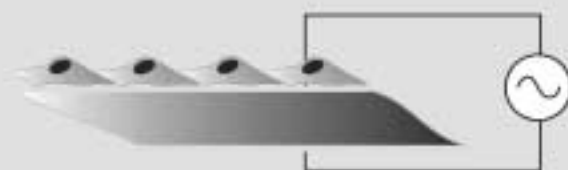
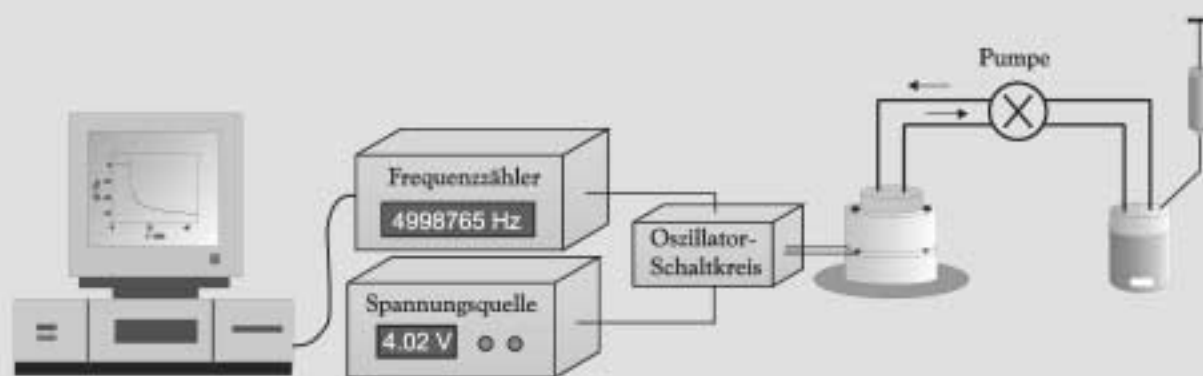


DIE QUARZMIKROWAAGE IN DEN BIOWISSENSCHAFTEN



Mikrogravimetrische Sensoren in der Bioanalytik – eine Alternative zu optischen Biosensoren?

Andreas Janshoff, Hans-Joachim Galla und Claudia Steinem*

Professor Erich Sackmann zum 65. Geburtstag gewidmet

Schon in den Anfängen des Radio- und Funkbetriebs brachte man – bedingt durch den Mangel an Schwingquarzen – mit einem Bleistift einen dünnen Film auf den Quarz auf, um Transmissions- und Empfängerfrequenz aufeinander abzustimmen. 1959 konnte Sauerbrey dann zeigen, dass sich die Frequenz von Schwingquarzen bei Abscheidung einer Fremdmasse proportional zur Massenbeladung verringert. Diese wichtige Erkenntnis war der Grundstein für die Entwicklung piezoelektrischer, gravimetrischer Sensoren. Für die Biowissenschaften interessant wurde diese äußerst empfindliche Messmethode allerdings erst, nachdem es gelungen war, Dickenschwinger durch die Entwicklung geeigneter Oszillatorschaltkreise auch in wässrigen Medien betreiben zu können. Das Studium von Adsorptionsphänomenen an biologisch relevanten Oberflächen wurde zu einem Haupt-

anwendungsgebiet piezoelektrischer Sensoren. Anfängen von Studien zu DNA/DNA- und DNA/RNA- sowie zu Protein-Rezeptor-Wechselwirkungen wurde über die Detektion von Viren und Bakterien bis hin zur Entwicklung kompletter Immunosensoren in den letzten 10 Jahren kein Gebiet ausgelassen, in dem nicht die Quarzmikrowaage als sondenfreie Messmethode zum Einsatz kam. Bei der Erforschung der einzelnen biologischen Systeme sind eine Vielzahl von Erkenntnissen gewonnen worden, wobei für die Messmethode selbst die hervorzuheben sind, welche gezeigt haben, dass mit Dickenschwängern in Flüssigkeiten nicht nur die reine Massenbeladung gemessen werden kann, sondern dass vielmehr auch die viskoelastischen Eigenschaften und die Ladungszustände des adsorbierten Materials (Grenzschichtphänomene) sowie die Oberflächenrauigkeit die Sensorant-

wort bestimmen. Genutzt werden diese Erkenntnisse in neuerer Zeit zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Zellen, Liposomen und Proteinen. Es ergeben sich dabei z.T. neue Parameter, die es ermöglichen, morphologische Veränderungen von anhaftenden (adhärenten) Zellen in situ zu detektieren und so die Auswirkung von Pharmaka zu quantifizieren sowie den Wassergehalt von Biopolymeren zu ermitteln. Die Leistungsfähigkeit mikrogravimetrischer Sensoren in der Bioanalytik wird mit etablierten sondenfreien optischen Methoden wie der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie und der Interferometrie verglichen.

Stichwörter: Analytische Methoden • Biosensoren • Molekulare Erkennung • Oberflächenreaktionen • Quarzmikrowaage

1. Einleitung

Obwohl ihnen gewöhnlich keine besondere Beachtung geschenkt wird, sind Schwingquarze aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften im täglichen Leben überall zu finden – sei es in Uhren und Computern als Zeitgeber, als Erzeuger von Trägersignalen für Nachrichten oder als Referenzfrequenzgeber in elektronischen Geräten. Große kommerzielle

Bedeutung gewannen Schwingquarze erstmals im 2. Weltkrieg, als allein für die militärische Kommunikation 30 Millionen Resonatoren benötigt wurden. Wichtigkeit für die Analytik erlangten Schwingquarze erst durch den Befund, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Frequenzänderung und der Massenbeladung besteht,^[1, 2] der 1959 von Sauerbrey formuliert wurde.^[3] Er konnte zeigen, dass diese Abhängigkeit bei einer hinreichend kleinen Schichtdicke der abgeschiedenen Fremdmasse, die starr an die Schwingung des Quarzes angekoppelt ist, gilt. D.h., eine abgeschiedene Masse kann mit Hilfe der Schwingquarzmethode im weitesten Sinne „gewogen“ werden – es wurde der Begriff der „Quarzmikrowaage“ geprägt. Die nach Sauerbrey berechnete Massenempfindlichkeit einer solchen Anordnung liegt bei

[*] Dr. C. Steinem, Dr. A. Janshoff, Prof. Dr. H.-J. Galla
Institut für Biochemie
Westfälische Wilhelms-Universität
Wilhelm-Klemm-Straße 2, 48149 Münster (Deutschland)
Fax: (+49) 251-83-33206
E-mail: steinec@uni-muenster.de

0.057 Hz cm² ng⁻¹ für einen Quarz mit einer Grundfrequenz von 5 MHz. Im Vergleich zu einer elektromechanischen Feinwaage, deren Empfindlichkeit bis minimal 0.1 µg reichen kann, ist die Quarzmikrowaage mit einer Nachweisgrenze von wenigen Nanogramm etwa um den Faktor 100 empfindlicher. In den 60er und 70er Jahren war die Technik für analytische Massenbestimmungen im Vakuum und an der Luft von Bedeutung und wird bis heute zur Schichtdickenbestimmung von Filmen im Hochvakuum verwendet. Für analytische Fragestellungen im Bereich der Biowissenschaften war diese Methode jedoch noch ungeeignet, da es keine Oszillatorschaltkreise gab, mit denen die durch die Flüssigkeit auftretende Dämpfung der Quarzschwingung überwunden werden konnte. Erst 1982 durchbrachen Nomura und Okuhara^[4] diese Einschränkung – der Startschuss für die Entwicklung eines bioanalytischen Verfahrens war gefallen.

Heutzutage kann man die Schwingquarze mit gutem Gewissen in die Reihe der gängigen mechanischen Signal-

wandler im Bereich der Chemo- und Biosensorik eingliedern. Der piezoelektrische Signalwandler wandelt die physikalische Eigenschaft der Masse oder Schichtdicke eines Analyten in ein elektrisches Signal um. Dabei wird die Masse durch die Scherbewegung des Quarzes mitbewegt. Bei dieser Bewegung auf der Oberfläche erfahren angekoppelte Materialien eine Beschleunigung von mehr als 10⁶ g. Die Amplitude der Scherbewegung beträgt ca. 10–20 nm an der Luft, in Flüssigkeiten wie z.B. Wasser hingegen nur 1–2 nm.^[5]

In diesem Artikel wird gezeigt werden, dass spezifische Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen quantitativ – sowohl hinsichtlich der Kinetik als auch der Thermodynamik der Bindung – mit dieser Messmethode erfasst und neben der Masse des adsorbierten Moleküls grenzflächenspezifische Eigenschaften biologischer Materialien detektiert werden können. Ein ganz neues Anwendungsgebiet der klassischen Quarzmikrowaage ist die Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften von zellulären Systemen. Die Stärke piezo-

Andreas Janshoff, geboren 1966, studierte zunächst Biologie und dann Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Nach dem Diplom im Jahre 1994 promovierte er 1997 am Institut für Biochemie mit einer Arbeit über die Biofunktionalisierung von Goldoberflächen und deren Anwendung in der Bioanalytik. In der Arbeitsgruppe von M. Reza Ghadiri am Scripps Research Institute in La Jolla, CA (USA), arbeitete er anschließend anderthalb Jahre an rasterkraftmikro-



A. Janshoff



H.-J. Galla



C. Steinem

skopischen Analysen von Lipidmembranen und wechselte 1999 zur Arbeitsgruppe von Harald Fuchs an das Physikalische Institut der Universität Münster, um dort seine Habilitation in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie der Universität Münster zu beginnen. Sein Forschungsgebiet umfasst die Entwicklung neuartiger Sensoren auf der Basis mikrostrukturierter Oberflächen und den Einsatz akustischer Sensoren zur Aufklärung biochemischer Fragestellungen.

Hans-Joachim Galla, geboren 1948, studierte Chemie an der Universität Göttingen. Nach dem Diplom im Jahre 1973 promovierte er 1975 bei Erich Sackmann in Göttingen mit einer Arbeit über Phasentrennungsphänomene und Lipid-Protein-Wechselwirkungen, die er am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie durchführte. 1976 wechselte er als wissenschaftlicher Assistent in die Abteilung Biophysik an der Universität Ulm, wo er 1979 habilitierte. Parallel dazu war er 1979/1980 als Research Associate an der Stanford-University tätig, bevor er als Heisenberg-Stipendiat an die Universität Ulm zurückkehrte. 1983 erhielt er einen Ruf an das Institut für Biochemie der Technischen Universität Darmstadt auf eine Professur für Biophysikalische Chemie, 1990 wechselte er auf den Lehrstuhl für Biochemie der Universität Münster. Seine Hauptarbeitsgebiete sind die Differenzierung des cerebralen Endothels der Blut-Hirn-Schranke, monomolekulare Lipid-Peptid-Schichten als Modelle des alveolaren Lungensurfactants und die Biofunktionalisierung festkörperunterstützter Membranen zur Anwendung in der Biosensorik.

Claudia Steinem, geboren 1967, studierte Biologie und Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Sie promovierte 1997 bei Hans-Joachim Galla mit einem Thema zum Ionentransport in festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten. Nach einem anderthalbjährigen Aufenthalt am Scripps Research Institute in La Jolla, CA (USA), in der Arbeitsgruppe von M. Reza Ghadiri kehrte sie 1999 als Lise-Meitner-Stipendiatin an das Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität zurück, wo sie zurzeit im Rahmen ihrer Habilitation eine eigene Arbeitsgruppe aufbaut. Ihre Forschungsinteressen umfassen das Studium der Wechselwirkung von Modellpeptiden, Annexinen und Proteinen der Signaltransduktion mit Lipidmembranen sowie die Entwicklung neuer Modellmembransysteme auf der Basis poröser Oberflächen.

elektrischer Resonatoren bei diesen Fragestellungen ergibt sich aus der Kopplung elektrischer und mechanischer Variablen, welche es ermöglicht, mit Hilfe elektrischer Ersatzschaltbilder das mechanische Verhalten von Biopolymeren und komplexen mehrschichtigen biologischen Materialien, wie eine konfluente Zellmonoschicht auf einem Substrat, zu analysieren. Mit der Quarzmikrowaage lassen sich neben molekularen Erkennungsreaktionen auf funktionalisierten Oberflächen auch Grenzflächeneigenschaften wie Viskoelastizität, Rauigkeit, Hydropathie, Ladungszustand und Wassergehalt von Proteinen und Polymeren ermitteln.

2. Grundlagen piezoelektrischer Resonatoren

2.1. Akustische Wellen im Festkörper

Das Spektrum akustischer Wellen deckt einen Frequenzbereich von etwa 14 Größenordnungen ab – von 10^{-2} Hz (seismische Wellen) bis 10^{12} Hz (thermoelastisch angeregte Phononen; Abbildung 1); die akustischen Resonatoren, welche in diesem Artikel besprochen werden, schwingen in einem engen Frequenzbereich von 10^6 – 10^9 Hz.

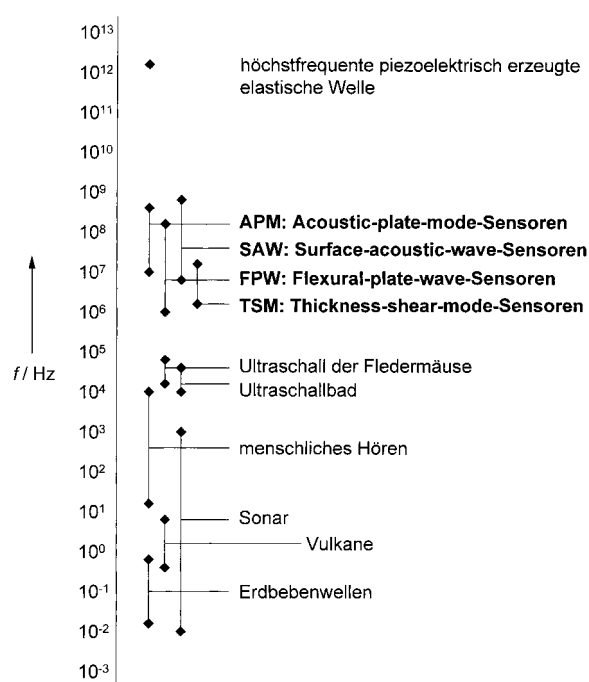


Abbildung 1. Das Spektrum der akustischen Wellen umfasst etwa 14 Größenordnungen. Die Frequenzbereiche der vier Sensoren, die in diesem Artikel behandelt werden, liegen zwischen 1 und 1000 MHz.^[7]

Bevor die Einzelheiten der Funktionsweise dieser Sensoren diskutiert werden, sollen zunächst kurz die Gesetzmäßigkeiten von allgemein akustischen und speziell piezoelektrisch angeregten Wellen im Festkörper zusammengefasst werden.

Wird eine periodisch veränderliche mechanische Spannung auf einen Festkörper appliziert, so werden elastische Deformationen angeregt, die sich als Wellen im Festkörper fortpflanzen. Die Schwingungsform – es lassen sich sowohl

transversale als auch longitudinale Wellen anregen – sowie die Fortpflanzungsgeschwindigkeit der elastischen Wellen hängen von den Randbedingungen und der Kristallstruktur des Festkörpers ab. Die allgemeine Wellengleichung (1), die akustische Wellen im Festkörper beschreibt, ergibt sich aus der Bewegungsgleichung, der Definition der Dehnung und den konstitutiven Gleichungen.^[6]

$$\nabla \cdot \mathbf{c} : \nabla_s \mathbf{u} = \rho \frac{\partial^2 \mathbf{u}}{\partial t^2} \quad (1)$$

\mathbf{u} ist die Auslenkung des Partikels, ρ die Dichte des Festkörpers und t die Zeit. Die Matrix \mathbf{c} bezeichnet die Elastizitätsmodule des Festkörpers. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Beziehungen für eine und drei Dimensionen zusammengefasst.

Tabelle 1. Dynamische Bewegungsgleichungen für eine und drei Dimensionen. \mathbf{c} ist der Tensor der Elastizität. Die Spannung \mathbf{T} und die Dehnung \mathbf{S} sind symmetrische Tensoren mit neun Elementen, wobei sechs aus symmetrischen Gründen unabhängig sind. u ist die Partikelauslenkung, z bezeichnet die Richtung, in der die Dehnung erfolgt, und ρ die Dichte des Materials.^[6]

	eindimensionales System	dreidimensionales System
Newtonsche Bewegungsgleichung	$\frac{\partial T}{\partial z} = \rho \frac{\partial^2 u}{\partial t^2}$	$\nabla \cdot \mathbf{T} = \rho \frac{\partial^2 \mathbf{u}}{\partial t^2}$
Definition der Dehnung	$S = \frac{\partial u}{\partial z}$	$\mathbf{S} = \nabla_s \mathbf{u}$
<i>konstitutive Gleichungen:</i>		
Hookesches Gesetz	$T = CS$	$\mathbf{T} = \mathbf{c} : \mathbf{S}$
Partikelgeschwindigkeit	$v = \frac{\partial u}{\partial t}$	$\mathbf{v} = \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t}$
mechanische Impedanz		$Z = \sqrt{\rho C}$
Phasengeschwindigkeit		$v_p = \sqrt{C/\rho}$

2.2. Piezoelektrisch angeregte Wellen im Festkörper

Als Piezoelektrizität, erstmals 1880 durch die Gebrüder Curie beschrieben, wird allgemein die Erzeugung elektrischer Ladungen an der Oberfläche eines Festkörpers durch Zug, Druck oder Torsion bezeichnet. Der reziproke piezoelektrische Effekt bezeichnet im Gegenzug das Auftreten einer mechanischen Deformation durch Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes. Die grundsätzlichen Zusammenhänge zwischen mechanischen und elektrischen Variablen sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Piezoelektrizität zeigen ausschließlich Kristalle ohne Inversionszentrum. Insgesamt erfüllen 21 Punktgruppen diese Bedingung, wobei jedoch nur 20 Punktgruppen von null verschiedene piezoelektrische Konstanten aufweisen. Zwar weisen viele Kristalle den piezoelektrischen Effekt auf, doch nur bei Quarz liegt die geeignete Kombination von mechanischen, elektrischen, chemischen und thermischen Eigenschaften vor, was zu seiner großen kommerziellen Bedeutung geführt hat. Unter Berücksichtigung der Piezoelektrizität lässt sich die Wellengleichung (1) um den Term $\mathbf{e} \nabla^2 \Phi$ erweitern, wobei Φ das elektrische Potential und \mathbf{e} der Piezomodul ist, dessen Komponenten als piezoelektrische Konstanten bezeichnet werden.^[7] Der zusätzliche Term ist

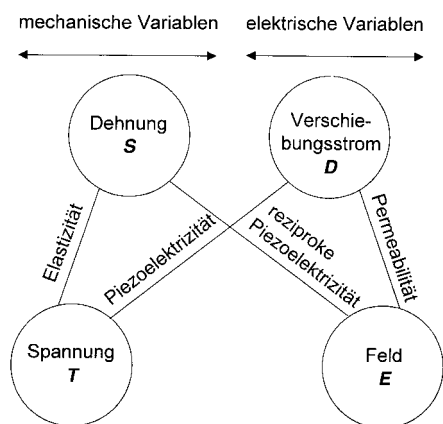


Abbildung 2. Beziehungen zwischen den mechanischen und elektrischen Variablen. Der piezoelektrische Effekt bezeichnet die Erzeugung einer elektrischen Verschiebung beim Anlegen einer mechanischen Spannung. Der reziproke piezoelektrische Effekt führt zur Dehnung des Kristalls beim Anlegen eines elektrischen Feldes. Die Beziehung zwischen Spannung und Dehnung wird durch die Elastizität des Festkörpers bestimmt.^[7]

verantwortlich für die elektrische Anregung elastischer Wellen in einem piezoelektrischen Medium. Die daraus resultierende Bewegung führt ihrerseits zu einer Potentialveränderung, die elektrisch detektiert werden kann. Durch Integration der erweiterten Wellengleichung unter Berücksichtigung, dass der Gradient des elektrischen Verschiebungsstroms null ist, d. h., dass keine freie Ladungsdichte im piezoelektrischen Medium auftritt, kann ein Ausdruck erhalten werden, der die Wellen im piezoelektrischen Medium vollständig beschreibt. Die grundsätzlichen physikalischen Konsequenzen sollen in den folgenden Abschnitten näher diskutiert werden.

2.3. Piezoelektrische Resonatoren

Schwerpunkt des vorliegenden Artikels ist die Behandlung der Bulk-acoustic-wave (BAW)- oder auch Thickness-shear-mode (TSM)-Resonatoren, die – wenn auch weniger aussagekräftig, dafür aber kommerziell wirksamer – als Quarzmikrowaage (quartz crystal microbalance, QCM) bezeichnet werden. Obwohl TSM-Resonatoren beträchtlich unempfindlicher sind als z. B. Flexural-plate-wave (FPW)- oder Surface-acoustic-wave (SAW)-Sensoren, sind sie doch aufgrund der einfachen Beschaltung, der robusten Bauweise und der niedrigen Herstellungskosten am weitesten verbreitet. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen Resonatortypen.

2.3.1. Thickness-shear-mode (TSM)-Resonatoren (Quarzmikrowaage)

Abhängig vom Schnittwinkel lassen sich eine Vielzahl von Resonatortypen aus einem Quarzkristall gewinnen (Abbildung 4 A). Es lassen sich Biege-, Flächen-, Längs- und Dickenscherschwinger mit einem Eigenfrequenzbereich von 5×10^2 – 3×10^8 Hz herstellen. Zum Aufbau der Quarzmikrowaage werden in erster Linie AT-cut-Quarze verwendet, die aus einem stabförmigen Quarzkristall mit einem Winkel von

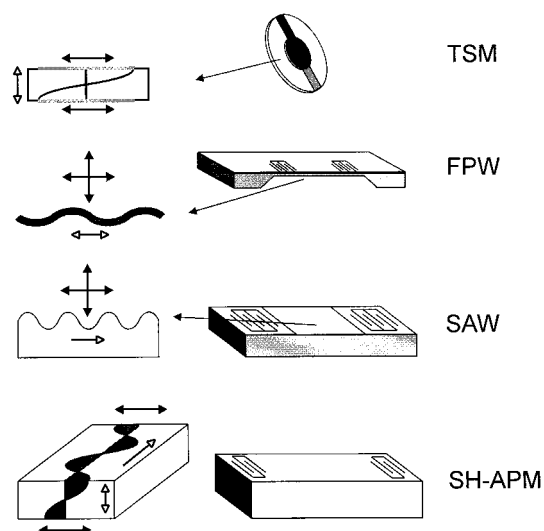


Abbildung 3. Schematische Darstellungen der vier gängigen akustischen Sensoren und ihrer Schwingungsmodi. Die Partikelauslenkung ist durch schwarze Pfeile, die Richtung der Wellenausbreitung durch Pfeile mit nicht ausgefüllten Spitzen gekennzeichnet. TSM: Thickness-shear-mode-Resonator, auch unter dem Begriff Quarzmikrowaage bekannt; FPW: Flexural-plate-wave-Resonator; SAW: Surface-acoustic-wave-Resonator (two port delay line); SH-APM: Shear-horizontal-acoustic-plate-mode-Resonator.

ca. 35.25° zur kristallographischen z -Achse herausgeschnitten werden (Abbildung 4 B). Diese Quarzschnitte sind aufgrund ihrer hohen Frequenzstabilität von $\Delta f/f \approx 10^{-8}$ in der kommerziellen Elektronik weit verbreitet.^[8, 9]

AT-cut-Quarze eignen sich besonders zum Aufbau von mikrogravimetrischen Sensoren, da sie einen Temperaturkoeffizienten aufweisen, der im Bereich von 0 – 50°C fast null ist.^[10] Die im Folgenden aufgeführten quarzspezifischen Daten beziehen sich immer auf AT-cut-Quarze.

Zur Beschreibung der Wellen in einem kreisförmigen isotropen AT-cut-Quarz mit der Dicke d_q kann unter Vernachlässigung von äußeren Kräften und Dämpfungerscheinungen die Wellengleichung bequem in Zylinderkoordinaten geschrieben werden (Abbildung 5). Der Ausdruck für die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Welle lautet mit dem piezoelektrischen Zusatzterm: $(\bar{c}_{66}/\rho_q)^{1/2}$ (ρ_q = Dichte des Quarzes).^[11] Die Randbedingungen verlangen, dass die Amplitude der Scherschwingung an den Rändern der

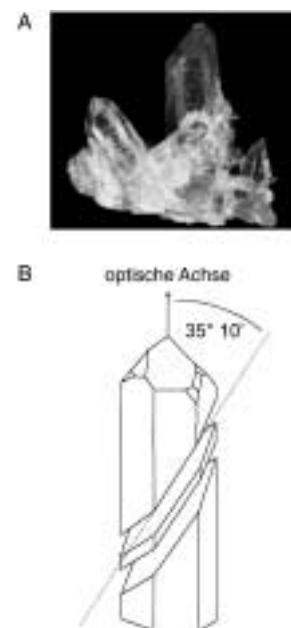


Abbildung 4. A) Photographie mehrerer α -Quarzkristalle. B) AT-Schnitt durch einen Quarzkristall. Es wird eine Quarzscheibe mit einem Winkel von $35^\circ 10'$ zur optischen Achse geschnitten. Eine Abweichung um $5'$ des Winkels führt bereits zu einem von null verschiedenen Temperaturkoeffizienten im Bereich von 0 – 50°C .

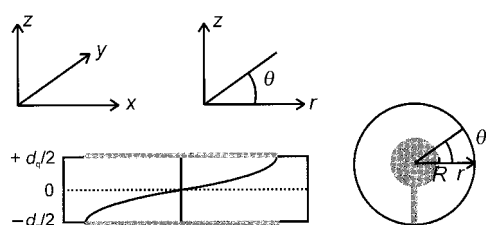


Abbildung 5. Definition der Koordinatensysteme für einen kreisförmigen Quarzkristall. Die graue Fläche stellt die aufgedampfte Metallelektrode dar.

Elektroden ($r = R$) verschwindet, bei $r = 0$ maximal ist und bei $z = 0$ einen Knoten aufweist. θ unterliegt periodischen Randbedingungen. Die Lösung des mechanischen Randwertproblems ergibt sich üblicherweise durch einen Separationsansatz.^[12] Aus der erhaltenen Lösung lassen sich wichtige Eigenschaften der Scherschwingung entnehmen. Die Eigenfrequenzen der Scherschwingung sind allgemein durch Gleichung (2) gegeben.^[9]

$$f_{mnk} = \frac{v_p}{2\pi} \sqrt{\frac{n^2 \pi^2}{d_q^2} + \frac{\lambda_{mk}^2}{R^2}} \approx \frac{\lambda_{mk}^2}{2\pi} \sqrt{\frac{n^2 \pi^2}{d_q^2}} = \frac{v_p n}{2 d_q} = \frac{n K_R}{d_q} \quad (2)$$

Da sich aus der Lösung der Wellengleichung unter den angegebenen Randbedingungen ergibt, dass n nur eine ungerade Zahl sein kann, wird aus Gleichung (2) deutlich, dass auch nur ungerade Oberschwingungen angeregt werden können.^[13] Für die Grundschiwingung gilt, dass die Auslenkung aus der Ruhelage in der Mitte der Kristallscheibe bei $r = 0$ und $z = \pm d_q/2$ am größten ist, während gemäß den gewählten Randbedingungen die Amplitude der Oszillation an den Elektrodenrändern bei $r = R$ null ist. Zudem weist die Transversalwelle eine Knotenebene bei $z = 0$ und einen Schwingungsbauch bei $z = \pm d_q/2$ auf.^[14]

Unter Berücksichtigung, dass die laterale Ausdehnung der Quarzscheibe sehr viel größer als die Dicke des Kristalls ist, wird das Problem eindimensional. Die Funktion $u_x(z, t)$ beschreibt dann zwei transversale Wellen, die in entgegengesetzte Richtungen laufen und so eine stehende Welle im Kristall bilden. Mit den Randbedingungen, dass die Kristallflächen keine externe Rückstellkraft erfahren ($\partial u / \partial z = 0$), also spannungsfrei sind, erhält man für das Profil der Scherschwingung eine einfache Cosinusfunktion (stehende Scherwelle). Aus der Bedingung konstruktiver Interferenz $d_q = n \lambda / 2$ und $R \gg d_q$ vereinfacht sich dann auch Gleichung (2).^[15] K_R bezeichnet die Frequenzkonstante des Quarzes in Abhängigkeit vom Schnittwinkel. Bei einem AT-cut-Quarz beträgt der numerische Wert $K_R = 1664 \text{ ms}^{-1}$.^[9] Gleichung (2) ist zu entnehmen, dass die Resonanzfrequenz eines AT-cut-Quarzes mit der Dicke des Kristalls sinkt. Ein 5-MHz-Quarz ist 0,33 mm dick, ein 30-MHz-Quarz dagegen nur noch 55 μm .

Der TSM-Resonator liefert eine Reihe materialspezifischer Parameter. Dafür ist es notwendig, die Umwandlung von mechanischen und akustischen Größen in elektrische zu verstehen, da nur die letzteren einer Messung direkt zugänglich sind. Betrachtet man die elektrische Anregung und Detektion der zuvor behandelten stehenden mechanischen Wellen, so lassen sich relativ einfache Modelle und mecha-

nische sowie elektrische Ersatzschaltbilder entwickeln, die eine vollständige Beschreibung der Quarzoszillation erlauben und so Rückschlüsse über die Natur des Adsorbens zulassen. Ein allgemeines eindimensionales akustisches Breitbandmodell stammt von Mason^[16] (Abbildung 6 A), es ist die Basis zur theoretischen Beschreibung komplexer zusammengesetzter (Komposit-) Resonatoren wie sie in den Biowissenschaften und der Biosensorik auftreten. In bestimmten Fällen, wie dem unbelasteten TSM-Resonator, lässt sich das Mason-Modell in der Nähe der Resonanz bei geringer Belastung und Dämpfung zu einem Ersatzschaltbild aus diskreten Impedanzelementen vereinfachen – dem so genannten Butterworth-van-Dyke (BVD)-Schaltbild (Abbildung 6 B). Eine ausführliche Behandlung der Modelle und insbesondere der Überführung des Mason-Modells in das BVD-Schaltbild findet man bei Rosenbaum.^[6]

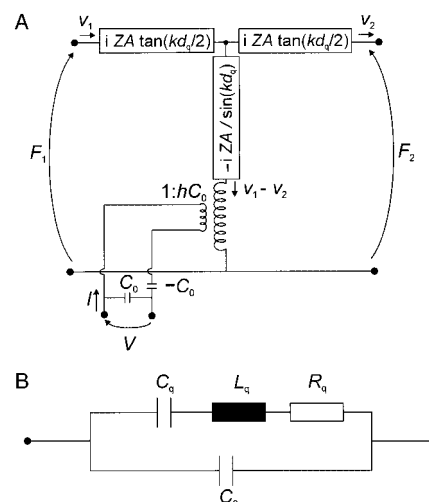


Abbildung 6. A) Äquivalenzschaltbild (Breitbandmodell) des Drei-Pol-Mason-Modells für einen piezoelektrischen Kristall endlicher Dicke. Das Schaltbild enthält zwei mechanische Pole und einen elektrischen Pol. Z bezeichnet die charakteristische Impedanz des Quarzes, k die komplexe Wellenzahl, A die Fläche und d_q die Dicke des Resonators. hC_0 ist das Verhältnis der Windungen des Transformators und ist definiert als $(e_{26} / \epsilon_{22}) C_0$. B) Butterworth-van-Dyke-Ersatzschaltbild. Das Drei-Pol-Mason-Modell kann in der Nähe der Resonanzfrequenz des Quarzes in ein Ersatzschaltbild mit diskreten Impedanzelementen überführt werden. Die Kapazität C_q repräsentiert die mechanische Elastizität des Quarzes, die Induktivität L_q die Masse zu Beginn und der Widerstand R_q die Energieverluste aufgrund von Viskositätseffekten, interner Reibung und Dämpfung durch die Kristallhalterung. Die statische Kapazität C_0 bestimmt die Admittanz entfernt von der Resonanz, während die Bewegungskomponenten im Bereich der Resonanz dominieren.^[6]

Im Wesentlichen handelt es sich beim BVD-Schaltbild um die Kombination eines seriellen mit einem parallelen elektrischen Schwingkreis. Der auch als Bewegungsweig (motional branch) bezeichnete Serienschwingkreis wird durch die Induktivität L_q , die Kapazität C_q und den Widerstand R_q repräsentiert. Durch die auf den Kristallflächen aufgetragenen Elektroden tritt eine zusätzliche parallele Kapazität C_0 auf, die zusammen mit den anderen Elementen Bestandteil des parallelen Schwingkreises ist. In Tabelle 2 sind die Ausdrücke für L_q , C_q und R_q sowie C_0 in Abhängigkeit von den quarzspezifischen Parametern ohne Berücksichtigung von Oberschwingungen angegeben.

Tabelle 2. Parameter des BVD-Ersatzschaltbildes und deren Zusammenhänge mit den physikalischen Größen eines AT-cut-Quarzes sowie mit den verschiedenen Resonanzfrequenzen. A = Elektrodenfläche, η_q = Viskosität, d_q = Dicke des Quarzes, ϵ_{22} = Dielektrizitätskonstante des Quarzmaterials, e_{26} = die vom Schnittwinkel abhängige piezoelektrische Konstante, welche sich aus den Matrixelementen e_{11} und e_{14} des piezoelektrischen Polarisationsmoduls e und dem Schnittwinkel ergibt. Die hier aufgeführten Materialkonstanten beziehen sich ausschließlich auf AT-cut-Quarze.^[9]

Parameter	Ausdruck
C_0	$\frac{\epsilon_{22}A}{d_q}$
C_q	$\frac{8Ae_{26}^2}{\pi^2 d_q \epsilon_{66}}$
L_q	$\frac{d_q^3 \rho_q}{8Ae_{26}^2}$
R_q	$\frac{d_q \eta_q \pi^2}{8Ae_{26}^2}$
f_s	$\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{L_q C_q}} \left(1 + \frac{C_0 R_q^2}{2L_q}\right)$
f_p	$\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{L_q C_q}} \left(1 + \frac{C_q}{2C_0} - \frac{C_0 R_q^2}{2L_q}\right)$
f_{Zmin}	$\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{L_q C_q}} \left(1 - \frac{C_0 R_q^2}{2L_q}\right)$
f_{Zmax}	$\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{L_q C_q}} \left(1 + \frac{C_q}{2C_0} + \frac{C_0 R_q^2}{2L_q}\right)$

Das zwischen den beiden aufgedampften Elektroden (Abbildung 5) befindliche Quarzmaterial verhält sich wie ein Dielektrikum in einem Plattenkondensator. Wie sich die Variation der Parameter L_q , C_q und R_q sowie C_0 auf die Resonanzkurven (Impedanzspektren) auswirkt, ist in Abbildung 7 anhand von Simulationen gezeigt. Der Lastwiderstand R_q beinhaltet intrinsische Dämpfungserscheinungen des Schwingquarzes und ist verantwortlich für die Energiedissipation. Die Höhe des Phasenmaximums kann als Kenngröße für das Maß der Dämpfung des Quarzoszillators dienen. Eine exakte Analyse dieser Problematik findet man bei Martin et al.^[17]

Bei vernachlässigbarer Dämpfung ($R_q \rightarrow 0$) weist der Quarz zwei Resonanzfrequenzen auf, die einer Phasenverschiebung von $\varphi = 0$ und einem minimalen sowie maximalen Betrag der Impedanz $|Z|$ entsprechen. Die Frequenzen werden als Resonanzfrequenz f_R und Antiresonanzfrequenz f_A bezeichnet.^[9, 18, 19] Sie unterscheiden sich zunehmend bei steigender elektromechanischer Kopplungskonstante K . Durch den Einfluss der Dämpfung ($R_q > 0$) fällt die Resonanz am Phasenulldurchgang nicht mehr mit der minimalen oder maximalen Impedanz zusammen. In diesem Fall werden insgesamt vier Resonanzfrequenzen unterschieden (Abbildung 8A). f_R spaltet sich in f_{Zmin} , die Frequenz bei minimaler Impedanz ($|Z|$), und f_s , die Frequenz des ersten Nulldurchgangs der Phase φ , auf; f_A spaltet sich in f_p , die Frequenz des zweiten Phasen-

nulldurchganges, und f_{Zmax} , die Frequenz bei maximaler Impedanz, auf. Die Resonanzfrequenzen f_s , f_p , f_{Zmin} und f_{Zmax} ergeben bei hinreichend kleinem R_q in Abhängigkeit von den elektrischen Parametern des BVD-Ersatzschaltbildes einfache Ausdrücke (für die mathematischen Zusammenhänge siehe Tabelle 2).

Die Resonanzfrequenzen in Abhängigkeit vom Dämpfungswiderstand R_q sind in Abbildung 8B dargestellt. Während f_{Zmax} und f_s mit wachsender Dämpfung steigen, fallen f_{Zmin} und f_p mit steigendem R_q . Die Resonanzfrequenzen f_s und f_p fallen mit wachsendem R_q bei $\varphi_{max} = 0$ zusammen.

Die Oszillation des Scherresonators als frequenzbestimmendes Element einer Oszillatorschaltung ist auf den Fall $\varphi_{max} > 0$ beschränkt. Bei größeren Widerständen, die zu $\varphi_{max} \leq 0$ führen, kann nur noch mit Hilfe eines Netzwerkanalysators, für den diese Beschränkung keine Gültigkeit hat, gemessen werden.

2.3.1.1. Fremdmassenbeladung

Historisch geht die erste theoretische Beschreibung der Auswirkung der Fremdmassenbeladung eines TSM-Resonators auf Sauerbrey zurück.^[3] Sauerbrey konnte durch Lösung der eindimensionalen mechanischen Bewegungsgleichung zeigen, dass bei Belegung des Schwingquarzes an Luft oder im Vakuum mit einer starren Fremdmasse eine lineare Beziehung zwischen der Fremdmasse Δm und der Änderung der Resonanzfrequenz Δf besteht. Mit der Näherung, dass das

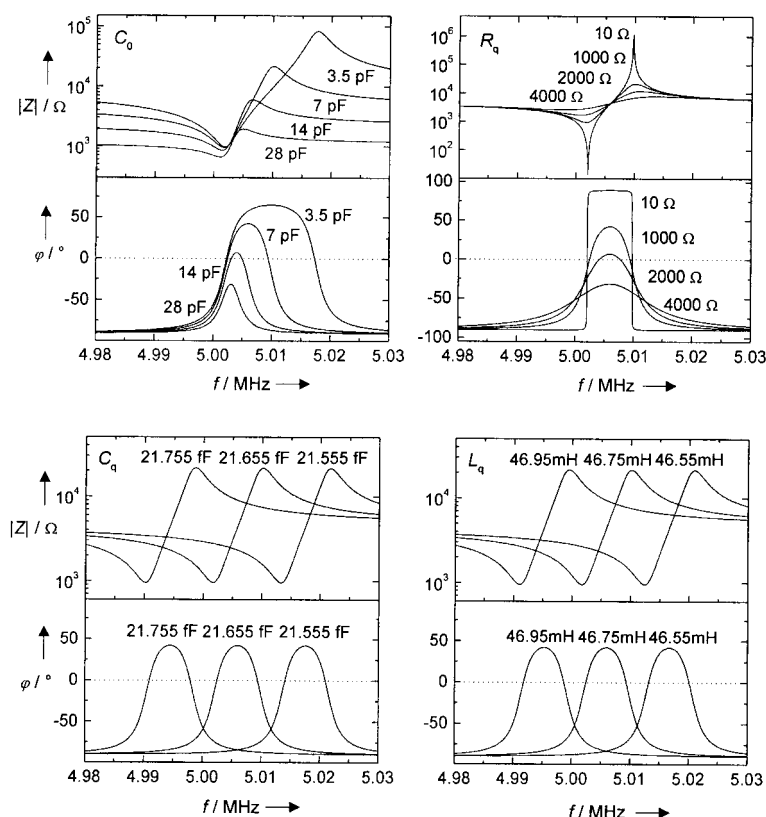


Abbildung 7. Simulierte Impedanzspektren auf der Basis des BVD-Netzwerkes bei diskreter Variation der Impedanzelemente C_0 , C_q , L_q und R_q .

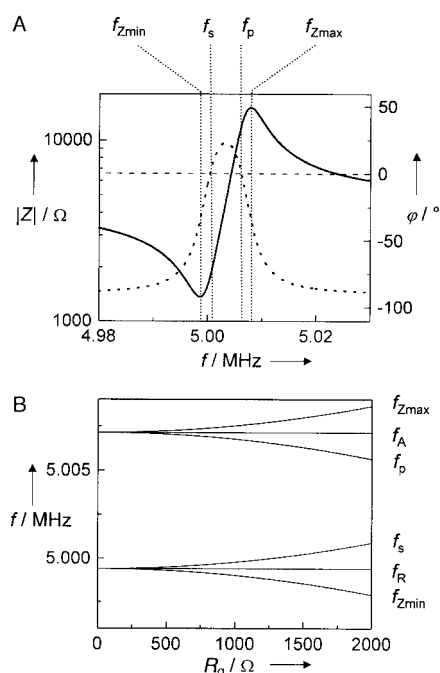


Abbildung 8. A) Simuliertes Impedanzspektrum auf der Basis des BVD-Ersatzschaltbildes mit eingezeichneten Resonanzfrequenzen f_{Zmin} , f_s , f_p und f_{Zmax} für den Fall $R_q > 0$. B) Abhängigkeit der Resonanzfrequenzen f_{Zmin} , f_s , f_p und f_{Zmax} vom Dämpfungswiderstand R_q nach der Näherung von Bottom.^[9] Bei exakter Rechnung fallen f_s und f_p bei $R_q = 2280 \Omega$ zusammen.

Filmmaterial die gleiche Dichte wie der Quarz aufweist, ergibt sich die gesuchte Proportionalität (3).

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\epsilon_{66}\rho_q}} \Delta m = -S_f \Delta m \quad (3)$$

Aus Gleichung (3) geht hervor, dass die Resonanzfrequenz mit steigender Masse fällt, wobei der von Sauerbrey aufgestellte Zusammenhang nur für den Fall starrer, dünner Filme gültig ist. Die Empfindlichkeit der Massenbestimmung, die auch als integrale Schichtwägemempfindlichkeit oder Sauerbrey-Konstante S_f bezeichnet wird, hängt vom Quadrat der Resonanzgrundfrequenz der Oscillation ab [Gl. (3)]. Bei Anregung von Oberschwingungen wächst die integrale Schichtwägemempfindlichkeit proportional zur Schwingzahl.

Betrachtet man die Schichtwägemempfindlichkeit eines Quarzes an bestimmten Punkten orts aufgelöst (Abbildung 9), so stellt man fest, dass diese in der Mitte des Quarzes am größten ist und zu den Elektrodenrändern hin auf null absinkt.

Eine Erklärung für die Beschränkung der Schichtwägemempfindlichkeit auf die Elektrodenflächen liefert das Konzept des Energieeinfangs (energy trapping).^[6] Aufgrund der zusätzlichen Elektrodenmasse ist die Resonanzbedingung und damit auch die Resonanzfrequenz im Bereich der aufgedampften Elektroden eine andere als im unbeschichteten Resonator. Analog zur

Totalreflexion von Licht in einem Wellenleiter, bei der das Licht bei einem entsprechenden Einfallswinkel nicht in das optisch dichtere Medium eindringen kann, bleibt die im Bereich der Elektroden angeregte stehende akustische Welle nahezu auf dieses Gebiet begrenzt – man spricht vom Energieeinfang. Betrachtet man die lateralen Komponenten der akustischen Welle, die sich tangential zur Oberfläche des TSM-Resonators ausbreiten, so werden diese an der Grenzfläche zum unbeschichteten Bereich der Quarzoberfläche fast vollständig reflektiert. Auf diese Weise werden störende Spurmoden wirksam unterdrückt und die Güte des Resonators steigt.^[20] Für die Anwendung von Resonatoren hat das Konzept des Energieeinfangs grundlegende Bedeutung. Ist die Schichtdicke der aufgetragenen Elektroden nicht groß genug, so sind die Resonanzfrequenzen für die Bereiche mit und ohne Elektroden sehr ähnlich und die Energie der akustischen Welle bleibt nicht auf den elektrodenbelegten Bereich begrenzt (gewöhnlich beträgt die Schichtdicke der Elektroden 500 Å). Als Folge des fehlenden Energieeinfangs sinkt die Güte Q der Schwingung beträchtlich. Bei sehr dicken Elektroden hingegen, insbesondere bei Verwendung von Goldelektroden, führt der schlechte Gütefaktor der Goldschicht („totes Dielektrikum“) zu einer Abnahme der Gesamtgüte des Kompositresonators; dieser Effekt macht sich besonders bei höheren Frequenzen bemerkbar.^[21] Eine Verbesserung wäre hier die Verwendung von Aluminium, da es einen geringeren akustischen Absorptionskoeffizienten als Gold aufweist. Ebenfalls erhöhen lässt sich die Güte des Resonators durch eine Vergrößerung der Elektrodenflächen.

Eine analytische Beschreibung der Ortsabhängigkeit der differentiellen Schichtwägemempfindlichkeit s_f ergibt sich aus der radialen Verteilung der Schwingungsamplitude ($s_f(r) \propto |u(r)|^2$)^[22] und liefert eine Bessel-Funktion J_0 erster Art und

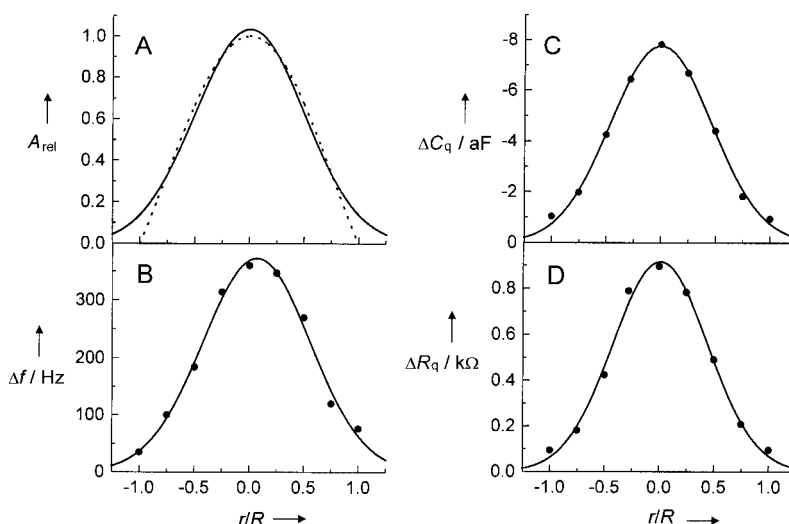


Abbildung 9. A) Radiale Verteilung der relativen Schwingungsamplitude A_{rel} auf der Quarzoberfläche gemäß der Bessel-Funktion (gepunktete Linie) und der Gauß-Verteilung (durchgezogene Linie) mit einer charakteristischen Breite $a = 2$. Die Bessel-Funktion fällt an den Elektrodenrändern bei $r/R = 1$ auf 0 ab, während die Gauß-Verteilung eine Schwingung über den Elektrodenrand hinaus beschreibt. Frequenzerhöhung $\Delta f = f(r) - f_0$ (B), Kapazitätsänderung C_q (C) und Änderung des Widerstandes R_q (D) eines 5-MHz-AT-cut-Quarzes bei Andruck einer Polyethylenspitze auf die Quarzoberfläche unter Wasser; die durchgezogenen Linien sind die Ergebnisse der Anpassung der Parameter einer Gauß-Verteilung an die Daten.

0. Ordnung (Abbildung 9 A).^[12] Die Empfindlichkeit ist in der Mitte des Kristalls bei $r=0$ am höchsten und fällt zum Rand der Elektroden hin auf null ab. Martin und Hager^[23] konnten zeigen, dass die Schwingungsamplitude eines AT-cut-Quarzes entgegen der Vorstellung der Energieeinfangtheorie aufgrund von Feldrandeffekten (field fringing, inhomogenes elektrisches Feld am Elektrodenrand, siehe hierzu auch Abbildung 16) über den Elektrodenrand ($r=R$) hinausreicht. Dieser Effekt tritt verstärkt in einer Umgebung mit hoher Dielektrizitätskonstante auf, wie z.B. in Wasser. Die Amplitude der Scheroszillation hängt von Energieverlusten und somit von der Beladung des Quarzes ab. Bei Kontakt mit wässrigen Lösungen ist der Quarz stärker gedämpft und Feldrandeffekte sind ausgeprägter – die Kurve verbreitert sich und die maximale Amplitude wird kleiner. Empirisch ergab sich daraus eine Näherung für die Schwingungsamplitude durch eine Gauß-Verteilung [Gl. (4)].^[23]

$$u(r) = u_{\max} \exp\left(-a \frac{r^2}{R^2}\right) \quad (4)$$

u_{\max} bezeichnet die maximale Auslenkung am Ort $r=0$ und a eine charakteristische Breite der Verteilungsfunktion, für die typischerweise $a \approx 2$ für einen planparallelen 5-MHz-Quarz in Wasser ermittelt wird. Abbildung 9 A zeigt die beiden Verteilungsfunktionen. Experimentell lässt sich die Verteilung durch das Aufbringen kleiner definierter Massen auf dem Kristall oder durch den Kontakt der Oberfläche mit einer feinen Nadel orts aufgelöst bestimmen. Das Ergebnis eines solchen Experimentes ist in den Abbildungen 9 B–D gezeigt. Die Änderung von Δf , ΔR_q und ΔC_q ist in der Mitte des Kristalls maximal und der radiale Verlauf der Größen wird durch die empirische Gauß-Funktion gut beschrieben. Hillier und Ward^[12] geben eine Lösung der Wellengleichung unter Berücksichtigung von Feldrandeffekten an, wonach die Änderung der Resonanzfrequenz nur dann proportional zur aufgetragten Masse ist, wenn eine homogene Verteilung vorliegt. Bei Elektrolyseprozessen ist dies aber nicht immer der Fall; so wird Material vermehrt an den Elektrodenrändern abgeschieden, was häufig zu systematisch unterbestimmten integralen Schichtwägeempfindlichkeiten führt, da diese meist durch elektrolytisch abgeschiedene Massen kalibriert werden.

Wie oben bereits angedeutet, verliert der von Sauerbrey gefundene Zusammenhang seine Gültigkeit bei großen Schichtdicken, viskosen Flüssigkeiten, elastischen Festkörpern und viskoelastischen Filmen. Um diese Arten von Beladungen zu beschreiben, mussten neben der experimentellen Realisierung – die Aufgabe bestand im Wesentlichen in der Entwicklung von Oszillatorschaltkreisen, mit denen die durch die Beladung auftretende hohe Dämpfung überwunden werden kann – theoretische Modelle entwickelt werden, welche die auftretenden Frequenzänderungen und Impedanzspektren vollständig beschreiben.^[24–29] Da die Beschreibung von Kompositmehrschichtsystemen insbesondere für die Biowissenschaften von besonderer Bedeutung ist, soll im Rahmen dieses Aufsatzes ausschließlich die Strategie der Lösung von Bandey et al.^[25] skizziert werden und sollen Beispiele für die Gültigkeit der theoretischen Betrachtungen behandelt werden.

Ausgehend vom Drei-Pol-Mason-Modell (Abbildung 6 A) lässt sich die einseitige Beladung des Quarzes durch die mechanische Impedanz Z_s gemäß Gleichung (5) beschreiben (T_{xz} = mechanische Spannung in xz -Richtung; V_x = Potential in x -Richtung).

$$Z_s = \frac{T_{xz}}{V_x} \bigg|_{z=0} \quad (5)$$

Die Gesamtimpedanz Z_m setzt sich aus einem Anteil Z_m^0 [Gl. (6a)] für den unbeeinflussten Resonator und einem Anteil Z_m^1 [Gl. (6b)] zusammen, welcher die durch Beladung hervorgerufene Impedanz beinhaltet (ω = Winkelfrequenz).

$$Z_m^0 = \frac{1}{i\omega C_0} \left(\frac{k d_q / K^2}{2 \tan(k d_q / 2)} - 1 \right) \approx R_q + i\omega L_q + \frac{1}{i\omega C_q} \quad (6a)$$

$$Z_m^1 = \frac{k d_q (Z_s / Z_q)}{4 K^2 \omega C_0} \left(1 - \frac{i(Z_s / Z_q)}{2 \tan(k d_q / 2)} \right)^{-1} \approx \frac{n\pi}{4 K^2 \omega C_0} \frac{Z_s}{Z_q} \quad (6b)$$

K bezeichnet die elektroakustische Kopplungskonstante. Die angeführten Näherungen gelten für kleine Belastungen des Quarzes ($Z_s / Z_q < 2 \tan(k d_q / 2)$). Für den Fall $Z_s / Z_q \leq 0.1$ können die Impedanzen in Form des BVD-Ersatzschaltbildes dargestellt werden, wobei Z_m^1 als Zusatzelement in den bereits aus Abbildung 6 B bekannten BVD-Schaltkreis in Serie zum Serienschwingkreis integriert werden kann (Abbildung 10). Die mechanische Impedanz Z_s ist eine komplexe Größe; der Realteil repräsentiert die mechanischen Energieverluste und der Imaginärteil die mechanische Energiespeicherung an der Oberfläche. In Tabelle 3 sind die Impedanzelemente von Z_s für unterschiedliche Oberflächenfilme angegeben.

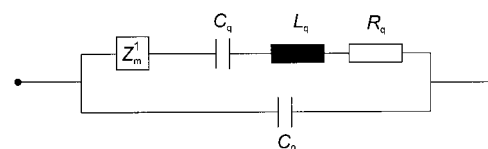


Abbildung 10. Modifizierter BVD-Schaltkreis mit einer komplexen Impedanz Z_m^1 , welche die Beladung der Oberfläche repräsentiert.

Tabelle 3. Mathematische Ausdrücke für die Induktivität L_L und den Dämpfungswiderstand R_L für ausgewählte Beladungen eines AT-cut-Quarzes.^[25]

Beladung	L_L	R_L
starre Masse	$\frac{n\pi}{4 K^2 \omega C_0 Z_q} \frac{\rho_s}{Z_q}$	0
Newtonsche Flüssigkeit	$\frac{n\pi}{4 K^2 \omega C_0 Z_q} \sqrt{\frac{\rho_L \eta_L}{2\omega}}$	$\frac{n\pi}{4 K^2 \omega C_0 Z_q} \sqrt{\frac{\omega \rho_L \eta_L}{2}}$
semi-infinite viskoelastische Schicht	$\frac{n\pi}{4 K^2 \omega C_0 Z_q} \left[\frac{\rho_v (G - G')}{2} \right]^{1/2}$	$\frac{n\pi}{4 K^2 \omega C_0 Z_q} \left[\frac{\rho_v (G + G')}{2} \right]^{1/2}$

Mit den Gleichungen (6a) und (6b) lassen sich nun prinzipiell alle typischen homogenen Oberflächenbeladungen wie dünne starre Massen, viskose Flüssigkeiten und viskoelastische Polymere beschreiben.^[25, 30, 31] Kombinationen dieser

Beladungen lassen sich in günstigen Fällen durch eine Linearkombination der Impedanzelemente beschreiben, solange die Terme für die Wechselwirkungen zwischen den Materialien nicht allzu groß sind. Auf diese Nichtlinearitäten wird später noch einmal eingegangen. Zunächst sollen drei relevante Fälle, denen in den biowissenschaftlichen Anwendungen der Quarzmikrowaage eine besondere Bedeutung zukommt, diskutiert werden: a) eine dünne starre Masse, die mit einer Newtonschen Flüssigkeit überschichtet ist, b) ein semi-infiniter viskoelastischer Körper und c) ein dünner viskoelastischer Körper, der mit einer Newtonschen Flüssigkeit überschichtet ist.

3.2.1.1.1. Mit einer Newtonschen Flüssigkeit überschichtete dünne starre Masse

Wird eine starre, hinreichend dünne Schicht^[32] mit einer semi-infiniten Newtonschen Flüssigkeit überschichtet, so lassen sich die mechanischen Impedanzen der Masse und der Flüssigkeit linear kombinieren (Abbildung 11).

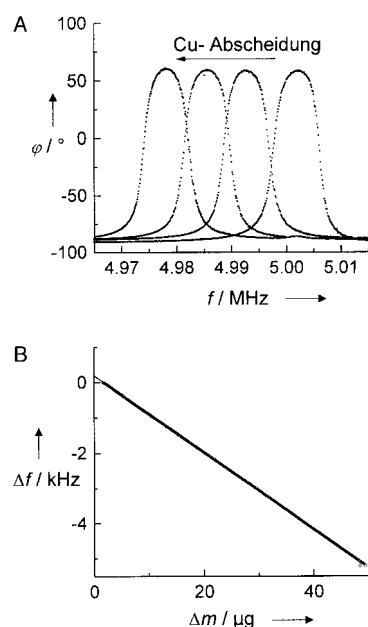


Abbildung 11. A) Impedanzspektren eines 5-MHz-AT-cut-Quarzes vor und nach Abscheidung von 79, 158 und 237 μg Kupfer. Gemessen wurde mit einer Seite des Quarzes in Kontakt mit Wasser. B) Änderung der Resonanzfrequenz bei zunehmender Kupfermasse.

Die mechanische Impedanz einer starren Schicht mit der Flächendichte ρ_s beträgt $Z_s = i\omega\rho_s$, d.h., die Masse schwingt in Phase mit der Quarzoberfläche. Die mechanische Impedanz Z_s einer Flüssigkeit mit der Viskosität η_L und der Dichte ρ_L ergibt sich aus dem Geschwindigkeitsprofil eines laminaren Flusses parallel zur Oberfläche des Kristalls [Gl. (7)], wobei $\delta = \sqrt{2\eta_L/(\omega\rho_L)}$ die Abklinglänge der gedämpften Scherwelle in der Flüssigkeit ist.

$$v_x(z,t) = v_{x,0} e^{-z/\delta} \cos(z/\delta) e^{i\omega t} \quad (7)$$

Die gedämpfte Scherwelle pflanzt sich umso weiter in das Medium fort, je größer die kinematische Viskosität (η_L/ρ_L)

der Flüssigkeit ist. Die Abklinglänge eines 5-MHz-Quarzes beträgt 250 nm für Wasser. Nimmt man eine Beladung des Resonators mit einer Newtonschen Flüssigkeit der Masse $\Delta m = A\rho_L\delta$ an und setzt dies in Gleichung (3) ein, so erhält man den erstmals von Kanazawa und Gordon^[29] aufgestellten Zusammenhang (8) zwischen dem Produkt aus Dichte und Viskosität einer Flüssigkeit und der resultierenden Frequenzänderung.

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_L \rho_L}{\pi \rho_q c_{66}}} \quad (8)$$

Kanazawa und Gordon berücksichtigten bei ihrem Ansatz nicht die Dämpfung durch das viskose Medium. Nach dem elektromechanischen Modell von Martin und Mitarbeitern^[17, 25] kann jedoch gezeigt werden, dass der Ohmsche Widerstand R_L und die Induktivität L_L ebenfalls proportional zur Quadratwurzel des Produktes aus Dichte und Viskosität der Flüssigkeit sind (Abbildung 12 A und B).

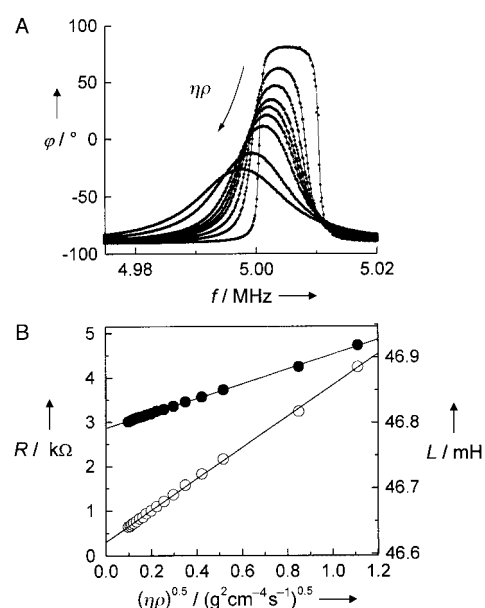


Abbildung 12. A) Einfluss verschiedener Glycerin/Wasser-Gemische auf die Phasenverschiebung. Die durchgezogenen Linien sind die Ergebnisse der Anpassung der Parameter des BVD-Ersatzschaltbildes. Messungen an Luft (Spektrum mit dem größten Phasenmaximum), in Wasser sowie in Glycerin/Wasser-Gemischen mit 40, 55, 60, 65, 70, 80 und 85 % Glycerin (der Pfeil deutet die Zunahme des Glycerinanteils im Gemisch an).^[167] B) Abhängigkeit des Widerstandes R (\circ) und der Induktivität L (\bullet) von der Quadratwurzel des Produktes aus Dichte und Viskosität der Glycerin/Wasser-Gemische. Die Parameter wurden mit einem verallgemeinerten BVD-Schaltkreis bestehend aus L , C , R und C_0 angepasst. Die Kapazität C (21.655 fF) kann aus den intrinsischen Eigenschaften des unbelasteten Quarzes (5 MHz) berechnet werden.

Für den Fall der Linearkombination der mit einer Newtonschen Flüssigkeit überschichteten starren Masse ergibt sich die Gesamtimpedanz der Oberflächenbeladung einfach als Summe der beiden Impedanzen. Die zugehörigen elektrischen Impedanzelemente R_L und L_L ergeben sich ebenfalls aus den entsprechenden Linearkombinationen der in Tabelle 3 angegebenen Ausdrücke. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 11 Impedanzspektren eines mit verschiedenen Kupfermassen beschichteten Quarzes in Wasser dargestellt.

Bei konstantem Dichte-Viskositäts-Produkt gilt auch in Flüssigkeit der lineare Zusammenhang zwischen Frequenzänderung und Massenänderung ohne Veränderung von R_L (Abbildung 11 B).

3.2.1.1.2. Semi-infinite viskoelastische Körper

Der semi-infinite viskoelastische Festkörper zeichnet sich dadurch aus, dass die Scherwelle nicht an der Oberfläche der viskoelastischen Schicht reflektiert wird, d.h., dass die Abklinglänge kleiner als die Schichtdicke des Materials ist. In diesem Fall ist die Wellenbewegung unidirektional, was zu einem einfachen Ausdruck für die mechanische Impedanz Z_s eines Films der Dichte ρ_v führt [Gl. (9)].^[25]

$$Z_s = \sqrt{G\rho_v} \quad (9)$$

G bezeichnet den komplexen Schermodul, wobei $\text{Re}(G)$ als Speichermodul G' und $\text{Im}(G)$ als Verlustmodul G'' bezeichnet wird. Aus den Ausdrücken für R_L und L_L lassen sich die Speicher- und Verlustmodule direkt berechnen, sodass man durch ein entsprechendes Modell z.B. die Viskosität und den Elastizitätsmodul bestimmen kann. Abbildung 13 zeigt das Frequenzverhalten und die Amplitude der Scherbewegung für verschiedene viskoelastische Medien.

3.2.1.1.3. Mit einer Newtonschen Flüssigkeit überschichtete dünne viskoelastische Körper

Die Kombination eines mit einer Newtonschen Flüssigkeit überschichteten dünnen viskoelastischen Films lässt sich nicht mehr durch eine Linearkombination der individuellen mechanischen Impedanzen beschreiben. In diesem Fall ergeben sich Terme für die Wechselwirkungen zwischen den Materialien. Die mechanische Impedanz Z_s solcher nichtadditiver Beladungen können nach Granstaff und Martin^[26] durch die allgemeine Rekursionsformel (10) beschrieben werden, welche ein beliebiges Schichtsystem aus n viskoelastischen Filmen beschreibt.

$$Z_s = \frac{Z_s^{(n+1)} \cosh(\gamma^{(n)} d^{(n)}) + Z_s^{(n)} \sinh(\gamma^{(n)} d^{(n)})}{Z_s^{(n)} \cosh(\gamma^{(n)} d^{(n)}) + Z_s^{(n+1)} \sinh(\gamma^{(n)} d^{(n)})} \quad (10)$$

γ bezeichnet die komplexe Wellenzahl ik , und $Z_s^{(n)}$ ist die charakteristische Impedanz für den n -ten viskoelastischen Film. Die mechanische Impedanz der einzelnen Schichten wird sukzessiv ausgehend von der bekannten charakteristischen Impedanz des obersten Films bis hin zur Resonatoroberfläche bestimmt. Ein Beispiel für einen solchen Fall ist ein mit einer Flüssigkeit beschichteter dünner viskoelastischer Film der Dicke d . Bedingt durch die Phasenverschiebung der Scheroszillation an der Oberfläche des viskoelastischen Films ist eine Beschreibung mit diskreten Impedanzelementen hier nicht zulässig. Bei einer akustischen Phasenverschiebung $\phi = \omega d \text{Re} \sqrt{\rho_v/G}$ von $\pi/2$ ist die Resonanz des viskoelastischen Materials erreicht, und dieser Zustand ist begleitet von einem plötzlichen Anstieg der Resonanzfrequenz und der Dämpfung (Abbildung 13 A, B). Die Oberfläche des Films schwingt bei $\phi > \pi/2$ um 90° phasenverschoben zur Resonatoroberfläche mit höherer Amplitude als der Quarz, dessen Schwingung sehr stark gedämpft wird.

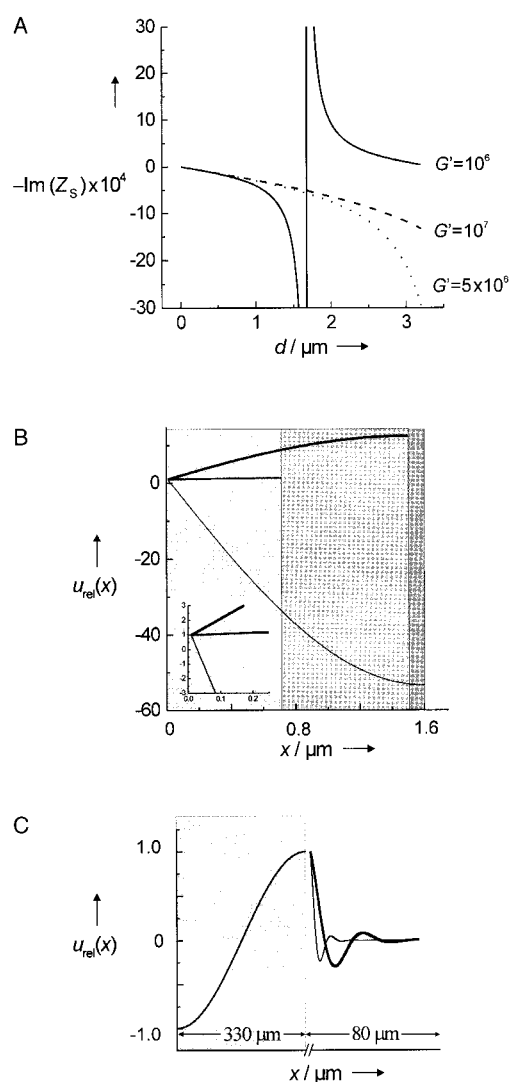


Abbildung 13. A) Numerische Simulation des (zur Frequenzänderung proportionalen) Imaginärteils der mechanischen Impedanz eines verlustfreien viskoelastischen Films in Abhängigkeit von der Schichtdicke. Wird der Film weicher, d.h., nimmt der Schermodul G bzw. G' kleinere Werte an, sind Abweichungen von der Sauerbrey-Gleichung schon bei kleinen Schichtdicken deutlich erkennbar. Bei sehr weichen Filmen ist im betrachteten Dickenbereich auch die Resonanz des Filmes erkennbar, welche bei $\phi = \pi/2$ einsetzt und durch einen starken Anstieg der Resonanzfrequenz gekennzeichnet ist. B) Zugehörige Scherbewegung im Film. Im linearen Bereich der $\text{Im}(Z_s)$ - d -Kurve schwingt die Polymeroberfläche in Phase mit dem Quarz und die Dämpfung ist nahezu null (mittlere Kurve). Bei größerer Dicke kommt es zum Überspringen und die Oberfläche des elastischen Films bewegt sich zwar noch synchron mit der Quarzschwingung, allerdings mit höherer Amplitude (obere Kurve). Direkt nach der Resonanz des Films kehrt sich die Amplitude der Scherbewegung um (untere Kurve), d.h., die Schwingung des Films hinkt der Scheroszillation des Schwingquarzes um 90° hinterher. C) In einem unendlich ausgedehnten weichen viskoelastischen Festkörper pflanzt sich die Scherwelle je nach komplexem Schermodul G und Dichte des Festkörpers mit unterschiedlicher Wellenlänge und Abklinglänge fort.

2.3.1.1.4. Zusammenfassung

Die hier behandelten Fälle von viskoelastischen Schichten und starren Massen in Flüssigkeiten zeigen, dass der Betrieb von TSM-Resonatoren in wässrigen Medien, wie es in den Biowissenschaften fast ausschließlich vorkommt, mit einer

Reihe von experimentellen und theoretischen Problemen behaftet ist. Neben den bereits erwähnten Schwierigkeiten bei der Behandlung nichtlinearer Kompositresonatoren, wie sie z.B. bei der Kombination eines mit einer Newtonschen Flüssigkeit überschichteten dünnen viskoelastischen Films auftreten, sind Beiträge des Elektrolyten, der Rauigkeit der Kristalloberfläche und der Oberflächenbeschaffenheit der Rezeptorschicht sowie der Einfluss longitudinaler Wellen auf die Resonanzfrequenz des Quarzes zu berücksichtigen. Diese Einflüsse sollen im Folgenden genauer beleuchtet werden.

3.2.1.2. Longitudinale Wellen

Füllt man eine leichtflüchtige Flüssigkeit in eine nach oben offene Messkammer, deren Boden ein Schwingquarz ist, so tritt in der zeitlichen Veränderung der Resonanzfrequenz eine niederfrequente periodische Schwankung auf (Abbildung 14). Schließt man die Kammer hingegen luftdicht, so verschwindet diese Instabilität.

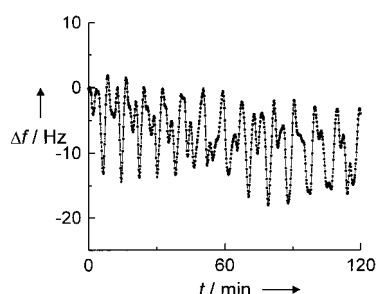


Abbildung 14. Periodische Schwankungen der Resonanzfrequenz eines 5-MHz-Quarzes, der mit Ethanol bedeckt wurde. Ethanol verdampft mit der Zeit, sodass sich die Resonanzbedingung der Longitudinalwelle, die an der Ethanol-Luft-Grenzfläche reflektiert wird, kontinuierlich ändert.

Diese Beobachtung lässt sich durch die Erzeugung von longitudinalen Wellen am Ort der Scherbewegung erklären. Durch die Verdunstung der Flüssigkeit kommt es je nach Flüssigkeitsstand in der Messkammer zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz der an der Flüssigkeit-Luft-Grenzfläche reflektierten longitudinalen stehenden Welle. Der Ursprung longitudinaler Wellen kann zum einen im Auftreten von anderen Modi (longitudinal, flexural (Biegung)) als der Scherschwingung gesucht werden, zum anderen, wie von Martin und Hager gezeigt,^[23] im Geschwindigkeitsgradienten der Scherschwingung entlang der x -Achse (Abbildung 15).

Lin und Ward^[33] sowie Schneider und Martin^[34] konnten durch ein einfaches Experiment und theoretische Rechnungen zeigen, dass in der Tat Longitudinalwellen von der Quarzoberfläche gebildet und an einer Grenzfläche reflektiert werden. Sie platzierten parallel zur Quarzscheibe mehrere 100 μm entfernt eine Glasplatte, deren Höhe durch eine Mikrometerscheibe in z -Richtung verstellt werden konnte. Wie sich zeigte, ändern sich die Resonanzfrequenz sowie der Dämpfungswiderstand R periodisch mit dem Abstand des Reflektors von der Quarzoberfläche mit einer Periodizität von $\lambda_c/2$, wobei λ_c die Wellenlänge der Longitudinalwelle in der Lösung ist.

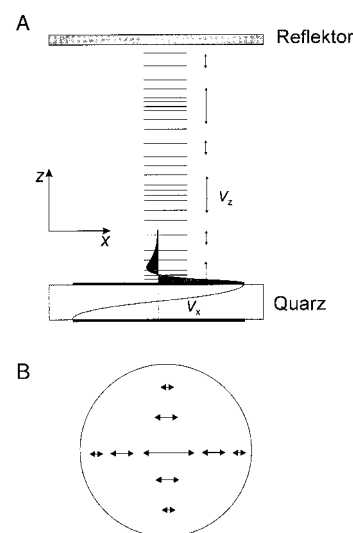


Abbildung 15. A) Darstellung der durch die unterschiedlichen Geschwindigkeitsgradienten der Partikelbewegung auftretenden Longitudinalwellen in der über dem Quarz befindlichen Flüssigkeit; die Longitudinalwellen werden an der Glasfläche reflektiert und bilden eine stehende Welle. B) Geschwindigkeitsverteilung der Partikelbewegung auf der Quarzoberfläche.^[34]

3.2.1.3. Leitfähigkeit und Dielektrizitätskonstante der Lösung

Ein weiterer bedeutender Faktor, welcher die Resonanzfrequenz eines Scherwellenresonators in Lösung beeinflussen kann, ist die Ionenstärke bzw. die Dielektrizitätskonstante der Lösung. Muss zur Detektion der Bindung von Biomolekülen der Puffer gewechselt werden tritt je nach Elektrodenform, Leitfähigkeit und Resonanzfrequenz eine unerwünschte Frequenzänderung auf, die durchaus dem Messsignal entsprechen kann. Die Serienresonanz ist von Änderungen der Leitfähigkeit und der Dielektrizitätskonstanten nur sekundär betroffen,^[35] da alle Effekte, welche zusätzliche Impedanzelemente parallel zum Serienschwingkreis einführen, ausschließlich die Parallelresonanz beeinflussen.^[36] Zeichnet man die Parallelresonanz in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit der Lösung auf, so sinkt diese stetig. Ein erweitertes BVD-Ersatzschaltbild, welche die experimentellen Befunde erklärt, stammt von Shana und Josse.^[37]

Entscheidend für den Einfluss der Dielektrizitätskonstanten und der Leitfähigkeit der Lösung ist das parallele RC-Glied (Abbildung 16B). Bei hohen Leitfähigkeiten kann R_G vernachlässigt werden, sodass C_G und $C_{0,A}$ zusammenfallen und sich so wieder das gewöhnliche BVD-Ersatzschaltbild – allerdings mit modifizierter Kapazität C_0 – ergibt. In einer umfassenden Studie konnten Rodahl et al.^[38] den Einfluss der Leitfähigkeit auf Serien- und Parallelresonanz sowie auf die Dämpfung des Resonators für unterschiedliche Elektrodenformen getrennt untersuchen.^[39] Dabei zeigte sich, dass der Ursprung der beobachteten Phänomene in Feldrandeffekten (Abbildung 16A) zu suchen ist. Feldrandeffekte hängen erheblich von der Elektrodenform ab: So zeigen ringförmige Arbeitselektroden, bei denen die Mitte des Quarzes unbeschichtet bleibt, die stärkste Änderung der Parallelresonanzfrequenz mit der Ionenstärke, während bei komplett elektrodenbelegten Quarzoberflächen in Kontakt mit der Flüssigkeit nahezu keine Abhängigkeit festgestellt werden kann.

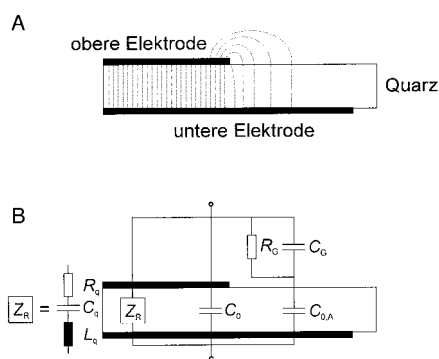


Abbildung 16. A) Verlauf der Feldlinien am Rand der Elektroden eines Quarzoszillators. Die Änderung der Resonanzfrequenz des Quarzes bei Veränderung der Ionenleitfähigkeit in der Lösung ist auf Feldrandeffekte zurückzuführen. B) Diese Randeffekte des elektrischen Feldes können im Ersatzschaltbild durch ein RC-Glied (R_G und C_G) repräsentiert werden. Durch die Ausbreitung des elektrischen Feldes über den Elektrodenrand hinaus ist die effektive Fläche des schwingenden Anteils des Quarzes vergrößert, sodass sich auch die Kapazität C_0 des Quarzes um $C_{0,A}$ vergrößert.^[37, 38]

3.2.1.4. Oberflächenrauigkeit

Die Oberflächenrauigkeit der Quarze spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Deutung von Adsorptionsprozessen, insbesondere dann, wenn sich die Hydropathie der Oberfläche während der Adsorption ändert. Raue hydrophile Oberflächen schließen einen Teil der Flüssigkeit ein (entrapped liquid). Die eingeschlossene Flüssigkeit wird bei der Scheroszillation wie eine zusätzliche Masse mitbewegt und trägt so zu einer weiteren Frequenzerniedrigung bei.^[40, 41] Ist die Oberfläche eines rauen Quarzes hydrophob, so benetzt eine polare Flüssigkeit wie Wasser nicht mehr die gesamte Oberfläche – es bilden sich luftgefüllte oder luftleere Hohlräume (Abbildung 17),^[41] sodass die dämpfende Wirkung der Flüssigkeit auf einer rauen hydrophoben Quarzoberfläche im

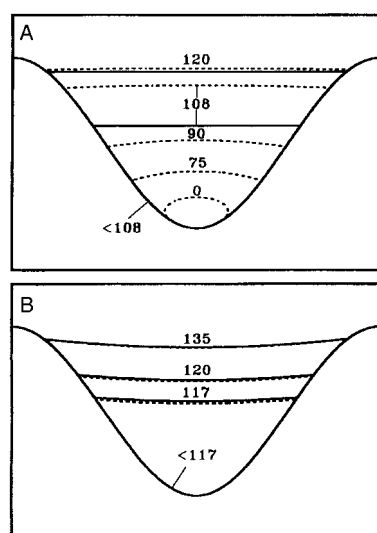


Abbildung 17. Querschnitt verschiedener Flüssigkeitsmenisken, die bei einer gewellten, rauen Oberfläche in Abhängigkeit vom Kontaktwinkel gebildet werden, mit (A) und ohne eingeschlossene Luft (B). Die gestrichelten Linien zeigen die anfängliche Eindringtiefe für den jeweiligen mikroskopischen Kontaktwinkel, die durchgezogenen den Flüssigkeitsmeniskus im Gleichgewicht; bei einem Kontaktwinkel $< 108^\circ$ bzw. $< 117^\circ$ wird die Oberfläche vollständig von der Flüssigkeit benetzt.^[7]

Vergleich zu der bei einer rauen hydrophilen Oberfläche deutlich geringer ist. Das bedeutet, dass die Resonanzfrequenz bei einem Wechsel von einer hydrophoben zu einer hydrophilen Oberfläche signifikant sinkt. Um Frequenzänderungen aufgrund wechselnder Hydropathie der Oberfläche gering zu halten, sollten möglichst glatte Oberflächen verwendet werden.

3.2.1.5. Elektrochemische Doppelschicht

Eine sinnvolle Näherung für den Einfluss der elektrochemischen Doppelschicht an der Resonator-Wasser-Grenzfläche stammt von Tsionsky et al.^[42] Diese Autoren behandeln die elektrochemische Doppelschicht aufgrund ihrer geringen Ausdehnung in z -Richtung als starre Masse und erhalten eine zusätzliche Frequenzänderung Δf_{DS} , welche durch Änderungen der elektrochemischen Doppelschicht an der Quarz-Flüssigkeits-Grenzfläche verursacht wird. Die Dicke der elektrochemischen Doppelschicht in Gegenwart eines 1:1-Elektrolyten beträgt bei einer Elektrolytkonzentration von 0.1M ca. 1 nm. Beachtet man, dass die Ausdehnung der Scherwelle in Wasser jedoch mit 250 nm wesentlich weiter als die elektrochemische Doppelschicht in den Elektrolytraum hineinreicht, lässt sich die Annahme rechtfertigen, dass die elektrochemische Doppelschicht in Phase mit der Scheroszillation der Quarzoberfläche schwingt und somit wie eine dünne starre Masse behandelt werden kann. Eine Änderung der elektrochemischen Doppelschicht durch zusätzliche adsorbierte geladene Spezies oder Änderungen der Ionenstärke der Lösung führt in Analogie zur Sauerbrey-Gleichung zu einer Frequenzverschiebung [Gl. (11a) und (11b)].

$$\Delta f_{DS} = - \frac{2f_0^2}{A\sqrt{\epsilon_{66}\rho_q}} \Delta m_{DS} \quad (11a)$$

$$\Delta m_{DS} = \frac{q_+}{F} (M_A - M_w n_A) - \frac{q_-}{F} (M_K - M_w n_K) \quad (11b)$$

M_A und M_K sind die Molekülmassen der Anionen bzw. Kationen, M_w ist die Molekülmasse des Wassers, n_A und n_K bezeichnen die Zahl der Wassermoleküle, die durch die Adsorption der Anionen bzw. Kationen von der Oberfläche verdrängt wurden und q_- und q_+ sind die negativen bzw. positiven Überschussladungen auf der Resonatoroberfläche. Adsorbieren z.B. Partikel mit positiven Ladungen auf der Resonatoroberfläche, so erhöht sich bei hinreichend großen Gegenionen die scheinbare Masse der Partikel aufgrund der größeren Masse der elektrochemischen Doppelschicht, die sich an der Grenzschicht der adsorbierten Partikel und der Flüssigkeit bildet. Geladene Partikel können demnach bei entsprechender Elektrolytzusammensetzung eine größere Resonanzverschiebung als ungeladene verursachen. Unberücksichtigt bleiben bei diesem Modell Auswirkungen auf die hydrodynamischen Eigenschaften der überstehenden Flüssigkeit.

2.3.1.6. Zusammenfassung

Die in den Abschnitten 2.3.1.2 bis 2.3.1.5 aufgeführten Einflüsse von in Flüssigkeiten auftretenden Phänomenen zeigen, dass die Quarzmikrowaage, wie sie in den Biowissen-

schaften eingesetzt wird, nicht uneingeschränkt als einfacher Massensensor verwendet werden darf. Im Gegenteil, es muss eine Vielzahl von Einflüssen berücksichtigt werden, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. So gilt es, Änderungen der Hydropathie sowie der Oberflächenladungsdichte während der Adsorption eines Biomoleküls zu berücksichtigen, Temperatur und Ionenstärke der Lösung konstant und Schwankungen des Flüssigkeitsmeniskusses gering zu halten. Allerdings ist es dann auch möglich, neben der abgeschiedenen Masse weitere Parameter des Systems zu erhalten, wie z. B. die Viskosität oder die Elastizität. Bevor im Folgenden einige signifikante Ergebnisse der Untersuchung von Biomolekülen vorgestellt werden, soll noch ein kurzer Überblick über die anderen bekannten Resonatortypen gegeben werden.

2.3.2. Surface-acoustic-wave(SAW)-Sensoren

Akustische Oberflächenwellen (surface acoustic waves, SAW) wurden erstmals von Rayleigh beschrieben, der entdeckte, dass bei einer spannungsfreien Oberfläche eines Festkörpers elastische Wellen entstehen, die sich ausschließlich auf der Oberfläche als gekoppelte longitudinale und transversale Wellen fortpflanzen. Die Frequenz der angeregten Schwingung liegt gewöhnlich zwischen 50 MHz und einigen GHz.^[7] Die Auslenkung fällt exponentiell ab, die Oberfläche verhält sich daher wie ein akustischer Wellenleiter (evaneszierendes Feld). Akustische Oberflächenwellen lassen sich durch Aufbringen von lithografischen Interdigitalelektroden (siehe Abbildung 3) auf einem piezoelektrischen Einkristall aus z. B. Quarz, Lithiumniobat oder Lithiumtantal anregen und abgreifen (interdigital transducer, IDT), wobei jeder „Finger“ Entstehungsort einer Oberflächenwelle ist. Die größte Effektivität wird erreicht, wenn die Periodizität der Elektroden des Signalwandlers der Wellenlänge der Oberflächenwelle entspricht. Dies ist bei der Frequenz $f = v_p/d$ der Fall, wobei v_p die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Welle und d der Abstand zwischen den Interdigitalstrukturen ist. Man unterscheidet generell zwischen Anordnungen mit zwei Elektroden (two port delay lines) und One-port-Resonatoren.^[43] Bei ersteren fungiert ein IDT als Transmitter und der andere als Empfänger. Der Abstand zwischen den IDTs bestimmt die Verzögerungszeit zwischen Sendung und Empfang der akustischen Oberflächenwelle. Bei den One-port-Resonatoren wird ausgehend von einem IDT zwischen zwei Reflektoren eine stehende Welle in beide Richtungen erzeugt. Die Resonanzfrequenz ist gegeben durch $f_n = n v_p/2l$, wobei l der Abstand zwischen den Reflektoren ist. Der Gütefaktor von SAW-Resonatoren liegt zwischen 6000 und 12000 und ist damit deutlich niedriger als der von TSM-Resonatoren an der Luft (20000–50000, 10-MHz-Quarz).

2.3.2.1. Fremdmassenbeladung

Handelt es sich bei der aufgetragenen Masse um einen starren, dünnen Film, der sich synchron zu den Oberflächenwellen bewegt, so wird die kinetische Energie ohne Energiedissipation der Schwingung erhöht. Dies führt zu einer Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Wellen.

Aus diesen Betrachtungen ergibt sich für die relative Frequenzänderung Gleichung (12).^[7]

$$\frac{\Delta f}{f} = \frac{\Delta v}{v_p} = -c_t^{\text{SAW}} f \rho_s \quad (12)$$

Man beachte die Ähnlichkeit zu Gleichung (3). Wiederum wächst die Massenempfindlichkeit mit dem Quadrat der Grundfrequenz, die sehr viel höher ist (typischerweise im Bereich von einigen 100 MHz) als die von TSM-Resonatoren. Die Empfindlichkeit eines 100-MHz-SAW-Sensors ist somit an Luft ca. 200-mal höher als die eines 5-MHz-TSM-Resonators. Für die Biowissenschaften sind SAW-Sensoren jedoch von untergeordnetem Interesse, da in Flüssigkeiten eine starke Energiedissipation (Dämpfung) auftritt, welche im Wesentlichen durch zwei Mechanismen bestimmt wird. Durch Auslenkungen parallel zur Oberflächennormalen und durch viskose Ankopplung der Komponente ebenfalls parallel zur Oberfläche werden in der Flüssigkeit Kompressionswellen erzeugt.

2.3.3. Acoustic-plate-mode(APM)-Sensoren

APM-Sensoren sind speziell geschnittene Quarz-Einkristalle, die einen akustischen Wellenleiter darstellen, wobei die akustische Welle anders als bei den SAW-Sensoren das ganze Material durchdringt.^[44] APM-Resonatoren sind für die Verwendung in Flüssigkeiten wesentlich interessanter als SAW-Sensoren, da bei ihnen die Bewegungskomponenten parallel zur Oberflächennormalen fehlen. So genannte Shear-horizontal(SH)-APM-Resonatoren weisen vorwiegend Auslenkungen parallel zur Oberfläche und senkrecht zur Ausbreitungsrichtung auf. Der Verlust akustischer Energie durch Wechselwirkung mit dem Medium wird dabei stark verringert. Die Partikel auslenkung weist nur eine Komponente auf.^[45] Man kann die SH-Platten-Modi als Überlagerung von Plane- und In-plane- (= Shear-horizontal-) Wellen verstehen. Wie die SAW-Sensoren lassen sich auch die APM-Sensoren durch lithographische Aufprägung von Metallelektroden erhalten (Abbildung 3). Ein entsprechender Signalwandler mit der Periodizität b und einer Plattendicke d liefert näherungsweise die durch Gleichung (13) gegebene Eigenfrequenz.^[45]

$$f_n = \frac{v_p}{b} \left[1 + \left(\frac{nb}{2d} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (13)$$

2.3.3.1. Fremdmassenbeladung

Genau wie beim TSM- und SAW-Resonator gilt, dass die Abscheidung eines idealen Massenfilms zu einer Zunahme der kinetischen Energie und so zu einer Abnahme der Ausbreitungsgeschwindigkeit der akustischen Welle führt [Gl. (14)].^[7]

$$\frac{\Delta f}{f} = \frac{\Delta v}{v_p} = -c_t^{\text{APM}} \rho_s \quad (14)$$

c_t^{APM} ist die Massenempfindlichkeit des Sensors und ρ_s die Oberflächenmassendichte der aufgetragenen Fremdmasse.

2.3.4. Flexural-plate-wave (FPW)-Resonatoren

Bei den FPW-Resonatoren handelt es sich um eine dünne, rechteckige Membran aus spannungsfreiem Siliciumnitrid, welche in einem Rahmen aus Silicium eingefasst ist. Hergestellt werden derartige akustische Resonatoren durch photolithografische Verfahren. Die Eigenschwingungen dieser nur wenige Mikrometer dicken Membran werden piezoelektrisch über IDTs, elektrostatisch oder durch magnetische Signalwandler angeregt. Die Besonderheit dieser Resonatoren liegt in der hohen Güte der Schwingung bei geringen Energieverlusten in Flüssigkeiten und relativ niedrigen Resonanzfrequenzen. Trotz der hohen Amplitude von ca. 100 nm ist die Energiedissipation gering, da die Phasengeschwindigkeit der angeregten akustischen Welle unterhalb der Schallgeschwindigkeit in den meisten Flüssigkeiten liegt ($900\text{--}1500\text{ m s}^{-1}$).^[7] Die niedrigen Frequenzen (1–10 MHz) haben zudem den Vorteil, eine preiswerte Beschaltung zuzulassen, sodass sich hier in Zukunft eine attraktive Alternative zu den weniger empfindlichen TSM-Resonatoren anbietet. Die hohe Amplitude der Schwingung ermöglicht auch den Einsatz von FPW-Resonatoren als Aktuatoren, mit denen Flüssigkeiten und z. B. granuläre Festkörper bewegt werden können.

Der einfachste Fall einer schwingenden Platte beinhaltet eine unendliche Zahl von Wellen, die auch als Lamb-Wellen bezeichnet werden.^[46, 47] Die Wellen teilen sich in zwei Gruppen, symmetrische (S) und antisymmetrische (A). Bei hinreichend dünnen Membranen treten zwei Wellen auf, A0 (niedrigste Ordnung, antisymmetrisch) und S0 (niedrigste Ordnung, symmetrisch), die sich drastisch in ihrer Phasengeschwindigkeit unterscheiden. Bei abnehmender Membrandicke sinkt die Phasengeschwindigkeit der antisymmetrischen Wellen auf null ab, während die der symmetrischen auf einen Maximalwert steigt. Beschränkt man die Betrachtungen auf die A0-Welle, so wird deutlich, dass die Frequenz bei gegebener Wellenlänge λ mit abnehmender Dicke sinkt [Gl. (15)].^[7]

$$f = \frac{1\sqrt{B}}{\lambda M} \quad (15)$$

B ist der Biegemodul der Membran^[48] und M die spezifische Masse der Membran pro Fläche.

2.3.4.1. Fremdmassenbelegung

Erhöht man die Masse der Membran durch Abscheidung einer hinreichend dünnen starren Fremdmasse, so sinkt die Phasengeschwindigkeit der A0-Lamb-Welle gemäß Gleichung (16).^[7]

$$\frac{\Delta f}{f} = \frac{\Delta v}{v_p} = -\frac{\rho_s}{2M} \quad (16)$$

Somit kann die Schichtwägemempfindlichkeit mit $-1/(2M)$ angegeben werden. Die Massenempfindlichkeit eines FPW-Resonators lässt sich erhöhen, indem man die Membran dünner macht, also die Phasengeschwindigkeit senkt und damit auch die Grundfrequenz.

Ein Vergleich der Empfindlichkeiten der hier vorgestellten Resonatortypen ist in Tabelle 4 gegeben.

3. Adsorption von Biomolekülen und Zellen

3.1. Messaufbauten für die Quarzmikrowaage

Die zentrale Komponente einer Quarzmikrowaage ist die AT-cut-Quarzscheibe mit Grundresonanzfrequenzen, die typischerweise im Bereich von 5–30 MHz liegen; allerdings werden aus praktischen Gründen zumeist Quarze mit Grundresonanzfrequenzen von 4–10 MHz verwendet. Wird eine höhere Resonanzfrequenz als 15 MHz benötigt, weicht man meist auf die Anregung von Oberschwingungen aus, obwohl auch hochempfindliche Quarze mit Grundresonanzfrequenzen von 30 MHz Verwendung finden.^[49]

Die Analyse von Biomolekülen und Zellen erfordert Messungen in Flüssigkeiten – vorwiegend in wässrigen Medien. Durch die Entwicklung geeigneter Schaltkreise konnten AT-cut-Quarze in Lösung zur Schwingung angeregt werden,^[50, 51] was der Quarzmikrowaage den Einzug in die Biowissenschaften eröffnete. Mehrere prinzipiell unterschiedliche Aufbauten für die Quarzmikrowaage sind bis heute realisiert worden:

- In einer Durchflusszelle wird der Quarz gewöhnlich zwischen zwei Dichtringe eingespannt. Da die durch eine Gauß-Kurve beschriebene radiale Schichtwägemempfind-

Tabelle 4. Vergleich der verschiedenen akustischen Resonatoren. d = Plattendicke; λ = Wellenlänge der akustischen Welle; f = Frequenz; S_m = Massenempfindlichkeit.

Resonator	d	Medium	f [Hz]	Beispiel	Temperaturstabilität	S_m ^[a] [(Hz/MHz) (ng/cm ²) ⁻¹]
TSM	$\lambda/2$	g, fl	4–30	Quarz 6 MHz, $d = 277\text{ }\mu\text{m}$ $v_p = 3330\text{ m s}^{-1}$, $\lambda = 554\text{ }\mu\text{m}$	hoch	0.014 (6 MHz)
SAW	$\gg \lambda$	g	30–500	Quarz 158 MHz, $d = 760\text{ }\mu\text{m}$ $v_p = 3160\text{ m s}^{-1}$, $\lambda = 20\text{ }\mu\text{m}$	hoch/mittel	0.20 (158 MHz)
SH-APM	$3\text{--}10\lambda$	g, fl	25–200	Quarz 101 MHz, $d = 203\text{ }\mu\text{m}$ $v_p = 5060\text{ m s}^{-1}$, $\lambda = 50\text{ }\mu\text{m}$	hoch	0.019 (101 MHz)
FPW	$\ll \lambda/2$	g, fl	2–7	ZnO 5.5 MHz, $d = 3.5\text{ }\mu\text{m}$ $v_p = 550\text{ m s}^{-1}$, $\lambda = 100\text{ }\mu\text{m}$	mittel	0.38 (5.5 MHz)

[a] $S_m = \frac{\Delta m}{\Delta f} = (\Delta f/f)1/\rho_s$ [(Hz/MHz) (ng/cm²)⁻¹].

lichkeit zum Rand der Quarzscheibe hin stark abnimmt, ist es ratsam, die Kontaktfläche des Dichtringes möglichst klein und weit außen von der Quarzscheibe zu wählen, sodass die Dämpfung des Quarzes minimal und damit die Güte der Quarzschwingung maximal ist. Um zu vermeiden, dass die Longitudinalwelle an der Luft-Wasser-Grenzfläche reflektiert wird und so die Resonanzfrequenz des Schwingquarzes beeinflusst, muss die Messkammer abgedichtet sein. Auf diese Weise werden Luftblasen und eine Veränderung des Flüssigkeitsmeniskus vermieden. Durch einen Zu- und Ablauf kann in dieser Messanordnung zu jedem Zeitpunkt die zu untersuchende Substanz unter gleichzeitiger Aufnahme der Resonanzfrequenzverschiebung zugeführt werden, sodass neben Gleichgewichtswerten auch kinetische Daten erhalten werden können. Die Zeitauflösung des Quarzes wird im Wesentlichen durch seine Güte begrenzt und ist üblicherweise im oberen Millisekundenbereich. Durch das Durchflusssystem ist zudem eine Durchmischung der Lösung gewährleistet, was eine Untersuchung der Kinetik des geschwindigkeitskontrollierten Anbindungsprozesses ermöglicht. Auch können diese Aufbauten für sensorische Anwendungen vollautomatisiert werden.

- b) Eine andere Möglichkeit, den Quarz nur auf einer Seite in Kontakt mit der Flüssigkeit zu bringen, besteht darin, ihn auf einer Seite mit einer Polymerhülle zu versehen, sodass die Quarzscheibe vollständig in eine Flüssigkeit getaucht werden kann, dabei aber nur eine Seite in direkten Kontakt mit der Flüssigkeit kommt. Die Substanz wird hierbei über eine Spritze zugegeben und die Lösung kontinuierlich gerührt.
- c) In einer weiteren Technik wird die Quarzscheibe horizontal an eine Luft-Wasser-Grenzfläche herangefahren, an der zuvor ein Film gespreitet und bis zu einem bestimmten Druck komprimiert wurde. Das Quarzplättchen ist so in direktem Kontakt mit der Monoschicht. Durch Zugabe des Analyten in die wässrige Phase kann die Wechselwirkung untersucht werden.
- d) Das wohl einfachste Verfahren ist die Adsorption von Biomolekülen in Lösung, während die eigentliche Frequenzmessung an Luft erfolgt. Auf diese Weise können nur Endwerte bestimmt werden, die aufgrund des ständigen Wechsels zwischen Luft und Flüssigkeit mit einem relativ hohen Fehler behaftet sind. Die so erhaltenen Resonanzfrequenzverschiebungen unterscheiden sich zu meist erheblich von denen in Lösung, da der Wassergehalt der Biomoleküle eine entscheidende Rolle bei der Frequenzantwort spielt. Der einzige Vorteil dieser Technik besteht darin, dass in diesem Fall für die Biofilme die Gültigkeit der Sauerbrey-Gleichung vorausgesetzt werden darf.
- e) Aus der Erkenntnis heraus, dass die Schwingung des Quarzes durch die Flüssigkeit beeinflusst wird, hat sich die so genannte Referenzkristallmethode entwickelt. In diesem Aufbau werden zwei Quarze parallel betrieben. Einer der beiden Quarze wird funktionalisiert und beide werden dem gleichen Medium ausgesetzt, sodass netto nur die reine Adsorption der Biomoleküle detektiert wird. Diese Methode hat sich bisher jedoch nicht durchgesetzt, da

neue Probleme aufgrund von Unterschieden in den Oberflächen der beiden Kristalle und daraus resultierenden Temperatur- und Resonanzfrequenzinstabilitäten auftreten.

Es existieren zwei grundsätzlich unterschiedliche Betriebsmodi von TSM-Resonatoren. Zum einen kann ein solcher Quarzkristall als frequenzbestimmendes Glied in einem Oszillatorschaltkreis eingesetzt werden und über die Bestimmung der Frequenz der Bedeckungszustand des Kristalls ausgelesen werden. Letzteres wird standardmäßig durch einen Oszillatorschaltkreis mit angeschlossenem Frequenzzähler erreicht. Diese Betriebsart wird als aktiv bezeichnet, da der Kristall in Resonanz schwingt und der Oszillatorschaltkreis nur die dissipierte Energie zurückführt. Dabei gilt zu beachten, dass häufig die vom Oszillatorschaltkreis unterstützte Resonanzfrequenz nicht bekannt ist und so die Ergebnisse je nach Beschaltung abweichen können. Insbesondere wenn Energiedissipationen aufgrund einer viskoelastischen Beladung auftreten, können völlig unterschiedliche Frequenzänderungen die Folge sein. Die Gleichungen in Tabelle 2, welche die unterschiedlichen Resonanzfrequenzen eines moderat gedämpften Systems beschreiben, verdeutlichen diese Problematik. Aus diesem Grund ist es sinnvoll zu wissen, ob die Serien- oder die Parallelresonanz vom Oszillatorschaltkreis unterstützt wird. Bei der Rückkopplung kommt es allerdings meist zu unvermeidlichen Phasenverschiebungen, die zu einer signifikanten Abweichung von der reinen Serien- oder Parallelresonanz führen, sodass die Festlegung der Resonanzfrequenz mitunter schwierig sein kann.

Bei der passiven Methode wird mit Hilfe eines Spektrumanalysators/Frequenzgenerators der Kristall zu einer erzwungenen Schwingung in der Nähe der Resonanz angeregt und die komplexe elektrische Impedanz (bzw. Admittanz) in Abhängigkeit von der Frequenz detektiert. Durch Anpassen der Parameter des BVD-Ersatzschaltbildes (Abbildung 6B) kann so die reine Massenbeladung sauber von energiedissipierenden Phänomenen getrennt werden.

Ein Zwischenglied zwischen der einfachen Frequenzmessung und der Netzwerkanalyse ist die von Kasemo und Mitarbeitern^[52] entwickelte und inzwischen kommerziell erhältliche QCM-D-Technik, die eine Messung der Resonanzfrequenz und gleichzeitig des Dissipationsfaktors erlaubt. Dabei wird der Quarz durch einen Frequenzgenerator zum Schwingen angeregt und anschließend die Quelle abgeschaltet, sodass es zum freien Ausschwingen des Quarzes kommt. Dieser Vorgang wird jede Sekunde wiederholt. Durch eine Kurvenanpassung erhält man den Dissipationsfaktor und gleichzeitig die Resonanzfrequenz. Die Dämpfung kann auch mit Hilfe eines amplitudenregulierten Oszillatorschaltkreises bestimmt werden, der neben der Resonanzfrequenz die Amplitude liefert.^[53]

3.2. In-situ-Hybridisierung von DNA/RNA auf Schwingquarzträgern

Die Analyse von genetischem Material, wie sie bei der Erkennung erblicher und infektiöser Krankheiten, bei der Klassifizierung von Organismen und in der forensischen

Chemie eingesetzt wird, hat einen enormen Stellenwert erzielt und zur raschen Entwicklung einer Vielzahl von Verfahren geführt, um Nucleinsäuren empfindlich, selektiv und schnell, im Sinne von High-throughput-Verfahren, quantifizieren zu können. Im Zuge dieser Entwicklungen wurde auch die Mikrogravimetrie in das Repertoire der Signalwandler aufgenommen, die es erlaubt, die Hybridisierung von Oligonucleotiden sondenfrei und online detektieren zu können. Die erste Beschreibung des direkten Nachweises von Nucleinsäuren mit Hilfe eines akustischen Sensors stammt von Fawcett et al.^[54] Allerdings wurden diese Messungen nur an der Luft durchgeführt. Die erste In-situ-Messung in Lösung erfolgte mit einem akustischen Plattenschwinger^[44] und die zweite mit einem Dickenschwinger, an den eine Einzelstrang-DNA über eine selbstorganisierte 11-Sulfanylundecanolschicht an die Goldoberfläche gebunden war.^[55]

Zentraler Schritt zur Entwicklung mikrogravimetrischer Nucleinsäuresensoren ist die Immobilisierung eines Einzelstrang-Oligonucleotids auf der Resonatoroberfläche, welches dann selektiv mit dem komplementären Nucleotidstrang aus der Lösung hybridisiert. Die gängigen Verfahren beruhen auf der Modifizierung der Phosphatgruppe des 5'-Endes durch Einführung von Schwefelgruppen.^[56–60] So können nicht nur DNA und RNA immobilisiert werden, sondern auch Peptidnucleinsäuren, die endständig einen über Polyethylenglycol gebundenen Cysteinrest tragen.^[61] Nur für DNA und RNA geeignete Verfahren beruhen hingegen auf der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem negativ geladenen Rückgrat der Nucleinsäuren und positiven Aminmonoschichten.^[62, 63] Ein häufig verwendetes, wenn auch recht kompliziertes Verfahren ist die Bindung biotinylierter Oligonucleotide an oberflächenfixiertem Avidin oder Streptavidin. Die Proteine werden entweder über einfache Physisorption,^[64] über elektrostatische Wechselwirkung^[63] oder kovalent über die Bildung einer Amidbindung zwischen chemisorbierter 3,3'-Bispropionsäure und einer Aminfunktion der Proteine^[56, 65, 66] gebunden. Welche Oligonucleotid-Belegungsgrade mit Hilfe dieser Techniken erhalten werden, ist in den meisten Fällen nicht genau bekannt. Zumeist werden die Bedeckungen aus der Frequenzerniedrigung nach Anbindung der Nucleinsäuren an Luft oder in Lösung anhand der zuvor ermittelten Proportionalitätskonstanten des Quarzes bestimmt. Die so ermittelten Bedeckungsgrade liegen meist deutlich unter 100 %, typischerweise werden Bedeckungsgrade zwischen 10 und 30 % erzielt. Eine direkte Korrelation zwischen der tatsächlichen Nucleinsäuremenge auf der Oberfläche und der Frequenzänderung, wie sie von Su et al.^[67] aufgestellt wurde, ergab jedoch, dass die über die Frequenzerniedrigung ermittelte Belegung 3- bis 12-mal größere Werte liefert als die direkte Bestimmung der Nucleinsäuren durch Radiomarkierung. So stellt sich die Frage, ob die gängigen Oligonucleotid-Immobilisierungstechniken wirklich zufrieden stellende Oberflächenbelegungen liefern. Die Qualität der Immobilisierungstechnik ist bei der Frage nach der Empfindlichkeit und der Spezifität der Resonatoroberfläche von großer Bedeutung, da sich die Belegungsdichte der Oberfläche in der Empfindlichkeit des Schwingquarzes widerspiegelt und eine unspezifische Adsorption durch eine vollständige Belegung der Oberfläche minimiert werden

kann. Die angestrebte und von Anwendern geforderte untere Nachweisgrenze liegt je nach Zahl der Basenpaare bei etwa 10^{-18} M.^[68] Um die Nachweisgrenze der funktionalisierten Resonatoroberflächen zu erniedrigen, wurden Quarze mit höherer Resonanzfrequenz verwendet, Mehrschichtsysteme aus Nucleinsäuren und Polymeren/Proteinen entwickelt,^[63] DNA-Dendrimere synthetisiert^[69] und die Nucleinsäuren durch Polymerasekettenreaktion (PCR) an der Oberfläche amplifiziert.^[70] In einer neueren Studie nutzten Bardea et al.^[71] Anti-Doppelstrang(ds)-DNA und Anti-Maus-Fc-Antikörper als Zweitantikörper, um eine Signalverstärkung zu erreichen. Trotz dieser Bemühungen liegt die derzeitige Nachweisgrenze bei 10^{-8} – 10^{-7} M.^[56, 60, 69]

Neben dem Problem der unzureichenden Nucleinsäure-Immobilisierungstechniken, die zu geringen und zum Teil nicht bekannten Belegungsgraden führen, muss eine Ursache für die mangelhafte Korrelation zwischen der tatsächlichen Nucleinsäuremenge auf der Oberfläche und der Frequenzänderung in der geringen, 10 % nie übersteigenden Ausbeute der Hybridisierung auf der Oberfläche zu suchen sein.^[57, 59, 67] Letzteres ist vor allem auf sterische Faktoren zurückzuführen. Allerdings ist die Äquivalenz von Massenänderung und Frequenz bei der Detektion von Nucleinsäuren in Flüssigkeiten fragwürdig. Zwar wird in vielen Publikationen die gemessene Frequenzänderung direkt mit der Sauerbrey-Gleichung in eine Massenbelegung umgerechnet, doch konnten Thompson und Mitarbeiter^[67, 72–74] sowie Fawcett et al.^[68] zeigen, dass an die Resonatoroberfläche gebundene Oligonucleotide sich in Lösung nicht wie eine starre Masse verhalten. So haben Thompson und Mitarbeiter festgestellt, dass sich die Serienresonanzfrequenz f_s bei Bindung von DNA um den Faktor 18 stärker ändert als nach der Sauerbrey-Gleichung vorausgesagt wird. Sie führen diese Abweichung auf eine durch die Hybridisierung veränderte Viskosität an der Oberfläche zurück. Durch eine Netzwerkanalyse konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass sich der Dämpfungswiderstand R , der durch Energieverluste der in die Lösung hineinreichenden Scherwelle beeinflusst wird, in entsprechender Weise wie die serielle Resonanzfrequenz ändert. Im Falle der immobilisierten DNA hängt R nicht nur von der Viskosität der Flüssigkeit, sondern auch vom Elektrolyten, der einen Einfluss auf die elektroakustische Kopplung der Welle hat. So wird R zusätzlich durch die Leitfähigkeit der Lösung und das Auftreten einer elektrochemischen Doppelschicht bestimmt, die vor allem im Falle der hochgeladenen DNA einen großen Beitrag leistet.^[67] Genutzt werden können diese veränderten viskoelastischen Effekte zur Bestimmung von kinetischen Parametern der DNA-Hybridisierung an der Oberfläche.^[72] Eine systematische Behandlung steht allerdings noch aus.

Neben der Frage nach der Empfindlichkeit ist die nach der Spezifität eines Oligonucleotid-Biosensors von besonderer Relevanz. Bardea et al.^[60, 71] konnten zeigen, dass eine sieben Basen lange Mutation in einem 31-mer, wie sie bei der Tay-Sachs-Krankheit auftritt, ausreicht, um die Hybridisierung dieser mutierten DNA mit der auf der Oberfläche immobilisierten zu unterbinden. Hingegen hybridisieren 10-mere mit zwei endständigen Mutationen fast vollständig (92 %) und solche mit einer zentralen Mutation immerhin noch zu etwa 30 %. Eine unspezifische Adsorption der Oligonucleotide

konnte zudem in diesen Experimenten nicht ausgeschlossen werden.^[57] Eine größere Empfindlichkeit wurde durch die Verwendung von Peptidnucleinsäuren anstelle von DNA auf der Oberfläche erzielt. Bei Funktionalisierung der Goldoberfläche mit Peptidnucleinsäuren reichte eine einzelne Punktmutation im komplementären DNA-Strang aus, um die Bindung dieser DNA an die Oberfläche vollständig zu unterbinden (Abbildung 18).^[61]

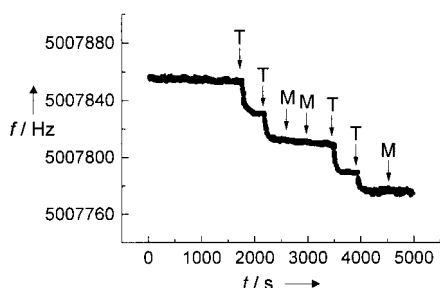


Abbildung 18. Frequenzantwort eines mit der Peptidnucleinsäure Cys-egl-GGC-AGT-GCC-TCA-CAA funktionalisierten QCM-Biosensors bei aufeinander folgenden Zugaben von $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ des 15-mers 5'-TTG-TGA-GGC-ACT-GCC-3' (T) und von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 5'-TTG-TGA-GAC-ACT-GCC-3' (M). Die Mismatch-Base ist fett hervorgehoben.^[61]

In einer neueren Studie konnten Wang et al.^[75] mit Hilfe der Quarzmikrowaagentchnik die enzymatische Wirkung von RNAsen und DNAsen gegenüber auf Oberflächen gebundenen Poly(U)-Einzelsträngen bzw. (dA)₂₀-(dT)₂₀-Doppelsträngen in Echtzeit verfolgen. Die Spezifität der beiden Enzyme blieb auch an der Oberfläche erhalten.

3.3. Adsorption von Proteinen an funktionalisierte Oberflächen

Das Hauptanwendungsgebiet der Quarzmikrowaagentchnik ist zurzeit die Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von Proteinen an funktionalisierten Oberflächen. Beispielsweise beruht das Prinzip vieler Piezoimmunosensoren auf der Detektion der Bindung von Antikörpern an auf Oberflächen immobilisierten Antigenen. Lange Zeit glaubte man, dass eine direkte Quantifizierung der Menge an adsorbiertem Protein mit Hilfe der Sauerbrey-Gleichung möglich ist. In mehreren Studien stellte sich jedoch bald heraus, dass eine Proteinadsorption in Lösung eine deutlich größere Frequenzänderung hervorruft als an Luft. Um eine universelle Anwendung der Quarzmikrowaage zu ermöglichen, ist es deshalb erstrebenswert, die Ursachen der unterschiedlichen Frequenzänderungen herauszufinden. Eine Studie aus dem Jahre 1993 zeigte erstmals eine direkte Korrelation zwischen der Massenbeladung und der Frequenzverschiebung am Beispiel von humanem Serumalbumin (HSA).^[76] Muratsugu et al. bestimmten die Massenbeladung durch radioisotopenmarkiertes HSA und gleichzeitig die Frequenzverschiebung mit Hilfe der Quarzmikrowaage. Das Ergebnis ist von großer Bedeutung im Hinblick auf die Empfindlichkeit eines Scherwellenoszillators. Während $\Delta f/\Delta m$ für einen 9-MHz-Quarz nach Sauerbrey $0.183 \text{ Hz cm}^2 \text{ ng}^{-1}$ betragen sollte, lieferten die

Messungen Werte von $(0.375 \pm 0.0124) \text{ Hz cm}^2 \text{ ng}^{-1}$ für HSA und $(0.716 \pm 0.066) \text{ Hz cm}^2 \text{ ng}^{-1}$ für Anti-HSA. Diese Werte sind zum einen deutlich größer als die nach Sauerbrey erwarteten und zum anderen abhängig vom untersuchten Protein. Um diese Diskrepanz erklären zu können, nutzten Kasemo und Mitarbeiter eine Messapparatur, mit der sie neben der Frequenzänderung gleichzeitig auch die Energieverluste in Form des Dissipationsfaktors mit einer Auflösung von 1 s bestimmen konnten.^[52] Energieverluste können innerhalb des adsorbierten Films, zu dem auch eingeschlossenes Wasser zählt, oder aber durch Reibung an den Grenzflächen auftreten. Studien zu Proteinadsorptionen in wässrigem Medium ergaben, dass in der Tat Energieverluste, d.h. ein Anstieg des Dissipationsfaktors, gemessen werden können.^[77–79] So tritt bei Bindung von Methämoglobin (met-Hb) und Hämoglobin-CO (HbCO) an eine hydrophobe Methylterminierte Monoschicht neben der Frequenzerniedrigung auch eine Änderung des Dissipationsfaktors D auf (Abbildung 19 A, B). Trägt man die Frequenzänderung gegen die Änderung von D auf, so ergeben sich Kurven mit zwei Bereichen unterschiedlicher Steigung, was auf einen zweistufigen Adsorptionsprozess hindeutet (Abbildung 19 C).

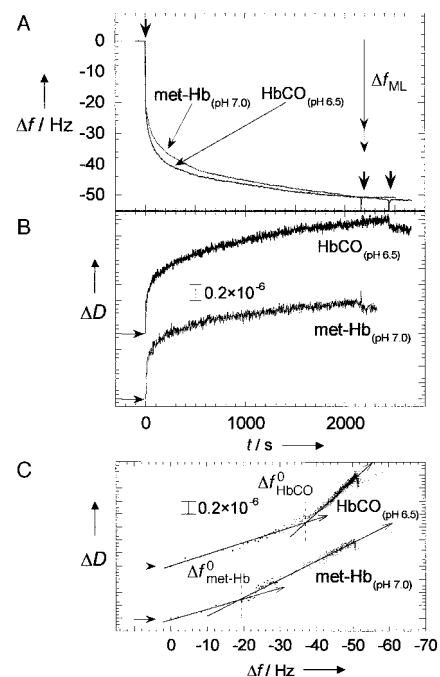


Abbildung 19. A) Frequenzänderung und B) Dissipationsfaktor als Funktion der Zeit während der Adsorption von met-Hb und HbCO bei pH 7.0 bzw. pH 6.5 an eine Methyl-terminierte Thiolmonoschicht (ML). C) Auftrag der Änderung des Dissipationsfaktors gegen die Änderung der Resonanzfrequenz. In beiden Fällen treten zwei Bereiche mit unterschiedlicher Steigung auf, was auf einen zweistufigen Adsorptionsprozess hindeutet.^[78]

Die Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass die Energieverluste nicht an den Grenzflächen auftreten, sondern in der Proteinschicht selber zu suchen sind und auf reversible Konformationsänderungen in der adsorbierten Proteinschicht und im fest gebundenen Wasser zurückzuführen sind, die durch die periodische Scherbelastung ausgelöst werden. Dass

eingeschlossenes Wasser einen großen Beitrag zur Frequenzantwort leistet, konnte auch von Rickert et al.^[80] gezeigt werden. Sie erhielten bei der Abscheidung von Multischichten aus abwechselnd biotinyliertem Rinderserumalbumin (BSA) und Streptavidin eine um den Faktor 4.13 größere Empfindlichkeit als nach der integralen Schichtwägeempfindlichkeit der Sauerbrey-Gleichung zu erwarten gewesen wäre. Durch eine Schichtdickenbestimmung konnten diese Autoren nachweisen, dass etwa 75 % der Gesamtmasse der Wasserschicht zugeordnet werden muss. Einen viskoelastischen Effekt schloss die Arbeitsgruppe aus, da die Frequenzänderung pro Proteinschicht bis zu einer Dicke von 20 Monoschichten konstant ist. Würden sich die Proteine viskoelastisch verhalten, so würde man nach Rickert et al.^[80] eine Abnahme der Frequenzantwort um einen Faktor von etwa 0.7 pro Schicht erwarten.

Obwohl die Frequenzänderung nicht direkt in eine Massenabscheidung umgerechnet werden kann, ist es trotzdem möglich, die Quarzmikrowaage zur direkten In-situ-Detektion von Bindungsereignissen zu nutzen. Durch Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Frequenzabnahme und unter der Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen Frequenzänderung und Massenbelastung können Bindungskonstanten und Geschwindigkeitskonstanten von Protein- und Peptidadsorptionsprozessen bestimmt werden.^[66, 81–85] Die Methode eignet sich zudem hervorragend zur Qualitätskontrolle bei der Präparation von Mehrschichtsystemen nach der Langmuir-Blodgett-Technik^[86] oder durch Selbstorganisationsprozesse.^[80, 87–94]

3.4. Lipid-Protein-Wechselwirkungen an festkörperunterstützten Lipidmembranen

Protein-Rezeptor-Wechselwirkungen an Lipidmembranen, wie z.B. Gangliosid-Toxin-Wechselwirkungen, haben eine zentrale biologische Bedeutung. Durch die erste Wechselwirkung eines Proteins, Virus oder Bakteriums mit seinem Rezeptor an der biologischen Membran wird eine Vielzahl von Reaktionen in und an der Zellmembran eingeleitet. Um diese Wechselwirkung an einer Lipidmembran untersuchen zu können, bedient man sich Modellmembransystemen, die in ihrer Lipidzusammensetzung fast beliebig variiert werden können.^[95, 96] Gängige Modellmembransysteme sind Vesikel und schwarze Membranen. Interessant für den Einsatz im Hinblick auf die Quarzmikrowaagetechnik sind Lipidmembranen, die in geordneter Weise auf einer Festkörperoberfläche immobilisiert werden können. Diese festkörperunterstützten Membranen können mit Hilfe verschiedener Techniken präpariert werden. Durch die Langmuir-Blodgett- und die Langmuir-Schäfer-Technik kann z.B. eine hochgeordnete Lipidmonoschicht von der Luft-Wasser-Grenzfläche auf eine vorbehandelte Quarzoberfläche übertragen werden. Apparativ deutlich weniger aufwändig und für goldbedampfte Quarze sehr gut geeignet sind Verfahren, die auf der Chemisorption von Thiol- und Disulfidverbindungen auf Gold basieren. Bei diesen Verfahren wird die Goldoberfläche in einem ersten Schritt durch die schwefelhaltigen Verbindungen funktionalisiert. Diese selbstorganisierten Mono-

schichten dienen dann als Basis zur Herstellung der Lipiddoppelschichten. Gängige Techniken zur Herstellung von Doppelschichten sind die Vesikelfusionstechnik, die Detergensverdünnungsmethode oder die Painted-lipid-membrane-Technik.^[96]

Ausgehend von der Langmuir-Schäfer-Technik immobilisierten Okahata und Mitarbeiter^[97–100] Lipidmonoschichten an der Luft-Wasser-Grenzfläche auf einer Quarzoberfläche durch horizontales Aufbringen der Quarzscheibe von der Luftseite her an die Grenzfläche. Die hydrophilen Kopfgruppen der Lipidmonoschichten sind so der Wasserphase zugewandt, dass in der wässrigen Phase gelöste Proteine und Peptide mit diesen wechselwirken können. Mit Hilfe der so funktionalisierten Quarzscheiben konnten die Bindungs- und Dissoziationskonstanten der Wechselwirkung zwischen dem Bienengift Melittin und β -Globulin an Dipalmitoylphosphatidylethanolamin sowie die Bindung des Lektins Concanavalin A an Glycolipid-Monoschichten quantifiziert werden.^[101] Es ist problemlos möglich, Rezeptormoleküle mit frei wählbarem Gehalt in die Lipidmonoschichten an der Luft-Wasser-Grenzfläche zu integrieren. So konnten mit der gleichen Präparationstechnik auch die Bindung des Influenza-A-Virus und von Weizenkeimagglutinin an G_{M3} -dotierte Monoschichten bestehend aus Sphingomyelin und/oder Glucosylceramid untersucht werden. Durch Variation der Lipidmatrix und des Dotierungsgrades konnte gezeigt werden, dass diese Parameter über die spezifische Bindung des Virus entscheiden und die Geschwindigkeit der Bindung maßgeblich beeinflussen. Durch Zugabe von Sialyllactose (Neu5Ac- α -2-3Gal- β -1-4Glc) konnte die Virusbindung inhibiert werden.^[97, 99, 100, 102]

Mit den auf Selbstorganisationsprozessen beruhenden Methoden können auf einfache Weise zweischichtige Lipidmembranen hergestellt werden. So kann eine Lipiddoppelschicht bestehend aus einer chemisorbierten Alkanthiolmonoschicht und einer auf dieser hydrophoben Schicht durch Fusion von unilamellaren Vesikeln abgeschiedenen Lipidmonoschicht gebildet werden. Die Vesikel fusionieren auf der Oberfläche, sodass ihre Zusammensetzung auch die der Oberfläche bestimmt. Durch impedanzspektroskopische Analyse der Mono- und Doppelschichten ist eine genaue Qualitätsprüfung jeder präparierten Lipidmembran möglich, sodass eine reproduzierbare Präparation gewährleistet werden kann (Abbildung 20).

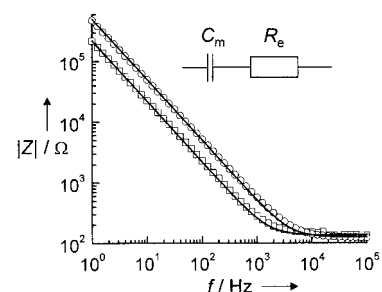


Abbildung 20. Impedanzspektren einer Octanthiolmonoschicht (□) und einer Lipiddoppelschicht aus Octanthiol und 1-Palmityl-2-Oleoyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholin (POPC; ○). Die durchgezogenen Linien sind die Ergebnisse der Anpassung der Parameter des ebenfalls dargestellten einfachen Ersatzschaltbildes.^[103]

Dass die Wahl der Modellmembran, d. h. die Präparationstechnik, ganz entscheidend das erhaltene Ergebnis beeinflusst, zeigt ein Vergleich zweier QCM-Studien, die sich beide mit der Adsorption von Melittin an Phospholipidmembranen beschäftigten. Während Okahata und Mitarbeiter Lipidmonoschichten an der Luft-Wasser-Grenzfläche verwendeten und eine ideale Langmuir-Adsorptionsisotherme bis zu Melittin-Konzentrationen von $100\ \mu\text{M}$ erhielten,^[100] zeichnen Steinem et al.^[103] bei Verwendung von Lipiddoppelschichten Adsorptionsisothermen auf, die ab einer Konzentration von $8\ \mu\text{M}$ auf eine Mehrschichtenadsorption hindeuteten. Bei Konzentration über $20\ \mu\text{M}$ wurde sogar die immobilisierte Lipidmembran durch Melittin solubilisiert. Derartige Effekte traten an der Luft-Wasser-Grenzfläche nicht auf.

Prinzipiell lassen sich mit der auf einer Alkanthiolmonoschicht durch Vesikelfusion erhaltenen zweiten Lipidmonoschicht auf einfache Weise thermodynamische und kinetische Parameter von Protein-Ligand-Paaren ohne Verwendung von Markern durch die Quarzmikrowaage erhalten. Dies sei am Beispiel der Wechselwirkung von Erdnussagglutinin (peanut agglutinin, PNA) mit Gangliosiden demonstriert. Eine Lipidmembran wurde mit dem Rezeptorlipid G_{M1} in verschiedenen Konzentrationen dotiert und die Frequenzänderung bei Zugabe von PNA detektiert. Wie Abbildung 21 zeigt, reicht eine Dotierung mit 1.3 Mol-% G_{M1} aus, um eine

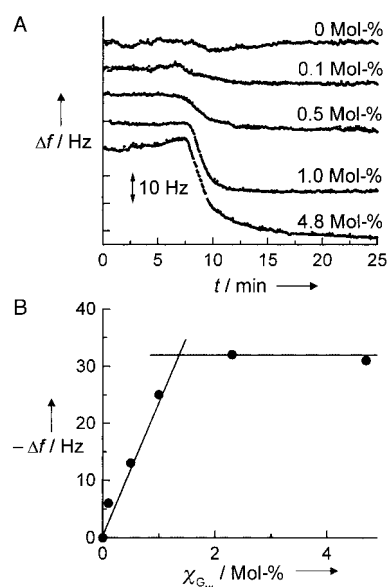


Abbildung 21. A) Frequenzänderungen von 5-MHz-Quarzen, die mit unterschiedliche G_{M1} -Gehalte aufweisenden Octanthiol/POPC-Lipiddoppelschichten funktionalisiert waren, bei Zugabe von $2\ \mu\text{M}$ PNA. B) Abhängigkeit des Gleichgewichtswertes der Resonanzverschiebung Δf vom Molenbruch $\chi_{\text{G}_{\text{M1}}}$ in der Phospholipidmonoschicht. Die durchgezogenen Linien schneiden sich bei $\chi_{\text{G}_{\text{M1}}} = 1.3\ \text{Mol-\%}$.^[107]

maximale Proteinbelegung der Oberfläche zu erzielen. Berechnet man den theoretischen minimalen Gehalt an G_{M1} unter Annahme einer homogenen Verteilung der Rezeptorlipide und der Geometrie des Proteins, so erhält man einen Wert von 1.5 Mol-%. Der Vergleich des theoretischen Wertes mit dem experimentell ermittelten deutet darauf hin, dass die maximale Proteinbelegung auf der Oberfläche nahe eins sein

muss. Eine maximale Proteinbelegung bei einer 2-Mol-%-Dotierung mit dem Rezeptorlipid konnte auch von Ebato et al.^[104] mit der Quarzmikrowaage am Beispiel des Streptavidin-Biotin-Paares nachgewiesen werden. Um die Bindungskonstante eines Protein-Rezeptor-Paares zu erhalten, muss die Frequenzänderung Δf in Abhängigkeit von der Konzentration c_0 des Proteins in Lösung bestimmt werden (Abbildung 22). Unter der Annahme, dass die Bindungs-

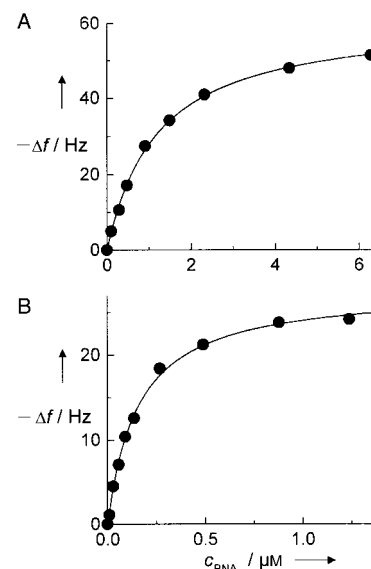


Abbildung 22. Isotherme der Bindung von PNA an eine G_{M1} -haltige (A) und an eine asialo- G_{M1} -haltige Octanthiol/POPC-Lipiddoppelschicht (B) auf einem goldbedampften AT-cut-Quarz. Dargestellt ist die Gleichgewichtsfrequenzverschiebung Δf in Abhängigkeit von der PNA-Konzentration in Lösung. Die POPC-Monoschichten sind mit 4.8 Mol-% des Rezeptorlipids dotiert. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis der Anpassung der Parameter einer Langmuir-Isotherme nach Gleichung (17) mit $K_a = (0.8 \pm 0.1) \times 10^6$ bzw. $(6.5 \pm 0.3) \times 10^6\ \text{M}^{-1}$ und $\Delta f_{\text{max}} = -(61.0 \pm 0.5)$ bzw. $(28.0 \pm 0.5)\ \text{Hz}$.^[109]

plätze an der Oberfläche energetisch gleich sind und das Rezeptorlipid homogen verteilt ist,^[105] kann die Bindungskonstante K_a aus der Anpassung der Langmuir-Adsorptionsisotherme (17) an die Daten erhalten werden.

$$\Delta f = \Delta f_{\text{max}} \frac{K_a c_0}{1 + K_a c_0} \quad (17)$$

Die ermittelten Bindungskonstanten liefern Informationen über die für die Bindung notwendigen funktionellen Gruppen des Rezeptors, wie das Beispiel der Bindung von PNA an G_{M1} und an asialo- G_{M1} zeigt. Während die Bindungskonstante von PNA an G_{M1} $(0.83 \pm 0.04) \times 10^6\ \text{M}^{-1}$ beträgt, ist sie für asialo- G_{M1} mit $K_a = (6.5 \pm 0.3) \times 10^6\ \text{M}^{-1}$ fast um den Faktor 10 größer.^[105] Dieser Unterschied kann dadurch zustande kommen, dass die *N*-Acetylneuraminsäure von G_{M1} für die Bindung des PNA an den Rezeptor nicht benötigt wird oder gar störend wirkt. Es ist allerdings auch nachgewiesen worden, dass die Affinität von PNA zum Trisaccharid $\beta\text{-Galp-(1,3)-GalNac-(1,4)-}\beta\text{-Galp}$ größer ist als die zum Disaccharid $\beta\text{-Galp-(1,3)-GalNac}$.^[106]

Dies ist ein Beispiel dafür, wie durch Variation des Rezeptors in der Lipidmembran die molekulare Zusammen-

setzung des Rezeptormoleküls mit Hilfe der Quarzmikrowaage ermittelt werden kann. Durch Quantifizierung einer Bindungsinhibition in Lösung kann die Methode zur Aufklärung der für die Rezeptorfunktion essentiellen Kohlenhydratstruktur beitragen. So erlaubte die Messung der Frequenzänderung bei Bindung von PNA an G_{M1} in Gegenwart eines Inhibitors (Abbildung 23) die Bestimmung der Bindungskonstanten des Inhibitors K_I in Lösung.^[107] Voraussetzung für die Bestimmung von K_I ist ein geeignetes Verhältnis von K_I und K_a . Nur wenn die beiden Bindungskonstanten in der gleichen Größenordnung liegen, ist eine genaue Bestimmung von K_I möglich, da sich die Frequenz kontinuierlich mit der Inhibitorkonzentration in Lösung ändert. Liegen mehrere Größenordnungen zwischen K_I und K_a , so bindet das Protein entweder fast unbeeinflusst an die Oberfläche oder gar nicht.

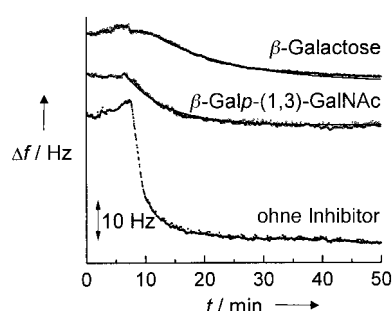


Abbildung 23. Zeitlicher Verlauf der Änderung der Resonanzfrequenz nach Zugabe einer $2 \mu\text{M}$ PNA-Lösung zu einer Octanthal/POPC-Lipiddoppelschicht, dotiert mit 4.8 Mol-% G_{M1} , ohne Inhibitor, mit 0.27 mM β -Galp-(1,3)-GalNAc und mit 26.5 mM β -Galactose.^[107]

Das System PNA-Gangliosid demonstriert, welche Möglichkeiten die Kombination der Quarzmikrowaage mit festkörperunterstützten Lipidmembranen für die Untersuchung von Ligand-Rezeptor-Paaren bietet und welche Parameter aus den erhaltenen Daten ermittelt werden können. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der QCM-Methode auf einfache Weise Bindungskonstanten und -kinetiken quantifiziert werden können, sodass Aussagen über die natürlichen Rezeptoren in einer Lipidmembran möglich sind. Dies konnte besonders deutlich am Beispiel der Adsorption von bakteriellen Toxinen – dem Cholera-, Tetanus- und Pertussistoxin – auf verschiedene Ganglioside – gezeigt werden.^[104, 107–109]

Neben grundlegenden Erkenntnissen, die mit auf Quarzoberflächen immobilisierten Lipidmembranen gewonnen werden können, sind diese Membranen auch in der Biosensorik von Bedeutung. Nicht nur wegen der einfachen, reproduzierbaren und genau einstellbaren Funktionalisierung der Goldoberflächen sind sie sehr geeignet, sondern auch wegen der Tatsache, dass unspezifische Proteinadsorptionen durch die Lipidmatrix vollständig unterdrückt werden. Erste Ansätze zur Regeneration der Sensoroberfläche nach Bindung des Proteins wurden von Janshoff et al.^[107] beschrieben. Durch Zugabe einer Protease kann das an die Oberfläche gebundene Protein wieder entfernt werden (Abbildung 24).

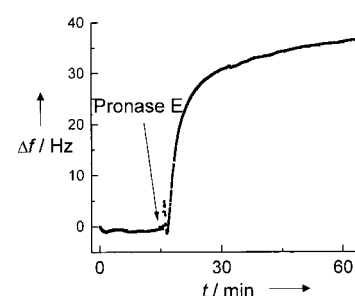


Abbildung 24. Zeitlicher Verlauf der Änderung der Resonanzfrequenz nach Zugabe einer Pronase-Lösung zu einer PNA-beschichteten Octanthal/POPC-Lipiddoppelschicht, dotiert mit 4.8 Mol-% G_{M1} . Die PNA-Konzentration betrug $2 \mu\text{M}$, die damit verbundene Frequenzverschiebung -36 Hz . Die Konzentration der Pronase E betrug 0.2 % (w/w). Die durch die Einwirkung der Pronase verursachte Frequenzerhöhung betrug nach ca. einstündiger Inkubation der Proteinmonoschicht in der Proteaselösung 35 Hz .^[107]

3.5. Piezoelektrosensoren

Die hohe Spezifität von Antigen-Antikörper-Reaktionen und die Möglichkeit, Antikörper gegen eine Vielzahl biologischer und nichtbiologischer Substanzen herstellen zu können, eröffnen einen Weg, um Immunsensoren für Fragestellungen aus den verschiedensten Bereichen der klinischen Diagnostik, der Lebensmittelkontrolle und der Umweltanalyse zu entwickeln. In den letzten drei Jahrzehnten wurden vor allem radioaktiv markierte Antikörper und Antigene in Immunoassays verwendet.^[110] Die Nachteile bei Verwendung radioaktiver Marker führten zur Entwicklung neuer Markierungssysteme, wie z. B. fluoreszenzmarkierten Antikörpern. In heutiger Zeit ist der enzyme-linked immuno sorbant assay (ELISA) die am weitesten verbreitete Methode zur Detektion von Antikörper-Antigen-Reaktionen. Das besondere dieses Verfahrens ist die Amplifikation der Antigen-Antikörper-Bindung durch ein Enzym, welches an den Antikörper gebunden ist und eine detektierbare Reaktion, z. B. die Bildung eines UV/Vis-aktiven oder fluoreszierenden Farbstoffes, katalysiert.^[111] Trotz dieses relativ etablierten Verfahrens ist das Interesse, markerfreie und weniger zeintensive Online-Detektionsmethoden zu finden, unvermindert. Diesen Anforderungen folgend sind eine Vielzahl von Publikationen erschienen, die sich mit der Immobilisierung von Antikörpern oder Antigenen auf der Oberfläche von Signalwandlern beschäftigen, deren Ausgangssignal sich bei Bindung des Komplements verändert. Solche Immunobiosensoren werden bezüglich ihrer Handhabbarkeit, der Wiederverwendbarkeit der Sensoroberfläche ohne Empfindlichkeitsverlust sowie der anfallenden Kosten bewertet.

Piezoelektrische Immunsensoren, wie die Quarzmikrowaage und die SAW-Sensoren, bieten Signalwandleroberflächen, die diesen Anforderungen ausreichend genügen. Piezoelektrische Immunsensoren in der Gasphase werden schon seit längerer Zeit untersucht,^[112–116] während die Online-Detektion von Antikörper-Antigen-Reaktionen in Lösung erst mit den Arbeiten von Roederer und Bastiaans^[117] über SAW-Sensoren und Thompson et al.^[118] über AT-cut-Quarze begann. Entgegen dem klassischen Verständnis von piezoelektrischen Sensoren fanden Thompson und Mitarbei-

ter in ihrer ersten Studie eine Frequenzzunahme bei Bindung von Immunglobulin G (IgG) an das immobilisierte Antigen. Sie führten dieses Ergebnis auf eine Veränderung der Mikroviskosität an der Oberfläche bei Bindung des Antikörpers zurück. In anderen Publikationen aus dieser Zeit zur piezoelektrischen Detektion von IgG wurde hingegen eine Frequenzabnahme bei Bindung des Antikörpers festgestellt, sodass die von Thompson et al. beschriebene Frequenzzunahme in Frage gestellt werden musste.^[119, 120] Auch weitere Studien zeigten in allen Fällen eine Frequenzabnahme bei Bindung eines Analyten an die Oberfläche.

Heute wird die Anwendbarkeit piezoelektrischer Immunsensoren in verschiedensten Bereichen untersucht. Das Spektrum erstreckt sich von medizinischen Verfahren zum Nachweis von bakteriellen Toxinen^[121–123] und Viren^[114, 116, 124–128] über die Bestimmung von Bakterien^[55, 115, 129–132] in der Nahrungsmittelindustrie bis in die Umweltanalytik beim Nachweis von organischen Verbindungen über eine Antigen-Antikörper-Reaktion.^[122, 133–137]

Zur Entwicklung eines funktionsfähigen Bioimmunsensors auf der Basis piezoelektrischer Signalwandler müssen die für alle Biosensoren typischen Probleme gelöst werden: 1) Funktionalisierung der bedampften Oberfläche, 2) empfindlicher, spezifischer und reproduzierbarer Nachweis des Analyten in Lösung und 3) Regenerierung der Sensoroberfläche.

Die Technik zur Immobilisierung von zumeist Antigenen oder Antikörpern führt nicht nur zu funktionalisierten Sensoroberflächen, sondern bestimmt zudem maßgeblich die Empfindlichkeit und die Reproduzierbarkeit des Sensors. Eine häufig verwendete Methode ist die einfache Physisorption der gewünschten Komponente auf gereinigten Goldoberflächen^[120, 124, 126–128, 131, 138, 139] und Polymeren.^[88, 115, 140] Die Stabilität der so immobilisierten Moleküle unterscheidet sich nicht wesentlich von der kovalent gebundener.^[129, 132, 138, 141, 142] Problematisch bei diesen Techniken ist jedoch die ungerichtete Anordnung der Moleküle auf der Oberfläche, was dazu führt, dass ein Teil der Antigene/Antikörper nicht zugänglich ist. Eine gerichtete Anordnung von Antikörpern kann man durch die zunächst ungerichtete Physisorption oder kovalente Anbindung von Protein A erzielen, an welches im nächsten Schritt der Antikörper mit der F_c -Domäne bindet, sodass die F_{ab} -Domäne bevorzugt ins Außenmedium weist.^[114, 119, 120] Eine andere Möglichkeit ist die Bindung des Antikörpers über eine einzelne Thiolgruppe.^[143] So gelang Göpel und Mitarbeitern die gerichtete Bindung eines Antigens – ein synthetisches Peptid des Capsid-Proteins des Maul- und Klauenseuche-Virus – auf einer ω -Hydroxyundecanthiol-Monoschicht.^[87, 144, 145] Eine andere Technik zur gerichteten Immobilisierung von Antikörpern, ausgehend von Langmuir-Blodgett-Filmen mit F_{ab} -Fragmenten, die an Linker-Phospholipide gebunden sind, haben Vikholm et al.^[143, 146] beschrieben.

Das Hauptproblem besteht in der unspezifischen Adsorption an der Signalwandleroberfläche; sie kann nur durch verbesserte Immobilisierungstechniken minimiert werden und wird nicht durch den Signalwandler selbst beeinflusst. Um die unspezifische Adsorption zu minimieren, wird die beschichtete Oberfläche zumeist mit einem Protein wie BSA

oder Casein vor der Bindung des Analyten blockiert. Zusätzlich kann die unspezifische Adsorption, die zumeist auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen ist, durch Zusatz von Detergentien herabgesetzt werden.^[124, 126, 128]

Neben der unspezifischen Adsorption, die unabhängig von der Wahl des Wandlers zu unerwünschten Signalen führt, tritt bei der Quarzmikrowaagentchnik ein Problem auf, das auf den Einfluss viskoelastischer Effekte der Lösung zurückzuführen ist. Der Scherwellenresonator reagiert sehr empfindlich auf unterschiedliche Lösungseigenschaften, wie z.B. eine veränderte Viskosität. Es gibt mehrere Möglichkeiten, um diesen Bulk-Effekt zu unterdrücken. Ist die Viskosität der zu untersuchenden Lösung bekannt, kann durch Zusatz von Glycerin die Viskosität des Trägermediums entsprechend eingestellt werden.^[128] Aberl und Mitarbeiter verwendeten verdünntes Humanserum als Trägermedium, um unspezifische Effekte zu minimieren.^[124, 126] Allgemeinere Verfahren zur Unterbindung dieser Art der Quarzantwort, die eine Kenntnis der Lösungszusammensetzung nicht voraussetzen, sind die Referenzkristallmethode^[147] und die Gleiche-Konditionen-Methode.^[148] Ein neues Verfahren wurde von Zhang et al.^[149] eingeführt, die die Massenbelastung des Quarzes von viskoelastischen Effekten durch parallele Messung der Resonanzfrequenz des Quarzes und der Amplitude der angelegten Spannung abtrennen und so die gemessene Frequenzänderung hinsichtlich viskoelastischer Effekte korrigieren konnten.

Durch die Minimierung der unspezifischen Adsorption wird die Empfindlichkeit des piezoelektrischen Immunsensors erhöht. Ferner wird die minimale Konzentration, die mit dieser Anordnung noch detektiert werden kann, durch die Bindungskonstante zwischen Ligand und Rezeptor bestimmt. Wie Ebato et al.^[135] zeigen konnten, wird durch die Immobilisierung des Antigens (eines Fluorescein-markierten Lipids) auf der Oberfläche die Bindungskonstante des Antikörpers um den Faktor 300 gegenüber der Reaktion in Lösung erniedrigt.

Letztendlich stellt sich nach der Bindung des Analyten die Frage nach der Regenerierbarkeit der Oberfläche für weitere Bindungsstudien. Mit der reversiblen Abspaltung von Antikörpern, die an einer Antigen-modifizierten Goldoberfläche eines Scherwellenoszillators gebunden sind, haben sich Willner und Mitarbeiter beschäftigt. Sie funktionalisierten Goldoberflächen von 9-MHz-Quarzen mit dem photoisomerisierbaren Substrat *N*-Methyldinitrospiropyran, welches eine Affinität für den Antikörper Anti-Dinitrophenyl-Ab aufwies. Durch Licht der Wellenlänge 360 nm < λ < 380 nm konnte *N*-Methyldinitrospiropyran zu *N*-Methyldinitromerocyanin isomerisiert werden, welches keine Affinität zum Antikörper aufweist. Die Reiserisierung erfolgt bei λ > 495 nm. Die reversible Bindung des Anti-Dinitrophenyl-Antikörpers konnte durch QCM eindrucksvoll nachgewiesen werden.^[150–152] Ein anderes Verfahren zur reversiblen Antikörper-Antigen-Wechselwirkung an Oberflächen haben Sargent und Sadik^[140] beschrieben. Sie immobilisierten Anti-HSA-Antikörper auf einer auf einem Quarz aufgetragenen, leitfähigen Polypyrroloberfläche und konnten durch Anlegen von Rechteckspannungspulsen die Bindung von HSA reversibel induzieren.

Piezoelektrische Immunosensoren sind also durchaus eine Alternative zu den etablierten ELISA-Methoden. Anders als diese, die ein Markermolekül und etwa zwei Stunden pro Analyse benötigen, kann das piezoelektrische Verfahren vollautomatisiert werden. So können heutzutage Phagenbibliotheken durch Fließinjektionssysteme in kurzer Zeit mit der Quarzwaagentechnik analysiert werden.^[153] Der Nachweis des Analyten erfolgt online und markerfrei in etwa 10 min, sodass zudem auch kinetische Daten zum spezifischen Nachweis der Antikörper herangezogen werden können. Da die Spezifitäten vorwiegend durch die Immobilisierungstechnik bestimmt werden, sind sie bei ELISA und Quarzwaagenmessung äquivalent. Die erzielte Empfindlichkeit von Piezoelektrosensoren ist derzeit allerdings noch niedriger als die von ELISA-Methoden.

3.6. Detektion von zellulären Systemen

Der Einsatz mikrogravimetrischer akustischer Sensoren für die Detektion und Charakterisierung pro- und eukaryotischer Zellen hat aufgrund der Fülle an Informationen, welche eine solche Analyse bereitstellt, zu einer Reihe interessanter experimenteller Befunde geführt. Als piezoelektrische Sensoren sollen TSM-Resonatoren aufwändige und zeitintensive Methoden der Zellbiologie durch schnellere, höher auflösende und einfachere Verfahren ablösen. Besonders in der Lebensmittelindustrie werden diese Sensoren für die routinemäßige Bestimmung der Zahl von Bakterienzellen in Nahrungsmitteln benötigt, aber auch für klinische Anwendungen wäre es erstrebenswert, Zellzahlen in Körperflüssigkeiten online bestimmen zu können. In Tabelle 5 ist ein Überblick über Bakterien, deren Zellzahlen mit Hilfe von Piezosensoren bestimmt wurden, aufgelistet.

Die meisten Verfahren zur Detektion von Bakterien in Lösung mit Piezosensoren basieren auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der das Bakterium an den entsprechend auf der Oberfläche immobilisierten Antikörper bindet und so nachgewiesen werden kann. Auf diese Weise wird die größtmögliche Spezifität gewährleistet. Allerdings treten, ähnlich wie im Falle der Immunosensoren, Probleme durch unspezifische Adsorption auf, die nur durch eine Blockierung der freien Bindungsplätze durch Proteinadsorption behoben

werden können. Zumeist ergibt sich in einem bestimmten Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang zwischen der Zahl der Bakterienzellen und der Frequenzänderung, sodass nach Kalibrierung des Systems unbekannte Bakterienzellzahlen bestimmt werden können. Bei diesen Untersuchungen wird die Frequenzänderung bei Bindung der Zellen gemäß der Sauerbrey-Gleichung auf eine Massenänderung zurückgeführt. Bereits 1993 wiesen jedoch Gryte et al.^[154] sowie Redepenning et al.^[155] in den damals einzigen veröffentlichten Daten zur Adhäsion von Zellen auf Quarzresonatoren darauf hin, dass Zellen in einem Medium nicht als starre Masse behandelt werden können, sondern vielmehr als viskose Beladung ähnlich einer Flüssigkeit angesehen werden müssen. Eine einzelne Zelllage auf einem 5-MHz-Quarz würde nach der Sauerbrey-Gleichung theoretisch eine Frequenzänderung von 5600 Hz hervorrufen.^[155] Die tatsächlich gemessenen Werte liegen jedoch mindestens eine Größenordnung unter diesem Wert. Dies wird auf die Tatsache zurückgeführt, dass sich der Zellkörper unter Scherbelastung wie ein viskoelastischer Körper (z. B. Voigt- oder Kelvin-Körper)^[156] verhält, was dazu führt, dass neben einer Erhöhung der kinetischen Energie durch Veränderung der Masse (Erhöhung der Induktivität L) auch eine Energiedissipation (Erhöhung von R) auftritt. Es konnte gezeigt werden, dass die Scherwelle in dem System aus Zelle, extrazellulärer Matrix und einer Wasserschicht vollständig verschwindet. Dies wurde dadurch bestätigt, dass beim Vorliegen mehrerer Zellschichten sowie nach Adsorption von Kieselgelkügelchen auf der Zelloberfläche keine Frequenzänderung mehr auftritt.^[157]

Um Rückschlüsse auf die Parameter der Zelle als viskoelastischer Körper zu gewinnen, ist eine Impedanzspektroskopische Analyse im Bereich der Resonanzfrequenz des Schwingquarzes notwendig. Durch die Anpassung elektromechanischer Modelle an die so erhaltenen Daten können komplexe Schermodule der Zellmonolagen ermittelt werden. In Abbildung 25 ist beispielhaft das Impedanzverhalten eines 5-MHz-Quarzes mit und ohne anhaftende (adhärente) Madin-Darbyne-Canine-Kidney (MDCK-II)-Zellen gezeigt. Der Quarz ist durch die Zellen stark gedämpft – ein Hinweis darauf, dass es sich nicht um den Fall einer einfachen Massenbeladung handelt. Setzt man als erste Näherung für das Verhalten der Zellen die mechanische Impedanz einer Newtonschen Flüssigkeit (siehe Tabelle 3) an, so stellt man

Tabelle 5. Zusammenstellung von Zelltypen, die mit Quarzresonatoren untersucht wurden. Angegeben sind die Zellzahlen^[186] mit unterer Nachweisgrenze sowie die zur Detektion der Zellen verwendete Oberflächenreaktion.

Zelltyp	Zellzahlen	Oberflächenreaktion
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ^[187]	$1 \times 10^2 - 4 \times 10^7$ Zellen mL ⁻¹	Gelatineverflüssigung
<i>Listeria monocytogenes</i> ^[131]	$2.5 \times 10^5 - 2.5 \times 10^7$ Zellen pro Quarz	Antigen-Antikörper
<i>Chlamydia trachomatis</i> ^[129]	$0.26 - 7.8$ µg mL ⁻¹	Antigen-Antikörper
<i>Vibrio cholerae</i> ^[122]	$> 10^5$ Zellen mL ⁻¹	Antigen-Antikörper
<i>Candida albicans</i> ^[188]	$10^6 - 5 \times 10^8$ Zellen mL ⁻¹	Antigen-Antikörper
<i>Enterobacteriaceae</i> ^[189]	$10^6 - 10^9$ Zellen mL ⁻¹	Antigen-Antikörper
<i>Salmonella typhimurium</i> ^[190]	$10^5 - 10^9$ Zellen mL ⁻¹	Antigen-Antikörper
<i>Salmonella typhimurium</i> ^[132]	$9.9 \times 10^5 - 1.8 \times 10^8$ CFU mL ⁻¹ [a]	Antigen-Antikörper
<i>Salmonella typhimurium</i> ^[191]	$3.6 \times 10^6 - 102 \times 10^6$ Zellen mL ⁻¹	Zellwachstum auf SS-Agar ^[b]
<i>Pseudomonas cepacia</i> ^[192]	$> 3 \times 10^5$ Zellen cm ⁻²	Zellwachstum auf Gold
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ^[193]	3.9×10^{-2} % (v/v)	Antigen-Antikörper-Agglutination in Lösung
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^[130]	$10^5 - 10^8$ Zellen mL ⁻¹	Antigen-Antikörper

[a] CFU = colony-forming unit (Zahl der Zellen einer Kultur, die in der Lage sind, eine neue Kolonie zu bilden). [b] SS = *Salmonella shigella*.

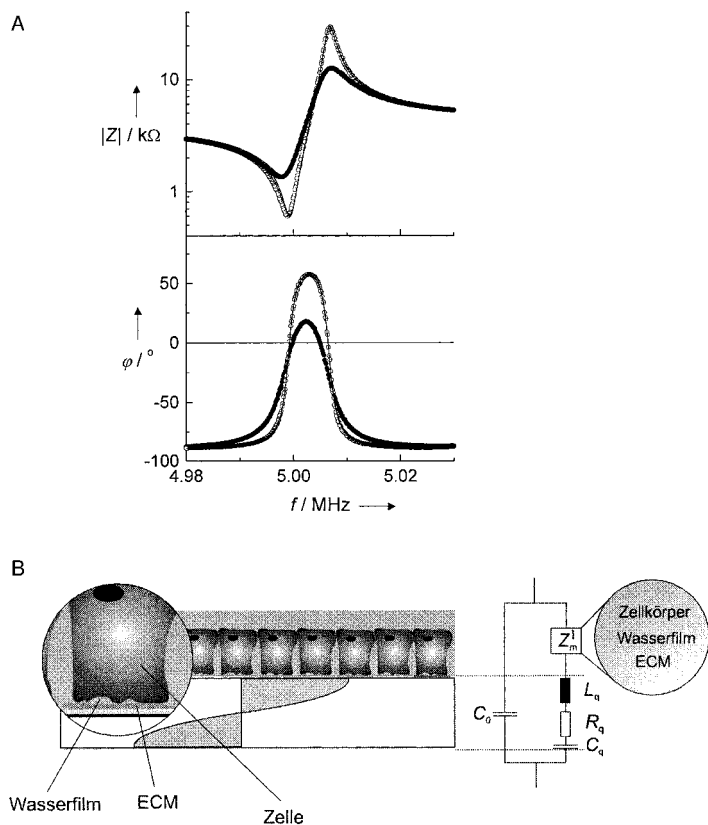


Abbildung 25. A) Einfluss einer konfluenten MDCK-II-Zellmonoschicht auf das Impedanzspektrum eines 5-MHz-Quarzresonators ($|Z|$ und φ); gezeigt ist jeweils das Spektrum vor (●) und nach dem Entfernen der Zellschicht (○). Die durchgezogenen Linien sind die Ergebnisse der Kurvenanpassung auf der Grundlage des BVD-Ersatzschaltbildes. B) Ersatzschaltbild einer Zellmonoschicht mit extrazellulärer Matrix (ECM) und Wasserschicht. Z_m^1 repräsentiert die viskoelastischen Eigenschaften der adhärennten Zellen sowie der ECM und der zwischen Zellen und Quarz befindlichen Wasserschicht.^[167]

fest, dass dieser Ansatz zu einfach ist, um das Verhalten der Zellen ausreichend zu beschreiben, da eine elastische Komponente unberücksichtigt bleibt.^[158] Eine genauere Analyse der einzelnen Komponenten einer Zellmonoschicht auf einem Quarz verdeutlicht die Komplexität des Problems. Neben der eigentlichen Zellage müssen auch die extrazelluläre Matrix (ECM), der zwischen ECM und Zelle befindliche Wasserfilm sowie das darüber stehende Medium berücksichtigt werden. Es zeigte sich, dass der Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Scheroszillation die größte Rolle spielt, während die mechanischen Eigenschaften eines zellbedeckten Quarzresonators vom überstehenden Medium kaum beeinflusst werden. Der Beitrag der ECM ist hauptsächlich induktiv und somit ein einfacher Massenbeitrag, also ohne Einfluss auf die Energiedissipation der Oszillation.^[159]

Es stellte sich heraus, dass die Dämpfung der Scheroszillation durch eine konfluente Zellmonolage stark vom jeweiligen Zelltyp und deren Adhäsion auf der Oberfläche abhängt. So haben schwach adhärennte Rinderaortazellen fast keine Auswirkungen auf den Dämpfungswiderstand R , während stark adhärennte MDCK-Zellen die Oszillation des Quarzes sehr stark dämpfen (Tabelle 6). Dieser Unterschied lässt sich mit einem variablen, dünnen Wasserfilm zwischen Zelle und

Tabelle 6. Änderung des Dämpfungswiderstands R und der Induktivität L verschiedener Zellspezies. Die Parameter wurden durch Anpassung des BVD-Ersatzschaltbildes vor und nach mechanischer Entfernung konfluenter Zellschichten erhalten.^[194]

Zellspezies	ΔR [Ω]	ΔL [μH]
MDCK I	755 ± 36	6.7 ± 0.7
MDCK II	992 ± 36	10.5 ± 0.8
Plexus-Epithel	804 ± 43	16 ± 1.5
BAEC	55 ± 12	3.1 ± 0.5
3T3-Fibroblasten	277 ± 20	2.5 ± 0.5

Oberfläche erklären. Verringert man z. B. die Ausdehnung der Wasserschicht durch hyperosmolare Belastung, bei der die osmotisch aktive Substanz nicht durch die Zellschicht hindurchtreten kann (Saccharose), so ist die Scherschwingung erheblich stärker gedämpft (Abbildung 26).

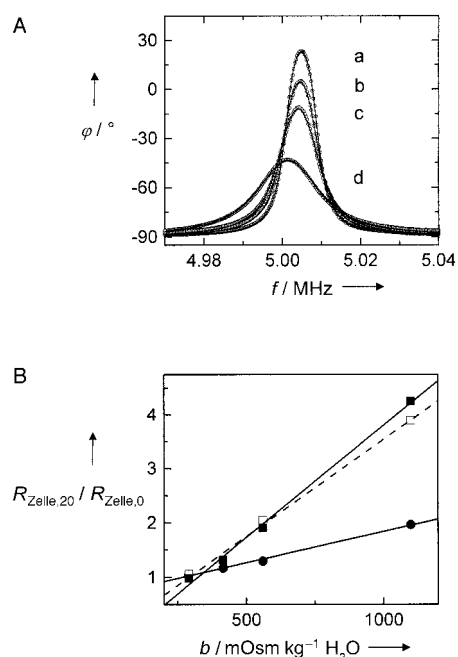


Abbildung 26. A) Phasenspektren eines mit einer konfluenten MDCK-I-Zellschicht modifizierten Quarzresonators bei schrittweiser Erhöhung der Konzentration des osmotisch aktiven Stoffes; a) 290, b) 415, c) 560, d) 1100 mOsm pro kg H_2O . Die durchgezogenen Linien sind die Ergebnisse der Anpassungen auf der Grundlage des BVD-Ersatzschaltbildes. B) Änderung des relativen Dämpfungswiderstands als Funktion der Molalität b der osmotisch aktiven Stoffe für MDCK-I- (□), MDCK-II- (■) und 3T3-Zellen (●). Der Dämpfungswiderstand $R_{\text{Zelle},20}$ wurde 20 min nach Austausch des isotonen Mediums gegen eines mit der angegebenen Molalität des osmotisch aktiven Stoffes bestimmt und auf den Ausgangswiderstand $R_{\text{Zelle},0}$ bezogen. Die durchgezogenen Linien sind Ergebnisse linearer Regressionen.^[159]

Wegener et al.^[159] konnten zeigen, dass sich die beobachtete Zunahme der Dämpfung aller Wahrscheinlichkeit nach nicht allein auf die Verminderung des Zellvolumens zurückführen lässt;^[160] stattdessen tritt ein osmotischer Wasserausstrom aus dem Zell-Substrat-Zwischenraum auf, der die Zellen näher an die Quarzoberfläche bringt und so zu einer stärkeren Dämpfung führt.^[161]

Zur quantitativen Auswertung der Impedanzdaten unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse sollte die zellbedeckte

Quarzoberfläche als Dreischichtmodell, bestehend aus einer starren Masse (ECM), einem dünnen Flüssigkeitsfilm zwischen ECM und Zellkörper und einem semi-infiniten viskoelastischen Festkörper (der Zelle) beschrieben werden. Eine genaue Analyse dieses Mehrschichtsystems ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

Neben den statischen Daten konfluenter Zellmonoschichten lassen sich mit Hilfe der Quarzmikrowaage im passiven und aktiven Modus auch die Zelladhäsion und der Einfluss von Wirkstoffen zu einer Zelllage zeitlich aufgelöst untersuchen. Der Prozess der Zelladhäsion ist sehr kompliziert, er setzt sich aus mehreren Einzelprozessen zusammen, die das Schwingungsverhalten des Quarzresonators beeinflussen können. Angefangen vom ersten physikalischen Kontakt der Zelle mit der Oberfläche beeinflussen Prozesse wie das Zellspreiten, d.h. die Vergrößerung der Kontaktfläche der Zelle auf der Oberfläche, die Modifizierung der Adhäsionseigenschaften, die Exkretion extrazellulärer Matrixkomponenten sowie Änderungen des Cytoskeletts der Zelle das Schwingungsverhalten auf ganz unterschiedliche Weise. Eine sehr detaillierte Untersuchung der Zelladhäsion durch eine zeitaufgelöste Frequenzanalyse am Beispiel verschiedener Zelllinien (MDCK-I- und -II-Zellen sowie 3T3-Fibroblasten) wurde von Wegener et al.^[162] durchgeführt. Wie bereits von Redepenning et al.^[155] sowie Matsuda et al.^[163] vermutet, korreliert, wie Wegener et al. nachweisen konnten, die Frequenzabnahme mit der Zahl der Zell-Substrat-Kontakte. Zellen, die keinen Kontakt mit der Oberfläche bilden, sei es durch kontaktinhibierende Peptide (RGD-Sequenzen) oder infolge Zelltod, erniedrigen die Resonanzfrequenz des Quarzes nicht (Abbildung 27).

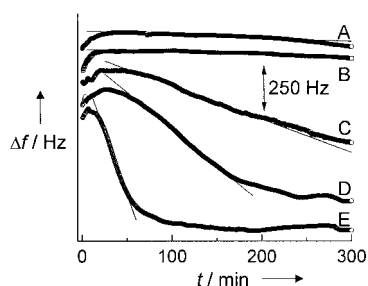


Abbildung 27. Zeitlicher Verlauf der Resonanzfrequenz während der Adhäsion von MDCK-II-Zellen mit einer Aussaatdichte von $(8 \pm 1) \times 10^5$ Zellen pro cm^2 in Gegenwart von A) 1 mM GRGDS, B) 1 mM RGDS, C) 2 mM RGD, D) 1 mM RGD und E) 1 mM SDGRG. Die durchgezogenen Linien sind lineare Regressionen zur Ermittlung der scheinbaren Adhäsionsgeschwindigkeit.^[162]

Wenn eine vollständige Impedanzanalyse der Schwingung des Quarzes nicht möglich ist oder eine höhere zeitliche Auflösung als bei der Impedanzanalyse erforderlich ist, kann zumindest durch Messung der Änderung des Dissipationsfaktors $D = Q^{-1}$ (Q = Güte) des Oszillators die Energiedissipation bei der Anbindung von Zellen an die Resonatoroberfläche verfolgt werden. So konnten Kasemo und Mitarbeiter die Adsorption von Monkey-Kidney-Epithel(MKE)- und Chinese-Hamster-Ovary(CHO)-Zellen sowie von Neutrophilen anhand der Änderung der Resonanzfrequenz des Quarzes und simultan dazu die sich zeitlich verändernde

Energiedissipation verfolgen.^[164, 165] Mit der gleichen Technik studierten Otto et al.^[166] die Wechselwirkung von *E. coli* mit Oberflächen unterschiedlicher Hydropathie. Dabei zeigte sich, dass Kontaktfläche, Oberflächenenergie, Ionenstärke und Zelloberfläche die Frequenz- und Dissipationsänderungen wesentlich beeinflussen.

Weisen Zellmonoschichten aufgrund von festen Verknüpfungen (tight junctions) interessante barrierebildende Eigenschaften auf, so ergibt sich die Möglichkeit, die mikrogravimetrische Methode mit herkömmlichen elektrochemischen Messtechniken zu kombinieren. Eine solche Messanordnung, die zur Durchführung einer quasi-simultanen Double-mode-Impedanzanalyse geeignet ist, wurde von Janshoff et al.^[167] beschrieben (Abbildung 28). Mit dieser Anordnung ist es

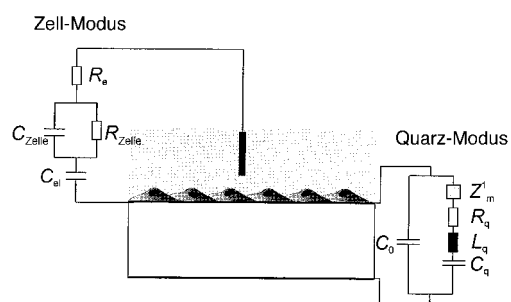


Abbildung 28. Schematische Darstellung von Zellen, die auf einem Quarz haften, sowie die Ersatzschaltbilder für die im Quarz- und im Zell-Modus aufgenommenen Impedanzspektren.^[167]

möglich, in einer Messung sowohl elektrische als auch viskoelastische Eigenschaften von Zellmonoschichten zu bestimmen. Versteht man die Zellmonoschicht als ein paralleles RC-Glied in Serie zu einer Kapazität C_{el} , welche die Grenzfläche zur Elektrode repräsentiert, so kann die Zellschicht auf einer Goldelektrode durch das in Abbildung 28 links gezeigte Ersatzschaltbild wiedergegeben werden. Beispielhaft zeigt Abbildung 29A den zeitlichen Verlauf des transepithelialen und des Dämpfungswiderstandes beim Aufbringen von MDCK-II-Zellen auf einen Schwingquarz. Die Dämpfung der Scheroszillation tritt direkt nach dem Aufbringen der Zellen ein, während der transepitheliale Widerstand erst 15 h später detektiert werden kann. Die Adhäsion der Zellen, welche die Dämpfungseigenschaften der Zellen auf der Resonatoroberfläche maßgeblich bestimmt, findet demnach weit vor der Bildung der tight junctions statt. Mit dieser Messanordnung können auch morphologische Änderungen der Zellen infolge von Änderungen des Cytoskeletts der adhären Zellen zeitlich aufgelöst werden, wie die Experimente mit dem Alkaloid Cytochalasin D zeigen, welches die Polymerisation der Aktinfilamente inhibiert (Abbildung 29B, C). Die Abrundung der Zellen durch den Abbau der Aktinfilamente führt wegen der verringerten Kontaktfläche zum Resonator zu einer Vergrößerung des mittleren Abstandes der Zellen vom Substrat und somit zu einem Verlust der für die konfluente Zellschicht typischen Dämpfung der Scheroszillation. Parallel dazu brach auch der transepitheliale Widerstand der Zellschicht infolge der starken morphologischen Veränderungen zusammen.

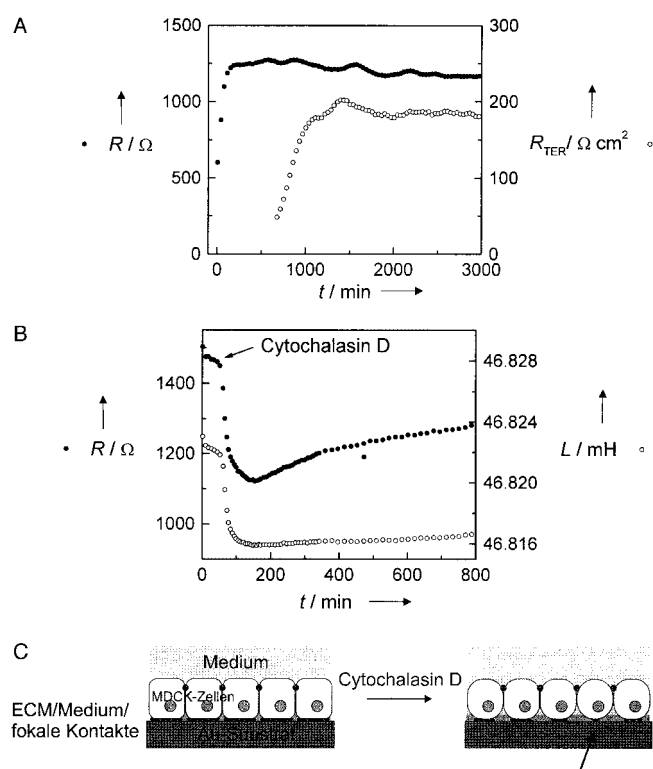


Abbildung 29. A) Zeitlicher Verlauf des Dämpfungswiderstand R (●) und des transepithelialen Widerstand R_{TER} (○) bei Bildung einer konfluenten MDCK-II-Zellschicht auf einem 5-MHz-Quarz. Die Aussaatdichte betrug $(1.5 \pm 0.2) \times 10^6$ Zellen pro cm^2 . B) Zeitlicher Verlauf des Dämpfungswiderstands R (●) und der Induktivität L (○) eines mit MDCK II bewachsenen 5-MHz-Quarzes bei Zugabe des Alkaloids Cytochalasin D in einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$. C) Modellvorstellung zum Einfluss von Cytochalasin D auf eine konfluyente Zellschicht. Der Pfeil weist auf eine infolge Abrundung der Zellkörper verkleinerte Kontaktfläche zwischen den Zellen und der Oberfläche.^[109]

3.7. Funktionalisierte Vesikel als Modell für die Zelladhäsion

Wegen der Komplexität der Zelle und ihrer Wechselwirkungen mit einer Oberfläche ist es schwer, die Frage zu klären, welche Eigenschaften der Zelle die Resonanzfrequenzverschiebung maßgeblich beeinflussen. Ein stark vereinfachtes System, um die Oberflächenadhäsion von Zellen im Detail zu modellieren, sind rezeptorhaltige Lipidvesikel, die mit auf einer Oberfläche immobilisierten Liganden wechselwirken können.^[168] Pignataro et al.^[169] untersuchten in einer detaillierten Studie die Wechselwirkung zwischen biotinylierten Lipidvesikeln und einer Streptavidin- sowie einer Avidinmatrix. Wie sich zeigte, wird die Frequenzerniedrigung des Quarzes durch den Biotinylierungsgrad der Vesikel bestimmt (Abbildung 30).

Diese Frequenzerniedrigung konnte jedoch nicht allein mit der Zahl der auf der Oberfläche adsorbierten Vesikel erklärt werden. Einer rasterkraftmikroskopischen Studie zufolge führt eine Erhöhung des Biotinylierungsgrads der Vesikel, d. h. eine erhöhte Zahl an Biotin-Streptavidin-Bindungen, zu einer verstärkten Abflachung der Vesikel, bis schließlich die Vesikel zu Doppelschichtstrukturen auf der Oberfläche auf-

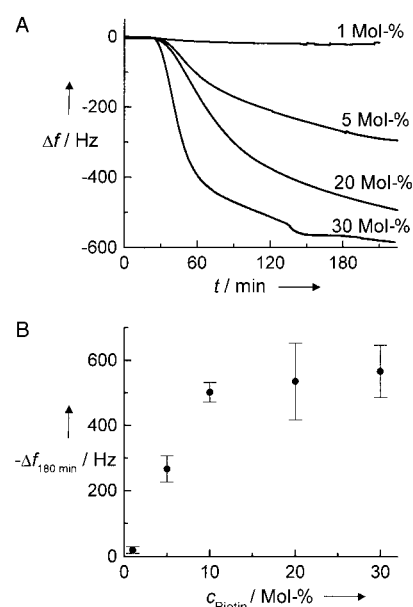


Abbildung 30. A) Frequenzabnahme eines 5-MHz-Quarzes bei Anbindung von Vesikeln, die mit Biotin-X-DHPE in unterschiedlichen Gehalten dotiert sind, an eine Avidinschicht. B) Frequenzänderungen 180 min nach der Vesikelzugabe.^[169]

reißen. Die Autoren schlossen aus diesem Befund, dass die Zahl der Kontakte die Frequenzantwort des Scherwellenresonators beeinflusst. Den Zusammenhang zwischen Kontaktfläche und Frequenzerniedrigung beobachteten auch Liebau et al.^[170, 171] Sie konnten zeigen, dass polymerisierte Liposomen eine deutlich geringere Frequenzerniedrigung hervorrufen als nichtpolymerisierte, was sie auf eine unterdrückte Membranfusion zurückführten. Dass die Fusion von Vesikeln auf Oberflächen zu großen Frequenzerniedrigungen von mehr als 230 Hz bei einem 5-MHz-Quarz führt, wurde bereits von Ohlson et al.^[172] sowie Janshoff et al.^[107] beschrieben. Möglicherweise ist eine erhebliche Änderung der Oberflächenenergie für die Frequenzerniedrigung verantwortlich.^[173] Eine genaue Erklärung dieses Phänomens steht noch aus.

4. Entwicklung von Biosensoren auf der Basis optischer Signalwandler

In diesem Abschnitt sollen die Einsatzmöglichkeiten der beschriebenen akustischen Resonatoren in der Biosensorik mit denen der optischen Methoden verglichen werden. Grundsätzlich kann die Information über eine mengenmäßig zu analysierende Substanz aus den charakteristischen Eigenschaften des Lichtes wie Frequenz, Amplitude, Phase oder Polarisation gewonnen werden. Im Bereich der Biosensorik haben sich verschiedene sondenfreie, optische Methoden, wie die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR),^[174–176] der Gitterkoppler, die Reflexionsinterferenzspektroskopie (RIFS)^[177] und die Ellipsometrie,^[178] etabliert, bei denen der Brechungsindex n , die Schichtdicke d oder die effektive Schichtdicke (nd) gemessen wird. Die Prinzipien einiger optischer Techniken sind in Abbildung 31 illustriert.

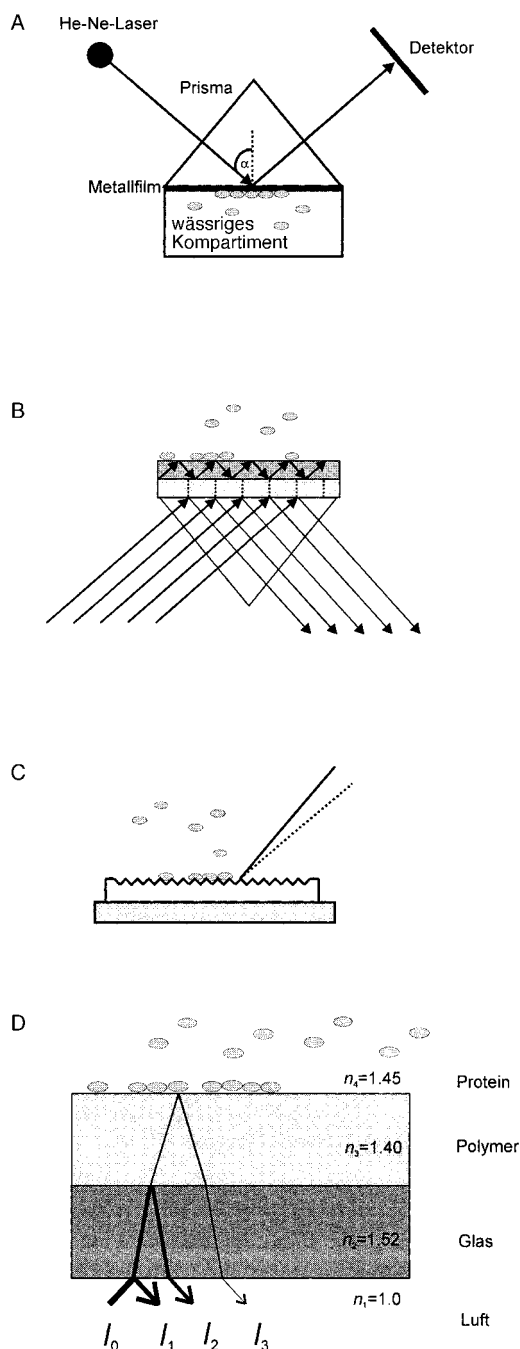


Abbildung 31. Schematische Darstellung der Messprinzipien verschiedener sondenfreier optischer Methoden. A) Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (surface plasmon resonance spectroscopy, SPR); B) Resonanzspiegel (RM); C) Gitterkoppler und D) Reflexionsinterferenzspektroskopie (RIfS).

Ihre Spezifität erlangen die Sensoren durch eine auf der Oberfläche immobilisierte Rezeptorschicht. Die Funktionalisierung der Oberfläche muss dabei auf die Art der Sensoroberfläche abgestimmt sein. So kommt bei der SPR und der Ellipsometrie die Thiolchemie zum Einsatz, bei Glasoberflächen (Gitterkoppler, Interferometrie) hingegen vorwiegend die Silanchemie. Im Folgenden soll auf Techniken, die eine große kommerzielle Bedeutung erlangt haben, wie die SPR, der Gitterkoppler und die Resonanzspiegelmethode

sowie die Reflexionsinterferenzspektroskopie, näher eingegangen werden. Dabei werden wichtige Parameter, wie Empfindlichkeit, Messbereich und Nachweisgrenze, mit denen akustischer Sensoren vergleichend diskutiert.

4.1. Gitterkoppler und Resonanzspiegeltechnik

Techniken mit evaneszierenden Feldern beruhen auf der Mehrfachreflexion an der Grenzfläche zwischen einem Träger und einem dünnen Film ($d < 1 \mu\text{m}$) von auf die Oberfläche aufgebrachtem Material, das in den hier diskutierten Fällen biologische Rezeptoren enthält und einen geringeren Brechungsindex als das Trägermaterial aufweist. Wird dieses System als Wellenleiter mit Mehrfachreflexion aufgebaut, erniedrigt sich die Nachweisgrenze erheblich, da die relative Ausbreitungsgeschwindigkeit der geführten Welle primär zwar vom Brechungsindex des Mediums auf dem Wellenleiter, aber natürlich auch von der Reflexionshäufigkeit abhängt. Die Welle wird in der Regel über eine in die Oberfläche eingeprägte Gitterstruktur unter einem definierten Winkel eingekoppelt. Gemessen wird im einfachsten Fall die Intensität des Strahls bei Austritt am Ende des Films.^[177]

Meist jedoch wird diese Technik als differentielle Interferometrie verwendet, indem man die für verschiedene Polarisierungen unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeit der Lichtwelle nutzt. Da der *E*- und der *B*-Feldvektor einer elektromagnetischen Welle senkrecht aufeinander stehen, werden sie abhängig vom Brechungsindex der auf den Träger aufgetragenen Substanz unterschiedliche Geschwindigkeiten aufweisen. Die messbare Änderung der Phasendifferenz ist ein Maß für den sich ändernden Brechungsindex z.B. bei Anbindung eines Analyten an die rezeptorbeschichtete Oberfläche.

Die Resonanzspiegel(RM)-Methode^[179] basiert auf einem so genannten Prismenkoppler, bei dem die Einkopplungsbedingungen zweier zueinander orthogonaler Wellenzüge linear polarisierten Lichtes unter verschiedenen Winkeln erfüllt sind. Beim Durchlaufen des Wellenleiters entsteht eine Phasenverschiebung zwischen den polarisierten Wellen. Zur Messung strahlt man linear polarisiertes Licht unter einem Winkel von 45° ein. Die messbare Elliptizität hängt nach Durchgang durch den Wellenleiter von der Phasendifferenz und damit wesentlich vom Brechungsindex, aber auch von der Absorption an der Grenzfläche ab. Damit ist die zu messende Elliptizität nach Durchgang durch den Wellenleiter wieder ein direktes Maß für den auf der Oberfläche gebundenen Analyten. Der Einsatzbereich beider Methoden in der Bioanalytik besteht vorwiegend in der Untersuchung von Antigen-Antikörper-Reaktionen.

4.2. Oberflächenplasmonenresonanz

Wie bei der Resonanzspiegeltechnik werden auch bei der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) evaneszierende Felder zur Bestimmung des Brechungsindex in der Nähe der Sensoroberfläche verwendet. Oberflächenplasmonen sind longitudinale Dichtefluktuationen von Elektronen an der

Grenzfläche von z.B. einer Metallschicht und einem Dielektrikum. Eine Oberflächenplasmonenresonanz entsteht durch optische Anregung nur dann, wenn der einfallende Lichtstrahl mit den freien Elektronen des Metalls wechselwirkt und Energie sowie Impuls des einfallenden Lichts denen der Oberflächenplasmonen entsprechen. Entscheidend für die Anregbarkeit ist die Dispersionsrelation zwischen der Frequenz ω und dem Wellenvektor k der Plasmonen [Gl. (18); ϵ_m und ϵ_d sind die Dielektrizitätskonstanten des Metallfilm bzw. des Dielektrikums].

$$k = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} \quad (18)$$

Die Anregung wird durch abgeschwächte Totalreflexion erreicht, indem die zu untersuchende Substanz auf ein Glasprisma mit einer aufgedampften Metallschicht aufgebracht wird. Die Plasmonen werden bei diesem Aufbau durch das evaneszierende elektromagnetische Feld angeregt, wobei Oszillationen der freien Elektronen im Metall erzeugt werden. Nur p-polarisiertes Licht vermag Oberflächenplasmonen anzuregen. Diese verursachen ihrerseits ein zusätzliches elektromagnetisches Feld, das in das an der Metalloberfläche aufliegende Dielektrikum eindringt. Nur bei einem definierten Einfallswinkel stimmen die Wellenvektoren des Lichts und der Plasmonen überein, und es kommt zu einem Resonanzphänomen, bei dem die Energie von den Photonen auf die Plasmonen übertragen wird. Die Plasmonenresonanz kann dann als ein scharfes Minimum im Reflexionsgrad des einfallenden Strahls beobachtet werden. Experimentell ist dazu der Einfallswinkel des monochromatischen Lichts zu variieren und den Reflexionsgrad im Bereich des Resonanzminimums aufzuzeichnen. Der Winkel beim Resonanzminimum hängt somit bei konstanter Wellenlänge nur von der Dielektrizitätskonstanten des die Metallschicht bedeckenden Mediums ab und ist ein Maß für die Konzentration eines an die funktionalisierte Metalloberfläche bindenden Analyten.

Die SPR kann nicht nur als Spektroskopie, sondern auch als Mikroskopie angewendet werden, was den Einsatzbereich dieser optischen Methode stark erweitert. Die SPR wird darüber hinaus nicht nur in der klassischen Ligand-Rezeptor-Biochemie routinemäßig eingesetzt, sondern auch zur Untersuchung von Bindungsereignissen an Lipidmembranen, ähnlich wie bei der Quarzmikrowaage. Dies erfordert spezielle Techniken zur Oberflächenmodifikation, die im Wesentlichen auf der Fusion von Liposomen auf entsprechend hydrophoben Oberflächen beruhen. Hier sei auf die Ausführungen von Salamon et al.^[175, 176] hingewiesen. Die hohe Empfindlichkeit in Bereichen bis zu einem Abstand von bis zu 100 nm von der Goldoberfläche hat auch ermöglicht, fokale Kontakte von adhären Zellen mit der SPR-Mikroskopie abzubilden.^[180]

4.3. Reflexionsinterferenzspektroskopie

Während die beiden bisher besprochenen sondenfreien Methoden Änderungen im Brechungsindex nach der Analyt-anbindung über die evaneszierende Welle registrieren, liefert die Reflexionsinterferenzspektroskopie direkt die effektive

Schichtdicke und damit die Oberflächenkonzentration des Analyten. Die Analytschicht weist bei Biomolekülen eine Dicke von bis zu 10 nm auf, bei niedermolekularen Substanzen dagegen nur 0.1 nm.^[177] Das physikalische Prinzip dieser Methode ist die wellenlängenabhängige Modulation des Reflexionsgrades eines dünnen, transparenten Films (siehe Abbildung 31 D). Lässt man weißes Licht durch den Träger auf den Film fallen, so wird dieses an beiden Grenzflächen des Films reflektiert. Bei monochromatischem Licht würde je nach Phasenlage konstruktive oder destruktive Interferenz auftreten, bei weißem Licht variiert die Interferenz mit der Wellenlänge, sodass eine periodische Modulation der Intensität des reflektierten Lichts – ein Interferenzspektrum – die Folge ist. Die Lage der Extremwerte hängt bei gegebenem Brechungsindex und Einfallswinkel nur noch von der Dicke der Schicht ab. Bei senkrechtem Einfall gilt für konstruktive Interferenz Gleichung (19), in der m die Ordnung der Maxima bezeichnet.

$$2nd = m\lambda \quad (19)$$

Mit zunehmender Dicke der transparenten Schicht verschiebt sich das Spektrum zu größeren Wellenlängen; dies gilt streng nur für transparente Filme, deren Dicke im Bereich der Wellenlänge des eingestrahlt Lichts liegt, was für hochmolekulare Biomoleküle und niedermolekulare Analyte nicht zutrifft. Mit einem einfachen technischen Trick kann man trotzdem definierte Interferenzspektren erhalten: Zunächst wird z.B. ein Glaträger mit einer dicken Interferenzschicht aus polymerem Material, Gelen oder Oxiden (SiO_2) beschichtet. Diese Interferenzschicht wird durch Aufbringen von Rezeptormolekülen funktionalisiert, sodass die durch Bindung des komplementären Partners entstehende Dickenänderung gemessen werden kann. Diese Dickenänderung ist deutlich kleiner als die Wellenlänge des Lichts, und die so modifizierte Methode erlaubt Messungen von Schichtdickenänderungen als Änderungen der effektiven optischen Dicke mit einer Auflösung von bis zu 1 pm. Mit dieser Technik ist es Gauglitz und Mitarbeitern gelungen, Antigen-Antikörper-Reaktionen als Beispiel mit einem hochmolekularen Analyten sowie die Bindung von Pestiziden (Triazine) als niedermolekularen Analyten zu quantifizieren. Sie immobilisierten Anti-Pestizid-Antikörper auf der Interferenzschicht und bestimmten die zum Teil weniger als 1 pm betragende Schichtdickenänderung.

Alternativ zu Polymerfilmen werden in Spezialfällen auch poröse Oberflächen aus p-dotiertem Silicium verwendet.^[181] Diese dünnen meso- bis makroporösen Filme dienen nicht nur der Erzeugung der Interferenzmaxima und -minima, sondern auch der Signalverstärkung durch die stark vergrößerte Oberfläche. Die Poreninnenräume müssen dazu jedoch geeignet funktionalisiert werden, was entweder mit Trialkoxysilanen, Lewis-Säuren oder Grignard-Verbindungen zur Knüpfung von Si-C-Bindungen realisiert werden kann.^[182–184] Die Reflexionsinterferenzspektroskopie liefert wie die anderen Methoden auch sowohl kinetische als auch thermodynamische Bindungsdaten und ist trotz ihrer geringen Empfindlichkeit in Konkurrenz zu herkömmlichen ELISA-Techniken zu sehen. Ein hohes Anwendungspotential weist sie im

Bereich der Pharmaforschung z. B. zum Nachweis von Wirkstoffen auf, wobei der Vorteil dieser Methode sicher nicht in der Empfindlichkeit, sondern in der Möglichkeit des automatisierten Durchsatzes von Analysen liegt.

5. Vergleich der Einsatzbereiche von Quarzmikrowaage und optischen Methoden

Ein detaillierter Vergleich der QCM- und der SPR-Methode wurde bereits 1995 von Kößlinger et al.^[185] veröffentlicht. In diesem Beitrag wurde ein Aufbau beschrieben, mit dem an einer Probe sowohl QCM- als auch SPR-Messungen durchgeführt werden können. Als Ergebnis stellten die Autoren fest, dass hinsichtlich Empfindlichkeit und Kreuzreaktivität kein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Techniken besteht. Beide Messverfahren sind bestens zur Online-Bestimmung von chemischen und biologischen Analyten geeignet und kommen dabei ohne chemische Modifikation des Analyten mit Markermolekülen (Fluoreszenzmarkern, Isotopen etc.) aus. Die grundsätzlich unterschiedlichen Messprinzipien (Massendichte bei der QCM und dielektrische Konstante bei der SPR) ergeben dabei zwangsläufig verschiedene Limitierungen hinsichtlich Empfindlichkeit, Signal-Rausch-Verhältnis, Messgenauigkeit, Reproduzierbarkeit der Messung, Regenerierung der Sensoroberfläche, Eignung für unterschiedliche komplexe Analytsysteme, Handhabbarkeit und Preis-Leistungs-Verhältnis.

Bei den SPR-Wandlern wird der Metallfilm auf Glaträgern oder Siliciumchips aufgebracht, die für Laser im sichtbaren Bereich bzw. im IR-Bereich transparent sind.^[174] Als apparative Komponenten können sowohl einfache Glasfasern, ATR-Prismenkoppler (ATR = abgeschwächte Totalreflexion), Gitterkoppler oder integrierte Schichtsysteme als optische Wellenleiter eingesetzt werden. Der Preis eines solchen Aufbaus erreicht leicht das Doppelte des Preises einer QCM, welche im Wesentlichen aus einem Frequenzzähler, einem Netzteil und einer preiswerten Oszillatorschaltung besteht. Die Übersicht in Tabelle 7 zeigt typische Charakteristika der beiden Messsysteme.

Der vergleichenden Betrachtung von Kößlinger et al.^[185] zufolge sind beide Methoden für die Bioanalytik gleicher-

maßen geeignet. Affinitätsmessungen lassen sich mit beiden Versuchsanordnungen zufrieden stellend durchführen (Abbildung 32).

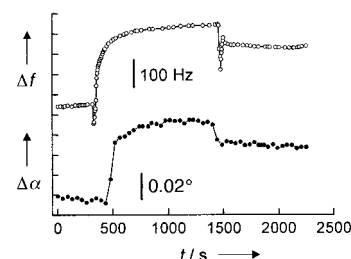


Abbildung 32. Änderung der Resonanzfrequenz (○) und des SPR-Winkels (●) bei unspezifischer Adsorption von Rinder Serumalbumin an eine Goldoberfläche.^[185]

Der große Vorteil der SPR gegenüber der QCM liegt in der geringen Größe des Messfeldes ($5 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ statt 5 mm^2 bei der QCM) und der damit verbundenen höheren Empfindlichkeit im Sinne von detektierbaren Teilchenzahlen auf der effektiven Oberfläche (10^{-17} Mol bei SPR und 10^{-14} Mol bei der QCM). Dagegen eignet sich die Quarzmikrowaage auch für die Bestimmung von Materialparametern wie der Viskoelastizität von Polymerfilmen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Quarzmikrowaage hat sich in den letzten Jahren von einem reinen Massensensor in der Gasphase zu einem vielseitigen Werkzeug der Chemo- und Bioanalytik entwickelt, welches nicht nur Informationen über Bindungsereignisse an Oberflächen, sondern auch materialspezifische Größen, wie Elastizitätsmodule, Oberflächenladungszustände und Viskositäten, liefert. Indirekt können aus den Messungen Konformationsänderungen von Proteinen sowie der Wassergehalt und die Nettoladung von Biomolekülen abgeschätzt werden. Ein großes Anwendungspotential liegt in der Quantifizierung von Zelladhäsionsprozessen und der Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften von adherenten Zellen. Es ist zu erwarten, dass sich TSM-Resonator-

Tabelle 7. Vergleich der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) mit der Quarzmikrowaage (QCM; 20-MHz-Quarz) anhand ausgewählter Eigenschaften.^[185]

	QCM	SPR
Wellengleichung	Christoffel-Gleichung	Maxwell-Gleichungen
Wellentyp	elastische Scherwellen	Oberflächenplasmonen
zentrale physikalische Größe	mechanische Impedanz Z	Reflexionsgrad R
Messgröße	Frequenz, Güte, Impedanz	Winkel am Reflexionsminimum
Materialparameter	Schichtdicke, Dichte, Viskosität, Oberflächenspannung, Viskoelastizität, Ionenstärke	Dielektrizitätskonstante, Schichtdicke
Eindringtiefe der Welle in Wasser	126 nm	150 nm ($\lambda = 1300 \text{ nm}$)
Empfindlichkeit gegenüber Änderungen der Ionenstärke	kann ausgeschlossen werden	groß
aktive Sensorfläche	5 mm^2	$0,005 \text{ mm}^2$
Detektionsgrenze	10^{-14} Mol	10^{-17} Mol
Schichtdickenempfindlichkeit/Proteinfilm	184 Hz nm^{-1}	$0,0263^\circ \text{ nm}^{-1}$
minimale signifikante Veränderung der Messgröße	20–25 Hz	$0,005^\circ$
minimal detektierbare Masse	30 ng auf 5 mm^2	$0,5\text{--}5 \text{ ng}$ auf $5 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$
Empfindlichkeitskalibrierung	Elektrolyse	–

Methoden in Zukunft zu einer echten Alternative zu konventionellen zellbiologischen Techniken, wie der Zellzählung und optischen Mikroskopietechniken zur Kontrolle von Zellkulturen, entwickeln werden. Viele Wirkstoffe haben einen direkten Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von Zellen, und die Quarzmikrowaage ist ein schnelles, hochauflösendes Verfahren, um Änderungen von Zell-Substrat-Wechselwirkungen nachzuweisen – sei es die Veränderung der Zahl fokaler Kontakte oder des Abstandes der Zellen vom Substrat. Auch die Möglichkeit, die Quarzmikrowaage mit anderen Methoden zu kombinieren, wie z. B. mit optischen (SPR) oder elektrochemischen Techniken, wird viel zum Verständnis von Grenzflächenprozessen in der Biochemie, wie sie z. B. auf der Zelloberfläche ablaufen, beitragen. So konnten bereits mit der Double-mode-Impedanzspektroskopie quasi-simultan Änderungen der Barriereigenschaften von konfluenten Zellmonoschichten mit der Zell-Substrat-Wechselwirkung zeitlich korreliert werden. In der Elektrochemie wird die elektrochemische QCM (EQCM) bereits standardmäßig zur Kontrolle von Abscheidungen und Korrosionsprozessen eingesetzt, während die Kombinationen von Voltammetrie, Chronoamperometrie oder Impedanzanalyse mit der QCM in der Bioanalytik bisher nur wenig Verwendung fanden.

Kritisch betrachtet ist die Nachweisempfindlichkeit der Quarzmikrowaage derzeit noch schlechter als die von optischen Methoden wie der SPR oder der RIFS, was zum Teil an der größeren Sensoroberfläche liegt, zum Teil an der eigentlichen Empfindlichkeit. Zumeist ist die geringere Empfindlichkeit im Rahmen biologischer Fragestellungen nicht von Bedeutung, da Gleichgewichtsthermodynamik- und kinetische Daten aus Gründen der begrenzten Gefäßgröße nicht jenseits von Konzentrationen im Pikomolbereich gewonnen werden können. Eine stetige Substanzverarmung in der Lösung wäre die Folge – dies gilt auch für die SPR, die zwar mit einem deutlich kleineren Messfeld auskommt, bei der aber die mit Adsorbaten bedeckte gesamte Sensoroberfläche meist viel größer ist. Der QCM sind natürliche Grenzen für eine Miniaturisierung gesetzt, die hinsichtlich einer gewünschten Automatisierung und geringer Lösungsmengen eine Rolle spielen. Die Stärke der piezoelektrischen Sensoren liegt eindeutig in der großen Informationsvielfalt und in der zuverlässigen Bestimmung thermodynamischer und kinetischer Daten. Die Methode erlaubt die Verwendung nahezu beliebiger Oberflächen, die von Metall- bis hin zu dielektrischen Oberflächen reichen. Benötigt man niedrige Nachweisgrenzen zur Spurenanalyse, so muss man auf piezoelektrische Sensoren mit höherer Massensensitivität, wie die APM- und FPW-Sensoren, zurückgreifen; hier ist allerdings noch einige Entwicklungsarbeit zu leisten.

Eingegangen am 21. Dezember 1999 [A378]

- [1] R. Schumacher, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 347; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 329.
- [2] D. A. Buttry, M. D. Ward, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1355.
- [3] G. Sauerbrey, *Z. Phys.* **1959**, 155, 206.
- [4] T. Nomura, M. Okuhara, *Anal. Chem.* **1982**, 281.
- [5] B. A. Martin, H. E. Hager, *J. Appl. Phys.* **1989**, 65, 2630.
- [6] J. F. Rosenbaum, *Bulk Acoustic Wave Theory and Devices*, Artechhouse, Boston, **1988**.

- [7] D. S. Ballantine, R. M. White, S. J. Martin, A. J. Ricco, E. T. Zellers, G. C. Freye, H. Wohltjen, *Acoustic Wave Sensors*, Academic Press, San Diego, **1997**.
- [8] G. Kurz, W. Mathis, *Oszillatoren*, Hüthig, Heidelberg, **1994**.
- [9] a) V. E. Bottom, *Introduction to Quartz Crystal Unit Design*, van Nostrand Reinhold, New York, **1982**; b) $v_p = \sqrt{c/\rho}$.
- [10] T. A. Jones, M. Kleitz, I. Lundström, W. Göpel, *Micro- and Nanosensor Technology/Trends in Sensor Markets*, VCH, Weinheim, **1995**.
- [11] \bar{c}_{66} wird als piezoelektrisch versteifter Elastizitätsmodul des Quarzkristalls bezeichnet und ergibt sich aus der Kopplung der mechanischen Auslenkung und dem Potential in planaren piezoelektrischen Wellen: $\bar{c}_{66} = c_{66} + e_{26}^2/\epsilon_{22}$.
- [12] a) A. C. Hillier, M. D. Ward, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 2539. b) Das Ergebnis der Lösung der Wellengleichung unter den angegebenen Randbedingungen lautet $u(r, \theta, z, t) = \sum A_{mn} J_m \left(\lambda_{mk} \frac{r}{R} \right) (C_m \cos(m\theta) + D_m \sin(m\theta)) \sin \left(\frac{n\pi}{d_q} z \right) \sin(\omega_{mnk} t)$ mit den natürlichen Zahlen $m = 0, 1, 2, \dots, n = 1, 3, 5, \dots$ und $k = 1, 2, 3, \dots$ sowie den Konstanten A_{mn} , C_m und D_m , der Scheroszillation, die von der gewählten Anfangsbedingung abhängen. J_m ist die Bessel-Funktion erster Art mit der Ordnung m , λ_{mk} sind die positiven Nullstellen der Bessel-Funktion.
- [13] Außerdem hängt die Resonanzfrequenz bei kleinen Resonatoren mit großer Schichtdicke auch beträchtlich von den lateralen Ausmaßen der kreisförmigen Scheibe ab, wie der zweite Term verdeutlicht.
- [14] Ein AT-cut-Quarzkristall weist neben der Anregung der Dicken-schwingung (thickness excitation, TE) auch eine Anregung durch das laterale Feld (lateral field excitation, LFE) auf, wobei erstere transversale und letztere longitudinale Wellen produziert.
- [15] Hier sei darauf hingewiesen, dass es sich bei Gleichung (2) streng genommen um die Serienresonanz ($Z \rightarrow 0$) handelt. Der Unterschied zwischen Antiresonanz ($Z \rightarrow \infty$) und Serienresonanz besteht in der elektroakustischen Konstante k_t : $\omega_a^2 - \omega_s^2 = 8k_t(\bar{c}_{66}/\rho_q d_q^3)$.
- [16] W. P. Mason, *Physical Acoustics*, Vol. 2A, Academic Press, New York, **1965**.
- [17] S. J. Martin, V. E. Granstaff, G. C. Frye, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2272.
- [18] M. Yang, M. Thompson, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1158.
- [19] A. L. Kipling, M. Thompson, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 1514.
- [20] Eine Verkleinerung der Resonatorabmessungen führt ebenfalls zum Verschwinden der Spurmoden, da sich der Abstand zwischen den Resonanzfrequenzen vergrößert. Spurmoden treten insbesondere auf, wenn die Schichtdicke der Elektroden zu gering ist.
- [21] Durch die nichtpiezoelektrische Elektrodenmasse verringert sich auch die effektive elektroakustische Kopplungskonstante, wodurch die Resonanzfrequenzen (Anti- und Serienresonanz) stärker zusammenrücken. Dies ermöglicht ein Abstimmen des Resonators über einen breiteren Frequenzbereich.
- [22] F. Josse, Y. Lee, S. J. Martin, R. W. Cernosek, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 237.
- [23] B. A. Martin, H. E. Hager, *J. Appl. Phys.* **1989**, 65, 2627.
- [24] C. E. Reed, K. K. Kanazawa, J. H. Kaufman, *J. Appl. Phys.* **1990**, 68, 1993.
- [25] H. L. Bandey, S. J. Martin, R. Cernosek, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 2205.
- [26] V. E. Granstaff, S. J. Martin, *J. Appl. Phys.* **1994**, 75, 1319.
- [27] E. Benes, *J. Appl. Phys.* **1984**, 56, 608.
- [28] C. Lu, D. Lewis, *J. Appl. Phys.* **1972**, 43, 4385.
- [29] K. K. Kanazawa, J. G. Gordon, *Anal. Chem.* **1985**, 57, 1770.
- [30] E. Nwankwo, C. J. Durning, *Sens. Actuators A* **1999**, 72, 99.
- [31] E. Nwankwo, C. J. Durning, *Sens. Actuators A* **1999**, 72, 195.
- [32] $h < 10 \mu\text{m}$, $G' > 10 \text{ GPa}$.
- [33] Z. Lin, M. D. Ward, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 685.
- [34] W. T. Schneider, S. J. Martin, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 3324.
- [35] Eine Änderung der Leitfähigkeit und der Dielektrizitätskonstanten wirkt sich auf die Ausdehnung der elektrochemischen Doppelschicht aus. Diese Ausdehnung nimmt im Gegenzug Einfluss auf die Resonanzfrequenzen des Schwingquarzes. Dabei spielen sowohl Änderungen in der Dichte und der Viskosität der Wasserschichten in der Nähe der Resonatoroberfläche eine Rolle als auch echte Massenänderungen. Dieser Effekt ist jedoch klein im Vergleich zu den durch die Änderung der Leitfähigkeit der Lösung hervorgerufenen Frequenzänderungen der Parallelresonanz.

- [36] Die Serienresonanz wird durch die mechanischen Eigenschaften des Quarzes bestimmt, die Parallelresonanz durch die mechanischen und die elektrischen.
- [37] Z. Shana, F. Josse, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1955.
- [38] M. Rodahl, F. Höök, B. Kasemo, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2219.
- [39] Kasemo und Mitarbeiter fanden, dass der Dämpfungsfaktor ein Maximum aufweist, während die Parallelresonanzfrequenz bei hohen Frequenzen gegen einen Minimalwert strebt. Je nach Elektrodenform können bei einem Lösungsmittelwechsel ($0 \rightarrow 1 \text{ S m}^{-1}$) Frequenzänderungen von mehreren 1000 Hz bei einem 5-MHz-Quarz beobachtet werden.
- [40] R. Beck, U. Pittermann, K. G. Weil, *J. Electrochem. Soc.* **1992**, 139, 453.
- [41] S. J. Martin, G. C. Frye, A. J. Ricco, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2910.
- [42] V. Tsionsky, L. Daikhin, E. Gileadi, *J. Electrochem. Soc.* **1996**, 143, 2240.
- [43] E. Benes, M. Gröschl, W. Burger, M. Schmid, *Sens. Actuators A* **1995**, 48, 1.
- [44] J. C. Andle, J. F. Vetelino, M. W. Lade, D. J. McAllister, *Sens. Actuators B* **1992**, 8, 192.
- [45] S. J. Martin, A. J. Ricco, T. M. Niemczyk, G. C. Freye, *Sens. Actuators* **1989**, 20, 253.
- [46] H. Lamb, *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. A* **1917**, 93, 114.
- [47] B. A. Auld, *Acoustic Fields and Waves in Solids*, Wiley, New York, **1973**.
- [48] $B = \left(\frac{\lambda}{2\pi} \right)^2 \frac{E d^3}{12(1 - \nu_p^2)}$ mit dem Young-Modul E und der Poisson-Zahl ν_p .
- [49] Z. Lin, C. M. Yip, I. S. Joseph, M. D. Ward, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1546.
- [50] S. Bruckenstein, M. Shay, *Electrochim. Acta* **1985**, 30, 1295.
- [51] C. Barnes, *Sens. Actuators A* **1991**, 29, 59.
- [52] M. Rodahl, F. Höök, A. Krpzer, P. Brzezinski, B. Kasemo, *Rev. Sci. Instrum.* **1995**, 66, 3924.
- [53] C. Zhang, G. Feng, *Ultrason. Symp. Proc.* **1996**, 43, 942.
- [54] N. C. Fawcett, J. A. Evans, L.-C. Chen, N. Flowers, *Anal. Lett.* **1988**, 21, 1099.
- [55] H. A. Su, Dissertation, University of Toronto, **1991**.
- [56] Y. Okahata, M. Kawase, K. Niikura, F. Ohtake, H. Furusawa, Y. Ebara, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 1288.
- [57] Y. Okahata, Y. Matsunobu, K. Ijio, M. Mukae, A. Murakami, K. Makino, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8299.
- [58] T. Sato, T. Kawakami, N. Shirakawa, Y. Okahata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, 68, 2709.
- [59] K. Ito, K. Hashimoto, Y. Ishimori, *Anal. Chim. Acta* **1996**, 327, 29.
- [60] A. Bardea, A. Dagan, I. Ben-Dov, B. Amit, I. Willner, *Chem. Commun.* **1998**, 839.
- [61] J. Wang, P. E. Nielsen, M. Jiang, X. Cai, J. R. Fernandes, D. H. Grant, M. Ozsoz, A. Beglieter, M. Mowat, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 5200.
- [62] F. Caruso, E. Rodda, D. N. Furlong, V. Haring, *Sens. Actuators B* **1997**, 41, 189.
- [63] F. Caruso, E. Rodda, D. N. Furlong, K. Niikura, Y. Okahata, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2043.
- [64] R. C. Ebersole, J. A. Miller, J. R. Moran, M. D. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 3239.
- [65] F. Caruso, D. N. Furlong, K. Niikura, Y. Okahata, *Colloids Surf. B* **1998**, 10, 199.
- [66] Y. Okahata, K. Niikura, Y. Sugiura, M. Sawada, T. Morii, *Biochemistry* **1998**, 37, 5666.
- [67] H. Su, K. M. R. Kallury, M. Thompson, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 769.
- [68] N. C. Fawcett, R. D. Craven, P. Zhang, J. A. Evans, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2876.
- [69] J. Wang, M. Jiang, T. W. Nilsen, R. C. Getts, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8281.
- [70] K. Niikura, H. Matsuno, Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8537.
- [71] A. Bardea, A. Dagan, I. Willner, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 385, 33.
- [72] H. Su, M. Thompson, *Biosens. Bioelectron.* **1995**, 10, 329.
- [73] H. Su, S. Chong, M. Thompson, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, 12, 161.
- [74] H. Su, S. Chong, M. Thompson, *Langmuir* **1996**, 12, 2247.
- [75] J. Wang, M. Jiang, E. Palecek, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1999**, 48, 477.
- [76] M. Muratsugu, F. Ohta, Y. Miya, T. Hosokawa, S. Kurosawa, N. Kamo, H. Ikeda, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2933.
- [77] F. Höök, M. Rodahl, P. Brzezinski, B. Kasemo, *Langmuir* **1998**, 14, 729.
- [78] F. Höök, M. Rodahl, B. Kasemo, P. Brzezinski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12271.
- [79] F. Höök, M. Rodahl, P. Brzezinski, B. Kasemo, *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, 208, 63.
- [80] J. Rickert, A. Brecht, W. Göpel, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 1441.
- [81] K. Niikura, K. Nagata, Y. Okahata, *Chem. Lett.* **1996**, 863.
- [82] K. Niikura, H. Matsuno, Y. Okahata, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 1609.
- [83] K. Ijio, H. Ringsdorf, E. Birch-Hirschfeld, S. Hoffmann, U. Schilken, M. Strube, *Langmuir* **1998**, 14, 2796.
- [84] M. Lion-Dagan, I. Ben-Dov, I. Willner, *Colloids Surf. B* **1997**, 8, 251.
- [85] M. Laatikainen, M. Lindstrom, *J. Colloid Interface Sci.* **1988**, 125, 610.
- [86] T. S. Berzina, L. Piras, V. I. Troitsky, *Thin Solid Films* **1998**, 327–329, 621.
- [87] J. Rickert, A. Brecht, W. Göpel, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, 12, 567.
- [88] F. Caruso, K. Niikura, D. N. Furlong, Y. Okahata, *Langmuir* **1997**, 13, 3427.
- [89] Y. Lvov, K. Ariga, T. Kunitake, *Chem. Lett.* **1994**, 2323.
- [90] Y. Lvov, K. Ariga, I. Ichinose, T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6117.
- [91] Y. Lvov, K. Ariga, I. Ichinose, T. Kunitake, *Langmuir* **1996**, 12, 3038.
- [92] Y. M. Lvov, Z. Lu, J. B. Schenkman, X. Zu, J. F. Rusling, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4073.
- [93] J. Anzai, Y. Kobayashi, Y. Suzuki, H. Takeshita, Q. Chen, T. Osa, T. Hoshi, X. Du, *Sens. Actuators B* **1998**, 52, 3.
- [94] J. Anzai, H. Takeshita, Y. Kobayashi, T. Osa, T. Hoshi, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 811.
- [95] E. Sackmann, *Science* **1996**, 271, 43.
- [96] C. Steinem, A. Janshoff, W.-P. Ulrich, M. Sieber, H.-J. Galla, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1279, 169.
- [97] T. Sato, T. Serizawa, Y. Okahata, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1285, 14.
- [98] T. Sato, T. Serizawa, Y. Okahata, *Front. Biomed. Biotechnol.* **1996**, 3, 145.
- [99] T. Sato, T. Serizawa, F. Ohtake, M. Nakamura, T. Terabayashi, Y. Kawanishi, Y. Okahata, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 12, 82.
- [100] Y. Okahata, Y. Ebara, T. Sato, *MRS Bull.* **1995**, 20(6), 52.
- [101] Y. Ebara, Y. Okahata, *Langmuir* **1993**, 9, 574.
- [102] „The Influence of Serum on the Spreading of Tumor Cells on Synthetic Glycolipid Films“: T. Sato, M. Endo, Y. Okahata, *Adv. Biomater. Biomed. Eng. Drug Delivery Syst. (Iketani Conf. Biomed. Polym.)* **1996**, 5, 273.
- [103] C. Steinem, A. Janshoff, H.-J. Galla, *Chem. Phys. Lipids* **1998**, 95, 95.
- [104] H. Ebato, J. N. Herron, W. Müller, Y. Okahata, H. Ringsdorf, P. Suci, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 1064; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 1087.
- [105] T. Molin, P. Fredman, L. Svennerholm, *FEBS Lett.* **1986**, 205, 51.
- [106] M. J. Swamy, D. Gupta, S. K. Mahanta, A. Surolia, *Carbohydr. Res.* **1991**, 213, 59.
- [107] A. Janshoff, C. Steinem, M. Sieber, H.-J. Galla, *Eur. Biophys. J.* **1996**, 25, 105.
- [108] A. Janshoff, C. Steinem, M. Sieber, A. el Baya, M. A. Schmidt, H.-J. Galla, *Eur. Biophys. J.* **1997**, 26, 261.
- [109] C. Steinem, A. Janshoff, J. Wegener, W.-P. Ulrich, W. Willenbrink, M. Sieber, H.-J. Galla, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, 12, 787.
- [110] J. S. Garvey, D. H. Campbell, N. E. Cremer, *Methods in Immunology: A Laboratory Text for Instruction and Research*, W. A. Benjamin, Reading, **1977**.
- [111] E. Engvall, *Methods Enzymol.* **1980**, 70, 419.
- [112] A. Shons, F. Dorman, J. Najarian, *J. Biomed. Mater. Res.* **1972**, 6, 565.
- [113] P. H. Ngeh-Ngwainbi, S. S. Foley, G. G. Kuan, J. Guilbault, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 5444.
- [114] B. König, M. Grätzel, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 341.
- [115] K. Nakanishi, H. Muguruma, I. Karube, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1695.
- [116] J. M. Abad, F. Pariente, L. Hernandez, E. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta* **1998**, 368, 183.
- [117] J. E. Roederer, G. J. Bastiaans, *Anal. Chem.* **1983**, 55, 2333.

- [118] M. Thompson, C. L. Arthur, G. K. Dhaliwal, *Anal. Chem.* **1986**, 58, 1206.
- [119] H. Muramatsu, J. Dicks, E. Tamiya, I. Karube, *Anal. Chem.* **1987**, 59, 2760.
- [120] K. Davis, R. T. Leary, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 1227.
- [121] A. Barraud, H. Perrot, V. Billard, C. Martelet, J. Therasse, *Biosens. Bioelectron.* **1993**, 8, 39.
- [122] R. M. Carter, J. J. Mekalanos, M. B. Jacobs, G. J. Lubrano, G. G. Guilbault, *J. Immunol. Methods* **1995**, 187, 121.
- [123] S. Drost, S. Hauck, E. Yacoub-George, H. Wolf, S. Koch, C. Kößlinger, B. Hillerich, K. Hieber, *Mater. Sci. Forum* **1998**, 287–288, 521.
- [124] F. Aberl, H. Wolf, C. Kößlinger, S. Drost, P. Woias, S. Koch, *Sens. Actuators B* **1994**, 18–19, 271.
- [125] F. Aberl, C. Kößlinger, H. Wolf, *Methods Mol. Med.* **1998**, 13, 519.
- [126] C. Kößlinger, S. Drost, F. Aberl, H. Wolf, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1994**, 349, 349.
- [127] E. Uttenthaler, C. Kößlinger, S. Drost, *Biosens. Bioelectron.* **1998**, 13, 1279.
- [128] E. Uttenthaler, C. Kößlinger, S. Drost, *Anal. Chim. Acta* **1998**, 362, 91.
- [129] I. Ben-Dov, I. Willner, E. Zisman, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3506.
- [130] J. S. Bovenizer, M. B. Jacobs, C. K. O'Sullivan, G. G. Guilbault, *Anal. Lett.* **1998**, 31, 1287.
- [131] M. Minunni, M. Mascini, R. M. Carter, M. B. Jacobs, G. J. Lubrano, G. G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta* **1996**, 325, 169.
- [132] I.-S. Park, N. Kim, *Biosens. Bioelectron.* **1998**, 13, 1091.
- [133] C. Steegborn, P. Skadal, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, 12, 19.
- [134] R. Blonder, S. Levi, G. Tao, I. Ben-Dov, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10467.
- [135] H. Ebato, C. A. Gentry, J. N. Herron, W. Müller, Y. Okahata, H. Ringsdorf, P. A. Suci, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1683.
- [136] P. Skladal, M. Minunni, M. Mascini, V. Kolar, M. Franek, *J. Immunol. Methods* **1994**, 176, 117.
- [137] M. Liu, Q. X. Li, G. A. Rechnitz, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 387, 29.
- [138] S. Storri, T. Santoni, M. Minunni, M. Mascini, *Biosens. Bioelectron.* **1998**, 13, 347.
- [139] R. C. Ebersole, M. D. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 8623.
- [140] A. Sargent, O. A. Sadik, *Anal. Chim. Acta* **1998**, 376, 125.
- [141] N. J. Geddes, E. M. Paschinger, D. N. Furlong, Y. Ebara, Y. Okahata, K. A. Than, J. A. Edgar, *Sens. Actuators B* **1994**, 17, 125.
- [142] N. J. Geddes, E. M. Paschinger, D. N. Furlong, F. Caruso, C. L. Hoffmann, J. F. Rabolt, *Thin Solid Films* **1995**, 260, 192.
- [143] I. Vikholm, W. M. Albers, *Langmuir* **1998**, 14, 3865.
- [144] J. Rickert, T. Weiss, W. Göpel, *Sens. Actuators B* **1996**, 31, 45.
- [145] J. Rickert, T. Weiss, W. Kraas, G. Jung, W. Göpel, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, 11, 591.
- [146] I. Vikholm, W. M. Albers, H. Valimaki, H. Helle, *Thin Solid Films* **1998**, 327–329, 643.
- [147] A. Näbauer, P. Berg, *Sens. Actuators B* **1990**, 1, 508.
- [148] N. Miura, H. Higobashi, *Sens. Actuators B* **1993**, 13–14, 188.
- [149] C. Zhang, G. Feng, Z. Gao, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, 12, 1219.
- [150] I. Willner, R. Blonder, A. Dagan, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 9365.
- [151] I. Willner, B. Willner, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1997**, 42, 43.
- [152] R. Blonder, I. Ben-Dov, A. Dagan, I. Willner, E. Zisman, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, 12, 627.
- [153] A. Hengerer, J. Decker, E. Prohaska, S. Hauck, C. Kößlinger, H. Wolf, *Biosens. Bioelectron.* **1999**, 14, 139.
- [154] D. M. Gryte, M. D. Ward, W. S. Hu, *Biotechnol. Prog.* **1993**, 9, 105.
- [155] J. Redepenning, T. K. Schlesinger, E. J. Mechalka, D. A. Puleo, R. Bizios, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 3378.
- [156] Y. C. Fung, *Biomechanics*, Springer, New York, **1994**.
- [157] Die Abklinglänge in der Zelle hängt selbstverständlich von der Viskosität der Zelle ab.
- [158] Mit $R \propto (\eta\rho)^{1/2}$ lässt sich für die Viskosität einer MDCK-I- oder -II-Zellmonoschicht ein Wert von ca. $0.1 \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ abschätzen. Dieser Wert erscheint im Vergleich zu denen anderer Methoden wie der Mikropipettentechnik sehr klein, allerdings ist hier die Messfrequenz sehr viel höher und die Auslenkungen sind kleiner.
- [159] J. Wegener, J. Seebach, A. Janshoff, H.-J. Galla, *Biophys. J.* **2000**, 8, 2821.
- [160] Während die Viskosität bei hyperosmolarer Belastung nur um den Faktor 2 erhöht wird, nimmt der Dämpfungswiderstand um den Faktor 6 statt $\sqrt{2}$ zu.
- [161] Aufgrund von Verknüpfungen (tight junctions) verhält sich die Zellmonoschicht wie eine für Wasser durchlässige semipermeable Membran.
- [162] J. Wegener, A. Janshoff, H.-J. Galla, *Eur. Biophys. J.* **1998**, 28, 26.
- [163] T. Matsuda, A. Kishida, H. Ebato, Y. Okahata, *ASAIO J.* **1992**, 38, M171.
- [164] G. Nimeri, C. Fredriksson, H. Elwing, L. Liu, M. Rodahl, B. Kasemo, *Colloids Surf. B* **1998**, 11, 255.
- [165] C. Fredriksson, S. Kihlman, M. Rodahl, B. Kasemo, *Langmuir* **1998**, 14, 248.
- [166] K. Otto, H. Elwing, M. Hermansson, *J. Bacteriol.* **1999**, 181, 5210.
- [167] A. Janshoff, J. Wegener, M. Sieber, H.-J. Galla, *Eur. Biophys. J.* **1996**, 25, 93.
- [168] K. Yun, E. Kobatake, T. Haruyama, M. E. Laukkanen, K. Keinänen, M. Aizawa, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 260.
- [169] B. Pignataro, C. Steinem, H.-J. Galla, H. Fuchs, A. Janshoff, *Biophys. J.* **2000**, 78, 487.
- [170] M. Liebau, G. Bendas, U. Rothe, R. H. H. Neubert, *Sens. Actuators B* **1998**, 47, 239.
- [171] M. Liebau, A. Hildebrand, G. Bendas, U. Rothe, R. H. H. Neubert, *Pharm. Ind.* **1999**, 61, 459.
- [172] P.-A. Ohlsson, T. Tjaernhage, E. Herbai, S. Loefas, G. Puu, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1995**, 38, 137.
- [173] J. Wang, L. M. Frostmann, M. D. Ward, *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 5226.
- [174] J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz, *Sens. Actuators B* **1999**, 54, 3.
- [175] Z. Salamon, H. A. Macleod, G. Tollin, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1331, 117.
- [176] Z. Salamon, H. A. Macleod, G. Tollin, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1331, 131.
- [177] A. Brecht, G. Gauglitz, W. Nahm, *Analysis* **1992**, 20, 135.
- [178] J. A. De Feijter, J. Benjamins, F. A. Veer, *Biopolymers* **1978**, 17, 1759.
- [179] R. Kush, J. M. Cronin, W. J. Stuart, C. H. Maule, J. Molloy, N. J. Goddard, *Biosens. Bioelectron.* **1993**, 7–8, 347.
- [180] K.-F. Giebel, C. Bechinger, S. Herminghaus, M. Riedel, P. Leiderer, U. Weiland, M. Bastmeyer, *Biophys. J.* **1999**, 76, 509.
- [181] A. Janshoff, K.-P. Dancil, C. Steinem, D. P. Greiner, V. S.-Y. Lin, C. Gurtner, K. Motesharei, M. J. Sailor, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12108.
- [182] N. Y. Kim, P. E. Laibinis, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4516.
- [183] J. H. Song, M. J. Sailor, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 2376.
- [184] J. M. Buriak, M. J. Allen, *J. Chem. Am. Soc.* **1998**, 120, 1339.
- [185] C. Kößlinger, E. Uttenthaler, S. Drost, F. Aberl, H. Wolf, G. Brink, A. Stanglmaier, E. Sackmann, *Sens. Actuators B* **1995**, 24–25, 107.
- [186] Unter dem Begriff „Zellzahlen“ wurde der Messbereich angegeben, der untersucht wurde und in dem eine Frequenzantwort erhalten wurde.
- [187] L. Bao, L. Deng, L. Nie, S. Yao, W. Wei, *Anal. Chim. Acta* **1996**, 319, 97.
- [188] H. Muramatsu, K. T. Kajiwar, E. I. Karube, *Anal. Chim. Acta* **1986**, 188, 257.
- [189] M. Plomer, G. G. Guilbault, B. Hock, *Enzyme Microb. Technol.* **1990**, 14, 230.
- [190] E. Prusak-Sochaczewski, J. H. T. Luong, G. G. Guilbault, *Enzyme Microb. Technol.* **1990**, 12, 173.
- [191] L. Deng, L. Bao, W. Z. Wei, L. H. Nie, S. Z. Yao, *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, 19, 525.
- [192] D. E. Nivens, J. Q. Chambers, T. R. Anderson, D. C. White, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 65.
- [193] K. D. Pavey, Z. Ali, C. J. Olliff, F. Paul, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 20, 241.
- [194] J. Wegener, *Impedanzspektroskopische und mikrogravimetrische Untersuchungen an barrierebildenden Zellen auf planaren Gold-elektroden*, Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster, **1998**.