der Goldelektroden wird das Quarzplättchen auf die Ansaugvorrichtung platziert (Abbildung 12), mit Vakuum fixiert und das Sieb darüber positioniert. Die Goldpaste (Fa. Heraeus) wird mit einer Rakel aufgetragen und

glatt abgezogen. Anschließend werden die Elektroden 2 Stunden bei 400° C eingebrannt. Die in der Goldglanzpaste enthaltenen organischen Lösungsmittel pyrolysieren dabei und die Goldschicht verteilt sich weitgehend homogen. Die Dicke von Goldelektroden kann durch Messungen der Resonanzfrequenz am Netzwerkanalysator abgeschätzt werden. Oder für exaktere Bestimmungen der Elektrodendicke kann das AFM herangezogen werden.

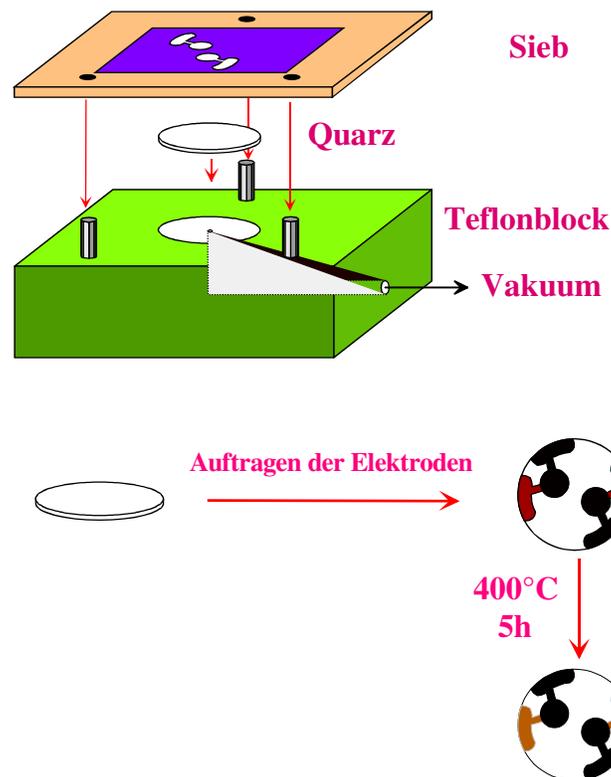


Abbildung 12: Siebdruckverfahren zur Herstellung der Goldelektroden: Aufbringen der Goldpaste und anschließend Pyrolysieren des Lösungsmittels im Ofen.

Die Goldelektroden können durch Behandlung der Quarze im Königswasser – ein Gemisch aus konzentrierter Salpetersäure und konzentrierter Salzsäure im Verhältnis 1:3 regeneriert werden, also die Elektrodenschicht wird unter Ausbildung von Tetrachloridogold(III)säure herunter gewaschen.

3.3. Sensitive Schichten

Als Schichtmaterial wurden verschiedene Polymersysteme getestet und in der Zusammensetzung variiert. Die Eigenschaften eines solchen Polymers beziehen sich auf den Analyt, respektive den Templat. In diesem Fall handelt es sich um Mikroorganismen, für die sich Polymere am besten eignen. Am günstigsten erschien als Polymer Polyurethan mit Tetrahydrofuran oder Dioxan als Lösungsmittel. Daneben wurden die Schwingquarze auch mit einem hydrophilen Polymer – Polyacrylat, respektive Polymethacrylat - beschichtet. Dieses Material zeichnet sich durch Biokompatibilität aus, die Haftung auf den Goldelektroden ist aber geringer als beim Polyurethan.

Die verwendeten Polymere wurden frisch hergestellt und auf die Quarze in zähflüssigem Zustand aufgebracht und bei Raumtemperatur oder im Ofen auspolymerisiert gelassen.

3.3.1. Polyurethan

Polyurethane⁴⁶, abgekürzt PUR, weisen in der Kette die charakteristische Gruppierung $-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-$ auf. Sie werden technisch durch die Reaktion von Di- und Triisocyanaten mit Di- und Polyhydroxy-Verbindungen hergestellt. Die Reaktion von Hydroxylgruppen mit Isocyanatgruppen zu Urethangruppen verläuft als Polyaddition und wird durch Protonsäuren, tertiäre Amine oder metallorganische Verbindungen katalysiert. Je nach Äquivalenz der Reaktanden oder Überschuss an Isocyanatgruppen entstehen verschiedene Gruppierungen. Diese Polyaddition ist eine Gleichgewichtsreaktion. Als Faustregel gilt, dass die entstehenden Urethane umso stabiler sind, je geringer ihre Bildungsgeschwindigkeit ist. Urethane aus aliphatischen Isocyanaten sind also stabiler als solche aus aromatischen und solche aus sekundären Alkoholen stabiler als die aus primären. Polyurethane sind gegen alkalische und saure Verseifung sehr beständig. Diese Eigenschaft und die

Vielzahl möglicher Reaktionen der Isocyanatgruppe führen zu einer Reihe von Polymeren für sehr unterschiedliche Verwendungszwecke.

In der Abbildung (13) wird der Mechanismus bei der Herstellung von Polyurethan aus den monomeren Komponenten dargestellt.

Zusätzlich zu dem zweiwertigen Alkohol wurde ein dreiwertiger Alkohol als Quervernetzer zugegeben, um die Haltbarkeit der generierten MIPs entsprechend zu erhöhen. Als Diisocyanat wurde 4,4'-Diisocyanato-Diphenylmethan (4,4'-MDI), als Alkohol Bisphenol A (BPA) und als Quervernetzer das Phloroglucin eingesetzt (Abbildung 14).

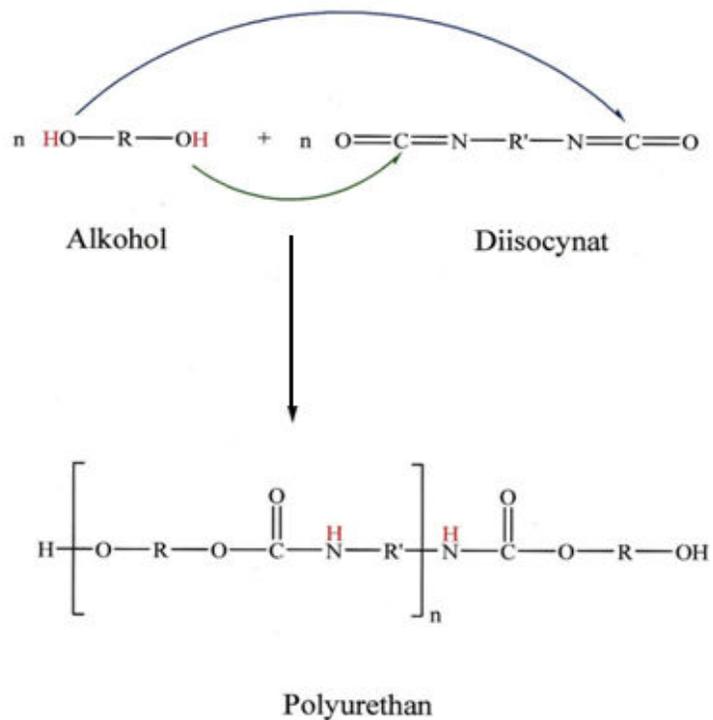


Abbildung 13: Herstellung von Polyurethan aus Diisocyanat und Dialkohol in einer Polyaddition

Da die Isocyanate mit Wasser zu Amin und Kohlendioxid abreagieren können - siehe Abbildung (15), muss darauf geachtet werden, dass die vorbereiteten Stempel mit nativem Zellmaterial trocken vorliegen.

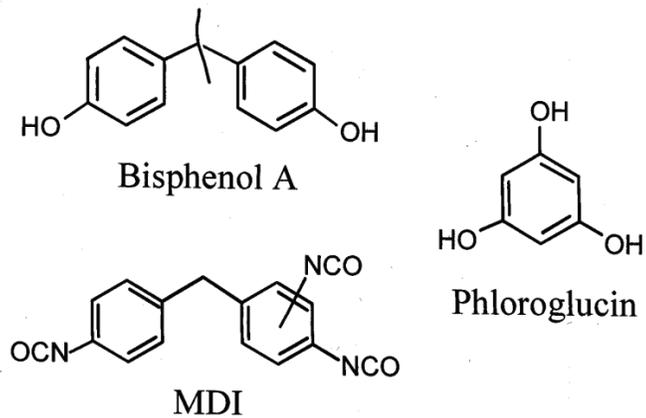


Abbildung 14: Monomere Komponenten des Polyurethans: Bisphenol A, Phloroglucin und 4,4'-Diisocyanato-Diphenylmethan.

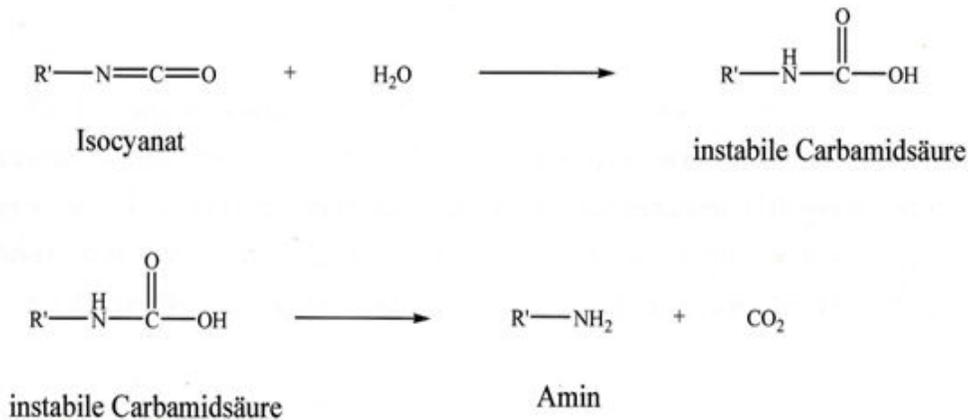


Abbildung 15: Reaktion des Isocyanat unter Feuchtigkeit

Für die Herstellung vom Polymer wird BPA mit Phloroglucin in 0,2 mL Tetrahydrofuran gelöst. Die genaue Zusammensetzung ist aus der (Tabelle 2) ersichtlich. Diisocyanat und Pyridin als Katalysator werden zugegeben. Die Vorpolymerisation erfolgt bei 70° C am Wasserbad unter Rühren - zirka 12 Minuten,

bis die klare Flüssigkeit gelartig wird, respektive bis der Gelpunkt erreicht wird, und anschließend wird sie auf 1mL Volumen mit Tetrahydrofuran verdünnt. Das vopolymerisierte Polyurethan kann man bei -20°C in der Tiefkühltruhe aufbewahren. Das Aushärten des Polyurethans kann mit FT-IR verfolgt werden (Abbildung 16, 17).

Bisphenol A	47,8 w/w %
Phloroglucin	12 w/w %
4, 4'-MDI	40,2 w/w %
Pyridin	10 μL

Tabelle 2: Zusammensetzung von Polyurethan

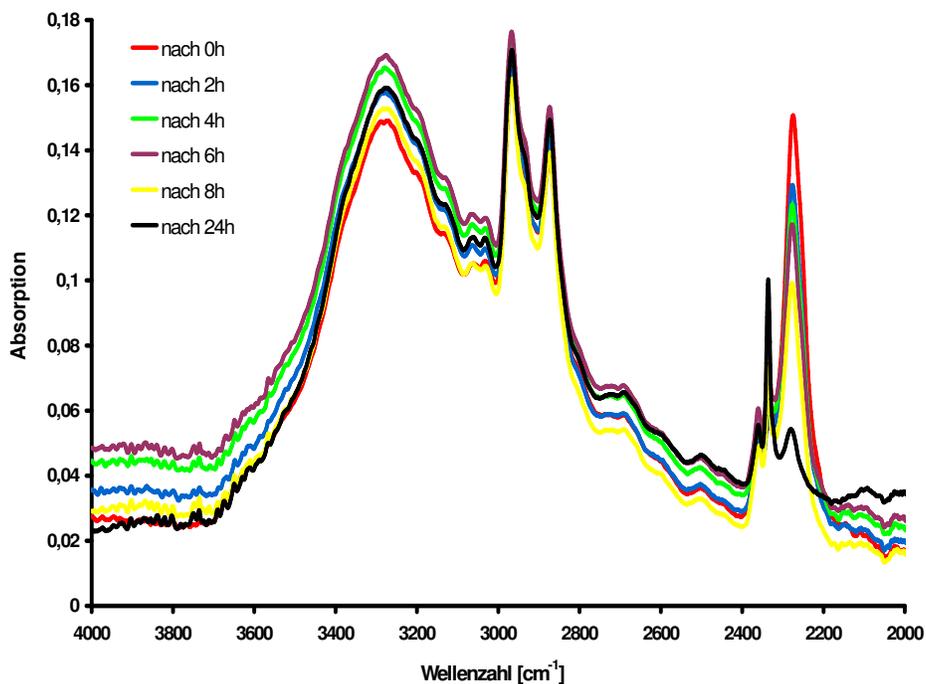


Abbildung 16: Aushärtung von Polyurethanschicht: ATR-IR Spektrum.

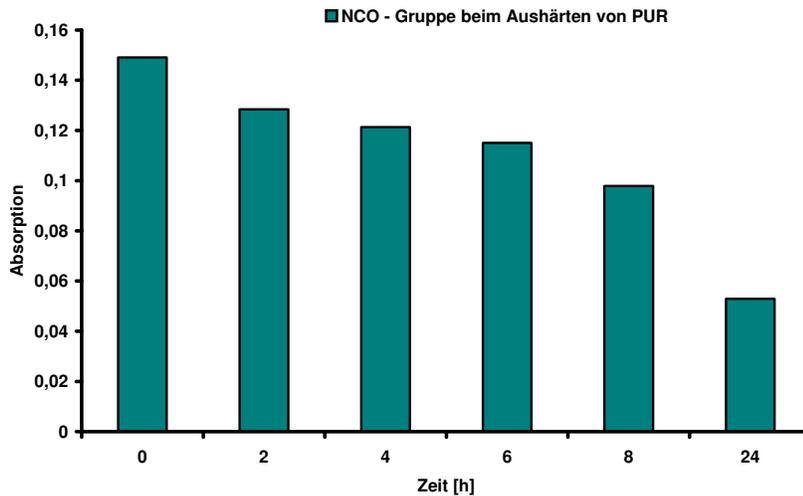


Abbildung 17: Abnahme der Intensität der NCO-Bande des Polyurethans, gemessen mit ATR-IR.

3.3.2. Polyacrylat

Unter der Bezeichnung Acrylate⁴⁷ fasst man heute die Vielzahl von Polymeren auf der Grundlage von Acrylsäure und Methacrylsäure sowie vor allem deren Ester zusammen. Bei dem Polymethacrylat handelt es sich um polymere Ester der Methacrylsäure sowie von Acrylsäurederivaten mit Alkoholen. Polyacrylate werden in der Praxis in Lacken oder Klebstoffen verwendet. Weitere Anwendung sind Superabsorber, Dispergiermittel oder Flockungshilfsmittel.

Die Herstellung läuft über radikalische Polymerisation in wässrigen Lösungen oder in Emulsionen. Für die Beschichtung von Schwingquarzen wurde Polymethacrylat als Copolymer aus Methacrylsäure, Vinylpyrrolidon und DHEBA (N, N-1,2- Dihydroxyethylenbisacrylamid) verwendet.

Die Monomere Methacrylsäure und Vinylpyrrolidon werden mit DHEBA als Quervernetzer in destilliertem Wasser vermischt und im Wasserbad bei 70° C gut gelöst. Zu diesem Ansatz wird noch AIBN (Azo-bis(isobutyronitril)) als Radikal-

starter addiert und weiter im Wasserbad rühren gelassen, bis sich nach etwa 40 Minuten eine milchig-trübe Zähflüssigkeit bildet. Das Präpolymer wurde auf den jeweiligen Quarz aufgespinnt und unter UV-Licht über 12 Stunden lang ausgehärtet.

Methacrylsäure	60 w/w %
Vinylpyrrolidon	20 w/w %
DHEBA	20 w/w %
AIBN	1,5 mg

Tabelle 3: Zusammensetzung von Polymethacrylat.

Das frisch zubereitete Polymer kann in einem Kühlschrank bei 4° C über längere Zeit aufbewahrt werden. Für die Beschichtung vom Schwingquarz wird das Vorpolymerisat entsprechend gewünschter Schichtdicke mit destilliertem Wasser verdünnt.

3.3.3. Coating

Die viskose Flüssigkeit kann prinzipiell auf zwei verschiedene Weisen auf die beiden Elektroden am Schwingquarz aufgebracht werden: Spin- und Drop-Coating Verfahren. Beim Spin-Coating Verfahren werden etwa 10 µL der Präpolymerlösung mit einer Gilsonpipette auf ein gereinigtes Quarzplättchen aufgetragen. Mittels eines Motors (Spinner) verdampft das Lösungsmittel bei 2000-3000 rpm. Es bleibt ein sehr dünner Polymerfilm auf dem Schwingquarz zurück. Die noch flüssige Polymerlösung muss die richtige Verdünnung haben, um eine bestimmte Polymerschichtdicke auf dem Schwingquarz erhalten. Eine optimale Schichtdicke für Prägung mit kleineren Mikroorganismen ist um die 450 nm; für Hefe wurden Schichtdicken im Bereich 1000 bis 3500 nm getestet.

In weiterer Folge wird ein Stempel mit dem zu bestimmenden Analyten in das noch nicht ausgehärtete Polymer gedrückt, und zwar auf eine Elektrode, die später als geprägter Teil des Quarzes verwendet wird. Nach 12 bis 48 Stunden, nachdem also ein vollständiges Auspolymerisieren gewährleistet ist, kann der Templat entfernt werden. Es entstehen Hohlräume, sogenannte Kavitäten, die bei der Messung selektiv durch die Analytmoleküle, respektive Analytzellen besetzt werden (Abbildung 18).

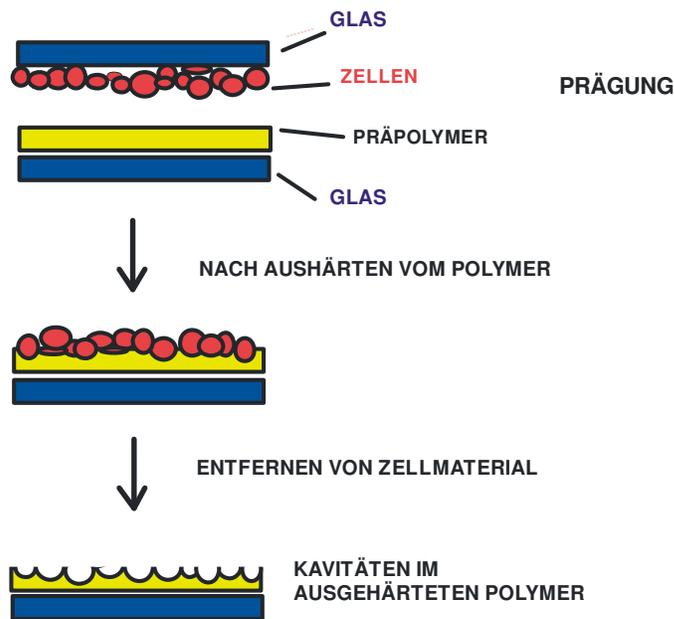


Abbildung 18: Schematische Darstellung für die Polymerprägung.

3.4. Silikone

Der Name „Silikon“ ist in der Chemie eine Sammelbezeichnung für monomere und polymere siliziumorganische Verbindungen mit Silizium-Kohlenstoff Bindungen. In der Technik bezeichnet man als Silikone nur die Polysiloxane $-O-SiRR'-$ mit organischen Substituenten R und R'. Silikone können durch polymeranaloge Umwandlung von Silicaten hergestellt werden. Technische Silikone

stellt man ausschließlich durch Polykondensationen oder Polymerisation niedermolekularer siliziumorganischer Verbindungen (Abbildung 19).

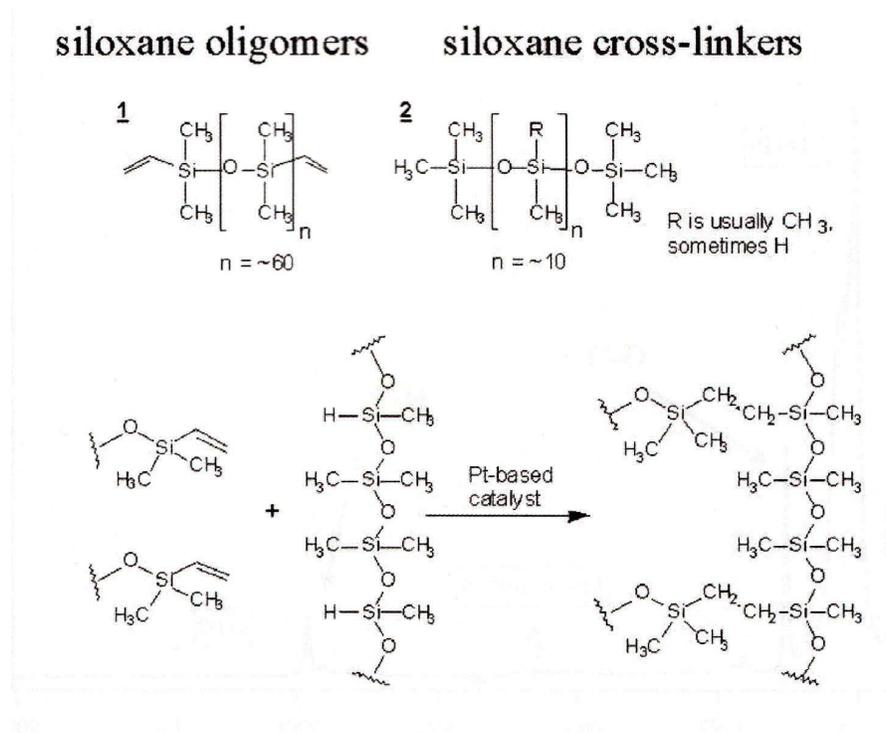


Abbildung 19: Herstellung von Silikon.

Sylgard[®] 184 ist ein flüssiges, aus zwei Komponenten bestehendes Silikon-Elastomer. Das Silikon besteht aus einem Basismaterial (Base) und einem Vernetzungsreagenz (Curing Agent). Beide Komponenten werden in einem Volumenverhältnis von 10:1 (Base mit Curing Agent) gemischt. Das Gemisch wird in einem Exsikkator mit Hilfe einer Vakuumpumpe entgast, bis die Flüssigkeit frei

Aushärtung von Silikon:

~ 48 Stunden bei Raumtemperatur
45 Minuten bei 100°C
20 Minuten bei 125°C
10 Minuten bei 150°C

Tabelle 4: Zeitliche Beschreibung zum Aushärten von Silikon.

von Luftblasen ist. Der Grund ist, dass selbst kleinste Bläschen das Ergebnis im anschließenden Vulkanisationsprozess stark beeinträchtigen. Zum vollständigen Aushärten⁴⁸ von Silikongemisch wird dieser über mehr als 2 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen, oder im Trockenschrank, wobei die Härtingszeit verkürzt sich merklich (Tabelle 4).

3.5. Aufbau der Messapparatur

Für die praktische Ausführung wurde eine Messapparatur zusammengestellt, die in der Abbildung (20) gezeigt wird.

Für die Flüssigphasenmessungen wurde eine Messzelle benötigt, in der Schwingquarze eingelegt, entsprechend der Elektrodengeometrie elektrisch kontaktiert werden und in Kontakt mit dem Analyten treten. Die Flüssigkeit wird mittels Peristaltikpumpe in die Messzelle befördert. In weiterem wurde ein Thermostat verwendet, um die Temperaturschwankungen der Probenlösungen zu minimieren. Da das wässrige Medium eine zusätzliche Dämpfung von etwa 10 dB bedingt, wurde sie durch die Verwendung von Oszillatorschaltung kompensiert. Daneben wurden auch ein Netzteil, Frequenzzähler und Computer mit einem geeigneten Programm für die Erfassung und Auswertung von erhaltenen Daten.

Jeder Schwingquarz muss vor seinem Einsatz mittels Netzwerkanalysator auf seine Eigenschaften, die Schwingungs-

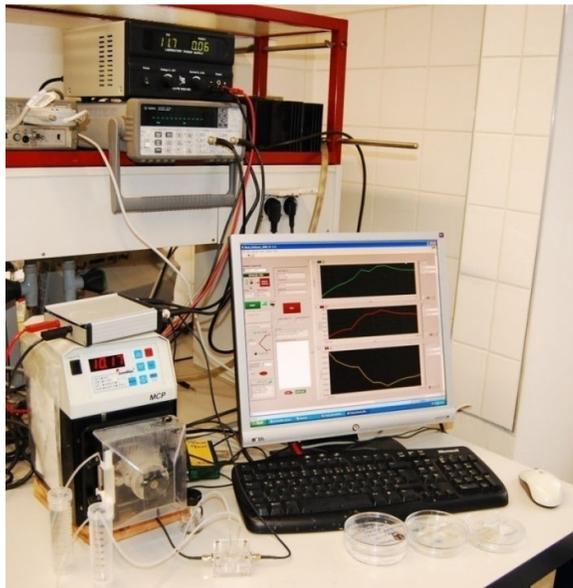


Abbildung 20: Messanordnung: Frequenzzähler, Netzteil, Schaltung, Peristaltikpumpe, Messzelle und Rechner.

frequenz und Dämpfung, geprüft werden.

3.5.1. Netzwerkanalysator

Die Resonanzfrequenz der hergestellten QCM's wurde mit Netzwerkanalysator bestimmt. Der verwendete Netzwerkanalysator HP Agilent Technologies E5062A wird für den Frequenzbereich von 300 kHz bis 3 MHz eingesetzt.

Er charakterisiert als passiver Modus die Veränderung der Resonanzfrequenz bei Massebeladung der Elektrode durch die Messung der Dämpfung des Signals. Der Netzwerkanalysator wobbelt über einen ausgewählten Frequenzbereich, in der Regel 0,5 MHz, und somit wird das Dämpfungsspektrum und Phasenspektrum ermittelt. Das Dämpfungsspektrum eines QCM-Sensors wird als Beispiel in der Abbildung (21) präsentiert. Bei einem 10 MHz Schwingquarz sind zwei Resonanzen – die serielle Resonanz bei minimaler Dämpfung und parallele Resonanz

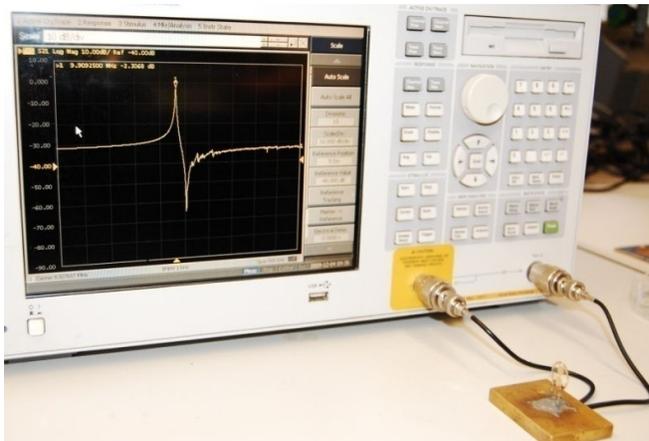


Abbildung 21: Netzwerkanalysator Agilent Technologies E5062A verbunden mit über eine Halterung mit Schwingquarz.

für das Dämpfungsmaximum auftretend, sowie mitunter einige Nebenresonanzen, die auf antisymmetrische und Twist-Schwingungen zurückzuführen sind. Die Dämpfungsskala stellt eine in der Elektrotechnik übliche Skalierung dar:

$$\text{dB} = 20 \times \log [U_{\text{out}} / U_{\text{in}}]$$

wobei U_{out} und U_{in} die Spannung des Aus- und Eingangssignals darstellt.

Mit Hilfe von Netzwerkanalysator wird die Qualität eines QCM-Sensors überprüft. Schon bei der Vorbereitung von den Quarzen werden die Quarze mit frisch aufgetragenen Goldelektroden auf die Dämpfungsverschiebung getestet.

3.5.2. Oszillatorschaltung

Die Herstellung der Oszillatorschaltungen für den Eigengebrauch wurde in unserer Arbeitsgruppe vorgenommen. Die entsprechenden Schaltungsentwürfe wurden auf eine Transparentfolie spiegelverkehrt ausgedruckt und auf den Belichtungstisch aufgeklebt. Die Kupfer-Platine mit Fotolack-Schicht wurde dann für 5 Minuten bestrahlt und in einer 10%en NaOH Lösung entwickelt. Die gewaschene Platine wurde zum Ätzen der Leiterbahnen in 50° C warmes Bad mit einer 25%en $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ Lösung gelegt und mit Luftbläschen gespült. Zum Schluss wurde die fertige Platine mit Aceton vom Lack befreit und mit Wasser gespült.

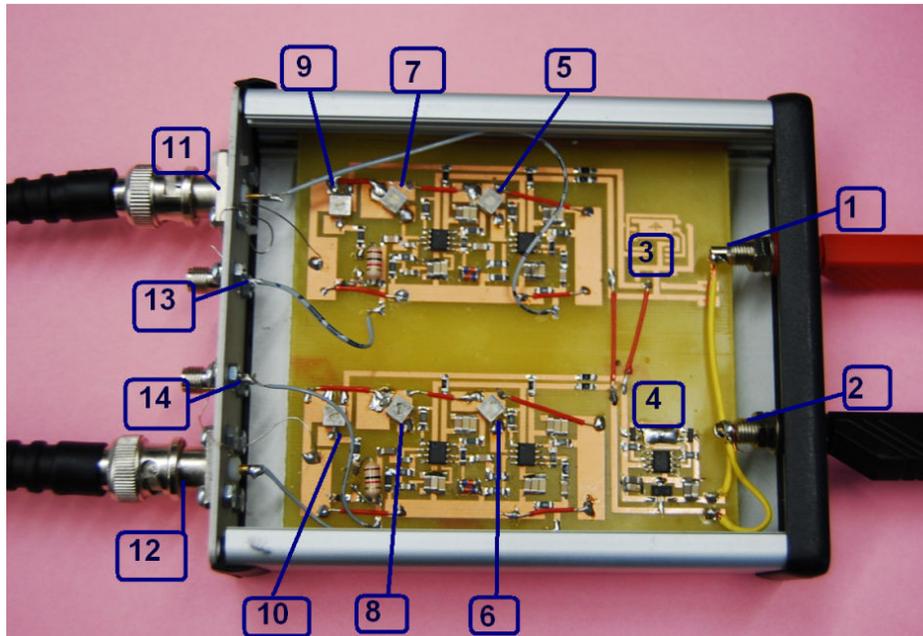


Abbildung 22: Oszillatorschaltung: (1) und (2) Eingang für die Stromversorgung, (11) Ausgang zum Frequenzzähler – Kanal A; (12) Ausgang zum Frequenzzähler – Kanal B; (13) Eingang zum QCM – Kanal A; (14) Eingang zum QCM – Kanal B; (3) und (4) Spannungsregler; (9) Phasenregelung – Kanal A; (10) Phasenregelung – Kanal B; (7) Frequenzregelung – Kanal A; (8) Frequenzregelung – Kanal B; (5) Verstärkungsregelung – Kanal A; (6) Verstärkungsregelung – Kanal B.

Mit Lötack wurden die Kupferbahnen vor Oxidation geschützt. Die Bauteile der Schaltung wurden als “*surface mounted devices*“ aufgelötet. Die Platine mit der Elektronik wurde in ein Aluminiumgehäuse integriert, um sie v.a. vor den äußeren mechanischen Einflüssen zu schützen. Die Oszillatorschaltung wurde mit einer konstanten Gleichstromspannung von +/- 5 V versorgt, die von einem externen Netzgerät generiert wurde (Abbildung 22).

3.5.3. Messzelle

Für die Messung der Sensoreffekten benötigt man vor allem eine Messzelle, die der jeweiligen Analytlösung angepasst wird. Die Messzelle ist dann verbunden mit einer Oszillatorschaltung und einem Frequenzzähler, der seinerseits mit einem Computer verbunden ist.

Die Messzelle für die flüssigen Proben in Abbildung (23) besteht aus einem



Abbildung 24: Messingvorlage für die Silikonmesszelle.

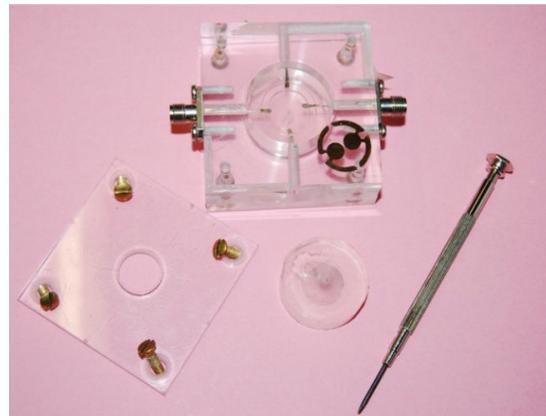


Abbildung 23: Messzelle für die Flüssigphasenmessungen: in dem Plexiglasdeckel (5x5 cm) befinden sich eine runde Öffnung (d= 1,5 cm) mit Innengehäuse aus Silikon mit Zu- und Ableitungen für die Analytlösung.

Innengehäuse aus PDMS (Polydimethylsiloxan, Sylgard 184 Silicon Elastomer) und einem Außengehäuse aus Acrylglas, ist eigentlich leicht herzustellen (Abbildung 24, 25). Das glasklare Silikon ist temperaturstabil und hält Temperaturen bis zu 250° C aus.

Die Silikonzellen wurden mit Gussverfahren hergestellt. Zur Silikonbasis wurden 10% Katalysator zugefügt, gut verrührt, in Gussforme eingegossen und der Ansatz im Exikkator für eine halbe Stunde entgast, um die entstehenden Luftblasen zu entfernen. Die viskose Silikonmasse wurde anschließend waagrecht im Trockenschrank bei 80° C über einige Stunden auspolymerisieren gelassen.

Auf der oberen Seite mit konischer Form wurden Zu- und Ableitungen zur

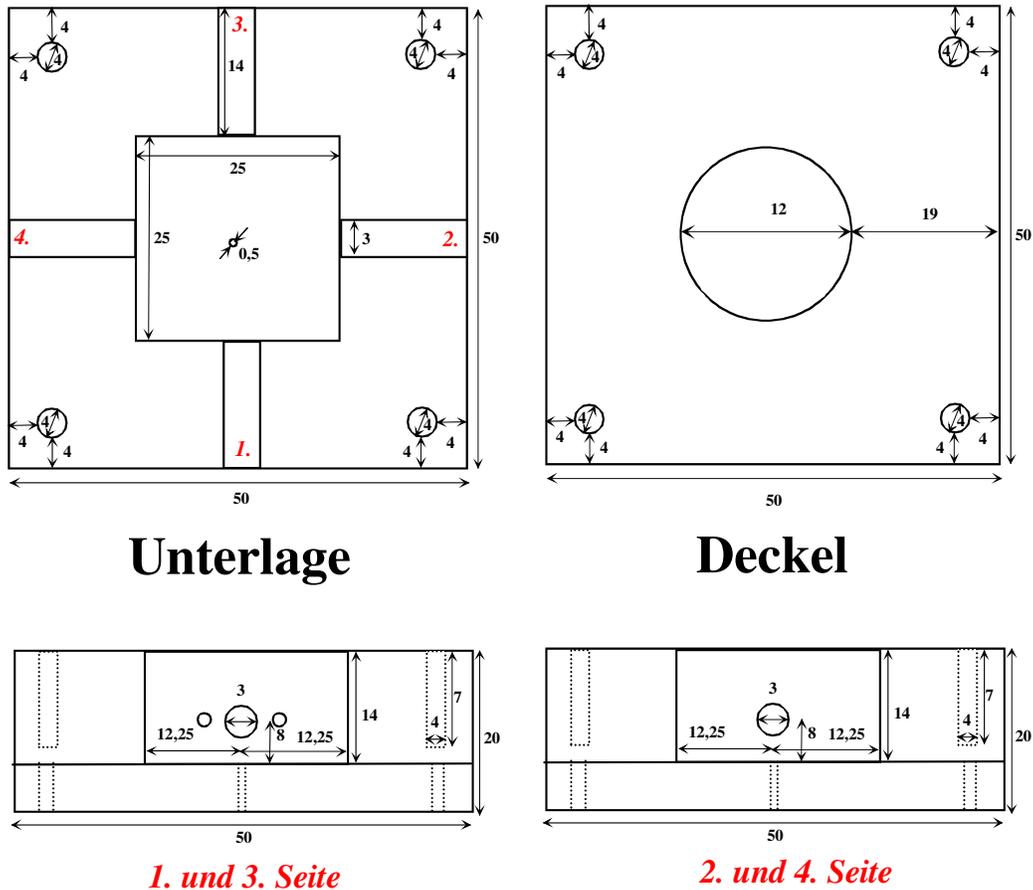


Abbildung 25: Mustervorlage für die Herstellung von Acrylgehäuse für die Flüssigkeitsmessung.

Pumpe, auf der unteren Seite mit ovaler Form ein kleines Loch zur Druckkompensation gestanzt. Die Messkammereinheit wurde mit Acrylglasunterlage und Decklage mit jeweils 4 Schrauben stabilisiert.

3.5.4. Messprogramm

Die Datenerfassung und Visualisierung erfolgt mit einem eigens für diese Zwecke programmierten System. Die verwendete Software ist Lab View. Die Schnittstelle zwischen Computer und Gerät stellt Agilent IO (Agilent Technologies) zur Verfügung (Abbildung 26).

Das verwendete Programm zeigt gleichzeitig beide eingeschalteten Messkanäle, die den beiden Frequenzsignalen der beschichteten Goldelektroden am Schwingquarz entsprechen. Somit zeigen die Fenster - wie aus der Abbildung (26) ersichtlich – die Frequenzänderungen mit der Zeit für die Messelektrode und das andere Fenster für die Referenzelektrode. Durch die Differenz der Kanäle erhält man die Messkurve im dritten Fenster.

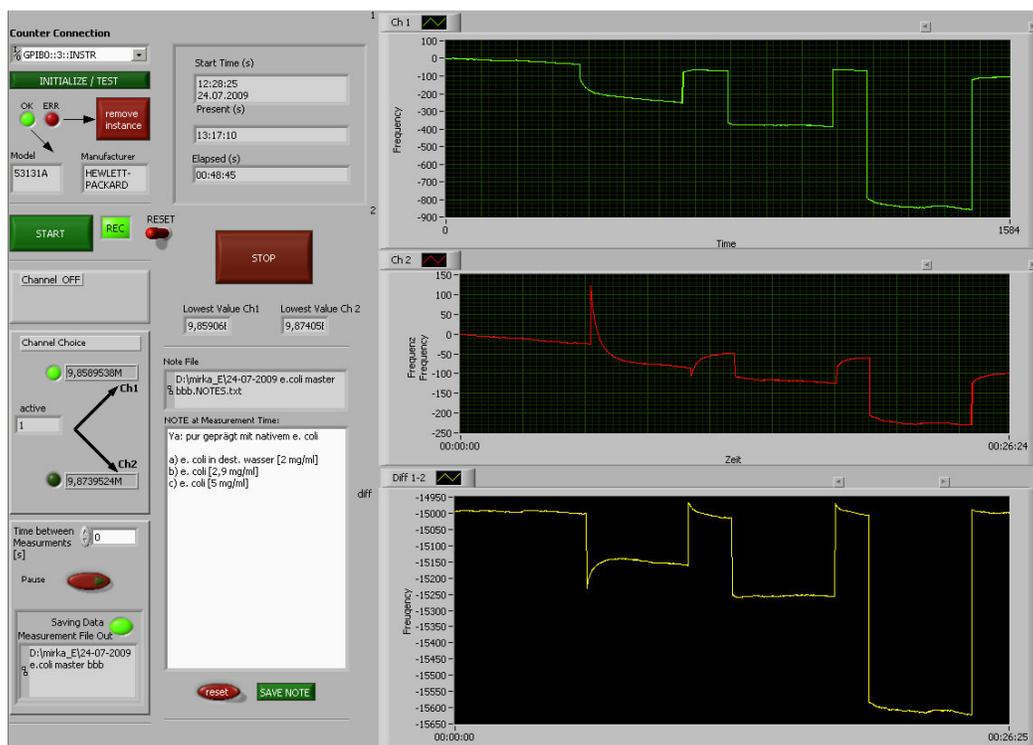


Abbildung 26: Messprogramm für die Verfolgung von Frequenzänderung bei verwendeten QCMs. Oberes Fenster stellt die Sensorantwort von geprägter Seite des Schwingquarzes, das mittlere dagegen die Frequenzänderung an der Referenzelektrode. Das unterste Fenster entspricht der Differenz der beiden Kanäle. Die aufgenommenen Kurven zeigen die Frequenzänderung in Hertz als Funktion der Zeit in Sekunden.

3.6. Fluoreszenzmikroskopische Messungen

Die Zellen werden mit Fluoreszenzmarker Bisbenzimid für 30 Minuten lang inkubiert. Dabei bindet der Farbstoff an AT-reiche Sequenzen der DNA, somit wird bei der Anregung der Zellkern der Hefezellen sichtbar. Eine weitere Möglichkeit stellt der Fluorochrom DAPI oder Dansylchlorid; mit diesen werden die Proteine in synchronisierten Zellen sichtbar gemacht.

3.7. Quantitative Bestimmung von Zellen

Zur Bestimmung von Zellzahlen und der Zellmasse einer Population von Organismen wurden verschiedene Methoden herangezogen. Durch die quantitative Bestimmung der Zellen konnte auf Fortschritt der Teilung geschlossen werden. Das Wachstum einer Zellkultur wird als Zunahme der Biomasse pro Volumeneinheit mit der Zeit gemessen, wobei die Wachstumsgeschwindigkeit von der Zusammensetzung des Mediums und den Kultivierungsbedingungen, wie Temperatur, O₂-Partialdruck, Lichtintensität oder pH abhängig ist. Prinzipiell wird unterschieden in Gesamtzellzahl einer Zelllösung und Lebendzellzahl. Die Gesamtzellzahl kann mikroskopisch bestimmt werden, die Lebendzellzahl durch Ausplattieren und Zählen der wachsenden Kolonien.

Alle in dieser Arbeit angegebene Zellzahlen respektive Konzentrationen beziehen sich auf die quantitative Bestimmung mit Hilfe einer Zählkammer. Die verwendete Zählkammer ist von *Neubauer*⁴⁹, Typ *improved*. Es handelt sich hierbei um ein Präzisionsgerät aus optischem Spezialglas - etwa 30x80 mm groß und 5 mm dick, das die Bestimmung der Teilchenzahl pro Volumeneinheit einer Flüssigkeit ermöglicht. Die sich in der Zählfläche befindliche Teilchen werden unter dem Mikroskop visuell ausgezählt. In der Mitte der Zählkammer befindet sich eine vertiefte Mittelfläche, wo quadratische Felder definierter Größe eingätzt sind. Das Zählgitter besteht aus 3x3 Großquadraten von je 1 mm Kanten-

länge, was der Fläche von je 1 mm^2 entspricht. Das zentrale Großquadrat teilt sich in 5×5 kleine Gruppenquadrate mit je $0,2 \text{ mm}$ Kantenlänge, was der Fläche von $0,04 \text{ mm}^2$ entspricht. Die Höhe der Kammer wird durch ein Deckglas festgelegt – $0,1 \text{ mm}$. Die Zellsuspension wird seitlich bei aufgelegtem Deckglas aufpipettiert und durch die Kapillarkraft füllt sich der Spalt zwischen dem Deckglas und Kammerboden. Unter dem Lichtmikroskop wird die Zählfläche mit angesaugter Zellsuspension visualisiert und ausgezählt.

Die Konzentration wird dann mit Hilfe einer Formel als Zellen pro μL bestimmt:

$$\frac{\text{Anzahl der ausgezählten Zellen}}{[(\text{ausgezählte Fläche [mm}^2]) * (\text{Kammertiefe [mm]}) * \text{Verdünnung}] } =$$

$$= \text{Zellzahl pro } \mu\text{L}$$

4. Hefesensor

4.1. Hefen

Hefen sind einzellige Pilze und gehören zu den eukaryontischen Mikroorganismen der Abteilung Ascomycota (Sprosshefen) und zur Klasse Saccharomycetes – zuckerabbauende Pilze. Sie sind unizellular, wobei die Größe kann von Gattung zu Gattung stark variieren, von 3-4 μm bis 40 μm . Bis dato wurden mehr als 1500 verschiedene Hefearten beschrieben. Zu dem am besten beschriebenen Hefestamm gehört *Saccharomyces cerevisiae*, das in der Molekularbiologie als ein Modellorganismus verwendet wird.

Die medizinisch bedeutungsvollen Hefen⁵⁰ sind vorwiegend imperfekte Hefen und den Deuteromycotina zugehörig. Andere Hefen mit sexueller Vermehrung sind meist apathogen anzusehen. Nur eine geringe Anzahl von Hefen ist in der Lage, sich bei Körpertemperatur zu vermehren und pathogene Eigenschaften zu entfalten. Von Bedeutung als opportunistische Krankheitserreger sind insbesondere einige Arten der Gattung *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* und *Malassezia*.

Die Größe und biochemische Zusammensetzung der Hefezelle ist von den Kultivierungsbedingungen und dem Alter der Zelle abhängig. Für die molekulare Erkennungsmethoden ist vor allem die chemische Zusammensetzung der Oberfläche der Hefen. Die äußere Zellwand⁵¹ besteht aus langen Polysaccharidfäden, an denen sich komplex gebundene Proteine befinden. Die Hauptkomponenten der Polysaccharide sind Glucose, Mannose, Galaktose, Xylose und N-Acetyl-D-Glucosamin.

Die Hefe ist fakultativ anaerob, das bedeutet, dass der Katabolismus von Kohlenhydraten sowohl bei Sauerstoffanwesenheit, als auch bei Abwesenheit betrieben wird. Nach dem Pasteur-Effekt wird die Gärung in Gegenwart von Sauerstoff gehemmt, wobei das Wachstum von den Hefezellen gleichzeitig zunimmt. Der

biochemische Abbau der Kohlenhydrate erfolgt zuerst über mehrere Zwischenschritte durch Glykolyse von der Glucose zum Pyruvat. Im nächsten Schritt kann die Atmung (aerob) oder die Gärung (anaerob) einsetzen. Bei der Sauerstoffanwesenheit gelangt das Pyruvat-Molekül ins Mitochondrium, wo es zunächst zum Acetyl-Coenzym A umgesetzt wird, um dann in den Citratzyklus eingeschleust zu werden. Bei der Gärung wird das Pyruvat zu Ethanol und Kohlendioxid umgesetzt.

4.2. Hefe in Biotechnologie und Industrie

Hefen gehören seit Jahrzehnten zu den meist verwendeten Mikroorganismen. Sie sind ein fixer Bestandteil der Backindustrie, einerseits beim Brotbacken, andererseits als Nahrungs- oder Futtermittel selbst, und der Getränkeindustrie, wo sie zur Herstellung von Bier oder Wein verwendet wird. In dem oben liegen-

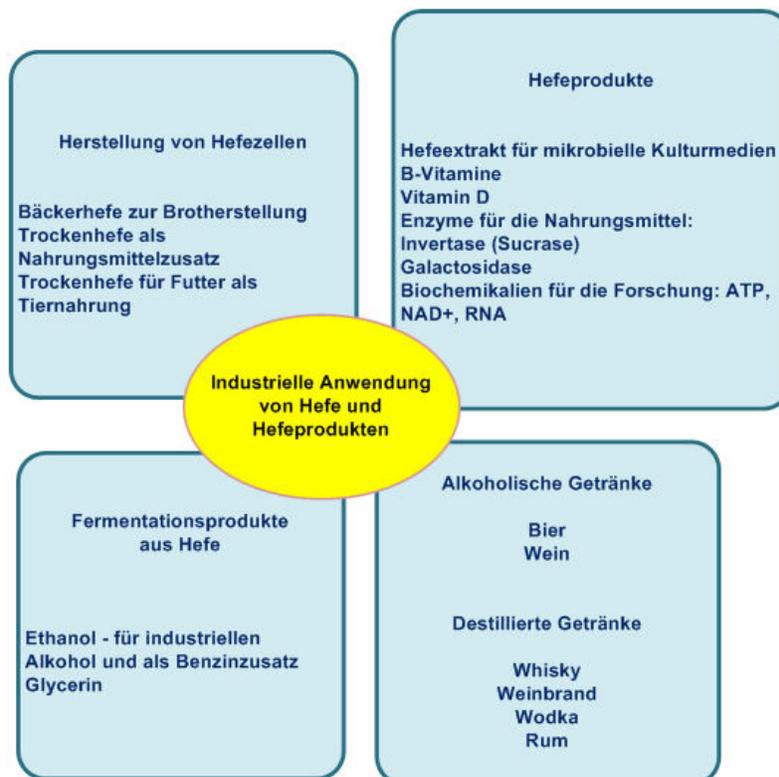


Abbildung 27: Anwendungsspektrum für Hefe.

den Diagramm in der Abbildung (27) wird die Anwendung⁵² der Hefen zusammengefasst.

Für die Nahrungsmittelbranche wird fast ausschließlich die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. In der industriellen Produktion verwendet man große belüftete Fermenter – für 40 bis 200.000 Liter Flüssigkeit. Eine geeignete Starterkultur wird in einem Medium kultiviert, wobei als Hauptkomponente Melasse vorliegt. Melasse besteht aus großer Menge Zucker als Kohlenstoff- und Energiequelle, Mineralien, Vitaminen und Aminosäuren. Neben Melasse werden noch Phosphorsäure und Ammonsulfat als Phosphor und Stickstoffquelle dazugegeben. Am Ende der Wachstumsphase werden die gezüchteten Hefezellen abzentrifugiert und mit Wasser mehrmals gewaschen. Im weiteren Schritt wird die Hefe noch mit Emulgatoren, Stärke und Zusatzstoffen vermischt. Die im Handel angebotene Backhefe ist in zwei Formen erhältlich: als komprimierte Würfeln mit 70% Feuchtigkeit und aktive Trockenhefe mit 8% Feuchtigkeit.

4.3. Zellzyklus bei Hefen

Verglichen mit den meisten Tierzellen hat die Sprosshefe *Saccharomyces cerevisiae* einen sehr einfachen Aufbau. Die auffälligste Eigenschaft ist die markante Asymmetrie der Hefezellen, die sich klar in der asymmetrischen Teilung durch Knospung zeigt, bei der eine kleine Tochterzelle und eine große Mutterzelle entstehen. Diese Asymmetrie leitet sich von der polaren Orientierung ihres Actincytoskellets her. Sich vermehrende Sprosshefzellen müssen hoch polar sein, um der Mutterzelle zu ermöglichen, eine Knospe an einer einzigen Stelle auf der Zelloberfläche wachsen zu lassen. Bei diesem Vorgang sind die Actinflecken an der Wachstumsspitze der Knospe konzentriert, und die Actinkabel sind auf sie ausgerichtet angeordnet. Wie viele andere einzellige Organismen, bildet Hefe unter Hungerbedingungen Sporen aus. Sporulation kann aber nur bei diploiden Sprosshefzellen auftreten, während Sprosshefen sich meist als hap-

loide Zellen vermehren. Eine haploide Einzelzelle muss also einen Partner des entgegengesetzten Paarungstyps finden, ihn umwerben und sich mit ihm paaren, bevor Sporulation erfolgen kann.

Das Durchlaufen des Zellzyklus (Abbildung 28) wird mit dem Zellwachstum koordiniert. Damit proliferierende Zellen ihre Größe ungefähr konstant halten

können, muss die Dauer eines Zellzyklus mit der Zeit übereinstimmen, die die Zelle für die Verdopplung ihrer Größe benötigt. Ist die Dauer eines Zyklus kürzer, werden die Zellen mit jeder Teilung kleiner; ist sie länger, werden die Zellen mit jeder Teilung größer. Weil das Zellwachstum von Nahrungsstoffen und Wachstumssignalen aus der Umwelt abhängt, muss sich auch die Dauer des Zellzyklus an wechselnde Umweltbedingungen anpassen können. Es ist nicht klar, wie proliferierende Zellen ihr Wachstum mit der Geschwindigkeit des Zellzyklus abstimmen, um ihre Größe konstant zu halten. Hefe wachsen und teilen sich andauernd, solange nur genügend Nahrung vorhanden ist. Tierische Zellen dagegen wachsen und teilen sich nur, wenn sie von anderen Zellen Signale empfangen, die sie dazu auffordern. Die Größe, bei der sich eine Zelle teilt, hängt zumindest teilweise von diesen extrazellulären Signalen ab, die

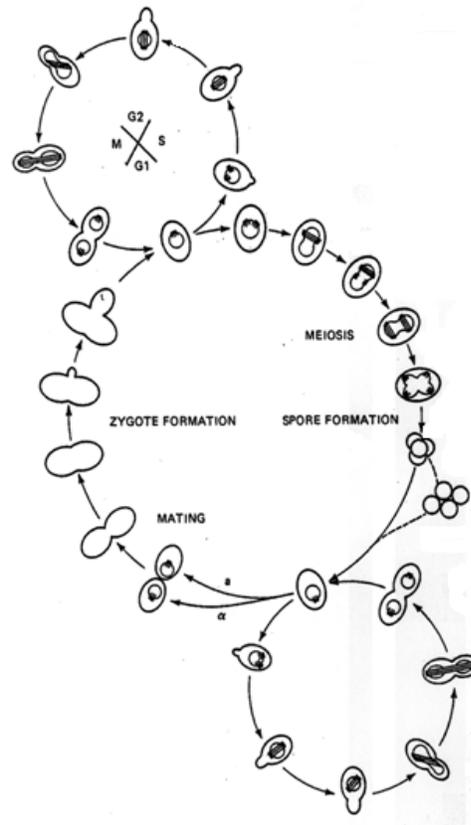


Abbildung 28: Teilungszyklus der Hefe. Der obere kleine Kreis beschreibt die diploide Zellteilung, der unterste die haploide Teilung. (Yeasts in natural and artificial habitats, Spencer&Spencer. Springer Verlag).

wachsen und teilen sich andauernd, solange nur genügend Nahrung vorhanden ist. Tierische Zellen dagegen wachsen und teilen sich nur, wenn sie von anderen Zellen Signale empfangen, die sie dazu auffordern. Die Größe, bei der sich eine Zelle teilt, hängt zumindest teilweise von diesen extrazellulären Signalen ab, die

Zellwachstum und Zellteilung unabhängig voneinander regulieren. Zellwachstum

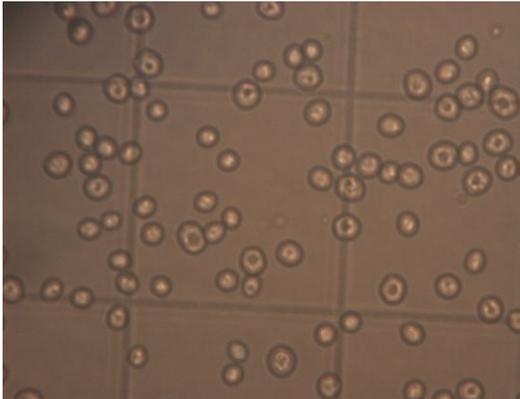


Abbildung 29: *S. cerevisiae* in der G1-Phase. Vergrößerung 100 unter Durchlichtmikroskop.

hängt nicht vom Durchlaufen des Zellzyklus ab: Hefezellen, deren Zellzyklus durch eine Mutation arretiert ist, wachsen weiter.

In erster Reihe wurde das Wachstum der Zellen in verschiedenen vorgegebenen Nährmedien getestet, später auch in anderen Medien, wie

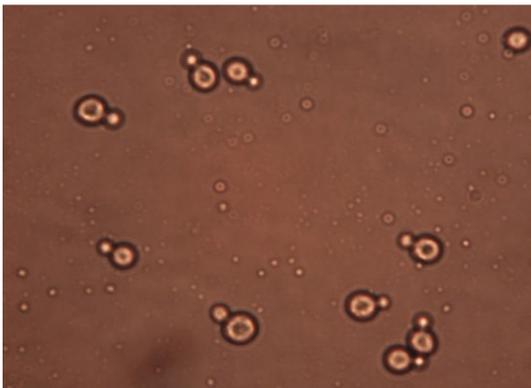


Abbildung 30: *S. cerevisiae* im Nährmedium (YPD). Teilungsphase: frühe S-Phase. Durchlichtmikroskop: hundertfache Vergrößerung.

Zucker, wobei die Wachstumsrate langsamer verläuft. Die einzelnen Schritte, respektive Stadien der Teilung wurden mit gravimetrischen Sensoren verfolgt. Daneben wurden die Zellen in den einzelnen Stadien des Wachstums mit Hilfe von Licht-

mikroskop aufgenommen. Die gemischten Zellen wurden für jede Messung mit Hilfe von einer Zählkammer

(Neubauer improved) ausgezählt, was auch einen anderen quantitativen Blick auf die Teilungsfortschritte wirft. Kaum sind die Hefezellen in

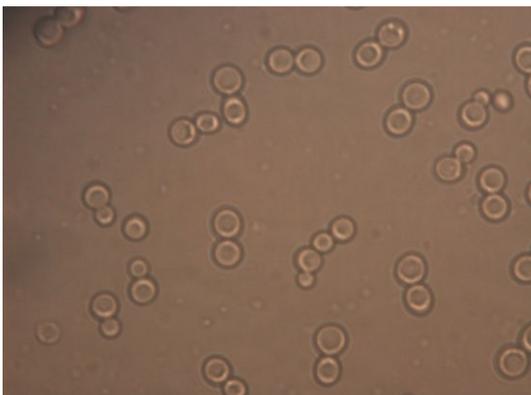


Abbildung 31: *S. cerevisiae* am Ende der Teilung im Nährmedium (YPD), sog. M-Phase. Vergrößerung 100 unter Durchlichtmikroskop.

einem Nährmedium, kommt es bei günstigen Bedingungen, wie geeignete Temperatur, zu Vergrößerung der Zellen und diese bilden um-

gehend die S-Phase - (Abbildung 29, 30). Aus der S-Phase entwickelt sich

G2-Phase, und später die M-Phase, bei derer zwei quasi identischen Hefezellen kurz vor dem Entbinden stehen – siehe Abbildung (31).

4.4. Synthetische Hefemaster

Für die Herstellung von Mastern für die sensorische Detektion von Hefe wurde aus praktischen Gründen Silikon als das optimale Material verwendet. Zunächst werden Hefeimprints in Polyurethan hergestellt. Dazu werden native Hefestempel herangezogen. Die Abbildungen 32, 33 als Zwei- und Dreidimensionale Darstellung zeigen die ungeteilten Hefezellen in destilliertem Wasser auf einem Glasstempel. Diese Aufnahmen wurden mit AF-Mikroskop durchgeführt, im Kontakt-Modus. Für Darstellungen im dreidimensionalen Format wurde das Programm WSxM⁵³ verwendet.



Abbildung 33: Native Hefezellen. Dreidimensionale Anordnung der Hefezellen am Stempel. Bildgröße: 40x40 μm . AFM contact mode.

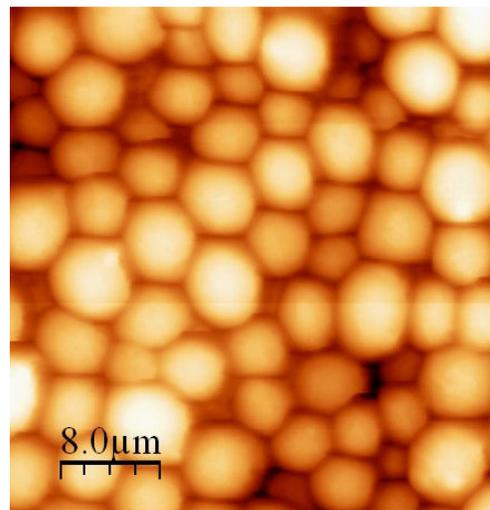


Abbildung 32: Native Hefezellen angeordnet in einer Polylage. Bildgröße: 40x40 μm . AFM contact mode.

4.4.1. Hefestempel

Bei der Vorbereitung von Hefestempeln wurde ein gereinigter Hefekonzentrat auf ein Glasplättchen aufgetragen und zirka nach 2 Minuten die überschüssige Lösung aufgespinn. Die Hefe wird als gewöhnliche Backhefe im Lebensmittelgeschäft gekauft und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Hefe wird im destillierten Wasser aufgelöst und in der Zentrifuge dreimal für sieben Minuten bei 3000rpm zentrifugiert. Beim Auftragen auf die Glasplättchen mit den Massen 1 x 1 cm muss darauf geachtet werden, dass das Hefekonzentrat mit einer gewissen Restfeuchte vorliegt. Beim Austrocknen entstehen Risse in dem aufgetragenen Hefefilm, was eigentlich für die Herstellung von Hefeimprints in dem Polyurethan unbrauchbar ist. Der Hefefilm auf dem Stempel soll kontinuierlich sein.

4.4.2. Polymer

Der auf diese Weise vorbereitete Hefestempel wird in den noch nicht ausgehärteten Polyurethanfilm auf dem anderen Glasplättchen aufgedrückt und mit einer Büroklammer versehen (Abbildung 34, 35). Im Falle, dass der Hefestempel zu viel Restwasser enthält, kann es zu einer Reaktion zwischen dem Polyurethan und Wasser kommen. Dann entsteht Kohlendioxid und der Stempel ist unbrauchbar. Für die Herstellung von Polyurethan werden die Monokomponenten Bisphenol A, Monodiisocyanat und Phloroglucinol in Tetrahydrofuran aufgelöst und mit Pyridin als Reaktionsbeschleuniger am Wasserbad bei 70° Celsius gekocht. Es dauert zirka 10 Minuten bis der Gelpunkt erreicht wird, die Lösung wird dabei honigartig, also der Zeitpunkt ist mit dem bloßen Auge zu erkennen. Diese vorbereitete Lösung ist für den weiteren Gebrauch in der Tiefkühltruhe bei -20° Celsius aufzubewahren. Für die Herstellung von den Bioanalytimrinten werden zirka 15 bis 20 µL des Monomerenmischung auf ein silanisierendes Glasplättchen aufgetragen. Nach einigen Sekunden entweicht das Lösungsmittel und für die

Gleichmäßigkeit des Polyurethanfilmes wird die überschüssige Lösung bei 2400rpm abgespinn.

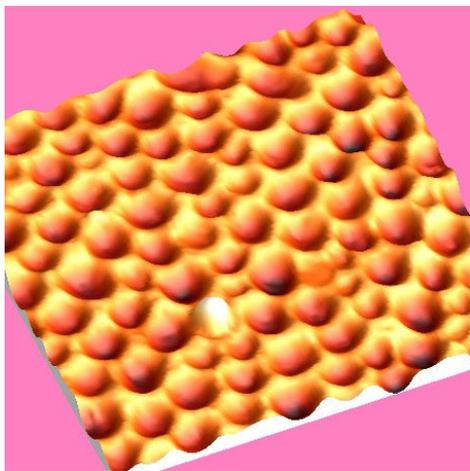


Abbildung 35: Dreidimensionale Darstellung der sensitiven Polyurethanschicht (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) am Schwingquarz. AFM contact mode.

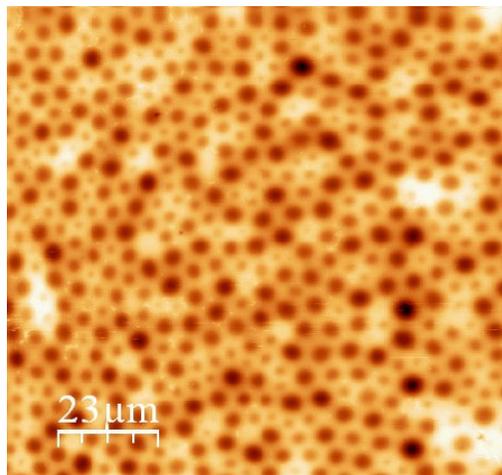


Abbildung 34: Polyurethanoberfläche (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) mit Hohlräumen (Kavitäten), die durch die Prägung mit synthetischen Hefezellen in G1 Phase (ungeteilte Einzelzellen) generiert wurden. Bildgröße: 120x120μm. AFM contact mode, 2D Darstellung.

Die Silanisierung des Glases erfolgt in der Hoffnung, die Haftfestigkeit des Polyurethans am Glas zu sichern. In den früheren Arbeiten ohne vorherige Silanisierung wurde der Polyurethanfilm beim späteren Auswaschen vom Templat sehr beschädigt oder überhaupt herunter gewaschen. Im ersten Schritt werden die auf einen bestimmten Maß zugeschnittene Glasplättchen in der Piranhalösung gewaschen. Die Piranhalösung besteht aus drei Teilen konzentrierter Schwefelsäure und einem Teil Wasserstoffperoxid. Die Glasplättchen werden in die vorbereitete Mischung eingetaucht und herausgenommen, wenn die heiße Lösung abkühlt. Die Plättchen werden im destillierten Wasser gewaschen und in einer 5%igen APTES-Ethanol-Lösung für eine Stunde stehen gelassen, wobei die Silanisierung erfolgt. Anschließend werden die silanisierten Glasplättchen mit destilliertem Wasser gewaschen und in einem Ofen bei 120° Celsius über Nacht getrocknet. Eine vollständige Aushärtung vom Polyurethan dauert in etwa zwei Tage, aber schon nach 24 Stunden kann man die Büroklammer vom Stempel mit

dem jeweiligen Templat und Polymer abnehmen. Später ergibt sich die Frage des effektiven Auswaschens von Bioanalyten, also den Templaten aus dem

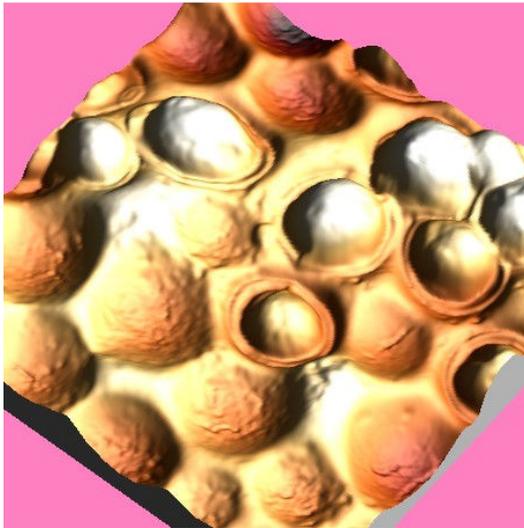


Abbildung 36: Hohlräume in der sensitiven Schicht – Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit ungeteilten Hefezellen mittels Stempelmethode. 3D Darstellung. Bildgröße: 25x25 µm. AFM contact mode.

ausgehärteten Polymer. Nach dem Abnehmen der Büroklammer bleiben beide Glasplättchen mit dem Bioanalyten und Polymer fest zusammenhalten. Erst das Waschen im destillierten Wasser, eventuell auch erhitzt auf etwa 40° Celsius, bringt die Plättchen auseinander. Dabei dringt das Wasser in die Polylage aus Hefezellen und weicht sie ein.

Unter dem Rastermikroskop kann man dann beobachten, dass die Hefezellen in dem zurückgebliebenen Glasplättchen mit Polyurethan in regelmäßigen Abständen in den Kavitäten stecken geblieben sind. Zur Entfernung des Templates kann man 0,5%ige Lösung von SDS (Natrium-Dodecylsulfat) verwenden oder kurzzeitige Behandlung im Ultraschall (Abbildung 36).

4.4.3. Silikonmaster

Für die Herstellung vom hydrophoben Master für das jeweilige Bioanalyt wurde PDMS, also Polydimethylsiloxan - Grundmaterial Elastomer SYLGARD 184 herangezogen (Abbildung 37). Sehr praktisch ist die einfache Vorbereitung von Silikon. Die gewünschte Härte wird durch das Mischen in einem bestimmten Verhältnis vom Grundmaterial und Härter. Das von mir verwendete Polymer wurde im Verhältnis 10:1 verwendet, also 10 Teile Basismaterial und ein Teil vom Härter. Zunächst wurde versucht, das Silikon genauso wie vorher

beschrieben beim Polyurethan, an einem Glasplättchen oder Teflonblock haften zu lassen. Da Silikon aber hydrophob ist, erwies sich dies als unrealistisch und unpraktisch. Die vorbereitete Mischung wurde kräftig umgerührt und für eine Stunde im Exsikkator unter Verwendung der Wasserstrahlpumpe stehen gelassen, da sich umgehend sehr viele Luftbläschen bilden, die später bei der Aushärtung störend wirken können.

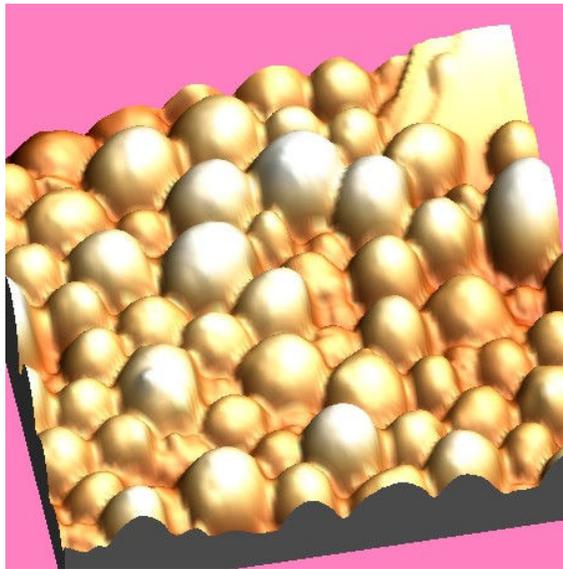


Abbildung 37: Synthetische ungeteilte Hefezellen in der G1-Teilungsphase aus Silikonmaterial. Bildgröße: 40x40 μm . AFM contact mode, dreidimensionale Darstellung mit WSxM-Programm.

Die zuvor hergestellten Polyurethanimprints werden mit der Oberfläche nach oben in eine Plastikschaale in einem kleinen Abstand voneinander gelegt und mit dem Silikon übergossen. Für eine Schale mit dem Durchmesser von 9 cm wird in etwa 15 ml flüssiges Silikon gebraucht, damit man im nach hinein eine Dicke von 1,5 mm vom ausgehärteten PDMS erhält. Die Plastikschaale wird zugedeckt und in waagerechter Position zwei Tage lang bei der Raumtemperatur stehen gelassen. Früher wurde versucht, Silikon auf ein Glasplättchen zu gießen und mit dem Polymerimprint überdecken und wieder mit einer Büroklammer zu übersehen. Das Silikon konnte aber nicht aushärten und wurde glitschig. Beim Übergießen über die aufgestellten Imprints in der Schale ist kein Druck von oben

notwendig, wie bei der Herstellung von Kavitäten in Polyurethan. Das Silikon dringt in die freien Kavitäten und nach der vollständigen Aushärtung erhält man einen negativen Abdruck von dem jeweiligen Bioanalyten. Da Silikon hydrophob ist, wirken chemisch gesehen keine Kräfte zwischen dem hydrophilen Polyurethan und dem Silikonstreifen.

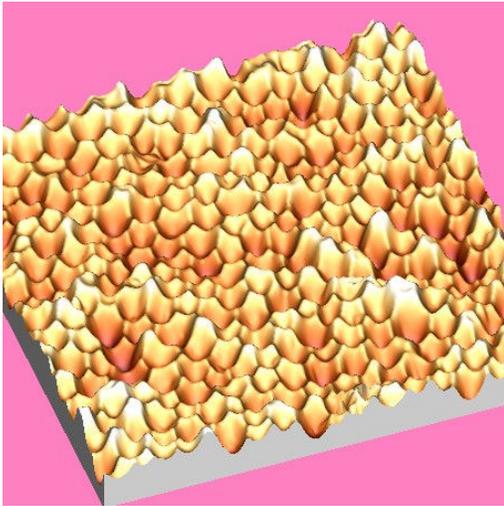


Abbildung 39: Detailaufnahme der Prägung mit synthetischen Hefezellen in ungeteilter Form. Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI). Ausschnitt: 10x10µm. AFM contact mode. Bearbeitung mit WSxM Programm.

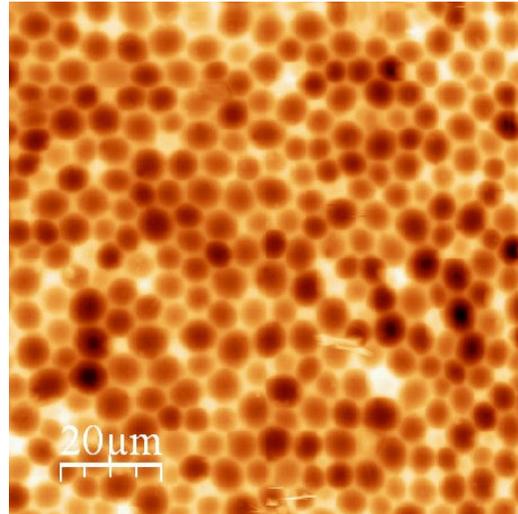


Abbildung 38: Geprägte Polyurethanoberfläche (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) mit synthetischen Hefezellen aus Silikonmaterial. AFM contact mode. WSxM Programm für die graphische 3-dimensionale Darstellung. Bildgröße: 100x100µm.

Zur Abtrennung von Master werden die Stempel mit der Silikonschicht mit einem Rasierklingermesser herausgeschnitten und der Silikonstreifen wird ganz leicht abgezogen. Diese Seite mit den Abdrücken erscheint am sonst durchsichtigen Silikon als matt, die andere Seite glänzt. Es ist also keine Beschriftung und keine andere Markierung der geprägten Seite notwendig. Die so hergestellten Hefemaster sind chemisch und physikalisch ziemlich stabil, aber gegen mögliche Verschmutzung, vor allem den Staub, in einer Plastik- oder Glasschale aufzubewahren.

Die Qualität der abgebildeten Abdrücken von Bioanalyten kann man mit dem AFM-Mikroskop überprüfen am Silikon direkt oder indirekt durch einen Abdruck des Masters in ein noch nicht ausgehärtetes Polymer, wobei man dann die Kavitäten sehen kann. Die von den AFM Messungen erhaltenen Bilder werden mit WSxM Programm bearbeitet (Abbildung 38, 39).

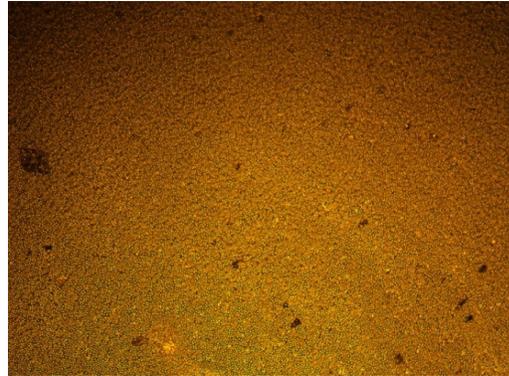


Abbildung 40: Hefemaster: Regelmäßige Verteilung der Silikonzellen am Stempel bei einer Vergrößerung von 10 unter Durchlichtmikroskop.

Die folgenden Bilder zeigen auch die Durchlichtmikroskop Aufnahmen vom Zellenmaster aus Silikon in verschiedenen Vergrößerungen (10 bis 100). Durch die Größe der Zellen, die für die Prägung herangenommen werden, können die Stempel, in diesem Fall Master unter Mikroskop beobachtet werden. Das erwies sich als sehr praktisch, da die Größe und Gestalt der künstlichen Zellen am Silikonmaster oder dann später der Erfolg der Prägung am Polymer schnell geprüft sein konnte. In der Abbildung (40, 41, 42) ist das Zellendesign am Silikonmaster sichtbar, mit dem die nachfolgenden Prägungen erfolgten. Bei der Vergrößerung von 10 des Durchlichtmikroskops ist der Silikonstempel großflächig zu sehen. So sind



Abbildung 41: Hefemaster bei einer Vergrößerung von 50 unter Durchlichtmikroskop.

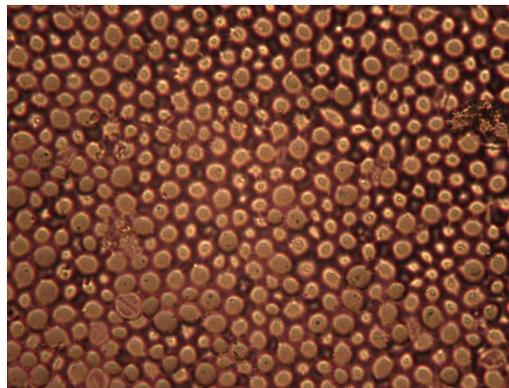


Abbildung 42: Hefemaster aus Silikon: Vergrößerung 100 unter Durchlichtmikroskop.

wesentliche Kontaminationen auszuschließen.

4.5. AFM-Untersuchungen

Mit Hilfe von AF-mikroskopischen Aufnahmen konnten spezifischere Angaben zu den hergestellten und bei den Messungen eingesetzten Hefechips, respektive derer sensitiver Schicht gemacht werden. Von Interesse waren auch die Angaben über die quantitative Besetzung der Kavitäten, die mit Hilfe der geeigneten Prägetechnik im Polymer generiert werden. Genaue Eigenschaften der Kavitäten in der sensitiven Polymerschicht, wie Tiefe, Form oder Durchmesser lassen sich mit

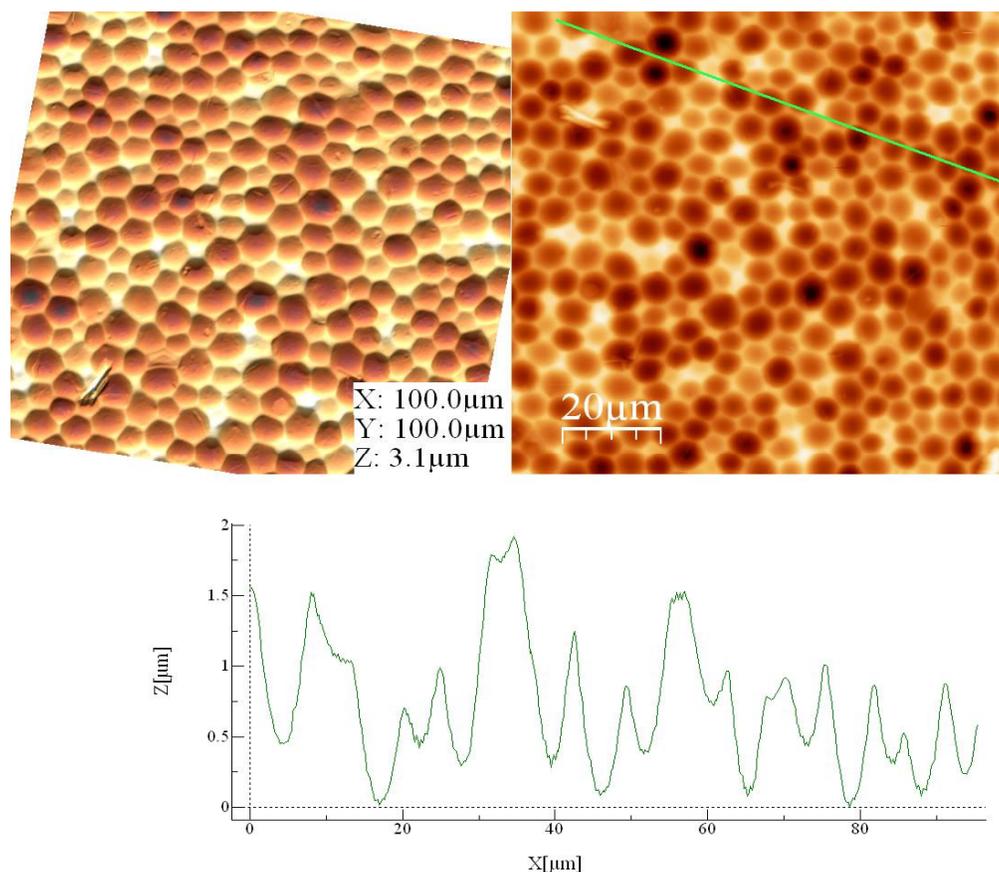


Abbildung 43: Hefesensor - sensitive Schicht am QCM mit geprägten Hohlräumen. AFM contact mode. Polyurethanbeschichtung (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) ausgehärt bei Raumtemperatur, Schichtdicke 2 μm. Prägung mit synthetischem Silikonhefestempel selektiv für Hefe einzelnzellen (Teilungsstadium G1) der Gattung *Saccharomyces cerevisiae*. Abgetastete Oberfläche: 100x100 μm mittels AFM contact mode, 2- und 3-dimensionale Darstellung. Sektionsanalyse: Kavitätenbreite 5 bis 10 μm, Tiefe 1 μm.

Sektionsanalysen von AFM –Aufnahmen untersuchen. Die gekennzeichneten Geraden in den jeweiligen 2D-Darstellungen entsprechen der horizontalen und der vertikalen Markierung, womit die Tiefe und Breite der Abdrücke im untenstehenden Bild ermittelt wird.

Die ungeteilten Hefezellen in der sog. G1-Teilungsphase sind 4 bis 10 μm groß. Die Abbildung (43) zeigt das MIP, das mit synthetischen Einzelzellen aus Silikon geprägt wurde. Durch die Prägung eines Polymers hinterlassen sie je nach Stempeltechnik, respektive Druck beim Kontakt Stempel-Polymer und Verdünnung des Vorpolymers, in der ausgehärteten Oberfläche Hohlräume der Breite 4 bis 10 μm und zirka 400 bis 1000 nm tief. Auf einer Fläche von $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ entstehen in etwa 280 Kavitäten; respektive 57% der Kavitäten sind 9 μm große Hohlräume und die restlichen 43% sind kleinere 5 μm große und ca. 400 nm tiefe Abdrücke.

Die sich teilende Zellen wachsen im Nährmedium und nehmen dabei Wasser auf; die Mutterzellen bilden demnach größere Kavitäten von ca. 5 bis 5,5 μm und die Knospen (buds) sind je nach Wachstumsphase 0,5 bis 2 μm groß – siehe

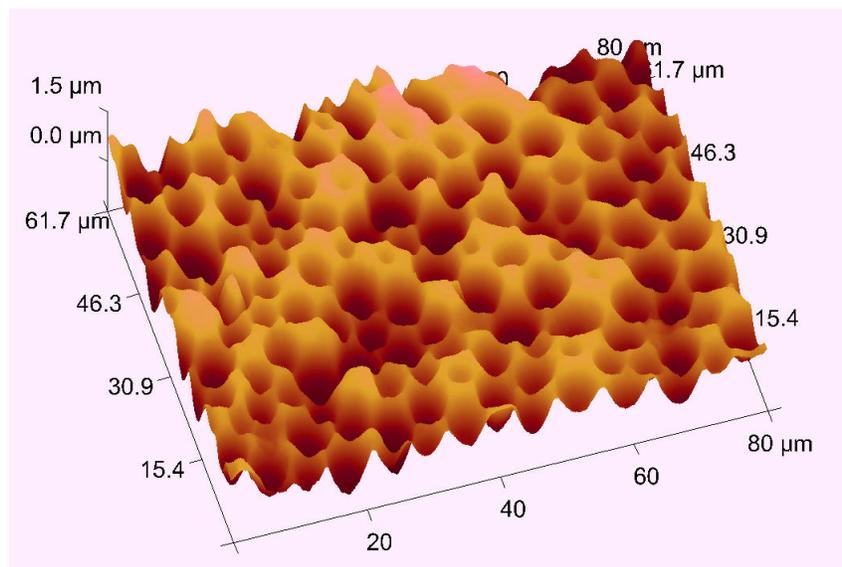


Abbildung 44: Polyurethan-Oberfläche geprägt mit künstlichen Hefezellen in S-Phase. Die Prägung erfolgte mit Drop-Coating Methode im noch nicht ausgehärteten Vorpolymer (Polyurethan: 47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI). Erreichte Polymerschichtdicke: 2 μm . Dreidimensionale Darstellung mit AFM contact mode. Bildgröße: 80x62 μm .

Abbildung (44 und 45). Aus der S-Phase gelangen die Hefezellen in die G2-Phase und weiter bis in die M-Phase, wobei die beiden verbundenen Duplex-Zellen in gleiche Dimensionen heranwachsen und die Unterscheidung zwischen Mutter- und Tochterknospe nicht mehr möglich ist. Die Abbildung (46) zeigt ein M-Hefesensor. Die doppelzellige Hefe hinterlässt im Polymer Abdrücke von 4 bis 6 μm groß und je nach Verdünnung des Vorpolymers 500 bis 700 nm tief für jede ihre Knospe.

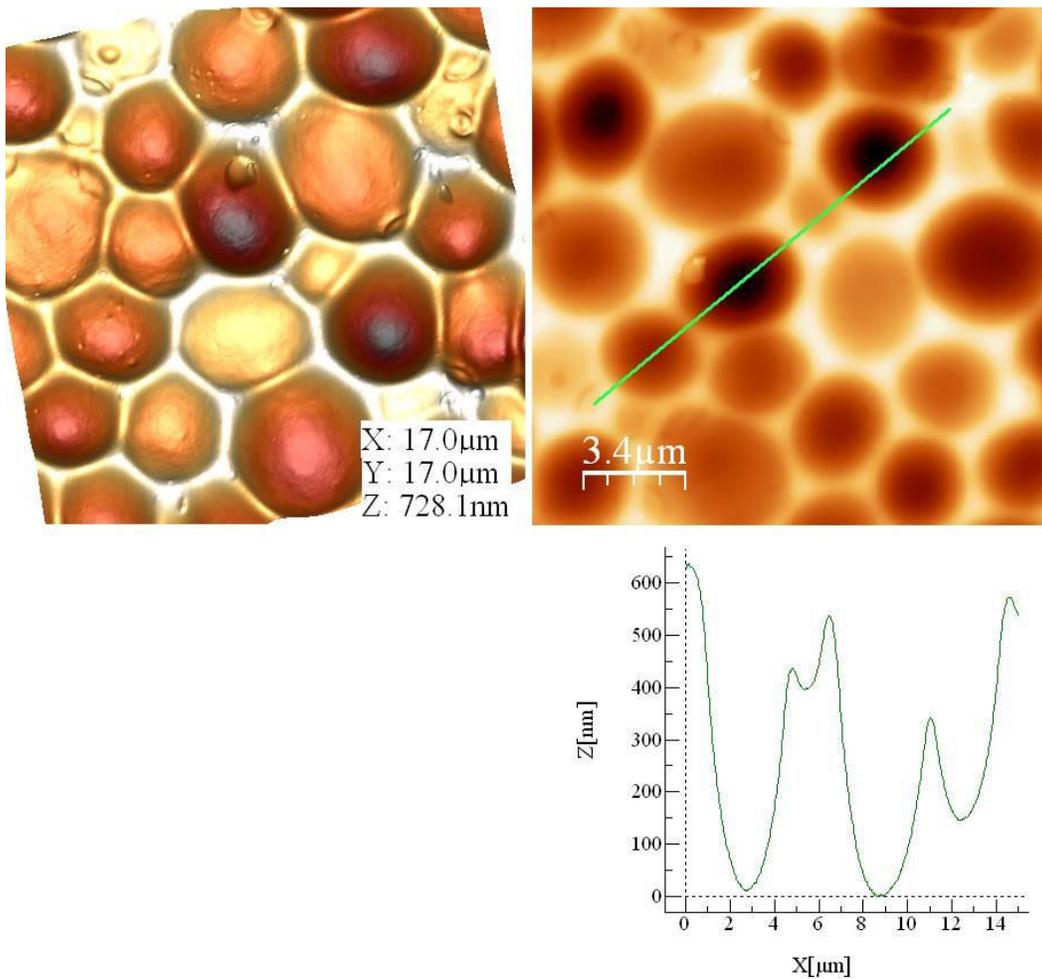


Abbildung 45: Sektionsanalyse von Polymeroberfläche: sensitive Schicht aus Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) auf der Messelektrode eines Schwingquarzes. Polymerschichtdicke: 1000 μm . Prägung erfolgte mit synthetischen Hefezellen *S. cerevisiae* aus Silikon. Die Mastersilikonzellen stellen die Replika der Hefezellen in der S-Teilungsphase dar. AFM contact mode, bearbeitet mit WSxM Programm. Die großen Kavitäten sind 500 bis 600 nm tief und 4 bis 6 μm breit, die kleineren Kavitäten sind etwa 200 nm tief und 500 bis 2000 nm breit.

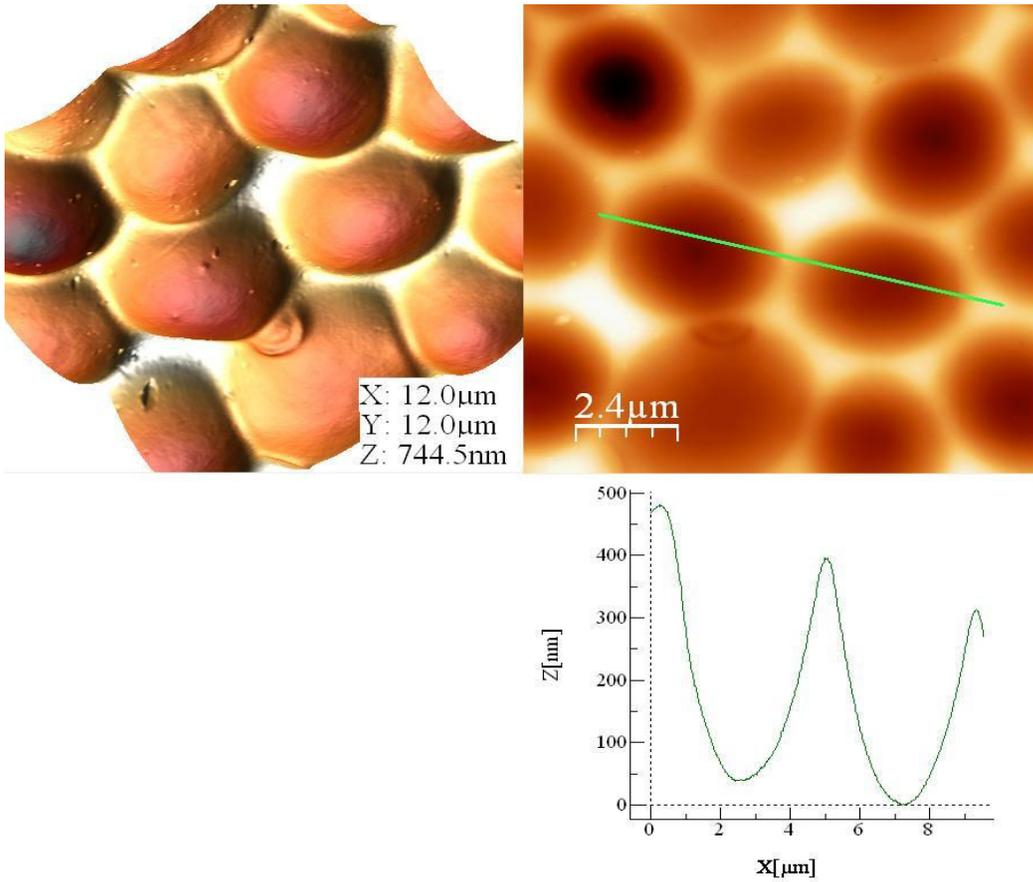


Abbildung 46: M-Hefesensor. Sektionsanalyse einer Polyurethanoberfläche (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit synthetischen duplexen Hefezellen aus Silikon. Polymerschichtdicke: 10000 nm. Die Hefe-zellen entsprechen der M-Zellteilungsphase. Die abgetastete Oberfläche: 12x12 μm. Zwei-dimensionale Darstellung mit AFM contact mode, bearbeitet mit WSxM Programm. Die Kavitäten sind 400 bis 500 nm tief und 4 bis 6 μm breit.

4.6. Hefechip

Die wichtigsten Kenndaten eines Chemosensors sind derer Sensitivität, Selektivität, Reproduzierbarkeit und Genauigkeit. Diese physikalisch-chemischen Eigenschaften sind von der Beschaffenheit des Transducermaterials und der geprägten sensitiven Schicht abhängig.

In der Abbildung (47) sind die Frequenzänderungen der jeweiligen Elektroden von 15 verschiedenen Schwingquarzen als Beispiel angeführt, die entweder mit einem Frequenzanalysator oder über einen Frequenzzähler verbunden mit der Acrylmesszelle vermessen wurden. Durch das Anbringen der Goldelektroden und später dann durch die sensitive Schicht sinkt die Frequenz und auch die Dämpfung verschlechtert sich. Für die Herstellung von einem optimalen Chip ist es notwendig, dass die Dämpfung der nackten Elektroden unterhalb von -2,0 dB liegt. Bei der Verwendung von Hefesensoren muss man darüber hinaus beachten, dass die effektive Schichtdicke des aufgetragenen Polymers für solche großen Analytzellen sich im Bereich von 1,0 bis 2 μm befindet. Es muss also wieder mit

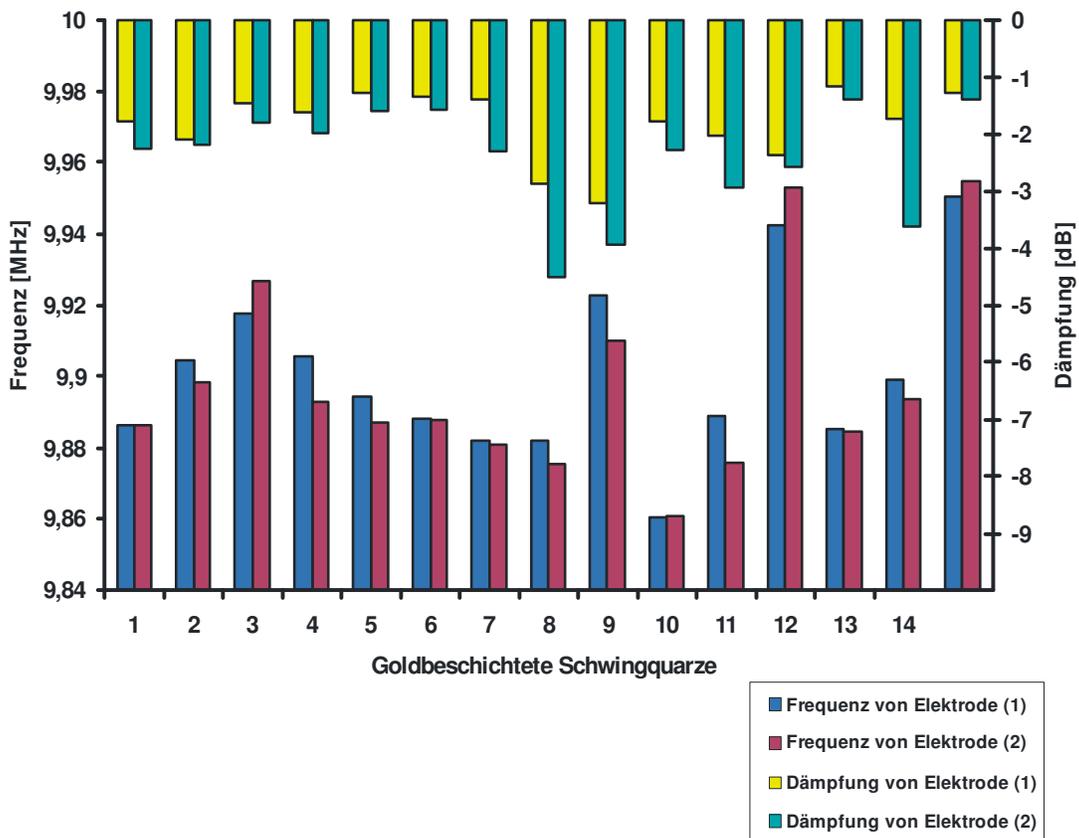


Abbildung 47: Schwingquarze mit Resonanzfrequenz von 10 MHz beschichtet mit Goldelektroden. Messwerte entsprechen der Vermessung mit Netzwerkanalysator. Zum Vergleich wurden 15 regenerierte Schwingquarze mit dualem Elektrodendesign herangezogen und die Resonanzfrequenz von beiden Elektroden und die entsprechende Dämpfung vermessen.

einer wesentlichen Verschlechterung der Dämpfung rechnen, was sich natürlich bei der Qualität der später aufgenommenen Sensorcurve aufschlägt. Die untere Abbildung (48) verdeutlicht die Änderung der Resonanzfrequenz und Dämpfung mit der aufgetragenen Polymerschicht. Durch die Schicht verschiebt sich mit der Dicke die serielle und parallele Resonanz zu kleineren Frequenzwerten, wobei auch die Dämpfung sich verschlechtert.

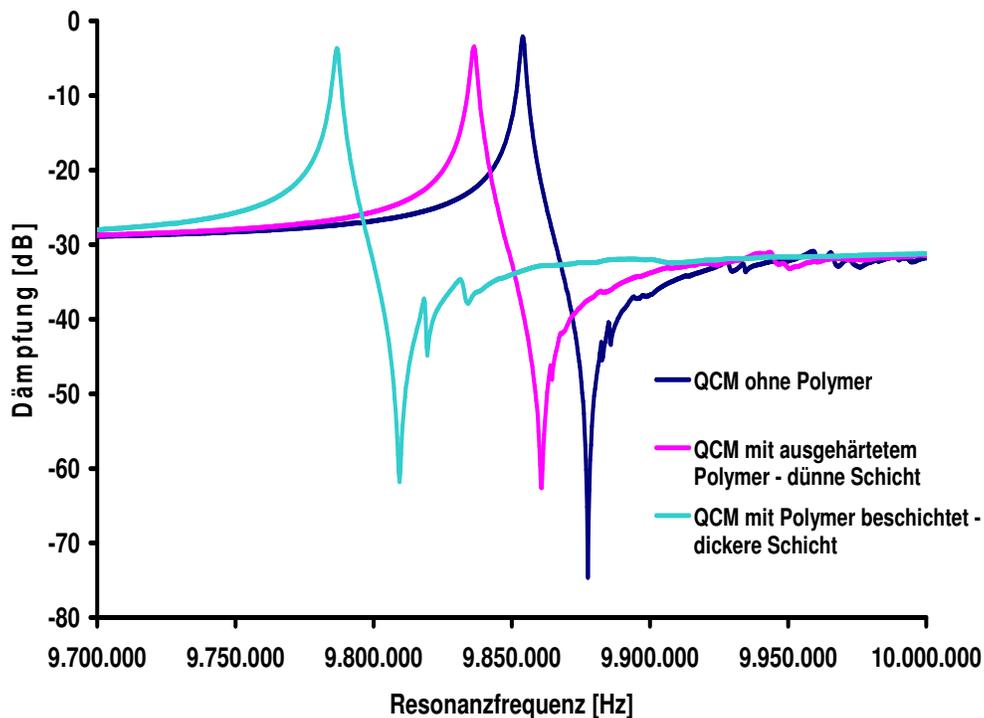


Abbildung 48: Vergleich von Messeffekten eines 10 MHz Schwingquarzes mit Netzwerk-analysator. (1) Der Schwingquarz mit dualen Goldelektroden-Design wurde gereinigt vermessen (dunkelblaue Kurve); die Dämpfung beträgt -2 dB. (2) Der Schwingquarz wurde mit Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) mittels Spin-Coating beschichtet. Dämpfung: -4 dB. Die effektive Schichtdicke: 1200nm. (3) Der Schwingquarz wurde mit Vorpolymer beschichtet, wobei die Dämpfung -4 dB und die effektive Schichtdicke ca. 2500nm beträgt.

Für die Herstellung von Hefechips wurden Silikonmaster verwendet. Bei allen hier angeführten Messungen wurden 10 MHz Quarze mit dualer Elektroden-geometrie verwendet. Die Elektroden wurden mittels Siebdruckverfahren auf die Oberfläche von gereinigten Quarzen aufgetragen – siehe Kapitel 3.2. Über die größeren Elektroden wurde eine Schicht aus geeignetem Vorpolymer homogen

aufgespinnnt und eine der Rundelektroden wurde mit einem Silikonmaster mit den entsprechenden künstlichen Hefezellen auf der Kontaktfläche versehen. Um die entsprechenden Tiefenprofile der Kavitäten zu erreichen, wurden die Stempel mit einer Büroklammer am Quarz festgehalten, wie es in der Abbildung (49) gezeigt wird.

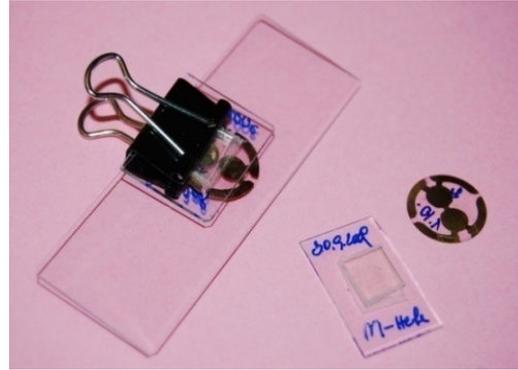


Abbildung 49: Prägetechnik mit einem Silikonmaster. Die Silikonplättchen mit synthetischen Zellen werden mit der ungeprägten Seite auf ein Glasplättchen aufgeklebt.

Die Aushärtung des Polymers erfolgte bei der Raumtemperatur je nach der verwendeten Schichtdicken über 12 bis 48 Stunden. Durch das Ablösen des Stempels von der Polymeroberfläche werden in dieser Kavitäten für die spätere Anlagerung der Analyzellen generiert. Ausgehärteter Polyurethan stellt ein chemisch und mechanisch robustes Polymer, das sich in der Sensorik bewährt hat. Trotzdem wurde nach öfter Benutzung eines Hefechips beobachtet, dass sich die sensitive Schicht in einem wässrigen Medium von der Quarzoberfläche ablöst – siehe Abbildung (50). Dieses Problem wurde durch Thiolisierung der Goldelektroden auf der Quarzoberfläche umgegangen. Dazu wurden die Quarzplättchen in Piranha-Lösung (H_2SO_4 mit H_2O_2 im Verhältnis 3:1) kurz gewaschen. Im nächsten Schritt werden sie in 1 mM Dimercaptobutan-ethanolischen Lösung über 5 Stunden bei $60^\circ C$ thiolisiert. Danach werden die Oberflächen der Schwingquarze gründlich

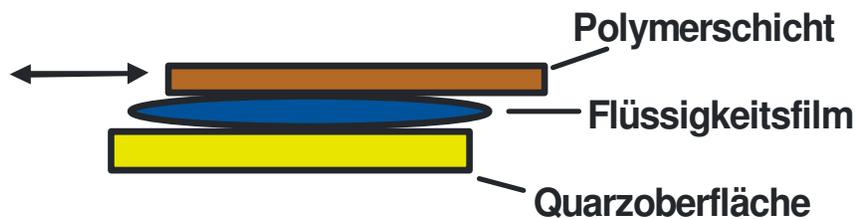


Abbildung 50: Beweglichkeit eines Polymers auf einer Quarzoberfläche.

mit Ethanol gewaschen und trocken gelassen. Über die thiolisierten Elektroden können nun Vorpolymere aufgetragen werden und zur Prägung mit den Analyt-zellen verwendet werden.

4.7. Messungen mit einfachen Hefesensoren

Für die folgenden Messungen wurden Konzentrate von frischer Backhefe und anderen Hefegattungen hergestellt, wobei 1 g Presshefe etwa 10^{10} Hefezellen enthält. In praktischer Ausführung wurden 5 mg/ml abgewogen und in destil-liertem Wasser gerührt. Für die genauen Angaben zu den Konzentrationen der Hefesuspensionen wurde eine Zählkammer von Neubauer verwendet. Die Mes-sung der Sensoreffekten erfolgte in einer Silikonmesskammer mit einem Vo-lumen von 150 μ l oberhalb des Quarzes mit den großen Goldelektroden nach oben. Die Zuführung der Flüssigkeit, die dann in Kontakt mit der sensitiven

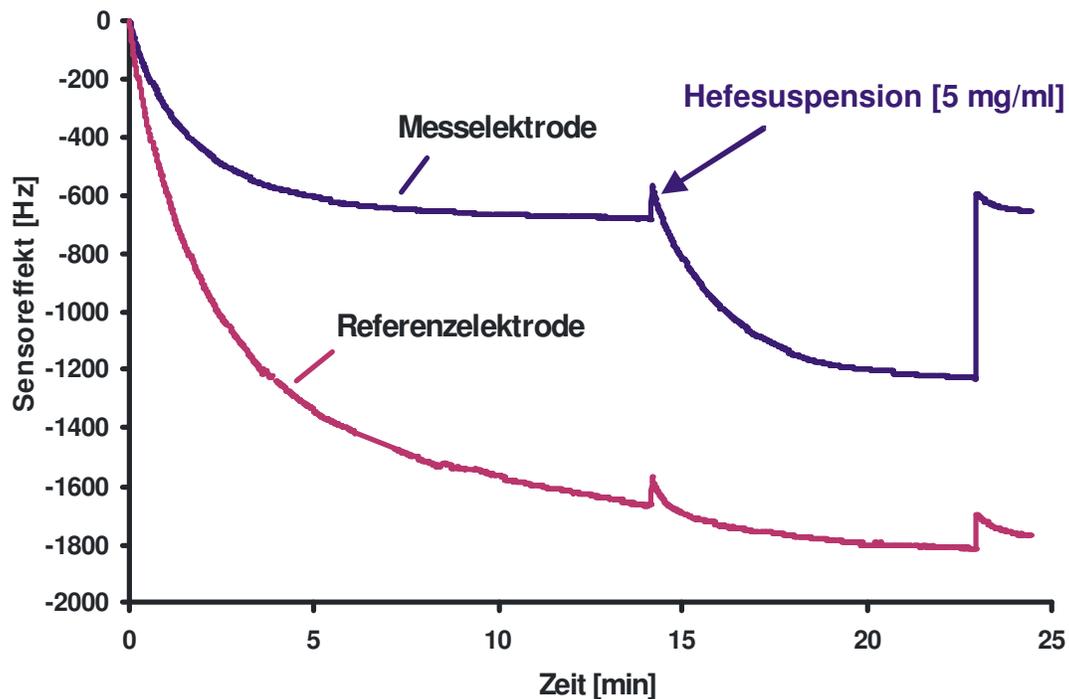


Abbildung 51: Sensoreffekt von einem 10 MHz Hefechip mit Polyurethanbeschichtung (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI), Schichtdicke 1,2 μ m. Messelektrode: Prägung mit nativen ungeteilten Hefezellen der Gattung *S. cerevisiae*; Referenzelektrode: ungeprägtes Polyurethan. Messkurve: Einschwingen des QCM mit dest. Wasser, Zugabe von 5 mg/ml Hefesuspension in G1 Phase in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur. Gemessen im stopped-flow Modus.

Schicht tritt, erfolgte mit einer Peristaltikpumpe im stopped-and-flow Modus bei Raumtemperatur. Der beschichtete Schwingquarz wird zuerst im destillierten Wasser für eine bis fünf Stunden quellen gelassen, wobei eine starke Abnahme der Frequenz zu erwarten ist. Nach Einstellen der Basislinie wird das Hefekonzentrat in die Messkammer geleitet und die Frequenzabnahme entsprechend dem Sauerbrey-Verhalten am Frequenzzähler abgelesen. Nach Einstellen des Messeffektes wird mit destilliertem Wasser gespült und damit erneut auf die Basislinie rückgestellt.

In der Abbildung (51 und 52) sind Sedimentationseinflüsse auf das Sensorsignal gezeigt. Beide Elektroden – geprägte Messelektrode mit den Kavitäten und ungeprägte Referenzelektrode – zeigen beim Einführen der Hefelösung in die Messzelle einen Effekt. Bei der Messelektrode tritt ein größerer Effekt, also die Frequenzerniedrigung ist stärker, als bei der Referenzelektrode. Der Effekt bei der

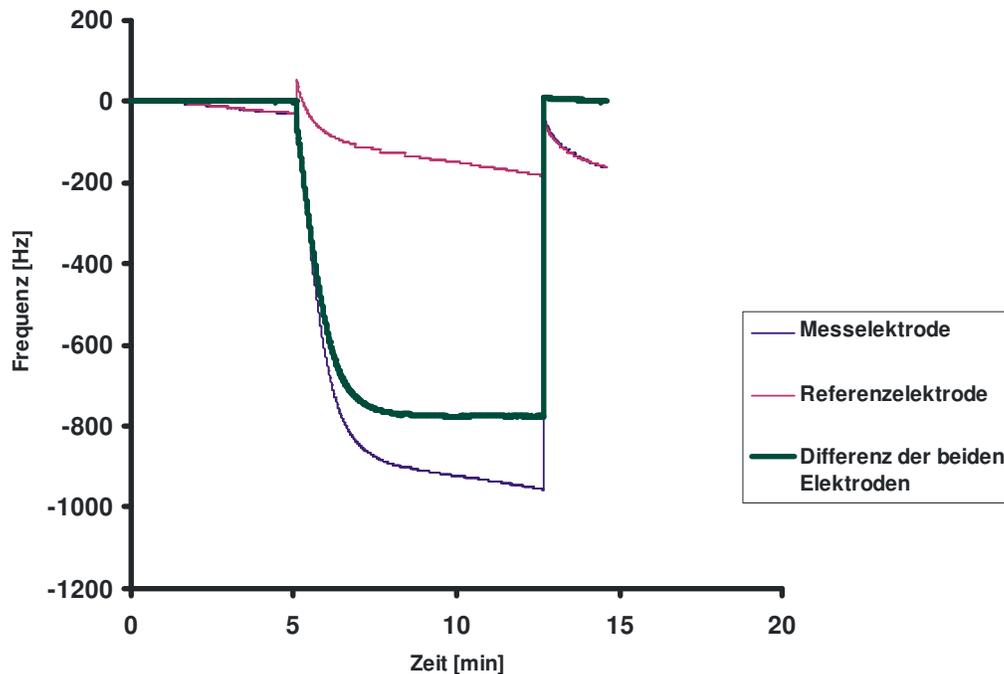


Abbildung 52: Sensoreffekt von einem 10 MHz Hefechip mit Polyurethanbeschichtung (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) ausgehärtet in THF Atmosphäre bei Raumtemperatur, Schichtdicke 1,1 μm . Prägung mit synthetischem Silikonhefestempel selektiv für ungeteilte Hefezellen der Gattung *S. cerevisiae*. Zugabe von 5 mg/ml Hefesuspension in G1 Phase in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur. Gemessen im stopped-flow Modus.

Messelektrode verläuft erwartungsgemäß, da sich in sensitiver Schichtdicke, die Polyurethan darstellt, Kavitäten für die Hefezellen befinden. Bei der Einlagerung vom Analyt kommt es automatisch zu Frequenzänderung, die der Konzentration der jeweiligen Lösung entspricht. Die Frequenzerniedrigung an der Referenzelektrode entspricht einer unselektiven Anlagerung der Zellen auf dem Polymer. Aus der Graphik ist auch die zeitliche Änderung des Signals von dem Zeitpunkt des Einbringens der Messlösung in die Messzelle bis zum Auswaschen mit destilliertem Wasser bei der Raumtemperatur.

Die in der Abbildung (53) gezeigten Messkurven beweisen die Stabilität und Reproduzierbarkeit des Mess-Signals. Beim mehrmaligen Messen der gleichen Hefekonzentration bleiben die Frequenzänderungen gleich hoch.

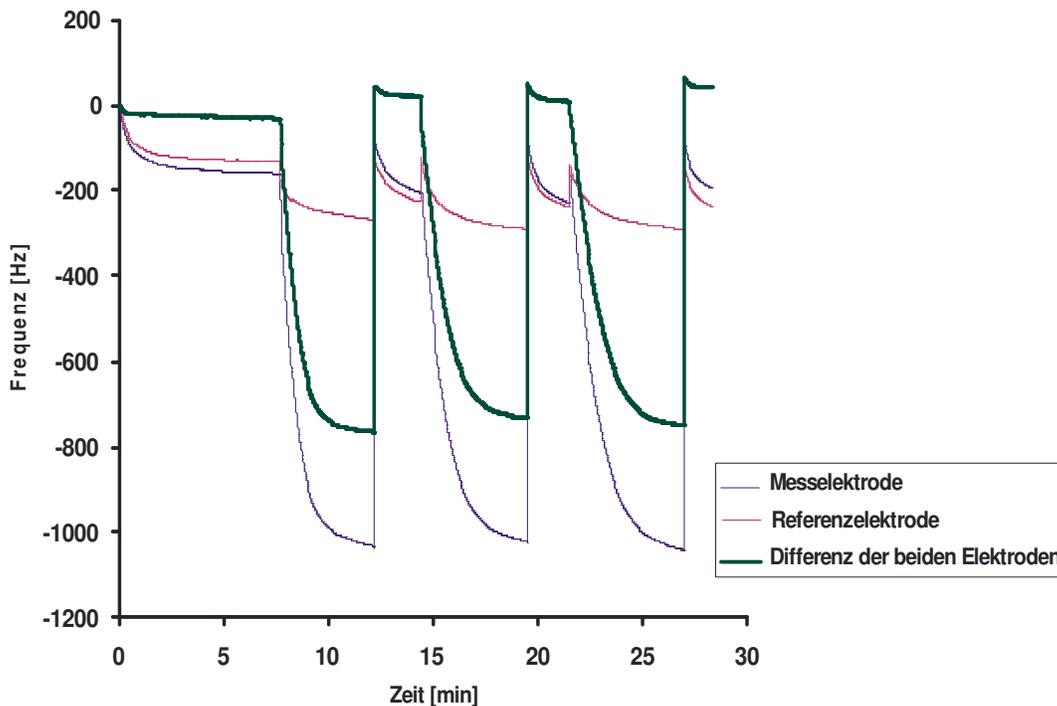


Abbildung 53: Stabilität des Sensorsignales bei einem Hefensensor mit Polyurethanbeschichtung (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) ausgehärtet in THF Atmosphäre bei Raumtemperatur, Schichtdicke 1,1 μm . Prägung mit synthetischem Silikonhefestempel selektiv für ungeteilte Hefezellen der Gattung *S. cerevisiae*. Zugabe von 5 mg/ml Hefesuspension in G1 Phase in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur. Gemessen im stopped-flow Modus.

Die folgende Abbildung (54) zeigt die sensitive Schicht mit den entsprechenden Kavitäten. Das Bild (54.a) zeigt die leeren Kavitäten am Messelektrode eines 10 MHz Schwingquarzes, der mit synthetischen Hefezellen aus Silikon geprägt wurde. Im Bild (54.b) werden die mit nativen Hefezellen gefüllten Kavitäten gezeigt. Die Aufnahmen wurden mit Durchlichtmikroskopie mit 50- respektive 100-fachen Vergrößerung durchgeführt.

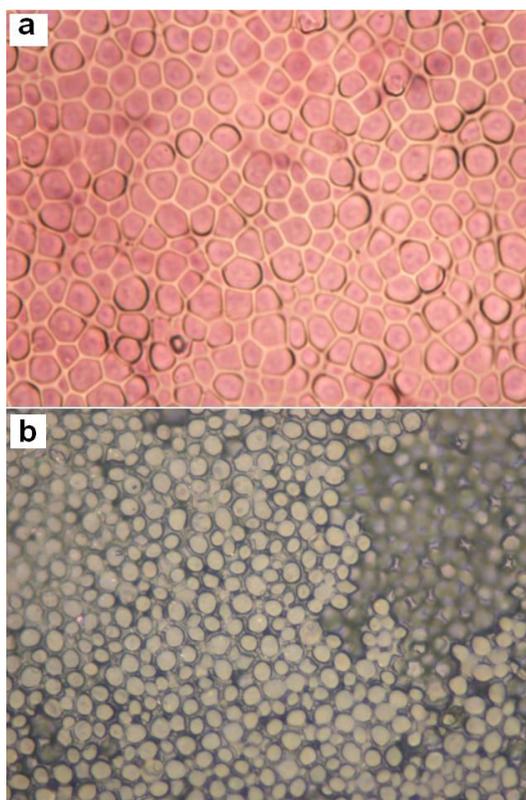


Abbildung 54: Lichtmikroskopische Aufnahmen von der sensitiven Schicht am Schwingquarz. Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit Silikonzellen als Replika der Hefeinzellen. Schichtdicke 1,1 μm . (a) Leere Hefekavitäten im Polyurethan – Aufnahme vor der gravimetrischen Messung. 100-fache Vergrößerung. (b) Aufgefüllte Kavitäten nach der Messung mit den Einzelzellen, wobei diese nicht ausgespült wurden. 50-fache Vergrößerung.

Durch die Variation der Zellkonzentrationen wurde eine Kalibrierkurve aufgenommen – siehe Abbildung (55). Die Kurve zeigt eine Linearität bis zu der Konzentration von 2,5 mg Hefezellen/ml im destillierten Wasser. Darüber hinaus zeichnet sich ein Plateau aus.

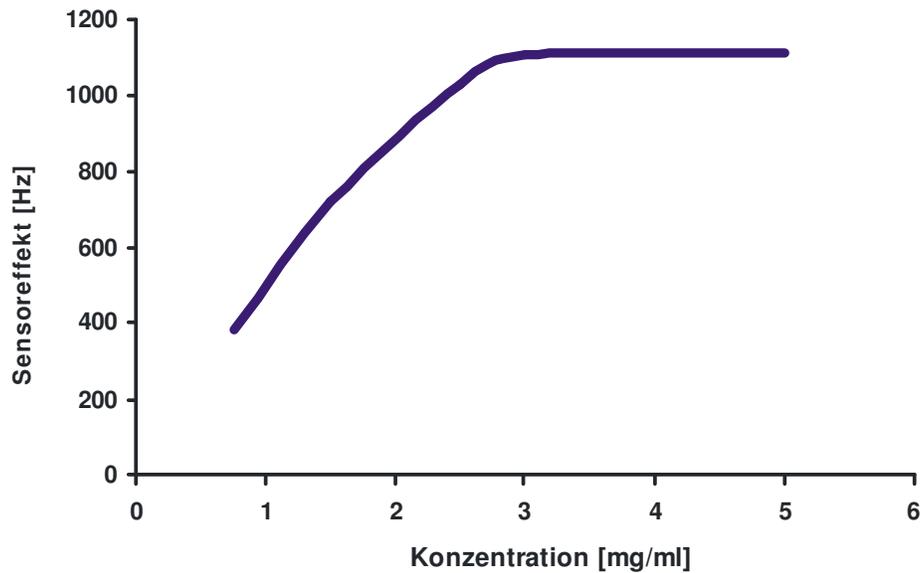
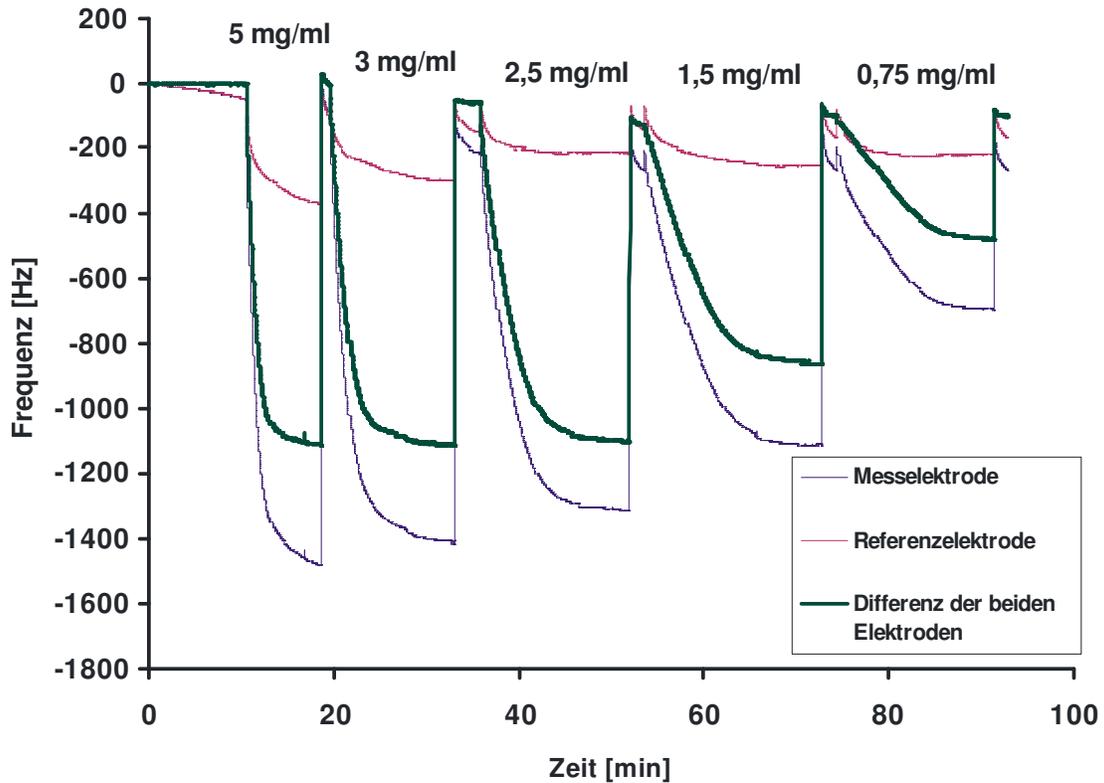


Abbildung 55: Konzentrationsabhängigkeit eines Hefesensor mit Polyurethanbeschichtung (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) ausgehärtet in THF Atmosphäre bei Raumtemperatur, Schichtdicke 1,1 μm . Prägung mit synthetischem Silikonhefestempel selektiv für ungeteilte Hefezellen (*S. cerevisiae*). Zugabe von 5; 3; 2,5; 1,5 und 0,75 mg/ml Hefesuspension in G1 Phase in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur. Gemessen wurde im stopped-flow Modus.

4.8. Andere Polymersysteme

Neben dem Polyurethan, der sich als sehr robust und somit praktisch für die Messung erwiesen hat, wurde auch Polymethacrylat für die Herstellung von sensiblen Schichten verwendet. Beim Vergleich von beiden Polymersystemen findet man andere funktionellen Gruppen beim Polymethacrylat wie OH- und COOH-Gruppen. Polymethacrylat stellt ein wässriges System dar, was in Gegensatz zu Polyurethan mit organischem Lösungsmittel eine höhere biologische Verträglichkeit mit sich bringt. Vor allem bei biologischen Proben wie Zellen, deren Oberflächen zu rund 90% aus Proteinen bestehen, ist das Polymethacrylat-system gegenüber den Polyurethanen vorzuziehen. Die Zellsensoren, die mit den nativen Zellen geprägt wurden, zeigen in den nachfolgenden Messungen sensitivere Effekte, da die bessere Adaptation eine effizientere und vor allem selektivere Einlagerung mit sich bringt. Ein Nachteil dieser Systeme stellt die geringe mechanische Stabilität. Polymethacrylat lässt sich bereits nach einigen Messungen in wässriger Phase von der Schwing-quarzoberfläche herunter

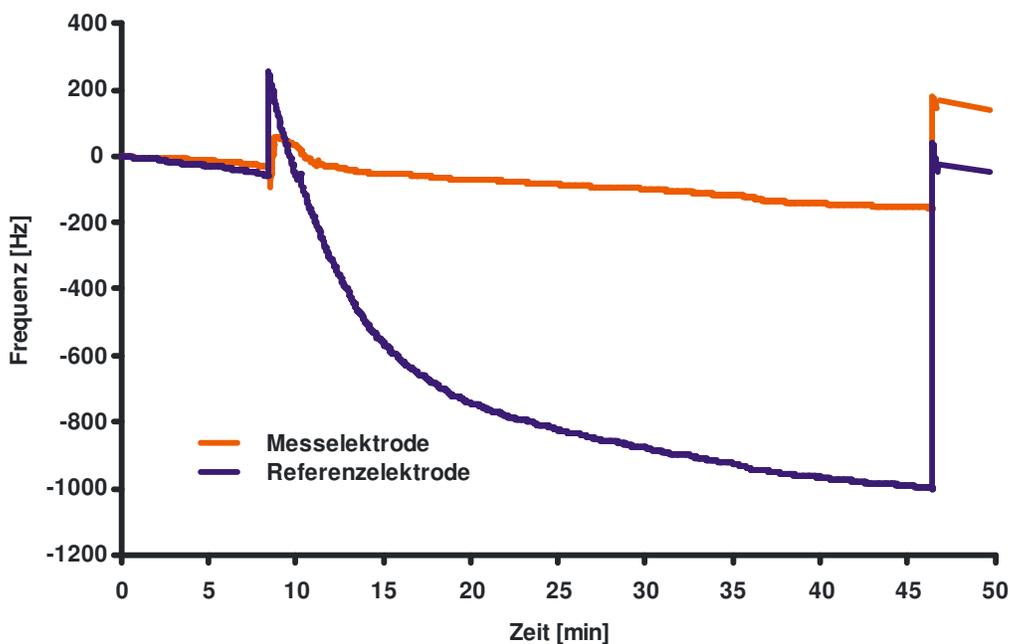


Abbildung 56: Hefesensor: 10 MHz Quarz beschichtet mit Polymethacrylat (Methacrylsäure 60 w/w %, Vinylpyrrolidon 20 w/w %, DHEBA 20 w/w %), Schichtdicke 1000 nm. Prägung mit ungeteilten synthetischen Hefezellen (G1). Der Sensoreffekt bezieht sich auf die Lösung von *S. cerevisiae* der Konzentration 5 mg/ml in destilliertem Wasser.

waschen.

Polymethacrylat (Methacrylsäure 60 w/w %, Vinylpyrrolidon 20 w/w %, DHEBA 20 w/w %) wurde ebenfalls für die Prägung mit den synthetischen Hefemastern aus Silikon verwendet. Die in der Abbildung (56) gezeigte Messkurve stellt einen Effekt bei der Wiedereinlagerung der nativen Hefezellen in die in der sensitiven Schicht aus Polymethacrylat hergestellten Hohlräume. Die Kavitäten wurden durch Prägung mit Silikonmaster der ungeteilten Hefezellen generiert.

4.9. Messung von Hefezellen in verschiedenen Phasen des Teilzyklus

Wie schon im Kapitel 4.3. erläutert wurde, lassen sich die aktivierten Hefezellen im geeigneten Nährmedium zum Teilen anregen. Durch die Wahl der Nährmedienskomponenten verläuft die Teilung in unterschiedlicher Geschwindigkeit. Für die Herstellung von Hefesensoren für die Hefezellen in den jeweiligen Teilungsstadien müssen die Zellen geeignet synchronisiert werden. Bei der Verwendung von N-Hydroxyharnstoffes lassen sich die Hefezellen in dem dritten Zellteilungsstadium, also M-Phase, synchronisieren.

Die Synchronisierung der Hefezellen kann auf zwei Arten durchgeführt werden, wobei die Inhibitoren an verschiedenen Stellen arretieren. N-Hydroxyharnstoff (Abbildung 57) (Hydroxyurea, Fa. Calbiochem) stellt ein Inhibitor von Enzym Ribonukleotid Reduktase dar. Durch die Einwirkung von Hydroxyurea können die Zellen keine Deoxyribonukleotide synthetisieren und die DNA-Synthese wird sich nicht

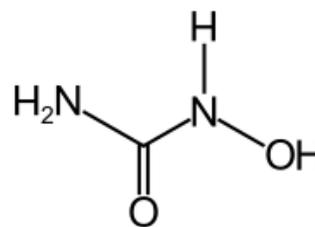


Abbildung 57: Hydroxyharnstoff.

vervollständigen. Einen anderen Zellsynchronisierer stellt Nocodazol dar. Dieses Zellgift verhindert den Aufbau und die Polymerisation der Mikrotubuli, wodurch die Chromosomen während der Mitose nicht ausgerichtet und getrennt werden können. Damit lassen sich die Hefezellen in das Stadium M synchronisieren,

bevor die Zellteilung abgeschlossen werden kann. Der Nachteil der Technik ist, dass die Methode kostenaufwendiger ist und außerdem die Ausbeute an doppelzelliger Hefe geringer ist.

Für das Synchronisieren von den Hefezellen wurde handelsübliche Backhefe, was der Gattung *S. cerevisiae* mit einer Restfeuchte von etwa 30% entspricht, gekauft. Es wurden 250 mg von der Packung abgewogen, mit destilliertem Wasser gewaschen und in 100 ml YPD Nährmedium (Hefeextrakt 3 mg/ml, Pepton 5 mg/ml, D-Glucose 10 mg/ml) suspendiert. Nach 5 Minuten wurde 750 mg Hydroxyharnstoff dazugegeben und unter ständigem Rühren bei 25°C über 5 Stunden lang teilen gelassen. Die Fortschritte der Teilung konnten leicht mit Hilfe

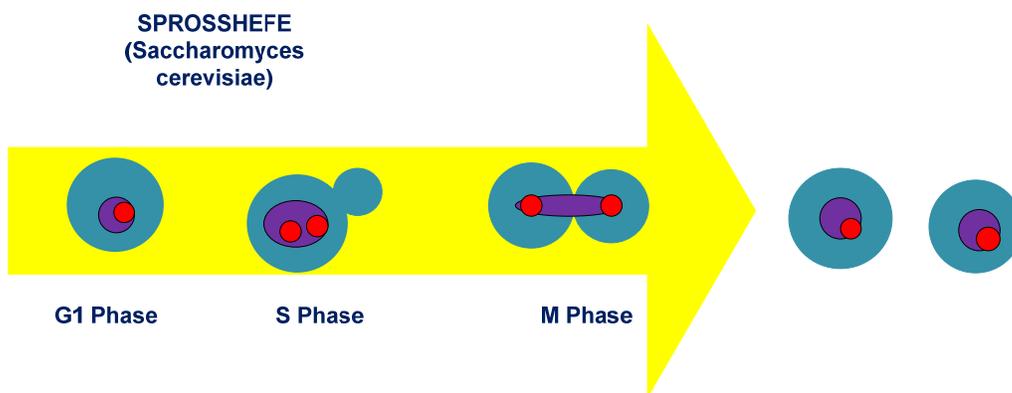


Abbildung 58: Bei der Spaltheefe verläuft der Zellzyklus über G1, S und M-Phase, wobei sie keine abgegrenzte G2-Phase (angrenzend an die S-Phase) durchläuft - im Gegenteil zu Spaltheefe. Stattdessen bildet sich schon früh im Zyklus, noch während der S-Phase, eine Spindel aus Mikrotubuli im Kern aus. Durch die Verwendung von Hydroxyharnstoff, zu den Zellen einheitlich in der G1-Phase zugemischt, werden die Zellen in der M-Phase als Doppelzellen aus dem Zellteilungszyklus aussteigen.

von Auflichtmikroskop überprüft werden (Abbildung 58). Synchronisierte Hefezellen wurden anschließend gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und im geeigneten Puffer aufgenommen. Für die Lagerung in der Tiefkühltruhe wurden sie abzentrifugiert und ohne Flüssigkeit über 2 Wochen lang gehalten.

Die mit N-Hydroxyurea behandelten Hefesuspensionen enthalten in der Regel mehr als 95% synchronisierte Hefezellen.

4.10. Querselektivität zwischen den synchronisierten Hefezellen

Die in verschiedene Stadien synchronisierten Zellen wurden unter Anderem bei den Messungen verwendet, um die Selektivität des Hefesensors zu überprüfen, der mit ungeteilten Hefezellen geprägt wurde. Da sich die Oberflächen der Zellen nicht wesentlich unterscheiden, ist für die Sensoreffekte größtenteils nur der geometrische Fit ausschlaggebend.

Die erhaltenen experimentellen Messergebnisse werden in den Abbildungen (59) bis (61) präsentiert. Der verwendete 10 MHz Schwingquarz wurde mit Polyurethan der Zusammensetzung Bisphenol A (47,8% w/w), Phloroglucin (12% w/w), MDI (40,2% w/w) in Tetrahydrofuran beschichtet und mit synthetischen Zellen ohne Knospen, in sog. Phase G1, mittels Stempeltechnik geprägt. Die zu den Messungen verwendeten Hefezellen wurden jeweils in destilliertem Wasser gewaschen und bei gleicher Konzentration der Messzelle zugeführt. Die Konzentra-

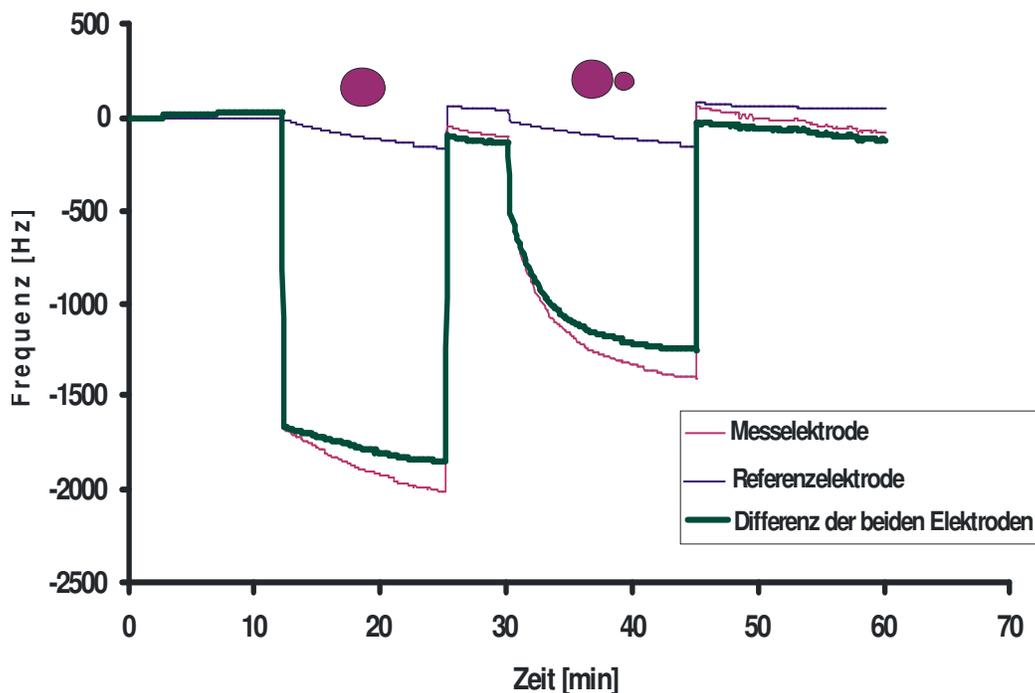


Abbildung 59: Querselektivität eines Hefesensor sensitiv für *S. cerevisiae* in ungeteiltem Stadium. 10 MHz Quarz mit dualer Elektrodengeometrie beschichtet mit Polyurethan (47,8% BPA, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI), Schichtdicke 1µm. Prägung mit synthetischen ungeteilten Hefezellen. Zugabe von 5mg/ml *S. cerevisiae* in destilliertem Wasser in G1-Phase (ungeteilt) und in der Anfangsphase ihres Teilungszyklus. Gemessen wurde im stopped-and-flow Modus.

tionen wurden durch die Zellenzählung in der Zählkammer (Neubauer improved) ermittelt. Durch die tunnelmikroskopischen Messungen wurden die geometrischen Parameter der Kavitäten vermessen und mit jenen der synchronisierten Zellen verglichen.

In der Abbildung (59) werden zwei Sensoreffekten nebeneinander gestellt, die von Hefezellen in verschiedenen Teilungsstadien vorliegen. Die erste Frequenzerniedrigung von etwa 1800 Hz wurde durch die ungeteilten Hefezellen in G1 Phase erzielt, die auch zur Prägung mit synthetischen Stempeln herangezogen wurden. Der nächste Sensoreffekt entspricht der gleichen Konzentration der Hefezellen in dem nächsten Teilungsstadium. Die Zellen haben angefangen sich zu vergrößern, an einer Seite der Hefezelle wächst ein „Bud“. Diese Hefezellen sind vergleichsweise gleich groß wie die Zellen in der ungeteilten Form, wenn man den kleinen Bud nicht berücksichtigt. Der Sensoreffekt von rund 61 % deutet auf die Bedeutung der Ausrichtung der kleinen Knospe in der unmittelbaren Nähe der sensitiven Schicht mit den geprägten Kavitäten.

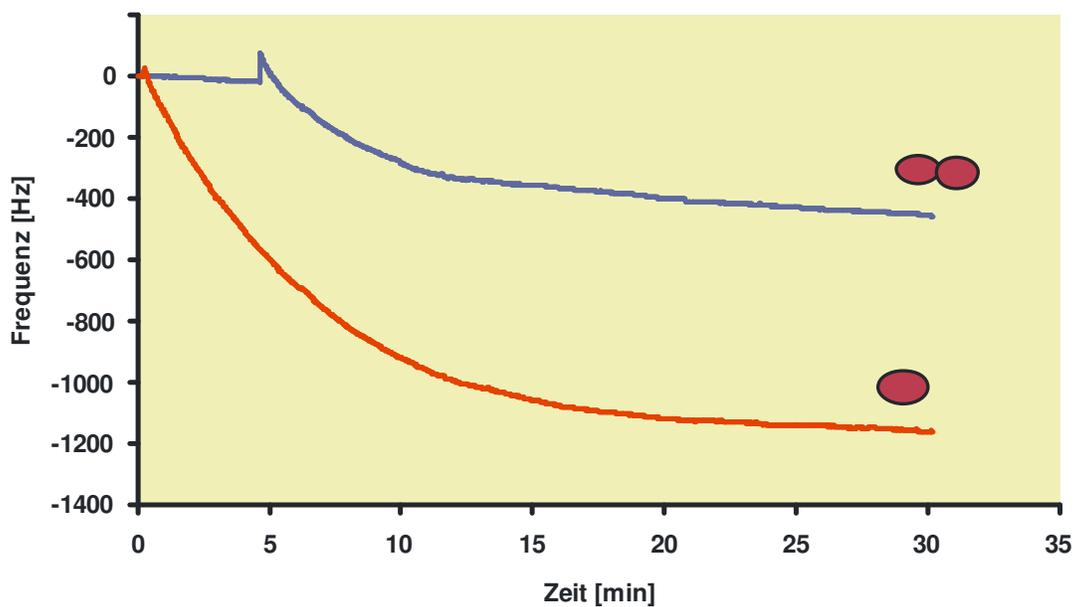


Abbildung 60: Sensoreffekte für die Messung von ungeteilten und geteilten Hefezellen im Nährmedium, wobei der Schwingquarz mit Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI beschichtet ist. Die Kavitäten entsprechen den ungeteilten Hefezellen. Zugabe von 5 mg/ml *S. cerevisiae* in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur. Gemessen wurde im stopped-flow Modus, Prägung mit synthetischen ungeteilten Hefezellen.

Wie die Messung in der Abbildung (60) zeigt, weisen die Hefesensoren für einfache, nicht geteilte Hefezellen sowohl hohe Selektivität, als auch niedrige Querempfindlichkeit gegenüber synchronisierten Doppelzellen. Für die Konzentrationen von 5 mg/ml Hefezellen in G1 Stadium ergeben sich Sensoreffekte von rund 1200 Hz, dagegen für die synchronisierten Doppelzellen in destilliertem Wasser bei gleicher Konzentration unter gleichen Bedingungen nur 400 Hz, obwohl die Zellen eine quasi doppelte Zellmasse aufweisen.

Die nächste Abbildung (61) veranschaulicht die Verhältnisse bei der Messung von allen drein häufigsten Erscheinungsformen, die man in großer Ausbeute synchronisieren kann. Der erste Messeffekt bezieht sich auf die Prägezellen, deswegen überragt er erwartungsgemäß die anderen Effekte.

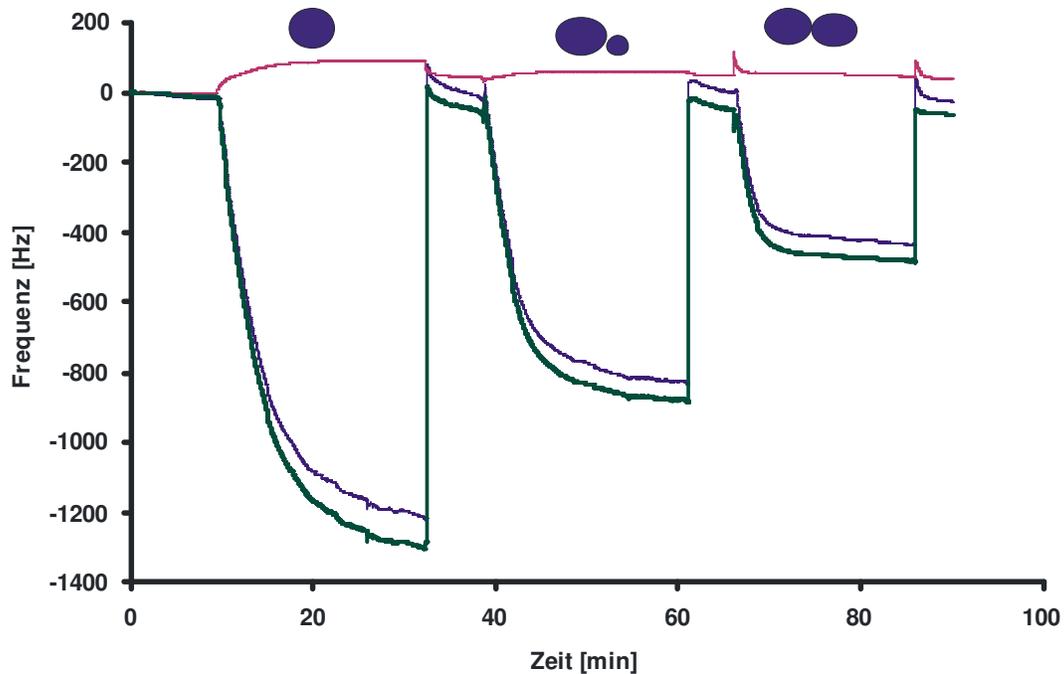


Abbildung 61: Vergleich der Messeffekte für ein Hefechip sensitiv für ungeteilte Zellen von *S. cerevisiae*. 10 MHz Schwingquarz beschichtet mit Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI). Schichtdicke 1,1 μ m. Zugabe von *S. cerevisiae* in ungeteiltem Stadium, sowie in S-Phase und Doppelzellen bei gleicher Konzentration 5 mg/ml in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur. Gemessen in stopped-flow Modus, Prägung mit synthetischen ungeteilten Hefezellen.

4.11. Silikonmaster für sich teilende Hefezellen

Bei der Herstellung von den synthetischen Stempeln aus Silikon für die Hefezellen in den anderen Zellteilungsstadien wurde nach dem gleichen Prinzip gearbeitet wie im Kapitel 4.4.3. beschrieben wurde. Die Hefezellen der Gattung *Saccharomyces cerevisiae* wurden im geeigneten Nährmedium (D-Glucose, Peptone, Hefeextrakt) aufgenommen. Durch die Behandlung mit Hydroxyharnstoff werden nach etwa 5 Stunden der Teilung Duplex-Hefezellen erhalten. Die auf diese Art und Weise erhaltenen Zellen werden gereinigt und der Rückstand aufkonzentriert. Die gereinigte Hefesuspension wird auf Silikon-stempel mit einer Spatel aufgetragen und bei Raumtemperatur einige Minuten lang trocknen gelassen, bis sich der Wasserrückstand sichtlich verringert. Die Stempel werden dann zur Prägung des Polymers herangezogen. Durch das Prägen mit nativen synchronisierten Hefezellen werden Hohlräume im Polyurethan (47,5% w/w Bisphenol A, 12% w/w Phloroglucin, 40,2% w/w MDI in Tetrahydrofuran) generiert, die nach dem Aushärten mit flüssigem Silikon (Sylgard 184) ausgegossen werden. Das Silikon härtet bei der Raumtemperatur 2 Tage lang oder im Ofen bei 60°C über mehrere Stunden aus. Durch das Trennen von Silikon und Polymer erhält man einen künstlichen Hefestempel. Die Oberfläche zeigt nun ein Muster von Zellen, die durch Silikonkopien gegeben ist. In

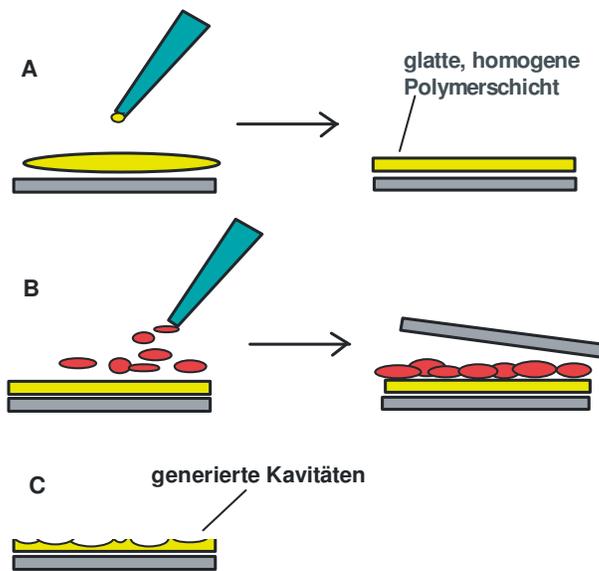


Abbildung 62: Methode des Spin-Coatings: auf gereinigtes Schwingquarz wird ein Vorpolymerisat aufgetragen und abgespinnt. In das noch nicht ausgehärtete Polymer wird eine hochkonzentrierte Zellsuspension mit einer Pipette getropft und mit einem Silikonplättchen zudeckt und bis zur vollständigen Aushärtung des Polymers fixiert.

Das Silikon härtet bei der Raumtemperatur 2 Tage lang oder im Ofen bei 60°C über mehrere Stunden aus. Durch das Trennen von Silikon und Polymer erhält man einen künstlichen Hefestempel. Die Oberfläche zeigt nun ein Muster von Zellen, die durch Silikonkopien gegeben ist. In

den nächsten Schritten wird dieser synthetische Stempel für die Prägung herangezogen.

Gravimetrische Messungen mit der Stempelmethode hergestellten sensitiven Schichten haben keine oder vernachlässigbare Unterschiede in der Selektivität gezeigt. Die Querselektivität der einzelnen Messungen war sehr niedrig. Aus diesem Grund wurde zu einer anderen Prägetechnik, der sogenannten Spin-Coating gegriffen (Abbildung 62). Dazu werden konzentrierte Lösungen der syn-

chronisierten Hefezellen – etwa 100 mg/ml Backhefe in destilliertem Wasser – mittels einer Gilson-Pipette in das noch nicht ausgehärtete Vorpolymer aufpipettiert. Es wird etwa drei Sekunden lang gewartet, bis die Zellen in das noch viskose Polymer sedimentieren und erneut abgespinnt. Auf die geprägte Seite wird ein gesäuberter Silikonstempel aufgetragen und mit einer

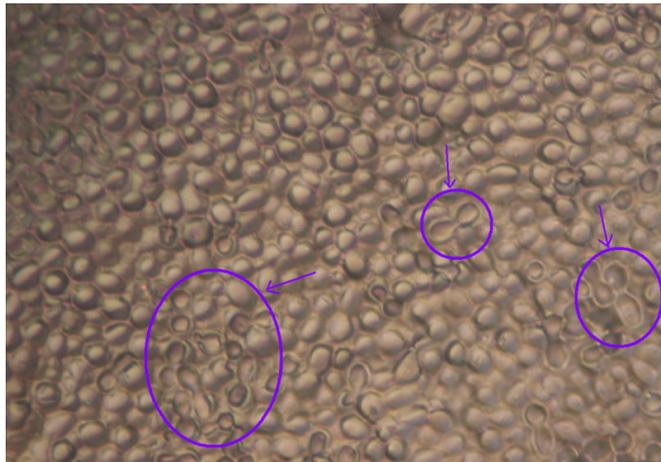


Abbildung 63: Synthetischer Hefestempel mit duplexen Zellen von *S. cerevisiae*, die der M-Zellteilungsphase entsprechen. Die Pfeile zeigen auf Gebiete mit Hohlräumen, die durch schlechtes Auswaschen von nativem Zellmaterial entstanden sind. Mastermaterial: Silikon (Sylgard 184), ausgehärtet bei Raumtemperatur. Durchlichtmikroskop – Vergrößerung von 100.

Büroklammer festgehalten. Der ausgehärtete Polymer wird vom Silikonstempel befreit und im lauwarmen destillierten Wasser rühren gelassen. Die Zellen aus den oberen Schichten gelangen dabei ins Wasser, die festsitzenden Hefezellen werden erst mit Hilfe von Ultraschall aus den eigenen Kavitäten entfernt. Nachdem das geprägte Polymer trocken vorliegt, können die Kavitäten mit Silikon ausgegossen werden. Dazu werden die Stempel mit der sensitiven Schicht nach oben in eine Schale fixiert und mit entgastem flüssigem Silikon übergossen, in etwa 2 mm Flüssigkeitshöhe oberhalb vom Stempel. In der

Abbildung (63) wird eine Aufnahme mit Durchlichtmikroskop vom Silikonmaster für Doppelzellen. Bei einem schlecht verarbeiteten geprägten Polymer werden später im ausgehärteten Silikon Kavitäten sichtbar, die bei erneutem Prägen von Schwingquarzen „falsche“ Hefezellen im Polymer entstehen

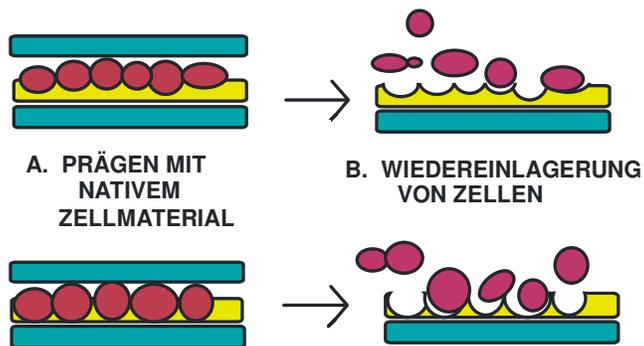


Abbildung 64: Wiedereinlagerung von Zellen als Abhängigkeit von Beschaffenheit des geprägten Polymers.

lässt. Die synthetisch hergestellten synchronisierten Hefezellen wurden für die gravimetrischen Messungen mit 10 MHz Schwingquarz verwendet. Die Messeffekte zeigen hohe Sensitivität bezüglich der Prägezellen, aber auch hohe Querselektivität. Da sich die Hefezellen in verschiedenen Stadien des Teilungszyklus nicht in der Beschaffenheit der Oberfläche, sondern nur in der Gestalt, musste zur selektiven Messung verschiedene Schichtdicken herangezogen werden. In der Abbildung (64) werden die Unterschiede bei der Prägung mit dem nativen Zellmaterial verdeutlicht. Wenn die aufgetragene Schichtdicke des Vorpolymers höher ist als der Durchmesser der kugelförmigen Zellen, die sich da wie starre Körper verhalten, und auch der Vorpolymer einige Sekunden ange trocknet wurde, entstehen nach dem Aushärten von Polymer flachere Zellenabdrücke, in die sich selektiv duplexe Hefezellen anlagern.

Die Abbildungen (65) und (66) zeigen sensitiven Schichten von den Hefechips, die für die Messung von Hefezellen in der S- und M-Phase hergestellt wurden. Die sensitiven Oberflächen wurden mit AF-Mikroskop im Kontakt Modus abgetastet. Die Darstellungen im 3D-Format wurden im WSxM Programm ausgewertet.

Die Abbildung (67) zeigt einen Hefesensor mit Polyurethanschicht von $2\mu\text{m}$. Das Polymer wurde an der Messelektrode mit synthetischen Doppelzellen des Hefestamms *S. cerevisiae* mittels Stempeltechnik geprägt. Die erste Frequenzerniedri-

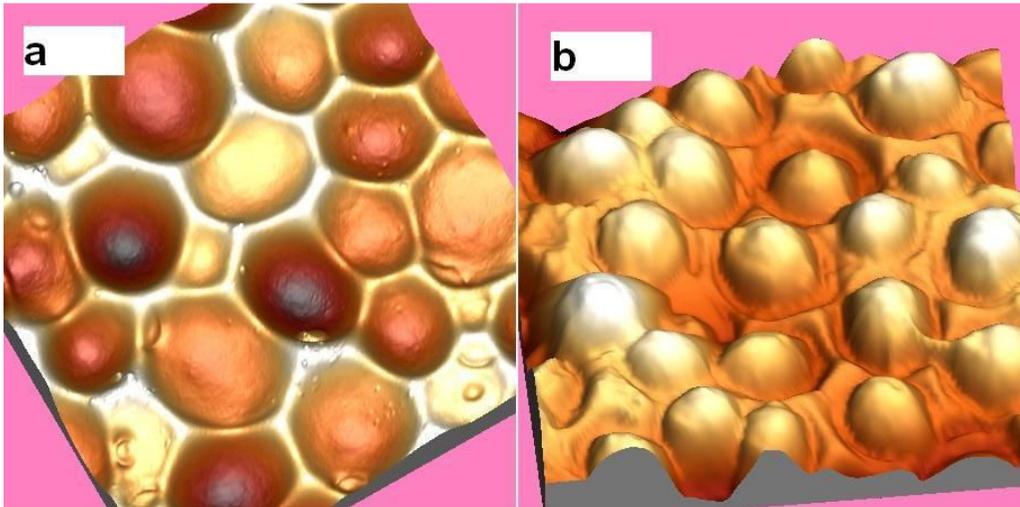


Abbildung 65: Abb. (a) Sensitive Schicht aus Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI), Schichtdicke $1\mu\text{m}$ - geprägt mit synthetischen Hefezellen aus Silikon in geteilter Form mit einer kleineren Knospe (S-Phase). Die Prägung erfolgte mit Stempeltechnik. Abb. (b) Masterstempel für Hefezellen in der S-Teilungsphase aus Silikon. AFM contact mode, 3D-Format mittels WSxM.

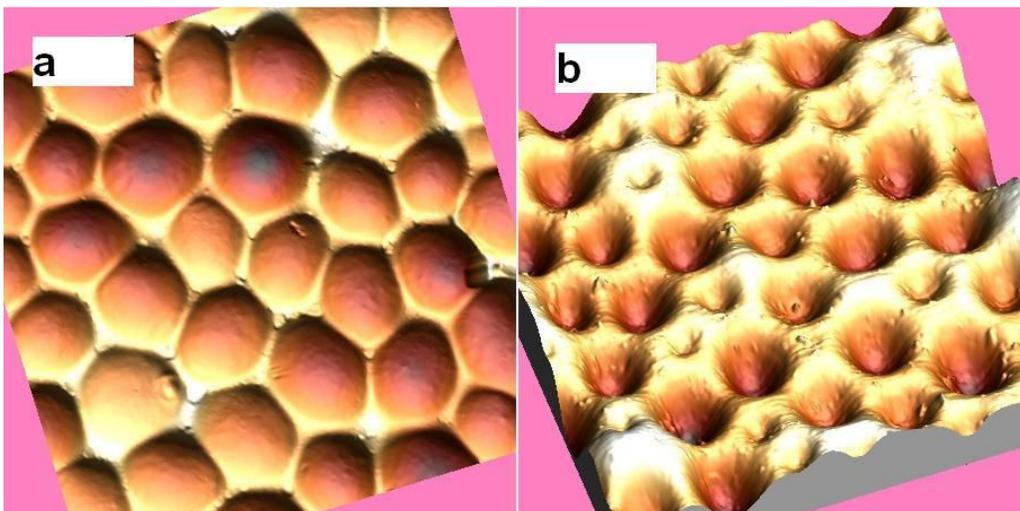


Abbildung 66: Sensitive Schicht aus Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI), Schichtdicke $2\mu\text{m}$ generiert mit synthetischen Zellenmaster aus Silikon. Die synthetischen Zellen haben Gestalt duplexer Hefezellen (M-Teilungsphase). Die Prägung des Polymers in der Abbildung (a) durch Stempeltechnik, in (b) mit Spin-Coating Methode. Dreidimensionale Darstellung der entstandenen Kavitäten mit AF-Mikroskop, SD-Bilder mit WSxM-Programm.

gung bezieht sich auf die doppelzellige Hefesuspension, die in die Messzelle angebracht wurde. Der Effekt erreicht 2400 Hz für 5 mg/ml der Dupplex-Zellen in destilliertem Wasser. Nach Auswaschen der Lösung wurde die Basislinie erreicht und eine Hefesuspension von Einzelzellen der gleichen Konzentration vermessen. Der Messeffekt an der Messelektrode beträgt rund 1000 Hz. Die Abbildung (68) zeigt Konzentrationsabhängigkeit eines Hefesensors, dessen sensitive Schicht mit synthetischen Hefezellen mit kleinen Knospen, also in beginnender S-Phase, geprägt wurde. Die gemessenen Effekte beziehen sich auf die Prägezellen suspendiert im destillierten Wasser bei Raumtemperatur. Den Zusammenhang zwischen den aufgenommenen Messeffekten zeigt die Kalibrierkurve. Die Abbildung (69) veranschaulicht konzentrationsabhängige gravimetrische Messeffekte eines mit synthetischen Doppelzellen geprägten Schwingquarzes.

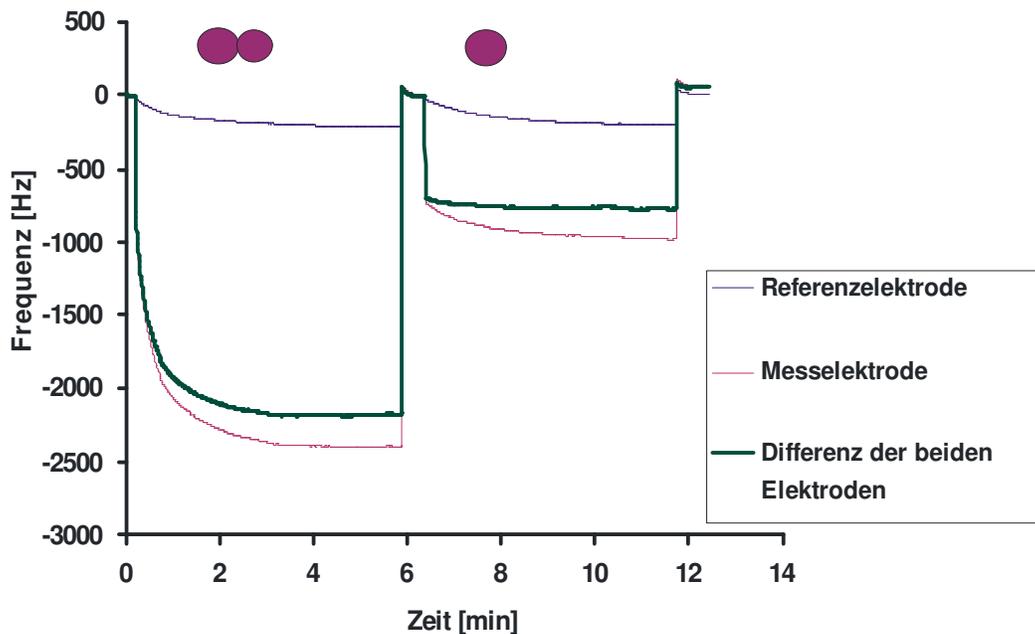


Abbildung 67: Hefechip sensitiv für geteilte Hefezellen (Doppelzellen). 10 MHz Schwingquarz beschichtet mit Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI), Schichtdicke 2 μm . Messelektrode: Polymerprägung erfolgte mit synthetischen Replica-Hefezellen in der M-Teilungsphase. Referenzelektrode: ungeprägtes Polyurethan. Sensoreffekte: Basislinie mit dest. Wasser, Zugabe von synchronisierten Doppelzellen und Einzelzellen, Konzentration 5mg/ml in destilliertem Wasser bei RT. Gemessen im stopped-flow Modus.

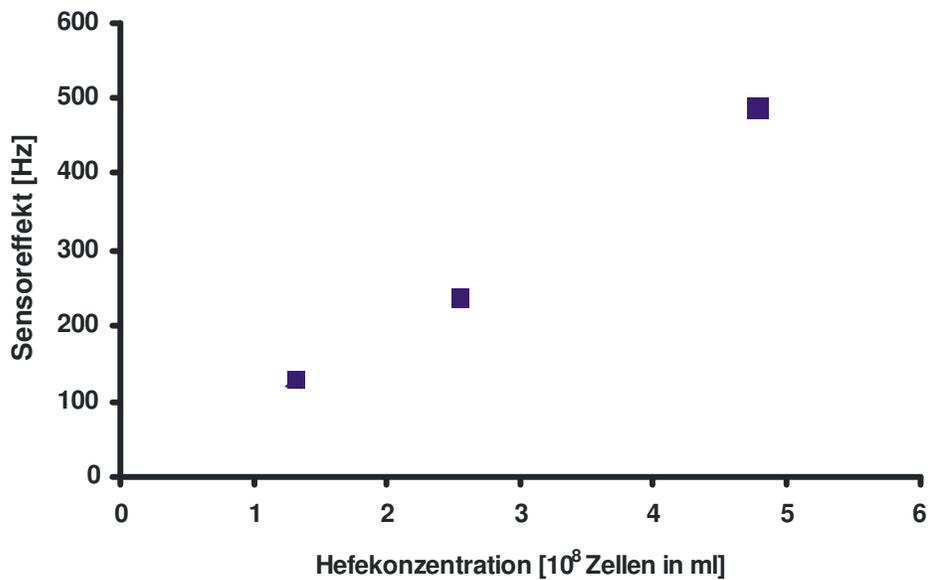
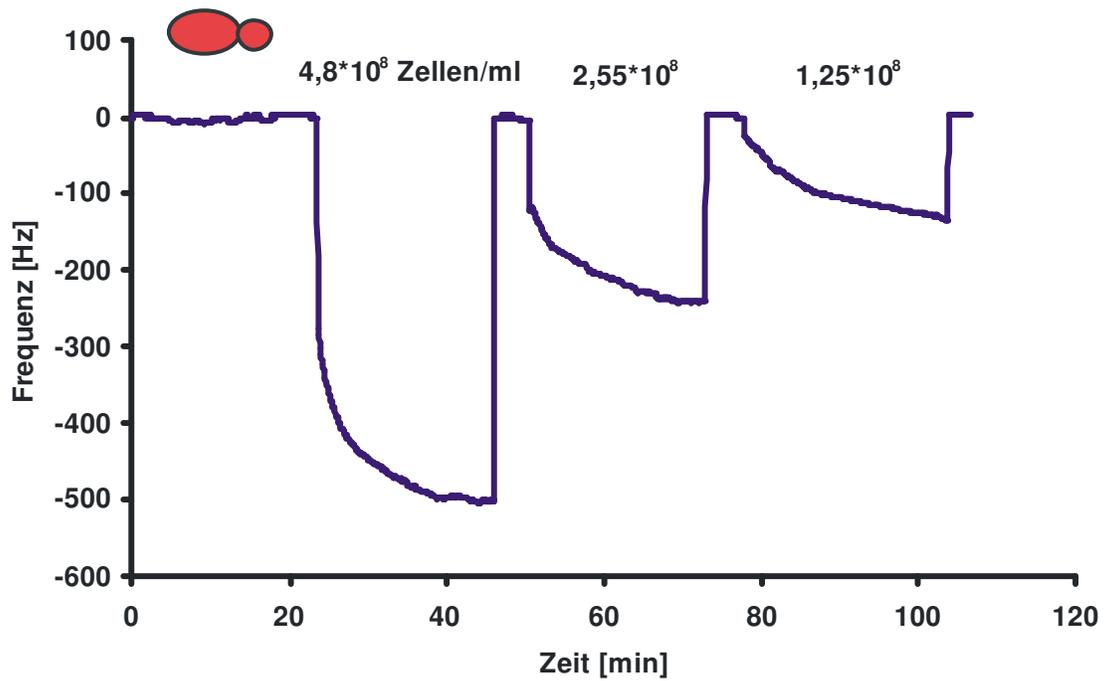


Abbildung 68: Konzentrationsabhängigkeit eines Hefesensors sensitiv für S-Phase Hefezellen des Stammes *Saccharomyces Cerevisiae*. 10 MHz Schwingquarz beschichtet mit Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI), Schichtdicke 2 μm . Prägung mit synthetischen Hefezellen in der S-Phase aus Silikon. Messkurve: Basislinie mit dest. Wasser eingestellt, Zugabe von 4,8; 2,55 und $1,25 \cdot 10^8$ Hefezellen (S-Teilungsphase)/ml in dest. Wasser. Gemessen wurde im stopped-flow Modus bei RT. Untenliegender Diagramm: Sensoreffekte als Frequenzänderung aufgetragen gegen die vermessene Hefekonzentration.

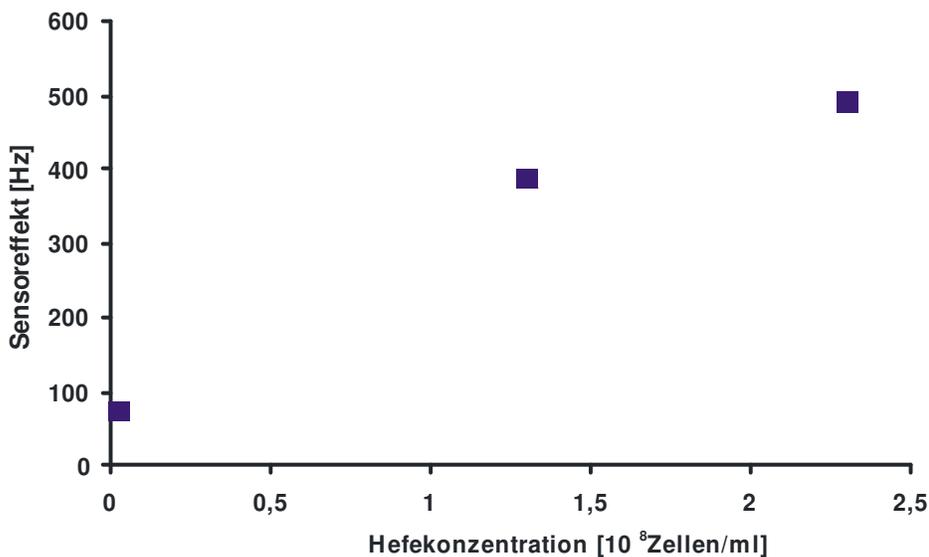
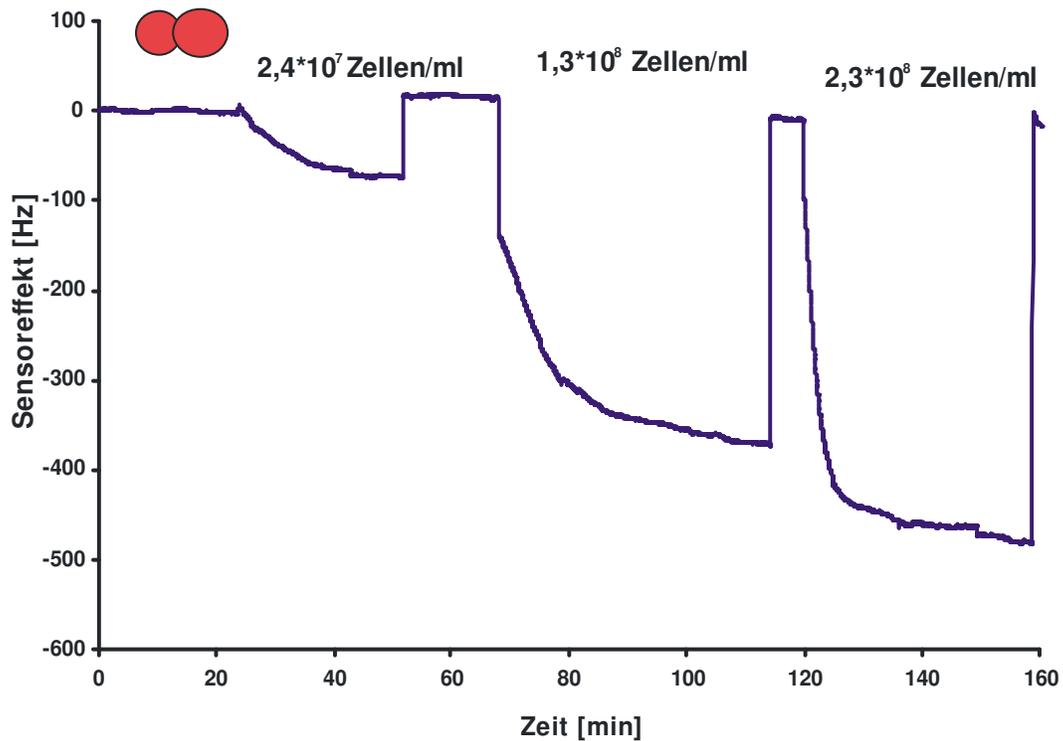


Abbildung 69: Konzentrationsabhängigkeit eines Hefesensors sensitiv für M-Phase Hefezellen des Stammes *Saccharomyces cerevisiae*. 10 MHz Schwingquarz beschichtet mit Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI), Schichtdicke 2 μ m. Prägung mit synthetischen Hefezellen in der M-Phase aus Silikon. Messkurve: Basislinie mit dest. Wasser eingestellt, Zugabe von $2,4 \cdot 10^7$ Zellen/ml; $1,3$ und $2,3 \cdot 10^8$ Hefezellen (M-Teilungsphase)/ml in dest. Wasser. Gemessen wurde im stopped-flow Modus bei RT. Untenliegender Diagramm: Sensoreffekte als Frequenzänderung aufgetragen gegen die vermessene Hefekonzentration.

4.12. Querselektivität bei den Hefesensoren

Im weiteren Schritt wurde die Querselektivität der Hefesensoren getestet, wobei diesmal verschiedene Hefestämme zur Messung herangezogen wurden. Die Hefezellen wurden im geeigneten Puffer unter denselben Bedingungen regeneriert und gereinigt. Schließlich wurden sie in destilliertem Wasser suspendiert und mit Hilfe von Zählkammer ausgezählt. Da die Hefezellen der verschiedenen Gattungen in Größe und Masse variieren, erwiesen sich die Angaben über Konzentrationen als unpraktisch. Vielmehr ist die Angabe der Zellanzahl in der jeweiligen Suspension aussagekräftig.

Die *S. bayanus* Hefezellen sind um etwa 10% kleiner als die vom Stamm *S. cerevisiae*. Bei der Herstellung von den Hefesensoren wurde nach dem gleichen Schema wie im Kapitel 4.4.3. beschrieben wurde. Zuerst wurden synthetische Hefestempeln für beide Hefegattungen in ungeteilter Form (entspricht der G1

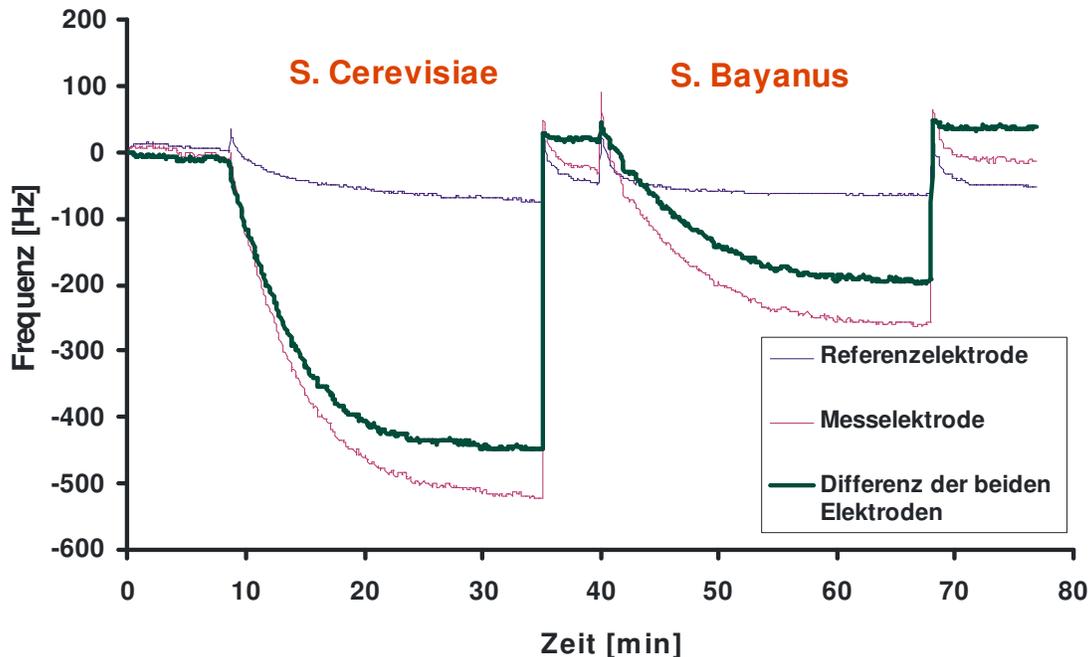


Abbildung 70: Querselektivität beim Hefesensor sensitiv für *S. cerevisiae*. 10 MHz Schwingquarz mit dualer Elektrodengeometrie. Polymerschicht aus Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI), Schichtdicke 1 μm . Prägung mit synthetischen Hefezellen in G1-Teilungsphase (Stamm *S. cerevisiae*). Messkurve: Basislinie mit dest. Wasser eingestellt, Zugabe von *S. cerevisiae* und *S. bayanus* der gleichen Zellenzahl $1,0 \cdot 10^8$ Zellen/ml in dest. Wasser bei Raumtemperatur. Gemessen wurde im stopped-flow Modus

Phase) aus Silikon hergestellt. Als sensitive Schicht wurde Polyurethan der Zusammensetzung BPA, Phloroglucin, MDI mit Pyridin als Katalysator verwendet. Das frische Präpolymer wurde in geeigneter Verdünnung auf gereinigte 10 MHz Schwingquarze mittels Spin-Coating Methode aufgetragen, wobei die gewünschte Schichtdicke vom ausgehärteten Polymer 1 μm betragen sollte. In das noch nicht ausgehärtete Polymer wurden synthetische Hefestempel aufgedrückt und mit einer Klammer festgehalten. Nach mehrstündigem Aushärten des Polymers wurden die Stempel leicht heruntergenommen und unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Für die Messung wurden sie in geeignete Flüssigkeitsmesszelle eingespannt und in destilliertem Wasser über eine Stunde lang stehen gelassen, bis sich eine konstante Basislinie eingestellt hat.

Die Messung in der Abbildung (70) zeigt die Querselektivität des Hefesensors, der für die *S. cerevisiae* sensitiv hergestellt wurde. Der erste Effekt der Frequenzerniedrigung infolge von Zugabe von 10^8 Hefezellen pro ml bezieht sich auf die eigenen Templatzellen (*S. cerevisiae*), wobei der Sensoreffekt rund 500 Hz er-

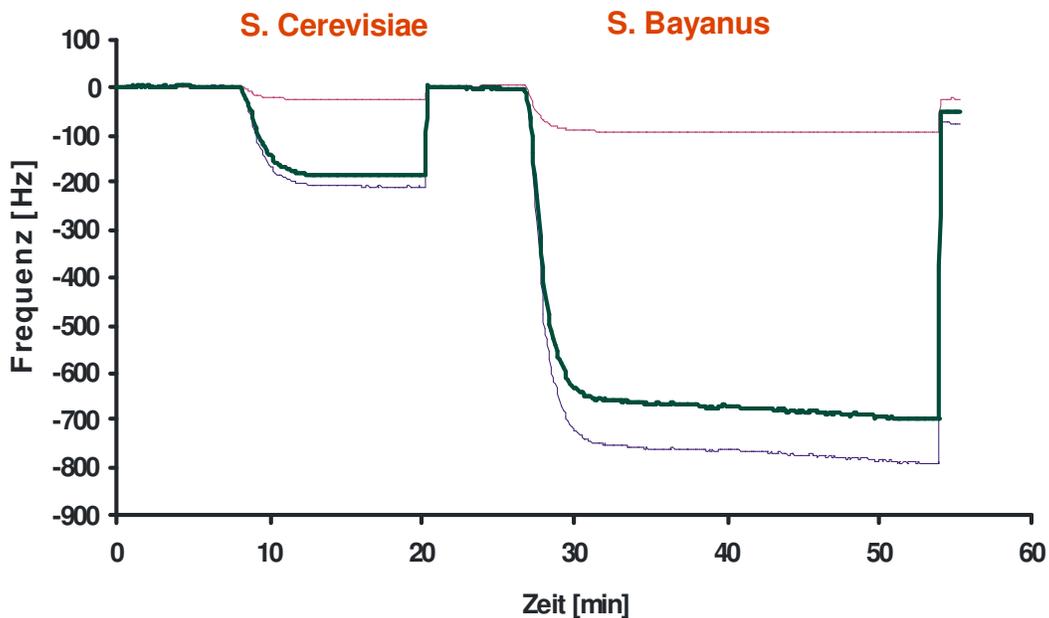


Abbildung 71: Querselektivität beim Hefesensor für *S. bayanus*. 10 MHz Quarz beschichtet mit Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI), Schichtdicke 1 μm . Prägung erfolgte mit synthetischen Hefezellen aus Silikon, die den Hefezellen *Sacharomyces bayanus* entsprechen. Basislinie wurde mit destilliertem Wasser erreicht. Zugabe von *S. cerevisiae* und *S. bayanus* ($1,0 \cdot 10^8$ Zellen/ml) in dest. Wasser bei RT. Gemessen wurde im stopped-flow Modus.

zielt wird. Bei der nächsten Zugabe wurden Hefezellen von *S. bayanus* bei der gleichen Zellanzahl vermessen. Die Frequenzerniedrigung beträgt 300 Hz an der geprägten Messelektrode. Zum Vergleich wurde auch ein Hefesensor sensitiv für die *S. bayanus* hergestellt. Für die Herstellung von diesen Sensoren wurde das gleiche Polymer zur Beschichtung des Schwingquarzes verwendet, das auch für *S. cerevisiae* Hefesensoren benutzt wurde. Da die Zellen kleiner sind, sind dementsprechend auch die Kavitäten im Polymer kleiner, was eine zusätzliche Steigerung für die Querselektivität bedeutet. Die in der Abbildung (71) gezeigte Messung der Kreuzselektivität für *S. bayanus* Sensor zeigt den Unterschied in den Effekten von *S. cerevisiae* und *S. bayanus*, die besser in den Kavitäten haften können und somit mehr zum Messeffekt beitragen. Das Balkendiagramm in der Abbildung (72) veranschaulicht die die Messeffekte von den beiden Sensoren für beide Hefegattungen.

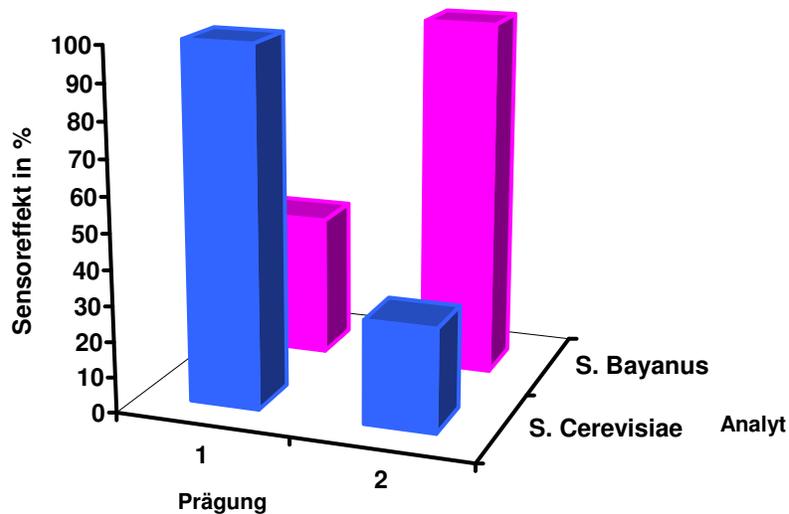


Abbildung 72: Querselektivität eines Hefesensors: Vergleich der relativen Sensorantworten von *Saccharomyces cerevisiae* und *bayanus* bei der Messung mit Hefechip mit Polyurethansensorschicht (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit synthetischen Hefezellen aus Silikon. (1) Prägung mit *S. cerevisiae*-Replika, (2) mit *S. bayanus*. Zusammenfassung der Messergebnisse aus den Abbildungen (75) und (76). Beide Hefesensoren sind durch die spezifische Prägung entsprechend sensitiv auf eigene Prägezellen.

4.13. Auswaschen von Kavitäten in der sensitiven Schicht

Bei der Arbeit mit Hefesensoren stellt sich auch die Frage des effektiven Auswaschens von Kavitäten in der sensitiven Schicht des jeweiligen Chips. Idealerweise zeigen die Sensoren in ihren Effekten Reversibilität. Bei den gravimetrischen Sensoren wird nach der Exposition des Analyten eine Frequenzabnahme beobachtet. Anschließend erwartet man sich in Abwesenheit des Analyten eine Frequenzzunahme, die der Frequenzdifferenz entspricht. Die Abbildung (73) zeigt eine Messkurve mit einem 10 MHz sensitiven Schwingquarz aufgenommen. Die Frequenzabnahme bezieht sich auf die exponierte Konzentration von 5 mg/ml Hefesuspension in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur. Nach Einstellen von einem konstanten Sensoreffekt wurde die Messzelle mit destilliertem Wasser gespült. Der erwartete Effekt liegt bei 0 Hz, was der aufgenommenen Basislinie entspricht. Die Differenz zwischen dem tatsächlichen Wert und der Basislinie entspricht den zurückgebliebenen Hefezellen in der sensitiven Schicht. Eine andere Beobachtung hat ergeben, dass sich mit der Zeit für die gleichen Konzentrationen unter den gleichen Bedingungen eine

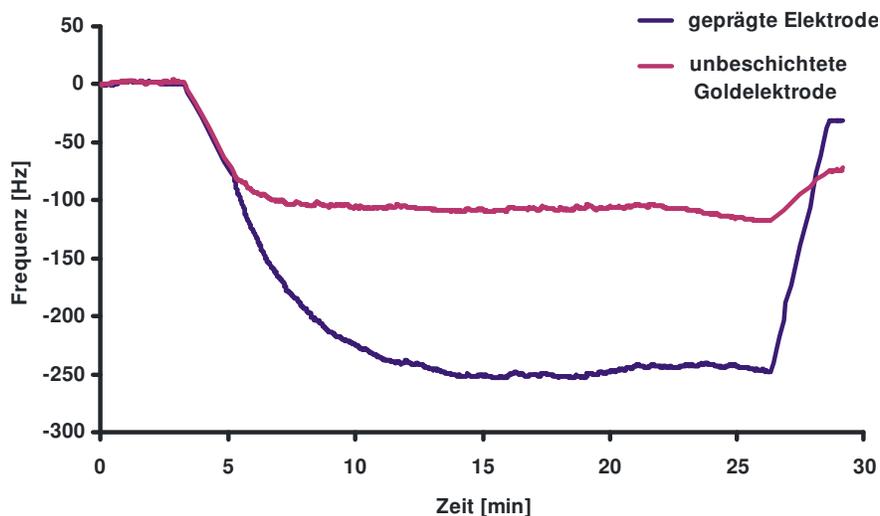


Abbildung 73: Hefesensor 10 MHz beschichtet mit Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) ausgehärtet im Ofen bei 70°C über 2 Stunden. Schichtdicke von Polymer: 2 µm. Prägung mit synthetischem Hefestempel selektiv für ungeteilte Hefezellen der Gattung *S. cerevisiae*. Zugabe von 5 mg/ml Hefesuspension in G1 Phase in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur. Gemessen im stopped-and-flow Modus.

Abnahme der Sensoreffekte eintritt.

Für die Entfernung von Zellen aus den Kavitäten wurde üblicherweise destilliertes Wasser bei der Raumtemperatur genommen. Für das Einbringen der Lösung wurde das Messprogramm angehalten und die jeweilige Lösung mit Hilfe der Pumpe in die Messzelle befördert (stopped-and-flow Modus). Beim Auswaschen wurde zusätzlich die Pumpe auf die maximale Geschwindigkeit (entspricht 99,99 ml/min) gebracht, da durch das schnelle Fließen von Wasser die verbleibenden Zellen aus den Kavitäten herausgebracht wurden. Eine andere, noch effektivere Lösung als destilliertes Wasser ist Puffer – wie zum Beispiel PBS. In der nachfolgenden Abbildung (74) werden der Sensoreffekte von destilliertem Wasser und 1/15 M PBS (pH 5 bis pH8) verglichen. Daneben kann der Hefechip auch mit einer Salzlösung behandelt werden. Durch die Wirkung von

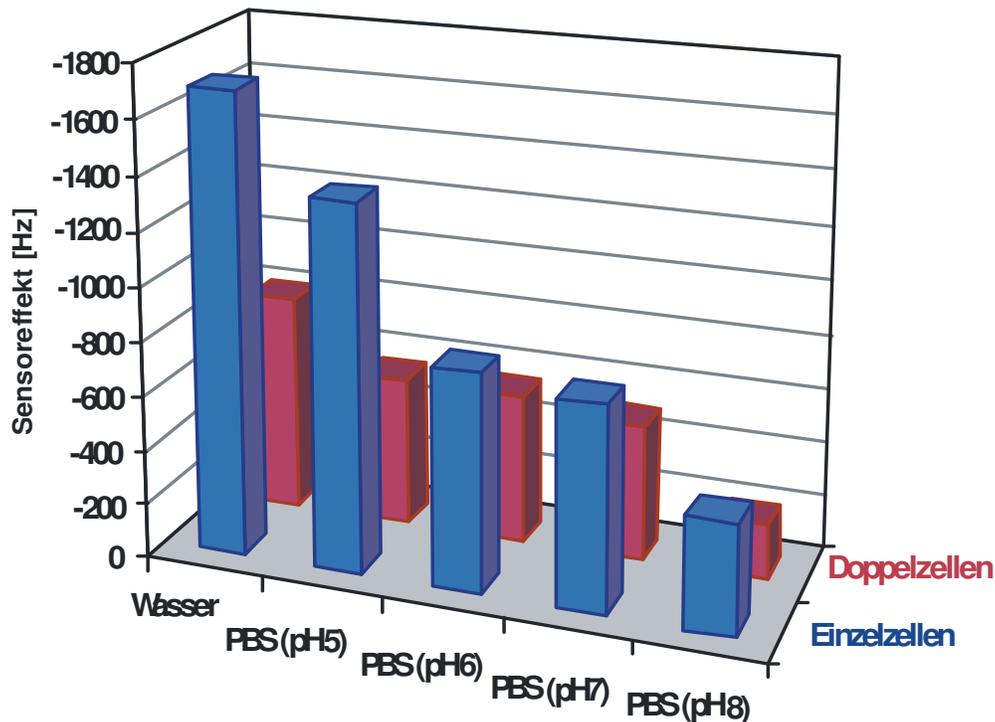


Abbildung 74: Sensoreffektänderungen in verschiedenen Medien: destilliertes Wasser und 1/15 M PBS unterschiedlicher pH. Sensitive Schicht Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) beschichtet. Prägung mit synthetischen Hefezellen aus Silikon in ungeteilter Form (G1 Phase), Schichtdicke 1,1 μm . Vermessene Konzentration: jeweils 10^8 Zellen/ml von a) einzelliger Hefe, b) doppel-zelliger Hefe in jeweiligem Medium. Temperatur: 22° C.

z.B. 0,5 M NaCl Lösung kommt es zu Wasserentzug und damit verbunden Masseverlust. Infolge dessen werden die Hefezellen aus ihren Kavitäten leichter gespült.

Die weiteren Aufnahmen (Abbildung 75) zeigen ein Quarz mit rundem Elektrodendesign aus Gold, das als schwarzes Feld zu sehen ist. Dieser Quarz wurde mehrere Wochen zu Messungen herangezogen und zeigt mittlerweile sehr verminderte Sensoreffekte. Außerhalb der Elektrode sind unter dem Auflichtmikroskop bei der Vergrößerung von 100 die Kavitäten im geprägten Polyurethan der Schichtdicke ca. 2µm sichtbar. Die gezeigten Kavitäten sind verschwommen dargestellt, da sie durch restliche Zellen oder restliche Stücke von Hefeextrakt aus dem Nährmedium verunreinigt sind. Diese Verunreinigung konnte nicht mit destilliertem Wasser oder Puffer beseitigt werden, erst durch kurze Behandlung (dreimal 2 Sekunden) im Ultraschallbad wurden die Überreste, die die Messung beeinträchtigt haben, herausgewaschen. In der Abbildung (75.b) sind die gereinigten Kavitäten im Polymer zu vergleichen, sie erscheinen viel heller und deutlicher als die verunreinigten aus der Abbildung (75.a). Die feststeckenden Hefezellen wurden auch mit AF-Mikroskop nachgewiesen. In der Abbildung (76) wird eine Hefezelle neben einer leeren Kavität gezeigt und mit Hilfe von

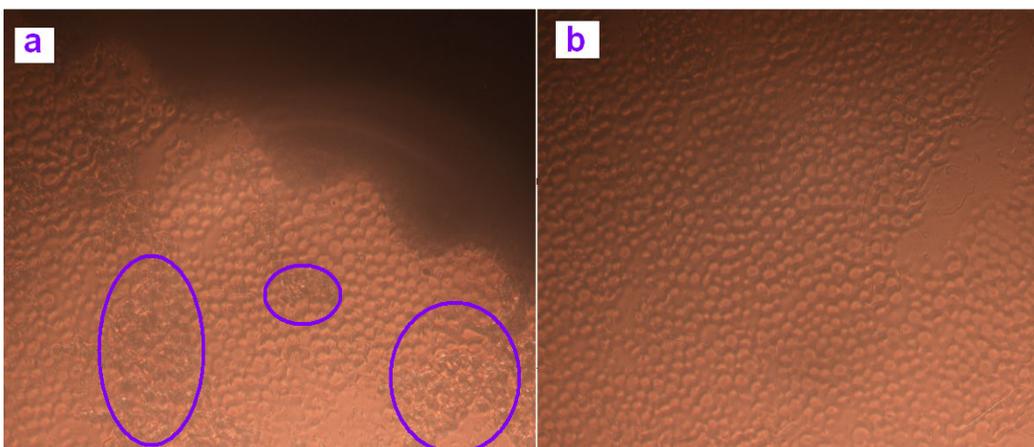


Abbildung 75: Hefechip: Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI), Prägung mit Silikonmaster für Hefezellen in ungeteilter Form (G1). Die Kavitäten sind verschmutzt, der Sensor zeigt nur einen minimalen Effekt bei der Messung der Hefelösungen. Vergrößerung 50 unter Durchlichtmikroskop.

Sektionsanalyse der Höhen- respektive Tiefenprofil dargestellt. Aus der 3D-Aufnahme in der Abbildung (77) ist ersichtlich, wie die sensitive Schicht durch lysierte Hefezellen verunreinigt bleibt. Die restlichen Zellteile lassen sich durch eine kurze Behandlung im Ultraschallbad entfernen.

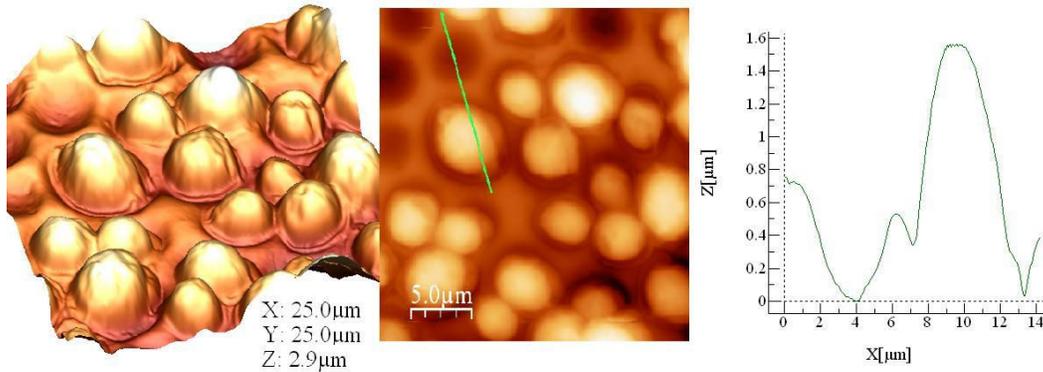


Abbildung 76: AF-Mikroskopische Darstellung von sensitiver Polyurethanschicht (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) am Schwingquarz. Prägung mit synthetischem Hefemaster in G1-Teilungform. Die Kavitäten sind zum Großteil mit Hefezellen besetzt. Die Sektionsanalyse zeigt Tiefenprofil einer Kavität und Höhenprofil einer Hefezelle, die sich in einer benachbarten Kavität befindet. AFM contact mode, WSxM.

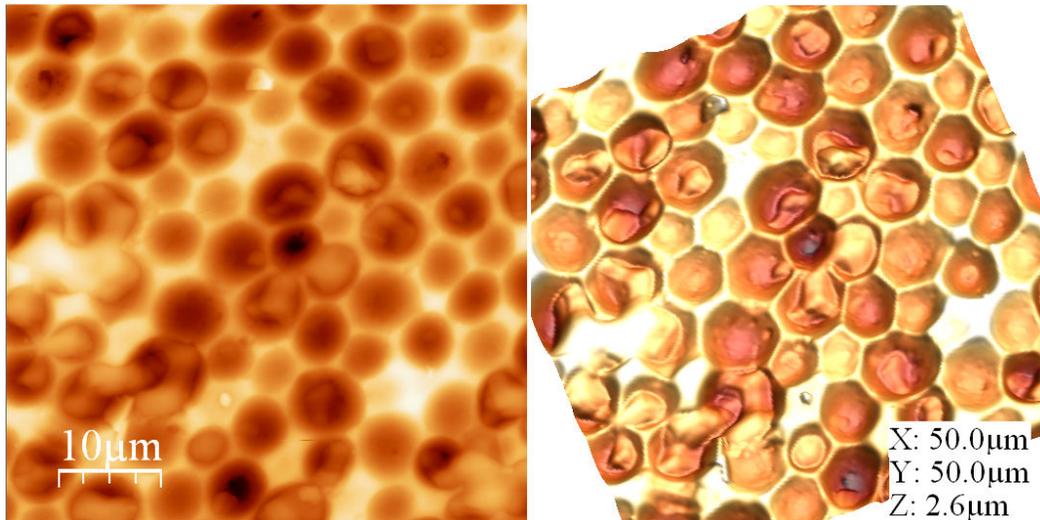


Abbildung 77: AF-Mikroskopische Darstellung von sensitiver Polyurethanschicht (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) am Schwingquarz. Prägung mit Silikonmaster für Hefezellen in ungeteilter Form (G1). Die Hefekavitäten sind mit lysierten Hefezellen bedeckt. Die Zellreste lassen sich mit destilliertem Wasser oder durch eine kurze Behandlung im Ultraschallbad wegspülen.

4.14. Temperaturabhängigkeit bei Messungen mit Hefesensoren

Die gemessenen Sensoreffekte weisen Abhängigkeit von der Temperatur, bei der die Lösungen, die zu der jeweiligen Messung in der Messzelle herangezogen werden. Für diesen Versuch wurde die gleiche Lösung der Konzentration 5 mg/ml von *Saccharomyces cerevisiae* in destilliertem Wasser verwendet. Zum Vergleich wurde noch eine andere Hefegattung der gleichen Konzentration bei den gleichen Versuchsbedingungen vermessen. Die Lösungen von Hefe wurden bei den Temperaturen 4° C, 30° C, 35° C und 40° C, sowie bei der Raumtemperatur. Zur Messung wurde ein 10 MHz AT-cut Quarz mit dualer Elektrodengeometrie verwendet. Am Quarz wurde Polyurethanschicht angebracht, die beide Elektroden bedeckt. Die Messelektrode wurde mit Hefemaster aus Silikon geprägt. Die künstlichen Zellen am Master entsprechen den Hefezellen der Gattung *S. cerevisiae* in ungeteilter Erscheinungsform. In der Abbildung (78) sind

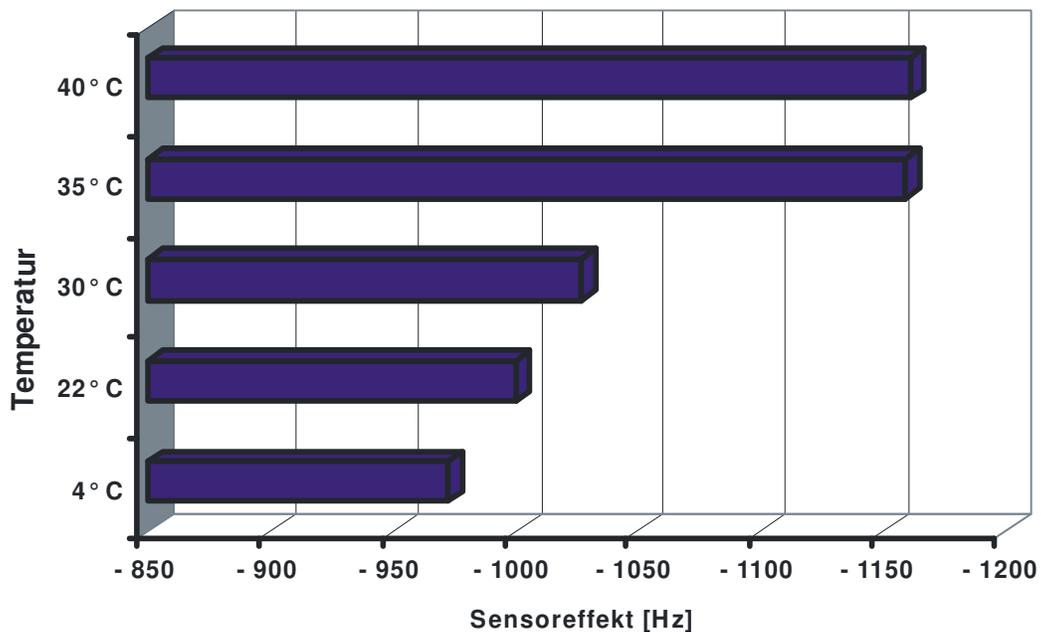


Abbildung 78: Temperaturabhängigkeit bei einem 10 MHz Hefesensor mit Polymerschicht von 1µm. Schwingquarz wurde mit Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) beschichtet. Prägung mit synthetischen Hefezellen aus Silikon in ungeteilter Form. Es wurden verschiedene temperierte Hefelösungen bei der gleichen Konzentration von 5 mg/ml in destilliertem Wasser in Messzelle eingebracht und die Sensormesseffekte als Frequenzänderung gegen die jeweilige Temperatur aufgetragen.

die Sensoreffekte bei der Messung *S. cerevisiae* zusammengefasst. Der größte Unterschied zwischen den Messeffekten zeigt sich beim Übergang von 30°C zu 35°C.

Der Grund für derartige Temperaturabhängigkeit des Hefesensors kann in den Stoffwechselfvorgängen in den Hefezellen selbst liegen.

4.15. Monitoring von sich teilenden Hefezellen in realer Matrix

Für die Teilung der Hefezellen von *Saccharomyces cerevisiae* wurde ein Nährmedium verwendet. Die kommerziell erhältlichen Backhefezellen wurden im YPD (Hefeextrakt, Proteose Pepton, D-(+)-Glucose und Malzextrakt) bei

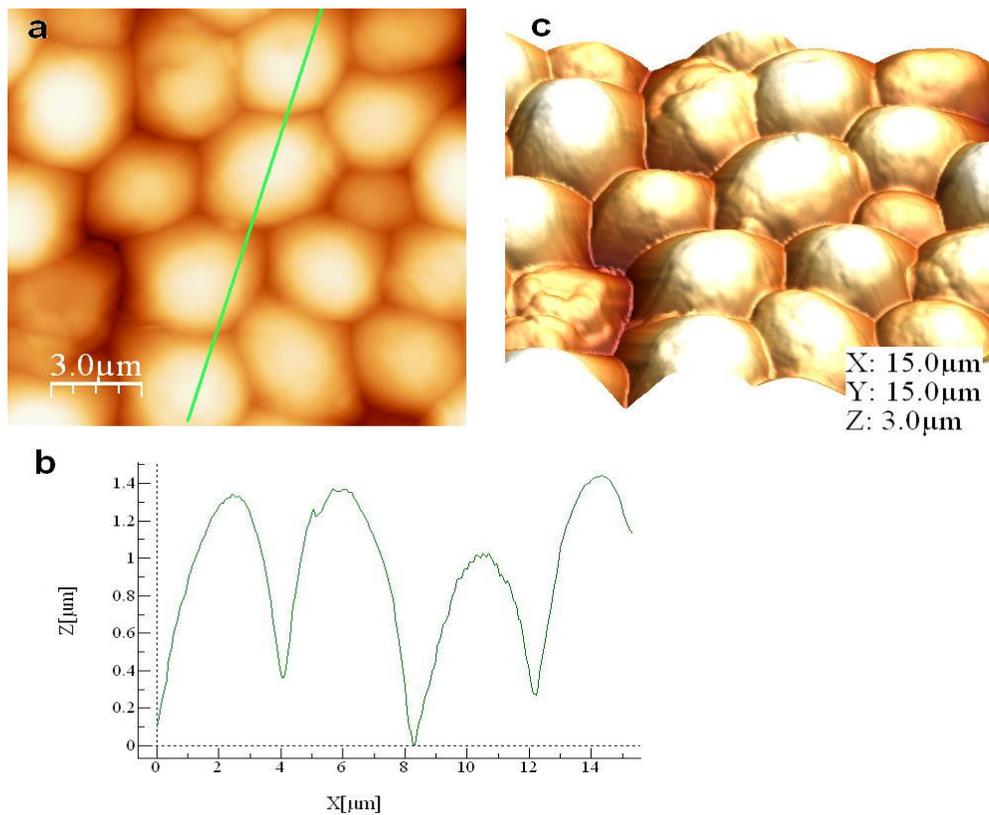


Abbildung 79: Hefezellen der Gattung *S. cerevisiae* im Nährmedium YPD bei Raumtemperatur. (a) 2-Dimensionale Darstellung von sich teilenden Hefezellen auf einem Glasplättchen exponiert. Bildgröße 15x15 μm. AFM contact mode, (b) Sektionsanalyse der gekennzeichneten Hefezellen. (c) 3-Dimensionale Darstellung im WSxM Programm.

30°C gerührt. Die sich teilenden Hefezellen wurden in der Abbildung (79) mit Hilfe von AF-Mikroskop dargestellt, wobei die sprossenden Zellen mit ihren heranwachsenden Knospen klar zu sehen sind. Für die Verfolgung der Teilung wurden die Zellen im zeitlichen Abstand vom Nährmedium befreit, mit destilliertem Wasser gewaschen und in die Messzelle eingebracht. Bei den Vorversuchen wurde festgestellt, dass das gewählte Nährmedium selbst einen großen Einfluss auf die Frequenz des Quarzes ausübt, somit konnten die Zellen nicht direkt im Nährmedium, sondern gereinigt zur Messung verwendet. In der Abbildung (80) sind die Sensoreffekte der einzelnen Bestandteile des YPD-Nährmediums zu sehen. Diese wurden in der gleichen Konzentration vermessen mit der sie im YPD-Medium vorliegen. Ausgewaschen wurden die Stoffe mit destilliertem Wasser.

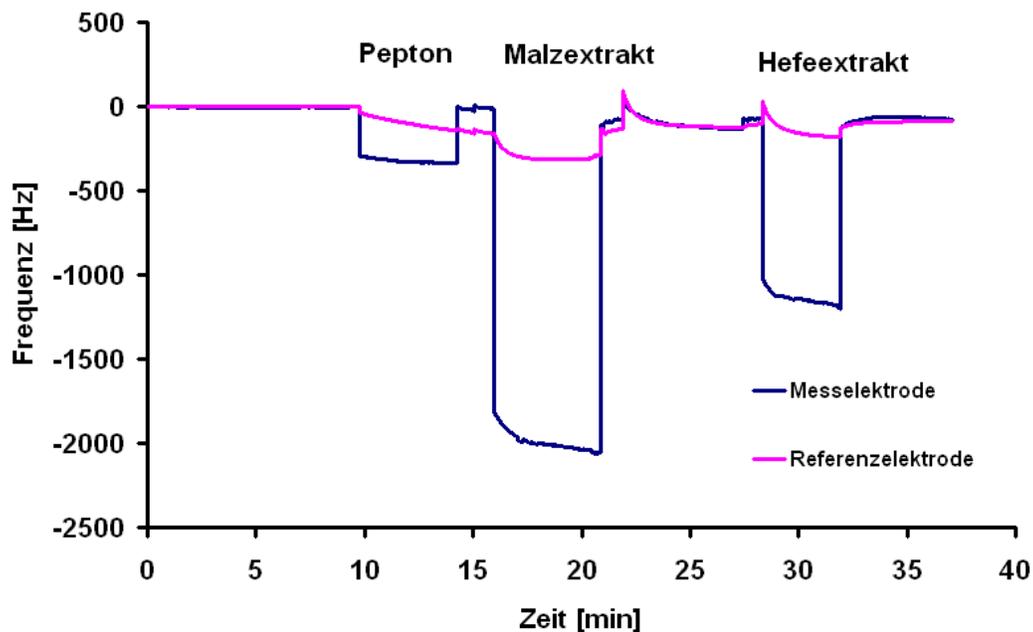


Abbildung 80: 10 MHz Schwingquarz mit dualer Elektrodengeometrie: Messelektrode mit sensitiver Schicht aus Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloro-glucin, 40,2% MDI) geprägt mit synthetischen Hefezellen vom Typ G1 aus Silikonmaterial, Referenzelektrode wurde nur mit Polyurethan beschichtet. Schichtdicke des Polymers: 1,1 μm . Sensoreffekte bei der Messung von den einzelnen Bestandteilen des Nährmediums für Teilung von Hefezellen: Pepton [5mg/ml] - Malzextrakt [3 mg/ml] - Hefeextrakt [3mg/ml]. Alle Komponenten wurden in dest. Wasser bei RT suspendiert.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Änderung der Frequenz des 10 MHz Hefechips bei der Verfolgung der Teilung der Hefe im YPD bei 30°C. Der Hefechip besteht aus 2 aufgetragenen Goldelektroden und sensitiver Schicht aus Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI), der auf der Messelektrode mit Silikonhefemaster geprägt ist. Die Schichtdicke beträgt 1,1 µm. Gemessen wurden Sensoreffekte bei der gereinigten Hefezellen zum Zeitpunkt Null, also am Anfang der Teilung (Abb. 81.a.), dann nach eineinhalb Stunden (Abb. 81.b.), nach zwei Stunden (Abb. 81.c.) und schließlich nach mehr als drei Stunden (Abb. 81.d.). Daneben wurden auch die Zellen unter Lichtmikroskop in den zeitlichen Abständen verfolgt und in Zellzählkammer ausgezählt.

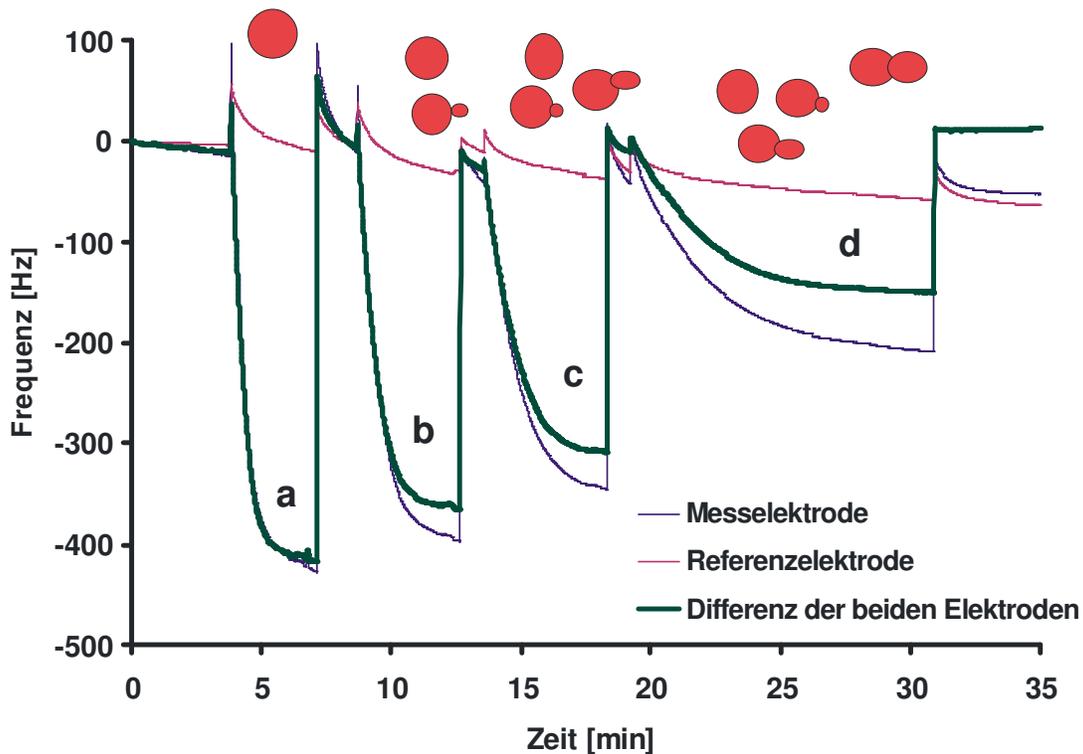


Abbildung 81: Monitoring von sich teilenden Hefezellen im Nährmedium bei 30°C- 10 MHz Schwingquarz mit dualer Elektrodengeometrie: Messelektrode mit sensitiver Schicht aus Polyurethan (47,8% Bisphenol A, 12% Phloro-glucin, 40,2% MDI) geprägt mit synthetischen Hefezellen vom Typ G1 aus Silikonmaterial, Referenzelektrode wurde nur mit Polyurethan beschichtet. Schichtdicke des Polymers: 1,1 µm. Sensoreffekte: zeitliche Verfolgung der Teilung der Hefezellen (a) zum Zeitpunkt 0, (b) nach 1,5 Stunden, (c) nach 2 Stunden und (d) nach 3 Stunden im Nährmedium (YPD). Für die gravimetrische Messung wurden die Hefezellen nach der exponierten Zeit gründlich mit dest. Wasser gewaschen.

Die Frequenzerniedrigung bei der Lösung von *S. cerevisiae* der Konzentration 2,5 mg/ml in destilliertem Wasser. Die Zellen befinden sich alle in der ungeteilten Phase, unter dem Lichtmikroskop sind kugelförmige Zellen, die nur in der Größe variieren. Der nächste Sensoreffekt (81.b) kleiner ist, zeigt die gleiche Lösung, aber im zeitlichen Abstand von 1,5 Stunden. Der verminderte Effekt ist dadurch bedingt, dass die Zellen im Nährmedium an Größe zugenommen haben und sich viele von den Zellen im nächsten Teilungsstadium (S – Hefezellen mit kleiner Knospe) befinden. Nach 2 Stunden befinden sich nur 40% der Zellen in G1-Teilungsphase – Abbildung (82). Der Sensoreffekt verringert sich zu diesem Zeitpunkt um etwa 30%. Nach mehr als drei Stunden im Nährmedium steigt der Anteil an duplexen Zellen auf 70%, wobei die Hefezellen noch zu etwa 10% als Einzelzellen vorliegen. Der gravimetrische Sensoreffekt erreicht nach drei Stunden nur noch 130 Hz.

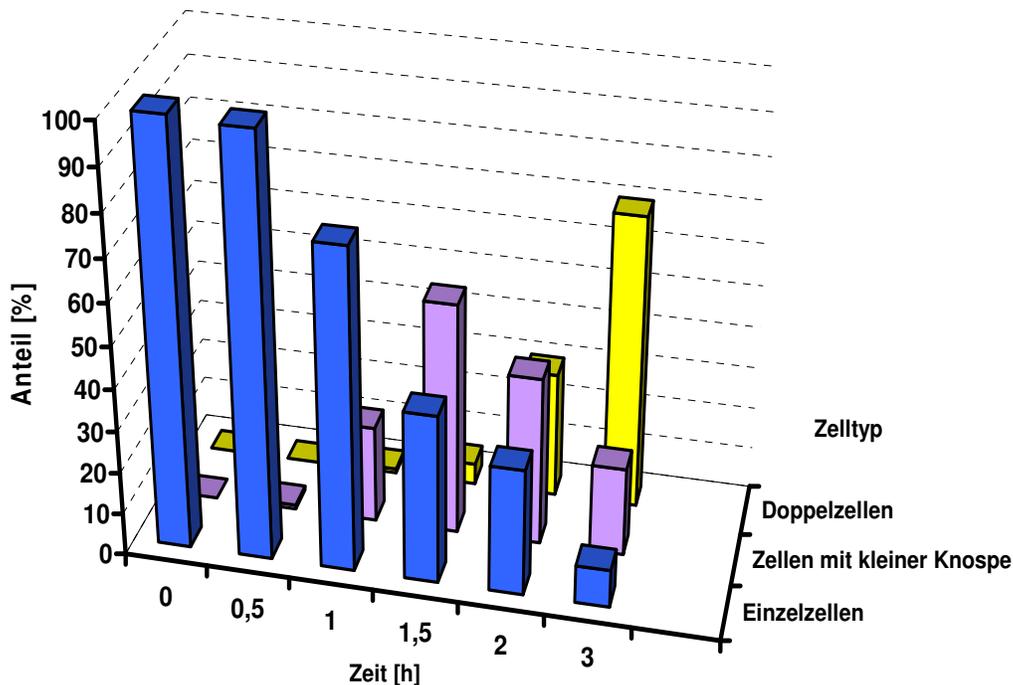


Abbildung 82: Die zeitliche Verfolgung der Differenzierung der Hefezellen durch die Exposition im Nährmedium (YPD) bei 30°C. Die Hefezellen wurden in halbstündigen Intervallen abzentrifugiert und mit destilliertem Wasser gewaschen. Für die quantitative und qualitative Bestimmung der sich teilenden Zellen wurde eine Zählkammer (Neubauer Improved) verwendet. Es wurde unter Einzelzellen (Typ G1), Doppelzellen (Typ M) und Zellen mit einer kleineren Knospe (Typ S).

Der Fortschritt der Teilung lässt sich auch mikroskopisch verfolgen. Dazu wird das Zellmaterial entsprechend verdünnt und unter Lichtmikroskop oder AF-Mikroskop kontrolliert. Da die Atomkraft-mikroskopische Messung zeit- und kostenaufwendiger ist, wurde es bevorzugt zu Lichtmikroskop gegriffen. Die Zellen lassen sich entweder direkt im Nährmedium ablichten, wobei auch die Nährmediumkomponenten zu sehen sind, oder sie werden mit destilliertem Wasser oder Puffer gewaschen. In der Abbildung (83) sind Einzelzellen und Mutterzellen mit kleinen Knospen zu sehen. Diese wurden nach eineinhalb Stunden aus dem Nährmedium genommen, abzentrifugiert und mit Fluoreszenzfarbstoff Dansylchlorid markiert. In der Abbildung (84) sind die Hefezellen nach drei-stündiger Exposition im YPD-Nährmedium unter Lichtmikroskop bei der hundertfachen Vergrößerung abgebildet. Die Hefezellen befinden sich größten Teils in der G2 oder M-Teilungsphase.

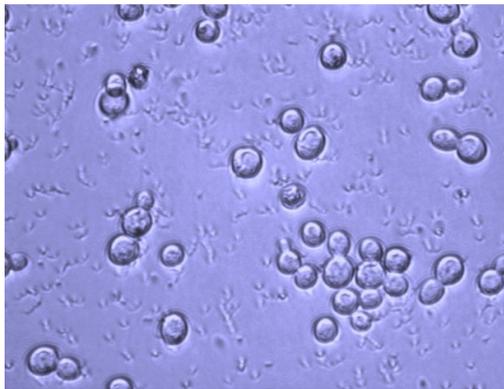


Abbildung 84: Hefezellen *S. cerevisiae* im Nährmedium (YPD) nach 3-stündigen Exposition. Durchlichtmikroskop, Hundertfache Vergrößerung.



Abbildung 839: Hefezellen *S. cerevisiae* nach 1,5-stündiger Exposition im Nährmedium (YPD). Fluoreszenzmikroskop, Zellen wurden mit Dansylchlorid gefärbt.

4.16. Resümee - Hefesensor

Für die Herstellung von Hefesensoren für Flüssigkeitsmessungen wurden kommerziell erhältliche Schwingquarze (AT cut) mit Grundfrequenz von 10 MHz verwendet und mit Goldelektroden mit dualer Geometrie versehen. Der Transducer wurde mit Polymer mittels Spin-coating beschichtet, wobei die dadurch entstandene Schichtdicke im Bezug auf die Größe der Bioanalyten im Bereich zwischen 1,0 und 2,0µm liegen sollte. Die sensitive Polymerschicht wurde mit nativen oder künstlichen Hefezellen über Stempelmethode geprägt. In erster Linie wurden hydrophile Polymere wie Polyurethane verwendet, die aus den Monomeren Diisocyanaten und Bisphenol A unter Zusatz von Quervernetzer wie Phloroglucinol synthetisiert wurden.

Dadurch dass die Zellen eine enorm große Oberfläche besitzen, die chemisch gesehen aus einer großen Anzahl von Hydroxygruppen besteht, hinterlassen sie auf der Oberfläche des ausgehärteten Polymers maßgeschneiderte chemisch definierte Hohlräume oder Kavitäten. Die Qualität der sensitiven Schichten wurde mit Hilfe von Lichtmikroskop und AFM überprüft.

Die Herstellung von künstlichen Hefezellen verläuft über einen 2-Stufen-Prozeß. Zuerst wird Polyurethan mit nativen Hefezellen geprägt, wobei maßgeschneiderte Hohlräume entstehen, die im nächsten Schritt mit einem weiteren Kunststoff – Silikon ausgegossen werden. Die synthetisch hergestellten Zellen wurden zur Prägung von sensitiven Schichten an Schwingquarzen verwendet. Diese Schichten wurden über die gravimetrischen Messungen auf die Sensitivität, Selektivität, sowie Kreuzselektivität und Reproduzierbarkeit getestet. Die hergestellten Replicaen der Hefezellen zeigen die gleiche geometrische Gestalt wie native Zellen, was auch bei den gravimetrischen Messungen bestätigt wurde.

Die kommerziell erhältlichen Backhefezellen lassen sich unter Verwendung von Zellgiften in verschiedene Teilungsstadien fixieren. Obwohl die synchronisierten

Zellen die gleichen physikalisch-chemische Eigenschaften der eigenen Oberfläche aufweisen, unterscheiden sie sich durch die geänderten geometrischen Parameter, die für die Sensitivität und Selektivität bei den massensensitiven Chemosensoren ausschlaggebend sind. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, die Fortschritte der Zellteilung direkt zu verfolgen.

5. Bakteriensensor

5.1. Bakterien

Bakterien sind einzellige Kleinorganismen ohne echten Zellkern. Sie gehören der Gruppe der Prokaryonten – im Unterschied zu den Eukaryonten ist ihr DNA frei im Zytoplasma dispergiert. Die Zellteilung erfolgt asexuell durch Querteilung, Knospung oder durch Sporenbildung. Alle Nachkommen haben ein identisches Genom und bilden demnach einen Klon.

Bakterien haben einen aeroben oder anaeroben Stoffwechsel. Sie verfügen über vielfältige Enzymsysteme, daher sind sie auch auf künstlichen unbelebten Nährboden züchtbar. Manche Bakterien bilden Dauerstadien, oder Sporen, aus, in denen der komplette Stoffwechsel zu Erliegen kommt. In diesem Zustand können die Bakterien für sie ungünstige oder auch extreme Umweltbedingungen überstehen und mehrere Jahre überdauern.

Die Bakterien sind von großer Bedeutung und sogleich Bedrohung für den Menschen selbst. Es wird zwischen mutualistischen, oder nützlichen und pathogenen Bakterien unterschieden. Der Mensch wird von den Mikroorganismen regelrecht besiedelt. Auf der Oberfläche eines Menschen befinden sich nur etwa 10^9 Bakterien, dagegen der Speichel bereits bis zu 10^9 Bakterien pro Milliliter enthält, wobei sie als Wächter gegen pathogene Mikroorganismen wirken. Im Verdauungstracht befinden sich 10mal mehr Bakterienzellen⁵⁴ als der Mensch an Körperzellen besitzt. Pathogene Bakterien verursachen Infektionen, Sepsis oder Entzündungen von Organen. Bakterielle Infektionskrankheiten wie Tuberkulose, Pest, Cholera, Typhus oder Diphtherie haben vor dem 20. Jahrhundert regelmäßig die Bevölkerung dezimiert. Solche Erreger von Seuchen werden als denkbare biologische Waffen eingesetzt, wobei sie sehr billig herzustellen sind. Es

besteht demnach die Notwendigkeit, effiziente und hochsensitive Sensoren zu bauen, die solche Pathogene detektieren können.

5.2. Escherichia Coli

Escherichia Coli ist ein gramnegatives Bakterium, ein gerades Stäbchen mit Geißeln und geringen Nährbodenansprüchen - Abbildung (85). Es spaltet Laktose, Maltose, Mannitol und Saccharose. Der Zuckerabbau geht mit Säure- und Gasbildung einher.

In der Bakteriologie fungiert E. Coli als Modellorganismus für gramnegative Bakterien. Für die Forschung werden nichtpathogene Stämme herangezogen; die

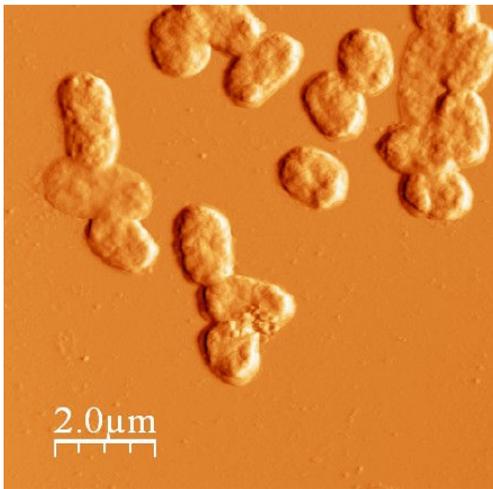


Abbildung 85: AF-Mikroskopische 2D-Aufnahme von Escherichia Coli, Stamm W.

entsprechenden Forschungsergebnisse lassen sich jedoch oft auch auf die entsprechenden pathogenen Varianten, wie enterohämorrhagische Escherichia Coli (EHEC), sowie andere klinisch relevante Bakterien übertragen und sind damit auch für die Medizin von Bedeutung. Zu den gramnegativen Keimen gehören neben E. Coli Bakterien auch Salmonellen, Enterobacter, Pseudomonaden, Legionellen, die Neisserien, Chlamydien, die Spirochäten und die Cyano-

bakterien. Die Differenzierung der Bakterien in grampositive und gramnegative Bakterien beruht auf unterschiedliche Gram-Färbung⁵⁵. Diese Methode stammt von H. C. Gram, wobei die Bakterien mit dem basischen Farbstoff Kristallviolett angefärbt und mit einer Jodlösung behandelt werden. Jod bildet mit Kristallviolett Lacke, die in Wasser unlöslich und in Alkohol oder Aceton nur mäßig löslich sind. Mit Alkohol bleiben gramnegative Zellen violett, da sie eine dickere

Zellwand aufweisen, und die gramnegativen Zellen (mit dünner Zellwand) werden durch Alkohol entfärbt. Gramnegative Zellen werden durch eine Gegenfärbung mit einem rötlichen Kontrastfarbstoff (Safranin) sichtbar gemacht, sie erscheinen dann rötlich.

Die allgemeine Zellwandarchitektur⁵⁶ der gramnegativen Bakterien:

- *Zytoplasmamembran, ca. 15%*
- *periplasmatisches Gel (PG)*
- *Peptidoglykan (Murein), ca. 20%*
- *Lipoproteine, ca. 25%*
- *äußere Membran, Phospholipide, ca. 10%*
- *Lipopolysaccharid (LPS), ca. 15%*

Die Zellwände gramnegativer Bakterien enthalten nur eine dünn-schichtige Peptidoglykanschicht, etwa 2nm dünn, die in ein großräumiges periplasmatisches Gel eingebettet ist (Abbildung 86). Das Peptidoglykan-Makromolekül, bezeichnet auch Murein, ist aus vielen Glykanketten (Zuckerpolymere), die durch Oligopeptide kovalent quervernetzt sind, aufgebaut. Der Kohlenhydratanteil besteht aus alternierenden N-Acetylglukosamin und N-Acetylmuraminsäure-Einheiten. An die Muraminsäuren sind kovalent Tetrapeptide aus D- und L-Aminosäuren gekoppelt, die untereinander auch kovalent quervernetzt sind. Die Quervernetzung der Peptiduntereinheiten erfolgt häufig durch enzymatische Knüpfung einer Peptidbindung zwischen einer freien Aminogruppe einer basischen Aminosäure und der freien Carboxylgruppe der terminalen Aminosäure eines anderen Muraminsäure-Tetrapeptids durch eine Glykopeptid-Transpeptidase. Die glykosidischen Bindungen des Kohlenhydratgerüsts in Murein werden durch ein hydrolytisches Enzym, dem Lysozym, das besonders reichlich in Tränenflüssigkeit, in respiratorischen Sekreten und im Speichel vorkommt, gespalten. Auf diese Weise erfolgt die natürliche Abwehr. Das Periplasma wird begrenzt durch eine äußere Membran, die für die gramnegativen Bakterien charakteristisch ist. Diese

ist asymmetrisch aufgebaut und enthält in der äußeren Schicht große Mengen von Lipopolysaccharid und in der inneren Lage Phospholipide. Beim Lipopolysaccharid unterscheidet man drei strukturelle Komponenten:

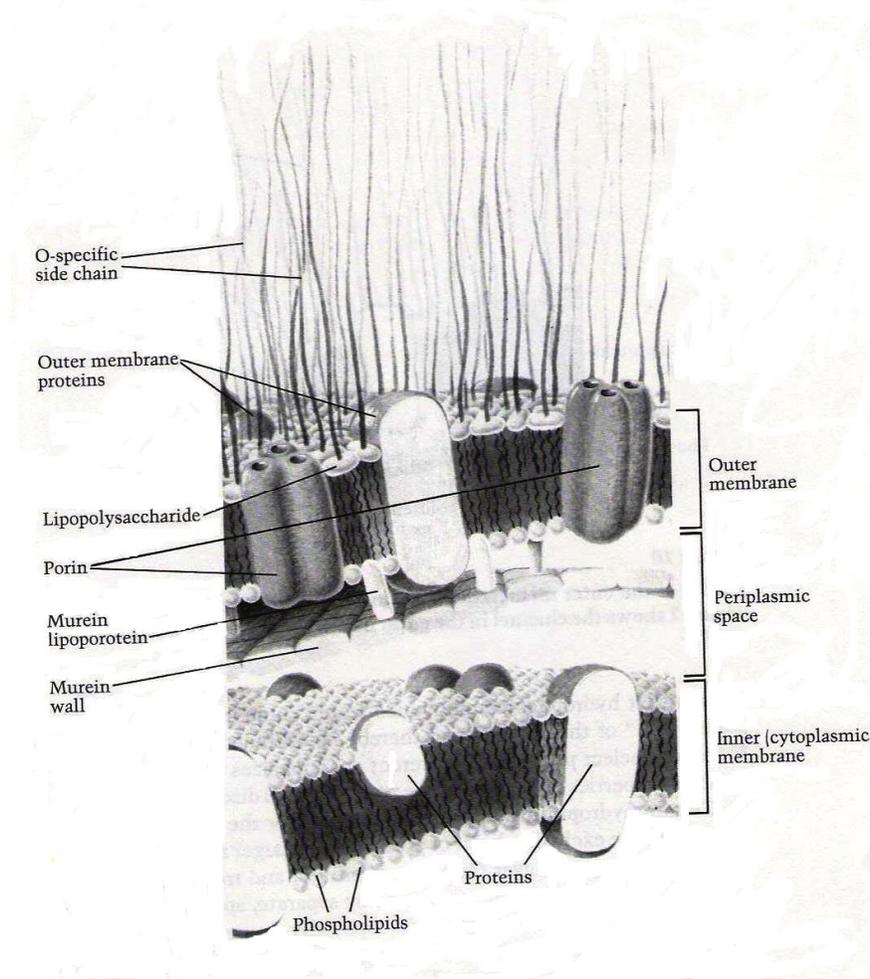


Abbildung 86: Schematische Darstellung⁵⁷ der Zellwandarchitektur bei gramnegativen Bakterien.

- i. Lipid A, ein Phosphoglycolipid (biphosphoryliertes N-Acetylglucosamin-Disaccharid mit meist vier Fettsäuren). Lipid A wird auch als Endotoxin bezeichnet, hat in höheren Konzentrationen stark toxische Effekte und führt zu pathophysiologischen Effekten wie Fieber, Hypotonie, Entzündung und septischer Schock.

- ii. Konstante Kern-Polysaccharidregion (Core): aus definierten Zuckern aufgebaut; spezielle Zuckersäuren (KDO = Keto-desoxy-octonsäuren) verbinden das Lipid A mit dem Core.
- iii. O-spezifische Seitenkette: eine äußere Polysaccharidkette bestehend aus bis zu 25 sich wiederholenden Einheiten von 3 bis 5 verschiedenen Zuckerbausteinen, die vom Keim zu Keim variieren. Diese Struktur stellt ein sehr wichtiges Antigen (O-Antigen) für die Produktion von Antikörpern durch das Immunsystem von Säugern dar.

O-spezifischen Polysaccharidketten, KDO und Phosphorsäurereste des Lipid A verleiht der Zelloberfläche einen stark hydrophilen Charakter. Dabei werden die negativen Ladungen der Säuren durch eingelagerte zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} teilweise kompensiert, was zur Stabilisierung erheblich beiträgt. Gramnegative Bakterien sind deswegen resistent gegenüber lipophilen Verbindungen, zu denen Gallensäuren von Säugern und viele Antibiotika gehören. Escherichia Coli ist häufigster bakterieller Erreger von Harnwegsinfektionen (uropathogene E. Coli-Stämme, Abkürzung UPEC) ferner von Gallenweg- und Gallenblasenentzündungen, Appendizitis, Peritonitis, Wundinfektionen und Sepsis, bei Säuglingen auch Meningitis.

Der natürliche Lebensraum von Escherichia Coli ist der Darm von Tier und Mensch. Das Escherichia Coli Bakterium gilt daher als Indikatorkeim für fäkale Verunreinigungen von Trinkwasser, Badewasser und Lebensmitteln.

Es werden fünf Pathovaren⁵⁸ von Escherichia Coli unterschieden:

- 1) enteropathogene E. Coli (EPEC): auch Dyspepsie-Kolibakterien genannt, verursachen Brechdurchfall bei den Säuglingen und führen zu Gedeihstörungen.
- 2) enterotoxische E. Coli (ETEC): ist Erreger der Reisediarrhoe. Die Stämme O25 und O78 verursachen durch Bildung eines hitzelabilen und hitze-

stabilen Enterotoxins mit choleraähnlichem Wirkungsmechanismus bei Säuglingen, Kindern und Erwachsenen eine choleraähnliche Durchfallerkrankung. Übertragung erfolgt vor allem über fäkal-orale Kontaktinfektion.

- 3) enteroinvasive E. Coli (EIEC): englisches Synonym ist Shigella Like Coli.
- 4) enterohämorrhagische E. Coli (EHEC): bilden Shigatoxine SH1 und SH2 (Verotoxin). Sie verursachen hämorrhagische Kolitis und können besonders bei Kindern das hämolytisch-urämische Syndrom mit akutem Nierenversagen, Thrombozytopenie und hämolytische Anämie auslösen. Nach dem Infektionsschutzgesetz ist der Nachweis von EHEC meldepflichtig. EHEC-Infektionen sind die häufigsten Lebensmittelvergiftungen. Infektionsquellen können Trinkwasser, Rinder oder Rohmilch sein.
- 5) enteroaggregative E. Coli (EAEC): verursachen chronische Durchfälle.

5.3. Aufbereitung von Bakterienzellen

Das kommerziell erhältliche Bakterien vom Stamm W (ATCC 9637) und B (ATCC 10303) wurden als lyophilisierte Zellen verwendet und bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden zum Generieren von MIPs herangezogen, sowie für die späteren gravimetrischen Messungen. Vor dem Gebrauch wurden sie in einem Nährmedium behandelt und für ca. zwei Stunden bei 37°C am Wasserbad inkubiert. Die Zusammensetzung des Extraktes für einen Liter setzt sich aus NaCl (5g), Hefeextrakt (5g), Peptone (10g) zusammen. Die so erhaltenen Zellen können nach Zentrifugieren und mehrmaligem Waschen mit destilliertem Wasser im Kühlschrank gelagert und für weitere Experimente verwendet werden.

5.4. Synthetische Bakterienstempel

Die Herstellung von Mastern für bakterielle Detektion erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie mit den Hefezellen. Für die Vorbereitung von Stempeln mit den lebenden Zellen ist die Größe und Haftfestigkeit am Glas oder einem anderen festen Material zu berücksichtigen. Erste Versuche wurden mit dem gramnegativen Bakterium *Escherichia Coli* vorgenommen. Der verwendete Stamm W wurde in pulvriger Form in der Tiefkühltruhe bei -20° Celsius aufbewahrt. Für die Wiederbelebung der angetrockneten Zellen wird ein Nährmedium aus Natriumchlorid, Hefeextrakt und Peptonen verwendet. Es werden in etwa 25 ml der Nährlösung hergestellt und eine Spatelspitze von Bakterien dazugegeben und umgerührt. Die Lösung lässt man für eine bis zwei Stunden inkubieren, entweder bei der Raumtemperatur oder im Wasserbad bei etwa 35° Celsius. Danach wird die Zellsuspension in einer Tischzentrifuge bei 3000rpm 10 Minuten lang abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wird verworfen und im destillierten Wasser gewaschen. Der Vorgang wird noch zweimal wiederholt. Man erhält einen weißen Rückstand von gereinigten, generierten Zellen, der nun in einer 2 μ l Küvette im destillierten Wasser aufgenommen wird. Diese Lösung

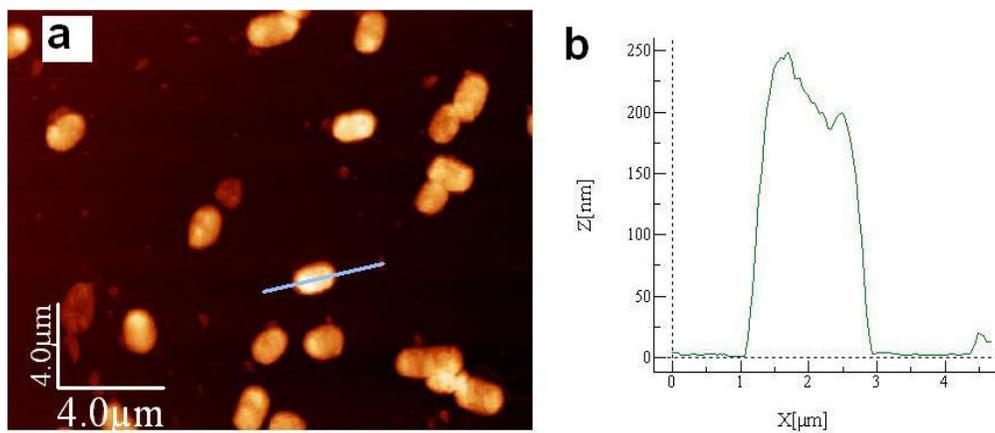


Abbildung 87: Bakterienstempel: (a) native Bakterien *Escherichia Coli* (Stamm W) auf einem Glasplättchen exponiert. Bildgröße 17x20 μ m. AFM contact mode. (b) Sektionsanalyse im WSxM Programm: Ein Colibakterium wurde markiert und vermessen: Länge 2 μ m, Höhe 250 nm.

wird wiederum im Kühlschrank für die nächste Verwendung aufbewahrt.

Bei der praktischen Ausführung von Stempeltechnik wurde Verschiedenes ausprobiert. Die Bakterien wurden zuerst auf ein Glasplättchen aufgetragen und damit geprägt, wobei die spätere Abtrennung des Polymers von dem Glas mit Templat wurde als sehr schwierig empfunden. Wie schon bei den Arbeiten mit Silikon bei der Anwendung als Mastermaterial gesehen wurde, ist die Trennbarkeit eines Streifens Silikon vom Polyurethan leicht. Zu diesem Zweck wurden später dünne Silikonplättchen vorbereitet. Für die Vorbereitung von Silikonstreifen wurde Silikonbasis Sylgard 184 (Firma Calbiochem) genommen und mit einem Härterer im Verhältnis 1:10 vermischt und eine geeignete Form ausgegossen. Die ausgehärtete Platte wurde in kleine Plättchen ausgeschnitten, die die Größe der verwendeten Elektroden am Schwingquarz überschreiten. Die gereinigten Plättchen werden auf ein größeres Glasplättchen mit beidseitigem Klebeband festgehalten. Die generierten Bakterienzellen werden in einer konzentrierten Suspension auf das Plättchen aufgetragen. Die Qualität von den nativen Stempeln lässt sich unter Lichtmikroskop schnell überprüfen. Um das Zellmaterial homogen auftragen zu können, kann man die Suspension auch unter Spin-Coating auf den Silikonstempel bringen. Die generierten, luftgetrockneten Zellstempel werden in ein noch viskoses Präpolymer aufgedrückt und mit einer Klammer bis zur vollständigen Aushärtung des Polymers festgehalten. Da die Bakterienzellen zu Agglomerieren tendieren, kann man dieses Problem durch Spin-Coating der Zellen auf die aufgetragene Schicht vom Polymer umgehen. Die Methode von Spin-Coating läuft analog zu dem im Kapitel 4.11. beschriebenen Prägungsvorgang mit synchronisierten doppelzelligen Hefen ab. Das verwendete Polymer (Polyurethan: 47,8% w/w Bisphenol A, 12% w/w Phloroglucinol, 40,2 % w/w MDI) wurde schon im Kapitel 4.4.2. beschrieben. Die Monomeren werden im Tetrahydrofuran gemischt und unter Verwendung von Pyridin als Katalysator bei 70° C bis zum Gelpunkt gebracht. Durch geeignete Verdünnung werden 15 µL vom Präpolymer auf ein sauberes Glasplättchen auf-

gespinnt und mit einem Stempel versehen. Nach vollständigem Aushärten von Polymer werden die Silikonstempel unter leichtem Druck oder im lauwarmen destilliertem Wasser heruntergenommen. Im Polymer bleiben noch einige Bakterienzellen in ihren Kavitäten festhaften. Das Auswaschen vom Bakterienmaterial aus dem Polymer ist durch die stärkere Wechselwirkung der Zelloberflächen und den endständigen Polyurethangruppen schwieriger als bei den Hefezellen.

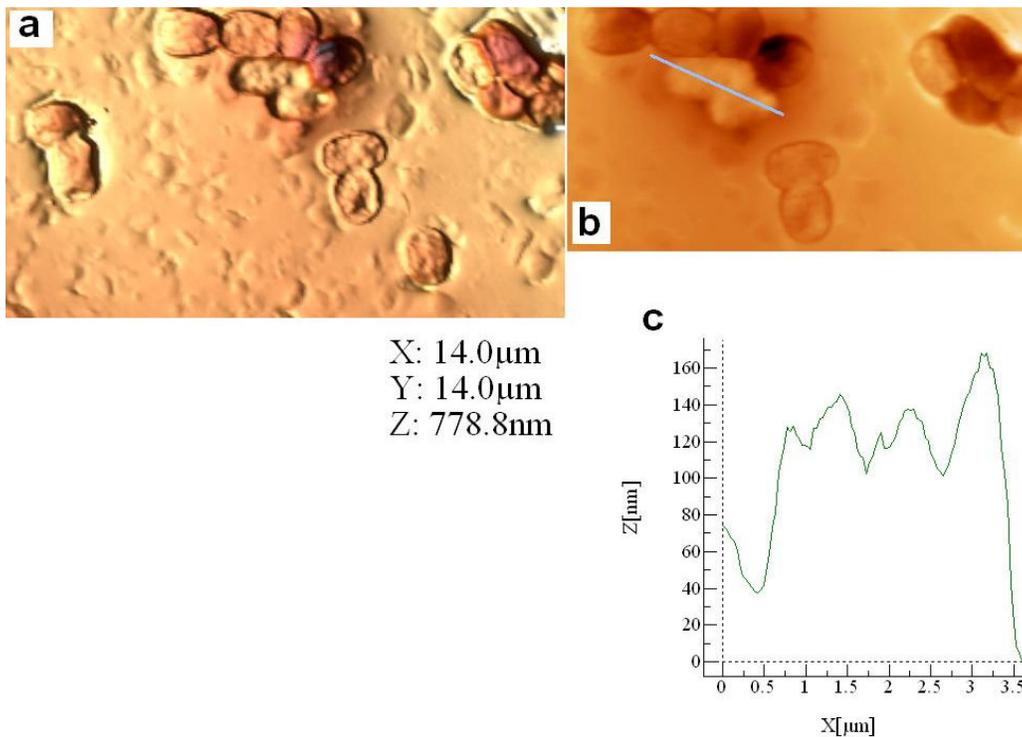


Abbildung 88: Escherichia Coli (Stamm W) als Templat im ausgehärteten Polymer nach der Prägung mit nativen Bakterien. Polyurethan (47,5% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI), Schichtdicke 350 nm. Aufnahme mit AF-Mikroskop contact mode. (a) 3-Dimensionale Darstellung der sensitiven Schicht mit WSxM Programm, (b) 2D-Bild mit zwei gekennzeichneten nebeneinander im Polymer liegenden Bakterien, die in der Abbildung (c) sektionsanalytisch dargestellt wird. Die Templatzellen ragen etwa 100 nm aus dem Polymer heraus.

Es wurden verschiedene Methoden zum Entfernen vom Templat aus der sensitiven Schicht angewendet, respektive kombiniert:

- *Rühren im destilliertem Wasser bei 40°C über einige Stunden*

- *Ultraschallbehandlung – mit der Gefahr, dass das Polymer vom Glas herunter gewaschen wird*
- *Behandlung mit 0,5%igen SDS-Lösung*
- *Behandlung mit 0,1%igen NaCl-Lösung*
- *Behandlung mit Lysozym (0,5 mg/ml)*

Nach dem Entfernen von Zellen werden die Glasplättchen mit geprägtem Polyurethan unter dem AFM- Mikroskop auf die Quantität und Qualität der generierten Kavitäten getestet. Die Abbildung (88) zeigt einen Ausschnitt aus dem Polymer mit Bakterien. In der nächsten Abbildung (89) werden zum Vergleich die ausgewaschenen, leeren Kavitäten präsentiert.

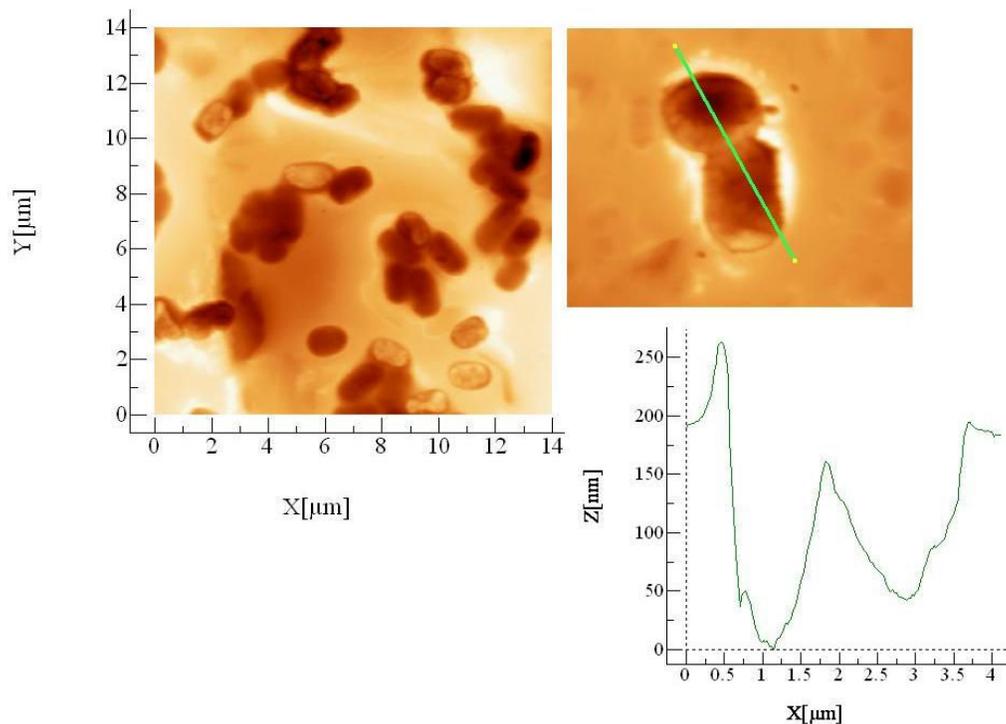


Abbildung 89: Kavitäten im Polyurethan (47,5% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) nach Auswaschen vom Templat. Prägung mit EC W. AFM contact mode. 2D-Darstellung mit WSxM Programm, aus dem unteren Diagramm (Sektionsanalyse) sind die Maße der beiden Kavitäten ersichtlich: 1,5 bis 2 μm lang und 100 bis 250 μm tief.

In nächsten Schritt werden die Kavitäten im Polymer mit flüssigem, entgastem Silikon (Sylgard 184, Mischverhältnis des Basismaterials zu Härterer 10:1) in

einer Petrischale übergossen, so dass ein Film von zirka 0,3 cm oberhalb der Stempel entsteht. Das Silikon härtet je nach verwendeter Temperatur aus, es wird aus der Schale um die jeweiligen Glasstempel herum herausgeschnitten und vom Polymer sanft abgetrennt. Die Größe der Silikonplättchen entspricht der Größe der verwendeten Elektroden am Schwingquarz. Die untere Silikonoberfläche, die während des Aushärtens in Kontakt mit dem geprägten Polyurethan war, zieren jetzt Auswülstungen, die den negativen Abdrücken der nativen Bakterienzellen entsprechen. Diese synthetischen Stempel werden später für die Prägung von sensitiven Schichten an Schwingquarzen für die gravimetrischen Messungen verwendet.

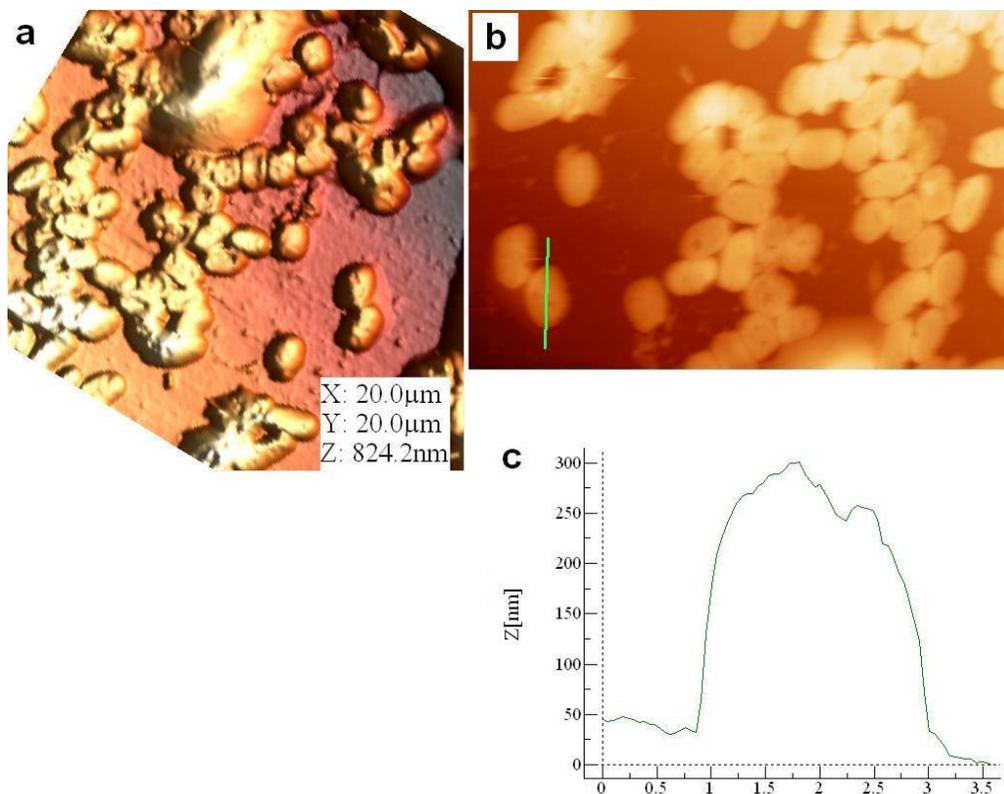


Abbildung 89: Synthetische Bakterienzellen aus Silikonmaterial: (a) Oberfläche einer Bakterienreplika für *Escherichia Coli* (Stamm W). Aufnahme mit AF-Mikroskop, im contact Mode. 3D-Darstellung mit WSxM. (b) 2D-Darstellung und (c) Sektionsanalytische Darstellung der Masse einer Silikonzelle: Länge 2,2 µm und Höhe 250 µm.

5.5. Gravimetrische Bakterienchips

Für die Herstellung von bakteriellen Sensoren wurden die gleichen Quarze mit der speziellen 2-Elektroden Geometrie für Flüssigkeitsmessungen verwendet. Als sensitive Schicht wurden verschiedene Polymersysteme getestet und auch die Schichtdicke des Polymers am Quarz optimiert. Aus praktischer Sicht wurde zu Polyurethan gegriffen, das sich durch Langlebigkeit auszeichnet und sich für die Messung in flüssigen Medien sehr gut eignet. Analog zu den Hefesensoren wurde zuerst mit nativen Zellen gearbeitet, um später die Ergebnisse von den Silikonzellen vergleichen zu können. Bei der nativen Prägung wurde ein Stempel aus Glas oder Silikon mit frisch generierten Bakterienzellen benetzt und in das aufgespinnte Polymer (Polyurethan: 47,8% w/w Bisphenol A 12% w/w, Phloroglucinol, 40,2 % w/w MDI) am Schwingquarz gedrückt und mit einer Büroklammer fixiert. Nach dem Aushärten der sensitiven Schicht wurde der Glasstempel wieder mit destilliertem Wasser unter Rühren bei 40°C in einer Glasschale abgelöst. Die restlichen Zellen wurden versucht, mit 0,1%igen SDS-Lösung und mit Hilfe von Ultraschall aus den Kavitäten abzulösen. Der Quarz mit der sensitiven Schicht wurde am Netzwerkanalysator auf die Dämpfung getestet. Der Bakterienchip mit dualer Elektrodengeometrie wurde in die Acrylatmesszelle gelegt und mit destilliertem Wasser gespült. Bei verwendeter Schichtdicke des Polymers von maximal 400nm stellt sich nach ungefähr einer Stunde Gleichgewicht in der Frequenzanzeige ein. Nach dem Einschwingen der Quarze in destilliertem Wasser wurden frische Bakterienzellen mit den Chips gemessen. Die Sensitivität eines Bakteriensensors ist in der Abbildung (90) gezeigt. Die Sensorantwort auf die Zugabe von 5mg/ml beträgt rund 900 Hz. Durch die Variation der Analytkonzentrationen, kann man aus den erhaltenen Frequenzänderungen eine entsprechende Kalibrationskurve erhalten. Die Darstellung deutet auf einen linearen Zusammenhang bei niedrigeren Konzentrationen von Bakterienzellen. Bei der Zugabe von 5 mg/ml wurde allerdings ein ver-

gleichsweise höherer Effekt verzeichnet, was wahrscheinlich auf die Agglomeration und Sedimentation bei höheren Konzentrationen zurückzuführen ist.

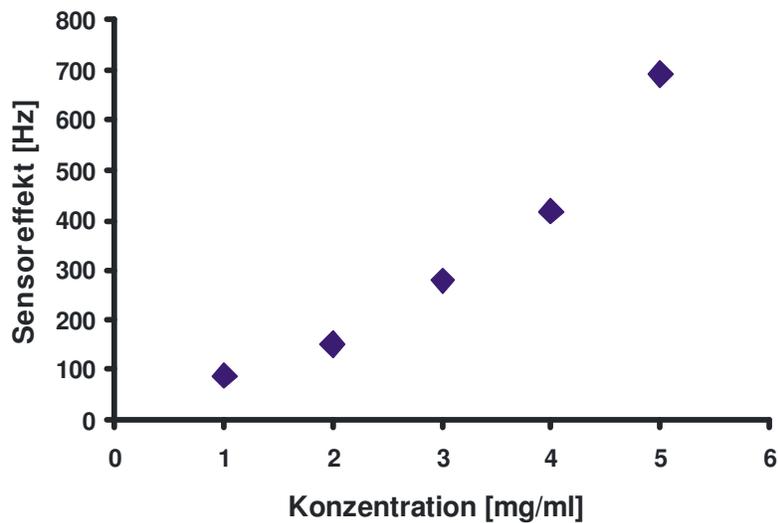
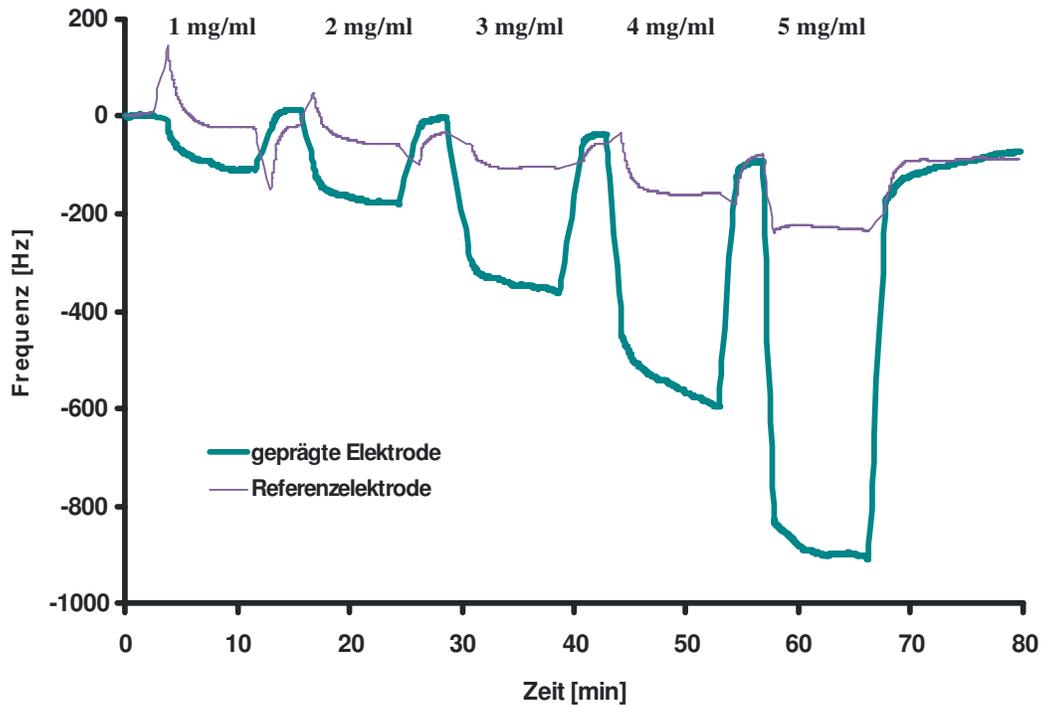


Abbildung 90: Konzentrationsabhängigkeit eines Bakteriensensors: 10 MHz Schwingquarz mit dualer Elektrodengeometrie. Sensitive Schicht: Polyurethan (47,5% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI), Schichtdicke 400nm. Prägung mit nativen Escherichia Coli Bakterien des Stammes W. Messkurve: Basislinie mit dest. Wasser, Variation der Konzentrationen von E. Coli (Stamm W) von 1 bis 5 mg/ml in dest. Wasser. Gemessen wurde im stopped-flow Modus bei RT. Untenliegendes Diagramm veranschaulicht die gemessenen Sensoreffekte als Frequenzänderungen in Abhängigkeit von den vermessenen Analytkonzentrationen.

5.6. Prägung mit synthetischen Bakterienstempeln

Entsprechend der nativen Prägung wurde auch mit den Silikonstempeln geprägt. Zunächst wurde versucht die Aushärtung des Polymers im Ofen zu beschleunigen, aber bessere Erfolge wurden beim langsamen Aushärten bei der Raumtemperatur erreicht. Die Ergebnisse zur Prägung mit synthetisch hergestellten Stempeln können mikroskopisch auf die Qualität getestet werden. Durch die Abtastung der AFM Rasterspitze der Polymeroberfläche erhält man einen Höhenbild, der sich später mit dem Programm WSxM zu dreidimensionalen Bildern bearbeiten lässt. Die Abbildung (91.a und 91.b) lässt die Qualität der Kavitäten im Polyurethan veranschaulichen. In der nächsten Abbildung (91.b) wird die sektionanalytische Darstellung präsentiert.

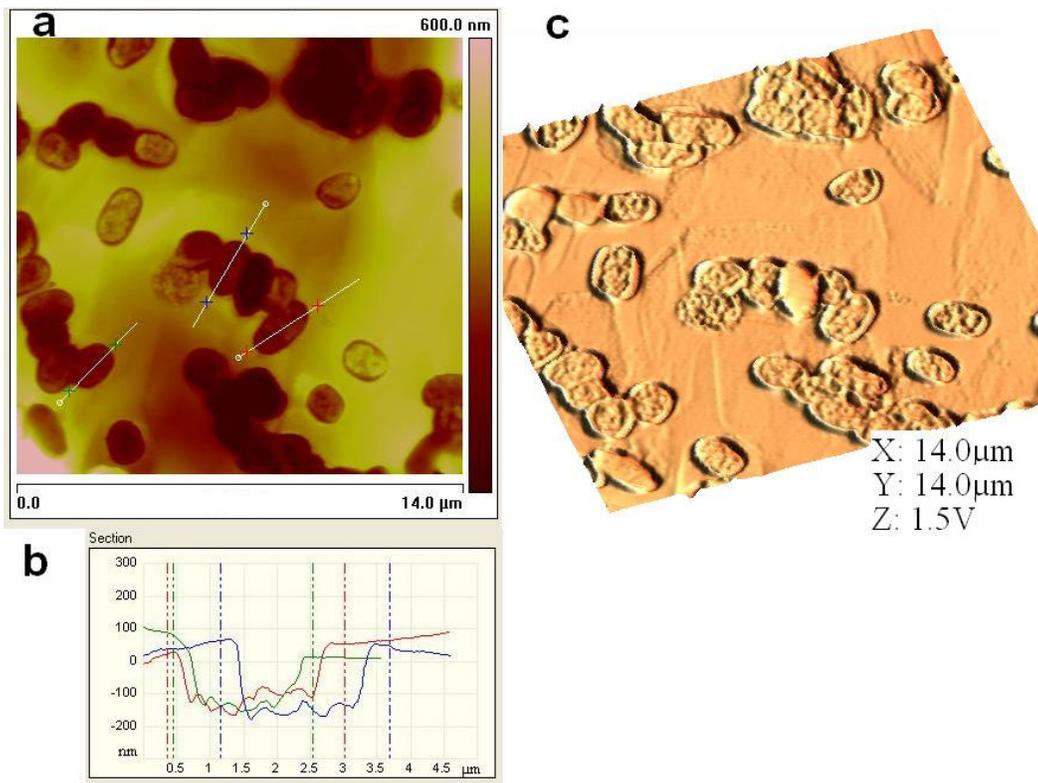


Abbildung 91: Sensitive Schicht mit Kavitäten für *E. coli*: Polyurethan (47,5% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit einem synthetischen Bakterienstempel aus Silikon – Replica von *E. coli* Stamm W. (a) 2-Dimensionale Darstellung der Oberfläche mit AFM contact mode. (b) Sektionsanalyse: Tiefenprofil der im Bild (a) gekennzeichneten Kavitäten. (c) 3-Dimensionale Darstellung des Polymerausschnittes aus dem Bild (a). Graphische Bearbeitung der Ergebnisse mit Programm WSxM.

Bei der Prägung mit synthetischen Bakterienstempeln wurde ebenfalls versucht, die optimalste Temperatur und Bedingungen zum Aushärten – korreliert mit gravimetrischen Messergebnissen. So präsentiert die Abbildung (92) ein Versuch, wo die aufgetragene Vorpolymerlösung mit Masterzellen in THF Atmosphäre in einem Excikkator bei Raumtemperatur ausgehärtet wurde. Der Sensoreffekt bei E. Coli W Konzentration von 5 mg/ml zeigt sich vergleichsweise höher als bei der schnellen Aushärtung im Trockenschrank, aber auch der unspezifische Effekt auf der Referenzelektrode zeigt sich sehr hoch. Der Grund dafür kann in der höherer Porosität des Polymers liegen.

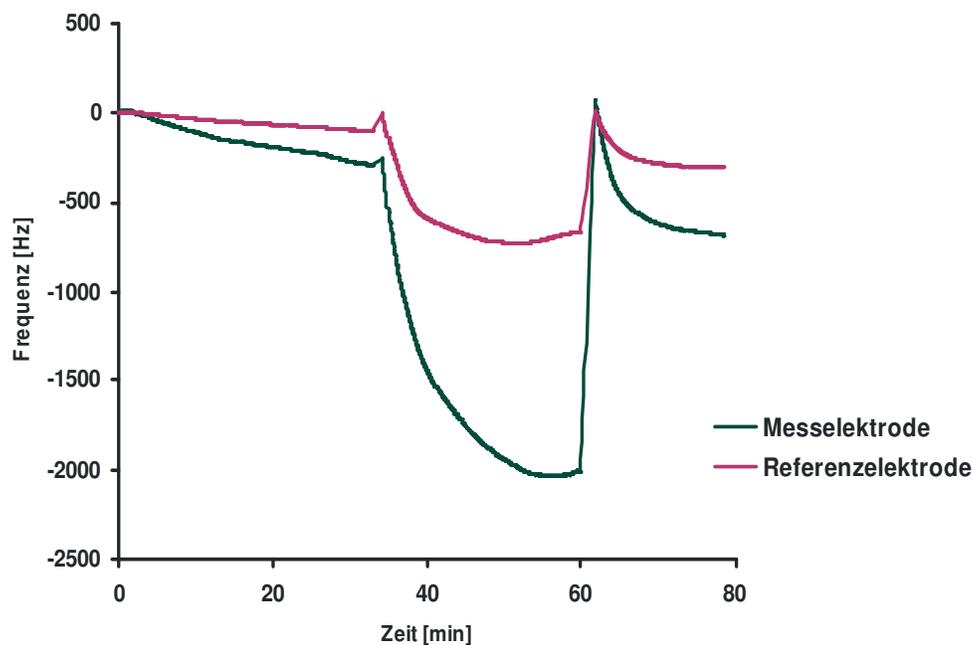


Abbildung 92: Sensoreffekt eines 10 MHz Bakterienchip. Polymer: Polyurethan (47,5% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) der Schichtdicke 400nm. Prägung mit synthetischen Bakterienstempel (EC W) Aushärtung bei Raumtemperatur in THF Atmosphäre. Vermessen wurde Lösung von E. Coli des Stammes W der Konzentration 5 mg/ml in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur.

Die Abbildung (93) zeigt die Sensorantwort eines 10 MHz Quarzes beschichtet mit Polyurethan mittels Spin-Coating und geprägt mit einem Kunststoffstempel. Die Messergebnisse werden in der Abbildung (94) als Frequenzänderung gegen die vermessenen Konzentrationen von Escherichia Coli Stamm W zusammengefasst.

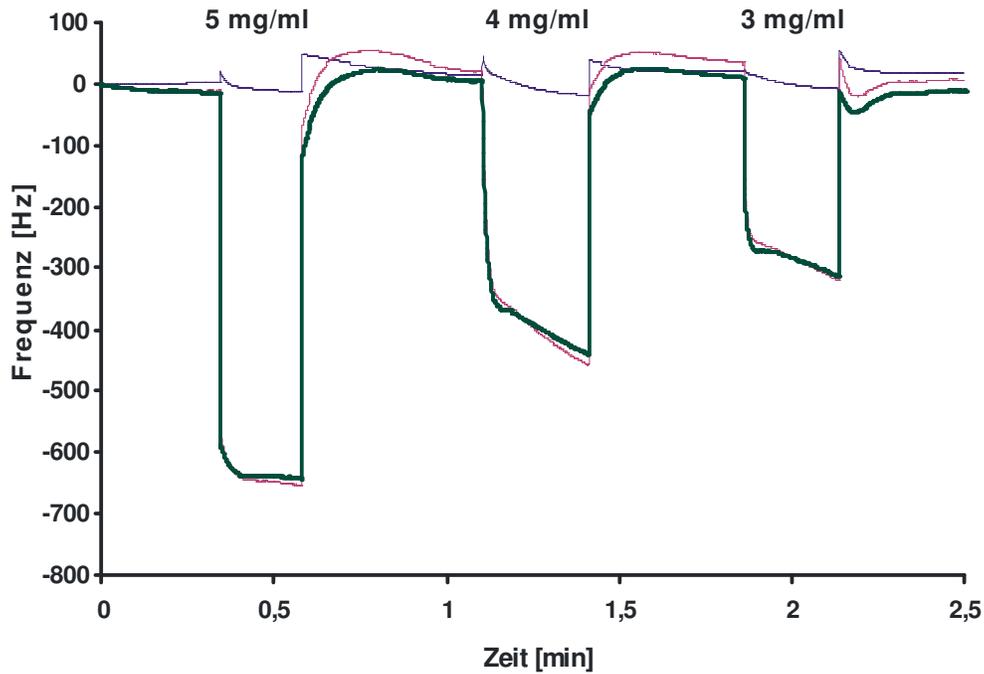


Abbildung 93: Sensitivität eines Bakteriensensors, der mit Hilfe von synthetischen Bakterienzellen vom Typ E. Coli Stamm W aus Silikon generiert wurde. 10 MHz Schwingquarz beschichtet mit Polyurethan (47,5% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI), Schichtdicke 350 nm. Vermessen wurden Lösungen von E. Coli (Stamm W) im Konzentrationsbereich 3 bis 5 mg/ml in dest. Wasser bei Raumtemperatur im stopped-flow Modus.

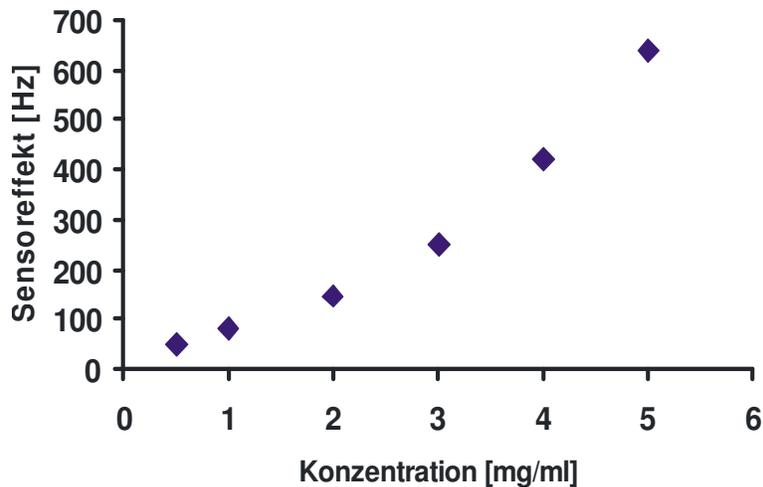


Abbildung 94: Konzentrationsabhängigkeit eines mit synthetischen Bakterienzellen (Stamm W) geprägten Sensors: 10 MHz Quarz beschichtet mit Polyurethan (47,5% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) der Schichtdicke 350nm und geprägt mit Silikonmastern von E. Coli des Stammes W. Vermessene Lösungen von E. Coli W mit Konzentration 0,5; 1; 2; 3; 4 und 5 mg/ml in dest. Wasser bei Raumtemperatur.

Die Sensoreffekte stellen sich sehr schnell ein – im Vergleich zu größeren Zellen wie Hefe *S. cerevisiae* (5-10µm groß). Nach Entfernen der Zellen aus der Flüssigkeitsmesszelle stellt sich wieder die Basislinie ein. Erst nach oftmaliger Verwendung des Bakterienchips beobachtet man – analog zu den Hefesensoren – ein Absinken der Frequenzantworten bei den gleichen Konzentrationszugaben. Auch die effektive zeitliche Einstellung des Sensorsignales verringert sich. Ein ähnlicher Effekt wurde in der Abbildung (95) präsentiert. Durch die Analytzugabe von 5 mg/ml *E. coli*, das auch zur Prägung verwendet wurde, stellt sich sehr langsam – binnen 20 Minuten – eine Frequenzantwort von etwa 700 Hz ein. Beim Auswaschen vom Analyten bleibt die Frequenz von destilliertem Wasser auf 400 Hz unterhalb von der Basislinie. Dieser Effekt darauf zu führen, dass die Zellsuspension eine höhere Viskosität beträgt. Nach dem versuchten Entfernen bleibt trotzdem ein großer prozentueller Satz des Bakterienmaterials in den Kavitäten haften.

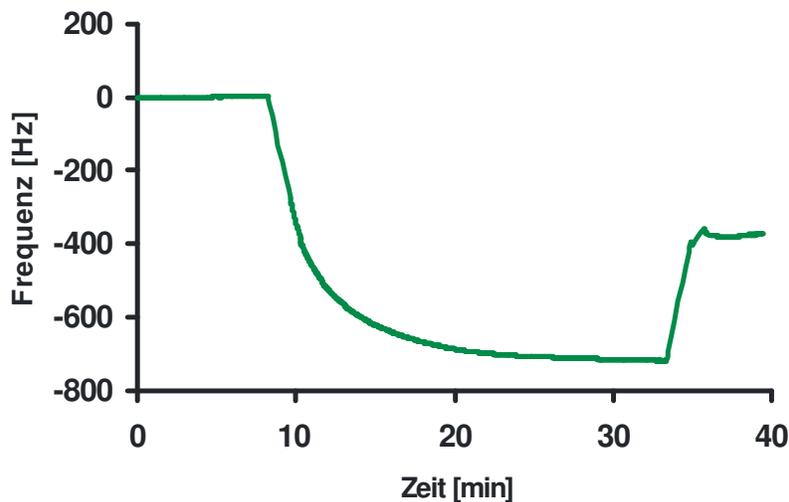


Abbildung 95: Sensoreffekt bei einem verunreinigten Bakterienchip. Nach der Messung von einer Bakterienlösung der Konzentration 5 mg/ml bei Raumtemperatur stellt sich ein um ca. 18 % niedrigerer gravimetrischer Effekt als erwartet. Nach dem üblichen Waschvorgang mit destilliertem Wasser lässt sich die Basislinie nicht mehr erreichen. Sensitive Schicht: Polyurethan (47,5% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) geprägt mit synthetischen Colistempeln aus Silikon.

In der Abbildung (96) werden die unterschiedlichen Effekte für regenerierte und degenerierte Zellen zusammengefasst. Der Bakteriensensor wurde mit dem

gleichen Zellmaterial (EC Stamm W) geprägt, wie es zu der Messung verwendet wurde. Infolge dessen wurde erwartungsgemäß ein Sensoreffekt von ungefähr 750 Hz erreicht. Als Nächstes wurde die Messzelle mit degenerierten Zellen, die schon höhere Viskosität aufweisen, gefüllt. Diese Bakterienzellen (EC Stamm W) wurden über 4 Wochen lang im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Der Messeffekt an beiden Elektroden – geprägten Messelektrode und ungeprägten Referenzelektrode -zeigt sich für die gleiche Konzentration von E. Coli Zellen viel höher und stellt sich viel langsamer ein.

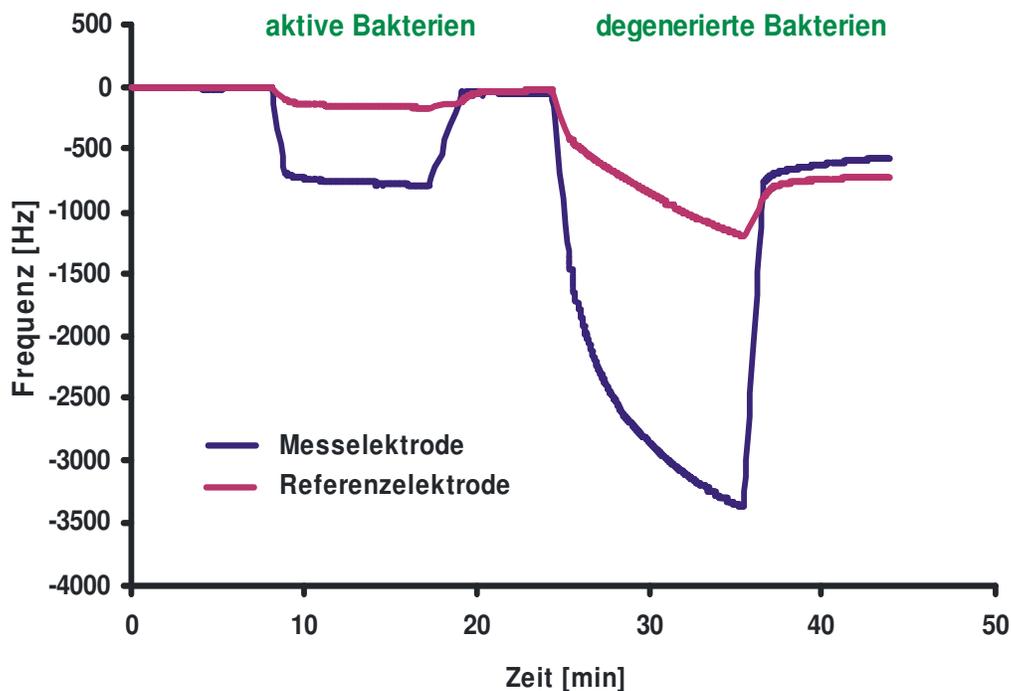


Abbildung 96: Bakteriensensor: Vergleich von Sensoreffekten für frische aktive Bakterienzellen und degenerierte Zellen unter gleichen Bedingungen. 10 MHz Quarz mit Polyurethanschicht (47,5% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) von 400nm. Messelektrode wurde mit Silikonmaster für E. Coli Bakterien vom Stamm W geprägt. Vermessen wurden Lösungen von E.Coli (W) der Konzentration 5 mg/ml in destilliertem Wasser im stopped-and-flow Modus bei Raumtemperatur.

5.7. Querempfindlichkeit des Bakteriensensors

Im nächsten Schritt wurde die Querempfindlichkeit des Bakteriensensors auf verschiedene Stämme von Escherichia Coli getestet. Zu diesem Zweck wurden 10 MHz Schwingquarze mit Polyurethan gleicher Schichtdicke mit Spin-Coating Methode (siehe Kapitel 4.11.) beschichtet und mit synthetischen Zellen für die jeweiligen bakteriellen Stämme geprägt. Die synthetischen Bakterienstempel wurden aus Silikon nach den Vorlagen den jeweiligen nativen Bakterienzellen hergestellt. Durch die Stempeltechnik wurde das Prägen im aufgetragenen Vorpolymer am Quarz vorgenommen. Nach der 12 stündigen Aushärtung bei der Raumtemperatur wurden die Bakterienchips in die Flüssigkeitsmesszelle eingesetzt und mit verschiedenen E. Coli Stämmen bei gleicher Konzentration in destilliertem suspendiert und unter identen Konditionen vermessen.

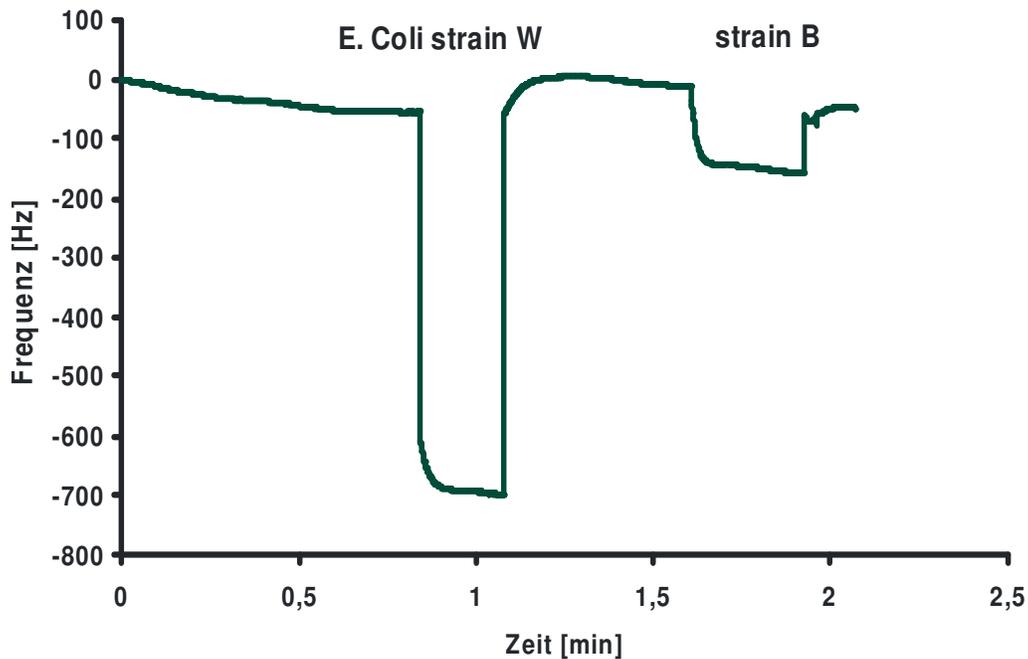


Abbildung 97: Querselektivität: E. Coli-Sensor: 10 MHz Schwingquarz beschichtet mit Polyurethan (47,5% Bisphenol A, 12% Phloroglucin, 40,2% MDI) der Schichtdicke 350 nm. Stempelprägung mit einem synthetischen Zellenstempel als Replica von E. Coli Stamm W. Verglichen wurden die Stämme W und B bei gleicher Konzentration 5 mg/ml. Messung im stopped-and-flow Modus.

Die Abbildung (97) zeigt die Sensorantwort auf eine Messung mit E. Coli des Stammes W und B. Der eingesetzte Sensor besteht aus einem 10 MHz Quarz mit Goldelektroden auf den Oberflächen. Die aufgetragene Polymerschicht beträgt 350nm. Die nächste Abbildung (98) präsentiert die Sensorantworten eines Bakteriensensors sensitiv für E. coli Stamm B. Dementsprechend bezieht sich die erste Frequenzerniedrigung von 1000 Hz auf die Prägezellen – EC B, die zweite Frequenzantwort von 180 Hz entspricht dem E. Coli W.

Die gemessenen Ergebnisse der beiden Bakteriensensoren werden in prozentuellen Anteilen im Balkendiagramm in der Abbildung (99) wiedergegeben.

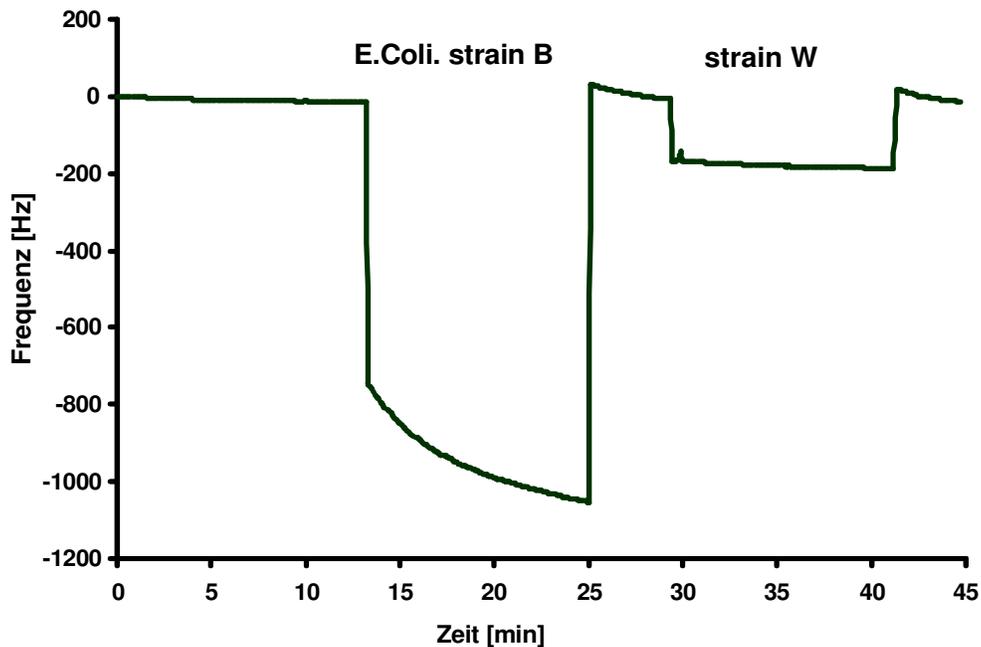


Abbildung 98: Querselektivitätskurve: Coli-Bakteriensensor 10 MHz Schwingquarz beschichtet mit Polyurethan (47,8% w/w Bisphenol A, 12% w/w Phloroglucin, 40,2% w/w MDI), Schichtdicke 400nm. Prägung mit synthetischem E. Coli-Stempel empfindlich für Stamm B. Vermessen wurden Lösungen von E. Coli Stamm B und W bei gleicher Konzentration 5 mg/ml in destilliertem Wasser im stopped-flow Modus bei Raumtemperatur.

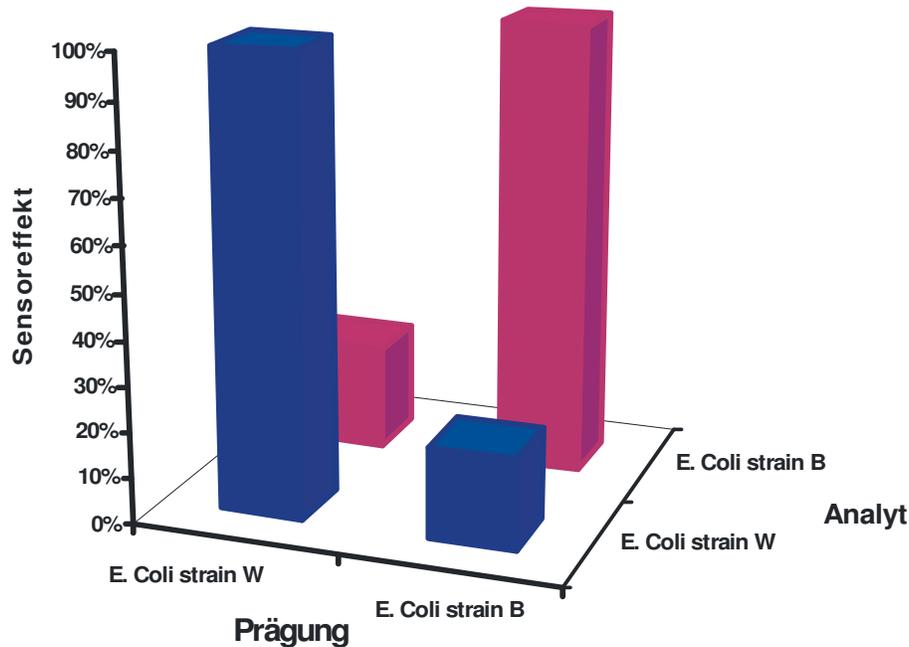


Abbildung 99: Querselektivität beim Coli-Bakteriensensor: 10 MHz Schwingquarze beschichtet mit Polyurethan (47,8% w/w Bisphenol A, 12% w/w Phloroglucin, 40,2% w/w MDI), Schichtdicke 350 bis 400nm. Prägung mit synthetischem E. Coli-Stempel empfindlich für Stamm W, respektive Stamm B. Vermessen wurden jeweils Lösungen von E. Coli Stamm B und W mit gleichen Konzentrationen 5 mg/ml in dest. Wasser im stopped-flow Modus bei RT.

5.8. Resümee - Bakteriensensor

In dem zweiten Teil der Dissertation wurden Bakterienchips hergestellt und auf ihre Funktionstüchtigkeit geprüft und optimiert. Die Herstellung erfolgte auf die gleiche Art und Weise wie schon bei den Hefesensoren beschrieben wurde. Der verwendete Schwingquarz als Transducer wurde mit einer sensitiven Schicht kombiniert und für die Messungen von flüssigen Proben herangezogen. Die optimalen Polymere für soft-lithographische Prägung sind ohne Zweifel Polyurethane, die die vorgegebene geometrische Form des Templatmaterials nach dem Aushärten wiedergeben. Für die optische Kontrolle wurde Atomkraftmikros-

kopie verwendet. Zunächst wurden Bakteriensensoren für Modelorganismus *Escherichia Coli* – Stamm W hergestellt und die Sensoreffekte auf die Sensitivität und Selektivität geprüft. Im nächsten Schritt wurden aus geprägtem Polymer durch Ausgießen mit einem Kunststoff negative Abdrücke von den Kavitäten, respektive positive Abdrücke der nativen Bakterienzellen generiert. Die Qualität dieser synthetischen Zellen wurde ebenfalls mit AFM contact-mode bestimmt. Um die Kreuzselektivität testen zu können, wurde zusätzlich ein Bakteriensensor hergestellt, der mit synthetischen Zellen als Replica von EC Stamm B geprägt wurde.

Die Prägung mit Masterzellen zeigte ähnliche Ergebnisse bei den gravimetrischen Messungen wie schon bei den Bakterienchips mit nativen Zellen erreicht wurde.

6. Zusammenfassung

6.1. Deutsche Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde Herstellung von Chemosensoren anwendbar für Flüssigkeitsbioanalytik beschrieben. Für diesen Zweck wurden Hefechips und Bakterienchips selektiv für Vorzeigeorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia Coli* hergestellt und diskutiert. Es wurde im Detail demonstriert, wie die molekulare Analyte zur Generierung von chemisch sensitiven Schichten im Rahmen des Molekularen Prägens verwendet werden können. Durch die Kombination von makromolekularen Chemie und Selbstorganisation werden geeignete sensitive Materialien mit Assay-analogen Eigenschaften geschaffen.

Hefe spielt eine wichtige Rolle in der Biotechnologie als unabdingbarer Bestandteil der Genussindustrie und Lebensmittelindustrie. Hefechips stellen demnach eine geeignete Möglichkeit für dessen Einsatz bei on-line Überwachung in der Prozesskontrolle. Es wurden ebenfalls spezifische Hefechips für einzelne Teilungsstadien hergestellt, die sich auf den Teilungszyklus beziehen. Ausgehend von Einzelzellen, die am Markt erhältlich sind, teilen sich die Hefezellen unter günstigen Bedingungen. Da sich die diese Hefechips durch hohe Selektivität auszeichnen, können sie zur Überwachung des Wachstums eingesetzt werden.

Die soft-lithographische Methode des Prägens wurde auch auf Bakterien ausgedehnt. Bei bakteriellen Zellen ist es von Interesse, standardisierte Master zu herstellen, mit denen geeignete Polymere geprägt werden und somit passende Chemosensoren generiert. Neben mutualistischen Zellen befinden sich im menschlichen Umfeld auch Bakterien als Krankheitserreger oder als eventuelle Biowaffen, die jederzeit zum Einsatz kommen könnten. Auch die Tendenz der Bioanalyten, sich schnell der aktuellen Umgebung anzupassen und eventuell

mutieren, führt zu stetig steigender Anzahl von neuen möglichen Bedrohungen für den Menschen. Um die drohenden Potentiale rechtzeitig zu erkennen, bedarf es an entsprechenden Analysenstrategien, mit schnell und adäquat der sich ändernden Analyten anpassen. Die Chemosensoren als miniaturisierte Messwertfühler auf der Basis von piezoelektrischen Transducern mit einer ultradünnen synthetischen Erkennungsschicht, die leicht und vor allem schnell herzustellen wäre, stellen eine potentielle brauchbare Lösung für diesen Zweck. Sie überzeugen mit hoher Sensitivität und Selektivität, schnellen Ansprechzeiten im Sekundenbereich und leichter Handhabung.

Einen weiteren Schritt in Richtung Reproduzierbarkeit stellt die Verwendung von künstlichen Zellen dar, die zur Herstellung von sensitiven Schichten herangezogen werden. Für die künstlichen Zellen oder Master wird die gleiche Strategie der Selbstorganisation verwendet, wie schon bei der Herstellung von sensitiven Polymerschichten beschrieben wurde. Die Master entstehen als negative Abdrücke von Bioanalyten durch Ausgießen von Kavitäten, die nach der Prägung mit dem nativen Zellmaterial im Polymer entstanden sind, mit einem anderen noch flüssigen Polymer. Bei der Verwendung von sensitiven Schichten aus Polyurethan eignet sich Silikon als Material für die synthetischen Zellen, da es chemisch inert ist und demnach für die Trennung von beiden Materialien nach erfolgtem Aushärten äußerst geeignet ist.

6.2. Englische Version der Zusammenfassung

In this study, the establishment of chemosensors for liquid bioanalytics has been described. For this purpose, yeast and bacteria chips have been prepared for model organisms like *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia Coli*. It has been demonstrated in detail, how the molecular analytes were used for the generation of chemically sensitive layers within the scope of molecular stamping. With the combination of macromolecular chemistry and self-organisation the

construction of suitable sensitive materials with assay-analogue features can be realised.

Yeast plays an important role in biotechnology and is a main part in food- and luxury food technology. Yeast chips are used for on-line observation in process control and they have also been used for monitoring the specific division states in the yeast cell cycle. The single cells, which are available on the market, divide under beneficial conditions and as yeast chips are highly selective, they can be used for growing control.

The photolithographic method of stamping has also been used for bacteria cells. Here one is interested in preparing standard masters which can be used for the stamping of polymers for generating chemosensors. Beside mutualistic cells the human environment contains bacteria as pathogens or possible bio-weapons which could be applied anytime. The tendency of bioanalytes to adapt to the actual environment and to maybe mutate leads to a growing number of possible threats for the civilisation. The special strategy analysis is used to recognize imminent dangers on time. The chemosensors based on piezoelectric transducers along with artificial recognition layers present a suitable solution for this purpose. The main advantages are high selectivity and sensitivity, fast response time on the time scale of seconds and easy handling.

To further improve reproducibility one can use artificial cells for the generation of sensitive layers. The strategy for self-organisation for the artificial cells or masters is the same as for the sensitive polymer layers described before. The masters establish as negative imprints of bioanalytes through effusion of cavities with liquid polymers, which have been formed after stamping of the native cell material in the polymer. With sensitive layers of polyurethane, silicone is used as material for the synthetic cells because it is chemically inert and therefore suitable for the separation of the two materials after hardening.

7. Anhang

7.1. Chemikalien

AIBN (Azo-bis(isobutyronitril)) (98%, Aldrich), APTES (98%, Fluka), Bisphenol A (97% , Merck), Dansylchlorid (95%, Sigma), DHEBA (99%, Fluka), Dimercaptobutan (Fluka), EC B (ATCC 10303, Sigma), EC W (ATCC 9637, Sigma), Ethanol (99,8%, Merck), D-(+)-Glucose (99,5%, Sigma), Goldglanzpasta (Heraeus), Hydroxyurea (Calbiochem), Lysozym (aus Hühnereiweiß, Sigma-Aldrich), Malzextrakt (Sigma), 4,4'-MDI (4,4'-Diisocyanato-Diphenylmethan) (30% Triisocyanate, Merck), Methacrylsäure (99%, Aldrich), Natrimchlorid (Merck), Pepton (Sigma), Phloroglucin (98%, Fluka), Pyridin (99%, Fluka), SDS (Fluka), Schwefelsäure (95-97%, Merck), Sylgard 184 Silicon kit (Dow corning), THF (Tetrahydrofuran) (99%, Merck), UV-Polymer AZOCOL (Poly-PlusS, KIWO) Vinylpyrrolidon (98%, Merck), Wasserstoff-peroxid (30%, Merck), Yeast extract (Sigma)

7.2. Geräte

AFM Nanoscope IIIa (Digital Instruments), Frequenzzähler (HP 53131 A), Lichtmikroskop (Nikon Eclipse LV 100), Netzgerät (EA PS 2032-025), Netzwerkanalysator (HP E 5062; 300 kHz bis 3 GHz), Ofen (Heraeus Thermicon P 750/1), Peristaltik-Pumpe (Ismatech IP 65), Thermostat (Haake DC 3 Fisons), Ultraschallbad (Transsonic T780/H), UV-Belichtungsgerät, Tischzentrifuge (Eppendorf 5702), Zählkammer (Neubauer improved)

7.2. Polymerbasis für Silikonzellen und Masterzellen

Sylgard 184 – Silicone elastomer kit

Elastomer Basis: Dimethylsiloxan, dimethylvinyl-terminiert; dimethylvinylierte und trimethylierte Silica, Tetratrimethoxysilan

Härter: Dimethyl-methylhydrogensiloxan, Dimethylsiloxan, dimethylvinylierte und trimethylierte Silica, Tetramethyl-tetravinyl-cyclotetrasiloxan

7.3. Abkürzungen

AFM Atomic Force Microscopy

AIBN 2,2'-Azobis-(2-Methyl-propionitril)

APTES 3-Aminopropyl-triethoxysilan

BPA Bisphenol A

C Kapazität

dB Dezibel

DVB Divinylbenzol

DHEBA N, N-1,2- Dihydroxyethylenbisacrylamid

EC Escherichia Coli

V Frequenz

Hz Hertz

IR Infrarote Strahlung

IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry

L Induktivität

M molar, molare Masse

MDI Methyldiphenylisocyanat

MIP Molecular Imprinted Polymer

NaCl Natriumchlorid

NCO- Isocyanatgruppe

PA Polyacrylat

PBS Phosphate Buffered Saline

PUR Polyurethan

QCM Quartz Crystal Micro Balance

R Widerstand

RT Raumtemperatur

SDS Sodium Dodecyl Sulfate

SPM Scanning Probe Microscopy

THF Tetrahydrofuran

TSM Thickness Shear Mode Resonator

UV Ultraviolette Strahlung

V Volt

2D zwei-dimensional

3D drei-dimensional

8. Literaturverzeichnis

-
- ¹ O. Hayden, D. Podlipna, X. Chen, S. Krassnig, A. Leidl, F.L. Dickert, Nanolithography and Subnanomolecular Interactions for Biomimetic Sensors, *Materials Science and Engineering C*, 26, 924-928, 2006.
- ² F.L. Dickert, O. Hayden, P. Lieberzeit, C. Haderspoeck, R. Bindeus, C. Palfinger, B. Wirl, Nano- and Micro-Structuring of Sensor Materials – from Molecule to Cell Detection, *Synthetic Metals* 138, 65-69, 2003.
- ³ A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingmann, IUPAC Discussion Paper, Commission V. I., Juli 1989.
- ⁴ F. L. Dickert, *Chemie in unserer Zeit* 3, 138-143, 1992.
- ⁵ R. Nießer, *Chemische Sensoren – Prinzipien und Anwendungen*. Analytiker Taschenbuch (Hrsg. Borsdorf), Akademie Verlag, Berlin, 55-87, 1987.
- ⁶ F.L. Dickert, O. Hayden, Nanolithography and Subnanomolecular Interactions for Biomimetic Sensors, *Materials Science and Engineering C*, 26, 924-928, 2006.
- ⁷ P. Hauptmann, *Sensoren – Prinzipien und Anwendungen*. 1. Auflage, Hanser Verlag, München Wien, 101-131, 1990.
- ⁸ F. Oehme, *Chemische Sensoren heute und morgen*. 1. Auflage, Expert Verlag, Renningen - Mannheim, 1994.
- ⁹ F.L. Dickert, W. Greibl, A. Rohrer, G. Voigt, *Advanced Materials*, 13, 1327-1330, 2001.
- ¹⁰ S. Matsuura, *Sensors Actuators B*, 13-14, 7-11, 1993.
- ¹¹ E.M. Logothetis, *Automotive Oxygen Sensors*, *Chemical Sensor Technology*, Vol. 3 (Hrsg. N. Yamazoe), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 89-104, 1991.
- ¹² M. Nanfo, G. Guilbault, *Analytical Chemistry*, 46, 1769, 1974.
- ¹³ K. Camman, *Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden*, Springer Verlag, 1997.
- ¹⁴ F.L. Dickert, H. Besenböck, M. Tortschanoff, Molecular Imprinting through van der Waals Interactions: Fluorescence Detection of PAHs in Water, *Adv. Mater.*, 10, 149, 1998.

-
- ¹⁵ F.L. Dickert, P. Achatz, K. Halikias, Double Molecular Imprinting – a New Sensor Concept to Improve Selectivity in Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Water, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371, 11, 2001.
- ¹⁶ F.L. Dickert, M. Tortschanoff, W.E. Bulst, G. Fleischerauer, Molecular Imprinted Sensor Layers for the Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon in Water, *Anal. Chem.* 71, 4559, 1999.
- ¹⁷ F.L. Dickert, W. Greibl, P.A. Lieberzeit, A. Rohrer, P. Forth, G. Voigt, Quality Assessment with Molecularly Imprinted Microsensors – Degradation Processes in Automotive Oils, *SPIE, Chemical Microsensors and Applications II*, 3857, 14-22, 1999.
- ¹⁸ F.L. Dickert, W. Greibl, A. Rohrer, G. Voigt, Sol-Gel Coated QCMs for Monitoring Automotive Oil Degradation, *Adv. Mater.*, 13, 1327, 2001.
- ¹⁹ F.L. Dickert, P. Forth, P.A. Lieberzeit, G. Voigt, Quality Control of Automotive Engine Oils with Mass-Sensitive Chemical Sensors – QCMs and Molecularly Imprinted Polymers, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366, 802, 2000.
- ²⁰ A. Seifner, P.A. Lieberzeit, C. Jungbauer, F.L. Dickert, Synthetic Receptors for Selectively Detecting Erythrocyte ABO Subgroups, *Analytica Chimica Acta* 651, 215-219, 2009.
- ²¹ F.L. Dickert, O. Hayden, P.A. Lieberzeit, C. Haderspoeck, R. Bindeus, C. Palfinger, B. Wirl, Nano- and Micro-Structuring of Sensor materials – from Molecule to Cell Detection, *Synthetic Metals*, Volume 138, Issues 1-2, 65-69, 2003.
- ²² F.L. Dickert, O. Hayden, Molecular Imprinting in Chemical Sensing, *TRACS*, 18, 192, 1999.
- ²³ F.L. Dickert, O. Hayden, K. Halikias, Synthetic Receptors as Sensor Coatings for Molecules and Living Cells, *Analyst*, 126, 766, 2001.
- ²⁴ O. Hayden, F.L. Dickert, Selective Microorganism Detection with Cell Surface Imprinted Polymers, *Adv. Mater.* 13, 1480, 2001.
- ²⁵ P.A. Lieberzeit, A. Afzal, D. Podlipna, S. Krassnig, H. Blumenstock, F.L. Dickert, Printing Materials in Micro- and Nano-Scale: Systems for Process Control, Sensors and Actuators, *B, Chemical* 126 (1), 153-158, 2007.

-
- ²⁶ K. Seidler, M. Polreichova, P.A. Lieberzeit, F.L. Dickert, Biomimetic Yeast Cell Typing—Application of QCMs, *Sensors* 9, 8146-8157, 2009.
- ²⁷ W. Kleber, Einführung in die Kristallographie, 17. Auflage, Verlag Technik, Berlin, 178-188, 1990.
- ²⁸ W. Briese, Schwingquarze, ein unverzichtbares Bauelement in der Elektronik, Vistas Verlag, Berlin, 5-108, 1985.
- ²⁹ G. Sauerbrey, *Z. Phys.*, 155, 206, 1959.
- ³⁰ P. Hauptmann, Sensoren: Prinzipien und Anwendungen, Carl Hanser Verlag München Wien, 101-169, 1990.
- ³¹ K.K. Kanazawa, J. G. Gordon, The Oscillation Frequency of a Quartz Resonator in Contact with Liquid, *Anal. Chim. Acta*, Volume 175, 99-105, 1985.
- ³² W. Göpel, K. D. Schierbaum, *Sensors – a Comprehensive Survey*, Volume 2, W. Göpel, J. Hesse, J. N. Zemel, VCH Verlag, Weinheim, 18-27, 1991.
- ³³ G. Wulff, A. Sarhan, *Angew. Chem.*, 84, 364-381, 1972.
- ³⁴ K. Mosbach, *Trends Biochem. Sci.*, 19, 9, 1994
- ³⁵ F.L. Dickert, A. Haunschild, M. Reife, W. Bulst, Sensors for Organic Solvent Detection in the ppm Range Based on Diowo[6.1.6.1]paracyclophanes – from Molecular Modeling to Analyte Recognition, *Adv. Mater.* 5(4), 277-279, 1993.
- ³⁶ F.L. Dickert, A. Bauer, The Detection of Halogenated Hydrocarbons via Host-Guest Chemistry – a Mass Sensitive Sensor Study with QMB and SAW Devices, *Adv. Mater.* 3(9), 436-438, 1991.
- ³⁷ F.L. Dickert, P. Schuster, Supramolecular Detection of Solvent Vapour with Calixarenes: Mass-Sensitive Sensors, Molecular Mechanics and BET Studies, *Microchim. Acta*, 119(1-2), 55-62, 1993.
- ³⁸ F.L. Dickert, O. Hayden, Bioimprinting of Polymers and Sol-Gel Phases. Selective Detection of Yeast with Imprinted Polymers, *Analytical Chemistry*, 74, 1302-1306, 2002.

-
- ³⁹ F.L. Dickert, O. Hayden, Nano- and Micro-Structuring of Sensor Materials – from Molecul to Cell Detection, Synthetic Metals 138, 65-69, 2003.
- ⁴⁰ E. Oesterschulze, The Potential of the Scanning Probe Microscopy For Thin Film Charakterization, Surface and Coatings Technology, Volume 97, Issues 1-3, 694-706, 1997.
- ⁴¹ G. Binning and H. Rohrer, Scanning Tunnelling Microscopy, Surface Science, Volume 126, Issues 1-3, 236-244, 1983.
- ⁴² H. Stroppe, Physik für Studenten der Natur- und Ingenieurwissenschaften, 13. Auflage, FV Leipzig, 467, 2005.
- ⁴³ O. Hayden, R. Bindeus and F.L. Dickert, Combining Atomic Force Microscope and Quartz Crystal Microbalance Studies for Cell Detection, Meas. Sci. Technol. 14, 1876-1881, 2003.
- ⁴⁴ N. K. Myshkin, A. Ya. Grigoriev, S. A. Chizhik, K. Y. Choi and M. I. Petrokovets, Surface Roughness and Texture Analysis in Microscale, Wear, Volume 254, Issue 10, 1001-1009, 2003.
- ⁴⁵ F. L. Dickert, K. Halikias, Sensors Based on Fingerprints of Neutral and Ionic Analytes in Polymeric Materials, Sensors and Actuators B, 3768, 1-4, 2001.
- ⁴⁶ H. – G. Elias, Makromoleküle, Band 2, 5. Auflage, Hüthig&Wepf Verlag Basel. Heidelberg. New York, 1992.
- ⁴⁷ Dipl.-Ing. Hans Domininghaus, Die Kunststoffe und ihre Eigenschaften, 3. Auflage, VDI Verlag, Düsseldorf, 1998.
- ⁴⁸ www.swiss-composite.ch
- ⁴⁹ www.marienfeld-superior.com/2007/information-zaehlkammer
- ⁵⁰ H. Weber, Allgemeine Mykologie, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, 1993.
- ⁵¹ V. Farkas, Polysaccharide Metabolism, in: A. H. Rose, J. S. Harrison, The Yeasts, New York, Academic Press, 37-366, 1989.
- ⁵² M.T. Madigan, J.M. Martinko, Brock Mikrobiologie, 11. Auflage, Pearson Studium, 2006.
- ⁵³ I. Horcas et al. Rev. Sci. Instrum. 78, 013705, 2007.

-
- ⁵⁴ D. Sagan, L. Margulis, Garden of Microbial Delights, A Practical Guide to the Subvisible World. Kendall/ Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa, 1993.
- ⁵⁵ G. Fuchs, Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 126-139, 2007.
- ⁵⁶ G. Fuchs, Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 126-139, 2007.
- ⁵⁷ F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, M. Schaechter, Physiology of the Bacterial Cell: a Molecular Approach, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1990.
- ⁵⁸ Pschyrembel – Klinisches Wörterbuch, 261. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin-New York, 568, 2007.

Curriculum Vitae

Personal information

First name and Surname	Miroslava Polreichová
Residence	1060 Vienna, Austria
Nationality	Czech
Date of birth	19.08.1979

Education and training

Dates	05/2008 – 03/2009
-------	-------------------

Specializations	PhD dissertation with title „Modellierung von Bioanalyten durch Polymere und deren Verwendung zur Strukturierung von Oberflächen – Anwendung von Zellen-Replicae in der Chemosensorik“ Prof. Mag. Dr. F.L. Dickert Lehrstuhl für Chemosensoren und optische Molekülspektrometrie
-----------------	---

Name and type of organisation providing education and training	Universität Wien /University of Vienna Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie Vienna, Austria
--	---

Dates	10/2000 – 04/2008
-------	-------------------

Specializations	Master thesis with title „Nachweis von Escherichia Coli Bakterien mit Sensoren – Modelluntersuchungen zu biologischen Bedrohungspotentialen“ Prof. Mag. Dr. F.L. Dickert Lehrstuhl für Chemosensoren und optische Molekülspektrometrie
-----------------	--

Name and type of organisation providing education and training	Universität Wien /University of Vienna Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie Vienna, Austria
Dates	03/2002 – 03/2007
Specializations	BWL /Management
Name and type of organisation providing education and training	Wirtschaftsuniversität Wien /Vienna University of Economics and Business Administration Vienna, Austria
Dates	10/1997 - 10/1998
Specializations	German language and literature studies
Name and type of organisation providing education and training	Jihoceska univerzita /University of South Bohemia Česke Budejovice, Czech republic
Dates	09/1993 – 06/1997
Name and type of organisation providing education and training	Biskupské gymnázium /High School in Žďár n. Sázavou, Czech Republic