

# Faserbasierter Biosensor

Dokumentation einer hilfswissenschaftlichen Tätigkeit von April 2008 bis April 2009  
in der QUANTUM Gruppe von Prof. A. Rauschenbeutel, Joh. Gutenberg Univ. Mainz  
Betreuerin Dr. R. Garcia Fernandes

Raoul Malm\*

6. Oktober 2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Thema</b>	<b>1</b>
<b>2 Grundprinzip des Sensors</b>	<b>1</b>
<b>3 Versuchsaufbau</b>	<b>2</b>
3.1 Faser - Eckdaten . . . . .	3
3.2 Nutblöcke . . . . .	3
3.3 Lichtquelle und Detektoren . . . . .	3
3.4 Chemikalien . . . . .	4
<b>4 Faser - Grundlegendes Verhalten an Luft / in Flüssigkeit</b>	<b>4</b>
<b>5 Erster Ansatz - Reaktive Beschichtung</b>	<b>10</b>
<b>6 Zweiter Ansatz - Biotin-Silan Verbindung</b>	<b>12</b>
<b>7 Fazit</b>	<b>13</b>

## 1 Thema

Es soll zunächst untersucht werden wie sich die Lichttransmission durch eine ultradünne Glasfaser ( $\varnothing$  500 nm) ändert, wenn sich an ihrer Oberfläche Moleküle anlagern. Gelänge es gezielt nur bestimmte Moleküle an die Oberfläche zu binden, so könnte man aus einem Gemisch von Molekülen (in einer wässrigen Lösung) einen speziellen Typ nachweisen und seine Bindung an die Faser in Echtzeit verfolgen und damit bspw. auf dessen Konzentration und Bindungskinetik schließen. Dieser Typ eines Biosensors nutzt die Absorption/Streuung des evaneszenten Strahlungsfeldes durch Oberflächenmoleküle und gehört zur Gruppe der "absorption TFOBS" (TFOBS = Tapered Fiber Optic BioSensor, [1] und [2] bieten eine gute Übersicht über die faserbasierten Biosensoren). Die Vorteile eines solchen Sensors liegen in der hohen Sensitivität der Faser für Molekülanlagerungen an der Fasertaille, wie in [3] nachgelesen werden kann.

## 2 Grundprinzip des Sensors

An den Siliziumkern der Faser werden chemisch sogenannte "Fängermoleküle" immobilisiert. Diese bedecken im Idealfall die komplette Oberfläche der verjüngten Faserstelle und bleiben an dieser langfristig haften. Nun können direkt Moleküle eines speziellen Analyts aus einem Gemisch mehrerer verschiedener Analyte an die Faser gebunden werden, sofern diese zum Fängermolekül passen. Der Nachteil ist, dass zum Nachweis eines Analyts immer ein dazu passendes Fängermolekül immobilisiert werden muss. Dies kann man umgehen, indem man eine

---

\*rmalm@students.uni-mainz.de

Streptavidin - Biotin Kombination verwendet. Hierzu nimmt das Streptavidin die Rolle des Fänger-moleküls ein und wird auf der Oberfläche immobilisiert. Der Vorteil besteht darin, dass man einige Analyte biotinieren kann, d.h. man bringt an den nachzuweisenden Molekülen jeweils ein Biotinmolekül an. Da Biotin und Streptavidin eine hohe gegenseitige Affinität aufweisen (allgemeine Eigenschaften können in [4] nachgelesen werden) wird das biotinierte Analyt-Molekül über die Biotin-Streptavidin Bindung an die Oberfläche der Faser gebunden.

Die grundlegenden Schritte sind

1. Aufbereiten der Faseroberfläche, z.b. Reinigen, Präparation für Schritt 2
2. Immobilisierung mit Fänger-molekülen
3. Zugabe der nachzuweisenden Moleküle und Beobachtung des Transmissionsverhaltens der Faser
4. Reinigung/Regeneration der Faser um einen erneuten Lauf durchführen zu können

In dieser Arbeit sind zwei verschiedene Ansätze ausprobiert worden, deren Einzelheiten in den Abschnitten 5 und 6 erläutert werden.

### 3 Versuchsaufbau

Die gezogene Faser wird auf einem 7 cm langen Aluminium-Träger befestigt, der an einem beweglichen Metallarm eingeklemmt werden kann. Der Metallarm besteht hauptsächlich aus einem Spiegelkipper und einer drehbaren Bratze, die mit einem System von zwei Verschiebetischen verbunden ist. Damit kann die Faser in einer horizontalen und einer vertikalen Richtung verschoben werden, um sie in eine Nut navigieren zu können. Die Nut ist Teil eines quaderförmigen Blockes, der in seiner letzten Version aus Edelstahl gefertigt worden ist. Dieser Block ist über eine Halterung mit einer Aluminiumplatte, die auch die zwei Verschiebetische trägt, verbunden. Dies macht den Aufbau transportabel, siehe Abb. 1 und 2. Experimente sind teilweise unter Flow-Boxen zur Staubminimierung, in einem Abzug aufgrund chemisch flüchtiger Stoffe und in einer Kombination aus Beidem durchgeführt worden. Die für den Aufbau benötigten 6 Bauteile sowie die Nutblöcke sind mit dem Programm "Autodesk Inventor" am Rechner entworfen und dann in der institutsansässigen Werkstatt angefertigt worden.

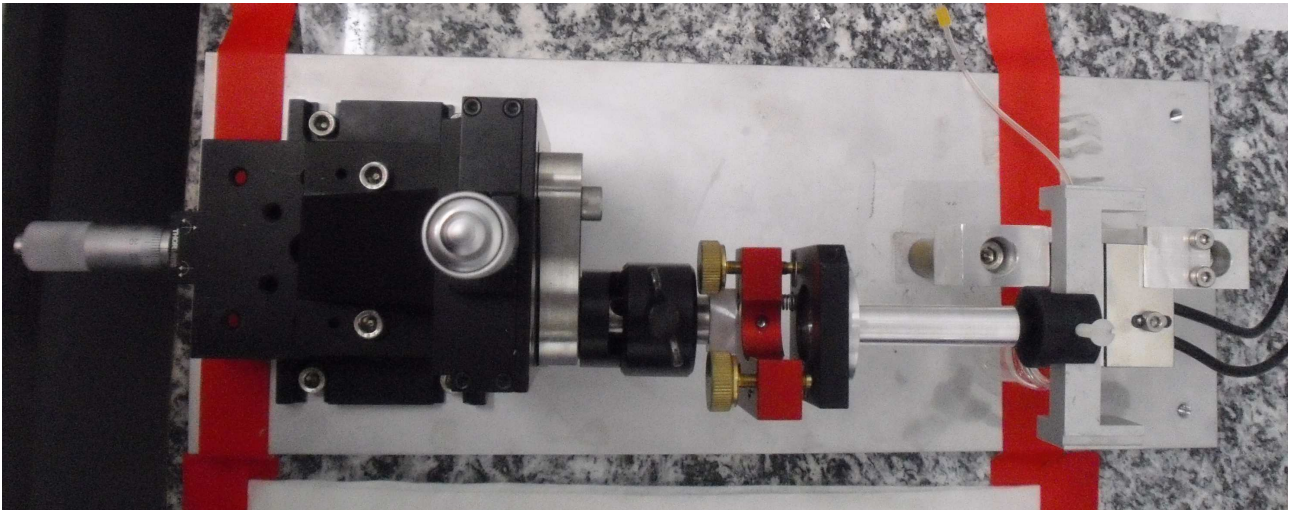


Abbildung 1: Aufbau - von oben: Zu sehen sind die beiden Verschiebetische in horizontaler und vertikaler Richtung, der Metallarm bestehend aus Spiegelkipper, Verlängerungen und Trägerhalter und der eingespannte Träger, der über dem Nutblock positioniert ist.

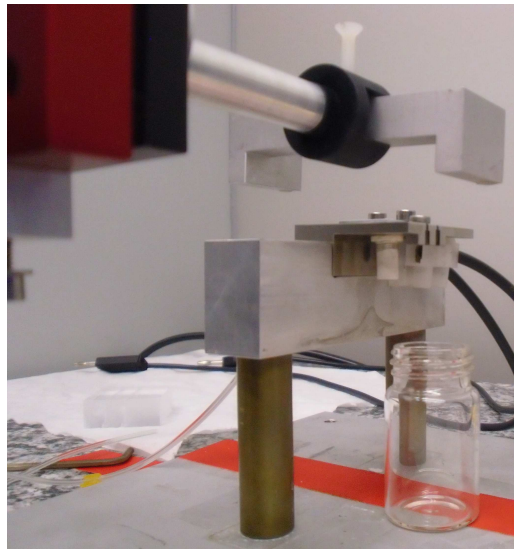


Abbildung 2: Aufbau - vorderer Teil: Nicht im Bild zu sehen ist eine Faser, die längs des Trägers eingespannt wird. Mit dem Metallarm lässt sie sich in die Nut des Edelstahlblockes navigieren. Eine Flüssigkeit kann per Nadel in die Nut eingeleitet werden (hinter dem Block, im Bild nicht zu sehen) und dann vorne mit einem Glasbehälter wieder aufgefangen werden. Unter dem Edelstahlblock ist eine Heizvorrichtung angebracht.

### 3.1 Faser - Eckdaten

Die verwendeten Glasfasern stammen von der Firma "Newport", Modell "F-SF". Sie sind vom Typ "Single Mode" mit einer Cut-Off Wellenlänge von 730 nm. Sie bestehen aus einem Kern, einem Mantel und außen aus einer Acrylbeschichtung. Diese wird an der zu verjüngenden Stelle entfernt, bevor die Faser auf den entsprechenden Durchmesser gezogen wird (Details zur Faserziehung kann man in [5] nachlesen). Folgende Fasertypen sind in dieser Arbeit zur Anwendung gekommen:

- **Typ A:**  $\varnothing$  500 nm, 5 mm Länge
- **Typ B:**  $\varnothing$  1  $\mu$ m, 5 mm Länge, MatLab-Trajektorie: 5\_62.5\_44\_9\_0.5\_2\_2\_1
- **Typ C:**  $\varnothing$  2  $\mu$ m, 5 mm Länge, MatLab-Trajektorie: 5\_62.5\_44\_9\_1\_3\_3\_3

### 3.2 Nutblöcke

Ziel ist es, dass eine Flüssigkeit mit regelbarer Geschwindigkeit und gleichförmigen Fluss die Faser entlangfließt. Da das Flussvolumen möglichst klein sein soll ist die Nut einen Millimeter breit und zwei Millimeter tief. Durch Injektionsnadeln kann die Flüssigkeit in die Nut eingeleitet werden und am Ende wieder in einem Glasbehälter aufgefangen werden. Damit lässt sich ein geschlossener Kreislauf erreichen. Die getesteten Nutblöcke aus Plexiglas, Teflon und Edelstahl sind in Abb. 3 dargestellt. Das Material Plexiglas eignet sich für den Fluss, ist allerdings chemisch sehr anfällig gegenüber Aceton und Salpetersäure. Umgekehrt verhält es sich bei Teflon, das hohe chemische Resistenz aufweist, aber hydrophober Natur ist. Dies erschwert es wässrige Lösungen durch die Nut zu leiten. Als praktikabel erweist sich Edelstahl. Dieser Block ist zudem so konstruiert worden, dass man die Flüssigkeit heizen kann (siehe Abb. 4). Der Heizdraht besteht aus Platin und ist um einen Bornitrid-Schmelztiegel in Zylinderform gewickelt, der auf dem Edelstahl aufsitzt. Hiermit können Temperaturen bis zu 80 °C innerhalb der Nut erreicht werden. Alle Blöcke weisen zwei identische parallele Nüte auf, um die Möglichkeit für zeitgleiche Referenzmessungen zu bieten.

### 3.3 Lichtquelle und Detektoren

Als Lichtquelle ist eine rote 5 mW Laserdiode der Wellenlänge (781  $\pm$  6) nm und eine Weisslichtquelle (Ando: AQ-43038, (400–1800) nm) verwendet worden. Als optische Spektrometer sind zwei Modelle der Firma Avantes mit Wellenlängenbereichen von (280–1400) nm und (100–800) nm sowie ein Gerät der Firma Ando eingesetzt

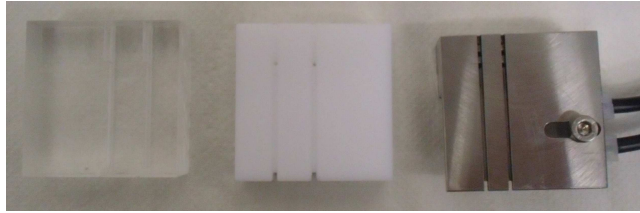


Abbildung 3: Nutblöcke von links nach rechts aus Plexiglas, Teflon und Edelstahl: Plexiglas hat den Nachteil, dass es chemisch angreifbar ist und Teflon dass es hydrophob ist und damit ungeeignet um einen Fluss hindurchzuleiten. Ein Block aus Edelstahl vermeidet diese Probleme.

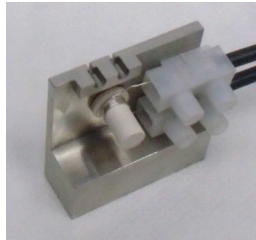


Abbildung 4: Nutblock aus Edelstahl - Unterseite: Dieser Block bietet zwei identische Nüte, die zeitgleiche Referenzmessungen ermöglichen. Unterhalb der Nüte ist ein von Platindraht umwickelter Bornitrid-Zylinder angebracht, der geheizt werden kann.

worden. Alle in diesem Bericht gezeigten Messungen sind mit der Weisslichtquelle und dem AvaSpec-2048 Spektrometer durchgeführt worden.

### 3.4 Chemikalien

Wenn von Wasser in diesem Text die Rede ist, wird von dessen destillierter Form ausgegangen. Chemische Substanzen wie Salpetersäure und Aceton sind z.T. nochmals durch einen 200 nm Spritzenfilter gedrückt worden, um mögliche Staubpartikel der Größe  $\sim 1 \mu\text{m}$  zu entfernen. Weitere verwendete spezifische Substanzen werden in den Abschnitten 5 und 6 über die Ansätze erläutert.

## 4 Faser - Grundlegendes Verhalten an Luft / in Flüssigkeit

Nach dem Ziehvorgang einer Faser wird an ihren beiden Enden jeweils ein FC-Stecker angebracht, um sie mit Geräten verbinden zu können. Die Einkopplung, d.h. der Anschluss einer Lichtquelle und eines Detektors, ist solange optimiert worden bis die maximal mögliche Signalamplitude am Dekektor angezeigt wird. Einige Spektren an Luft von Fasern mit Typ A Trajektorie (siehe Abschn. 3.1) sind in Abb. 5 oben zu sehen. Dass sie sich z.T. um einen Faktor 4 in ihrer Amplitude unterscheiden hängt mit Staubanlagerungen zusammen. Dies stellt aber kein Problem dar, Abbildung 5 soll zunächst mit den Spektren vertraut machen. Im unteren Grafen sind vier Spektren an Luft von Fasern des Typs B und C dargestellt. Deren Amplituden liegen insgesamt unterhalb Denjenigen vom Typ A, dafür sind diese Fasern jedoch zuvor in einer einfachen Box transportiert worden und waren mechanischen Belastungen sowie Verunreinigungen innerhalb der Box ausgesetzt. An Luft ist die Transmission einer gezogenen Faser, die sich im Einzugsbereich einer Flow-Box befindet generell über mehrere Tage für die benötigten Zwecke ausreichend stabil.

Im nächsten Schritt wird die Nut wahlweise mit destilliertem Wasser, Aceton oder Salpetersäure befüllt. Per Metallarm wird nun eine gezogene Faser von oben herabgefahren, sodass sie sich einige Millimeter oberhalb der Nut befindet. In allen drei Fällen ist ein stetiger Abfall der Transmission in allen Wellenlängen zu beobachten, beispielhaft ist in Abb. 6 ein Ausschnitt des Transmissionsrückganges der Faser über dest. Wasser gezeigt. Wird die Faser wieder entfernt, erholt sich die Transmission nach längerer Wartezeit wieder in stetiger Weise. Der zeitliche Verlauf der über alle Wellenlängen gemittelten Transmission ist für die drei Flüssigkeiten in Abb. 7 zu sehen.

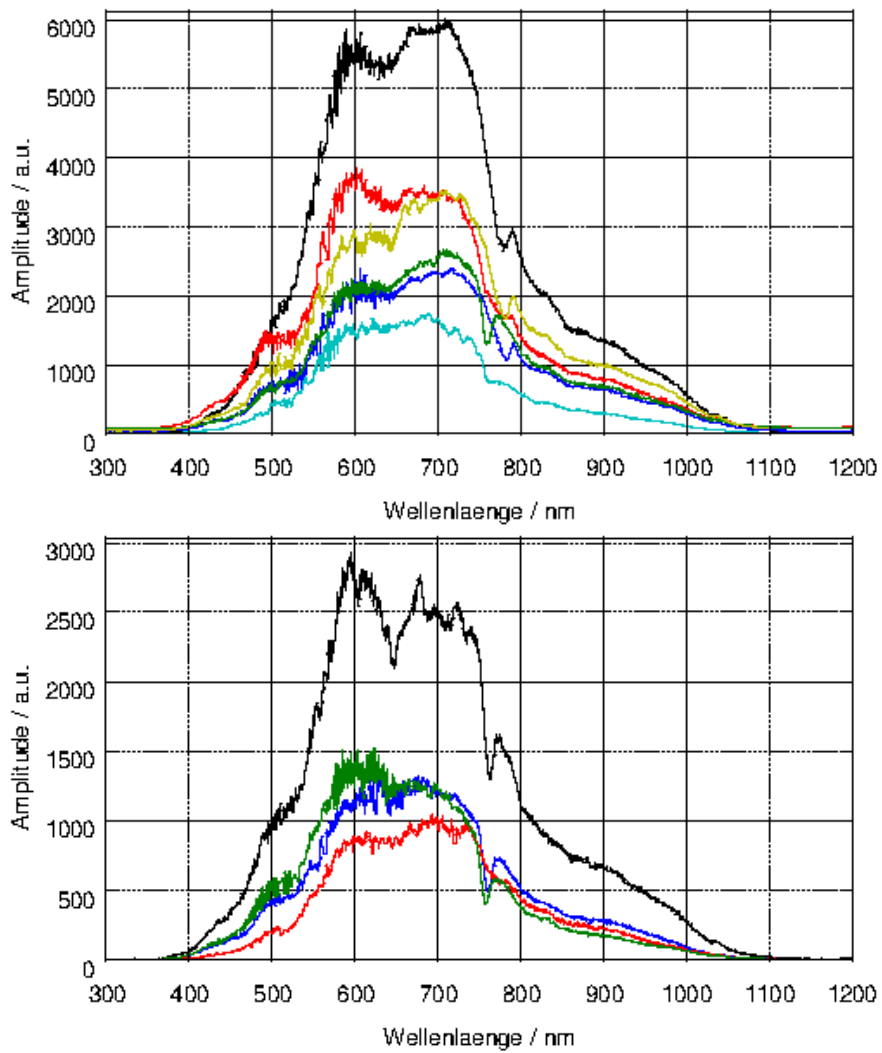


Abbildung 5: **oben:** Spektren an Luft von verschiedenen Fasern mit Typ A Trajektorie. **unten:** Spektren an Luft von verschiedenen Fasern mit Typ B (schwarz, rot, grün) und Typ C (blau) Trajektorie.

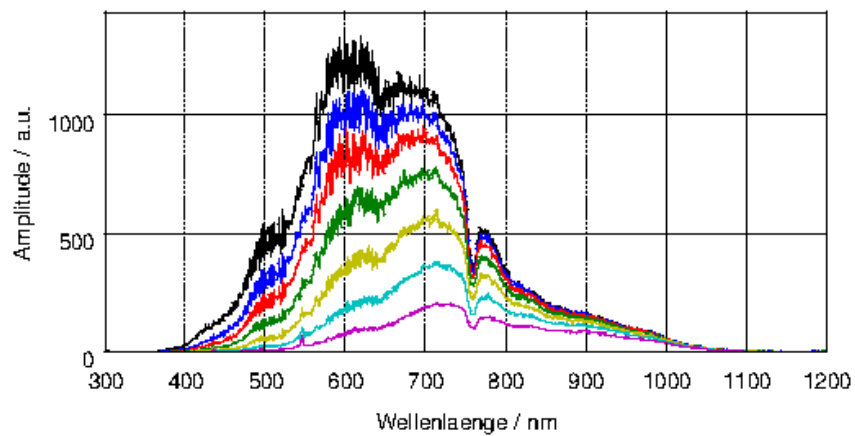


Abbildung 6: Stetiger Transmissionsrückgang in allen Wellenlängen für eine gezogene Faser, die sich nur einige Millimeter über dest. Wasser befindet. Anfängliches Spektrum ist in schwarz und Letztes in Magenta dargestellt. Mit jeder der drei Molekülsorten tritt eine wellenlängenunabhängige Transmissionsänderung auf, d.h. hierfür ist die Streuung an den Oberflächenmolekülen verantwortlich.

ansässig

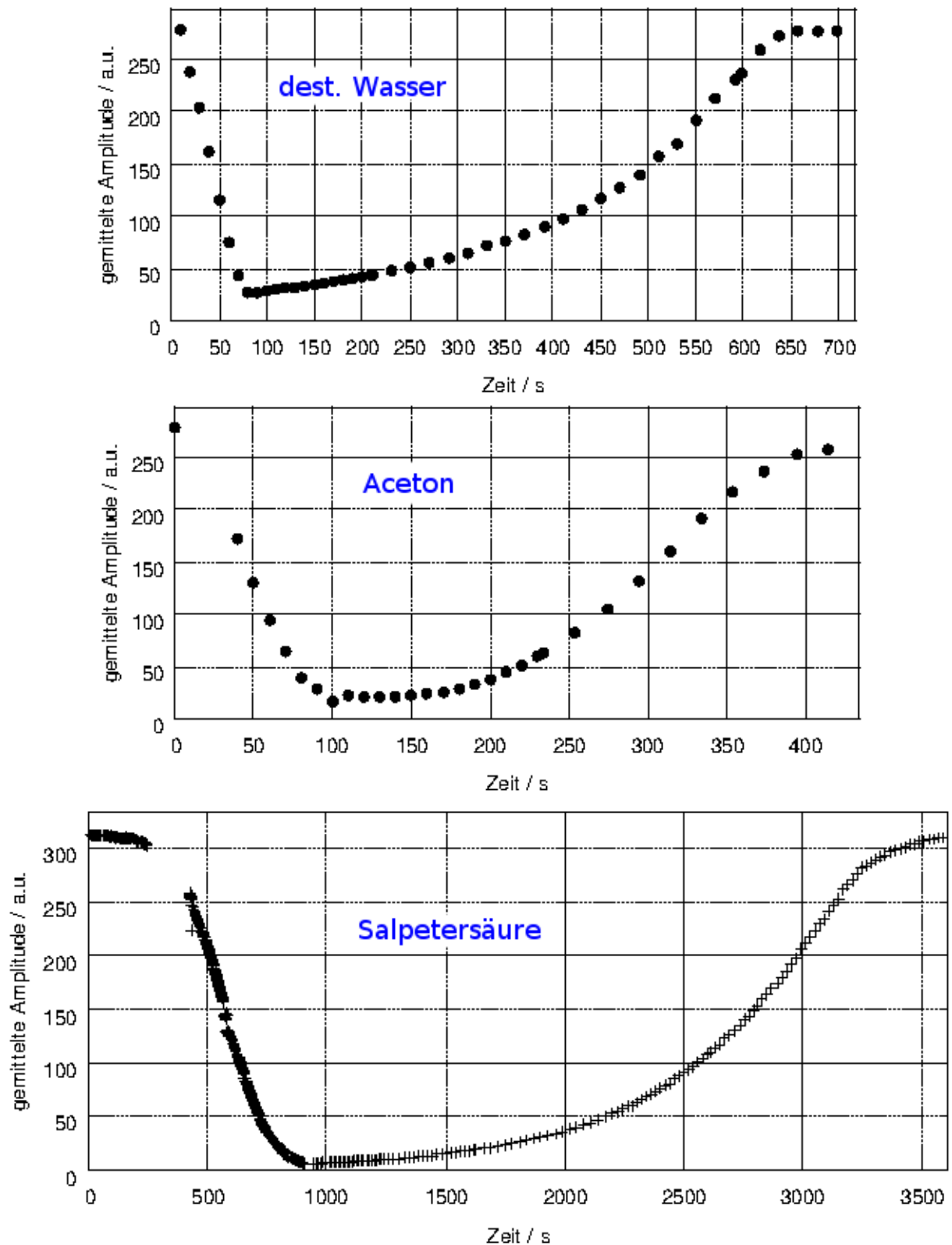


Abbildung 7: Gemessene zeitliche Verläufe der über alle Wellenlängen gemittelten Transmissionen bei Ad- und Desorption von dest. Wasser (oben), Aceton (Mitte) und Salpetersäure (unten). Der Kurvenverlauf ist in allen drei Fällen ähnlich, lässt sich jedoch nicht mit einem einfachen Ad- und Desorptionsmodell nach I. Langmuir erklären. Vermutlich können mehrere Moleküle an einer Elementarzelle der Faser Oberfläche adsorbiert werden. Dass nach der Desorption die Transmission wieder ihren anfänglichen Wert erreicht, deutet darauf hin, dass sich die Moleküle nicht chemisch an die Glasstruktur binden. Man spricht dann von Physisorption.

Strukturell sind sich die Verläufe ähnlich. Unterschiede sind in den Zeitdauern des Abfalls und Anstiegs vorhanden. Der zeitliche Verlauf des Transmissionsabfalls steht in Bezug zu der Adsorptionsrate an der Oberfläche der Faser, und diese wiederum hängt vom Abstand zwischen Faser und Flüssigkeit ab. Da dieser Abstand nicht exakt gleich in allen drei Fällen gewesen ist, kann hier keine Aussage bezüglich des Adsorptionsverhaltens der Wasser-, Aceton- oder Salpetersäuremoleküle gemacht werden. Jedoch lässt sich solche Information eventuell an dem ansteigendem Verlauf der Transmission, verursacht durch die Desorption der Moleküle ablesen. Acetonmoleküle scheinen sich am Schnellsten wieder von der Faseroberfläche zu lösen. Jedoch sind dies nur Vermutungen, da sich die drei Fasern nur bedingt miteinander vergleichen lassen. Im Fall von dest. Wasser und Aceton ist jeweils eine eigene  $1 \mu\text{m}$  (Typ B), im Fall von Salpetersäure eine  $2 \mu\text{m}$  (Typ C) dicke Faser verwendet worden. Auch geht die Transmission in allen drei Verläufen nicht zeitweise auf Null zurück, weil die Faser absichtlich früher von der Flüssigkeit wieder entfernt worden ist. Andernfalls wären die Desorptionszeiten länger gewesen.

Die Kurvenform der Verläufe sollen nun mit der Vorhersage eines Modells der einfachen Ad- bzw. Desorption verglichen werden. Ein Solches geht auf I. Langmuir zurück [6]. Angenommen wird eine planare Oberfläche, überdeckt mit Elementarzellen, die jeweils nur ein adsorbiertes Molekül halten können. Da die Transmission durch die Faser interessiert, werden in Analogie zu [6] die Lösungen für den Anteil der unbesetzten Zellen  $\Theta(t)$  an der Gesamtzahl der Zellen  $\Theta_1$  betrachtet:

$$\text{Adsorption : } \Theta(t) = \Theta_1 \left( 1 + \frac{\Theta_0 - \Theta_1}{\Theta_1} \exp(-k_{ads}t) \right)$$

$$\text{Desorption : } \Theta(t) = \Theta_0 \left( 1 - \frac{\Theta_0 - \Theta_1}{\Theta_0} \exp(-k_{des}t) \right)$$

mit  $\Theta(t)$  : Bruchteil der unbesetzten Zellen zum Zeitpunkt  $t$

$\Theta_0$  : Bruchteil der unbesetzten Zellen zu Beginn (bei  $t=0$ ), hier auf  $\Theta_0 = 1$  gesetzt

$\Theta_1$  : Bruchteil der unbesetzten Zellen im Gleichgewicht, d.h. nach maximaler Adsorption

$k_{ads}$  : feste Adsorptionsrate echt größer Null

$k_{des}$  : feste Desorptionsrate echt größer Null

Die Raten der Adsorption und Desorption lassen sich ebenfalls aus dem Modell errechnen, relevant ist jedoch nur, dass sie sich antiproportional zur Flächendichte der Elementarzellen verhalten. Wählt man  $\Theta_0 = 1$ ,  $\Theta_1 \approx 0$ ,  $k_{ads} = k_{des} = 0.01 \text{ s}^{-1}$  so ergibt sich der Verlauf in Abb. 8.

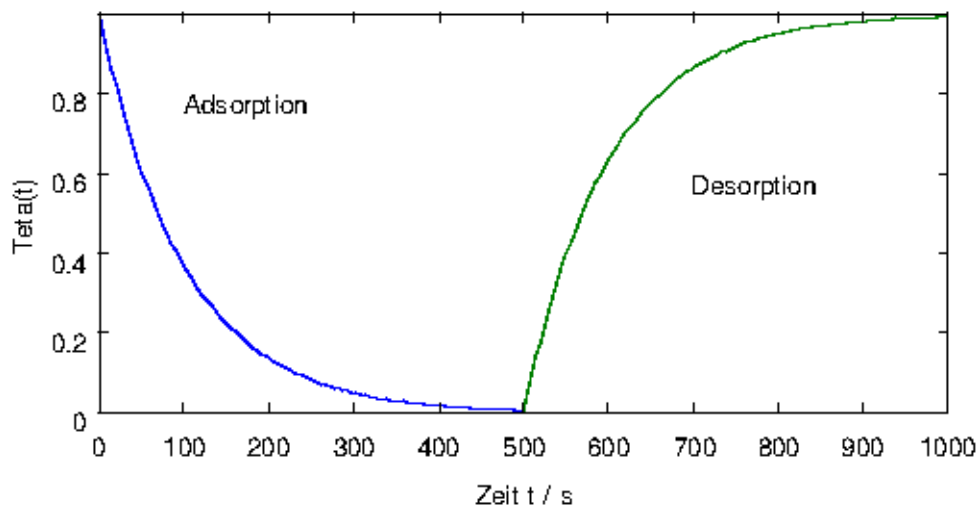


Abbildung 8: Ad- und Desorptionsverlauf nach dem Langmuir-Modell im einfachen Fall für die Parameter  $\Theta_0 = 1$ ,  $\Theta_1 \approx 0$ ,  $k_{ads} = k_{des} = 0.01 \text{ s}^{-1}$ . Zu Beginn sind alle Elementarzellen unbesetzt, d.h.  $\Theta(t = 0) = 1$ . Mit zunehmender Moleküladsorption verringert sich die Geschwindigkeit mit der der Adsorptionsprozess abläuft, da mit der Zeit immer weniger unbesetzte Zellen vorhanden sind. Dieser Prozess läuft asymptotisch auf  $\Theta_1$  zu ( $\Theta(t) \approx 0$  für  $t \rightarrow \infty$ ). Nun wird aber bei endlicher Zeit ( $t = 500 \text{ s}$ ) der Desorptionsprozess gestartet. Die positive Änderungsrate von  $\Theta(t)$  ist proportional zu der Anzahl der besetzten Zellen, d.h. sie verkleinert sich stetig bis im Grenzfall  $t \rightarrow \infty$  wieder der anfängliche Wert  $\Theta(t = 0)$  erreicht wird.

Da  $\Theta(t)$  proportional zur Lichttransmission durch die Faser angenommen wird, kann man die gemessenen Verläufe (Abb. 7) mit dem Modell (Abb. 8) vergleichen. Der erste Unterschied ist am Anfang der Adsorptionsphase zu sehen. Im Modell fällt die Kurve direkt exponentiell ab, dies ist bspw. für den gemessenen Verlauf der Salpetersäure (Abb. 7 unten) nicht zu erkennen. Erst nach dem Wendepunkt (bei ca.  $t = 600$  s für Salpetersäure) lenkt die gemessene Kurve in den vom Modell vorhergesagte exponentielle Abfall, der asymptotisch auf die Zeitachse zuläuft, ein. Bei Entfernung der Faser vom Einzugsbereich der Flüssigkeit geschieht Ähnliches, zu Beginn der Desorptionsphase widerspricht die Messung dem Modell. Der Anstieg der Transmission verläuft langsamer aber dafür mit steigender Geschwindigkeit. Nach dem Wendepunkt (bei ca.  $t = 3000$  s für Salpetersäure) kann der modellhafte exp. Anstieg erkannt werden. Da sich insgesamt Vorhersagen und Messungen nicht vertragen, müssen die Annahmen des Modells untersucht werden. Zunächst hat die Faseroberfläche keine planare Geometrie, die Faser vom Typ C hat einen Umfang von  $3142$  nm. Jedoch liegt die Größe der betrachteten Moleküle in der Größenskala eines Nanometers, weswegen ein einzelnes Molekül approximativ eine ebene Fläche sehen sollte. Angenommen worden ist auch, dass es sich um den Typ Physisorption (physikalische Ad- und Desorption) handelt, d.h. zwischen der Glasoberfläche der Faser und den einzelnen Molekülen tritt keine chemische Bindung auf. Da alle Fasern wieder nach ausreichender Wartezeit ihren anfänglichen Transmissionsgrad erreicht haben, ist diese Annahme begründet. Desweiteren wird in dem Modell von Monolagen ausgegangen, d.h. eine Elementarzelle ist nur fähig ein einzelnes Molekül zu binden. Aufgrund der Diskrepanz zwischen Messung und Modell kann man den Schluss ziehen, dass in allen drei Fällen mehr als ein Molekül an eine Elementarzelle gebunden werden kann. Modelle, die diesen Fall behandeln sind komplexer und benötigen mehr Informationen zur Struktur der Glasoberfläche (siehe [6]). Interessant an den Messungen ist, dass die Änderung der Transmission in allen Fällen wellenlängenunabhängig abgelaufen ist. Spezifische Strahlungsabsorption durch adsorbierte Moleküle ist nicht gemessen worden, d.h. Streueffekte an Oberflächenmolekülen sind für die Transmissionsverluste verantwortlich.

Nun soll das Transmissionsverhalten einer Faser vom Typ B in einer Flüssigkeit untersucht werden. Problematisch hierbei sind Flüssigkeiten mit hoher Oberflächenspannung (dest. Wasser ist schon kritisch), da sie die Faser beim Eindringen abstoßen und sie dadurch mechanisch belastet wird. Liegt die Faser direkt auf der Oberfläche auf, wird das geführte Licht größtenteils herausgestreut. Taucht sie komplett in dest. Wasser ein ergibt sich ein Transmissionsverlust ohne die Form des Spektrums zu ändern, siehe Übergang von schwarz nach blau in Abb. 9. Bringt man die Faser anschließend wieder an Luft zeigt sich "willkürliches" Verhalten. Häufig bricht die Transmission zusammen wie in Abb. 9 als rotes Spektrum dargestellt, ohne dass eine Erholung des Signals mit der Zeit auftritt (unabhängig von der Flüssigkeit, gemessen wurde dies auch für Aceton und Salpetersäure). Adsorbierte Flüssigkeitsmoleküle müssten sich wie oben beschrieben mit der Zeit lösen, daher deutet dies auf Schmutzpartikel hin, die sich vermehrt an der Flüssigkeitsoberfläche befinden und sich an die Fasertaille angelagert haben. Beim Wiedereintauchen wird das ursprüngliche Signal erreicht, siehe grünes Spektrum in Abb. 9 für die Faser in Aceton. Mögliche Partikel, an denen das Licht zuvor gestreut hat, müssen sich gelöst haben. Nimmt man die Faser jetzt aus dem Aceton ist diesmal die Transmission erhalten geblieben. Aceton ist als Flüssigkeit einfacher zu verwenden als Wasser, da es geringere Oberflächenspannung besitzt, dies kann auch der Grund sein, weswegen diesmal die Fasertaille frei von Streupartikeln geblieben ist. Die Mehrzahl der durchgeführten Tests sind allerdings ohne Wiederkehr der Fasertransmission ausgefallen, obwohl alle verwendeten Flüssigkeiten so rein wie möglich gehalten worden sind. Dieselben Überlegungen gelten auch für Salpetersäure, siehe Abb. 10. In dieser Messung scheint der Wechsel zwischen Luft (schwarz, rot) und Salpetersäure (blau) als faserumgebendes Medium zunächst keinen Unterschied zu machen, um dann bei Wiederholung einen Transmissionsrückgang (grün) zu verzeichnen. Interessant ist hierbei, dass mit dem Eintauchen der Faser in Salpetersäure nicht unbedingt ein signifikanter Transmissionsrückgang einhergehen muss. Aber auch im Fall von Salpetersäure sind weitere Messungen durchgeführt worden, die keine wiederkehrende Transmission zeigten und bei denen sogar die Transmission auf Null zurückging. All dies sind Hinweise auf doch vorhandene Streupartikel in der Flüssigkeit und daher müssten die hier vorgestellten Messungen mit reinen Flüssigkeiten wiederholt werden, um stichhaltige Aussagen zu treffen.



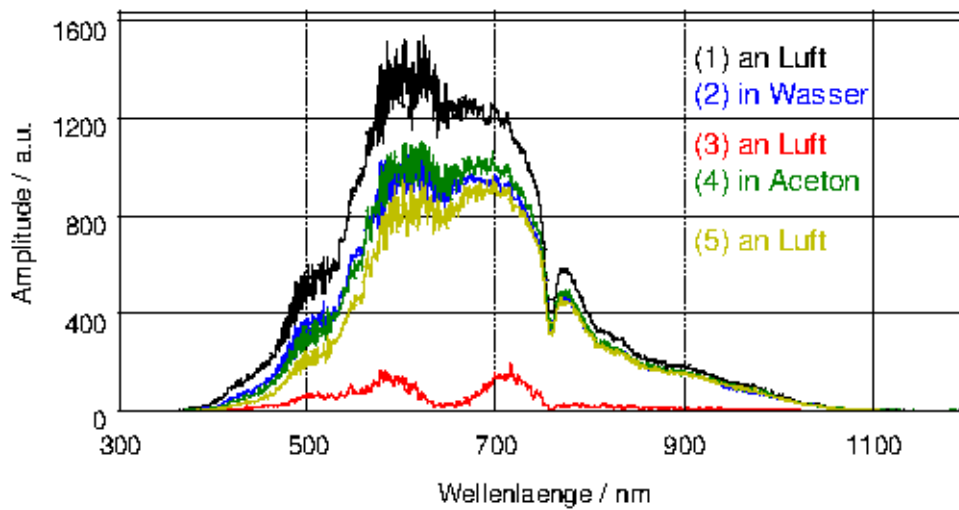


Abbildung 9: Eine Typ B Faser befindet sich abwechselnd an Luft und in Flüssigkeit. Die Transmission in Flüssigkeit (dest. Wasser oder Aceton) ist schwächer als zu Beginn an Luft (schwarz). Zwischendrin ist das Signal an Luft (rot) kaum mehr vorhanden. Möglicherweise sind Staubpartikel an der Fasertaille der Grund für diese Verluste.

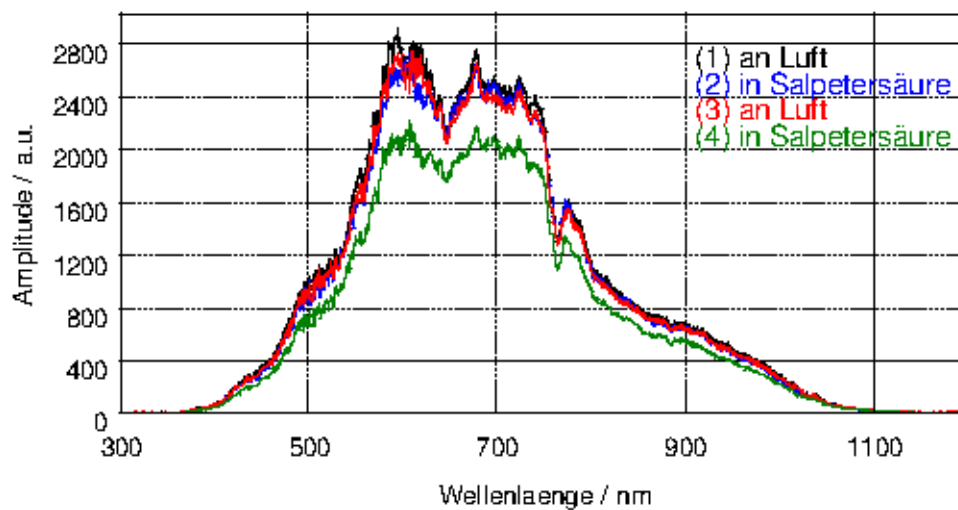


Abbildung 10: Eine Typ B Faser befindet sich abwechselnd an Luft und in Salpetersäure. Zunächst ist beim Wechsel kein signifikanter Transmissionsrückgang zu verzeichnen. Diese Schritte (1, 2, 3) sind dreimal wiederholt worden ohne Änderung des Spektrums. Bei der vierten Wiederholung ergibt sich das grüne Spektrum, das geringere Transmission aufweist. Diese Messung zeigt auch, dass ein Wechsel von Luft zu Flüssigkeit als faserumgebendes Medium auch ohne Transmissionsrückgang möglich ist.

## 5 Erster Ansatz - Reaktive Beschichtung

Hierbei wird das Polymer PMSSQ-PFPA (Polymethylsilsesquioxane-Polypentafluorphenylacrylat) auf die Faser aufgetragen. Dieses Polymer hat die Eigenschaft, dass es sehr stark haftend auf nahezu allen Oberflächen wirkt und eine reaktive Gruppe bietet. An dieser Gruppe kann anschließend Biotin angebunden werden, damit kann der Biotin-Streptavidin Komplex aus Abschnitt 2 genutzt werden. Erfolgreich durchgeführt worden sind diese Prozesse an planaren Glasoberflächen<sup>1</sup>. Überträgt man das Verfahren auf ultradünne Glasfasern ergeben sich folgende Schritte:

1. Tiefgefrorenes ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) PMSSQ-PFPA Polymer wird mit THF (Tetrahydrofuran) im Verhältnis  $1\text{ mg} : 1\text{ ml}$  vermischt und solange geschüttelt bis sich das feste Polymer aufgelöst hat.
2. Die Lösung kann nun auf die Fasertaille durch Betropfen aufgebracht werden.
3. Damit sich das Polymer mit dem Silizium verbindet wird die Fasertaille bei  $130^{\circ}\text{C}$  eine Stunde lang erhitzt.
4. Das feste Biotin wird mit Triethylamin in dest. Wasser gelöst und kann dann im gelösten Zustand mittels des Polymers an die Fasertaille binden.

Zunächst soll per Pumpsystem eine Flüssigkeit durch die Nut fließen können, um die Auswirkung eines konstanten Flusses auf die Fasertransmission zu ermitteln. Generell bietet ein Flusssystem den Vorteil, dass das Auswechseln zweier Flüssigkeiten reibungslos und schnell vollzogen werden kann. Hinzu kommen weitere mögliche Vorteile, z.B. die Minimierung des Massentransportes, eine lesenswerte Darstellung allgemeiner Anforderungen an einen Biosensor ist [7]. Die ersten Messungen sind mit einer geliehenen Spritzenpumpe (regelbar, max. Fließgeschwindigkeit:  $1\text{ ml}/\text{min}$ ), dest. Wasser als fließendes Medium und einer roten Laserdiode (siehe Abschnitt 3.3) durchgeführt worden. Die Faser reagiert auf die gleichförmige Bewegung des sie umspülenden Wassers (beliebige Geschwindigkeit) mit einem leichten Transmissionsverlust, wobei die Ausgangsamplitude nach Abschalten der Pumpe wieder erreicht wird. Während des Flusses treten keine Zitterbewegungen der Amplitude auf, vorausgesetzt das Wasser und eingesetzte Pumpsystem ist frei von Schmutzpartikeln. Die maximale Fließgeschwindigkeit von  $1\text{ ml}/\text{min}$  bedeutet bezüglich der Nutgeometrie eine Wassergeschwindigkeit von  $5\text{ m}/\text{min} \approx 8.3\text{ cm}/\text{s}$ , die von einer Typ A Faser zwar mechanisch ausgehalten wird aber zum Arbeitseinsatz zu hoch ist. Brauchbare Werte liegen um die  $0.7\text{ cm}/\text{s} \approx 0.08\text{ ml}/\text{min}$ . Dass die Faser empfindlich auf Bewegungen reagiert, lässt sich beim Einsatz einer Peristaltikpumpe beobachten. Diese schiebt die Flüssigkeit mittels 8 Rollen durch einen dünnen Gummischlauch mit regelbarer Geschwindigkeit. Der Fluss ist nicht gleichförmig, dies äußert sich im zeitlichen Verlauf der Amplitude der Laserdiode, die gleichmäßig und periodisch schwingt. Frequenz und Form der Schwingung hängen mit dem Geschwindigkeitsbetrag zusammen. Im zeitlichen Mittel bleibt die Amplitude jedoch konstant, wieder vorausgesetzt, dass sich im dest. Wasser keine Schmutzpartikel befinden. Leider konnten keine weitergehenden Messungen mit Aceton durchgeführt werden, da das Schlauchsystem dagegen nicht chemisch resistent ist. Interessant wäre dies, da mit der hohen Reinigungskraft des Acetons jede Faser vor Beginn aller Messungen und zwischendrin gründlich gereinigt werden könnte. Generell sollte man eine Vielkanalpumpe, die durch mehrere Schläuche gleichzeitig pumpen kann, verwenden, um den Wechsel von Flüssigkeiten zu erleichtern.

Für die Messungen sind eine Polymer- und eine Biotinlösung angesetzt worden. Die hohen Ungenauigkeiten bei den Polymer- und Biotinmengen liegen an der geringen Empfindlichkeit der verwendeten Waage.

1. **Polymerlösung:**  $(60 \pm 10)\text{mg}$  Polymer +  $(50 \pm 0.5)\text{ml}$  THF
2. **Biotinlösung:**  $(50 \pm 10)\text{mg}$  Biotin +  $(50 \pm 0.5)\text{ml}$  dest. Wasser

Im zweiten Schritt wird die Fasertaille mit einem oder zwei Tropfen der Polymerlösung betropft, dies führt i.d.R. zu einer Abschwächung der Transmission, die durch weitere Tropfenzugabe verstärkt wird. Die nötige Erhitzung der Faser hat sich als Schwierigkeit herausgestellt. Einfache Öfen in chemischen Laboren sind nicht rein genug, auch eine dichte Umschließung der Faser mit Aluminiumfolie kann nicht verhindern, dass nach dem mindestens einstündigen Heizvorgang kein Signal an Luft zu messen ist. Interessanterweise lassen sich die Schmutzpartikel auf der Faser aber in Flüssigkeiten wie Wasser oder Aceton lösen, d.h. der angerichtete Schaden ist zwar nicht irreversibel aber für weitergehende Messungen unbrauchbar. Um daher einen Ofen zu umgehen, ist der mit Platindraht umwickelte Bornitridzylinder aus Abb. 4 zur Heizung verwendet worden. Die Taille einer gezogenen Faser des Typs A wird einige Millimeter über diesem Zylinder positioniert und ein Strom durch den Draht geschickt, damit die Temperatur in der nahen Umgebung der Faser ca.  $130^{\circ}\text{C}$  beträgt. Schwankungen sind

<sup>1</sup>Ansprechpartner D. Kessler aus der Gruppe von Dr. Theato der Anorganischen Chemie, Joh. Gutenberg Univ. Mainz

nicht problematisch da die Temperaturhöhe nur in Beziehung zur Geschwindigkeit der Vernetzung des Polymers steht und somit kein fester Wert eingehalten werden muss. Während des Erhitzungsprozesses schwankt das gemessene Spektrum aufgrund der durch die Wärme angefachten Bewegung der Fasertaille. Im Mittel sinkt die Transmission mit der Zeit ohne die Form des Spektrums zu ändern, in der hier vorgestellten Messung um 14 % (gemittelt über die Amplituden aller Wellenlängen) nach einem einstündigen Heizprozess. Die Betropfung mit der Polymerlösung hat zu einem kompletten Signalverlust geführt, siehe Abb. 11 oben, Spektrum 1 in schwarz. Anschließendes Heizen führt zu Beginn zu einem direkten Transmissionsanstieg, nach einer Stunde ergibt sich in derselben Abbildung das Spektrum 2 in blau. Durch das Heizen muss sich ein Teil des Polymers von der Faser Oberfläche gelöst haben. Nun wird die Faser in die wässrige Nut gefahren, wodurch sich Spektrum 3 in rot ergibt. Gibt man einen Tropfen der Biotinlösung der wässrigen Nut hinzu beginnt die Transmission zu fallen und das Spektrum 4 in grün wird kurze Zeit später gemessen. Im nächsten Moment ist das Signal komplett auf Null gefallen und auch durch Reinigungsversuche nicht zu verbessern. Eine Wirkung der Biotinlösung scheint vorhanden zu sein, die Frage ist, ob diese nur im Zusammenhang mit einer polymerbeschichteten Faser auftritt. Dass dies nicht der Fall ist, zeigt der untere Graf von Abb. 11.

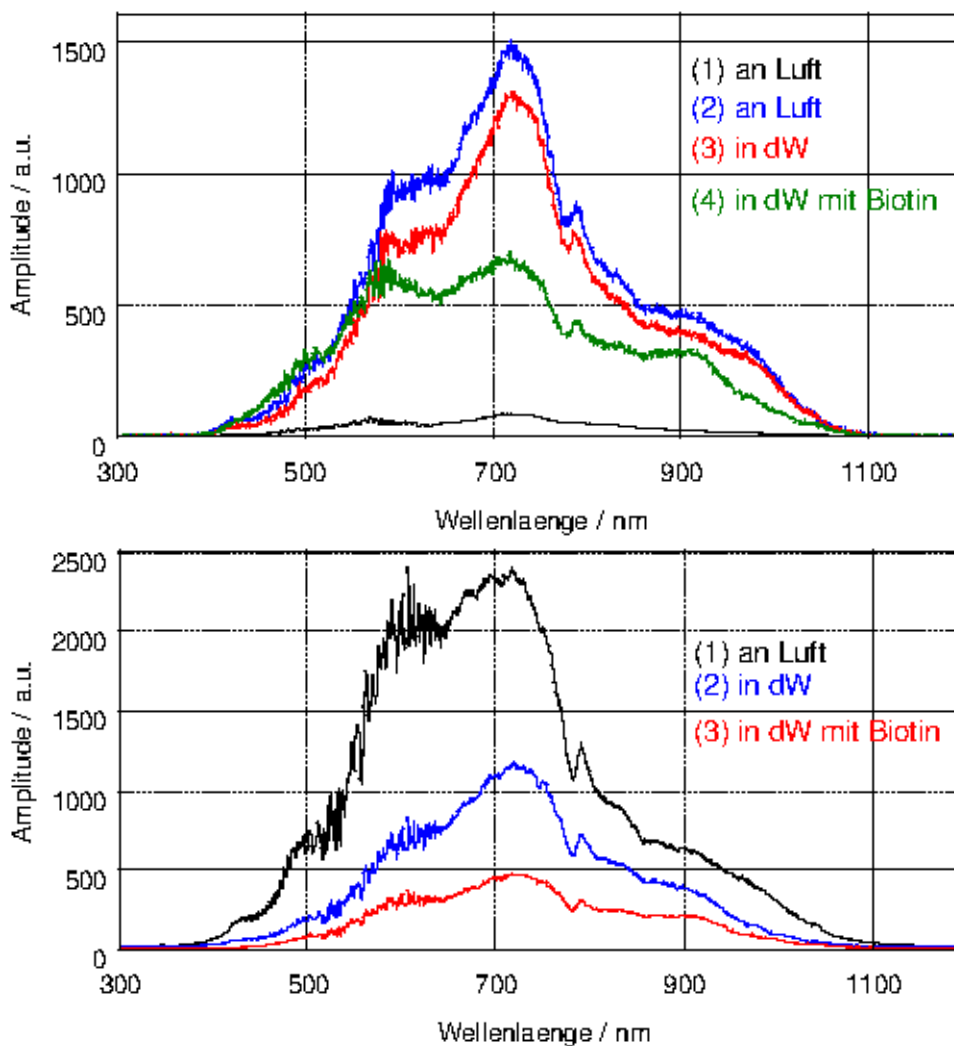


Abbildung 11: **oben:** Nach Betropfung der Fasertaille mit dem Polymer bricht die Transmission ein (schwarz). Heizt man die Faser steigt das Signal an (blau). Befindet sich die Faser in dest. Wasser (rot) und gibt dann Biotinlösung hinzu sinkt das Spektrum (grün), bei längerem Warten geht die Transmission irreversibel verloren. **unten:** Ohne die Faser mit dem Polymer behandelt zu haben soll nun die Reaktion auf die Biotinlösung gemessen werden. An Luft (schwarz) und in dest. Wasser (blau) ergeben sich die typischen Spektren. Zugabe der Biotinlösung führt wie oben zu einem sehr ähnlichen Abfall der Transmission (rot), bis kein Signal mehr vorhanden ist.

Hier ist eine unbehandelte Faser desselben Typs an Luft (Spektrum 1 in schwarz) und in dest. Wasser (Spektrum 2 in blau) vermessen worden. Bei Zugabe eines Tropfens Biotin fällt die Transmission und nach kurzer Zeit ist Spektrum 3 in rot zu sehen. Weiteres Warten führt zu einem vollständigen und ebenso irreversiblen Verlust des Signals, d.h. in beiden Messungen von Abb. 11 oben und unten hat sich dasselbe Verhalten bei Zugabe der Biotinlösung gezeigt. Auch spektral gibt es keine markanten Unterschiede. Folgende Ursachen könnten aufgetreten sein:

1. Das Polymer ist nicht an der Faseroberfläche immobilisiert gewesen
2. Biotin allein führt durch Adsorption zum Transmissionsverlust
3. Schmutzpartikel in der Biotinlösung sind für den Transmissionsverlust verantwortlich

Gegen erste Ursache spricht der Transmissionsrückgang bei Betropfen der Fasertaille, der auch in weiteren Messungen aufgetreten ist. Ein ähnliches Verhalten ist mit dest. Wasser nicht aufgetreten, d.h. das Polymer selbst muss zur Strahlungsstreuung geführt haben. Dabei muss vorausgesetzt werden, dass die Polymerlösung rein genug ist, was von Seiten der chemischen Abteilung bezeugt wird. Zusätzlich ist von dem Polymer PMSSQ-PFPA bekannt, dass es an nahezu allen Oberflächen, insbesondere Glas haftet. Jedoch könnte der Heizvorgang einen Teil des Polymers abgelöst haben, wodurch sich der Transmissionsanstieg erklärt. Übrig gebliebener Polymeranteil wäre dann fest mit der Glasoberfläche verbunden. Dass sich Biotin ( $\approx 7 \text{ nm}$  Audehnung) von alleine an die Faser bindet ist ebenso unwahrscheinlich. Dagegen sprechen Messungen, in denen eine Biotinzugabe zu keinem merklichen Signalarückgang geführt hat. Hier offenbart sich das Problem der Nicht-Reproduzierbarkeit einiger Resultate. Ursache drei sollte auch ausgeschlossen werden, wenn das feste Biotin aus der chemischen Abteilung einen ausreichenden Reinheitsgrad aufweist. Hier ergibt sich allerdings ein ernstes Problem, das mit dem Biotin selbst zusammenhängt. Es bildet in dest. Wasser Strukturen aus und lässt sich nicht ausreichend mischen. Daher wird das Lösungsmittel Triethylamin eingesetzt (siehe oben Behandlungsschritt (4)), jedoch haben sich in der für die Messungen verwendeten Biotinlösung kleine Brocken nicht auflösen lassen. Dies lässt vermuten, dass sich solche Brocken auch in einer nicht für das Auge sichtbaren Größenordnung gebildet haben. Damit können diese in Bezug zur Faserausdehnung großen Brocken für den Transmissionsrückgang verantwortlich sein.

## 6 Zweiter Ansatz - Biotin-Silan Verbindung

Mit Salpetersäure soll die Glasoberfläche der Fasertaille aktiviert werden, um eine Biotin-Silan Verbindung an diese zu immobilisieren. Damit kann wieder der Biotin-Streptavidin Komplex aus Abschnitt 2 benutzt werden. Erfolgreich ist diese Methode an planaren Glasoberflächen durch M. Colindres<sup>2</sup> im November 2008 durchgeführt worden. Im Falle einer Glasfaser ergeben sich folgende Behandlungsschritte:

1. Aktivierung: Die Fasertaille befindet sich für 10 Minuten in 10%-iger Salpetersäure bei einer Temperatur von  $70^\circ\text{C}$
2. Trocknung der Fasertaille durch Erhitzung
3. Herstellung der Biotin-Silan-Lösung: Festes Biotin-Silan wird mit flüssigem n-propylthrimethoxysilan im Gewichtsverhältnis 1 : 9 vermischt. Als Lösungsmittel kann Triethylamin hinzugegeben werden.
4. Inkubation: Fasertaille befindet sich einen Tag lang in der Biotin-Silan-Lösung

Zu beachten ist, dass man phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) anstatt reinem dest. Wasser verwenden sollte, um einen stabilen pH-Wert von 7.4 zu erreichen, damit die Lebensdauer von Biomolekülen verlängert wird. Die PBS-Lösung setzt man an, indem man handelsübliche PBS-Tabletten in dest. Wasser auflöst und diese dann einer  $200 \text{ nm}$  Filtrierung zur Staubentfernung unterzieht. Es ergeben sich keine Unterschiede der Transmission einer Faser in PBS-Lösung im Vergleich zu dest. Wasser. Der Umgang mit Salpetersäure gestaltet sich als problematisch, da sie in handelsüblicher Form nicht rein genug ist, was sich aus einigen Experimenten schließen lässt. Gelungen ist eine Messung, die in Abbildung 12 das stabile Spektrum (in schwarz) einer Typ C Faser in filtrierter 10%-iger Salpetersäure darstellt. Mittels der Heizvorrichtung unterhalb des Edelstahlblockes wird nun die Nut und damit die Salpetersäure auf eine Temperatur nahe der geforderten  $70^\circ\text{C}$  gebracht. Einige Minuten später zeigt sich eine leichte Änderung des Spektrums, in Abb. 12 (blaue Kurve) zu sehen. Solche Veränderungen können auf die vorhergesagte Aktivierung der Glasoberfläche deuten oder auf Anlagerungen durch Schmutzpartikel. Es bleibt damit fraglich ob Schritt eins (siehe oben) funktioniert hat. Um Schritt zwei auszuführen muss die Faser wieder aus der Nut an die Luft gehoben werden, was zu einem völligen Transmissionsverlust führt. Auch gezieltes Erhitzen der Fasertaille mit dem Platindraht hat zu keiner Besserung geführt. Damit ist eine Fortführung der obigen Behandlungsschritte zwecklos.

<sup>2</sup>zu diesem Zeitpunkt Wissenschaftlerin der Gruppe von B. Menges des MPI für Polymerforschung in Mainz

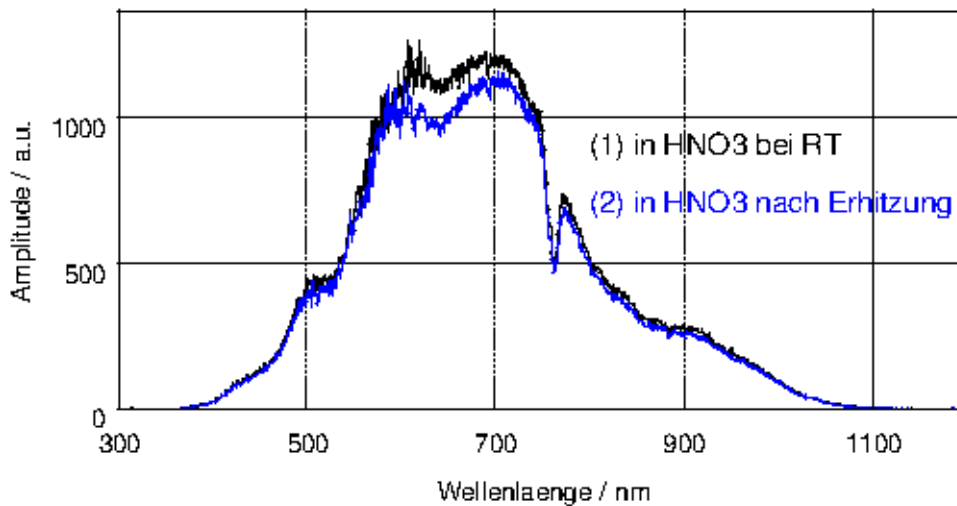


Abbildung 12: Zwei gemessene Spektren der Transmission einer Typ C Faser, die sich in 10%-iger Salpetersäure bei Raumtemperatur (schwarz) und bei  $70^{\circ}\text{C}$  (blau) befindet. Die leichte Veränderung des Spektrums kann ein Indiz für die Aktivierung der Oberfläche sein.

## 7 Fazit

Der einfachen und kostengünstigen Realisierung eines "absorption TFOBS" haben sich einige Probleme in der Durchführung der Experimente entgegen gestellt. Weiterführende Experimente sollten folgende Stichpunkte beachten:

1. Von zentraler Bedeutung ist das Verständnis der chemischen Abläufe, die an der Oberfläche der Fasertaille bei Kontakt mit Säuren, Biomolekülen usw. ablaufen. Daher ist eine fruchtbare Zusammenarbeit mit Gruppen der Oberflächenchemie unabdingbar, z.B. um die Behandlungsschritte der Ansätze an die besonders empfindlichen Fasern anzupassen. Neben chemischen Knowhow benötigt man auch den zugehörigen Laborbedarf.
2. In nahezu allen Messungen sind teilweise Probleme mit unzureichender Reinheit der Luft, der Flüssigkeiten, der Blöcke, des Pumpsystems usw. aufgetreten. Zum Experimentieren benötigt man eine Flowbox für die Staubminimierung und gleichzeitig einen Abzug, aufgrund flüchtiger und gesundheitsschädlicher Chemikalien. Bietet sich die Möglichkeit sollte man in einem Reinraum arbeiten. Hantiert man mit handelsüblichen Chemikalien, braucht man ein gut funktionierendes Filtersystem im Nanometerbereich.
3. Man sollte sich eine Vielkanalpumpe mit gleichförmigen Fluss aneignen, deren Schläuche und Ventile chemisch resistent sind. Damit wird der Wechsel von Flüssigkeiten in der Nut möglich ohne dass die Fasertaille in Kontakt mit Luft, was sich in den Messungen als großes Problem erwiesen hat, gerät.

Insgesamt bezeugen die drei Stichpunkte, dass mehr technischer und theoretischer Aufwand betrieben werden muss, um das gewünschte Ziel zu erreichen.

## Literatur

- [1] A. Leung, P. M. Shankar, and R. Mutharasan. A review of fiber-optic biosensors. *Sensors and Actuators B*, (125):688–703, 2007.
- [2] M.D. Marazuela and M.C. Moreno-Bondi. Fiber-optic biosensors - an overview. *Anal. Bioanal. Chem.*, (372):664–682, 2002.
- [3] F. Warken, E. Vetsch, D. Meschede, M. Sokolowski, and A. Rauschenbeutel. Ultra-sensitive surface absorption spectroscopy using sub-wavelength diameter optical fibers. *Optics Express*, 15(19), September 2007.
- [4] Lasse Välimaa. Streptavidin - a versatile binding protein for solid-phase immunoassays. 2008.
- [5] Florian Warken. *Ultradünne Glasfasern als Werkzeug zur Kopplung von Licht und Materie*. PhD thesis, R. F.-W.-Univ. Bonn, 2007.

- [6] I. Langmuir. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.*, 1918.
- [7] David G. Myszka. Improving biosensor analysis. *J. Mol. Recognit.*, 12:279–284, 1999.