

# **Markierungsfreie Virusdiagnostik mittels elektrochemischer Umsetzer**

**Label-free virus diagnosis by electrochemical transducer**

Matthias Steinmaßl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik der Universität der Bundeswehr München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.) genehmigten Dissertation.

Erstgutachter: Prof. Dr. Christoph Kutter

Zweitgutachter: Prof. Dr. Joachim Wegener

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Georg Düsberg

Die Dissertation wurde am 09.03.2022 bei der Universität der Bundeswehr München eingereicht und durch die Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik am 06.09.2022 angenommen. Die mündliche Prüfung fand am 29.09.2022 statt.

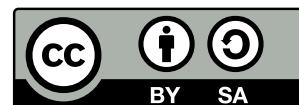






*Für Johann und Aaron  
- mögen auch sie entdecken,  
welche Schätze Gott in sie hineingelegt hat.*

Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons »Namensnennung – Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International« Lizenz.





## **Abstract**

The capacity of centralized clinical diagnosis laboratories represents a significant limiting factor in the fight against a pandemic. Can these capacities be extended by the use of electrochemical biosensors? A lab-on-chip system was investigated that allows the execution a monitoring of nucleic acid amplification and melt curve analysis of the resulting products. Here in, the method of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was used. It is shown that the processes of synthetization and denaturation of cDNS can be measured by the applied biosensors. The integration of appropriate components inside the biosensor allows the conduction of the necessary thermal profiles for both processes. The presented method describes a lab-on-chip system for the application in quantitative LAMP and consecutive melt curve analysis and opens the way for the development of a miniaturized, high-valid point-of-care nucleic acid test device.





# Zusammenfassung

Die begrenzten Testkapazitäten in Speziallaboren stellen einen limitierenden Faktor in der Bekämpfung einer Pandemie dar. Kann der Einsatz von Biosensoren dabei helfen, diese Kapazitäten zu vergrößern? Ein Lab-on-chip Ansatz wurde untersucht, der sowohl Quantifizierung von Nukleinsäure-Amplifizierung, als auch Schmelzkurvenanalyse von Amplifikaten ermöglicht. Dabei wurde die Methode der Schleifen-vermittelten, isothermalen Amplifizierung (LAMP) betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass der Prozess der Synthetisierung und der Denaturierung von Nukleinsäure mithilfe der Biosensoren gemessen werden kann. Die Integration geeigneter Komponenten im Biosensor erlaubt die Durchführung der benötigten Temperaturprofile für beide Prozesse. Die vorgestellte Methode beschreibt ein Lab-on-Chip-System für den Einsatz der Datenerhebung von quantifizierter LAMP und angehängter Schmelzkurvenanalyse und legt den Grundstein für ein miniaturisiertes und valides Point-of-care Nukleinsäure-Testinstrument.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract</b>	<b>vii</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>ix</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>xiii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Virusdiagnostik . . . . .	2
1.2 Neue Wege in der Virusdiagnostik . . . . .	4
1.2.1 Isothermale Nukleinsäure-Amplifizierung . . . . .	5
1.2.2 Stand der Technik . . . . .	6
1.3 Problemstellungen für den markierungsfreien Ansatz in Lösung . . . . .	7
1.3.1 Einsatz des Sensors in chemischer Umgebung . . . . .	7
1.3.2 Sensitivität auf gezielte Erkennungsevents . . . . .	7
1.3.3 Kontrolle der vorhandenen Querempfindlichkeit . . . . .	8
1.3.4 Mehrwert durch den Einsatz elektrochemischer Umsetzer . . . . .	8
1.4 Überblick . . . . .	8
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Amplifizierungsmethoden in der Virendiagnose . . . . .	11
2.1.1 Polymerase Kettenreaktion . . . . .	13
2.1.2 Isothermale Schleifen-vermittelte Amplifizierung . . . . .	14
2.1.3 Schmelzkurvenanalyse . . . . .	16
2.2 Biosensoren . . . . .	18
2.2.1 Transducer für den markierungsfreien Ansatz . . . . .	21
2.2.2 Ionen-Sensitiver Feldeffekt-Transistor . . . . .	23
2.2.3 Interdigitalelektroden . . . . .	30
2.3 Technologische Grundlagen . . . . .	35
2.3.1 Flexible Leiterplatten . . . . .	35
2.3.2 Bondverfahren . . . . .	36
2.4 Chemische Puffer und Amplifizierungsreaktionen . . . . .	37
2.4.1 Kalibrierpuffer für pH-Sensoren . . . . .	37

2.4.2	Reaktionsmix für isothermale Amplifizierung und Schmelzkurvenanalyse . . . . .	38
2.5	Methoden der Signalverarbeitung . . . . .	41
2.5.1	Savitzky-Golay-Filter . . . . .	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>43</b>
3.1	Sensordesign und Charakterisierung . . . . .	43
3.1.1	Interdigitalelektroden . . . . .	44
3.1.2	Ionen-Sensitiver Feldeffekt-Transistor . . . . .	49
3.2	Systemintegration . . . . .	63
3.2.1	Sensor Packaging . . . . .	64
3.2.2	Auswerteschaltungen . . . . .	71
3.3	Quantifizierung und Endpunkterkennung von isothermaler Amplifizierung	81
3.3.1	Quantifizierung durch pH-Messung . . . . .	81
3.3.2	Quantifizierung durch Kapazitätsmessung . . . . .	85
3.4	Schmelzkurvenanalyse . . . . .	94
3.5	Systemgedanken . . . . .	98
3.6	Einsatz in Patienten-naher Diagnostik . . . . .	102
3.7	Einordnung vorhandener Systeme . . . . .	105
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>107</b>
4.1	Weiterentwicklung der Transducer . . . . .	109
<b>5</b>	<b>Anhang</b>	<b>111</b>
5.1	Publikationen . . . . .	111
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>113</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>117</b>
	<b>Literatur</b>	<b>119</b>

# Abkürzungen

<b>ACF</b>	Anisotropic Conductive Film (anisotrop leitfähiger Klebefilm)
<b>ADC</b>	Analog-Digital-Converter
<b>AVT</b>	Aufbau- und Verbindungstechnik
<b>B3</b>	Hinterer äußerer Primer
<b>BIP</b>	Hinterer innerer Primer
<b>BPSG</b>	Borphosphorsilicatglas
<b>cDNA</b>	Complementary DNA (komplementäre DNA)
<b>CLIA</b>	Clinical Laboratory Improvement Amendments
<b>CMOS</b>	Complementary Metal-Oxide-Semiconductor Process (komplementärer Metall-Oxid-Halbleiter Prozess)
<b>CVD</b>	Chemical Vapour Deposition (chemische Gasphasenabscheidung)
<b>DAC</b>	Digital-Analog-Converter
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dsDNA</b>	doppelsträngige DNA
<b>EEPROM</b>	Electrically Erasable Programmable Read-Only Memory (elektrisch löschbarer programmierbarer Nur-Lese-Speicher)
<b>EGFET</b>	Extended-Gate Feldeffekttransistor
<b>EIS</b>	elektrochemische Impedanzspektroskopie
<b>EMFT</b>	Einrichtung für Mikrosysteme und Festkörpertechnologien
<b>F3</b>	Vorderer äußerer Primer
<b>FDA</b>	amerikanische Verwaltungsbehörde für Lebensmittel und Arzneien
<b>FEM</b>	Finite-Elemente-Methode

## *Abkürzungen*

---

<b>FIB</b>	Focused Ion Beam (Fokussierter Ionenstrahl)
<b>FIP</b>	Vorderer innerer Primer
<b>FG-ISFET</b>	Floating-Gate ISFET
<b>FOX</b>	Feldoxid
<b>FSC</b>	Full Scale Change
<b>GLRV2</b>	Grapevine Leafroll Virus Type 2
<b>IDK</b>	Interdigitalkondensator
<b>IDT</b>	Interdigitaltransducer
<b>ISFET</b>	Ionensensitiver Feldeffekttransistor
<b>LAMP</b>	Loop-Mediated Isothermal Amplifikation (Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation, siehe Kapitel 2.1.2)
<b>LPCVD</b>	Low-Pressure CVD (Niederdruck-CVD)
<b>MCA</b>	Melt Curve Analysis (Schmelzkurvenanalyse)
<b>MOSFET</b>	Metal Oxide Semiconductor Field-Effect Transistor
<b>NAT</b>	Nukleinsäure-Test
<b>OP</b>	Operationsverstärker
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion, siehe Kapitel 2.1.1)
<b>PECVD</b>	Plasma-Enhanced CVD (Plasma-verstärkte CVD)
<b>PG-ISFET</b>	Programmable-Gate Ionensensitiver Feldeffekttransistor
<b>PID</b>	Proportional-Integral-Differenzial-Regler
<b>POC</b>	Point of Care
<b>POCT</b>	Point of Care Test (in unmittelbarer Nähe zum Ort der Patientenversorgung)
<b>PWM</b>	Pulsweitenmodulation

---

<b>QCM</b>	Quartzkristall-Mikrowaage
<b>qPCR</b>	quantitative PCR
<b>REM</b>	Rasterelektronenmikroskop
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>ssDNA</b>	Single Stranded (einzelsträngige) DNA
<b>SARS-CoV-2</b>	Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2
<b>SMU</b>	Source Measure Unit
<b>TEOS</b>	Tetraethylorthosilicat
<b>TSC</b>	Touch Sensing Controller





# Kapitel 1

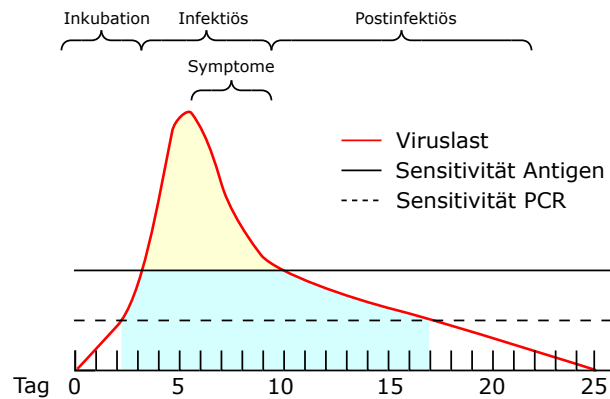
## Einleitung

Die Bedeutung einer ausreichenden Testkapazität zur Bekämpfung einer Viruspandemie ist nicht erst seit der Ausbreitung von SARS-CoV-2 in den Jahren 2019 und 2020 bekannt. Auch beim Ebola Ausbruch 2016 und dem Auftreten des Zika-Virus 2017 waren Kontaktverfolgung und Tests die einzigen Möglichkeiten einem Ausbruch Herr zu werden. Für Ebola wurde 2019 ein Impfstoff zugelassen, für den Zika-Virus bis heute nicht. Die Corona-Pandemie zeigte 2020 auch in Deutschland, dass Kontaktverfolgung ab einem gewissen Inzidenzgeschehen nicht mehr durchgeführt werden kann. Zu spät waren ausreichend Testkapazitäten verfügbar, um die ersten beiden Wellen effektiv eindämmen zu können. Obwohl seit Jahrzehnten an Point of Care Testverfahren (POCT) zum Virennachweis geforscht wird, gibt es heute als einzige Option Antigen-Schnelltests, die in breiter Masse kostengünstig verfügbar sind [1, 2]. Da diese jedoch nur hohe Viruslasten nachweisen können, bleiben viele Corona-Infektionen unentdeckt [3]. Die Viruslast zu Beginn und gegen Ende der Infektion ist schlichtweg zu gering, trotz der hohen Infektiosität in dieser Phase der Erkrankung. Doch gerade mitten in den Pandemiewellen, in denen die Inzidenzwerte exponentiell steigen, braucht es eine hohe Testquote mit hoch-sensitiven Testverfahren. Die Bereitstellung von Laborinfrastruktur für PCR-Tests ist dabei eine zentrale Herausforderung [4]. Neue Ansätze müssen entwickelt werden, um die Lücke zwischen hochpräzisen, aber teuren und zeitintensiven Tests und günstigen Massentests mit geringer Sensitivität zu schließen. Elektronische Mikrosysteme können dabei helfen. Durch die Miniaturisierung ermöglichen sie eine hohe Funktionalität bei geringer Baugröße und geringem Kostenaufwand. Um mit Hilfe von Mikrochips Lösungen für die Probleme in der Virusdiagnostik angehen zu können, braucht es jedoch die Anwendung innovativer biochemischer Verfahren und eine sinnvolle Kombination. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit genau dieser Fragestellung und untersucht dabei die Anwendbarkeit von markierungsfreien (Label-freien) Methoden. In dieser Einleitung soll zunächst nochmals die Problematik im Zusammenhang mit Virus-Tests erörtert werden. Im Folgenden werden vorhandene Ansätze präsentiert und die Vor- und Nachteile diskutiert. Der gewählte Ansatz wird schließlich in den Zusammenhang gesetzt und die einzelnen daraus abgeleiteten Problemstellungen erörtert.

## **1.1 Virusdiagnostik**

Baldrich und Garcia-Aljaro beschreiben drei verschiedene Verfahren für den Nachweis von Pathogenen [5, S. 17]. Das Erste ist die Zellkultur, die vor allem im Nachweis von Bakterien zum Einsatz kommt. Unter Einsatz von Wirtszellen, in denen sich Viren vermehren können, ist diese Methode auch auf die Virendiagnostik anwendbar. Das Verfahren spielt in der Labordiagnostik jedoch aufgrund des hohen zeitlichen Aufwandes kaum eine Rolle. Im Folgenden beschränkt sich diese Arbeit deshalb auf die Betrachtung der beiden weiteren Verfahren. Diese sind der Nachweis von Proteinen (Antigenen oder Antikörpern) über den Einsatz von Immuno-Assays, sowie Methoden zum Nachweis von Nukleinsäuren über Amplifikationsverfahren, kurz gesprochen Nukleinsäure-Tests (NAT).

Betrachtet man NATs, die auf der PCR oder anderen Amplifikationsverfahren wie LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) basieren, erreicht man laut Studien eine Sensitivität von bis zu 100 % [3]. Dabei ist man jedoch auf die Durchführung im Labor angewiesen. Ein Hauptziel bei der Entwicklung von POCTs ist die Verkürzung der Dauer des Tests. Rechnet man vom Zeitpunkt der Probennahme bis zur Übermittlung des Testergebnisses, können bei einem Corona-PCR-Test mehrere Tage verstreichen. Die meiste Zeit nimmt dabei der Transport des Probengefäßes an den Ort der Laboranalyse ein. In dieser Zeit kann sich ein Proband in falscher Sicherheit wiegen und Infektionsketten weitertragen. Doch auch in anderen Bereichen fehlt es an POCT-Möglichkeiten zum Virusnachweis. In der Lachs-zucht ist Virenbefall ein großes Problem. In den engen Aquafarmen, die häufig einige Kilometer abseits der Küste liegen, können sich Viren schnell ausbreiten. Um gezielt medikamentös zu behandeln, müsste eine Probe von einem erkrankten Tier genommen werden und in ein Labor am Festland gebracht werden. Da dies nicht in adäquater Zeit möglich ist, werden Medikamente großzügig prophylaktisch eingesetzt und gelangen so unnötigerweise in die Umwelt [6]. Auch in der Landwirtschaft würde der Einsatz von POCTs eine direkte Entnahme von befallenen Pflanzen ermöglichen [7]. Darüber hinaus gibt es Viruserkrankungen in tropischen Gebieten, in denen gar keine Laborkapazitäten zur Verfügung stehen. Auch hier existieren Ansätze zur Entwicklung von POCTs [8, 9]. Diese basieren häufig auf dem LAMP-Verfahren, welches im Gegensatz zur PCR bei konstanter Temperatur abläuft und dadurch weniger aufwendiges Equipment benötigt.



**Abbildung 1.1:** Viruslast (Grafik adaptiert nach [10]). In blau dargestellt ist der Zeitraum, in dem eine Corona-Infektion mit PCR-Tests nachgewiesen werden kann. Gelb markiert den Zeitraum, in dem Antigentests valide funktionieren. Dies umfasst vor allem die infektiöse Phase einer Viruserkrankung.

Kommerzielle Schnelltests basieren auf dem Nachweis der Antigene an der Virushülle. Da keine Amplifikation und dadurch keine Erhöhung der Konzentration stattfindet, können diese Tests nur bei hohen Viruslasten valide Ergebnisse liefern [10]. Die Genauigkeit beträgt dabei zwischen 75 und 95 %, sinkt jedoch bei geringer Viruskonzentration bis unter 50 % ab [3]. In Deutschland müssen diese Antigentests den Kriterien des Paul-Ehrlich-Instituts entsprechen, welche Spezifität, Kreuzreaktivität und Interferenz umfassen [11]. Außerdem sollen sie dem Stand der Technik entsprechen. Die amerikanische Verwaltungsbehörde für Lebensmittel und Arzneien (FDA) formuliert für POCTs die Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) Kriterien, welche in Tabelle 1.1 aufgelistet sind.

**Tabelle 1.1:** FDA CLIA-waiver Kriterien [12].

1	Wissen	Mindestnötiges technisches Wissen
2	Training	Minimales Training notwendig
3	Reagenzvorbereitung	Stabile Reagenzien und minimale Vorbereitung
4	Durchführungsschritte	Keine manuellen Schritte notwendig
5	Kalibrierungsmittel	Stabile Kalibrierungsmittel
6	Problembehandlung	automatisch oder mit minimaler Beurteilung
7	Interpretation	Minimale Interpretation der Ergebnisse

Trotz dieser Kriterien kommt es beim Einsatz von POCTs zu einer verminderten Genauigkeit bei der Ausführung durch untrainiertes Personal, wie eine deutsche Studie ergeben hat [13]. Problematisch ist dabei die korrekte Durchführung der Probennahme. Diese wird zwar in einer beigefügten Anleitung erläutert, jedoch werden häufig Begriffe verwendet, die ohne Expertenwissen nicht verstanden werden können. Diese Sprachbarrieren und

oftmals auch Nervosität in der Durchführung sind die Hauptgründe für Fehler durch untrainiertes Personal. Nicht ohne Grund werden Labore, in denen PCR-Tests durchgeführt werden, einer regelmäßigen Überprüfung der Validität durch Ringversuche unterzogen [14]. Die Bundesärztekammer hatte dazu bereits vor dem Beginn der Pandemie neue Richtlinien zur internen und externen Qualitätskontrolle beim Einsatz von POCT im klinischen Umfeld veröffentlicht (RiliBÄK, Teil B3 [15]). Zur internen Qualitätskontrolle wird die Mitnahme einer Positiv- und einer Negativkontrolle bei jeder Durchführung empfohlen. Für Kartuschensysteme, die häufig nur eine Probe pro Durchlauf verarbeiten können, ist eine Kontrollprobe nur bei Chargenwechsel oder Orts- bzw. Bedienerwechsel notwendig. Zur externen Qualitätskontrolle empfiehlt die Bundesärztekammer die Teilnahme an halbjährlichen Ringversuchen. Mit den gegenwärtig verfügbaren Tests wird auf eine engmaschige Kontrolle mit günstigen, in Massen verfügbaren Antigentests gesetzt, um Covid-Erkrankungen zu erfassen. Natürlich wäre es effektiver, für die Massentestung auf NAT-Verfahren zurückzugreifen. Die Sensitivität ist höher und auch der Zeitraum, in dem der Virus nachgewiesen werden kann ist länger [16]. Deshalb ist das Ziel der Forschung und Entwicklung, diese Lücke zu schließen. In Bayern wurden kürzlich PCR-Tests entwickelt, die durch ein innovatives Heizverfahren die Reaktionszeit um mehr als die Hälfte verkürzen [17]. Per Laserpuls werden Nanopartikel im Reaktionsvolumen angeregt und heizen die Probenflüssigkeit in äußerst kurzer Zeit auf. Das Verfahren kann nur in Laborumgebungen umgesetzt werden. Da es keine echte Lösung für POCTs bietet, hat es sich bisher auch nicht in diesem Bereich durchgesetzt [18]. Große Hoffnungen liegen aktuell auf dem LAMP-Verfahren [19]. Diese befinden sich aktuell in der Entwicklungsphase [20, 21] und könnten in Zukunft PCR ersetzen.

### 1.2 Neue Wege in der Virusdiagnostik

LAMP ist ebenfalls ein vielversprechender Kandidat, wenn es um den Einsatz von NAT-POCTs geht. Es läuft bei konstanter Temperatur ab und benötigt somit weniger Equipment als die konventionelle PCR [9]. Everitt u. a. untersuchten aktuelle LAMP-basierte POCTs auf deren Tauglichkeit [2]. Darunter befanden sich Marktprodukte, die nach den CLIA-waiver Kriterien zertifiziert wurden (siehe Tabelle 1.1), sowie Produkte in der Entwicklung. Sie kommen dabei zu dem Schluss, dass im Allgemeinen zu wenig Fokus auf die Problematik einer validen Probenvorbereitung gelegt wird. Ein LAMP-basiertes Schnelltestsystem erreichte dadurch ein sehr schlechtes Ergebnis in der klinischen Studie [22]. Daher formulierten Everitt u. a. ein neues Set von möglichen Bewertungskriterien für POCTs (siehe Tabelle 1.2). Sie setzen dabei auf ein möglichst einschrittiges Probennahmeverfahren (Sample-to-answer), auf eine schnelle Analyse (Rapid), eine Vor-Ort-Durchführung des Tests (Local), welche günstig ist (Inexpensive) und einen hohen Durchsatz bei geringem Equipmenteinsatz ermöglicht (Throughput/Equipment).

**Tabelle 1.2:** STARLITE Kriterien zur Bewertung von POCTs [2].

STA	Sample-to-answer	Einschrittverfahren ohne Benutzereingriff
R	Rapid	Ergebnis steht innerhalb des Aufenthalts im Testzentrum bereit
L	Local	Durchführung am Ort der Probennahme
I	Inexpensive	Niedrige Kosten pro Test
TE	Throughput/Equipment	Hoher Durchsatz bei geringem Equipmenteinsatz

Die Autoren erklären den ausbleibenden Erfolg bereits zertifizierter Testverfahren mitunter auch an den zu weichen Kriterien der FDA. Gerade der Sample-to-answer Aspekt werde von vielen Forschenden zu sehr außer Acht gelassen. Oft seien der Einsatz von Papier-basierten Sensoren oder Mikrofluidik Grund genug, von einem POCT-fähigem Gerät zu sprechen. Das Kriterium des Sample-to-answer-Ansatzes greift hier weiter als die CLIA-Kriterien, da die Notwendigkeit der Kalibrierung oder die notwendige Vorbereitung von Reagenzien ein mehrschrittiges Verfahren implizieren. Als Antwort auf den zunehmenden Einsatz von POCT-Systemen im klinischen Umfeld wurde kürzlich eine gemeinsame Empfehlung zur Implementierung von NAT-POCTs durch die deutschen Gesellschaften für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und Virologie (GfV) und dem Berufsverband der Ärzte für Mikrobiologie, Virologie und Infektionsepidemiologie (BÄMI) herausgegebenen [23]. Darin finden sich unter anderem Selektionskriterien für POCTs und Best-Practice-Regeln für die Implementierung im klinischen Umfeld, aus denen sich auch Bewertungskriterien für die Entwicklung von POCT-Systemen ableiten lassen. Die Autoren Luppa u. a. gehen dabei über die Bewertung der technologischen Aspekte, wie Probennahme, Spezifität, Sensitivität, Wiederholbarkeit und Kosten pro Test hinaus und führen auch praktische Voraussetzungen an. Darunter erwähnen sie die Integration in bestehende IT-Systeme, Datensicherheit, Risikokontrolle, Nutzerakzeptanz, Verfügbarkeit der Verbrauchsmaterialien und Reparaturmöglichkeiten.

### 1.2.1 Isothermale Nukleinsäure-Amplifizierung

Warum LAMP im Zentrum der Aufmerksamkeit steht, wird am Beispiel der Probenaufbereitung deutlich. Für die Amplifizierung muss das genutzte Enzym Zugriff auf die Virus-RNA bekommen. Dafür ist ein Aufspalten der Virushülle (Lysis) notwendig. Vor einigen Jahren wurde bereits gezeigt, dass dafür die Temperatur des LAMP-Prozesses ausreicht [24]. Dass auf den Schritt der Lysis tatsächlich verzichtet werden kann, wurde inzwischen experimentell bestätigt [7]. Die Schnelligkeit des LAMP-Verfahrens übertrifft die der PCR. Konventionelle Laboranalysen mit PCR nehmen etwa zwei Stunden in Anspruch, LAMP liefert bereits nach maximal einer Stunde Ergebnisse. Das Primerdesign

spielt dabei eine wichtige Rolle. Primer sind Oligonukleotide, welche dem Enzym in der Amplifizierung als Startpunkt dienen. Durch geschickte Wahl Kürzlich konnte durch die Erhöhung der Anzahl der Primer die Zeit sogar unter 30 min gedrückt werden [25]. Die Durchführung erfordert wenig bis keine Instrumente. Die schwierigsten Aspekte sind die Bereitstellung der Reaktionstemperatur und das Auslesen des Ergebnisses. Für die Temperierung wurde beispielsweise eine chemisch-aufgeheizte Tasse entwickelt, welche sich die Reaktion zwischen Mg-Fe und Wasser zunutze macht [9]. Auf der Seite der Evaluation wurden Proben-basierte Methoden vorgestellt, die jedoch komplexe Arbeitsschritte beinhalten, die durch trainiertes Personal durchgeführt werden müssen [26, 27]. Jede LAMP Amplifikationsreaktion produziert ein Proton. Dadurch ändert sich der pH-Wert und dieser kann über die Farbe des Indikators mit dem Auge beobachtet werden [28]. Die Firma New England Biolabs vertreibt einen schwach-gepufferten LAMP-Reaktionsmix, der Phenolrot als Indikatorfarbstoff enthält [29]. Es wurden bereits Systeme präsentiert, welche mithilfe von Smartphone-Kameras den Farbumschlag in Echtzeit aufnehmen und dadurch auch eine Quantifizierung der Viruslast ermöglichen [30].

Nachteile ergeben sich aus der zunehmenden Vereinfachung der Laborprozesse ebenfalls. So zeigte LAMP in Studien eine hohe Falsch-Positiv-Rate [31], welche auf die Selbstamplifizierung der Primer zurückgeführt wird. Im Labor können solche Fehler durch Schmelzkurvenanalyse [32, 33] oder Gelelektrophorese erkannt werden. Edgü u. a. verwendeten Lateral-Flow-Tests, wie sie in Antigen-Tests Einsatz finden, um die zuvor Biotin-markierten Amplifikate nochmals zu verifizieren. Dafür ist allerdings ein erneuter Transfer des Reaktionsproduktes auf die Teststreifen notwendig [7], was jedoch nicht dem Sample-to-answer Aspekt entspricht.

### 1.2.2 Stand der Technik

Die meisten am Markt verfügbaren NAT-POCT-Geräte setzen auf ein Kartuschensystem. Dabei wird für jeden Test ein Probenbehälter in ein Gerät eingeführt. Konventionelle PCR ist als Amplifikationsmethode am weitesten verbreitet, wobei es auch Geräte gibt, die die isothermale Amplifikation nutzen [34], wie z.B. der ID NOW™. Die Kartuschen unterscheiden sich je nach eingesetzter Technologie für die Probenverarbeitung. Klassische Kartuschen kommen beim GeneXpert® zum Einsatz [35], der Roche cobas® Liat® benutzt ein Röhrchen (Lab-in-a-tube) [36], beim Spindiag Rhonda™ kommt eine Scheibe mit mikrofluidischen Kanälen zum Einsatz (Lab-on-a-disc) [37]. Zur Auswertung der Amplifikation werden zumeist Fluoreszenz-Label eingesetzt, wie auch in der konventionellen, quantitativen PCR (qPCR). Meist muss eine Abstrichprobe in die Kartusche eingeführt werden und die Kartusche in das Gerät, um die Virusanalyse zu starten. Bei dem bereits erwähnten ID NOW™ besteht das System aus mehreren Einzelteilen, welche vor dem automatischen Prozess manuell zusammengesteckt werden müssen. Die Geräte

liefern die Ergebnisse innerhalb von 30 bis 60 min. Nicht erwähnt werden hier Geräte die eine Probe gleichzeitig auf mehrere Pathogene testen können (bspw. Rhonda oder GeneXpert). Die Verarbeitung von mehr als einer Probe erlaubt von den vorgestellten Geräten nur der GeneXpert, welcher auch als System für bis zu 16 Proben erhältlich ist. Mit dem Ansteigen der Anzahl der Proben, die verarbeitet werden können, steigt jedoch auch die Produktgröße, sodass nur das kleinste System für zwei Kartuschen als POCT im eigentlichen Sinne verstanden werden kann.

## 1.3 Problemstellungen für den markierungsfreien Ansatz in Lösung

Für diese Arbeit wurde ein markierungsfreier (Label-freier) Ansatz in Lösung gewählt, um eine möglichst günstige und robuste Anwendung zu erzielen. Es soll untersucht werden, inwieweit auf Biotin-Labeling und oder Immobilisierung von Ribonukleinsäure (RNA) verzichtet werden kann und dabei trotzdem eine hohe Validität bei Einhaltung der STARLITE Kriterien (siehe Tabelle 1.2) zu ermöglichen. Zum Einsatz kommen dabei Mikrosysteme und chemische Sensoren, um dem Sample-to-answer Aspekt möglichst nahe kommen zu können. Nachfolgend wird in die dafür zentralsten Problemstellungen noch einmal näher eingeführt.

### 1.3.1 Einsatz des Sensors in chemischer Umgebung

An den Stellen, an denen Elektronik mit chemischen Medien in Verbindung kommen soll, ist eine verlässliche Aufbau- und Verbindungstechnik (AVT) mit ein kritischer Punkt, an dem sich der Erfolg eines solchen Unternehmens entscheidet. Miniaturisierte Bauteile zeichnen sich meist durch minimale Abstände zwischen verschiedenen elektronischen Signalen aus, welche auf keinen Fall kurzgeschlossen werden dürfen. Das Eindringen von Wasser oder Feuchtigkeit in diese kritischen Strukturen muss also in jedem Fall verhindert werden. Diese Arbeit stellt dafür ein neuartiges hybrides Packaging-Konzept vor, welches diesen Problemen vorbeugt.

### 1.3.2 Sensitivität auf gezielte Erkennungsevents

Ein Label-freier Ansatz schließt die Nutzung von Erkennungsreaktionen aus, die auf der spezifischen Bindung von komplementären Molekülen beruhen. Biosensorkonzepte, welche beispielsweise auf der Bindung von Biotin und Avidin oder auf Hybridisierung zwischen komplementären DNA Strängen beruhen, können nicht angewandt werden. Die dazu notwendigen Prozessschritte des Auswaschens oder Aufkonzentrierens benötigen funktionalisierte Oberflächen mit immobilisierten Molekülen, auf welche eben gerade

verzichtet werden soll. Daher ist es notwendig auf biochemische Prozesse aufzubauen, die die Selektivität bereits mitbringen und physikalische Effekte für diese Prozesse zu identifizieren, welche anschließend mit elektrochemischen Umsetzern (Transducer) gemessen werden können.

### **1.3.3 Kontrolle der vorhandenen Querempfindlichkeit**

Chemische Sensoren weisen ungleich zu physikalischen Sensoren eine Vielzahl von Querempfindlichkeiten auf, die es zu umgehen oder zu kompensieren gilt. Dazu zählt insbesondere die Temperatur, jedoch auch chemische Parameter, wie die Ionenkonzentration, also auch pH-Wert oder Leitfähigkeit. Da diese Querempfindlichkeiten theoretisch nur sehr schwer abgeschätzt werden können, muss der Einfluss eben jener Parameter experimentell bestimmt werden. Beim Sensordesign kann zusätzlich darauf geachtet werden, Einflüsse durch Querempfindlichkeit zu minimieren.

### **1.3.4 Mehrwert durch den Einsatz elektrochemischer Umsetzer**

Der Einsatz von elektrochemischen Transducern erhöht in gewissem Maße die Komplexität eines Messsystems. Das Erreichen eines Mehrwerts muss also mit dem Einsatz einhergehen, um diesen erhöhten Aufwand zu rechtfertigen. Die Identifikation von existierenden Problemen oder Beschränkungen ist dahingehend zu erfolgen, ob und inwieweit elektrochemische Transducer zur Lösung dieses Problems einen unbedingten Mehrwert beitragen.

## **1.4 Überblick**

In der vorliegenden Arbeit werden zunächst die verwendeten Materialien und Methoden dargestellt und erläutert. Das umfasst zuerst die biochemischen Analysemethoden LAMP und MCA (Melt Curve Analysis, Schmelzkurvenanalyse), welche in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kommen. Die verwendeten Biosensoren werden eingeführt, Werkzeuge der Charakterisierung vorgestellt und der aktuelle Stand der Technik erläutert, der den Einsatz in der Virendiagnostik betrifft. Da für den Einsatz von Transducern in flüssigen Medien die AVT eine wichtige Rolle spielt, werden ebenso Leiterplattentechnologien und Bondverfahren erläutert.

Darauf aufbauend wird im Ergebnisteil das entwickelte Sensorpackaging vorgestellt und alle Module der Systemintegration erläutert, welche beim Aufbau der Demonstratoren und Prototypen zum Einsatz kamen. Dies umfasst neben den Messsystemen für die Biosensoren auch eine Temperaturregelung, welche mithilfe von Temperatur- und Heizwiderständen auf dem Interdigitaltransducer (IDT) realisiert wurde. Die Biosensoren wurden



für den Einsatz in der Endpunkterkennung und Auswertung einer LAMP-Reaktion und für die Durchführung einer MCA getestet und evaluiert. Die Ergebnisse werden vorgestellt und Ansätze zur Integration in ein POCT-System präsentiert.

Anschließend werden die Ergebnisse diskutiert und anhand der in dieser Einleitung eingeführten Kriterien bewertet. Das angestrebte Konzept wird mit den aktuell vorhandenen Systemen verglichen und mögliche Ansätze für eine Weiterentwicklung werden erörtert.

Schließlich erfolgt eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus Sicht der verschiedenen Disziplinen Sensorentwicklung, Systemintegration, Biochemie und Laboratoriumsmedizin.



# Kapitel 2

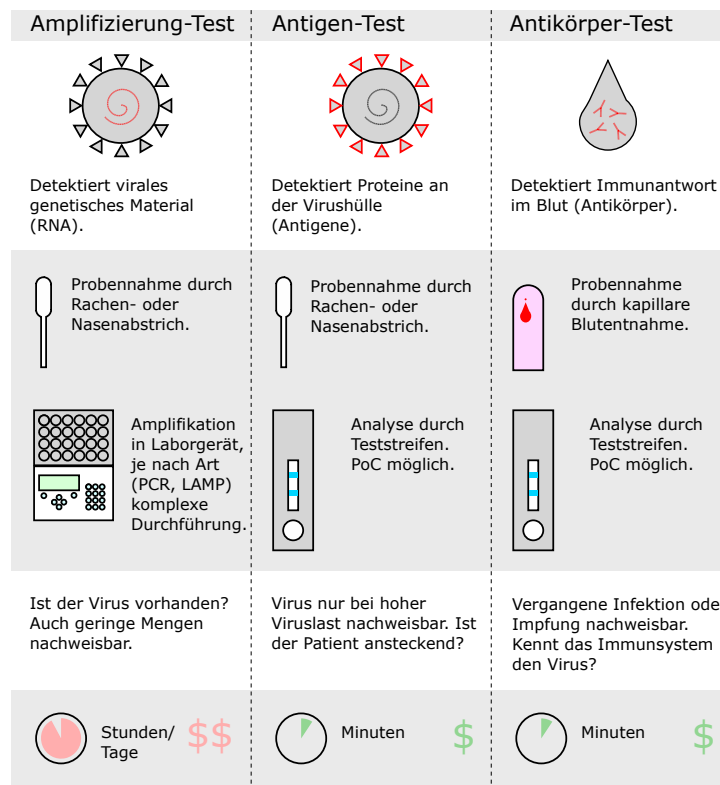
## Material und Methoden

### 2.1 Amplifizierungsmethoden in der Virendiagnose

Bereits in der Einleitung wurde erläutert, dass für den Virennachweis Amplifizierungsmethoden den Antigentests überlegen sind. Das betrifft vor allem die Sensitivität (siehe Abbildung 1.1). Einen kompletten Überblick über die vorhandenen Tests liefert Abbildung 2.1 nach [3]. Amplifizierungstests detektieren das spezifische genetische Material des Virus. Die Probennahme erfolgt durch Rachen- oder Nasenabstrich [38]. Je nach Art der Amplifizierung sind verschiedene Vorbereitungsschritte notwendig. Dazu zählen die Aufspaltung der Zellwand (Lysis) und die Umwandlung der RNA in komplementäre DNA (cDNA) per Reverser Transkriptase (Enzym) [39]. Die Amplifikation selbst benötigt einen Mix aus den virusspezifischen Primern, der Polymerase (Enzym), den vier Desoxy-Nukleotiden und einem Puffer [40]. Die Amplifizierung findet dann in einem Thermocycler statt, ein Gerät, welches Probengefäße aufnehmen und die Temperatur des enthaltenen Mix präzise einstellen kann. Ist der Virus in der Probe vorhanden, findet die Amplifikation statt, ansonsten nicht. Die Reaktion wird so lange durchgeführt bis die Amplifikate detektiert werden können, beziehungsweise bis nicht mehr mit einer erfolgreichen Amplifikation gerechnet werden kann. Detektionsprinzipien sind vielfältig und gliedern sich in nachgeschaltete Analysemethoden (Gelelektrophorese, Schmelzkurvenanalyse oder Beobachtung von Salzausfall) bis hin zu Live-Monitoring. Mittels des Live-Monitorings kann auch der Zeitpunkt bestimmt werden, bei dem die Amplifikation einsetzt. Dieser ist ein Maß für die Viruslast in der Probe. Die untere Nachweisgrenze liegt weit unter der von Antigen-Tests. Was die Dauer und den Preis betrifft, kann der Test jedoch nicht punkten. Die Probe muss in ein Labor gebracht werden. Zudem sind die eingesetzten Reagenzien teurer im Vergleich zum Antigen-Test.

Dieser beruht auf einem anderen Detektionsprinzip. Die Virushülle ist bedeckt mit spezifischen Antigenen. Für den Antigen-Test wird ein Assay entworfen, bei dem die zugehörigen Antikörper eingesetzt werden. In einem ersten Schritt wird die Abstrichprobe in eine Lösung eingetaucht, welche farbig markierte Antikörper enthält. Die Lösung wird auf einen Teststreifen aufgebracht. Durch Kapillarkräfte fließt die Lösung entlang des Streifens.

Dadurch gelangen diese Komplexe an das Testfeld, welches immobilisierte Antikörper aufweist. Die Komplexe binden daran und bei hinreichend großer Anreicherung wird eine Verfärbung sichtbar. Am Kontrollfeld befinden sich immobilisierte Proteine, an denen die markierten Antikörper andocken. Tritt dort keine Farbänderung auf, muss von einem Fehler bei der Durchführung ausgegangen werden. Dasselbe Detektionsprinzip findet beim Antikörper-Test statt, nur dass dabei die Rollen der Antigene und Antikörper getauscht sind. Die Probennahme erfolgt durch einen Punks in den Finger und der Entnahme eines Blutropfens mithilfe beispielsweise einer Kapillare. Beide Verfahren sind als POCTs verfügbar und können auch im Selbsttest durchgeführt werden.



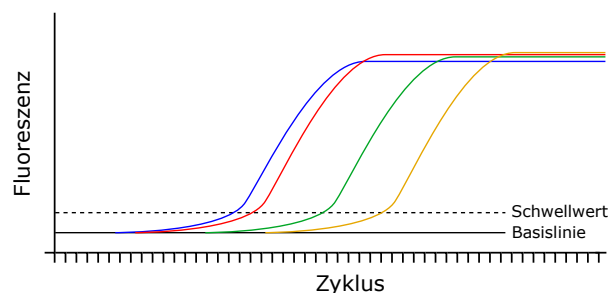
**Abbildung 2.1:** Vergleich von verschiedenen Virustests (adaptiert von [3]). Geringe Viruslasten können nur mit Genamplifizierungstests nachgewiesen werden. Jedoch bei hohen Kosten und langer Dauer. Günstige Schnelltests weisen hohe Viruslasten nach oder erkennen vergangene Infektionen. Sie basieren auf der Antigen-Antikörper-Bindung.

Technologische Hürden für die Amplifikationsverfahren sind das Design der virusspezifischen Primer. Für einen spezifischen NAT ist es erforderlich, dass einzig die Gensequenz des zu detektierenden Virus amplifiziert werden kann. Um diese Gensequenzen zu bestimmen kommen umfangreiche Berechnungsprogramme zum Einsatz, welche auf riesige

Genomdatenbanken zurückgreifen, die bereits entschlüsselte Sequenzen beinhalten. Durch Mutation von Viren kann die Genauigkeit von NATs sinken. Für die Entwicklung der Teststreifen muss die Herstellung der Antikörper, bzw. Antigene möglich sein und Verfahren für das Labeln mit Farbstoffen beziehungsweise für die Immobilisierung auf den Teststreifen vorliegen. Beide Tests greifen auf Pufferlösungen zurück und sind dadurch ähnlich lange haltbar (ca. 2 Monate).

### 2.1.1 Polymerase Kettenreaktion

Seit der Entdeckung der PCR in den Achtzigerjahren [41] spielt sie eine zentrale Rolle in der molekularbiologischen Forschung und hat sich in den letzten Jahren zum Gold-Standard in der Labordiagnostik entwickelt [42]. Bei der PCR sind für jeden der drei Einzelschritte eines Amplifizierungsdurchgangs unterschiedliche Temperaturen notwendig [43]. Im ersten Schritt wird die cDNA (doppelsträngig) bei 95 °C in zwei Einzelstränge aufgespalten. Für die Primeranlagerung wird die Probe auf 40 °C gekühlt. Die eigentliche Amplifizierung durch die Polymerase findet im dritten Schritt bei ca. 70 °C statt. Hier wird von den angelagerten Primern ausgehend durch die Polymerase wieder eine komplementäre DNA (cDNA) hergestellt. Für jeden Amplifizierungsschritt verdoppelt sich die Anzahl der cDNA-Moleküle. Bei der PCR wird die Reaktion nach ca. zwei Stunden gestoppt. Proben, welche bis zu diesem Zeitpunkt keine Amplifikation gezeigt haben, werden als negativ interpretiert. Eine erwähnenswerte Form des Live-Monitorings ist die qPCR. Dabei werden beim Amplifizierungsschritt Fluoreszenzmarker aktiviert. Über die Zunahme der Fluoreszenz kann die Konzentrationszunahme der Amplifikate live beobachtet werden [44].



**Abbildung 2.2:** Beispielhaftes Ergebnis einer qPCR. Die Fluoreszenz der Probe wird gemessen während die Temperaturzyklen durchgeführt werden. Ab einem bestimmten Punkt überschreitet die Anzahl der aktivierten Fluoreszenzlabel einen Schwellwert. Je früher dieser Punkt einsetzt, desto höher die Viruslast in der untersuchten Probe (blau: hohe Viruslast, gelb: niedrige Viruslast).

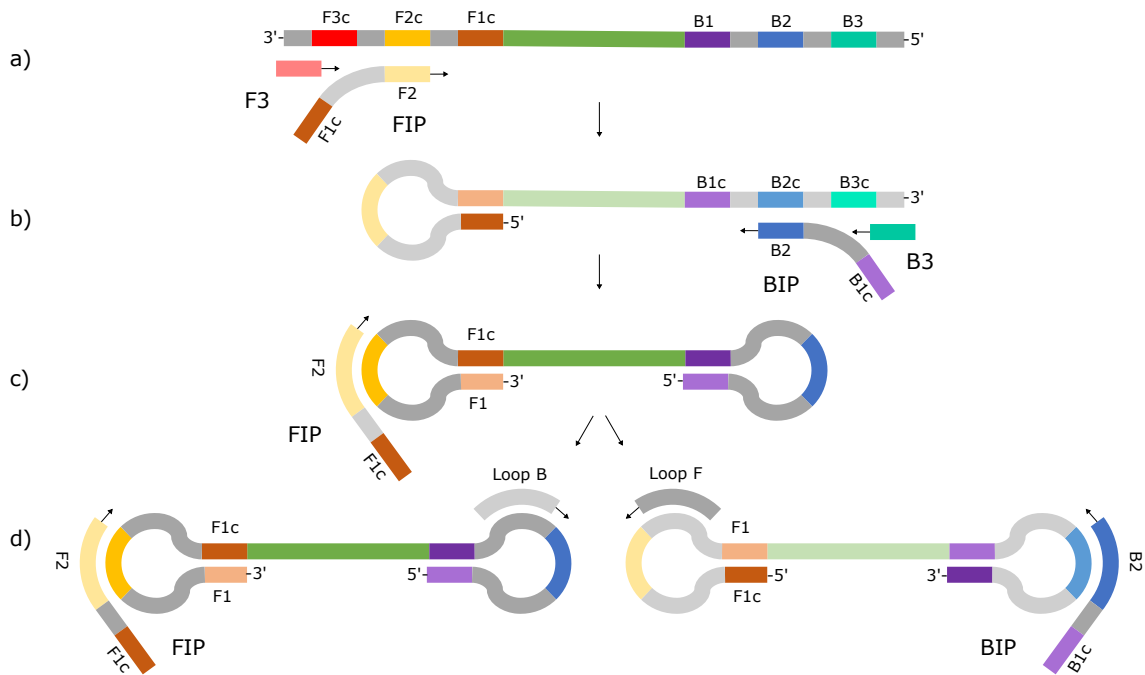
Abbildung 2.2 zeigt den typischen Verlauf einer Amplifikationsreaktion, wie sie von einem qPCR-Cycler aufgezeichnet wird. Über der steigenden Anzahl der Zyklusdurchläufe

ist das Fluoreszenzsignal aufgetragen. Eine Amplifikation gliedert sich in drei Phasen. In der Initialen Phase findet gegebenenfalls die Umwandlung der RNA in cDNA statt und die Anzahl der erzeugten Amplifikate ist noch zu gering, um eine messbare Erhöhung im Fluoreszenzsignal zu erzeugen. Spätestens mit dem Überschreiten des Threshold-Wertes befindet sich die Reaktion in der Phase der exponentiellen Zunahme. Hier verdoppelt sich die Anzahl der cDNA mit jedem Zyklus. In der dritten Phase erreicht das Fluoreszenzsignal ein Plateau. Hier findet keine Amplifikation mehr statt. Gründe dafür sind das Aufbrauchen der Desoxy-Nukleotide oder Primer, beziehungsweise die Sättigung des Puffers. Die verschiedenen Kurven stellen unterschiedliche Proben mit unterschiedlicher Ausgangskonzentration der Probe dar. Je früher die Kurve zeitlich gesehen zu steigen beginnt, desto höher ist die Konzentration der Probe. Eine quantitative Bestimmung der Ausgangskonzentration erfordert eine Kalibrierung mit bekannten Standards des zu messenden Ausgangsmaterials. Die Einsatzzeit ist dabei indirekt proportional mit dem Logarithmus der Konzentration [44]. Bleibt eine Kurve unter der Threshold-Linie wird sie als negativ bewertet. Ein weiterer Vorteil der quantitativen Methode ist außerdem, dass im Falle einer positiven Probe die Durchführungszeit mittels Endpunkterkennung reduziert werden kann.

### **2.1.2 Isothermale Schleifen-vermittelte Amplifizierung**

Ein relativ junger Vertreter der Amplifizierungsverfahren ist die LAMP-Methode [45]. Dabei handelt es sich um ein isothermales Verfahren. Die Reaktion läuft bei einer Temperatur zwischen ca. 60 und 70 °C ab. Möglich wird dies durch die Verwendung einer speziellen Modifikation der Polymerase, welche eine Strangverdrängungsaktivität besitzt. Die Notwendigkeit des Aufheizens bis zur Denaturierung entfällt. Das Primerdesign ist komplexer als bei der konventionellen PCR. Benötigt werden vier Primer, welche insgesamt sechs spezifische Sequenzen der Ziel-DNA beinhalten. Zusätzlich können zwei Loop-Primer eingesetzt werden, um die Reaktionszeit auf 30 min zu reduzieren [25]. Entwickelt wurde das Verfahren bei der Firma Eiken, Japan [46]. Abbildung 2.3 zeigt den schematischen Ablauf ohne den Einsatz von Loop-Primern. Die anvisierten Sequenzen befinden sich an der vorderen (F für front) und hinteren (B für Back) Ende der Ziel-DNA. Für beide Enden werden äußere komplementäre Einzelsequenzen gewählt (F3 und B3), sowie innere Primer (FIP und BIP), welche aus der komplementären mittleren Sequenz und der innersten Sequenz zusammengesetzt sind. Bevor die exponentielle Amplifizierung anlaufen kann, muss eine hantelförmige Start-Struktur erzeugt werden (Abbildung 2.3c). Der FIP hybridisiert an das vordere Ende der Ziel-DNA und der Rest wird komplementär synthetisiert (Abbildung 2.3a). Anschließend dockt der F3 Primer an das noch freie Ende des Ausgangsstrangs, auch hier startet anschließend die komplementäre Synthetisierung. Währenddessen sorgt die Strangverdrängungsaktivität der Polymerase dafür, dass der

im ersten Schritt erzeugte Komplementärstrang abgetrennt wird. Die äußere Sequenz des vorderen Endes ist nun komplementär zur inneren Sequenz. Durch Hybridisierung der beiden bildet sich das vordere Hantelende (Abbildung 2.3b). Analog dazu wird durch die Primer BIP und B3 das hintere Hantelende gebildet. Die Start-Struktur ist fertig (Abbildung 2.3c). Die äußeren Primer (F3 und B3) werden nun für die Amplifizierung nicht mehr benötigt. Ein innerer Primer (z.B. FIP) dockt an das betreffende Ende an. Nun laufen an dieser Struktur zwei Synthesisierungsprozesse ab. Am vorderen Ende der Hantelstruktur (1) und vom FIP ausgehend (2). Der zweite Synthesisierungsvorgang trennt das Ergebnis des ersten ab - hier kommt wieder die Strangverdrängungsaktivität der Polymerase zum Einsatz - sodass die Struktur wie in Abbildung 2.3d entsteht. Dabei handelt es sich um die komplementäre Start-Struktur, welche an einer Struktur hybridisiert wird, die eine Schleife von doppelter Länge der Start-Struktur synthetisiert. Nach Vollendung dieser Schleife liegen zwei Strukturen vor, an welche die inneren Primer (FIP und BIP) wie an die Start-Struktur andocken können. Mit Fortgang der Reaktion verdoppelt sich die Anzahl der Strukturen und gleichzeitig wächst die Schleifenlänge der Amplifikate an. Um die Synthesisierung zu beschleunigen, können Loop-Primer eingesetzt werden, welche Sequenzen aus dem Zentrum der Ziel-DNA beinhalten.



**Abbildung 2.3:** LAMP (adaptiert nach [46, 47]). Mithilfe zweier Primerpaare wird eine hantelähnliche Startstruktur (c) erzeugt. Durch die Strangverdrängungsaktivität der eingesetzten Polymerase kann der Vorgang bei isothermalen Bedingungen stattfinden. Das innere Primerpaar (FIP und BIP) hybridisiert an die Startstruktur und wird komplementär synthetisiert. Dabei entstehen länger-kettige Variationen der Startstruktur und Kopien derselben.

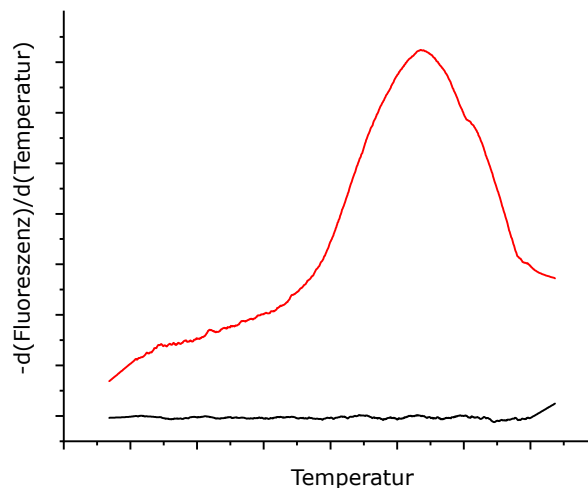
Ein während der komplementären Synthetisierung frei werdendes Proton kann für ein Live-Monitoring der Reaktion verwendet werden [48]. In schwach gepufferten Mixen kann dadurch eine Änderung des pH-Werts erreicht werden. Darauf basierend wurden kolorimetrische Mixe entwickelt, welche den Fortschritt einer LAMP-Reaktion über die Farbe eines Indikators sichtbar machen [28], welche von der Firma New England Biolabs vertrieben werden. Sie beinhalten den Farbstoff Phenolrot. Der pH-Wert des vorbereiteten Mix liegt bei ca. pH 8,5 und erscheint deshalb pinkrot. Nach erfolgreicher Amplifikation sinkt der pH-Wert auf pH 6, die Farbe wechselt zu gelb.

### 2.1.3 Schmelzkurvenanalyse

Mithilfe der Schmelzkurvenanalyse (MCA) wird das temperaturabhängige Denaturierungsverhalten der DNA untersucht. Heizt man eine Lösung von doppelsträngigen Nukleotid-Sequenzen, also beispielsweise DNA, auf, so kommt es zu einer Aufspaltung in zwei Einzelstränge (ssDNA [49]). Die Temperatur, bei der dies geschieht, ist abhängig von der Sequenz. Im Nachgang an eine qPCR wird die MCA häufig zur Analyse des Am-



plifikats eingesetzt. Während der qPCR werden Fluoreszenzfarbstoffe in die amplifizierte DNA eingebaut und aktiviert. Diese Farbstoffe schalten sich bei der Denaturierung wieder ab. Die zum Amplifikat gehörende Schmelzkurve kann somit relativ einfach bestimmt werden. Das Amplifikat verbleibt im qPCR-Cycler, die Temperatur wird in kleinen Schritten bis ca. 100 °C erhöht und das Fluoreszenzsignal gemessen [32]. Im Vergleich zu Abbildung 2.2 ergibt sich eine umgekehrte sigmoidale Kurve. Die übliche Darstellung erfolgt dann in der Auftragung der negativen ersten Ableitung des Signals, wie in Abbildung 2.4 dargestellt. Die rote Linie stellt den Verlauf einer cDNA-Probe statt, die schwarze Linie eine Kontrollprobe, ohne Amplifikat. Nahe Raumtemperatur bleibt das Fluoreszenzsignal stabil. Erst bei einer erhöhten Temperatur beginnen die Doppelstränge zu denaturieren. Die Abnahme der Fluoreszenz erreicht ein Maximum, der Punkt, der als Schmelztemperatur  $T_m$  definiert wird. Die Rate der sich aufspaltenden Doppelstränge ist hier am höchsten. Die Hälfte des vorhandenen Amplifikats ist denaturiert. Theoretisch würde sich die Fluoreszenz danach langsam dem Basiswert der Referenzmessung annähern.



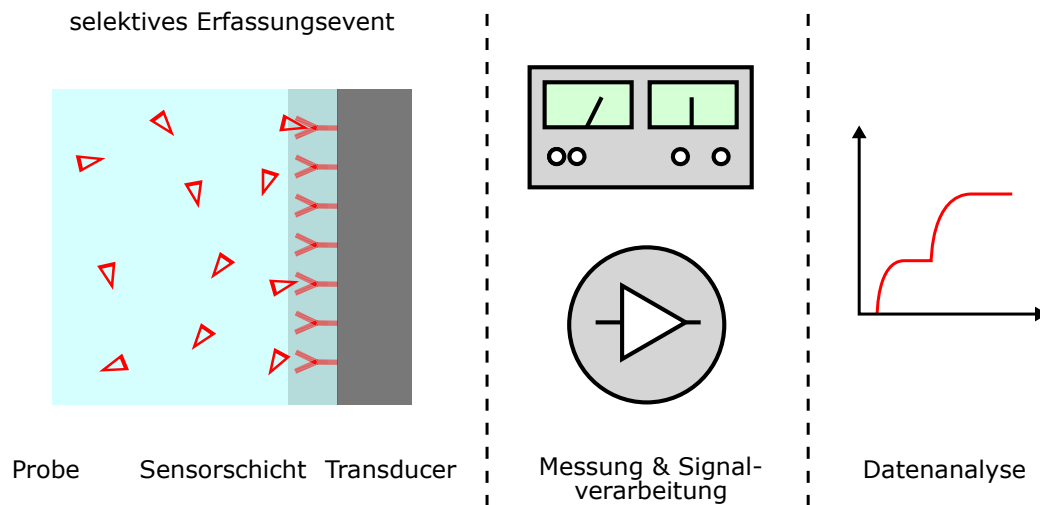
**Abbildung 2.4:** Exemplarischer Datenverlauf der MCA einer DNA-Probe (rot) und von reinem Wasser (schwarz). Aufgetragen ist die negative erste Ableitung des Fluoreszenzsignals nach der Temperatur. Das Maximum der Kurve markiert die charakteristische Schmelztemperatur der untersuchten DNA.

Es existieren eine Reihe von Modellen, mithilfe derer sich  $T_m$  ausgehend von der Gensequenz berechnen lässt [50]. Die Selektivität ist dabei eingeschränkt. Zwar hängt  $T_m$  vom GC-AT-Verhältnis, der Länge und der Sequenz ab, jedoch liegen die Schmelztemperaturen nah beieinander und in der Praxis liegt die Temperaturauflösung selten unter 0.25 °C. Beim Nachweis von Mutationen ist die Methode jedoch äußerst zuverlässig [51]. Gerade bei der Verwendung von qPCR ist die MCA eine schnelle Analysemethode, um das Amplifikat zu charakterisieren [52, 53]. Die Probe verbleibt im Gerät. Im Vergleich zur Gelelektrophorese spart man sich Zeit und vermeidet Verunreinigungen, da ein Handling

der Probe nicht notwendig ist. Im Vergleich zum Einsatz von kolorimetrischen Puffern oder Salzen, die nach der Amplifizierung ausfallen, ist der zeitliche Aufwand größer. Dafür bekommt man zusätzliche Informationen über die ungefähre sequentielle Struktur des Amplifikats.

## **2.2 Biosensoren**

Ein Sensor ist ein Gerät, welches einen Impuls registriert und darauf mit einem elektrischen Signal reagiert [54, S. 2]. Wie gut ein Sensor dabei arbeitet, lässt sich anhand zahlreicher Merkmale charakterisieren, die von der Genauigkeit über die Wiederholbarkeit bis hin zur Verlässlichkeit reichen. Nicht ohne Grund heißt es, „wir kennen viele Sensoreffekte, aber wenig Sensoren“ oder „alle Sensoren sind zuerst einmal Temperatursensoren“ [55]. Für einen Biosensor gelten dabei die gleichen Kriterien, insbesondere aber die Selektivität. Sie ist ein Maß für die Abwesenheit von Interferenzen. Ein Biosensor für die Virusdiagnostik weist demnach eine hohe Selektivität auf, wenn er nur für einen bestimmten Virus ein Signal ausgibt und auf andere Viren nicht reagiert. Biosensoren sind meist nach demselben Prinzip aufgebaut (siehe Abbildung 2.5 nach [56]). Im Mittelpunkt steht das selektive Erfassungsevent. Das Biomolekül, welches nachgewiesen werden soll, wird in irgendeiner Art und Weise spezifisch erfasst. Das Erfassungsevent kann die Bindung eines zu bestimmenden Antigens an einen Antikörper sein oder die Hybridisierung eines Primers an eine zu amplifizierende Gensequenz. Tritt das Event auf, wird es durch den Transducer in ein physikalisches Signal übertragen. Nicht in jedem Fall besitzt der Transducer eine funktionale Sensorschicht. In jedem Fall jedoch ist die Übertragungsfähigkeit des Transducers lokal begrenzt. Ein Fluoreszenzmikroskop ist beispielsweise ein Transducer, der die Präsenz eines aktivierten Fluorophors in ein (elektrisches) Bildsignal übersetzt. Eine Quartzkristall-Mikrowaage (QCM) übersetzt die Massenänderung auf seiner Oberfläche in eine Frequenzänderung seiner Eigenschwingung. Im nächsten Schritt wird dieses physikalische Signal gemessen und verarbeitet (verstärkt oder gefiltert). Im Beispiel des Fluoreszenzmikroskops kommt eine Kamera zum Einsatz, die das vom Fluorophor emittierte Licht einfängt. Der QCM wird durch eine Ansteuerung angeregt und die Eigenfrequenz mithilfe eines Frequenzzählers bestimmt. Eine Datenanalyse ist für die Bewertung des Signals wichtig. Hier findet möglicherweise die Anwendung einer Kalibrierfunktion statt. Im Beispiel des Fluoreszenzmikroskops wird die Intensität des eingefangenen Lichtes berechnet und mit Messwerten bekannter Proben verglichen. Bei der QCM-Messung liegt ein linearer Zusammenhang zwischen der Frequenzänderung und der Massenänderung vor. Störeinflüsse müssen eventuell durch Integration der Messwerte herausgefiltert werden.



**Abbildung 2.5:** Allgemeines Schema von Biosensoren (adaptiert nach [56]). Das selektive Erfassungsevent wird mithilfe einer Sensorschicht von einem Transducer in ein elektrisch messbares Signal umgewandelt. Die Signalverarbeitung erzeugt daraus eine Datenlage, die interpretiert werden kann.

Eine Klassifizierung von Biosensoren fällt aufgrund der Fülle der möglichen Anwendungsfelder schwer. Beschränkt man sich auf den Bereich der Virusdiagnostik, werden hauptsächlich elektrochemische, optische, kalorimetrische und gravimetrische Transducer verwendet [57]. Zu den elektrochemischen Transducern gehören amperometrische Elektroden. Diese 3-Elektroden-Systeme (Arbeitselektrode, Gegenelektrode und Bezugselektrode) erlauben die Durchführung einer Vielzahl von elektrochemischen Techniken, wie beispielsweise Zyklovoltammetrie. Daneben gibt es impedimetrische und konduktimetrische Elektroden. Diese 2-Elektroden-Systeme werden häufig in interdigitaler Form als zwei ineinandergreifende Kamm-Strukturen realisiert. Sie messen entweder die Impedanz oder die Leitfähigkeit. Potentiometrische Elektroden nehmen Spannungen zwischen zwei Bezugspunkten auf. Zu ihnen zählen auch ionensensitive Feldeffekttransistoren. Sie erleichtern die Messung der extrem hochohmigen Potentialunterschiede. Zu den optischen Sensoren zählen Transducer, die Änderungen im Brechungsindex oder der Schichtdicke messen, sowie auch Lichtsensoren. Beispiele für erstgenannte sind Oberflächenplasmonenresonanzsensoren (SPR) oder faseroptische Sensoren wie in der Evaneszentwellen-Sensorik. Lichtsensoren detektieren Lichtabsorption oder -emission (beispielsweise unter Verwendung von Indikator- oder Fluoreszenzfarbstoffen). Kalorimetrische Sensoren detektieren Änderungen in der Wärmeleitung, indem Temperatursensoren die Abwärme eines nahegelegenen Heizelementes aufzeichnen. Der Grad der Abkühlung ist dabei stark masseabhängig. Kleinste Masseänderungen durch Adsorption werden mit gravimetrischen Transducern, wie QCM, Akustischen-Oberflächenwellen-Sensoren (SAW) oder Cantilevern detektiert. Bei den relevanten biochemischen Methoden LAMP und

MCA geht es um den Nachweis der Amplifikation beziehungsweise Denaturierung der Nukleinsäuren. Für die LAMP-Methode unterscheiden Bechterer und andere nach homogenen und heterogenen Nachweismethoden, sowie den Einsatz von Partikeln für den Nachweis [58]. Betrachtet wird zum einen der Zustand der Elemente, welche durch den Transducer detektiert werden. Befinden sich die Elemente in Lösung, handelt es sich um eine homogene Methode, sind sie auf einer Oberfläche gebunden bzw. immobilisiert, so handelt es sich um eine heterogene Methode. Zum anderen geht es um den Nachweis an sich. Detektiert der Transducer die Nukleinsäure direkt oder werden die Nukleinsäuren markiert und die Marker detektiert. Tabelle 2.1 listet Beispiele für die verschiedenen Arten von LAMP-Nachweismethoden auf.

**Tabelle 2.1:** Beispiele für LAMP-Nachweismethoden nach [58].

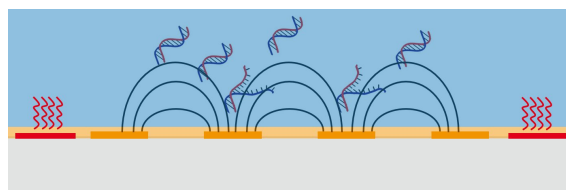
	Homogen	Heterogen
<b>Partikel-frei</b>	Fluorophor im inneren Primer	Biotin-Label an innerem Primer, Avidin an Transducer
<b>Partikel-basiert</b>	Komplementärstrang immobilisiert an Nanopartikel	Komplementärstrang immobilisiert an Transduceroberfläche

Ein Partikel-freier homogener Ansatz ist beispielsweise die Verwendung von inneren Primern, (FIP und BIP) in die ein inaktives Fluorophor eingebaut ist, welches durch Hybridisierung aktiviert wird. Durch die fortschreitende Amplifizierung steigt die Anzahl der eingebauten inneren Primer und dadurch die Anzahl der aktiven Fluorophore. Die Intensität des fluoreszierenden Lichts ist damit ein Maß für den Fortschritt der Amplifikation [59]. Ein Partikel-freier heterogener Ansatz wäre der Einsatz von Primern in welche ein Biotin-Label eingebaut ist. Nach Ablauf der LAMP liegen dadurch Amplifikate mit Biotin-Markern vor. Werden diese über einen mit Avidin beschichteten QCM-Transducer gegeben und anschließend gespült, kann der Massenzuwachs durch die Avidin-Biotin-Bindung gemessen werden [60]. Partikel-basierte Methoden nutzen die Hybridisierung der Ziel-DNA an einen komplementären Einzelstrang. Der Nachweis findet dann entweder über eine Charakterisierung der funktionalisierten Oberflächen (z.B. über enzymatische Zyklovoltammetrie [61]) oder der funktionalisierten gelösten Nanopartikel (z.B. über Ramanspektroskopie [62]) statt. Partikel-basierte Methoden greifen nach dieser Klassifizierung auf Rezeptormoleküle zurück, um die Ziel-DNA zu detektieren. Nicht in der Klassifizierung inbegriffen ist die Unterscheidung bezüglich der Verwendung von Marker-molekülen, wie beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffen. Heterogene Ansätze setzen dabei

größtenteils ein mehrstufiges Verfahren ein, bei dem die funktionalisierte Oberfläche gespült werden muss, wodurch eine Immobilisierung notwendig wird.

### 2.2.1 Transducer für den markierungsfreien Ansatz

Eine Fokussierung auf einen Label-freien Ansatz in Lösung, wie sie in dieser Arbeit vollzogen wird, fügt sich nach der Klassifizierung von Becherer (siehe Tabelle 2.1) in den Bereich der Partikel-freien homogenen Methoden ein. Darüber hinaus verzichtet er auf den Einsatz von Markermolekülen. Um diesem Ansatz gerecht zu werden, müssen physikalische Effekte genutzt werden, die bereits in der Natur der Amplifizierung und Denaturierung vorhanden sind. Zum einen wurde ausgehend von den Ergebnissen von Lee [63] und Ma [64] die Impedanzabhängigkeit von Nukleinsäuren in Bezug auf deren Länge, Konzentration und Strangkonfiguration in Betracht gezogen, zum anderen die Erzeugung von Protonen während der Amplifikation [28, 48]. Als Transducer wurden Interdigitalkondensatoren (IDK) für die Messung der Impedanz gewählt. Diese werden in einer Metallebene (Gold) auf Glassubstraten realisiert. Dabei können Widerstandsstrukturen für Heizung und Temperaturmessung einfach integriert werden. In der Literatur finden potentiometrische Sensoren zur Messung der pH-Änderung bei LAMP-Reaktionen eine höhere Aufmerksamkeit [65–70]. Somit wurde als Alternative der Einsatz eines ISFETs untersucht. Für das selektive Erkennungsevent wurde die LAMP-Reaktion ausgewählt. Einerseits verspricht sie eine hohe Sensitivität, andererseits benötigt die Reaktion nichts weiter als das Aufheizen der Lösung auf eine konstante Temperatur. Die hohe Falsch-Positiv-Rate der LAMP-Reaktion (siehe Kapitel 2.1.2) stellt allerdings ein Risiko dar. Um die Validität dennoch auf ein hohes Niveau zu bringen, wurde im Rahmen der Arbeit der Einsatz der Schmelzkurvenanalyse als Erkennungsmethode der Falsch-Positiv-Amplifikate untersucht. Dafür kamen die IDKs zum Einsatz.



**Abbildung 2.6:** Sensorprinzip für den Ansatz mit Interdigitalkondensatoren als Transducer. Auf dem Sensorsubstrat befinden sich Fingerelektroden. Deren Kapazität wird von den dielektrischen Eigenschaften der DNA-Lösung bestimmt. Zusätzlich beinhaltet der Sensor einen Temperaturwiderstand und einen Heizmäander zur geregelten Temperierung der DNA-Lösung.

Tabelle 2.2 listet die Komponenten für beide Ansätze gemäß dem Biosensorschema aus Abbildung 2.5 auf, welche hier zusammenfassend noch einmal erläutert werden

sollen. Gegenstand der Untersuchung ist ein zweistufiger Analyseprozess aus LAMP und MCA. Der Prozess benötigt keine vorangehende Immobilisierung von Rezeptoren auf der Sensoroberfläche sowie keine Zugabe von Markierungspartikeln. Der LAMP-Schritt dient dem Nachweis von spezifischer Virus-RNA und der Quantifizierung derselben. Der MCA-Schritt dient der Erhöhung der Validität der LAMP-Reaktion. Untersucht werden der Einsatz eines pH-Sensors (Ionensensitiver Feldeffekttransistor (ISFET)) für die LAMP-Reaktion und eines IDKs für die LAMP-Reaktion und die MCA.

**Tabelle 2.2:** Biosensor Ansätze für die Virendiagnostik.

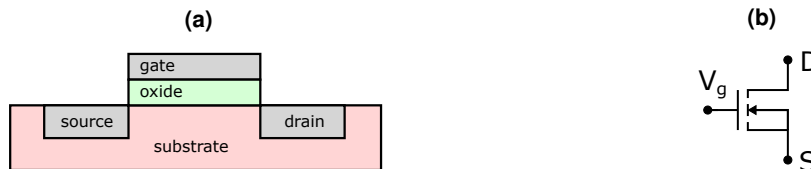
	LAMP auf ISFET	LAMP auf IDK	MCA auf IDK
selektives Erkennungsereignis	Amplifizierung durch spezifische Primer		charakteristische $T_m$
Sensorschicht	pH-Änderung durch Reaktion	Änderung der Dielektrizitätszahl	
Transducer	ISFET	IDK	
Messung	Eingangskennlinie	Messung C	
Signalverarbeitung	Zeitpunkt der Kennlinienverschiebung	Zeitpunkt der C-Änderung	Maximum der C-Änderung
Datenanalyse	Quantifizierung durch Kalibrierung mit bekannter Viruskonzentration	Identifizierung Falsch-Positiver durch niedrigere $T_m$	

Die Sample-to-answer-Abfolgen für die drei untersuchten Prozesse können wie folgt zusammengefasst werden: Für die LAMP-Reaktion auf ISFETs gilt: Eine Abstrichprobe wird in einen LAMP-Mix mit spezifischen Primern eingetaucht. Die vorhandene Virus-RNA wird amplifiziert, dabei tritt eine pH-Änderung des Puffers auf. Die Eingangskennlinie des ISFETs verschiebt sich. Der Zeitpunkt der Verschiebung gibt durch den Vergleich mit Messungen aus bekannten Viruskonzentrationen Informationen über die Konzentration des Virus in der Probe. Für die LAMP-Reaktion auf IDKs gilt analog: Die vorhandene Virus-RNA wird amplifiziert, dabei tritt eine Änderung in der Dielektrizitätszahl der Probenlösung auf. Die Kapazität des IDKs ändert sich. Der Zeitpunkt der Kapazitätsänderung gibt durch den Vergleich mit Messungen aus bekannten Viruskonzentrationen Informationen über die Konzentration des Virus in der Probe. Für den zweiten Schritt der MCA auf IDKs gilt: Das Amplifikat wird erhitzt, bei einer charakteristischen Temperatur findet eine Denaturierung der enthaltenen cDNA statt. Die Kapazität des IDKs ändert sich. Die Temperatur, bei der die Kapazitätsänderung ihr Maximum erreicht, ist die charakteristische Schmelztemperatur  $T_m$ . Sie wird mit der zu erwartenden theoretischen  $T_m$  der Virusamplifikate verglichen. Liegt sie darunter, handelt es sich um eine Falsch-Positiv-

Probe. Es war keine Virus-RNA enthalten, stattdessen fand eine Selbstamplifizierung von Primern statt.

### 2.2.2 Ionen-Sensitiver Feldeffekt-Transistor

Der ionensensitive Feldeffekttransistor ISFET kann inzwischen auf eine 50-jährige Entwicklungsgeschichte zurückblicken. 1972 erschien der erste Artikel in einer Fachzeitschrift von Peter Bergveld [71]. Die Idee dabei war, den Transistor als Impedanzwandler für hochohmige Spannungssignale in der Medizintechnik zu verwenden. Die ersten Versuche machte Bergveld mit einem Metal Oxide Semiconductor Field-Effect Transistor (MOSFET), der nicht zu Ende prozessiert worden war und über kein Gate verfügte [72]. Im Folgenden soll die Entwicklung des ISFETs anhand der im Laufe der Jahre entwickelten ISFET-Varianten vorgestellt werden. In Kapitel 3.1.2 wird der Floating-Gate ISFET (FG-ISFET), welcher in dieser Arbeit entwickelt wurde, ausgehend von diesen Varianten eingeführt.

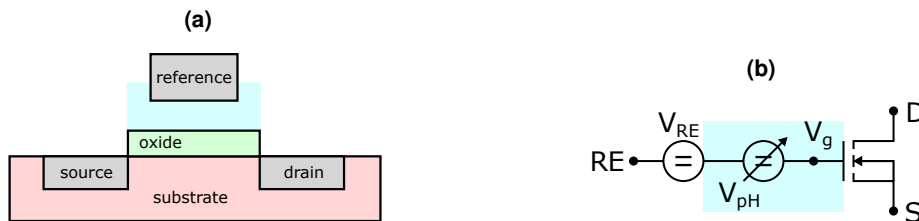


**Abbildung 2.7:** MOSFET, ein Feldeffekttransistor mit einem Schichtaufbau aus Metall, Oxid und Halbleiter. Zwischen den dotierten Gebieten von Source und Drain bildet sich ein Leitungskanal aus. Der Widerstand in diesem Kanal folgt aus der Konzentration der vorhandenen Ladungsträger, die über das Potential am Gate eingestellt werden kann.

Abbildung 2.7 zeigt den schematischen Aufbau und das Schaltbild eines MOSFETs. N-Kanal und P-Kanal MOSFETs gehören zu den Grundbausteine der Mikroelektronik, weshalb man von CMOS-Technologie (complementary MOS) spricht. Wir betrachten als Beispiel einen N-Kanal MOSFET. Das Substrat besteht aus leicht p-dotiertem Silizium mit zwei hochdotierten (n++) Gebieten (Source und Drain). Im Kanal zwischen Source und Drain ist durch die beiden entgegengesetzten Diodenübergänge zum Substrat kein Stromfluss möglich. Über dem Kanal befindet sich das Gate, welches aus Metall oder Polysilizium besteht und auf einer Isolatorschicht (häufig Siliziumdioxid) liegt [73]. Durch Anlegen eines positiven Potentials am Gate bildet sich im Kanal eine Inversionslage mit negativen, beweglichen Ladungsträgern aus, welche Source und Drain verbindet und einen Stromfluss erlaubt. Der Drainstrom im linearen Bereich (vergleiche Beginn des Graphs in Abbildung 2.11b) kann durch folgende Gleichung beschrieben werden [73]:

$$I_d = \mu \frac{W}{L} \frac{\epsilon_{\text{ox}}}{d_{\text{ox}}} \left( (V_g - V_{\text{th}}) V_{\text{ds}} - \frac{V_{\text{ds}}^2}{2} \right) \quad (2.1)$$

wobei  $W$  und  $L$  die Weite und Länge des Gates sind,  $\epsilon_{\text{ox}}$  und  $d_{\text{ox}}$  die Permittivität und die Dicke des Gate-Oxids und  $\mu$  die Ladungsträgerbeweglichkeit im Inversionskanal. Neben der Source-Drain-Spannung  $V_{\text{ds}}$  hängt der Drainstrom maßgeblich von der Spannung am Gate  $V_{\text{g}}$  ab. Ein MOSFET kann demnach als elektrischer Schalter verwendet werden. Liegt die Spannung am Gate jenseits eines bestimmten Schwellwerts  $V_{\text{th}}$ , ist der Schalter an, liegt sie darunter, ist er aus. Im Schaltbild (Abbildung 2.7b) sind die drei Terminals des Bauteils, Source (S), Drain (D) und Gate (G) zu sehen.



**Abbildung 2.8:** Bei einem ISFET fehlt das Metallgate und ist durch eine Flüssigkeit ersetzt, in die eine Referenzelektrode eingetaucht ist. Die gedachte Gatespannung  $V_{\text{G}}$  folgt aus der Spannung an der Referenzelektrode und einer pH-Spannung  $V_{\text{pH}}$ , welche sich durch die Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht bildet.

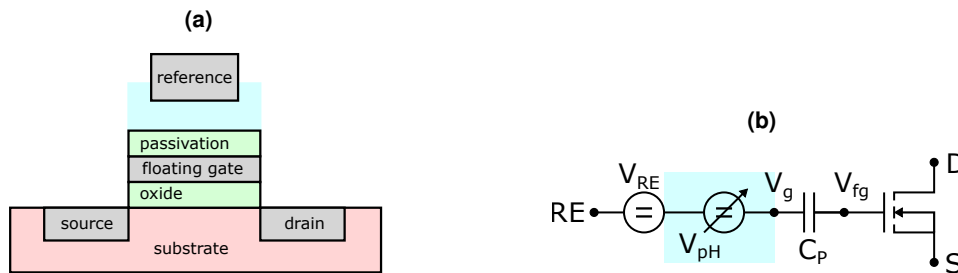
Lässt man das Gate weg und ersetzt es durch eine Flüssigkeit, in die eine Referenzelektrode eingetaucht ist, erhält man einen ISFET (Abbildung 2.8). An der Oberfläche des Isolators bildet sich eine elektrochemische Doppelschicht aus, welche nach dem Stern-Modell aus Helmholtz-Schicht und Gouy-Chapman-Schicht besteht [74]. Im Gouy-Chapman-Modell hängt die Kapazität der Schicht vom pH-Wert ab, sodass die Schwellspannung für den ISFET aus einer kapazitiven Kopplung aus der elektrochemischen Doppelschicht und der Charakteristik des MOSFETs entsteht [75]. Vereinfacht kann eine zusätzliche veränderliche pH-Spannung  $V_{\text{pH}}$  angenommen werden.

$$V_{\text{th}(\text{ISFET})} = V_{\text{th}(\text{MOSFET})} + \gamma + \underbrace{\alpha S_{\text{N}} \text{pH}}_{V_{\text{pH}}} \quad (2.2)$$

wobei  $\gamma$  eine chemische Konstante ist.  $S_{\text{N}}$  bezeichnet die ideale pH-Sensitivität einer pH-Elektrode abgeleitet aus der Nernst-Gleichung. Diese ist 59 mV/pH in Raumtemperatur. Aufgrund der begrenzten Oberflächenpufferkapazität des Gate-Isolators wird dieser Wert für die meisten Materialien nicht erreicht [76]. Daher gilt  $\alpha \leq 1$ . ISFETs, welche industriell in CMOS-Prozessen gefertigt werden, verwenden häufig  $\text{Si}_3\text{N}_4$  als Sensormaterial [70, 77]. Wo hingegen eine hohe Sensitivität wünschenswert ist, hat sich  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  als bestes Material für die abschließende Schicht auf dem Gate-Isolator herausgestellt [66, 78, 79]. Der Grund dafür liegt in der hohen Oberflächenpufferkapazität, welches auch dazu dient, die Querempfindlichkeit zur Leitfähigkeit signifikant zu reduzieren [74, 80]. Um die kleine Baugröße des ISFETs im Vergleich zu einer kombinierten Glaselektrode



auszunutzen, werden auch für die Referenzelektrode integrierte Lösungen entwickelt. Dabei kommen noble Metalle [69, 81] zum Einsatz, aber auch miniaturisierte Ag/AgCl-Elektroden [82–84]. Ebenso wurden Lösungen vorgestellt, die auf den Einsatz einer Referenzelektrode verzichten [70]. Dabei kommt ein zweiter ISFET zum Einsatz, der in einer Referenzlösung verweilt. Eine Vorab-Charakterisierung des Driftverhaltens ist für diese Messung jedoch unabdingbar.



**Abbildung 2.9:** Mittels Standard-CMOS-Prozesse kann ein Extended-Gate Feldeffekttransistor (EGFET) hergestellt werden [75]. Es handelt sich um einen MOSFET mit einem floatenden Gate, welches mit einer Passivierung abgedeckt ist. Die Dämpfung des Sensorsignals durch den kapazitiven Spannungsteiler aus  $C_P$  und der Kapazität des MOSFETs ist zu beachten.

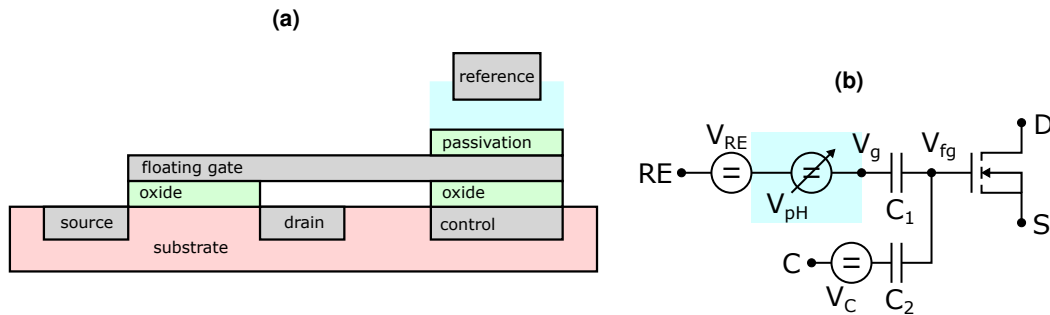
Wenn neben dem ISFET zusätzliche elektronische Bauteile auf einem Sensorchip integriert werden sollen und der CMOS-Prozess nicht angepasst werden kann, muss ein ISFET in der dargestellten EGFET Konfiguration gefertigt werden [75]. Dabei wird ein MOSFET in konventioneller Technologie gefertigt und eine Passivierung auf das Gate-Metall aufgebracht, die dann zur Flüssigkeit hin offen liegt. Das Gate des MOSFETs bleibt floatend. Dieser Aufbau bringt den Vorteil mit sich, dass Sensorelektrode und MOSFET örtlich getrennt werden können und somit weniger von den umgebenden Lichteinflüssen abhängen [85]. Andererseits wird durch die Einführung von  $C_P$  (siehe Abbildung 2.9b) die Sensitivität um einen Faktor [75]

$$\beta = \frac{C_P}{C_P + (C_{ox}C_d)/(C_{ox} + C_d)} \quad (2.3)$$

gedämpft, wobei  $C_{ox}$  und  $C_d$  die Kapazitäten der Oxidschicht und der Verarmungszone widerspiegeln. Hinzu kommt eine hohe Variation der Einsatzspannung aufgrund von prozess-technisch nicht definierten Ladungsträgern im Gate-Oxid und auf dem Floating-Gate selbst [86].

Um dieses Problem zu beheben, wurde am Imperial College London der Programmable-Gate Ionensensitiver Feldeffekttransistor (PG-ISFET) vorgestellt, welcher eine zusätzliche Elektrode unter dem Extended-Floating-Gate besitzt [87]. Durch Anlegen einer spezifischen Hilfsspannung können Verschiebungen in der Einsatzspannung kompensiert

werden. Dies macht den PG-ISFET vor allem für Anwendungen interessant, in denen Arrays von ISFETs eingesetzt werden [88]. Eine Alternative dazu stellen Lösungen dar, in denen - ähnlich wie beim EEPROM - Ladungen über Tunnelkontakte auf das Floating-Gate induziert werden können [89].



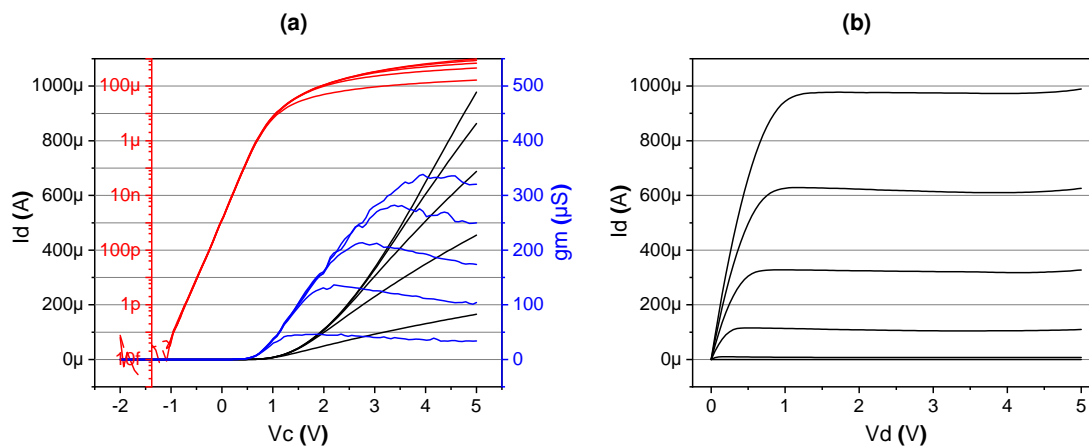
**Abbildung 2.10:** Der PG-ISFET zeichnet sich durch eine zusätzliche Hilfselektrode aus, welche unterhalb des floatenden Gates positioniert ist. Unterschiede in PG-ISFET-Arrays, die durch eine unkontrollierbare Beladung des floatenden Gates zustande kommen, können damit kompensiert werden.

Ein Vorteil bei Einsatz eines Floating Gate ist die Möglichkeit, die beiden Kondensatoren zur Signalverstärkung zu benutzen [90, 91]. Ein PG-ISFET mit  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Passivierung erreichte dadurch eine Sensitivität von  $113 \text{ mV/pH}$  [77]. Dafür wurden die Kapazitätswerte von  $C_1$  und  $C_2$  (in Abbildung 2.10b) so eingestellt, dass eine etwa zweifache Verstärkung der Spannungsänderung erreicht wurde. Eine Weiterentwicklung des PG-ISFETs stellt der FG-ISFET dar, welcher für die vorliegende Arbeit entwickelt wurde. Dieser wird in Kapitel 3.1.2 vorgestellt.

### 2.2.2.1 Charakterisierung und Messung

Bei diesem FG-ISFET ist das Floating-Gate kapazitiv an zwei Elektroden gekoppelt: Die Referenzelektrode in der Flüssigkeit und die Control-Elektrode unter dem Floating-Gate. In der Regel wurden die Messungen an den Bauteilen bei festem Potential an der Referenzelektrode durchgeführt. Abbildung 2.11 zeigt eine Messung der Ein- und Ausgangscharakteristik eines FG-ISFETs. Die Spannung an der Referenzelektrode  $V_{\text{ref}}$  wurde so gewählt, dass die Einsatzspannung  $V_{\text{th}}$  bei etwa  $900 \text{ mV}$  liegt. Dies entspricht dem Wert, der für den verwendeten n-Kanal MOSFET ausgehend von der durchgeführten Implantationsdosis erwartet wurde. Für eine Messung des Eingangskennlinienfeldes (Abbildung 2.11a) wurde an den Source Anschluss Massepotential angelegt, an Drain wurden diskrete Spannungswerte  $V_{\text{d}}$  von  $0.1, 0.3, 0.5, 0.7$  und  $0.9 \text{ V}$  angelegt. Die Spannung an der Control-Elektrode  $V_{\text{c}}$  wurde von  $-2$  bis  $5 \text{ V}$  gefahren und dabei der Strom durch den Leitungskanal  $I_{\text{d}}$  gemessen. Aufgetragen sind die Stromwerte bei den verschiedenen Drainspannungen

$V_d$  in linearer (schwarz) und logarithmischer (rot) Darstellung und die Transkonduktanz  $g_m$ , die erste Ableitung von  $I_d$  nach  $V_c$ . Für steigende  $V_d$  nimmt auch die Transkonduktanz, also die Steigung von  $I_d$  zu, sodass auf eine Beschriftung der Datenlinien verzichtet wurde. Das Ausgangskennlinienfeld (Abbildung 2.11b) zeigt den Verlauf des Drainstroms  $I_d$  bei Variation der Drainspannung  $I_d$  für verschiedene Spannungen an der Control-Elektrode  $V_c$  0, 1, 2, 3, 4 und 5 V. Hier wird ebenfalls auf eine Beschriftung der Datenlinien verzichtet. Charakteristisch ist der ohmsche Bereich zu Beginn der Messung ( $0 \leq V_d \leq 0.5$  V) und der anschließende Sättigungsbereich.



**Abbildung 2.11:** Dargestellt sind Kennlinienfelder, die für die Charakterisierung der FG-ISFETs bei einer festen Referenzspannung aufgezeichnet werden. Das Eingangskennlinienfeld (a) zeigt den Drainstrom gegen die Controlspannung für verschiedene Drainspannungen (aufsteigend). Das Ausgangskennlinienfeld (b) zeigt den Drainstrom gegen die Drainspannung bei verschiedenen Controlspannungen. Der lineare Bereich bei  $V_d \leq 0.5$  V wird durch Gleichung 2.1 beschrieben.

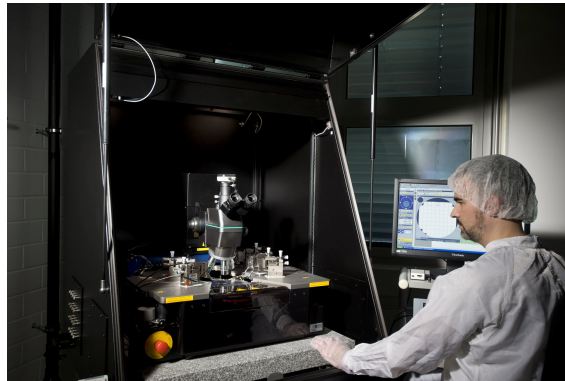
Etwaige Leckströme im Leitungskanal können schnell erkannt werden, wie sie im Beispiel etwa ab 4.5 V auftreten. Im Sperrzustand ( $V_c = 0$  V) fließt über den ganzen Messbereich folgerichtig kein Strom. Wichtige Kennwerte, die aus der Eingangskennlinie (Abbildung 2.11a) abgelesen werden können, sind die maximale Transkonduktanz  $g_{\max}$ , die Einsatzspannung  $V_{\text{th}}$  und der Sperrstrom  $I_{\text{off}}$ .  $g_{\max}$  ist das Maximum der Transkonduktanz,  $V_{\text{th}}$  die Spannung, bei dem Strom zu fließen beginnt und  $I_{\text{off}}$  der kleinste gemessene Strom im geschlossenen Zustand. Im Beispiel aus Abbildung 2.11a sind die Werte:

**Tabelle 2.3:** Charakteristische Werte aus den MOSFET Kennlinienfeldern.

$g_{\max}$	Maximale Transkonduktanz	680 $\mu\text{S}$ bei $V_d = 900$ mV
$V_{\text{th}}$	Einsatzspannung	950 mV
$I_{\text{off}}$	Sperrstrom	< 100 fA

Beide Messungen wurden für die Charakterisierung der verwendeten FG-ISFETs aufgenommen. Darüber hinaus wurden zeitlich abhängige Messungen durchgeführt, bei denen ein Arbeitspunkt ( $V_{\text{ref}}$ ,  $V_d$ ,  $V_c$  und  $I_d$ ) gewählt wurde und die zeitliche Änderung einer Variablen aufgezeichnet wurde ( $V_c$  oder  $I_d$ ).

**Waferlevel** Für die Messungen kam ein Waferprober PA-200 der Firma Cascade Microtech mit einem Agilent B1500A Parameter Analyzer [92] zum Einsatz. Der Waferprober verfügt über einen heizbaren Chuck, der in xyz-Richtung gefahren werden kann. Der Waferprober ist erschütterungsfrei in einer Dunkelkammer aufgebaut (siehe Abbildung 2.12). Zum Kontaktieren der elektrischen Kontakte auf dem Wafer stehen 5 Probereinheiten mit Wolframnadeln zur Verfügung.



**Abbildung 2.12:** Der eingesetzte Waferprober Cascade Microtech PA-200 mit Mikroskop, fahrbarem Waferchuck und Probernadeln in einer verschließbaren Dunkelkammer (© Bernd Müller, Fraunhofer EMFT).

Der B1500A Parameter Analyzer verfügt über einzeln ansteuerbare SMUs, welche entweder Spannungssignale ausgeben und Ströme messen, oder Ströme ausgeben und Spannungssignale messen. Die Genauigkeit geht je nach Modul bis in den Femtoamperebereich. Zusätzlich steht ein Kapazitätsmessmodul zur Verfügung. Die proprietäre Messsoftware des Geräts erlaubt eine Vielzahl von Standardmessungen, darunter auch die Aufnahme von Ein- und Ausgangskennlinienfeldern. Eine zeitliche Messung ist jedoch nicht möglich.

**Labormesstechnik** Da innerhalb des Waferprobers nicht mit Flüssigkeiten hantiert werden kann, wurde ein zweiter Aufbau realisiert. Mithilfe eines HP4142B Modular DC Source Monitors [93] und einer E5250A Switch Matrix [94] wurde ein achtkanaliges Setup aufgebaut, welches Ein- und Ausgangskennlinienfelder, sowie zeitliche Messungen erlaubt. Dafür wurde auf das Open Source Framework PyMeasure [95] zurückgegriffen und

entsprechende Gerätetreiber programmiert. Wo nicht anders erwähnt, kamen als Referenzelektroden die DRIREF-Serie der Firma World Precision Instruments zum Einsatz [96]. Diese bestehen aus einem chlorierten Silberdraht in einem mit 3M KCl als Innenelektrolyt gefülltem Röhrchen, welches mit einer Glasfritte aus Corning Vycor™ verschlossen ist. Das Röhrchen besteht dabei aus TPU (DRIREF-2SH) oder PP (DRIREF-L). Die DRIREF-Serie zeichnet sich durch eine sehr geringe Ausdiffusion von Chlorid-Ionen aus. Für einige Versuche wurde auch die integrierte Referenzelektrode verwendet. Dabei handelt es sich um ein Goldpad mit 500 µm Durchmesser, welches mit einer Silber-/Silberchlorid-Paste der Firma Gwent/Sun Chemicals bedruckt wurde [97]. Verwendung fand diese Lösung bei den Experimenten mit LAMP-Reaktionen auf FG-ISFETs, bei denen die Reaktionsgefäße dicht verschlossen sein mussten, um ein Verdampfen der Reaktionsflüssigkeit zu verhindern. Erwartungsgemäß zeigten die Sensoren in diesen Experimenten ein höheres Driftverhalten, als mit kommerziellen Referenzelektroden.

**Systemintegration** Um dem POCT-Ansatz Rechnung zu tragen, wurde eine Auswertelektronik entworfen und aufgebaut, welche ebenfalls zur Charakterisierung der FG-ISFETs verwendet wurde. Diese wird im Absatz 3.2.2.1 näher beschrieben.

### 2.2.2.2 Einsatz in der Virendiagnostik

Da während der Hybridisierung Protonen frei werden, liegt die Idee nahe, pH-Sensoren als Messsonden für den Fortschritt von Amplifikationsreaktionen analog zur qPCR zu verwenden. EIS-Sensoren wurden dazu verwendet, eine LAMP-Reaktion zu monitoren [66, 98]. Der EIS-Sensor besteht analog zu einem Metall-Isolator-Halbleiter (MIS) Bauelement aus dem Elektrolyt (mit einer Referenzelektrode), einem Isolator und einem Halbleiter. Über C-V Messungen können Potentialänderungen an der Grenzfläche zwischen Elektrolyt und Isolator analog zum ISFET gemessen werden. Im Vergleich zum ISFET fehlt jedoch die Vorort-Impedanzwandlung des Spannungssignals, sodass dieser Sensor stets auf die Nutzung präziser Messinstrumente mit hoher Eingangsimpedanz, sowie auf kurze Signalwege angewiesen ist. Die Experimente zeigen, dass der Vorgang der Hybridisierung und die dabei entstehende pH-Änderung mit solchen Sensoren gemessen werden kann. Auch mit ISFETs ist das möglich. Eine Arbeitsgruppe am Imperial College in London hat dieses Prinzip der qPCR auf ISFETs bereits 2010 patentiert [99] und in einigen Anwendungen nutzbar gemacht. Mit dem entwickelten ISFET konnte gezeigt werden, dass die Erkennung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP), also Variationen in einzelnen Basenpaaren möglich ist [67]. Dazu wurden Variationen von Einzelsträngen auf den Oberflächen von ISFETs immobilisiert und die pH-Änderung während der Hybridisierung gemessen. Da sich die Kinetik für vollständig komplementäre DNA Stränge und solchen mit SNPs unterscheidet, können diese erkannt werden. Darauf aufbauend

konnten ISFET-Anordnungen entwickelt werden, welche zur Erkennung von Mutationen eingesetzt werden [70]. Die Gruppe benutzte dafür in CMOS-gefertigte ISFETs mit Sensormaterial Siliziumnitrid. Die bei diesen Sensoren auftretende Drift kompensieren die Forscher durch eine Extrapolation des Driftverhaltens aus einer initialen Charakterisierungsphase bei gleichbleibenden Bedingungen. Für diese Array-Anordnungen wurde dabei eine gemeinsame Referenzelektrode für alle ISFETs verwendet [88]. Eine Weiterentwicklung dieses Prinzips führte dann zur Einführung des Ion Torrent™ Systems zur Sequenzierung von DNA. Eine Probe wird auf ein Array aus ISFETs gegeben, auf denen je eine Variation eines Einzelstrangs immobilisiert ist. Durch aufeinanderfolgende Zugabe der vier verschiedenen Nukleinsäuren kann der Hybridisierungsvorgang erkannt werden. Die verwendeten Ion Torrent™ besitzen bis zu  $10^6$  ISFETs. Damit kommen sie dem sehr nahe, was der Erfinder des ISFETs, Piet Bergveld, anstrebte: eine chemische Kamera, mit der die Ionenaktivität um Muskel- und Nervenfasern gemessen werden kann [72]. Inzwischen wurden auch ISFET-REFET Konfigurationen mit Quasi-Referenzelektroden aus Edelmetallen als Sensoren für NATs untersucht [69].

### 2.2.3 Interdigitalelektroden

Ein zweites Sensorprinzip, welches in dieser Arbeit zur Anwendung kommt, ist ein kapazitives. In anderen Veröffentlichungen wurde bereits gezeigt, dass sich Veränderungen in der Konfiguration von Nukleinsäuren auf die Dielektrizitätszahl auswirken [63, 64]. Ein Kondensator im einfachsten Sinne besteht aus zwei parallelen leitfähigen Platten. Durch Anlegen einer Spannung  $V$  kommt es zu einer gegensätzlichen Beladung mit einer Ladung  $Q = CV$ .  $C$  ist die Kapazität, für die im Beispiel des Plattenkondensators gilt:

$$C = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{A}{d} \quad (2.4)$$

Dabei ist  $A$  die Fläche der Platten und  $d$  der Abstand zwischen ihnen,  $\epsilon_0$  ist die Dielektrizitätskonstante und  $\epsilon_r$  die spezifische Dielektrizitätszahl oder Permittivität des Materials zwischen den Platten. Tabelle 2.4 listet einige Materialien und ihre Dielektrizitätszahlen auf.

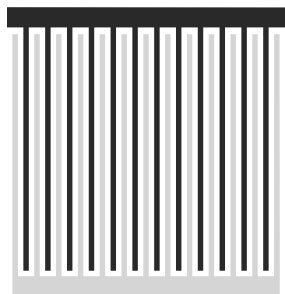
**Tabelle 2.4:** Einige Materialien und ihre Dielektrizitätszahl.

Luft	1
Wasser	80
Silizium	11.9
Borosilikatglas	4.2
1% DNA-Lösung	100 [100]

Wasser hat dabei eine sehr hohe Dielektrizitätszahl, da durch den Dipolcharakter des

Wassermoleküls zusätzlich elektrische Energie in der Polarisierung der Wassermoleküle gespeichert werden kann. Elektrolytlösungen haben gewöhnlicherweise eine niedrigere Dielektrizitätszahl, da gelöste Ionen die Wassermoleküle verdrängen. Anders ist es bei Lösungen, deren Bestandteilen stärkere Dipole als das Wassermolekül bilden können. Für DNA ist das der Fall, da sich in Lösung die Phosphatgruppen der Basenpaare abspalten und die DNA somit zweifach negativ geladen ist. Dort lagern sich Gegenionen an, welche sich im elektrischen Feld entlang der DNA-Struktur verschieben. Die induzierten Partialladungen sind stärker als bei Wassermolekülen [101, 102]. Noch größer wird der Effekt für denaturierte DNA, da sich die intrinsischen Dipolmomente in der Doppelhelixstruktur aufheben, im Einzelstrang jedoch nicht.

Für diese Arbeit wurden interdigitale Kondensatoren verwendet, welche aus zwei ineinander greifenden Kammstrukturen bestehen (Abbildung 2.13).



**Abbildung 2.13:** Der Interdigitalkondensator besteht aus zwei ineinander greifenden Kammstrukturen (hellgrau und dunkelgrau), wie hier schematisch dargestellt. Die Kammstrukturen werden aus einer Metallebene auf einem Wafersubstrat mittels lithografischer Ätzverfahren hergestellt.

Zur Berechnung der Kapazität eines Interdigitalkondensators kann eine Einheitszelle (siehe Abbildung 2.14) angenommen werden und die Gesamtkapazität aus der 2D-Kapazität der Einheitszelle abgeleitet werden nach [103]

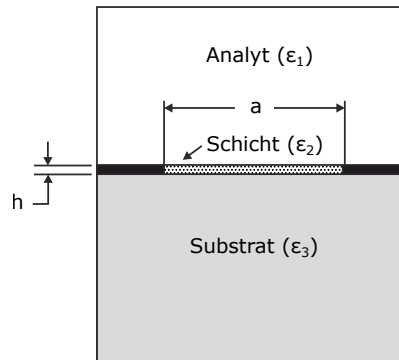
$$C = C_{2D}(N - 1)L \quad (2.5)$$

für einen Interdigitalkondensator mit  $N$  Fingern an einer Kammstruktur der Länge  $L$ . Dabei wird für die Berechnung der 2D-Kapazität der Einheitszelle

$$C_{2D} = \underbrace{\epsilon_0 \frac{(\epsilon_1 + \epsilon_3)}{2} \frac{K \left[ \left(1 - \left(\frac{a}{b}\right)^2\right)^{\frac{1}{2}}\right]}{K \left[\frac{a}{b}\right]}}_{C_1 + C_3} + \underbrace{\epsilon_0 \epsilon_2 \frac{h}{a}}_{C_2} \quad (2.6)$$

wobei  $b$  die Summe aus Fingerdicke und Fingerabstand und  $K[x]$  das elliptische Integral erster Ordnung sind. Werden kapazitive Sensoren in flüssigen Medien eingesetzt, ist

eine Passivierung der Elektroden notwendig. Elektroden ohne Passivierung bilden einen leitenden Kontakt zur Flüssigkeit und werden zur Leitfähigkeitsmessung eingesetzt. Bei Schichtaufbauten mit Passivierung kann die Berechnungsmethode nach Endres [103] nicht verwendet werden. In der Praxis werden für die Berechnung der 2D-Kapazität Finite Elemente Methoden (FEM) eingesetzt [104]. Bei komplizierteren Geometrien werden auch Simulationen der gesamten Elektrodenanordnung in drei Dimensionen simuliert [105, 106].

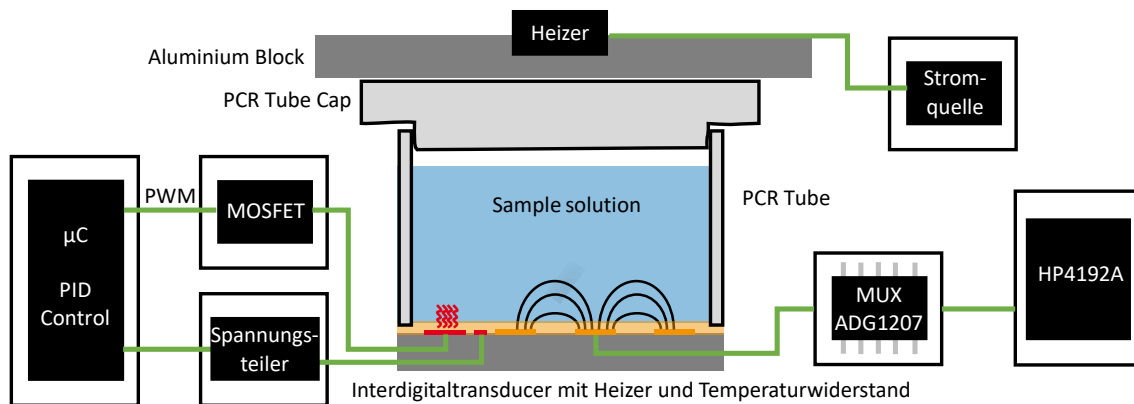


**Abbildung 2.14:** Modell zur Berechnung der Kapazität nach [103]. Dargestellt ist ein Querschnitt durch eine Einheit zelle eines IDKs. Die Einheit zelle wird durch die Mittellinie zweier benachbarter Finger begrenzt.

Charakteristisch für die Elektrodenstruktur ist dabei nicht nur ihre Gesamtkapazität sondern insbesondere die Eindringtiefe des elektrischen Felds  $d_p$  in beide zur Kammstruktur orthogonalen Richtungen. Idealerweise ist das Feld nach unten hin innerhalb des Substrats begrenzt. Das kann im Bedarfsfall durch Anbringen einer Äquipotentialfläche erreicht werden. Die Eindringtiefe in den Analyten hängt stark von dessen Dielektrizitätszahl ab. Beim Einsatz in flüssigen Medien muss die Passivierung notwendigerweise dünn sein, damit Änderungen in der Dielektrizitätszahl des Analyten hinreichend große Kapazitätsänderungen bewirken. Die Eindringtiefe  $d_p$  reicht bis zu dem Punkt, an dem das elektrische Feld auf  $1/e$  (ca. 37 %) abgefallen ist.



### 2.2.3.1 Charakterisierung und Messung



**Abbildung 2.15:** Der Versuchsaufbau für die LAMP und MCA Messung auf IDTs schematisch dargestellt. Die kapazitiven Strukturen sind über einen Multiplexer (MUX) an den HP4192A Impedanzanalysator angeschlossen. Der Temperaturwiderstand wird über einen Spannungsteiler ausgelesen und als Input für einen PID Regler verwendet, der den Heizstrom über einen MOSFET per PWM steuert. Um Kondensation zu vermeiden, wird der Deckel des Reaktionsgefäßes mithilfe einer Aluplatte geheizt.

Das Messsystem für den Einsatz der IDTs ist in Abbildung 2.15 dargestellt. PCR-Tube Strips, bei denen der Boden abgeschnitten wurde, sind auf die Polyimid-Leiterplatte (nicht im Bild) aufgeklebt, welche den Sensor beinhaltet. Dieser besitzt einen Heizer, welcher per MOSFET und PWM angesteuert werden kann. Die PID-Regelung bezieht sich dabei auf den Messwert des Temperaturwiderstands, der über einen Spannungsteiler ausgelesen wird (Beschreibung in Kapitel 3.2.2.5). Die Kapazitätsmessung geschieht wahlweise über einen Multiplexer und einen Impedanzanalysator oder über eine integrierte Messung (siehe Kapitel 3.2.2.3). Der PCR-Tube Strip bildet die Reaktionsgefäße, welche mit einem passendem Cap Strip verschlossen werden können. Um Kondensation an der Deckelinnenseite zu verhindern, wurde auf den Cap Strip eine Aluminiumplatte gelegt, welche mithilfe von Leistungstransistoren auf 70 °C geheizt wurde.

Da für die Messung zunächst geklärt werden sollte, ob die Methode mit rein kapazitiven Auswertemethoden funktioniert, wurde die Impedanzspektroskopie angewandt. Zudem sollte der ideale Frequenzbereich für die Messung bestimmt werden. Vor jeder Messung wurden die Sensoren gereinigt. Dazu wurde 70 % Ethanol in die Reaktionsgefäße gefüllt und die Sensoroberfläche vorsichtig mit einem Wattestäbchen gesäubert.

**Impedanzspektroskopie** Bei der Impedanzspektroskopie oder elektrochemischen Impedanzspektroskopie (EIS) wird ein Bauteil mit einer sinusförmigen Wechselspannung

angeregt und die Stromantwort gemessen. Dies kann in einer 2-Pol-Konfiguration erfolgen. Um den Einfluss der Zuleitung zu kompensieren, wird häufig eine 4-Draht-Messung durchgeführt, wobei die Strommessung an separat geführten Messleitung möglichst nah am Bauteil erfolgt. Bei der Impedanzspektroskopie werden konsekutiv Messungen bei unterschiedlicher Frequenz durchgeführt. Ein wichtiger Parameter ist außerdem die Amplitude des Anregungssignals. Das Ergebnis der Messung kann als Wertepaar aus Impedanz  $|Z|$  und Phasenverschiebung  $\theta$  dargestellt werden oder als Vektor im imaginären Raum:

$$\underline{Z}(\omega) = \frac{V(\omega)}{I(\omega)} = \underbrace{|Z| \sin(\omega + \theta)}_{\text{polar}} = \underbrace{R + iX}_{\text{karthesisch}} \quad (2.7)$$

mit dem Widerstand  $R$  und dem Blindwiderstand  $X$ . Läuft der gemessene Strom der Spannung hinterher  $\theta < 0$ , handelt es sich um ein Bauteil mit einem Kondensator. Dann berechnet sich der Blindwiderstand aus  $X = -\frac{1}{i\omega C}$ . Im Sonderfall  $\theta = -90^\circ$  handelt es sich um einen reinen Kondensator ohne Widerstandsanteil und  $C = -\frac{1}{2\pi f|Z|}$ . Die Darstellung erfolgt üblicherweise als Bode-Plot wobei  $|Z|$  und  $\theta$  über die Frequenz (logarithmisch) geplottet werden. Bei Untersuchungen von DNA gelöst in Wasser wird ein Frequenzbereich von 100 Hz bis 100 kHz untersucht [107–109].

**HP 4192A** Für die Charakterisierung kam ein Impedanzanalysator HP 4192A [110] mit einem Frequenzbereich von 10 Hz bis 100 MHz und einem Anregungssignal von 1 bis 1000 mV zum Einsatz. Er besitzt vier Anschlüsse für eine 4-Draht-Messung. Die Ergebnisse wurden in der polaren Darstellung gespeichert und für die Datenanalyse nach dem Modell eines parallelen RC-Glieds gemäß der Gleichung

$$C = -\frac{1}{2\pi f Z \sin(\theta)} \quad (2.8)$$

in Kapazitätswerte umgewandelt. Um alle 8 Sensoren parallel messen zu können, wurde ein Multiplexer der Firma Analog Devices ADG1207 [111] verwendet, welcher über eine geringe Kapazität verfügt.

**Systemintegration** Um dem POCT-Ansatz gerecht zu werden, wurden zwei Mikrochips für die Impedanz- beziehungsweise die Kapazitätssmessung eingesetzt. Diese sind in Abschnitt 3.2.2.5 näher beschrieben.

### 2.2.3.2 Einsatz in der Virendiagnostik

**Amplifizierungsreaktionen** Die Erfassung von Hybridisierungsvorgängen mithilfe von Impedanzsensoren mit immobilisierten Komplementärsträngen wurde bereits intensiv untersucht [109, 112] und auch patentiert [113]. Wobei auch mitunter eine Immobilisierung der Enzyme auf den Impedanzsensoren durchgeführt wird. In jedem Fall aber wird

so der Vorgang der Hybridisierung lokal auf die Oberfläche der Sensoren forciert, um ein möglichst hohes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Die Funktionalisierung mit immobilisierten Einzelsträngen ist jedoch teuer und verringert die Robustheit der eingesetzten Sensoren. In mikrofluidischen Systemen wurden Impedanzsensoren eingesetzt um zwischen amplifiziertem und nicht amplifiziertem Material zu unterscheiden [114]. Patente zur Durchführung von qPCR in Lösung, also ohne die Funktionalisierung, wurden ebenfalls veröffentlicht [115, 116]. Auch Studien zur Bestimmung der optimalen Frequenz bei der Impedanzmessung wurden publiziert [117]. In der Klassifizierung nach Becherer (siehe Kapitel 2.5) ordnet sich dieser Ansatz in die Partikel-freien und homogenen Methoden ein. Zusätzlich verzichtet er auf den Einsatz von Markermolekülen. In der Praxis ist die Methode jedoch anfällig für allerlei Querempfindlichkeiten, da letzten Endes mit den Elektroden die Leitfähigkeit der Lösung gemessen wird, die von mehr Eigenschaften beeinflusst wird, als nur von der Konzentration und Konfiguration der vorhandenen Nukleinsäuren.

**Schmelzkurvenanalyse** Schmelzkurvenanalyse von doppelsträngigem DNA-Material mit IDTs wurden in der Vergangenheit bereits angedacht und Systeme dafür entwickelt und charakterisiert [118]. Aufgrund des geringen Signal-Rausch-Verhältnisses wurden jedoch optische Methoden zur Messung des Denaturierungsprozesses häufig bevorzugt [119]. Der Einsatz von Impedanzsensoren beschränkt sich dabei auf 3-Elektrodenanordnungen, bei welchen die Arbeitselektrode mit DNA immobilisiert wurde [107, 120, 121]. In veröffentlichten Studien kamen Heizmäander oder Heizgitter zum Einsatz, welche Temperaturen bis über 100 °C erreichen können [119, 122].

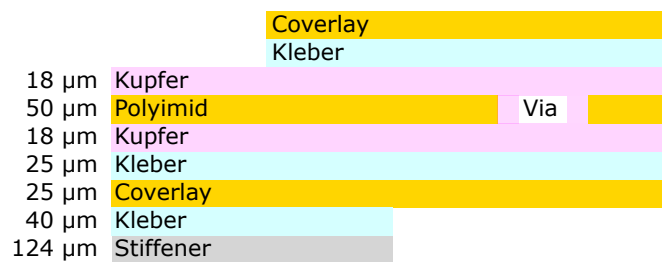
## 2.3 Technologische Grundlagen

Da in dieser Arbeit Packaging Methoden entwickelt wurden, sollen im folgenden die wesentlichen Hintergründe der Leiterplattentechnologie sowie Bondverfahren für Mikrochips vorgestellt werden. Dabei wird ein besonderes Augenmerk auf die Herstellung flexibler Leiterplatten gelegt und anschließend das Thermokompressionsverfahren beschrieben.

### 2.3.1 Flexible Leiterplatten

Die Herstellung von flexiblen Leiterplatten unterscheidet sich nicht wesentlich von der konventioneller FR-4 Leiterplatten. Am Anfang steht ein mit Kupfer beschichtetes Basismaterial. Die Strukturierung erfolgt subtraktiv durch Fotolithographie und Ätzen. Für die Herstellung von Mehrlagenleiterplatten steht jedoch kein Prepeg (vorgetrocknetes Gemisch aus Glasfaser und Harz) zur Verfügung. Bei flexiblen Leiterplatten werden

einzelne Schichten Polyimidfolien miteinander verklebt. Da die Substrate nur eine geringe Dicke (25 oder 50  $\mu\text{m}$  plus Kupfer) aufweisen, muss keine mechanische Bearbeitung stattfinden. Kanten und Bohrungen werden üblicherweise per Laserschneiden erstellt. Durchkontaktierungen werden wie bei den starren Leiterplatten durch Galvanisieren erzeugt.



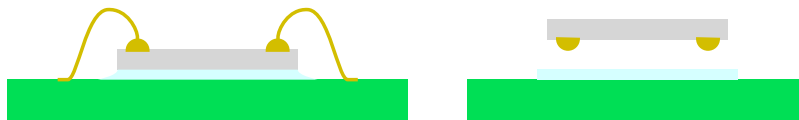
**Abbildung 2.16:** Beispielhafter Lagenaufbau einer flexiblen Leiterplatte. Die Lötstoppsmaske besteht aus einer aufgeklebten Polyimid Coverlay Folie. Vias sind standardmäßig bedeckt. Mithilfe eines aufgeklebten Stiffeners erreicht die Folienplatte im Bereich des Steckkontakts die erforderliche Mindestdicke.

Für die Abdeckung aller Bereiche, in denen nicht gelötet wird, kann konventioneller Lötstopplack aufgebracht werden. Alternativ wird ein Polyimid-Coverlay aufgeklebt, welches zuvor per Laserschneiden bearbeitet wurde. Durch die fehlende Verwindungssteifigkeit des Materials Polyimid kann es dabei zu größeren Ungenauigkeiten als beim Lötstopplack kommen, sodass in etwa Freistellungen mit 200  $\mu\text{m}$  anstatt 50  $\mu\text{m}$  vorgesehen werden sollten. Der Vorteil bei der Verwendung von Coverlay ist jedoch die Möglichkeit Vias ohne zusätzliche Schritte abzudecken. Abbildung 2.16 zeigt beispielhaft den Lagenaufbau einer flexiblen Leiterplatte. Im Bereich der Steckkontakte wird ein FR4 Stiffener aufgebracht. Damit erreicht die Leiterplatte eine Dicke von 300  $\mu\text{m}$  und kann in Standardkonnektoren eingesteckt werden. Das Material Polyimid ist biokompatibel, sodass es sich hervorragend für den Einsatz im Packaging für Biosensoren eignet [123].

### 2.3.2 Bondverfahren

Mikrochips können durch unterschiedliche Verfahren in elektrische Baugruppen integriert werden. Ein zentraler Punkt ist dabei die elektrische Verbindung. Egal ob der Chip ungehäust auf die Leiterplatte aufgebracht oder auf einen Träger fixiert wird, der anschließend vergossen wird, kommen dabei hauptsächlich zwei Verfahren zum Einsatz: Drahtbonden und Thermokompressionsbonden. Beim Drahtbonden wird ein Draht (15 bis 50  $\mu\text{m}$ ) über eine Kapillare auf ein Kontaktpad gepresst. Das Kontaktpad wird dabei erhitzt und zusätzliche Energie durch Anlegen von Ultraschall an die Kapillare eingebracht. Man unterscheidet dabei Ball- und Wedgebonds. Beim Ballbond wird der Draht senkrecht

von oben aufgepresst, wobei ein ballförmiger Fuß entsteht. Beim Wedgebond wird das Ende des Drahtes waagrecht mit einem Tool angepresst. Verbindungen mit Golddrähten werden über Ball-Wedge-Verbindungen, Verbindungen mit Aluminiumdrähten werden mit Wedge-Wedge-Verbindungen ausgeführt. Durch Abreißen des Golddrahts exakt über dem ersten gesetzten Ball, wird ein Bump erzeugt. Der Durchmesser eines Bumps hängt von der Dicke des verwendeten Golddrahts ab. Die Höhe kann durch nachträgliches Verpressen (Coining) verringert werden. Diese Gold Stud Bumps werden in der Aufbau und Verbindungstechnik verwendet um Kontaktpads zu verstärken. Für die Montage auf einem Träger wird der Chip zunächst aufgeklebt und anschließend die Kontakte per Drahtbond gezogen. Der Platzbedarf um den Chip für die Landungspads kann in Anwendungen zu Nachteilen führen. Ebenso ist eine gewisse Höhe für das Ziehen der Drahtloops erforderlich.



**Abbildung 2.17:** Beim Drahtbondverfahren (links) wird der Chip mit den Kontakten nach oben auf die Platine geklebt und elektrische Kontakte durch Drahtbonden auf seitlich liegende Lötkontakte ausgeführt. Beim Thermokompressionsverfahren (rechts) sind die Kontakte mit Bumps versehen. Er wird kopfüber auf die Platine gepresst. Dabei kommt ein anisotrop leitfähiger Kleber zum Einsatz, der für die Haftung und den elektrischen Kontakt sorgt.

Eine Alternative dazu mit geringerem Platzbedarf ist das Flip-Chip-Bond-Verfahren. Der Chip wird dabei kopfüber auf den Träger aufgebracht. Die Position der Kontaktpads des Trägers sind dabei spiegelverkehrt zu den Kontakten des Chips angeordnet. Bei der Aufbringung kommen unterschiedliche Klebstoffe zum Einsatz. Dazu gehören Flüssigklebstoffe oder Klebefilme. Diese können mit leitfähigen Partikeln versetzt sein, um beim Klebevorgang eine anisotrop leitfähige Verbindung zu ermöglichen. Wichtige Parameter für den Bondvorgang sind die Kraft, mit der der Chip auf den Träger aufgepresst wird, die Temperaturen des Chips und des Trägers, sowie die Anpresszeit. Wie auch beim Drahtbonden kann zusätzlich Energie über Ultraschall eingebracht werden. Ein vorheriges Leveling der Kontakte durch Anpressen auf eine glatte Oberfläche ist optional.

## 2.4 Chemische Puffer und Amplifizierungsreaktionen

### 2.4.1 Kalibrierpuffer für pH-Sensoren

Für den Test der pH-Sensoren wurden sowohl kommerziell erhältliche Kalibrierpuffer für Glaselektroden verwendet, als auch phosphatgepufferte Salzlösungen PBS herge-

stellt. Kalbirierpuffer wurden von Hanna Instruments mit den pH-Werten 4.01, 7.01 und 10.01 bezogen. PBS ist ein Puffersystem aus den Ionen Hydrogenphosphat  $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$  und Dihydrogenphosphat  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , dem zusätzlich Kochsalz NaCl und Kaliumchlorid KCl beigemischt sind. Als Puffersalze kommen Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und Kaliumdihydrogenphosphat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  zum Einsatz. PBS wird in der Biochemie bei Versuchen eingesetzt, in denen die Umgebung des menschlichen Organismus simuliert werden soll. Die Konzentration der eingesetzten Salze ist festgelegt, um den osmotischen Druck und den pH-Wert (7.4) im menschlichen Organismus zu reproduzieren. PBS leitet sich vom Sörensen-Puffer ab, der nur aus den beiden Phosphat-Salzen besteht. Er kann zwischen ca. pH 5 und pH 8 verwendet werden [124]. Für die vorliegende Arbeit wurden zwei Stammlösungen hergestellt mit 100 mM NaCl und 100 mM des jeweiligen Phosphatsalzes. Anschließend wurden per Titration Puffer mit den pH-Werten 5, 6, 7 und 8 hergestellt. Die Puffer wurden dunkel bei Kühlschranktemperaturen gelagert und ca. 60 min vor den Experimenten entnommen um sich der Raumtemperatur anzugleichen. Vier Wochen nach dem Ansetzen wurden die Puffer entsorgt und neu angesetzt.

#### **2.4.2 Reaktionsmix für isothermale Amplifizierung und Schmelzkurvenanalyse**

Untersucht wurden zwei verschiedene Virenarten. Zuerst ein starkes Pflanzenvirus, welches in Südamerika Weinpflanzen befällt. Symptome sind eingerollte Blätter und ein verminderter Ernteertrag [125]. Den Symptomen folgt auch die Namensgebung. Es handelt sich um das Grapevine Leafroll Virus Type 2 (GLRV2). Die LAMP Experimente wurden mit künstlichen Proben durchgeführt. Die erzeugten Amplifikat-Lösungen wurden ohne Anpassung für die MCA Experimente verwendet. Die Primer, sowie die Target-RNA wurden bei Integrated DNA Technologies (IDT) bestellt. Dabei handelte es sich um die Sequenz des GLRV2. Abbildung 2.18 zeigt die Sequenz der Target-RNA. Markiert wurden die für das Primerdesign ausgewählten Sequenzen F3c, F2c und F1c, sowie B1, B2 und B3. Für die Anwendung im Virennachweis muss eine RNA amplifiziert werden. Für die LAMP Methode setzt dies eine Umwandlung in cDNA per reverser Transkription (RT) voraus, sodass genau genommen von RT-LAMP gesprochen werden muss. Daher sind die Primer, welche in den Abbildungen 2.19-2.22 dargestellt sind, nicht komplementär zur Target-RNA.

## 2.4 Chemische Puffer und Amplifizierungsreaktionen

ACACTT TGCGTGTACTTGC ACTGG GG TTATTTGTT CAGTACCTGCC AATTATGATA  
F3c F2c  
GCGTTCAAAGGAATTTCACTGATC AGTGTGTTTCACTCAGCGGTTA TCAGTGCGTA  
F1c  
TATATGATCAATGA ACCTTCAGCGGCTGCGCTAT CTGCGTGTAATTCGGTTGGAAA  
B1  
GAAATCCGCAAAT TTGGCTGTTTACGATTTTCG GTGGTGGGACCTTTAACGTG AATG  
B2 B3  
GTTGTCATACA

**Abbildung 2.18:** Genomsequenz des GLRV2, welche für die LAMP Versuche verwendet wurde. Es besitzt 236 Basen. Markiert sind die Sequenzen, welche für das Primerdesign selektiert wurden.

TGCGTGTACTTGC ACTGG  
F3c

**Abbildung 2.19:** Die Sequenz F3c wurde als F3 Primer benutzt. Sie besitzt 18 Basen.

TAACCGCTGAGTGAAACACACT TTT TATTTGTT CAGTACCTGCC  
F1 F2c

**Abbildung 2.20:** Die Sequenzen F2c und das Komplement zu F1c wurden für den FIP verwendet. Er besteht aus 44 Basen.

CACGTTAAAGGTCCCACCAC  
B3c

**Abbildung 2.21:** Das Komplement zu B3 wurde als B3 Primer verwendet. Er besteht aus 20 Basen.

ACCTTCAGCGGCTGCGCTAT TTTTTT CGAAATCGTAAACAGCCAA  
B1 B2c

**Abbildung 2.22:** B1 und das Komplement zu B2 wurden als BIP Primer verwendet. Er besteht aus 45 Basen.

Zusätzlich dazu wurden weitere Proben verwendet, welche im Rahmen des Forschungsprojektes CoVMoTe vom Fraunhofer IME bereitgestellt wurden. Dabei handelte es sich um eine in vitro transkribierte Sequenz des SARS-CoV-2 Virus (Basen von 28287 bis 29230, N-Gen des Wuhan Wildtyps [126]), ein starkes Virus, das den Menschen befällt. Für die LAMP-Reaktionen kam ein 6-teiliges Primerset in einer Vorentwicklungsstufe zum Einsatz [127]. Neben den F3, B3, FIP und BIP Primern enthält dieses Set sogenannte Loop-Primer, welche den einen Teil der Sequenz zwischen FIP und BIP abbilden. Durch den Einsatz von Loop-Primern kann die Reaktionszeit für eine LAMP auf unter 30 min verkürzt werden [7].

**Tabelle 2.5:** Basen von 28287 bis 29230, N-Gen des SARS-CoV-2 Wuhan Wildtyps [126]

---

```
GACCCCAAATCAGCGAAATGCACCCCGCATTACGTTTGGTGGAC
CCTCAGATTCAACTGGCAGTAACCAGAATGGAGAACGCAGTGGGG
CGCGATCAAACAACGTCGGCCCCAAGGTTTACCCAATAATACTG
CGTCTTGGTTCACCGCTCTCACTCAACATGGCAAGGAAGACCTTAA
ATTCCCTCGAGGACAAGGCGTTCCAATTAACACCAATAGCAGTCCA
GATGACCAAATTGGCTACTACCGAAGAGCTACCAGACGAATTCGTG
GTGGTGACGGTAAAATGAAAGATCTCAGTCCAAGATGGTATTTCTA
CTACCTAGGAAGTGGGCCAGAAGCTGGACTTCCCTATGGTGCTAAC
AAAGACGGCATCATATGGGTTGCAACTGAGGGAGCCTTGAATACAC
CAAAAGATCACATTGGCACCCGCAATCCTGCTAACAATGCTGCAAT
CGTGCTACAACCTCCTCAAGGAACAACATTGCCAAAAGGCTTCTAC
GCAGAAGGGAGCAGAGGGCGGCAGTCAAGCCTCTTCTCGTTCCTCAT
CACGTAGTCGCAACAGTTCAAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAG
GGGAAGTTCCTGCTAGAAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCT
CTTGCTTTGCTGCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGCAAAA
TGTCTGGTAAAGGCCAACAAACAAGGCCAAACTGTCACTAAGA
AATCTGCTGCTGAGGCTTCTAAGAAGCCTCGGCAAAAACGTAAGTGC
CACTAAAGCATAACAATGTAACACAAGCTTTCGGCAGACGTGGTCCA
GAACAAACCCAAGGAAATTTGGGGACCAGGAACTAATCAGACAA
GGAAGTATTACAAACATTGGCCGCAATTGCACAATTTGCCCCCA
GCGCTTCAGCGTTCTTCGGAATGTCGCGC
```

---

Die Herstellung des Reaktionsmix wurde in der stets gleichen Reihenfolge durchgeführt. Zur Verdünnung der Bestandteile wurde Nuklease-freies Wasser verwendet, welches von New England Biolabs (NEB) bezogen wurde. Die Primer lagerten in einer 100 µM Stammlösung bei –18 °C. Die verwendeten Bestandteile wurden 45 min vor der Proben-vorbereitung aus dem Gefrierfach bzw. Kühlschrank entnommen, um Raumtemperatur



anzunehmen. Nach dem Auftauen wurde daraus eine 10  $\mu\text{M}$  Arbeitslösung hergestellt. Bezogen auf den schlussendlichen Reaktionsmix wurden zuerst die Primer zusammengesetzt mit 1.6  $\mu\text{M}$  der inneren Primer (FIP und BIP), sowie 0.2  $\mu\text{M}$  der äußeren Primer (F3 und B3), welche nur zur Erzeugung der Startstruktur benötigt werden. Der Primermix stellt 10 % des Volumens des Reaktionsmix dar. Anschließend wurde Nuclease-freies Wasser mit einem Anteil von 36 % hinzugegeben. Darauf folgte die Zugabe des WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix mit einem Volumenanteil von 50 % und schließlich die Target-RNA mit einem Volumenanteil von 4 %. Der WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix wurde ebenfalls von NEB bezogen. Er enthält die RT-LAMP Polymerase, Nukleinsäure-Bausteine, Magnesium, Puffersalze, sowie den Indikatorfarbstoff zur Anzeige des pH-Werts Phenolrot. Bis zum Einfüllen in die Reaktionsgefäße und Aufheizen wurde der Reaktionsmix im Kühlschrank gelagert. Alle Oberflächen und Reaktionsgefäße wurden vor der Benutzung mit 70 % Ethanol gereinigt.

## 2.5 Methoden der Signalverarbeitung

### 2.5.1 Savitzky-Golay-Filter

Bei der Berechnung der Schmelzkurven aus den kapazitiven Messungen wurden die Messwerte vor der Bildung der ersten Ableitung mithilfe eines Savitzky-Golay-Filters geglättet. Dieser stellt eine Weiterentwicklung einer lokalen polynomialen Regression dar [128]. Der Filter findet besonders bei der Glättung von rauschhaften Signalen in chemischen Messungen Anwendung, da er die Form und die Höhe vorhandener Peaks erhält. Im Frequenzraum handelt sich beim Savitzky-Golay-Filter um einen Lowpass-Filter [129].

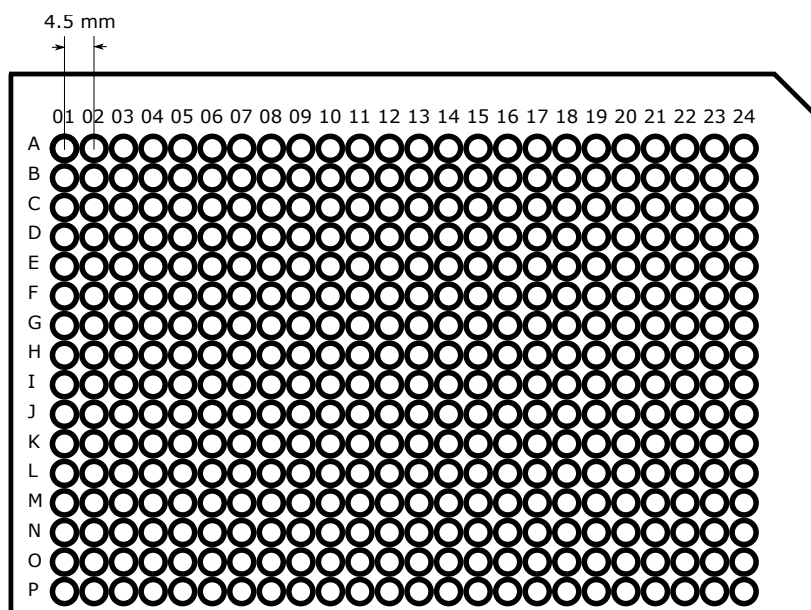


# Kapitel 3

## Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Sensordesign und Charakterisierung

Beide Sensorbausteine wurden mit übereinstimmenden Außenmaßen und Bondpad-Rastern designt. Angelehnt an das Rastermaß einer 192er Wellplatte wurde als Grundstruktur ein Quadrat mit der Seitenlänge 4.5 mm gewählt. Dadurch ist es möglich, eine 192er Wellplatte ohne Boden auf einen Wafer aufzukleben und dabei je einen Sensor in jedem Well zu haben (siehe Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1:** Eine 192er Wellplatte kommt zur Untersuchung einer Vielzahl von parallel laufenden biochemischen Reaktionen zum Einsatz. Moderne qPCR-Cycler nehmen solche Platten auf und messen die Fluoreszenz in jedem der 192 Gefäße. Der Abstand zwischen den Gefäßen beträgt 4.5 mm und diente für die vorliegende Arbeit als Ausgangsraster für die Dimensionierung der Biosensoren.

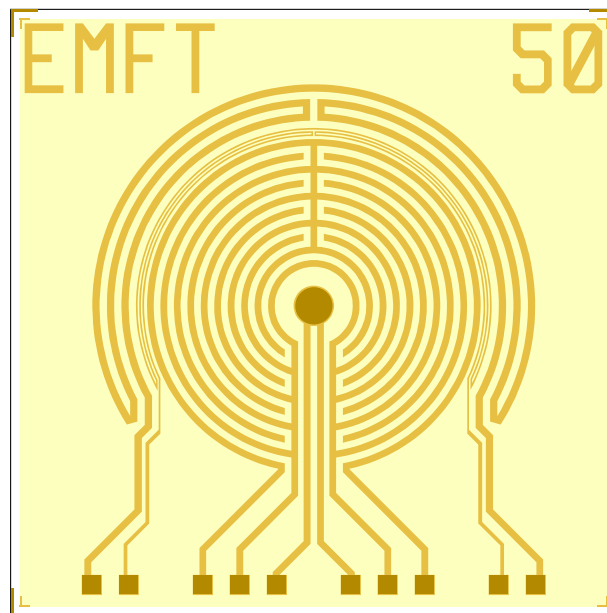
### 3.1.1 Interdigitalelektroden

Im Zuge dieser Arbeit wurden im Reinraum der Fraunhofer Einrichtung für Mikrosysteme und Festkörpertechnologien (EMFT) IDTs hergestellt. Dafür wurden 150 mm Glaswafer mit einer strukturierten Goldbeschichtung versehen. Glas besitzt eine hohe chemische Beständigkeit und eignet sich daher exzellent als Substrat für chemische Sensoren. Es ist transparent und unterstützt daher viele Verfahren der optischen Inspektion. Im Vergleich zu Silizium besitzt es eine niedrigere Dielektrizitätszahl. Warum diese jedoch vernachlässigt werden kann, darauf wird im späteren Kapitel 3.1.1.2 näher eingegangen. Als Metallisierung wurde Gold gewählt. Seine chemische Beständigkeit reicht nicht an diejenige von Platin heran, doch gehört es ebenfalls zur Gruppe der Edelmetalle und ist inert. Kritisch ist der Einsatz von Gold bei Elektrodenspannungen im Voltbereich, da es durch Oxidation und Elektrolyse zur Auflösung der Goldschicht kommen kann. Bei der verwendeten Impedanzspektroskopie wurden jedoch maximal 300 mV Spannungsunterschied zwischen den Goldelektroden angelegt. Gold ist zudem günstiger als Platin und es stehen als Strukturierungsmethoden neben dem Lift-Off-Prozess auch ein Ätzprozess zur Verfügung. Der Ätzprozess ist ein subtraktives Verfahren, bei dem der Wafer im ersten Schritt ganzflächig metallisiert wird. Im zweiten Schritt wird Fotolack aufgebracht, belichtet und entwickelt, sodass die designten Metallstrukturen mit Lack geschützt sind. Alle übrigen Flächen werden nasschemisch oder trocken im Plasma weggeätzt. Dabei können Unterätzungen auftreten [130]. Beim Lift-Off wird im ersten Schritt der Fotolack aufgebracht und strukturiert, sodass die designten Metallstrukturen frei von Lack sind. Im zweiten Schritt erfolgt die ganzflächige Metallisierung. Darauf folgt der eigentliche Lift-Off, bei dem der Fotolack zusammen mit dem unerwünschten Metall entfernt werden [130]. Unterätzungen gibt es hier nicht. Trotz dieses Vorteils wurden die Sensoren in dieser Arbeit mit dem Ätzverfahren hergestellt, da gerade die langen und dünnen Fingerstrukturen beim Lift-Off häufig Haftungsprobleme zeigten.

#### 3.1.1.1 Design

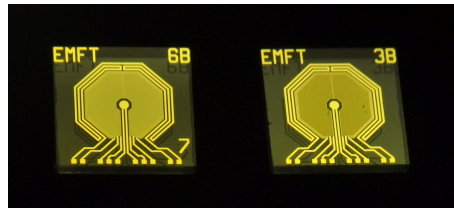
Um die Haftung auf dem Glassubstrat zu verbessern, wurde unter der 175 nm Goldmetallisierung eine 10 nm Titan-Wolfram-Schicht vorgesehen. Der Schichtaufbau wird durch eine Polyimidschicht komplettiert, welche als Passivierung verwendet wird. Polyimid haftet sowohl auf Glas, als auch auf Gold, auf eine Haftschrift kann verzichtet werden. Eine Passivierung ist vor allem bei Zuleitungen sinnvoll. Außerdem kann sie als Kantenschutz eingesetzt werden. Da die Dicke einer Polyimidschicht typischerweise bei einigen Mikrometern liegt, ist ein Kantenschutz beim IDK wenig sinnvoll. Abbildung 3.2 zeigt das Design der IDTs exemplarisch am Beispiel der Struktur „50B“. In der Metallisierungsebene (rot) befinden sich 5 aktive Strukturen, welche jeweils über zwei Bondpads angeschlossen sind. Passive Strukturen umfassen Sägemarken, Justagemarken

für den Flip-Chip-Bond und Beschriftungen. Vom Mittelpunkt des Chips aus nach außen gehend befinden sich eine Referenzelektrode, zwei ineinandergreifende Kammelektroden, welche einen IDK bilden, ein Temperaturwiderstand mit Bahnbreite 10  $\mu\text{m}$  und ein Heizwiderstand mit Bahnbreite 54  $\mu\text{m}$ . Die Doppelbelegung der Bondpads ist einerseits bei den Widerständen notwendig und andererseits hilfreich. Beim IDK wird dadurch eine Vierdrahtmessung erleichtert, bei der Referenzelektrode kann der Kontaktwiderstand der Aufbau- und Verbindungstechnik bestimmt werden. Die designten Metallbahnen unterscheiden sich nur in der Geometrie des IDK. Dabei wurden die Abstände zwischen den Fingern, sowie die Breite derselben variiert mit den Werten 3, 6, 10, 20 und 50  $\mu\text{m}$ . Unter Berücksichtigung des Schichtwiderstands, der nach dem Aufspütern der Goldschicht aufgrund von Korngrenzen höher liegt als die theoretischen  $2.44 \times 10^{-8} \Omega \text{m}$ , ergeben sich für den Temperaturwiderstand ca. 500  $\Omega$  und für den Heizwiderstand ca. 150  $\Omega$ . Die Geometrie dieser Strukturen wurde bereits in vorhergehenden Studien entwickelt, um Luftfeuchtigkeitssensoren zu temperieren und funktioniert bis etwa 200  $^{\circ}\text{C}$  [131].



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung eines IDT mit Metalllage (braun) und Passivierung (gelb). Von innen nach außen besitzt der Transducer eine Referenzelektrode, zwei Interdigitalelektroden, die einen IDK bilden, einen Temperaturwiderstand und einen Heizdraht. Die Passivierung ist ausschließlich an den Bondpads und der Referenzelektrode geöffnet (dunkelbraun).

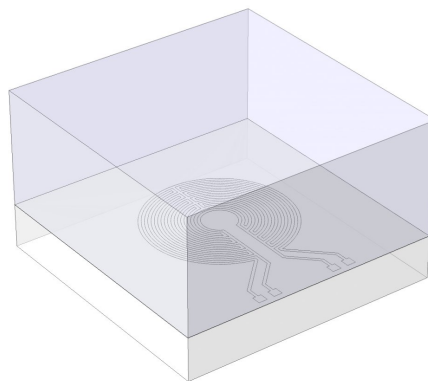
Für die Passivierung kam ein photostrukturierbares Polyimid Fujifilm Durimid<sup>®</sup> 7505 zum Einsatz. Die Sägestraßen wurden von Polyimid freigestellt, um ein Verschmutzen der Sägeblätter zu verhindern. Interdigital-Sensoren, deren Strukturen vollständig mit Polyimid bedeckt sind, messen eine Änderung in der Dielektrizitätszahl.



**Abbildung 3.3:** Fotografie des in Abbildung 3.2 dargestellten IDTs. Dabei handelt es sich um ein alternatives achteckiges Design.

### 3.1.1.2 Charakterisierung

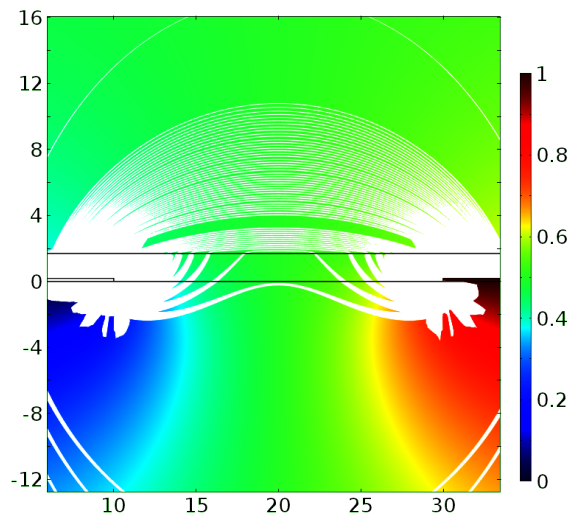
Als Substrat für die Sensoren wurde Borosilikatglas verwendet. Im Vergleich zu Silizium ist es weniger reaktiv im Kontakt mit einer Vielzahl von Chemikalien. Außerdem besitzt es eine deutlich niedrigere Dielektrizitätszahl (siehe Tabelle 2.4). Dadurch ist die Grundkapazität im Verhältnis zur Signaländerung geringer, was den Full Scale Change (FSC) Wert erhöht. Die entworfenen Kapazitätsstrukturen wurden in das FEM-Tool COMSOL Multiphysics<sup>®</sup> importiert und um weitere Lagen zu dem in Abbildung 3.4 dargestellten Modell erweitert. Das Modell besteht aus dem Substrat, den Elektroden, der Passivierung und dem darüber liegenden Medium. COMSOL wurde verwendet, um die Kapazität zwischen den Fingerstrukturen in verschiedenen Medien, Luft, Wasser und DNA-Lösung zu berechnen.



**Abbildung 3.4:** Modell des IDT für die Simulation der Kapazität. Auf der Substratschicht befinden sich die beiden Goldelektroden, bedeckt von der Polyimidschicht. Darüber eine Schicht, deren Dielektrizitätskonstante gemäß den Werten aus Tabelle 2.4 variiert wurde.

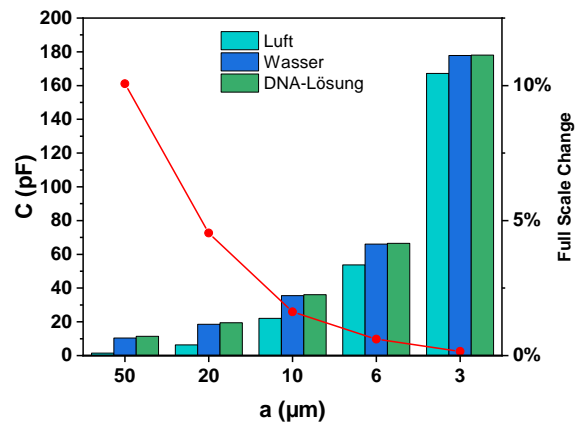
Abbildung 3.5 zeigt die Verteilung des elektrischen Potentials und die Feldlinien des elektrischen Feldes im Querschnitt zwischen zwei Fingerstrukturen eines Sensors mit

20  $\mu\text{m}$  Fingerabstand in Wasser. Die weißen Linien repräsentieren die Feldlinien. Ihre Dicke zeigt die Größe der elektrischen Feldstärke an diesem Punkt im Diagramm an. Es ist leicht erkennbar, dass sich der Großteil der elektrischen Feldenergie in den Bereichen mit niedriger Dielektrizitätszahl speichert. In der Passivierung und im Substrat befinden sich die Feldlinien der größten Linienstärke.



**Abbildung 3.5:** Simulation des elektrischen Feldes. In Farbe ist das elektrische Potential dargestellt, weiß überlagernd die elektrischen Feldlinien. Die Dicke gibt dabei den Absolutwert des elektrischen Feldes an dieser Position an. Der Großteil der elektrischen Feldenergie konzentriert sich auf die Bereiche mit niedriger Dielektrizitätszahl (Substrat, Passivierung).

Trotzdem ragen die Feldlinien auch in den Bereich des Mediums, obwohl ihre Ausbreitung dort sehr viel stärker gehemmt wird (die Dielektrizitätszahl von Wasser ist um einen Faktor 20 größer). Die anteilige Änderung der Kapazität, hervorgerufen durch die dielektrischen Eigenschaften des Mediums, sind je größer, desto größer das Verhältnis zwischen Fingerabstand und Dicke der Passivierung (2  $\mu\text{m}$ ) ist. Dieser FSC wurde für die verschiedenen Geometrien bestimmt, indem die prozentuale Veränderung für eine Simulation in Wasser und einer in 1 %-iger DNA-Lösung berechnet wurde. Abbildung 3.6 zeigt sowohl die Kapazitätswerte (Balken), als auch den FSC (rote Linie). Auch hier wird deutlich, je größer der Fingerabstand, desto größer der FSC. Jedoch sinkt dabei auch durch die gleichbleibende Sensorfläche die Anzahl der Finger und somit die Gesamtkapazität. Niedrige Kapazitäten wiederum stellen höhere Anforderungen an die Messtechnik.



**Abbildung 3.6:** IDT Simulation der zu erwarteten Signaländerung während der Amplifizierungsreaktion. Aufgetragen sind die absoluten Kapazitätswerte der einzelnen Geometrien für verschiedene Medien in der obersten Schicht des Modells. Der Full Scale Change (FSC) ist bei höheren Fingerabstand größer, die Grundkapazität jedoch geringer.

Die bestimmten Kapazitäten in Luft wurden mit Messwerten verglichen, die mit einem Impedanzanalysator aufgezeichnet wurden. Die Messung fand bei 40 kHz statt. Die Berechnung der Kapazität erfolgte intern im Gerät anhand des parallelen R-C-Modells. Tabelle 3.1 stellt die Werte für die verschiedenen Geometrien gegenüber. Zeigen die Werte für Fingerabstände von 50 und 20 µm noch eine relativ genaue Übereinstimmung, so treten mit abnehmendem Fingerabstand immer größer werdende Abweichungen auf. Im Modell ist für die Passivierung ein perfekter Isolator angenommen, welcher sich jedoch in der Praxis als nicht realitätsgetreu erweist.

**Tabelle 3.1:** Testmessungen im Vergleich zu simulierten Kapazitätswerten.

Geometrie	gemessener Wert $C_p$ bei 40 kHz	simulierter Wert COMSOL
3 µm	35 pF	167 pF
6 µm	19 pF	54 pF
10 µm	14 pF	22 pF
20 µm	7 pF	6.3 pF
50 µm	1.5 pF	1.5 pF

Der Isolator, in diesem Fall Polyimid nimmt Feuchte auf und kann durch Ionentransport kleine Ladungstransporte ermöglichen [132]. Daher kann gerade in den IDTs mit geringem Fingerabstand von 10 µm und kleiner nicht dieselbe Ladung gespeichert werden, da es aufgrund der Leckströme zu Ladungsverlusten kommt. Nichtsdestotrotz liefert die

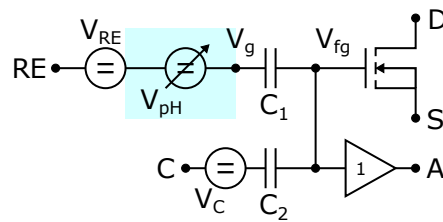


Simulation einen ersten quantitativen Anhaltspunkt, in welcher Größenordnung die zu erwarteten Werte und Signaländerungen liegen.

#### 3.1.2 Ionen-Sensitiver Feldeffekt-Transistor

Für die pH-Messung wurde ein ISFET entwickelt, der das Prinzip des PG-ISFETs adaptiert und einen zusätzlichen Operationsverstärker (OP) als Spannungsfolger am Floating-Gate beinhaltet. Dieser wurde im Reinraum der Fraunhofer EMFT (ISO Class 4) in einem 0.8  $\mu\text{m}$ -Prozess hergestellt. Die hergestellten Gate-Oxide sind für einen Betrieb bis 5 V Versorgungsspannung dimensioniert. Abbildung 3.7 zeigt den schematischen Aufbau. Das Potential auf dem Floating-Gate hängt vom pH-Wert und der Spannung an der Referenzelektrode ab, ist aber zusätzlich auch über die Control-Elektrode kapazitiv gekoppelt. Das Floating-Gate-Potential kann nun entweder über den MOSFET oder über den Operationsverstärker gemessen werden. In beiden Fällen findet eine Impedanzwandlung des Spannungssignals statt. Beide Optionen der Impedanzwandlung können dabei unabhängig voneinander verwendet werden. Die Eingangsstufe des OPs ist ein MOSFET-Gate und lässt das Floating-Gate-Potential unverändert. Diese Konfiguration eröffnet nun mehrere Möglichkeiten der Messung des Sensorsignals.

Die erste Möglichkeit ist die Messung über den OP. Da der FG-ISFET die Nachteile des PG-ISFETs erbt, gilt auch für ihn, dass das Potential auf dem Floating-Gate durch unkontrollierte Beladung während der Prozessierung stark variiert und möglicherweise außerhalb des Arbeitsbereichs des OPs liegt. Diese Verschiebung kann durch eine Hilfsspannung an der Control-Elektrode oder durch Wahl der Spannung an der Referenzelektrode kompensiert werden, verhindert in diesem Fall aber eine weitere vorteilhafte Option des Einsatzes dieses OPs. Im Gegensatz zum klassischen ISFET kann mit einem EGFET oder PG-ISFET das Nernst-Limit aufgrund der kapazitiven Dämpfung nicht mehr erreicht werden (siehe Gleichung 2.3). Der FG-ISFET löst dieses Problem. Verbindet man den Output A mit der Control-Elektrode C löschen die gleichen Potentiale an  $C_2$  seinen Einfluss aus, eine Dämpfung findet nicht statt.

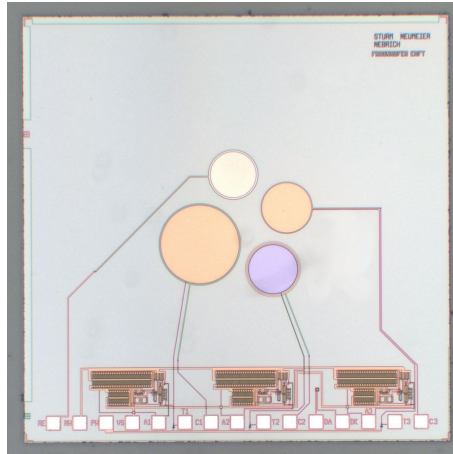


**Abbildung 3.7:** Schematische Darstellung der auf dem pH-Sensor eingesetzten FG-ISFET Struktur. Im Unterschied zum PG-ISFET kommt hier ein OP zum Einsatz, der als Spannungsfollower an das Floating-Gate angeschlossen ist. Damit lässt sich durch Verbindung von A und C die kapazitive Dämpfung kompensieren.

Bei der Verwendung des OPs ist das Sensorsignal die Ausgangsspannung des OPs, die vom pH-Wert abhängt. Bei Verwendung des MOSFETs führt eine pH-Änderung zu einer Änderung der Spannung am Gate und somit zu einer Änderung des Drainstroms. Wird die Referenzelektrode auf ein festes Potential gesetzt und der Drainstrom während eines Spannungssweeps an der Control-Elektrode gemessen, lässt sich eine FG-ISFET Eingangskennlinie messen (vergleiche Abbildung 2.11a). Eine pH-Änderung führt dann zu einer Verschiebung der Einsatzspannung. Beim Einsatz einer Regelschaltung kann die kapazitive Anordnung aus  $C_1$  und  $C_2$  zur Verstärkung des Sensor-Signals genutzt werden. Näheres dazu im Kapitel 3.2.2b.

### 3.1.2.1 Design

Der Sensorchip verfügt über eine integrierte Referenzelektrode und 3 Anordnungen der in Abbildung 3.7 dargestellten FG-ISFET-Struktur. Diese unterscheiden sich im Schichtaufbau (siehe Abbildung 3.9), das Verhältnis der Kapazitäten  $C_1$  und  $C_2$  ist jedoch identisch. Die genauen Unterschiede werden später im Abschnitt erläutert. Die drei Anordnungen werden dabei mit ISE1, ISE2 und ISE3 bezeichnet (ISE, Ionensensitive Elektrode). Auf ISE3 wird nicht näher eingegangen, da es sich um eine technologische Variation handelt, die für den Betrieb des Sensors keine Bedeutung innehat. Wie in Abbildung 3.8 ersichtlich, wurden die Sensorstrukturen von den elektrisch aktiven Strukturen räumlich getrennt. In der Mitte des Chips befinden sich die Referenzelektrode (oben) und die drei kreisförmigen Sensorelektroden von ISE1 (links), ISE2 (unten) und ISE3 (rechts). Im unteren Bereich befinden sich die Bondpads, darüber die drei Operationsverstärker. Nicht erkennbar, da deutlich kleiner, sind die drei zugehörigen MOSFETs, sowie die Temperaturdiode, die sich zwischen den Bondpads 11 und 12 befindet. Ein Heizmäander wurde aufgrund Platzmangels nicht integriert. Wie bereits eingangs des Kapitels erwähnt, beträgt die Kantenlänge des Chips 4.5 mm. Eine Arraybildung für das Raster einer 192-Well PCR-Platte ist auf Waferlevel prinzipiell möglich.



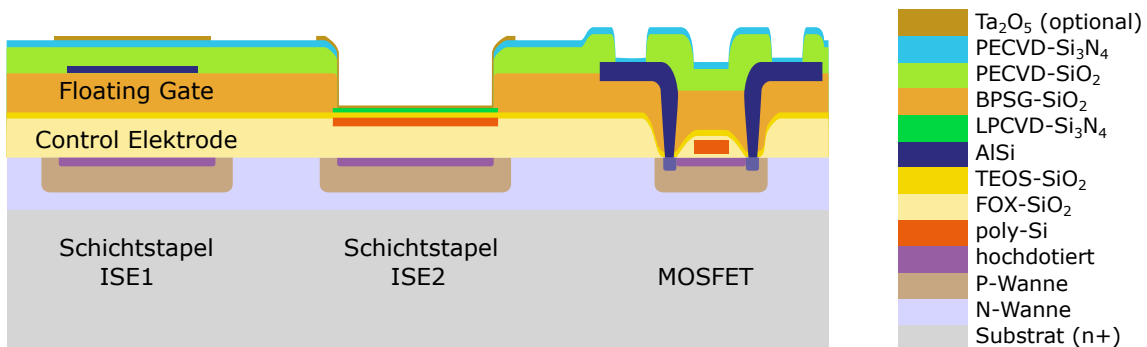
**Abbildung 3.8:** Fotografie des FG-ISFET pH-Sensorchips. Über den Bondpads finden sich mit den MOSFETs und den Operationsverstärkern die elektrisch aktiven Komponenten. Darüber in der Mitte die 4 Elektroden der Sensorfläche, welche aus Referenzelektrode (weiß) sowie drei FG-ISFET Strukturen bestehen. Als Passivierung kommt dabei einmal LPCVD-Nitrid (blau) und zweimal PECVD-Nitrid (orange) zum Einsatz.

Die Referenzelektrode wurde als durchgehende Polysiliziumfläche ausgeführt. Diese wurde dann entweder mit einer Silber-Silberchloridpaste (Gwent/Sun Chemicals) oder mit Titan-Wolfram und Gold beschichtet. Tabelle 3.2 listet die Bondpad-Zuordnung für den Sensorchip auf. Referenzelektrode (1), N-Wanne (2), P-Wanne (3) und VS (4) sind für alle drei FG-ISFET-Anordnungen gemein. N-Wanne ist gleichzeitig die positive Versorgung aller drei OPs, P-Wanne der gemeinsame Source-Anschluss für alle drei MOSFETs und VS die negative Versorgung für alle drei OPs. Für jede FG-ISFET-Anordnung gibt es drei Anschlüsse für den OP-Ausgang, den MOSFET-Drain-Anschluss und die Control-Elektrode und schließlich noch die beiden Anschlüsse für die Temperaturdiode.

**Tabelle 3.2:** Bondpads des FG-ISFET Chips mit Funktionen.

	Name	Funktion
1	RE	Referenzelektrode
2	NW	N-Wanne und positive Versorgung für alle OPs
3	PW	P-Wanne und gemeinsames Source für alle MOSFETs
4	VS	negative Versorgung für alle OPs
5	A1	OP Ausgang ISE1
6	T1	Drain ISE1
7	C1	Control-Elektrode ISE1
8	A2	OP Ausgang ISE2
9	T2	Drain ISE2
10	C2	Control-Elektrode ISE2
11	DA	Temperaturdiode Anode
12	DK	Temperaturdiode Kathode
13	A3	OP Ausgang ISE3
14	T3	Drain ISFET3
15	C3	Control-Elektrode ISE3

Abbildung 3.9 gibt einen Eindruck davon, wie sich die FG-ISFET-Anordnungen in ihrem Schichtaufbau unterscheiden. Sowohl für ISE1, als auch ISE2 ist die Control-Elektrode durch ein hochdotiertes Gebiet in der P-Wanne ausgeführt und bildet zusammen mit dem Floating-Gate den Kondensator  $C_2$ . Das Floating-Gate ist bei ISE1 in der Metallebene ausgeführt, für ISE2 im Polysilizium. Das  $C_2$ -Dielektrikum für ISE2 besteht aus Feldoxid (FOX), für ISE1 zusätzlich noch aus TEOS und BPSG. Der Kondensator  $C_1$  bildet sich zwischen dem Floating-Gate und der Flüssigkeit aus. Das Dielektrikum im Falle der ISE1 besteht aus Plasmaoxid und Plasmanitrid, im Falle der ISE2 aus TEOS-Oxid und LPCVD-Nitrid. Aus der Literatur ist bekannt, dass LPCVD-Nitrid eine höhere pH-Sensitivität aufweist [133]. Somit können ISE1 und ISE2 als ISFET-REFET-Paar verwendet werden [134, 135]. Dabei handelt es sich um eine Kombination zweier ISFETs, die sich in ihrer pH-Empfindlichkeit unterscheiden, nicht aber in ihrem Driftverhalten. Über eine Differenzbildung kann somit der Drifteffekt kompensiert werden. Eine 50 nm dicke  $Ta_2O_5$ -Schicht über den Schichtstapeln von ISE1 und ISE2 wurde auf einige Chips aufgebracht, um eine Verbesserung im Driftverhalten und in der pH-Steilheit zu erreichen.

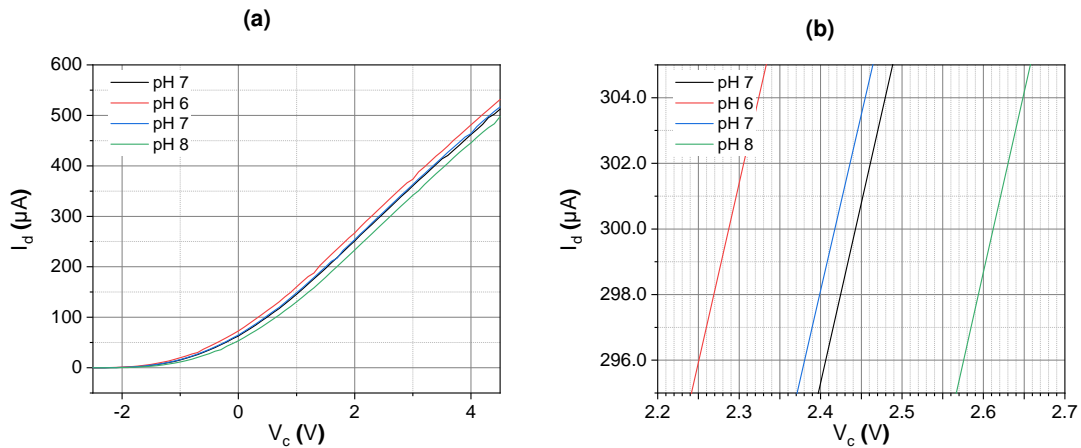


**Abbildung 3.9:** Der FG-ISFET-Schichtaufbau schematisch dargestellt. Bei ISE1 und ISE2 ist die Control-Elektrode als dotiertes Gebiet im Substrat ausgeführt. Das Floating-Gate für ISE1 befindet sich in der Metallebene, die Sensorschicht ist PECVD-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Für ISE2 liegt das Floating-Gate im Polysilizium. Sensorschicht ist LPCVD-Nitrid, welches durch einen Ätzprozess freigelegt ist. Beide Floating-Gate-Strukturen sind an das Gate eines MOSFETs angeschlossen.

Dafür wurden die Kapazitäten der beiden FG-ISFET-Schichtaufbauten auf dasselbe Kapazitätsverhältnis  $\frac{C_2}{C_1+C_2} = 0.7$  durch geeignete Wahl der Oxiddicken eingestellt. Die Durchmesser der Elektroden wurden so gewählt, dass auch die absoluten Kapazitäten nahezu identisch sind.  $C_1$  lag für ISE1 bei 32.2 pF, für ISE2 bei 31.9 pF,  $C_2$  für ISE1 bei 12.6 pF und 11.7 pF für ISE2. Neben den Sensoren befinden sich auf dem Wafer zusätzlich Teststrukturen. Diese umfassen neben Strukturen für das Prozesskontrollmonitoring auch eine Reproduktion der im FG-ISFET verwendeten MOSFET und OP.

### 3.1.2.2 Charakterisierung

Die pH-Sensoren wurden nach der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Vorgehensweise aufgebaut und die in Kapitel 2.4.1 vorgestellten Phosphatpuffer auf die Sensorfläche aufgebracht. Als Referenzelektrode kam eine World Precision Instruments DRIREF-2SH zum Einsatz. Sie besteht aus einem Polyurethan-Röhrchen mit einer Glaskeramik-Fritte, in der ein KCl-Innenelektrolyt eine Silber-Silberchlorid-Elektrode umgibt. Messungen wurden im linearen Bereich ( $V_d = 0.5$  V) durchgeführt (siehe Abbildung 2.11b. Abbildung 3.10 zeigt die Eingangskennlinie einer ISE1-Struktur bei verschiedenen pH-Werten im Ganzen (3.10a) und im Detail (3.10b) bei  $I_d = 300 \mu\text{A}$ . Der Puffer wurde auf den Sensor gegeben, die Referenzelektrode in den Puffer eingetaucht, fünf Minuten gewartet und anschließend die Kennlinie von ISE1 mithilfe des in Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Messgeräts bei einer Source-Drain-Spannung von  $V_{ds} = 500$  mV aufgezeichnet. Die Referenzspannung lag dabei konstant bei -1 V. Die Messung des Drainstroms  $I_d$  erfolgte über eine Spannungsänderung an der Control-Elektrode  $V_C$ . Zwischen den Pufferwechseln wurden alle Komponenten mit vollentsalztem Wasser gespült.



**Abbildung 3.10:** Kennlinien in Kalibrierpuffer über den gesamten Sweepbereich (a) und im Detail bei  $I_d = 300 \mu\text{A}$  (b). Die Kennlinien wurden bei  $V_d = 0.5 \text{ V}$  und  $V_{\text{ref}} = -1 \text{ V}$  für eine MOSFET an ISE1 aufgezeichnet.

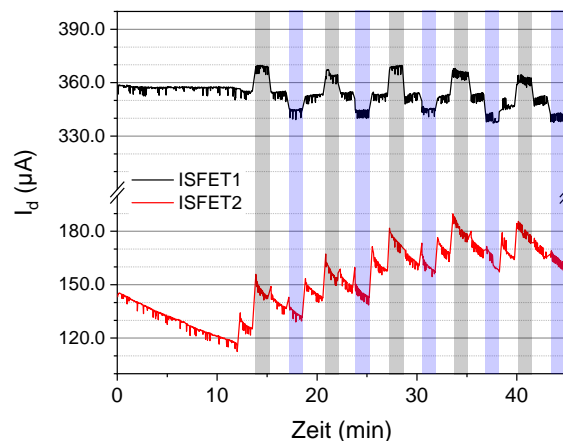
Abbildung 3.10b zeigt die Ergebnisse des Experiments im Detail, bei dem der Sensor zuerst in pH 7, dann in pH 6, wiederum in pH 7 und schließlich in pH 8 vermessen wurde. Wäre der Sensor in der Regelschaltung eingebaut (Kapitel 3.2.2.1), gäbe es eine Verstärkung des FG-ISFET-Signals um einen Faktor  $\frac{C_1}{C_2} = 2.7$ . In diesem Fall verhält sich der Aufbau jedoch anders. Um den Verstärkungsfaktor für diesen Messaufbau zu bestimmen, wurde die Kennlinie in pH7 Puffer bei verschiedenen Spannungen an der Referenzelektrode aufgezeichnet. Das Verhältnis zwischen der Änderung in der Referenzspannung und der Verschiebung der Kennlinie betrug 2.2, was dem Faktor  $\frac{C_1+C_2}{C_1-C_2}$  entspricht (Daten nicht dargestellt). Tabelle 3.3 listet die Spannungswerte  $V_c$  für die vier verschiedenen pH-Werte auf. Für den Übergang zwischen zwei pH-Werten kann jeweils eine pH-Steilheit berechnet werden. Wird diese Steilheit um den gerade beschriebenen Faktor  $\frac{C_1+C_2}{C_1-C_2}$  aus der kapazitiven Spannungsteilung korrigiert, erhält man 71 mV für den Übergang von pH 7 nach pH 6, 59 mV für die Stufe von pH 6 nach pH 7 und 89 mV von pH 7 nach pH 8.

**Tabelle 3.3:** Spannungsänderungen im pH-Test aus Abbildung 3.10b.

pH-Schritt	$\Delta V_c$	pH-Steilheit
pH 7-6	156 mV	70.9 mV/pH
pH 6-7	130 mV	59.0 mV/pH
pH 7-8	196 mV	89.1 mV/pH

Wie aus Kapitel 2.2.2 bekannt, kann die pH-Steilheit nicht größer als das Nernst-Limit von 59 mV bei Raumtemperatur sein. Das Ergebnis des Übergangs von pH 7 auf pH 8 deutet also auf einen überlagernden Drifteffekt hin. Ebenso zeigt die Diskrepanz zwischen

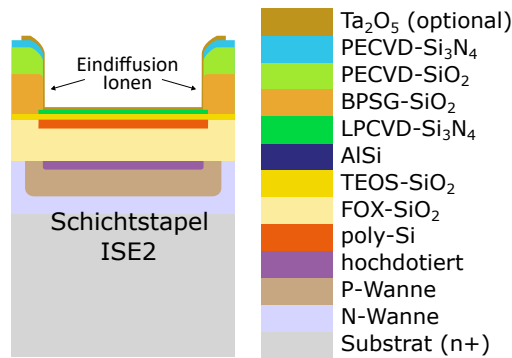
der Spannungsänderung von pH 7 auf pH 6 und zurück von pH 6 auf pH 7, dass das Sensorsignal einer Drift unterliegt. Zur Untersuchung der zeitlichen Abhängigkeit wurden  $V_{ds}$ ,  $V_{ref}$  und  $V_c$  auf einen festen Wert gesetzt und  $I_d$  mit der SMU gemessen. Dabei wurde der Puffer, in dem sich der Sensor befindet, alle drei Minuten durch Pipettieren ausgetauscht. Abbildung 3.11 zeigt die Ergebnisse dieses Tests für ISE1 und ISE2. Der gemessene Drainstrom ist über die Messzeit aufgetragen. Farblich hinterlegt sind die Zeitpunkte bei denen pH 7 (weiß), pH 6 (grau) und pH 8 (blau) auf dem Sensor befüllt waren. Während ISE1 eine relativ stabile Messkurve über die Dauer von 45 min zeigt, fallen bei ISE2 extreme Drifteffekte auf, die den pH-bedingten Einfluss auf den Messwert teilweise übertreffen. Betrachtet man die Kurve von ISE1 sieht man eine Stromänderung von ca. 10  $\mu\text{A}$  pro pH-Stufe. Mit der Transkonduktanz von 110  $\mu\text{S}$  aus den Daten aus Abbildung 3.10 folgen daraus etwa 90 mV Spannungsänderung, welche ohne die kapazitive Verstärkung einer pH-Steilheit von ca. 41 mV/pH entsprechen. Dieser Wert liegt deutlich unter dem in Tabelle 3.3 bestimmtem Wert für die pH-Steilheit.



**Abbildung 3.11:** Die Wiederholbarkeit des FG-ISFET wurde sowohl für Struktur ISE1 als auch ISE2 getestet. Dafür wurden  $V_d = 0.5\text{ V}$ ,  $V_{ref} = -1\text{ V}$  und  $V_c = 3\text{ V}$  auf feste Werte gesetzt und  $I_d$  über die Zeit bei verschiedenen pH-Puffern mit pH 6 (grau), pH 7 (weiß) und pH 8 (blau) gemessen. ISE2 zeigt aufgrund der offenen BPSG-Flanken aus dem Ätzen ein erhebliches Driftverhalten.

Das Verhalten der ISE2 deutet zumindest auf eine höhere pH-Steilheit hin, jedoch werden diese von erheblichen Drifteffekten überlagert. Diese Drift wird durch die offenen Ätzflanken im BPSG (siehe Abbildung 3.12) hervorgerufen. Durch die Freiätzung der LPCVD- $\text{Si}_3\text{N}_4$  Sensorschicht, kommt es zu dieser Ätzflanke im BPSG, welches für seine unzureichende Beständigkeit gegenüber Wasser bekannt ist [136]. Versuche, in denen die ISE2-Struktur mit Carbonpaste abgedeckt waren, zeigten ein vermindertes Driftverhalten bei ISE1 (Daten nicht gezeigt). Für die Reduktion der Drift wurden zwei Ansätze angestoßen. Ein optimiertes Design, welches einen Guard-Ring neben der BPSG-Ätzflanke

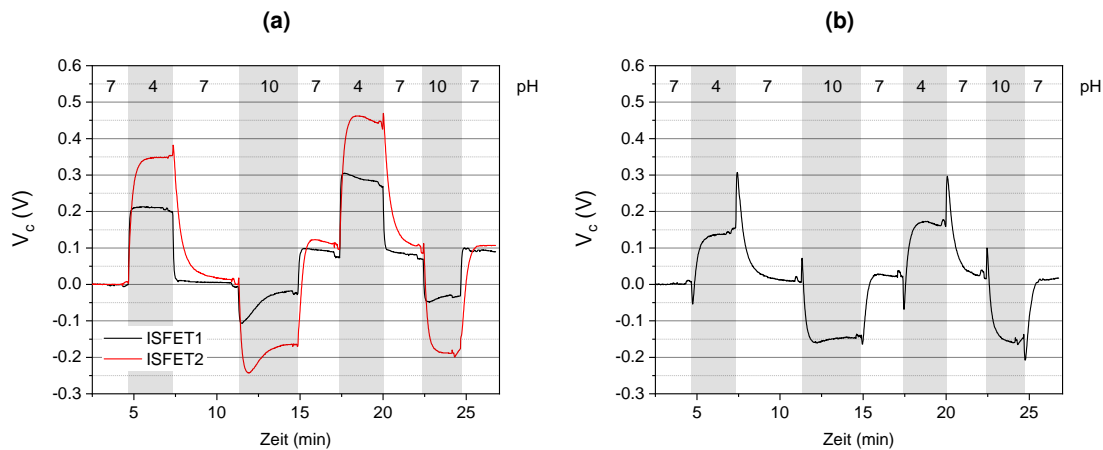
beinhaltete, wurde erstellt und in die Produktion im Reinraum überführt. Des Weiteren wurde eine Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Beschichtung (siehe Abbildung 3.12) realisiert. Die Ergebnisse sind in einem nachfolgendem Abschnitt beschrieben.



**Abbildung 3.12:** Der Schichtstapel bei ISE2 weist eine offene Ätzflanke in der BPSG-Schicht auf. Eindiffusion von Wasser und anderen Ionen führt zu den beobachteten Drifteffekten.

Die Drift trat besonders bei wiederholt durchgeführten Messungen auf. Um das Konzept der ISFET-REFET-Anordnung zu überprüfen, in dem PECVD-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (ISE1) mit geringer pH-Steilheit und LPCVD-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (ISE2) mit hoher pH-Steilheit zum Einsatz kommen, wurde ein Chip direkt nach dem Packaging getestet. Abbildung 3.13a zeigt diese Messung eines frisch gepackagten ISE1-ISE2-Paares mit der in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Regelschaltung. Der Graph zeigt die Änderung der Ausgabespannung, welche an der Control-Elektrode anliegt, über die Zeit gemessen an in verschiedenen kommerziellen Kalibrierpuffern (pH 4.01, 7 und 10.01). Farblich gekennzeichnet sind die Zeitabschnitte, in denen sich der Sensor im selben Puffer befand.



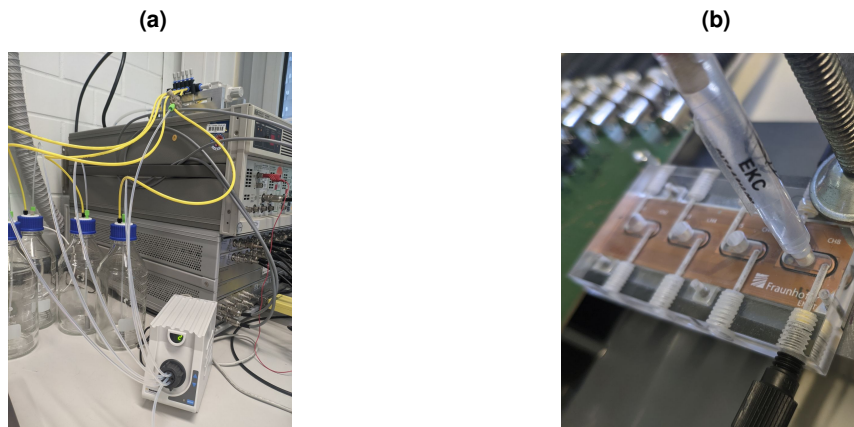


**Abbildung 3.13:** Eine FG-ISFET Differentialmessung wurde mit einem frisch gepackagetem pH-Sensorchip mit kommerziellen pH-Puffern pH 4, pH 7 und pH 10 durchgeführt (a). Die Differenzbildung der beiden kapazitiv amplifizierten Sensorsignale (b) zeigt mit 50 mV/pH eine annähernd Nernste pH-Steilheit und ist gleichzeitig immun gegen Drifteffekte wie sie beispielsweise bei Minute 10 auftreten.

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, besitzt LPCVD-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (ISE2) eine signifikant höhere pH-Steilheit als PECVD-Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (ISE1). Dies wird in folgender Messung besonders deutlich. Die Ansprechzeiten sind für ISE2 geringer, was an der Geometrie des Aufbaus liegen könnte (siehe Abbildung 3.9). Die Sensorschicht von ISE2 liegt tiefer als der Rest des Sensorchips. Flüssigkeitsaustausch findet eventuell verzögert statt. Spannend ist die Betrachtung des Abschnitts zwischen 10 und 15 Minuten. Während des Kontakts mit dem pH-10-Puffer erfolgt ein Driftevent, welches das Sensorsignal um ca. 70 mV verschiebt. Das Driftevent findet parallel im gleichen Umfang für beide ISFETs statt. Der Grund für dieses Driftevent konnte nicht bestimmt werden. Entweder handelt es sich um eine Degradation in der Referenzelektrode oder aber eine Veränderung im Interface zwischen Flüssigkeit und der Siliziumnitrid-Sensorschichten. In jedem Fall aber kann das Driftevent durch Differenzbildung eliminiert werden. Abbildung 3.13b zeigt die Differenz der Signale aus ISE1 und ISE2. Nach der Differenzbildung bleibt das Sensorsignal stabil für die jeweiligen pH-Werte. Aufgrund der kapazitiven Verstärkung erreicht der Sensor in dieser Konfiguration noch immer eine Steilheit von etwa 50 mV pro pH-Stufe.

Ein zweiter Lösungsansatz über die Abdeckung der Ätzflanke mit einer 50 nm Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Schicht konnte hingegen realisiert werden. Die verwendeten Chips für diesen Test stammen aus einer anderen Charge als die Chips, welche für die bisher präsentierten Ergebnisse verwendet wurden. Die Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Schicht wurde mittels reaktivem Sputtern mit einem Tantal-Target in Sauerstoffatmosphäre aufgebracht und über einen Lift-Off-Prozess strukturiert. Um eine mögliche Verbesserung der FG-ISFETs durch Aufbringen dieser Schicht zu un-

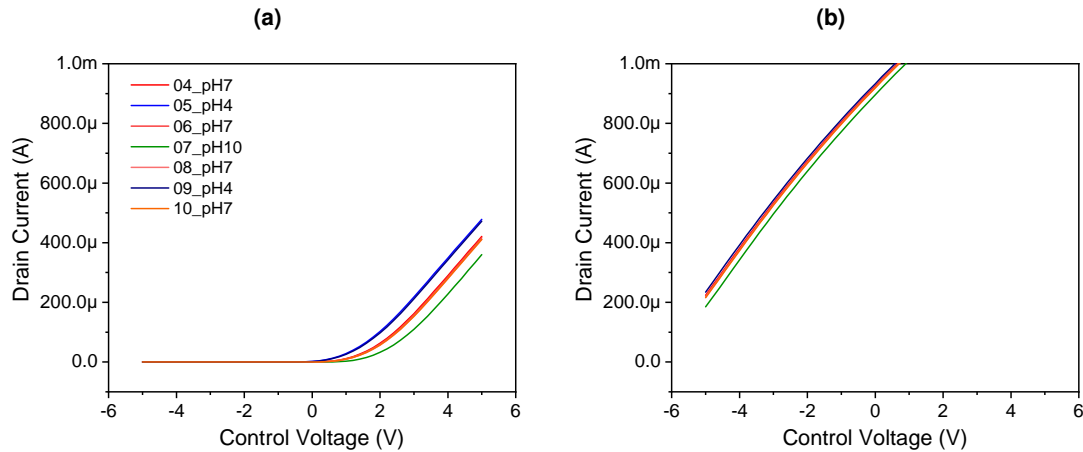
tersuchen, wurden Sensoren mit unterschiedlichem Sensorschichtaufbau gepackaget und getestet. Beim  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -FG-ISFET handelte es sich dabei um eine ISE1 mit dem Schichtaufbau aus Floating-Gate (Aluminium) und einer Plasma-Oxid/Plasma-Nitrid-Passivierung (PECVD- $\text{Si}_3\text{N}_4$ , siehe Abbildung 3.9). Mit  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  kamen sowohl ISE1, als auch ISE2 zum Einsatz. Dabei besitzen die Sensoren zusätzlich über der PECVD- $\text{Si}_3\text{N}_4$ - bzw. LPCVD- $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Schicht eine 50 nm  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ -Schicht mit 10  $\mu\text{m}$  positivem Überlapp.



**Abbildung 3.14:** Testaufbau mit automatischem Pufferwechsel. (a) Foto zeigt die verwendeten Laborgeräte HP4142B SMU und E5250A Switch Matrix. Im Vordergrund vier unter Druckluft stehende Flaschen mit pH-Pufferlösungen. Über die transparenten Schlauchverbindungen werden vier Flüssigkeitssäulen an ein Motorauswahlventil geführt, welches eine davon an die Messkammer weitergibt. (b) Foto der Messkammer mit IDEX Flangeless Fittings Anschlüssen, zwei FG-ISFETs in einer Messkammer und Referenzelektrode.

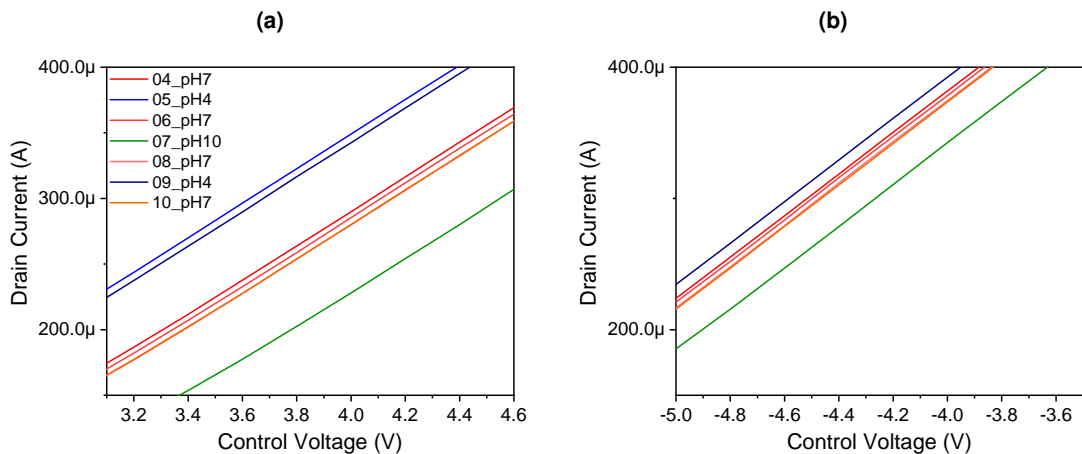
Um die  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ -beschichteten FG-ISFETs zu charakterisieren, wurde das in Kapitel 2.2.2.1 beschriebene Messsystem um eine Anordnung zum automatischen Pufferwechsel erweitert. Abbildung 3.14 zeigt Fotos des Aufbaus. Laborflaschen dienen als Flüssigkeitsreservoirs für die verwendeten Puffer. Diese sind unter Druckluft gesetzt (ca. 1.5 bar). Über einen eingetauchten Schlauch steht somit für jede Flasche eine Flüssigkeitssäule an einem Motorauswahlventil (Rheodyne MXX777-605 [137]) an. Der Ausgang des Ventils ist über ein Absperrventil und ein Nadelventil zur Flussregulierung an die Messkammer (Abbildung 3.14b) angeschlossen. Von dort führt ein Schlauch in ein Abwassergefäß. Für die Schlauchverbindung kommen IDEX Flangeless Fittings [138] zum Einsatz. Über das Nadelventil wurde ein Durchfluss von etwa 25 ml/min eingestellt, was zu einem Austausch der Flüssigkeit in der Kammer innerhalb ca. 5 s führt. Als Referenzelektrode kam eine WPI DRIREF-L [96] zum Einsatz. Deren Spitze ist als Luer-Anschluss ausgeführt. Eine entsprechend konisch geformte Öffnung in der PMMA-Kammer sorgt für eine abdichtende Steckverbindung der Referenzelektrode. Im verwendeten PMMA-Block sind 4 Kammern

mit jeweils Ein- und Auslass eingefräst. In jeder Kammer sitzen jeweils zwei FG-ISFET Chips. So konnten FG-ISFETs mit und ohne Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Beschichtung verglichen werden.



**Abbildung 3.15:** Die Eingangskennlinien zweier FG-ISFETs mit unterschiedlichen Sensormaterialien wurden in verschiedenen pH-Kalibrierpuffern gemessen. Graph (a) zeigt die Ergebnisse einer ISE2 mit Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, (b) die Ergebnisse einer ISE1 mit Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Die Legende in (a) gibt die Reihenfolge an. Beide Messungen fanden mit zwei FG-ISFETs in einer gemeinsamen Kammer (siehe Abbildung 3.14b) statt.

Die Daten in den Abbildungen 3.15 und 3.16 zeigen die Ergebnisse aus einer Vergleichsmessung. Dazu wurde für eine ISE2 mit Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Beschichtung und eine ISE1 ohne diese Beschichtung, also mit Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> als Sensorschicht, die Eingangskennlinie in verschiedenen pH-Kalibrierpuffern wiederholt gemessen. Die Drainspannung  $V_d$  war dabei 500 mV, die Spannung an der Referenzelektrode war auf  $V_{REF} = -1$  V eingestellt.



**Abbildung 3.16:** Vergrößerung der Kennlinien aus Abbildung 3.15 bei  $I_d = 300 \mu\text{A}$ . (a) ISE2 mit Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Beschichtung, (b) ISE1 ohne Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Beschichtung (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-Sensorschicht). ISE2 mit Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Beschichtung zeigt bessere Werte in der Sensitivität, Linearität und Wiederholbarkeit. Die Spannungsänderungen sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

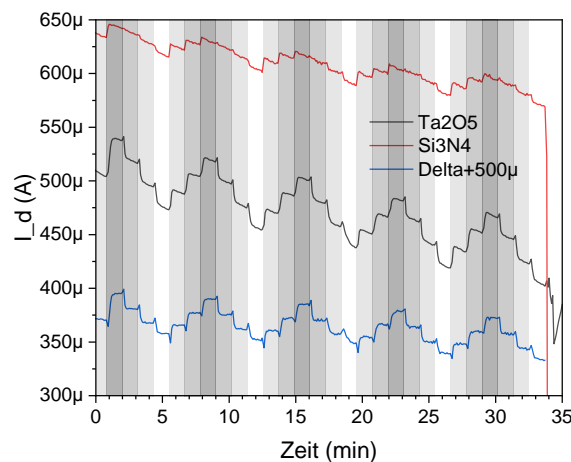
Betrachtet man die Kennlinienverschiebung im Detail (Abbildung 3.16) wird deutlich, dass sich die beiden Sensoren in ihrem Driftverhalten qualitativ kaum unterscheiden. Dieses wurde mit einem späteren Experiment genauer untersucht (siehe Text zu Abbildung 3.17). Was die Sensitivität angeht, kann jedoch durch die Beschichtung mit Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> eine deutliche Verbesserung erreicht werden. Um diese quantitativ zu erfassen, wurden die Werte für die Kennlinienverschiebung erfasst und sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

**Tabelle 3.4:** Spannungsänderungen im pH-Test aus Abbildung 3.16.

pH-Schritt	$\Delta V_c$ Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	pH-Steilheit	$\Delta V_c$ Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	pH-Steilheit
7-4	-	-	449 mV	59.0 mV/pH
4-7	-	-	485 mV	64.7 mV/pH
7-10	236 mV	35.8 mV/pH	440 mV	58.7 mV/pH
10-7	209 mV	31.7 mV/pH	396 mV	52.8 mV/pH
7-4	115 mV	17.4 mV/pH	476 mV	63.5 mV/pH
4-7	124 mV	18.8 mV/pH	472 mV	63.0 mV/pH
Mittelwert	171 mV	25.9 mV/pH	453 mV	60.3 mV/pH

Im Vergleich zu den vorhergehenden Messungen der Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-Schicht (siehe Tabelle 3.3) fällt eine deutliche Abnahme der Sensitivität im Mittel von 73 mV/pH auf 25.9 mV/pH auf. In beiden Messungen wurde der verstärkende Faktor von 2.2 durch den Spannungsteiler

berücksichtigt. In der vorhergegangenen Messung waren offene BPSG-Ätzflanken noch als Grund für extreme Drifteffekte identifiziert worden (siehe Abbildung 3.12), welche in dieser Messung durch die Abdeckung mit  $Ta_2O_5$  keinen Einfluss mehr haben. Da es sich bei ISE1 um eine PECVD- $Si_3N_4$ -Schicht handelt, ergibt die geringere Sensitivität von 25.9 mV/pH auch durchaus Sinn. So sollte das PECVD- $Si_3N_4$  ursprünglich als REFET zur Driftreduktion verwendet werden, wo eine geringere pH-Abhängigkeit von Vorteil ist. Für ISE2 mit der zusätzlichen  $Ta_2O_5$ -Schicht sinkt der Wert von  $C_1$ , somit steigt der Faktor für die Kennlinienverschiebung  $\frac{C_1+C_2}{C_1-C_2}$  auf 2.5. Die gemessenen Daten zeigen eine mittlere pH-Sensitivität von 60.3 mV/pH, welche im Rahmen der Messungenaugigkeit dem Nernst'schen Potential von 59 mV/pH bei Raumtemperatur entspricht. Um die Drift für beide Sensoren zu bestimmen, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Dazu wurde der Drainstrom  $I_d$  der Sensoren bei konstanten Spannungen  $V_d$ ,  $V_C$  und  $V_{REF}$  aufgezeichnet, während der Puffer ca. alle 60 s gewechselt wurde. Für dieses Experiment wurde Phosphatpuffer nach Sörensen mit den pH-Werten 5, 6, 7 und 8 verwendet (siehe Kapitel 2.4.1). Abbildung 3.17 zeigt die Ergebnisse der beiden Sensoren mit  $Ta_2O_5$  bzw.  $Si_3N_4$ . Auffällig ist der deutlich höhere Drift bei ISE1 mit  $Si_3N_4$ . Das nahezu driftfreie Verhalten aus den vorangegangenen Ergebnissen (siehe Abbildung 3.11) mit den ISE1-Sensoren aus der früheren Produktionscharge konnte nicht reproduziert werden.

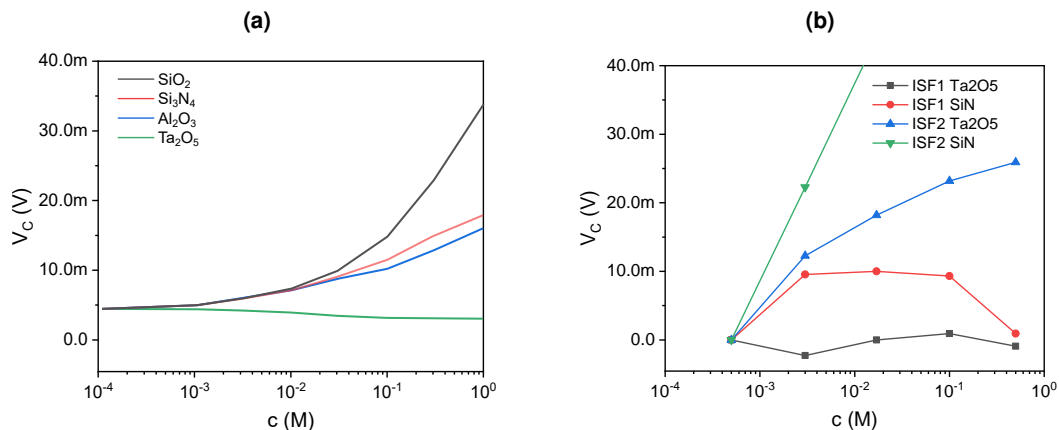


**Abbildung 3.17:** Messung zur Bestimmung des Driftverhaltens der beiden Sensorschichten  $Ta_2O_5$  (schwarz) und PECVD- $Si_3N_4$  (rot). Dargestellt ist der Drainstrom bei konstanter  $V_{REF}$  und  $V_C$ . Zusätzlich ist die Differenz aus den beiden Kurven (blau) in positive Richtung verschoben (zur besseren Darstellbarkeit). Dafür wurden Phosphatpuffer mit pH 5 (dunkelgrau), pH 6 (grau), pH 7 (hellgrau) und pH 8 (weiß) durch die Kammer geleitet. Bei Minute 34 wurde die Kammer mit Luft gespült.

Diese Anordnung aus  $Si_3N_4$ - und  $Ta_2O_5$ -Sensor kann als ISFET-REFET Kombination benutzt werden, um die beschriebenen Drifteffekte zu minimieren. Die Differenz der beiden

Sensorsignale weist bei bleibend hoher Signalauflösung ein geringeres Driftverhalten auf. Durch die Beschichtung mit  $Ta_2O_5$  konnte im Großen und Ganzen die Sensitivität erhöht und der Einfluss von Drifteffekten verringert werden.

Für den Einsatz in der Echtzeitmessung von Amplifikationsprozessen ist jedoch auch die Querempfindlichkeit zur Leitfähigkeit wichtig. Zwar sollte sich die Änderung der Leitfähigkeit im zeitlichen Verlauf nicht von der pH-Änderung unterscheiden, da beide Parameter von der Erzeugung von doppelsträngige DNA (dsDNA) abhängen. Im schlechtesten Fall würden sich diese Sensoreffekte jedoch gegenseitig aufheben. Daher wurde im folgenden Experiment die Querempfindlichkeit der FG-ISFETs zur Leitfähigkeit untersucht. Dazu wurden pH 7 Phosphatpuffer mit verschiedenen Konzentrationen an NaCl angesetzt und die Kennlinien der Sensoren in diesen Pufferlösungen gemessen. Abbildung 3.18b zeigt die Änderungen der Kennlinienverschiebung in Bezug auf die Messung in 0.5 mM NaCl Konzentration (bereinigt um die Verstärkung durch den kapazitiven Spannungsteiler). Zum Vergleich dazu ist in Abbildung 3.18a eine Vergleichsmessung für verschiedene ISFET-Sensormaterialien aus der Literatur [80] mit derselben Skalierung dargestellt.



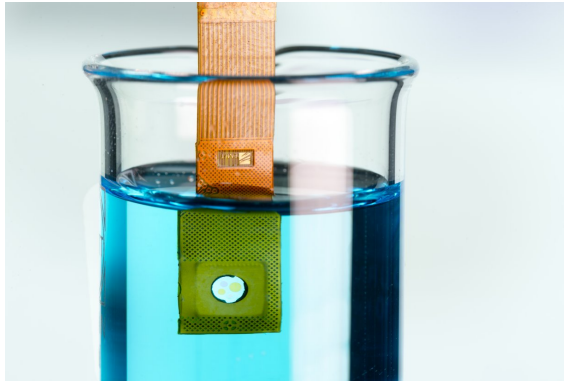
**Abbildung 3.18:** Um die Querempfindlichkeit der FG-ISFETs zur Leitfähigkeit zu testen, wurden die Kennlinien in verschiedenen pH 7 Phosphatpuffern gemessen, welchen eine unterschiedliche Konzentration an NaCl beigemischt war (x-Achse). (a) zeigt die Referenzdaten eines Vergleichs aus der Literatur [80], (b) die Verschiebung der Kennlinie ohne eine Bereinigung der Verstärkung durch den kapazitiven Spannungsteiler (Faktor 2.2).

Die Bedeckung mit  $Ta_2O_5$  führt für ISE1 zu einer Reduktion der Querempfindlichkeit um 100 %. Bei ISE2 führt die Beschichtung mit  $Ta_2O_5$  ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Querempfindlichkeit. Die Tatsache, dass es sich bei der Variante ISE2 (LPCVD- $Si_3N_4$ ) um eine starke lineare Abhängigkeit zur NaCl Konzentration handelt, stützt die Vermutung, dass Ionendiffusion in die BPSG-Ätzflanke der Grund für die Drift-

effekte ist (vergleiche Abbildung 3.12). Die immer noch zu hohe Signalabhängigkeit von der Leitfähigkeit bei ISE2, der mit 50 nm Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> beschichtet wurde, legt nahe, dass die Kantenabdeckung nicht vollständig erfolgt ist. Eine weitere Untersuchung der Kantenabdeckung mittels FIB-REM bzw. eine Erhöhung der abgeschiedenen Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Schichtdicke steht noch aus. Trotz der noch hohen Drift wurden diese Sensoren mit dem vorliegenden Fertigstellungsgrad in der Echtzeitmessung der LAMP-Reaktionen verwendet (Ergebnisse siehe Kapitel 3.3).

### 3.2 Systemintegration

Um die Sensoren in die Umgebung einer biochemischen Pufferlösung bringen zu können, muss sichergestellt werden, dass nur die aktive Sensorfläche in Kontakt mit der Flüssigkeit kommt. Andere aktive Bereiche auf dem Sensorchip und insbesondere elektrische Kontaktstellen müssen vor dem Kontakt mit leitfähigen Flüssigkeiten geschützt werden. In der AVT kommen verschiedene Lösungen zum Einsatz, welche das Eindringen von Flüssigkeit in die elektrischen Bereiche verhindern sollen. Bevor elektrochemische Sensoren in Industrie und im Consumerbereich eingesetzt werden konnten, stellten das Haupthindernis die Probleme dar, die bezüglich der AVT gelöst werden mussten [139, 140]. Der meistverwendete Ansatz dafür war und ist der Verguss der zu schützenden Bereiche mit einem Kunststoffharz. Der Chip wird auf eine Leiterplatte aufgeklebt, die Kontakte werden per Drahtbond verbunden und die Drähte anschließend vergossen [141]. Für die Herstellung von pH-Sonden, die auf der ISFET-Technologie basieren wurde dafür ein komplizierter mehrstufiger Verguss-Prozess entwickelt [142]. Der Zeitpunkt dieser Entwicklung, circa 25 Jahre nach der Erfindung des ISFETs, zeigt die Komplexität und Schwierigkeit dieses Problems. Schon im Design der Bauteile wurde auf die Herausforderungen für den Verguss Rücksicht genommen. Durch Ätzverfahren stellte die Gruppe um Bergveld einen ISFET mit einer erhöhten Sensorfläche her [143], um das Kriechen der Vergussmasse auf die Sensorfläche zu verhindern. Schon früh wurden Bauteile vorgeschlagen, deren elektrische Kontakte auf der Rückseite sitzen [141], was den Prozess erheblich vereinfachen würde. Am Fraunhofer EMFT wurde ein ChemFET vorgestellt, der die elektrisch aktiven Bereiche und die Sensorfläche auf Vorder- und Rückseite des Chips aufteilt [77]. Für diesen Fall sind jedoch Durchkontaktierungen erforderlich, welche einen enormen Kostenaufwand in der Sensorfertigung bedeuten.



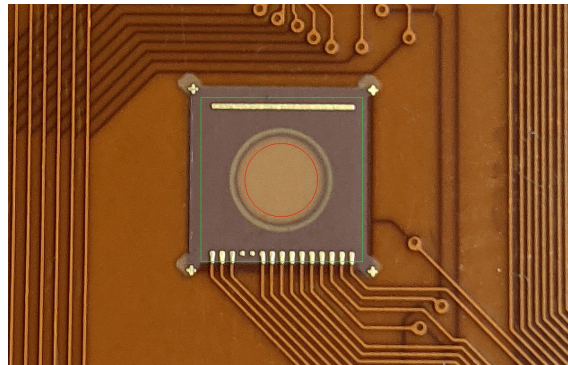
**Abbildung 3.19:** FG-ISFET als Eintauchsensoren in einem in diesem Kapitel beschriebenen Folienpackage. Die flexible Leiterplatte trägt die elektrischen Kontakte zum Sensor. Kontaktierung und Abdichtung erfolgen über einen Thermokompressionsbond auf eine Folienplatine mit Lochaussparung für die Sensorfläche (© Bernd Müller, Fraunhofer EMFT).

Einfachere Lösungen, die sich die Vorteile von flexiblen Leiterplatten zu Nutze machen, wurden ebenfalls bereits in der Vergangenheit angedacht [144] und entwickelt [145]. Dabei wurde eine flexible Leiterplatte mit einer Öffnung von oben auf den Sensor geklebt, die elektrische Kontakte durch Anpressen realisiert. Die Klebung basierte hier jedoch ebenfalls auf einem Verguss mit flüssigem Kunststoffharz, welches den Prozess nur schwer reproduzierbar und aufwändig in der Durchführung machte. In der Industrie wurden für die Verklebung von ungehäuteten Chips bereits in den 90er Jahren anisotrop leitfähige Klebefilme (ACF) entwickelt [146]. Diese beinhalten vergoldete Mikropartikel, welche beim Verpressen des Films leitfähige Pfade in vertikaler Richtung bilden. Der Einsatz eines solchen Films erlaubt eine Herstellung eines solchen Sensor-Packagings ohne die Unwägbarkeiten beim Einsatz von Flüssigkleber. Am Fraunhofer EMFT wurde dieses „Sensor-on-hole“ Package für den Einsatz von Drucksensoren in Strömungskanälen entwickelt [147] und patentiert [148]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Ansatz weiterentwickelt, um den Sensor zusätzlich hermetisch abzudichten und so den Einsatz in Flüssigkeiten zu ermöglichen.

### 3.2.1 Sensor Packaging

Für das Packaging der Sensoren wurde eine hybride Lösung entwickelt [149]. Die Vorteile der flexiblen Leiterbahntechnologie wurden auf das Packaging von Festkörperbauteilen angewandt, die Methode für beide Sensoren, den FG-ISFET und den IDT, entwickelt und erfolgreich eingesetzt. Abbildung 3.21 zeigt den Schichtaufbau des Packaging schematisch.

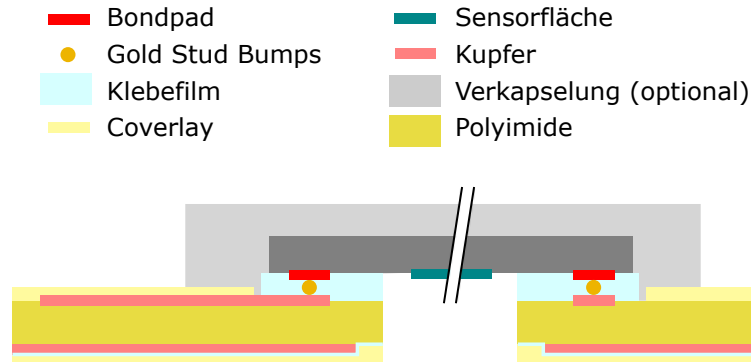




**Abbildung 3.20:** Foliensplattine für die Durchführung des Packagingprozesses. Der grüne Kasten markiert die Außenmaße des Sensorchips, der rote Kreis die Schnittlinie des Lasers. Die Besonderheiten im Lagenaufbau von oben nach unten sind die Aussparung im Coverlay, sodass der Chip nicht auf dem Coverlay aufliegt, in der oberen Metallisierungsebene die Bondpads, die Justagekreuze in den Ecken des Chips für das Alignmentsystem des Flip-Chip-Bonders und eine Leiste für das korrekte horizontale Leveling des Chips. In der unteren Metallebene die Metallfläche für den Lichtschutz und ein Guardring um Potentialeintrag in die Flüssigkeit zu verhindern.

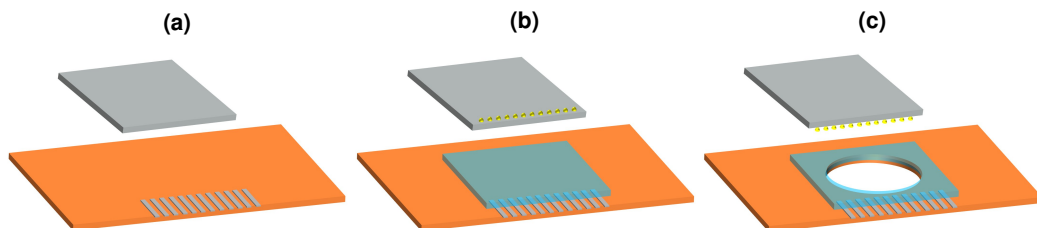
Grundlage dafür bildet eine flexible Leiterplatte, die in einem Pooling Service in 2-Lagen Ausführung hergestellt wurde. Auf der oberen Seite befinden sich die elektrischen Kontakte für den Sensorchip. Diese sind in der exakt gleichen Geometrie wie auf dem Sensor ausgeführt. Im Bereich des Sensorchips ist die Coverlay Passivierung freigestellt. Auf der Unterseite ist das Metall flächig ausgeführt. Da beide Sensoren nur mit einer Metalllage ausgeführt sind, wirkt diese Metallfläche auf der Unterseite als lichtschützender Schild. Abbildung 3.20 zeigt den Bondbereich der Foliensplattine für einen FG-ISFET. Die Anschlüsse für die Temperaturdiode sind nicht angeschlossen. Rot ist die Schnittlinie für den Laser eingezeichnet, die grüne Linie zeigt die Außenabmessungen des Chips. In der oberen Metalllage sind die Justagekreuze für den Flip-Chip-Bond in den Ecken der Coverlay-Aussparung sichtbar, gegenüber den Bondpads eine Metallleiste zum horizontalen Höhenausgleich des Chips. In der unteren Metalllage wird die Schnittlinie von einem floatenden Metallring umgeben. Dieser erhöht zum einen die Abdichtung zwischen Coverlay und Folie, zum anderen verhindert er Leckströme in die Flüssigkeit von der Metallfläche, die zur Lichtabdeckung vorhanden ist. Zwischen Sensor und flexibler Leiterplatte wirkt der ACF als Klebeverbindung. Die elektrischen Kontakte werden zusätzlich über Gold Stud Bumps sichergestellt. Von der Unterseite her entsteht eine hermetische Abdichtung gegen Flüssigkeiten bei niedrigem Druck. Zwischen Coverlay auf der Oberseite und Sensor bleibt ein kleiner offener Rand. Soll das Package auch in Hochdruckanwendungen zum Einsatz kommen muss der Sensor noch zusätzlich vergos-

sen werden. Mit dem zusätzlichen Verguss ist auch die Oberseite flüssigkeitsdicht, sodass die Konfiguration auch als Eintauchsensor verwendet werden kann (Abbildung 3.19).



**Abbildung 3.21:** Der Schichtaufbau des Packings nach der Fertigstellung. Die Bondpads erhalten den elektrischen Kontakt zum Kupfer auf dem FLEX-PCB über die Gold Stud Bumps. Der Klebefilm dichtet den Chip zur Folie hermetisch ab. Für Eintauchanwendungen ist aufgrund des Spalts zwischen Sensor und Coverlay an der Oberseite ein zusätzlicher Epoxy-Verguss notwendig.

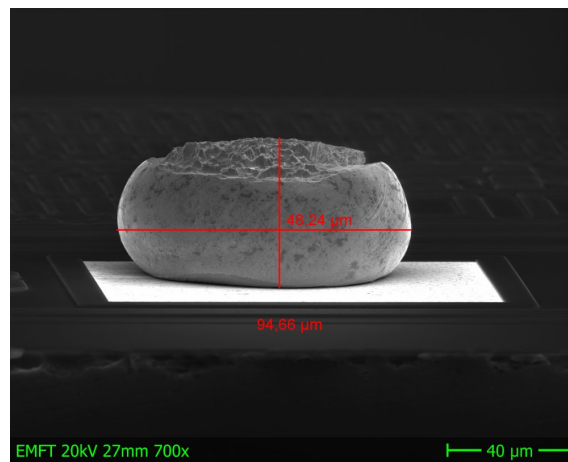
Abbildung 3.22 zeigt schematisch den Ablauf der Herstellung. Im ersten Schritt (a) liegen beide Komponenten, Folie und Chip, mit geometrisch passenden Kontakten vor. Im zweiten Schritt (b) werden die Bondpads des Sensorchips verstärkt, beispielsweise mit Gold Stud Bumps, und ein ACF in der Größe des Sensorchips auf die flexible Leiterplatte laminiert. Im dritten Schritt (c) wird per Ultrakurzzeitlaser ein Loch für die aktive Sensorfläche in die Leiterplatte geschnitten. Anschließend kann der Chip per Thermokompressionsverfahren aufgebracht werden.



**Abbildung 3.22:** Der Ablauf des Packings schematisch dargestellt. Im ersten Schritt (a) wird die Leiterplatte gemäß der Sensorgeometrie gefertigt, im zweiten Schritt die Bondpads verstärkt und der Klebefilm auf das FLEX-PCB laminiert. Im dritten Schritt (c) wird das Loch für die Sensorfläche gelasert bevor der Thermokompressionsbond erfolgt.

Die Verstärkung der Kontakte auf dem Chip wurde mit Gold Stud Bumps ausgeführt,

kann jedoch auch galvanisch erfolgen. Auf beiden Komponenten liegt dadurch eine Erhöhung der Kontakte gegenüber dem Substrat vor. Für die Lötkontakte auf der flexiblen Leiterplatte ergibt sich aus dem Basiskupfer (17  $\mu\text{m}$ ), der Durchkontaktierung (20  $\mu\text{m}$ ), der Nickelsperrschicht (5  $\mu\text{m}$ ) und dem Goldfinish (100 nm) eine Enddicke von ca. 42  $\mu\text{m}$ . Die Gold Stud bumps auf der Chip sind ca. 50  $\mu\text{m}$  dick (siehe Abbildung 3.23). Im Falle des FG-ISFETs bestehen die Bondkontakte aus Aluminium. Die Ausbildung einer intermetallischen Gold-Aluminium-Legierung führt in der AVT häufig zum Abreißen von Aluminium-Zuleitungen. Um die Ausbildung dieser sogenannten „Purpurpest“ zu verhindern, wurden die Pads mit einer 10 nm dicken Titanwolfram-Schicht und anschließend 150 nm Gold besputtert. Die Ausformung des Gold Stud Bumps erfolgte unter Verwendung eines 25  $\mu\text{m}$  dicken Golddrahts. Ein Ball-Wedge-Bond wurde durchgeführt, wobei der Wedge zum Ball um 50  $\mu\text{m}$  in die Ausführungsrichtung verschoben war. Im Schichtaufbau ergeben beide Erhöhungen zusammen eine Höhe von 80  $\mu\text{m}$ , die durch den Klebefilm gefüllt werden müssen, um eine hermetische Abdichtung zu erreichen. ACFs werden bis zu einer Maximaldicke von 40  $\mu\text{m}$  gefertigt. Für diese Anwendung wurde ein Hitachi Chemicals AC-246J verwendet, der auch unter dem Markennamen „Anisolm“ bekannt ist. Es ist ein Kunststoffharz-basierter Klebefilm, welcher mit goldbeschichteten Kunststoffpartikeln einer Größe von 3  $\mu\text{m}$  versetzt ist. Er wird auf einer 50  $\mu\text{m}$  dicken PET Laminierfolie ausgeliefert. Der Klebefilm wird bei 90 °C auflaminiert. Nach dem Laserschnitt wird die Laminierfolie entfernt. Der Bondvorgang wird standardmäßig bei 200 °C und einem Anpressdruck 200 MPa für 10 s durchgeführt. Bei einer Bondpadgröße von ca. 150  $\mu\text{m}$  sollte der Bondkopf die Komponenten also mit einer Kraft von 4.5 N verpresst werden.



**Abbildung 3.23:** Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme eines Gold Stud Bumps. Nach dem Setzen besitzt er eine Höhe von 48  $\mu\text{m}$ , welche durch einen Levelingschritt auf ca. 25  $\mu\text{m}$  gecoint wird.

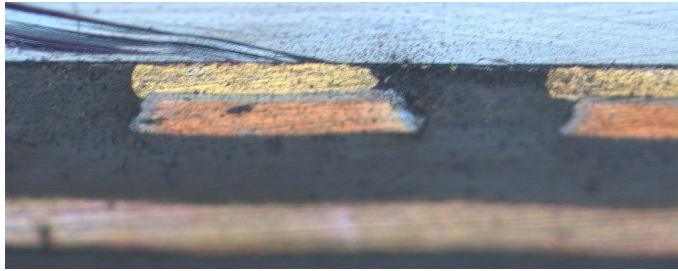
Das Bonden des Chips auf der flexiblen Leiterplatte per Thermokompressionsverfahren

wurde auf einer Panasonic FCB3 durchgeführt. Für die ersten Tests wurden IDTs verwendet. Bei den Glassubstraten konnte die Abdichtung optisch mit dem Mikroskop bewertet werden. Erwartungsgemäß reichte der Einsatz der Standardparameter für eine hermetische Abdichtung nicht aus. Im Bereich der Bondpads konnte der Klebefilm die Lücke zwischen Sensorchip um Polyimidfolie nicht auffüllen. Um dies zu erreichen, wurden drei Maßnahmen getestet. Zuerst das Laminieren von zwei Lagen ACF, um eine Klebefilmstärke von 80  $\mu\text{m}$  zu erreichen. Weiter wurde ein zusätzlicher Coining Schritt eingeführt. Dabei wird der Sensorchip nach Aufbringen der Stud Bumps mit bis zu 100 N auf eine planare Fläche gedrückt, um diese abzuflachen. Zusätzlich wurden alle Parameter für den Thermokompressionsschritt variiert, um eine möglichst gute Abdichtung zu erreichen. Das beinhaltet den Anpressdruck, die Bondtemperatur und die Bonddauer. Der Ansatz mit einer doppellagigen Klebeschicht erreichte zwar eine fluidische Abdichtung, wurde jedoch verworfen, da der Kleber 200  $\mu\text{m}$  in die Sensoröffnung gedrückt wurde. Durch das Coining konnte die Höhe der Stud Bumps auf weniger als 40  $\mu\text{m}$  reduziert werden (siehe Abbildung 3.24). Die idealen Parameter für einen Bond, der auch fluiddicht war, sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

**Tabelle 3.5:** Bondparameter.

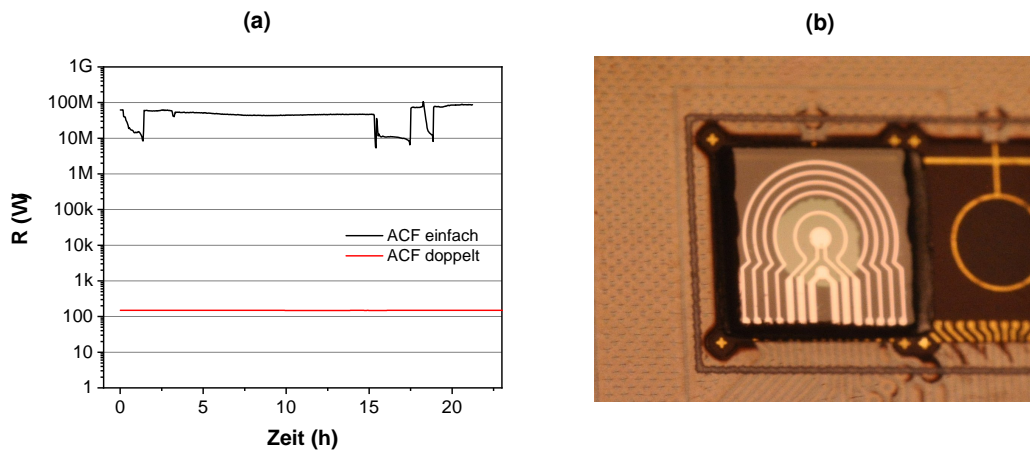
	Verwendete Parameter	Empfohlene Parameter
Levelling	100 N	
Anpressdruck	25 N	5 N
Bondtemperatur	280 °C	200 °C
Bondzeit	20 s	10 s

Abbildung 3.24 zeigt einen Querschnitt durch einen Thermokompressionsbond, der mit einem FG-ISFET durchgeführt wurde. Von der unteren Bildseite aufwärts gehend sind die einzelnen Schichten und Komponenten zu erkennen: die untere Metalllage der flexiblen Leiterplatte (kupferfarben), das Polyimid-Substrat (dunkelgrau), den Bondbereich und der Sensorchip (Silizium, silberfarben). Zwischen Polyimidsubstrat und Siliziumchip befinden sich die Bondkontakte und der mit ACF gefüllte Zwischenraum. Die Bondkontakte bestehen aus dem Lötkontakt (kupferfarbenen das Basiskupfer, silbern die Nickelsperrschicht) und dem auf etwa 30  $\mu\text{m}$  Höhe geplätteten Gold Stud Bump.



**Abbildung 3.24:** Mikroskopaufnahme eines Querschnitts durch den Bond. Von unten nach oben: Bottom-Lage, PI Substrat, Kupfer Top-Lage, Stud Bump (geoint), Siliziumchip. Zwischen den Kontakten befindet sich der Klebefilm als Füllmaterial.

In der Exposition des Sensors in Flüssigkeiten sind nur die flexible Leiterplatte, die Sensoröffnung und der dort vorhandene Kleberand mit dem Medium in Kontakt. Um etwaiges Eindringen von Lösungen in den Kleberegion zu untersuchen, wurde ein IDT verwendet, der aus sechs konzentrischen Kreisen besteht (Abbildung 3.25b). Über einen Zeitraum von 24 Stunden wurde dieser gepackte Testchip in 0.1 M KCl-Lösung gelagert und der Widerstand zwischen den zwei mittleren der vier außen liegenden Ringen gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.25a dargestellt. Die schwarze Kurve bleibt während der ganzen Zeit über einem Wert von 10 M $\Omega$ . Die Änderungen können auf Messungenauigkeiten zurückgeführt werden, da die fließenden Ströme bei diesen hohen Widerständen sehr nah an der unteren Messgrenze des verwendeten Multimeters liegen. Auffallend war, dass der Testchip, der mit zweilagigem ACF gebondet worden war, eine hohe Leitfähigkeit zwischen den Ringen aufwies: unter 200  $\Omega$  bei einem Abstand von 200  $\mu\text{m}$ . Erklärt werden kann dies nur durch das Ausbilden von leitfähigen Pfaden zwischen den Ringen durch die im ACF enthaltenen Partikel. Werden die Klebefilme auf dieselbe Enddicke verpresst, so bedeutet eine Verwendung von zwei Lagen ACF einer Verdoppelung der Konzentration dieser Partikel, was diese Annahme wahrscheinlich macht.



**Abbildung 3.25:** Für die Messung der Dichtigkeit wurde ein Testchip (b) gebondet und der Widerstand mit einem Impedanzanalysator gemessen, während das Package 24 h in Salzlösung verweilte (a). Die Verwendung von doppellagigem ACF erlaubte zwar geringere Anpressdrücke, führte jedoch durch eine Konzentration der leitfähigen Partikel zu Leitungspfaden zwischen den Ringstrukturen und damit einem Widerstand im Bereich  $100\ \Omega$ .

Die vorgestellte AVT ermöglicht ein hermetisch dichtes Packaging bei einer geringen Bauhöhe und nahezu flachem fluidischen Interface. Der Einsatz der Sensoren im Boden einer 192er Wellplatte (siehe Abbildung 3.1) ist mit dieser Methode realisierbar. Eine kürzlich an der TU München veröffentlichte Arbeit zeigt dieses Konzept in einer Abwandlung mit einer Integration der Sensoren und der zugehörigen Auswerteelektronik für eine 24er Wellplatte [150]. Durch eine Erhöhung der Lagenanzahl und der Verwendung von Blind Vias könnte ein ähnlicher Aufbau für eine 96er Platte mit den vorhandenen Sensoren realisiert werden.

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Folienplatine gefertigt, auf welche 8 Sensoren aufgebracht werden können. Diese wurden in einer Reihe angeordnet auf einem Raster von 9 mm. Als Reaktionsgefäße wurden PCR-Tube-Streifen mit demselben Raster verwendet. Der Boden der Tubes wurde abgeschnitten und die Gefäße auf die Folienplatine geklebt. Aufgrund der schlechten Klebeeigenschaften der Tube-Streifen (Material Polypropylen) kam ein spezieller Sekundenkleber von Henkel, der Loctite® 424 in Verbindung mit dem Primer Loctite® SF 777 zum Einsatz. Das Ergebnis war zufriedenstellend für die Durchführung von zwei bis drei Versuchen. Bei mehrmaligem Aufheizen und mechanischer Belastung löste sich die Klebestelle, was zu undichten Reaktionsgefäßen führte (siehe Abbildung 3.44). Praktischerweise konnten zugehörige PCR Cap Strips zum luftdichten Verschließen der Reaktionsgefäße verwendet werden.

### 3.2.2 Auswerteschaltungen

Der FG-ISFET stellt einen Impedanzwandler zur Messung von hochohmigen Potentialen in Flüssigkeiten dar. Eine Möglichkeit, diese Potentiale zu messen, ist das Ausgangssignal der integrierten OPs mit einer Verstärkung von 1 direkt an einen Analog-Digital-Converter (ADC) anzuschließen. Eine höhere Flexibilität wird durch die Messung über die MOSFETs erreicht. In der Praxis kommen zur Messung von ISFETs häufig Source-Drain-Follower zum Einsatz [75]. Dabei wird die Drainspannung und der Drainstrom konstant gehalten und die resultierende Spannung an der Referenzelektrode gemessen. Diese ist dann linear zum pH-Wert. Alternativ werden die Spannungen auf einen festen Wert eingestellt und der Drainstrom gemessen. Der Einsatz eines Source-Drain-Followers hat Vorteile, wie die Linearität des Sensorsignals und der einfachen Umsetzbarkeit einer Spannungsmessung. Für den FG-ISFET gibt es dabei mehrere Optionen, welche kurz diskutiert werden sollen. Der Drainstrom hängt von der Drainspannung und dem Potential ab, welches auf dem Floating-Gate vorhanden ist (siehe Gleichung 2.1). Dieses ist kapazitiv sowohl an das Potential der Control-Elektrode, als auch das Potential der Flüssigkeit, welches durch die Referenzelektrode vorgegeben ist, gekoppelt.

#### a) Festes Potential an der Control-Elektrode, Regelung über die Referenzelektrode

Wie bereits erwähnt, kann die Control-Elektrode dazu genutzt werden, Ungleichheiten in der Ladungsträgerbelegung des Floating-Gate zwischen verschiedenen FG-ISFETs auszugleichen. In diesem Fall verhält sich der FG-ISFET wie ein normaler ISFET mit der einen Einschränkung, dass es zu einer kapazitiven Dämpfung des Sensorsignals kommt.

#### b) Festes Potential an der Referenzelektrode, Regelung über die Control-Elektrode

Hierbei verhält es sich analog zu der unter a) beschriebenen Konfiguration. In manchen Anwendungsfällen mag es vorteilhaft sein, die Referenzelektrode auf das Ground-Potential zu legen. Ein weiterer Unterschied ist die Möglichkeit sich in dieser Anordnung die Kondensatoren als Signalverstärker zu Nutze machen zu können. Angenommen, die Schichtdicken der Isolatoren in  $C_1$  und  $C_2$  werden so gewählt, dass  $C_1$  doppelt so groß ist, wie  $C_2$ . Der Source-Drain-Follower regelt die Control-Elektrode so, dass sich das Potential am Floating-Gate nicht ändert. Kommt es aufgrund einer pH-Änderung zu einer Änderung im Flüssigkeitspotential  $\Delta V$ , so muss an der Control-Elektrode die Spannung um  $2\Delta V$  geregelt werden. Das Ausgangssignal wird also im Vergleich zu einem konventionellem ISFET um den Faktor 2 verstärkt.

### c) Referenzelektrode und Control-Elektrode kurzgeschlossen

Hierbei wird die Regelspannung in gleicher Weise auf die Referenz- und die Control-Elektrode ausgegeben. Die Kennlinie eines FG-ISFETs in dieser Konfiguration ist durch die Ladungsträger auf dem Floating-Gate und das einfließende chemische Potential in der Einsatzspannung  $V_{th}$  verschoben. Die kapazitive Dämpfung ist hier ebenfalls zu beachten.

#### 3.2.2.1 FG-ISFET Regelschaltung

Im Rahmen der Arbeit wurde eine Regelschaltung aufgebaut, welche in Abbildung 3.26 schematisch dargestellt ist. Sie besteht aus zwei Teilen. Den ersten Teil (links) bildet eine Differenzverstärkerschaltung, dessen Eingangsspannungen kurzgeschlossen sind. Der Drain des FG-ISFETs ist an den negativen Eingang des OPs angeschlossen, sodass durch DAC1 die Drainspannung

$$V_{ds} = V_{DAC1} \frac{R_2}{R_1} \quad (3.1)$$

eingestellt werden kann, ohne dass  $V_{DAC1}$  auf die Ausgabespannung des OPs wirkt. Diese Ausgabespannung  $V_1$  entspricht dem Drainstrom, da der OP zusätzlich als Transimpedanzverstärker wirkt:

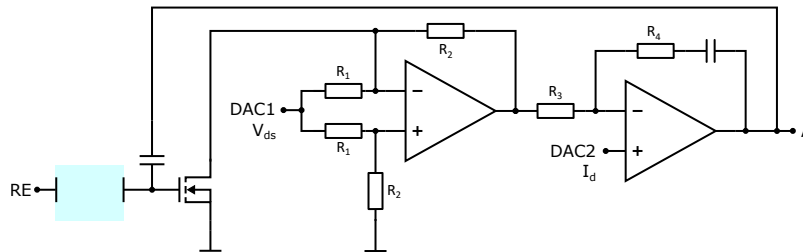
$$V_1 = R_2 I_d \quad (3.2)$$

Der rechte Teil ist ein PI-Regler, welcher über die Spannung von DAC2 den Drainstrom einstellt gemäß:

$$I_d = \frac{V_{DAC2}}{R_2} \quad (3.3)$$

Source ist an Masse angeschlossen. An der Referenzelektrode liegt ein fester Wert an. Die Ausgabespannung am Punkt A ( $V_{Control}$ ) liegt zudem an der Control-Elektrode an. Ändert sich die Spannung am Sensor  $V_g$  um einen Wert  $\Delta V$ , so regelt die Schaltung  $V_{Control}$  um den Wert  $\frac{C_1}{C_2} \Delta V$ , sodass die vorangegangenen Werte für Drainstrom und Drainspannung wieder erreicht sind. Somit kann  $\frac{C_1}{C_2}$  als kapazitive Verstärkung der pH-Spannung genutzt werden.



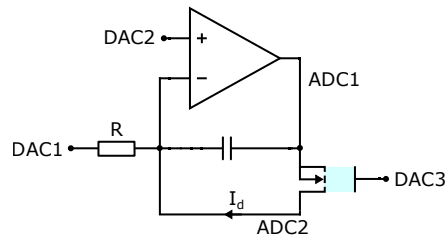


**Abbildung 3.26:** Die FG-ISFET Regelschaltung besteht aus zwei Teilen. DAC1 legt die Drainspannung am Differenzverstärker fest, der gleichzeitig als Transimpedanzverstärker wirkt. DAC2 dient zur Einstellung des Drainstroms über einen PI-Regler. Die Spannung  $V_A$  ist die Regel- und Ausgabespannung. Sie wird zurück auf die Control-Elektrode geführt. Erfolgt über  $C_1$  eine Spannungsänderung muss die Spannung  $V_A$  an der Control-Elektrode um den Faktor  $\frac{C_1}{C_2}$  nachgeregelt werden, was zu einer Verstärkung des Signals führt [91].

Die vorgestellte Schaltung lieferte erwartungsgemäße Werte, solange der Sensor in Luft vermessen wurde. Für den Fall also, in dem über  $C_1$  keine Spannung an das Floating-Gate gekoppelt ist. Auch in Flüssigkeiten wurde die Schaltung verwendet (siehe Abbildung 3.13). Aus ungeklärten Gründen übersteuert die Regelung hier häufig in positiver Richtung. Als Ursache wäre denkbar, dass bei einer Verwendung in Luft  $C_1$  gegen Null geht und somit die Transkonduktanz höher ist als bei der Verwendung in Flüssigkeit. Für die in Kapitel 3.3 gezeigten Ergebnisse wurde zum Teil ein modularer DC Source Monitor verwendet. Leider konnte das Verhalten der Regelschaltung anhand von Schaltungssimulationen nicht vollständig nachvollzogen werden. Eine Anpassung des Arbeitsbereichs hin zu geringeren Strömen brachte ebenfalls nicht den erhofften Erfolg, sodass eine alternative Auswerteschaltung zur Eignungsprüfung herangezogen wurde.

### 3.2.2.2 Integriertes ISFET-Frontend

Als weitere Option zur Messung der FG-ISFET-Anordnung über den MOSFET wurde ein integriertes ISFET-Frontend auf Basis des MPS430FR2355 untersucht, welches an der TU München entwickelt wurde [150–152]. Beim MSP430FR2355 handelt es sich um einen Mikrocontroller von Texas Instruments mit einem integrierten analogen Frontend, welches aus vier sogenannten Smart-Analog-Combos (SAC) besteht. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus einem Digital-Analog-Converter (DAC) und einem OP, welche über die Firmware des Mikrocontrollers beliebig verschaltet werden können. Diese Option wird hier genutzt, um eine Regelung gemäß dem Schaltbild in Abbildung 3.27 aufzubauen [151].



**Abbildung 3.27:** Integriertes ISFET Frontend. DAC2 stellt die Drainspannung, DAC1 den Drainstrom ein. Über ADC1 und ADC2 können  $V_{ds}$  und anschließend  $I_d$  gemessen werden. Über einen Softwarealgorithmus, werden die DAC Spannungen angepasst, bis die gemessenen Werte den Sollwerten entsprechen. Die Sourcespannung ist in diesem Fall variabel.

SAC2 wird verwendet, um die Drainspannung über DAC2 einzustellen. Die Sourcespannung stellt sich über den Operationsverstärker aus SAC2 ein. SAC1 wird verwendet, um den Drainstrom über den Widerstand  $R$  festzulegen.

$$I_d = \frac{V_{DAC2} - V_{DAC1}}{R} \quad (3.4)$$

SAC3 wird verwendet, um die Spannung an der Referenzelektrode einzustellen. Über DAC2 und DAC1 werden  $V_{ds}$  und  $I_d$  festgelegt und  $V_g$  über DAC3 so eingestellt, dass die an ADC1 und ADC2 gemessenen Spannungen die Sollwerte für  $V_{ds}$  und  $I_d$  ergeben. Im Detail läuft die Messroutine wie folgt ab.  $V_g$  wird auf den kleinstmöglichen Wert  $V_g = 0$  gesetzt. DAC2 wird auf den Sollwert von  $V_{ds}$  gesetzt, DAC1 ergibt sich nach dem Sollwert für  $I_d$  aus Gleichung 3.4.  $V_s$  ist ein freier Parameter, welcher sich durch die Rückkopplung so einstellt, dass  $V_{ds}$  und  $I_d$  den Sollwerten entsprechen. Über ADC1 und ADC2 werden  $V_d$  und  $V_s$  bestimmt und die realen Spannungen für  $V_{ds}$  und  $V_{gs}$  berechnet. Diese weichen von den Sollwerten ab, falls mit den anliegenden Werten für  $V_d$  und  $V_g$  der eingestellte Drainstrom  $I_d$  nicht erreicht werden kann. Ist dies der Fall, werden DAC2 und DAC1 um diese Abweichung nachjustiert [151].

$$V_{DAC2} = V_{DAC2} - (V_{ds,soll} - V_{ds,real}) \quad (3.5)$$

und

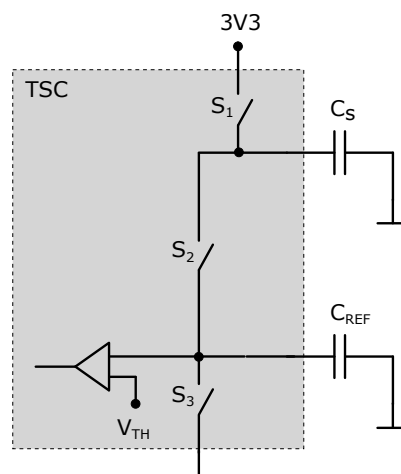
$$V_{DAC1} = V_{DAC1} - \frac{I_{d,soll}}{R} \quad (3.6)$$

Ist diese Nachjustierung nach 30 Versuchen nicht erfolgreich, wird  $V_g$  um 100 mV erhöht. Vereinfacht gesprochen wird  $V_{ds}$  solange auf dem zur Verfügung stehenden Spannungsintervall geschoben, bis die Sollwerte für  $V_{ds}$  und  $I_d$  erreicht sind. Zur Erhöhung der Genauigkeit kann der noch verfügbare SAC4 genutzt werden, um das  $V_s$  Signal zu verstärken. Die Methode ist auf den Einsatz für konventionelle ISFETs mit 3 Anschlüssen (Source, Drain und Referenz) mit möglichst wenig externen Bauteilen optimiert. Um sie auf die in

dieser Arbeit vorliegenden FG-ISFETs anzuwenden sind zwei Wege möglich, die im Folgenden als Ausblick diskutiert werden: Der erste Weg beschränkt sich auf die in Abschnitt 3.2.2c beschriebene Konfiguration. Durch Kurzschluss der Referenz und Control-Elektrode ergibt sich ein ISFET mit drei Anschlüssen, welcher mit der beschriebenen Schaltung kompatibel ist. Um jedoch die Verstärkung des Signals über den kapazitiven Spannungsteiler optimal auszunutzen, ist die unter Abschnitt 3.2.2 beschriebene Konfiguration notwendig.  $V_g$  wird in diesem Fall (2. Weg) an die Control-Elektrode ausgegeben. Durch einen Verzicht auf die Auflösungserhöhung kann SAC4 als zusätzlicher Analogausgang für die Referenzelektrode umgewidmet werden. Da diese Spannung jedoch auf das Source-Potential  $V_s$  bezogen werden muss, ist die ausgegebene Referenzspannung auf den Bereich von 0 bis  $V_{ds}$  begrenzt. Gerade beim Einsatz von FG-ISFETs, die sich durch eine starke Streuung in der Einsatzspannung von Chip zu Chip auszeichnen, birgt dies jedoch die Gefahr, dass mit der zur Verfügung stehenden Potentialwerte kein optimaler Arbeitspunkt gefunden werden kann. Ein möglicher Lösungsweg wäre, den Regelbereich für  $V_{ds}$  zu beschränken um dafür einen größeren Spielraum für die Spannung  $V_{ref}$  zu erhalten.

### 3.2.2.3 Kapazität-zu-Digital Konverter

Für eine integrierte Messung der IDKs wurde auf die STM32L4 Mikrocontrollerreihe zurückgegriffen. Diese verfügt über einen Touch Sensing Controller (TSC), welches für die Kapazitätsmessung genutzt werden kann. Abbildung 3.28 zeigt den schematischen Aufbau einer Kapazitätsmessung mit diesem Controller.



**Abbildung 3.28:** Messprinzip der Kapazität in einem STM32L4. Durch wiederholte Ladungsübertragung vom Sensor  $C_S$  auf einen deutlich größeren Referenzkondensator  $C_{REF}$  über den Schalter  $S_2$  kann auf die Ladung auf dem Sensor und somit seiner Kapazität geschlossen werden.

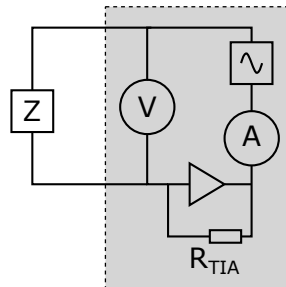
Über einen Schalter  $S_1$  wird eine Ladung  $Q$  auf den kapazitiven Sensor  $C_S$  gebracht und anschließend über den Schalter  $S_2$  auf einen Referenzkondensator transferiert. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis am Referenzkondensator  $C_{REF}$  ein Spannungswert  $V_{TH}$  erreicht wird. Die Kapazität des Sensorkondensators errechnet sich dann aus

$$C_S = -\frac{C_{REF}}{N} \ln \left( 1 - \frac{V_{TH}}{3.3 \text{ V}} \right). \quad (3.7)$$

Das Prinzip wird auch als Charge-Transfer-Methode bezeichnet [153, 154].

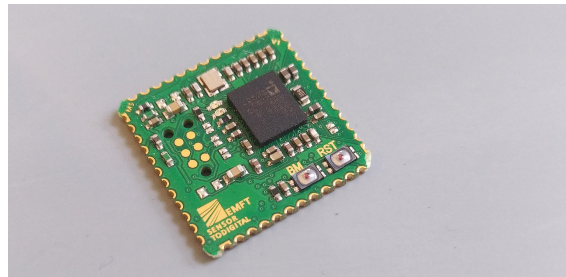
### 3.2.2.4 Integrierte Impedanzspektroskopie

Für die integrierte Impedanzmessung wurde der Analog Devices ADuCM355 eingesetzt.



**Abbildung 3.29:** Messprinzip der Impedanz bei einem ADuCM355. Ein Frequenzgenerator erzeugt einen Sinuspuls, der auf ein Messobjekt  $Z$  angelegt wird. Die Stromantwort wird mithilfe eines Transimpedanzverstärkers gemessen.

Dabei handelt es sich um ein analoges elektrochemisches Frontend mit Impedanzmessung (baugleich zum AD5940) in einem Package mit einem ARM M3 Mikrocontroller. Abbildung 3.29 zeigt das Schema für die Impedanzmessung. Ein interner Frequenzgenerator erzeugt eine Sinusspannung, welche über einen ADC gemonitort wird. Die Strommessung erfolgt über einen Transimpedanzverstärker, wobei der Wert des Transimpedanzwiderstands  $R_{TIA}$  per Softwarecode eingestellt werden kann. Die Empfindlichkeit der Strommessung ist somit einstellbar. Das macht den Chip auch für bioimpedimetrische Messungen am Menschen einsetzbar.

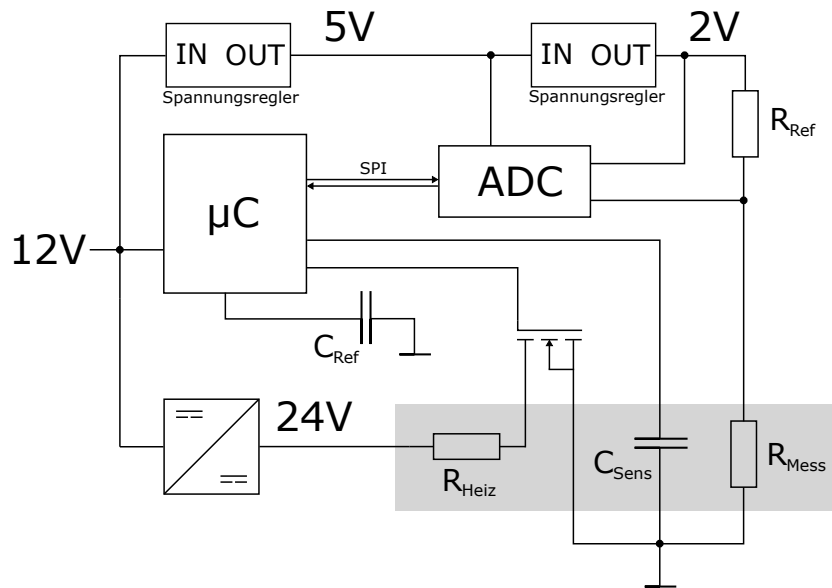


**Abbildung 3.30:** Entwickeltes ADuCM355 Modul, welches per Hand auf Testplatinen aufgelötet werden kann. Es enthält den LGA-Mikrocontroller, Oszillatoren, Taster, Entstörkondensatoren und eine Programmierschnittstelle.

Der ADuCM355 liegt als 72-Pin Land-Grid-Array (LGA) vor. Da sich die 72 Anschluss-pads auf der Chipunterseite anordnen, muss der Chip maschinell bestückt werden. Um einen schnelleren Aufbau von Prototypen zu ermöglichen, wurde das in Abbildung 3.30 dargestellte Modul entwickelt. Es handelt sich um eine 17 x 17 mm Platine mit seitlich ausgeführten Halbloch-Anschluss-pads. Darauf befindet sich der ADuCM355 Mikrocontroller, 2 externe Oszillatoren, Druckknöpfe für BOOT und RESET, Entstörkondensatoren und ein Tag-Connect Anschluss-pad für das Programmierinterface.

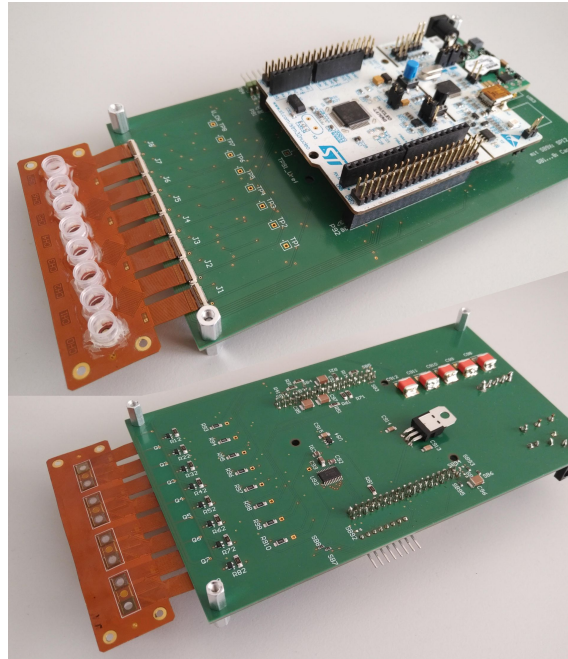
### 3.2.2.5 System zur Temperaturregelung

Die auf dem IDT vorhandenen Widerstandsmäander können zur Heizung des Chips und zur Temperaturmessung genutzt werden (siehe Kapitel 3.1.1.1). In einer vorhergehenden Arbeit wurde ein ähnliches Design bereits für die geregelte Heizung von Polymerschichten in Gassensoren verwendet [155]. Für die vorliegende Arbeit wurden die Strukturen verwendet, um die Temperatur, die für die LAMP-Reaktion erforderlich ist, einzustellen, beziehungsweise um die Temperatur bei der MCA geregelt von 65 bis 100 °C zu ändern. Dafür wurde ein Mikrocontroller-gestütztes System zur Temperaturregelung entwickelt. Zum einen erlaubt diese den Einsatz in POCT-Anwendungen, zum anderen erlaubt sie eine schnelles Regelintervall, welches für die geringe Zeitkonstante des Aufheizvorgangs im Bereich von zehntel Sekunden notwendig ist. Abbildung 3.31 zeigt den schematischen Aufbau des Geräts. Betrieben wird die Schaltung mit einer 12 V Spannungsversorgung, welche z.B. auch von einer Autobatterie kommen kann. Weitere Spannungslevel werden über DC-DC-Wandler (24 Volt für die Sensorheizung) und Spannungsregler (5V für den ADC) und 2 V (Spannungsreferenz für den ADC) erzeugt. Im ersten Entwicklungsschritt kam ein Evaluationsboard der Firma STMicroelectronics des Typs Nucleo-L476RG zum Einsatz, welches mit 12 V versorgt werden kann. Dieser Mikrocontroller wurde gewählt, da er über einen Touch Sensing Controller (TSC) verfügt, der zur Kapazitätsmessung genutzt werden kann (siehe Kapitel 3.2.2.3).



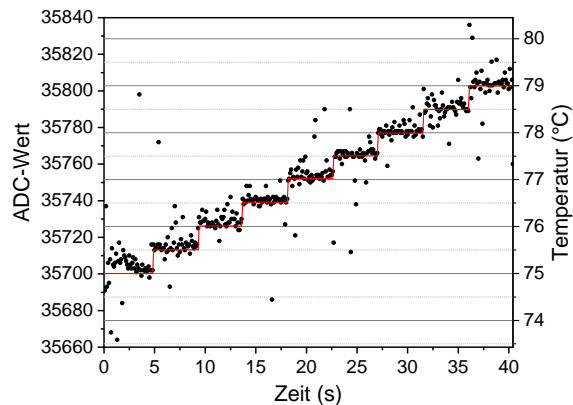
**Abbildung 3.31:** Temperaturregelungssystem für die IDTs. Gespeist von einer Autobatterie oder einem Netzteil, werden die 12 V in 5 V für den Digitalteil und 24 V für die Heizspannung transformiert. Ein zusätzlicher Spannungsregler stellt eine 2 V Referenzspannung zur Verfügung. Ein SPI-ADC misst den Temperaturwiderstand  $R_{\text{Mess}}$  über einen Spannungsteiler, ein PWM-gesteuerter MOSFET legt den Heizstrom fest. Optional misst der Touch Sensing Controller (TSC) im Mikrocontroller die Kapazität.

Das System wurde so ausgelegt, dass eine Folienplatine mit 8 IDTs angeschlossen werden kann. Der Einfachheit halber ist in Abbildung 3.31 nur ein Kanal dargestellt. Die Komponenten  $R_{\text{Ref}}$ ,  $C_{\text{Ref}}$  und der MOSFET sind jeweils achtfach ausgeführt. Grau hinterlegt sind die drei Komponenten des IDTs dargestellt, Heizmäander  $R_{\text{Heiz}}$ , IDK  $C_{\text{Sens}}$  und Temperaturwiderstand  $R_{\text{Mess}}$ . Bei dem ADC handelt es sich um einen 8 Kanal ADC, der auf dem Prinzip der sukzessiven Approximation (SAR) basiert. Er misst die Temperaturwiderstände über den Spannungsteiler aus  $R_{\text{Ref}}$  und  $R_{\text{Mess}}$ . Zur Erhöhung der Genauigkeit wurde eine externe Referenzspannung eingesetzt. Für den ADC fiel die Wahl daher auf den Texas Instruments ADS8332, der über einen Eingang für eine externe Referenzspannung verfügt. Die Datenübertragung zum Mikrocontroller erfolgte über das SPI-Protokoll. Die Heizung wurde über einen Pulsweitenmodulation (PWM) gesteuerten MOSFET realisiert. Dabei wird ein Rechtecksignal mit einer festen Frequenz an das Gate angelegt und die Impulsdauer moduliert. Der Tastgrad, also das Verhältnis der Einschaltzeit zur Periodendauer, auch Duty-Cycle genannt, legt fest, wie viel Strom auf den Heizwiderstand fließen kann. Auf dem Mikrocontroller wurde ein PID-Regler implementiert, der ausgehend vom ADC-Messwert den Duty-Cycle berechnet. Dieser wird dann per Timer als PWM-Signal auf den MOSFET ausgegeben. Abbildung 3.32



**Abbildung 3.32:** Fotografie des Temperaturregelungssystems. Der eingesetzte Mikrocontroller wird als Nucleo-Entwicklungsplatine aufgesteckt. Die rechte Hälfte des PCBs umfasst die Spannungsversorgung. Auf der linken Hälfte befinden sich je 8 MOSFETs, Spannungsteiler und Zuleitungen zu 8 IDTs auf einer Folienplatine.

zeigt den fertigen Prototypen. Das Nucleo-L476RG Evaluationsboard, durch den weißen Lötstopplack erkennbar, verfügt neben dem Mikrocontroller auch über ein Programmer-Modul und eine zugehörige USB-Schnittstelle, über die auch das UART-Interface des Mikrocontrollers angesprochen werden kann. Im oberen Bild rechts oben ist der DC-DC-Wandler (48 W) zu sehen. An der linken Seite befinden sich 8 Foliensteckerbuchsen, um die Folienplatine mit den IDTs aufzunehmen. Auf der Unterseite (unteres Bild) sind die Pufferkondensatoren für den DC-DC-Wandler zu sehen, sowie der Spannungsregler für die 5 V. Bei den 4 kleineren Kondensatoren handelt es sich um vier 220 nF C0G Kondensatoren. Diese übernehmen die Funktion des  $C_{\text{Ref}}$  für jeweils zwei IDTs. C0G ist ein Dielektrikum mit einer besonders niedrigen Temperaturabhängigkeit.



**Abbildung 3.33:** Test des Temperaturregelungssystems. Die ADC Werte sind gegen die Zeit aufgetragen (schwarze Punkte). Während der Messung wurde die Solltemperatur von 75 °C alle 5 s um ein halbes Grad erhöht.

Über die serielle Schnittstelle können Kommandos gesendet werden und Messdaten empfangen werden. Es wurden Kommandos zur Einstellung der Proportional-Integral-Differenzial-Regler (PID)-Regelparameter, zum Starten und Stoppen der Regelung, zum Einstellen der Zieltemperatur und zur Abfrage der aktuellen ADC und TSC-Messwerte gesendet. Darüber hinaus wurde ein Kalibrierprogramm implementiert. Die Sensoren werden dafür in einer Temperaturkammer platziert und ADC-Messungen getriggert. Die Temperaturen und die zugehörigen Messwerte werden in den Speicher des Mikrocontrollers abgelegt und zur Berechnung des PID-Duty-Cycles genutzt. Abbildung 3.33 zeigt den zeitlichen Verlauf einer Regelung von 75 bis 79 °C in 0,5 °C Schritten alle fünf Sekunden. Die rote Linie zeigt dabei den Sollwert an und die schwarzen Punkte die ADC-Messwerte. Trotz einiger Ausreißer bei der ADC-Messung ist die PID-Regelung so eingestellt, dass die Ausreißer nicht ins Gewicht fallen und trotzdem ein schnelles Umschalten der Temperaturen ermöglicht wird.

Die verwendeten Sensoren wurden mit der beschriebenen Methode kalibriert und die Kalibrierparameter lokal abgespeichert. Bei Wechsel der Sensorplatinen konnten somit die zugehörigen Kalibrierparameter geladen werden. Ein weiterer Test bestand in der Durchführung einer LAMP-Reaktion mithilfe der integrierten Sensorheizung. Die Solltemperatur wurde auf 65 °C eingestellt und der Reaktionsmix, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, vorbereitet und eingefüllt. Nach 60 min war ein deutlicher Farbumschlag von Rot nach Gelb sichtbar, wie er für eine erfolgreiche LAMP-Reaktion erwartet wird. LAMP ist, was die Temperatur betrifft, eine sehr robuste Methode, welche zwischen 63 und 67 °C verwertbare Ergebnisse liefert [156]. Von diesem ersten Versuch konnte die Genauigkeit des Systems zumindest auf  $\pm 2$  °C eingeschränkt werden.

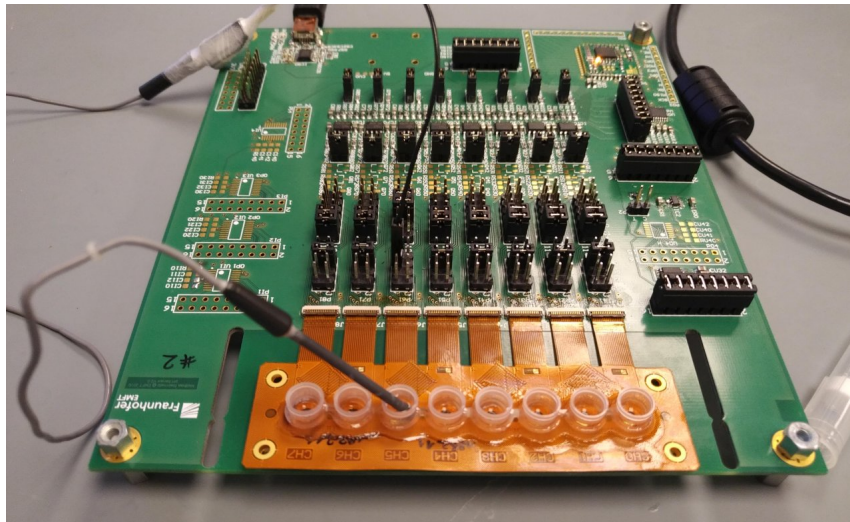


### **3.3 Quantifizierung und Endpunkterkennung von isothermaler Amplifizierung**

Mittels Echtzeitmessung von Amplifizierungsprozessen kann auf die Konzentration der Viren in einer Probe geschlossen werden. Außerdem erlaubt die zeitaufgelöste Messung eine Auswertung der Reaktion inklusive einer Endpunkterkennung. Für eine Anwendung von elektrochemischen Transducern auf die quantifizierbare LAMP-Reaktion (qLAMP) wurden die bereits vorgestellten FG-ISFETs und IDTs untersucht.

#### **3.3.1 Quantifizierung durch pH-Messung**

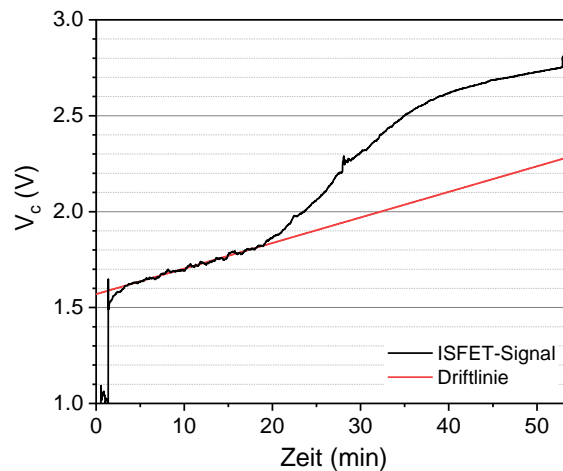
LAMP-Reaktionspuffer wurden, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, vorbereitet und 35  $\mu\text{l}$  in die Reaktionsgefäße gefüllt, welche am Boden mit einem FG-ISFET-Sensor ausgerüstet waren. Ein Deckelstreifen wurde verwendet, um die Reaktionsgefäße luftdicht zu verschließen. Die Folienplatinen mit den Reaktionsgefäßen wurden zwischen zwei Metallplatten geklemmt, welche mithilfe zweier Leistungswiderstände und einem PT100 auf 65 °C beheizt wurden. Da der verwendete Aufbau keinen Platz für eine externe Referenzelektrode vorsieht, wurde die integrierte Referenzelektrode verwendet. Dabei handelt es sich um eine Elektrode auf dem Chip, welche mit einer Silber-/Silberchloridpaste bedruckt ist (Kapitel 2.2.2.1). Dies erklärt die teils stärker auftretende Drift in den folgenden pH-Messungen.



**Abbildung 3.34:** Messsystem für FG-ISFETs zum Monitoring von LAMP-Reaktion. Die Platine beinhaltet 8 Source-Drain-Follower-Schaltungen (siehe Abbildung 3.26) mit den zugehörigen DACs und ADCs, sowie einer Möglichkeit, eine Referenzspannung an die integrierte Referenzelektrode anzulegen. Eine Folienplatine mit 8 FG-ISFETs kann eingesteckt werden. Um LAMP-Reaktion messen zu können, wird die Platine in einen Temperaturschrank bei 65 °C gelegt.

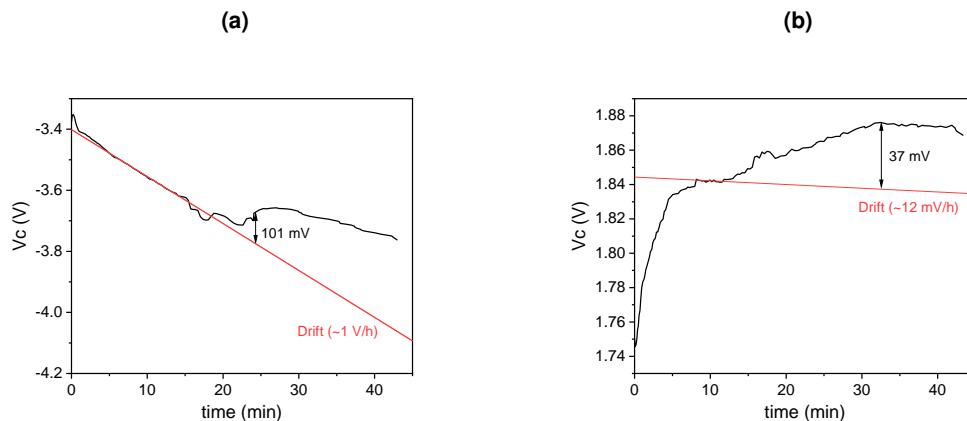
Das erste Experiment, welches mithilfe der in Kapitel 3.2.2.1 vorgestellten Regelschaltung (siehe Abbildung 3.34) aufgezeichnet wurde, fand im Mikrobiologie-Labor im Fraunhofer CSB statt. Dafür wurde eine LAMP-Reaktion mit Proben von Blättern von an GLRV2 erkrankten Weinpflanzen auf den Sensoren durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 3.2.2.1 erwähnt, konnten die FG-ISFETs mit der aufgebauten Schaltung nicht zuverlässig vermessen werden. Diese Tatsache verbunden mit der geringen Chip-Ausbeute aus Charge 1 führte dazu, dass aus den zahlreichen Experimenten nur diese eine verwertbare Kurve aufgenommen werden konnte.

### 3.3 Quantifizierung und Endpunkterkennung von isothermaler Amplifizierung



**Abbildung 3.35:** ISFET Messung LAMP Charge 1. Verwendet wurde ein ISE1 mit  $\text{Si}_3\text{N}_4$  als Sensormaterial zur Vermessung einer LAMP-Reaktion von GLRV2. Nach dem Aufheizen (2 min) driftet die Kurve konstant bei etwa 0.8 V/h. Nach 20 min beginnt der pH zu sinken (positive Signaländerung) und erreicht ab Minute 35 eine Sättigung. Die Absolute Spannungsänderung beträgt etwa 450 mV, was nach Bereinigung der kapazitiven Verstärkung von 2.7 einer erwartbaren pH-Änderung von ca. pH 8.8 nach pH 6 entspricht [28].

In Abbildung 3.35 ist der Verlauf der Ausgabespannung  $V_C$  über die Zeit dargestellt. Die Messung ist durch eine konstante Drift von ca. 800 mV/h überlagert, welcher zu Beginn und zum Ende der Messung sichtbar ist. Ab Minute 20 setzt das exponentielle Wachstum der Amplifikatkonzentration ein. Durch die Erzeugung eines Protons bei jedem Hybridisierungsvorgang sinkt der pH-Wert von etwa pH 8.8 zu Beginn auf pH 6.5-6.0 zum Endpunkt der Reaktion (Sättigungsbereich) [28]. Die Abnahme des pH-Werts wird durch den FG-ISFET über eine Zunahme des Messsignals gemessen. Unter Berücksichtigung der Drift zeigt sich eine Signal-Änderung um 450 mV, was nach der Bereinigung um den Faktor 2.7 der kapazitiven Verstärkung und der Annahme einer pH-Änderung von 2.8 Stufen einer Sensitivität von etwa 60 mV/pH entspricht. Das Nernst'sche Potential bei der LAMP-Reaktionstemperatur von 65 °C liegt bei etwa 67 mV/pH. Vergleicht man diesen Wert mit den in vorangegangenen Untersuchungen erhaltenen Sensitivitäten für ISE1, liegt die Vermutung nahe, dass der Sensor hier zusätzlich auf eine Leitfähigkeitsänderung reagiert. Messungen zur Leitfähigkeit (Abbildung 3.18) zeigen, dass sich das ISFET Signal proportional zur Leitfähigkeit verhält.



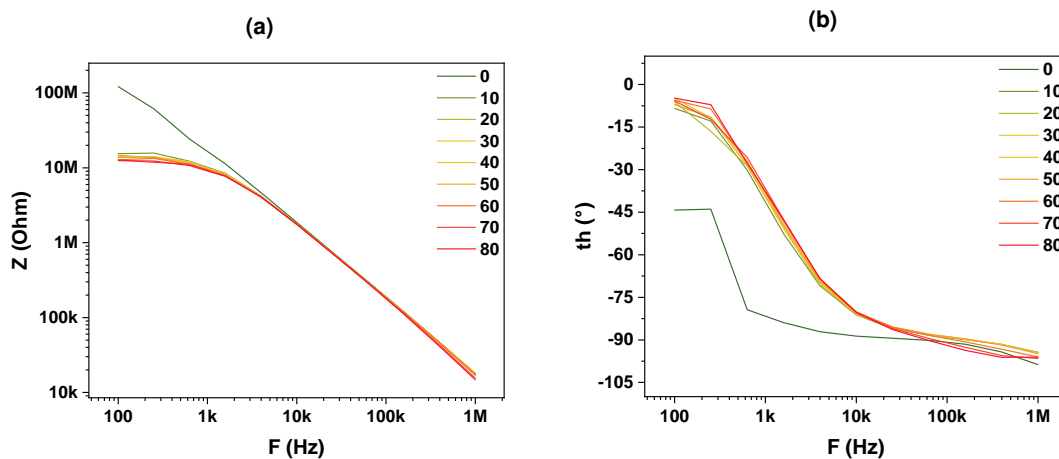
**Abbildung 3.36:** ISFET-Messung einer SARS-CoV-2-LAMP-Reaktion mit FG-ISFETs aus Charge 2. (a) ISE1 mit  $\text{Si}_3\text{N}_4$  als Sensorschicht und (b) ISE2 mit einer  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ -Sensorschicht. Für beide Kurven wurde die überlagernde Drift aus der Startphase der Reaktion extrapoliert und die Signaländerung dazu in Relation gesetzt.

Die Experimente wurden mit dem Reaktionsmix für die SARS-CoV-2 RNA und den angepassten FG-ISFETs aus Charge 2 wiederholt. Abbildung 3.36 zeigt die Ergebnisse eines (a) ISE1 mit  $\text{Si}_3\text{N}_4$  und (b) ISE2 mit  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  als Sensorschicht. Auch hier kam als Referenzelektrode die mit Silber/Silberchlorid bedruckte integrierte Elektrode auf dem Chip zum Einsatz. Für die Messung wurde der modulare DC-Source-Monitor verwendet. Um auf die zeitaufgelösten Daten der Control-Spannung zu kommen, wurde zu jedem Zeitpunkt eine Kennlinie bei fester Drainspannung  $V_d$  und Referenzspannung  $V_{\text{REF}}$  aufgenommen und im Anschluss die Control-Spannung bei  $I_d = 300 \mu\text{A}$  per Interpolation zwischen den benachbarten Messwerten bestimmt. Für  $\text{Si}_3\text{N}_4$  wurde eine hohe Drift von etwa 1 V/h beobachtet, welcher in derselben Größenordnung liegt wie bei ISE1 aus Charge 1. ISE2 mit  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  zeigte eine geringere Drift von nur 12 mV/h. Die pH-Änderung während der LAMP-Reaktion konnte mit beiden Sensoren gemessen werden, allerdings blieben die Signalhöhen deutlich hinter den bestimmten Sensitivitäten zurück. Eine Auswertung, wie sie bei der Verwendung von pH-Sensoren zur zeitlich aufgelösten Messung von PCR-Reaktionen durchgeführt wurde [70], ist auch hier möglich. Die ersten Minuten, in denen keine Signaländerung auftritt, werden genutzt, um die Drift zu bestimmen, welcher anschließend für das gesamte Experiment abgezogen wird. Jegliche Signaländerung, welche dem Kurvenverlauf einer Amplifizierung (entsprechend Abbildung 2.2) entspricht und einen festgelegten Threshold-Wert übersteigt, wird normiert und als positives Signal gewertet. Für die verwendete Amplifikation der SARS-CoV-2 RNA ist der Zeitraum zur Driftberechnung zu Beginn der Reaktion etwas zu kurz. Zusätzlich reagiert der verwendete FG-ISFET stark auf Temperatur, sodass die Aufheizzeit nicht hinzugenommen werden

kann. Eine On-Chip Temperaturregelung, wie sie auf den IDTs zum Einsatz kommt, würde hier einen bedeutenden Vorteil verschaffen, zumal es schwieriger ist, Temperatureffekte zu kompensieren, da diese auf viele Komponenten des Systems Einfluss haben (Sensitivität, Referenzelektrode, Halbleitereffekte und Effekte an der Sensorschicht) [75].

#### 3.3.2 Quantifizierung durch Kapazitätsmessung

Für die Impedanzspektroskopie wurde der in Kapitel 2.2.3.1 beschriebene Impedanzanalysator verwendet. Die ersten Versuche wurden mit Sensoren mit 6  $\mu\text{m}$  Fingerabstand durchgeführt. Trotz niedrigem zu erwartenden FSC verfügen diese über eine höhere Grundkapazität, welche die Messgenauigkeit erhöht. Das System zur Temperaturregelung stand noch nicht zur Verfügung. Die Sensoren wurden zwischen zwei Aluminiumkörper geklemmt, welche mithilfe von Leistungswiderständen und einem PT100 aufgeheizt wurden. In einem ersten Versuch wurde der Impedanzanalysator direkt an einen Sensor in einer Vierdrahtkonfiguration verbunden und Impedanzspektren im Frequenzbereich von 100 Hz bis 1 MHz in zeitlicher Abfolge aufgezeichnet. Abbildung 3.37 zeigt die Spektren im Abstand von 10 min für eine Dauer von 80 min in einem Bode-Diagramm.



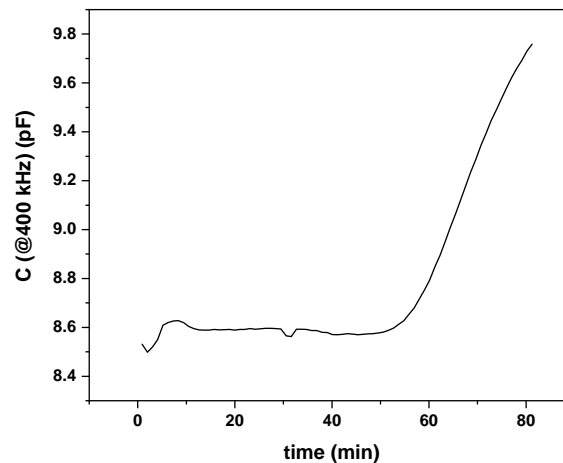
**Abbildung 3.37:** Ergebnis des ersten Versuchs einer LAMP-Reaktion auf einem 6  $\mu\text{m}$  Sensor mit einer Aluminiumblockheizung. Dargestellt ist ein Bodediagramm für verschiedene Zeitpunkte vom Einfüllen des Reaktionsmixes (0 min, grün) in 10-Minuten-Schritten bis 80 min nach dem Einfüllen (orange).

Dargestellt sind Absolutwert der Impedanz und Phasenwinkel über die Frequenz in doppelt logarithmischer beziehungsweise halb logarithmischer Darstellung. Die aufgezeichneten Kurven entsprechen den Werten direkt nach Einfüllen des Reaktionsmix (0 min, grün) bis zum Zeitpunkt 80 min (orange) in 10 Minuten Schritten. Zudem stellt der Graph 0 min (grün) das Impedanzspektrum bei Raumtemperatur vor dem Aufheizen

dar. Gerade bei niedrigen Frequenzen übersteigt der resistive Anteil (Phasenwinkel nahe  $0^\circ$ ) den kapazitiven Anteil. Dies ist besonders bei den Spektren der Fall, die 10 min nach Beginn der Messung und später aufgezeichnet wurden. Erklären lässt sich dies durch den Ionen-transport in der Polyimid-Passivierung, welcher bei vollständiger Durchnässung der Polyimid-Schicht höher ansteigt [132]. Oberhalb von 10 kHz zeigt der Sensor ein nahezu vollständiges kapazitives Verhalten, welches sich durch die Gerade im logarithmischen Raum des Impedanzplots und des Phasenwinkels nahe  $-90^\circ$  auszeichnet. Der Sensor kann als Widerstand und Kondensator in einer Parallelschaltung betrachtet werden, wobei der Widerstand mit ca.  $10\text{ M}\Omega$  eine Größe aufweist, die für Messungen bei Frequenzen im oberen Kilohertz Bereich vernachlässigbar ist. Mit fortschreitender Dauer des Experiments sinkt die Impedanz. Für die genauere Betrachtung dieses Effekts wurde der Frequenzbereich von 10 bis 400 kHz gewählt. Der erste Grund dafür ist, dass die Impedanz in diesem Bereich unter  $1\text{ M}\Omega$  liegt, und somit höhere Ströme fließen, welche auch mithilfe einfacher elektrischer Schaltungen gemessen werden können. Der zweite Grund liegt im Mechanismus des Sensorprinzips. Bei niedrigen Frequenzen spielt vor allem der Ionen-transport im Polyimid eine Rolle. Für diese Anwendung ist jedoch vorrangig die Messung der Sensorkapazität von Interesse, da diese von der Dielektrizitätszahl des umgebenden Mediums abhängt, welche sich während der LAMP-Reaktion ändert. Sichtbar wird dies, wenn aus den vorliegenden Daten anhand des parallelen R-C-Modells der kapazitive Anteil der Impedanz gemäß

$$C = \frac{1}{-|Z|2\pi f \sin \theta} \quad (3.8)$$

berechnet wird. Für die Frequenz von 400 kHz ist dies in Abbildung 3.38 dargestellt.



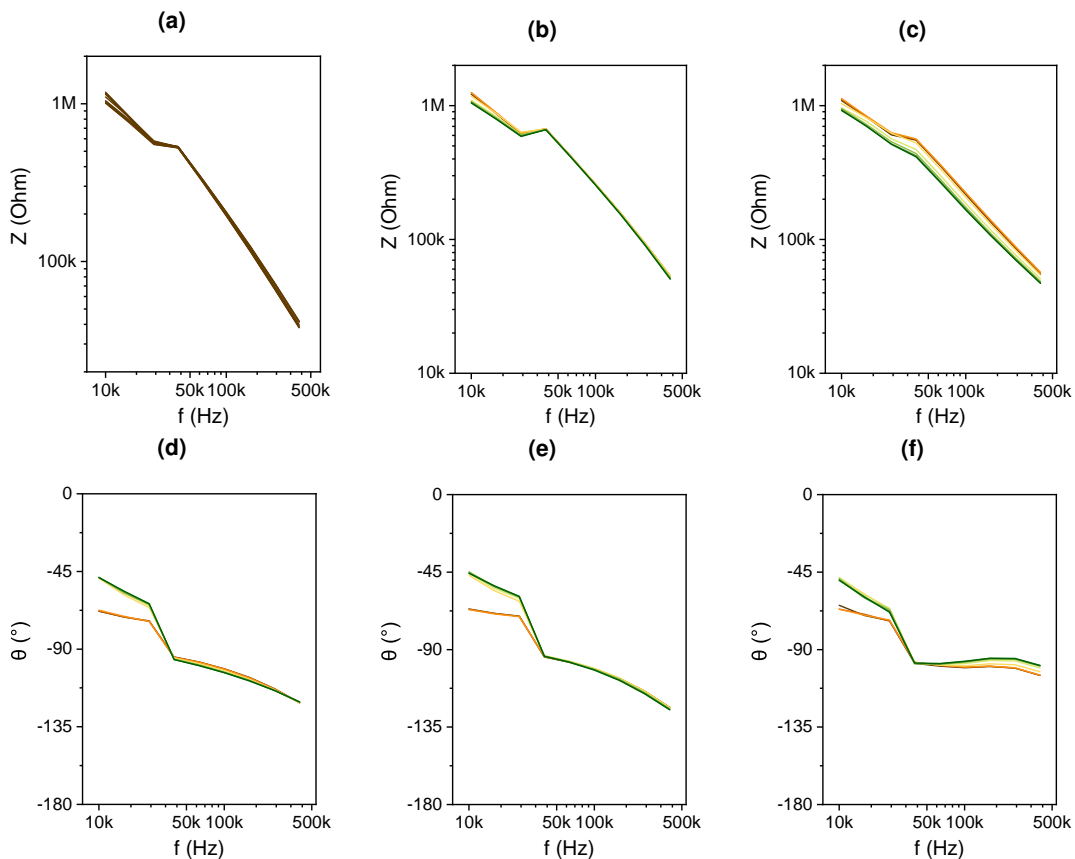
**Abbildung 3.38:** Kapazitätswerte der ersten IDT Messung LAMP. Verwendet wurde das in Kapitel 2.4.2 beschriebene Material des GLRV2, welches erst nach langer Startphase von 50 min in das exponentielle Wachstum übergeht. Der Eingang in die Endphase der Reaktion ist am Abflachen der Kapazitätskurve zu Ende der Messung erkennbar.

Der Anstieg der Kapazität geht einher mit dem Anstieg in der Dielektrizitätszahl des LAMP-Reaktionsmix, hervorgerufen durch die steigende Anzahl an induzierbaren Dipolen, nämlich die cDNA-Produkte der Amplifikation. Charakteristisch für den Verlauf einer LAMP-Reaktion befindet sich die Kapazität zuerst auf einem Plateau, geht dann in eine exponentielle Wachstumsphase über und flacht schließlich wieder ab. Das vorliegende Experiment wurde augenscheinlich zu früh abgebrochen, sodass die letzte Phase der Sättigung nicht dargestellt werden kann (vergleiche Abbildung 2.2). Das hier verwendete Primerset benötigt ca. 50 min, bis das exponentielle Wachstum einsetzt. Daher wurde bei den folgenden Versuchen das SARS-CoV-2-Primerset eingesetzt, welches deutlich schnellere Reaktionszeiten aufweist (siehe Kapitel 2.4.2). Von den Werten aus den vorangegangenen Simulationen ergeben sich Abweichungen sowohl in der Grundkapazität, als auch im FSC. Die Abweichung in der Grundkapazität kann, wie bereits vorangehend erläutert, dadurch erklärt werden, dass sich Polyimid, besonders wenn es durchnässt ist, nicht wie ein idealer Isolator verhält. Für den FSC waren beim Einsatz des 6  $\mu\text{m}$  Sensors ca. 1 % Signaländerung erwartet worden. Nun liegt sie in dieser Messung bei ungefähren 20 %. Ein Erklärungsansatz für die Differenz ist, dass sich die Dielektrizitätszahl nicht genau von 80 auf 100 ändert. Im Anfangszustand enthält der Reaktionsmix viele Ionen und Moleküle, welche die starken Wasserdipole verdrängen und somit zu einer Verringerung der Dielektrizitätszahl führen. Auf der anderen Seite hängt die Kapazität stark von der Polyimidoberfläche und wenigen Mikrometern darüber ab. Amplifikate der verwendeten RNA, die selbst etwa 100 nm lang ist, können schnell eine Länge von einigen Mikrometern erlangen, welche in der optimalen geometrischen Anordnung durch Dipolinduzierung

auch höhere Dielektrizitätszahlen erreichen können, als rein homogen betrachtet, in Lösung. Ein vollumfängliches Bild kann die Simulation hier an keiner Stelle liefern, jedoch könnte die Hinzunahme des Stofftransports in der Polyimidschicht das Modell erheblich verbessern. Die Software dazu lag bei der Erstellung dieser Arbeit jedoch nicht vor.

Um die optimalen Messparameter zu bestimmen, wurden diese Experimente in einem größeren Umfang wiederholt. Dafür kam das in Kapitel 3.2.2.5 vorgestellte System zur Temperaturregelung zum Einsatz. Für die Impedanzmessung wurden zwei 8:2 Multiplexer Analog Devices ADG1207 auf dem Board integriert, um zwischen den 8 Sensoren, die auf einer Sensorplatine sitzen, durchzuschalten. Diese Multiplexer besitzen einen relativ hohen Einschaltwiderstand von  $120\ \Omega$ , zeichnen sich im Gegensatz dazu jedoch durch eine sehr niedrige Kapazität und Ladungsinjektion aus, was sie besonders für Impedanzspektroskopie-Anwendungen interessant macht [111]. Der Frequenzbereich wurde auf das Band zwischen 10 und 400 kHz festgelegt. In diesem Bereich zeigte der Sensor annähernd rein kapazitives Verhalten. 400 kHz ist dazu die maximale Messfrequenz, die der TSC des verwendeten STM32L476 Mikrocontrollers erreichen kann. Abbildung 3.39 zeigt die Impedanzspektren als Bode-Diagramme. Farblich von grün nach orange sind hier zeitlich die Messungen von 0 bis 45 min in 5-Minuten-Schritten dargestellt.

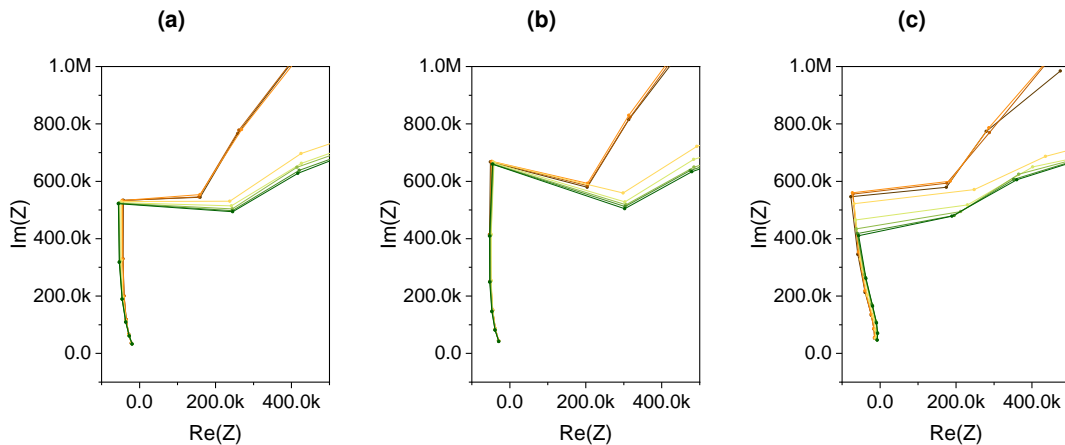




**Abbildung 3.39:** LAMP-Reaktion mit dem SARS-CoV-2-Reaktionsmix auf Sensoren mit verschiedenen Elektrodenabständen von (a, d) 6  $\mu\text{m}$ , (b, e) 10  $\mu\text{m}$  und (c, f) 50  $\mu\text{m}$ . Dargestellt sind die Bode-Diagramme, Impedanz und Phase über die Frequenz bei verschiedenen Zeitpunkten der Reaktion: 0 min (grün) bis 45 min (orange) in 5 min Schritten.

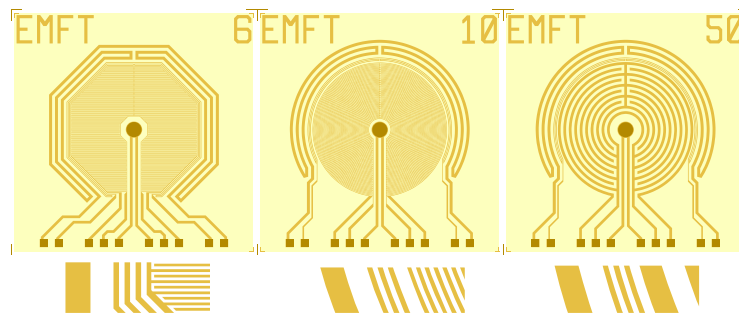
In erster Betrachtung tritt das kapazitive Verhalten des Sensors auch in diesem Experiment deutlich in Erscheinung. Die Impedanz bildet im doppelt logarithmischen Raum eine Gerade und der Phasenwinkel bewegt sich nahe  $-90^\circ$ . Die Impedanz erfährt mit der Zeit eine Änderung, die umso größer ausfällt, je größer der Abstand zwischen den Fingern der Elektrode ist. Auffallend bei der Betrachtung der Spektren sind die Abweichungen vom rein kapazitiven Verhalten, welche in der Linearität des Impedanzplots auftreten und in Werten für die Phasenwinkel, die von  $-90^\circ$  abweichen. Bei etwa 600 k $\Omega$  geht der Impedanzanalysator in einen anderen Strom-Messbereich über, welcher als Knick in der Impedanz sichtbar wird. Der Phasenwinkel bewegt sich über den Frequenzbereich von  $-45^\circ$  bis  $-125^\circ$ , wobei auch hier eine sprunghafte Änderung auf das Umschalten des Strom-Messbereichs zurückzuführen ist. Je höher die Frequenz, desto näher befinden sich die Messdaten an den erwartbaren Werten eines idealen Kondensators. Betrachtet

man die Daten in einem Nyquist-Diagramm (Abbildung 3.40), so ist eine vertikale Linie zu sehen, welche sich für zunehmend kleiner werdende Frequenzen im Halbraum verliert. Wie bereits im vorangegangenen Experiment spielt der Ladungstransport durch Ionen im durchnässten Polyimidfilm auch hier für niedrige Frequenzen eine starke Rolle. Erst ab etwa 40 kHz, nach dem Umschalten auf den höheren Strom-Messbereich, fällt dieser resistive Anteil weniger ins Gewicht.



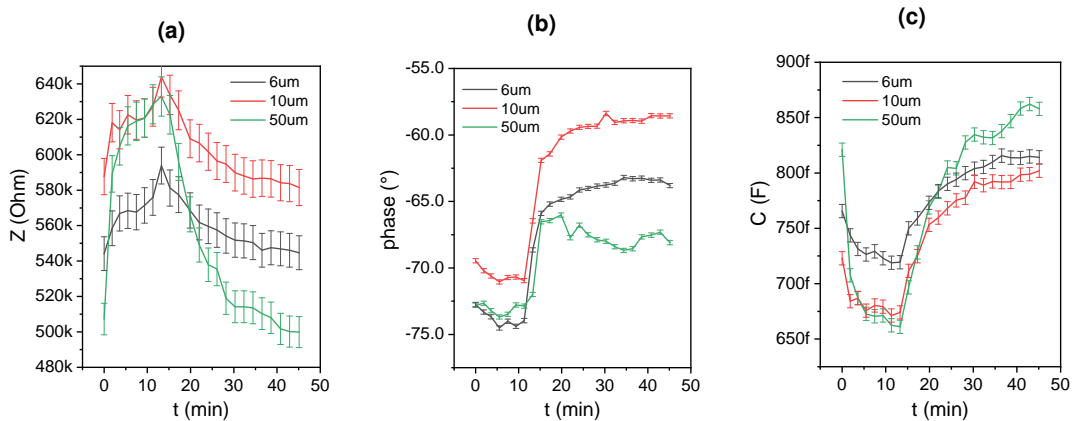
**Abbildung 3.40:** LAMP-Reaktion mit dem SARS-CoV-2-Reaktionsmix auf Sensoren mit verschiedenen Elektrodenabständen von (a) 6  $\mu\text{m}$ , (b) 10  $\mu\text{m}$  und (c) 50  $\mu\text{m}$ . Dargestellt sind die Nyquist-Diagramme.

Im Gegensatz zur vorangegangenen Messung tritt hier für Frequenzen größer als 40 kHz ein Phasenwinkel kleiner als  $-90^\circ$  auf. In der Theorie entspricht dies einer kapazitiven Komponente mit einem zusätzlichen negativen Widerstand. Ein negativer Widerstand zeichnet sich durch einen niedrigeren Stromfluss bei höherer Spannung aus. Dieses Ergebnis erwächst aus der Hinzunahme der integrierten Temperaturregelung über den Temperaturwiderstand und den Heizmänder. Beide müssen als zusätzliche Elektroden aufgefasst werden, an denen eine höhere Spannung anliegt als an den Fingerelektroden. Über den bereits beschriebenen Ladungstransport im Polyimid sammelt die Messelektrode auch diesen Strom auf. Dieser entsteht durch die Spannungsdifferenz der Anregungsspannung und der konstanten Mess- bzw. Heizspannung. Je höher die Anregungsspannung ist, desto niedriger diese Spannungsdifferenz und damit auch desto niedriger der Strom. Dieser indirekte Zusammenhang führt zu dem negativen Widerstand, den der Impedanzanalysator registriert.

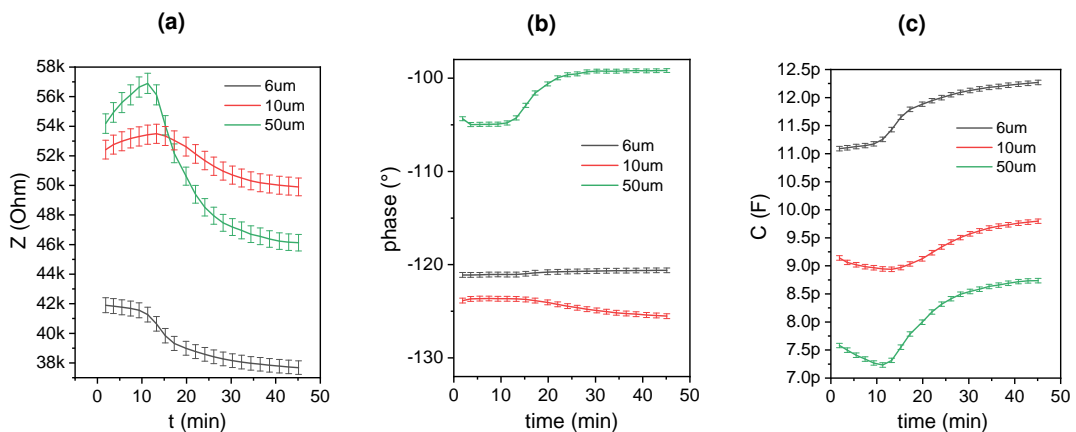


**Abbildung 3.41:** Details der Geometrien der 6-, 10- und 50- $\mu\text{m}$ -Sensoren. Unter den Sensorstrukturen sind im Detail die Abstände zwischen Sensorelektroden und Widerstandsmäandern dargestellt.

Für den 50- $\mu\text{m}$ -Sensor ist dieser Effekt deutlich kleiner als für die beiden 6  $\mu\text{m}$  und 10- $\mu\text{m}$ -Sensoren, da der Abstand zwischen den Elektroden und den Widerstandsmäandern größer ist (siehe Abbildung 3.41). Für Frequenzen unter 40 kHz ist der Beitrag des positiven Widerstands zwischen den Sensorelektroden betragsmäßig höher, sodass der negative Widerstand im Phasendiagramm nicht zum Tragen kommt. Deutlicher werden die genannten Effekte, wenn die Impedanzwerte über den zeitlichen Verlauf betrachtet werden. Nachfolgend sind der Verlauf der Impedanz, des Phasenwinkel und der errechneten Kapazität über die Zeit für die Frequenzen 25 kHz (Abbildung 3.42) und 400 kHz (Abbildung 3.43) dargestellt. In diese Graphen wurden nun auch die Fehlerbalken eingefügt, welche deutlich machen, dass der Impedanzanalysator für niedrigere Impedanzwerte genauere Ergebnisse liefert. Für den 6- $\mu\text{m}$ -Sensor entspricht der Fehler der Impedanzmessung bei 25 kHz fast der Hälfte der Signaländerung. Die Messung bei 400 kHz kann hier deutlich genauere Werte erzeugen. Zusätzlich ist auch der Kapazitätswert höher. Für eine Mikrocontroller-basierte Messung ist ein hoher Kapazitätswert von Vorteil, da die Auflösung des TSCs nur 10 fF beträgt. Wie im ersten Experiment kommt es auch in diesem zu einer Abnahme in der Impedanz. Da die Reaktion deutlich schneller abläuft, sind alle Phasen der Amplifikationsreaktion sichtbar. In den ersten 10 Minuten stagniert die Kapazität. Hier läuft die reversible Transkription ab und die Startstruktur für die LAMP wird gebildet. Danach entsteht schnell eine Phase des exponentiellen Wachstums, in der die Startstruktur vervielfältigt wird. Dieser Anstieg erreicht nach ca. 30 Minuten eine Sättigung. Zu diesem Zeitpunkt läuft die Reaktion nicht mehr oder nur noch gehemmt ab, da entweder keine Nukleotid-Bausteine mehr vorhanden sind oder die Pufferbedingungen, also insbesondere der pH-Wert, die Enzymaktivität der Polymerase hemmen. Dies stellt den Endpunkt der Reaktion dar. Ab hier kann das Experiment abgebrochen werden.



**Abbildung 3.42:** Zeitlicher Verlauf der (a) Impedanz, (b) Phase und (c) der berechneten Kapazität für eine Messfrequenz von 25 kHz. Aufgrund des geringen Stroms sind der Messfehler und das Signalrauschen noch zu groß, um eine saubere Datenaufnahme zu ermöglichen. Nichtsdestotrotz sind im Kapazitäts-Plot die drei Phasen der LAMP-Reaktion zu erkennen (Start der Reaktion, exponentielles Wachstum, Sättigung).

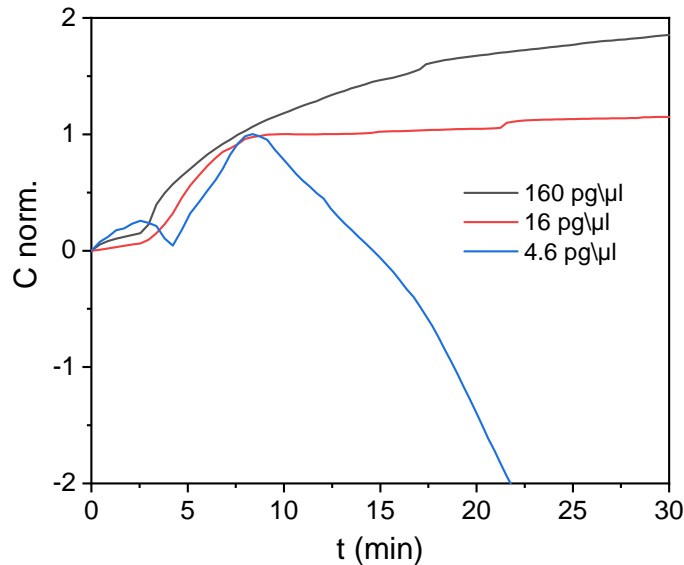


**Abbildung 3.43:** Zeitlicher Verlauf der (a) Impedanz, (b) Phase und (c) der berechneten Kapazität für eine Messfrequenz von 400 kHz. Im Kapazitäts-Plot sind die drei Phasen der LAMP-Reaktion zu erkennen (Start der Reaktion, exponentielles Wachstum, Sättigung).

Um zu zeigen, dass die Methode auch zur Quantifizierung der Viruslast geeignet ist, wurde das Experiment zeitgleich mit drei verschiedenen RNA-Konzentration 160 pg/ $\mu$ l, 16 pg/ $\mu$ l und 4.6 pg/ $\mu$ l auf drei unterschiedlichen 6- $\mu$ m-Sensoren durchgeführt. Abbildung 3.44 zeigt den zeitlichen Verlauf dieses Dreifachexperimentes. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Kapazitätswerte auf die Werte des exponentiellen Anstiegs normiert. Das Reaktionsgefäß mit der 4.6 pg/ $\mu$ l RNA-Konzentration hatte ein Leck, was

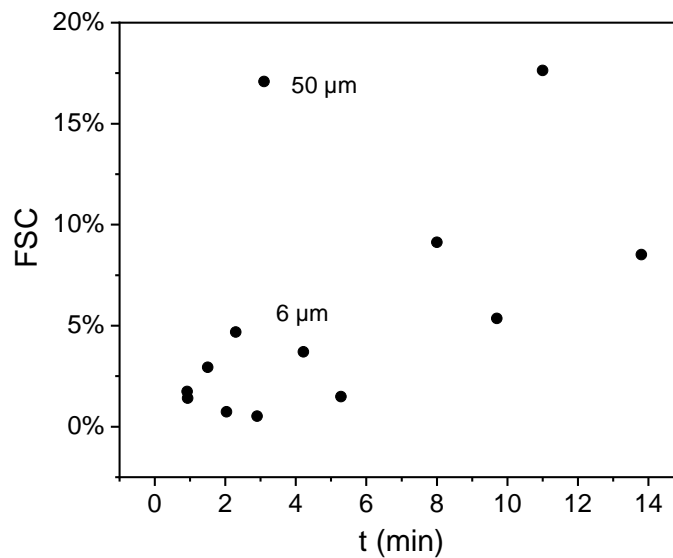
### 3.3 Quantifizierung und Endpunkterkennung von isothermaler Amplifizierung

dazu führte, dass die Pufferlösung nach 10 min vollständig aus dem Gefäß verdampft war. Bis zu diesem Zeitpunkt lieferte die Messung jedoch plausible Werte. Der Zusammenhang zwischen der Viruslast und dem Zeitpunkt des Einsatzes des exponentiellen Wachstums ist klar zu sehen. Zuerst setzt die hochkonzentrierte 160 pg/ $\mu$ l Probe ein, gefolgt von der 16 pg/ $\mu$ l und der 4.6 pg/ $\mu$ l. Sind Patientenproben mit bekannter Viruslast vorhanden, kann diese Methode genutzt werden, um die Viruslast mittels einer Vergleichsmessung zu bestimmen.



**Abbildung 3.44:** Änderung der Kapazität während der LAMP-Reaktion dreier SARS-CoV-2 RNA Proben mit unterschiedlicher Konzentration (normiert). Eine Quantifizierung der RNA-Konzentration ist mittels der kapazitiven Messung möglich. In diesem Experiment ist die Reaktionsflüssigkeit der 4.6 pg/ $\mu$ l Probe aufgrund eines Lecks ab Minute 10 verdampft.

Um die Verlässlichkeit der Methode der kapazitiven Auswertung der LAMP-Reaktion zu testen, wurden eine Reihe von positiven Standardproben untersucht, der Zeitpunkt des Einsatzes des exponentiellen Wachstums, sowie der Full-Scale-Change (FSC), der sich aus der Differenz der Kapazität in der Startphase und in der Sättigung, bezogen auf die Kapazität in der Startphase, berechnet. In Abbildung 3.45 sind diese Experimente dargestellt, welche ausnahmsweise mit der 160 pg/ $\mu$ l SARS-CoV-2-Probe durchgeführt wurden. Bezogen auf den FSC erscheint eine hohe Streuung. Da es bei LAMP-Produkten durch wiederholte Amplifizierung zu langkettigen dsDNA-Strängen kommt [45], kann die räumliche Orientierung dieser Produkte zur Sensoroberfläche eine große Rolle spielen. Zehn aneinandergelinkte LAMP-Produkte verfügen bereits über eine Länge von etwa 1  $\mu$ m.

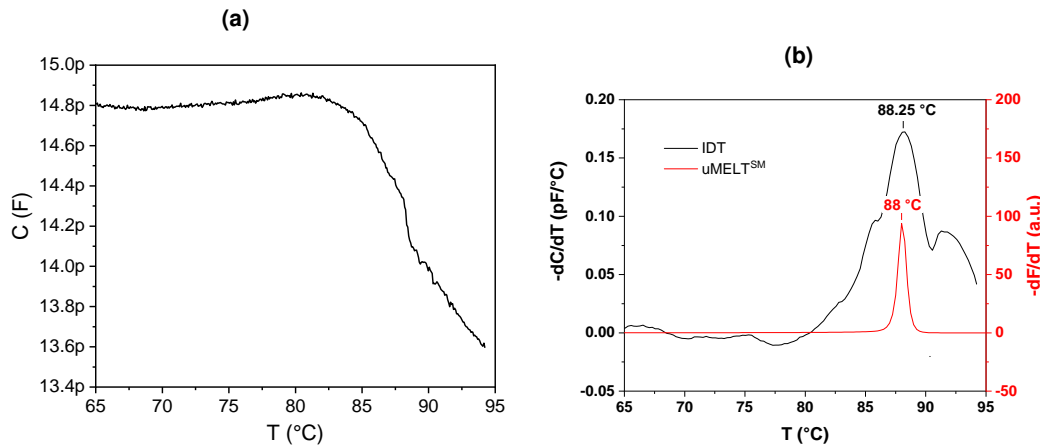


**Abbildung 3.45:** Im Graphen sind die durchgeführten Experimente mit der SARS-CoV-2-RNA (160 pg/ $\mu$ l) dargestellt. Die Position auf der X-Achse (t) stellt den Beginn der Kapazitätszunahme (Einsatzzeit), die Position auf der Y-Achse den FSC zwischen Beginn der Reaktion und Sättigung dar. Im Rahmen von 1 bis 5 % FSC und 0 bis 7 min Einsatzzeit kann auf eine valide positive LAMP-Reaktion geschlossen werden.

### 3.4 Schmelzkurvenanalyse

Im Anschluss an die Messung der LAMP-Reaktion kann mithilfe der kapazitiven Sensoren direkt eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. In einigen Fällen wurden nach der LAMP die Reaktionsgefäße geöffnet, um den Flüssigkeitsverlust zu bestimmen und das Ergebnis der LAMP auch optisch über den Farbumschlag zu bestimmen. Für dieses Experiment wurde abermals die Heizung des Deckels eingesetzt, um die Kondensation von Flüssigkeit im Deckel zu vermeiden. Bevor das Temperaturregelungssystem zur Verfügung stand, wurde das Experiment wie folgt durchgeführt: Wie im Experiment zu Abbildung 3.37 kamen zwei Alublöcke zum Einsatz, welche über Leistungswiderstände aufgeheizt wurden. Zusammen mit jeweils einem PT100 wurde über ein Python-Programm eine PID-Regelung aufgesetzt. Die Regelung wurde auf ein festes Aufheizprofil eingestellt, sodass sich die Temperatur von 65 bis 95 °C in Schritten von 0.25 °C alle 10 s änderte. In diesem Experiment wurde die Impedanz nur eines Sensors bei nur einer Frequenz (400 kHz) kontinuierlich vermessen. Die aktuelle Temperatur wurde gemeinsam mit den Impedanzwerten in eine Log-Datei geschrieben und zur Datenauswertung herangezogen. Die aufgezeichnete Messkurve verfügt somit über eine sehr dichte Abtastrate (siehe Abbildung 3.46a). Charakteristisch ist die lange unveränderliche Kapazität, die beim

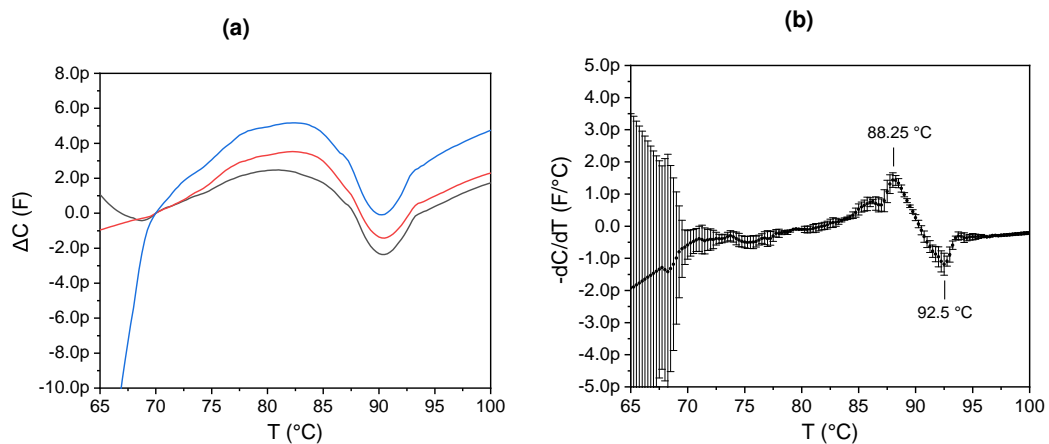
Annähern an die Schmelztemperatur rapide absinkt und sich danach wieder langsam stabilisiert. Der Zeitpunkt der größten Kapazitätsabnahme ist als Schmelztemperatur  $T_m$  definiert. Um diesen zu bestimmen, wurde zuerst ein Savitzky-Golay-Filter (siehe Kapitel 2.5.1) angewandt, um die Daten zu glätten.



**Abbildung 3.46:** (a) Kapazitätsverlauf für die MCA eines Amplifikats aus einer GLRV2 Probe. Aufgenommen wurde die Kurve durch die direkte Messung mit einem Impedanzanalysator während dem kontinuierlichen Aufheizvorgang durch zwei Aluminiumplatten. (b) Negative Ableitung der Kurve aus (a, schwarz) im Vergleich der theoretisch zu erwartenden Schmelzkurve in einem qPCR Cycler (berechnet mit uMelt<sup>SM</sup>).

Anschließend wurde die erste Ableitung der Daten nach der Temperatur gebildet und geplottet (siehe Abbildung 3.46b). Die Kapazitätsabnahme erreicht einen Höhepunkt bei 88,25 °C. Parallel dazu wurde der Online-Kalkulator uMELT<sup>SM</sup> verwendet, um  $T_m$  für das Amplifikat des GLRV2 (siehe Abbildung 2.18) zu berechnen. Diese beträgt 88 °C. Die erwartbare Kurve im qPCR-Gerät ist als rote Linie in Abbildung 3.46b eingetragen. Die Änderung in der Kapazität tritt nicht in derselben Schärfe auf, wie sie bei der Änderung im Fluoreszenzsignal typisch ist. Die Breite des Peaks für das Kapazitätssignal in Abbildung 3.46b ist daher breiter. Die Peakposition dagegen stimmt bis auf eine Abweichung von 0,25 °C überein. Ein Grund für die Verbreiterung der Peakkurve könnte die unterschiedliche Dynamik der beiden Prozesse sein. Bei der Fluoreszenz-Messung stehen die Ereignisse Denaturierung und Deaktivierung der Fluoreszenzfarbstoffe in direktem zeitlichen Zusammenhang. Änderungen in der Dielektrizitätszahl der gelösten Nukleotide gehen jedoch auch mit Begleitprozessen wie der Änderung der räumlichen Konfiguration der Stränge einher. Dies führt unter Umständen zu sich überlagernden Effekten, falls sich die Prozesse in ihrem Beitrag zum Dipolcharakter gegensätzlich verhalten. Für die transkribierte RNA aus dem SARS-CoV-2 Virus ist dies der Fall, wie die Ergebnisse aus den Experimenten mit dieser Probe zeigen.

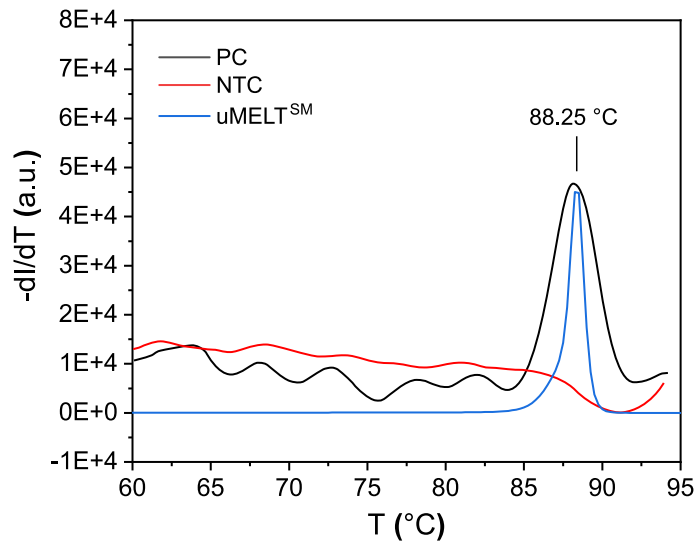
Auf drei gleichartigen Sensoren wurde die Schmelzkurve des Amplifikats aus der SARS-CoV-2-LAMP-Reaktion untersucht. Da die Basiskapazität der Sensoren aufgrund von Unterschieden in der Fertigung und der elektrischen Zuleitungen voneinander abweicht, zeigt Abbildung 3.47a nur die Änderungen in der Kapazität bezogen auf die Kapazität bei 70 °C. Der Kapazitätsverlauf zwischen 70 und 100 °C unterscheidet sich kaum in seinem Verlauf. Nimmt man die Ableitung dieser drei Kurven und berechnet daraus den Mittelwert, erhält man eine geringe Standardabweichung (siehe Fehlerbalken in Abbildung 3.47b). Dies spricht für eine hohe Reproduzierbarkeit der durchgeführten Schmelzkurvenanalyse.



**Abbildung 3.47:** (a) Kapazitätsverlauf für die MCA eines Amplifikats aus einer SARS-CoV-2 Probe. Aufgenommen wurde die Kurve durch Messung mit einem Impedanzanalysator. Die Temperatur wurde mit dem Regelungssystem in 0.25 °C Schritten eingestellt. Dargestellt sind drei Messungen, die parallel auf drei unterschiedlichen 6- $\mu$ m-Sensoren durchgeführt wurden (Delta C in Bezug auf C bei 70 °C). (b) Mittelwert der negativen Ableitung der Kurven aus (a) mit Standardabweichung (Fehlerbalken). Der Kapazitätsanstieg bei 88.25 °C steht in guter Übereinstimmung mit der erwarteten Schmelztemperatur.

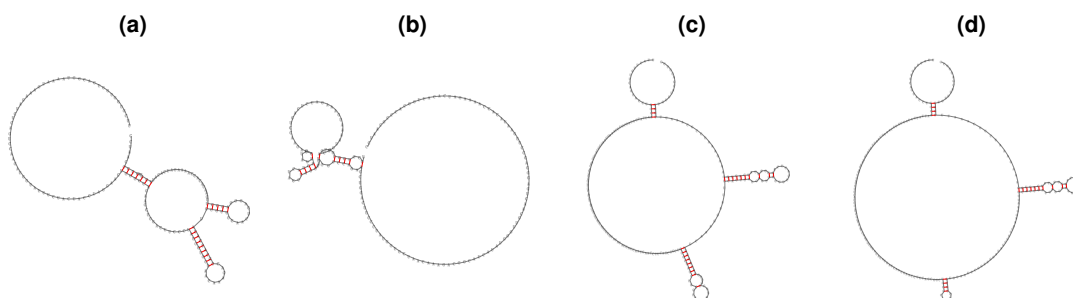
Die Bestimmung der Schmelzkurve fällt allerdings deutlich schwerer als für das GLRV2 Amplifikat (Abbildung 3.46b). In der Messung tritt eine Kapazitätsabnahme auf, die etwa bei 85 °C startet und bei 90 °C in eine Kapazitätszunahme übergeht. Dies führt dazu, dass in der Darstellung der Ableitung ein lokales Maximum bei 88.25 °C und ein lokales Minimum bei 92.5 °C auftreten. Ob diese Peaks jedoch einen Zusammenhang mit den Schmelztemperaturen haben, ist aufgrund der sich überlagernden Prozesse fraglich. Abbildung 3.48 zeigt die Schmelzkurvenanalyse des SARS-CoV-2 Amplifikats, die an einem qPCR Cycler durchgeführt wurde.





**Abbildung 3.48:** Schmelzkurvenanalyse des SARS-CoV-2 Amplifikats mit einem qPCR-Cycler. Dargestellt ist die Schmelzkurve für eine Positivkontrolle (schwarz), eine Negativkontrolle (rot) und die theoretische zu erwartende Kurve, die mit uMELT<sup>SM</sup> aus der amplifizierten Sequenz errechnet wurde.

Auch in diesem Plot findet sich die modellierte Kurve, welche mithilfe von uMELT<sup>SM</sup> berechnet wurde. Die tatsächliche Schmelztemperatur dieses Amplifikats liegt bei 91,2 °C. Sie liegt zwischen den beiden Peaks, die in der kapazitiven Messung sichtbar werden. Geht man jedoch von den beiden Annahmen aus, dass nämlich die Denaturierung des Amplifikats mit der Kapazitätsabnahme einhergeht und die Peakbreite für beide Messungen gleich ist, so kann der Beginn der Kapazitätsabnahme als Ankerpunkt für die Abschätzung der Schmelztemperatur aus der Messung in Abbildung 3.47b verwendet werden. Dieser liegt mit 83 °C drei Grad höher als bei der GLRV2 Probe. Auch hier landet der Schmelzpunkt mithilfe dieser Abschätzung dann beim theoretischen Wert von 91,2 °C (siehe rote Linie in Abbildung 3.47b).

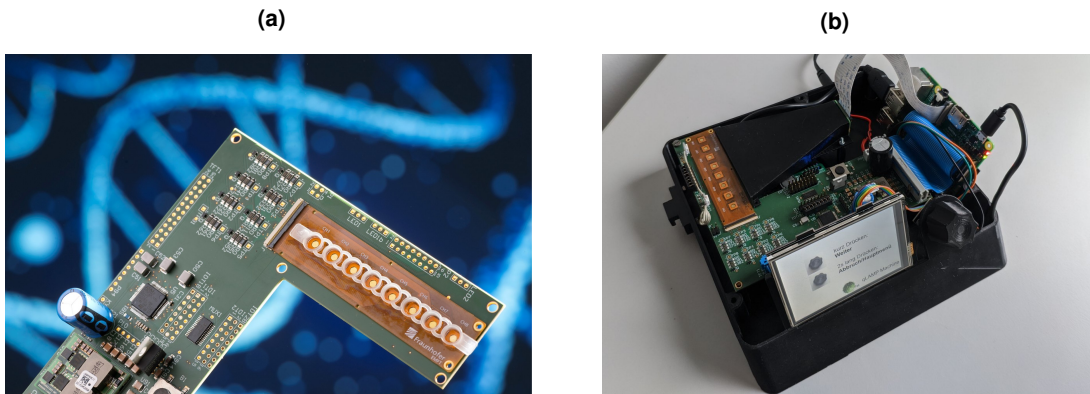


**Abbildung 3.49:** Sekundärstruktur der SARS-CoV-2 RNA Probe (Tabelle 2.5) bei (a) 89 °C, (b) 89 °C und der (c) GLRV2 Probe (Abbildung 2.18) bei (c) 89 °C, (d) 89 °C simuliert mit der ViennaRNA Software [157].

Um die hinter den Kapazitätsänderungen liegenden Mechanismen genauer zu untersuchen, sind weitergehende Experimente notwendig. Dabei sollten nicht nur unterschiedliche RNA Sequenzen in ihrem Schmelzverhalten untersucht werden. Beispielsweise könnte chemisch induzierte Denaturierung von dsDNA mit impedimetrischen Sensoren untersucht werden, um die durch Denaturierung auftretende Änderung in der Dielektrizitätszahl unabhängig von anderen temperaturabhängigen Prozessen wie räumlicher Konfiguration betrachten zu können. Eine Visualisierung der Sekundärstruktur der verwendeten RNA Sequenzen zeigt (Abbildung 3.49), dass sich die SARS-CoV-2 RNA Sequenz (Tabelle 2.5) zwischen 88 und 89 °C tatsächlich ändert, während die GLRV2 Probe dies kaum tut. Die Form ändert sich dabei in ein eher längliches Molekül, was durchaus mit einem höheren induzierten Dipolmoment einhergehen kann. Diese räumliche Rekonfiguration könnte den Kapazitätsanstieg bei 89 °C in Abbildung 3.47b erklären. Um den Einfluss der räumlichen Konfiguration auf die Dielektrizitätszahl untersuchen zu können, sollte eine temperaturabhängige Vermessung von aufkonzentrierten RNA-Proben mit den kapazitiven Sensoren in weitergehenden Untersuchungen durchgeführt werden.

### **3.5 Systemgedanken**

Die bisher vorgestellten Messungen an den kapazitiven Transducern wurden mit einem Laborgerät, dem HP 4192A Impedanzanalysator durchgeführt. Um diese Messungen in ein mobiles, kompaktes System zu überführen, wurden verschiedene integrierte Impedanz- und Kapazitätsmesssysteme aufgebaut (siehe Kapitel 3.2.2). Aus den Messergebnissen zur LAMP und zur MCA wurde deutlich, dass eine Kapazitätsmessung bei Frequenzen oberhalb von 100 kHz die besten Daten liefert. Daher wurde für den Aufbau eines mobilen Messsystems die Kapazitätsmessung mithilfe des TSC aufgebaut, der im STM32L4 Mikrocontroller integriert ist, welcher bereits für die PID-Regelung der Sensortemperatur verantwortlich ist. In Kapitel 3.2.2.5 wurde der Aufbau in Abbildung 3.31 bereits dargestellt und erläutert. Basierend auf dieser Schaltung wurde eine Platine aufgebaut (Abbildung 3.50a), die in einem Funktionsdemonstrator (Abbildung 3.50b) Platz findet. Der Funktionsdemonstrator erlaubt die Aufnahme einer Sensorplatine mit 8 IDTs und verfügt neben der Elektronik zur Temperaturregelung und zur Kapazitätsmessung über ein Display, einen Drehencoder, eine Kamera und einen Einplatinencomputer (Raspberry Pi 3B+).



**Abbildung 3.50:** (a) Platine für den Funktionsdemonstrator. Integriert sind auf der Platine die Stromversorgung und der STM32L4 Mikrocontroller. Zum einfacheren Wechsel der Sensorplatine ist diese Variante nur mit einem Flachbandstecker ausgestattet (© Bernd Müller, Fraunhofer EMFT). (b) Innenleben des Demonstratorgehäuses, das neben der Platine (a) ein Display, einen Drehencoder, einen Raspberry Pi und eine Kamera zur Farbmessung beinhaltet.

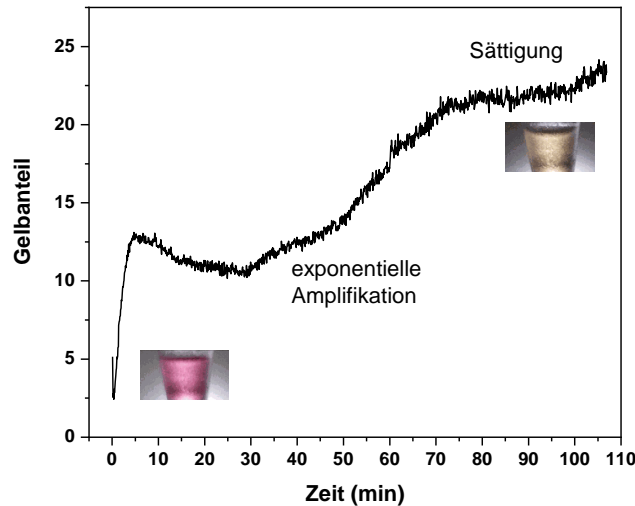
Das Display und der Drehencoder dienen zur Auswahl von Prozessen, die der Nutzer durchführen möchte. Auf dem Display werden die Prozessschritte (beispielsweise für die Probenaufbereitung) angezeigt und Messdaten wiedergegeben. Die Kamera dient zur Aufnahme der Farbe der Probenflüssigkeit während der LAMP-Reaktion. Diese enthält den Indikatorfarbstoff Phenolrot (siehe Kapitel 2.4.2) und erlaubt somit eine visuelle Erfassung des pH-Wertes, welcher sich bei einer erfolgreichen Amplifizierungsreaktion von ca. pH 8 (Farbe pink) nach pH 6 (Farbe gelb) ändert.



**Abbildung 3.51:** Kamerabild des Funktionsdemonstrators nach der LAMP-Reaktion. In Kanal 3 und 7 ist die Farbe der Reaktionsflüssigkeit unverändert pink. In diesen Gefäßen hat keine Amplifizierung stattgefunden.

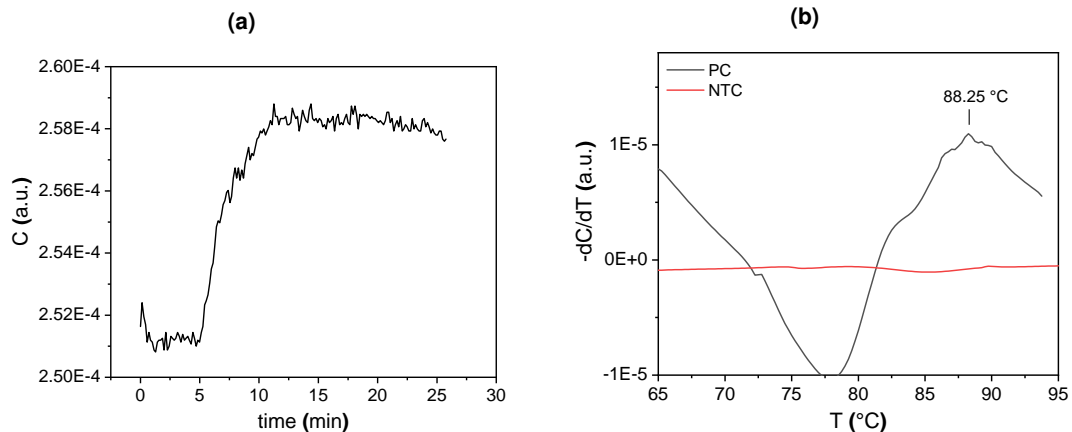
Abbildung 3.51 zeigt den Ausschnitt des Kamerabildes, in welchem die Reaktionsgefäße des Funktionsdemonstrators zu sehen sind. Im dritten und siebten Gefäß (gezählt von links nach rechts) ist die Farbe der Reaktionsflüssigkeit unverändert pink, was darauf schließen lässt, dass in diesen Proben keine LAMP-Reaktion stattgefunden hat. Eine automatisierte Auswertung des Kamerabildes kann bei einer LAMP-Reaktion, wie auch die kapazitive Messung zu einer Echtzeitmessung und Endpunkterkennung verwendet werden. Abbildung 3.52 zeigt die Daten einer Messung für eine LAMP-Reaktion einer GLRV2 Probe. Zu Beginn der Reaktion ist die Farbe des Puffers pink, bleibt die ersten 30 min gleich und geht dann in eine Änderung über, in der sich der Gelbanteil exponentiell

erhöht. Nach ca. 60 min flacht die Farbänderung merklich ab und erreicht nach 75 min eine Sättigung.



**Abbildung 3.52:** Farbverlauf einer positiven LAMP-Reaktion einer GLRV2 Probe. Aufgezeichnet ist der Gelbanteil des Kamerabilds im entsprechenden Bildausschnitt. Wie auch bei der pH-Messung mit ISFETs (Abbildung 3.35) sind auch hier die Startphase, die Phase des exponentiellen Wachstums und die Sättigung sichtbar.

In der Sample-to-answer-Abfolge (siehe Tabelle 2.2 in Kapitel 2.2.1) entspricht auch hier die Sensorschicht der Änderung des pH-Wertes durch die Reaktion wie beim Ansatz der Messung mit ISFETs. Der Transducer ist jedoch kein ISFET, sondern der Indikatorfarbstoff. Die Messung erfolgt über die Kamera, die Signalverarbeitung über die Berechnung des Gelbanteils im entsprechenden Bildausschnitt. Damit kann jedoch nur die Amplifizierung von RNA durch spezifische Primer sensorisch erkannt werden. Die Bestimmung der charakteristischen Schmelztemperatur ist mit diesem Ansatz nicht möglich. Die beschriebene Farbbestimmung dient als zusätzliche Echtzeit-Messung der LAMP-Reaktion für den Fall einer unbestimmten Sensorantwort bei der kapazitiven Messung. Die Änderung der Kapazität während der LAMP-Reaktion kann mit dem Demonstrator selbstverständlich auch aufgezeichnet werden. Zusätzlich ist die Durchführung der Schmelzkurvenanalyse auf den kapazitiven Sensoren möglich.

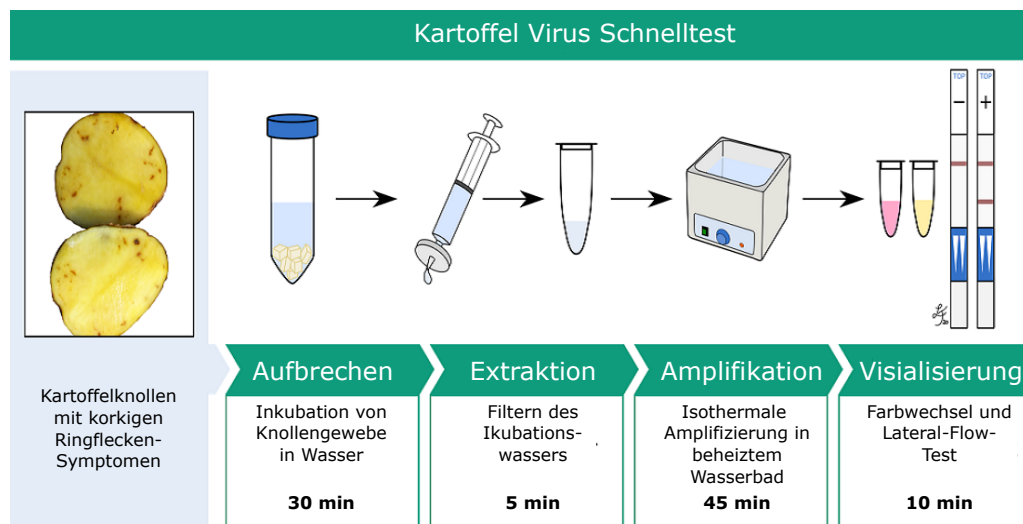


**Abbildung 3.53:** LAMP und MCA einer SARS-CoV-2 RNA Probe, aufgezeichnet mit der Kapazitätsmessmethode des TSCs des Mikrocontrollers im Funktionsdemonstrator. Das erste Maximum in der negativen Ableitung, welches auch in Abbildung 3.47b sichtbar ist, kann der Mikrocontroller auflösen, das Minimum nicht.

Abbildung 3.53 zeigt die Ergebnisse einer Messung mit dem Demonstrator. Hierfür wurde die SARS-CoV-2 Probe verwendet. Als Sensoren kamen Transducer mit Fingerabstand  $6 \mu\text{m}$  zum Einsatz, da diese eine hohe Grundkapazität aufweisen und somit bei der Kapazitätsmessung mit dem TSC des Mikrocontrollers die höchste Genauigkeit erzielen. Diese reicht aus, um den zeitlichen Verlauf und die Änderung der Kapazität während einer LAMP-Reaktion zu messen (siehe Abbildung 3.53a). Bei der Schmelzkurvenanalyse können die Daten, die auf diese Weise generiert wurden, nur mit Einschränkungen verwendet werden. Abbildung 3.53b zeigt die bereits über einen Savitzky-Golay Filter geglätteten Daten in der negativen Ableitung. Die Größe des Glättungsintervalls wurde so gewählt, dass auftretende Peaks noch zu erkennen sind. Im Vergleich zu den vorangegangenen Messungen mit dem Impedanzanalysator zeigt der Kapazitätsverlauf auch in diesem Experiment eine Abnahme, welche sich bei  $88.3^{\circ}C$  in einen Kapazitätsanstieg umkehrt. Das lokale Minimum bei  $92.5^{\circ}C$  kann mit der mikrocontrollerbasierten Messung jedoch nicht aufgelöst werden. Nichtsdestotrotz weist die MCA der positiven SARS-CoV-2 Probe (PC, schwarze Kurve) zumindest ein charakteristisches Merkmal auf, wohingegen die Negativkontrolle (NTC, rote Kurve) keinen Extrempunkt aufweist und sich nahe dem Nullpunkt bewegt, was einer gleichbleibenden Kapazität über dem gesamten Temperaturbereich entspricht. Somit erreicht der Demonstrator die Anforderung, mittels MCA zwischen positiven und negativen Amplifikaten unterscheiden zu können. Ebenfalls liegt nahe, dass mit dieser Methode Positivproben und Falsch-Positivproben unterschieden werden können, da sich diese in ihrer Schmelztemperatur deutlich unterscheiden (siehe Erläuterungen in Kapitel 1.2.1).

### 3.6 Einsatz in Patienten-naher Diagnostik

Einleitend wurden mehrere Kataloge zur Bewertung von POCT angeführt. Einen umfassenden Blick aus der Sicht des Anwenders gibt die Betrachtung von Luppa et al. [23]. Der Einsatz des entwickelten Funktionsdemonstrators mit den kapazitiven Sensoren soll anhand der dort angeführten Punkte nun diskutiert werden und potenzielle Entwicklungsfelder sollen aufgezeigt werden. Als Diskussionsgrundlage dient dafür ein Protokoll, das am Fraunhofer IME erfolgreich beim Nachweis von Kartoffelviren angewandt wurde. Dabei wurden Proben in Wasser eingelegt und gefilterte Mengen davon in einer LAMP-Reaktion untersucht. Das Verfahren lässt sich auch auf das SARS-CoV-2 übertragen. In diesem Fall kann mit Gurgelwasser gearbeitet werden [158].



**Abbildung 3.54:** Ablauf eines auf LAMP basierendn Schnelltests für Kartoffelviren. Die hohe Sensitivität der LAMP-Reaktion erlaubt eine vereinfachte Probennahme durch Inkubation in Wasser (Abbildung nach [7]).

Im Vergleich zur konventionellen PCR liegt die Falsch-Positiv-Rate bei der LAMP zwar höher [159, 160], im Gegenzug aber liegt die untere Nachweisgrenze bei niedrigeren Konzentrationen [7, 161]. Zusätzlich konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass eine vereinfachte Probennahme bereits zufriedenstellende Ergebnisse liefert [7, 161]. Abbildung 3.54 zeigt den Ablauf einer am Fraunhofer IME entwickelten Nachweismethode für Kartoffelviren. Gewebeprouben werden 30 min bei Raumtemperatur in Wasser gelegt, das Inkubationswasser gefiltert und anschließend zusammen mit dem kolorimetrischen LAMP Master Mix und den Primern für 45 min auf eine Temperatur von 65 °C gebracht. Ob ein Farbwechsel stattgefunden hat, gibt Auskunft darüber, ob die Amplifikation positiv abgelaufen ist und der Lateral-Flow-Test dient zur Bestätigung und der Identifizierung falsch-positiver Amplifikate. Im Falle von SARS-CoV-2 erreichten die Kollegen am IME

eine Testdauer von nur 40 min [158]. Beim Einsatz des Funktionsdemonstrators mit den IDTs verlängert sich die Testdauer auf 50 min, da für die MCA etwa 20 min eingeplant werden müssen, anstatt der 10 min für den Lateral-Flow-Test.

**Probennahme** Durch die hohe Sensitivität der LAMP erfolgt die Probennahme relativ problemlos. Beim Nachweis von Pflanzenviren reicht die Inkubation von Pflanzengewebe in Wasser bei Raumtemperatur aus. Für das SARS-CoV-2 wird Gurgelwasser ohne weitere Aufbereitung benutzt. Die einzig bleibende Herausforderung ist die Zugabe von ca. 1 µl des Gurgelwassers zum Reaktionsmix. Dies kann durch Eintauchen einer Impföse (in der Größe 1 µl verfügbar) zuerst in das Gurgelwasser und dann in den vorbereiteten Reaktionsmix erfolgen. In Hinsicht auf die Probennahme und -vorbereitung kann das vorgestellte Verfahren seine Stärken voll einsetzen.

**Spezifität und Wiederholbarkeit** Das Design und die Erprobung der Primer stellt natürlich die größte Herausforderung an das Design des Verfahrens an neue Virusarten dar. Davon hängt in hohem Maße auch die Spezifität und Querempfindlichkeit ab. Mit der zusätzlich durchgeführten Schmelzkurvenanalyse steht jedoch prinzipiell ein wirksames Mittel zur Verfügung, mit der DNA-Sequenzen unterschieden werden können, falls es doch aufgrund von Fehlern im Primer-Design zur Amplifizierung von RNA kommt, auf die der Test nicht abgezielt hatte. Die hohe Skalierbarkeit des Systems ist ein zusätzlicher Vorteil in Hinblick auf die Spezifität. Denkbar wäre, eine 96er Wellplatte, komplett mit IDTs bestückt, zu benutzen, um ein und dieselbe Probe mithilfe von jeweils unterschiedlichen Primersets in den einzelnen Gefäßen auf eine Vielzahl von Pathogenen gleichzeitig zu testen. Aufgrund der einfachen Skalierbarkeit sind auch Duplex-Reaktionen ohne besonderen Mehraufwand möglich. Durch die geringe Menge an nötigem Probenmaterial kann ein Test mit demselben Inkubationswasser beliebige Male wiederholt werden.

**Risikokontrolle** Durch die Tatsache, dass der Test nach dem Verschließen der Reaktionsgefäße konsekutiv ohne weiteren manuellen Eingriff ablaufen kann, ist das Risiko einer Verfälschung des Ergebnisses durch Eintrag fremder Partikel minimiert. Gerade im Vergleich zum Ansatz, der in Abbildung 3.54 vorgestellt ist, wo ein Pipettieren des LAMP Produkts auf die Lateral-Flow-Tests notwendig ist. Zusätzliche Risiken, die von einer unsachgemäßen Anwendung her kommen, könnten durch eine Erweiterung des Sensorkonzepts abgefangen werden. Beispielsweise könnte mithilfe einer vertikalen Anordnung der kapazitiven Sensoren der Füllstand in den Reaktionsgefäßen überprüft und somit Verdampfungsvorgänge oder falsche Befüllung automatisch erkannt werden.

**Testkosten und Verfügbarkeit von Verbrauchsmaterialien** Im Bereich der Reagenzien sind die Kosten in derselben Größenordnung wie bei der konventionellen PCR ohne

Quantifizierung durch Fluoreszenzmessung (also einige wenige Euro). Da es sich um ein mobiles Gerät handelt, entfallen Transport und Logistikkosten. Für den Ort des Tests ist jedoch eine Kühlmöglichkeit notwendig, da der LAMP Reaktionsmix nicht bei Raumtemperatur gelagert werden kann [29]. Die Kosten pro Test hängen aktuell sehr stark vom Sensor und der AVT ab. Diese könnte aufgrund des Rolle-zu-Rolle kompatiblen Packaging in eine industrielle Fertigung überführt werden. Die passivierten Sensoren sind für die Messung nicht im direkten Kontakt zur Probenflüssigkeit. Ein Entwicklungsansatz wäre, Passivierung und Sensor voneinander zu trennen. In diesem Fall könnte auch das Reaktionsgefäß durch einfaches Formen von Kunststoffteilen kostengünstig und auch massenhaft gefertigt werden. Der Materialeinsatz für den Funktionsdemonstrator in seinem aktuellen Entwicklungsstand liegt bei etwa 150 €.

**IT-Integration und Datensicherheit** Mit dem Raspberry Pi als Basis des Systems ist ein kostengünstiger und flexibler Mini-PC vorhanden, der in bestehende Datenbanksysteme drahtgebunden oder drahtlos eingebunden werden kann. Für die Weiterentwicklung des Demonstrators ist hier die Zusammenarbeit mit einer Klinik oder einem Testzentrum unabdingbar, um die notwendigen Schnittstellen zu identifizieren und Lösungsansätze erarbeiten zu können.

**Nutzerakzeptanz und Reparaturmöglichkeiten** LAMP hat sich im Vergleich zur PCR in Laboren noch nicht durchgesetzt. Dies hängt zu einem großen Teil auch mit den auftretenden falsch-positiven Ergebnissen zusammen [159, 160]. Vergleicht man das vorgestellte Testkonzept jedoch mit den vorhandenen mobilen Antigen-Schnelltests (siehe Abbildung 2.1), dann erhält man bei etwas geringerer Probenvorbereitung ein deutlich genaueres Testergebnis, da die Sensitivität von LAMP noch weit unter der von PCR Tests liegt [158]. Testkandidaten würden wahrscheinlich in jedem Fall das Gurgeln einem hinteren (oder auch vorderen) Nasenabstrich vorziehen. Bei der Probenvorbereitung ist nur noch die Übertragung des Probenvolumens per Impföse in das vorbereitete Reaktionsgefäß nötig. Einzig die Dauer des Tests steigt auf ca. 50 min. Die Einbettung der Biosensoren in ein handliches Gerät, welches in seiner Art modernen Küchengeräten ähnelt (siehe Abbildung 3.50b), erlaubt den Verzicht auf eine gedruckte Anleitung. Die Schritte der Probennahme, welche entscheidenden Einfluss auf die Genauigkeit des Tests haben (siehe Kapitel 1.1), können als Video auf dem Bildschirm angezeigt werden. Sprachbarrieren und Nervosität werden abgebaut, die Verlässlichkeit der Testdurchführung steigt.

Mit der Adressierung der von Luppá vorgeschlagenen Anforderungen werden auch die STARLITE Kriterien erfüllt. Das Sample-to-answer Konzept (STA) wird durch das vorgestellte Verfahren umgesetzt. Es folgt aus der Bestrebung, jegliche Risikomöglichkeiten zu minimieren. Die Schnelligkeit des Tests (R, rapid) ist eine Voraussetzung für die Nutzerak-



zeptanz und durch die 50 min Testdauer für Probennahme, LAMP und MCA gegeben. Die lokale Durchführung (L) ist für den POCT Ansatz eigentlich selbstverständlich, im Falle des vorgestellten Verfahrens jedoch auf Orte beschränkt, an denen eine Kühlmöglichkeit zur Lagerung des Reaktionsmix vorhanden ist. Denkbar ist beispielsweise eine Arztpraxis oder die Pforte eines Klinikums oder auch einer größeren Arbeitsstätte. Geringe Testkosten (I, inexpensive) wurden bereits diskutiert und hängen bedeutend mit der Weiterentwicklung der Sensoren zusammen. Equipment und Durchsatz (TE, throughput and equipment) wurden unter dem Punkt Testkosten und Verfügbarkeit von Verbrauchsmaterialien ebenfalls andiskutiert. Der limitierende Faktor ist auch hier die Produktion der Sensoren bzw. Reaktionsgefäße. Elektrochemische Transducer können also in der Virendiagnostik durchaus einen Mehrwert gegenüber existierenden Lösungen bieten. Sie ermöglichen den Transfer komplexer Laboranalyseprozesse auf miniaturisierte Systeme. Zudem senken sie den nötigen Ressourceneinsatz für fortgeschrittene Untersuchungen. Die Quantifizierung von Amplifikationsreaktionen (qLAMP) und Schmelzkurvenanalyse (MCA) kann ohne den Einsatz von Fluoreszenzmarkern und Fluoreszenzmikroskopen durchgeführt werden. Zudem schaffen sie eine Erhöhung der Validität von LAMP-Reaktionen bei Bewahrung des Sample-to-answer Konzepts.

### 3.7 Einordnung vorhandener Systeme

Verglichen mit den eingangs aufgeführten POCT Geräten (Kapitel 1.2.2), handelt es sich beim vorgestellten Konzept der kombinierten LAMP und MCA noch nicht um ein vertriebsreifes Produkt. Es kann daher nur in Ansätzen diskutiert werden, wo die Potenziale liegen, wie der Einsatz kapazitiver Sensoren gegenüber den existierenden Lösungen einen Mehrwert liefern kann.

Die Validität in den existierenden Systemen kommt hauptsächlich durch den Einsatz der konventionellen und erprobten PCR und einer gründlichen Probenvorbereitung zustande. Dafür sind Kartuschensysteme notwendig, in denen die verschiedenen Prozesse von der Zellaufspaltung über die Extraktion und Waschschrte bis hin zur Zugabe der Reaktionsflüssigkeit abgebildet werden können. Die reduzierte Probenvorbereitung im vorgestellten Prozess bietet hier einen Vorteil, der auch durch den Einsatz von LAMP möglich wird. Diese gilt im Vergleich zur PCR sowohl als robuster als auch sensitiver [7]. Leider geht das auf Kosten der Validität. So wird beispielsweise für den Abbott ID NOW™, in welchem ebenfalls eine isothermale Amplifizierung ähnlich der LAMP zum Einsatz kommt, eine geringe Validität berichtet [162]. Durch die konsekutive Durchführung von LAMP und MCA bei Bewahrung des Sample-to-answer Konzepts, erhöht sich die Validität auf ein wenigstens gleiches Niveau. Die Möglichkeit eines Verzichts auf eine Kartusche erlaubt zudem die einfache Skalierung auf ein mehrkanaliges System ohne dabei die Gerätemaße proportional skalieren zu müssen, wie es beispielsweise beim GeneXpert der Fall ist [35].

Denkbar wäre ein 96 kanaliges System in der Größe eines konventionellen Thermocyclers. Die Kosten für die Produktion der Reaktionsgefäße mit passivierten kapazitiven Sensoren sind schwer abzuschätzen. Im Vergleich zur Produktion der Kartusche kann jedoch auf den Einsatz von Markierungspartikel, wie teuren Fluoreszenzfarbstoffen oder magnetischen Beads verzichtet werden. Eine Funktionalisierung von Oberflächen ist ebenfalls nicht notwendig. Entscheidend ist also für den erfolgreichen Einsatz in POCT Anwendungen die Verfügbarkeit der Verbrauchsmaterialien. Die Herstellung eines Reaktionsgefäßes, welches mit einer kapazitiven Sensoreinheit gekoppelt wird, kann im Vergleich zur Fertigung einer Kartusche weniger aufwendig gestaltet werden. Somit entscheidet sich der Einsatz von elektrochemischen Transducern in der Virendiagnostik am Transfer des hier vorgestellten Sensorkonzepts in ein industriereifes Produkt.

## Kapitel 4

### Zusammenfassung und Ausblick

Der Einsatz von elektrochemischen Transducern in der Virendiagnostik wurde untersucht. Ausgehend von den bekannten physikalischen Effekten der pH-Änderung bei der Hybridisierung und der Abhängigkeit der Dielektrizitätszahl von Stranglänge und -konfiguration wurden Sensoren entwickelt, die diese Effekte messen können. Für die pH-Messung war dies ein FG-ISFET mit integrierter Referenzelektrode und Operationsverstärker, für die Messung der Dielektrizitätszahl ein passivierter IDT mit Heizmäander und Temperaturwiderstand, verbunden mit einer hochfrequenten Kapazitätsmessung.

Für die Sensoren wurde eine Aufbau- und Verbindungstechnik entwickelt und realisiert, welche sich durch eine geringe Bauhöhe, ein extrem flaches fluidisches Interface, den Einsatz von biokompatiblen Materialien und abschirmende Eigenschaften bezüglich elektromagnetischer Strahlung auszeichnet. Im experimentellen Aufbau wurden PCR-Tube-Streifen als Reaktionsgefäße auf die Sensoren geklebt. Für zwei verschiedene starke Virenarten, GLRV2 und SARS-CoV-2, wurden die zeitaufgelöste Messung von isothermaler Amplifikation (LAMP) auf ISFETs und IDTs sowie die Schmelzkurvenanalyse (MCA) auf IDTs durchgeführt. Durch die robuste AVT kam es in keinem der Experimente zu Ausfällen im Betrieb der Sensoren durch das Eindringen von Flüssigkeit im Bereich sensitiver elektrischer Strukturen. Als Schwachstelle entpuppte sich dagegen die Klebeverbindung zwischen den Reaktionsgefäßen und der Sensorplatine. Das Austreten von Flüssigkeit durch undichte Stellen führte dazu, dass der Sensor nicht mehr in Kontakt zur Flüssigkeit stand, die vermessen werden sollte. Dies trat jedoch nur vereinzelt auf und verhinderte keineswegs die Eignungstests der Sensoren für die angestrebte Anwendung.

Die Untersuchungen zeigen, dass beide Sensorkonzepte geeignet sind, um LAMP-Reaktionen in Echtzeit zu vermessen. Damit wurde eine Label-freie Virendiagnostik mittels elektrochemischer Transducer erreicht. Das selektive Erkennungsevent findet in der spezifischen Amplifikation durch den Ansatz speziell auf die Zielsequenz designter Primersets statt. Es wurden zwei physikalische Effekte identifiziert und experimentell bestätigt, die dieses Erkennungsevent zeitaufgelöst messen können: die Änderung des pH-Werts durch FG-ISFETs und die Änderung der Dielektrizitätszahl durch passivierte IDTs. Der Ansatz der kapazitiven Messung mit IDTs besteht dabei durch eine Reihe von

Vorteilen. Die Integration von Heizmäandern ist einfacher, da es nicht zu Elektromigration kommen kann. Drifteffekte sind geringer und die Querempfindlichkeit zur Leitfähigkeit fällt weniger stark ins Gewicht. Zudem kann die Messung der Dielektrizitätszahl auch für andere molekularbiologische Verfahren genutzt werden. Schmelzkurvenanalyse ist ein Beispiel, welches im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich umgesetzt wurde. Aber auch andere Analyseverfahren, die in der Diagnostik eingesetzt werden, wie beispielsweise CRISPR/Cas9-RPA [163], können theoretisch auf den kapazitiven Transducern durchgeführt und in Echtzeit gemessen werden.

Der Nachteil besteht im Vergleich zum FG-ISFET in der fehlenden Impedanzwandlung, sodass bei der Verwendung von langen Kabeln große Störeinflüsse in die kapazitive Messung einfließen. Das vorgestellte Packaging-Konzept lässt sich jedoch leicht mit integrierten Kapazitätswandlern wie dem verwendeten TSC des STM32L4 Mikrocontrollers kombinieren und somit lassen sich Leitungslängen minimal halten. Auch andere Sensor-konzepte mit ICs geringerer Baugröße können zur Impedanzmessung verwendet werden, wie der MSP430FR2355 [150].

Bei der Messung der LAMP-Reaktion zeigten die Sensoren zwar eine hohe Streuung, was den FSC und die Einsatzzeit der Signaländerung betrifft, jedoch konnten positive Reaktionen zuverlässig erkannt werden. Bei gleicher Probenvorbereitung und zeitlich gekoppelter Ausführung konnten verwertbare Ergebnisse erzielt werden. Der Ursprung in den Änderungen der Kapazität während der Schmelzkurvenanalyse konnte final nicht gänzlich geklärt werden. Zwar war es möglich, die theoretisch erwartete Schmelztemperatur durch die Messung zu bestätigen, jedoch traten im Messbereich andere Effekte auf, die in einem ungünstigen Fall die Schmelzkurve (Kapazitätsabnahme) überlagern könnten. Hier ist es erforderlich, die verschiedenen molekularbiologischen Prozesse mit kapazitiven Sensoren im Detail in den Blick zu nehmen. Denkbar wäre dabei, den Denaturierungsprozess chemisch zu induzieren [108], um Temperatureffekte auszuklammern. Die Grundidee, die Validität der LAMP-Reaktion zu erhöhen, indem man negative und falsch-positive Amplifikate aussortiert [159, 160], ist dennoch umsetzbar, da die Schmelzkurven dieser Proben im Temperaturbereich von 65 bis 95 °C gar keine Kapazitätsänderungen zeigten.

Durch die Verwendung passivierter kapazitiver Sensorstrukturen kann die Querempfindlichkeit zur Leitfähigkeit kontrolliert werden. Der Einsatz einer integrierten und geregelten Sensorheizung erlaubt die Kontrolle der Temperatur auf einen konstanten Wert, beziehungsweise eine kontrollierte Temperaturänderung im Falle der MCA. Weitere Querempfindlichkeiten tauchten in den MCA Experimenten dort auf, wo neben den Denaturierungsprozessen weitere Effekte die Dielektrizitätszahl in der Probenflüssigkeit beeinflussten. Der Ursprung dieser Änderungen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Sie scheinen abhängig von der Sequenz des amplifizierten Produkts zu sein, da sie nur für eine der beiden untersuchten Virenarten auftraten.

Die hohe Skalierbarkeit des Systems, die Möglichkeit ohne den Einsatz von Fluoreszenz-

markern LAMP-Reaktionen zeitaufgelöst zu messen und MCA durchzuführen, stellen einen echten Mehrwert beim Einsatz elektrochemischer Transducer in der Virendiagnostik dar. Ob dieser auch für den Einsatz in POCT Anwendungen nutzbar gemacht werden kann, hängt mit der Entwicklung eines vertriebsreifen Produkts zusammen, bei dem insbesondere auf eine hohe Verfügbarkeit von kostengünstigen Verbrauchsmaterialien geachtet werden muss.

### 4.1 Weiterentwicklung der Transducer

Dazu gibt es verschiedene Ansätze. Die Verwendung eines IDTs in Reinraumtechnologie mit Goldstrukturen auf einem Glassubstrat bringt den Vorteil einer hohen Kapazität bei geringer Sensorgröße. Mit alternativen Technologien können zwar nur weniger feine Elektrodenabstände realisiert, die Elektrodenanordnung aber flexibler gestaltet werden. Eine günstigere Lösung, ein Reaktionsgefäß zu formen, wäre beispielsweise ein Interdigitaltransducer auf einem flexiblen Substrat mit einer Polyimid-Coverlay Passivierung, der um einen Zylinder gewickelt und unten verschlossen wird. Folienbasierte Systeme bieten in dieser Hinsicht enormes Potenzial, die nötigen elektrischen Sensorstrukturen mit den Kunststoff-basierten Verbrauchsmaterialien in der Bioanalytik zu verknüpfen. Unter dem Einsatz der 3D-MID-Technologie wäre es denkbar, PCR-Tubes zu formen, an deren Außenseite IDTs angebracht sind. Eine Anbringung an der Außenseite würde zudem die Messung des Füllstands ermöglichen. Fehler bei der Befüllung oder Flüssigkeitsverlust durch schlecht verschlossene Gefäße könnten so erkannt und in die automatisierte Bewertung des Ergebnisses einbezogen werden. Dies würde auch die Verwendung von Polypropylen-Gefäßen vermeiden, welche sich zwar durch hohe chemische Beständigkeit auszeichnen, genau aus diesem Grund aber schlecht verklebt werden können. Der gegenwärtige Entwicklungsstand der FG-ISFETs erlaubt den Einsatz in Anwendungen, wie der Echtzeitanalyse von LAMP-Reaktion, in denen allein eine pH-Änderung über eine kurze zeitliche Dauer erforderlich ist. Um die Sensoren in anderen Bereichen einsetzen zu können, ist jedoch die Weiterentwicklung einer stabilen Referenzelektrode nötig. Mögliche Ansätze wären die Verwendung eines edlen Metalls und der Einsatz einer differentiellen Messung [70] oder die elektrochemische Abscheidung von Silber und die Chlorinierung zu Silber/Silberchlorid [164]. Die Integration eines Heizmäanders würde eine stärkere Miniaturisierung unterstützen. Denkbar wäre die Nutzung der Waferrückseite für Heizstrukturen, wie dies bereits in vorangegangenen Projekt realisiert wurde [77]. Im Hinblick auf das System bietet die Verwendung des Einplatinencomputers großes Entwicklungspotenzial für die Integration in bestehende IT-Systeme von Kliniken und Testzentren. Zudem könnte der in der MCA verwendete Savitzky-Golay-Filter in das System übertragen werden. Die schrittweise Anleitung auf dem Display könnte mit der kapazitiven Füllstandsmessung gekoppelt und somit Fehler gleich vor Beginn der Reakti-

on korrigiert werden. Das vorgestellte Konzept der Probennahme in Verbindung mit der kapazitiven Messmethode legt den Grundstein für die Entwicklung eines POCT-Systems für die Virusdiagnostik mit computergestützter geführter Probennahme durch den Anwender und Fehlererkennung durch eine intelligente Sensorik. Die verwendete kapazitive Messung von LAMP und MCA erlaubt eine äußerst sensitive und valide Erkennung von Virusinfektionen und bietet zusätzlich eine hohe Skalierbarkeit.

# Kapitel 5

## Anhang

### 5.1 Publikationen

Steinmaßl, M.; Boudaden, J.; Edgü, G.; Meyer, S.; Mordehay N.; Soto, M.; Endres, H.E.; Muth, J.; Prüfer, D.; Lerch, W.; Kutter, C. Passivated impedimetric sensors for immobilization-free pathogen detection by isothermal amplification and melt curve analysis. *Biosensors* 2022, paper submitted.

Steinmaßl, M.; Boudaden, J.; Hell, W.; Kutter, C. (2021): Simple and powerful encapsulation through hybrid packaging for electrochemical transducers. In: *Smart Systems Integration* 2021.

Fahem, M.; Steinmaßl, M.; Neumeier, K.; Eisele, I.; Korek, E.; Brederlow, R. (2021): pH Measurement System-on-Foil Aided with a Mixed Signal Processor. In: *SMSI 2021 - Sensors and Instrumentation*. S. 85–86.

Steinmaßl, M.; Boudaden, J.; Endres, H.-E.; Reiser, D.; Heigl, M.; Neumeier, K.; Eisele, I.; Kutter, C. (2019): Mikroanalysesystem auf Basis eines ladungsempfindlichen Fluidsensors mit Rückseitenkontakten. In: *20. GMA/ITG-Fachtagung Sensoren und Messsysteme* 2019.

Boudaden, J.; Steinmaßl, M.; Endres, H.-E.; Müller-Buschbaum, P. (2018): Method to Study Water Diffusion into Polymers. In: *EUROSENSORS 2018* (13), S. 812.

Boudaden, J.; Steinmaßl, M.; Endres, H.-E.; Drost, A.; Eisele, I.; Kutter, C.; Müller-Buschbaum, P. (2018): Polyimide-Based Capacitive Humidity Sensor. In: *Sensors* (Basel, Switzerland) 18 (5).

Steinmaßl, M.; Endres, H.-E.; Eisele, I.; Kutter, C.; Boudaden, J.; Müller-Buschbaum, P. (2018): Smart Monitoring System for Air Quality Control with Capacitive Sensors. In: *Proceedings IMCS 2018*. Vienna, Austria





# Abbildungsverzeichnis

1.1	Viruslast. . . . .	3
2.1	Vergleich Virustests. . . . .	12
2.2	qPCR. . . . .	13
2.3	LAMP. . . . .	16
2.4	MCA. . . . .	17
2.5	Biosensor. . . . .	19
2.6	IDT mit Heizer . . . . .	21
2.7	MOSFET. . . . .	23
2.8	ISFET. . . . .	24
2.9	EGFET. . . . .	25
2.10	PG-ISFET. . . . .	26
2.11	FG-ISFET Kennlinienfelder. . . . .	27
2.12	Prober. . . . .	28
2.13	Interdigitalkondensator. . . . .	31
2.14	Modell zur Berechnung der Kapazität. . . . .	32
2.15	IDT System Aufbau. . . . .	33
2.16	Beispielhafter Lagenaufbau einer flexiblen Leiterplatte. . . . .	36
2.17	Drahtbond- und Thermokompressionsverfahren. . . . .	37
2.18	GLRV2 Genomsequenz. . . . .	39
2.19	F3c. . . . .	39
2.20	FIP. . . . .	39
2.21	B3c. . . . .	39
2.22	BIP. . . . .	39
3.1	192er Wellplatte. . . . .	43
3.2	IDT. . . . .	45
3.3	IDT. . . . .	46
3.4	IDT Modell. . . . .	46
3.5	Simulation. . . . .	47
3.6	IDT Simulation. . . . .	48
3.7	FG-ISFET schematisch. . . . .	50
3.8	FG-ISFET. . . . .	51

3.9	FG-ISFET-Schichtaufbau. . . . .	53
3.10	Kennlinie in pH-Puffer. . . . .	54
3.11	FG-ISFET Wiederholbarkeit. . . . .	55
3.12	BPSG Ätzflanke. . . . .	56
3.13	FG-ISFET Differentialmessung. . . . .	57
3.14	Testaufbau mit automatischem Pufferwechsel. . . . .	58
3.15	FG-ISFET Kennlinien in Kalibrierpuffer Sensormaterialvergleich. . . . .	59
3.16	FG-ISFET Kennlinienverschiebung Sensormaterialvergleich. . . . .	60
3.17	Vergleich der Sensitivität verschiedener FG-ISFET-Sensormaterialien. . . . .	61
3.18	FG-ISFET Querempfindlichkeit zu Leitfähigkeit. . . . .	62
3.19	FG-ISFET als Eintauchsensor. . . . .	64
3.20	Folienplatine. . . . .	65
3.21	Packaging-Schichtaufbau. . . . .	66
3.22	Packaging Ablauf. . . . .	66
3.23	Gold Stud Bump. . . . .	67
3.24	Packaging Querschnitt. . . . .	69
3.25	Messung der Dichtigkeit und Testchip. . . . .	70
3.26	FG-ISFET Regelschaltung. . . . .	73
3.27	Integriertes ISFET Frontend. . . . .	74
3.28	Messprinzip Kapazität STM32L4. . . . .	75
3.29	Messprinzip Impedanz ADuCM355. . . . .	76
3.30	ADuCM355 Modul. . . . .	77
3.31	Schema Temperaturregelungssystem. . . . .	78
3.32	Fotographie Temperaturregelungssystem. . . . .	79
3.33	Testmessung Temperaturregelungssystem. . . . .	80
3.34	ISFET System LAMP. . . . .	82
3.35	ISFET Messung LAMP Charge 1. . . . .	83
3.36	ISFET Messung LAMP Charge 2. . . . .	84
3.37	LAMP IDT erster Versuch. . . . .	85
3.38	Kapazitätswert der Messung LAMP. . . . .	87
3.39	Bode Plots der LAMP auf verschiedenen Geometrien. . . . .	89
3.40	Nyquist Plots der LAMP auf verschiedenen Geometrien. . . . .	90
3.41	Details der Geometrien der 6-, 10- und 50- $\mu$ m-Sensoren. . . . .	91
3.42	Impedanz-Zeit Plot (25 kHz) . . . . .	92
3.43	Impedanz-Zeit Plot (400 kHz) . . . . .	92
3.44	Quantifizierung LAMP mit Kapazitätsmessung. . . . .	93
3.45	Statistik aus durchgeführten LAMP Versuchen auf IDTs. . . . .	94
3.46	MCA auf IDTs mit GLRV2 Amplifikat. . . . .	95
3.47	MCA auf IDTs mit SARS-CoV-2 Amplifikat . . . . .	96

3.48 MCA SARS-CoV-2 qPCR-Cycler und uMELT <sup>SM</sup> . . . . .	97
3.49 RNA Sekundärstruktur bei verschiedenen Temperaturen . . . . .	97
3.50 Platine und Demonstrator. . . . .	99
3.51 Kamerabild des Funktionsdemonstrators. . . . .	99
3.52 Farbverlauf einer positiven LAMP-Reaktion. . . . .	100
3.53 LAMP und MCA mit TSC Kapazitätsmessung im Funktionsdemonstrator	101
3.54 Kartoffel Virus Schnelltest. . . . .	102



# Tabellenverzeichnis

1.1	FDA CLIA-waiver Kriterien [12]. . . . .	3
1.2	STARLITE Kriterien zur Bewertung von POCTs [2]. . . . .	5
2.1	Beispiele für LAMP-Nachweismethoden nach [58]. . . . .	20
2.2	Biosensor Ansätze für die Virendiagnostik. . . . .	22
2.3	Charakteristische Werte aus den MOSFET Kennlinienfeldern. . . . .	27
2.4	Einige Materialien und ihre Dielektrizitätszahl. . . . .	30
2.5	Basen von 28287 bis 29230, N-Gen des SARS-CoV-2 Wuhan Wildtyps [126]	40
3.1	Testmessungen im Vergleich zu simulierten Kapazitätswerten. . . . .	48
3.2	Bondpads des FG-ISFET Chips mit Funktionen. . . . .	52
3.3	Spannungsänderungen im pH-Test aus Abbildung 3.10b. . . . .	54
3.4	Spannungsänderungen im pH-Test aus Abbildung 3.16. . . . .	60
3.5	Bondparameter. . . . .	68



## Literatur

- [1] Jane Ru Choi. »Development of Point-of-Care Biosensors for COVID-19«. In: *Frontiers in Chemistry* 8 (2020), S. 517. DOI: 10.3389/fchem.2020.00517.
- [2] Micaela L. Everitt u. a. »A critical review of point-of-care diagnostic technologies to combat viral pandemics«. In: *Analytica Chimica Acta* 1146 (2021), S. 184–199. ISSN: 00032670. DOI: 10.1016/j.aca.2020.10.009.
- [3] Giorgia Guglielmi. »Rapid coronavirus tests: a guide for the perplexed«. In: *Nature* 590.7845 (2021), S. 202–205. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/d41586-021-00332-4.
- [4] IGBCE. *Arbeiten am Limit*. 26.08.2021. URL: <https://igbce.de/igbce/arbeiten-in-den-corona-testlaboren-176768>.
- [5] Eva Baldrich und Cristina Garcia-Aljaro. *Pathogen detection methods: Biosensor development*. Biotechnology in agriculture, industry and medicine. New York: Nova Science Publishers, 2010. ISBN: 1616686995. URL: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=383224>.
- [6] Irene Cano u. a. »Non-lethal loop-mediated isothermal amplification assay as a point-of-care diagnostics tool for *Neoparamoeba perurans*, the causative agent of amoebic gill disease«. In: *Journal of Fish Diseases* 43.7 (2020), S. 779–790. ISSN: 0140-7775. DOI: 10.1111/jfd.13175.
- [7] Güven Edgü u. a. »Fast, Precise, and Reliable Multiplex Detection of Potato Viruses by Loop-Mediated Isothermal Amplification«. In: *International journal of molecular sciences* 21.22 (2020). DOI: 10.3390/ijms21228741.
- [8] Federico Figueredo u. a. »Towards a versatile and economic Chagas Disease point-of-care testing system, by integrating loop-mediated isothermal amplification and contactless/label-free conductivity detection«. In: *PLOS Neglected Tropical Diseases* 15.5 (2021), e0009406. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009406.
- [9] Jinzhao Song u. a. »Instrument-Free Point-of-Care Molecular Detection of Zika Virus«. In: *Analytical Chemistry* 88.14 (2016), S. 7289–7294. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b01632.

- [10] Alex Crozier u. a. »Put to the test: use of rapid testing technologies for covid-19«. In: *BMJ* 372 (2021), n208. DOI: 10.1136/bmj.n208.
- [11] *Coronavirus und COVID-19 - SARS-CoV-2-Testsysteme*. 8.09.2021. URL: <https://www.pei.de/DE/newsroom/dossier/coronavirus/testsysteme.html>.
- [12] »Recommendations for Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA) Waiver Applications for Manufacturers of In Vitro Diagnostic Devices«. In: *FDA 1988* (). URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/recommendations-clinical-laboratory-improvement-amendments-1988-clia-waiver-applications>.
- [13] Andreas K. Lindner u. a. *SARS-CoV-2 patient self-testing with an antigen-detecting rapid test: a head-to-head comparison with professional testing*. 2021. DOI: 10.1101/2021.01.06.20249009.
- [14] Idowa Dpa. »Corona-Faktencheck - Wie verlässlich sind PCR-Tests?« In: *idowa* (4.02.2021). URL: <https://www.idowa.de/inhalt.corona-faktencheck-wie-verlaesslich-sind-pcr-tests.cc661b64-0699-4232-8e06-eb8ecd48b2f8.html>.
- [15] G. Schumann. »Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen«. In: *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2019, S. 2072–2073. DOI: 10.1007/978-3-662-48986-4\_2697. URL: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-48986-4\\_2697](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-48986-4_2697).
- [16] Heinrich Scheiblauer u. a. »Comparative sensitivity evaluation for 122 CE-marked rapid diagnostic tests for SARS-CoV-2 antigen, Germany, September 2020 to April 2021«. In: *Eurosurveillance* 26.44 (2021), S. 2100441. ISSN: 1560-7917. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.44.2100441. URL: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.44.2100441>.
- [17] Katharina Müller u. a. »Pulse-Controlled Amplification-A new powerful tool for on-site diagnostics under resource limited conditions«. In: *PLOS Neglected Tropical Diseases* 15.1 (2021), e0009114. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009114.
- [18] Klaus Ott und Johann Osel. »Corona in Bayern: Aiwangers Schnelltest-Flop«. In: *Süddeutsche Zeitung* (22.08.2021). URL: <https://www.sueddeutsche.de/bayern/bayern-aiwanger-corona-schnelltest-octea-flop-1.5388777>.



- [19] Heita Kitajima u. a. »Clinical COVID-19 diagnostic methods: Comparison of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) and quantitative RT-PCR (qRT-PCR)«. In: *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 139 (2021), S. 104813. DOI: 10.1016/j.jcv.2021.104813.
- [20] Kerstin U. Ludwig u. a. »LAMP-Seq enables sensitive, multiplexed COVID-19 diagnostics using molecular barcoding«. In: *Nature Biotechnology* (2021). ISSN: 1087-0156. DOI: 10.1038/s41587-021-00966-9.
- [21] Informationsdienst Wissenschaft. *Neuer Corona-Massentest bis zu 100-mal empfindlicher als Antigen-Schnelltests*. 26.08.2021. URL: <https://idw-online.de/de/news771741>.
- [22] Byron Freire-Paspuel und Miguel Angel Garcia-Bereguiain. »Low clinical performance of the Isopollo COVID-19 detection kit (M Monitor, South Korea) for RT-LAMP SARS-CoV-2 diagnosis: A call for action against low quality products for developing countries«. In: *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 104 (2021), S. 303–305. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.12.088.
- [23] Peter B. Luppä u. a. »Rational clinical use of near-patient analytical systems for molecular detection of infectious agents«. In: *Journal of Laboratory Medicine* 45.3 (2021), S. 159–165. ISSN: 2567-9430. DOI: 10.1515/labmed-2021-0035.
- [24] Aashish Priye u. a. »A smartphone-based diagnostic platform for rapid detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses«. In: *Scientific reports* 7.1 (2017), S. 44778. DOI: 10.1038/srep44778.
- [25] Imaly A. Nanayakkara und Ian M. White. »Demonstration of a quantitative triplex LAMP assay with an improved probe-based readout for the detection of MRSA«. In: *The Analyst* 144.12 (2019), S. 3878–3885. ISSN: 0003-2654. DOI: 10.1039/C9AN00671K.
- [26] Changping Xu u. a. »Visual detection of Ebola virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nucleic acid strip detection«. In: *Archives of virology* 161.5 (2016), S. 1125–1133. DOI: 10.1007/s00705-016-2763-5.
- [27] Natalia M. Rodriguez u. a. »Paper-Based RNA Extraction, in Situ Isothermal Amplification, and Lateral Flow Detection for Low-Cost, Rapid Diagnosis of Influenza A (H1N1) from Clinical Specimens«. In: *Analytical Chemistry* 87.15 (2015), S. 7872–7879. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01594.

- [28] Nathan A. Tanner, Yinhua Zhang und Thomas C. Evans. »Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes«. In: *BioTechniques* 58.2 (2015), S. 59–68. DOI: 10.2144/000114253.
- [29] New England Biolabs. *WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix with UDG* | NEB. 17.09.2021. URL: <https://international.neb.com/products/m1804-warmstart-colorimetric-lamp-2x-master-mix-with-udg#Product%20Information>.
- [30] Huynh Quoc Nguyen u. a. »Quantification of colorimetric isothermal amplification on the smartphone and its open-source app for point-of-care pathogen detection«. In: *Scientific Reports* 10.1 (2020), S. 15123. DOI: 10.1038/s41598-020-72095-3.
- [31] Robert J. Meagher u. a. »Impact of primer dimers and self-amplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA«. In: *The Analyst* 143.8 (2018), S. 1924–1933. ISSN: 0003-2654. DOI: 10.1039/C7AN01897E.
- [32] Carl T. Wittwer, Randy P. Rasmussen und Kirk M. Ririe. »Rapid polymerase chain reaction and melting analysis«. In: *The PCR revolution*. Hrsg. von Stephen A. Bustin. Cambridge: Cambridge University Press, 2010, S. 48–69. ISBN: 9780511818974. DOI: 10.1017/CBO9780511818974.006.
- [33] Patrick Hardinge und James A. H. Murray. »Reduced False Positives and Improved Reporting of Loop-Mediated Isothermal Amplification using Quenched Fluorescent Primers«. In: *Scientific Reports* 9.1 (2019), S. 7400. DOI: 10.1038/s41598-019-43817-z.
- [34] Michael J. Loeffelholz und Yi-Wei Tang. »Detection of SARS-CoV-2 at the point of care«. In: *Bioanalysis* 13.15 (2021), S. 1213–1223. DOI: 10.4155/bio-2021-0078.
- [35] Siva Raja u. a. »Technology for automated, rapid, and quantitative PCR or reverse transcription-PCR clinical testing«. In: *Clinical chemistry* 51.5 (2005), S. 882–890. ISSN: 0009-9147. DOI: 10.1373/clinchem.2004.046474.
- [36] Jamie E. Phillips. »Invited Product Profile – Cobas Liat System«. In: *Point of Care: The Journal of Near-Patient Testing & Technology* 17.4 (2018), S. 129–131. ISSN: 1533-029X. DOI: 10.1097/POC.0000000000000175.
- [37] Lisa Becherer u. a. »Point-of-Care System for HTLV-1 Proviral Load Quantification by Digital Mediator Displacement LAMP«. In: *Micromachines* 12.2 (2021). ISSN: 2072-666X. DOI: 10.3390/mi12020159.
- [38] Padmapriya Banada u. a. *Evaluation of sample collection and transport strategies to enhance yield, accessibility, and biosafety of COVID-19 RT-PCR testing*. 2021. DOI: 10.1101/2021.03.03.21251172.

- [39] Mickey Williams. »Real-time polymerase chain reaction«. In: *The PCR revolution*. Hrsg. von Stephen A. Bustin. Cambridge: Cambridge University Press, 2010, S. 3–11. ISBN: 9780511818974. DOI: 10.1017/CBO9780511818974.003.
- [40] Michael J. McPherson und S. G. Møller. *PCR. repr. The basics*. Oxford: BIOS, 2003. ISBN: 1859960170.
- [41] R. K. Saiki u. a. »Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia«. In: *Science (New York, N.Y.)* 230.4732 (1985), S. 1350–1354. ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.2999980.
- [42] Stephen A. Bustin, Hrsg. *The PCR revolution: Basic technologies and applications*. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. ISBN: 9780511818974. DOI: 10.1017/CBO9780511818974.
- [43] Sudip K. Rakshit. »Thermostable enzymes used in polymerase chain reaction«. In: *The PCR revolution*. Hrsg. von Stephen A. Bustin. Cambridge: Cambridge University Press, 2010, S. 12–18. ISBN: 9780511818974. DOI: 10.1017/CBO9780511818974.004.
- [44] Grace Adams. »A beginner’s guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR«. In: *The Biochemist* 42.3 (2020), S. 48–53. ISSN: 0954-982X. DOI: 10.1042/BIO20200034.
- [45] T. Notomi u. a. »Loop-mediated isothermal amplification of DNA«. In: *Nucleic acids research* 28.12 (2000), E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
- [46] Eiken Chemical Co., Ltd. *Principle of LAMP method: Basic principle*. 2005. URL: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>.
- [47] New England Biolabs GmbH. *Isothermal Amplification - New England Biolabs GmbH*. 8.12.2021. URL: <https://www.neb-online.de/en/pcr-and-dna-amplification/isothermal-amplification/>.
- [48] Nader Pourmand u. a. »Direct electrical detection of DNA synthesis«. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.17 (2006), S. 6466–6470. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0601184103.
- [49] A. T. Ansevin u. a. »High-resolution thermal denaturation of DNA. I. Theoretical and practical considerations for the resolution of thermal subtransitions«. In: *Biopolymers* 15.1 (1976), S. 153–174. ISSN: 0006-3525. DOI: 10.1002/bip.1976.360150111.
- [50] Zachary Dwight, Robert Palais und Carl T. Wittwer. »uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application«. In: *Bioinformatics* 27.7 (2011), S. 1019–1020. ISSN: 1367-4803. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr065.

- [51] Athanasios C. Tsiatis u. a. »Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications«. In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 12.4 (2010), S. 425–432. DOI: 10.2353/jmoldx.2010.090188.
- [52] K. M. Ririe, R. P. Rasmussen und C. T. Wittwer. »Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction«. In: *Analytical Biochemistry* 245.2 (1997), S. 154–160. ISSN: 00032697. DOI: 10.1006/abio.1996.9916.
- [53] Mariko Yamamura, Koichi Makimura und Yasuo Ota. »Evaluation of a New Rapid Molecular Diagnostic System for Plasmodium falciparum Combined with DNAFilter Paper, Loop-Mediated Isothermal Amplification, and Melting Curve Analysis«. In: *Japanese Journal of Infectious Diseases* (2009), S. 20–25.
- [54] Jacob Fraden. *Handbook of Modern Sensors: Physics, Designs, and Applications*. 5th ed. 2016. Cham und New York: Springer, 2016. ISBN: 9783319193038. DOI: 10.1007/978-3-319-19303-8. URL: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&AN=1081958>.
- [55] Colin Campbell. *New Medium Scale Soil Moisture Measurement Technique - Environment*. Hrsg. von Environmental Biophysics. 2015. URL: <https://www.environmentalbiophysics.org/new-medium-scale-soil-moisture-measurement-technique/>.
- [56] Richard C. Alkire, Hrsg. *Bioelectrochemistry: Fundamentals, applications and recent developments*. Bd. 13. Advances in electrochemical science and engineering. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. ISBN: 9783527328857.
- [57] Filiberto González Garcia u. a. »Epoxy networks for medicine applications: Mechanical properties and in vitro biological properties«. In: *Journal of Applied Polymer Science* 112.3 (2009), S. 1215–1225. ISSN: 00218995. DOI: 10.1002/app.29528.
- [58] Lisa Becherer u. a. »Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection«. In: *Analytical Methods* 12.6 (2020), S. 717–746. ISSN: 1759-9660. DOI: 10.1039/C9AY02246E.
- [59] Vijay J. Gadkar u. a. »Real-time Detection and Monitoring of Loop Mediated Amplification (LAMP) Reaction Using Self-quenching and De-quenching Fluorogenic Probes«. In: *Scientific Reports* 8.1 (2018), S. 5548. DOI: 10.1038/s41598-018-23930-1.
- [60] Preeda Prankamanant u. a. »The development of DNA-based quartz crystal microbalance integrated with isothermal DNA amplification system for human papillomavirus type 58 detection«. In: *Biosensors & bioelectronics* 40.1 (2013), S. 252–257. DOI: 10.1016/j.bios.2012.07.033.

- [61] Martin Bartosik u. a. »Genomagnetic LAMP-based electrochemical test for determination of high-risk HPV16 and HPV18 in clinical samples«. In: *Analytica Chimica Acta* 1042 (2018), S. 37–43. ISSN: 00032670. DOI: 10.1016/j.aca.2018.08.020.
- [62] Mohamed Shehata Draz und Xiaonan Lu. »Development of a Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) - Surface Enhanced Raman spectroscopy (SERS) Assay for the Detection of Salmonella Enterica Serotype Enteritidis«. In: *Theranostics* 6.4 (2016), S. 522–532. ISSN: 1838-7640. DOI: 10.7150/thno.14391.
- [63] Richard S. Lee und Stephen Bone. »Dielectric studies of chain melting and denaturation in native DNA«. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1397.3 (1998), S. 316–324. ISSN: 01674781. DOI: 10.1016/S0167-4781(98)00024-4.
- [64] Hanbin Ma u. a. »An impedance-based integrated biosensor for suspended DNA characterization«. In: *Scientific reports* 3 (2013), S. 2730. DOI: 10.1038/srep02730.
- [65] Jiten Ch. Dutta. »Ion sensitive field effect transistor for applications in bioelectronic sensors: A research review«. In: *Proceedings 2012 2nd National Conference on Computational Intelligence and Signal Processing (CISP)*. Piscataway, N.J.: IEEE, 2012, S. 185–191. ISBN: 978-1-4577-0720-9. DOI: 10.1109/NCCISP.2012.6189704.
- [66] Bruno Veigas u. a. »Ion sensing (EIS) real-time quantitative monitorization of isothermal DNA amplification«. In: *Biosensors & bioelectronics* 52 (2014), S. 50–55. DOI: 10.1016/j.bios.2013.08.029.
- [67] Sunil Purushothaman, Chris Toumazou und Chung-Pei Ou. »Protons and single nucleotide polymorphism detection: A simple use for the Ion Sensitive Field Effect Transistor«. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 114.2 (2006), S. 964–968. ISSN: 09254005. DOI: 10.1016/j.snb.2005.06.069.
- [68] Michael J. Schöning und Arshak Poghossian. »Recent advances in biologically sensitive field-effect transistors (BioFETs)«. In: *The Analyst* 127.9 (2002), S. 1137–1151. ISSN: 0003-2654. DOI: 10.1039/b204444g.
- [69] Eric Salm u. a. »Electrical detection of nucleic acid amplification using an on-chip quasi-reference electrode and a PVC REFET«. In: *Analytical chemistry* 86.14 (2014), S. 6968–6975. DOI: 10.1021/ac500897t.
- [70] Christofer Toumazou u. a. »Simultaneous DNA amplification and detection using a pH-sensing semiconductor system«. In: *Nature methods* 10.7 (2013), S. 641–646. DOI: 10.1038/nmeth.2520.
- [71] P. Bergveld. »Development, operation, and application of the ion-sensitive field-effect transistor as a tool for electrophysiology«. In: *IEEE transactions on bio-medical engineering* 19.5 (1972), S. 342–351. ISSN: 0018-9294. DOI: 10.1109/TBME.1972.324137.

- [72] C. Toumazou und P. Georgiou. »Piet Bergveld - 40 years of ISFET technology: From neuronal sensing to DNA sequencing«. In: *Electronics Letters* 47.26 (2011), S.7. ISSN: 00135194. DOI: 10.1049/el.2011.3231. URL: <https://digital-library.theiet.org/content/journals/10.1049/el.2011.3231>.
- [73] »Metal–insulator–semiconductor structures and MOSFETS«. In: *Introduction to Semiconductor Devices*. Hrsg. von Kevin F. Brennan. Cambridge: Cambridge University Press, 2005, S. 127–168. ISBN: 9780521831505. DOI: 10.1017/CBO9781139171373.009.
- [74] R.E.G. van Hal, J.C.T. Eijkel und P. Bergveld. »A novel description of ISFET sensitivity with the buffer capacity and double-layer capacitance as key parameters«. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 24.1-3 (1995), S. 201–205. ISSN: 09254005. DOI: 10.1016/0925-4005(95)85043-0.
- [75] Nicolas Moser u. a. »ISFETs in CMOS and Emergent Trends in Instrumentation: A Review«. In: *IEEE Sensors Journal* 16.17 (2016), S. 6496–6514. ISSN: 1530-437X. DOI: 10.1109/JSEN.2016.2585920.
- [76] Pantelis Georgiou und Christofer Toumazou. »ISFET characteristics in CMOS and their application to weak inversion operation«. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 143.1 (2009), S. 211–217. ISSN: 09254005. DOI: 10.1016/j.snb.2009.09.018. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400509007059>.
- [77] M. Heigl u. a. »Charge sensitive fluid sensor for chemical and biological applications«. In: *Transducers'17, Kaohsiung*. Hrsg. von Weileun Fang, Actuators International Conference on Solid-State Sensors und Microsystems. Piscataway, NJ: IEEE, 2017, S. 1418–1421. ISBN: 978-1-5386-2732-7. DOI: 10.1109/TRANSDUCERS.2017.7994324.
- [78] Ibrahim Fakih u. a. »Large area graphene ion sensitive field effect transistors with tantalum pentoxide sensing layers for pH measurement at the Nernstian limit«. In: *Applied Physics Letters* 105.8 (2014), S. 083101. ISSN: 0003-6951. DOI: 10.1063/1.4894078.
- [79] Dae-Hyuk Kwon u. a. »Effects of heat treatment on Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sensing membrane for low drift and high sensitivity pH-ISFET«. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 34.1-3 (1996), S. 441–445. ISSN: 09254005. DOI: 10.1016/S0925-4005(96)01938-7.
- [80] P. Bergveld. »Thirty years of ISFETOLOGY«. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 88.1 (2003), S. 1–20. ISSN: 09254005. DOI: 10.1016/S0925-4005(02)00301-5.

- [81] S. Meier u. a. »Patterning Platinum by Selective Wet Etching of Sacrificial Pt-A1 Alloy«. In: *2020 4th IEEE Electron Devices Technology & Manufacturing Conference (EDTM)*. IEEE, 4/6/2020 - 4/21/2020, S. 1–4. ISBN: 978-1-7281-2539-8. DOI: 10.1109/EDTM47692.2020.9117886.
- [82] S. Liébana u. a. »Design and development of novel screen-printed microelectrode and microbiosensor arrays fabricated using ultrafast pulsed laser ablation«. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 231 (2016), S. 384–392. ISSN: 09254005. DOI: 10.1016/j.snb.2016.02.142.
- [83] Anette Simonis u. a. »Miniaturised reference electrodes for field-effect sensors compatible to silicon chip technology«. In: *Electrochimica Acta* 51.5 (2005), S. 930–937. ISSN: 00134686. DOI: 10.1016/j.electacta.2005.04.063.
- [84] I-Yu Huang, Ruey-Shing Huang und Lieh-Hsi Lo. »Improvement of integrated Ag/AgCl thin-film electrodes by KCl-gel coating for ISFET applications«. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 94.1 (2003), S. 53–64. ISSN: 09254005. DOI: 10.1016/S0925-4005(03)00326-5.
- [85] Salvatore Andrea Pullano u. a. »EGFET-Based Sensors for Bioanalytical Applications: A Review«. In: *Sensors (Basel, Switzerland)* 18.11 (2018). DOI: 10.3390/s18114042.
- [86] Mark J. Milgrew und David R. S. Cumming. »Matching the Transconductance Characteristics of CMOS ISFET Arrays by Removing Trapped Charge«. In: *IEEE Transactions on Electron Devices* 55.4 (2008), S. 1074–1079. ISSN: 00189383. DOI: 10.1109/TED.2008.916680.
- [87] Pantelis Georgiou und Chris Toumazou. »An adaptive CMOS-based PG-ISFET for pH sensing«. In: *2009 IEEE International Symposium on Circuits and Systems*. [Piscataway, N.J.]: IEEE, 2009, S. 557–560. ISBN: 978-1-4244-3827-3. DOI: 10.1109/ISCAS.2009.5117809.
- [88] Mohammadreza Sohbaty. »Circuits and Systems for DNA Detection by Ion-Sensitive Field Effect Transistor«. Dissertation. London: Imperial College, 2014.
- [89] Abdulrahman Al-Ahdal, P. Georgiou und C. Toumazou. »ISFET's threshold voltage control using bidirectional electron tunnelling«. In: *2012 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS 2012)*. Piscataway, NJ: IEEE, 2012, S. 172–175. ISBN: 978-1-4673-2293-5. DOI: 10.1109/BioCAS.2012.6418469.
- [90] Ignaz Eisele. »Fluidsensor mit einer Verstärkung«. DE 10 2015 104 419 A1 2015.10.08. 2014.
- [91] I. Eisele u. a. »Fluid sensor and method for examining a fluid«. WO2019063650A1. 2017. URL: <https://patents.google.com/patent/WO2019063650A1/>.

- [92] Keysight. *B1500A Semiconductor Device Parameter Analyzer*. 5.09.2018. URL: <https://www.keysight.com/de/de/products/parameter-device-analyzers-curve-tracer/precision-current-voltage-analyzers/b1500a-semiconductor-device-parameter-analyzer.html>.
- [93] Keysight. *Product Discontinued Exemplar - 4142B*. 10.02.2021. URL: <https://www.keysight.com/de/de/product/4142B/modular-dc-sourcemonitor.html>.
- [94] Keysight. *E5250A Low-leakage Switch Mainframe*. 9.09.2020. URL: <https://www.keysight.com/de/de/product/E5250A/low-leakage-switch-mainframe.html>.
- [95] C. Jermain und et al. *ralph-group/pymmeasure: PyMeasure 0.8*. 2020. DOI: 10.5281/zenodo.3732545. URL: [github.com/pymmeasure/pymmeasure](https://github.com/pymmeasure/pymmeasure).
- [96] World Precision Instruments. *Compare Dri-Ref Reference Electrodes*. 19.01.2022. URL: <https://www.wpiinc.com/blog/post/compare-dri-ref-reference-electrodes>.
- [97] Gwent Group. *Sensor/biosensor development and Instrumentation*. 19.01.2022. URL: [https://web.archive.org/web/20200129121607/http://www.gwent.org/gem\\_reference\\_materials.html](https://web.archive.org/web/20200129121607/http://www.gwent.org/gem_reference_materials.html).
- [98] H. Berney u. a. »A DNA diagnostic biosensor: development, characterisation and performance«. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 68.1-3 (2000), S. 100–108. ISSN: 09254005. DOI: 10.1016/S0925-4005(00)00468-8.
- [99] Christofer Toumazou. »QPCR using an ion-sensitive field effect transistor for pH sensing: EU«. EP 2 129 792 B1. 2010.
- [100] M. Mandel. »Dielectric properties of charged linear macromolecules with particular reference to DNA«. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 303.1 (1977), S. 74–89. ISSN: 00778923. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1977.tb55921.x.
- [101] A. Loidl u. a. *Untersuchungen zu der Fragestellung, ob makroskopische dielektrische Gewebeeigenschaften auch auf Zellebene bzw. im subzellulären Bereich uneingeschränkte Gültigkeit besitzen: Bestandsaufnahme*. Hrsg. von Deutsches Mobilfunk Forschungsprogramm. 2006. URL: [http://www.emf-forschungsprogramm.de/forschung/dosimetrie/dosimetrie\\_verg/dosi\\_075\\_ZwB\\_01.pdf](http://www.emf-forschungsprogramm.de/forschung/dosimetrie/dosimetrie_verg/dosi_075_ZwB_01.pdf).
- [102] SHIRO TAKASHIMA. »Mechanism of Dielectric Relaxation of Deoxyribonucleic Acid«. In: *Mass Spectrometry in Inorganic Chemistry*. Hrsg. von John L. Margrave. Bd. 63. *Advances in Chemistry*. Washington, D.C.: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1968, S. 232–252. ISBN: 9780841200647. DOI: 10.1021/ba-1967-0063.ch017.



- [103] H.-E. Endres und S. Drost. »Optimization of the geometry of gas-sensitive interdigital capacitors«. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 4.1-2 (1991), S. 95–98. ISSN: 09254005. DOI: 10.1016/0925-4005(91)80182-J.
- [104] Scott MacKay u. a. »Simulations of Interdigitated Electrode Interactions with Gold Nanoparticles for Impedance-Based Biosensing Applications«. In: *Sensors (Basel, Switzerland)* 15.9 (2015), S. 22192–22208. DOI: 10.3390/s150922192.
- [105] P. Oikonomou u. a. »Chemocapacitance response simulation through polymer swelling and capacitor modeling«. In: *Procedia Engineering* 25 (2011), S. 423–426. ISSN: 1877-7058. DOI: 10.1016/j.proeng.2011.12.105.
- [106] Arslan Qaiser. *Designing a Capacitive Sensor using COMSOL: Application Note*. Hrsg. von ECE 480 DESIGN TEAM 6. 2010.
- [107] C.A. Marquette u. a. »Impedance based DNA chip for direct  $T_m$  measurement«. In: *Talanta* 56.4 (2002), S. 763–768. ISSN: 0039-9140. DOI: 10.1016/S0039-9140(01)00633-6. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914001006336>.
- [108] B. van Grinsven u. a. »Rapid assessment of the stability of DNA duplexes by impedimetric real-time monitoring of chemically induced denaturation«. In: *Lab on a chip* 11.9 (2011), S. 1656–1663. DOI: 10.1039/c1lc20027e.
- [109] Andrei L. Ghindilis u. a. »Sensor Array: Impedimetric Label-Free Sensing of DNA Hybridization in Real Time for Rapid, PCR-Based Detection of Microorganisms«. In: *Electroanalysis* 21.13 (2009), S. 1459–1468. ISSN: 10400397. DOI: 10.1002/elan.200904549.
- [110] Keysight. *4192A LF Impedance Analyzer, 5 Hz to 13 MHz*. 10.02.2021. URL: <https://www.keysight.com/de/de/product/4192A/lf-impedance-analyzer-5-hz-to-13-mhz.html>.
- [111] *ADG1207 Datasheet and Product Info | Analog Devices*. 1.01.2022. URL: <https://www.analog.com/en/products/adg1207.html#product-overview>.
- [112] J. Kafka u. a. »A label-free DNA sensor based on impedance spectroscopy«. In: *Electrochimica Acta* 53.25 (2008), S. 7467–7474. ISSN: 00134686. DOI: 10.1016/j.electacta.2008.01.031.
- [113] Robin Miles, Phillip Belgrader und Christopher Fuller. »Sensor using impedance change to detect the end-point for PCR DNA amplification«. US20020072054A1. 2002. URL: <https://patents.google.com/patent/us20020072054a1/en>.

- [114] Melinda G Simon u.a. »Label-Free Detection of DNA Amplifications in Droplets Using Electrical Impedance«. In: *15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences 2011* (Oct 2-6). URL: [https://www.researchgate.net/profile/melinda\\_simon2/publication/267841588\\_label-free\\_detection\\_of\\_dna\\_amplification\\_in\\_droplets\\_using\\_electrical\\_impedance](https://www.researchgate.net/profile/melinda_simon2/publication/267841588_label-free_detection_of_dna_amplification_in_droplets_using_electrical_impedance).
- [115] Jae-hoon Lee u.a. »Method for detecting PCR product using electrical signal«. US7135294B2. 2006. URL: <https://patents.google.com/patent/us7135294b2/en>.
- [116] R. Bahir u. a. »Label free detection of nucleic acid amplification«. US20110086352A1. 2016. URL: <https://patents.google.com/patent/us9376713b2/en>.
- [117] Juhun Lim u. a. »An analysis method to detect the presence of DNA using electrochemical impedance spectroscopy (EIS) for real-time PCR«. In: *Microsystem Technologies* (2020). ISSN: 0946-7076. DOI: 10.1007/s00542-020-05074-3.
- [118] A. Ohlander u. a. »Assembly of a polymer lab-on-chip device for impedimetric measurements of D-dimers in whole blood«. In: *2010 Proceedings 60th Electronic Components and Technology Conference (ECTC)*. IEEE, 2010, S. 1004–1009. ISBN: 978-1-4244-6410-4. DOI: 10.1109/ECTC.2010.5490824.
- [119] Anna Ohlander. »Foil-based Lab-on-Chip technologies for advanced Point-of-Care molecular diagnostics«. Diss. KTH Royal Institute of Technology, 26.04.2017. URL: <http://kth.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A1090968&dswid=4974>.
- [120] Hany Nasef, Valerio Beni und Ciara K. O’Sullivan. »Labelless electrochemical melting curve analysis for rapid mutation detection«. In: *Analytical Methods* 2.10 (2010), S. 1461. ISSN: 1759-9660. DOI: 10.1039/c0ay00344a.
- [121] V. Vermeeren u. a. »Towards a real-time, label-free, diamond-based DNA sensor«. In: *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 23.26 (2007), S. 13193–13202. ISSN: 0743-7463. DOI: 10.1021/la702143d.
- [122] Vindhya Kunduru. »Microcalorimetric Biosensors for DNA Melting Curve Analysis«. Dissertation. Raleigh: North Carolina State University, 2014.
- [123] Catalin P. Constantin u. a. »Biocompatibility of Polyimides: A Mini-Review«. In: *Materials (Basel, Switzerland)* 12.19 (2019), S. 3166. ISSN: 1996-1944. DOI: 10.3390/ma12193166.
- [124] K. Halsey. *Preparation of Sørensen Phosphate Buffer*. Rothamsted Research, Harpenden, UK, 2017. URL: <https://www.rothamsted.ac.uk/sites/default/files/Preparation-of-Sorenson-PB.pdf>.

- [125] Melissa Soto u. a. »Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of Grapevine Leafroll-associated virus subtypes 1, 2 and 3 in Chile«. In: *Manuscript in preparation* (2022).
- [126] Fan Wu u. a. »A new coronavirus associated with human respiratory disease in China«. In: *Nature* 579.7798 (2020), S. 265–269. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32015508/>.
- [127] G. Edgü u. a. »Designer-Oligonukleotide für den hochspezifisch und schnellen Nachweis von SARS-CoV-2 mittels Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)«.
- [128] Abraham. Savitzky und M. J. E. Golay. »Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures«. In: *Analytical Chemistry* 36.8 (1964), S. 1627–1639. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac60214a047.
- [129] Ronald Schafer. »What Is a Savitzky-Golay Filter?« In: *IEEE Signal Processing Magazine* 28.4 (2011), S. 111–117. ISSN: 1053-5888. DOI: 10.1109/MSP.2011.941097.
- [130] Christian Koch und Titus J. Rinke. *Fotolithografie: Grundlagen der Mikrostrukturierung*. 2. Auflage 2020. Ulm: MicroChemicals, 2020. ISBN: 3981878205.
- [131] Jamila Boudaden u. a. »Polyimide-Based Capacitive Humidity Sensor«. In: *Sensors (Basel, Switzerland)* 18.5 (2018), S. 1516. DOI: 10.3390/s18051516.
- [132] F. Bellucci u. a. »Moisture Effects on the Electrical Conductivity of Kapton Polyimide«. In: *Journal of The Electrochemical Society* 137.6 (1990), S. 1778–1784. ISSN: 0013-4651. DOI: 10.1149/1.2086797.
- [133] L. Bousse, J. Shott und J. D. Meindl. »A process for the combined fabrication of ion sensors and CMOS circuits«. In: *IEEE Electron Device Letters* 9.1 (1988), S. 44–46. ISSN: 0741-3106. DOI: 10.1109/55.20408.
- [134] E. Muller u. a. »Differential ISFET/REFET pairs as a reference system for integrated ISFET-sensor arrays«. In: *Transducers '91*. Piscataway, NJ: IEEE, 1991, S. 467–470. ISBN: 0-87942-585-7. DOI: 10.1109/SENSOR.1991.148913.
- [135] H.-S. Wong und M. H. White. »A CMOS-integrated 'ISFET-operational amplifier' chemical sensor employing differential sensing«. In: *IEEE Transactions on Electron Devices* 36.3 (1989), S. 479–487. ISSN: 00189383. DOI: 10.1109/16.19957.
- [136] Charles C. Liu und Krzysztof Nauka. »Suppression of water vapor absorption in glass encapsulation«. US5094984A.

- [137] *MX Series II™ 6 Position/7 Port Selector Valve*. 20.01.2022. URL: <https://www.idex-hs.com/store/fluidics/valves/stand-alone-valve-products/mx-series-iitm/low-pressure/mx-series-iitm-6-position-7-port-selector-valve.html>.
- [138] *Flangeless Fittings - HPLC Fittings | IDEX Health & Science*. 20.01.2022. URL: <https://www.idex-hs.com/store/fluidics/fluidic-connections/fittings/flat-bottom-fittings/flangeless-fittings.html>.
- [139] Timir Datta-Chaudhuri, Pamela Abshire und Elisabeth Smela. »Packaging commercial CMOS chips for lab on a chip integration«. In: *Lab on a chip* 14.10 (2014), S. 1753–1766. DOI: 10.1039/c4lc00135d.
- [140] L. Sudakov-Boreysha u. a. »ISFET CMOS compatible design and encapsulation challenges«. In: *Proceedings of the 2004 11th IEEE International Conference on Electronics, Circuits and Systems, 2004. ICECS 2004*. IEEE, Dec. 13-15, 2004, S. 535–538. DOI: 10.1109/ICECS.2004.1399736.
- [141] A. Grisel u. a. »Packaging technologies for integrated electrochemical sensors«. In: *Sensors and Actuators* 17.1-2 (1989), S. 285–295. ISSN: 02506874. DOI: 10.1016/0250-6874(89)80093-9. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0250687489800939>.
- [142] W. Oelßner u. a. »Encapsulation of ISFET sensor chips«. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 105.1 (2005), S. 104–117. ISSN: 09254005. DOI: 10.1016/j.snb.2004.05.009. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400504003740>.
- [143] Hal, R. E. G. van, P. Bergveld und J. F. J. Engbersen. »Fabrication and Packaging of Mesa ISFETs«. In: *Sensors and Materials* Volume 8, Number 7 (1996), S. 455–168. URL: <https://www.myukk.org/SM2017/article.php?ss=10259>.
- [144] N. J. Ho u. a. »Encapsulation of polymeric membrane-based ion-selective field effect transistors«. In: *Sensors and Actuators* 4 (1983), S. 413–421. ISSN: 02506874. DOI: 10.1016/0250-6874(83)85052-5.
- [145] Amy Wu u. a. »Modular integration of electronics and microfluidic systems using flexible printed circuit boards«. In: *Lab on a chip* 10.4 (2010), S. 519–521. DOI: 10.1039/b922830f.
- [146] N. R. Basavanhally u. a. »Direct chip interconnect with adhesive-connector films«. In: *1992 proceedings / 42nd Electronic Components & Technology Conference*. New York, NY: IEEE, 1992, S. 487–491. ISBN: 0-7803-0167-6. DOI: 10.1109/ECTC.1992.204250.

- [147] Indranil Bose u. a. »Low Profile Open MEMS and ASIC Packages manufactured by Flexible Hybrid Integration in a Roll-to-Roll compatible process«. In: *48th European Solid-State Device Research Conference (ESSDERC)*. IEEE, 2018, S. 102–106. DOI: 10.1109/ESSDERC.2018.8486868.
- [148] Christof Landesberger u. a. »Housing for a microchip with a structured layer composite and manufacturing method therefor«. DE102016213878B3. 2017. URL: <https://patents.google.com/patent/DE102016213878B3/de?q=102016213878>.
- [149] Matthias Steinmaßl u. a. »Simple and Powerful Encapsulation through Hybrid Packaging for Electrochemical Transducers«. In: *Smart Systems Integration SSI*. Bd. 4/27/2021 - 4/29/2021. 2021, S. 1–4. DOI: 10.1109/SSI52265.2021.9466968.
- [150] Markus Hefele. »Highly Integrated Multichannel CMOS Sensor Systems for Micro-Physiological High-Content Screening Applications«. Dissertation. München: Technische Universität München, 2021.
- [151] Markus Hefele. *Integrated multipurpose analog front-end for electrochemical ISFET sensors*. München, 2019.
- [152] M. Fahem u. a. »A7.3 pH Measurement System-on-Foil Aided with a Mixed Signal Processor«. In: *SMSI 2021 - Sensors and Instrumentation*. AMA Service GmbH, Von-Münchhausen-Str. 49, 31515 Wunstorf, Germany, 5/3/2021 - 5/6/2021, S. 85–86. DOI: 10.5162/SMSI2021/A7.3.
- [153] G.A.M. Nastasi u. a. »Simple Cost Effective and Network Compatible Readout for Capacitive and Resistive (Chemical) Sensors«. In: *Procedia Engineering* 87 (2014), S. 1234–1238. ISSN: 1877-7058. DOI: 10.1016/j.proeng.2014.11.406. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877705814025211>.
- [154] M. Steinmaßl u. a. »Smart Monitoring System for Air Quality Control with Capacitive Sensors«. In: *Proceedings IMCS 2018* (2018), S. 298–299. DOI: 10.5162/IMCS2018/GS8.2. URL: <https://www.ama-science.org/proceedings/details/3003>.
- [155] Jamila Boudaden u. a. »Method to Study Water Diffusion into Polymers«. In: *Proceedings* 2.13 (2018), S. 812. DOI: 10.3390/proceedings2130812.
- [156] Patrice Francois u. a. »Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications«. In: *FEMS immunology and medical microbiology* 62.1 (2011), S. 41–48. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2011.00785.x.
- [157] Ronny Lorenz u. a. »ViennaRNA Package 2.0«. In: *Algorithms for molecular biology : AMB* 6 (2011), S. 26. DOI: 10.1186/1748-7188-6-26.

- [158] Freie Journalistin Anja Köhler. *Mit neuem Testcenter in 40 Minuten zum Ergebnis*. 2020. URL: <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/news/artikel/2020/10/19/mit-neuem-testcenter-in-40-minuten-zum-ergebnis>.
- [159] K. D. Senarath u. a. »Non Specific Amplification with the LAMP Technique in the Diagnosis of Tuberculosis in Sri Lankan Settings«. In: *Journal of Tuberculosis Research* 02.04 (2014), S. 168–172. ISSN: 2329-843X. DOI: 10.4236/jtr.2014.24021.
- [160] Justin C. Rolando u. a. »Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification«. In: *Nucleic acids research* 48.7 (2020), e42. DOI: 10.1093/nar/gkaa099.
- [161] J. Lucina Romero Romero u. a. »A rapid, sensitive and inexpensive method for detection of grapevine red blotch virus without tissue extraction using loop-mediated isothermal amplification«. In: *Archives of virology* 164.5 (2019), S. 1453–1457. DOI: 10.1007/s00705-019-04207-y.
- [162] Tonia Tauh u. a. »Diagnostic performance and clinical application of preoperative COVID-19 bedside testing with ID NOW™«. In: *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthésie* 68.10 (2021), S. 1569–1571. DOI: 10.1007/s12630-021-02035-w.
- [163] Michael M. Kaminski u. a. »CRISPR-based diagnostics«. In: *Nature biomedical engineering* 5.7 (2021), S. 643–656. DOI: 10.1038/s41551-021-00760-7.
- [164] Gerhard Baaken u. a. »Planar microelectrode-cavity array for high-resolution and parallel electrical recording of membrane ionic currents«. In: *Lab on a chip* 8.6 (2008), S. 938–944. DOI: 10.1039/b800431e.







## Danksagung

Nach einem langen Stück Arbeit möchte ich denjenigen danken, die zum Erfolg dieses Projekts beigetragen haben.

Allen voran geht mein Dank an Dr. Jamila Boudaden, die mich auf dem Weg dieser Promotion sowohl fachlich beraten, als auch freundschaftlich begleitet hat. Vielen Dank für deine konsequente Betreuung und dein stets offenes Ohr.

Besonders danke ich für seinen unermüdlichen Einsatz zum Gelingen dieses Vorhabens Prof. Dr. Christoph Kutter. Danke für deine Begeisterung an dem Thema und deine Ermutigung immer noch einen Horizont weiter zu träumen. Ebenso danke ich den Mitgliedern des Prüfungsausschusses Prof. Dr. Joachim Wegener und Prof. Dr. Georg Düsberg.

Dem ganzen Team der Abteilung Siliziumtechnologien und Devices am Fraunhofer EMFT möchte ich Danke sagen, da ohne euch kein einziger der verwendeten Sensoren je zum Dasein gekommen wäre. Mein besonderer Dank geht dabei neben dem Team im Reinraum an Karl Neumeier, Leonhard Sturm-Rogon, Dennise Linke, Uwe Seidelmann, Dr. Hanns-Erik Endres, Robert Wieland, Gabi Reiner, Prof. Dr. Marc Tornow, Prof. Dr. Ignaz Eisele und Dr. Wilfried Lerch.

Den Praktikanten, Bachelor- und Masterstudenten, die sich tatkräftig in diesem Projekt engagiert haben, möchte ich für ihr Vertrauen und ihren Mut danken, sich auf neue Wege zu wagen. Danke an Noa Mordehay, Simon Meyer, James Widjita, Aaron Stahl, Jack Ming Feng, Syrine Soussi, Stefano Gremmo und Mustapha Fahem.

Danke an die Kollegen, welche immer ein offenes Ohr für Probleme hatten, welcher Art diese auch immer waren. Ihr habt die Fraunhofer EMFT zu einem Ort gemacht, an dem ich gerne gearbeitet habe. Anh Bui, Dr. Simon Pfaehler, Martin Heigl, Tina Möbius, Dr. Sebastian Kibler, Christian Hochreiter, Dr. Karin Bauer, Dr. Martin Alberti, Leonhard Sturm-Rogon, Sarina Wagner, Katrin Menz und Dr. Erwin Yacoub.

Für die tolle Zusammenarbeit am Fraunhofer EMFT über Abteilungsgrenzen hinweg danke ich besonders Waltraud Hell, Dieter Bollmann, Christian Hochreiter, Leo Meixner, Franz Wenninger, Dr. Christoph Landesberger, Denis Agafonov, Dieter Hemmetzberger, Michael Henfling, Henry Wolf und Dr. Horst Gieser.

Die Grenzen des Bekannten verschieben wir heute vor allem da, wo wir uns interdisziplinär auf einen gemeinsamen Weg begeben. Den Kollegen am Fraunhofer Institut für

Molekularbiologie und Angewandte Ökologie (IME) gilt mein Dank für ihre Offenheit und Geduld, mit uns Ingenieuren an diesem Thema dran zu bleiben. Danke besonders an Dr. Güven Edgü für die gemeinsamen Arbeitstreffen und Diskussionen, in denen manche Ideen aus dieser Arbeit entstanden sind. Ebenso danke an Dr. Jost Muth, Lena Freund und Prof. Dr. Dirk Prüfer.

Durante dos meses pude conocer el trabajo en un laboratorio de biología molecular del Fraunhofer Centro de Biotecnología de Sistemas en Santiago de Chile. Por la hospitalidad durante este tiempo especial, agradezco muy sinceramente Melissa Soto, Joselyn Fuentes, Martina Spengler, Dr. Derie Fuentes y Dra. Pilar Parada.

Für den anregenden Austausch zum Thema ionensensitive Feldeffekttransistoren möchte ich den Mitarbeitern an der Technischen Universität München am Lehrstuhl für Schaltungsentwurf danken, Markus Hefe, Eva Korek, Christian Pfeffer und Prof. Dr. Ralf Brederlow.

Für die gemeinsame Arbeit im Projekt CitizenSensor, die viel Spaß gemacht hat und aus dem manche Idee in die vorliegende Arbeit eingegangen ist, danke ich Tina Möbius, Dr.-Ing. Peter Weiß, Robert Meisenecker, Andreas Kahler, Dr. Hanns-Erik Endres, Heinrich Hottarek, Sonja Steckhan, Gerhard Herrmann, Dr. Jamila Boudaden, Dr. Tina Klages und Urban Kaiser.

In den vergangenen drei Jahren haben mich Familie und Freunde außerordentlich unterstützt und mir ermöglicht, diese Zeit erfolgreich zu gestalten. Danke meinen Eltern Anita und Hans, meinen Schwiegereltern Doris und Franz, danke Jonathan, Friedemann, Klaus, Renate, Robert, Max, Andreas und allen, die ich hier vergessen habe, für die guten Gespräche in der Zeit meiner Doktorarbeit.

Danke Johann und Aaron, ihr seid ein Grund zur Freude und lasst mich den Sinn erkennen, warum es sich lohnt, Tag für Tag zu versuchen, die Welt ein Stückchen besser zu machen. Falls ihr diese Zeilen in ein paar Jahren lest, fragt mich doch, was ich damals immer so lange am Computer gemacht habe, dann erkläre ich es euch nochmal.

Danke Christina, dass du diesen Weg mit mir gegangen bist. Ich freue mich auf das, was vor uns liegt.



