Eurostars is a joint programme between more than 30
EUREKA member countries and the European Union

Schlussbericht zum Vorhaben

„Konzept und Zuverlässigkeit des Aptamer-FET-Biosensors“

im Rahmen des Eurostars Projekts
E! 113397 AFETAR
„Aptamer-Feldeffekttransistor-Diagnostikplattform zur schnellen Detektion von Antibiotika-resistenten Bakterien“

Dr.-Ing. Natalia Beshchasna

Fraunhofer-Institut für Keramische Technologien und Systeme IKTS
Maria-Reiche-Straße 2, 01109 Dresden

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin / beim Autor.

Förderkennzeichen 01QE1942C
Projektlaufzeit: 01.11.2019 – 31.10.2023

Zusammenfassung

Die Zunahme von Infektionen mit bakteriellen Krankheitserregern, die gegen Antibiotika resistent sind bereitet Medizinern besondere Sorge. Diese Art der Infektionen hat in den letzten Jahren massiv zugenommen. Das zentrale Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung einer Aptamer-Feldeffekttransistor (FET)-Diagnostikplattform zum schnellen Nachweis von antibiotikaresistenten Bakterien direkt aus Stuhlproben oder Analtupfern von Patienten für klinische Verwendung. Grundlegendes Ziel ist die Entwicklung eines für die klinische Anwendung geeigneten robusten Biosensor-Prototyps und einer kostengünstigen, reproduzierbaren und für die spätere Vermarktung geeigneten Herstellungstechnologie des Biosensors. Die Sensorfunktionalität soll durch Tests mit degradiertem Beta-Laktam-Antibiotikum im Labor nachgewiesen werden.
Das Ziel des Teilprojektes IKTS besteht in der Entwicklung eines funktionierenden Sensor-Konzeptes sowie in der Umsetzung und Validierung des Biosensors in Kooperation mit dem Partner Università degli Studi della Tuscia (UNITUS). In Kooperation mit den anderen Projektpartnern arbeitet IKTS an der Definition des Anforderungsprofils an den Biosensor, Spezifikation und ihrer regelmäßigen Aktualisierung. Unter Berücksichtigung der Sensor-Funktionalität sowie der Anwendbarkeit sollen user-freundliche Varianten des Sensor-Packages entwickelt und validiert werden. Dabei werden Fragestellungen der Werkstoffauswahl, der Sensor-Lebensdauer, der Reinigungs- und Sterilisationsabläufe sowie mechanischer, thermischer und elektrischer Belastungen berücksichtigt.
Der Bericht stellt die wesentlichen wissenschaftlichen und technischen Ergebnisse aus der Bearbeitung des Teilprojektes des Fraunhofer IKTS dar. Der Bericht bezieht sich auf den Projektzeitraum 01.11.2019 – 31.12.2023.

Keywords

Aptamer-Feldeffekttransistor (FET)-Diagnostikplattform, Biosensor-Element, Elektroden, Aptamer, Aufbau- und Verbindungstechnik für Sensorik.

1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

1.1 Aufgabenübersicht

Zu den Hauptaufgaben des IKTS im Verbundvorhaben gehört

- **Im Arbeitspaket 1:** Spezifikation für Biosensor und regelmäßige Aktualisierung

  - Erstellung der Spezifikation für Biosensor und regelmäßige Aktualisierung inkl. Literaturrecherche fokussierend auf dem Projektziel
  - Detaillierte Beschreibung der Messaufgaben und Anforderungen an das Messsystem, Formulierung der Zielvorgaben (zu bestimmende Konzentrationen von Antibiotika-Resten in den Testproben, Sensor-Spezifikationen für Sensitivitäten und Nachweisgrenzen)
  - Festlegung der Anforderungen an die Gesamtbaugruppe (Elektrodenherstellung, Funktionalisierung, Sensor-Package)
  - Konzepte der Probenpräparation und Bestimmung von Toleranzbereichen der Sensorelemente
  - Entwicklung von Kalibrierungskonzepten und Algorithmen
  - Auswahl von Sensor relevanten Werkstoffen (Substrat-, Elektroden und Einhausungswerkstoffe), physikalisch-chemische Materialcharakterisierung (Topographie, Benetzbarkeit)

- **Im Arbeitspaket 4:** Umsetzung und Validierung der Biosensor-Einweg-Kassette

  - Materialcharakterisierung und –Auswahl bezüglich Materialbeständigkeit für Sensorsubstrat, Mikrofluidik, Einhausung und Passivierung
  - Materialauswahl für Sensorkomponenten
  - Design des Biosensor-Packages bezüglich des Aufbaus und der Werkstoffauswahl
  - Machbarkeitstest mit der Biosensor-Einweg-Kassette

  Im Arbeitspaket 8: Zuverlässigkeit des Biosensors und Handling-Konzepte

  - Ermittlung der Stabilität und Degradation von Biorezeptoren
  - Einfluss von Umgebungsfaktoren auf die Biosensor-Funktionalität
  - Validierung der Sterilisationsvorgänge
  - Validierung der langzeitstabilen Einhausung
  - Zuverlässigkeit der Aptamer-Immobilisierung und Detektion
  - Sicherstellung der Zuverlässigkeit des Biosensors.

1.2 Stand der Arbeiten im Arbeitsplan IKTS

Alle Arbeiten haben einen guten Stand der Bearbeitung. Es bestehen keine Verzögerungen in der Durchführung der Arbeitspakete. Es bestehen gute Aussichten innerhalb des verbleibenden Zeitraums die Bearbeitung des Projektes erfolgreich abzuschließen. In der nachfolgenden Tabelle (Abb. 1) sind die Arbeitspakete mit Status aufgelistet.

Arbeitspaket	Status
AP 1 Spezifikation für Biosensor und regelmäßige Aktualisierung	abgeschlossen
AP 4 Umsetzung und Validierung der Biosensor-Einweg-Kassette	abgeschlossen
AP 8 Zuverlässigkeit des Biosensors und Handling-Konzepte	abgeschlossen

Abb. 1 Status der Bearbeitung von Arbeitspaketen IKTS

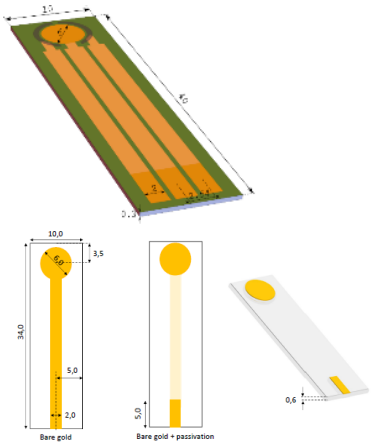
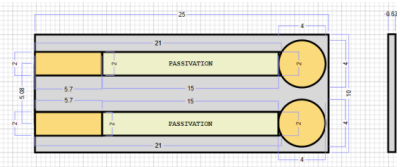
1.3 Beschreibung der Projektergebnisse in den Arbeitspaketen IKTS

1.3.1 Arbeitspaket 1: Spezifikation des Biosensors und regelmäßiges Update

Im Rahmen des Arbeitspaketes wurde die Definition des Anforderungsprofils an die Aptamer-FET-Diagnostikplattform zum schnellen Nachweis von antibiotikaresistenten Bakterien erarbeitet und in einer Spezifikation zusammengefasst (Abb. 2). Die wichtigsten Sensorparameter wurden analysiert und dokumentiert.
Der neu zu entwickelnde Sensor soll einen schnellen Nachweis eines offenen Beta-Lactam-Rings in Patientenproben ermöglichen. Es werden hoch-spezifische Aptamere für degradierte Antibiotikareste (Amoxicillin und Cephalexin) als empfindliche Biorezeptoren genutzt. Die spezifische Interaktion zwischen dem Target und der Sensoroberfläche führen zu einem Detektionsereignis, das dann von einem elektronischen Bauelement (wie FET, MOSFET) in ein elektrisches Signal übertragen und von einer eingebetteten Software analysiert werden kann.
Die Herausforderung des Ansatzes besteht darin, eine hohe Biomarkerspezifität und hohe Detektionsempfindlichkeit (Stromauflösung von ca. 1-10 nA) bei kompakten Abmessungen und geringen Kosten für das endgültige Sensorgerät zu kombinieren. Um eine Stromauflösung im nA-Bereich zu erreichen, können die Erfassungsfläche (extended gate) und das Transduktionselement (FET) mit einem mikroelektronischen System gekoppelt sein, das aus einer Präzisionsspannungsquelle (100 mV) besteht, die an einen Rshunt angeschlossen ist.

Abb. 2 Spezifikation des Aptamer-FET-Biosensors

Parameter/ Eigenschaften	Werte/ Information	Notizen
Biosensor-Gerätekonzept	Ausleseeinheit + Kartusche + grafische Benutzeroberfläche	Bindung, elektrisches Signal, Verstärkung, Digitalisierung, Software-Verarbeitung, Speicherung / Visualisierung
Messprinzip/ Analyt	Aptamer-FET-Detektion basierend auf der Änderung des Halbleiter-Source-Drain-Stroms aufgrund der Gate-Potentialänderung, die sich wiederum aus der Ladungsfreisetzung von abgebauten Beta-Lactam-Antibiotika ergibt	Hochspezifische Aptamere für abgebaute Antibiotika-Reste (Produkt des Abbaus von Amoxicillin unter dem Einfluss von Beta-Lactamase)
Aptamer-Bindungsstrategie	Mischung des Aptamers in einem Inkubationsröhrchen und Bindung mit einem	Synthese eines spezifischen Antisense zu den endgültigen Aptameren mit -SS- Brücke am 5'-

	Antisense an Gold; stärkere Affinität und Erhöhung der freigesetzten Ladung an das FET-Gate	Ende. Die Signaldetektion basiert auf der Menge der Aptamer-Bindung an das Antisense. Je höher die Konzentration des abgebauten Beta-Lactams ist, desto stärker ist das Signal. Es ist möglich, mehrere Aptamere für verschiedene Ziele im selben Assay mit spezifischen Antisense-Konstrukten für jedes Aptamer zu haben.
Probenmatrix	Physiologische Lösung, die Patientenabstriche und Antibiotika enthält. Für die Messung benötigtes Probenvolumen – weniger als 1 ml.	
Abmessungen der Kartusche, Chipdesign (L x H x B)	34 x 10 x 0.6 mm	
	25 x 10 x 0.63 mm	Alternativ ein Doppelelektroden-Sensor-chip zur Erhöhung der Zuverlässigkeit der BioFET-Messung, Verbesserung der Signalreproduzierbarkeit und Verringerung des Rauschens. 
Kartusche und Elektrodenmaterial	I. Substrat – Low Temperature Cofired Ceramics (LTCC) Sensorfläche – extended gate – Au; Referenzelektrode - Ag/AgCl oder Pt. II. Kapton-Folie + gesputtertes Gold auf Silizium. III. Substrat – Siliziumwafer	Substratdicke 600 µm Chip-Variante ohne Ag/AgCl-Elektrode um die Sensorstabilität und Goldreinheit zu verbessern. SiO/SiN oder Al2O3 als mögliche Passivierung (für III).

	(Standard 4" Si-Wafer, einseitig poliert, Standarddicke 525 ± 15 µm). (Standard 4" Si-Wafer, einseitig poliert, Standarddicke 525 ± 15 µm). Sensorfläche/extended gate – bedampftes Gold (mindestens 50 nm dick), Passivierung – SU8 oder andere Werkstoffe.	
Sensitivität/ Limit of Detection (LOD)	Konzentration des Analyts: 1-10 pM	konzeptionell
Betriebsmessbereich Niedrigste und obere Nachweisgrenzen	1 pM – 1 mM	konzeptionell
Durchlaufzeit (TAT) pro Probe	1-2 h	Von der Entnahme eines Abstrichtupfers bis zum Ausdruck/Export der Ergebnisse
Messzeit im Gerät	< 5 min?	
Integration von mikrofluidischen Komponenten	wahrscheinlich notwendig	Das hängt von dem für eine Messung notwendigen Probenvolum ab.
Empfohlene Lagerbed-ingungen (Temperatur, Feuchtigkeit)	Raumtemperatur/ Luftfeuchtigkeit	Die Kanäle müssen mit einem Lösungsmittel gefüllt sein, das die Antisense-Aktivität aufrechterhält (damit sie sich nicht auf der Ober-fläche zusammenfalten). Empfohlen wird 20% DMSO. Dieses würde vor der Verwendung ausgewaschen werden. Die in die Reaktion eingebrachten Antibiotika müssen frisch sein, da sie bekanntermaßen instabil sind. Idealerweise werden sie erst am Testort zugegeben.
Lagerzeit (bei empfohlenen Lagerbedingungen)	6 Monate	Aptamere werden in Probensammel-röhrchen lyophilisiert.
Robustes Gehäuse für den Sensorchip	noch zu definieren	Der Sensorchip: - bedeckt von einer Plastik-/ Papierfolie - eingehaust in einer Aluminium-Verpackung - gelegt in ein Kunststoffgehäuse

Robustheit der Elektroden	Elektroden benötigen möglicherweise ein Gehäuse zum Schutz (Staub/Feuchtigkeit)
Kennzeichnung	Das Feld für die Probenanwendung, die Einführrichtung und der Name des Analyten sollten auf der Kassette/Kartusche aufgedruckt sein. Der Beutel/die Kassette kann mit einem Barcode versehen werden: Er muss die Referenznummer, die Chargennummer, das Verfallsdatum und den Parameternamen enthalten.

1.3.2 Arbeitspaket 4: Umsetzung und Validierung der Biosensor-Einweg-Kassette

Im Rahmen von durchgeführten Arbeiten wurden verschiedene Technologien zur Herstellung von Sensorchips eingesetzt und für die Projektzwecke evaluiert.

1.3.2.1 LTCC-Chips

Low Temperature Cofired Ceramics (LTCC), (dt.: Niedertemperatur-Einbrand-Keramiken) ist eine Technologie zur Herstellung von Mehrlagenschaltungen auf der Basis von gesinterten Keramikträgern. Es können Leiterbahnen, Kondensatoren, Widerstände und Spulen erzeugt werden. Die Elemente können durch Siebdruck oder photochemische Prozesse aufgebracht werden. Die ungebrannten Keramikfolien werden einzeln strukturiert, danach gestapelt und laminiert. Abschließend wird ein definiertes Sinterprofil mit einer Spitzentemperatur von ca. 850 - 900 °C gefahren. Für die Fertigung von LTCC verwenden wir vorgefertigte Grünfolien. Abhängig vom vorgegebenen Design werden Löcher an vorgegebene Positionen gestanzt und mit einer Metallpaste befüllt. Diese sogenannten Vias bilden im Multilagenaufbau die vertikale Kontaktierung. Anschließend werden mittels Siebdruck die Metallpasten auf die Grünfolie aufgebracht, welche die planaren elektrischen Leiterbahnen bilden. Das Fraunhofer IKTS verfügt über umfangreiche Werkzeuge zur Auslegung und zum Design von mehrlagenkeramischen Komponenten und Systemen (FE-Tools: Ansys, Flex-PDE und COMSOL; Design Tools: Altium Designer und HYDE) sowie über eine komplette Technologielinie zur Entwicklung und Herstellung

keramischer Mehrlagenkomponenten. Weiterhin ist das Equipment für die funktionale Charakterisierung (z.B. Druck- und Strömungssensoren) und für Zuverlässigkeitsuntersuchungen vorhanden.

Der Begriff „Cofired“ verweist darin auf das Verfahren, Leiterbahnen gemeinsam mit der Glaskeramik zu brennen. Durch die moderaten Temperaturen beim Sintern sind niederohmige Edelmetallpasten mit Gold und Silber einsetzbar. Die LTCC-Technologie eignet sich hervorragend für biologische Verfahren und findet in einem breiten Spektrum Anwendung. Durch ihre Strukturierbarkeit, um Kanäle, Kammern und Membranen einzubringen und die hohe Anzahl an Methoden zur Fusion mit sensorischen, aktorischen und optischen Komponenten ist die LTCC-Technologie hervorragend für komplexe Systeme wie Lab-on-Chip und µTAS Verfahren geeignet. Gerade im Bereich der Biosensoren bieten keramische Werkstoffe unikale Eigenschaften: Langzeitstabilität, Bioverträglichkeit und die Möglichkeit der Kombination von elektrischen und isolierenden Eigenschaften.

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurden zum Aufbau der Chips verschiedene Substratmaterialien für LTCC und Gold- und Ag/AgCl-Pasten ausgewählt, um optimale Bedingungen für biosensorische Anwendungen zu gewährleisten (Abb. 3-6). Die Nutzung der Elektroden in Biosensoren stellt besondere Anforderungen an die Oberflächenbeschaffenheit der Goldelektroden und damit auch an die Keramik als deren Substrat.

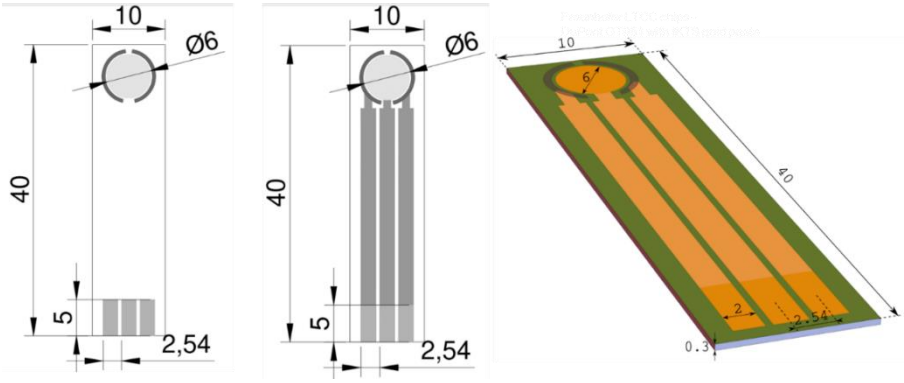


Abb. 3 Technisches Layout für die Sensorchip-Herstellung

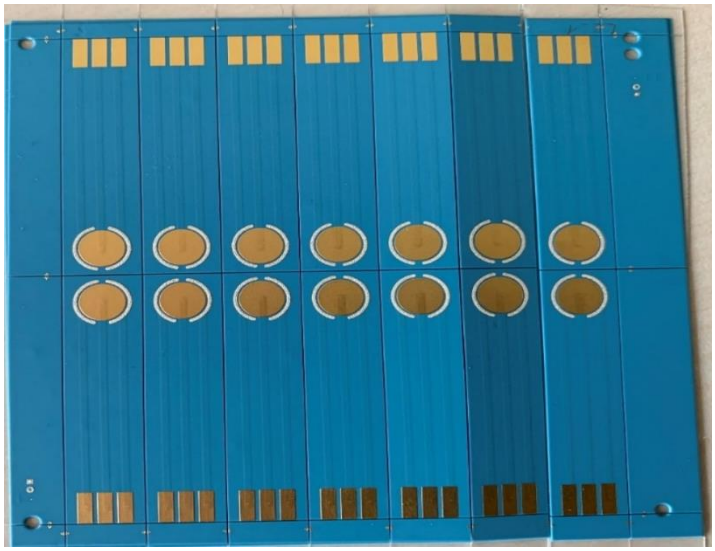


Abb. 4 Gedruckte Elektrodenstrukturen auf LTCC (BioElectrode 01), hergestellt am Fraunhofer IKTS (Ag / AgCl 125-21 chemisch beständige medizinische Elektrodentinte)

Nr.	Process	BioEl_01	BioEl_02
1	Cuttingt 4" x 4" GT951	✔	✔
2	Stamping	✔	✔
3	Via-Filling (Au-elektrodes)	Gold paste	Gold paste
4	Via-Filling Ag (RF-elektrodes)	Silver paste	Silver paste
5	Screen printing derivatives	✔	✔
6	Staking	✔	✔
7	Laminating	✔	✔
8	Co-firing I	✔	✔
9	Screen printing Au-electrodes	Gold (IKTS-paste)	Gold (IKTS-paste)
10	Co-firing II	✔	✔
11	Thickness measurement I	✔	✔
12	Screen printing RF-electrodes	125-21 (Ag/AgCl-paste - polymer)	Ag/AgCl (IKTS-paste)
13	Drying	✔	-
14	Co-firing III	-	✔
15	Thickness measurement II	✔	✔
16	Separating	✔	✔

Abb. 5 Herstellungsprozess für gedruckte Elektroden

Substrate BioEl-01 (LTCC substrate, polymer-Ag/AgCl paste (125-21 chemically resistant, medical electrode ink, Creative Materials, Inc.)

Messument device:	Microprof FRT
Sensor:	3000 µm
Points per line/Point distance: [µm]	15000/~5

Sensor	*after co-firing II*		*after drying*			
	Au [µm]		Ag/AgCl [µm]			
	L2	L3	L2		L3	
			left	right	left	right
1	12,607	13,885	15,206	16,139	16,548	19,157
2	11,859	10,864	10,172	17,861	20,674	9,742
3	13,468	11,048	22,621	17,816	25,829	19,666
4	12,469	10,711	21,963	17,009	20,648	16,292
5	14,415	13,889	13,855	15,919	17,761	8,535
6	13,663	10,804	28,620	11,516	17,861	19,076
7	13,023	11,416	10,173	15,591	18,995	14,885
Average value	13,072	11,802	16,747		17,548	
STADEV	0,8527749	1,4421106	5,054110683		4,397905816	

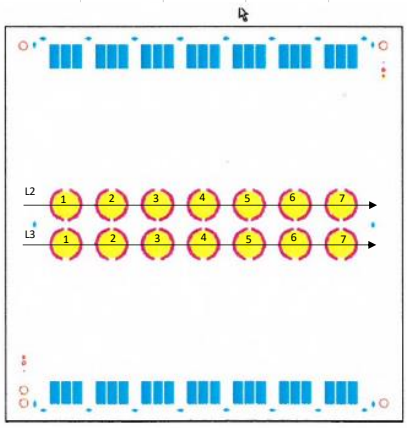


Abb. 6 Schichtdickenmessungen (BioElectrodes 01)

Substrate BioEl-02 (glass-Ag/AgCl paste IKTS made)

Messument device:	Microprof FRT
Sensor:	3000 µm
Points per line/Point distance: [µm]	15000/~5

Sensor	*after co-firing II*		*after drying*					
	Au [µm]		**Au [µm]**		**Ag/AgCl [µm]**			
					L2		L3	
	L2	L3	L2	L3	left	right	left	right
1	11,386	11,585	15,021	14,931	18,992	19,468	22,120	20,212
2	12,666	13,279	15,815	14,351	17,459	21,518	16,782	18,788
3	12,913	12,787	14,921	15,389	18,876	23,650	19,465	22,063
4	13,878	12,943	16,365	15,940	20,227	20,577	18,803	20,633
5	12,771	13,026	15,939	15,434	19,597	18,219	22,593	18,665
6	18,395	12,787	16,414	15,545	18,395	17,584	20,068	16,243
7	11,717	12,497	13,784	14,705	19,311	17,829	20,039	19,627
Average value	13,389	12,701	15,466	15,185	19,407		19,722	
STADEV	2,3536489	0,5477432	0,9466	0,5468	1,688137272		1,848488561	

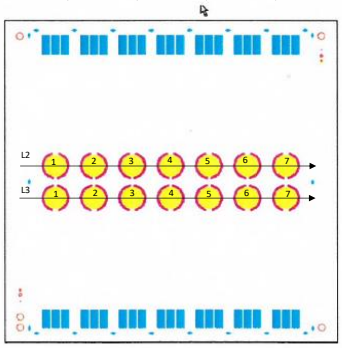


Abb. 7 Schichtdickenmessungen (BioElectrodes 02)

Ein erster Biosensorchip auf Basis eines LTCC-Substrats mit bedruckter Goldelektrode und zwei bedruckten Ag / AgCl-Referenzelektroden zeigte beim Testen bei UNITUS eine gute Leistung hinsichtlich Stabilität und Reproduzierbarkeit. Die Biosensorfähigkeit dieser Chips weist jedoch eine höhere Nachweisgrenze (LOD = 10 nM) im Vergleich zu der von Siliziumchips (erfahrungsmäßig zwischen 100 pM und 1 nM).
Als Alternative wurden im nächsten Schritte Sensor-Chips mit dem durch Sputtern aufgebrachten Gold hergestellt.

1.3.2.2 Herstellung von Sensorchips mit Sputtertechnologie

Die Sputtertechnologie ist eine der am weitesten verbreiteten PVD-Technologien und wird für verschiedenste Anwendungen von der Großflächenbeschichtung (z.B. Fensterglas) bis zur Beschichtung in der Mikroelektronik eingesetzt. Durch eine magnetfeldunterstützte Glimmentladung in Argonatmosphäre werden Argonionen erzeugt, die durch eine negative elektrische Vorspannung am Target mit hoher Energie auf das Target auftreffen. Dadurch werden Atome des Targetmaterials aus der Oberfläche herausgelöst und können zur Beschichtung von Substraten genutzt werden.

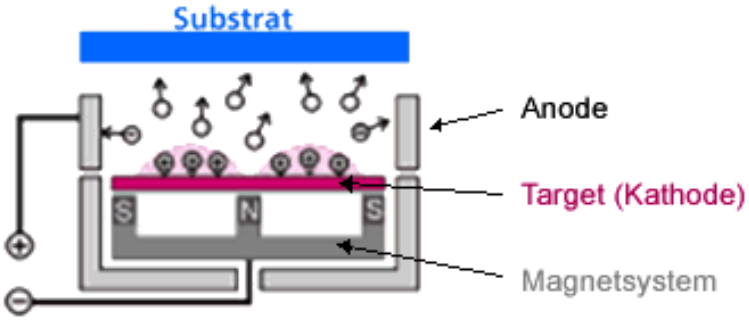


Abb. 8 Prinzip des Sputterprozesses

Im Vergleich zu LTCC-basierten Sensorchips sollten die gesputterten Gold-Elektroden eine deutliche kleinere Rauheit und eine bessere Homogenität aufweisen. Darüber hinaus wurden die auf dem Sensorchip integrierten Ag / AgCl-Pseudoreferenzen durch eine externe Volumenelektrode ersetzt, um die Sensorstabilität zu verbessern und eine mögliche Kontamination der Goldelektroden während der Oberflächenvorbereitung zu vermeiden. Ein neues Chip-Design (Abb. 9) wurde durch Sputtern von hochreinem Gold auf einer Kapton-Folie, der auf ein Siliziumsubstrat geklebt wurde, ohne Pseudoreferenzen

hergestellt. Die technologischen Schritte des Herstellungsprozesses sind in Abb. 10 dargestellt.

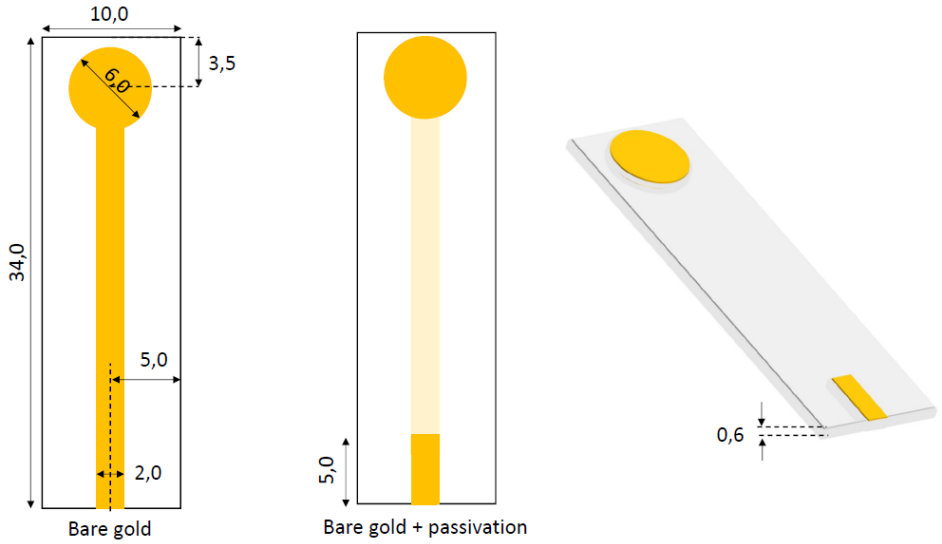


Abb. 9 Technisches Design 2 für die Herstellung von Sensorchips

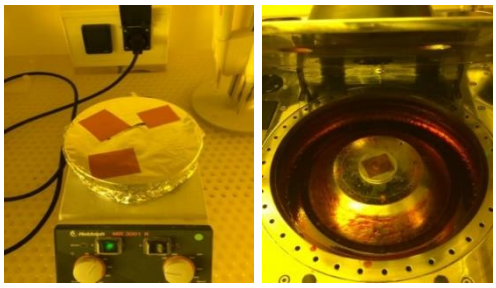
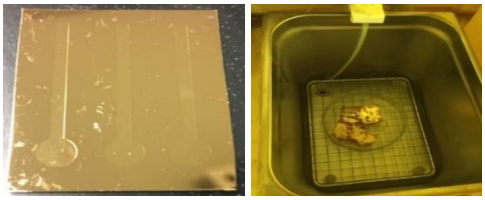
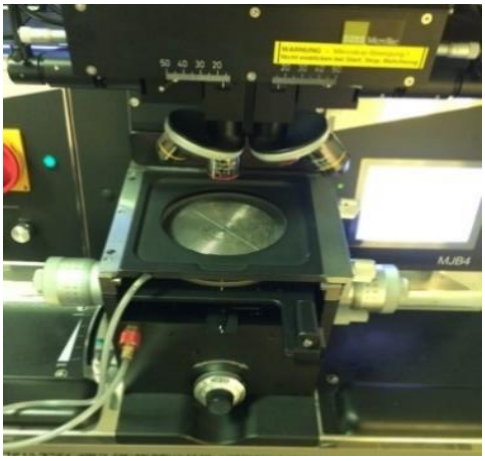
Herstellungsschritte	Abläufe/ Parameter
Vorbereitung der Kapton-Polyimid-Folie 	○ Reinigung des Kapton-Polyimidfilms mit Aceton und Isopropanol und Trocknen auf der Heizplatte; ○ Schleuderbeschichtung (Spin coating) mit Ti Prime, um die Haftungseigenschaften zu verbessern (4000 rpm, 4000 rpm/s, 50 s); ○ Erhitzen der Oberfläche bis 120°C für 2 min; ○ Spincoating der Oberfläche mit AZ5214e Fotolack (4000 rpm, 4000 rpm/s, 50 s); ○ Erhitzen der Oberfläche bis 110°C für 1 min; ○ Beleuchtung der Oberfläche mit der UV-Licht für 2.5 s; ○ Entwicklung der Oberfläche in AZ726MIF für 1 min.
Goldsputtern 	○ Abscheidung von 5 nm Chrom; ○ Abscheidung von 50 nm Gold; ○ Lift-off mit Aceton im Ultraschallbad.

Abb. 10 Herstellung von Sensor-Chips bei Magnetronsputtern

Passivierung 	○ Reinigung der abgeschiedenen Goldschicht mit Wasser und Isopropanol und Trocknen auf der Heizplatte; ○ Schleuderbeschichtung mit Ti-Prime, um die Haftungseigenschaften zu verbessern (4000 rpm, 4000 rpm/s, 50 s); ○ Erhitzen der Oberfläche bis 120 °C für 2 min; ○ Schleuderbeschichtung mit SU8-2010 - 500 rpm, 100 rpm/s, 10 s - 2000 rpm, 300 rpm/s, 1 min; ○ Vorbacken; - 65 °C für 1 min - 95 °C für 6 min ○ Exposition im UV-Licht für 7.5 s ○ Nachbacken (bei 65 oC für 2 min zuerst und dann bei 95 oC für 9 min); ○ Entwicklung der Oberfläche in MR600 für 140 s; ○ Die Oberfläche 30 min bei 180 ° C hart backen.
Integration auf Siliziumwafer 	○ Schneiden des Siliziumwafers in die Chips der gewünschten Größe; ○ Aufbringen von 3M Adhesive 9482PC-Klebeband auf das Silizium.

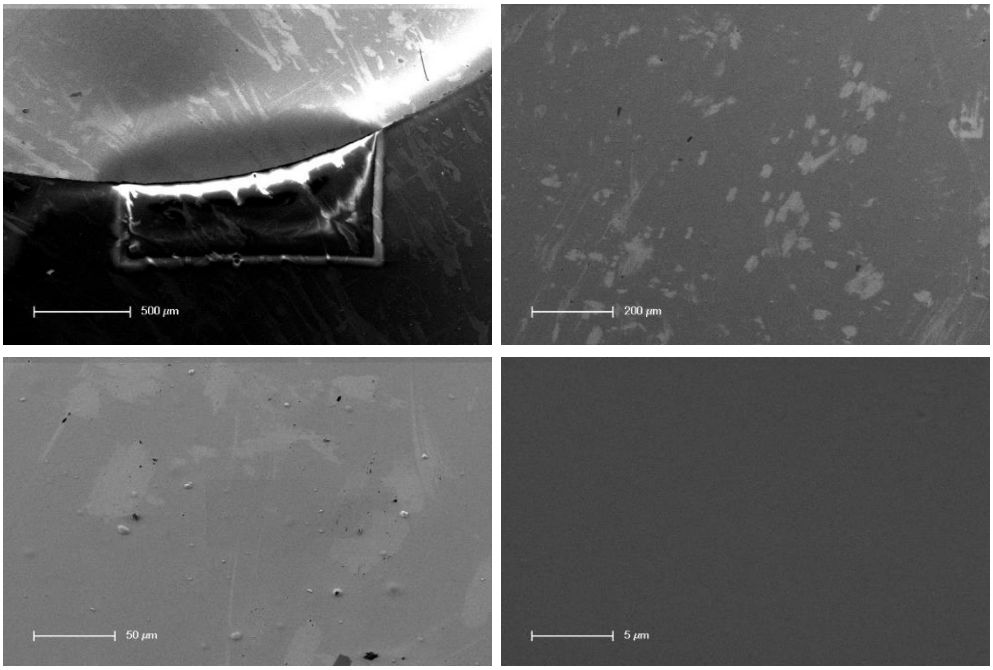


Abb. 11 REM-Aufnahmen von hergestellten Sensor-Chips (Design 2)

Die Ergebnisse von rasterelektronenmikroskopischen (REM) (XL 30 ESEM-FEG Philips, Voltage 3.0 kV) Aufnahmen demonstrieren eine homogene glatte Goldelektrodenoberfläche. Die Kontaktwinkelmessungen wurden mit dem optischen Kontaktwinkelmesssystems OCA 200 (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Deutschland) unter Verwendung von drei Testflüssigkeiten Wasser, Ethylenglykol und Diiodmethan durchgeführt. Die Parameter der Testflüssigkeiten sind in Abb. 12 aufgeführt. Die Sensoroberflächen weisen hydrophile Oberflächeneigenschaften auf, was auf eine günstige Oberfläche für die Biosensorapplikation hindeutet. Demnächst werden die hergestellten Chips hinsichtlich der Sensormessung bei Partnern evaluiert.

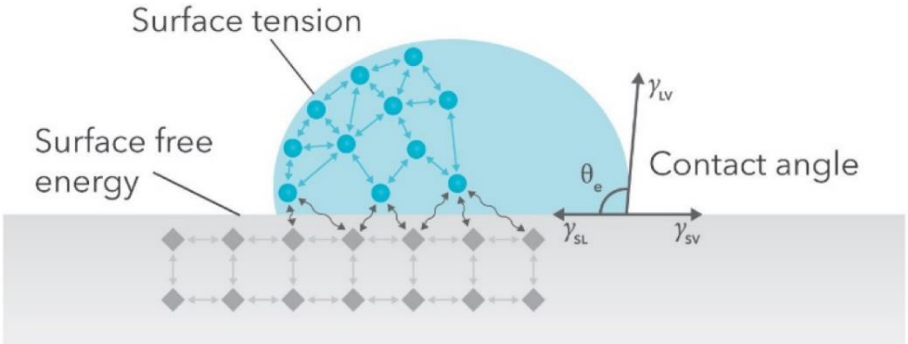


Abb. 12 Parameter der Testflüssigkeiten

Testflüssigkeit	Oberflächenspannung (γ_{LV}, mN/m)	dispersiver Anteil		polarer Anteil	
		$\alpha_L = \sqrt{\gamma_L^p}$, $(mN/m)^{1/2}$	γ_{LV}^d, mN/m	$\beta_L = \sqrt{\gamma_L^d}$, $(mN/m)^{1/2}$	γ_{LV}^p, mN/m
Wasser	72,1	4,46	19,9	7,23	52,2
Ethylenglykol	48,0	5,29	28,0	4,34	19,0
Diiodomethan	50,0	6,88	47,4	1,58	2,60

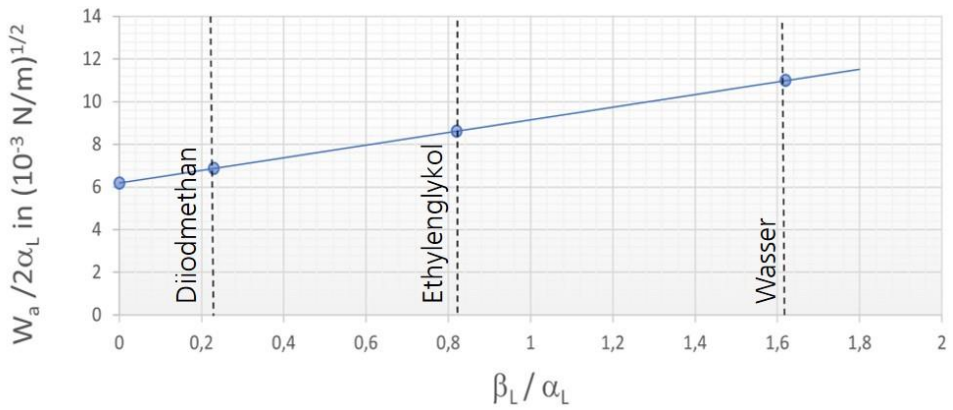


Abb. 13 Adhäsionsarbeit der Fest-Flüssig-Grenzfläche

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten wurden in Ergänzung zu den früher vorgestellten Goldelektroden auf dem LTCC- und Polyimidsubstrat zwei weitere Technologien, chemische Gasphasenabscheidung kombiniert mit Elektronenstrahlverdampfen zur Herstellung von Silizium-basierten Chips und Inkjet-Druckverfahren zur Herstellung von Polyethylennaphthalat (PEN)-basierten Sensorchips, eingesetzt. Das Sensordesign wurde dabei nicht geändert (Abb. 2).

1.3.2.1 Design und Herstellung von Silizium-basierten Sensorchips mit Gold-Finish-Schicht

Für die Herstellung von Au/Si-Chips wurden Standard 4" Si-Wafer [100], einseitig poliert, mit einer Standarddicke von 525 ± 15 µm, 1-10 µOhm/cm und mit 100-200 nm SiO_2 verwendet. Als Hauptanforderung an die Sensorchips war eine Passivierung der großen Goldfläche, wie auf dem Sensordesign dargestellt, notwendig. Als Passivierungsschicht wurde 50 nm Siliziumnitrid (SiN) +50 nm Siliziumoxid (SiO) ausgewählt (Abb. 14). Eine Kombination dieser beiden Schichten wurde in der Literatur als eine erfolgreiche Passivierung für Si-basierte Biosensorchips bereits beschrieben [1]. Die Passivierungsschicht wurde in einem chemischen Gasphasenprozess (Chemical Vapour Deposition, CVD) unter 340 °C auf die Goldschicht aufgebracht. Die 100 nm dicke Goldschicht wurde durch Elektronenstrahlverdampfen hergestellt. Zusätzlich wurde eine 5 nm dicke Titanschicht als Haftschicht aufgebracht. Die Strukturierung der SiN/SiO-Passivierungsschicht wurde mittels des reaktiven Ionenätzens (RIE) realisiert. Dadurch wurde (20 – 30) nm Gold abgetragen und eine raue Oberfläche erzeugt (Abb. 15). Die Goldabscheidung konnte auf eine gewünschte Restschichtdicke angepasst werden. Eine gute Haftung der SiN/SiO-Passivierungsschicht auf der Goldoberfläche konnte erzielt werden. Trotz einer guten Haftung war die Qualität der einzelnen Sensorchips nicht befriedigend, da es Au-Diffusion zwischen dem Au – Ti – Si nach der SiN/SiO CVD bei 340°C festgestellt wurde (Abb. 16). Die 5 nm dicke Ti-Schicht konnte keine ausreichende Diffusionsbarriere ermöglichen. Daher wurden in den nächsten Versuchen eine 30 nm dicke Ti-Schicht und 5 nm und 30 nm dicke WTi-Schichten als weitere mögliche Diffusionsbarrieren untersucht (Abb. 17, 18). Ein diffusionsfreies Interface mit einer guten Haftung der einzelnen Schichten wurde durch den in der Abb. 19 dargestellten Schichtaufbau mit einer größeren WiTi-Schichtdicke von (30-50) nm ermittelt. Zur Reduzierung der Defektdichte wurde zusätzlich SiN/SiO-Untergrund eingesetzt (Abb. 19-21). Diese Zwischenschicht reduzierte die Defekte deutlich.

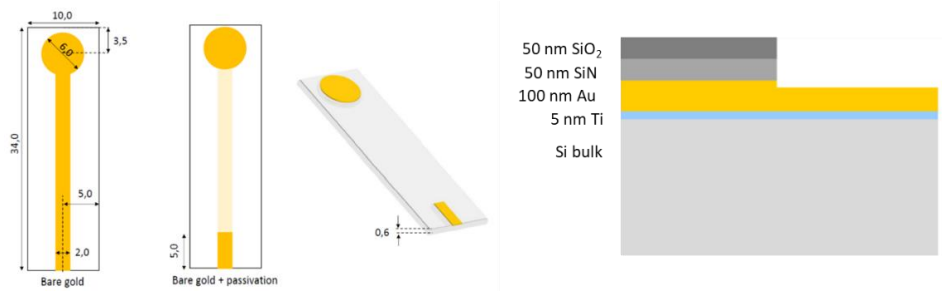


Abb 14. Sensordesign (links) und die erste Schichtkonfiguration des Siliziumchips (links)

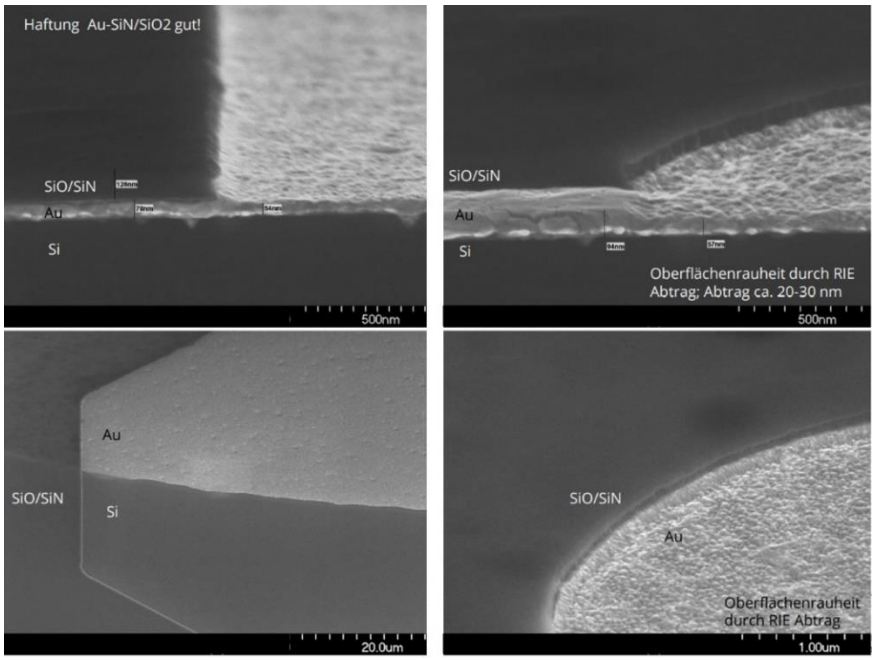


Abb 15. Strukturierung der SiN/SiO-Passivierungsschicht mittels des reaktiven Ionenätzens (REM-Aufnahmen)

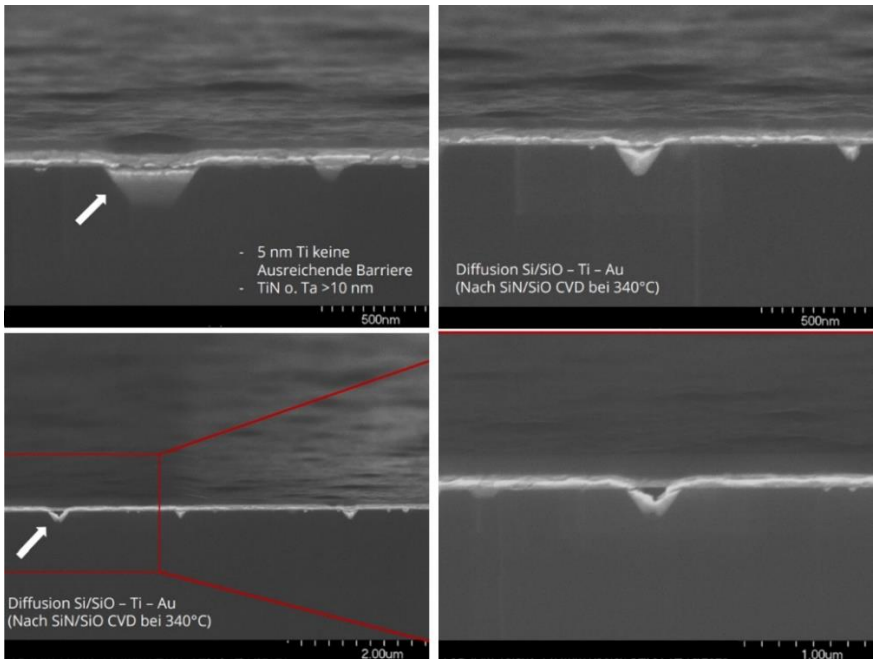


Abb 16. Au-Diffusion zwischen dem Au – Ti – Si nach der SiN/SiO CVD (REM-Aufnahmen)

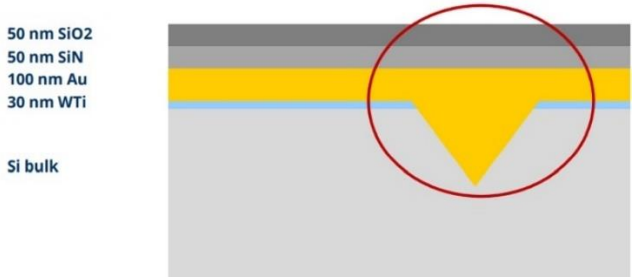


Abb 17. Schichtkonfiguration des Silizium-Chips mit einer Diffusionsbarrierre aus WTi

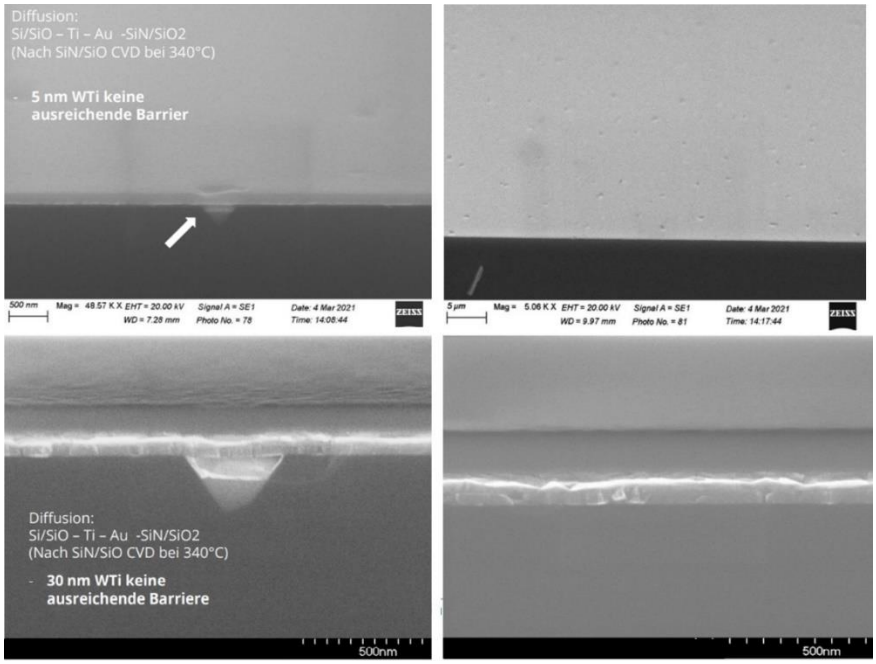


Abb 18. Schichtkonfiguration des Silizium-Chips mit einer Diffusionsbarrierre aus WTi (REM-Aufnahmen)

Abb 19. Schichtkonfiguration des Silizium-Chips mit einem diffusionsfreien Interface

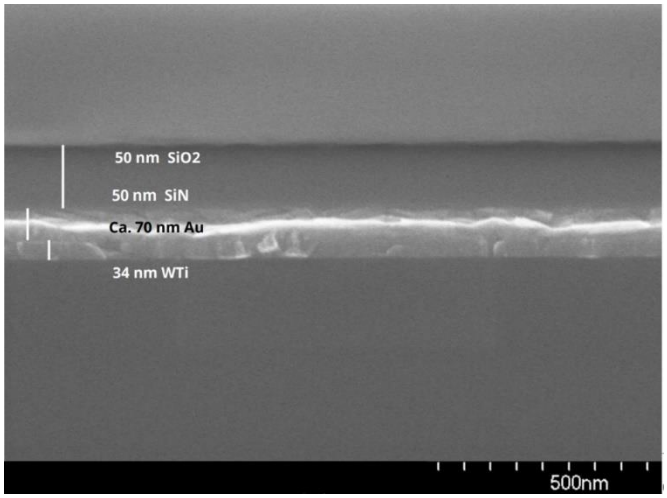


Abb 20. Schichtkonfiguration des Silizium-Chips mit einem diffusionsfreien Interface (REM-Aufnahme)

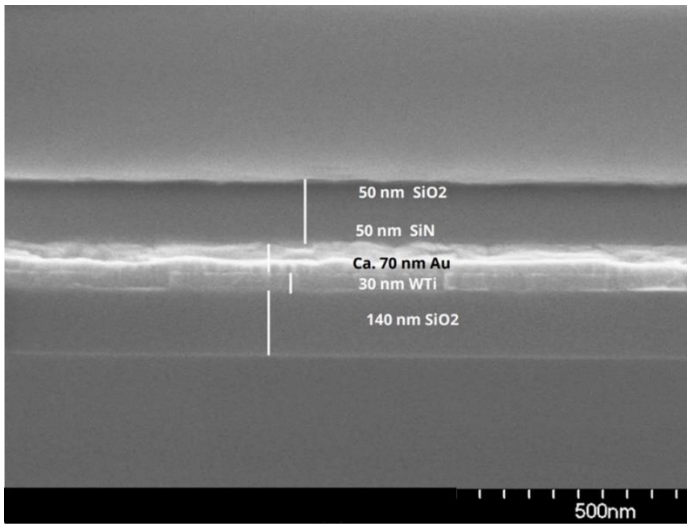
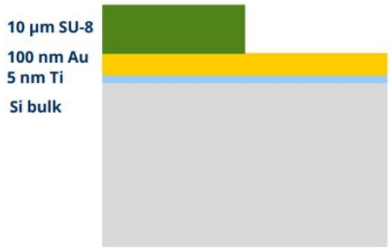


Abb 21. Schichtkonfiguration des Silizium-Chips mit einem diffusionsfreien Interface und einem zusätzlichen SiN/SiO-Untergrund zur Reduzierung der Defektdichte (REM-Aufnahme)

Alternativ zu SiO/SiN-Passivierung wurde die Möglichkeit einer Passivierung mit dem Negativlack SU-8 untersucht (Abb. 22). Die Anwendung von SU-8 könnte den Vorteil der lithographischen Strukturierbarkeit bieten, was den Aufwand bei der Herstellung von Chips deutlich reduzieren würde. Allerdings zeigten die hergestellten und mit SU-8 passivierten Sensorchips Spannungsrisse und Defekte in großflächig vernetzten SU-8 Flächen. Anhand von lichtmikroskopischen Aufnahmen wießen die quervernetzten Gebiete nach dem entwickeln eine hohe Defektdichte in Form von Rissen auf (Abb. 23). Diese Spannungsrisse und Defektstellen im quervernetzten SU-8 konnten auch nicht durch einen angepassten Postexposurebake mit geringen thermischen Gradienten reduziert werden. Laut der endgültigen Auswertung der Ergebnisse stellte SU-8 somit keine ausreichende Passivierung dar.
Schließlich wurden 300 Sensorchips mit dem Schichtaufbau (50 nm SiO/ 50 nm SiN / 100 nm Au / 30-50 nm WTi /140 nm SiO /bulk Si) hergestellt und an Projektpartner UNITUS zur weiteren Charakterisierung verschickt (Abb. 24).



Process parameters:

- SU-8-3035 (75 % SU-8-3035/ 25 % Thinner)
- starting temperature: 200 °C/5 min
- HMDS: 30 °C/5 min
- SpinOn: 2000 rpm/ 30 sec = 10 um
- Softback: 70 °C/95° 300 s/300 s
- Exposure: 200 mJ/cm^2
- PEB: 65 °C/ 1 min + 95°/ 6 min
- Development: 6 min SU-8 developer

Abb 22. Schichtkonfiguration des Silizium-Chips mit einer SU-8-Passivierungsschicht

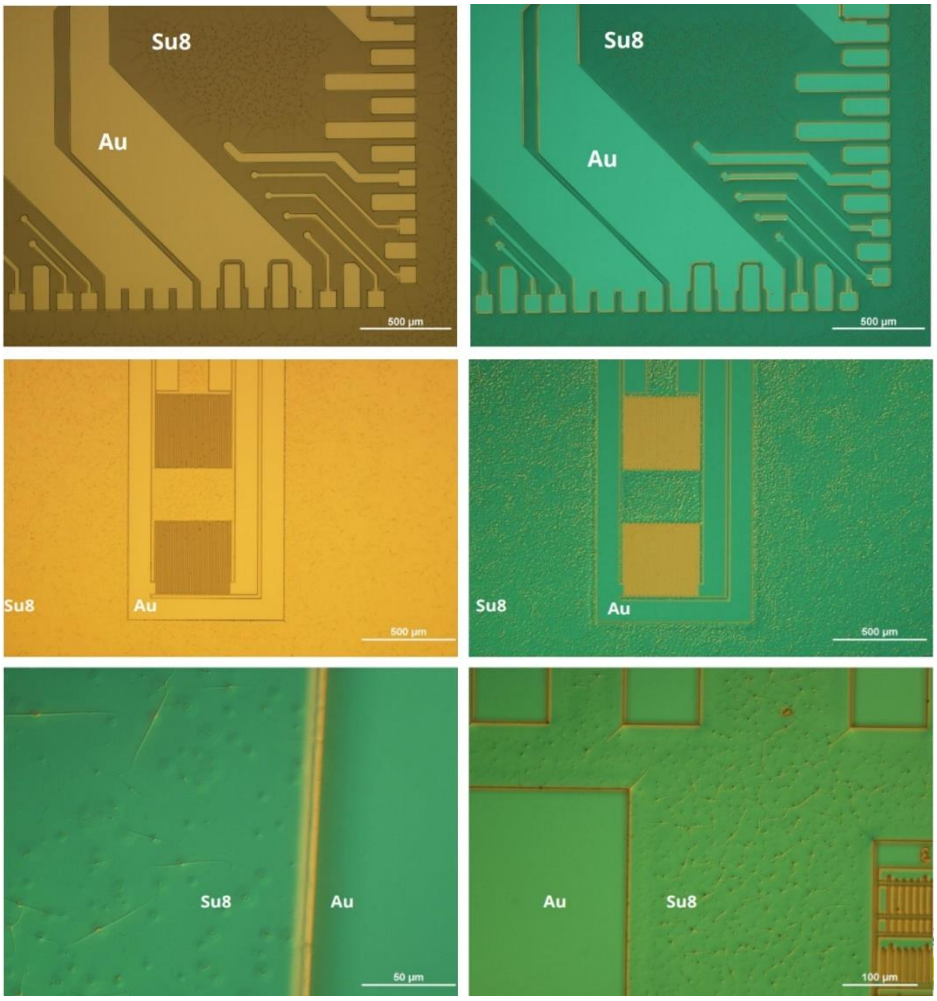


Abb 23. Silizium-Chip mit einer SU-8-Passivierungsschicht (lichtmikroskopische Aufnahmen)

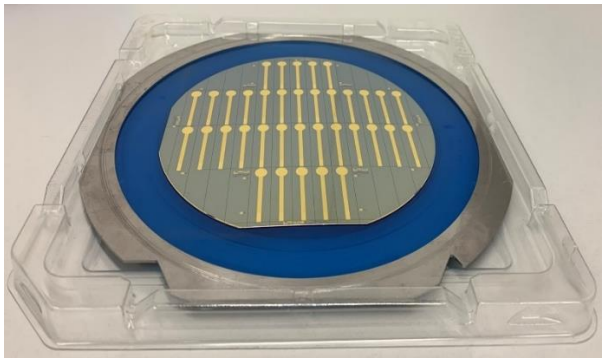


Abb 24. Silizium-Chip (endgültige Konfiguration)

1.3.2.2 Design und Herstellung von Polyethylennaphthalat-basierten Sensorchips mittels Inkjet-Drucktechnologie

Mittels Inkjet-Drucktechnologie können hochaufgelöste Schichtstrukturen bei hoher Flexibilität des Drucklayouts berührungslos auf dem Zielsubstrat erzeugt werden. Die Technologie erlaubt eine Skalierung bis zum Rolle-zu-Rolle Maßstab. Beispiel für technische Anwendungen sind die Herstellung von Sensoren oder direkt gedruckte Leiterbahnen in der Mikroelektronik. Die Technologie wurde im Projekt angewendet um kostengünstige Sensorsubstrate auf Polyethylennaphthalat (PEN)-Folien herzustellen.
Polyethylennaphthalat ist ein durch Polykondensation hergestellter thermoplastischer Kunststoff aus der Familie der Polyester. PEN unterscheidet sich von

Polyethylenterephthalat (PET), das als Substratmaterial für Drucktechnologien langjährig erprobt ist, durch eine höhere Gasdichtigkeit und Wärmeformbeständigkeit, sowie die mechanischen Werte (E-Modul, Festigkeit) und eine gesteigerte Chemikalien-, UV- und Hydrolysebeständigkeit. Der Kunststoff ist bis ca. 220 °C thermisch stabil.
Au/PEN-Chips wurden als kostengünstige Lösung für die Herstellung von Einweg-Biosensoren auf Aptamer-FET-Basis betrachtet und im Tintenstrahldruck mit Dimatix-Druckköpfen der DMP-Klasse mit den folgenden Backofen-Sinterung und Linienlaser Nachsinterung (Sinterung bei erhöhter Temperatur unter thermische Schonung der PEN-Folie) hergestellt. Zur Optimierung der Druckparameter für das im Projekt ausgewählten Elektrodendesign wurde eine Vorstudie mit Variation der dpi-Auflösung und Auswertung der Druckqualität bezüglich des Drucklayouts im Druckprozess sowie der Auswahl optimaler Prozessparameter durchgeführt (Abb. 25 -27). Die Trocknung und Sinterung der Proben erfolgte in einem Labortrockenschrank. Exemplarische Kontrolle der elektrischen Leitfähigkeit der gedruckten Goldelektroden wurde durchgeführt. Alle Proben mit guter Leitfähigkeit mit ca. 7 bis 10 Ohm je Elektrode wurden bereits nach Ofensinterung erreicht. Die Benetzung der Tinte auf der Polymerfolie wurde durch Plasma Vorbehandlung erhöht. Die Sinterung der Proben wurde bei 220 °C für 30 min durchgeführt. Die Qualität der gedruckten Elektroden wurde mittels Stereomikroskopie bewertet (Abb. 26). Das beste Ergebnis wurde mit dem 30-Ohmigen Widerstand, der 1016 dpi Auflösung und fünffachem Druck erreicht (Abb. 28).

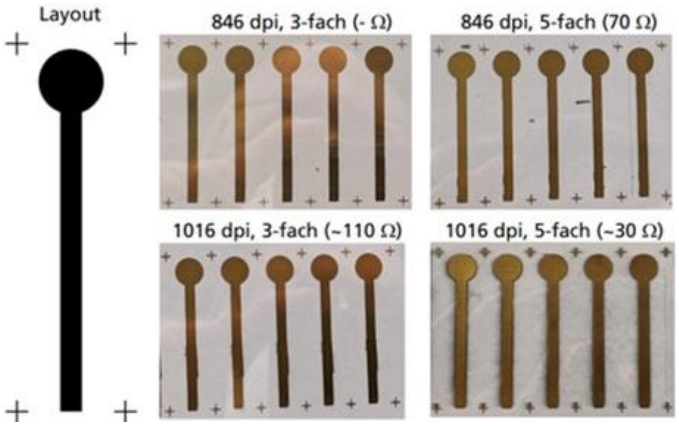


Abb 25. Vorstudie mit Variation der dpi-Auflösung zur Herstellung von PEN-basierten Sensorchips

Bezeichnung	Bemerkung	Ofensinterung	Laser-Nachbehandlung (HPDL)	R / Ohm
846 dpi, 5x	2 Stk.	Ja	nein	70 – 80
846 dpi, 5x No.6	1 Stk.	Ja	Ja	10
846 dpi, 5x No.7	1 Stk.	Ja	Ja	11
846 dpi, 5x No.8	1 Stk.	Ja	Ja	19
1016 dpi, 3x	2 Stk.	Ja	nein	100 - 120
1016 dpi, 3x No.10	1 Stk.	Ja	Ja	18
1016 dpi, 3x No.11	1 Stk.	Ja	Ja	24
1016 dpi, 3x No.12	1 Stk.	Ja	Ja	32
1016 dpi, 5x	2 Stk.	Ja	nein	29 - 37
1016 dpi, 3x No.14	1 Stk.	Ja	Ja	11
1016 dpi, 3x No.15	1 Stk.	Ja	Ja	15
1016 dpi, 3x No.16	1 Stk.	Ja	Ja	10

Abb 26. Vorstudie mit Variation der dpi-Auflösung zur Herstellung von PEN-basierten Sensorchips (Parameterauswahl)

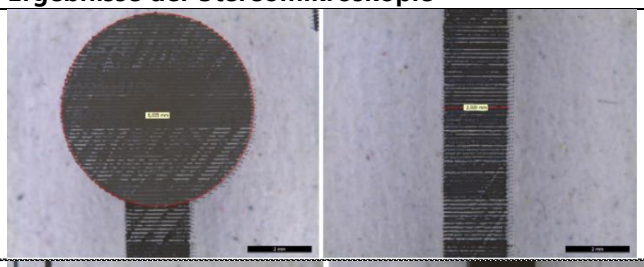
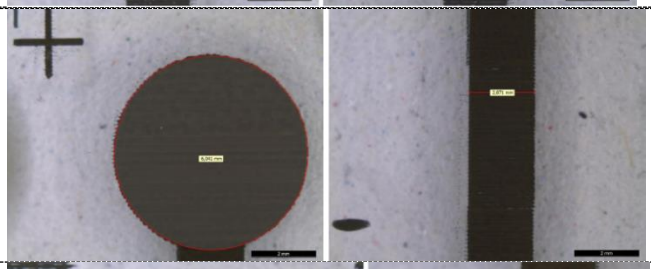
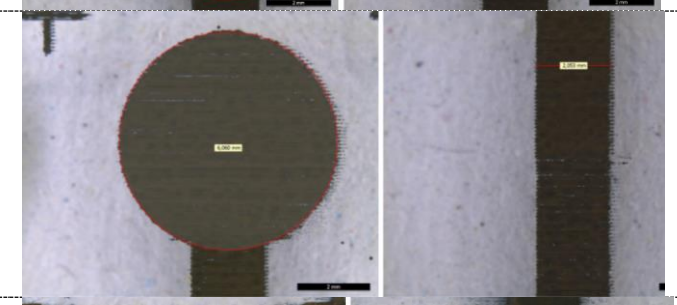
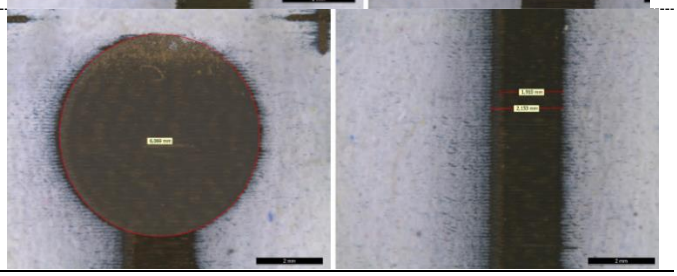
Inkjetdruckparameter	Ergebnisse der Stereomikroskopie
846 dpi, 3-fach Druck (Zustand getrocknet)	
846 dpi, 5-fach Druck (Zustand getrocknet)	
1016 dpi, 3-fach Druck (Zustand getrocknet)	
1016 dpi, 5-fach Druck (Zustand getrocknet)	

Abb 27. Vorstudie mit Variation der dpi-Auflösung zur Herstellung von PEN-basierten Sensorchips (Ergebnisse der Stereomikroskopie)

Abb 28. PEN-basierte Sensorchips

1.3.2.3 Physikalisch-chemische Charakterisierung von Sensorchips und anwendungsorientierter Vergleich

Messungen der Oberflächenrauheit

Alle im Rahmen des Projektes hergestellten Sensorchips wurden hinsichtlich ihrer Oberflächentopographie (Rauheit) und Benetzbarkeit charakterisiert. Zur Charakterisierung der Oberflächentopographie mit Abschätzung der in DIN EN ISO 4287 definierten Rauheitswerte Ra, Rz, Rt, RMS und Rmax wurde das Laserprofilometer µSCAN der NANO FOCUS AG eingesetzt. Hier ist Ra – die durchschnittliche Rauhigkeit, Rz – die durchschnittliche maximale Höhe des Profils, Rt – die maximale Höhe des Profils, RMS – die mittlere quadratische Rauheit und Rmax – die maximale Rauheitstiefe. Die Auflösung sowohl in x- als auch in y-Richtung wurde auf 0,02 nm, die Abtastrate des Sensors auf 800 Hz und die Abtastgeschwindigkeit auf 16 $mm.s^{-1}$ eingestellt. Alle Werte sind der Durchschnitt von drei Proben und sind in Abb. 29 dargestellt. 2D- und 3D-Bilder der Höhenprofile der Elektrodenoberflächen sind in Abb. 30 dargestellt. Die Rauhigkeitswerte der Sensorchips hergestellt nach verschiedenen Technologien (Au/LTCC, Au/PCB, Au/Si und Au/PEN) wurden analysiert und verglichen. Die niedrigste Rauheitswerte wurden auf Au/Si-Chips gemessen, während die höchsten Rauheitswerte auf LTCC-Chips erzielt sind.

Parameter	Au-Silicon	Au-LTCC	Au-PEN	Au-PCB
Ra, µm	0.0542 ± 0.01	1.5413 ± 0.07	0.3710 ± 0.04	0.3082 ± 0.08
Rz, µm	0.7322 ± 0.36	18.6828 ± 4.24	3.1310 ± 0.39	3.4252 ± 0.69
Rt, µm	1.6350 ± 1.09	23.0640 ± 6.68	4.0368 ± 0.64	5.7380 ± 2.59
RMS, µm	0.0878 ± 0.03	2.1972 ± 0.22	0.4797 ± 0.05	0.4293 ± 0.10
Rmax, µm	1.6108 ± 1.11	22.7615 ± 6.93	3.8402 ± 0.73	4.9065 ± 1.41

Abb 29. Rauheitswerte der untersuchten Sensorchips

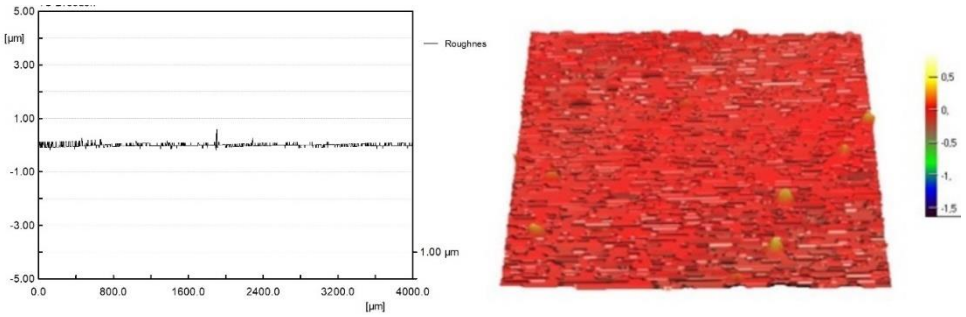
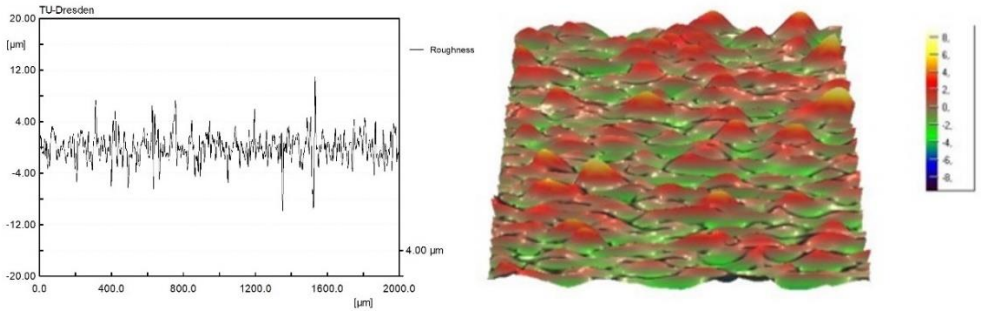
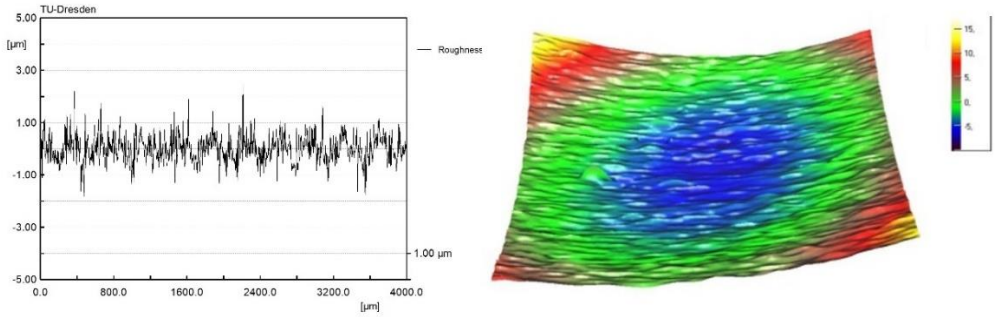
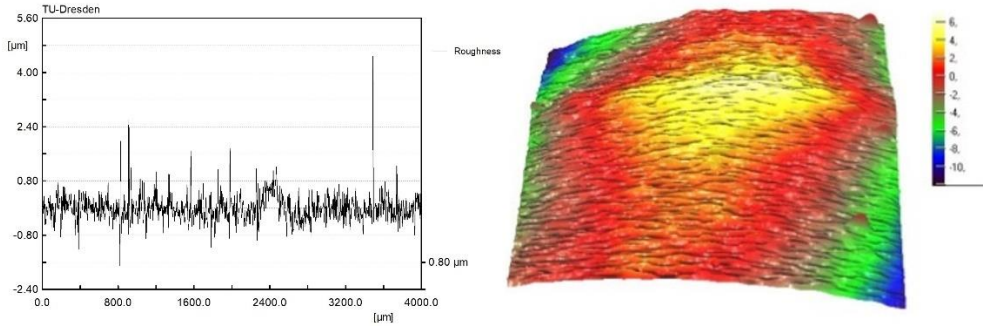


Abb 30. 2D- und 3D-Bilder der Höhenprofile der Elektrodenoberflächen







Benetzbarkeit und freie Oberflächenenergie

Kontaktwinkelmessungen wurden mit dem Kontaktwinkelmessgerät DataPhysics OCA 20-Systems (Filderstadt, Deutschland) bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Drei verschiedene Testflüssigkeiten: Wasser, Diiodmethan (DIM) und Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden für alle Proben als Testflüssigkeiten eingesetzt. Die Oberflächenspannungen mit ihren polaren $\gamma_L{}^p$ und dispersiven $\gamma_L{}^d$ Anteilen sind bekannt und in der Abb. 31 dargestellt. Die Messergebnisse für alle vier getesteten Sensorchips mit drei Testflüssigkeiten sind in der Abb. 32 dargestellt. Laut Literaturangaben variiert der Kontaktwinkel vs. Wasser für reines Gold im Bereich von 40° bis 80° [2]
Die an Sensorchips gemessenen und in der Abb. 33 dargestellten Messwerte zeigen eine Übereinstimmung mit Literaturangaben für alle Sensorchips außer Au/Si-Chips, welche einen hydrophoben Charakter besitzen.

Testflüssigkeit	γ_L (mJ/m²)	$\gamma_L{}^d$ (mJ/m²)	$\gamma_L{}^p$ (mJ/m²)
Wasser	72.8	21.8	51
Dimethylsulfoxid	44	36	8
Diiodmethan	50.8	4.2	46.7
Ethylene glycol	48.3	29.3	19.0

Abb 31. Oberflächenspannung mit polarem und dispersivem Anteil für drei verschiedene Testflüssigkeiten (Quelle: Kaeble, Moacanin (1977)

Sensorchip	Water, °	DMSO, °	DIM, °
Au-Si	86.2 ± 0.4	15.2 ± 0.8	30.3 ± 0.3
Au-LTCC	74.8 ± 0.9	24.5 ± 1.1	41.2 ± 2.0
Au-PEN	60.8 ± 2.6	16.7 ± 0.3	11.8 ± 0.3
Au-PCB	53.7 ± 1.8	33.1 ± 3.2	49.5 ± 1.7

Abb 32. Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen für alle gemessenen Sensorchips

Die gemessenen Kontaktwinkelwerte wurden verwendet, um eine lineare Kurvenanpassung nach Owens-Wendt-Modell mittels Gleichung (1) zu berechnen.

$$\frac{\gamma_L(\cos\theta + 1)}{2(\gamma_L{}^d)} = \sqrt{(\gamma_S{}^p)}\sqrt{\frac{(\gamma_L{}^p)}{(\gamma_L{}^d)}} + \sqrt{(\gamma_S{}^d)} \qquad (1)$$

Die linke Seite der Gleichung 1 kann gegen $\sqrt{\frac{(\gamma_L{}^p)}{\gamma_L{}^d)}}$ geplottet werden. Um die unbekannten Parameter $\gamma_S{}^p$ und $\gamma_S{}^d$ zu bestimmen, können Kontaktwinkel verschiedener Flüssigkeiten und ihre Oberflächenspannung kombiniert [3].
Mittels Kurvenanpassung war es möglich, die Werte von dispersiven und polaren Anteilen der Oberflächenenergie und den Gesamtwert der Oberflächenenergie als Summe dieser Anteile für jede Goldelektrode zu bestimmen. Die Werte sind in der Abb. 33 dargestellt.

Sensorchip	γ_S (mJ/m²)	$\gamma_S{}^d$ (mJ/m²)	$\gamma_S{}^p$ (mJ/m²)
Au-Si	41.10	33.74	7.35
Au-LTCC	39.90	11.81	28.09
Au-PEN	50.12	38.25	11.87
Au-PCB	45.15	22.52	22.63

Abb 33. Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen für alle gemessenen Sensorchips

1.3.3 Arbeitspaket 8: Zuverlässigkeit des Biosensors und Handling-Konzepte

Labormessplatz zur Durchführung von elektrochemischen Messungen und elektrochemische Messzelle

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurde die Zuverlässigkeit des Biosensors, sowie die Reproduzierbarkeit von Sensorchips während der Herstellung und nach der Immobilisierung von Aptameren untersucht. Für die Untersuchung von Sensorchips wurden am IKTS elektrochemische Messungen durchgeführt. Für die elektrochemischen Messungen wurde ein Messaufbau mit einem Dreielektrodensystem und einer selbst konstruierten und gefertigten elektrochemischen Zelle (EC) entwickelt (Abb. 34, 35). Die elektrochemische Charakterisierung der vorgereinigten blanken Elektrode auf Au-Silizium-Basis und anderer Proben wurde mittels "Electrochemical Impedance Spectroscopy" (EIS) und "Cyclic Voltammetry" (CV) durchgeführt. Bei den ausgewählten elektrochemischen

Techniken handelte es sich um leistungsfähige Techniken, die in der Literatur für die elektrochemische Charakterisierung von Elektroden in Schicht-für-Schicht-Biosensoranwendungen gut etabliert waren.

Bei der elektrochemischen Charakterisierung wurde eine gut untersuchte Redox-Sonde $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ zur Durchführung von Faradic EIS und CV verwendet (Shahrokhian and Ranjbar 2018; Lee et al. 2021). Basierend auf dieser Redoxsonde wurden die Randbedingungen für die elektrochemische Charakterisierung mittels EIS und CV ausgewählt und für alle WP beibehalten. Um die Sensorchips des ausgewählten Designs elektrisch zu kontaktieren, wurde elektrochemische Messzelle entwickelt und hergestellt. Die Chips wurden auf den Halter gelegt, der dann wie in Abb. 34 zu sehen in der Blackbox montiert waren. Ein Kupferstab überspannte die obere Hälfte der Blackbox, die die Möglichkeit bietete, die Arbeitselektrode über ein Krokodilklemmenkabel mit dem Potentiostaten zu verbinden.

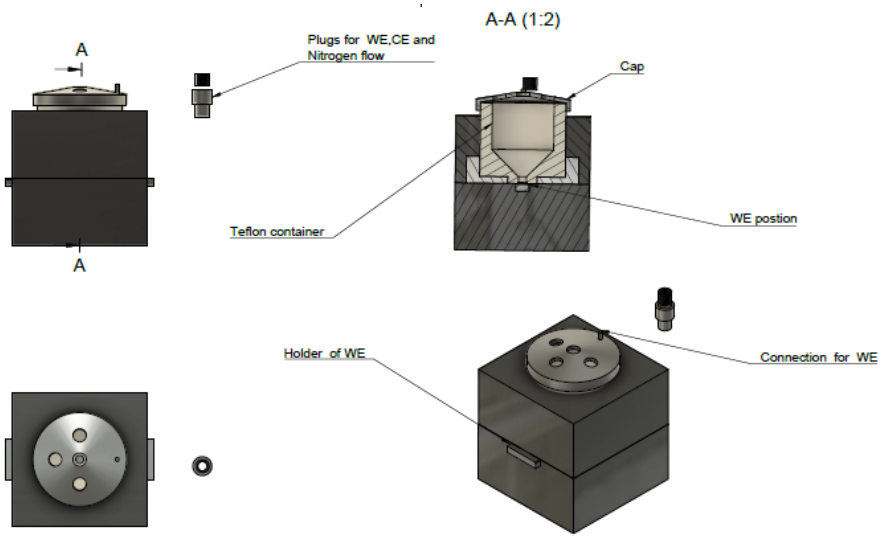


Abb 34. Design der EC-Zelle

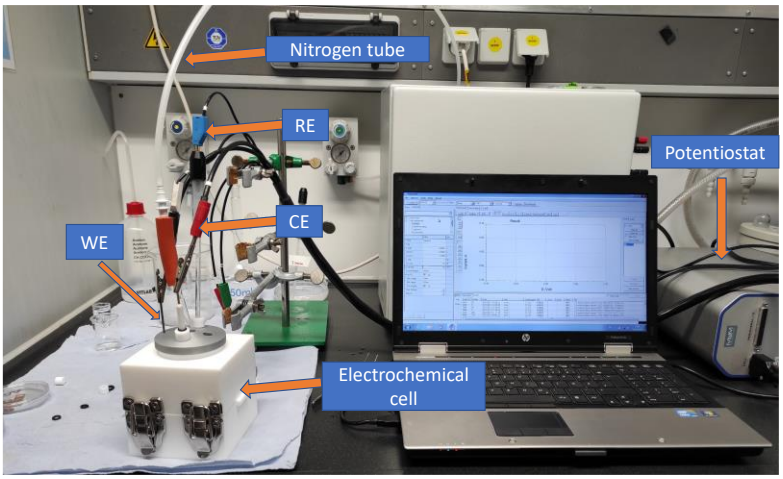


Abb 35. Labormessplatz zur Durchführung von elektrochemischen Messungen

Der Elektrolyt, die Platin-Gegenelektrode (PLANO GmbH, Wetzlar) und Ag/AgCl-Referenzelektrode "SE10" (Xylem Analytics, Waldheim) werden in den Volumenbereich der oberen Zellenhälfte eingeführt und montiert. In diesem Bereich fanden Messungen und Reaktionen statt. Ein O-Ring mit einer inneren Oberfläche von 0,106 cm^2 diente zur Abdichtung des Systems und begrenzte die freiliegende Oberfläche der Arbeitselektrode. Die Referenzelektrode mit dem bekannten Elektrodenpotential von E = +0,197 V im gesättigten KCL-Elektrolyt und gemessen gegen Standardwasserstoffelektrode (SHE) erfuhr eine Redoxreaktion mit einem Elektronentransfer zwischen Silbermetall (Ag) und seinem

Salz – Silberchlorid (AgCl). Als Arbeitselektrode dienten die zu untersuchenden Sensorchips. Im weiteren Schritt wurden die funktionalisierten Sensorchips beeinflusst durch verschiedene Umweltfaktoren wie Temperatur, Feuchtigkeit, Hitze usw. vorbereitet und elektrochemisch untersucht. Diese Arbeit zielte auf eine statistische Analyse ein, um die Reproduzierbarkeit der Messungen und somit die damit verbundenen Aussagen zu gewährleisten.

Untersuchung der Auswirkung der Lagerung der Sensorchips auf ihre Eigneschaften

Die Arbeiten in den Aufgaben 8.1, 8.2 und 8.4 konzentrierten sich auf die Festlegung optimaler Lagerungsbedingungen für funktionalisierte Sensorchips auf Siliziumbasis, um eine stabile Aptamer-Immobilisierung zu gewährleisten und Probleme durch den Aptamer-Abbau zu vermeiden. Das Antwortsignal vom ersten Tag der Lagerung sollte bei kurz- und langfristiger Lagerung beibehalten werden. Insgesamt wurden 12 Elektroden mit Aptameren funktionalisiert. Die Charakterisierung der Proben erfolgte elektrochemisch mithilfe der elektrochemischen Impedanzspektroskopie (EIS) und der zyklischen Voltammetrie (CV). Die elektrochemischen Messungen (EC) der unter verschiedenen Bedingungen gelagerten Proben wurden an Tag 1, Tag 7, Tag 14, Tag 24 und Tag 180 durchgeführt. Die erforderlichen Materialien und Geräte für die elektrochemischen Tests mit der Redox-Sonde $K_3Fe(CN)_6$ / $K_4Fe(CN)_6$ in einer Konzentration von 1 mM in Standard-PBS (pH 7,3) sind in Abb. 36 aufgeführt.

Abb. 36 Materialien für elektrochemische Tests

Name	Spezifikation
Elektrochemische Lösung	1mM $K_3Fe(CN)_6$, 1mM $K_4Fe(CN)_6$ In 1X PBS Puffer
damx Aptamer	66.43 kDa
Bindungspuffer	50mM Kaliumphosphat, 50mM NaCl Natriumchlorid, 5mM KCl Kaliumchlorid, 2,5 mM $MgCl_2$ Magnesiumchlorid, pH = 8.0
Lösung zur chemischen Reinigung	0,050M KOH Kaliumhydroxid, 0,050M H_2O_2 Wasserstoffperoxid in MilliQ-Water
Mercaptohexanollösung (MCH)	1mM MCH in Bindungspuffer

Für die Kurvenanpassung und die Peaksuche wurde die Software Nova 2.1.5 der Firma Metrohm verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden als Referenzwerte für die funktionalisierten Proben verwendet. Diese Referenzwerte nach der Immobilisierung erhöhten die Rct-Werte der EIS aufgrund des immobilisierten Aptamers über die Oberfläche von 212 Ω auf einen Mittelwert von 8,56 KΩ mit einer hohen Standardabweichung. Bei der CV änderten sich sowohl die Position der Oxidations- und Reduktionsspitzen als auch die Höhe der Spitzen. Bei einer sauberen Elektrode lag der Oxidationspeak zunächst bei 0,2785 V und verschob sich dann nach der Immobilisierung auf 0,3723 V, und die Peakhöhe wurde von 27,8 µA auf 12,96 µA reduziert. Für den Reduktionspeak verschob sich die Position von 0,1723 V auf 0,0671 V, während sich die Höhe von -29,20 µA auf -9,37 µA veränderte. Diese Veränderungen deuteten auf die Blockierung des Ladungstransfers durch die auf der Oberfläche immobilisierte Bioschicht hin. Die erhaltenen Werte spiegelten das in der Literatur gefundene Verhalten wider, bei dem die Immobilisierung von Aptameren die Rct-Werte erhöhte und die Peakhöhen in CV-Experimenten verringerte (Mehennaoui et al. 2019). Wir haben uns auf das Vorhandensein der Veränderung konzentriert und eine qualitative Änderung der Basiswerte durch die Lagerungsstudien betrachtet. Der Unterschied zwischen den Daten der Proben vor und nach der Immobilisierung ist in Abbildung 37 und 38 dargestellt.

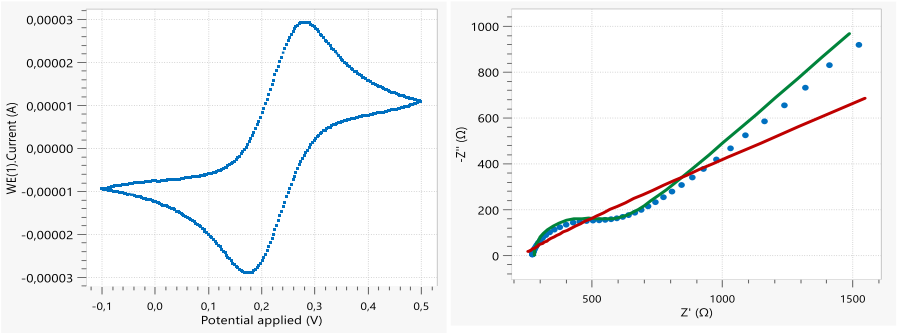


Abb. 37 IvE -Diagramm und Nyquist-Diagramm der sauberen Au-Si-Elektrode vor der Funktionalisierung mit den Aptameren. Der Nyquist-Plot enthält zwei Simulationsmodelle, eines mit einem Kondensator (grüne Linie) und eines mit einem Konstantphasen-Element (rote Linie).

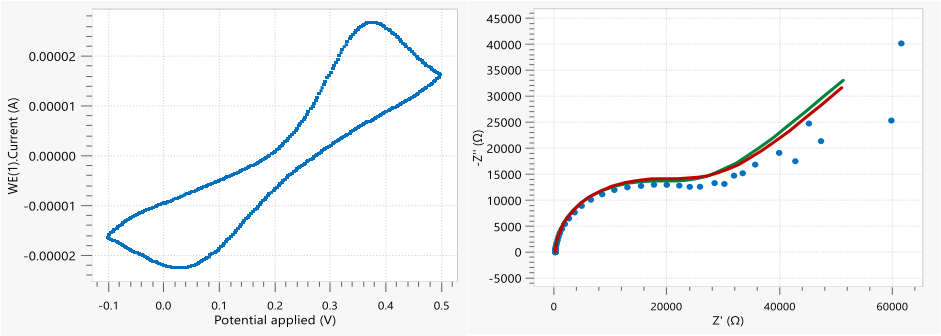


Abb. 38 IvE -Diagramm und Nyquist-Diagramm der Au-Si-basierten Elektrode nach der Funktionalisierung mit den Aptameren. Der Nyquist-Plot enthält zwei Simulationsmodelle, eines mit einem Kondensator (grüne Linie) und eines mit einem Konstantphasen-Element (rote Linie).

Nach Messung der Basis-/Referenzwerten wurden die Elektroden gelagert, um die folgenden Lagerungsbedingungen zu untersuchen: 1) Raumtemperatur (RT), Normaldruck, trockene Bedingungen; 2) RT, Niederdruck (Exsikkator); 3) 4 °C, Normaldruck; 4) RT, PBS (pH = 7,4). Diese vier Gruppen von Bedingungen und Lagerungszeiten (14 Tage) wurden aus der Literatur ausgewählt (Zoubir et al. 2021; Magar et al. 2022; Kökpinar et al. 2011; Shin et al. 2016; Zhang and Yuting; Milkani; Shaver and Arroyo-Currás 2022). Die Säulendiagramme, in denen die spezifischen Parameter der einzelnen elektrochemischen Tests zusammengefasst sind, befinden sich in Abb. 39, Abb. 40 und Abb. 41.

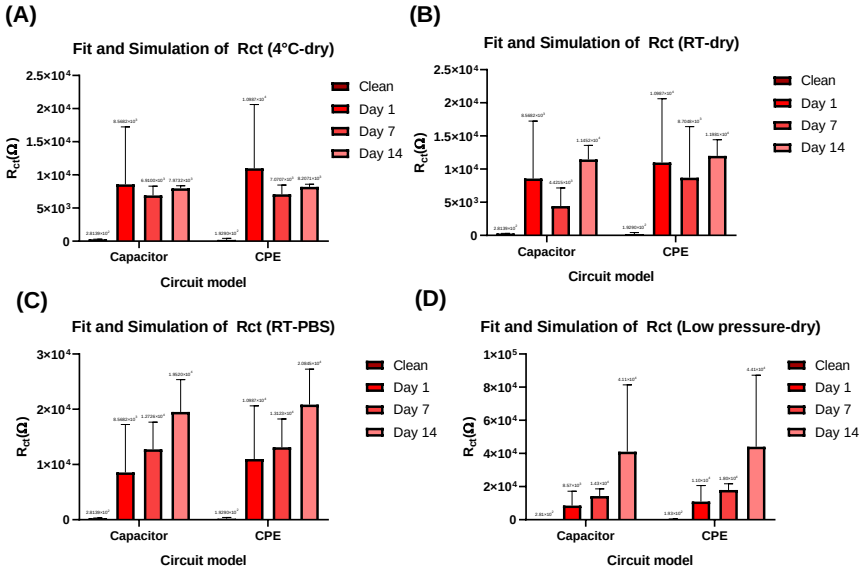


Abb. 39. Widerstands-Ladungsübertragungswerte von Au-Si-basierten Elektroden mit immobilisiertem Antisense 1,5damx nach Lagerung unter verschiedenen Bedingungen während 2 Wochen (A) Lagerung bei 4°C in trockenen Bedingungen. (B) Bei Raumtemperatur unter trockenen Bedingungen gelagert. (C) Bei Raumtemperatur in PBS eingetaucht gelagert. (D) Bei Raumtemperatur unter niedrigem Druck gelagert (Exsikkator).

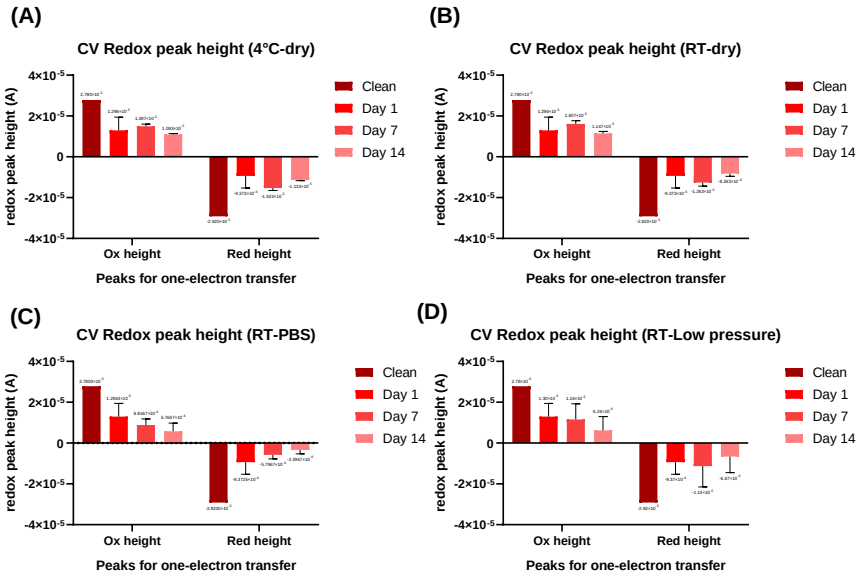


Abb. 40. Werte der Peakhöhen der mit 1,5 Damx funktionalisierten Au-Si-basierten Elektroden, welche unter verschiedenen Bedingun-gen über einen Zeitraum von 2 Wochen gelagert wurden. (A) Gelagert bei 4°C unter trockenen Bedingungen. (B) Gelagert bei Raumtemperatur und unter trockenen Bedingungen. (C) Gelagert bei Raumtemperatur in PBS getaucht. (D) Lagerung bei Raumtemperatur im Nieder-drucktank (Exsikkator)

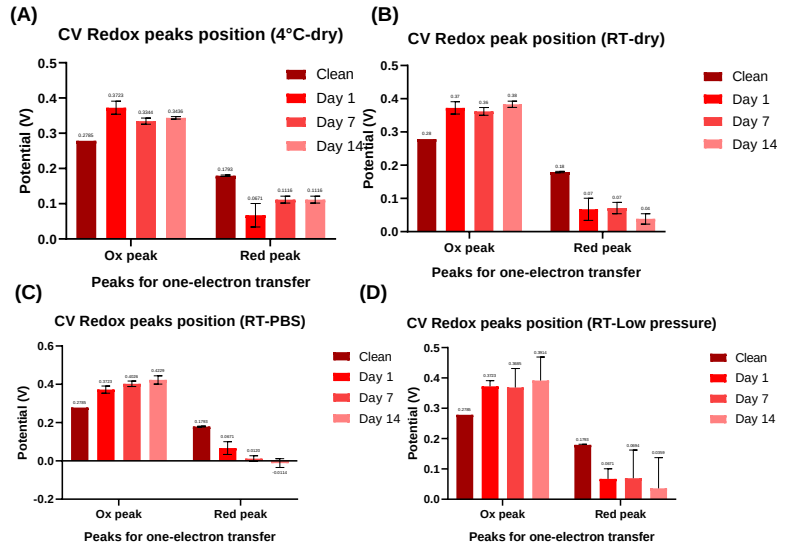


Abb. 41. Werte der Peakpositionen der mit 1,5 Damx funktionalisierten Au-Si-basierten Elektroden, welche unter verschiedenen Bedingungen über einen Zeitraum von 2 Wochen gelagert wurden. (A) Gelagert bei 4°C unter trockenen Bedingungen. (B) Gelagert bei Raumtemperatur und unter trockenen Bedingungen. (C) Gelagert bei Raumtemperatur in PBS getaucht. (D) Lagerung bei Raumtemperatur im Niederdrucktank (Exsikkator)

Aus diesen Diagrammen geht hervor, dass die elektrochemischen Messungen vor der Immobilisierung des dAmx-1.5-Aptamers reproduzierbare Ergebnisse mit einer geringen Standardabweichung zeigen. Ein Trend, der sich für alle 12 Elektroden fortsetzt, ist, dass die elektrischen Parameter wie Rct-Werte und Redox-Peak-Höhen und -Positionen während der Lagerzeit (unmittelbar nach der Immobilisierung) nicht in der Nähe der Basis-/Referenzwerte gehalten werden konnten. Wie bereits erwähnt, hängt das Ausmaß der Schwankungen von den Lagerungsbedingungen ab, die für jeden Satz Goldelektroden verwendet werden. Da wir nach einem stabilen Aptamer auf der Oberfläche suchen, sollten sich die Rct-Werte bei jeder Charakterisierung der Elektrode nicht wesentlich ändern. Basierend auf diesen Informationen und der Analyse der zusammengefassten Ergebnisse in Abb. 39 - 41 können wir schlussfolgern, dass die Elektrode, die für 2 Wochen bei 4°C gelagert wurde, eine geringere Veränderung der Basis-/Referenzwerte (unmittelbar nach der Immobilisierung) aufweist als die Elektrode, die in PBS oder bei niedrigem Druck (bei Raumtemperatur) gelagert wurde.

Als Teil der Validierung der am besten geeigneten Lagerungsbedingungen für die Kurz- und Langzeitlagerung im Rahmen der Aufgabe 8.5 bestand der nächste Schritt darin, die Studie unter Verwendung der vier anfänglichen Lagerungsbedingungen für längere

Lagerungszeiträume (24 Tage und 180 Tage) fortzusetzen sowie neue Lagerungsbedingungen unter Berücksichtigung anderer flüssiger Medien auf der Grundlage des vom Konsortialpartner bereitgestellten Wissens zu erproben. Die genutzten Silikonteile stammen aus Batch 5. Die Balkendiagramme, die die Ergebnisse der verschiedenen elektrochemischen Techniken zusammenfassen, sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Abbildung 42 enthält die Ergebnisse des EIS von Tag 0 bis Tag 180. Abbildungen 43 und 44 enthalten die Ergebnisse des CV von Tag 0 bis Tag 180

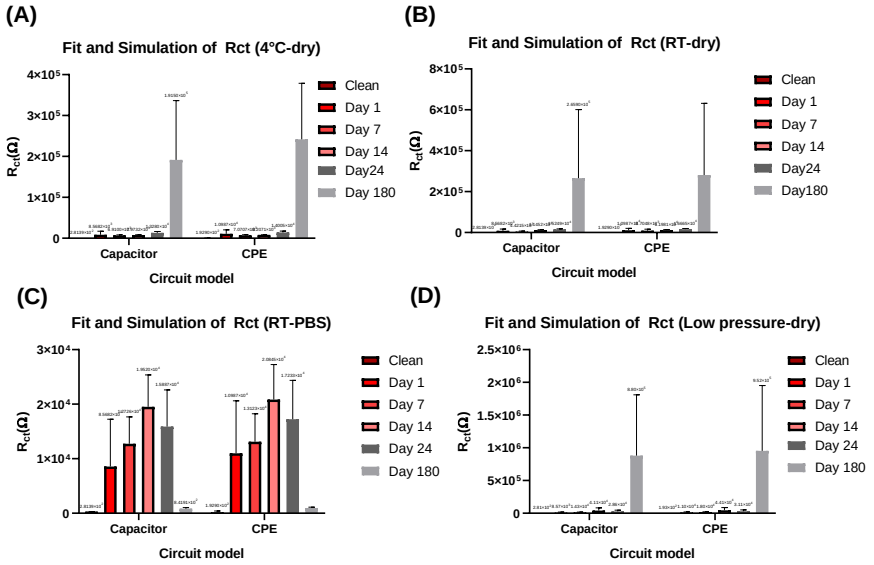


Abb. 42. Resistance charge transfer values of Au-Si-based electrodes functionalized with 1.5damx using different storage conditions for a period of 2 weeks: (A) Stored at 4°C in dry conditions; (B) Stored at room temperature in dry conditions; (C) Stored at room temperature immersed in PBS; (D) Stored at room temperature and under low pressure (desiccator).

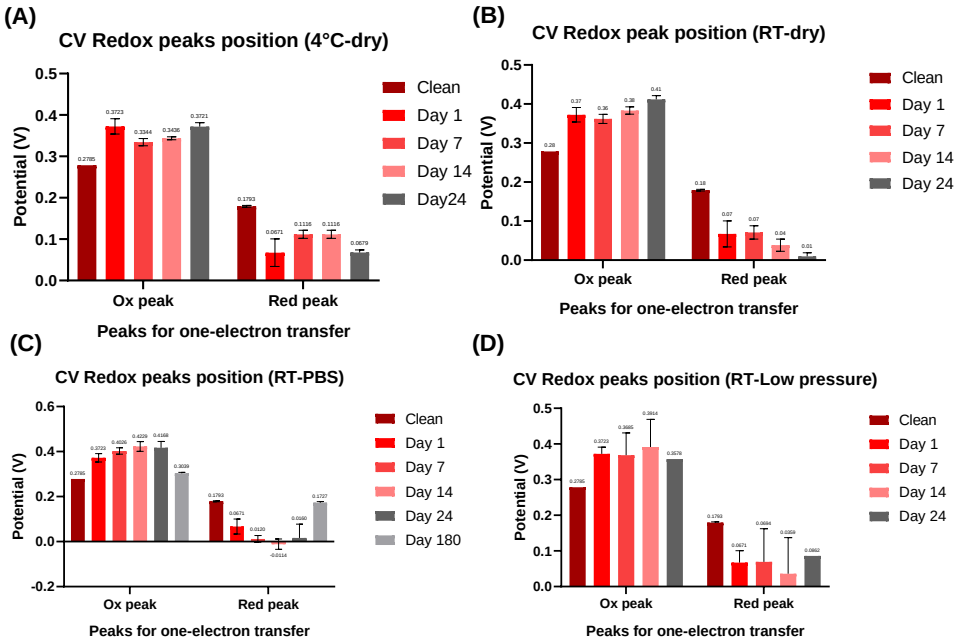


Abb. 43. Peak position values of Au-Si-based electrodes functionalized with 1.5damx under different storage conditions for a period of 2 weeks: (A) Stored at 4°C in dry conditions; (B) Stored at room temperature in dry conditions. (C) Stored at room temperature immersed in PBS; (D) Stored at room temperature and under low pressure (desiccator).

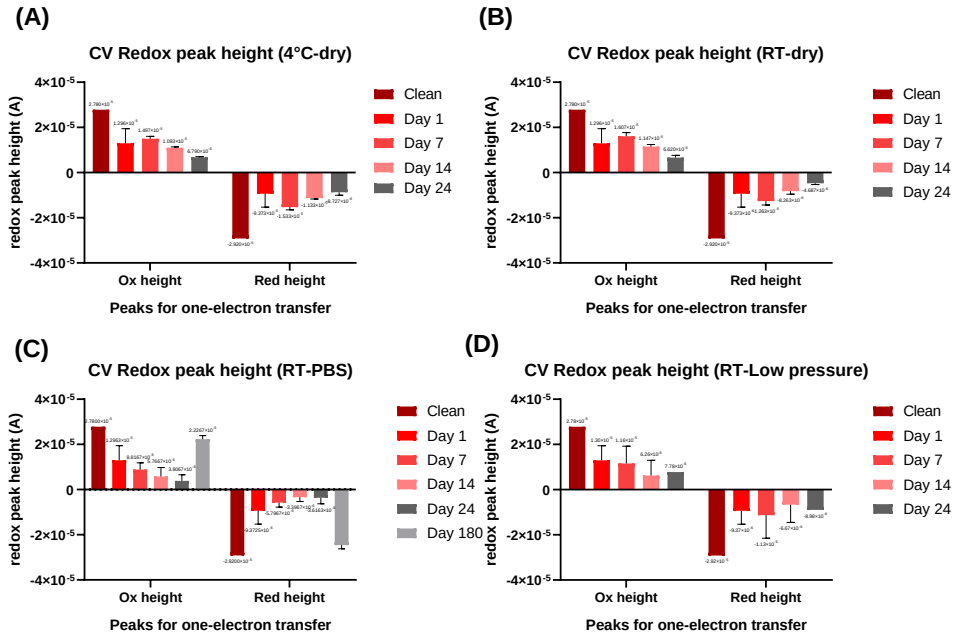


Abb. 44. Peak height values of Au-Si-based electrodes functionalized with 1.5damx under different storage conditions for a period of 2 weeks: (A) Stored at 4°C in dry conditions; (B) Stored at room temperature in dry conditions; (C) Stored at room temperature immersed in PBS; (D) Stored at room temperature and under low pressure (desiccator).

Die Auswertung der EIS-Daten nahm mehr Zeit in Anspruch, da einige der erhaltenen Daten nicht der Anpassung mit einem Randles-Ersatzschaltbild entsprachen. Es war notwendig, verschiedene Ersatzschaltungen zu implementieren, um zu verstehen, welche Prozesse an den Proben ablaufen können, sobald sie gelagert wurden. Als Beispiel ist in Abb. 45 das Nyquist-Diagramm einer Probe dargestellt, die 180 Tage lang bei RT unter trockenen Bedingungen gelagert wurde und deren EIS-Daten nicht mit einem Randles-Äquivalentschaltkreis angepasst werden können (Lazanas und Prodromidis 2023).

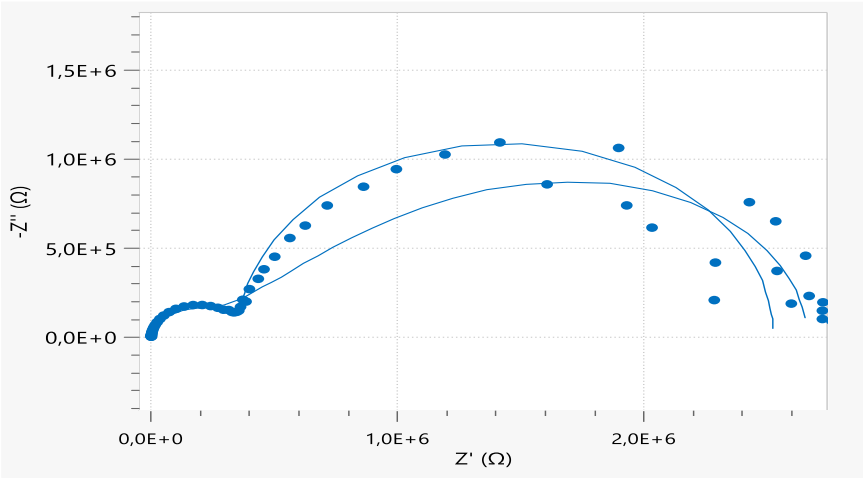


Abb. 45. Nyquist-Diagramm einer Au-Si-basierten Elektrode, die nach 24-tägiger Lagerung funktionalisiert wurde. Das Nyquist-Diagramm enthält ein Anpassungs- und Simulationsmodell mit dem G-Element unter Berücksichtigung der chemischen Reaktion.)

Die Schwankungen der Rct-Werte der Proben unter den Bedingungen 1, 2 und 3 (Lagerung in Luft bei unterschiedlichen Drücken und Temperaturen) am 180. Tag der Lagerung waren höher als die am 14. Bei der CV-Analyse, bei der die Proben am 180. Tag der Lagerung für die Bedingungen 1, 2 und 3 gemessen wurden, war es nicht möglich, die Veränderungen in den zyklischen Voltammogrammen zu quantifizieren, wie es in einem Beispielversuch in Abbildung 46 zu sehen war.
Im Gegensatz dazu wurde ein anderes elektrochemisches (EC) Verhalten der Sensorchips im Zustand 4 festgestellt. Die mittleren Rct-Werte der Bedingung 4 nahmen vom 14. bis

zum 24. Tag der Lagerung ab und sanken nach Tag 180 noch weiter. Bei den Redox-Peaks aus den CVs der verschiedenen Proben kam es zu Positionsverschiebungen und einer Zunahme der Höhe, wenn die Proben 180 Tage lang gelagert wurden. Auf der Grundlage dieser Analyse wurde die am besten geeignete Lagerungsbedingung auf die in flüssigem Medium (PBS) gelagerten Proben verlagert. Zu dieser Entscheidung für eine langfristige Lagerung hat auch beigetragen, dass die Desorption und/oder die Veränderung der Biolage die trocken gelagerten Proben beeinträchtigt. Es war eine Herausforderung, die Lagerungsbedingungen aufgrund der zwei vorhandenen Biolagen auf der Elektrode zu untersuchen, da wir nach den am besten geeigneten Bedingungen für das Aptamer suchen mussten, die auch für die Stabilität der zweiten Biolage aus MCH geeignet sind, die sich im Laufe der Messung und Lagerung strukturell verändert (Xu et al. 2019). Wir haben keine Tests mit anderen Biomolekülen als Passivierungsmittel durchgeführt, da wir unsere Testexperimente auf die Materialien des Konsortialpartners stützen.

Ein weiterer zu berücksichtigender Punkt ist der Wechsel des flüssigen Mediums für die Lagerung, da die Oberfläche der Proben deutlich verändert wird, wie in Abbildung 47 dargestellt. Es ist also notwendig, den Einfluss von PBS auf die Goldschicht zu berücksichtigen.

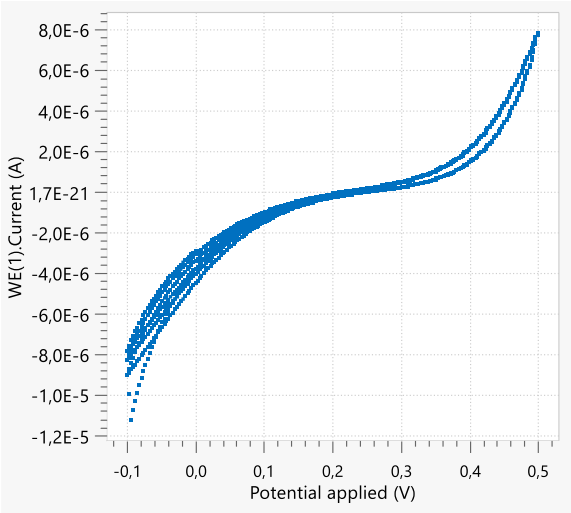


Abb. 46. IvE-Diagramm einer funktionalisierten Au-Si-basierten Elektrode nach 180-tägiger Lagerung bei 4 °C unter trockenen Bedingungen.

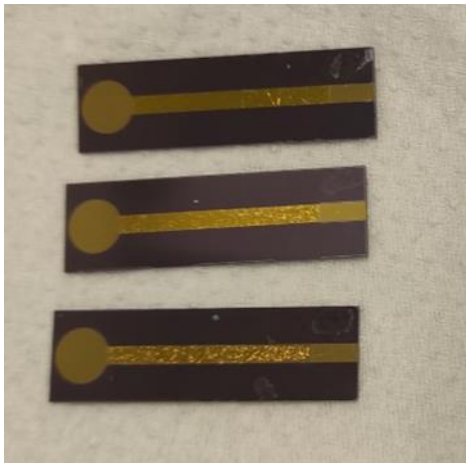


Abb. 47 makroskopische Ansicht der Au-Si-basierte Elektroden, welche 180 Tage in PBS gelagert wurden mit klar sichtbaren Veränderungen an der Kontaktlinie zwischen der Sensoroberflache und dem Potentiostat

Um die Lagerung in flüssigen Medien zu untersuchen, erstellten wir eine Versuchsplanung (DOE), die in Abbildung 48 zu finden ist. Die gewählten Lagerungsbedingungen basierten auf den früheren Ergebnissen, bei denen die Lagerung bei 4°C besser abschnitt. Zu den Medien gehören Reinstwasser (MilliQ-Wasser), 20 % DMSO in Reinstwasser und Trockenmedium. Alle Proben wurden in das Medium in einem versiegelten Behälter eingetaucht. Die elektrochemischen Messungen in diesem Abschnitt waren EIS, CV und wir betrachten zwei neue Techniken, die Rechteckvoltammetrie (SWV) und die Differenzialimpulsvoltammetrie (DPV). SWV und DPV wurden einbezogen, um den möglichen kapazitiven Strom zu berücksichtigen, der das Signal-Rausch-Verhältnis der Messung aufgrund der Veränderung der Bioschichten während der Lagerung beeinträchtigen könnte. Beide Techniken wurden zur Charakterisierung in Studien über Lagerungsbedingungen verwendet, und die verwendeten Parameter sind auch in Abbildung 49 enthalten (Watkins et al. 2023).

		Messungen		
Lagerungsbedingungen	Proben	nach 24 Std.	nach 48 Std.	nach 72 Std.
4°C - Trocken	Charge 1			
	Charge 2			
	Charge 3			
4°C- in Reinstwasser	Charge 4			
	Charge 5			
	Charge 6			
4°C- in 20% DMSO	Charge 7			
	Charge 8			
	Charge 9			

Abb. 48. Lagerungsbedingungen für mehrere Chargen (4 Proben pro Charge) von funktionalisierten Proben unter Verwendung des Immobilisierungsprotokolls aus dem vorherigen Abschnitt. Jedes farbige Kästchen zeigt an, wann die Messung für jede Charge durchgeführt wurde.

Technik	Parameter
Square Wave Voltammetry (SWV)	E: -0.1 to 0.5 Modulationsamplitude: 0.025V Frequenz: 15Hz Step= 0.004 V
Differential Pulse Voltammetry (DPV)	E: -0.1 to 0.5 Modulationsamplitude: 0.025V Modulationszeit: 0.05 s Frequenz: 15Hz Step= 0.004 V

Abb. 49. Elektrochemische Methoden

Die aus den DOE-Messungen gewonnenen Ergebnisse wurden mit sauberen Proben und funktionalisierten Proben ohne Lagerung verglichen. Die Referenzproben haben eine hohe Standardabweichung, die für den Vergleich mit der gelagerten Probe berücksichtigt werden muss. Die Rct-Werte nach 24 Stunden Lagerung zeigten eine Abnahme für alle getesteten Bedingungen, wie in Abb. 50 dargestellt ist.

Die in DMSO gelagerten Proben zeigen einen stärkeren Rückgang im Vergleich zu denen der anderen beiden Bedingungen. Bei der Lagerung unter trockenen Bedingungen ist die Veränderung im Vergleich zum Mittelwert der nicht gelagerten Proben geringer, die Standardabweichung ist jedoch höher. Während der dreitägigen Lagerung wiesen die trocken gelagerten Proben eine höhere Abweichung vom Mittelwert der nicht gelagerten Proben sowie eine höhere Standardabweichung in jeder Charge auf, wie die EIS-Ergebnisse zeigen. Die in Reinstwasser gelagerten Proben wiesen eine geringere Standardabweichung auf, gefolgt von den in DMSO gelagerten Proben.

Ein ähnliches Verhalten ist bei der SWV- und PDV-Technik zu beobachten, wobei die trocken gelagerte Probe eine größere Variabilität aufweist als die beiden anderen Bedingungen. Diese Beobachtungen sind in Abb. 51 und 52 dargestellt. Insgesamt liegen die aus DPV und SWV ermittelten Mittelwerte für die in DMSO gelagerten Proben näher an den Mittelwerten der Referenzprobe. Der durchgeführte ANOVA-Test ergab jedoch, dass sich die Mittelwerte der drei Lagerbedingungen auf dem Niveau von 0,05 signifikant unterscheiden. Die Ergebnisse der Proben, die 3 Tage lang in Wasser gelagert wurden, zeigen, dass ihre mittleren Differenzstromwerte dem Mittelwert der Referenzproben (nicht gelagerte Proben) am nächsten kommen. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird die Lagerung in Wasser als die bessere Lagerungsbedingung für eine 3-tägige Lagerungsdauer ausgewählt.

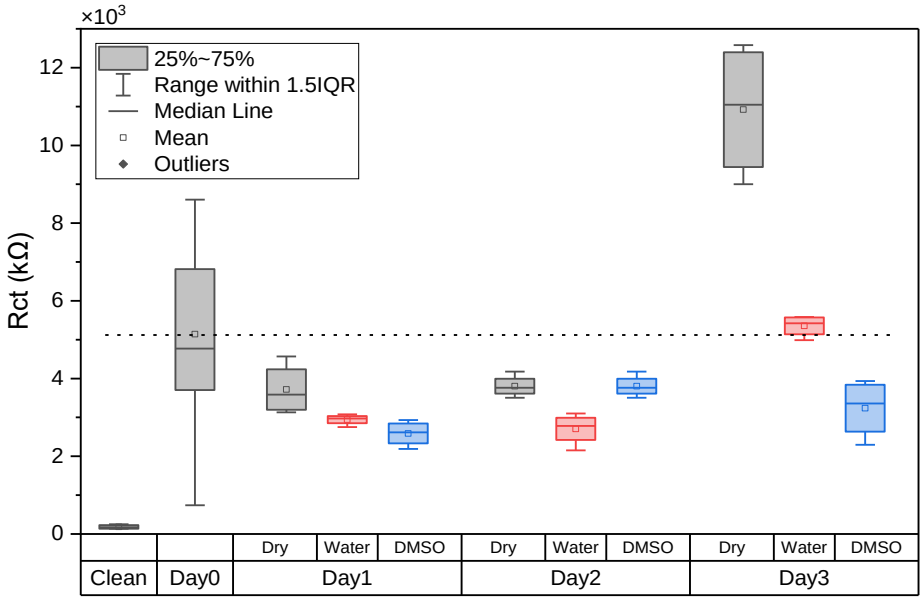


Abb. 50 Kastendiagramme der Rct-Mittelwerte für die verschiedenen Funktionalisierungen unter verschiedenen Lagerbedingungen über verschiedene Zeiträume

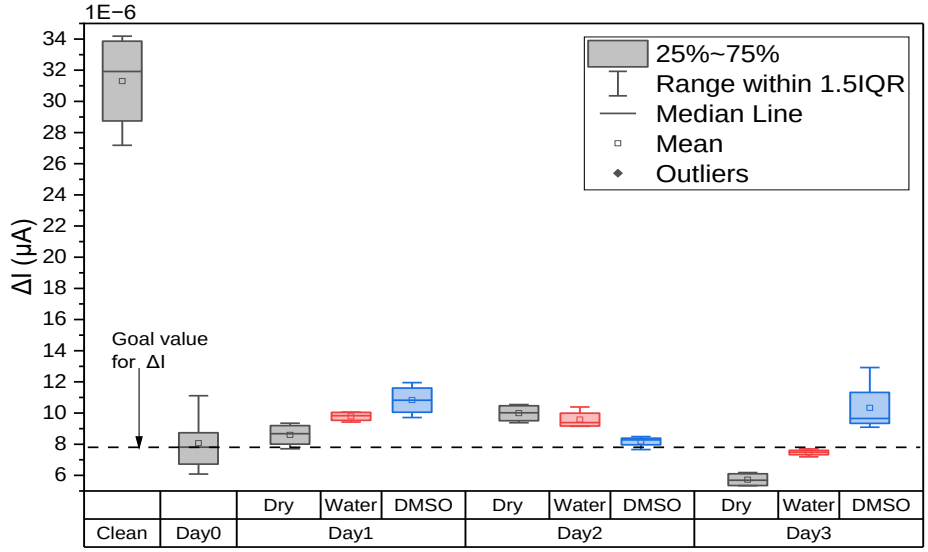


Abb. 51 Kastendiagramme der ΔI-Mittelwerte für die verschiedenen Funktionalisierungen unter verschiedenen Lagerbedingungen über verschiedene Zeiträume, die mit der DPV-Technik erhalten wurden

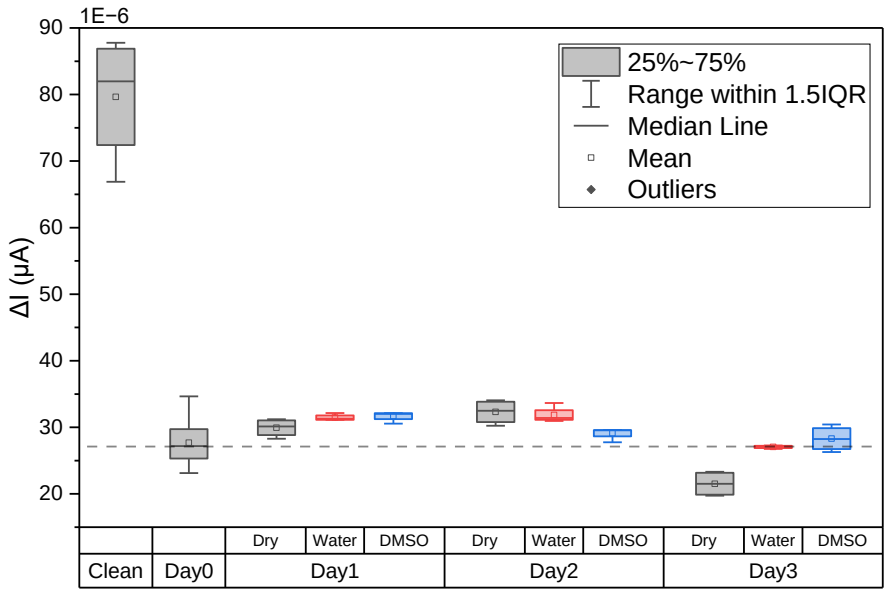


Abb. 52. Kastendiagramme der ΔI-Mittelwerte für die verschiedenen Funktionalisierungen unter verschiedenen Lagerbedingungen über verschiedene Zeiträume, die mit der SWV-Technik erhalten wurden

Die Abweichung zwischen den Proben könnte auf die Hydrophilie des Substrats zurückzuführen sein, die sich auf den Schritt des Tropfengießens bei der Immobilisierung der Proben auswirkt, da nicht die gesamte Aptamerlösung auf dem Au-Abschnitt verbleibt (siehe Abb. 53). Die Hydrophilie tritt nach der Reinigung der Probe auf. Auf der Grundlage der Ergebnisse wird empfohlen, die Proben in Mill-iQ-Wasser zu lagern und über einen längeren Zeitraum ihr Verhalten zu untersuchen. DMSO ist nicht völlig zu verwerfen, da verschiedene Prozentsätze von DMSO getestet werden könnten, um zu sehen, ob dies die Stabilität der funktionalisierten Proben verbessert.

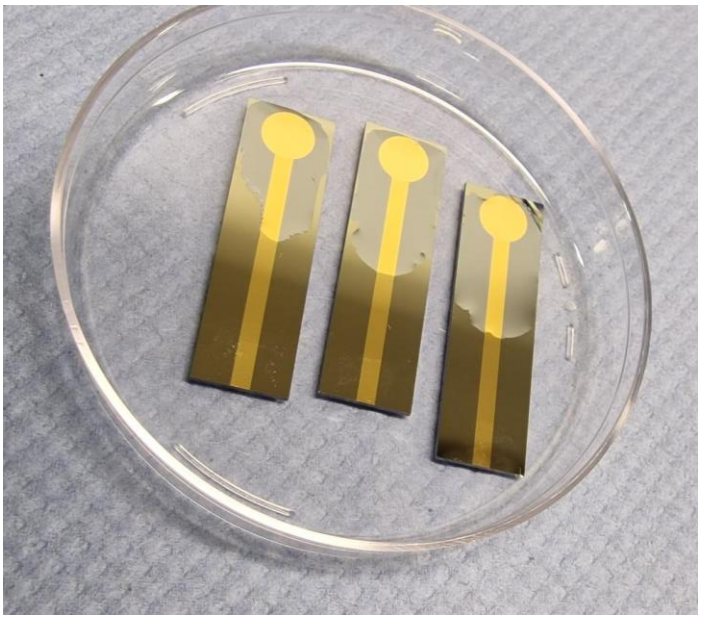


Abb. 53. Dropcasting-Schritt der Aptamerlösung über Proben während des Immobilisierungsschritts.

Die Arbeiten in Task 8.5 und 8.6 konzentrieren sich auf den zuverlässigen Nachweis des Targets. Auf der Grundlage der von den Konsortialpartnern erworbenen Kenntnisse erfolgte der Nachweis zunächst mit einer Methode, bei der zwei synthetische DNA-Stränge verwendet werden. Der erste Strang, Damx Aptamer genannt, wurde so konzipiert, dass er an das Target bindet, und der zweite Strang, Aptasense genannt, bindet an den

Komplex Damx Aptamer - Target, wobei diese Wechselwirkung vom Sensor erkannt werden soll.
Auf der Grundlage der von den Konsortialpartnern erhaltenen Ergebnisse haben wir den Nachweisansatz modifiziert und eine andere elektrochemische Technik für den Nachweis gewählt, da die FET-basierte Technik kein zuverlässiges Ausgangssignal für den Nachweis des Targets liefern konnte. Die Idee der gewählten Nachweismethode bestand darin, die Sensorchips nur mit dem Damx-Aptamer zu funktionalisieren und Nachweisexperimente gegen das Target mit der EIS- und PDV-Technik anstelle des FET-basierten Ansatzes durchzuführen, um die Ergebnisse und UNITIS zu vergleichen.

Die Experimente wurden wie folgt durchgeführt: Silizium-Elektroden aus Charge 7 wurden mit 15uM Damx-Aptamer funktionalisiert. Das DAMX-Aptamer wurde so synthetisiert, dass es an abgebautes Amoxicillin bindet. Das Protokoll zur Immobilisierung des DAMX-Aptamers sah wie folgt aus: Ein 10-µl-Tropfen von 15 µM thioliertem DAMX-Aptamer wurde auf die saubere Siliziumelektrode getropft. Die Probe wurde dann über Nacht in einer Petrischale bei Raumtemperatur gelagert. Am Ende der Inkubationszeit wird die Probe aus der Petrischale genommen, mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff getrocknet. Die getrocknete Probe wird in 1mM MCH-Lösung getaucht, um die Goldschicht zu passivieren, die verbleibenden unbesetzten Oberflächenplätze der Goldschicht zu füllen und unerwünschte Wechselwirkungen zu blockieren. Der Passivierungsschritt wird eine Stunde lang durchgeführt. Danach wird die Probe mit Reinstwasser gespült und mit Stickstoff getrocknet. Nach dem Trocknen ist die Probe bereit für Detektionsversuche.

Die Nachweisexperimente umfassen eine elektrochemische Referenzmessung, die unmittelbar nach dem Funktionalisierungsschritt jeder in diese Experimente einbezogenen Probe durchgeführt wurde. Nach der Referenzmessung wurde jede Probe dreimal mit verschiedenen Testlösungen inkubiert und nach jedem Inkubationsschritt wurde eine elektrochemische Messung durchgeführt. Die elektrochemischen Messungen umfassten eine elektrochemische Impedanzspektroskopie und eine Differenzialpulsvoltammetrie (DPV)-Messung. Die verwendete elektrochemische Lösung war 1mM Ferro/Ferricyanid in PBS. Jede Probe wurde mit Afetar-Puffer gewaschen und nach der elektrochemischen Messung getrocknet. Die verwendeten Testlösungen waren Afetar-Puffer, 25 µg/ml Amoxicillin-Lösung, 1mg/ml Amoxicillin-Lösung, 25µg/ml abgebaute Amoxicillin-Lösung und 1mg/ml.
Die Ergebnisse der ersten Gruppe von Proben, die nach 3 Tagen Lagerung gemessen wurden, sind in den Abbildungen 55 und 56 dargestellt. In Abbildung 1 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des Differenzstroms aus DPV-Experimenten für 3 Proben im Vergleich zu verschiedenen Testlösungen dargestellt. Abbildung 56 zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung des Ladungsübergangswiderstands Rct, der aus der EIS-Messung für die gleichen drei Proben in Abbildung 55 erhalten wurde.

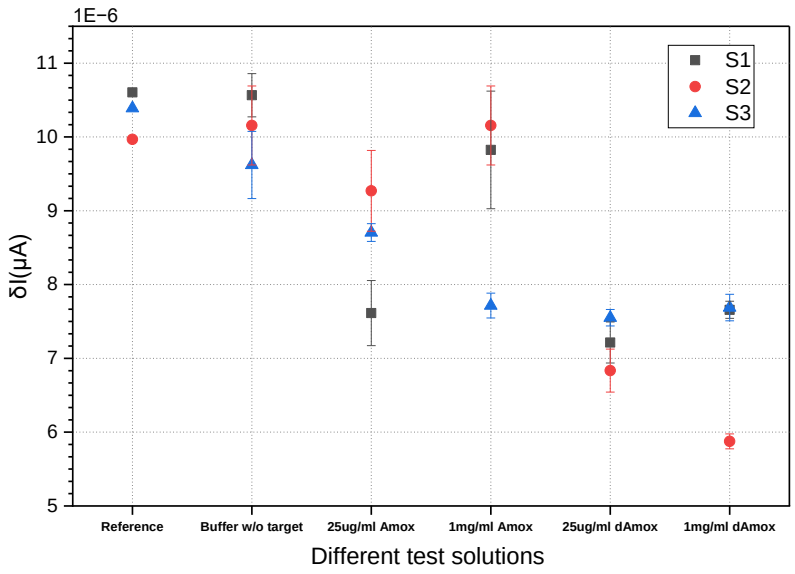


Abb. 55. Durchschnittswerte der Peakhöhe und Standardabweichung aus DPV-Experimenten, wenn Damx-Aptamer-funktionalisierte Sensorchips mit verschiedenen Testlösungen inkubiert werden. Für jede Testlösung wurden drei verschiedene Sensorchips verwendet

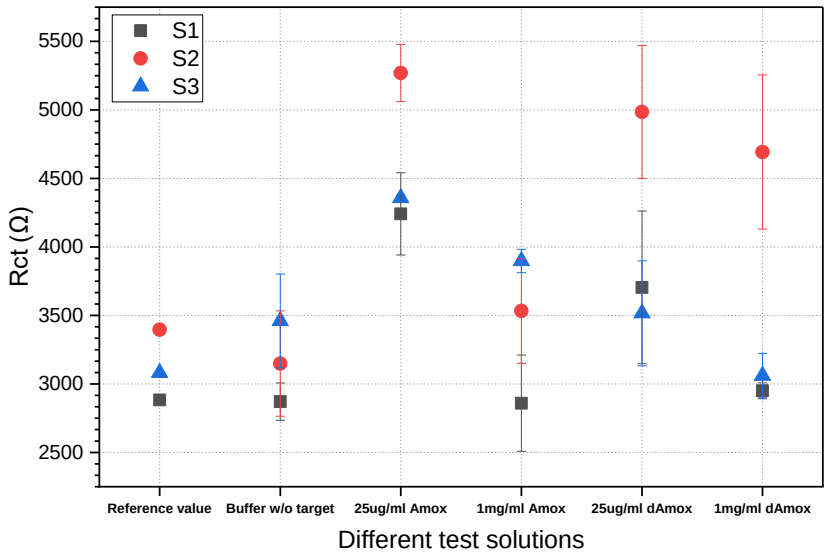


Abb. 56. Durchschnittswerte der Peakhöhe und Standardabweichung aus DPV-Experimenten, wenn Damx-Aptamer-funktionalisierte Sensorchips mit verschiedenen Testlösungen inkubiert werden. Für jede Testlösung wurden drei verschiedene Sensorchips verwendet

Der im DPV-Experiment aufgezeichnete Ausgangsdifferenzstromwert der Referenzmessung beträgt im Durchschnitt 10,3 µA und wenn die Proben nur mit Puffer inkubiert werden, bleibt das Signal zu 92% oder mehr erhalten, was darauf hindeutet, dass der Puffer keine nennenswerte Wirkung mehr hat, sobald er mit den funktionalisierten Elektroden in Wechselwirkung tritt, wie in Abbildung 55 zu sehen ist. Wenn die Testlösung das nicht abgebaute Target, 25 µg/ml Amoxicillin, enthält, sinkt der durchschnittliche Differenzstromwert der Proben auf bis zu 32 % des Referenzwertes, insbesondere bei Probe 3. Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten, da die Testlösung nur nicht abgebautes Amoxicillin enthält, das nicht das spezifische Ziel des Aptamers auf der Oberfläche der Arbeitselektrode ist. Wenn die Konzentration der Probe auf einen höheren Wert (1mg/ml Amoxicillin) geändert wird, ist der resultierende mittlere Differenzstromwert für jede Probe unterschiedlich. Zwei Proben weisen ähnliche Werte wie der Referenzwert auf (S1 und S2), und der durchschnittliche Differenzstromwert sinkt bei einem Test mit 1 mg/ml Amoxicillin weiter ab. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Aptamer an die nicht abgebaute Version des Ziels binden konnte und das Amoxicillin möglicherweise an der Oberfläche gesättigt war, da die Werte der Proben 1 und 2 dem Referenzwert ähneln, wenn die Probe im Vergleich zu 1mg/ml Amoxicillin getestet wird.

Wenn die Proben gegen die Version mit abgebautem Amoxicillin in der niedrigen Konzentration von 25 µg/ml getestet werden, sinkt der mittlere Differenzstromwert von 28 auf 37 % des Referenzwertes mit einer geringen Standardabweichung für die 3 Proben. Wenn die Testlösung 1mg/ml abgebautes Amoxicillin ist, lässt sich ein ähnlicher Abfall der Stromwerte wie im Fall der niedrigen Konzentration erkennen, was durch eine Sättigung der Oberfläche erklärt werden könnte, da der Stromabfall im gleichen Bereich liegt wie das vorherige Ergebnis der Testlösung.

Bei den EIS-Messergebnissen zeigen die Rct-Werte, die aus der Anpassung und Simulation der EIS-Daten gewonnen wurden, eine höhere Abweichung zwischen den Messungen für den gesamten Satz der erhaltenen Ergebnisse. Der mittlere Referenzwert beträgt 3113,09 Ohm und wenn die Proben mit dem Puffer ohne Amoxicillin inkubiert wurden, bleiben die Mittelwerte im Bereich von 92 % bis 112 % des ursprünglichen Referenzwertes. An dieser Stelle würde erwartet werden, dass die Werte, die mit der nicht abgebauten Version von Amoxicillin erzielt werden, nicht signifikant vom Referenzwert abweichen. Die Ergebnisse, die erzielt werden, wenn die Probe mit 25 µg/ml Amoxicillin getestet wird, zeigen jedoch den höchsten Anstieg der mittleren Rct-Werte, der von 40 % bis zu 80 % des Referenzwerts reicht. Diese Ergebnisse waren unerwartet, und bei dem anschließenden Versuch mit einer höheren Konzentration von Amoxicillin in Lösung sanken die durchschnittlichen Rct-Werte für die 3 Proben. Wenn abgebautes Amoxicillin in niedriger Konzentration verwendet wird, kommt es zu einem Anstieg des Rct-Wertes mit einer höheren Standardabweichung als bei den vorangegangenen Tests, und mit der Erhöhung der Konzentration für den nächsten Test wird ein allgemeiner Rückgang der Rct-Werte für die drei Proben beobachtet - ein Ergebnis, welches nicht erwartet, da die Konzentration höher ist. Aus der ersten Reihe von Experimenten wird vermutet, dass es Wechselwirkungen zwischen Aptamer und beiden Versionen von Amoxicillin gibt, was nicht erwünscht ist und auch diese Wechselwirkungen scheinen in diesem elektrochemischen Aufbau für die verwendeten Experimente nicht stabil zu sein, da die Ergebnisse mit höher konzentrierter Lösung der beiden Versionen von Amoxicillin die entgegengesetzten Ergebnisse zu den erwarteten und mit hohen Standardabweichungswerten zeigen. Dies wird mit der nächsten Reihe von Proben weiter untersucht, die funktionalisiert wurden und bei denen die Nachweisexperimente sofort (ohne Lagerzeit) durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse der zweiten Gruppe von Proben sind in Abbildung 57 und 58 für PDV bzw. EIS dargestellt. In dieser zweiten Gruppe von Proben haben wir ein weiteres unerwartetes Ergebnis beobachtet, das die Idee untermauert, dass die Wechselwirkungen zwischen dem Aptamer und beiden Versionen des Targets in diesem elektrochemischen Aufbau nicht stabil sind. Bei beiden elektrochemischen Techniken wird mit einem Referenzwert begonnen, der bei der PDV-Technik abnimmt, wenn die funktionalisierte Oberfläche mit dem Target interagiert, und im Falle der EIS-Technik ansteigt. Wie bei den vorangegangenen Proben sind in Abbildung 57 und 58 geringe Wechselwirkung zwischen der Probe und dem nicht abgebauten Amoxicillin bei niedrigen Konzentrationen zu beobachten. Wenn jedoch die Konzentration des nicht abgebauten Amoxicillins erhöht wird, lässt sich der gegenteilige Effekt auf die erzielten Ergebnisse erkennen, bei denen sich ein Anstieg des Stromwerts bei der PDV und einen Rückgang des Rct bei der EIS feststellen lässt und dieser Trend wird auf beide Tests mit abgebautem Amoxicillin ausgedehnt, was es schwierig macht, die Wechselwirkung mit abgebautem Amoxicillin sicherzustellen. Insgesamt ist die Standardabweichung jedoch geringer als bei der vorherigen Versuchsreihe.

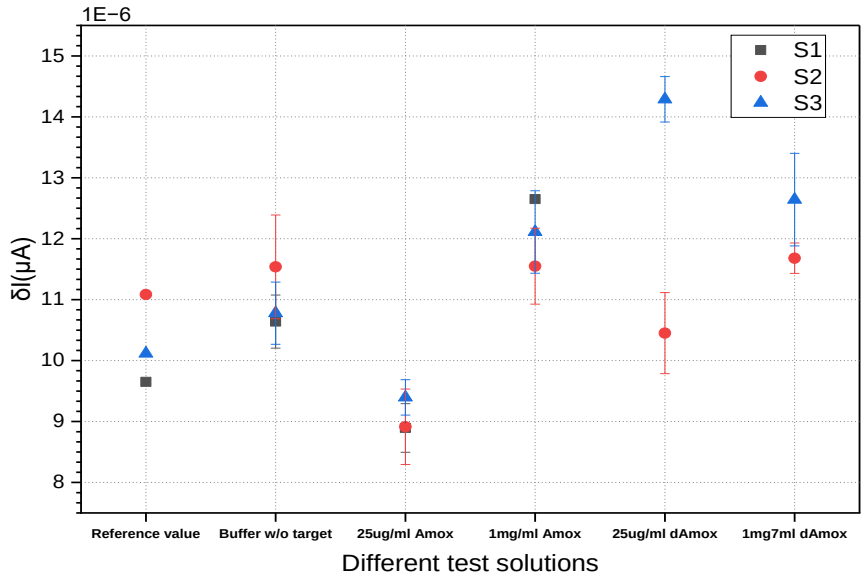


Abb. 57. Durchschnittswerte der Peakhöhe und Standardabweichung aus DPV-Experimenten, wenn Damx-Aptamer-funktionalisierte Sensorchips mit verschiedenen Testlösungen inkubiert werden. Für jede Testlösung wurden drei verschiedene Sensorchips verwendet

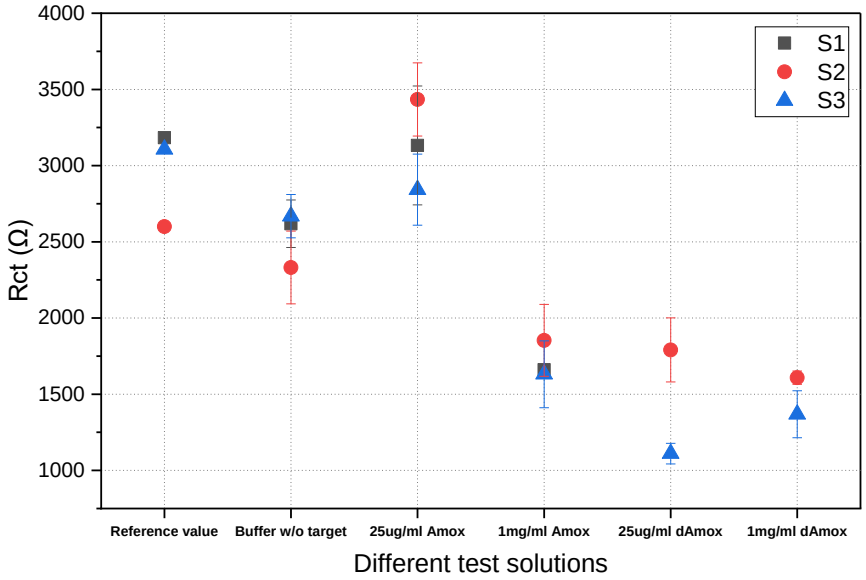


Abb. 58. Durchschnittswerte für den Ladungstransferwiderstand und Standardabweichungen aus EIS-Experimenten, wenn Damx-Aptamer-funktionalisierte Sensorchips mit verschiedenen Testlösungen inkubiert werden. Für jede Testlösung wurden drei verschiedene Sensorchips verwendet und in jedem Experiment dreimal gemessen

Die beobachteten Ergebnisse könnten auf mehrere Faktoren zurückzuführen sein: das Immobilisierungsprotokoll, die mangelnde Selektivität des Aptamers in Bezug auf die beiden Amoxicillin-Varianten, die Stabilität des Komplexes Aptamer-Target, die für die Nachweisexperimente verwendeten Bedingungen und die Lagerung des ersten Probensatzes sowie andere hier nicht berücksichtigte Faktoren, die die Gesamtleistung der verwendeten Proben beeinflussen könnten. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass es nicht möglich war, ein zuverlässiges Nachweisprotokoll für das Ziel zu erhalten, da das auf der Oberfläche funktionalisierte Aptamer nicht zwischen der nicht abgebauten und der abgebauten Version von Amoxiclin in Lösung unterscheiden konnte.

2 Vergleich des Standes des Vorhabens mit der ursprünglichen Arbeits-, Zeit- und Kostenplanung

Die Arbeiten sind entsprechend des ursprünglichen Arbeits- und Zeitplanes durchgeführt worden. Die personellen Finanzmittel sind entsprechend der Planung abgerufen worden.

3 Haben sich die Aussichten für die Erreichung der Ziele des Vorhabens innerhalb des angegebenen Berichtzeitraums gegenüber dem ursprünglichen Antrag geändert?

Nein.

4 Sind inzwischen von dritter Seite FE-Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant sind?

Nein.

5 Sind oder werden Änderungen in der Zielstellung notwendig?

Nein, sie sind nicht notwendig.

6 Jährliche Fortschreitung des Verwertungsplans

Hauptziel ist die Vermarktung einer Aptamer-Feldeffekttransistor-Diagnostikplattform (eines Biosensors) zur schnellen Detektion von Antibiotika-resistenten Bakterien direkt aus Stuhlproben oder Analtupfern von Patienten. Die Selektivität des Sensors wird durch die Entwicklung von neuen spezifischen Aptameren durch NeoVentures gesichert und durch das IKTS verkapselt und charakterisiert. Der Vorteil gegenüber konkurrierenden Verfahren ist die zielgerichtete Immobilisierung von Aptameren auf Biosensoroberflächen mit sehr hoher Belegungsdichte. Die Biosensoren werden sich gegenüber den bisherigen Verfahren durch schnelle Analyse, geringere Kosten und weniger falsche Ergebnisse auszeichnen. Die Verwertung der Diagnostikplattform wird durch die Projektpartner NeoVentures und nal von minden erfolgen, die den Sensor bis zur klinischen Zulassung entwickeln. Es wird angenommen, dass ein signifikanter Marktanteil bei Diagnostika im Bereich Antibiotika-resistente Bakterien erreicht werden kann. Grundsätzlich kann die Technologie auf andere Analyten übertragen werden und damit weiteres Umsatzpotential eröffnen. Fraunhofer wird gemäß seiner Beteiligung an der Produktentwicklung an der Verwertung z. B. über Lizenzeinnahmen beteiligt. Die Konditionen werden zu Projektbeginn im Kooperationsvertrag verträglich festgehalten.

Referenzen

Brett, Christopher M. A. (2022): Electrochemical Impedance Spectroscopy in the Characterisation and Application of Modified Electrodes for Electrochemical Sensors and Biosensors. In Molecules (Basel, Switzerland) 27 (5). DOI: 10.3390/molecules27051497.

Hua, Xin; Xia, Hai-Lun; Long, Yi-Tao (2019): Revisiting a classical redox process on a gold electrode by operando ToF-SIMS: where does the gold go? In Chemical science 10 (24), pp. 6215–6219. DOI: 10.1039/c9sc00956f.

Kökpinar, Öznur; Walter, Johanna-Gabriela; Shoham, Yuval; Stahl, Frank; Scheper, Thomas (2011): Aptamer-based downstream processing of his-tagged proteins utilizing magnetic beads. In Biotechnology and bioengineering 108 (10), pp. 2371–2379. DOI: 10.1002/bit.23191.

Lasia, Andrzej (2014): Self-Assembled Monolayers, Biological Membranes, and Biosensors. In Andrzej Lasia (Ed.): Electrochemical impedance spectroscopy and its applications. New York, NY, Heidelberg: Springer, pp. 263–270.

Lazanas, Alexandros Ch; Prodromidis, Mamas I. (2023): Electrochemical Impedance Spectroscopy-A Tutorial. In ACS measurement science au 3 (3), pp. 162–193. DOI: 10.1021/acsmeasuresciau.2c00070.

Lee, Seowon; Kim, Won Jae; Chung, Minsub (2021): Enhanced electrochemical biosensing on gold electrodes with a ferri/ferrocyanide redox couple. In The Analyst 146 (17), pp. 5236–5244. DOI: 10.1039/d1an00952d.

Magar, Hend S.; Brahman, Pradeep K.; Hassan, Rabeay Y.A. (2022): Disposable impedimetric nano-immunochips for the early and rapid diagnosis of Vitamin-D deficiency. In Biosensors and Bioelectronics: X 10, p. 100124. DOI: 10.1016/j.biosx.2022.100124.

Mehennaoui, Somia; Poorahong, Sujittra; Jimenez, Gaston Contreras; Siaj, Mohamed (2019): Selection of high affinity aptamer-ligand for dexamethasone and its electrochemical biosensor. In Scientific reports 9 (1), p. 6600. DOI: 10.1038/s41598-019-42671-3.

Milkani, Eftim: Milkani.

Rusling, James F.; Suib, Steven L. (1994): Characterizing Materials with Cyclic Voltammetry. In Advanced Materials 6 (12), pp. 922–930. DOI: 10.1002/adma.19940061204.

Semenova, Daria; Zubov, Alexandr; Silina, Yuliya E.; Micheli, Laura; Koch, Marcus; Fernandes, Ana C.; Gernaey, Krist V. (2018): Mechanistic modeling of cyclic voltammetry: A helpful tool for understanding biosensor principles and supporting design optimization. In Sensors and Actuators B: Chemical 259, pp. 945–955. DOI: 10.1016/j.snb.2017.12.088.

Shahrokhian, Saeed; Ranjbar, Saba (2018): Aptamer immobilization on amino-functionalized metal-organic frameworks: an ultrasensitive platform for the electrochemical diagnostic of Escherichia coli O157:H7. In The Analyst 143 (13), pp. 3191–3201. DOI: 10.1039/c8an00725j.

Shaver, Alexander; Arroyo-Currás, Netzahualcóyotl (2022): The challenge of long-term stability for nucleic acid-based electrochemical sensors. In Current opinion in electrochemistry 32. DOI: 10.1016/j.coelec.2021.100902.

Shin, Su Ryon; Zhang, Yu Shrike; Kim, Duck-Jin; Manbohi, Ahmad; Avci, Huseyin; Silvestri, Antonia et al. (2016): Aptamer-Based Microfluidic Electrochemical Biosensor for Monitoring Cell-Secreted Trace Cardiac Biomarkers. In Analytical chemistry 88 (20), pp. 10019–10027. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b02028.

Watkins, Zach; Karajic, Aleksandar; Young, Thomas; White, Ryan; Heikenfeld, Jason (2023): Week-Long Operation of Electrochemical Aptamer Sensors: New Insights into Self-Assembled Monolayer Degradation Mechanisms and Solutions for Stability in Serum at Body Temperature. In ACS Sens. 8 (3), pp. 1119–1131. DOI: 10.1021/acssensors.2c02403.

Xu, Xingxing; Makaraviciute, Asta; Kumar, Shalen; Wen, Chenyu; Sjödin, Martin; Abdurakhmanov, Eldar et al. (2019): Structural Changes of Mercaptohexanol Self-Assembled Monolayers on Gold and Their Influence on Impedimetric Aptamer Sensors. In Analytical chemistry 91 (22), pp. 14697–14704. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b03946.

Zhang; Yuting: 794222 (1).

Zoubir, J.; Radaa, C.; Idlahcen, A.; Bakas, I.; Assabbane, A. (2021): A new voltammetric sensor for metronidazole based on electro catalytic effect of Al2O3 modified carbon graphite. Application. Urine, tap water and river water. In Materials Science for Energy Technologies 4, pp. 296–306. DOI: 10.1016/j.mset.2021.08.003.