

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Bernhard Wolf

Konzeption und Erprobung eines biohybriden nanoanalytischen Handheld Systems

Michael Schmidhuber

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. sc. techn. A. Herkersdorf

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. B. Wolf
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. N. Schwesinger

Die Dissertation wurde am 05. 04. 2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik am 14.10.2011 angenommen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Quellen sind im Literaturverzeichnis zitiert.

Kurzfassung

Durch einen erhöhten Informations- und Bildungsstand der Bevölkerung stieg das Konsum- und Gesundheitsbewusstsein an. Dieser gesellschaftliche Fortschritt legitimiert die Entwicklung eines mobilen Bioanalysetools: Durch die Technologie der bioelektronischen Mikrosensoren ist es möglich, Analysen in Anwendungsgebieten wie Lebensmitteltests, Allergiesensorik und Pestiziddetektion durchzuführen oder auch therapierelevante Daten aus Urin, Speichel oder ähnlichem zu ermitteln. Neuartig ist hierbei die Verwendung lebender biologischer Zellen als Wandler zur Signaldetektion.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der konzeptionellen Entwicklung eines handheld Geräts, das für den mobilen Einsatz in der biomedizinischen multiparametrischen Analytik optimiert wurde. Ausgehend von bereits entwickelten und in Dünnschichttechnik gefertigten Sensorchips auf einem Keramiksubstrat, werden Zellen als Signalwandler verwendet. Dieser Biosensor ermöglicht die Messung von zellphysiologischen Parametern im extrazellulären Umfeld der Zelle. Sensoren für pH, Sauerstoffpartialdruck, Impedanz, elektrische Potentiale und Temperatur für die simultane in-vitro Messung von metabolischen, morphologischen und elektrophysiologischen Parametern wurden mit einer miniaturisierten Mixed Signal Elektronik kombiniert, um vor Ort (Point-of-Care) Analysen durchführen zu können.

Ein Schwerpunkt wurde dabei auf die Simulation der analogen Schaltungsteile sowie die Messung der elektrischen Impedanz gelegt. Konzepte zur systemischen Integration einer mikrofluidischen Versorgung der Zellen wurden ausgearbeitet. Anhand dieser Entwicklung wurde es erstmals möglich, dass Lebensmittelanalyse ohne aufwendige labortechnische Untersuchung gezeigt werden konnte. Die präsentierten Messergebnisse beweisen, dass diese Systemlösung mit den erarbeiteten Konzepten eine ernsthafte Alternative zu den bisher kommerziell verfügbaren Ansätzen darstellt. Zum Schluss werden Anwendungsszenarien präsentiert, in denen miniaturisierte Point-of-Care Diagnostik auch in den Consumer Electronics Bereich eintauchen könnte.

Abstract

The consumer behaviour and the health awareness rose due to an increased level of information of the population and their educational background. The social progress justifies the development of a mobile bio-analysis tool: Through the technology of the bioelectronic microsensors it became possible to widen the conventional application areas by research investigations on food tests, allergic sensor system development and pesticide detection. Also accomplishing therapy-relevant data from urine to determine saliva or something similar is possible through this new technology. The breaking innovation is the use of living biological cells as a transducer to signal detection.

This work deals with the conceptional development of a handheld device, which has been optimized for a mobile use in a bio-medical environment. The basis of this device is a custom-made biochip. It has been already available and consists of a ceramic substrate at which the sensor structures were sputtered by thin-film technology. Living cells upon its surface act as a signal converter and permit measurements of the extracellular environment. Sensors for pH, dissolved oxygen, impedance and temperature allow a simultaneous in-vitro acquisition of morphologic, metabolic and electro-physiologic parameters. Together with a miniaturized mixed-signal circuitry point-of-care measurements can be accomplished.

A main focus was put on the simulation of the analogue parts of the modular circuits and on the impedance measurement. Concepts for a systemic integration of a miniaturized fluidic system to feed the cells have been worked out. By this development it became possible for the first time that food analysis can be done without extensive laboratory equipment. The presented results prove that this approach is a seriously alternative to currently available methods. At the end a few application scenarios are discussed where miniaturized point-of-care diagnostics might touch the consumer electronics market.

Danksagung

Diese Dissertation entstand während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit als Assistent am Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik (LME) der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Wolf. Ihm gilt ganz besonderer Dank für die interessante Themenstellung, die exzellente Betreuung, die wertvollen Ratschläge und kritischen Diskussionen, und nicht zuletzt die Geduld, ohne die ein erfolgreiches Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

An dieser Stelle möchte ich mich ebenso bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Medizinische Elektronik für die gute Zusammenarbeit und das kollegiale Arbeitsklima bedanken. Besonders das Fachwissen, die konstruktive Kritik und die vielen Ideen von Herrn Dr.-Ing. Helmut Grothe, Herrn Dr. Martin Brischwein und Herrn Dr.-Ing. Joachim Wiest haben mir immer wieder den nötigen Schwung gegeben.

Ein aufrichtiger Dank gebührt den Werkstattmitarbeitern Herrn Robert Arbogast und Herrn Wolfgang Ruppert, die filigran Erfassbares produziert haben.

Ebenfalls möchte ich an dieser Stelle bei meinen Kollegen herzlich bedanken, die für Rat und Tat an meiner Seite standen, und mir durch zahlreiche fachliche Diskussionen und freundschaftlichem Beistand zum Erfolg verholfen haben. Hier sind auch meine Studenten zu nennen, die mich tatkräftig bei meinem Projekt unterstützt haben.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch meiner Familie und meinen treuen Freunden aussprechen, die mir auch in schwierigen und stressigen Zeiten Kraft und Ausdauer zusprachen. Hier ist ganz besonders Julia Reitberger zu erwähnen, deren ständige Unterstützung sich auf jeder Seite dieser Arbeit niederschlägt.

Großer Dank richtet sich nicht zuletzt auch an Herrn Dipl.-Ing. Herbert Zuleger und das gesamte Team der SHZ Softwarehaus Zuleger GmbH, die meine Dissertation nicht nur finanziell unterstützt haben, sondern mich durch weitere Projektaufgaben für die täglichen Herausforderungen eines Ingenieurs weiter qualifizierten.

Besonders zu erwähnen seien auch die Heinz Nixdorf-Stiftung, die Bayerische Forschungsförderung, das Bundesministerium für Bildung und Forschung, die cellasys GmbH und die Sensor GmbH, die das Projekt teilweise finanziell unterstützt haben. Ihnen gilt ein herzliches „Vergelt´s Gott“.

Publikationen

Preise:

e-on Umweltpreis 2008

Für die Präsentation des Zellchip-basierten Systems "Wasserqualitätsmonitoring mit biohybriden *Sensorchips*" wurde der Lehrstuhl für Medizinische Elektronik (LME) von der e-on Bayern AG am 22. Juli 2008 mit dem Umweltpreis 2008 ausgezeichnet.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht (in chronologischer Reihenfolge):

Publikationen:

1. Wiest, J., **Schmidhuber, M.**, Ressler, J., Scholz, A., Brischwein, M., Wolf, B.:
Cell Based Assays For Diagnostic And Therapy On Multiparametric Biosensor Chips With An Intelligent Mobile Lab
IFMBE Proceedings Volume 10, 2005, 7th International Conference on Cellular Engineering 2005, pp. 29-32
2. Wiest, J., Ressler, J., **Schmidhuber, M.**, Scholz, A., Brischwein, M., Wolf, B.:
Intelligent mobile lab for environmental analysis with multiparametric biosensor chips
Conference Guide Medical Biological Defence Conference 2005 by the Bundeswehr Institute of Microbiology, 2005, p. 129
3. Wiest, J., Stadthagen, T., **Schmidhuber, M.**, Brischwein, M., Ressler, J., Raeder, U., Grothe, H., Melzer, A., Wolf, B.:
Intelligent Mobile Lab for Metabolics in Environmental Monitoring
Analytical Letters, Volume 39, Issue 8, 2006, pp. 1759-1771
4. Wiest, J., Grundl, D., **Schmidhuber, M.**, Brückl, M., Brischwein, M., Grothe, H., Otto, A.M., Wolf, B.:
Cell based assay for label-free, long-term investigation of living cells as alternative testing method for toxicity
ALTEX, 2008, Suppl. Linz, 1, 77-78
5. Wiest, J., Grundl, D., **Schmidhuber, M.**, Brückl, M., Lob, V., F. Ilchmann, Brischwein, M., Grothe, H., Otto, A.M., Wolf, B.:
Real-time and marker-free investigation of living cells
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2008, 46, 9, A160
6. Grundl, D., Wiest, J., **Schmidhuber, M.**, Ressler, J., Grothe, H., Brischwein, M., Wolf, B.:
Zellchip-Systeme zur biologischen Grundlagenforschung
Proceedings BMT 2007, 41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik (DGBMT) im VDE, 2007, No. 48033
7. Ilchmann, F., Trappendreher, D., Becker, B., **Schmidhuber, M.**, Wolf, B.:
768 Electrode Neuroscreening system for automated high content analysis
Heinz Nixdorf Symposium, October 12-13, 2010, Munich, Germany, Proceedings 2010

-
8. Wolf, B., Brischwein, M., Grothe, H., Friedrich, P., **Schmidhuber, M.**, Grundl, D., Spittler, T., Cabala, E., Becker, S., Gleich, B., Clauss, J., Scholz, A., Wiest, J., Becker, B., Wolf, P.:
Komponenten und Systeme für die personalisierte Assistenz
Niederlag, W., Lemke, H.U. (ed.), Personalisierte Medizin, Health Academy Bd. 14, ISBN:978-3-00-030353-1, S. 215-234

Fachvorträge:

1. **Schmidhuber, M.**, Wiest, J., Brischwein, M., Otto, A.M., Grothe, H., Wolf, B.:
Multiparametric sensor chips for the metabolic analysis of live cells
25th DECHEMA annual convention of biotechnologists, Köln, 30.5.-01.06.2007
2. **Schmidhuber, M.**, Wiest, J., Grundl, D., Brückl, M., Büchels, N., Wolf, B.:
Detection of detrimental effects on health in Point-of-Care scenarios using a multiparametric biosensor
Proceedings of the Sixth IASTED International Conference BIOMEDICAL ENGINEERING, Innsbruck, Austria
3. **Schmidhuber, M.**, Becker, B., Wiest, J., Wolf, B.:
Development of a Multiparametric Handheld Biosensor for use in Mobile Applications
The IEEE Region 8 Eurocon 2009 Conference, 18.05.-23.05.2009, Saint-Petersburg, Russia, ISBN 978-1-4244-3861-7, S. 114-121, IEEE Catalog Number CFP09EUR-CDR 2009 IEEE, Library of Congress Number 2009900519
4. Becker, B., Eitzbach, S., **Schmidhuber, M.**, Grundl, D., Ilchmann, F., Grothe, H. Wolf, B.:
Realtime Screening System using living cells for chemosensitivity testing
The IEEE Region 8 Eurocon 2009 Conference, 18.05.-23.05.2009, Saint-Petersburg, Russia, ISBN 978-1-4244-3861-7, S. 114-121, IEEE Catalog Number CFP09EUR-CDR 2009 IEEE, Library of Congress Number 2009900519
5. J.Wiest, **Schmidhuber, M.**, Brischwein, M., Grothe, H., Wolf, B.:
Intelligent mobile lab for metabolics, 2nd International Workshop on Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring
Agadir 10.11.2005
6. Wiest, J., **Schmidhuber, M.**, Cabala, E., Brischwein, M., Grothe, H., Wolf, B.:
Modular, wireless bioelectronic cell chip system
The 3rd European Medical and Biological Engineering Conference EMBEC 05, Prague 23.11.05
7. Wiest, J., Cabala, E., **Schmidhuber, M.**, Brischwein, M., Grothe, H., Wolf, B.:
Intelligent Mobile Lab for detection and processing of cell vitality parameters
5th European Symposium on Biomedical Engineering, Patras, Greece, 07.-09.07.2006
8. Wiest, J., **Schmidhuber, M.**, Stadthagen, T., Brischwein, M., Grothe, H., Wolf, B.:
Intelligentes mobiles Labor für Bioassays und zur Analyse von lebenden Zellen
BMT 2006 Gemeinsame Jahrestagung der Schweizerischen, Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Zürich, 04.09-09.09.2006
9. **Schmidhuber, M.**, Wiest, J., Brischwein, M., Otto, A.M., Grothe, H., Wolf, B.:
Multiparametric sensor chips for the metabolic analysis of live cells
25th DECHEMA annual convention of biotechnologists, Köln, 30.5.-01.06.2007
10. Wiest, J., **Schmidhuber, M.**, Grundl, D., Brischwein, M., Grothe, H., Wolf, B.:
Environmental Engineering using Living Cells as Signal Transducers
IEEE Africon 2007, Windhoek/Namibia, Sep 25th-Sep 28th 2007
11. **Schmidhuber, M.**, Wiest, J., Grundl, D., Brückl, M., Büchels, N., Wolf, B.:
Detection of detrimental effects on health in Point-of-Care scenarios using a multiparametric biosensor
Proceedings of the Sixth IASTED International Conference BIOMEDICAL ENGINEERING, Innsbruck, Austria, 12.-15.02.2008

-
12. Wiest, J., **Schmidhuber, M.**, Lob, V., Grundl, D., Brückl, M., F. Ilchmann, Meyer, J., Brischwein, M., Otto, A.M., Grothe, H., Wolf, B.:
Cell-based assays for live cell monitoring
MipTec 2008, 14.-16.10.2008, Proceedings, Basel, 90
 13. Zottmann, M., Wiest, J., Grundl, D., Becker, B., **Schmidhuber, M.**, Wolf, B.:
Multiparametrische Lab-on-Chip Systeme für markerfreie zellbasierte Assays und Screenings
1. Regionaltagung BioMST, 19.-20.11.2008 Bremen
 14. Wiest, J., **Schmidhuber, M.**, Grundl, D., Brückl, M., Lob, V., F. Ilchmann, Brischwein, M., Grothe, H., Wolf, B.:
Zellbasierte Systeme zur label-freien Echtzeit-Untersuchung lebender Zellen
2. Dresdner Medizintechnik Symposium, 01.-03.12.2008, Dresden
 15. **Schmidhuber, M.**, Becker, B., Wiest, J., Wolf, B.:
Development of a Multiparametric Handheld Biosensor for use in Mobile Applications
The IEEE Region 8 Eurocon 2009 Conference, 18.05.-23.05.2009, Saint-Petersburg, Russia, ISBN 978-1-4244-3860-0, S. 94-101, INSPEC Accession Number: 10791109, Digital Object Identifier: 10.1109/EURCON.2009.5167610
 16. **Schmidhuber, M.**, Bähr, J., Ilchmann, F., Wiest, J., Wolf, B.:
Space saving Mixed Signal FPGAs for improving processing power and memory capacity as a replacement for μ Cs in portable biosensor devices
World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7. - 12. 2009, Munich, Germany, ISBN 978-3-642-03472-5, S. 37-40, IFMBE Proceedings, Volume 25/VIII, Olaf Dössel and Wolfgang C. Schlegel, Springer Heidelberg, 2009

Wissenschaftliche Präsentationen auf Fachtagungen (Veröffentlichungen in Tagungsbänden):

1. Wiest, J., Ressler, J., **Schmidhuber, M.**, Scholz, A., Brischwein, M., Wolf, B.:
Intelligent mobile lab for environmental analysis with multiparametric biosensor chips
Medical Biological Defence Conference 2005 by the Bundeswehr Institute of Microbiology, München, 26.-27.10.05
2. **Schmidhuber, M.**, Wiest, J., Brischwein, M., Grothe, H., Wolf, B.:
Intelligent Mobile Lab for Cellular Analysis
6. Würzburger Medizintechnik Kongress, 9.-11. Mai 2005, Fachverband Biomedizinische Technik e.V., Wetzlar, 358 - 359
3. Wiest, J., **Schmidhuber, M.**, Ressler, J., Scholz, A., Brischwein, M., Wolf, B.:
Cell Based Assays For Diagnostic And Therapy On Multiparametric Biosensor Chips With An Intelligent Mobile Lab
IFMBE Proceedings Volume 10, 2005, 7th International Conference on Cellular Engineering 2005, pp. 29-32
4. Wiest, J., Ressler, J., **Schmidhuber, M.**, Scholz, A., Brischwein, M., Wolf, B.:
Intelligent mobile lab for environmental analysis with multiparametric biosensor chips
Biological Medical Defense Conference 2005, 12
5. Wiest, J., **Schmidhuber, M.**, Cabala, E., Brischwein, M., Grothe, H., Wolf, B.:
Modular, wireless bioelectronic cell chip system
IFMBE Proceedings 11(1), ISSN: 1727-1983, 2005, The 3rd European Medical and Biological Engineering Conference EMBEC 2005
6. **Schmidhuber, M.**, Wiest, J., Brischwein, M., Grothe, H., Wolf, B.:
Intelligent Mobile Lab for Cellular Analysis
MipTec 2006, Proceedings, Basel, P78

-
7. Wiest, J., Cabala, E., **Schmidhuber, M.**, Brischwein, M., Grothe, H., Wolf, B.:
Intelligent Mobile Lab for detection and processing of cell vitality parameters
Proceedings of the 5th European Symposium on Biomedical Engineering, Patras, Greece, 07-09th July 2006
 8. Wiest, J., **Schmidhuber, M.**, Stadthagen, T., Brischwein, M., Grothe, H., Wolf, B.:
Intelligentes mobiles Labor für Bioassays und zur Analyse von lebenden Zellen
BMT 2006, Gemeinsame Jahrestagung der Schweizerischen, Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Biomedizinische Technik - Proceedings, Zürich, 04.09.-09.09.2006, ISSN 0939-4990
 9. Wiest, J., Brückl, M., **Schmidhuber, M.**, Grundl, D., Lob, V., Brischwein, M., Grothe, H., Wolf, B.:
Multiparametric, six channel, online analysis of MCF-7 cells
MipTec 2007, Proceedings, Basel, P116
 10. **Schmidhuber, M.**, Wiest, J., Brischwein, M., Otto, A.M., Grothe, H., Wolf, B.:
Multiparametric sensor chips for the metabolic analysis of live cells
European Bioperspectives 2007 – Book of Abstracts, Köln, 74
 11. Wiest, J., **Schmidhuber, M.**, Grundl, D., Brischwein, M., Grothe, H., Wolf, B.:
Environmental Engineering using Living Cells as Signal Transducers
IEEE Africon 2007, Windhoek/Namibia, ISBN: 0-7803-8606-X, IEEE Catalog number: 04CH37590C
 12. Grundl, D., Wiest, J., Lob, V., **Schmidhuber, M.**, Ressler, J., Grothe, H., Brischwein, M., Wolf, B.:
Zellchipsysteme zur biologischen Grundlagenforschung
41. Jahrestagung der DGBMT - Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik 2007, Aachen, 26.09.-29.09.2007
 13. **Schmidhuber, M.**, Wiest, J., Brischwein, M., Grothe, H., Wolf, B.:
µLab: Mobile miniaturisierte Point of Care Diagnostik
41. Jahrestagung der DGBMT - Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik 2007, Aachen, 26.09.-29.09.2007
 14. **Schmidhuber, M.**, Wiest, J., Otto, A.M., Brischwein, M., Grothe, H., Wolf, B.:
Microelectronic cellular vitality monitoring
Mikrosystemtechnik Kongress 2007, VDE, Dresden, 15.10.-17.10.2007
 15. **Schmidhuber, M.**, Wiest, J., Grundl, D., Brückl, M., Büchels, N., Wolf, B.:
Detection of detrimental effects on health in Point-of-Care scenarios using a multiparametric biosensor
Proceedings of the Sixth IASTED International Conference BIOMEDICAL ENGINEERING, Innsbruck, Austria, ISBN: 978-0-88986-721-5
 16. Brückl, M., Grundl, D., Otto, A.M., **Schmidhuber, M.**, Wiest, J., Lob, V., Ressler, J., Brischwein, M., Grothe, H., Wolf, B.:
Real-time analysis of tumor cell signalling and chemosensitivity testing using multiparametric sensor chips
International Congress on Integrative Cancer Genomics, Munich, 11.02.-13.02.2008, BayGene, Bayerisches Genomforschungsnetzwerk
 17. **Schmidhuber, M.**, Wiest, J., Wolf, B.:
A Handheld Biosensor for Point of Care Scenarios based on a Microsensor Array
14th Nordic-Baltic Conference on Biomedical Engineering and Medical Physics 2008, Riga, NBC 2008, 49
 18. Wiest, J., **Schmidhuber, M.**, Lob, V., Grundl, D., Brückl, M., Ilchmann, F., Meyer, J., Brischwein, M., Otto, A.M., Grothe, H., Wolf, B.:
Cell-based assays for live cell monitoring
MipTec 2008, Proceedings, Basel, 90

-
19. **Schmidhuber, M.**, Wiest, J., Wolf, B.:
A Multiparametric Handheld Biosensor for Mobile Metabolomics
The IET Conference on Synthetic Biology, Systems Biology and Bioinformatics (BioSysBio 2009),
23.-25.03.2009, Cambridge, UK, 192-193
 20. **Schmidhuber, M.**, Wiest, J., Wolf, B.:
Lebende Zellen als Signalwandler für einen Handheld Biosensor
6. Deutsches BioSensor Symposium, 29.03.-01.04.2009, Freiburg, S. 137
 21. Becker, B., Grundl, D., **Schmidhuber, M.**, Ilchmann, F., Brischwein, M., Wolf, B.:
Automatisches Lab-on-a-Chip Testsystem für cell-based assays
6. Deutsches BioSensor Symposium, 29.03.-01.04.2009, Freiburg, S. 147
 22. **Schmidhuber, M.**, Becker, B., Wiest, J., Wolf, B.:
Development of a Multiparametric Handheld Biosensor for use in Mobile Applications
The IEEE Region 8 Eurocon 2009 Conference, 18.05.-23.05.2009, Saint-Petersburg, Russia, ISBN
978-1-4244-3860-0, S. 94-101, INSPEC Accession Number: 10791109, Digital Object Identifier:
10.1109/EURCON.2009.5167610
 23. Becker, B., Etbach S., **Schmidhuber M.**, Grundl D., Ilchmann F., Grothe H., Wolf, B.:
Real-time Screening System using living cells for chemosensitivity testing
The IEEE Region 8 Eurocon 2009 Conference, 18.05.-23.05.2009, Saint-Petersburg, Russia, ISBN
978-1-4244-3860-0, S. 87-93, INSPEC Accession Number: 10791108, Digital Object Identifier:
10.1109/EURCON.2009.5167609
 24. **Schmidhuber, M.**, Bähr, J., Ilchmann, F., Wiest, J., Wolf, B.:
*Space saving Mixed Signal FPGAs for improving processing power and memory capacity as a repla-
cement for μ Cs in portable biosensor devices*
World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7. - 12. 2009, Munich,
Germany, ISBN 978-3-642-03472-5, S. 37-40, IFMBE Proceedings, Volume 25/VIII, Olaf Dössel and
Wolfgang C. Schlegel, Springer Heidelberg, 2009
 25. **Schmidhuber, M.**, Wiest, J., Wolf, B.:
A mobile biosensor using living cells for water quality analysis
World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7. - 12. 2009, Munich,
Germany, ISBN 978-3-642-03472-5, S. 24-26, IFMBE Proceedings, Volume 25/VII, Olaf Dössel and
Wolfgang C. Schlegel, Springer Heidelberg, 2009
 26. Ilchmann, F., Meyer, J., **Schmidhuber, M.**, Zottmann, M., Becker, B., Wolf, B.
Multiparametric NeuroLab with integrated MEA & life support
World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7. - 12. 2009, Munich,
Germany, ISBN 978-3-642-03472-5, S. 77ff, IFMBE Proceedings, Volume 25/VIII, Olaf Dössel and
Wolfgang C. Schlegel, Springer Heidelberg, 2009
 27. Demmel, F., Grundl, D., **Schmidhuber, M.**, Wiest, J., Wolf, B.:
Fieldbus controlled live support system for cell-based biohybrid measuring systems
World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7. - 12. 2009, Munich,
Germany, ISBN 978-3-642-03472-5, S. 98ff, IFMBE Proceedings, Volume 25/VIII, Olaf Dössel and
Wolfgang C. Schlegel, Springer Heidelberg, 2009
 28. Sattler, M., Clauss, J., **Schmidhuber, M.**, Belsky, J., Wolf, B.:
Implantable sensor system for the monitoring of bone healing
World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7. - 12. 2009, Munich,
Germany, ISBN 978-3-642-03472-5, S. 281ff, IFMBE Proceedings, Volume 25/VIII, Olaf Dössel and
Wolfgang C. Schlegel, Springer Heidelberg, 2009
 29. Wiest, J., **Schmidhuber, M.**, Grundl, D., Demmel, F., Zottmann, M., Grothe, H., Brischwein,
M., Wolf, B.:
Cell Based Assays for Label Free Investigation of Living Cells
World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7. - 12. 2009, Munich,
Germany, ISBN 978-3-642-03472-5, S. 363ff, IFMBE Proceedings, Volume 25/VIII, Olaf Dössel and
Wolfgang C. Schlegel, Springer Heidelberg, 2009

-
30. Zottmann, M., Wiest, J., Flurschütz, T., **Schmidhuber, M.**, Wolf, B.:
Sensor chips for multiparametric real time monitoring of cell metabolism and drug response
World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7. - 12. 2009, Munich, Germany, ISBN 978-3-642-03472-5, S. 45ff, IFMBE Proceedings, Volume 25/VIII, Olaf Dössel and Wolfgang C. Schlegel, Springer Heidelberg, 2009
 31. Wiest, J., **Schmidhuber, M.**, Brischwein, M., Grundl, D., Zottmann, M., Wolf, B.:
Cell Based Assays for Marker Free Monitoring of Living Cells
Workshop Microfluidics for Cells, Fraunhofer IZM, 20.10.2009, Munich, Germany, S. 24-26
 32. Wolf, B., Brischwein, M., Becker, B., Demmel, F., Grothe, H., Ilchmann, F., Kleinhans, R., **Schmidhuber, M.**, Schwarzenberger, T., Wiest, J., Wolf, P., Zottmann, M.:
Zell-basierte bioelektronische Chips und Systeme für Diagnostik, Wirkstoffsuche und Therapie
44. Jahrestagung der DGBMT - Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik 2010, Rostock, 05.10.-08.10.2010
 33. **Schmidhuber, M.**, Bähr, J., Zottmann, M. Eminaga, Y., Wiest, J., Wolf, B.:
A mobile biosensor using living cells for detection of pesticide contamination in fruit
Proceedings 20th Anniversary World Congress on Biosensors 26-28 May 2010, Glasgow, UK

Fachzeitschriften:

1. Wiest, J., Scholz, A., **Schmidhuber, M.**:
Drahtlos-Voltmeter via Bluetooth
Elektronik 24/2005, S. 62-64
2. **Schmidhuber, M.**:
Lebende Zellen als Signalwandler
Wasser, Luft und Boden, Zeitschrift für Umwelttechnik, 10/2008, S. 30f, ISSN 0938-8303

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	21
1.1. Aufgabenstellung und Aufbau der Arbeit	21
1.2. Biohybride Sensorsysteme mit Zellen als Signalwandler	22
1.2.1. Herkömmliche Analyse der Wirkung von Stimuli auf lebende Zellen	22
1.2.2. Signalwege und Selbstorganisation in zellulären Systemen	23
1.2.3. Rechtfertigung für einen biohybriden Sensor	25
1.2.4. Zelluläre Systeme als komplexe Filtersysteme und Signalwandler	25
1.2.5. Die Zelle als hochintegrierte Signalverarbeitungseinheit	26
1.2.6. Lebenserhaltungssystem (Fluidik)	26
1.3. Markerfreie zellbasierte Assays (Stand der Technik)	27
1.4. Lab-on-Chip-Systeme am Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik	35
1.4.1. IMOLA-System	37
1.4.2. IMR-System	38
1.4.3. NeuroLab	39
1.5. Biohybride Sensorchips	41
1.6. Portable zellbasierte Biosensoren	43
1.7. Nachteile der kommerziell verfügbaren Systeme	45
2. Impedanzmessung in der biomedizinischen Analytik	47
2.1. Impedanzspektroskopie bei Lab-on-a-Chip Systemen	47
2.1.1. ECIS (Applied BioPhysics)	49
2.1.2. RT-CES (ACEA Biosciences (Roche))	50
2.1.3. CDS (CellKey)	50
2.1.4. IDEs (Bionas)	50
2.2. Ziele der Impedanzmessung in dieser Arbeit	51
2.3. IC AD5933 von Analog Devices	51
2.4. Galvanische Trennung	52
2.5. Technische Ankopplung des BioChip-C an das Impedanzmodul	53
2.6. Schaltungsbeschreibung des Impedanzmoduls	53
2.7. Bestimmung des optimalen Spektrums für Zellmessungen (MCF-7)	54
2.8. Kalibrierung und Messfehler des AD5933	55
2.9. Impedanzmessung an lebenden Zellen	56
2.10. Vergleich der AD5933 Impedanzplatine mit dem Solartron SI1250	57
2.11. Charakterisierung der Messwerte anhand der Impedanzmessung mit MCF-7 Zellen	57
2.12. Darstellung der Ergebnisse aus den Messungen mit lebenden Zellen	58
2.13. Zusammenfassung der Ergebnisse	59
3. Hardware des mobilen Biosensors	63
3.1. Modulkonzept des Handheld Biosensors	63
3.2. Bedienerschnittstelle und Pumpensteuerung	66
3.3. Entwicklung und Simulation der analogen Schaltungskomponenten	66
3.3.1. Messung der Temperatur	66
3.3.1.1. Problemstellung und Schaltungskonzept	66
3.3.1.2. Schaltungsdimensionierung und Auswahl der Komponenten	66
3.3.1.3. Simulation der Temperaturschaltung	69
3.3.2. Messung des pH-Werts	71
3.3.2.1. Problemstellung und Schaltungskonzept	71
3.3.2.2. Schaltungsdimensionierung und Auswahl der Komponenten	71

3.3.2.3.	Simulation der pH-Schaltung	72
3.3.3.	Messung der Sauerstoffkonzentration	74
3.3.3.1.	Problemstellung und Schaltungskonzept	74
3.3.3.2.	Schaltungsdimensionierung und Auswahl der Komponenten	76
3.3.3.3.	Simulation der Sauerstoffschaltung	77
3.4.	Gerätemanagement mit einem Mixed-Signal FPGA	79
3.4.1.	Motivation zum Einsatz eines FPGAs	79
3.4.2.	Actel Fusion Mixed-Signal FPGA	80
3.4.3.	Beschreibung der Hardware und technische Spezifikation	80
3.4.4.	Leistungsanalyse	82
3.4.5.	Signalintegritätsanalyse und deren Einschränkungen	83
3.4.6.	Crosstalk Analyse	84
3.4.7.	Signalqualität der DACs	84
3.5.	Spannungsversorgung bzw. aktive Backplane	85
3.6.	Datenschnittstelle über Funk	87
3.6.1.	Schaltungsdesign der Funkmodule	87
3.6.2.	Einfluss des Funkmoduls auf die Messqualität	88
3.7.	ASIC als Alternative zur diskret aufgebauten Elektronik	88
3.7.1.	Struktur des ASIC Gesamtsystems	89
3.7.2.	Aufbau des ASIC	89
3.7.3.	Digitalteil des ASIC	89
3.7.4.	Analogteil (Mixed-Signal-Teil) des ASIC	90
3.7.5.	Kapazitive Kopplung der Sensormessschaltung und des Digitalteils im ASIC	92
3.8.	Übersicht der Betriebsparameter und technische Daten	94
3.8.1.	Funktionsübersicht	94
3.8.2.	Stromverbrauch	95
3.8.3.	Gewicht	95
4.	Software	97
4.1.	Überblick der Softwarekomponenten	97
4.2.	Embedded Software im FPGA	97
4.2.1.	Realzeitbetriebssystem	97
4.2.2.	Architektur der zentralen Steuersoftware	98
4.2.3.	Datenspeicher	99
4.2.4.	Messwertaufnahme	99
4.2.5.	Protokollverwaltung	100
4.2.6.	Steuerung des Bedienelements	101
4.2.7.	Ansteuerung des Displays	103
4.3.	Firmware des Impedanzmoduls	103
4.3.1.	Aufbau und Funktion	103
4.3.2.	Ansteuerung des Impedanzmess-ICs AD5933 mit einem Mikrocontroller	104
4.4.	Firmware der Kommunikationsmodule	107
4.4.1.	Kommunikationskonzept	107
4.4.2.	Verbindung via Bluetooth	107
4.4.3.	Verbindung via GSM/GPRS	108
4.5.	Anwendersoftware	108
4.5.1.	Entwicklungsstrategie und Auswahl der Softwarebasis	108
4.5.2.	Programmiersprache Python	109
4.5.2.1.	Zugriff auf die serielle Schnittstelle RS232	109
4.5.2.2.	Brücke zur Statistiksprache R	110
4.5.2.3.	Integration von Python und QtiPlot	110
4.5.3.	Testen des Impedanzspektrometers	110
4.5.4.	Steuerung des handheld Systems	111
4.5.5.	Analyse der Messdaten des Biosensors	112
4.5.6.	Statistische Auswertung mehrerer Messdaten	112
4.6.	Serverbasiertes Expertensystem	114

4.6.1.	Funktionale Anforderungen und Komponenten	114
4.6.2.	Darstellung der Messergebnisse	116
5.	Geräteaufbau und Lebenserhaltungssystem	119
5.1.	Kontaktierung des Sensorchips	119
5.2.	Anforderungen an das Gehäuse und Beschreibung des Entwurfs	120
5.3.	Fluidik	121
5.3.1.	Strömungsanalyse	121
5.3.2.	Referenzelektrode zur pH-Messung	123
5.3.3.	Einbringung von Wirkstoff in den geschlossenen Fluidikkreislauf	124
5.3.4.	Pumpkonzepte	125
5.3.5.	Schlauchquetschpumpe (Peristaltikpumpe)	125
6.	Exemplarische Versuchsreihen	129
6.1.	Handhabung der Biomaterialien	129
6.1.1.	Chiptest	129
6.1.2.	Hefezellen	132
6.1.3.	Lagerung und Reaktivierung von Hefe	133
6.1.4.	Optimierung der Hefekonzentration und der Pumprate	133
6.1.5.	Reinigung des Systems	135
6.2.	Getränketest mit Hefen als Signalwandler	135
6.2.1.	Herkömmliche Getränkeanalyse	136
6.2.2.	Versuchsdurchführung und verwendete Energy Drinks	136
6.2.3.	Ergebnisse und Charakterisierung der Energydrinks (Getränketest)	136
6.3.	Prozessparameter zur Pestiziddetektion mit lebenden Zellen	139
6.3.1.	Messtechnischer Hintergrund	139
6.3.2.	Abschätzung der optimalen Zellkonzentration von Hefe auf Filterpapier im BioChip-C und in der Multiwellplatte	140
6.3.3.	Nährmedium und Zellorganismus	140
6.3.4.	Methodik der Datenauswertung	140
6.3.5.	Charakterisierung der verwendeten Pestizide	142
6.3.5.1.	Neudo [®] -Vital Obst-Pilzschutz (Fungizid)	142
6.3.5.2.	Roundup [®] LB Plus Unkrautfrei (Herbizid)	142
6.3.5.3.	Dithane NeoTec (Fungizid)	143
6.3.5.4.	Universal Pilzfrei M (Fungizid)	144
6.3.5.5.	Celaflor [®] Gemüse-Pilzfrei Saprol [®] (Fungizid)	145
6.3.6.	Messkonfigurationen der Zellanalysegeräte	145
6.4.	Pestiziddetektion mit dem IMR-System	147
6.4.1.	Detektion von Neudo [®] -Vital Obst-Pilzschutz (Fungizid)	147
6.4.2.	Detektion von Roundup [®] LB Plus Unkrautfrei (Herbizid)	147
6.4.3.	Detektion von Dithane NeoTec (Fungizid)	148
6.4.4.	Detektion von Universal Pilzfrei M (Fungizid)	149
6.4.5.	Detektion von Celaflor [®] Gemüse-Pilzfrei Saprol [®] (Fungizid)	149
6.5.	Pestiziddetektion mit dem IMOLA-System	150
6.6.	Pestiziddetektion mit dem handheld Biosensor	152
6.6.1.	Negativprobe	152
6.6.2.	Positivprobe	153
6.6.3.	Rauschen der Messwerte	153
6.6.4.	Funktionstest an Zellen (Detektion von Celaflor [®])	154
7.	Diskussion	159
7.1.	Möglichkeiten einer weiteren Miniaturisierung	159
7.2.	Umgang mit der Zellimpedanz in den kommerziellen Systemen	161
7.3.	Alternative Impedanzmustererkennung	162
7.4.	Alternative Pumpkonzepte zur Miniaturisierung der Fluidik	163
7.5.	Problematik einer Zell- und Gehäusetemperierung	166
7.6.	Alternativen zum verwendeten FPGA	168

8. Ausblick	169
8.1. Verbesserungen der Gerätetechnik	169
8.1.1. Gehäuse	169
8.1.2. Elektronik	169
8.1.3. Biochips	170
8.2. Neue Anwendungsgebiete eines handheld Biosensors	170
8.2.1. Zellchipgeräte allgemein	170
8.2.2. Einsatzgebiete für handheld Systeme	170
8.2.3. Alternative Zelltypen	171
8.2.4. Enzyme als alternative Signalwandler	171
8.3. Aspekte zum Einsatz eines handheld Biosensors	172
8.3.1. Die Lebensmittelsicherheitsstrategie der Europäischen Union (EU)	172
8.3.2. Durchsetzung und Kontrolle der Behörden	172
8.3.3. Grenzen der Lebensmittelsicherheitspolitik und Chancen eines handheld Biosensors	173
Abbildungsverzeichnis	175
Tabellenverzeichnis	179
A. Anhang	181
A.1. Schaltpläne und Layouts	181
A.2. Analogmodul	182
A.3. Digitalmodul	184
A.4. Impedanzmodul	188
A.5. Bluetooth Funkmodul	189
A.6. GSM/GPRS Funkmodul	190
A.7. User Interface	191
A.8. Aktive Backplane	192
A.9. Kontaktierung des Sensorchips	193
A.10. Gehäuse (CAD Zeichnungen)	194
A.11. Sedac Protokollfamilie	199
A.11.1. Hauptprotokoll	199
A.11.2. Kommunikationskonzept	199
A.11.3. Beispiele	200
Literaturverzeichnis	201

1. Einleitung

1.1. Aufgabenstellung und Aufbau der Arbeit

Diese Dissertation behandelt die Entwicklung eines portablen Biosensors, der mit Hilfe lebender Zellen als Signalwandler zur Messung von Umweltgiften eingesetzt werden kann. Die daraus resultierende Herausforderung, eine möglichst kompakte und hochpräzise Elektronik zu entwickeln, war aber nur ein Aspekt der Arbeit. Als weltweit erstes Handheld Gerät mit biohybrider Sensorschnittstelle stand auch die Erprobung durch entsprechende Versuche im Vordergrund.

Die Einleitung verschafft dem Leser einen Überblick über das Thema: Hier wird auf die Grundlagen eines Biosensors eingegangen, der lebende Zellen als Signalwandler benutzt. Nachdem der Signalweg und die biologischen Zusammenhänge in der Zelle aufgrund externer Stimuli erklärt worden sind, wird die Schnittstelle zum Sensorchip beschrieben, der die metabolischen Parameter erfasst, die als das Produkt des Zellstoffwechsels angesehen werden können.

Ganz allgemein wird unter der Sektion 1.3 „Stand der Technik“ ein Überblick über die kommerziell verfügbaren Geräte gegeben, die mit vergleichbaren Methoden lebendes Gewebe untersuchen. Größtenteils beschränkt sich deren Einsatz auf die Labordiagnostik, da moderne Untersuchungsmethoden statistisch durch redundante Experimente untermauert sein müssen. Dem wird durch Hochdurchsatzsysteme Rechnung getragen. Die einzigen drei weltweit vergleichbaren Systeme, die als mobil und tragbar bezeichnet werden, sind Kofferlabore, die über den wissenschaftlichen Forschungsstand nicht weiter entwickelt sind. Ihr Aufbau und Funktionsumfang wird kurz umrissen.

Die Aspekte der Impedanzmessungen werden teilweise in der Einleitung beleuchtet, ihnen ist jedoch ein eigenes Kapitel im Hauptteil gewidmet. Es zeigt neben den bereits in Kap. 2.3 dargestellten notwendigen technischen Grundlagen der Hard- und Softwareentwicklung auch die Ergebnisse der Messungen, die das System als hochpräzise charakterisieren und demnach Aussagen über morphologische Parameter im Zellmilieu zulassen. Somit gestattet der in dieser Arbeit beschriebene Biosensor die Erfassung eines weiteren Parameters, der zur Bestimmung der Vitalität der Zellen auch vielfach von kommerziellen Geräteanbietern (z.B. ACEA Bioscience, Roche) als notwendig propagiert wird.

In Kapitel 3 des Hauptteils wird auf jedes Modul des Handheld Biosensors eingegangen. Die einzelnen Abschnitte beschreiben den technischen Aufbau, erläutern technische Raffinessen und Herausforderung in Bezug auf die angestrebte Miniaturisierung und zeigen konstruktionstechnische Problemlösungen auf. Hier wird auf die Umsetzung der elektronischen Komponenten eingegangen, jedoch soll die Konzeptionierung und Umsetzung der notwendigen Integration einer Fluidik in das Gesamtkonzept „Handheld Gerät“ in Kap. 5 nicht weniger wichtig dargestellt werden.

In Kapitel 4 wird sowohl die für den Gerätebetrieb notwendige Firmware als auch die Bedienersoftware auf der PC-Seite beschrieben: Die Grundlage einer Datenerfassung bildet ein gut überlegtes Kommunikationsprotokoll, das dynamisch Befehls- und Datenwörter verarbeiten kann. Das asynchrone Antwortkonzept der Sedac Protokollfamilie gewährleistet eine flexible und ausbaufähige Gerätekommunikation (aufwärtskompatibel).

Die Firmware wurde als Realzeitbetriebssystem umgesetzt, nachdem verschiedene Module zur selben Zeit Messwerte liefern und die Datenkommunikation nach außen sichergestellt sein muss. Auf das Kommunikationskonzept via Bluetooth oder GSM/GPRS wird zuletzt eingegangen.

Die anschließend in Kap. 4.5 beschriebene Umsetzung einer Messsoftware für den PC basiert auf der Nutzung einer frei verfügbaren Analysesoftware (Qtplot), dessen Funktionsumfang erweitert wurde: Zum

einen wurde eine Schnittstellenanbindung direkt zum Gerät realisiert, zum anderen wurden Auswertalgorithmen zur Dateninterpretation programmiert, die dem Anwender helfen, die durchgeführten Versuche zu bewerten. In einem weiteren Abschnitt wird auch noch ein webbasiertes Konzept erläutert, das langfristig ein „Expertensystem“ etablieren soll, mit dem man durch die Summe der Erkenntnisse und Daten aus den Einzelversuchen mehr Potential zur Interpretation der Daten gewinnen kann. Die dazu benötigte Datenbankstruktur sowie die Geräte- und Benutzerschnittstelle wird in Kapitel 4.6 erläutert.

Im folgenden Kapitel 6 werden Ergebnisse aus den biologischen Versuchen dargestellt: Grundlegende Betrachtungen zum richtigen Umgang mit den verwendeten Hefezellen und deren Präparation für den Einsatz als Signalwandler im Sensorchip bilden die Basis für die nachfolgend dargestellten Experimente mit Pestiziden. In jeweils unterschiedlicher Konzentration wurden verschiedene handelsübliche Spritzmittel auf ihre schädigende Wirkung des Zellstoffwechsels untersucht. Da sich der Hefezellstoffwechsel nicht wesentlich von dem der Humanzellen unterscheidet, kann ein gesundheitsgefährdendes Potential beim Verzehr von pestizidbelastetem Obst unterstellt werden. Die hierbei dargestellten Messkurven runden diese Arbeit in technischer Hinsicht ab und beweisen die Funktionsfähigkeit.

In der Diskussion (Kap. 7) und im Ausblick (Kap. 8) werden die Entwicklungen dieser Arbeit abschließend kritisch betrachtet. Mögliche Einsatzgebiete werden ebenfalls diskutiert, so auch mögliche Verbesserungen der Gerätetechnologie und deren Ausbaufähigkeit zur Serienreife. Zudem bietet der Sensorchip weiteres Potential, wenn man seine Sensitivität auf Kosten der ungewollten Spezifität z.B. durch Enzymbeschichtungen erhöhen würde.

1.2. Biohybride Sensorsysteme mit Zellen als Signalwandler

Biohybride Sensorsysteme sind miniaturisierte analytische Systeme, mit denen das zelluläre Signalnetzwerk mit Hilfe von Biomolekülen und biophysischen Signalen charakterisiert werden kann [1]. Solche biohybride Sensorsysteme eignen sich auch für eine Vielzahl von biologischen Versuchen, bei denen spezifische Muster und Signalwege getestet werden [2], [3]. Diese Reaktionen geschehen aufgrund von definierten externen Stimuli in ihrem Umfeld. Zelluläre Systeme eignen sich sowohl für multi-potente Signalfilter als auch als Signalwandler auf physikalischen Sensorarrays [4]. Die vorliegende Arbeit beschreibt einen Ansatz, mit dem lebende Zellen als Signaldetektoren verwendet werden können. Die Schnittstelle bildet ein biohybrider Sensor, der die Vitalitätsparameter in elektrisch erfassbare Signale wandelt [5], [6]. Messungen zeigen, dass das vorliegende Gerät im Bereich Lebensmitteltest und Umweltmonitoring tauglich ist. Die Abb. 1.1 zeigt eine schematische Darstellung der Wirkungskette des in dieser Arbeit beschriebenen Biosensors: Lebende Zellen werden als Signalwandler auf einem multiparametrischen Sensorchip immobilisiert, ein handheld Gerät liest die Signale des elektrochemisch arbeitenden Sensors aus und übermittelt die Daten via Internet an ein Rechenzentrum, das mit Hilfe eines installierten Expertensystems eine präzise Interpretation der Daten liefert.

1.2.1. Herkömmliche Analyse der Wirkung von Stimuli auf lebende Zellen

Um die Wirkung bestimmter Substanzen auf lebende Zellen aller Art zu bestimmen, wird in der Forschung meistens die Überlebensrate der Zellen unter Einwirkung dieses Stoffes gemessen. Dies geschieht, indem die Zellen in „normalem“ Nährmedium in Kultur gebracht werden und dem Medium, wenn die Zellen gut angewachsen sind, die zu testende Substanz in definierter Konzentration zugesetzt wird. Gleichzeitig werden als Kontrolle die gleiche Anzahl Zellen desselben Zelltyps ohne den Zusatz der zu testenden Substanz benötigt [7]. Um nun die Wirkung auf die Zellen zu analysieren, werden die Zellen in definierten Abständen aus der Inkubation (Zellkultur in 37°C Brutschrank) entnommen und die lebenden Zellen (ermittelt mit Hilfe von Trypan-Blau-Färbung) in einer Zählkammer am Mikroskop gezählt. Die Trypan-Blau-Färbung dient der

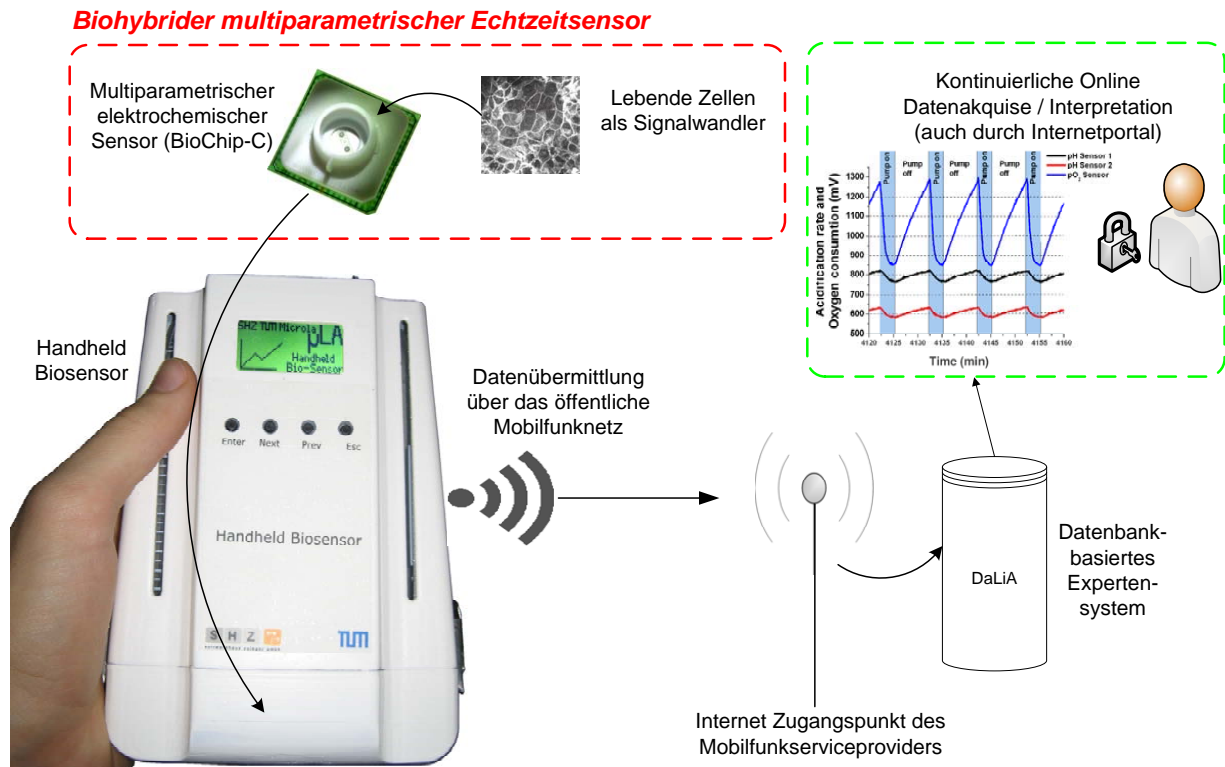


Abb. 1.1.: Schematische Darstellung der Funktion des hier vorgestellten mobilen Biosensors.

Unterscheidung lebender und toter Zellen [8]. Der Farbstoff kann nur in Zellen eindringen, deren normalerweise negatives Membranpotential nicht mehr besteht, das heißt, dass blau angefärbte Zellen tot oder schon sehr stark angegriffen sind. Falls es sich bei den zu zählenden Zellen um adhärenente Zellen handelt, müssen diese erst mit Hilfe eines proteinspaltenden Mittels (Trypsin) von der Oberfläche gelöst werden. Da diese Substanz bei längerer Wirkdauer auch eine schädliche Wirkung auf die Zellen hat, müssen die Zellen nach der Behandlung mit Trypsin mehrfach gewaschen (Zellen zentrifugieren, Medium vorsichtig abpipettieren, wieder mit Medium waschen, zentrifugieren, abpipettieren usw.) werden, bevor sie wieder in Kultur gebracht werden können. Mit diesem sehr arbeitsintensiven und zeitaufwendigen Verfahren kann aber nur die Anzahl lebender Zellen zu bestimmten Zeitpunkten erhalten werden, es kann dabei kaum eine Aussage über den Gesundheitszustand der Zellen getroffen werden (Endpunktanalyse). Die ständige Entnahme aus dem Inkubator und das Waschen mit relativ kühlem Kulturmedium bedeutet zusätzlichen Stress für die Zellen und kann somit Ergebnisse verfälschen. Außerdem steigt mit jedem zusätzlichen Arbeitsschritt das Kontaminationsrisiko für die Zellkultur.

Zellbasierte Analysegeräte, die Stoffwechseländerungen der Testkultur bereits online erfassen können, bieten demnach eine wertvolle Alternative zur Detektion von metabolismusverändernden Einflüssen [9], [10], [11], [12], [13] und [14].

1.2.2. Signalwege und Selbstorganisation in zellulären Systemen

Tierische und pflanzliche Zellen sind extrem komplexe Mikrosysteme, die aus verschiedenen funktionalen Teilsystemen aufgebaut sind. Diese sind speziell an ihre Aufgabe angepasst und bestehen aus Organellen, Membranen oder chemischen Verbindungen [8]. Einzelne Bausteine sind über biochemische Signalpfade verbunden. Auf den ersten Blick erscheinen diese unterschiedlichsten Pfade in höher entwickelten Zellen unüberschaubar und komplex [15].

Während der letzten Jahrzehnte allerdings sind durch neue analytische Methoden, wie z.B. Elektronenmikroskopie, Bildgebung, HPLC¹ und Genomanalysen tiefere Einblicke in die funktionalen Zusammenhänge der einzelnen Teilsysteme entstanden. Durch immunoanalytische Methoden und die feine Aufteilung der Zellbestandteile in Gruppen (vgl. Abb. 1.2) wurde es möglich, funktionale Merkmale mit Teilsystemen zu korrelieren [16]. Andere Methoden, wie die optische Bildgebung, angewandt in-vitro auf vitale Zellkulturen ermöglichte die Erforschung von dynamischen Prozessen aufgrund von Signalverläufen in einer Zellkultur. Als bekanntes Beispiel konnte gezeigt werden, dass intrazelluläre Kalziumoszillationen extrazelluläre Veränderungen im Zellmilieu bewirken und so Morphologie, Proliferation oder auch Zellmigration auslösen können [17]. Zellintern werden diese Veränderungen von rezeptor-vermittelten Signalwegen gesteuert (Metabolic Pathways). Es lassen sich die intrazellulären Signalweiterleitungen auch als elektrisch aktives Netzwerk beschreiben. Dabei werden die winzigen Einheiten an signalverarbeitenden biochemischen Kaskaden durch elektrochemische Gradienten gesteuert. Als Beispiele seien die Phosphorylierung, Photosynthese oder die zelluläre Atmung genannt. Die zellulären Signalwege sind nicht-linear, hoch parallel und dadurch vielfach redundant. So werden bis heute die Faktoren, die z.B. für ein Tumorstadium verantwortlich sind, nicht vollständig verstanden [1]. Die hohe Selbstorganisation innerhalb der Zelle verhindert, dass durch eine Destabilisierung eines Signalpfades durch externe Quellen (wie z.B. Medikamente) ein anderer Pfad die selbe Funktion übernehmen kann. Dieser Kurzschluss eines Pfades bewirkt statt dessen, dass andere Regelmechanismen innerhalb der Zelle nicht vorhersagbare Funktionen auslösen. Diese können die Proliferation sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Neben genetischen Mutationen können auch externe biochemische Stimuli die intrazellulären dynamischen Signalprozesse stören. Resultat einer solchen Veränderung kann entweder der Zelltod sein, oder aber die dynamischen Prozesse übernehmen die Funktionen der geschädigten Strukturen [1].

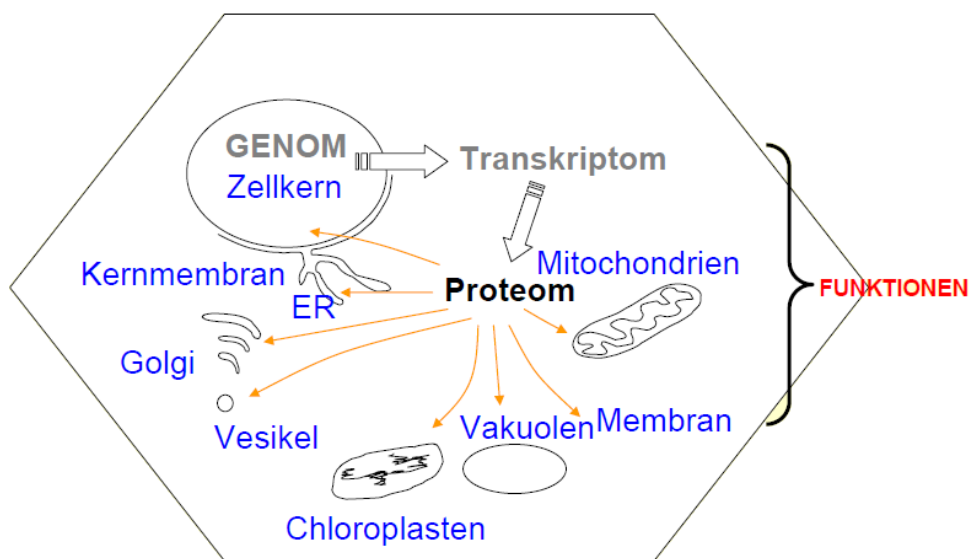


Abb. 1.2.: Die Kompartimentierung der Zelle schafft definierte Reaktionsräume, die einzeln funktional charakterisiert werden können.

Diese Beobachtung ist aber nicht nur auf Tumorzellen beschränkt, auch gesunde normale Zellen zeigen dieses Verhalten. Eine solche funktionale Charakterisierung von Zellen in ihren Zuständen durch Beobachtung ihrer Signalveränderungen stellt eine logische Alternative zu genetischen Analysemethoden dar. Die molekularbiologische Untersuchungsweise gibt zwar mehr Aufschluss darüber, was in den Metabolic Pathways abläuft und wie spezielle Signale wirken. Jedoch schafft es nur die Analyse an lebenden Zellen, dynamische Prozesse zu erfassen [18], [4]. Dafür stehen heute biohybride Sensorchips zur Verfügung, mit dessen Hilfe eine online Beobachtung der Vitalität lebender Zellen möglich ist. Externe Einflüsse auf das

¹HPLC: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Mikromilieu der Zelle lassen uns die Reaktion der internen Signalmuster besser verstehen. Umgekehrt kann aber auch durch Kenntnis der erwarteten Reaktion einer Zelle diese als Signalwandler verwendet werden. Dadurch ergeben sich im Bereich der Sensorik neue Anwendungsfelder, die von der einfachen Stoffanalyse bis hin zum Umweltmonitoring [19], [20] und der Lebensmittelanalyse [21], [22] reichen. Eine hinreichende Charakterisierung von Input-Output Mustern aufgrund von Chemotherapeutika wurde im Bereich der medizinischen Diagnostik bereits hinreichend gezeigt [12], [23], [24], [25].

1.2.3. Rechtfertigung für einen biohybriden Sensor

Zellen stellen hochentwickelte Mikrosysteme dar, deren Signalfade die Funktionalität abbilden. Intrazelluläre Information wird durch spezielle Rezeptoren, Enzymkaskaden oder elektrische Wege übermittelt [1]. Wenn eine Zelle biochemischen oder physiologischen Signalen ausgesetzt ist, reagiert sie mit entsprechenden Verhaltensmustern, die proportional zu Stärke und Intensität der Stimuli sind. Diese Verhaltensmuster können morphologischer oder aber auch molekularer Art sein. Beide Möglichkeiten lassen sich mit bioelektronischen Geräten bzw. Sensoren erfassen. Dabei sei auf die Wirkungskette eines Biosensors verwiesen: Abb. 1.3 zeigt, wie externe Stimuli auf Zellen in elektrische Ausgangssignale transferiert werden können.

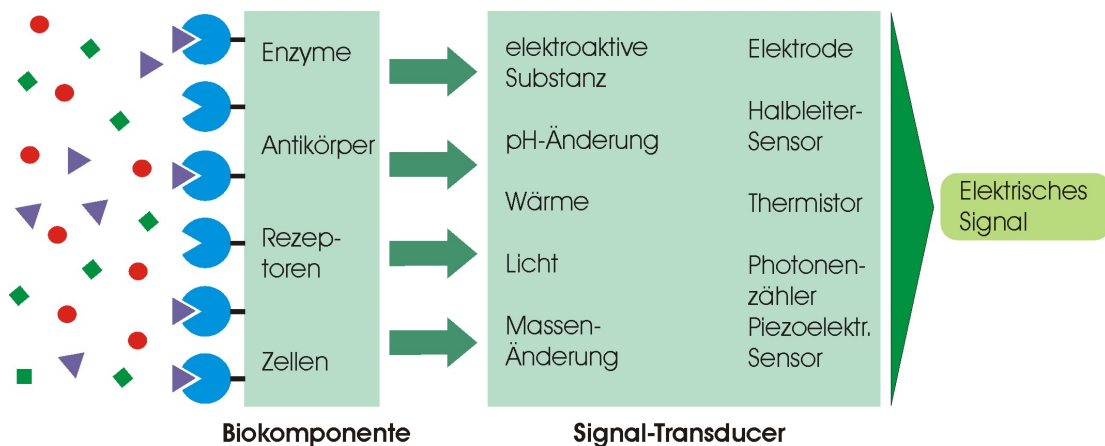


Abb. 1.3.: Funktionsweise eines Biosensors. Der Transducer ist eine elektronische Verstärker-Einheit, die die biologischen Reaktionsmuster der Biokomponente auf physikalische Messwerte abbildet. Quelle: LME

Der Unterschied zu herkömmlichen Methoden wie die Elektronenmikroskopie ist, dass biohybride Sensoren üblicherweise klein und leicht handhabbar sind [26]. Zusätzlich ermöglichen sie eine dynamische Erfassung von metabolischen und/oder morphologischen Veränderungen des Zellmilieus. Diese Sensorchips vereinen die Vorteile der kontinuierlichen Datenerfassung mit der der hochspezifischen und selektiven Eigenschaften eines lebenden Organismus durch biologische Signalfade. Bei zellulären Mikrosensoren ist die Auswahl eines geeigneten Zelltyps und dessen Immobilisierung auf dem Chip ein nicht triviales Unterfangen [4]. Zum einen muss die Zelle den detektorischen Anforderungen genügen, und zum anderen darf das Chipsubstrat keine Wechselwirkung mit dem biologischen Material aufweisen. Der Sensorchip selbst muss langzeitresistent gegen zelluläre Metabolite und Nährlösungen sein [5].

1.2.4. Zelluläre Systeme als komplexe Filtersysteme und Signalwandler

Biosensoren bestehen normalerweise aus einem biologischen oder biochemischen Element, das als Signal-konverter fungiert. Dieses ist auf einem Signalübertrager, dem Biosensor aufgebracht und wandelt die physikalischen oder chemischen Eigenschaften in elektrische oder optische Signale um [27]. Ein nachgeschalteter Verstärker macht die Informationen verarbeitbar. Dadurch wird es möglich, mittels Biosensoren

ein breites Anwendungsspektrum abzudecken und zu erforschen. Biomolekulare Analytik, medizinische Diagnostik, systembiologische Forschung und Umweltanalytik sind derzeit die am häufigsten studierten Disziplinen für Biosensoren, welche mit etablierten Zelllinien arbeiten. Es sei nochmals betont, dass es bei der Verwendung von Zellen als Signalwandler nicht um die spezifische Detektion von Reagenzien oder Stimuli geht. Mittels HPLC und anderen Methoden können gezielt Substanzen ermittelt werden, die bei der Erforschung von Wirkungsketten erforderlich sind. Bei dem hier vorgestellten Tool ist es hingegen möglich, unbekannte Wirkstoffe oder Toxine zu detektieren, die eine generelle Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels auslösen. Dies erweitert das Einsatzgebiet um ein Vielfaches.

Intelligent gestaltete Biosensoren zur Signalverarbeitung

Damit ein Biosensor erfolgreich funktioniert, muss das zelluläre Signalnetzwerk genau studiert werden. Das Matching von Input- zu Outputparametern kann so auf kleine Subsysteme in der Zelle herunter gebrochen werden. Diese Outputparameter können die physikalische Veränderung von pH-Wert und Sauerstoffgehalt im Mikromilieu sein. Innerhalb der Zelle sind die Funktionen von Enzymen, Proteinen oder auch von Rezeptoren ausreichend untersucht worden [8].

1.2.5. Die Zelle als hochintegrierte Signalverarbeitungseinheit

Die interne Signalstruktur der Zelle stellt ein komplexes Netzwerk dar, das nur dann stabil funktioniert, wenn die internen Prozesse durch Feedbackschleifen geregelt werden [1]. Dies wird durch die sich ändernden äußeren Einflüsse notwendig. Durch Simulationen, die diese Regulation der interne Mechanismen beschreibt, ist es gelungen, dass Zellen als Signalwandler verstanden werden können. Der Schritt, aufgrund äußerer Einflüsse die physikalischen Outputparameter zu deuten, liegt daher nahe. Die komplexen internen Vorgänge, angeregt durch biologische Faktoren im äußeren Umfeld des Zellmilieus, beeinflussen Proliferation und Metabolismus [28]. Die Abb. 1.4 zeigt mögliche Wirkungsketten, die durch externe Stimuli (z.B. Moleküle, Wachstumsfaktoren oder Hormone) durch die morphologischen Reaktionen innerhalb der Zelle bestimmt Ausgangssignale erzeugen. Diese äußern sich in veränderten Membranpotentialen, pH-Wertänderung und Änderung der Sauerstoffsättigung [29],[1],[3].

Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Eingangssignale durch intrazelluläre Kaskadierung um einige Größenordnungen verstärkt werden können [13]. Zusätzlich hat aber auch die Ionenkonzentration außerhalb der Zelle eine Schlüsselrolle: Ändert sich der pH-Wert, so reagieren Plasmamembran und interne Enzyme, sodass sich auch die Zellaktivität verändert. Beim Sauerstoffpartialdruck ist es ähnlich. Konzentrationsveränderungen werden durch molekulare Sensoren erfasst [3]. Interne Regelmechanismen verändern Funktionalitäten der Zelle. Diese wirken sich äußerlich wiederum auf die Leitfähigkeit aus [30]. Weitere Ausgangssignale sind eine Änderung des Plasmamembranpotentials, der zellulären Morphologie sowie der Atmungs- und Ansäuerungsaktivität. Weil diese physikalischen Signale nicht uneindeutig mit einer einzelnen externen Stimulanz korreliert werden können, und somit nicht jedes Reagenz einem charakteristischen Signalverlauf unterliegt, muss eine dynamische Auswertung mehrerer Sensoren erfolgen. Die Auswertung eines solchen multiparametrischen Sensorarrays gibt mehr Aufschluss über die Input-Outputfunktionen durch Korrelation der erhaltenen Signalmuster [24], [31].

1.2.6. Lebenserhaltungssystem (Fluidik)

Durch Kultivierung der Zellen auf dem Substrat des Biochips erhält man ein biohybrides Bauelement (cellristor^{®2}), das jedoch ohne Nährstoffversorgung nur eingeschränkt funktioniert. Ein solches Fluidiksystem versorgt die lebenden Zellen mit Nährstoff, damit eine länger währende Messung ermöglicht wird. Dabei werden Ansäuerungs- und Sauerstoffpartialdruckgradienten gemessen, die durch einen stop-and-go Betrieb einer Pumpe ausgelöst werden. In der Ruhephase können die zellinternen Regelmechanismen entsprechend auf die externen Stimuli reagieren und die metabolischen und morphologischen Parameter verändern.

²Eingetragenes Markenzeichen der Steinbeis GmbH & Co. für Technologietransfer Zell-Chip-Technologien

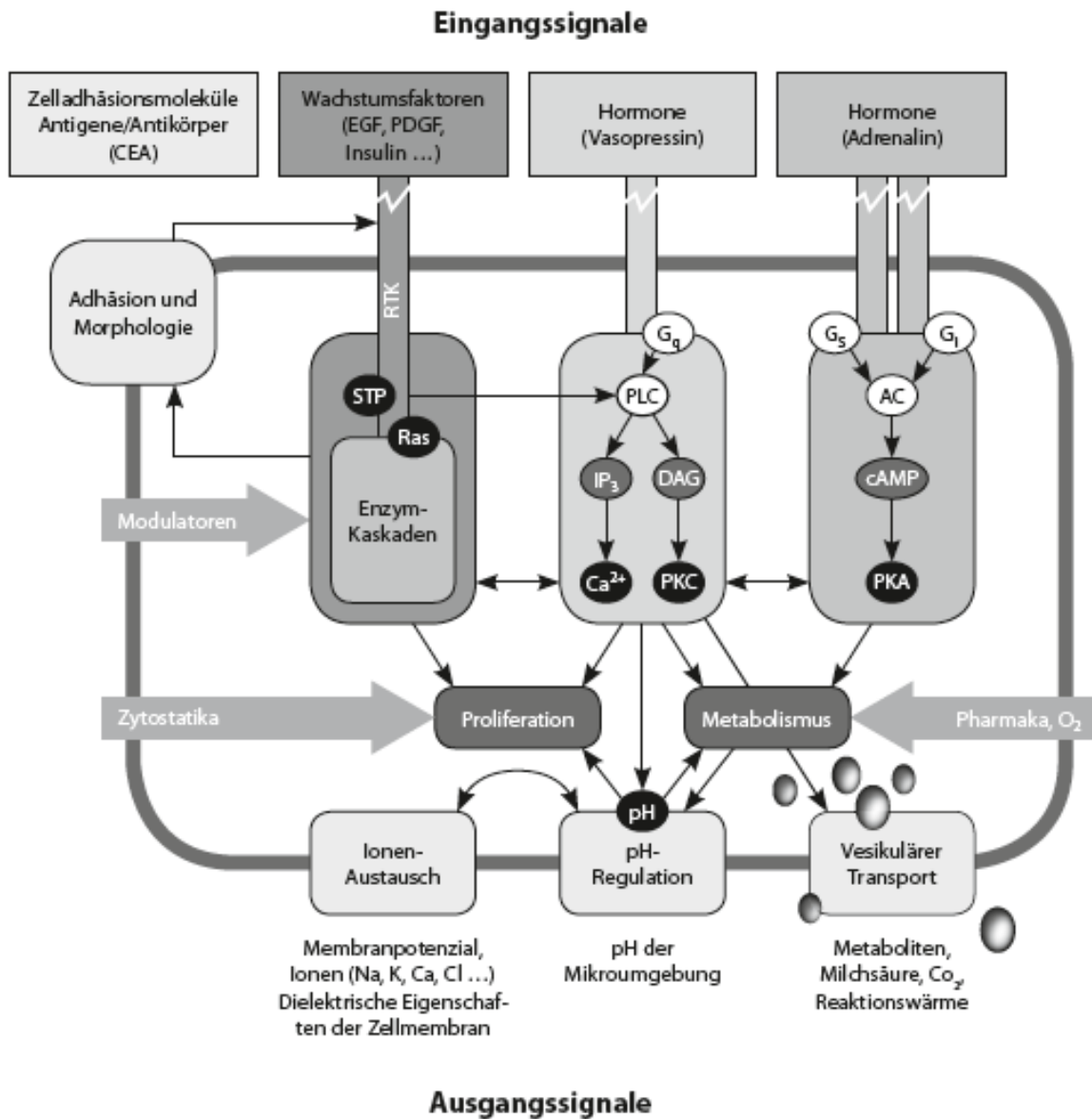


Abb. 1.4.: Transformation von molekularen und pharmakologischen Eingangssignalen durch die Zelle als informationsverarbeitende Signaleinheit, entnommen und modifiziert aus [29],[1]

1.3. Markerfreie zellbasierte Assays (Stand der Technik)

Die sog. *label-free Technologies* kann man in zwei unterschiedliche Kategorien einteilen, in cell-based assays und binding analysis assays. Bei letzteren erfolgt die Untersuchung bei einem relativ geringen Durchsatz mit einzelnen oder mehreren Sensoren oder durch Messung der Wärmekapazität einer Probe. Diese werden für Proteinapplikationen verwendet, die während einer biologischen Charakterisierung und eines biologischen Screenings durchgeführt werden.

Cell-based assays hingegen sind meist Systeme mit moderatem Durchsatz, die auf Mikrotiterplatten basieren. Nachfolgend wird ein besonders Augenmerk auf cell-based assays gelegt (nach [27] und [32]).

Label-free cell-based assays bieten sehr viel Potential. Der größte Vorteil ist die Möglichkeit, mit primary oder non-engineered cells zu arbeiten. Außerdem ist es möglich, schwierige Targets zu filtern und biorelevante Daten zu erstellen. Die wesentlichsten Grenzen der label-free cell-based assays sind derzeit die Interpretierbarkeit der Ergebnisse, das Verständnis der Messungen und die biologische Aussagekraft einer Messung [33]. In der Medikamentenforschung, in der die cell-based label-free Methode u.a. Anwendung findet, hat man bereits Erfolge in assay development, compound profiling und lead identification/secondary screening erzielt. Zukünftig erwartet man gute Ergebnisse in hit identification (primary screening/HTS) und lead optimisation (hits-to-leads). Geringe Erwartungen an dieser Technologie stellt man in clinical diagnostics und leads-to-candidate (ADME Tox/preclinical research) [32].

Nachfolgend wird ein kurzer Überblick über Anbieter von label-free technologies gegeben, erläutert, welchen Schwerpunkt sie in cell-based Anwendungen setzen und welche Erfolge sie bisher erreicht haben. Es sei aber hier darauf verwiesen, dass speziell die Systeme zur Messung der Impedanz erst in Kap. 2.1 genauer erläutert werden und dass hier nur ein genereller Überblick gegeben werden soll. Da in dieser Arbeit die Impedanzmessung Teil des mobilen Biosensors ist, wird ihr auch ein separates Kapitel gewidmet. Darin ist die technische Umsetzung sowie die Erfassung präziser Messergebnisse diskutiert. Die in Kap. 6.4 beschriebenen Anwendungen und Ergebnisse zur Pestiziddetektion machen hingegen keinen Gebrauch der Impedanzmessung, da aufgrund der biologischen Gegebenheiten dies nicht sinnvoll erscheint.

Applied BioPhysics, ein Unternehmen, das Pionierarbeit in label-free monitoring von Zellen geleistet hat, misst die Impedanzänderung einer kleinen Goldelektrode gegenüber einem Wechselstromfluss [34]. Das Herzstück von ECIS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing) ist eine spezielle Platte mit 8 individuellen Wells für Zellkulturen. Zu Beginn der Messung befinden sich auf der Elektrode keine Zellen und der Widerstand beträgt etwa $2\text{k}\Omega$. Nach einer Impfung verankern und breiten sich die Zellen auf der well-base aus, die eine aktive $250\mu\text{m}$ große Elektrode enthält. Die isolierende Plasmamembran der Zellen hemmt den elektrischen Strom und zwingt ihn, in Regionen bei und zwischen den Zellen zu fließen. Dieser ungleichmäßige Stromfluss hat eine große Änderung in der gemessenen Impedanz zur Folge. Obwohl diese Änderung auch auf der Gegenelektrode erfolgt, kann diese dort vernachlässigt werden, da sie hundert mal kleiner ist als auf der kleinen Elektrode. Zusätzlich zu dem Impedanzanstieg können kleine Fluktuationen beobachtet werden, da die lebenden Zellen ständig ihre Form und damit die Impedanz ändern. Mit dem zusammenfließenden cell layer hat nun der Widerstand einen Wert von knapp $15\text{k}\Omega$ erreicht. Es ist wichtig anzumerken, dass der Wechselstrom (etwa $1\mu\text{A}$) und die daraus resultierende Spannung (wenige mV) keine erkennbare Effekte auf die Zellen haben. Zudem ist die Messung nicht invasiv. Mit Hilfe von ECIS kann nach Messung der Impedanz von Zellen die Zellmembrankapazität und der Abstand zwischen Zelle und Elektrode bestimmt werden.

In den letzten Jahren wurde ECIS mit höheren elektrischen Feldern betrieben, um ein vollautomatisches Gerät zur Wundheilungsprüfung herzustellen, dessen Prinzip auf der Messung der Rate des Zellwachstums beruhte. Diese Prüfung kann Veränderungen infolge von Medikamenten und verschiedenen Medienzusammensetzungen nach sich ziehen. Letzte Untersuchungen zeigen Effekte verschiedener absorbierten extrazellulären Matrixproteine auf die Zellmigration [35], [36].

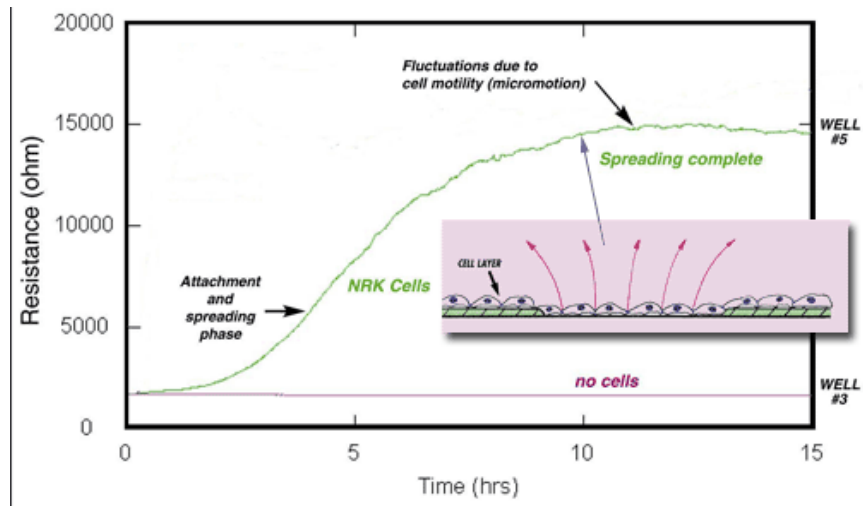


Abb. 1.5.: Messung der Impedanz mit Hilfe von ECIS [34].

Zur Durchführung einer biochemischen Prüfung eines kleinen Moleküls oder zur Untersuchung einer komplexen Funktionalcharakteristik eines endogenen exprimierten G-Proteins verspricht das **Epic®System** der Firma Corning eine Verbesserung der Qualität und der Geschwindigkeit in der Medikamentenforschung [37].

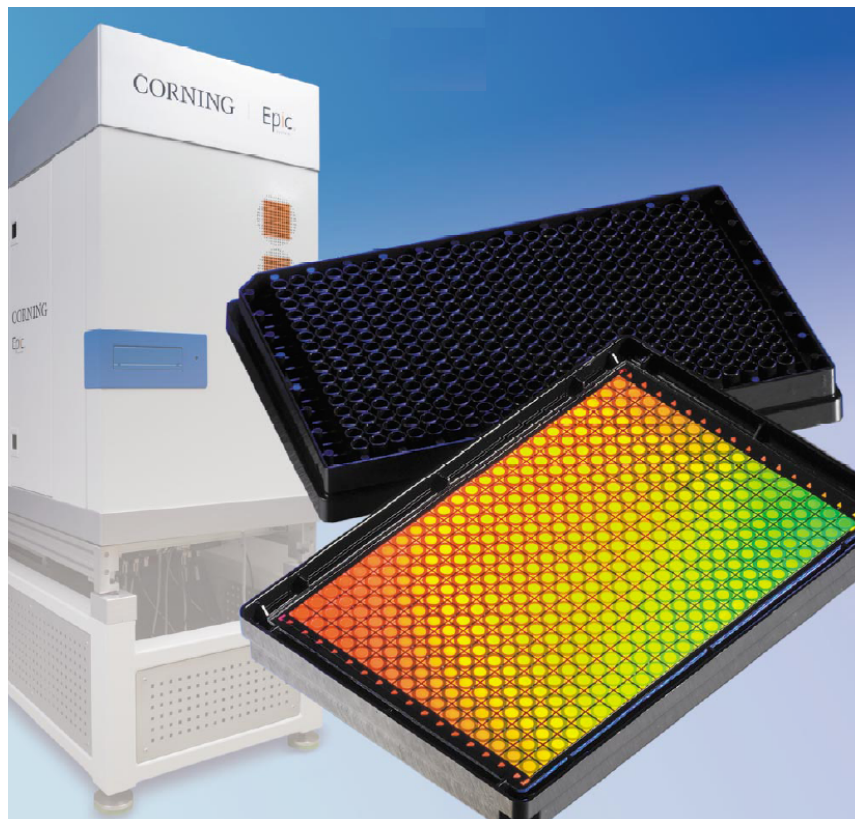


Abb. 1.6.: Corning®Epic®System, Quelle: [37]

Das Epic®System ist eine high-throughput label-free screening Plattform, die auf einer optischen Biosensortechnologie basiert. Das System arbeitet sowohl biochemisch als auch zellbasiert zur Entdeckung

neuer Arzneistoffe und bietet Entwicklern von Medikamenten die Möglichkeit, versprochene neue Medikamentenziele zu evaluieren. Es ermöglicht auch die Beobachtung direkter biologischer Interaktionen, die früher in high-throughput Anwendungen nicht detektierbar waren.

Das Epic®System besteht aus einer ANSI/SBS Standard 384-well Mikroplatte mit optischen Sensoren und einem High-Throughput System (HTS) kompatiblen Mikroplattenleser, geeignet, um bis zu 40000 Wells pro 8 Stunden auszulesen. Das Corning®Epic®System ist eine universelle Plattform, die eine Reihe von Untersuchungen von label-free, direct binding assays, bis zu label-free, functional assays, durchführen kann [38]. Es ermöglicht das Filtern von schwer erreichbaren Targets und Medienbeeinflussungen, die heutzutage nicht überprüft werden, weil Begrenzungen verbunden mit angehängten Labels und Lizenzgebühren entstehen würden [32].

Die Firma IonGate hat auf der Basis eines Biosensors die Technologieplattform **SURFE²R** (Surface Electrogenic Event Reader) entwickelt. Dadurch ist es möglich, elektrisch aktive Membranproteine ohne Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen oder radioaktiven Markern zu untersuchen [39]. Die zu untersuchenden Proteine werden über Vesikel oder Membranfragmente auf eine spezielle Sensoroberfläche gebracht. Die Aktivität der Proteine wird über eine elektrische Messung detektiert. Die SURFE²R-Technologie ist im Vergleich zu anderen Produkten sensitiver und zeichnet sich durch eine drastische Erhöhung der erreichbaren Durchsätze aus. Ein Anwendungsbeispiel ist in Abbildung 1.7 zu sehen. Hier wurde die Substrat-Konzentrationsabhängigkeit des humanen PepT1 untersucht.

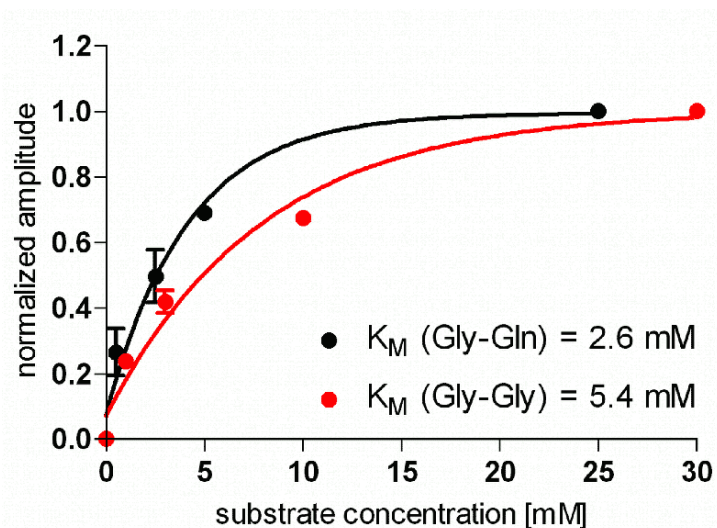


Abb. 1.7.: Substrat-Konzentrationsabhängigkeit des humanen PepT1 mit SURFE²R, Quelle: [39]

Das **CellKey384** von MDS Analytical Technologies (Abb. 1.8) unterstützt eine high-throughput, label-free, cell-based assay Technologie, die die Untersuchung von endogenen und transfizierten Rezeptoren mit haftenden, nicht haftenden und Primärzellen mit Hilfe von Impedanzmessung ermöglicht [40]. Dieses Gerät basiert auf der bereits erprobten CellKeyTM System Technologie und nutzt die Erfahrung, die beim originalen 96-well System gesammelt wurde. Als universelle Plattform können sowohl GPCRs (G protein-coupled receptors) als auch TKRs (tyrosine kinase receptors) gemessen werden [27].

Um schnelle zelluläre Antworten in einem high-throughput Umfeld zu erfassen, liefert das System Verbindungen zu allen 384 Wells der Zellplatte, während gleichzeitig die kinetischen Impedanzdaten erfasst werden, so dass ein Einblick in zelluläre Antworten von dem Zeitpunkt der Rezeptoraktivierung gegeben werden kann. Das CellKey384 System liefert auf einfache Weise reichhaltige Informationen über Impedanzuntersuchungen zu einem sehr frühen Zeitpunkt des Screenings.



Abb. 1.8.: MDS Analytical Technologies CellKey™ 384 System, Quelle: [40]

Das **xCELLigence** System von Roche Applied Science ist eine auf Impedanzmessung basierende label-free Analyseplattform für Zellen [41]. Das xCELLigence System (Abb. 1.9) ist das Ergebnis einer Co-Entwicklung zwischen Roche und ACEA Biosciences Inc.

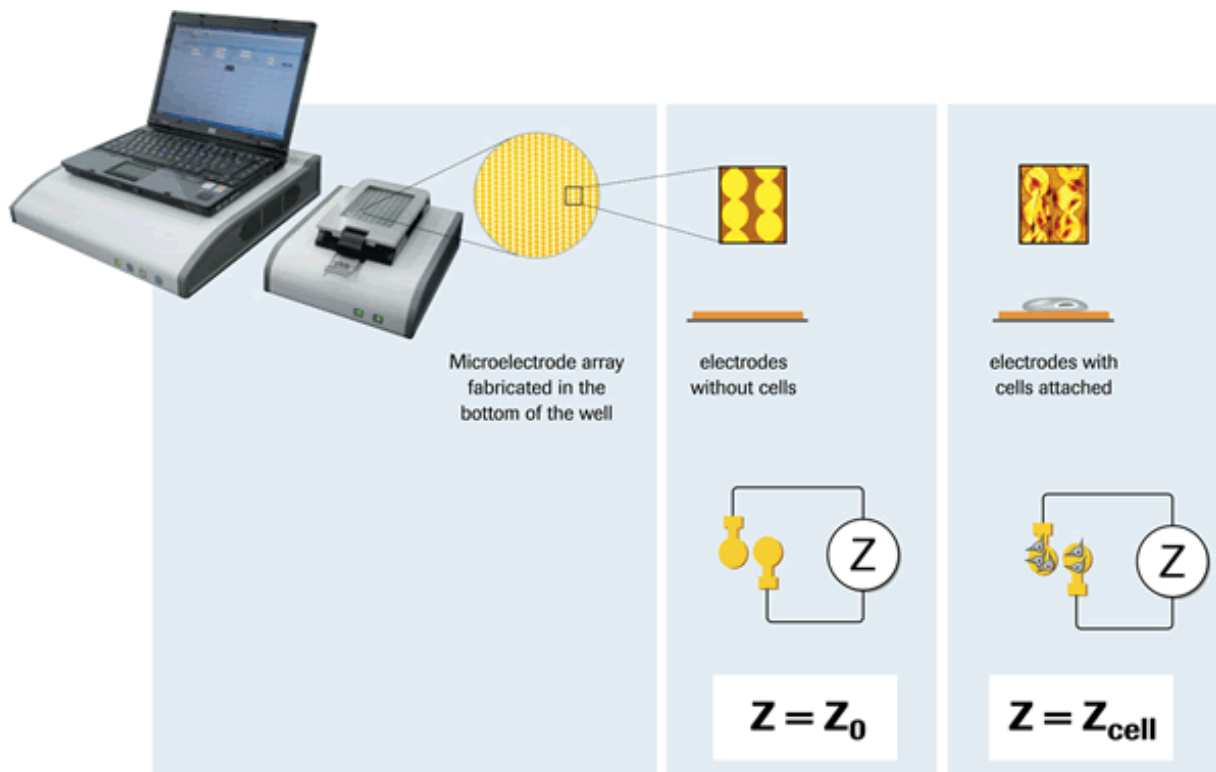


Abb. 1.9.: xCELLigence System, Quelle: [41]

1. Einleitung

Das xCELLigence System beobachtet zelluläre Ereignisse in Realzeit ohne Eintragung eines Labels. Befinden sich Zellen an den Elektroden, beeinflussen diese das lokale ionische Umfeld des Elektrodeninterface, was zu einer Erhöhung der Elektrodenimpedanz führt. Die Impedanz hängt dabei von der Qualität der Wechselwirkung zwischen Zellen und Elektroden ab. Beispielsweise wird eine wachsende Zelladhäsion oder Zellverteilung zu einer größeren Änderung der Elektrodenimpedanz führen. Deshalb kann die Elektrodenimpedanz, die als Zellindexwert (CI) angegeben wird, zur Überwachung der Anzahl der Zellen, der Entwicklungsfähigkeit, der Morphologie und des Adhäsionsgrades verwendet werden [42]. Welche elektrischen Parameter genau ausgewertet werden und auf welche Weise diese verrechnet werden, ist unklar.

SRU Biosystems hat zwei neue Instrumente in die BIND®-Plattform eingeführt und bezeichnende Fortschritte in label-free cell-based und biochemischen Assays gezeigt [43]. Das neue **BIND®Reader Turbo** bietet ein 1536-well Fassungsvermögen, eine maßgebliche Steigerung in der Abtastgeschwindigkeit und eine neue Software für die Integration mit gängiger Laborausstattung an. Im kinetischem Modus kann der Reader Zellantworten über eine ganze 1536-well Platte alle 45 Sekunden beobachten bzw. können im simple end point Modus nahezu 1 Million Wells an einem acht Stunden Tag abgetastet werden [32].

Der Biosensor hat ein proprietäres nanostrukturiertes optisches Gitter und besitzt eine Mikrowellplatte in industriellem Format. Abbildung 1.10 verdeutlicht das Funktionsprinzip. Das Gitter des BIND Biosensors reflektiert nur eine einzige Wellenlänge (Peak Wavelength Value (PWV)). Sobald sich ein Biomolekül oder eine Zelle an der Oberfläche des Biosensors haftet, erhöht sich die reflektierte Wellenlänge. Dieses Anheften kann durch Messen der Verschiebung des PWV in Realzeit beobachtet werden.

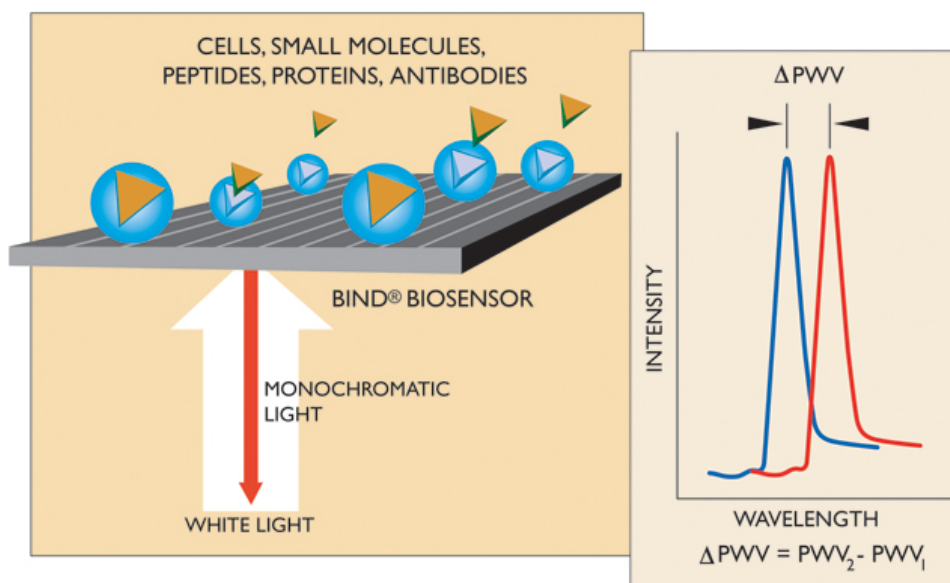


Abb. 1.10.: Prinzip des optischen Sensors im BIND System, Quelle: [32]

Die PAN Systech GmbH bietet mit dem Pansys 3000 (vgl. Abb. 1.11) eines der fortschrittlichsten Bioprozessautomaten an. Diese Zellkultursysteme können bis zu sechs Einzelproben aufnehmen und bieten zudem eine per Software gesteuerte und unabhängig zu regelnde Fluidik an [44]. Eine kontinuierliche Analyse und Dokumentation aller Zellkultur-Parameter (Temperatur, CO₂, O₂, pH) mit mikroskopischer Überwachung der Zellmorphologie und des Zellwachstums kann über einen PC erfasst werden. Das Life Cell Imaging bietet eine permanente video-mikroskopische Überwachung der Zellen mit kompletter Speicherung, Dokumentation und Analyse der Messdaten. Morphologische Veränderungen und Wachstumsverhalten können sehr schnell erfasst und ausgewertet werden. Die Firma wirbt mit einem breiten Anwendungsspektrum, angefangen von Tissue Engineering über Drug Discovery bis hin zu In-Vitro-Assays von Medikamenten und Messung des Zellwachstums im Zusammenhang mit Grundlagenforschung.

Das kleinste Gerät Pansys 3000 stellt eigens entwickelte Sensorkammersysteme zur Verfügung, in die multiparametrische Sensoren integriert wurden. Die Abb. 1.12 lässt eine elektrochemische Detektion vermuten, wenngleich auf der Website des Herstellers keine weiteren Informationen zu finden sind.

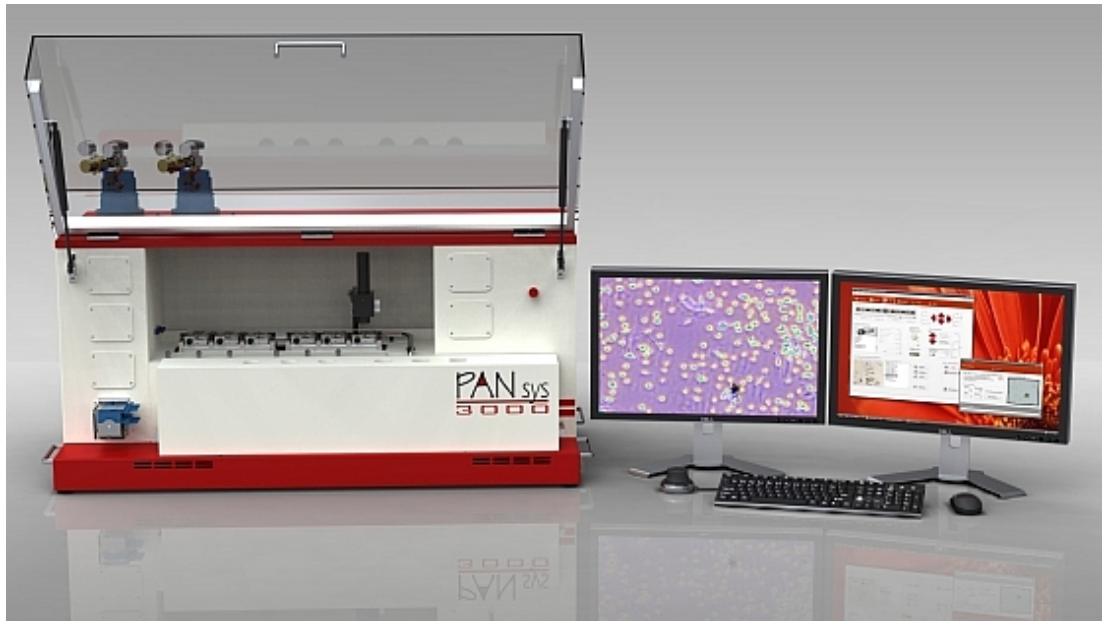


Abb. 1.11.: Bioprozessautomat der Firma PAN Systech GmbH mit sechs Kammern zur Zellkultivierung und vollständig automatisiertem Fluidiksystem, Quelle: [44]

Das Pansys 4000 bietet wesentlich mehr Durchsatz, da Zellkulturflaschen und Mikrotiterplatten verwendet werden können. Allerdings muss hier auf eine multiparametrische Detektion der zellphysiologischen Parameter verzichtet werden, da dem Anwender nur das Life Cell Imaging zur Verfügung steht. Ein Fluid-handling System rundet das ganze ab.

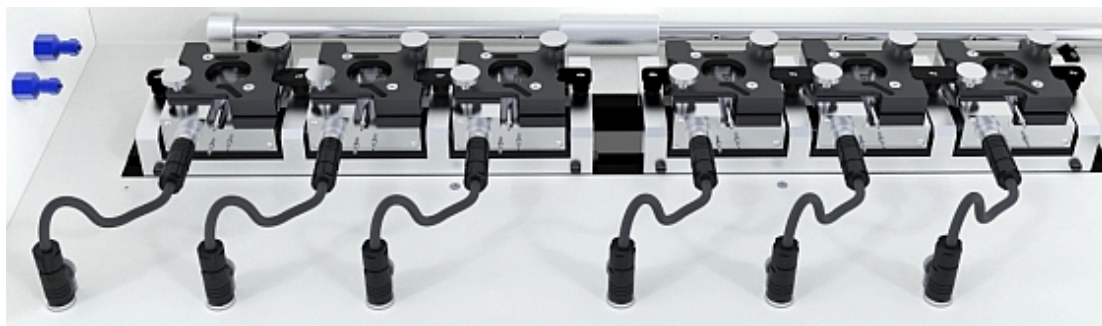


Abb. 1.12.: Sensorkammersystem des Bioprozessautomaten Pansys 3000 mit sechs Kavitäten zur Zellkultivierung und multiparametrischer Medienüberwachung, Quelle: [44]

Die Tabelle 1.1 soll einen Überblick über die Systeme geben, die label-free Technologien anbieten.

Tab. 1.1.: Übersicht von Anbietern mit „Label-free“ Technologie

Anbieter	System-name	Biosensor	Well-Format	Anwendungsschwerpunkt
Applied Biophysics	ECIS	Impedanzmessung	16- & 96-well	Erforschung von Zellmigration, -invasion, -durchlässigkeit und Signalweitergabe
Corning	EPIC	Optisches Gitter	384-well	Analyse von endogenen Rezeptoren und von Signalwegen und Untersuchungen der Wirkungsweise
IonGate	Elektrogen	SURFE ² R	96-well	Transporter und Ionenpumpen
MDS Analytical Technologies	CellKey TM	Impedanzmessung	96-, LV 96- & 384-well	Biorelevantes Screening und Analyse von transfizierten und endogenen Zellrezeptoren
Roche Applied Science	xCELLigence	Impedanzmessung	16- & 96-well	Zellqualität, rasches Anwachsen der Zellen, Entwicklungsfähigkeit, Zytotoxizität, Zelladhärenz und -ausbreitung, funktionales Monitoring der Rezeptorsignalwirkung
SRU Biosystems	BIND®	Optisches Gitter	8-, 16-, 96-, 384- & 1536-well	GPCR Untersuchungen, endogene Rezeptoranalyse, adhärenz und Suspensionszellen, Primärzellen, Ionenkanal
PAN Systechn Gmbh	Pansys 3000/4000	Elektrochemische Sensorik und Life Imaging	Proprietäres Multikammersystem und Mikrotiterplatten	Zytotoxizitätstest, Medikamentenentwicklung und Substanzscreening, Optimierung von Zellkulturmedien, Tissue Engineering

1.4. Lab-on-Chip-Systeme am Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik

Am Lehrstuhl für Medizinische Elektronik (LME) der Technischen Universität München wird Sensorik und Auswertetechnik entwickelt, um Messungen an lebenden Zellen durchzuführen. Die Anwendungsbereiche hierfür erstrecken sich vom Umwelt-Monitoring (z.B. Wasserproben, [19]) bis hin zu pharmakologischen Tests an Tumorzellen. Die Organismen werden auf eigens entwickelten Biochips kultiviert, die planar aufgebraute Sensoren enthalten (sog. „Lab-on-Chip“-Systeme, die die gesamte Funktionalität eines großen Labors auf einem nur Plastikkarten großen Kunststoffsubstrat unterbringen [45]). Die Sensoren dienen dazu, wichtige Stoffwechselfparameter der Zellen zu erfassen um damit Auskunft über die Vitalität zu geben. Wichtige Größen sind dabei pH-Wert (Messung der Ansäuerung der Zellumgebung), Sauerstoffkonzentration (Zellatmung) sowie Zelladhäsion-/morphologie (erfassbar durch eine Impedanzmessung). Die Einheit von biologisch aktivem System, Signalwandler (Transduktor) und Verstärker wird als Biosensor bezeichnet [20] (also z.B.: Zellen, pH-Sensor und elektronischer Verstärker).

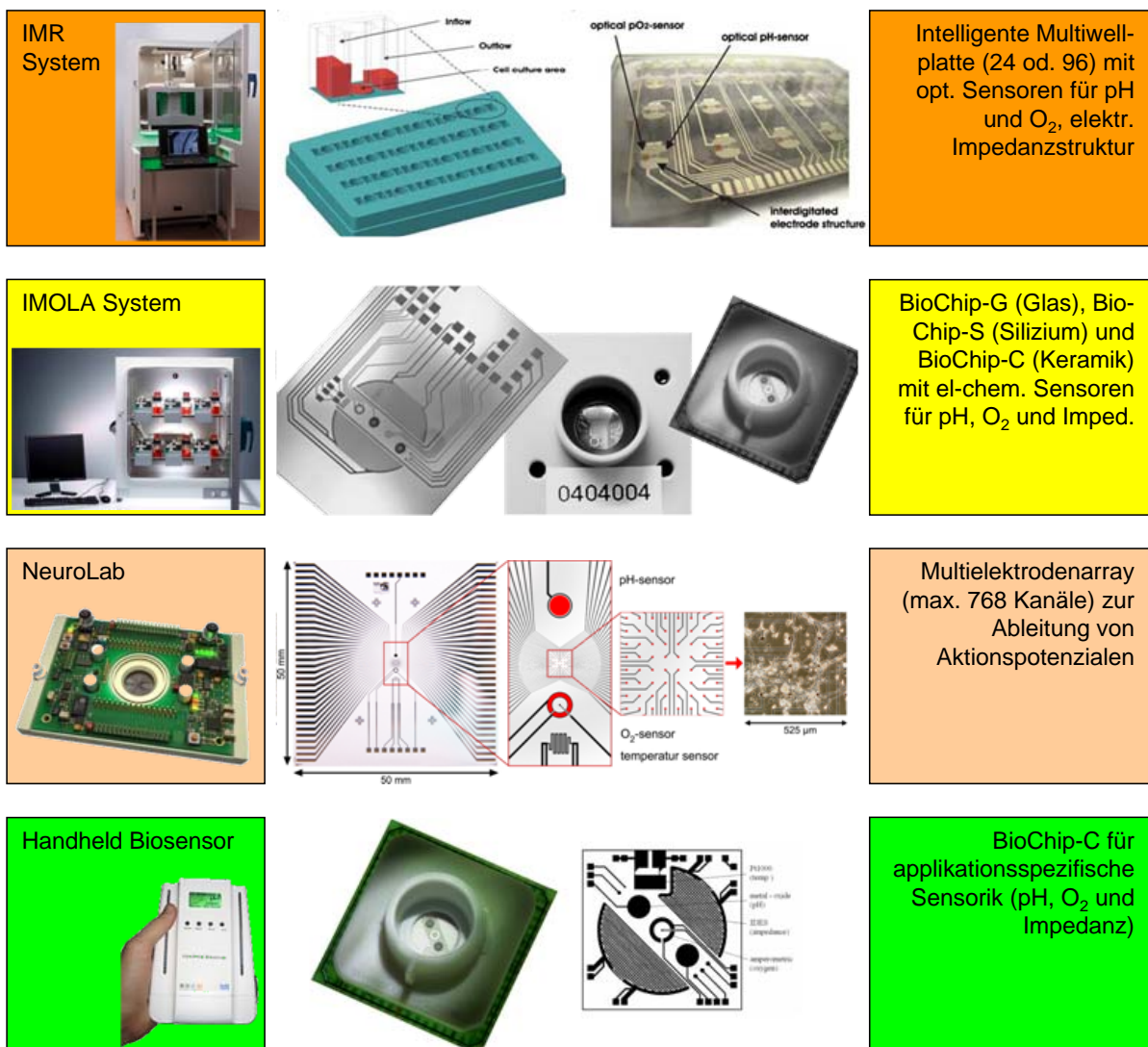


Abb. 1.13.: Übersicht über die am Lehrstuhl entwickelten Geräte und deren verwendete Sensorchips.

1. Einleitung

Die Vorteile solcher Lab-on-Chip-Systeme liegen auf der Hand: Es werden nur noch winzige Mengen chemischer Substanzen benötigt, dies ist umweltfreundlich und spart teure Chemikalien [46]. Außerdem können selbst komplexe Analysen direkt vor Ort gemacht werden, was als „Point-of-Care-Testing“ (also Vor-Ort-Tests, Schnelltests) bezeichnet wird.

Die Abb. 1.13 zeigt die Bandbreite der am Lehrstuhl entwickelten Geräte und deren Sensorchips. Hier werden zur Grundlagenforschung stationäre Großgeräte eingesetzt, meist um die Wirkung verschiedener Chemotherapeutika auf standardisierte Tumorzelllinien zu testen [14]. Für diese Anwendungsfälle ist das **IMR System** (Intelligent Microplate Reader) für Hochdurchsatzanalysen entwickelt worden [47]. Das Kap. 1.4.2 erklärt die Funktionsweise genauer. Die hier verwendeten Sensorplatten beinhalten sowohl Impedanzstrukturen zur Erfassung der Morphologie, als auch optische Sensoren, die mit Hilfe der Fluoreszenzanalyse den pH-Wert als auch die Gelöstsauerstoffkonzentration erfassen können.

Zur Erforschung des Verhaltens einzelner Assays steht das **IMOLA System** zur Verfügung, das in Kap. 1.4.1 näher erläutert wird. Dieses parallelisierte Einzelsensorsystem bietet eine sehr flexible Einstellung der Versuchsparameter und lässt dadurch die Entwicklung von Versuchsreihen zur Erforschung von Toxizitätstests oder die Bestimmung von Randparametern zur Zellhandhabung zu [48]. Für kleine Testreihen kann es ebenfalls zur Grundlagenforschung verwendet werden. Die automatisierte Fluidik versorgt die elektrochemischen Sensoren mit Nährstoffen. Das gesamte System wird stationär von einem PC gesteuert.

Die Abb. 1.14 zeigt, dass existierende Geräte immer nur einen Kompromiss zwischen Größe und den damit verknüpften Leistungsmerkmalen bieten. Die Lücke, die durch die eingeschränkte Einsatzmöglichkeit durch die fehlende Mobilität entsteht, wird durch den in dieser Arbeit vorgestellten handheld Biosensor geschlossen. Damit ist es erstmals möglich, im Labor entwickelte Tests vor Ort durchzuführen. Die Parameter sind durch Verifikationen am IMOLA System ausreichend bekannt [12].

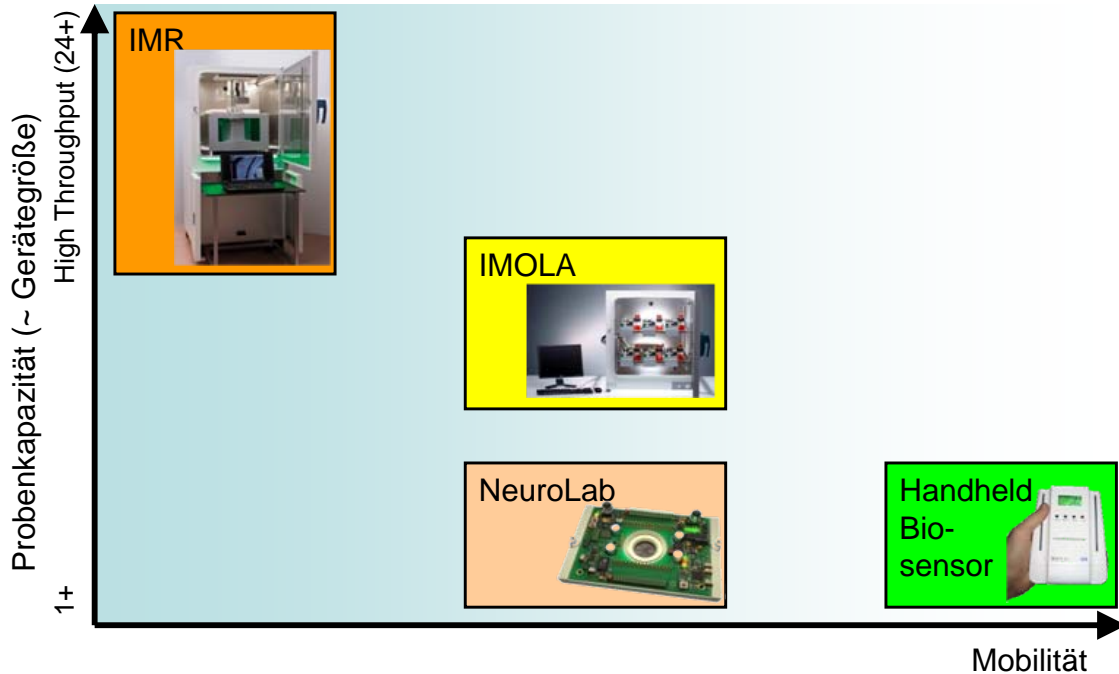


Abb. 1.14.: Bezug von Gerätegröße zu Anwendungsflexibilität aufgrund von (subjektiv empfundener) Mobilität. Hier schließt der handheld Biosensor die Lücke der am Lehrstuhl entwickelten Geräte.

Das **NeuroLab** (vgl. Kap. 1.4.3) spielt in dieser Arbeit eine untergeordnete Rolle, da das System mit elektrisch aktiven Nervenzellen arbeitet. Eine über mehrere Wochen lange Vorinkubation der Zellen macht das System praktisch unbeweglich, wenngleich es auch alle Lebenserhaltungsmaßnahmen auf dem Messsystem zur Verfügung stellt.

1.4.1. IMOLA-System

Biochips (Keramik/Silizium) finden Anwendung in dem am Lehrstuhl entwickelten Messgerät *IMOLA* („Intelligent mobile lab“), ein kompaktes, modular aufgebautes System, das sich sowohl für mobilen als auch für Laboreinsatz eignet [49]. Das Gerät besitzt eine Fluidikeinheit, die die Zellen über ein Schlauchsystem mit Nährstoffen versorgt und Teststoffe einbringt. Die Elektronik besteht aus einem Analogmodul (zur Vorverarbeitung der Temperatur-, pH- und pO_2 -Messsignale), einem Modul für die Impedanzmessung und einem Digitalmodul (enthält einen Mikrocontroller, mehrere A/D- und D/A-Wandler, EEPROM und Schnittstellen (*RS232*, *CAN*, *Bluetooth*)). Im Mikrocontroller und auf einem PC ist das Software-Modul implementiert, das die Datenübertragung regelt (Messwerte zum Computer und Konfigurationswerte, wie z.B. Arbeitspunktspannungen für die Sensoren an den Mikrocontroller).

Das Gerät kann einen der Chips (Keramik, Glas oder Silizium, vgl. Abb. 1.13) aufnehmen. Die Abb. 1.15 zeigt ein Bild eines Laboraufbaus des *IMOLA* mit einem Steuer-PC.

Das *IMOLA* („Intelligent MOBILE LAB“) ist ein mobiles Messsystem für das Zellmonitoring mit multiparametrischen Sensorchips. Das *IMOLA* besitzt ein integriertes Life Support System, um auf dem Sensorchip kultivierte Zellen am Leben zu erhalten. Eine miniaturisierte Piezopumpe versorgt die Zellen dabei mit einer Nährlösung.

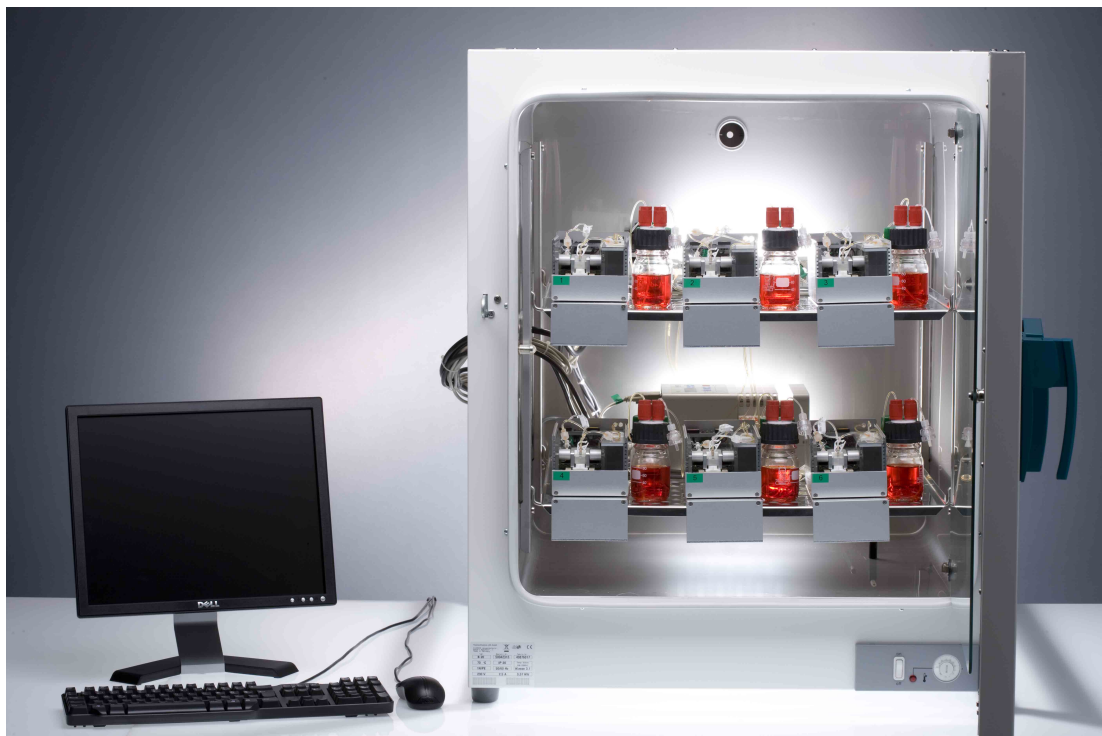


Abb. 1.15.: Stationärer Aufbau eines am LME entwickelten Biosensorsystems (*IMOLA*), Quelle: www.cellasys.com

Die Platinen des *IMOLA* sind modular aufgebaut und werden in Sandwich-Bauweise aufeinander gesteckt. Eine dieser Platinen enthält die Komponenten Datenerfassung, Kommunikation und Stromversorgung. Eine weitere Platine enthält die Analogelektronik zur Messung von pH, pO_2 und Temperatur. Die

dritte Platine enthält die Elektronik zur Messung der Impedanz der IDEs auf dem BioChip. Somit ist es möglich, das IMOLA nur mit den jeweils benötigten Platinen auszustatten.

1.4.2. IMR-System

Der *Intelligent Microplate Reader* („IMR“), ein High-Content-Screeningsystem, ist ein aktuelles Forschungsprojekt am Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik. Dieses System ermöglicht automatisierte Messungen an lebenden Zellen. Auf einer Multiwellplatte mit einer Arraydichte von 24 parallel angeordneten Biochips sind optische und elektrische Mikrosensoren integriert. Hierbei dienen die optischen Sensoren zur pH- und pO₂-Messung, die elektrischen zur Impedanz-Messung. Ferner wird für optische Untersuchungen der Zellkulturen ein Lichtmikroskop eingesetzt.

Um aussagekräftige Langzeitmessungen zur Evaluierung von Wirkstoffen durchführen zu können, ist es einerseits notwendig, die Zellen mit Nährstoffen zu versorgen, andererseits die Umweltparameter konstant und möglichst ideal zu halten. Mit einem Pipettier-Roboter wird eine dosierte Zugabe parallel an alle 24 Beprobungseinheiten mit Nähr- und Wirkstoffen erzielt. Dabei kommt ein spezielles Dreikammersystem zum Einsatz, das in Abb. 1.16 dargestellt ist: Durch den hydrostatischen Druck des Mediums nach Zugabe in die Zulaufkavität verteilt sich die Nährlösung gleichmäßig im Minimalvolumen überhalb der Zellen. Dieses Medium kann fast vollständig wieder abgesaugt werden, ohne dass es dabei zu einem Versorgungsdefizit kommt. Durch Zugabe von neuem Medium entsteht so ein Kreislauf. Die erfassten Signale gleichen dabei einem Sägezahnmuster, der Rückschlüsse auf die Zellvitalität gibt.

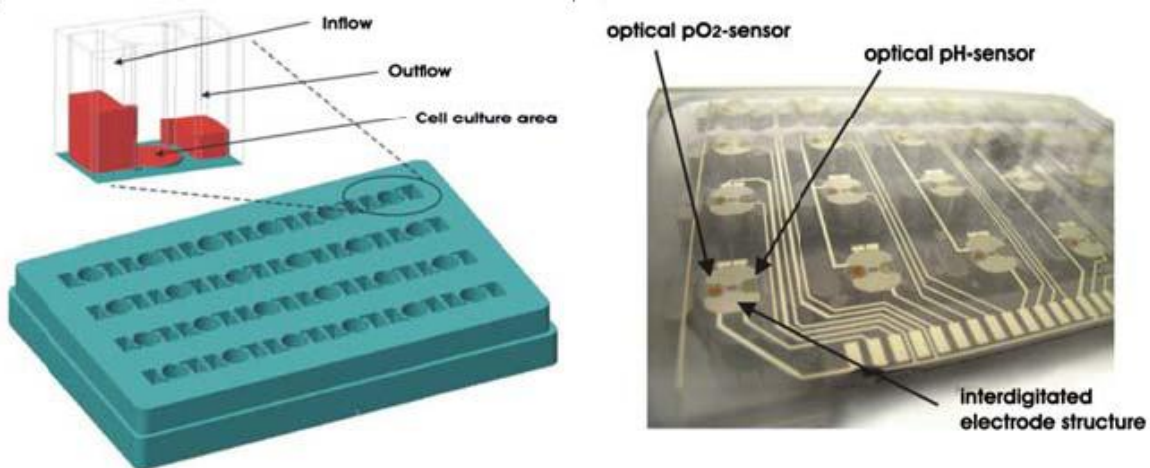


Abb. 1.16.: Darstellung der im IMR verwendeten multiparametrischen Sensorplatte. Ein Glassubstrat ermöglicht zusätzliche Zellbeobachtungen mit einem Mikroskop. Quelle: Lehrstuhl für Medizinische Elektronik – Technische Universität München

Der gesamte Arbeitsbereich, der Roboter, Multiwellplatte und Lösungen umfasst, befindet sich in einer Klimakammer. Die konstante Atmosphäre gewährleistet zudem reproduzierbare Ergebnisse. Zur Ansteuerung sind Messsysteme, Klimakammer, Pipettier-Roboter und evtl. weitere Peripheriegeräte zur Systemüberwachung mit einem Steuerrechner verbunden. Die Abb. 1.17 zeigt das Gesamtsystem.

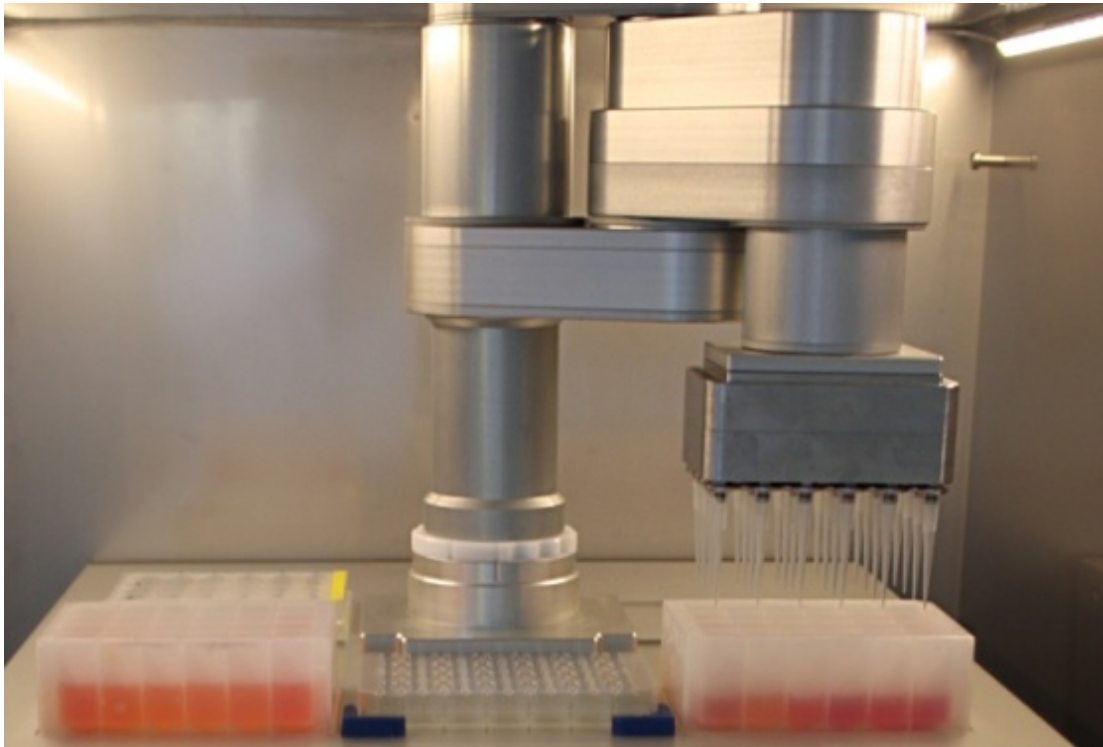


Abb. 1.17.: Darstellung des IMR Gesamtsystems ohne Steuerrechner. Die Sensorplatte befindet sich zwischen den beiden Vorratsbehältern. Quelle: Lehrstuhl für Medizinische Elektronik - Technische Universität München

1.4.3. NeuroLab

Seit der Erkenntnis über die Bedeutung elektro-physiologischer Messungen für die pharmazeutische Forschung und Neuroinformatik hat der Bedarf an parallelisierten und automatisierten Messsystemen ebenfalls stark zugenommen. Die elektrische Ableitung von Aktionspotenzialen lebender Zellkulturen, deren optische, magnetische oder elektrische Stimulation sowie auch die Beobachtung von Zell- oder Signalveränderungen (als Folge von Wirkstoffzugaben) liegt dabei im Fokus der Forschung der Neurodiagnostik des Heinz Nixdorf-Lehrstuhls für Medizinische Elektronik. Als Anwendung sei wieder die Medikamentenentwicklung genannt.

Ein aktuelles, gemeinsames Projekt mit der Ludwigs Maximilians Universität München widmet sich entsprechend neurodegenerativer Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson und greift für Messungen auf Systeme zurück, die vom Lehrstuhl entwickelt wurden. Zur parallelen Messdatenerfassung von 24 getrennten Netzwerken in-vitro kultivierter Nerven- oder Muskelzellen wurde das **NeuroLab** (auch *NeuroPlate*) entwickelt (vgl. Abb. 1.18).

Nach Einlegen der speziell entwickelten Glassensorchips mit den darauf gezüchteten elektrisch aktiven Zellkulturen lassen sich Aktionspotenziale über jeweils 32 Mikroelektroden aufzeichnen. Durch den Einsatz von Mikrosystemtechnik gelang es, die gesamte notwendige Schaltungstechnik zu integrieren.

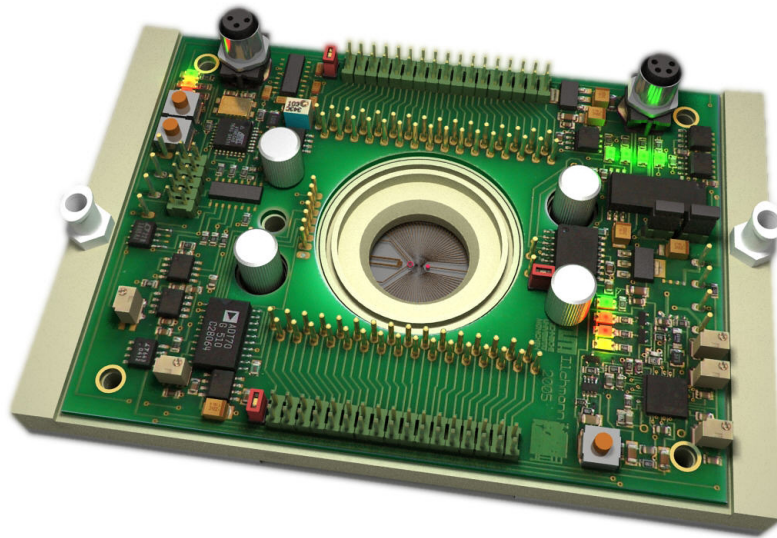


Abb. 1.18.: Darstellung des Systems zur Erfassung der Potentiale elektrisch aktiver Nervenzellen. Quelle: Lehrstuhl für Medizinische Elektronik - Technische Universität München

Multiparametrische Signableitung von Nervenzellen

Um die Umgebungsbedingungen der lebenden Zellkulturen experimentell zugänglich zu machen, wurden unterschiedliche Mikrosensor-Typen auf die Sensorchips integriert. Abb. 1.19 zeigt den gesamten Chip sowie die vergrößerten Abbildungen der Zellaufnahmefläche.

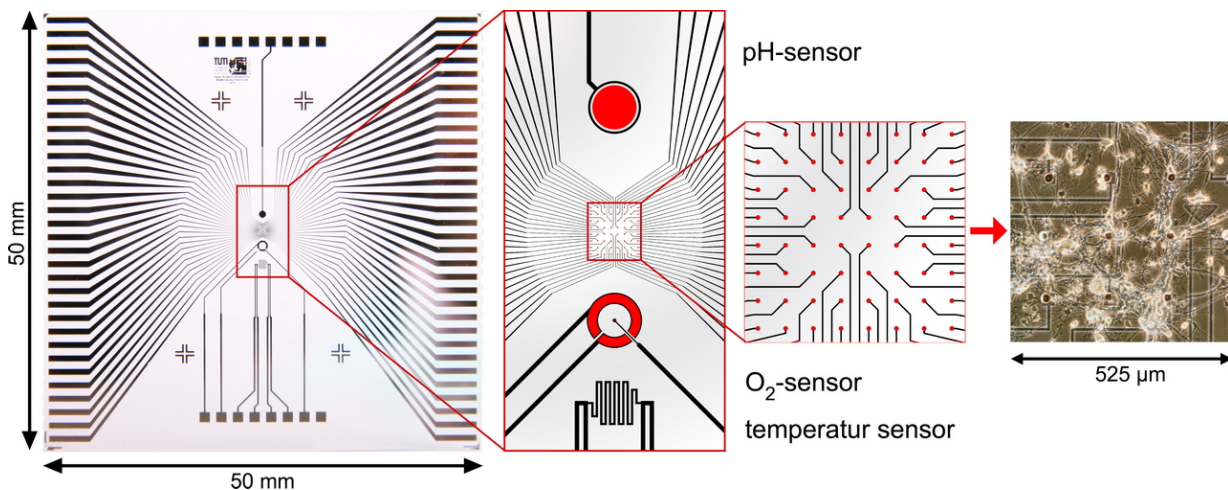


Abb. 1.19.: Darstellung des Sensorchips zur Erfassung der Nervensignale. Die Zellen werden über Mikroelektroden planar kontaktiert. Quelle: Lehrstuhl für Medizinische Elektronik - Technische Universität München

Sowohl der pH-Wert zur Messung des globalen Zellstoffwechsels als auch der Sauerstoffgehalt zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität lassen sich in absoluten Zahlen erfassen. Zur weiteren Automatisierung kann die NeuroPlate in den IMR (Intelligent Microplate Reader) eingelegt werden. Bei Verwendung beider Systeme kann somit parallel mit bis zu 24 elektrisch aktiven Proben redundant bzw. korrelierend über längere Zeiträume gemessen werden, wodurch hochpräzise und reproduzierbare Messergebnisse gewährleistet sind.

1.5. Biohybride Sensorchips

Am Lehrstuhl für Medizinische Elektronik wurden multiparametrische Sensorchips auf Silizium- und Keramiksubstraten entwickelt [5], [6]. Diese Chips enthalten Sensoren für den Sauerstoffgehalt, den pH-Wert, die Temperatur und eine so genannte InterDigitale ElektrodenStruktur (IDES), mit der die Impedanz der Zelladhäsion gemessen werden kann. Die IDES stellt eine planare, fingerartige Anordnung von zwei Elektroden dar (siehe Abb. 1.20).

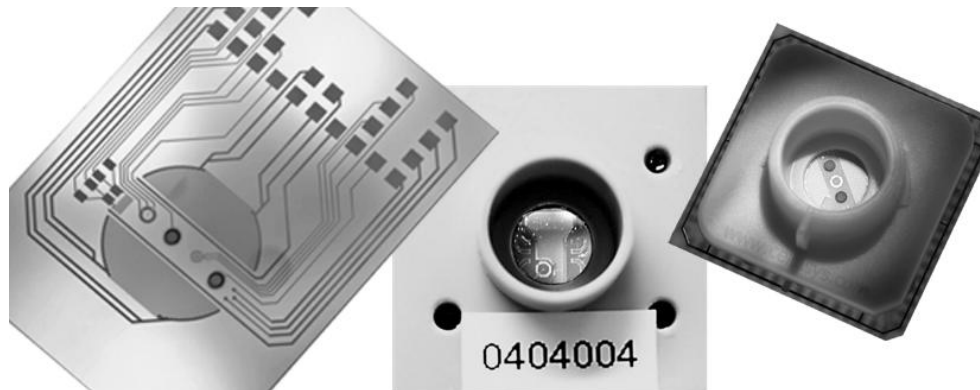


Abb. 1.20.: Übersicht der am Lehrstuhl für Medizinische Elektronik entwickelten biohybriden Sensorchips für die Anwendung in Stand-Alone Geräten.

In dieser Arbeit wurde bei Verwendung von IMOLA oder handheld Biosensor ausschließlich mit dem Sensorchip auf Keramiksubstrat, der unter dem Namen *BioChip-C* geführt wird, gearbeitet.

Tab. 1.2.: Anzahl und Typen der verwendeten Sensoren

Sensor Parameter	Silizium Technologie	Thin Film Technologie
Sauerstoff	1x Sauerstoffsensor, 1x O ₂ -FET	1x Sauerstoffsensor
pH-Wert	5x ISFET	2x Metall Oxid
Impedanz	2x IDES	2x IDES
Temperatur	1x pn-Diode	1x Pt1000

Um die verschiedenen Parameter zu messen, sind mehrere unterschiedliche Sensortypen auf diesem Chip integriert. Ein amperometrischer Sauerstoffsensor und ein O₂-FET für die Messung des verbrauchten Sauerstoffs, ISFETs³ oder Metalloxid-Sensoren zur pH-Wert Bestimmung, IDESs⁴ für die Impedanzmessung und eine pn-Diode oder ein Pt1000 zur Temperaturmessung. Der Vorteil der Thin-Film Technologie besteht darin, dass für diese Version nur noch vier Arbeitspunkte zur Verfügung gestellt werden müssen, wohingegen die Silizium Version 13 Arbeitspunkte benötigt [48].

Zum Einsatz kommen drei Technologien: Glas-, Silizium- und Keramikchips. Die Siliziumchips enthalten zur pH-/pO₂-Messung spezielle Feldeffekttransistoren („ISFETs“: ionensensitive FETs) während in Glas- und Keramikchips Metalloxid- (pH) und amperometrische Clark-Sensoren (pO₂) verwendet werden [5]. Abbildung 1.21 zeigt das Layout des Keramikchips (*BioChip-C*). An der Oberseite befindet sich zur Überwachung der Temperatur ein Platinsensor (*Pt1000*). Deutlich zu erkennen sind die Interdigital-Elektroden-Strukturen (IDES) der Impedanzsensoren.

³ISFET: Ionen selektiver Feldeffekt Transistor

⁴IDES: Interdigital Electrode Structure

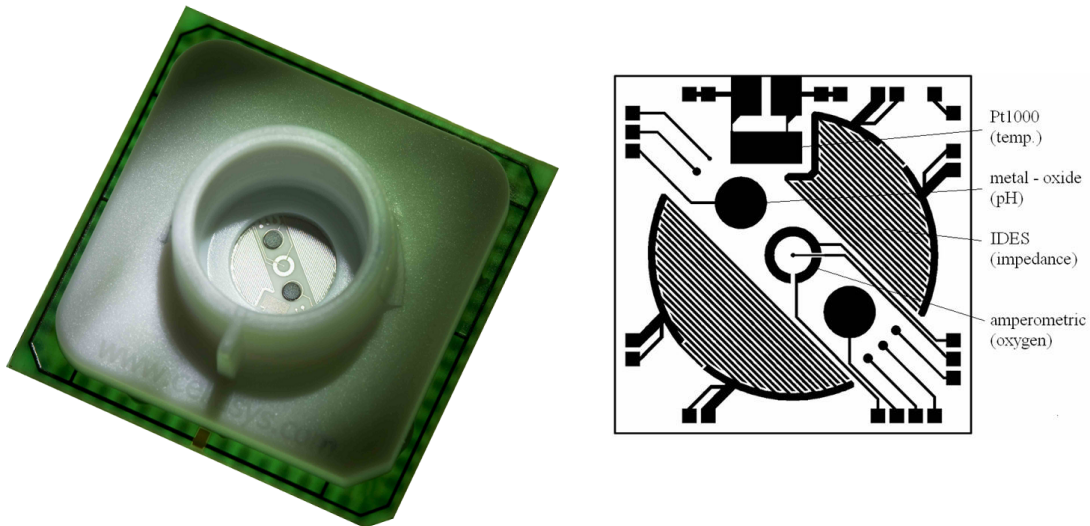


Abb. 1.21.: Foto und keramische Substratstruktur des verwendeten Biosensorchips, Quelle: Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, Technische Universität München

Dass sich biohybride Sensorchips als Signalwandler eignen, konnte ausreichend dargelegt werden (z.B. in [3]). Dennoch soll zur Verdeutlichung der Zell-Sensorsubstratbindung und dessen biokompatiblen Eigenschaften eine elektronenmikroskopische Aufnahme in Abb. 1.22 dargestellt werden. Sie zeigt eine angewachsene Tumorzelle auf dem ISFET eines BioChip-S, dessen Entwicklung und Eigenschaften in [45] und [6] dargestellt wurden.

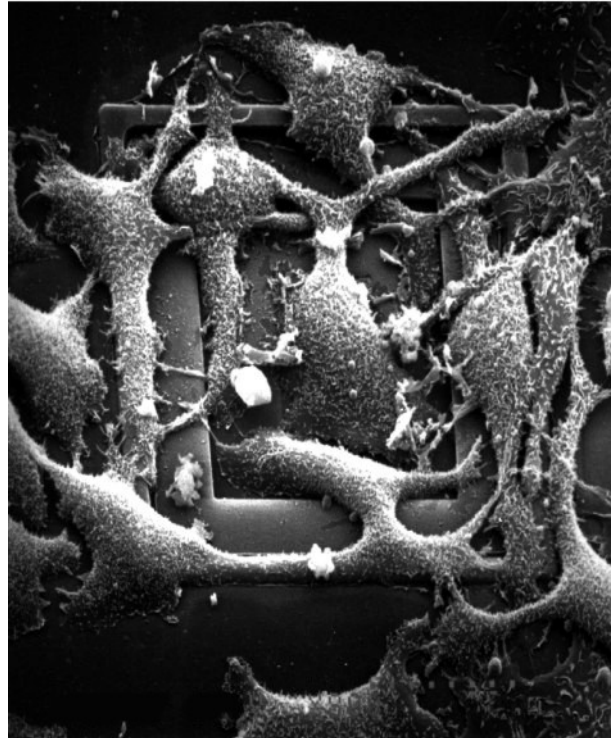


Abb. 1.22.: REM-Aufnahme einer Tumorzelle auf einem siliziumbasierten Biosensorchip, Quelle: Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, Technische Universität München

1.6. Portable zellbasierte Biosensoren

Derzeit gibt es keine kommerziell erhältlichen Biosensoren, die mit Hilfe von lebenden Zellen oder Zellpräparaten Umwelteinflüsse detektieren können. Die Idee, einen portablen Biosensor zum Umweltmonitoring zu konstruieren, wird jedoch von mehreren Forschungseinrichtungen verfolgt (z.B. [22]).

Das Max-Planck-Institut für Polymerforschung (MPIP) in Mainz hat zusammen mit der Fachhochschule Jena die *Entwicklung eines portablen, zellbasierten Messsystems zur Ermittlung von Umwelteinträgen* ([50]) angestrebt. Diese Studie zielt darauf ab, zukünftig Tierversuche durch die Erforschung der Wirkungsweise von Medikamenten zu ersetzen. Die Arbeit stellt jedoch das Ziel des Gewässermonitorings in den Vordergrund und beweist die Tauglichkeit des Konzepts mit einem Kofferlabor, selbst angefertigten Biochips und einem Aktivitätsnachweis von Muskelzellen aus Rattenembryonen. Die Basis ist ein Multi-Elektrodenarray (MEA), dessen 60 Ableitelektroden die elektrische Aktivität der Herzmuskelzellen erfassen sollen. Dabei wird in Versuchen die Spikerate nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Isoproterenol gemessen. Den Aufbau zeigt Abb. 1.23.

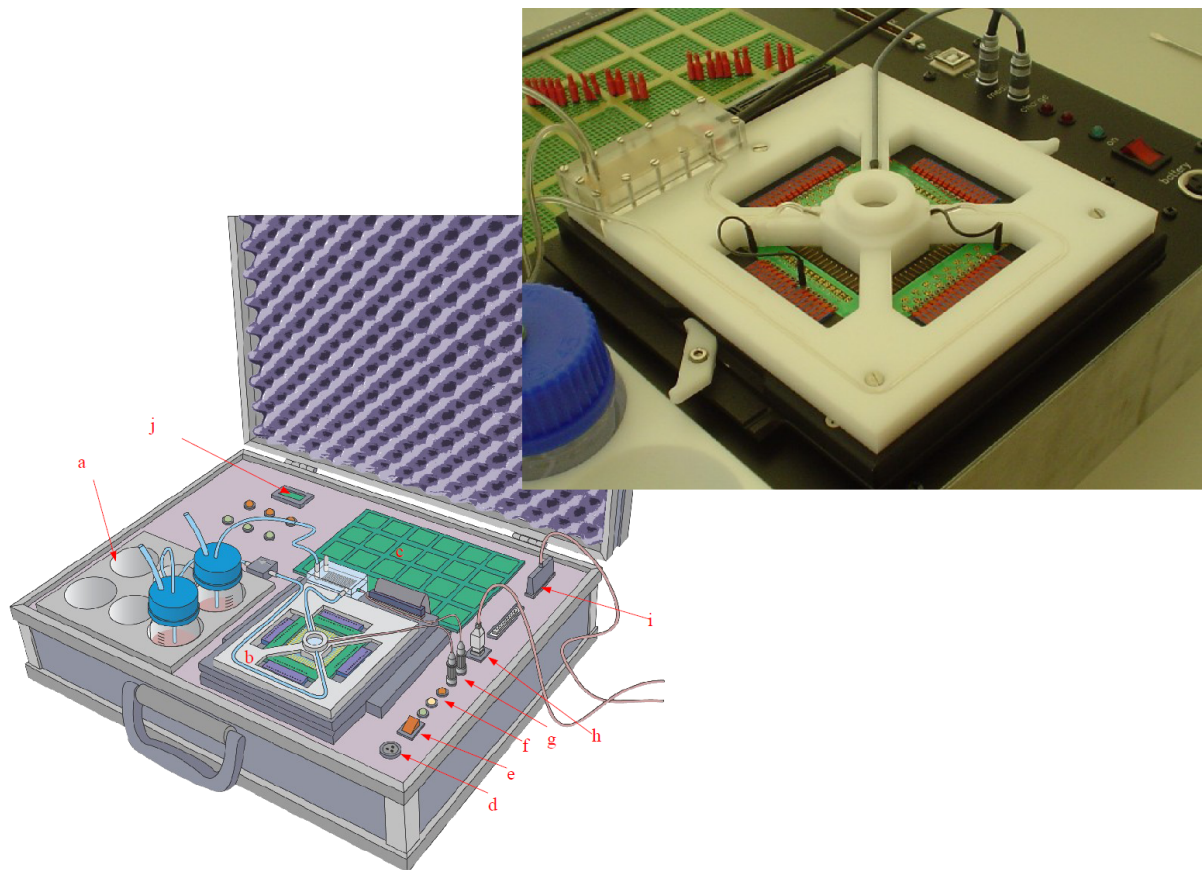


Abb. 1.23.: *Illustration des portablen Messgerätes „CELLectrodeLAB“: a: Fluidikeinsatz, b: MEA-Einheit, c: Vorauswahl, d: Netzteilanschluss, e: Hauptschalter, f: Ladeanzeige, g: Messfühler und Heizungsanschluss, h: USB-Anschluss für Steuerrechner, i: Messleitungsanschluss, j: Temperaturanzeige. Quelle: Dr. Mark Pottek, MPIP und [50]*

Die Spannungsversorgung der Verstärker, der Schlauchquetschpumpe und der eingebauten Durchflussheizung des Schlauchsystems ist batteriegepuffert. Die zur Signaldetektion nötigen Vorverstärker werden von Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, bezogen. Über eine PCMCIA AD-Wandler Karte werden die Signale in einem Laptop erfasst und dargestellt. Die Versuchsdauer wird mit zwei Stunden

1. Einleitung

bezieht. Die biologische Vorinkubation der Zellen wird nicht diskutiert. Das Kofferlabor misst 425 x 327 x 80 mm (ohne Laptop).

Die Stanford University hat in Zusammenarbeit mit dem NASA Ames Research Center einen portablen Biosensor entwickelt, der mit lebenden Zellen biologisch gefährliche Stoffe zur Kriegsführung detektieren sollte [51]. Ein zweiteiliges Kofferlabor (vgl. Abb. 1.24), bestehend aus einem Datenerfassungsmodul (Laptop mit angeschlossener Verstärkerelektronik zur Signalaufbereitung) und einem Zelltransportmodul, erfasst die Aktionspotenziale von HL-1 Zellen (Muskelzellen embryonaler Ratten). Es konnte eine signifikante Abnahme der Aktivität aufgrund von Nifedipin (Kalzium Kanal Blocker) nachgewiesen werden.

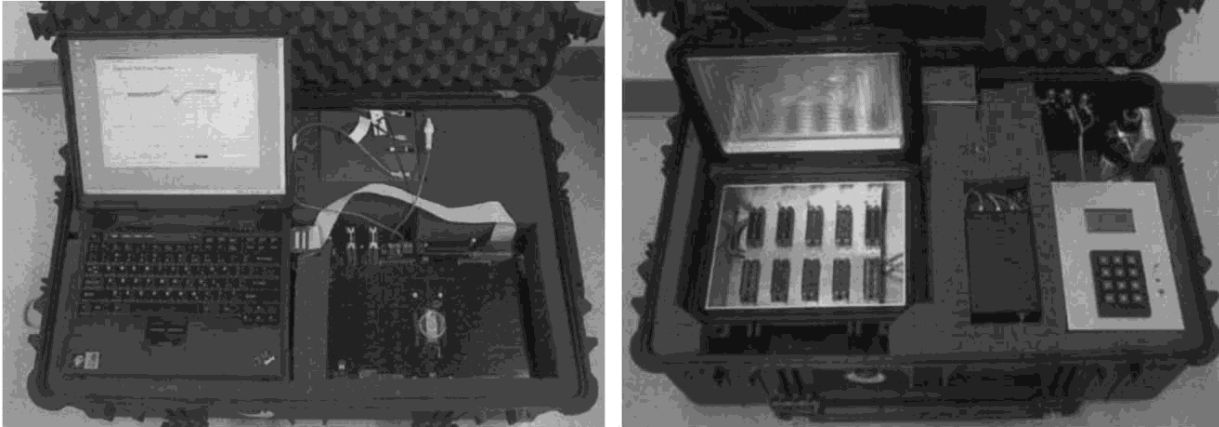


Abb. 1.24.: *Zweigeteiltes Kofferlabor zur in-vitro Analyse von Aktionspotenzialen auf MEAs. Links: Datenerfassung mit Verstärkerelektronik, rechts: Biologiemodul mit Biosensorik und Klimatisierung. Quelle: [51]*

Die Aktionspotenziale werden über ein 32poliges Multielektrodenarray erfasst. Sowohl ein Laptop zur Erfassung, Anzeige und Speicherung der Daten, als auch die eigens entwickelte Verstärkerelektronik sind in das Datenerfassungsmodul integriert. Es stellt die Verbindung zum Zelltransportmodul über Kabel her. Letzteres verfügt über eine eingebaute Klimatisierung: Das Zellmilieu kann konstant auf 37°C gehalten werden. Eine Regelung des CO₂-Gehalts ist ebenfalls möglich. Zur Handhabung der Zellen werden Cartridges eingesetzt, die ebenfalls Nährmedium transportieren. Die Abmessungen eines Koffers werden mit 830 x 513 x 284 mm angegeben. Da zum Betrieb ein Netzanschluss nötig ist, ist ein mobiler Einsatz nur bedingt möglich.

Die State University of New York hat zusammen mit dem US Army Center for Environmental Health Research und der Cornell University in Ithaca, USA, ein mobiles System entwickelt, das mit Hilfe von Endothelzellen von Rindern eine toxische Verunreinigung im integrierten Fluidiksystem detektieren kann [22]. Es zielt auf die Erkennung von Toxinen im Trinkwasser ab. Das Paper postuliert einen unproblematischen Umgang mit den eingesetzten Zellen, wodurch eine Laufzeit von bis zu neun Tagen möglich sei. Nährstoffe werden dem biohybriden System durch ein kompaktes, austauschbares Einweg-Fluidiksystem zugeführt, wodurch die Handhabung in Bezug auf Sterilität wesentlich vereinfacht wird.

Um die Zellvitalität charakterisieren zu können, wird bei diesem System die Impedanz gemessen [22]. Dabei bedient sich die Forschungsgruppe einer modifizierten Version von ECIS der Firma Applied BioPhysics, Troy, NY, USA. Die für den mobilen Einsatz angepassten ECIS Biochips wurden von Agave BioSystems, Ithaca, NY, USA, hergestellt. Ein Zellmonolayer auf dem Substrat des Biochips wird in einer geschlossenen Fluidik mit Zellkulturmedium (FCS) versorgt. Mit einer peristaltischen Pumpe werden die lebenden Zellen zyklisch versorgt. Die Wasserprobe wird von Hand durch eine Spritze in den Kreislauf eingebracht. Die Systemtemperatur wird durch eine eingebaute Heizung konstant bei 37°C gehalten. Eine pH-Sonde vor dem Abfallbehälter misst, ob die CO₂-Konzentration noch im richtigen Bereich ist.

Tests wurden mit 0,38 mM PCP-Lösung (Pesticide Pentachlorophenol) durchgeführt. Das Pflanzenvernichtungsmittel zeigte eine Degradation der Impedanzwerte um ca. 15%.

Der für die Anzeige und Auswertung der Messdaten erforderliche Laptop ist nicht in das in Abb. 1.25 gezeigte Kofferlabor integriert. Ebenfalls ungeklärt bleibt die Frage, ob ein mobiler Einsatz im Sinn von Unabhängigkeit gegenüber stationären Energiequellen möglich ist, da zum Betrieb ein Netzanschluss erforderlich ist. Die geschätzten Abmessungen des Koffers betragen ca. 400 x 400 x 180 mm.

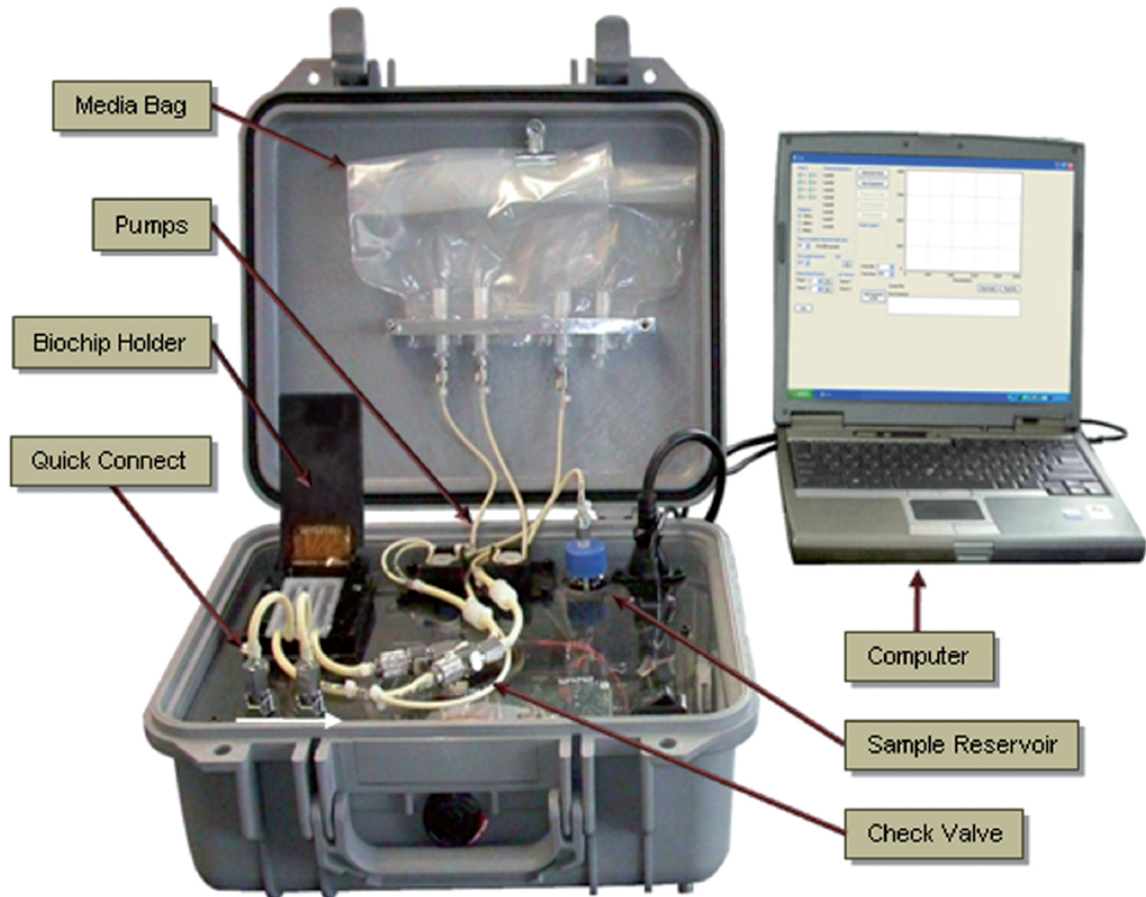


Abb. 1.25.: Tragbarer Biosensor zur Erkennung toxischer Verunreinigungen in Gewässern. Die Zellen werden durch das automatisch geregelte Fluidiksystem bis zu 9 Tagen am Leben gehalten. Quelle: [22]

1.7. Nachteile der kommerziell verfügbaren Systeme / Unterscheidung des neuen Biosensors zu anderen Systemen

Kommerziell erhältliche portable Biosensoren sind derzeit nicht auf dem Markt erhältlich. Das Kapitel 1.6 beschreibt lediglich den Ansatz anderer Forschungseinrichtungen, eine Alternative zu Geräten zu bieten, die von einem stationären Labor entkoppelt werden können. Dabei bieten die Geräte meist die Bedingungen, die stationäre Analysegeräte ebenso bereitstellen. Zu erwähnen ist hier eine großzügig bemessene Fluidik sowie teilweise eine integrierte Heizung, um die Temperatur im biologischen System konstant zu halten. Weiterhin bieten diese Systeme lediglich die Untersuchung eines einzelnen physikalisch-biologischen Parameters an, sei es die Impedanz oder die Potentialableitung von Nervenzellen. Im letzt genannten Fall

scheint eine schnelle Detektion von externen Stimuli nahezu ausgeschlossen, da vor allem Nervenzellen höchst sensibel auf externe Einflüsse reagieren [52]. Zudem ist die Versuchsdauer aufgrund der langen Vorinkubation der Zellen im Labor sehr groß, zumal es dann im Auge des Betrachters liegt, ob dann ein solches System noch als portabel bezeichnet werden kann.

Der in dieser Arbeit vorgestellte portable Biosensor bedient sich lebender Hefezellen als Signalwandler. Hefen zeichnen sich durch ihre einfache und ungiftige Handhabung aus [53]. Hefen sind i.d.R. nicht spezialisiert, d.h. sie eignen sich gut zur Detektion von unbekanntem Substanzen, deren generelle Wirkung untersucht werden soll [54]. Damit distanziert sich ein solcher Biosensor von Methoden und Geräten, die hoch sensitiv ein bestimmtes Toxin erkennen und dessen Konzentration erfassen sollen. Die Ansprechzeit liegt bei dem hier vorgestellten System bei unter fünf Minuten, was eine kurze Versuchsdauer ermöglicht. Als Konsequenz werden auch keine aufwendig gestalteten großen Medienbehälter notwendig. Über eine multiparametrische Erfassung von zellphysiologischen Signalen kann dann innerhalb kurzer Zeit eine Aussage über die Wirkung des (meist) toxischen Eintrags getroffen werden. Die Auswertung mehrerer Parameter (hier pH, pO_2 und Temperatur) des verwendeten Sensors durch die kompakte Elektronik lässt die Ergebnisse noch fundierter erscheinen.

2. Impedanzmessung in der biomedizinischen Analytik

2.1. Impedanzspektroskopie bei Lab-on-a-Chip Systemen

Die Impedanzspektroskopie (IS) ist eine etablierte Methode in der Elektrochemie, um (di-)elektrische Eigenschaften von Lösungen, Feststoffen oder Membranen zu untersuchen, Materialstrukturen und Morphologien zu analysieren oder biologisch-chemische Reaktionen zu detektieren.

Die Beiträge zur elektrochemischen Impedanz leisten zum einen die Leitfähigkeiten von Elektronen oder Ionen in einer Lösung, und zum anderen Ladungsverschiebungen und dielektrische Materialcharakteristiken. Besonders in der Biosensortechnologie zeigt die IS besondere Vorteile: Echtzeitmessungen statt Endpunktmethoden ermöglichen in-vitro-Beobachtungen in markerfreien (label-free) Lab-on-a-Chip-Systemen und können etablierte Methoden, wie etwa bei konventionellen Fluoreszenzassays ersetzen. Ein IS-Messsystem besteht aus der Messelektronik, einem Biochip mit integrierten Elektroden und einem Transducerelement (Messwertgeber), wie beispielsweise lebenden Zellen. Im Speziellen gibt die Impedanzspektroskopie von lebenden Zellen Rückschlüsse auf das Zellwachstum, die Zellmorphologie und die zelluläre Adhäsion.

Bei den gängigen voltametrischen Messungen an lebenden Zellen werden diese mit hohen Erregerspannungen stimuliert, um potentialabhängige elektrochemische Prozesse zu beobachten. Dem Wechselspannungsanteil für die Messung wird dabei ein variabler Gleichspannungsanteil überlagert, der das System aktiv beeinflusst. Bei der IS werden dagegen nur sehr kleine Erregersignale verwendet, um das System nicht aus dem Gleichgewichtszustand zu bringen. Dies vereinfacht die Interpretation der Messergebnisse, da kein Wissen über nichtlineare Effekte bei Überpotential eingebracht werden muss. Die Messung der komplexen Impedanz bei einer festen Frequenz kann zum Beispiel mithilfe einer Wheatstoneschen Messbrückenabgleichung erfolgen. Spricht man von der Aufzeichnung des Impedanzverhaltens über einen Frequenzbereich, so ist damit die Impedanzspektroskopie gemeint. Nach [36] und [35].

IS und die Darstellung der Ergebnisse folgen meist dem Schema von [55], das von nahezu allen Forschungsgruppen verfolgt wird:

Parallel zur tatsächlichen Messung kann mit dem vorhandenen elektrochemischen Verständnis ein empirisches physikalisches Modell entwickelt werden, aus dem sich ein elektrisches Ersatzschaltbild ableiten lässt. Mit Fitting-Algorithmen, beispielsweise nach der Least-Square-Methode, kann dieses Ersatzschaltbild anhand des Messergebnisses parametrisiert werden (vgl. Abb. 2.1). Nach der Ergebnisbewertung erfolgt die Reflexion auf das physikalische Modell oder dessen rekursive Verfeinerung. Es sei erwähnt, dass sich die gängigen elektrotechnischen Schaltelemente nur unter Vorsicht zur einfachen Modellierung eignen, da Biosysteme dynamisch und gekennzeichnet von strukturellen Inhomogenitäten sind.

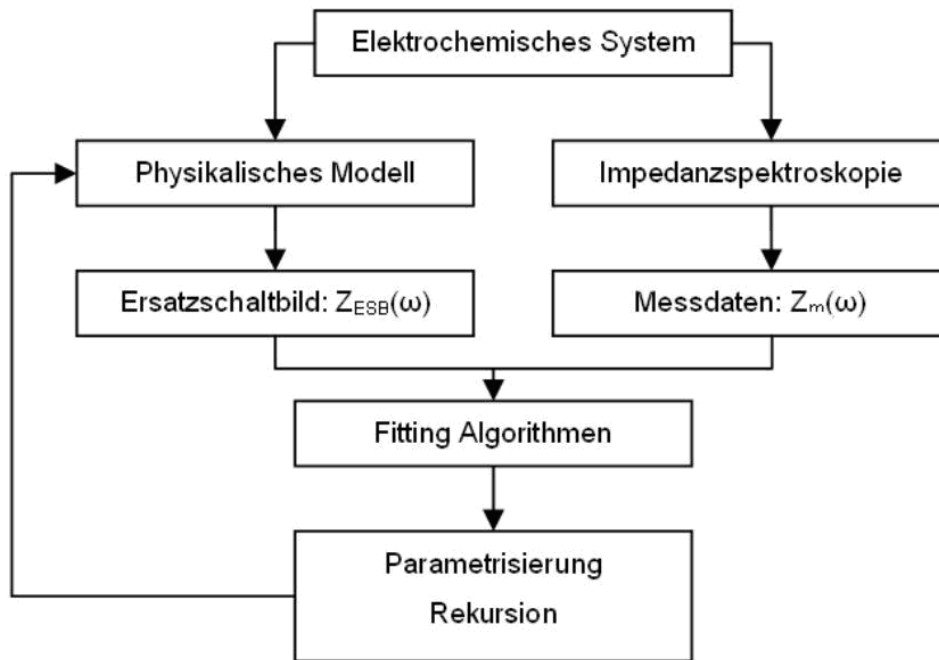


Abb. 2.1.: Etabliertes Vorgehen bei einer allgemeinen elektro-chemischen Impedanzspektroskopie mit Messdateninterpretation, Quelle: [55]

Ein weiterer Ansatz der Interpretation, den nur wenige Arbeitsgruppen begehen, ist die Vorstellung des Impedanzspektrums als komplexe Übertragungsfunktion. Statt ein elektrisches Ersatzschaltbild zu parametrisieren, wird eine aus Erreger- und Antwortsignal gegebene Übertragungsfunktion interpretiert. Hierbei treten Eigenschaften wie Zeitkonstanten oder Filter in den Vordergrund. Selbstverständlich schließen sich die beiden Betrachtungsweisen gegenseitig nicht aus.

Mit dem derzeitigen vagen Verständnis der elektrochemischen Vorgänge an einer Zellschicht ist eine Modellierung eines Ersatzschaltbildes oder einer Übertragungsfunktion kritisch zu betrachten. Die Vorgänge am Elektroden-Elektrolytübergang sind besser verstanden.

Impedanzeigenschaften lassen sich mit verschiedenen grafischen Darstellungen visualisieren: Nyquist Plots stellen den Realteil auf der Abszisse und den Imaginärteil auf der Ordinate (in der Biochemie häufig negativ aufgetragen) für verschiedene Frequenzen dar. Die Impedanz ist hier der Vektor mit Länge $|Z(\omega)|$ und Phasenwinkel $\varphi(\omega)$. Ein Frequenzspektrum ist daher eine Ortskurve ohne direkte Frequenzzuordnung. In einem Bodediagramm werden Betrag und Phase separat auf einer logarithmischen Frequenzskala aufgetragen. Zur Darstellung des dielektrischen Permittivitätsspektrums dienen Cole-Cole-Plots (nach [36]).

In der Regel sind elektrochemische Zellen stark nichtlinear, d.h. im Antwortsignal finden sich harmonische Vielfache der Erregerfrequenz, und die Systemantworten zweier verschieden frequenter Anregungen addieren sich nicht aus diesem Grund gemäß Superposition zu einer gültigen Lösung. Um dennoch approximativ von einem pseudolinearen Systemverhalten ausgehen zu können, sollte die Erregerspannung kleiner als die Temperaturspannung bei Raumtemperatur, $V_T = k \cdot T / e = 26 \text{ mV}$, gehalten werden. Unter dieser Berücksichtigung darf der Einfluss unkontrollierter elektrochemischer Prozesse an den Elektroden vernachlässigt werden. Eine weitere wichtige Voraussetzung bei Messungen eines elektrochemischen Systems ist der quasistationäre Zustand des Messobjekts während der Messung.

Die für den mobilen Biosensor verwendeten Hefezellen sind nicht adhären, so dass sich alle in dieser Arbeit angeführten Versuche auf Krebszelllinien beziehen. Hierzu wurde das systembiologische Wissen am Lehrstuhl durch die technischen Fortschritte erweitert.

Epithelzellen (wie MCF-7) bestehen aus einer Doppelschicht aus polarisierten Lipiden, wobei die Plasmamembran die Zellen vom Extrazellularraum abtrennt. Dabei bildet der hydrophile Teil der Lipide die äußere Membranschicht aus. Die Lipid-Doppelschicht ist undurchlässig für Ionen und schwer durchlässig für HO₂, CO₂ und O₂. In der Zellmembran integriert sind Rezeptorproteine für Neurotransmitter (Kommunikation) oder Wachstumsfaktoren, Adhäsionsproteine (Zelladhäsion), Ionenkanäle (z.B. Na⁺, K⁺, Cl⁻), Ionentauscher und aktiv betriebene Ionenpumpen. Die aktiven Elemente und die Konzentrationsgradienten über die Zellmembran sind verantwortlich für die Spannung V_m über die Membran, beschrieben durch die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung [8]:

$$V_m = \frac{R \cdot T}{F} \ln \frac{P_K(K)_{out} + P_{Na}(Na)_{out} + P_{Cl}(Cl)_{in}}{P_K(K)_{in} + P_{Na}(Na)_{in} + P_{Cl}(Cl)_{out}} \quad (2.1)$$

Das Membranpotential unterscheidet ruhende Zellen von proliferierenden Zellen: Als Grenzpotential gilt -36 mV, darunter erreichen die Zellen ihr Ruhepotential. Das ansteigende Potential wird durch die erhöhte Na⁺-Permeabilität und den Na⁺-Einfluss in die Zelle während der Proliferation verursacht. Zellen mit hoher Teilungsaktivität haben ein höheres Membranpotential. Konnexone sind die kommunizierenden Zell-Zell-Verbindungen der Epithelzellen, die sich nach der Proliferation aus Na⁺-Kanälen ausbilden. Gehen z.B. durch einen Erbdefekt zu wenig Na⁺-Kanäle in Konnexone über, resultiert ein dauerhaft erhöhtes Membranpotential durch Na⁺-Einfluss und somit fortlaufende Proliferation. Dies ist das Kennzeichen einer Vielzahl von epithelialen Krebszelllinien (nach [36]).

Insgesamt wurden vier kommerziell verfügbare Lösungen zur Messung der Bioimpedanz an lebenden Zellen gefunden (nach [36] und [35]). Diese werden im Folgenden zusammen mit ihren wissenschaftlichen Ursprüngen dargestellt, obwohl in der Einleitung dieser Arbeit (Kap. 1.3) schon oberflächlich darauf eingegangen wurde.

2.1.1. ECIS (Applied BioPhysics)

Die erste Veröffentlichung zur elektrochemischen Impedanzspektroskopie stammt 1984 aus der Gruppe Giaever und Keese von den General Electric Research Laboratories [56]. Aufbauend darauf ist seitdem eine Vielzahl von wissenschaftlichen Beiträgen unter der Begriffschöpfung ECIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy) erschienen [57],[58],[59],[60]. Die Artikel beinhalten einige Gemeinschaftsveröffentlichungen mit Wegener [61],[62]. Die Interpretation von ECIS als elektrochemischer Impedanzsensor der Gruppe Wegener (vgl. [63],[64],[65] und [66]) ist allgemeiner gewählt. Dahinter steckt allerdings eine äquivalente Technik, die daher hier nicht gesondert betrachtet wird. Beim ECIS-System erfolgt die Impedanzmessung anhand einer 2-Elektrodenmessung mit Punktelektroden. Dabei dient eine große Elektrode als Referenzelektrode und weitere kleine Elektroden zusammen als eine Detektionselektrode. Alternativ ist auch eine 3-Elektrodenkonfiguration mit Arbeits-, Referenz- und Gegenelektrode, mit dem Vorteil einer angeblich besseren Reproduzierbarkeit des Messergebnisses möglich. Die von Giaever eingeprägte Erregerfrequenz bei Einzelfrequenzmessungen beträgt 4 kHz; Veröffentlichungen mit Wegener berichten von 40 kHz. Bei einer AC-Messspannung von 1 V wird ein 1 MΩ Vorwiderstand verwendet, dessen Einfluss nicht weiter diskutiert wird. Zur besseren Rauschunterdrückung erfolgt die Messung über einen Lock-In-Verstärker. Giaever erörtert mögliche Strompfade durch eine aufgewachsene Zellschicht und entwickelt daraus einen Satz von Differentialgleichungen für ein analytisches Modell [60]. Das durch einen Frequenzdurchlauf bis 45 kHz gewonnene Spektrum wird anschließend benutzt, um das aus der Theorie abgeleitete Ersatzschaltbild zu parametrisieren. Die extrahierten Parameter mit Interpretationspotential sind die Membrankapazität C_m, der Zellwiderstand R_b (Zell-Zell-Index) und der Parameter α (Zell-Substrat-Index), der mit der Distanz zum Substrat korreliert. Die ECIS-Prinzipien werden von der Firma Applied BioPhysics mit dem Sitz in Troy (New York, USA) in der gleichnamigen Produktserie umgesetzt (Applied BioPhysics). Die Geräte bieten 8 bzw. 96 Wells zur Zellkultivierung auf Goldfilmelektroden. Messungen erfassen dadurch beschränkt durch die Elektrodengröße ca. 100 bis 1000 Zellen pro Well. Applied BioPhysics wirbt unter anderem mit einem Anwendungsgebiet ihres Systems von der Beobachtung von Zellproliferation und Wachstum, Adhäsion, Migration und Signalübertragung bis hin zu Untersuchungen der Membranbarriere und Zellinvasion. Insbesondere zur Elektroporation bieten ein Fluidikmodul und hohe elektrische Felder weitere Möglichkeiten. Die genaue Elektrodenstruktur ist nicht bekannt - es handelt sich wie bei den jünger-

ten Veröffentlichungen von Giaever um eine zentrale Punktelektrode mit der Fläche $5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$ und einer einzelnen, $0,15 \text{ cm}^2$ großen Gegenelektrode (nach [36]).

2.1.2. RT-CES (ACEA Biosciences (Roche))

Das unter Abassi [67],[68] entwickelte *Realtime Cell Electronic Sensing* (RT-CES) System wird seit 2004 von der Firma ACEA Biosciences in San Diego (Kalifornien, USA) als gleichnamiges Produkt vertrieben [69]. Das aktuellste Produkt mit RT-CES-Technologie, xCELLigence, wird in Kooperation mit dem Pharmakonzern Roche vermarktet [41]. RT-CES integriert ein Elektrodenarray aus 2000 Mikroelektroden in einem Well. Insgesamt sind 16- und 96-Well Systeme verfügbar. Die durch Photolithographie auf Glassubstrat erstellten Goldelektroden mit der Fläche $19,6 \text{ mm}^2$ haben eine Fingerstruktur, dabei sind einzelne Punktelektroden wie an einer Perlenkette verbunden [70],[67]. Durch die effektive Elektrodenfläche konnte Zellwachstum von 125 Zellen auf über 16000 Zellen aufgelöst und nachgewiesen werden [71]. Die Messaufnahme erfolgt über die Zeit bei einer maximalen Wiederholungsrate von einer Minute, wobei als Ergebnis der größte Messwert aus Messungen bei 10 kHz, 15 kHz und 25 kHz ausgegeben wird. Das RT-CES System wendet eine Erregerspannung von 10 mV an. Zur Datenauswertung dient ein empirisch aufgestelltes, parametrisierbares Ersatzschaltbild aus einem parallelen RC-Glied. Das Messergebnis wird jedoch noch weiter abstrahiert, normiert auf den systematischen Widerstand des Mediums, und als der so genannte Cell-Index ausgegeben: $R_b(f_i)$ steht für den ohmschen Anteil der Impedanz aus einer Vergleichsmessung ohne Zellen mit der Frequenz f_i , $R_{\text{cell}}(f_i)$ steht dementsprechend für den ohmschen Anteil einer Messung mit Zellen. Damit ist der Cell-Index das Maximum aus allen Messungen f_i nach der Formel: $\text{Cell-Index} = \text{Max}_i \{R_{\text{cell}}(f_i)/R_b(f_i)-1\}$. Von ACEA Biosciences gibt es eine Reihe von Veröffentlichungen [69], die eine Hauptapplikation des Systems in den Frühphasen der Medikamentenentwicklung und der Rezeptorenbeobachtung sehen. Genannt werden beispielsweise Versuche zur Zelladhäsion, Signalweiterleitung, Zellproliferation, Rezeptor-Ligandenbindungen, Toxizitätsanalysen oder Untersuchungen zur Zelldifferenzierung (nach [36]).

2.1.3. CDS (CellKey)

Das 96-Well CellKey System aus Sunnyvale (Kalifornien, USA) definiert sich als *Cellular Dielectric Spectroscopy (CDS)* [40]. Hierbei handelt es sich um Impedanzspektroskopie. CellKey identifiziert zwei Stromwege durch die Zellschicht: Einen bei niedrigen Frequenzen dominierenden Pfad durch die Extrazellularräume und einen Hochfrequenzpfad über die Zellmembranen [72]. Dementsprechend basiert das Impedanzmodell auf einem differentiellen RC-Glied, welches nur Impedanzänderungen betrachtet. Der Impedanzbeitrag des extrazellulären Stroms und der Impedanzbeitrag des transzellulären Stroms werden aus 12 Frequenzen zwischen 1 kHz und 10 MHz errechnet und alle zwei bzw. zehn Sekunden ausgegeben. Neben der Impedanzmessung beinhaltet das System eine Mikrofluidik und Temperaturkontrolle. Das CellKey System dient in erster Linie dazu, Signalwege, verursacht durch Rezeptor-Liganden-Interaktionen, zu detektieren. Statt der absoluten Impedanzbetrachtung im klassischen Sinn stehen rezeptor- und frequenzspezifische Zellprofile im Fokus. Die Anwendung liegt daher z.B. in der Pharmazie zur Ermittlung der Wirkpotenz mit Schild-Plots¹. Ligandeninduzierte Zellantworten werden durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Membranrezeptoren, die die Signaltransduktion ins Zellinnere verantworten) oder Tyrosinkinase ausgelöst (nach [36]).

2.1.4. IDES (Bionas)

Publikationen von Bionas berichten von Sensorchips in 96-Well-Platten auf Keramik- und Siliziumbasis [73],[74]. Die Sensoren basieren auf einem Siliziumsubstrat, dank dem durch integrierte ionensensitive Feldeffekttransistoren (ISFETs) als pH-Sensoren und Clarkensensoren zur Bestimmung des Sauerstoffgehalts weitere Möglichkeiten bestehen. Die Messung ist eine 2-Elektrodenmessung. Durch interdigitale Elektrodenstrukturen (IDES) wird der Elektrodenabstand verringert und eine große Zellzahlkapazität erreicht. Dies verbessert die Signalstärke, statistische Aussagekraft und Reproduzierbarkeit. Die Messfrequenzen

¹Der Schild-Plot beschreibt den linearen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der molaren Antagonistenkonzentration und der Hemmwirkung des Antagonisten

werden in der Literatur zu 4 kHz und 10 kHz bei einem angeblichen Erregerpotential von lediglich einem Millivolt angegeben. Der publizierte Technologiestand von 2007 erwähnt Gold-IDES in $50\mu\text{m}$ Technik, hergestellt durch Photolithographie, und eine Elektrodenfläche von 29mm^2 . Bionas reduziert das Zellmodell auf ein paralleles RC-Glied, wobei nur dem Parameter C_{par} eine Aussagekraft bezüglich der Zelladhäsion und dem Zellbewuchs zugeschrieben wird. Auch Bionas wirbt für eine Anwendung ihres Systems [75] in der Beobachtung von Zellmembranrezeptoren, insbesondere G-Protein gekoppelte Rezeptoren und tyrosingebundene Rezeptoren (nach [36]).

2.2. Ziele der Impedanzmessung in dieser Arbeit

Ziel der Impedanzmessung dieser Arbeit ist es, ein Impedanzmessgerät zu entwickeln, das als Modul im handheld Biosensor eingesetzt werden kann. Dabei wird bei der Auslegung der Hard- und Software auf größtmögliche Präzision und Funktionsumfang gelegt, so dass die Messergebnisse mit den Daten, die mit dem Solartron erfasst wurden, bestmöglich korrelieren. Bei der Verwendung von nicht-adhärenen Zellen spielt die Erfassung eines Impedanzspektrums keine wesentliche Rolle. Erweitert man aber in zukünftigen Anwendungsfeldern das Einsatzspektrum des Geräts, sind durchaus Schnelltests für die Qualitätsanalyse von Lebensmitteln denkbar (vgl. Kap. 8.3). So kann z.B. auch die Gerinnung von Blut direkt mit der hier vorgestellten Schaltung erfasst werden [76]. Hier arbeiten Forscher in Zusammenarbeit mit dem IC-Hersteller Analog Devices an einer Optimierung zur Einstellung der Gerinnungsfähigkeit bei Herz-Lungen-Maschinen. Der selbe IC (AD5933) wird auch in dieser Arbeit verwendet.

2.3. IC AD5933 von Analog Devices

Die Impedanzmessung erfolgt mit dem IC Typ AD5933 von Analog Devices [77]. Er ist intern in mehrere Funktionsblöcke aufgegliedert (vgl. Abb. 2.2).

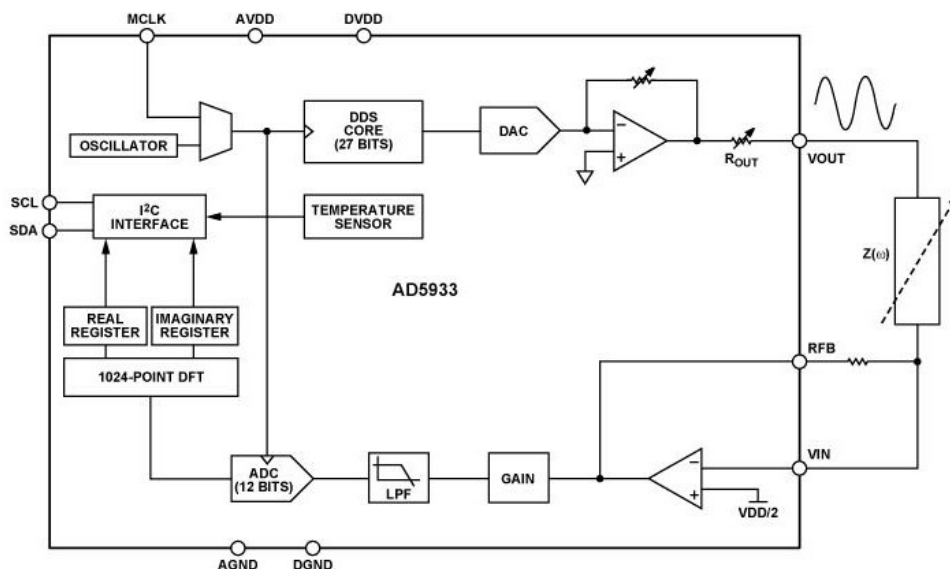


Abb. 2.2.: Funktionsblöcke des Impedanzmesssystems AD5933, Quelle: [77]

Getaktet wird der Chip entweder über einen externen Takteingang oder mit der internen Systemfrequenz 16,776 MHz. Mit einer Frequenzauflösung von 27 Bit durch direkte digitale Synthese (DDS) und anschließender Digital-Analog-Umsetzung wird das Messobjekt am Chip durch ein sinusförmiges Erregersignal stimuliert. Die Amplitude des Wechselspannungsanteils ist dabei wahlweise 1,98 V, 0,97 V, 383 mV oder

198 mV. Jeweils zu beachten ist jedoch auch der nicht unwesentliche Gleichspannungsanteil der Ausgangsspannung, der in Abhängigkeit zu der Versorgungsspannung steht. Am Messeingang ist ein Operationsverstärker in Feedbackschaltung implementiert, dessen externen Feedbackwiderstand aus dem Eingangsstrom eine Messspannung erzeugt. Nach einer weiteren konfigurierbaren Verstärkerstufe und Tiefpassfilterung wird das resultierende Messsignal $x(t)$ einer 12 Bit, 1 MSPS Analog-Digital-Wandlung unterzogen. Der essentielle Kniff der Impedanzmessung mit dem AD5933 ist eine besondere Fouriertransformation des nun diskreten Messsignals $X(f)$ gemäß folgender Gleichung (modifiziert aus [77])²:

$$X(f) = \frac{1}{1024} \sum_{n=0}^{1023} X_n (\cos(\phi_n) - j \sin(\phi_n)) \quad (2.6)$$

Diese Technik unterscheidet sich von einer konventionellen Fouriertransformation, indem sie eine Ein-Punkt Transformation darstellt (DFT). Dies bedeutet, dass die Signalenergie nur bei einer bestimmten Frequenz, nämlich der gesampelten Erregerfrequenz, analysiert wird. Damit tragen Störfrequenzen oder Harmonische des Erreger Signals nicht zur Signalleistung $X(f)$ bei der Erregerfrequenz f bei. Durch die Akkumulation von 1024 Werten und Mittelwertbildung verbessert sich das Ergebnis zusätzlich. Die Vektoren $\cos(\phi_n)$ und $\sin(\phi_n)$ werden gesampelt von DDS-Kern zur Verfügung gestellt. Realteile und Imaginärteile liegen dann in dementsprechenden Registern als zwei 16bit-Werte vor und beschreiben das Messergebnis einer komplexen Admittanz. Über die I²C-Schnittstelle des AD5933 lässt sich der Chip sowohl programmieren als auch auslesen. Somit können pro Messung maximal 512 Messwerte aufgenommen werden (nach [36]). Das Datenblatt des AD5933 gibt weiter keine Auskunft über die Signalerfassung mittels DFT und dessen genaue Berechnung. Dies soll aber hier nicht stören, da sich dies zum einen nicht beeinflussen lässt und zum anderen auch nicht für eine weitere Berechnung notwendig ist.

2.4. Galvanische Trennung

Die Abb. 1.21 zeigt, dass die elektrochemischen Sensoren auf dem Chipsubstrat durch das Zellkulturmedium bei der Messung leitend durch das Medium verbunden werden. Um eine gegenseitige Wechselwirkung der Messelektroniken im Gerät auszuschließen, müssen sowohl die Spannungsversorgung als auch die Datenleitungen voneinander entkoppelt werden.

DC/DC-Wandler sind bekannt für ihr relativ schlechtes EMV-Verhalten [78]. Je mehr Strom ein DC/DC-Wandler benötigt, umso stärker sind die von ihm verursachten elektromagnetischen Störungen. Deshalb wurde der Ansatz der galvanischen Trennung des I²C-Busses verfolgt (vgl. Abb. 2.3).

Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass der DC/DC-Wandler für die galvanisch getrennte Spannungsversorgung viel kleiner dimensioniert werden kann, da nur der AD5933 und die eine Seite des I²C-Bus-Isolators versorgt werden müssen. Ein 50 mA-Wandler reicht für diese Aufgabe aus.

² Herleitung:

Die Impedanz ist der komplexe Wechselstromwiderstand Z eines Zweipols (z.B. ein Kondensator, Widerstand, Spule, Leiter, ...). Sie ist für den Wechselstrom analog zum ohmschen Gesetz für Gleichstrom wie folgt definiert:

$$U = Z \cdot I \quad (2.2)$$

wobei $Z = Z(\omega)$ frequenzabhängig ist. Wird der Strom und analog die Spannung als

$$I(\omega) = I_0 \sin(\omega t) = I_0 e^{j\omega t} \quad (2.3)$$

$$U(\omega) = U_0 \sin(\omega t + \phi) = U_0 e^{j(\omega t + \phi)} \quad (2.4)$$

geschrieben, folgt mit der Gleichung 2.2

$$Z(\omega) = \frac{U(\omega)}{I(\omega)} = Z_0 e^{j\phi} = Z_0 \cos(\phi) - j Z_0 \sin(\phi) = Z_0 (\cos(\phi) - j \sin(\phi)) \quad (2.5)$$

Die Impedanz kann also als komplexe Zahl mit Imaginär- und Realteil bzw. Betrag und Phase aufgefasst werden.

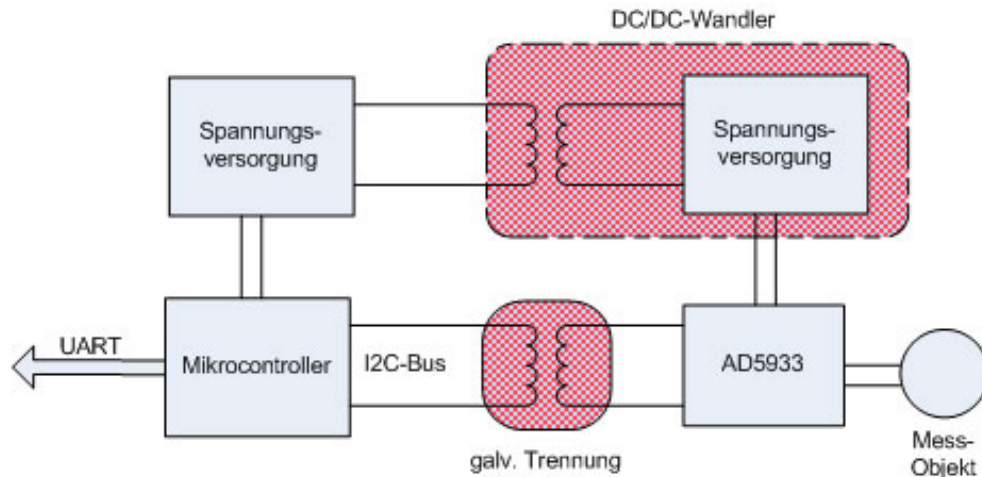


Abb. 2.3.: Konzeptioneller Schaltungsaufbau mit galvanischer Trennung.

Als DC/DC-Wandler wurde der TSM0505S von Traco Electronic AG ausgewählt. Dieser treibt bis maximal 200 mA und passt in ein SO14-Gehäuse mit einer Bauhöhe von 6,95 mm. Er hat eine Schaltfrequenz von 100 kHz und eine Ausgangs-Ripple-Spannung von max. 120 mV_{p-p}. Da diese Ripple-Spannung beachtlich hoch ist, wird der Ausgang des DC/DC-Wandlers mit einem RC-Glied geglättet. Der empfindliche AD5933-Chip wird außerdem über eine Referenzspannungsquelle betrieben.

Analog Devices stellt mit der Produktserie *I-Coupler* eine Alternative zu Optokopplern zur Verfügung. Der ADuM1250 entkoppelt den I²C-Bus induktiv. Dabei benötigt er im Vergleich nur 1/10 des Stromes.

2.5. Technische Ankopplung des BioChip-C an das Impedanzmodul

Die IDES-Signalleitungen werden über Miniatur-SMT-Koaxialkabel und nicht über die Backplaneverbindung auf die Impedanzplatine geführt. Somit ist ein störungsfreier Signalpfad gegeben.

2.6. Schaltungsbeschreibung des Impedanzmoduls

Die Elektronik zur Erfassung der Impedanzsignale des BioChip-C sind auf einer Modulplatine realisiert, deren Anschlussbelegung der Tabelle 3.6 zu entnehmen ist. Sie wird zentral über eine 3,3 V Spannung versorgt, wobei der Datenaustausch mit dem FPGA über eine serielle UART Schnittstelle erfolgt. Die detaillierten Schaltpläne finden sich im Anhang wieder. Ein Foto der Platine ist in der Komponentenübersicht in Abb. 3.2 dargestellt.

In Abb. 2.4 spielt der Multiplexer eine zentrale Rolle: Er dient zum einen der Ankopplung des AD5933 an beide Impedanzsensoren auf dem BioChip-C. Zum anderen ist aber zur exakten Bestimmung der Probe ein Referenz-RC-Glied zu vermessen, das der Software eine genaue Kalibrierung ermöglicht. Die Beschreibung der Firmware findet sich in Kap. 4.3.

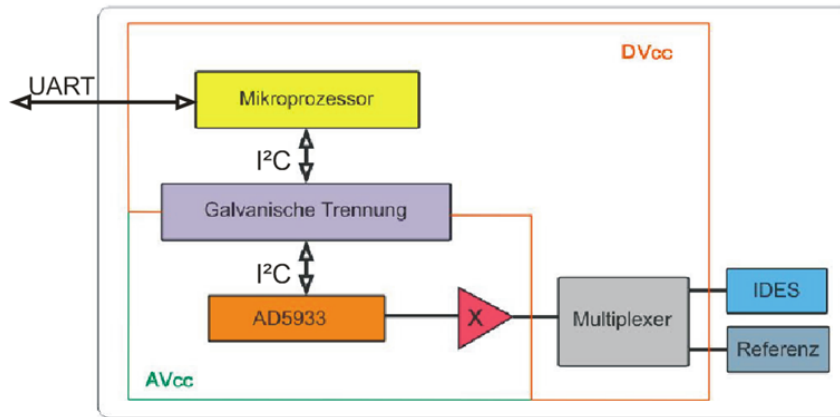


Abb. 2.4.: Funktionsgruppen und Schaltplankonzept für das AD5933- Impedanzmesssystem

2.7. Bestimmung des optimalen Spektrums für Zellmessungen (MCF-7)

Als optimales Spektrum soll genau der Frequenzbereich definiert werden, in dem sich die Messwerte in Betrag und Phase am deutlichsten unterscheiden. Dabei gilt als Bedingung, dass Funktionalität und Auflösungsfähigkeit des Messsystems AD5933 gegeben sein müssen. Unter Berücksichtigung oben beschriebener Problematik scheiden Randgebiete des theoretisch möglichen Spektrums von 1 kHz bis 100 kHz automatisch aus.

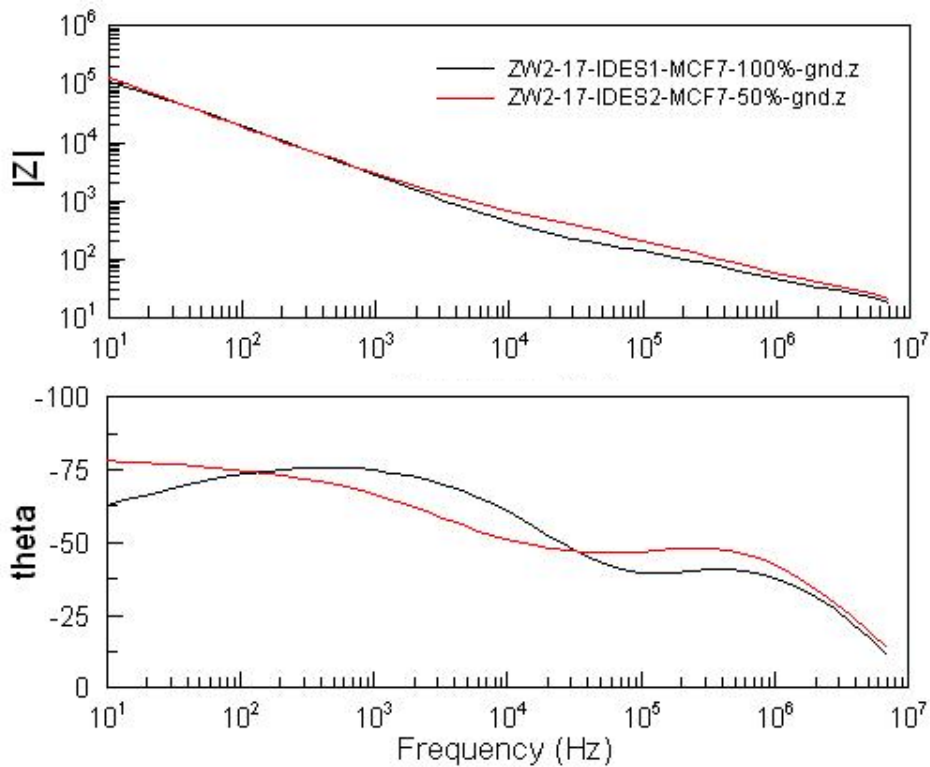


Abb. 2.5.: Impedanzspektren von MCF-7 Zellen unter 50%iger und 100%iger Sensorabdeckung. Die Spektren wurden mit dem Impedanzmessgerät Solartron aufgenommen.

Die Abbildung 2.5 zeigt das Impedanzspektrum von MCF-7 Zellen mit 100%iger und 50%iger IDES-Abdeckung mit MCF-7 Zellen. Hier ist der Unterschied vor allem beim Phasendiagramm am deutlichsten bei 10 kHz zu detektieren.

Die Abbildung 2.6 bildet das Spektrum von 100%iger MCF-7 Abdeckung der IDES und einer Elektrolytlösung (NaCl) zum Vergleich ab. Hier ist auch der Unterschied bei ca. 10 kHz am besten erkennbar. Die Spektren wurden mit dem Solartron Typ SI1250 von Schlumberger unter 10 mV Erregerspannung von 10 Hz bis 10 MHz aufgenommen (nach [36]).

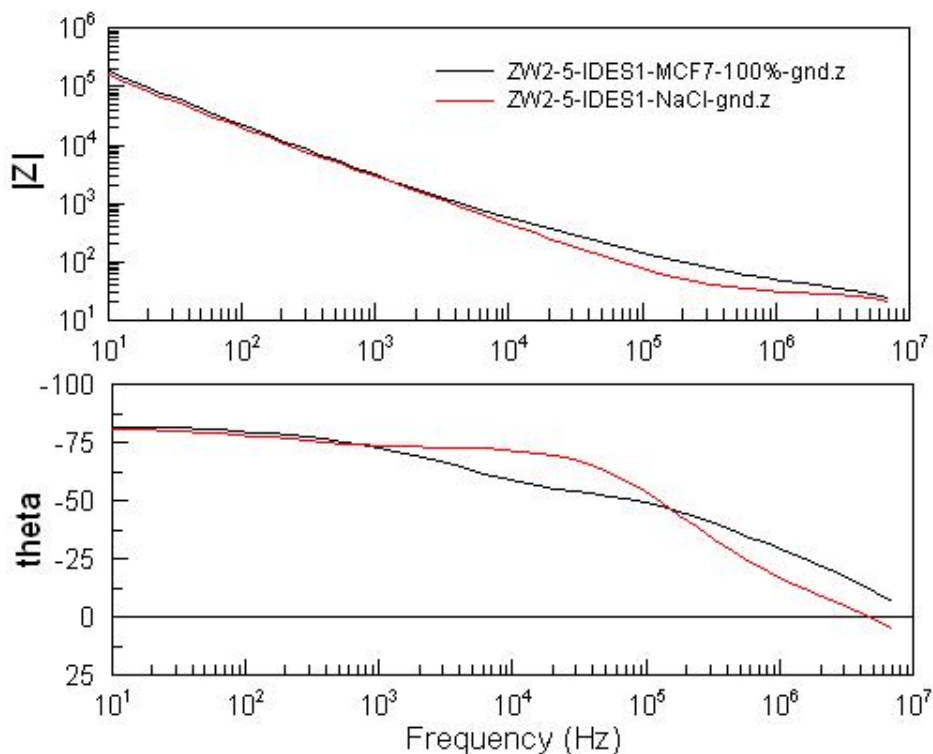


Abb. 2.6.: Impedanzspektren von MCF-7 Zellen unter 50%iger und 100%iger Sensorabdeckung (links), sowie das Spektrum einer NaCl-Lösung zum Vergleich (rechts). Die Spektren wurden mit dem Impedanzmessgerät Solartron aufgenommen.

2.8. Kalibrierung und Messfehler des AD5933

Vor den Messungen mit invertierendem Verstärker wurden zunächst einige Feedbackwiderstände getestet und $R_{fb} = 7 \text{ k}\Omega$ als optimale Konfiguration herausgefunden. Nach Abbildung 2.7 zeigt eine Messung mit $1 \text{ k}\Omega$ Kalibrierung eine einwandfreie Linearität. Einen weniger systematischen Messoffset erreicht man dagegen durch eine $220 \text{ }\Omega$ Kalibrierung. Wenn korrekte Absolutwerte bei einer Messung von Bedeutung sind, ließe sich der systematische Offset anhand einer zusätzlichen Referenz, wie beispielsweise dem zweiten Kalibrierwiderstand, leicht ermitteln und anschließend über einen Korrekturalgorithmus bereinigen. Wie jedoch die Abbildung 2.7 veranschaulicht, ist der Phasenfehler aller Messungen äußerst gering, nimmt jedoch bei größeren Impedanzen linear zu.

Die systematische Messunsicherheit anhand eines $1 \text{ k}\Omega$ Testwiderstandes mit einer $200 \text{ }\Omega$ -Kalibrierung zeigt die Abbildung 2.8: Der Frequenzverlauf der Mittelwerte des Betrags sowie die jeweiligen Varianzen σ^2 beziehen sich auf 10 Messreihen an der Probeimpedanz. Aus der Graphik ist zu erkennen, dass der Kalibrierwiderstand nahe der Zellimpedanz liegen sollte.

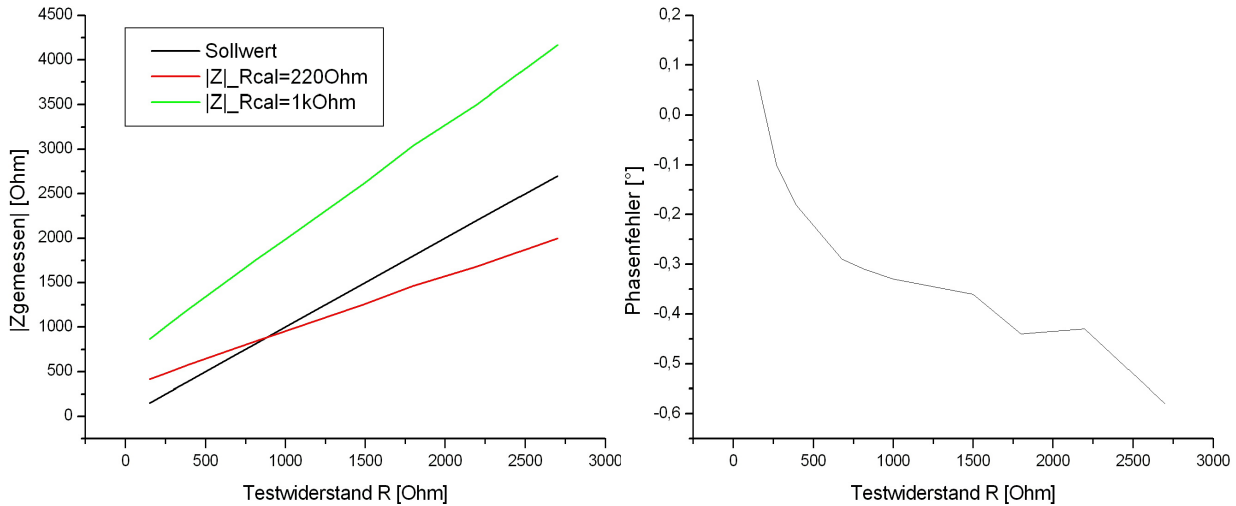


Abb. 2.7.: Einfluss des Kalibrierwiderstandes auf die Linearität und Monotonie der Messung (links) und Phasenfehler in Abhängigkeit vom Testwiderstand (rechts).

Zur Charakterisierung der Schaltung durch Vergleich mit den Messwerten des Solartron SI1250 wurden 13 Testdummies mit beiden Messgeräten bei 10 kHz charakterisiert. Dabei wurden Betrag und Phase der unterschiedlichen Ersatzschaltbildtopologien in der Tabelle 2.1 erfasst und deren absoluter Fehler in % berechnet. Das Ergebnis ist in Kapitel 2.12 dargestellt.

2.9. Impedanzmessung an lebenden Zellen

Sämtliche Messungen wurden mit den Biochips L796-1a-14 (I), L799-1a-2 (II) und L796-1a-1 (III) durchgeführt. Bevor Zellen auf den Chips kultiviert worden sind, wurden diese mehrfach mit destilliertem Wasser gespült und anschließend für zwei Stunden bei 120°C hitzesterilisiert. Mit Akkutase wurde eine Zelllinie gelöst und nach einer Zellzählung von ca. $0,8 \times 10^5$ Zellen in 300 μl DME-Kulturmedium auf jedem Biochip angesetzt. Die präparierten Biochips wurden vor und zwischen den Messungen in einem Inkubator in CO_2 -Atmosphäre bei 37°C gelagert. Schon nach 18 Stunden Inkubationszeit waren die IDEs vollständig mit einer einlagigen Zellschicht bedeckt (optische Kontrolle mit Mikroskop).

Das Versuchsziel der Messungen an MCF-7 Zellen war die Eignung des AD5933-Chips für eine Impedanzspektroskopie an lebenden Zellen zu beweisen. Dazu sollte das gemessene Spektrum mit den Ergebnissen des „Goldstandards“ Solartron übereinstimmen. Zudem wird erwartet, dass der Zellbewuchs der Sensoren, Stoffeinträge, welche die Zellmorphologie beeinflussen, Zellregeneration und der Zelltod detektierbar sind (gemäß Forschungsarbeiten aus [35] und [36]).

Die Zellproliferation ist über den Zeitverlauf nach Inkubation im Nährmedium DMEM beobachtbar. Vom Wirkstoff Cytochalasin B ist für MCF-7 Zellen bekannt, dass dieser die Zellen abflacht. Diese Strukturveränderung ist auch unter einem Lichtmikroskop erkennbar. Durch das Detergens Triton X-100 werden Zellmembranen aufgelöst und dadurch die Zellschicht zerstört. Für die entsprechenden Versuche wurden daher DME-Medien mit den genannten Wirkstoffen aufbereitet und damit die Zellmedien in den Biochips ausgetauscht. Die Messplattform ist in Abb. 2.9 dargestellt.

Versuchsdurchführung

Nach dem Animpfen der Chips mit lebenden Zellen wird die Bioimpedanz aller Chips zum ersten Mal erfasst. Nach 18 Stunden Inkubationszeit sollte in einer zweiten Messung durch das Anhaften der Zellen und die Zellproliferation eine Impedanzänderung nachgewiesen werden. Es folgt der Medienwechsel zu DMEM mit 2 μM Cytochalasin B unter einer Wirkdauer von eineinhalb Stunden und anschließender Regenerationsphase in DMEM von weiteren eineinhalb Stunden. Zum Abschluss werden die Zellmembranen

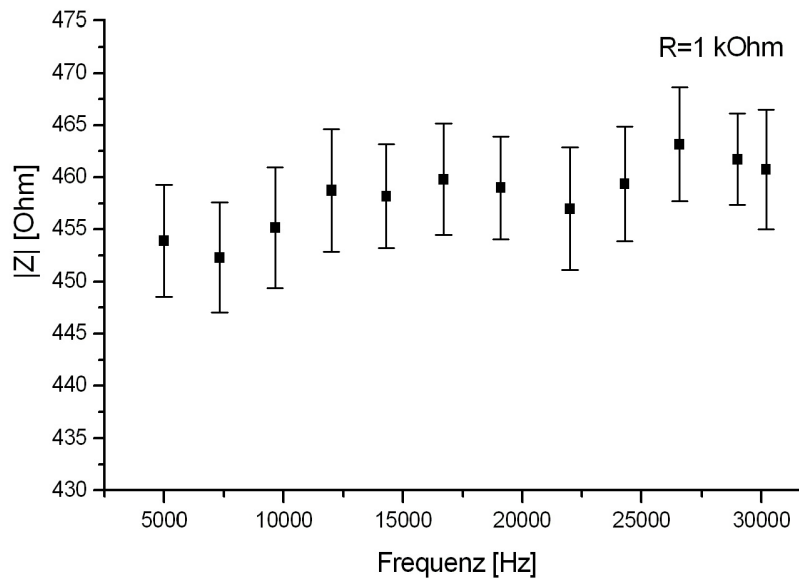


Abb. 2.8.: Frequenzverlauf des Mittelwertes und der Varianzen über einen Bereich von 10 kHz bis 30 kHz. Gemessen wurde ein 1 k Ω Widerstand mit einer 200 Ω -Impedanz als Referenz zur Kalibrierung.

innerhalb von einer halben Stunde in DMEM mit 0,2% Triton X-100 aufgelöst. Die Ergebnisse sind in Kapitel 2.12 zusammengefasst.

2.10. Vergleich der AD5933 Impedanzplatine mit dem Solartron SI1250

Die Tabelle 2.1 zeigt den absoluten Fehler von 13 Testmessungen bei 10 kHz im Vergleich des Solartron SI1250 und der Impedanzplatine mit dem IC AD5933. Der prozentuale Fehler liegt bei +/-1% im Betrag, sowie bei +/-1% bis +/-5% in der Phase.

2.11. Charakterisierung der Messwerte anhand der Impedanzmessung mit MCF-7 Zellen

Nach Abb. 2.5 und 2.5 unterscheiden sich die Beträge zweier Messkurven von MCF-7 Zellen bzw. MCF-7 Zellen gegenüber einem reinen Elektrolytmedium ganz deutlich im Bereich von ca. 1 kHz bis 3-10 MHz.

Überlagert man die Messkurven zweier MCF-7 Messungen bzw. einer MCF-7 Messung und einer Elektrolytmessung, so ergeben sich im Phasenplot zwei charakteristische Schnittpunkte. Typischerweise kreuzen sich die Plots bei ca. 200 Hz-500 Hz und 30 kHz-200 kHz. Innerhalb dieser Schnittstellen ist die Phasendifferenz der Kurven maximal. Darüber hinaus spreizen sich die Kurven erst wieder ab 1 MHz eindeutig. Da die Messungen mit dem AD5933 auf 100 kHz frequenzbegrenzt sind, eignet sich für das ideale Spektrum von MCF-7 Zellen nur die Schnittmenge der optimalen Bereiche von Betrag und Phase. Folglich begrenzt dies das zur Messung sinnvoll genutzte Frequenzband auf ca. 1 kHz bis 30 kHz. Die Impedanz für MCF-7 Zellen (vollbewachsen) auf den BioChip-C-IDES bewegt sich betragsmäßig von ungefähr 2 k Ω bei 1 kHz bis zu 200 Ω bei 30 kHz und für reine Elektrolytmessungen gegenüber NaCl von 1,8 k Ω bei 1 kHz bis zu 300 Ω bei 30 kHz. Dies entspricht auch nahezu den in [79] genannten Werten.

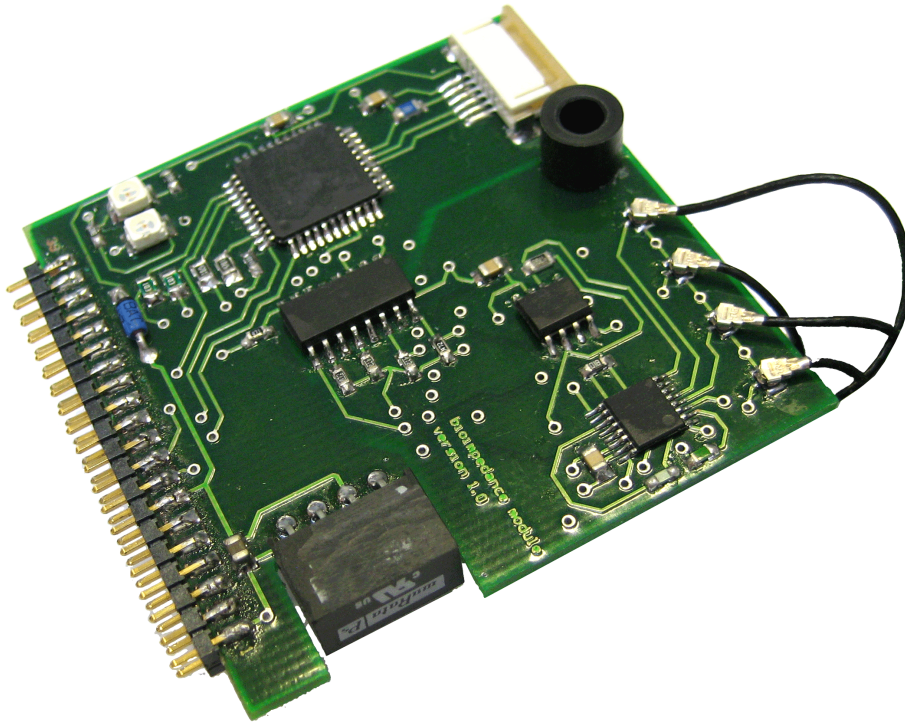


Abb. 2.9.: Impedanzmessplatine mit dem AD5933 zur Verwendung im handheld Biosensor.

2.12. Darstellung der Ergebnisse aus den Messungen mit lebenden Zellen

Gezeigt werden in den Kurven die Verläufe von Betrag und Phase, wie dies in einem Bodediagramm üblich ist. Alle Kurven beziehen sich auf die IDES 1 der ausgewählten Sensorchips und eine Kalibrierung mit dem Referenzwiderstand 220Ω .

In Abb. 2.10 ist ersichtlich, dass alle drei Sensoren nach dem Animpfen der Zellen dieselben Messwerte zurückgeben.

In Abb. 2.11 ist zu erkennen, dass sich die Betragsspektren nach der Inkubationszeit von 18 Stunden leicht spreizen. Die Beträge steigen in dieser Zeit deutlich an und deuten auf Adhäsion der Zellen auf den IDES und eine sich abgedichtete Zellschicht hin. Weniger deutlich zu erkennen ist dies jedoch anhand des Phasenspektrums. Die Behandlung mit Cytochalasin B lässt sich in Abb. 2.12 durch eine sprunghafte Erhöhung des Betragsspektrums innerhalb kurzer Zeit detektieren. Sensor III, der keiner Behandlung mit dem Wirkstoff unterliegt, verhält sich dagegen unauffällig. Die Betragskurve erhöht sich aufgrund der längeren Inkubationszeit ein wenig.

Möglicherweise ist der höhere Impedanzbetrag auf die längere Inkubationsdauer zurückzuführen. Interessanterweise ist nun die Phase des weiterhin in normalem Kulturmedium gehaltenen Sensor III kleiner als die Phasen der Sensoren I und II. Der Einfluss von Cytochalasin B, und damit die Morphologieveränderung, ist also im Phasenspektrum auszumachen.

Triton X-100 löst die Zellen innerhalb kurzer Zeit, beobachtbar unter einem Lichtmikroskop, auf. Nach einer halben Stunde beweist Abb. 2.13, dass nur noch DMEM mit den gelösten Zellresten gemessen wird.

Die Impedanzspektren entsprechen nahezu exakt der Eingangsmessung kurz nach dem Animpfen der Sensoren.

Die Messreihe beschreibt zusammenfassend Abb. 2.14.

Dargestellt wurden stets die Graphen aus den Rohdaten. Das Rauschen in den Messkurven kann durch einen Smoothing Algorithmus leicht eliminiert werden.

Tab. 2.1.: Vergleich der AD5933 Impedanzplatine mit dem Solartron SI1250

	$ Z_{AD5933} $ [Ω]	Φ_{AD5933} [$^\circ$]	$ Z_{solartron} $ [Ω]	$\Phi_{solartron}$ [$^\circ$]	dZ [Ω]	d Φ [$^\circ$]	Fehler Z [%]	Fehler Φ [%]
1	790,52	-73,80	788,67	-74,87	1,85	1,06	+0,23	-1,42
2	811,58	-75,33	809,80	-76,41	1,78	1,07	+0,22	-1,41
3	4159,68	-23,88	4314,50	-23,08	-154,82	-0,80	-3,59	+3,48
4	651,99	-77,73	654,74	-78,90	-2,75	1,17	-0,42	-1,48
5	720,53	-78,92	727,55	-80,07	-7,02	1,15	-0,96	-1,44
6	2982,88	-23,96	3061,60	-23,50	-78,72	-0,47	-2,57	+1,99
7	741,63	-67,10	744,18	-68,15	-2,55	1,05	-0,34	-1,54
8	1554,42	-38,96	1520,30	-41,23	34,12	2,27	+2,24	-5,51
9	10021,35	-83,15	10901,00	-87,85	-879,65	4,69	-8,07	-5,34
10	472,27	-88,10	469,93	-89,37	2,34	1,27	+0,50	-1,42
11	1180,49	-88,39	1193,40	-89,42	-12,91	1,03	-1,08	-1,15
12	743,36	-88,27	754,34	-89,42	-10,98	1,15	-1,46	-1,28
13	2062,15	-88,13	2064,50	-89,43	-2,35	1,30	-0,11	-1,45

2.13. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die MCF-7-Messkurven des AD5933 decken sich vollständig mit den Messkurven des Impedanzmessgeräts Solartron, das als der Goldstandard der Bioimpedanzmessung gehandelt wird.

Folgende Versuche wurden bislang unternommen und bestätigen die uneingeschränkte Tauglichkeit der Impedanzmessplatine:

- Erfolgreiche Messung der Bioimpedanz von Elektrolytlösungen
- Nachweis der Existenz lebender und abgestorbener Zellen im Nährmedium
- Beobachtung des Aufwuchsprozesses (Proliferation, Adhäsion) lebender Zellen auf den Elektrodenstrukturen
- Änderung der Zellmorphologie ausgelöst durch Wirkstoffzugabe
- Detektierung des künstlich verursachten Zelltods

Die Eigenentwicklung eines modularen Impedanzmesssystems für ein mobiles Messgerät erfüllt damit alle Erwartungen und stellt nun ein hilfreiches Werkzeug in der Impedanzanalyse lebender Zellen dar. Durch die vielseitige Darstellungsform der Zellimpedanz ist die Grundlage für eine tiefgreifende elektrochemische Zellanalyse gelegt.

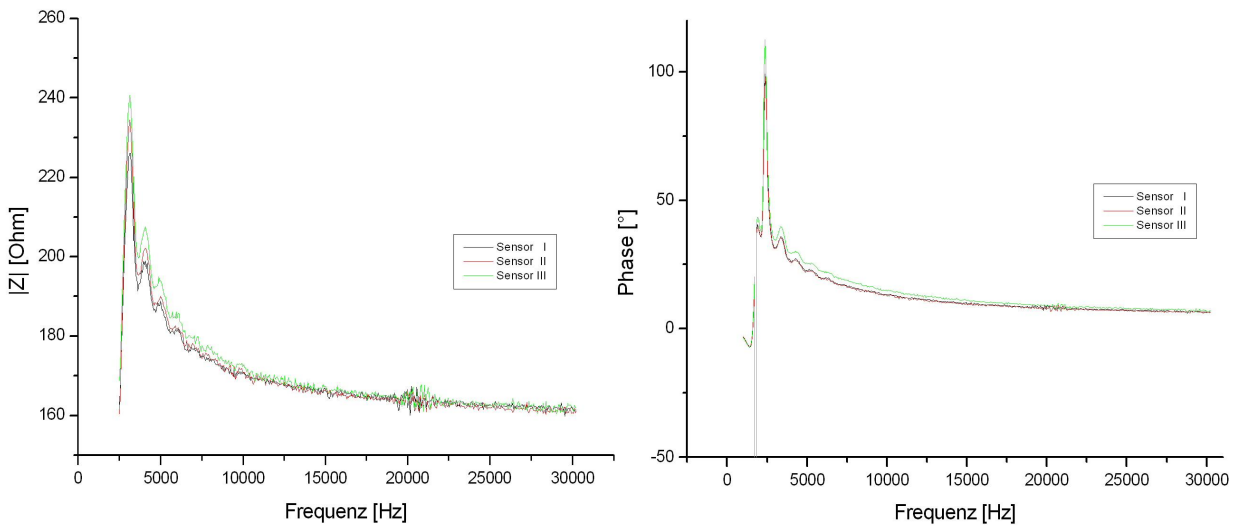


Abb. 2.10.: Bodediagramme der Sensoren I, II und III direkt nach begonnener Zellkultivierung in DMEM.

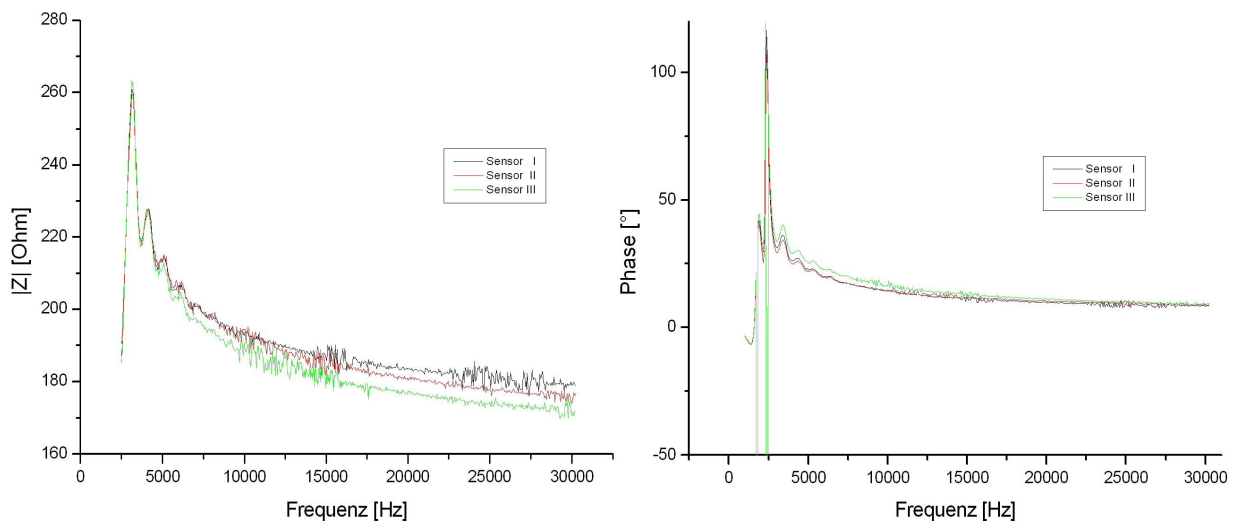


Abb. 2.11.: Bodediagramme der Sensoren I, II und III nach 18-stündiger Inkubationsdauer.

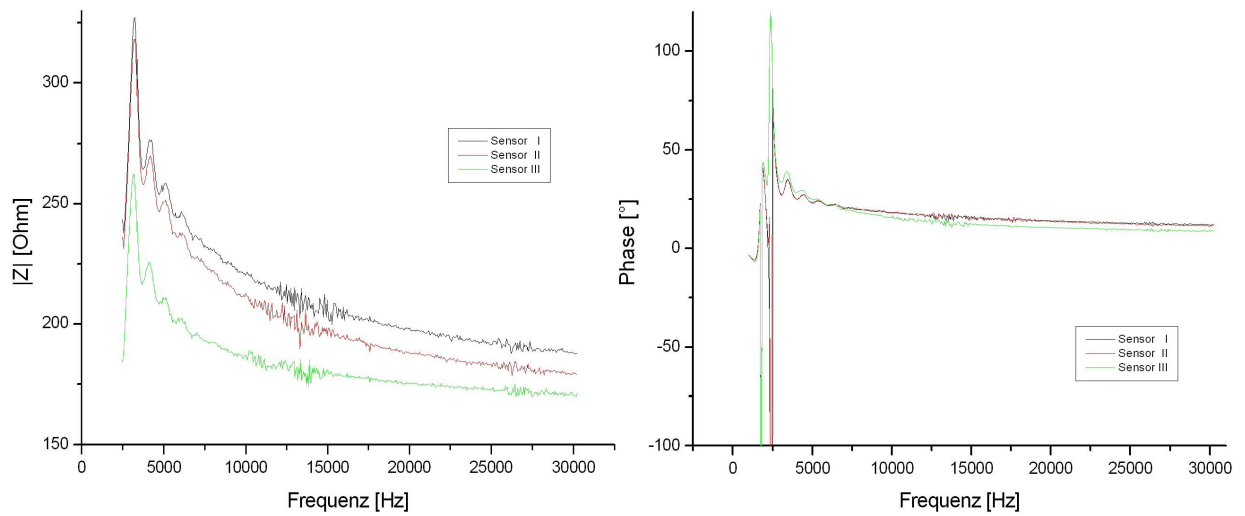


Abb. 2.12.: Bodediagramme der Sensoren I, II und III 1,5 Stunden nach Medienwechsel zu DMEM + Cytochalasin B (I und II) und DMEM (III).

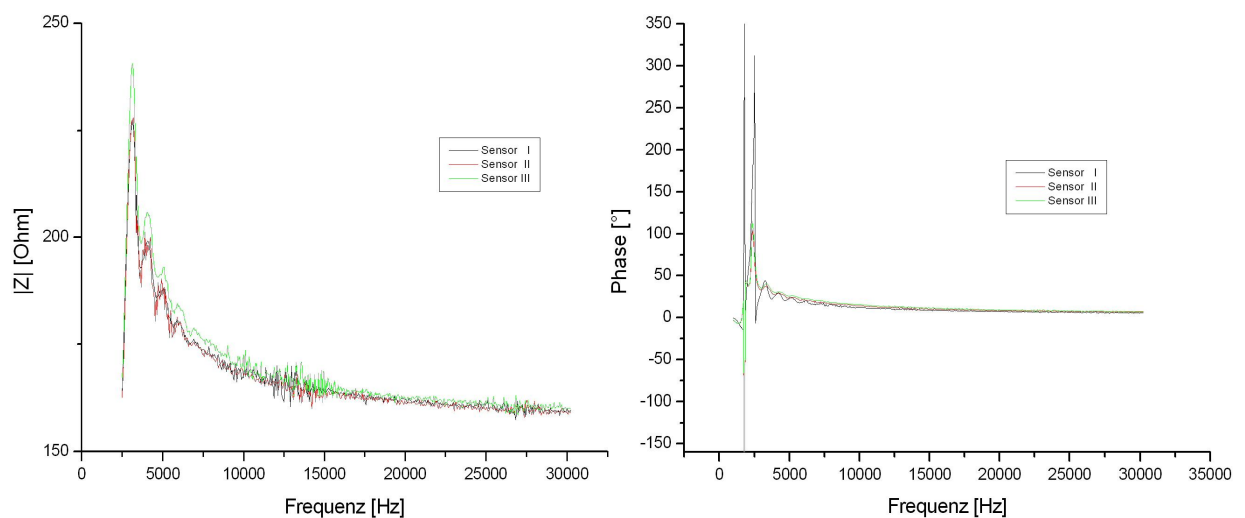


Abb. 2.13.: Bodediagramme der Sensoren I, II und III nach Zellbehandlung mit Triton X-100.

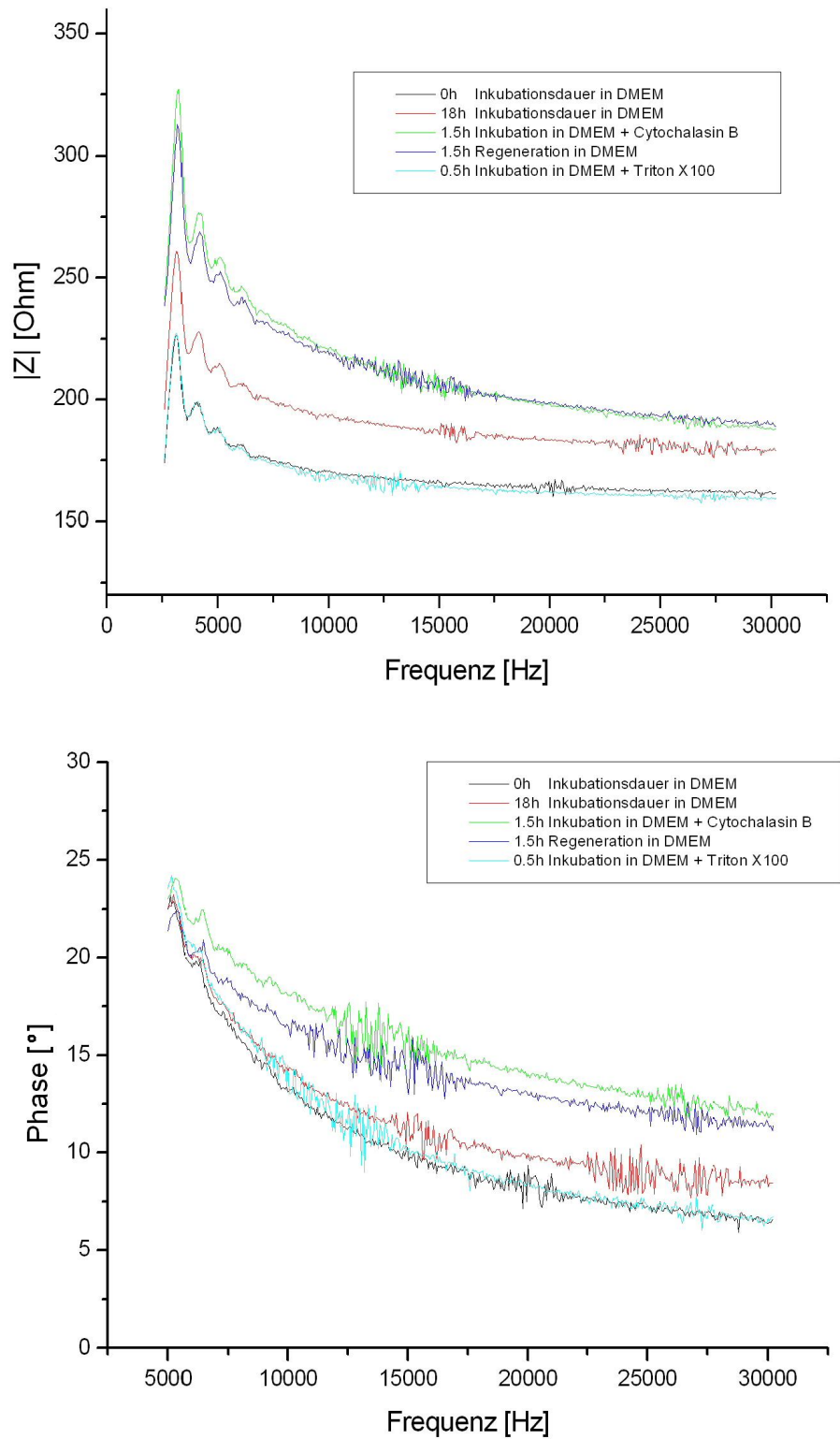


Abb. 2.14.: Bodediagramme des Sensors I über die gesamte Versuchsreihe.

3. Hardware des mobilen Biosensors

3.1. Modulkonzept des Handheld Biosensors

Bei der Entwicklung standen zwei Dinge im Vordergrund: Zum einen die bestmögliche Miniaturisierung, zum anderen neue Schaltungskonzepte, die getestet werden müssen. Die minimale Baugröße, die bei diesem Demonstrator erreicht werden kann und die Komplexität der Schaltungsteile sind entwicklungstechnisch schwierig. Daher wurden die Platinen modular aufgebaut. Sämtliche Schaltungsteile wurden jeweils auf einer separaten Platine verbaut, die zum einen die störungsempfindliche analoge Sensortechnik von der digitalen Datenvorverarbeitung trennt, aber auch Flexibilität bezüglich der Weiterentwicklung garantiert und somit die Integration zukünftiger Sensorschaltungen erleichtert. Separate Platinen für die folgenden Module wurden integriert (siehe Abb. 3.2):

- Bedienteil (Kap. 3.2)
- Analogelektronik (Kap. 3.3)
- Digitalelektronik (Kap. 3.4)
- Impedanzelektronik (Kap. 2.6)
- Spannungsversorgung bzw. aktive Backplane (Kap. 3.5) und
- Datenschnittstelle über Funk (Kap. 3.6)

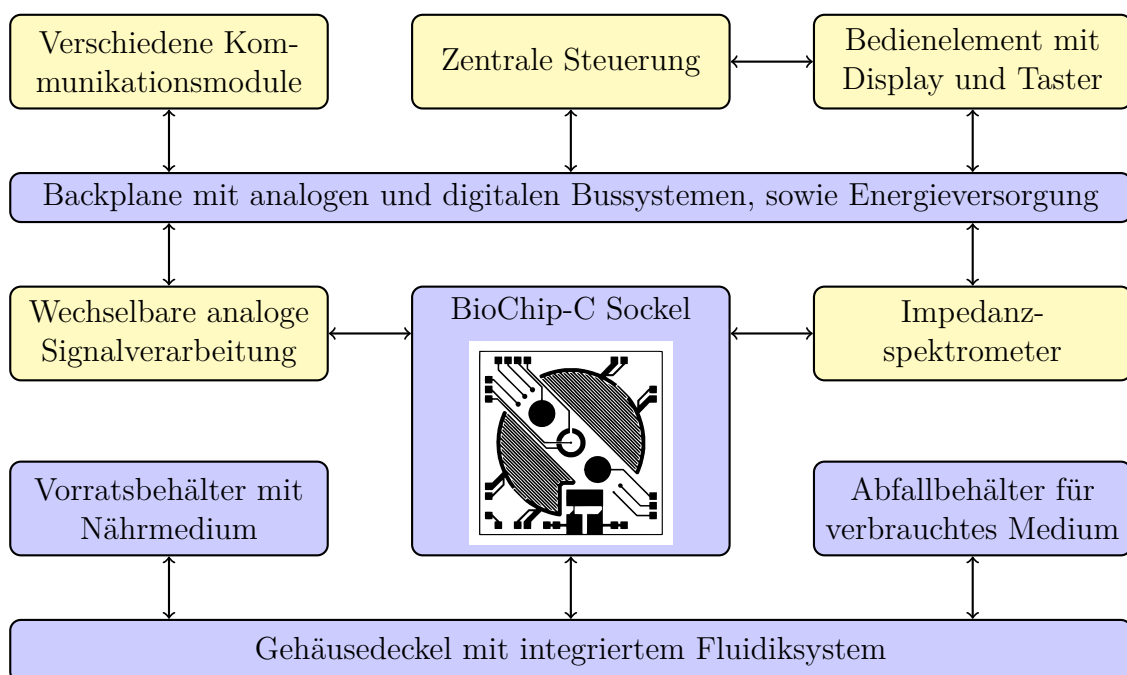


Abb. 3.1.: Schematischer Aufbau des handheld Biosensors. Austauschbare Module sind in gelb dargestellt, feste Infrastruktur in blau.

Die Abb. 3.1 zeigt den schematischen Aufbau der Hardware sowie die Schnittstellen zwischen den einzelnen Komponenten. Die Backplane versorgt alle Module mit Energie und sorgt für die Verbindungen der analogen und digitalen Signale.

Die Digitalplatine enthält neben dem FPGA für die eigentlichen Steuerungsaufgaben auch DACs¹ für die Einstellung von Arbeitspunkten, sowie ADCs² zum Abtasten der Messwerte. Hier werden die Signale des BioChip-C verstärkt, gefiltert und anschließend wieder in die Backplane eingespeist.

Die Impedanzeinheit ist ebenfalls mit dem Sensorchip verbunden. Die Ergebnisse einer Messung werden digital über die Backplane an die Steuereinheit weitergereicht. Dort werden sie zwischengespeichert und können über ein Kommunikationsmodul ausgelesen werden. Die Anbindung der Kommunikationskomponente erfolgt ebenfalls digital über die Backplane.

Das Bedienelement kann konzeptionell als Teil des Gehäuses gesehen werden, da das Display sowie die Taster in das Gehäuse eingelassen sind. Die Spannungsversorgung und die Ansteuerung der Anzeige erfolgen über die Backplane, während die Taster direkt mit der Steuereinheit verbunden sind.

Das Fluidiksystem (vgl. Kap. 5.3) ist in den Deckel des Gehäuses integriert.

Kapitelzuordnung zu den in Abb. 3.2 dargestellten Modulen

Links: Interdisziplinäre Module (Biologie, Mechanik und Software)	Rechts: Hardwarekomponenten (Platinen)
Biohybrides Sensorelement: Kapitel 1 und 6	Bedienerschnittstelle: Kapitel 3.2
Fluidik: Kapitel 5.3	Analogmodul: Kapitel 3.3
Referenzelektrode: Kapitel 5.3.2	FPGA Digitalmodul: Kapitel 3.4
Gehäuse: Kapitel 5	Impedanzmodul: Kapitel 2.3
Lokale Datenanalyse: Kapitel 4.5	Aktive Backplane: Kapitel 3.5
Datenbankbasiertes Expertensystem: Kapitel 4.6	Funkmodul: Kapitel 3.6

¹Digital to Analog Converter

²Analog to Digital Converter

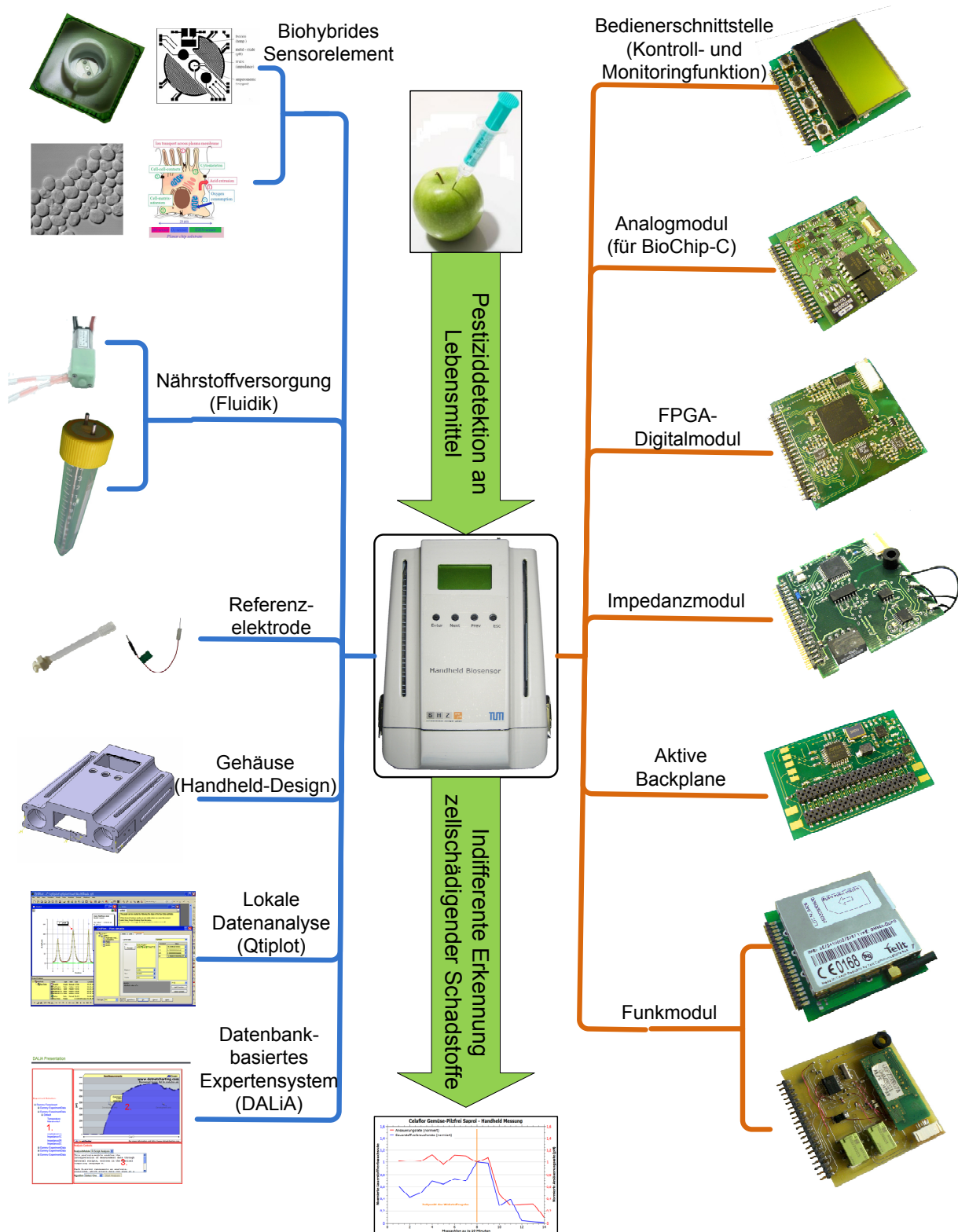


Abb. 3.2.: Übersicht der verwendeten Komponenten des handheld Biosensors.

3.2. Bedienerchnittstelle und Pumpensteuerung

Dieses Modul bietet eine Mensch-Maschine-Schnittstelle über ein graphisches LC-Display sowie vier Taster. Die Steuerung der Pumpe ist ebenfalls auf dieser Platine implementiert und besteht aus zwei separat schaltbaren Spannungsversorgungen. Diese lassen sich für zwei verschiedene Geschwindigkeitsstufen nutzen. Das Modul wird über den 40-poligen Steckverbinder zur Backplane mit Spannung versorgt und zur Ansteuerung des Displays mit dem I²C-Bus verbunden. Die darüber hinaus nötigen Signalleitungen zur Pumpensteuerung und Tastenabfrage werden mit einem 10-poligen Flachkabel direkt mit der FPGA-Platine verbunden. Die Beschreibung der Ansteuerung des Bedienelements per Software ist in Kap. 4.2.6 zu finden.

3.3. Entwicklung und Simulation der analogen Schaltungskomponenten

3.3.1. Messung der Temperatur

3.3.1.1. Problemstellung und Schaltungskonzept

Die Messung der Temperatur erfolgt beim *BioChip-C* über einen Platinsensor des Typs *Pt1000*. Für die Anwendung ist der Temperaturbereich von 0°– 50°C von Interesse und daher möglichst hoch aufzulösen. Es wurde eine lineare Verstärkerschaltung verwendet, die eine der Temperatur proportionale Spannung erzeugt.

Das Prinzipschaltbild ist in Abb. 3.3 dargestellt. Durch zwei gleiche Stromquellen wird dem Temperatursensor und einem Referenzwiderstand von 1kΩ ein Strom eingepreßt. Bei 0°C hat der *Pt1000* den selben Wert wie der Referenzwiderstand, so dass sich an beiden Eingängen des Verstärkers die gleiche Spannung einstellt. Da die Differenz verstärkt wird, ergibt sich 0 V für U_{temp} . Steigt die Temperatur, steigt auch der *Pt1000*-Widerstand proportional, und die Spannung am invertierenden Eingang sinkt entsprechend. Damit ergibt sich eine positive Differenzspannung und es folgt $U_{temp} = G \cdot I \cdot \Delta R$ (G: Verstärkungsfaktor, I: Strom, $\Delta R = R_{Pt} - R_{ref}$).

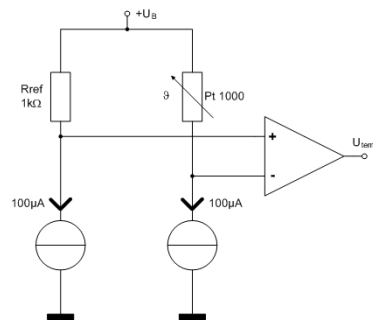


Abb. 3.3.: Schema der Temperaturschaltung

3.3.1.2. Schaltungsdimensionierung und Auswahl der Komponenten

Für die Temperaturmessung wird das Konstantstromprinzip verwendet. Durch den Stromfluss kommt es wegen $P = R \cdot I^2$ zu einer Eigenerwärmung des Sensors, die das Messergebnis verfälscht. Für den Strom durch Sensor wurde daher der geringe Wert von 100µA gewählt, um den Fehler vernachlässigbar klein zu halten. Die Temperaturschaltung ist im Anhang zu finden.

Die beiden Operationsverstärker U3A bzw. U3B in der linken Hälfte des Bildes bilden zusammen mit dem jeweils nachgeschalteten Transistor und Widerstand (Q1/R7 bzw. Q2/R8) die Konstantstromquellen, die nach dem folgenden Prinzip arbeiten: Eine konstante Spannung am nichtinvertierenden Eingang wird auch dem Widerstand am anderen Eingang eingeprägt. Deshalb fließt durch ihn der konstante Strom $I = \frac{U}{R}$ und die Ausgangsspannung des Operationsverstärkers stellt sich so ein, dass dieser auch durch den Transistor fließen kann. Für die Operationsverstärker sind Typen mit niedriger Offsetspannung wünschenswert, um den kleinen Strom nicht durch eine additive Spannung zu verfälschen. Außerdem ist ein niedriger Drift ein wichtiges Kriterium (Langzeitstabilität!).

Die Wahl fiel auf den hochpräzisen *AD8552* von *Analog Devices* (zwei Verstärker pro IC) mit ein paar wichtigen in Tab. 3.1 dargestellten Parametern [80].

Tab. 3.1.: Daten des *AD8552*

Versorgungsspannung	2,7V - 5V
max. Stromaufnahme	1,075mA
max. Eingangs-Offsetspannung	10 μ V
max. Offsetspannungsdrift	0,04 μ V/°C
Rauschspannung	1,6 μ V _{pp} (0-10Hz)

Dieser Operationsverstärker besitzt ein spezielles Kompensationsnetzwerk, das eine effektive Offsetspannung im μ V-Bereich erzeugt. Da Rauschen bei niedrigen Frequenzen ($\frac{1}{f}$ -Rauschen) stark unterdrückt wird, eignet sich der *AD8552* sehr gut für DC-Anwendungen. Externe Kondensatoren werden laut Datenblatt nicht benötigt. Aufgrund dieser Eigenschaften wird der *AD8552* in dieser wie auch den anderen Schaltungen als Standard-OPV eingesetzt.

Für die beiden Transistoren wird der Sperrschicht-Feldeffekt(JFET)-Typ *MMBFJ201* verwendet, der sehr wenig Rauschen aufweist, eine niedrige Abschnürspannung besitzt (zwischen -0,3V und -1,5V) [81] und sich damit gut für DC-Anwendungen mit kleinen Spannungen eignet. Bei Verwendung von Bipolartransistoren würde als Emitterstrom zwar ebenfalls $I = \frac{U}{R}$ fließen, dieser wird aber zum Teil über die Basis geliefert, so dass Referenzwiderstand und Sensor von einem verkleinerten Kollektorstrom I_C durchflossen werden. Es gilt mit der Stromverstärkung $B = \frac{I_C}{I_B}$: $I_C = I_E - I_B = \frac{U}{R} - \frac{I_C}{B} \Leftrightarrow I_C = \frac{U}{R} \cdot \frac{B}{B+1}$.

Da die Verstärkung B starken Typenstreuungen unterliegt, eignen sich Bipolartransistoren hier also nicht für möglichst genaue und identische Stromquellen. FETs sind dagegen sehr gut geeignet, da aufgrund der stromlosen Steuerung $I_{Drain} = I_{Source}$ gilt. Der Grund für die Verwendung von JFETs anstelle von MOSFETs liegt darin, dass Letztere ein wesentlich stärkeres Rauschen bei niedrigen Frequenzen aufweisen ($\frac{1}{f}$ -Rauschen).

Als Spannungsquelle dient die sehr genaue Referenz *LT1790-25* (U1 im Schaltplan), die im kleinen SOT-23-Gehäuse verfügbar ist. Sie besitzt die in Tab. 3.2 angeführten Daten [82].

Tab. 3.2.: Daten des *LT1790-25*

Ausgangsspannung	2,5V \pm 0,05%
max. Eingangsspannung	20V
min. Dropout-Voltage ($I_{out} = 0$ mA)	100mV
max. Ruhestrom	60 μ A
max. Spannungsdrift	10ppm/°C

Die Spannung von 2,5 V (V_{ref1}) stellt den Strom von 100 μ A durch die 25 k Ω -Widerstände R7 bzw. R8 ein. Der Temperatursensor R_{Pt} (=R3) wird in 4-Leitertechnik angeschlossen, wobei die Widerstände R1, R2, R4 und R6 die Leitungen darstellen. Sinn dieser Schaltung ist, an den oberen Anschlüssen von R_{Pt} und R_{Ref} (=R5) das gleiche Potential einzustellen. Dafür sorgt der Spannungsfolger U4A (durch „Leitung“ R2 fließt kein Strom). Es gilt mit $\Delta V = VIN_+ - VIN_-$, $I_0 = 100\mu A$ und keiner Belastung durch nachfolgendes IC U5

$$\Delta V = V_{ref2} - (R1 + R_{Ref}) \cdot I_0 - (V_{ref2} - (R1 + R_{Pt}) \cdot I_0) = (R_{Pt} - R_{Ref}) \cdot I_0 = \Delta R \cdot I_0$$

3. Hardware des mobilen Biosensors

so dass die Spannungsdifferenz unabhängig vom Leitungswiderstand R_1 ist.

Zur Verstärkung von ΔV wurde der *INA155* von *Texas Instruments* eingesetzt, einer von wenigen Rail-to-Rail-Input/Output Single-Supply-Instrumentenverstärker. Ein paar wichtige Parameter sind in der Tabelle 3.3 aufgelistet [83].

Tab. 3.3.: Daten des *INA155*

Betriebsspannung	2,5V-5,5V
max. Eingangs-Offsetspannung	1,5mV
max. Offsetspannungsdrift	$\pm 5\mu\text{V}/^\circ\text{C}$
Verstärkung (fix)	10
max. Verstärkungsfehler	$\pm 0,1\%$
max. Verstärkungsdrift	$\pm 10\text{ppm}/^\circ\text{C}$
max. Ruhestrom	2,6mA

Bild 3.4 zeigt den internen Aufbau des ICs.

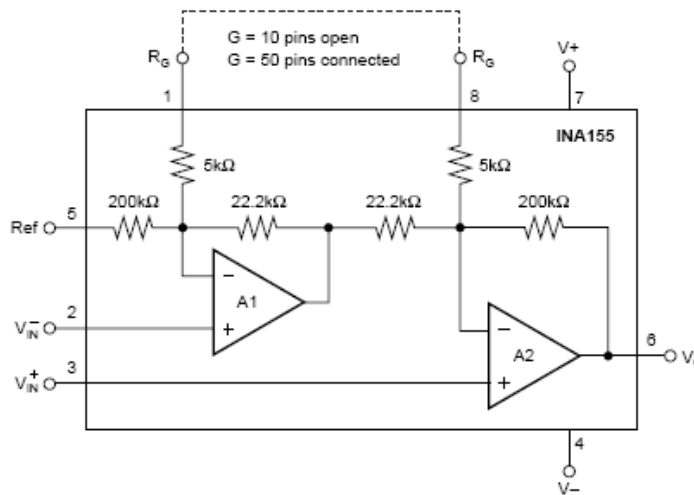


Abb. 3.4.: Aufbau des *INA155* [83]

Der Differenzverstärker hat eine Verstärkung von 10. Für den Ausgang des OPV A1 gilt mit den Werten von R_a und R_b :

$$V_{outA1} = \frac{1}{9}(10 \cdot V_{IN-} - V_{ref}) \Leftrightarrow V_{ref} = 10 \cdot V_{IN-} - 9 \cdot V_{outA1}$$

Unter der Annahme, dass die min. Versorgungsspannung 3,2 V beträgt, folgt $V_{ref} = 290\text{mV}$. Daher wurde die Referenzspannung zu 300 mV gewählt. Sie wird durch den Spannungsteiler R_9/R_{10} mit Spannungsfolger U4B hergestellt. Um die Spannungsdifferenz auf einen angemessen hohen Wert zu verstärken (Volt-Bereich), wird noch ein nichtinvertierender Verstärker (U6A mit R_{11}/R_{12}) nachgeschaltet. Dieser bewirkt eine zusätzliche Verstärkung von $1 + \frac{R_{11}}{R_{12}} = 14,33$. Damit ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$V_{out} = G \cdot \Delta V + V_{ref} = G \cdot \Delta R \cdot I_0 + V_{ref} \quad \text{mit} \quad G = 143,33$$

ΔR liegt im Bereich $1\text{k}\Omega$ - $1,194\text{k}\Omega$ ($\hat{=}$ 0°C - 50°C), dadurch liegt V_{out} zwischen 300 mV und 3,08 V.

Genauigkeit und Fehlerabschätzung

Alle möglichen Fehler (Offsetspannungen, Widerstands- und Referenzspannungstoleranzen, Gain-Error) wurden als maximal groß angenommen (s. Datenblätter). Die Fehler beinhalten zusätzlich einen Temperaturdrift. Dabei wurde angenommen, dass die Umgebungs-temperatur min. 0°C und max. 40°C betragen kann. Die Analyse ergab, dass sich nach Abgleich, im gesamten Bereich zwischen 0°C und 50°C Sensortemperatur, eine Auflösung von $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (genau berechneter Wert: $\pm 0,23^{\circ}\text{C}$) erzielen lässt.

Die Einstellung $REF = 300\text{mV}$ schränkt den Ausgangsspannungsbereich nur wenig ein und damit wird ein sicherer Betrieb der Schaltung mit V_{CC} zwischen 3,2 V und 3,4 V gewährleistet.

3.3.1.3. Simulation der Temperaturschaltung

Das Einschwingverhalten wichtiger Größen bei typischem Arbeitspunkt des Sensors von 37°C wurde überprüft ($\Rightarrow R_{Pt} = 1144\Omega$). Dazu wurde für 10 ms eine Transient Analysis durchgeführt. Abb. 3.5 zeigt die erhaltenen Signalverläufe.

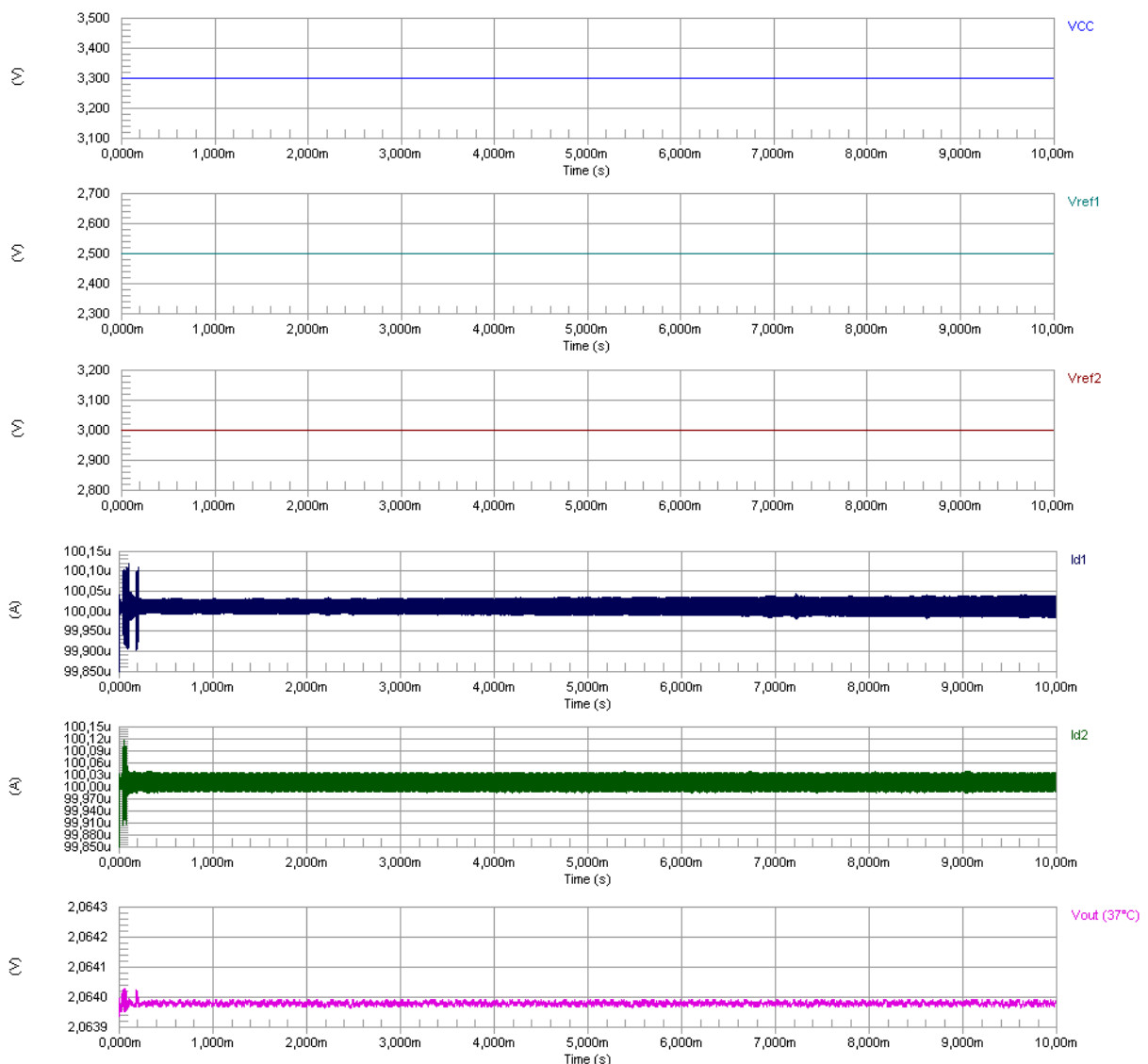


Abb. 3.5.: Temperaturschaltung — Einschwingen bei 37°C

Man erkennt den gewünschten Verlauf der konstanten Spannungen. V_{IN+} beträgt aufgrund des Spannungsabfalls von 100 mV an R_{ref} 2,9V und V_{IN-} liegt auf ca. 2,886 V (114 mV Spannungsabfall an R_{Pt}).

3. Hardware des mobilen Biosensors

Die mit Id1 bzw. Id2 gekennzeichneten Diagramme zeigen vergrößert die Konstantströme. Man sieht die hohe Präzision der Stromquellen mit einer Abweichung unter 50 nA vom Nominalwert. Zuletzt ist die Ausgangsspannung - auf REF bezogen - dargestellt. Da $\Delta V = V_{IN+} - V_{IN-} = 14,4mV$ ist, muss gelten: $V_{out} = G_1 \cdot G_2 \cdot \Delta V = 2,064V$. Dies stimmt sehr gut mit dem Bild überein.

Zuletzt wurde noch die Empfindlichkeit wichtiger Größen auf eine Betriebsspannungsänderung getestet (wieder im Arbeitspunkt bei $37^\circ C$). Annahme war dabei eine Änderung von V_{CC} zwischen 3,2 V und 3,4 V. Es wurde eine DC Sweep Analyse durchgeführt. Die folgende Abbildung zeigt die Spannungsverläufe. Man erkennt, dass die Ausgangsspannung nahezu konstant bleibt (Abb. 3.6).

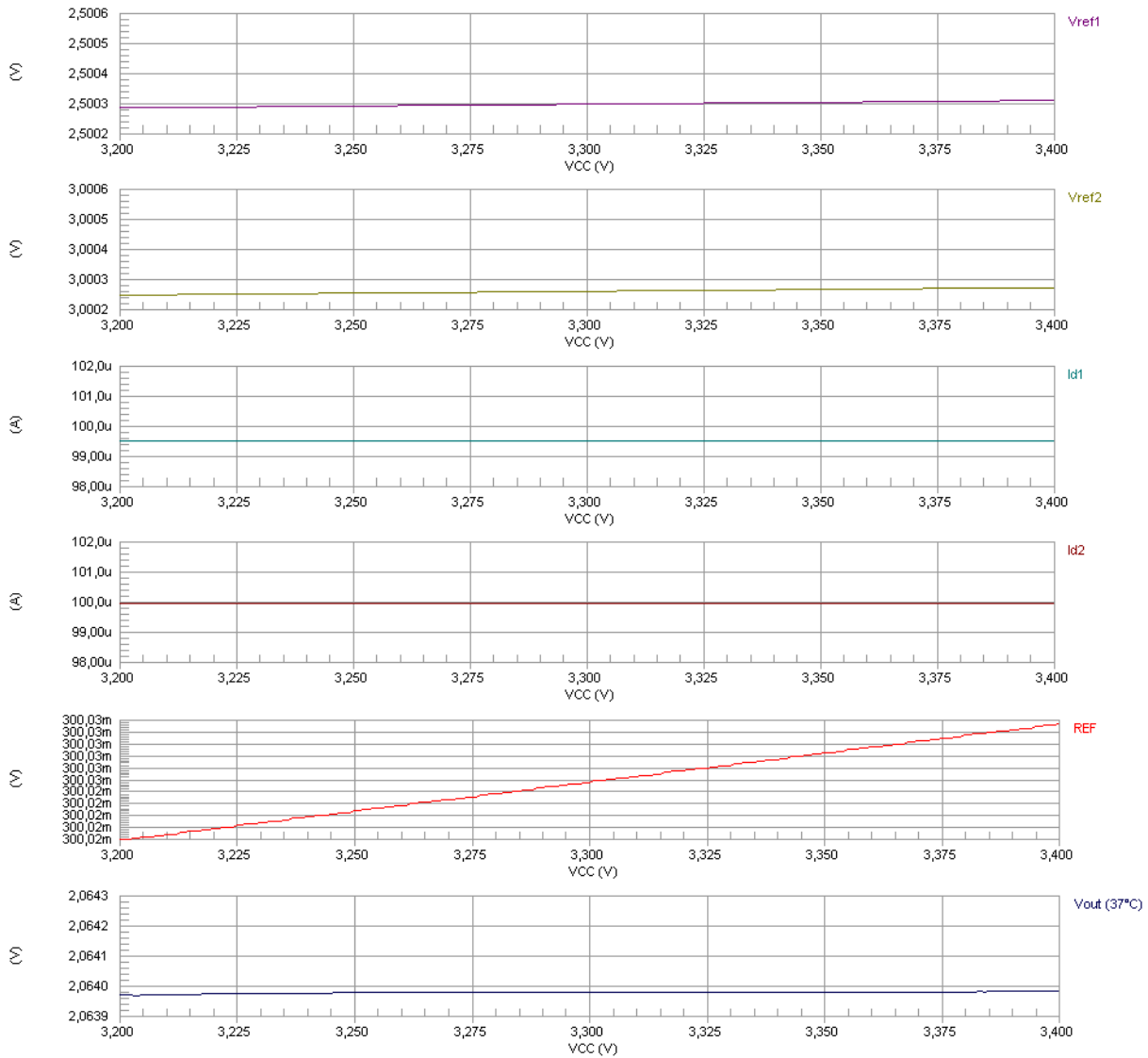


Abb. 3.6.: Temperaturschaltung — V_{CC} -Sweep

3.3.2. Messung des pH-Werts

3.3.2.1. Problemstellung und Schaltungskonzept

Beim *BioChip-C* kommen Metalloxid-pH-Sensoren zum Einsatz, z.B. aus Ruthenium- oder Iridiumoxid. Die Sensoren erzeugen eine zum pH-Wert proportionale Spannung, wobei diese um theoretisch ca. 59 mV pro pH-Stufe steigt. Dieser Wert ergibt sich aus der Elektrochemie (\Rightarrow *Nernstgleichung*, die den Zusammenhang zwischen elektrischem Potential und den Konzentrationen (bzw. Aktivitäten) der reagierenden Stoffe angibt [8]). Zur Messung wird eine Bezugs Elektrode benötigt, die in das Medium getaucht wird, da die Sensoren nur je einen Anschluss besitzen (vgl. Kap. 5.3.2). Die Schaltung wurde konsequent unter der Annahme entwickelt, dass die Bezugs Elektrode auf 0 V GND liegt. Der interessierende pH-Bereich liegt zwischen 5 und 9, so dass die Sensoren mit der erwähnten Vereinfachung eine Spannung zwischen 295 mV und 531 mV liefern, wenn man die Referenzelektroden Spannung außer Acht lässt. Die Schaltung soll auch die Möglichkeit bieten, die Ausgangsspannungen um einen Offset zu verschieben. Abb. 3.7 zeigt schematisch den Aufbau der Schaltung.

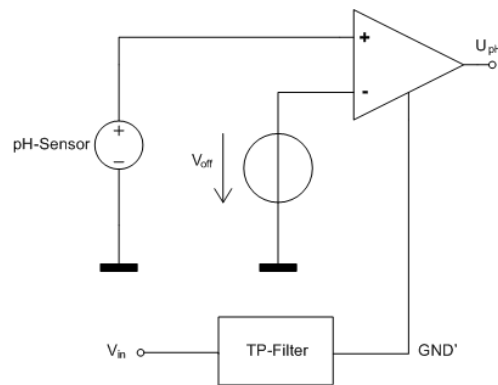


Abb. 3.7.: Schema der pH-Schaltung

3.3.2.2. Schaltungsdimensionierung und Auswahl der Komponenten

Dem Anhang ist der Schaltplan zu entnehmen, der im Folgenden kurz erläutert wird:

$V_{in1/2}$ sind die vom Digitalmodul erzeugten Verschiebespannungen zur Kompensation der galvanischen Spannung der Referenzelektrode, die im Bereich von 0 V-1 V eingestellt werden können. Diese durchlaufen ein aktives Butterworth-Filter 2. Ordnung mit einer 3dB-Frequenz von 10 Hz. Die gefilterten Spannungen werden mit GND1 bzw. GND2 bezeichnet. Mit dem entsprechenden Nennerpolynom gilt für die Übertragungsfunktion [84]

$$H(s_n) = \frac{1}{1 + \sqrt{2}s_n + s_n^2} \quad \text{mit} \quad s_n = \frac{s}{\omega_g} = \frac{j\omega}{\omega_g} = j\omega_n \quad \text{und} \quad \omega_g = 2\pi \cdot 10\text{Hz}$$

was mit den Werten der Schaltung wie folgt realisiert wird:

$$H(s_n) = \frac{1}{1 + \omega_g(C_{3/5}(R_{3/5} + R_{4/6}))s_n + \omega_g^2 R_{3/5} R_{4/6} C_{3/5} C_{4/6} s_n^2}$$

Die Spannung V_{off} wird durch einen Spannungsteiler geliefert, der von der 2,5 V-Referenz der Temperaturschaltung (*LT1790-25*, vgl. Kap. 3.3.1.2) versorgt wird. Durch die Widerstände R1 und R2 ergeben sich hier 288 mV.

Rechts im Schaltplan (siehe Anhang) sind die beiden identischen Instrumentenverstärker abgebildet, die aus je zwei Operationsverstärkern inklusive Widerständen bestehen. Die pH-Sensoren stellen extrem hochohmige Spannungsquellen dar (Innenwiderstand weit im M Ω -Bereich). Daher muss die Belastung so gering wie möglich gehalten werden, um die Messung nicht durch einen zu großen Spannungsabfall zu verfälschen. Für die Eingangs-OPVs werden deshalb Typen mit sehr niedrigen Bias-Strömen verwendet;

Tab. 3.4.: Daten des LMP7702

Betriebsspannung	2,7V-12V
max. Eingangs-Offsetspannung	220 μ V
max. Eingangs-Biasstrom	\pm 1pA
max. Stromaufnahme	2,1mA

die Wahl fiel auf den LMP7702 von National (zwei Verstärker pro Gehäuse). Tab. 3.4 zeigt wichtige Daten dieses Bauteils [85].

Für den anderen OPV des Instrumentenverstärkers wurde der AD8552 eingesetzt. An seinem pos. Eingang liegt die zu subtrahierende Spannung V_{off} . Die vier Widerstände R7-R10 bzw. R11-R14 dienen zum Einstellen des Verstärkungsfaktors G. Es gilt: $G = 1 + \frac{34k\Omega}{4,7k\Omega} = 8,23$. Für die Ausgangsspannung ergibt sich:

$$V_{out1/2} = G(V_{pH1/2} - V_{off}) + GND1/2$$

Mit dem gewählten Wert von G folgt, dass $V_{out1/2}$ bei $GND1/2 = 0V$ zwischen ca. 60 mV (pH 5) und 2,0 V (pH 9) liegt und bei der max. Verschiebespannung von 1,0 V zwischen 1,06V und 3,0 V. Somit wird der pH-Bereich von 5-9 auf einen Spannungsbereich von 1,94 V abgebildet, damit entspricht eine pH-Differenz von 0,05 ca. 24 mV. Diese Auflösung ist für die Schaltung problemlos erreichbar.

3.3.2.3. Simulation der pH-Schaltung

Abb. 3.8 zeigt den Test des verwendeten Filters. Hierzu wurde eine AC Small Signal Analysis mit Altium Designer durchgeführt. Die 3 dB-Frequenz (Amplitudenabfall um Faktor $\frac{1}{\sqrt{2}} \approx 0,707$) liegt bei 10 Hz.

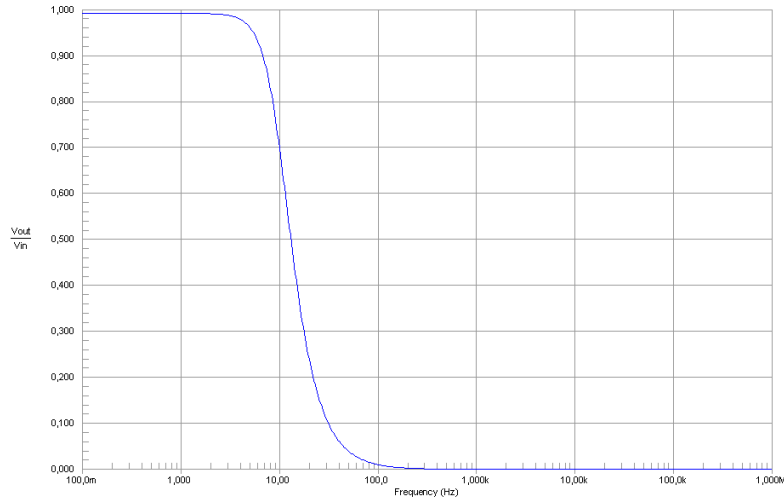


Abb. 3.8.: Betragsverlauf der Filter-Übertragungsfunktion

Die Abb. 3.9 zeigt den Verlauf von $V_{out1/2}$ bei einer pH-Änderung zwischen 5 und 9. Dabei wurde V_{in1} (und damit GND1) zu 150 mV gewählt und V_{in2} (GND2) zu 100 mV. Es wurde eine DC Sweep Analyse mit Veränderung von $V_{pH1/2}$ zwischen 295 mV und 531 mV durchgeführt. Man erhält den Verlauf der konst. Spannungen (V_{off} , GND1/2).

Abb. 3.10 zeigt die Ausgangsspannungsverläufe eines Verstärkers für eine Änderung der Verschiebespannung zwischen 0 V und 1 V in 100 mV Schritten (DC Sweep).

3.3. Entwicklung und Simulation der analogen Schaltungskomponenten

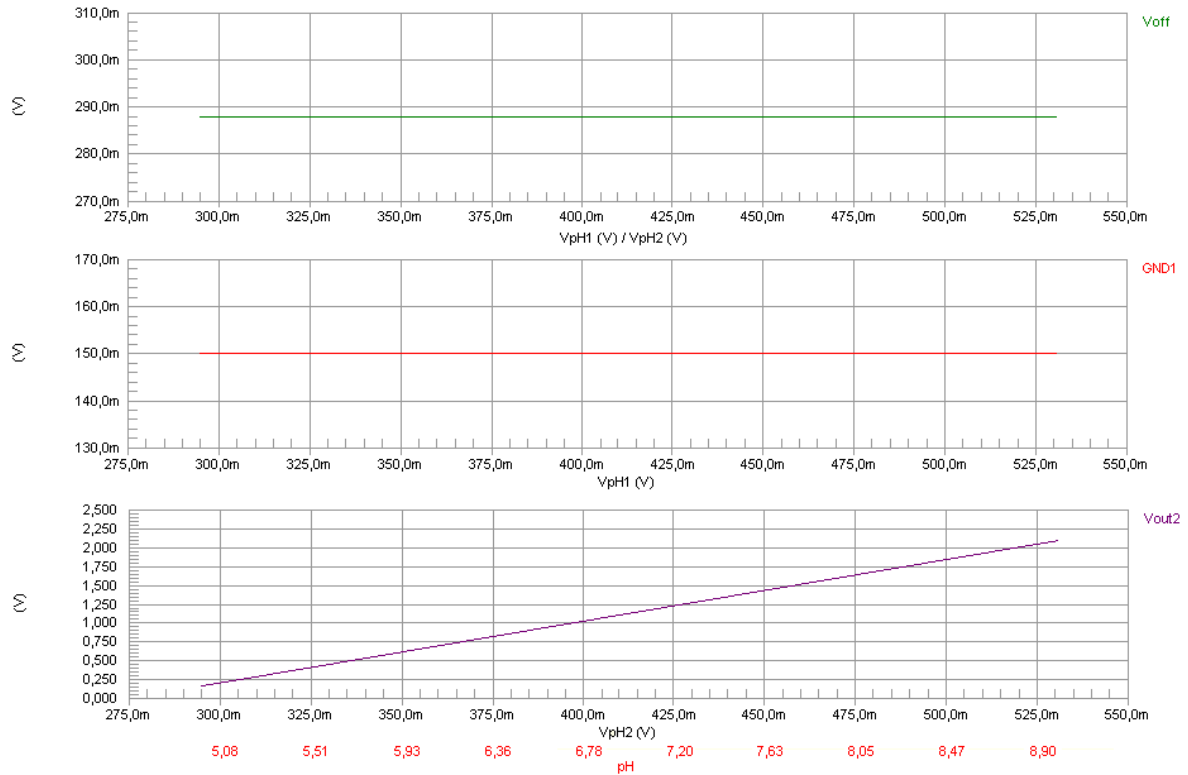


Abb. 3.9.: pH-Schaltung — pH-Sweep

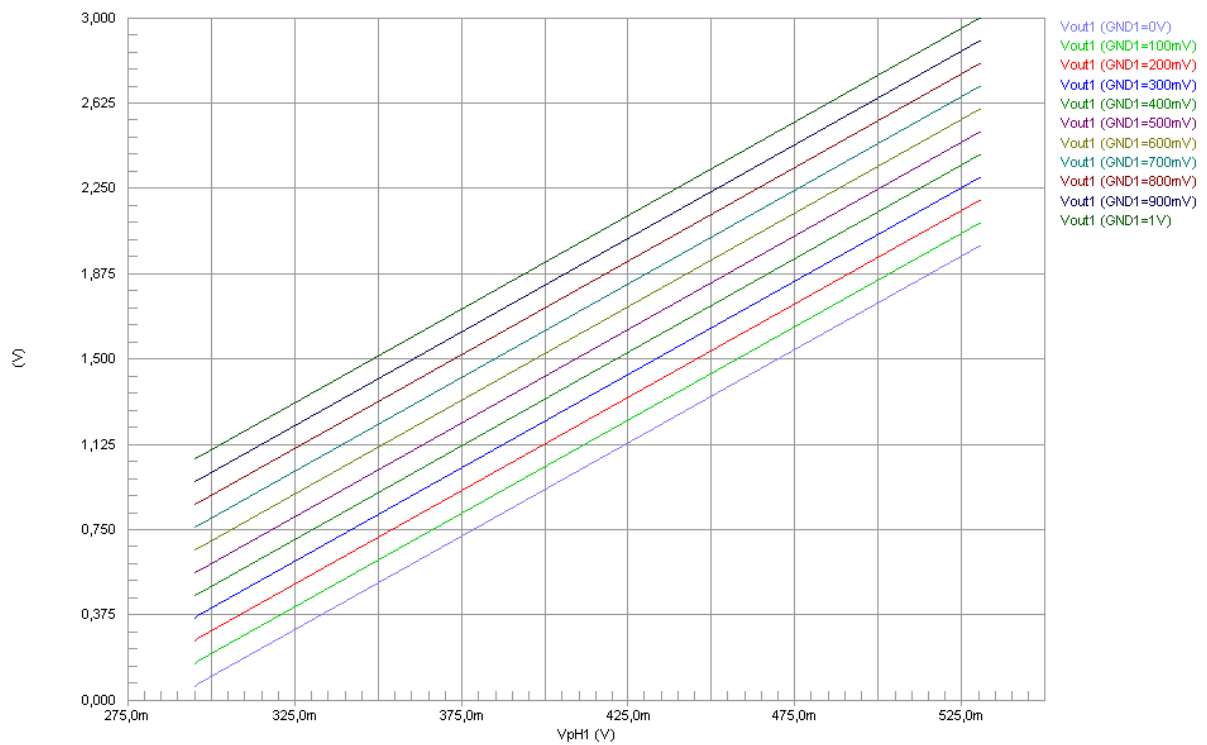


Abb. 3.10.: pH-Schaltung — GND-Shift

3. Hardware des mobilen Biosensors

Der Einfluss einer Betriebsspannungsänderung zwischen 3,2 V und 3,4 V wurde untersucht (für pH 7, typ. Arbeitspunkt). GND1 beträgt 150 mV. Die Abb. 3.11 zeigt, dass die Schaltung stabil arbeitet.

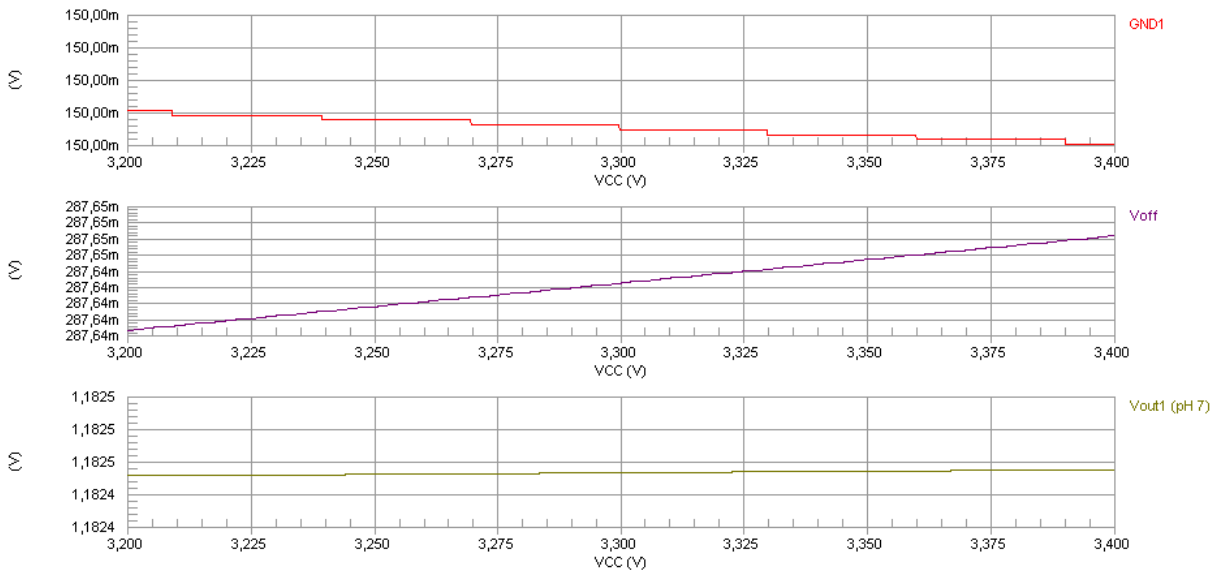


Abb. 3.11.: pH-Schaltung – V_{CC} -Sweep

3.3.3. Messung der Sauerstoffkonzentration

3.3.3.1. Problemstellung und Schaltungskonzept

Der Sauerstoff wird im *BioChip-C* mit einem amperometrischen Clark-Sensor gemessen. Die Anordnung der Arbeitselektrode (WORK), Bezugslektrode (REF) und Hilfelektrode (AUX) auf dem Substrat ist in Abb. 3.12 dargestellt.

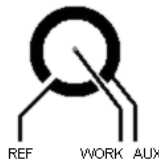
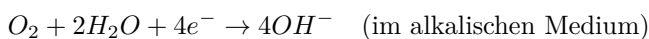
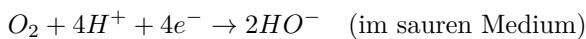


Abb. 3.12.: Clark-Sensor des biohybriden Sensorchips (*BioChip-C*)

Zwischen REF und WORK wird eine Spannung angelegt. Dadurch findet eine Reduktion des Sauerstoffs durch das negativere Potential an WORK statt. Dabei gilt [48]:



Der Strom ist umso größer, je höher die Sauerstoffkonzentration ist (Aufnahme von mehr Elektronen in einem best. Zeitintervall an WORK). Es wurde experimentell ermittelt, dass die größte Empfindlichkeit bei einer Spannung von ca. 600 mV-700 mV erreicht wird.

Eine einfache Modellierung zeigt das in Abb. 3.13 dargestellte Prinzipschaltbild.

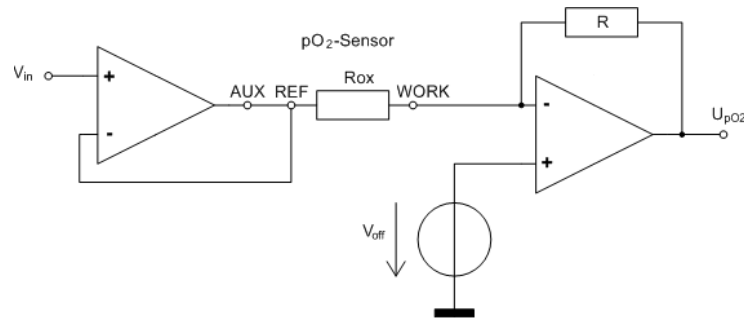


Abb. 3.13.: Schema der Sauerstoffschaltung. R_{ox} stellt den Sensor dar, über den der Strom proportional zum Sauerstoffverbrauch abfließt. An V_{in} wird der Arbeitspunkt eingestellt.

Das Verhalten des Sensors wird adäquat durch einen hochohmigen Widerstand (typ. 100M Ω) zwischen REF und WORK beschrieben, im Bild als R_{ox} gekennzeichnet. Durch V_{in} wird die Spannung an REF über den Spannungsfollower eingestellt. Wie aus dem Schaltplan ersichtlich ist, liegt am Widerstand die Spannung $\Delta V = V_{in} - V_{off}$ (Spannungen an den Operationsverstärker-Eingängen gleich). Da die Spannungen an AUX und REF annähernd gleich sind, wurden die Elektroden im Bild verbunden dargestellt. Der Messstrom fließt über den Widerstand R ab, der mit dem rechten OPV einen invertierenden Verstärker bildet. Somit lässt sich folgender Zusammenhang angeben: $U_{pO_2} = V_{off} - \frac{R}{R_{ox}}(V_{in} - V_{off}) = V_{off} - \frac{R}{R_{ox}}\Delta V$. Alle Größen bis auf R_{ox} sind konstant. Bei Zunahme des Sauerstoffgehalts sinkt R_{ox} , wodurch die Ausgangsspannung ebenfalls sinkt. Durch ΔV und R_{ox} ergeben sich Ströme im nA-Bereich.

Die Abbildung 3.14 zeigt das Prinzip der amperometrischen Messmethode. Hierbei wird zwischen der Arbeits- und der Referenzelektrode ein konstantes Potential U_{IN} eingestellt. Die Zusatz- oder Hilfelektrode dient hierbei als Stromgeber und sorgt dafür, dass sich das konstante Potential über der Referenzelektrode nicht durch den Stromfluss verschiebt. Gelegentlich wird zusätzlich eine so genannte Guard-Elektrode verwendet, die zum einen Störströme im Elektrolyt abdämpfen und zum anderen die Abscheidung von Silberionen auf der Arbeitselektrode verhindern soll (nach [48]).

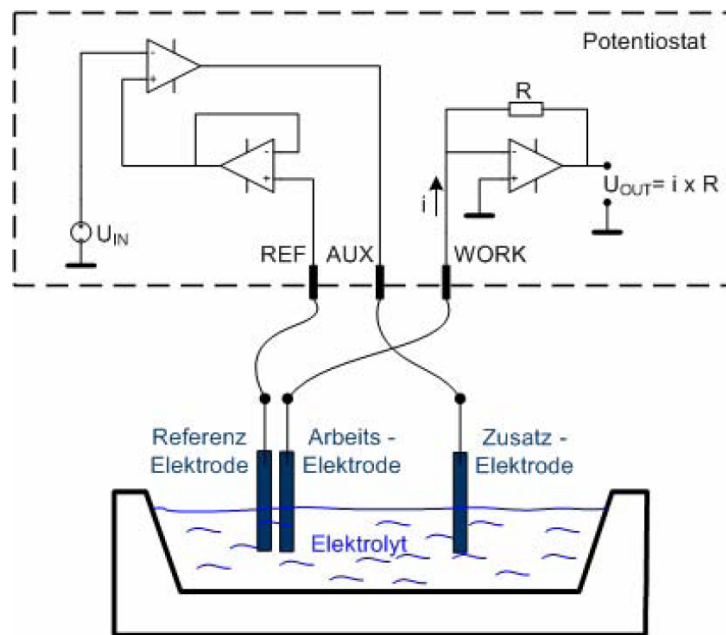


Abb. 3.14.: Schema der Sauerstoffschaltung [48]

3.3.3.2. Schaltungsdimensionierung und Auswahl der Komponenten

Der Schaltplan der Verstärkerschaltung befindet sich im Anhang. Die Funktion kann in zwei Blöcke unterteilt werden: Einem Messverstärker und die Isolation. Der Verstärker besteht aus den OPVs U6A und U6B der Reihe *LMC6035* von *National*. Die wichtigsten Daten zeigt Tab. 3.5 [86].

Tab. 3.5.: Daten des *LMC6035*

Betriebsspannung	2,7V-15V
max. Eingangs-Offsetspannung	5mV
max. Eingangs-Biasstrom	typ. 20fA
max. Stromaufnahme	1,6mA

An Pin 3 von U6A liegt die Spannung V_{in} zur Arbeitspunkteinstellung. Damit liegt auch REF und AUX auf V_{in} . C5 dient zum Abblocken möglicher Spannungsschwankungen zwischen diesen Elektroden. Am nichtinvertierenden Eingang von U6B liegt die konstante Spannung 2,048V, die durch die Referenz *REF3120* (U5) erzeugt wird, einem genauen ($\pm 0,2\%$ Toleranz) und kompakten Bauteil (SOT23-3 Gehäuse) der Firma *Texas Instruments* [87]. Der nachfolgende, einfache Tiefpass, bestehend aus R1 und C10, sorgt für eine möglichst störungsfreie Spannung. Diese Spannung stellt sich auch am negativen Eingang von U6B ein und liegt damit an der WORK-Elektrode des Sensors. Da die Empfindlichkeit bei ca. 600 mV-700 mV ihr Maximum erreicht, wird V_{in} typisch zu 2,7 V eingestellt. Der Messstrom fließt nun durch R2 und erzeugt dort einen Spannungsabfall. Damit ergibt sich für die Spannung am Ausgang von U6B $2,048V - \frac{R2}{R3} \cdot 652mV$.

Den größeren Teil der Schaltung stellt die Isolation dar. Die galvanische Trennung ist notwendig, da die pH-Sensoren und der Sauerstoffsensoren über das Medium im Sensorchip, in dem die Zellen kultiviert werden, leitend miteinander verbunden sind. Die galvanische Trennung wird mit dem sehr kompakten DC/DC-Wandler *NKE0303* von *Murata* erreicht, der mit der Eingangsspannung von 3,3V eine gleich große, galvanisch getrennte Ausgangsspannung erzeugt (V_{CC2} , GND2). Für das Bauteil werden keine zusätzlichen Komponenten benötigt.

Problematisch ist die Stromaufnahme, die hier ca. 40 mA beträgt. Für langen Akkubetrieb im mobilen Biosensor sind jedoch kleinere Ströme wünschenswert. Daher wurde der elektronische Schalter *FSA5157* (U8) vorgesehen, durch den die Sauerstoffschaltung bei Bedarf abgeschaltet werden kann.

Der Block rechts unten im Schaltplan (siehe Anhang) dient dazu, die Sensor-Arbeitspunktspannung V_{op} in die gleich große, galvanisch getrennte Spannung V_{in} umzusetzen. Der identische Block darüber überträgt die Ausgangsspannung von U6B 1:1 in die Spannung V_{out} mit Bezugspotential GND. Die Aufgabe der Isolation übernehmen die Optokoppler *HCNR201* von *Agilent* [88]. Es lässt sich durch die Beschaltung eine stabile und hochlineare Transfercharakteristik erzielen. Den Blöcken liegt das Schema in Abb. 3.15 zugrunde.

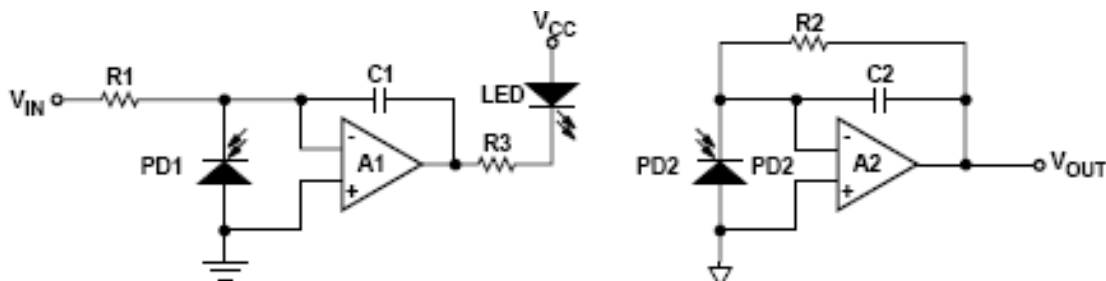


Abb. 3.15.: Schaltplan der Isolation mit dem *HCNR201*. Quelle: [88]

Der Optokoppler besteht aus zwei Photodioden (PD1/2) sowie einer Leuchtdiode (LED). R1 ist hier der 100kΩ-Widerstand (R4 bzw. R8 im Schaltplan), R2 der 91kΩ-Widerstand mit dem 20kΩ-Trimмер (R6/R7

bzw. R10/R11), R3 der 180Ω-Widerstand (R5 bzw. R9) und C1/2 die 100pF-Kondensatoren (C3/C7 bzw. C4/C8). A1 und A2 sind OPV des Typs AD8552. Der Teil links stellt die Regelschaltung dar. A1 stellt die Spannung der beiden Eingänge stets zu 0 V ein. Wird die Eingangsspannung V_{in} erhöht, steigt die Spannung am invertierenden Eingang, wodurch die Ausgangsspannung des OPV zunächst sinkt. Dadurch erhöht sich aber der Strom durch die LED, womit auch die Lichtleistung steigt. Mehr Licht bedeutet einen größeren Sperrstrom durch PD1, wodurch die Spannung am invertierenden Eingang wieder zu 0 V eingestellt wird. Bei einer Verkleinerung von V_{in} sinkt die Lichtleistung und ebenfalls der Sperrstrom, die Spannung zwischen den Eingängen stellt sich wieder zu 0 V ein. Somit werden die Stromkennlinien von PD1 je nach V_{in} auf der I-Achse ($U = 0$) verschoben. Der Strom I_{PD1} ist nur von V_{in} und R1 abhängig: $I_{PD1} = \frac{V_{in}}{R1}$. Genau wie I_{PD1} ist mit dem Regelungsprinzip die Lichtleistung der LED linear und stabilisiert. Das Licht fällt auch auf PD2, wodurch gleiches für I_{PD2} gilt. Das Verhältnis der Ströme $K = \frac{I_{PD2}}{I_{PD1}}$ ist geometrieabhängig und beträgt hier 1 mit einer Toleranz von $\pm 5\%$ (d.h. beide Photodioden bekommen die gleiche Lichtleistung). Mit dem Widerstand R2 wird die Ausgangsspannung $V_{out} = I_{PD2} \cdot R2$ erzeugt. Für das Übertragungsverhalten ergibt sich damit: $\frac{V_{out}}{V_{in}} = K \cdot \frac{R2}{R1}$. Mit $K = 1$ und gleichen Widerständen R1 und R2 erhält man also das gewünschte 1:1-Übertragungsverhältnis.

3.3.3.3. Simulation der Sauerstoffschaltung

Für die Gesamtschaltung wurde eine 10 ms Transientenanalyse für den typ. Arbeitspunkt von $V_{in} = 2,7 V$ simuliert. Die verschiedenen Werte zeigen die Abb. 3.17 und 3.18. Der elektronische Schalter wurde im „ON“-Zustand als 0,4 Ω-Widerstand (s. Datenblatt) modelliert. V_{CC2} ist etwas größer als 3,3 V. V_{ref} und V_{in} stellen sich passend ein, genauso die Spannungen an den Sensor-Elektroden. Für I[R3] ergeben sich aufgrund des 100 MΩ-Sensorwiderstand 6,5 nA, womit die Ausgangsspannung der Messschaltung V_{out_m} am Ausgang von U6B 1,4 V beträgt. Gleiches gilt für die galvanisch getrennte Spannung V_{out} . Alle Ströme verhalten sich wie berechnet.

Zum Testen verschiedener Sensorwiderstände (Parameter Sweep) darf die Schaltung vereinfacht werden: Die Isolationsschaltung kann weggelassen werden und der DC/DC-Wandler ebenfalls (ersetzt durch eine 3,4 V-Spannungsquelle). Mit einer Widerstandsänderung von 50 MΩ bis 200 MΩ in 50 MΩ-Schritten liefert die Messschaltung damit die Werte in Abb. 3.16.

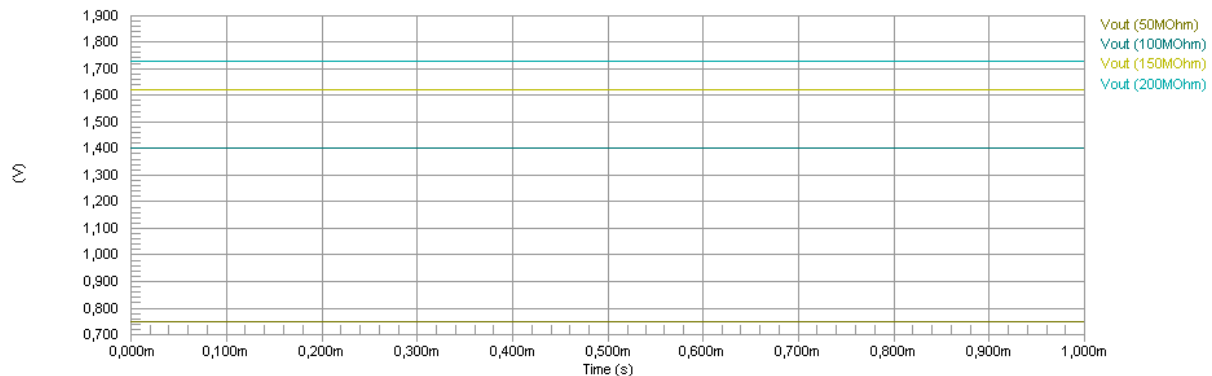


Abb. 3.16.: Sauerstoffschaltung – pO₂ -Sweep

3. Hardware des mobilen Biosensors

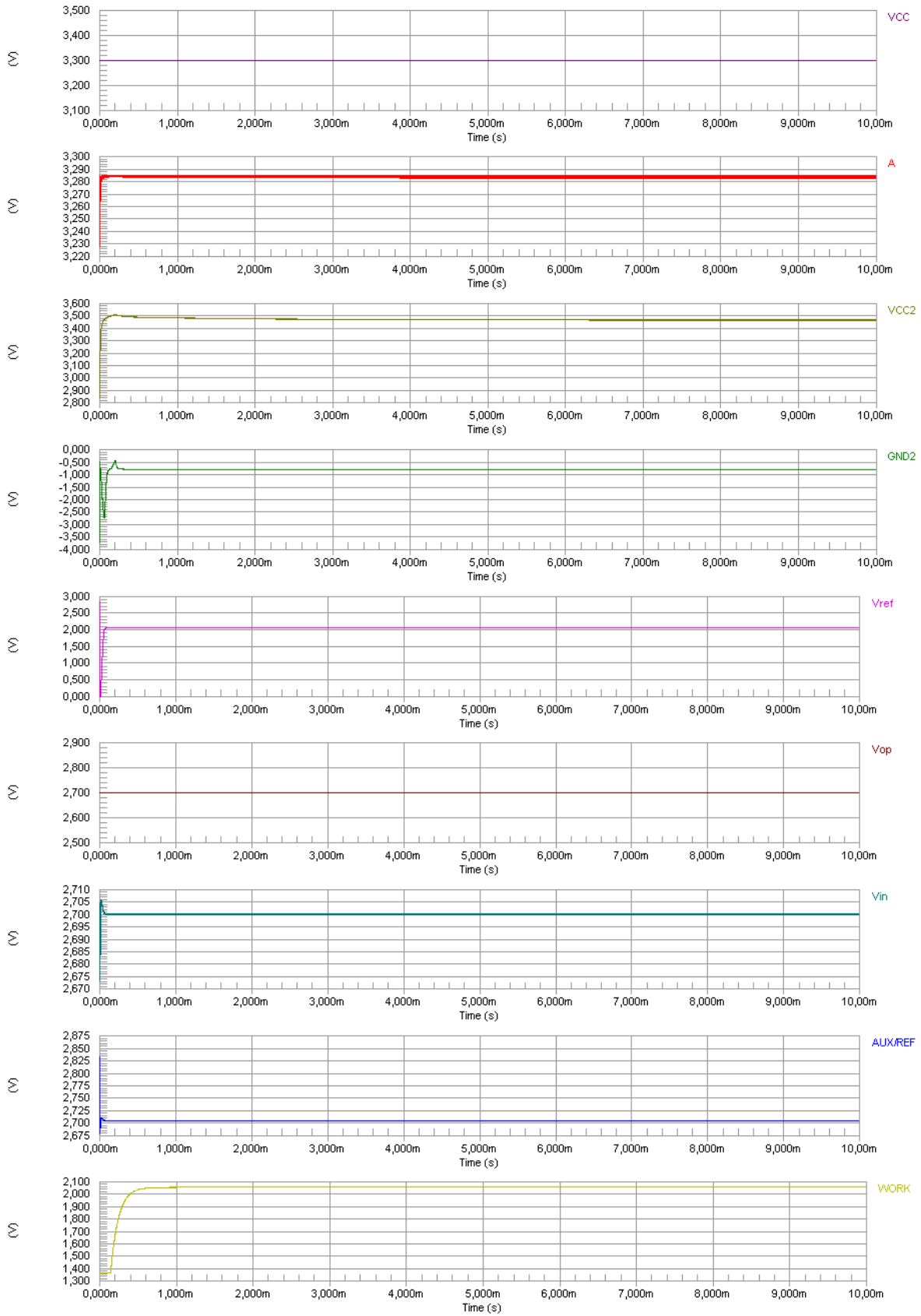


Abb. 3.17.: Sauerstoffschaltung – Einschwingen bei $V_{in} = 2,7V$ (a)

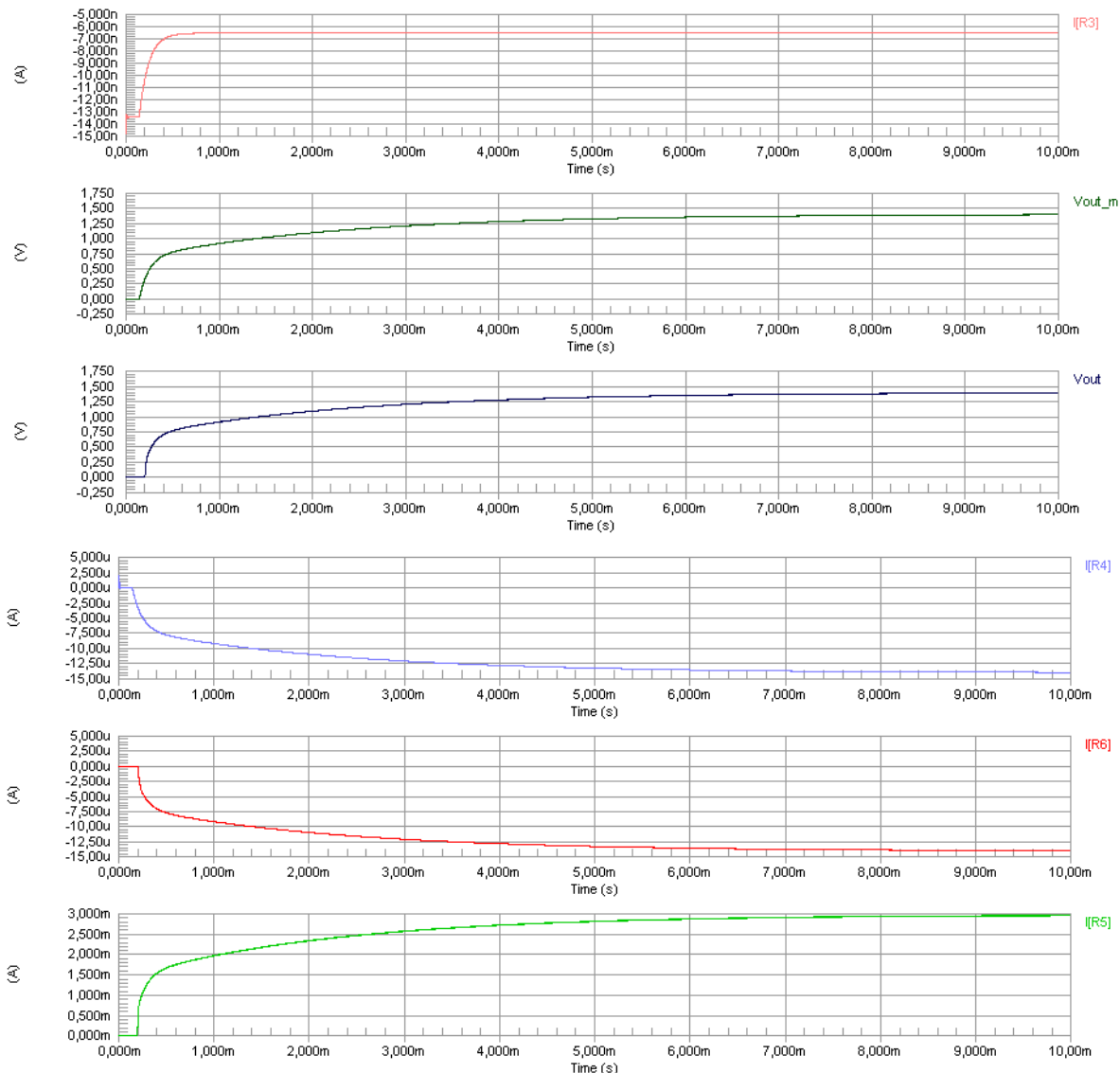


Abb. 3.18.: Sauerstoffschaltung – Einschwingen bei $V_{in} = 2,7V$ (b)

3.4. Gerätemanagement mit einem Mixed-Signal FPGA

3.4.1. Motivation zum Einsatz eines FPGAs

Vor allem die Flexibilität und die Möglichkeit, sehr kleine Abmessungen zu erreichen, begründen die Wahl eines FPGAs [89]. Das Ziel ist, Einsparungen hinsichtlich der Platinengröße und des Leistungsverbrauchs zu erreichen [90], wenngleich FPGAs eine höhere Stromaufnahme haben. Die Flexibilität in diesem Projekt lässt jedoch eine sofortige Optimierung nicht zu, da erst am Ende mit Anbindung des Geräts an eine Datenbank die benötigten Ressourcen abgeschätzt werden können. Beim Design wurde auch besonderes Augenmerk auf die Signalintegrität gelegt [91].

In analogen Schaltungen sind die Ursachen in den verschiedenen physikalischen Rauschquellen zu suchen (thermisches Rauschen, $1/f$ Rauschen, Hintergrundrauschen). Bei digitalen Schaltungen wie dieser werden solche Probleme nicht durch physikalische Ursachen, sondern durch die Funktionsweise der Schaltung selbst hervorgerufen [92]. Dabei spielen neben den geometrischen Abmessungen, die immer kleiner werden

und dadurch kapazitive oder induktive Kopplungen verursachen, auch die niedrigen Schaltschwellen (z.B. bei LVCMOS nur noch 1,8 V), die die Störabstände immer kleiner werden lassen, eine große Rolle.

Darüber hinaus werden durch die immer höheren Taktfrequenzen die Anstiegs- und Abfallzeiten immer kürzer und führen somit zu erhöhten kapazitiven Kopplungen. Diese Kopplungen, bei denen ein Signal auf einer Leiterbahn unerwünschte Effekte auf einer anderen Leiterbahn hervorruft, werden als *Crosstalk* bezeichnet [93]. Die Auswirkungen von solchen kapazitiven und induktiven Kopplungen können mit Hilfe von Simulatoren beim Design berücksichtigt werden. Dadurch können geeignete Gegenmaßnahmen (z.B. durch Impedanzanpassung) getroffen werden. Ein solcher Simulator ist Bestandteil von Altium Designer und wird für diese Arbeit verwendet.

3.4.2. Actel Fusion Mixed-Signal FPGA

Bei der FUSION Baureihe von Actel handelt es sich um sogenannte Mixed-Signal-FPGAs, d.h. diese beinhalten neben den digitalen Logikteilen auch analoge Blöcke wie beispielsweise einen Analog-Digital-Wandler. Der Baustein ist als „System on Chip“ konzipiert, so dass nur noch wenige externe Komponenten nötig und damit ideal für einen miniaturisierten Biosensor sind [94].

Fusion FPGAs enthalten einen konfigurierbaren SAR-A/D-Wandler, der mit bis zu 600 kSample/s bei 12 Bit Auflösung abtastet [95]. Der flexible Analogblock der Fusion-Bausteine ermöglicht mit Hochstrom-Ausgängen die Ansteuerung von MOSFETs und kann mit Eingangs-Analogspannungen von -12 V bis +12 V arbeiten. Dazu steht als Option ein Vorteiler (Prescaler) zur Verfügung, der den direkten Anschluss von Analogsignalen ermöglicht. Somit lassen sich Spannungen, Differenzströme oder Temperaturen messen. Außerdem enthalten die ICs bis zu 1 MByte Embedded-Flash pro Baustein. Die genauen Eigenschaften des verwendeten AFS600 sind in [96] dargestellt.

3.4.3. Beschreibung der Hardware und technische Spezifikation

Die Logikblöcke innerhalb des FPGA wurden mit der Entwicklungssoftware Libero von Actel realisiert. Diese Software ist eine Sammlung von Tools, die für den kompletten Designflow verwendet werden können. Folgende Softwaretools des Pakets wurden bei dieser Arbeit verwendet:

- Actel Project Manager: Verwaltung und Übersicht der einzelnen Bausteine
- Smart Design: Blockorientiertes Design, Konfiguration der analogen Blöcke
- CoreConsole: Erstellung des Prozessorsubsystems, IP-Core Datenbank
- Synplify AE: Synthesetool
- Actel Designer: Compilierung, Place-and-Route, Back-Annotate, Generierung der Programmierdatei
- Smart Power: Analyse des Strom-/Leistungsverbrauchs

Dabei wurde die Integration der analogen Teile wie AD-Wandler, Real-Time-Clock und die Spannungswandlerüberwachung mit Hilfe der SmartGen (Actel Corporation) Software gestaltet, wohingegen das Prozessor Subsystem mit Hilfe des IP-Core Generators CoreConsole [Actel Corporation) verwirklicht wurde. Der komplette Designflow ist in Abb. 3.19 dargestellt [97]. Der FPGA ist zuständig für die Messwertfassung der vier Sensoren und für deren Arbeitspunkteinstellung. Die Messwerte sollen im Flash-Speicher zusammen mit einem Zeitstempel gespeichert werden.

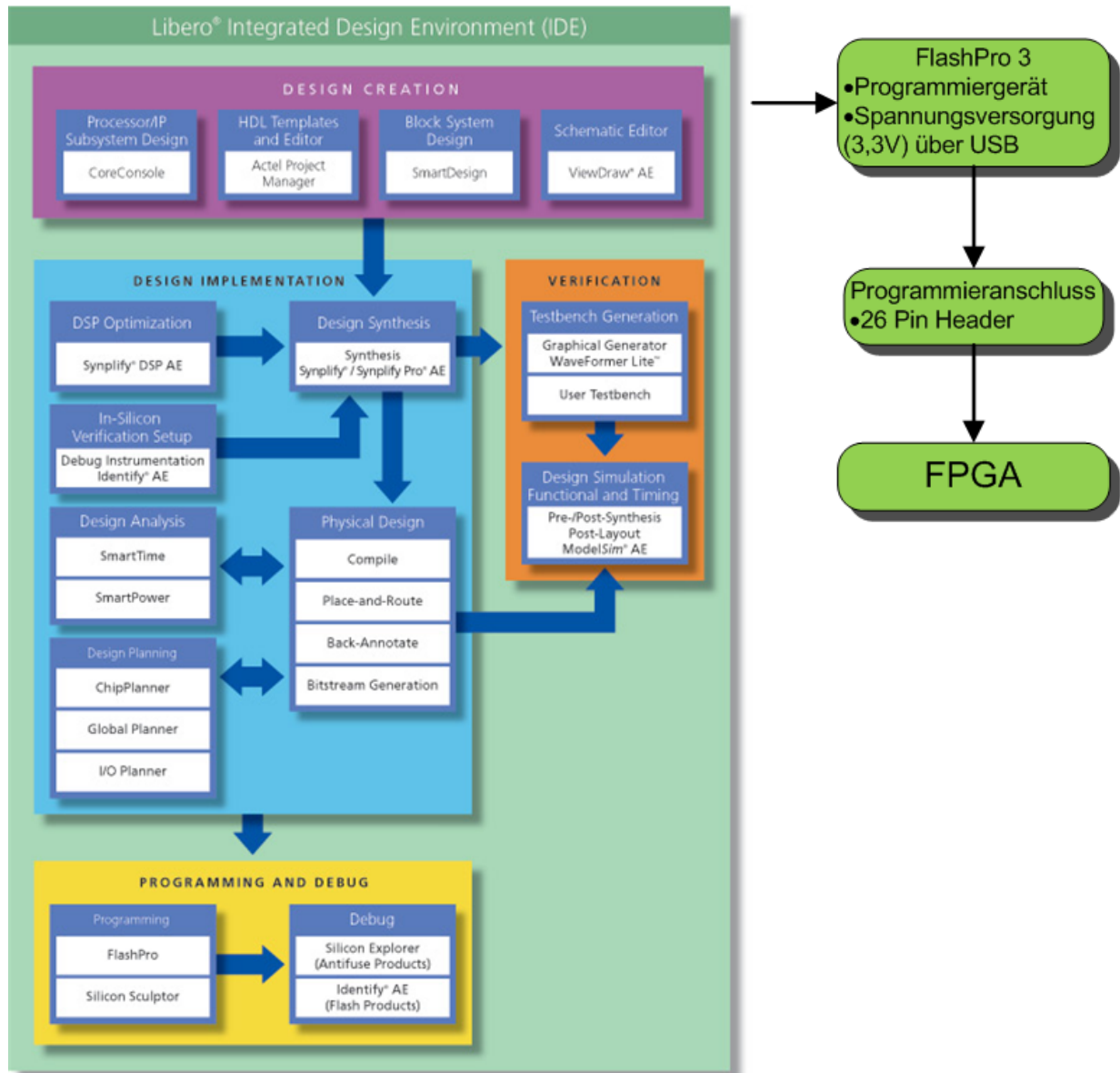


Abb. 3.19.: Actel Libero Design Flow [97]

Für die Realisierung des Analogteils wurden die folgenden Module verwendet:

- Ein **ADC-Modul** übernimmt die Ansteuerung der vier AD-Kanäle, die Überwachung der internen Versorgungsspannung und die Initialisierung des Real-Time-Counters. Der Takt des ADC-Systems wird zu 40 MHz gewählt. Dadurch wird der AD-Wandler mit den maximal möglichen 10 MHz getaktet und die vollen 600 kps stehen zur Verfügung. Jeder Kanal wird mit 105 kps und 12 Bit abgetastet und die Ergebnisse stehen am Ausgang zur Verfügung. Der Real-Time-Counter wird mit 0 initialisiert.
- Ein **Crystal-Modul** steuert die Einbindung des 32,768 kHz Quarzes zur Taktversorgung des Real-Time-Counters.
- **Flash-System-Modul** bindet den Flash-Speicher an die restlichen Systemkomponenten an und enthält außerdem die Konfigurationsdaten, die bei der Initialisierung des FPGAs benötigt werden.
- Ein Voltage-Regulator-Modul aktiviert den internen 1,5 V Spannungsregler zur Versorgung der digitalen FPGA-Komponenten.

- Ein **PLL-Modul** generiert die Taktsignale aus dem internen RC-Oszillator, der mit 100 MHz taktet. Das Gesamtsystem wird mit 10 MHz getaktet. Der eingesetzte Prozessor hat eine Maximalfrequenz von 25 MHz. Unter Berücksichtigung eines stromsparenden Designs stellen 10 MHz einen Kompromiss zwischen Geschwindigkeit und Leistungsverbrauch dar. Eine Ausnahme bildet das ADC-Modul, das wegen der maximalen Samplingrate mit 40 MHz getaktet wird.
- Ein **Ng-Mux-Modul** stellt einen Multiplexer zur Verfügung, der das ADC-Modul von 10 MHz auf 40 MHz Taktfrequenz umschaltet. Diese Umschaltung ist nötig, da die Initialisierung mit maximal 10 MHz zulässig ist. Nach der Initialisierung wird auf 40 MHz umgeschaltet.

Der verwendete FPGA *Actel FUSION AFS600FG256* besitzt 13824 Flip Flops, 10 analoge Quads, 512 kB Flashspeicher, einen RTC-Counter, einen integrierten 1,5 V Spannungswandler, 40 analoge und bis zu 172 digitale I/Os [96]. Das FGA256 Gehäuse ist platzsparend, da es seine Anschlüsse (wie bei BGA) über die Unterseite des Chips verteilt hat. Die Größe beträgt 17 mm x 17 mm. Die 1,5 V Versorgung wird durch Beschaltung der externen Spannungsregleranschlüsse mit einem Transistor vom Typ BDL31 im SOT223-Gehäuse sichergestellt.

Die Kondensatoren C12 bis C37 haben die Aufgabe, die Spannungsversorgung, sowohl die 3,3 V Schiene als auch die 1,5 V Schiene, frei von Störungen zu halten [98]. Dabei wurden Gehäuse im Format 0402 für die Keramikkondensatoren und 1206 für die Elektrolytkondensatoren verwendet. Diese Kondensatoren nehmen insgesamt eine sehr große Fläche ein, sind aber unverzichtbar für die korrekte Funktion des FPGA.

Für den Betrieb des RTC-Counters ist der Quarz Y1 mit 32,768 kHz nötig, der durch die Kondensatoren C3 und C4 stabilisiert wird. Die Spannungsreferenz vom Typ MAX6133 besitzt einen Drift von nur 5ppm/°C und wird im μ MAX-Gehäuse mit einer Fläche von 3 mm x 5 mm angeboten.

Der verwendete DA-Wandler AD5664 von Analog Devices besitzt vier Ausgänge, die mit 16 Bit gewandelt werden. Er benötigt 0,44 mA im Normalbetrieb und 0,2 μ A im Power-Down-Modus bei 3,3 V Betriebsspannung. Das ChipScale QFN Gehäuse hat die Abmessungen 3 mm x 3 mm. Der Wandler wird über die SPI-Schnittstelle mit dem FPGA verbunden.

Die Operationsverstärker U2 bis U5 vom Typ MAX4252 werden als Spannungsfolger beschaltet, um die analogen I/Os nicht zu belasten. Dabei werden auch passive RC-Filter benutzt, um das Rauschen zu minimieren. Der OpAmp wird im 10 Pin UCSP-Gehäuse mit den Abmessungen 2 mm x 1,5 mm verwendet. Seine Eigenschaften umfassen sehr geringes Eigenrauschen, sehr geringen Offset und Rail to Rail Fähigkeit [99].

3.4.4. Leistungsanalyse

Smart Power [97] berechnet die Leistungsaufnahme des gesamten FPGA, aufgeschlüsselt nach einzelnen Modulen und nach einzelnen Versorgungsspannungsschienen (vgl. Abb. 3.20). Dafür werden die Angaben der Frequenz und des Aktivitätsfaktors α in die Berechnung miteinbezogen. Da das Gesamtsystem für die Batterielaufzeit entscheidend ist und nicht die Ergebnisse der Leistungsanalyse des FPGAs, werden in Kapitel 3.8.2 die einzelnen Verbraucher genauer aufgeschlüsselt.

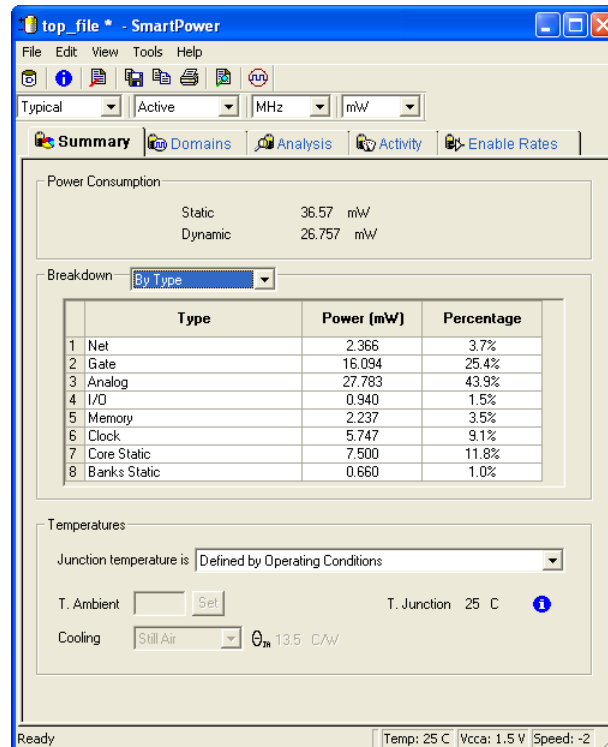


Abb. 3.20.: Berechnung des Leistungsbedarfs des FPGAs mit Smart Power.

3.4.5. Signalintegritätsanalyse und deren Einschränkungen

Messwertrauschen und Potentialverschleppungen sollen in dieser Arbeit durch eine Signalintegritätsprüfung vermieden werden. Mit dieser Analyse soll ebenfalls bewertet werden, in wie weit sich benachbarte Signale aufgrund von kapazitiven oder induktiven Kopplungen gegenseitig beeinflussen. Diese Störungen zeigen sich durch Über- oder Unterschwingungen bei Signaländerungen und können die beabsichtigte Funktionsweise erheblich stören. Messwertrauschen ist ein Ergebnis solcher Überschwinger, die z.B. genau dann auftreten, wenn ein Messwert gewandelt wird.

Um die Ergebnisse richtig zu interpretieren, gilt es, einige Einschränkungen des Simulators zu beachten: Für diese Art von Analyse werden die Bauteile nur durch ihre Input/Output Eigenschaften definiert. Für größere ICs, vorrangig Mikrocontroller und FPGAs, werden von den Herstellern sogenannte IBIS³ Modelle zur Verfügung gestellt. IBIS-Modelle beschreiben (im Gegensatz zu SPICE-Modellen) nicht die Funktionalität des Bauelements, sondern lediglich das Verhalten der Ein- und Ausgänge (Schaltverhalten, Induktivität, Kapazität, Strom- und Spannungsverhalten) [93]. Auf diese Weise können Elektronikhersteller Modelle ihrer Bauteile liefern, ohne Details zum internen Aufbau des Bauelements preiszugeben. Außerdem sind IBIS-Modelle (insbesondere bei komplexen Bauelementen wie Prozessoren) deutlich effizienter als SPICE-Modelle. Bei kleineren ICs und Transistoren wird vom Simulator aufgrund der gewählten Technologie (z.B. TTL, LVTTTL, CMOS, usw.) ein Standardmodell, das deren Schaltverhalten beschreibt, gewählt. Widerstände, Kondensatoren und Induktivitäten werden als passive Komponenten behandelt und können dazu führen, dass ein Signal nicht analysiert werden kann, da der Simulator eine Treiberstufe (also einen IC Ausgang) benötigt. Signale, die mit Steckverbindungen verbunden sind, können generell nicht in die Analyse mit eingebunden werden.

³IBIS: Input Output Buffer Information Specification

3.4.6. Crosstalk Analyse

Eine Crosstalk-Analyse kann mithilfe von Softwaretools EMV-Probleme und Signalübersprechen durch z.B. ungünstig verlegte Leiterbahnen aufdecken. Diese Funktion ist im Entwicklungstool von Altium Designer enthalten. Das Layout der Digitalschaltung wurde entsprechend überprüft (vgl. Abb. 3.21):

Net	Status	Falling Edge Overshoot	Falling Edge Undershoot	Rising Edge Overshoot	Rising Edge Undershoot
SDA	Failed	2,248	1,358	2,451	1,518
ALPS_TX	Failed	1,536	1,287	2,047	1,651
MAX3222_OUT	Failed	1,313	1,015	1,823	1,394
SCL	Failed	2,365	1,172	2,574	1,205
ALPS_HUM	Failed	1,447	1,181	1,884	1,555
VREF	Failed	377,7m	448,6m	582,7m	597,5m
ALPS_RX	Failed	1,237	971,7m	1,769	1,383
ALPS_ON	Failed	1,180	925,0m	1,725	1,260
DOUT_A	Failed	1,122	867,6m	1,676	1,297
DIN_B	Failed	374,7m	272,7m	953,4m	720,0m
IDES_ENABLE	Failed	2,489	1,982	2,594	2,052
MAX3222_IN	Failed	1,175	919,9m	1,721	1,346
CS_B	Failed	974,2m	777,9m	1,535	1,207
CS_A	Failed	1,673	1,360	2,101	1,695
DIN_A	Failed	1,161	907,4m	1,709	1,335
DCLK	Failed	1,227	981,1m	1,633	1,433
CH7	Failed	333,0m	262,5m	938,7m	668,3m
C2+	Failed	772,0m	565,9m	1,378	1,000
SIG321	Failed	772,0m	565,9m	1,378	1,000
CH6	Failed	1,044	797,3m	1,606	1,232
CH0	Failed	347,7m	274,5m	957,3m	687,8m
CH4	Failed	425,6m	338,3m	1,048	795,2m
CH1	Failed	723,3m	579,9m	1,302	1,034

Net	Status	Falling Edge Overshoot	Falling Edge Undershoot	Rising Edge Overshoot	Rising Edge Undershoot
NetC9_1	Passed	16,71m	9,047m	13,07m	7,990m
NetC9_2	Passed	16,71m	9,047m	13,07m	7,990m
NetC4_1	Passed	72,18m	60,38m	123,6m	89,99m
NetR4_2	Passed	13,45m	0,000	26,50m	488,6u
NetC40_2	Passed	13,45m	0,000	26,50m	488,6u
NetR2_2	Passed	27,02m	0,000	47,11m	199,5u
NetC38_2	Passed	27,02m	0,000	47,11m	199,5u
NetR3_2	Passed	21,16m	0,000	38,80m	0,000
NetC39_2	Passed	21,16m	0,000	38,80m	0,000
NetC2_5	Passed	23,67m	23,70m	38,97m	45,83m
NetC2_4	Passed	35,80m	66,37m	59,42m	47,12m
NetC2_6	Passed	19,73m	26,29m	42,86m	38,47m
NetC2_8	Passed	30,14m	23,73m	34,47m	36,50m
NetC2_7	Passed	26,60m	25,21m	36,59m	36,63m
NetC2_2	Passed	20,80m	26,20m	33,65m	35,59m
VREF	Passed	4,424m	0,000	5,779m	0,000
NetC3_1	Passed	98,99m	73,34m	164,8m	93,33m
NetC41_2	Passed	17,85m	0,000	33,23m	0,000
NetC2_1	Passed	16,97m	24,32m	30,69m	38,96m
NetR5_2	Passed	17,85m	0,000	33,23m	0,000

(a) Signalübersprechen außerhalb der Toleranz

(b) Optimierte Signalnetze

Abb. 3.21.: Screenshot der Entwicklungsumgebung nach erfolgter Crosstalk-Analyse

Ein grünes Netz bedeutet, dass die auftretenden Signalschwankungen innerhalb der Toleranz liegen und somit kein Problem darstellen. Orange Netze konnten aufgrund eines Fehlers (meist eine Steckverbindung, oder ein Netz ohne Treiber) nicht simuliert werden. Rote Netze besitzen Werte außerhalb der Toleranzschwellen und sind somit für eine genauere Untersuchung interessant. Die angesprochenen Toleranzwerte beziehen sich auf Spannungsschwellen.

Für jeden einzelnen Pin der simulierten Netze steht ein eigenes Diagramm zur Verfügung, da sich die Signalform abhängig von der Länge des Netzes verändert.

3.4.7. Signalqualität der DACs

Die Ausgänge der DACs wurden mit einem digitalen Speicheroszilloskop der Reihe *TPS2000* Firma *Tektronix, Inc.* näher betrachtet. Dieses Gerät ist in der Lage, ein Eingangssignal sowohl im Zeit- als auch im Frequenzbereich darzustellen. Abbildung 3.22 zeigt diese beiden Verläufe.

Es ist ersichtlich, dass hochfrequentes Rauschen keinen nennenswerten Anteil an der Signalleistung hat. Dadurch bedingte Schwankungen an den Arbeitspunkten der pH- und Sauerstoffsensoren sollten also keine Einflüsse auf die Messergebnisse haben. Das Rauschen der verstärkten Sensorausgänge selbst liegt um ein Vielfaches darüber (vgl. Abb. 3.24 in Kap. 3.6.2).

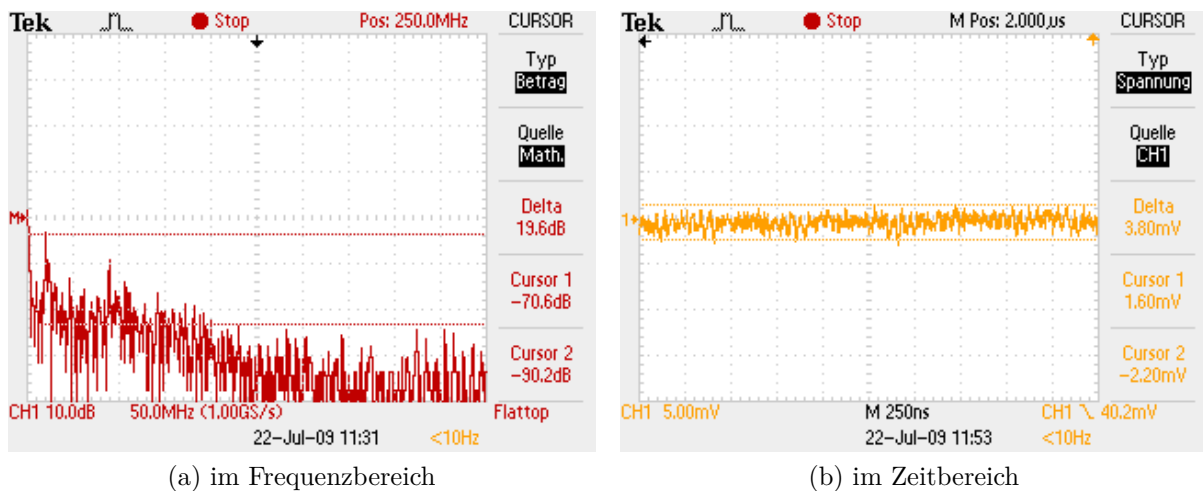


Abb. 3.22.: Ausgangssignal eines DAC der Digitalplatine

3.5. Spannungsversorgung bzw. aktive Backplane

Dieses Modul stellt zum einen die geforderten Spannungen für die einzelnen Module bereit, zum anderen übernimmt es das Management der Energieverteilung (Ladeschaltung des Akkus über Netzteil oder USB) [100]. Um Platz zu sparen, wurde die gesamte Spannungsversorgung für alle Module in die Backplane integriert. Diese sogenannte *aktive Backplane* (Abb. 3.23) stellt über einen proprietären, jedoch standardisierten Modulanschluss sämtliche Spannungen bereit, die die jeweiligen Module benötigen [101]. Zusätzlich ist sie zentraler Punkt für die Verteilung der Messspannungen, Definition der Arbeitspunkte und Ansteuerung verschiedener Platinen über einen Bus. Die Tabelle 3.6 zeigt, dass sämtliche Steuerungs- und Bussignale sowie alle Messsignale jeder Platine zur Verfügung stehen. Durch strikte Aufteilung und lokale Trennung der Signale wird eine mögliche elektrische Interferenz vermieden. Zudem kann durch individuelle Stapelung der Platinen (je nach Bauhöhe) maximale Packungsdichte der Elektronik erreicht werden.

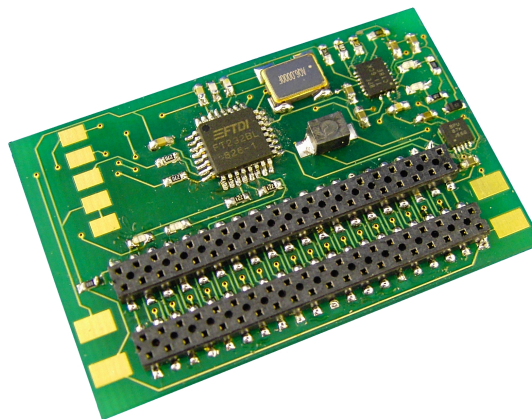


Abb. 3.23.: Aktive Backplane für Signalrouting und Spannungsversorgung sowie Datenschnittstelle der Modulplatinen.

Es wurde eine intelligente Ladeschaltung auf der aktiven Backplane integriert, um den integrierten Akku aufladen zu können [102]. Sie ermöglicht es dem Benutzer, über ein externes Netzteil oder über den USB Datenanschluss zu laden [103],[104]. Es wurde der Lade-IC Typ BQ24032A von Texas Instruments (TI)

eingesetzt [105]. Mit dem USB-Anschluss des Gerätes können auch Diagnose- und Statusinformationen vom Bediener über einen angeschlossenen Rechner abgerufen werden [106]: Dieser Anschluss stellt den Datenanschluss für den FPGA bereit. Da dieser über die Anschlüsse an Pin 5 und Pin 6 (vgl. Tab. 3.6) eine serielle UART-Schnittstelle zur Verfügung stellt, wurde diese über einen Seriell-zu-USB-Wandler (IC FTDI, FT232BL) in den USB-Ladeanschluss integriert. Für den mobilen Betrieb wird ein LiIon-Akku verwendet, der das System über mindestens 12 Stunden im Dauerbetrieb versorgt.

Tab. 3.6.: *Pinbelegung der aktiven Backplane*

Pin	Funktion	Pin	Funktion	Pin	Funktion	Pin	Funktion
1	DGND	11	DVCC3,3V	21	DAC-A3	31	ADC1
2	DGND	12	Vbatt-GSM	22	DAC-A4	32	ADC2
3	W-GP1	13	DVCC-IDES	23	DAC-A5	33	ADC3
4	W-GP2	14	IDES-GP	24	DAC-A6	34	ADC4
5	W-Rx	15	IDES-Rx	25	DAC-A7	35	ADC5
6	W-Tx	16	IDES-Tx	26	DAC-A8	36	ADC6
7	n/c	17	I ² C-SDA	27	DAC-B1	37	ADC7
8	CHG-GSM	18	I ² C-SCL	28	DAC-B2	38	ADC8
9	W-RST	19	DAC-A1	29	DAC-B3	39	AGND
10	W-Enable	20	DAC-A2	30	DAC-B4	40	AGND

Der Schaltplan und das Layout der Platine ist dem Anhang zu entnehmen. Die 3,3 V Versorgungsspannung erzeugt ein Buck-Boost Regler von TI (TPS63003), der laut Datenblatt [107] fast störungsfrei ein Eingangsspannungsspektrum von +5,5 V bis zu +1,2 V abfangen kann und stabil einen Ausgangsstrom von bis zu 600 mA liefert. Das ist wichtig, da das Gerät sowohl per USB als auch mit Akkus betrieben werden kann. Im letzteren Fall kann die Spannung auch unter 3,3 V abfallen. Somit führt dies nicht zum Ausfall des Geräts.

Um eine möglichst platzsparende Energieversorgung zu realisieren und dennoch den Anforderungen bzgl. Stromverbrauch gerecht zu werden, wurden verschiedene Akkutypen untersucht. Dabei wird eine Zellenspannung von 3,6 V bzw. 3,7 V benötigt. Messungen ergaben, dass die Elektronik 500 mW im Vollastbetrieb aufnimmt. Wenn man eine Betriebszeit von 12 Stunden pro Versuch veranschlagt, sollte das Akkupack eine Leistung von 6 Wh abgeben können. Die Tabelle 3.7 zeigt einen Überblick über kommerziell erhältliche Akkutypen sowie deren Energiedichte und weitere Entscheidungskriterien. Ein LiIon-Akku scheint am sinnvollsten, da Energiedichte und Entwicklungsstand am besten sind ([103]).

Für die Versuche wurden 3 NiMH-Akkus verwendet, da sich diese durch eine relativ hohe Energiedichte und moderate Zykluskosten auszeichnen. Sie garantieren zudem eine Laufzeit von ca. 8 Stunden (gemessen).

Im Rahmen des Projekts wurden jedoch noch weitere mögliche Energieversorgungskonzepte geprüft, da diese eine weitere Miniaturisierung möglich machen könnten. Der Vollständigkeit halber sei auf die „Bakterien Batterie“, die „Micro Brennstoffzelle“ [108] und den „Ultra Capacitor“ und andere Batterietypen [109] verwiesen, die jedoch noch nicht kommerziell verfügbar sind und hier nicht diskutiert werden sollen. Ebenfalls kommt Energy Harvesting nicht in Frage, da die Stromaufnahme des Geräts bei weitem höher ist, als diese Form der Energiegewinnung liefern kann [110].

Tab. 3.7.: Vergleich verschiedener Akkutypen mit Leistungsdichte

	Nickel-Kadmium	Nickel-Metall-Hydrid	Blei Säure	Lithium-Ion	Lithium-Ion-Polymer	Wieder-verwendbare Alkaline
Gravimetrische Energiedichte (Wh/kg)	45 - 80	60 - 120	30 - 50	110 - 160	100 - 130	80 (initial)
Volumetrische Energiedichte (Wh/l)	35 - 100	170 - 200	ca. 50	200 - 300	230 - 410	n. a.
Innenwiderstand [mOhm]	100 - 200	200 - 300	< 100	150 - 250	200 - 300	200 - 2000
Anzahl Zyklen (80% Nennkapazität)	1500	300 - 500	300 - 500	300 - 500	300 - 500	50 (für 50% Kapazität)
Schnellladezeit [h]	1	2 - 4	8 - 16	2 - 4	2 - 4	2 - 3
Überladetoleranz	mäßig	schwach	hoch	sehr schwach	schwach	mäßig
Selbstentladung/Monat (Raumtemperatur, [%])	20	30	5	10	10	0,3
Zellspannung nominal [V]	1,25	1,25	2	3,6	3,6	1,5
Wartungsbedarf [d]	30 - 60	60 - 90	90 - 180	kein Bedarf	kein Bedarf	kein Bedarf
Typische Batteriekosten [USD]	50	60	25	100	100	5
Kosten pro Zyklus [USD]	0,04	0,12	0,10	0,14	0,29	0,10 - 0,50
Kommerziell verwendet seit	1950	1990	1970	1991	1999	1992

3.6. Datenschnittstelle über Funk

Bei der Entwicklung eines mobilen Biosensors konnte man sich auf bereits bestehende Netzwerke wie Bluetooth [111], Zigbee [112] oder GSM [113] mitsamt seiner Infrastruktur bedienen, zumal der Systembetrieb von etablierten Technologien ausreichende Sicherheitsstandards bei der Datenübertragung bietet. Zudem stellt die drahtlose Datenübertragung den neuesten Trend in der Biosensorik und Medizin dar [114], [115].

Die Datenübertragung per Bluetooth wurde gewählt, da zum einen ein stationärer Betrieb des Gerätes an einem PC möglich ist. Zum anderen reicht ein handelsübliches Mobiltelefon aus, um Daten zu sammeln und an einen zentralen Server weiter zu senden [116], für den Fall, dass sich bei einem kommerziellen Einsatz der Kunde für die Nutzung des eigenen Mobiltelefons entscheidet [117]. Falls der autarke Einsatz vor Ort „im Feld“ stattfinden soll, erlaubt ein eingebautes GSM-Modul eine flächendeckende Datenanbindung. Im Gerät wird ein GSM Modul Typ GM862-GPS der Fa. Telit Communications S.p.A., Italien, verwendet.

Bluetooth verfügt über eine eingebaute Sicherheit, die es dem Gerät erlaubt, sich effektiv im Netzwerk zu verbergen und dennoch für Kommunikation zur Verfügung zu stehen [118]. Damit dies funktioniert, muss die MAC-Adresse des Geräts bekannt sein, mit dem man sich verbinden will. Im Gerät wird ein Bluetooth Modul Typ UGPZ2-607A der Fa. ALPS ELECTRIC CO., LTD, Japan, verwendet.

Bei GSM gewährleistet das Übertragungsprotokoll und ein Schlüssel in der SIM-Karte über einen Algorithmus die Übertragungssicherheit der Daten [118], [119].

Auf die Sicherheitsdiskussion wird im Weiteren nicht eingegangen, da es nicht die Intention dieser Arbeit war, eine möglichst sichere Datenübertragung zu etablieren, sondern einen mobilen Biosensor zu entwickeln und zu testen.

3.6.1. Schaltungsdesign der Funkmodule

Das Funkmodul wurde als Erweiterungsplatine realisiert, das eigenständig den Kommunikationskanal öffnet, schließt und die Daten durchreicht. Dadurch ist keine Modifikation der Firmware im FPGA als steuerndes Element nötig. Lediglich wird der Digitalplatine über einen Steuerpin am Backplaneanschluss angezeigt, welches Modul verbaut ist, um das Timing des Datentransfers entsprechend anzupassen. Für

das Funkmodul ist demnach ein eigener Controller verbaut, der den Datenkanal bei erfolgter Verbindung zu einem Bluetooth-Master oder zu einem ISP⁴ über GSM transparent schaltet. Die Konfiguration wird per Firmware im jeweiligen Controller gehalten. Die Schaltpläne befinden sich im Anhang, Abschnitt A.1.

3.6.2. Einfluss des Funkmoduls auf die Messqualität

Es wurden Messungen jeweils mit und ohne Abschirmung der analogen Verstärkerschaltung als auch mit und ohne Bluetooth Funkmodul durchgeführt. Exemplarisch wurde der Einfluss beider Faktoren auf das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) bei dem Temperatursensor untersucht. Für diese Untersuchung wurde der Dummychip einem BioChip-C vorgezogen, da so ein Einfluss der Sensoreffekte ausgeschlossen werden konnte.

Da der Dummychip eine konstante Temperatur simuliert, ist auch der Erwartungswert eine Konstante. Um Störeinflüsse zu ermitteln, wurde der Mittelwert μ des Signals als Sollwert interpretiert und die Standardabweichung σ als die Summe aller Störungen. Der Störabstand errechnet sich daraus wie folgt: $SNR = \mu/\sigma$. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind in Abbildung 3.24 dargestellt (nach [120]).

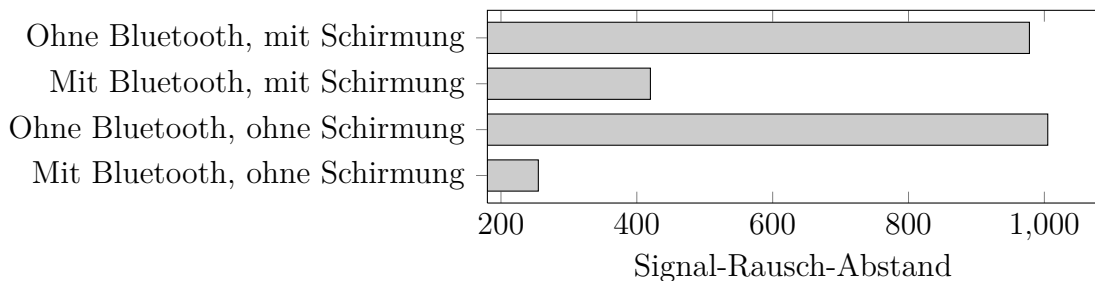


Abb. 3.24.: *Signal-Rausch-Abstand der Temperaturmessung mit Dummychips unter verschiedenen Voraussetzungen.*

Demnach beeinflusst der Einsatz des Bluetoothmoduls die Signalqualität erheblich. Wird ein Funkmodul eingesetzt, so sollte die analoge Verstärkerschaltung in jedem Fall abgeschirmt werden. Auch wenn das Signal immer noch fast 300 mal stärker als die Störeinflüsse ist, können sensible Messungen dadurch gestört werden. Wird lediglich die serielle Schnittstelle (USB) zur Datenübertragung verwendet, kann auf eine Abschirmung verzichtet werden.

3.7. ASIC als Alternative zur diskret aufgebauten Elektronik

Marktforscher prognostizieren, dass den FPGAs in den kommenden vier Jahren eine enorme Wachstumswelle bevorsteht [121]. Demnach werden FPGAs die ASICs in einigen Bereichen (z. B. Kommunikation, Medizintechnik) verdrängen, während sie in anderen Segmenten als Ergänzung zu SoC⁵ dienen werden. Nach Angaben des Marktforschungsunternehmens *The Linley Group* dürfte der FPGA-Markt von 2,55 Mrd. US-Dollar im Jahr 2009 auf nahezu 3,5 Mrd. US-Dollar im Jahr 2013 expandieren. Er wird damit die Zuwachsraten für den IC-Markt insgesamt noch übertreffen [122].

Die Entwickler setzen bei niedrigen Stückzahlen auf FPGAs, insbesondere weil diese Komponenten kosteneffektiver sind und der Designzyklus deutlich kürzer ist. Daher wurde auch in dieser Arbeit ein FPGA Design umgesetzt. Dennoch sollte die Möglichkeit der Realisierung der Mixed-Signal-

⁴Internet Service Provider

⁵System on Chip

Schaltungskomponenten mit einem ASIC im Folgenden kurz diskutiert werden.

Im Zuge dieser Arbeit wurde eine Designstudie in Zusammenarbeit mit der *Leibniz Universität Hannover — Institut für Mikroelektronische Systeme* durchgeführt. Dessen Ergebnisse sollen an dieser Stelle erläutert werden, wobei nur auf den biohybriden Sensorchip auf Keramikbasis (BioChip-C) eingegangen wird. Aufgrund der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von tragbaren Lab-on-Chip Systemen wird in naher Zukunft ein stark wachsender Bedarf solcher Geräte erwartet. Deshalb liegt der Gedanke nahe, alle für die Ansteuerung und Auswertung der Sensorchips benötigten Funktionen in einen ASIC zu integrieren. Bei hohen Stückzahlen ermöglicht dies die Herstellung günstigerer Messgeräte. Zusätzlich werden die Geräte kompakter, leichter und lassen sich dadurch flexibler einsetzen.

3.7.1. Struktur des ASIC Gesamtsystems

Eine integrierte Mixed-Signal Schaltung soll die Schnittstelle zwischen einem digital verarbeitenden Computer oder Mobiltelefon und dem analogen Sensorchip sein. Die einzustellenden Sensorarbeitspunkte sollen digital über eine UART-Schnittstelle an den ASIC übermittelt werden. Der ASIC setzt diese Vorgaben dann mit Hilfe von Digital-Analog-Wandlern und analogen Schaltungen in die entsprechenden Ströme und Spannungen um. In umgekehrter Richtung werden die Sensormesswerte vom ASIC digitalisiert und über den UART gesendet. Um permanenten Datenverkehr über die UART-Schnittstelle zu vermeiden, wird ein Speicher vorgesehen, der die Messdaten für ein bis zwei Minuten zwischenspeichert. Das Senden der gespeicherten Messwerte erfolgt erst nach einer Anforderung über die UART.

3.7.2. Aufbau des ASIC

Der Schaltkreis ist funktional in zwei Teile gegliedert: Einen Digitalteil, der den Ablauf der Messungen steuert, die Messdaten speichert und die digitalen Werte der Sensorarbeitspunkte enthält sowie einen Mixed-Signal-Teil, der die Arbeitspunkte der Sensoren einstellt und die eigentlichen Messungen an den Sensoren vornimmt. Einige der Sensoren müssen potentialgetrennt betrieben werden, da sie sich ansonsten gegenseitig beeinflussen würden. Dies erfordert, dass für jeden dieser Sensoren jeweils eine potentialgetrennte Versorgungsspannung bereitgestellt werden muss. Da der Einsatz von mehreren potentialunabhängigen Spannungen in einem Standard CMOS-Prozess nicht möglich ist, wird der Schaltkreis als Multi-Chip-Modul [123] gefertigt. Der amperometrische Sauerstoffsensoren sowie die beiden Metalloxidsensoren als auch die beiden Impedanzmessstrukturen müssen voneinander potentialfrei sein. Für jeden Sensor ist ein separates Modul notwendig. Ein Modul (Hauptmodul) enthält den Digitalteil und die Schaltungen für alle Sensoren, die keine Potentialtrennung benötigen. Die Messschaltungen der übrigen Sensoren benötigen jeweils ein separates Modul.

3.7.3. Digitalteil des ASIC

Der Digitalteil des ASICs ist in mehrere Teilschaltungen gemäß Abbildung 3.25 aufgeteilt. Das Kernstück des Digitalteils ist die Interfaceschaltung. Sie enthält die UART Schnittstelle und ist somit das Bindeglied zu einem Computer. Weiterhin dekodiert die Interfaceschaltung die über den UART eingehenden Befehle.

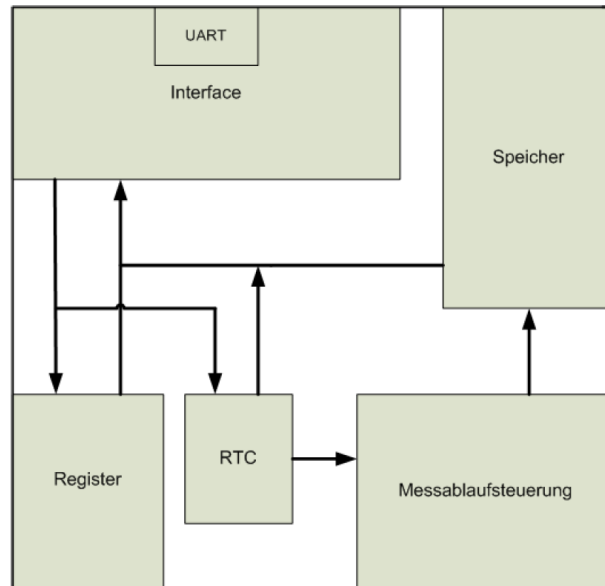


Abb. 3.25.: Schema des ASIC Digitalteils. Die Schnittstelle zum Analogteil ist die Messablaufsteuerung, die digitale Kommunikation erfolgt über das Interfacemodul.

Der Schaltungsblock Interface beinhaltet die UART-Schnittstelle und Logik zur Dekodierung und Auswertung der eingehenden ASCII-Strings. Weiterhin werden die zu sendenden Daten aus dem Speicher vor dem Senden in ASCII-Zeichen umgewandelt. Auf die Definition und Syntax sowie die Erklärung von Steuerbefehlen wird hier gänzlich verzichtet, da dies Teil der nicht erfolgten praktischen Umsetzung ist und per Software beliebig gestaltet werden kann. Letztlich ist beim Design nur die Größe der einzelnen Register zu beachten.

3.7.4. Analogteil (Mixed-Signal-Teil) des ASIC

Der Mixed-Signal-Teil stellt die Arbeitspunkte der Sensoren ein und nimmt die eigentlichen Messungen an den Sensoren vor. Der **Pt1000** des biohybriden Sensorchips wird in Vierleiterschaltung betrieben. Der Konstantstrom wird über einen externen Widerstand durch eine Bandgapspannung erzeugt, so dass Außentemperatur und Versorgungsspannungsschwankungen keinen Einfluss auf den Messwert haben. Die Schaltung selbst besteht aus Instrumenten- und Subtrahierverstärker und kann dem Anhang entnommen werden.

Zur Messung der Impedanz wird am **IDES** eine Wechselspannung angelegt und jeweils am Nulldurchgang sowie am positiven und negativen Scheitelwert der Strom gemessen. Dadurch erhält man vier Strom-Spannungspaare, mit deren Hilfe sich die Impedanz berechnen lässt. Die für die Messung notwendige Sinusspannung wird mit Hilfe eines DDS-Generators erzeugt. Dies ist eine Mixed-Signal-Schaltung, die es ermöglicht, periodische Spannungen mit digital einstellbarer Frequenz zu erzeugen. Für den implementierten DDS-Generator ist kein eigener VCO notwendig. Das Funktionsprinzip ist in Abb. 3.26 dargestellt: Ein Phasenakkumulator addiert den Inhalt $\Delta\varphi$ des IDES-Frequenzregisters aus dem Digitalteil zum Inhalt des Phasenregisters. Die Addition erfolgt zu jeder steigenden Flanke des Systemtakts. Durch den Überlauf des Phasenregisters entsteht ein sägezahnförmiges Signal $\varphi(k)$, das als Eingangssignal einer Sinus-LUT dient. Die LUT (Look Up Table) enthält die digitalen Sinuswerte, die den Werten des Phasensignals $\varphi(k)$ entsprechen. Der nachgeschaltete Analog-Digital-Wandler erzeugt ein stufiges Sinussignal, das durch einen Tiefpassfilter geglättet wird.

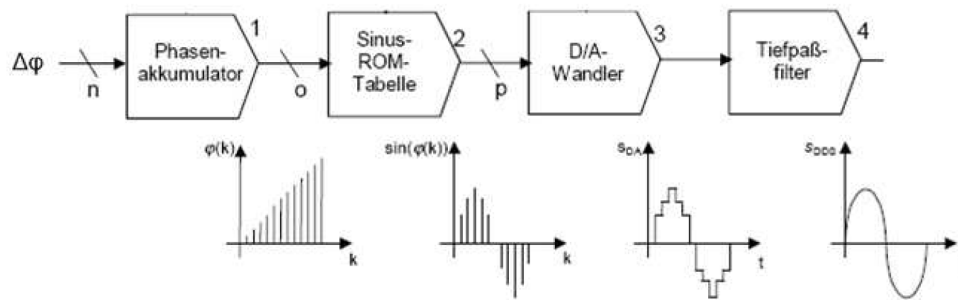


Abb. 3.26.: Schema der Frequenzspannungserzeugung der ASIC Impedanzmessung. Ein Direct Digital Synthesizer (DDS) erzeugt das Sinussignal.

Die Bestimmung des positiven und negativen Scheitelwerts der Sinusspannung wird in zwei Schritten durch Zähler realisiert. Zu Beginn einer Messung wird bei einem Nulldurchgang der Sinusspannung von negativ nach positiv ein erster Zähler gestartet. Dieser Zähler läuft so lange, bis der gleiche Nulldurchgang erneut festgestellt wird, also eine Periode vergangen ist. Zeitgleich mit dem Stoppen des ersten Zählers wird ein zweiter Zähler gestartet. Wenn ein Viertel des Zählwerts vom ersten Zähler erreicht ist, wird ein Flag gesetzt, um anzuzeigen, dass der positive Scheitelpunkt des Sinus aufgetreten ist. Beim nächsten Nulldurchgang wird der zweite Zähler erneut gestartet, um den negativen Scheitelpunkt zu indizieren.

Da auf dem Sensorchip zwei IDES-Strukturen vorhanden sind, wird durch ein Select Signal über einen Analog-Multiplexer ausgewählt, an welchem Sensor gemessen wird. Nach dem Multiplexer wird die Sinusspannung durch einen Spannungsfolger entkoppelt. Dies ist notwendig, da der On-Widerstand der Analog-Multiplexer so groß ist, dass dieser das Messergebnis ohne die Entkopplung verfälschen würde. Die Messung der Sensorströme erfolgt über die Operationsverstärker OP3 und OP4, die mit Hilfe der externen Widerstände als Strom-Spannungswandler geschaltet sind. Die Abb. 3.27 zeigt den Schaltungsaufbau.

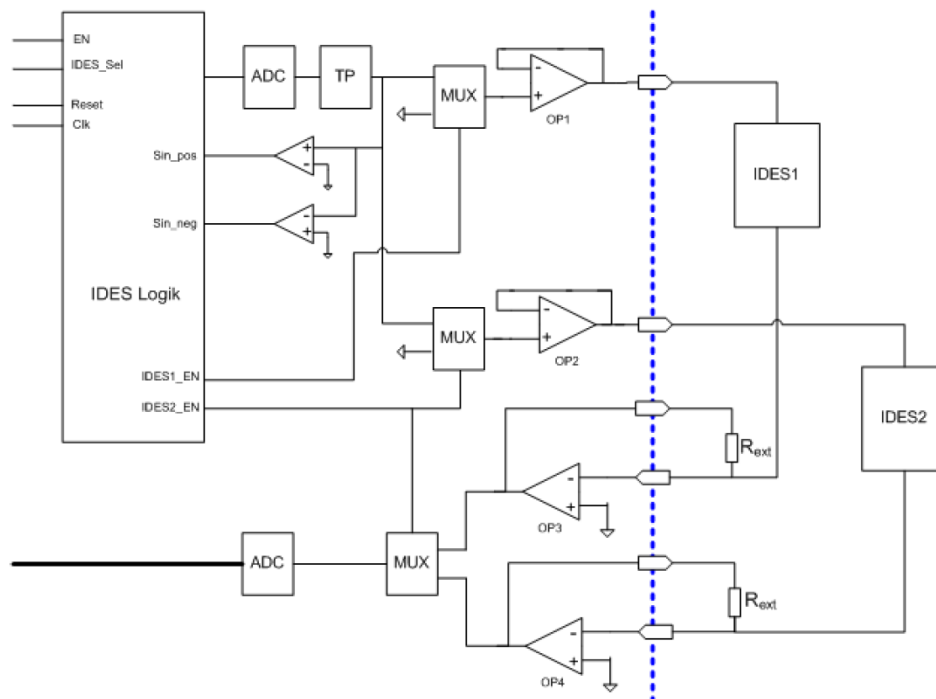


Abb. 3.27.: Schema der Impedanzmessung im ASIC. Die Mixed-Signal IDES Logik erzeugt die Sinusspannung, während Analogmultiplexer beide Sensoren ansteuern.

Die Messschaltung für die **pH-Sensoren** (Metalloxydsensoren) besteht aus einem Instrumentenverstärker, der sich aus Operationsverstärker (OP3) und den zwei Spannungsfolgern (OP1 und OP2) zusammensetzt. Die Spannungsfolger dienen hierbei als Impedanzwandler, um einen ausreichend hohen Eingangswiderstand zu erreichen. Die Schaltung in Abb. 3.28 entspricht im Wesentlichen der mit diskret aufgebauten Bauelementen in Kapitel 3.3.

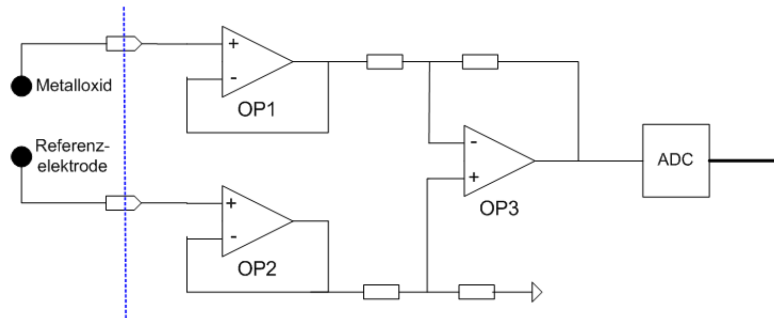


Abb. 3.28.: Schema der pH-Messschaltung im ASIC.

3.7.5. Kapazitive Kopplung der Sensormessschaltung und des Digitalteils im ASIC

Der ASIC muss als Multi-Chip-Modul erstellt werden, da einige Sensoren potentialfrei betrieben werden. Es ist jedoch nicht ausreichend, potentialfreie Versorgungsspannungen für die Sensoren bereitzustellen, da auch die Arbeitspunktwerte vom Hauptmodul auf die Sensormodule und die Messwerte von den Sensormodulen auf das Hauptmodul übertragen werden. Prinzipiell gibt es dazu zwei Ansätze: Die Übertragung von analogen oder von digitalen Signalen. Aufgrund der Tatsache, dass die Arbeitspunktdaten digital vorliegen und die Messwerte digitalisiert werden sollen, ist es nicht sinnvoll, die Signale analog zu übertragen, da damit unnötige Fehlerquellen eingebaut würden. Eine Lösung mit externen Komponenten zur potentialgetrennten Datenübertragung, wie beispielsweise Optokopplern oder Trennverstärkern, ist aufgrund der hohen Anzahl von zusätzlich notwendigen Pins am Gehäuse nicht sinnvoll.

Die Wahl fiel daher auf eine kapazitive Kopplung, wie sie in Abb. 3.29 dargestellt ist: Das zu übertragende Signal wird über den Kondensator C übertragen. Diese Kapazität wird auf dem Chip als Teil einer Padzelle realisiert. Weiterhin werden die beiden Massen über den Kondensator C_{gnd} verbunden. Die Kopplung der Massen erfolgt extern. Bei den Elementen $C1$ und $C2$ handelt es sich um parasitäre Elemente wie die Kapazität der Padzellen und die Ein- und Ausgangskapazitäten der Treiberstufen. Für die Dimensionierung des Kondensators C muss folgende Bedingung eingehalten werden: $C \gg C2$. Ansonsten ist die sich über $C2$ einstellende Spannung bei Übertragung eines High-Pegels nicht ausreichend, um die nachfolgende Treiberstufe zu schalten. Die externe Kapazität C_{gnd} sollte so groß wie möglich gewählt werden, über $10\mu\text{F}$.

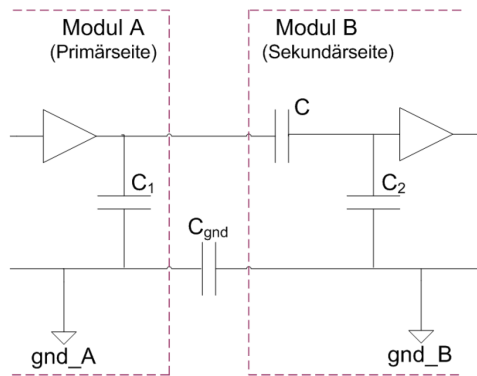


Abb. 3.29.: Schema der kapazitiven potentialgetrennten Kopplung von Signalen im ASIC.

Um eine bidirektionale Datenübertragung zwischen den Modulen zu ermöglichen, ist ein System gemäss Abb. 3.30 implementiert. Die Daten werden synchron über zwei Schieberegister übertragen, die zusammen ein Ringschieberegister bilden. Zwischen den Schieberegistern befindet sich die kapazitive Kopplung. Auf beiden Seiten befinden sich ausser den Schieberegistern noch jeweils eine FSM (Finite State Machine), die das Senden und Empfangen der Daten steuert sowie auch die Schieberegister beschreibt. Die sekundäre Seite besitzt noch vier Register, in die die übermittelten Daten gespeichert werden können sowie einen Multiplexer, über den die Daten, die an die primäre Seite gesendet werden sollen, ausgewählt werden.

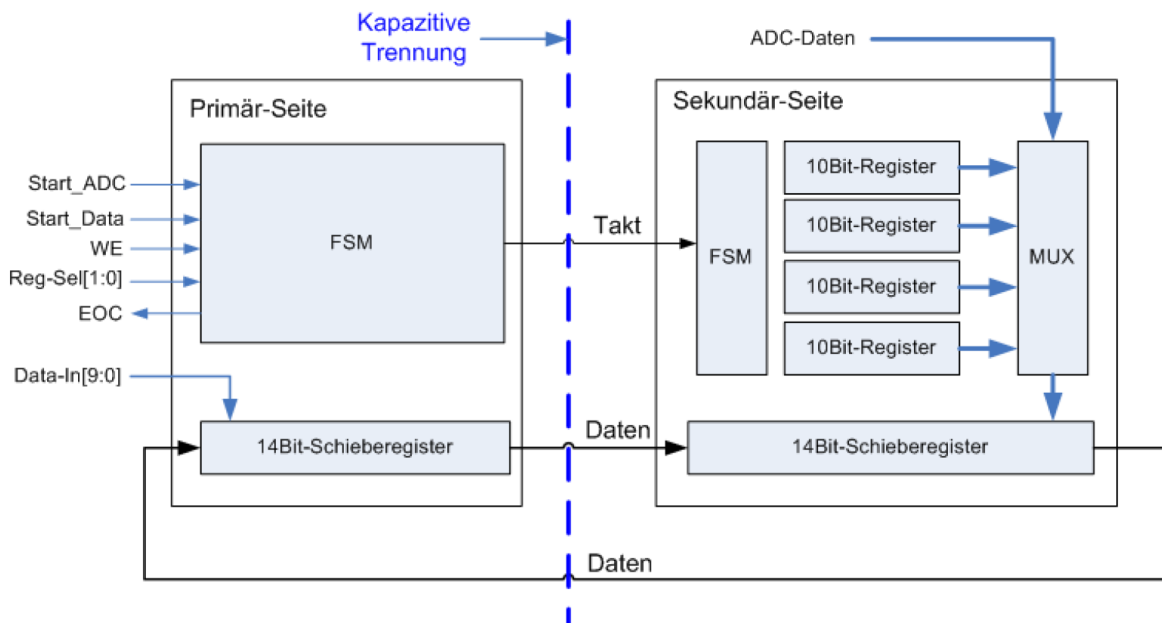


Abb. 3.30.: Schema der kapazitiven Kopplung des Datentransfers von Registerinhalten im ASIC.

Zusätzlich zu den Daten wird noch der Systemtakt übertragen, mit dem beide Schieberegister arbeiten. Der übertragene Takt wird weiterhin als Systemtakt für die Logik auf der entkoppelten Seite eingesetzt. Anderenfalls müsste für jedes Modul ein eigener Takt generiert werden. Allerdings wird der Takt nur solange übertragen, wie auch Daten übertragen werden. Damit wirkt er für die sekundäre Seite zusätzlich als Startsignal für die Datenübertragung, die nur von der primären Seite gestartet werden kann. Die sekundäre Seite hat nicht die Möglichkeit, eine Übertragung zu starten oder das Starten einer Datenübertragung anzufordern.

Die potentialgetrennten Sensormodule haben den in Abb. 3.31 dargestellten Aufbau. Die Verbindung zum Hauptmodul über die kapazitive Kopplung und die oben erläuterten FSM zum Empfangen und Senden von Daten sind für alle Module gleich. Nur die für jeden Sensor individuelle Messschaltung und die Anzahl der Pins zum Anschluss des Sensors muss für jedes Modul separat erstellt werden.

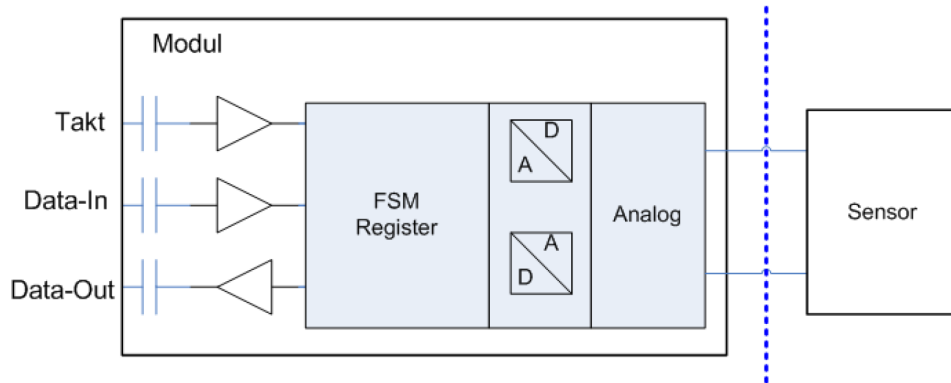


Abb. 3.31.: Schema der kapazitiven Ankopplung von Sensormodulen im ASIC.

3.8. Übersicht der Betriebsparameter und technische Daten

Die einzelnen Hardwaremodule des Biosensors wurden in den vorhergehenden Kapiteln erläutert. Abschließend soll die Abb. 3.32 zeigen, wie die Signalführung der jeweiligen Platinen ausgeführt ist. Dies ist den Schaltplänen nicht auf den ersten Blick zu entnehmen.

3.8.1. Funktionsübersicht

Die nachfolgende Auflistung gibt einen Überblick über die technischen Leistungsmerkmale, die durch das Hard- und Softwaredesign des handheld Biosensors erreicht werden konnten:

- Batteriebetriebenes Handheld Gerät
- Bedienelement mit graphischem LC-Display
- PLCC68-Sockel zur Aufnahme des Biochips
- Messung von pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck und Temperatur
- Messung des Zellimpedanzspektrums in Lösung mit zwei Sensoren
- Aufnahme frei konfigurierbarer, zyklusgebundener Impedanzspektren
- Garantiert konstante Abtastrate von bis zu fünf Messungen pro Sekunde
- Bei variabler Abtastrate über zehn Messungen pro Sekunde
- Messfrequenz und Dauer der Messzyklen frei einstellbar
- Integriertes Life-Support-System zur Versorgung lebender Zellen
- Pumpzeitraum und -durchsatz pro Zyklus frei einstellbar
- Sensoren einzeln deaktivierbar, um Speicherplatz und Stromverbrauch zu senken
- Aufzeichnung von Synchronisationsmarken (Pumpzeitpunkte, Zykluszahlen) zur Vereinfachung der Datenanalyse

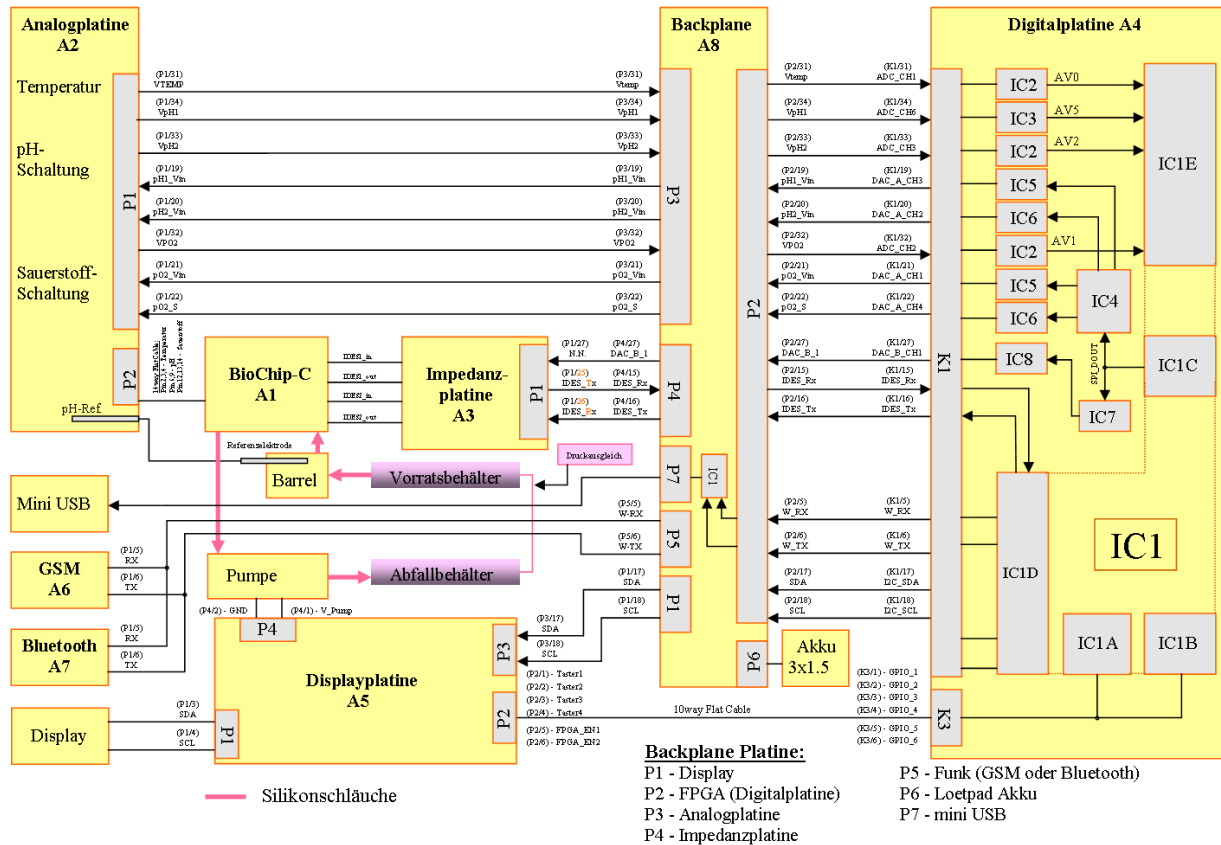


Abb. 3.32.: Übersicht über die Vernetzung der verwendeten Hardwaremodule

- Datenübertragung per USB, Bluetooth oder GSM
- Modular erweiterbar
- Komfortable Bediensoftware mit Kalibrierfunktion und Datenauswertung

3.8.2. Stromverbrauch

Der Stromverbrauch der einzelnen Komponenten wurde während der Messungen mit einem Dummychip ermittelt. Die Elektronik des Biosensors wurde außerhalb des Gehäuses betrieben, um die einzelnen Komponenten in die Backplane stecken zu können. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 aufgelistet.

3.8.3. Gewicht

Das Gesamtgewicht des handheld Biosensors variiert je nach Ausstattung und Energieversorgung. Im Batteriebetrieb wiegt er ca. 460 g. Eine Auflistung der Einzelposten zeigt Tabelle 3.9.

Tab. 3.8.: *Stromverbrauch der einzelnen Komponenten*

Komponente		Stromverbrauch in mA
Backplane		7.2
FPGA-Modul		42.2
Display		1.9
Analogmodul	ohne O ₂	6.0
	mit O ₂	68.0
Impedanzmodul	aus	59.0
	messend	79.0
Bluetoothmodul	aus	2.2
	an, passiv	10.0
	an, sendend	40.0
Pumpe	schnell	40.0
	langsam	23.0
Gesamt	maximal	278.3
	minimal	57.3

Tab. 3.9.: *Gewicht der einzelnen Komponenten*

Komponente		Gewicht in g
Elektronik		72
Gehäuse	incl. Pumpe	303
Akkus	3 Stück á 25 g	75
Medium	10 ml bei 1 g/ml	10
Gesamt	Einsatzgewicht	460

4. Software

4.1. Überblick der Softwarekomponenten

Mehrere Komponenten des Systems sind mit Mikrocontroller ausgestattet, welche individuell programmiert werden. Darüber hinaus wird eine PC-Anwendung benötigt, wodurch das Handheldgerät angesteuert werden kann und eine Auswertung der Daten ermöglicht wird. Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über die verschiedenen Softwarekomponenten sowie deren Kommunikation untereinander. Diese Kommunikationspfade sind in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt.

In der zentralen Steuereinheit befindet sich ein FPGA, welcher neben der Messwertaufnahme und -speicherung auch für die Kommunikation der Daten und die Ansteuerung des Bedienelements zuständig ist. Die Firmware dieser Komponente ist in Abschnitt 4.2.2ff ausführlich beschrieben.

Über einen UART¹ wird das Impedanzmodul konfiguriert und ausgelesen. Generelle Details zum Kommunikationsprotokoll finden sich im Anhang A.11. Das Steuerprogramm selbst ist in Abschnitt 4.3 erklärt.

Die Verbindung zur PC-Applikation, siehe Kap. 4.5, erfolgt entweder direkt via USB, oder drahtlos mittels eines Kommunikationsmoduls. Dieses kommuniziert über einen UART mit der Zentraleinheit und ist, nach erfolgreichem Verbindungsaufbau, für die Datenübertragung zum PC transparent. Das verwendete Protokoll ist in Abschnitt A.11.1 beschrieben. Informationen zur Firmware der Kommunikationsmodule finden sich in Abschnitt 4.4.

4.2. Embedded Software im FPGA

4.2.1. Realzeitbetriebssystem

Die Abarbeitung mehrerer voneinander unabhängigen Aufgaben zur selben Zeit erfordert ein Realzeitbetriebssystem auf der Firmware des FPGA: Die Messwertaufnahme muss in exakt definierten Intervallen erfolgen, um die spätere Analyse der Daten zu vereinfachen. Nebenläufige Aufgaben, wie die Erfassung

¹Universal Asynchronous Receiver Transmitter

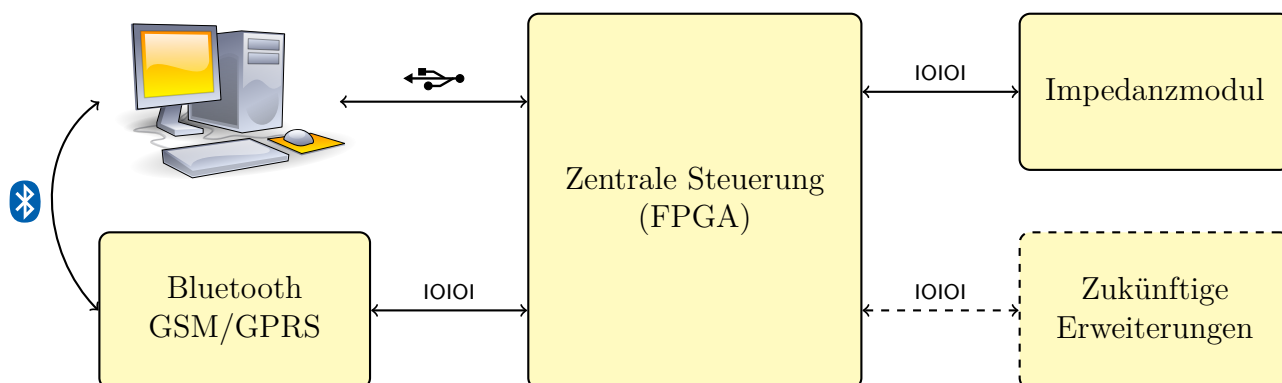


Abb. 4.1.: Software-Kommunikationspfade im handheld Biosensor.

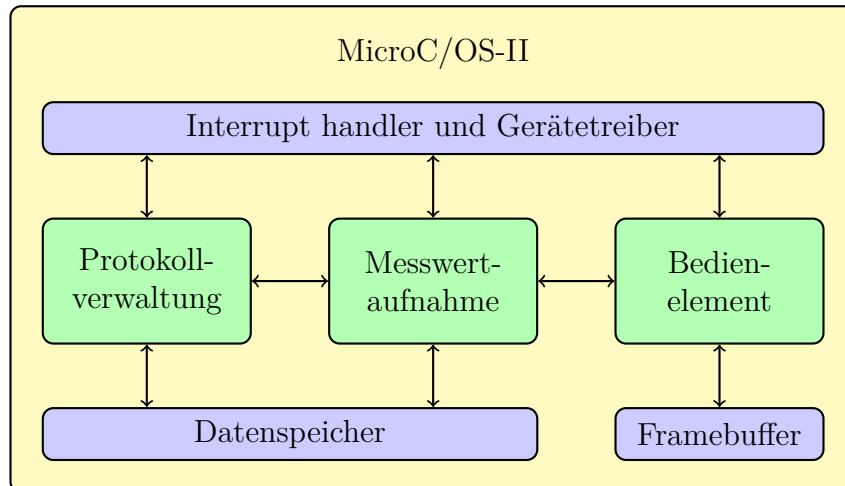


Abb. 4.2.: Architektur der zentralen Steuersoftware des handheld Biosensors

des Datenstroms der Impedanzplatine, setzte die Implementierung eines Algorithmus voraus, welcher den verschiedenen Programmteilen auf der einen Seite ausreichend Rechenzeit zuteilt, auf der anderen Seite feste Antwortzeiten garantiert. Durch ein kommerziell verfügbares Realzeitbetriebssystem konnte auf eine robuste Implementierung der Arbitrationslogik, des *Schedulers*, zurückgegriffen werden. Zudem steht jedem Programmabschnitt ein eigener Stack zur Verfügung. Darüber hinaus werden allgemeine Mechanismen zur Synchronisation und zur Kommunikation von Prozessen untereinander bereitgestellt.

Für diese Implementierung wurde MicroC/OS-II der Firma *Micrium* [124] eingesetzt. Es ist fast vollständig in ANSI-C geschrieben, hoch portabel und liegt im Quelltext vor [125]. Werden, wie im Falle des handheld Biosensors, weniger als 64 Tasks verwendet und nur die tatsächlich benötigten Funktionen aktiviert, belegt das System an sich lediglich ein paar hundert Byte im RAM und ist damit hervorragend für den Einsatz im softwareemulierten Mikrocontroller (Softcore) geeignet.

Da insgesamt nur 8 kB RAM zur Verfügung stehen [93], können komplexere Systeme wie etwa *rt-Linux* oder *Windows CE* nicht eingesetzt werden. Eine weitere Einschränkung ergibt sich durch die verhältnismäßig gering verbreitete Prozessorarchitektur LatticeMico32², welche im FPGA-System verwendet wird. Neben MicroC/OS-II waren lediglich *µClinix* und *µiTron* zum Zeitpunkt der Entwicklung einsatzbereit. Während das Linuxderivat schon aus Gründen des Speicherbedarfs von mehreren Megabytes nicht in Frage kam, wurde *µiTron* aufgrund mangelnder Dokumentation nicht weiter in Betracht gezogen. Die Alternative *FreeRTOS* ([126]) wurde erst Ende 2009 auf den LatticeMico32 portiert und wird offiziell weiterhin nicht unterstützt.

4.2.2. Architektur der zentralen Steuersoftware

Abbildung 4.2 zeigt eine strukturelle Übersicht über die Architektur der Firmware des handheld Biosensors. MicroC/OS-II bildet die Basis für die Steuersoftware. Es verwaltet die Interruptroutinen und die darauf aufsetzenden Gerätetreiber, um nach einer Unterbrechung dem nächst höchsten Task in Bereitschaft die Kontrolle über die CPU zu übergeben. Daneben bedient es drei Funktionsblöcke für die drei prinzipiellen Aufgaben der Firmware: Die Steuerung der Messwertaufnahme, die Verwaltung des Kommunikationsprotokolls und die Interaktion mit dem Benutzer über das Bedienelement.

Auf der Basis eines von der CPU direkt gesteuerten Timerinterrupts wird der aktuelle Programmabschnitt unterbrochen und derjenige ermittelt, welcher die höchste Priorität hat und zur Ausführung bereit ist. Das Stackpointer-Register der CPU wird so verändert, dass es auf den Speicherbereich des neuen Tasks

²Ein 32 bit RISC Prozessor der Firma *Lattice*, welcher als Softcore im FPGA der Digitalplatine bei dieser Arbeit zum Einsatz kommt.

Tab. 4.1.: Informationen über die einzelnen Tasks. Je kleiner die Zahl, desto höher die Priorität.

Task	Priorität	Stackgröße in Byte
Systemstart	1	512
Messwertaufnahme	2	1024
Protokollverwaltung	3	1024
Benutzerinteraktion	4	1024
Leerlaufprozess	<i>niedrigst</i>	256

zeigt, in welchem die Abarbeitung fortgesetzt wird. Da auf diese Weise jeder Task über einen eigenen Stack verfügt, sind Rücksprungadressen von Funktionsaufrufen sowie lokale Variablen für jeden Programmabschnitt von den jeweils anderen unabhängig.

Neben den in Abbildung 4.2 dargestellten Tasks für die Hauptaufgaben des Steuerprogramms sind weitere Programmteile als Teil der Betriebssysteminfrastruktur nötig. Da es theoretisch vorkommen kann, dass kein Programmabschnitt zur Ausführung bereit ist, da sie z.B. auf Ereignisse von außen warten, ist ein sog. Leerlaufprozess vorgesehen, welcher in diesen Wartezeiten die Kontrolle über die CPU übernimmt. Dieser Idle-Task unterscheidet sich konzeptionell nicht von den übrigen Funktionsblöcken. Seine einzige Aufgabe ist es, eine Endlosschleife auszuführen. Prinzipiell ist es möglich, die Recheneinheit während dieser Zeit in einen Stromsparmmodus zu versetzen, welcher im LatticeMico32 allerdings nicht vorgesehen ist.

Tabelle 4.1 gibt Auskunft über die Stackgröße und Priorität der einzelnen Tasks. Es ist zu beachten, dass bei dem LatticeMico32 als 32-bit-CPU jedes Register 4 Byte breit ist. Von den 32 Registern werden 10 für die Übergabe von Funktionsparametern genutzt, 16 bilden den lokalen Kontext einer Funktion und die übrigen werden von der CPU selbst benötigt, beispielsweise für den Stackpointer. Ein einzelner Kontextwechsel benötigt bereits 92 Bytes auf dem Stack. Dieser darf also nicht zu klein bemessen werden, da sonst andere Speicherbereiche überschrieben werden könnten.

4.2.3. Datenspeicher

Der Datenspeicher ist ein sog. FIFO-Speicher, *First In First Out*, implementiert als Ringpuffer im RAM. Er ist so konzipiert, dass er sowohl alleinstehend als auch als Cache für einen wesentlich langsameren Flash-Speicher genutzt werden kann. Er ist transaktionsbasiert und arbeitet mit Sedac-Datenrahmen [120] (vgl. Abschnitt A.11) als elementarer Speichereinheit. Dies bedeutet, dass jeweils ein solcher Datenblock entweder im Ganzen oder überhaupt nicht in den Speicher geschrieben wird. Tritt während des Schreibens ein Fehler auf, wird die Transaktion rückgängig gemacht, ohne dass Rückstände der Daten weiterhin Platz belegen. Weitere Details sind den ausgiebigen Quellcodekommentaren zu entnehmen.

4.2.4. Messwertaufnahme

Wie jeder Task unter MicroC/OS-II ist die Messwertaufnahme zunächst eine Endlosschleife. Hierin wird auf den Befehl zum Starten der Messung gewartet, welcher sowohl über die Kommunikationsschnittstelle als auch durch das Bedienelement gegeben werden kann. Für diese Synchronisation der Tasks werden sogenannte *Flags* benutzt. Hierbei handelt es sich um ein Bitfeld, worin jeder Position eine bestimmte Rolle zugeordnet wird. Über bestimmte Funktionen können einzelne Bits gezielt gesetzt, gelöscht oder abgefragt werden.

Um für die Interprozesskommunikation eingesetzt werden zu können, müssen diese Flags vom Betriebssystem verwaltet werden. MicroC/OS-II stellt hierzu einige Verwaltungsroutinen bereit, die einen exklusiven Zugriff auf das zu Grunde liegende Bitfeld garantieren. Darüber hinaus ermöglichen sie es, die Ausführung eines Task von dem Zustand eines solchen Flags abhängig zu machen. Im konkreten Fall wird der Messwertaufnahme keine Rechenzeit auf der CPU zugeteilt, solange keine Messung gestartet wurde.

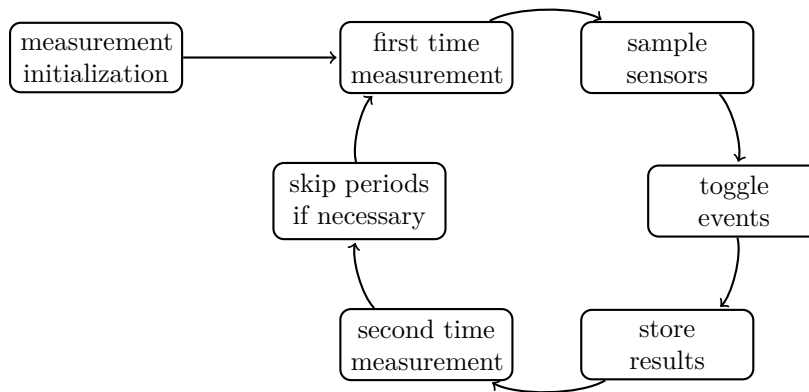


Abb. 4.3.: Funktionsweise der Messwertaufnahme

Der generelle Verlauf einer Messung ist in Abbildung 4.3 dargestellt und wird im Folgenden genauer erläutert.

Zunächst wird die Messroutine initialisiert. Hierbei werden die Zähler für die aktuelle *Messperiode*³ sowie den *Messzyklus*⁴ zurückgesetzt und die statischen Arbeitspunkte der Sensoren eingestellt. Je nach Bedarf erfolgt nun eine Kalibriermessung des Impedanzspektrometers und die Aktivierung der Sauerstoffmessschaltung.

Die eigentliche Messung besteht aus einer Schleife, die so lange läuft, wie das Flag zur Messwertaufnahme gesetzt ist. Zu Beginn wird die neue Messperiode und gegebenenfalls ein neuer Messzyklus initialisiert. Hier werden die entsprechenden Zähler inkrementiert und aperiodische Ereignisse, wie die Steuerung der Pumpe oder der Start einer Impedanzmessung, abgearbeitet. Etwaige Wartezeit zur Synchronisation darauf folgender Sensorabfragen mit dem vorgegebenen Zeitraster stehen anderen Tasks zur Verfügung.

Nach der Initialisierungsphase der Messperiode beginnt die eigentliche Messung. Es wird geprüft, ob eine asynchron laufende Impedanzspektroskopie abgeschlossen ist. In diesem Fall werden die Ergebnisse aus dem Impedanzmodul übertragen und abgespeichert. Ist der hierfür benötigte Speicherplatz nicht ausreichend, wird die weitere Ausführung der laufenden Periode solange unterbrochen, bis wieder genügend Speicher frei ist. Derartige Verzögerungen werden für eine spätere Analyse aufgezeichnet und bei entsprechender Konfiguration mit den Messergebnissen übertragen.

Im Folgenden werden die übrigen Sensoren ausgelesen. Dies geschieht in zwei Stufen. Um maximal von der parallelen Quantisierung der einzelnen ADCs profitieren zu können, wird im ersten Schritt die Wandlung für alle aktiven Sensoren angestoßen. Anschließend werden die Ergebnisse der Reihe nach ausgelesen und abgespeichert.

Abschließend werden die neuen Messergebnisse dem Bedienelement zur Anzeige auf dem LC-Display bereitgestellt und die tatsächliche Dauer der Messperiode durch eine erneute Zeitmessung ermittelt. Diese Daten werden zu Beginn der nächsten Periode für die Synchronisation benötigt und können für Diagnosezwecke zusammen mit dem Messwerten übertragen werden.

4.2.5. Protokollverwaltung

Der Task für die Protokollverwaltung implementiert das Hauptprotokoll wie in Abschnitt A.11.1 beschrieben. Vor dem Eintritt in die Hauptschleife wird zunächst der UART konfiguriert. Neben der Baudrate,

³Kehrwert der Messfrequenz, bezeichnet das Zeitintervall zwischen dem periodischen Abtasten der Sensoren

⁴Bezeichnet die Zeitspanne oder Menge aller Messperioden um einen Medienwechsel. Meist verwenden die Messungen einen Messzyklus von 10 min bzw. 600 Messperioden (vgl. Kap. 6.3.6)

standardmäßig 9600 bps, wird der Gerätetreiber für die serielle Schnittstelle so eingestellt, dass er den Programmfluss niemals blockiert.

Für den Fall, dass eine Lese- oder Schreiboperation aufgrund eines leeren bzw. vollen Puffers fehlschlägt, wird ein entsprechender Statuscode zurückgegeben. Darauf aufbauend wurden spezielle Lese- und Schreibfunktionen entwickelt, welche in derartigen Situationen die Kontrolle an das Betriebssystem übergeben, damit ein anderer Task in dieser Wartezeit die CPU nutzen kann. Der Quellcodeauszug 4.2.1 zeigt diese Funktionen, wobei der Übersicht halber die per *Doxygen* formatierten Kommentare weggelassen wurden. Die Wartezeiten wurden so bemessen, dass sich die Hälfte des Lesepuffers, 16 Byte, füllen kann, bzw. 4 Byte versendet werden können.

Listing 4.2.1: *Lese- und Schreibfunktionen für den Protokoll-UART*

```

1 uint8_t readByte() {
2     uint8_t byte = 0xff;
3     while (MicoUart_getC(PROTOCOL_UART, &byte) == MICOUART_ERR_WOULD_BLOCK) {
4         OSTimeDly(BLOCKING_IDLE_TICKS_READ);
5     }
6     return byte;
7 }

9 static void writeByte(uint8_t byte) {
10    while (MicoUart_putC(PROTOCOL_UART, byte) == MICOUART_ERR_WOULD_BLOCK)
11        OSTimeDly(BLOCKING_IDLE_TICKS_WRITE);
12 }

```

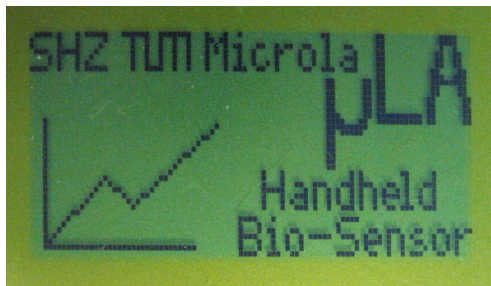
In der Hauptschleife wird nun ein Byte gelesen und als Befehl interpretiert. Je nachdem, um welchen Befehl es sich handelt, werden weitere Funktionen aufgerufen, die den entsprechenden Befehl ausführen und gegebenenfalls weitere Bytes aus dem Eingangspuffer lesen. Nach der Abarbeitung des Befehls beginnt die Schleife erneut mit dem Lesen des nächsten Kommandos.

4.2.6. Steuerung des Bedienelements

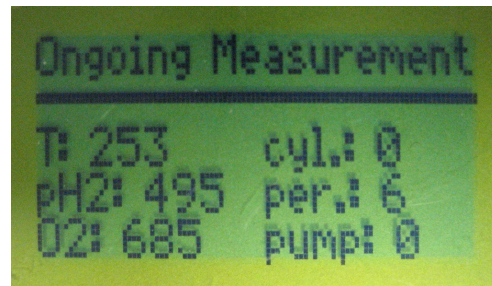
Die Steuerung des Bedienelements erfolgt in einem eigenen Task in einer Endlosschleife. Hierin wird der Status der Taster abgefragt. Mit diesen Eingaben wird ein Zustandsautomat für die Darstellung des Menüs getrieben.

Während im Initialzustand lediglich ein Splash Screen (siehe Abb. 4.4a) angezeigt wird, und bei einer laufenden Messung die aktuellen Sensorwerte dargestellt werden (vgl. Abb. 4.4b), erfordert die Menüsteuerung ein direktes Auswerten der Benutzereingaben. Der Taster *Enter* wählt den aktuellen Menüpunkt aus, *Next* und *Previous* ermöglichen die Navigation zwischen den Punkten und *Escape* bricht die aktuelle Funktion ab oder kehrt in das vorherige Menü zurück.

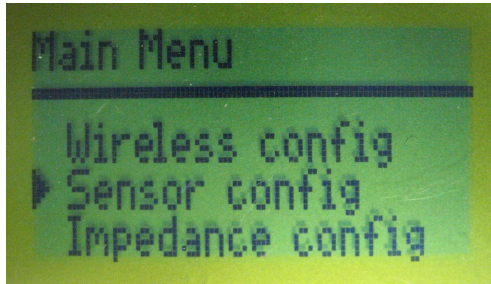
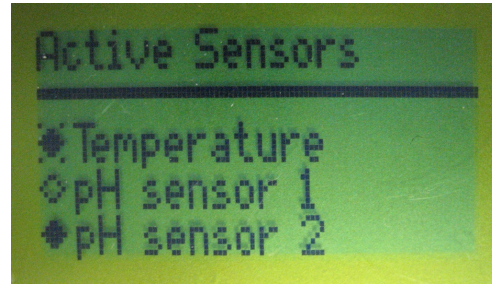
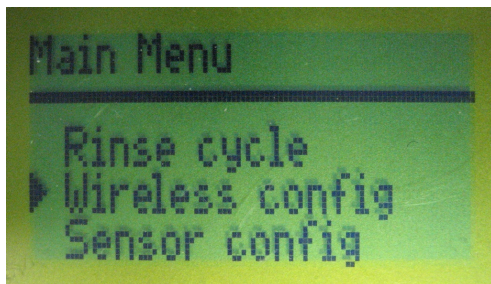
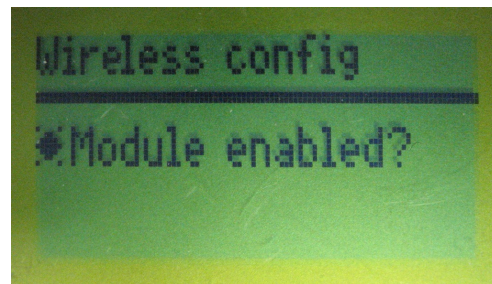
Die Definition eines Menüs erfolgt über eine spezielle Datenstruktur. Enthalten sind neben dem Titel ein Zeiger auf das übergeordnete Menü, eine Liste der Menüeinträge, die Anzahl der Einträge und der Index des aktuell ausgewählten Punktes. Jedes Listenelement besteht aus einem Typ, welcher angibt, ob es sich um einen normalen Menüpunkt handelt, eine ausgewählte oder eine nicht ausgewählte Checkbox. Darüber hinaus hat jeder Eintrag einen Titel und einen Pointer auf eine Funktion, die ausgeführt wird, wenn der entsprechende Punkt ausgewählt wird. Dieser Funktion kann zusätzlich noch ein universeller Datenzeiger (`void*`) übergeben werden. In Listing 4.2.2 ist exemplarisch die Definition des Hauptmenüs dargestellt.



(a) Splash Screen



(b) Laufende Messung

(c) Menüpunkt *Sensor*(d) Untermenu *Sensor*(e) Menüpunkt *Wireless*(f) Untermenu *Wireless***Abb. 4.4.:** Einige Bilder des LC-Displays in Betrieb

Listing 4.2.2: Definition des Hauptmenüs

```

13 "Main Menu", // title
14 0, // parent
15 (menu_entry_t[]){ // entries
16   // {type, "Label", handler, data}
17   {normal, "Quick start", quickstart_handler, 0},
18   {normal, "Rinse cycle", rinsing_handler, 0},
19   {normal, "Wireless config", submenu_handler, &menu_wireless},
20   {normal, "Sensor config", submenu_handler, &menu_sensor},
21   {normal, "Impedance config", 0, 0},
22   {normal, "Measurement config", 0, 0},
23 },
24 6, // sizeof_entries
25 0 // current_entry
26 };

```

Weitere Details sind dem ausführlich kommentierten Quellcode zu entnehmen. Abbildung 4.4 zeigt einige ausgewählte Displayinhalte.

4.2.7. Ansteuerung des Displays

Bei dem graphischen LC-Display des Bedienelements handelt es sich um ein *Batron BTHQ 96040*. Es bietet eine Auflösung von 96×40 Pixeln und verfügt über einen STE2004S-kompatiblen Controller. Dieser enthält weder einen eigenen Zeichensatz, noch primitive Zeichenfunktionen, sondern ermöglicht lediglich, die einzelnen Pixel direkt anzusprechen. Aus diesem Grund wurden spezielle Routinen zur Darstellung von Text und Linien implementiert. Die Ansteuerung selbst erfolgt über I²C.

Für die Darstellung von Text wurde ein Bitmapfont von acht Pixeln Höhe implementiert, womit eine fünfzeilige Anzeige möglich wird. Da bei einer Schrift mit fester Buchstabenbreite nicht ausreichend viel Text in die 96 Pixel breiten Zeilen passt, wurden Glyphen variabler Breite eingesetzt. Darüber hinaus wurde das typographische Merkmal der *Unterschneidung* (engl. *kerning*) implementiert. Darunter versteht man, bestimmte Buchstabenkombinationen näher zusammenzurücken. In Abbildung 4.4d ist beispielsweise zu erkennen, wie in dem Wort “Temperature” das kleine *e* unter das versale *T* ragt. Aus der Kombination mit variabler Buchstabenbreite ergeben sich längere Zeilen bei gleicher Anzahl an benötigten Pixeln.

Für die Anzeige der laufenden Messergebnisse wurde die Funktion `printf` für den im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Textrenderer implementiert. Diese ermöglicht Zahlenwerte in textueller Form darzustellen. Zur Minimierung des Entwicklungsaufwands wurde der Code der Funktion `shrink_printf` aus dem LatticeMico32-SDK entsprechend angepasst. Im Unterschied zu dem `printf` aus der C-Standardbibliothek werden keine Gleitkommazahlen unterstützt.

4.3. Firmware des Impedanzmoduls

4.3.1. Aufbau und Funktion

Konzeptionell sind von der Firmware zwei unabhängige Funktionen parallel zu bewältigen: Die Ansteuerung des Messchips *AD5933* via I²C und die Kommunikation mit der „Außenwelt“ über einen UART. Hierbei stehen sich die konkurrierenden Ziele einer möglichst schnellen Messwertaufnahme und einer niemals blockierenden Kommunikationsschnittstelle gegenüber. Darüber hinaus sollte möglichst wenig Speicher benötigt werden, um ausreichend Platz zum Ablegen der eigentlichen Messergebnisse zu behalten.

Gelöst wurde die Aufgabe der Parallelität durch eine Art kooperatives Pseudo-Multitasking. Es liegt kein richtiges Multitasking vor, da die beiden Programmabschnitte nicht über separate Stacks verfügen. Statt dessen wurden die beiden funktionalen Blöcke in kleine Teilaufgaben zerlegt, welche sich jeweils durch einen Zustandsautomaten modellieren lassen. Zwischen den einzelnen Zustandsübergängen wird die Kontrolle an den jeweilig anderen Automaten übergeben. Man spricht von kooperativem Multitasking, da es, im Gegensatz zum preemptiven Multitasking, keine zentrale Instanz gibt, welche einen laufenden Programmabschnitt unterbrechen kann, um einem anderen die CPU zu überlassen. Jeder Task ist eigenständig dafür verantwortlich. Im konkreten Fall hat dies den Vorteil, dass gemeinsam genutzte Ressourcen, wie etwa der Datenspeicher, nicht vor wechselseitigem Zugriff geschützt werden müssen.

Abbildung 4.5 zeigt diese beiden State Machines für die Messwertaufnahme und Protokollverwaltung.

Die Implementierung besteht im Wesentlichen aus zwei Funktionen für die Zustandsautomaten. Hier wird jeweils die für den aktuellen Zustand vorgesehene Teilaufgabe ausgeführt, gegebenenfalls der nächste Zustand gesetzt und die Kontrolle wieder abgegeben. Im Listing 4.3.1 zeigt die Hauptroutine, welche in einer Endlosschleife die beiden Zustandsautomaten treibt.

Daneben gibt es noch eine weitere State Machine, welche von dem UART-Interrupt gesteuert wird. Diese ist dafür verantwortlich, die Ausführung des entsprechenden Befehls im Protokollautomaten zu veranlassen. Sobald ausreichend Zeichen gelesen wurden, wird hierfür der benötigte Zustand gesetzt.

Listing 4.3.1: Hauptroutine der Firmware des Impedanzmoduls

```
1 protocol_init();
2 ad5933_init();
```

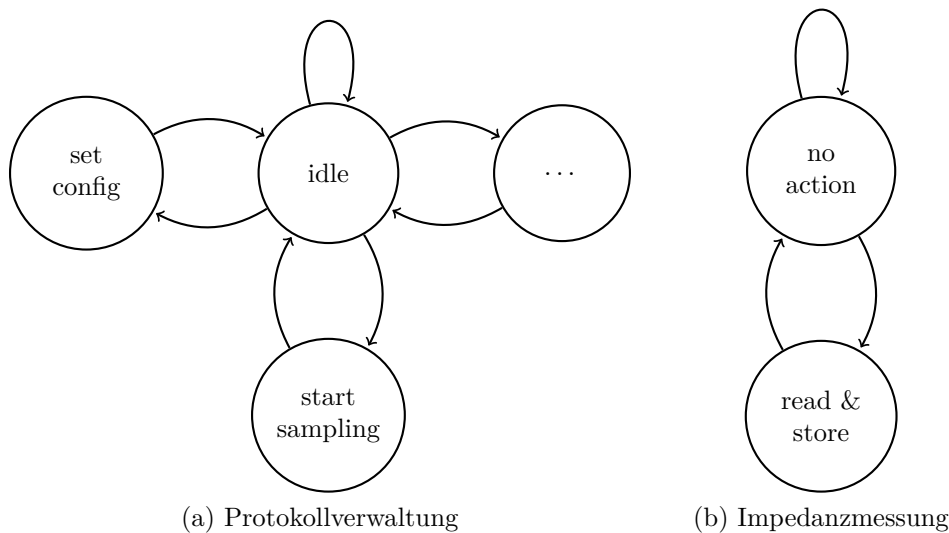


Abb. 4.5.: Modell der Software des Impedanzmoduls als Zustandsautomaten

```

4  enable_interrupts(GLOBAL); // enable interrupts globally
6  while(TRUE) {
7      protocol_handle_commands(); // this is the general command dispatcher
8      // this drives the AD5933 event machine for asynchronous
9      operations:
10     ad5933_handle_actions();
11 }
12 // main

```

Auf eine Kalibrierung der Messdaten im Impedanzmodul wurde aus Effizienzgründen verzichtet. Dennoch soll in Abschnitt 4.3.2, Abschnitt „Berechnung der komplexen Impedanz“ eingegangen werden, um die Komplexität zu erläutern. Hierzu sind mehrere trigonometrische Berechnungen mit Fließkommazahlen nötig, welche sich im modernen PC besser umsetzen lassen als in einem 8-bit Mikrocontroller. Darüber hinaus verfügt dieser nicht über ausreichend RAM Speicher, um bei hohen Auflösungen sowohl Messdaten als auch Kalibrierwerte vorzuhalten. Aus diesen Gründen wurden die Rohdaten aller Messungen übertragen und die Auswertung dieser in die Analysesoftware auf dem PC, siehe Kapitel 4.5, verlagert.

Messgeschwindigkeit

Ein 100-Punkte Spektrum konnte in weniger als fünf Sekunden aufgenommen, übertragen und ausgewertet werden.

4.3.2. Ansteuerung des Impedanzmess-ICs AD5933 mit einem Mikrocontroller

Eine allgemeine Impedanzmessung mit dem AD5933 [77] läuft nach dem Schema in Abb. 4.6 ab. Zu Beginn der ersten Messung müssen die Parameter Startfrequenz, Frequenzinkrement, Anzahl der Frequenzinkremente, Erregerspannung, interner Verstärkungsfaktor „GF“⁵ und die Warteperioden (Settling), also die Anzahl der Signalschwingungen, die vor jeder Einzelmessung verstreichen, in die Kontrollregister des AD5933 geschrieben werden. Danach kann das Startkommando gegeben werden. Sobald ein Messwert vorliegt, wird dies im Statusregister angezeigt und die Registerwerte können ausgelesen werden.

⁵Gain Factor

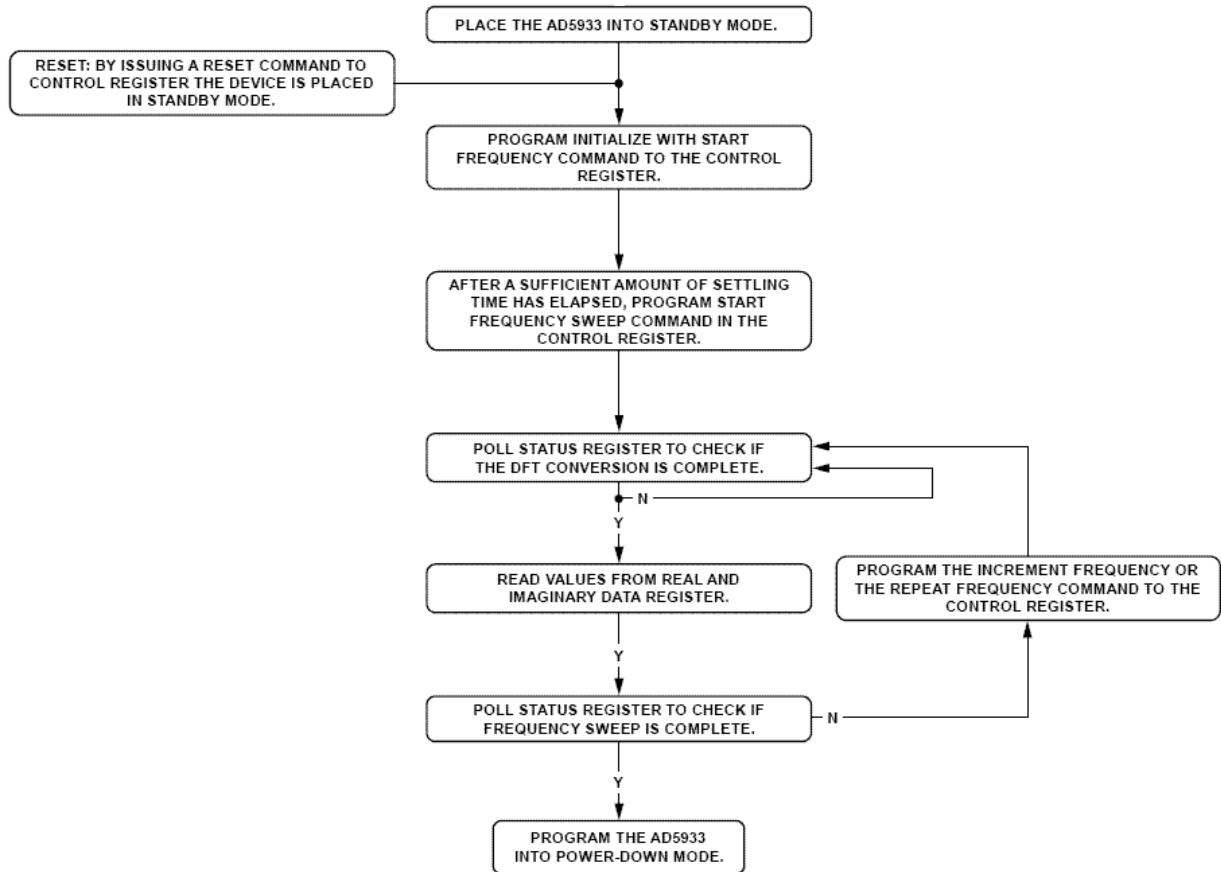


Abb. 4.6.: Ablaufdiagramm einer Impedanzmessung mit dem AD5933, Quelle: [77]

Die Zweipunktkalibrierung

Das Problem der Drift kann nach Abbildung 2.2 im Datenblatt des AD59333 [77] auf den frequenzabhängigen GF zurückgeführt werden. Die Kalibrierung bei einer festen Frequenz ist daher nur für eine Einzelfrequenzmessung zulässig und würde die Impedanzspektroskopie verfälschen. Die Idee hierbei ist, an einem Referenzwiderstand ein vollständiges Impedanzspektrum zu messen. Um Gain Faktoren zu jeder Frequenz zu errechnen und abzuspeichern, steht im PIC-Mikrocontroller nicht genügend Speicherplatz zur Verfügung. Daher wird mit folgender Gleichung eine Zweipunktkalibrierung durchgeführt, die beliebige Gain Faktoren aus linearer Interpolation zweier GF an zwei Eckpunktfrequenzen errechnet [77].

$$GF_i = GF_A + \left(\frac{GF_B - GF_A}{f_B - f_A} \right) \cdot (f_i - f_A) \quad (4.1)$$

Das Vorgehen der linearen Interpolation wird noch einmal durch Abb. 4.7 veranschaulicht. Die Dichte der Eckpunktfrequenzen beeinflusst die Qualität der Messung. Weil es sich bei den GF um Float-Werte handelt, stößt der PIC-Mikrocontroller schnell an seine Grenzen. Das beste Ergebnis wurde damit erzielt, ein Spektrum aus 505 Messwerten aufzubauen und in 63 Segmente aus je neun Messwerten zu unterteilen. 64 GF werden dann als Basis zur Interpolation der übrigen 441 GF herangezogen. Dies sorgt für die aktuelle Speicherauslastung von 60% für den ROM- und 77% für den RAM-Bereich im Mikrocontroller.

Berechnung der komplexen Impedanz

Die Firmware Routinen veranlassen die Programmierung der AD5933-Kontrollregister. Innerhalb dieser folgt eine Impedanzspektroskopie am gewünschten Referenzwiderstand und die Auswahl der Registerwerte an den Eckfrequenzen zur GF- und Phasenberechnung. Nach dem Rücksprung aus der Funktion folgt die

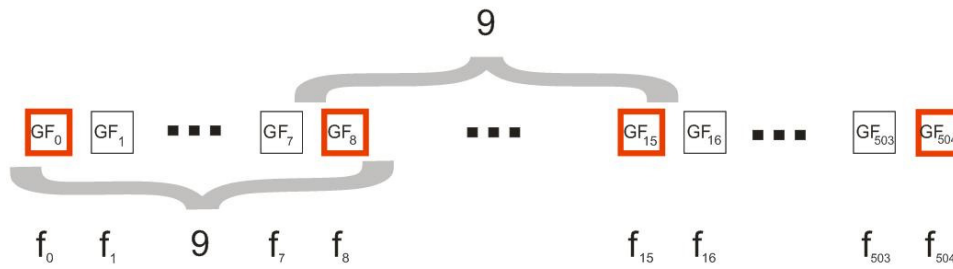


Abb. 4.7.: Prinzip der linearen Interpolation bei der Zweipunktkalibrierung des AD5933

Messung am eigentlichen Messobjekt sowie die Berechnung sämtlicher GF und Phasenfehler durch lineare Interpolation, schließlich die Korrektur der Messwerte. Der Funktionsablauf wird zum besseren Verständnis noch einmal in Abb. 4.8 verdeutlicht.

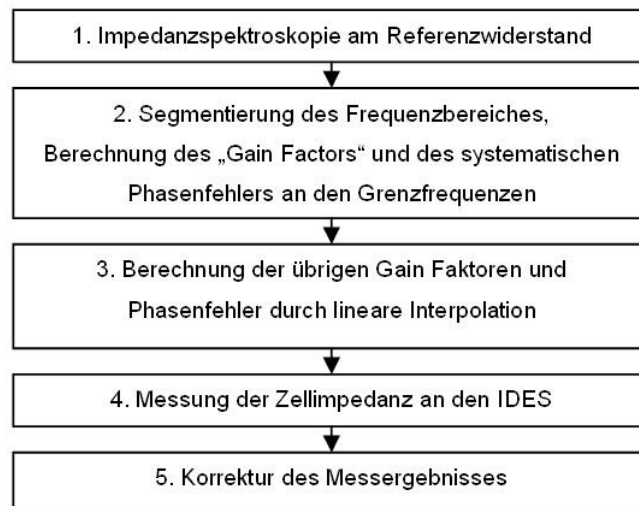


Abb. 4.8.: Ablaufdiagramm der Firmware im Mikrocontroller der Impedanzplatte

Bei den ausgegebenen Registerwerten handelt es sich um den Realteil G und Imaginärteil B einer komplexen Admittanz $Y = G + jB$, statt einer gewünschten Impedanzdarstellung in der Form $Z = R + jX$.

Der Betrag wird allgemein mit $|Y| = \sqrt{G^2 + B^2}$, bzw. $|Z| = \sqrt{R^2 + X^2}$ berechnet.

Um den AD5933 zu kalibrieren, muss zunächst eine Messung an einem Referenzwiderstand R_{cal} erfolgen. Damit lässt sich GF aus den Registerwerten zu Y_{cal} errechnen:

$$GF = \frac{1}{\frac{R_{cal}}{|Y|}} \tag{4.2}$$

Der tatsächliche Betrag der Admittanz eines Messobjekts Z ist damit $Y = GF \cdot |Y_{meas}|$ mit dem Betrag $|Y|$ aus den Registerwerten des Messobjekts. Der **Betrag der Impedanz Z** ist demnach:

$$Z = Y^{-1} = \frac{1}{GF \cdot |Y_{meas}|} \tag{4.3}$$

Die **Phase** φ der Admittanz errechnet sich für $G > 0$ und $B > 0$ zu

$$\varphi = \tan^{-1}(B/G) \quad (4.4)$$

und für $G < 0$ zu

$$\varphi = \tan^{-1}(B/G) + 180^\circ \quad (4.5)$$

und für $G > 0$ und $B < 0$ zu

$$\varphi = \tan^{-1}(B/G) + 360^\circ \quad (4.6)$$

Mit $G = |Z| \cdot \cos(\varphi)$ und $B = |Z| \cdot \sin(\varphi)$ können Real- und Imaginärteil von Y berechnet werden (nach [36]).

4.4. Firmware der Kommunikationsmodule

4.4.1. Kommunikationskonzept

Der Einsatz eines Kommunikationsmoduls erfolgt für die zentrale Steuerung des handheld Biosensors transparent. Das bedeutet, dass dieselben Protokolle unverändert beibehalten werden können.

Nachdem das Kommunikationsmodul explizit aktiviert wurde, in der Regel durch eine Aktion des Benutzers über das Bedienelement, stellt es zunächst selbst einen Sedac-Master dar. Während dieser Initialisierungsphase kann das Modul von der zentralen Steuerung beispielsweise Verbindungsparameter erfragen. Im Anschluss baut es entweder selbst aktiv eine Verbindung zu einem anderen Kommunikationspartner auf, oder, im Falle des GSM/GPRS-Moduls, zu einem Server im Internet. Bei einem etwaigen Einsatz von Bluetooth dagegen wird auf eine Verbindungsanfrage von außen gewartet.

Sobald die Verbindung steht, wird das Modul für jede Datenübertragung in beide Richtungen durchlässig. Die Gegenstelle wird selbst zum Sedac-Master und kann wie gewohnt mit dem Biosensor kommunizieren, welcher in jedem Falle die Rolle des Sedac-Slaves behält. Zum Verbindungsabbau weist der Master die zentrale Steuerung an, das Modul zurückzusetzen.

4.4.2. Verbindung via Bluetooth

Das Gerät soll selbst einen Dienst anbieten (Bluetooth Master), welcher von jeder Gegenstelle, meist einem PC, nutzbar sein sollte. Die Bluetooth-Hardware wird durch die FPGA-Firmware aktiviert. Die beiden LEDs leuchten für diesen Zeitraum. Während der anschließenden Initialisierungsphase ist nur die rote Diode aktiv. Hierbei wird der Hardwarename auf *MicroLa* gesetzt, das *Serial Port Profile* im Serviceregister eingetragen und der Slavemodus aktiviert. Zuletzt werden Statusmeldungen unterdrückt, da diese das Sedac-Protokoll stören würden. Das Modul kann nun bei einer Bluetooth-Gerätesuche gefunden werden und nimmt Verbindungen entgegen. Auf der Platine leuchtet nun die grüne Diode.

Ohne auf das Zustandekommen einer konkreten Verbindung zu warten, werden bereits nach der Initialisierungsphase jegliche Signale zur zentralen Steuerung durchgeschaltet. Bei eingehenden Daten blinkt die grüne LED, bei ausgehenden die rote. Der entsprechende Codeabschnitt ist in Listing 4.4.1 zu sehen. Es ist zu beachten, dass dieser nur wie erwartet funktioniert, wenn mindestens einer der beiden UARTs in Hardware implementiert ist, da sonst während des Sendens auf einem Kanal empfangene Daten auf dem anderen mangels Puffer verworfen werden. Das Weiterleiten der Signale bleibt auch über verschiedene Bluetoothverbindungen hinweg bis zum Zurücksetzen des Moduls bestehen.

Listing 4.4.1: *Routine zum Durchschleifen der Verbindung im Bluetoothmodul. Der Name MICROLA steht für den mobilen Biosensor, ALPS ist der Hersteller des Bluetooth Moduls.*

```
13 while(TRUE) {
14     if (kbhit(MICROLA)) {
15         output_high(LED_GREEN);
16         putc(getc(MICROLA), ALPS);
17         output_low(LED_GREEN);
18     }
19     if (kbhit(ALPS)) {
20         output_high(LED_RED);
21         putc(getc(ALPS), MICROLA);
22         output_low(LED_RED);
23     }
24 }
25 } // forward_uart
```

4.4.3. Verbindung via GSM/GPRS

Konzeptionell verhält sich die Bluetooth-Einheit identisch zur GSM/GPRS-Einheit (vgl. Kap. 4.4.2). Einziger Unterschied ist, dass hier das Modul aktiv eine Verbindung aufbaut, anstatt auf Eingehende zu warten. In der Regel ist die Gegenstelle ein Server im Internet, welcher, sobald der Datenkanal steht, die Rolle des Sedac-Masters übernimmt. Auf die Konfiguration der ISP⁶-Parameter wird nicht näher eingegangen, da diese je nach Netz-Provider unterschiedlich sind. Generell ist die Verbindung zu einem Internet-Host in wenigen Schritten zu etablieren: Anzugeben sind Hostname (IP), Socketnummer (Port) und evtl. Benutzername und Passwort; dies wird dem Modem vom Mikrocontroller per AT-Befehlen übermittelt.

4.5. Anwendersoftware

4.5.1. Entwicklungsstrategie und Auswahl der Softwarebasis zur Datenanalyse und -visualisierung

Die Integration der Anwendersoftware zur Steuerung des handheld Biosensors in eine bestehende Datenanalysesoftware bringt folgende Vorteile: Erheblich geringerer Entwicklungsaufwand auf der einen Seite und eines ungleich größeren Funktionsumfangs und Bedienkomforts auf der anderen Seite im Gegensatz zu einer Eigenentwicklung. Es sind keine separaten Anwendungen für die Datenakquise, -analyse und -visualisierung erforderlich und für die Auswertung selbst kann auf ein breites Spektrum an bestehenden Funktionen zurückgegriffen werden.

Verschiedene Anbieter einer Datenanalysesoftware wurden evaluiert. Bei kommerziellen Produkten wurde nur ORIGIN der US-Amerikanischen Firma *OriginLab Corporation* [127] untersucht, da dies die einzige am Lehrstuhl eingesetzte Analysesoftware ist. Diese hatte sich aber als zu unflexibel herausgestellt.

Andere interne Analyseprodukte des Lehrstuhls wie der *Zellchip-Viewer*, hervorgegangen aus der Dissertation von E. Cabala [128], oder der *DALiA-Client* als zukunftsorientiertes Expertensystem (Parallelentwicklung, vgl. Kap. 4.6) boten noch keinen befriedigenden Funktionsumfang in Bezug auf die hardwareseitige Kommunikation.

An freier, quelloffener Software wurden *LabPlot* [129], *QtiPlot* [130] und *SciDAVis* [131] in Betracht gezogen.

LabPlot ist in der aktuell verfügbaren Version 1.6 ein Programm für den UNIX Desktop KDE 3 und als solches nur mit erheblichem Aufwand auf anderen Plattformen zu betreiben.

Aktuelle Versionen von QtiPlot nutzen das plattformübergreifende C++ Toolkit *Qt* von *Nokia* [132]. Da auch die weiteren Abhängigkeiten weitestgehend Plattform unabhängig sind, kann QtiPlot problemlos unter Microsoft Windows, Linux und Mac OS X betrieben werden. Zusätzlich bietet QtiPlot umfangreiche Funktionen bezüglich Analyse und Visualisierung von Messdaten an. Graphen lassen sich in Raster- und Vektorformaten exportieren. Abbildung 4.9 zeigt einen Screenshot der Software.

⁶Internet Service Provider

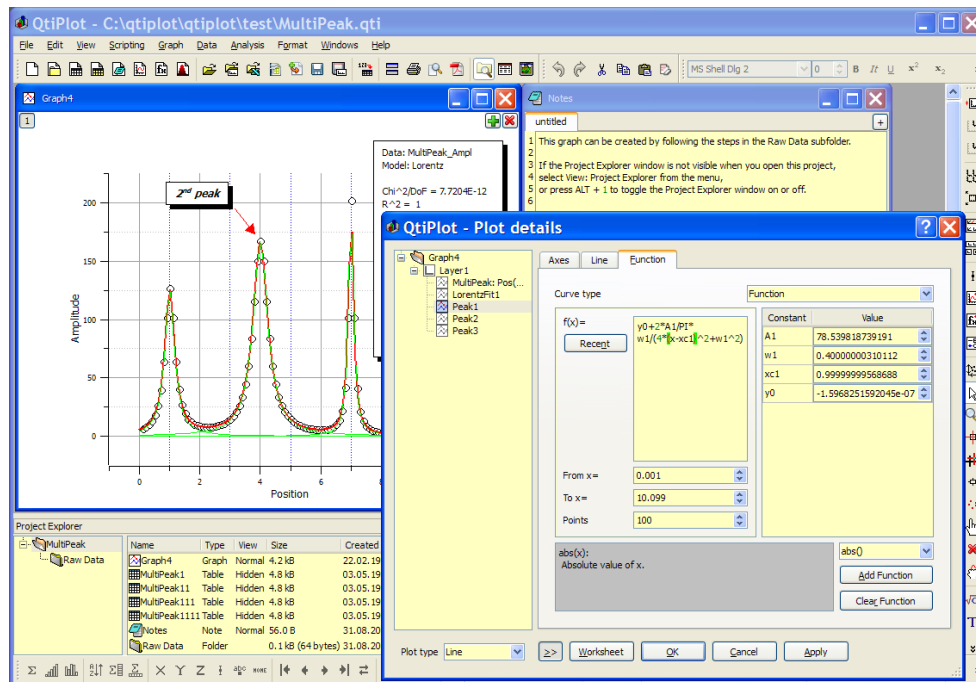


Abb. 4.9.: Allgemeiner Screenshot von QtiPlot unter Windows XP. Quelle: Website des Herstellers.

SciDAVis hat sich von QtiPlot abgespalten und bietet einen vergleichbaren Funktionsumfang. Während QtiPlot mit kontinuierlicher Geschwindigkeit weiterentwickelt wurde, scheint die Entwicklung von SciDAVis unregelmäßiger voran zu schreiten.

4.5.2. Programmiersprache Python

Python ist eine sogenannte Skriptsprache. Python wurde Anfang der 1990'er Jahre von Guido van Rossum [133] entworfen und wird bis heute ständig erweitert. Mit Python kann wesentlich schneller und fehlertoleranter entwickelt werden.

Die Referenzimplementierung steht unter der GNU General Public Licence [134].

Mit Python-Erweiterungsmodulen lassen sich zusätzlich benötigte Funktionen erstellen und in die grafische Benutzeroberfläche (GUI⁷) einbinden.

Zur Erstellung grafischer Benutzerschnittstellen mittels Python wird hier das Modul *PyQt* des britischen Unternehmens *Riverbank Computing Limited* [135] benutzt. Dies ermöglicht zum einen den direkten Zugriff auf die GUI-Elemente von QtiPlot selbst, zum anderen gewährleistet die Verwendung derselben Basis ein reibungsloses Zusammenspiel mit eigenen Dialogen. Solche Dialoge lassen sich einfach über ein grafisches Interface, den *Qt Designer*, erstellen und als XML speichern. Zur Laufzeit werden diese Dateien geladen und die GUI-Elemente angezeigt.

4.5.2.1. Zugriff auf die serielle Schnittstelle RS232

Das Modul *PySerial*, erhältlich auf der Projektseite bei *Sourceforge* [136], bietet ein Plattform übergreifend einheitliches API⁸ zum Zugriff auf die serielle Schnittstelle RS232 des PCs. Über diese Erweiterung kann eine solche Schnittstelle, unter Windows häufig als *COM-Port* bezeichnet, konfiguriert, geöffnet und zur Datenübertragung genutzt werden.

⁷Graphical User Interface

⁸Application Programming Interface

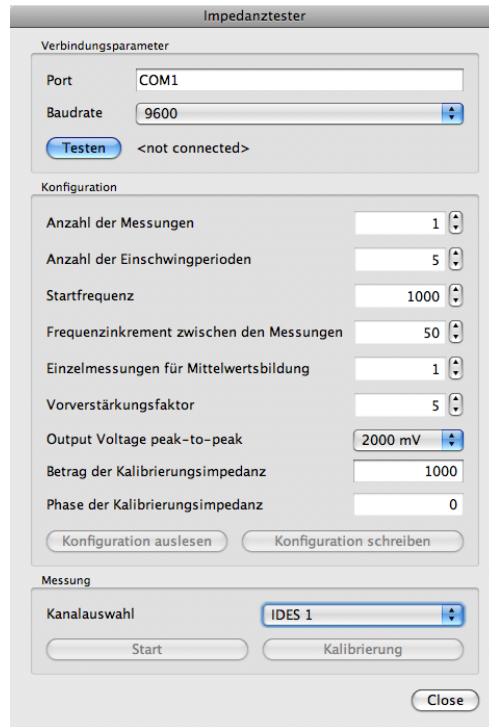


Abb. 4.10.: Screenshot des Impedanztesters

4.5.2.2. Brücke zur Statistiksprache R

Teile der Datenauswertung wurden in der Sprache *R* geschrieben. Auf diese Komponenten kann über das Pythonmodul *RPy2* [137] zugegriffen werden. Dieses ermöglicht die Konvertierung von und zu den in *R* verwendeten Datenformaten sowie den Aufruf von *R*-eigenen Funktionen über ein objektorientiertes API.

4.5.2.3. Integration von Python und QtiPlot

Mit dem Modul *PyQt* lassen sich eigene Menüpunkte und Dialoge in die Software integrieren. Da diese Qt für das GUI verwendet, ist die Menüleiste programmtechnisch über eine Instanz der Klasse *QMenuBar* realisiert und ist über den Pythoninterpreter zugänglich. Dieser kann nun eigene Instanzen von *QMenu* erstellen und an die Menüleiste anhängen. Auf diese Weise ist es möglich, für den Benutzer vollkommen transparent eigene Pythonfunktionen über das Hauptmenü zugänglich zu machen. Diese stehen gleichwertig neben den vom Programm selbst bereitgestellten Funktionen.

4.5.3. Testen des Impedanzspektrometers

Über den Menüpunkt *Impedanztester* ist der in Abbildung 4.10 dargestellte Dialog erreichbar. Mit ihm kann das Hardwaremodul für die Impedanzspektroskopie (vgl. Kap. 2.3) eigenständig betrieben werden. Diese Erweiterung von QtiPlot implementiert einen Sedac-Master für das Peripherieprotokoll Impedanz, wodurch vorausgesetzt wird, dass die Hardware mit der neuen, in Abschnitt 4.3 vorgestellten Firmware betrieben wird.

Über den Dialog lassen sich sämtliche Parameter der Impedanzmessung einstellen. Für die Vermessung von lebenden Zellen optimale Parametersätze zu finden, ist noch Gegenstand aktueller Forschung, daher werden hier keine vereinfachenden Einschränkungen auferlegt. Diese Erweiterung für die Analysesoftware eignet sich somit nicht nur zum eigenständigen Test der Hardware, sondern kann auch für konkrete Forschungsarbeiten rund um die Impedanzspektroskopie herangezogen werden.

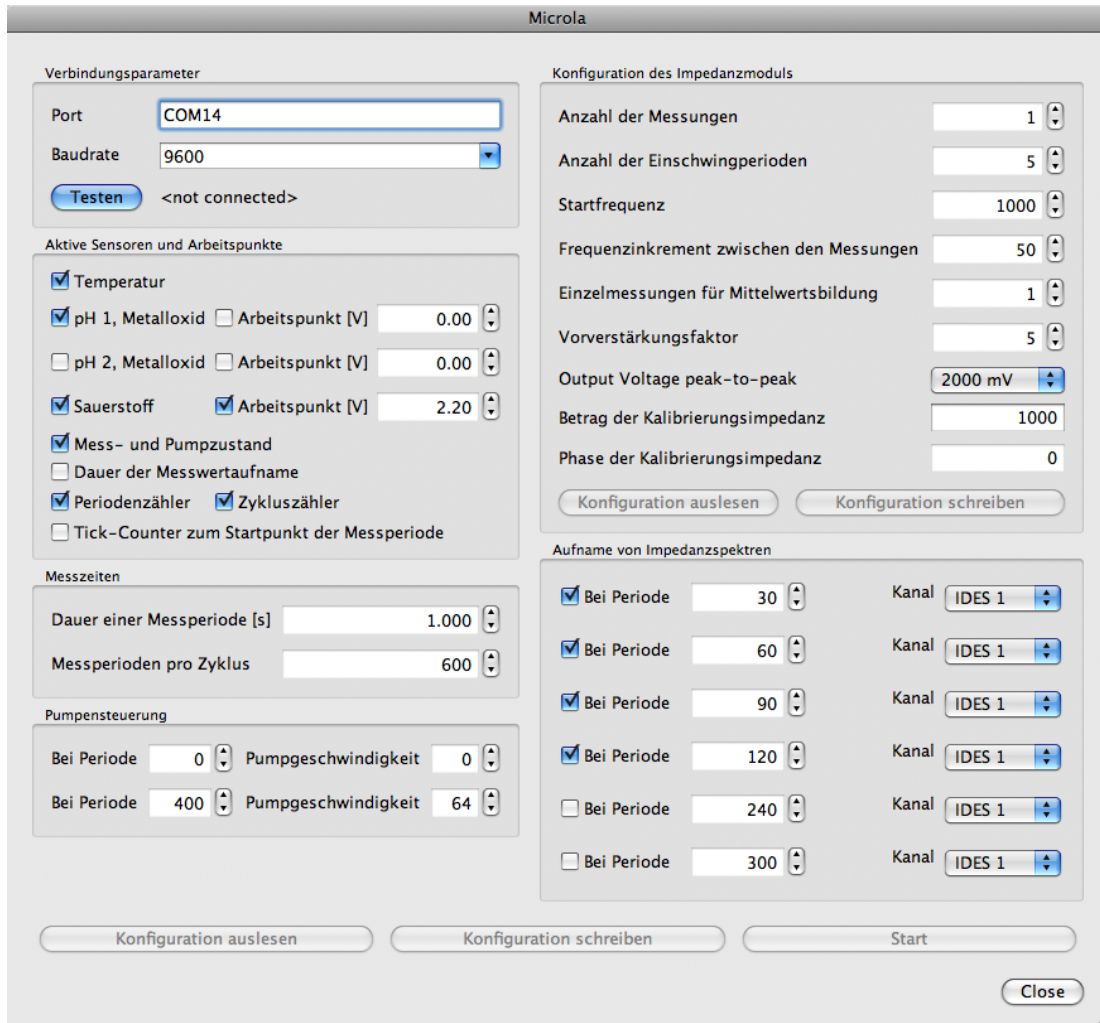


Abb. 4.11.: Screenshot der Steuerung des handheld Biosensors

Für die Inbetriebnahme muss zunächst die serielle Schnittstelle, worüber das Impedanzspektrometer angeschlossen ist, konfiguriert werden. Diese Einstellungen sind unter *Verbindungsparameter* zusammengefasst. Nach einem erfolgreichen Test der Verbindung wird die Firmwareversion des Spektrometers einblendet und die restlichen Funktionen des Dialogs freigeschaltet. Anschließend ist das Gerät zu konfigurieren. Der Dialog ermöglicht sowohl das Auslesen der aktuellen Einstellungen als auch das Setzen einer neuen Konfiguration.

Für eine Messung muss zuerst ein Satz Kalibrierdaten eingelesen werden. Dafür wird eine Messung auf einem Kanal mit bekannter Impedanz durchgeführt. Dies und die anschließende Berechnung der Kalibrierungsparameter erfolgt über die Schaltfläche *Kalibrieren*. Anschließend können über *Start* beliebig viele Messungen auf anderen Kanälen durchgeführt werden. Die Ergebnisse liegen als Tabellen in QtiPlot vor und können nun exportiert oder mit den Bordmitteln der Software analysiert und visualisiert werden.

4.5.4. Steuerung des handheld Systems

Der in Abbildung 4.11 abgebildete Dialog dient der Steuerung des handheld Biosensors. Er ermöglicht sowohl die Konfiguration des Geräts, als auch die Durchführung von Messungen mit der Übertragung der Ergebnisse in Echtzeit.

Zunächst ist die serielle Schnittstelle zu konfigurieren, über die der Biosensor mit dem PC verbunden ist. Hierbei handelt es sich entweder um eine reale RS232-Schnittstelle oder um eine virtuelle Schnittstelle, wenn die Datenübertragung drahtlos via Bluetooth geschieht. Über die Schaltfläche *Testen* wird die Verbindung überprüft und bei Erfolg die Version der Firmware angezeigt sowie die restlichen Funktionen des Dialogs freigeschaltet.

Die übrigen GUI-Elemente dienen der Konfiguration der Messung. Es können die benötigten Sensoren aktiviert sowie deren Arbeitspunkte gesetzt werden. Neben den realen Sensoren auf dem verwendeten Biochip stehen auch virtuelle Sensoren zur Übermittlung von internen Zuständen zur Wahl. Diese dienen entweder der Diagnose oder liefern Synchronisationsinformationen, um die spätere Analyse der Daten zu vereinfachen. Darüber hinaus wird hier die Dauer einer Messperiode (Kehrwert der Messfrequenz) sowie die Anzahl an Perioden pro Messzyklus konfiguriert. Außerdem kann bei bestimmten Periodenzahlen im Zyklus die Pumpe des Biosensors ein- und ausgeschaltet werden.

Die Einstellungen für die Impedanzspektroskopie werden an die entsprechende Hardware weitergereicht. Die einzelnen Optionen entsprechen denen des in Kap. 4.5.3 vorgestellten Impedanztesters. Für die Implementierung wird auch auf dieselben Eingabelemente zurückgegriffen. Die Aufnahme eines Impedanzspektrums erfolgt zu bestimmten Periodenzahlen innerhalb des Messzyklus. Für diese lässt sich zusätzlich der verwendete Kanal einstellen.

Beim Start der Messung wird zunächst eine Kalibrierung des Impedanzspektrometers durchgeführt und die gemessenen Werte an die Anwendung übertragen. Im Anschluss werden die periodisch erfassten Sensordaten ausgelesen und entsprechend der Kalibrierung umgerechnet. Da die Werte der meisten Sensoren nur als Rohdaten des entsprechenden ADCs vorliegen, kommen statische Funktionen für die Umrechnung in die für die entsprechende Größe gängige Einheit zum Einsatz. Liegt für einen Sensor keine spezifische Funktion vor, wie zum Beispiel um eine Temperatur in Grad Celsius darzustellen, wird eine generelle Funktion angewendet, die das Ergebnis in Volt bzw. Millivolt angibt.

Die Messdaten liegen anschließend in drei Tabellen vor. Eine für allgemeine Sensorwerte und, bei Nutzung der Impedanzspektroskopie, zwei weitere für die Betrags- und Phasenwerte, nach Frequenz aufgeschlüsselt. Diese können nun mit QtiPlot exportiert, analysiert oder visualisiert werden.

4.5.5. Analyse der Messdaten des Biosensors

Die Abb. 4.12 zeigt den Dialog für die Gradientenanalyse. Die Messdaten, welche nur als Tabellen in QtiPlot vorliegen, werden in die einzelnen Messzyklen unterteilt. Anschließend wird die Steigung und der Achsenabschnitt der jeweiligen Regressionsgeraden in einem bestimmten Fenster zusammen mit der entsprechenden Zykluszahl und deren Startzeit als weitere Tabelle ausgegeben.

Sollten die Rohdaten der Sensormesswerte noch mit einem Lowess geglättet werden, können in diesem Dialog noch Parameter gesetzt werden [138].

Informationen über die Konfiguration der Analyseparameter der Rohdaten sind in der Beschreibung des jeweiligen Set-ups eines Experiments zu finden (resp. Kap. 2.3, wobei die Anwendung der Berechnungsparameter für den jeweiligen Versuch individuell ist, da diese auf die Startzeit und die Periodendauer angepasst werden müssen).

Die Abb. 4.13 zeigt exemplarisch einen Screenshot der Bedien- und Analysesoftware QtiPlot: Im Fenster sind die generierten Tabellen zu finden, deren Erweiterung (Berechnung der zusätzlichen Spalten *Steigung/Regressionsgerade*, bzw. *normierte Steigung*) mit den implementierten Modulen erzeugt wurde. Damit lassen sich Kurvendiagramme erzeugen, die aussagekräftige Graphen beinhalten und ebenso statistisch fundiert untermauert werden können.

4.5.6. Statistische Auswertung mehrerer Messdaten

Werden Messungen mehrfach durchgeführt, müssen die Ergebnisse vergleichbar werden. Da sich jedoch die Anzahl der eingesetzten Zellen nicht im benötigten Maße vorab festlegen lässt, müssen die dadurch

Parametereingabe

Zeitpunkt der ersten Messperiode (in Sekunden)

Dauer einer Messperiode (in Sekunden)

Start bei Messperiode

Anzahl an Messperioden

Lage der Regressionsgraden in der Messperiode

Offset (in Sekunden)

Länge (in Sekunden)

Glättung

Parameter f für Lowess

Parameter iter für Lowess

Betrachteter Sensor

Abb. 4.12.: Screenshot der Parametereingabe für eine Gradientenanalyse

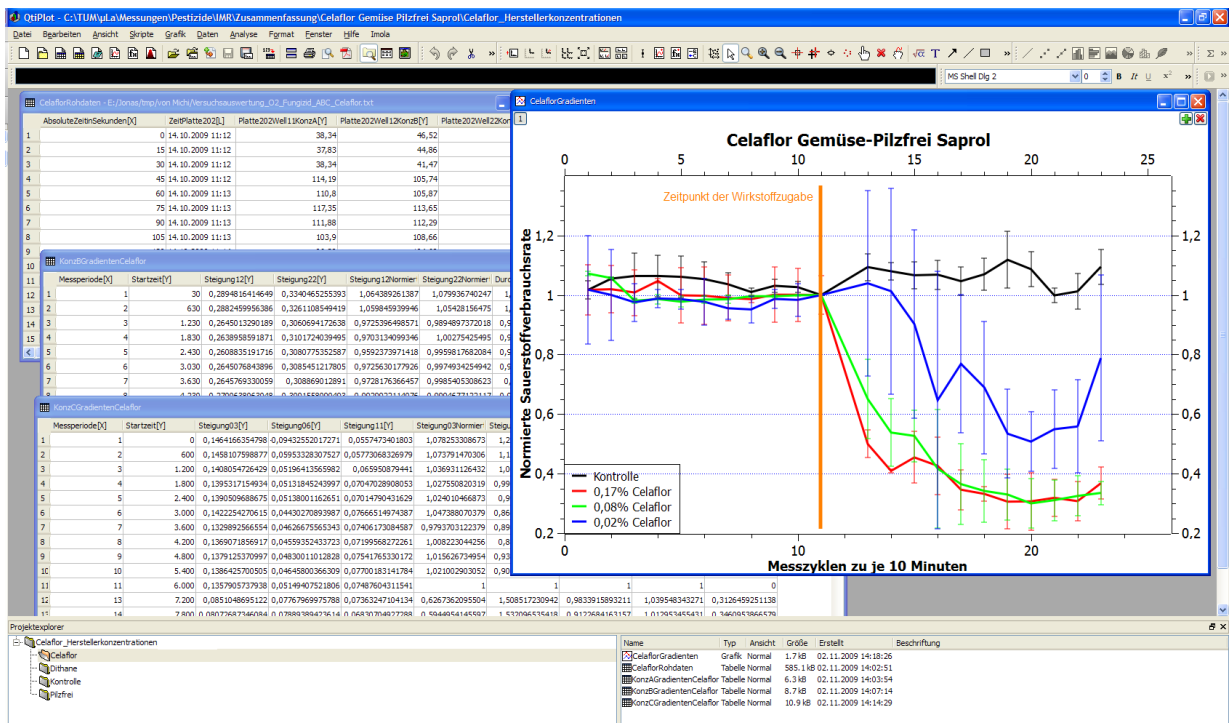


Abb. 4.13.: Beispiel-Screenshot der QtiPlot Ergebnisse der Gradientenberechnung in Form von Tabellen und statistisch ergänzten Messgraphiken.

entstandenen Effekte, wie scheinbar stärkere oder schwächere Stoffwechselaktivitäten, nachträglich herausgerechnet werden. Dazu werden die Ergebnisse der Gradientenanalyse aller Messreihen auf einen bestimmten Zeitpunkt normiert. Dieser wird so gewählt, dass er unmittelbar vor dem erwarteten Eintreten einer Veränderung liegt, also etwa der Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe bei einem Vergleich der Wirkungsweise unterschiedlicher Dosen bei einem Toxineintrag. Anschließend kann der Durchschnitt und die Standardabweichung von Messreihen mit gleichen Parametern errechnet werden.

Um diese Arbeitsabschnitte zu vereinfachen, wurde die Funktion *Normierte Durchschnittsbildung* implementiert. Hierzu müssen die Gradienten aller Messreihen mit gleichen Parametern, wie etwa die Kontrollgruppe, in einer Tabelle vorliegen. Die generierte Tabelle in QtiPlot wird dann um weitere Spalten mit den jeweils normierten Daten, deren Durchschnitt und um die Standardabweichung erweitert. Der Zeitpunkt für die Normierung wird vom Benutzer abgefragt.

4.6. Serverbasiertes Expertensystem

Zur Entwicklung des bioelektronischen Sensorsystems ist eine lokale Softwarelösung durchaus sinnvoll, da sie kurze Entwicklungszeiten und schnelle Datensichtung erlaubt. Da jedoch die Hauptanwendung des Systems in der mobilen Messdatenaufnahme (Feldbetrieb) liegt, rechtfertigt dies den Betrieb mit eingebautem GSM/GPRS Modem. Andererseits ist ein zentrales Datenerfassungssystem nötig, das an die Funkstrecke angebunden ist.

DALiA (*Data Analysis and Link Application*) ist ein Server-Client Softwaremodell, das es erlaubt, Messdaten und Konfigurationen von einer Vielzahl von mobilen Biosensoren in einer Datenbank zu verwalten [139]. Zudem bietet DALiA die Möglichkeit, mit einem Webbrowser die gewonnenen Daten zu sichten. Der größte Vorteil ist, dass DALiA einen Dateninterpretationsdienst bietet, mit dem der Nutzer statistisch relevante Aussagen über die Güte des Experiments treffen kann. Dieses sog. *Expertensystem* setzt auf Algorithmen, die die Daten gleichartiger Experimente korrelieren. So lässt sich durch die Summe der internen Auswertungen mehr über das stattgefundene Experiment aussagen, wie wenn man dieses einzeln betrachtet auswerten würde.

Dieses Kapitel beschreibt die funktionalen Anforderungen des Server-Client Modells, die Komponenten, die Schnittstellen und die Anwendungsszenarien. Abb. 4.14 zeigt einen Überblick des Gesamtkonzepts.

4.6.1. Funktionale Anforderungen und Komponenten

Die *Clientapplikation* ist der Rahmen für die Steuerung aller angeschlossenen Geräte. Die Anbindung des mobilen Biosensors geschieht über GSM/GPRS, so dass die Clientapplikation als Dienst auf dem zentralen Server läuft. Sie ist dem Benutzer über die Präsentationsumgebung zugänglich. Hier besteht die Möglichkeit, den Versuch zu parametrisieren (Eingabe von Versuchsname, Zelltyp, Zellzahl, benutztes Kulturmedium, zu testende Substanz, deren Konzentration, Zugabezeitpunkt, Zugabedauer etc.). Abb. 4.15 zeigt eine schematische Darstellung des Softwarekonstrukts. Die Notwendigkeit zur Speicherung immer größerer Datenmengen und des schnellen Zugriffs auf diese Daten macht die Benutzung von Datenbanksystemen (Database Management Systems, DBMS) unverzichtbar (nach [139]).

Die *Serverapplikation* wird als Dienst auf dem Server realisiert. Sie muss die Daten der Clientapplikationen aufnehmen, prüfen und in einer Datenbank ablegen. Außerdem braucht sie geeignete Schnittstellen zur Anbindung der Clientapplikation und der Präsentationsumgebung (vgl. Abb. 4.16).

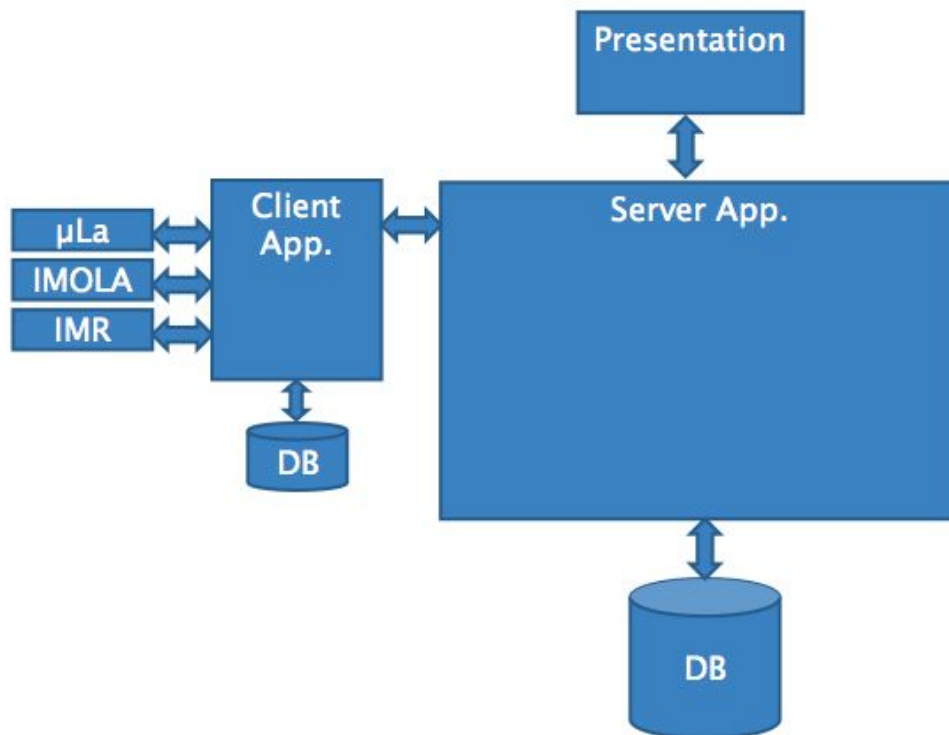


Abb. 4.14.: Struktur von DALiA: Über die Clientapplikation können beliebige Zellchip Auswertegeräte gesteuert werden, die Daten werden zentral in der Serverapplikation verwaltet und der Benutzer hat über die Präsentationsumgebung Zugriff auf die Messdaten. Quelle: [139]

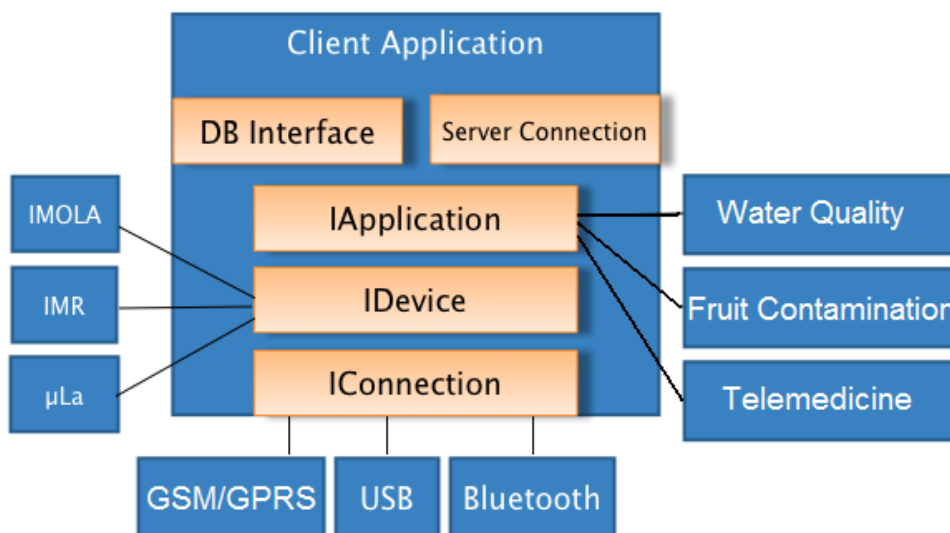


Abb. 4.15.: Clientapplikation von DALiA: Über eine einstellbare Schnittstelle (IConnection) können verschiedene Geräte (IDevice) angeschlossen werden; der Benutzer parametrisiert den Versuch über die auszuwählende Anwendung (IApplication). Modifiziert aus [139]

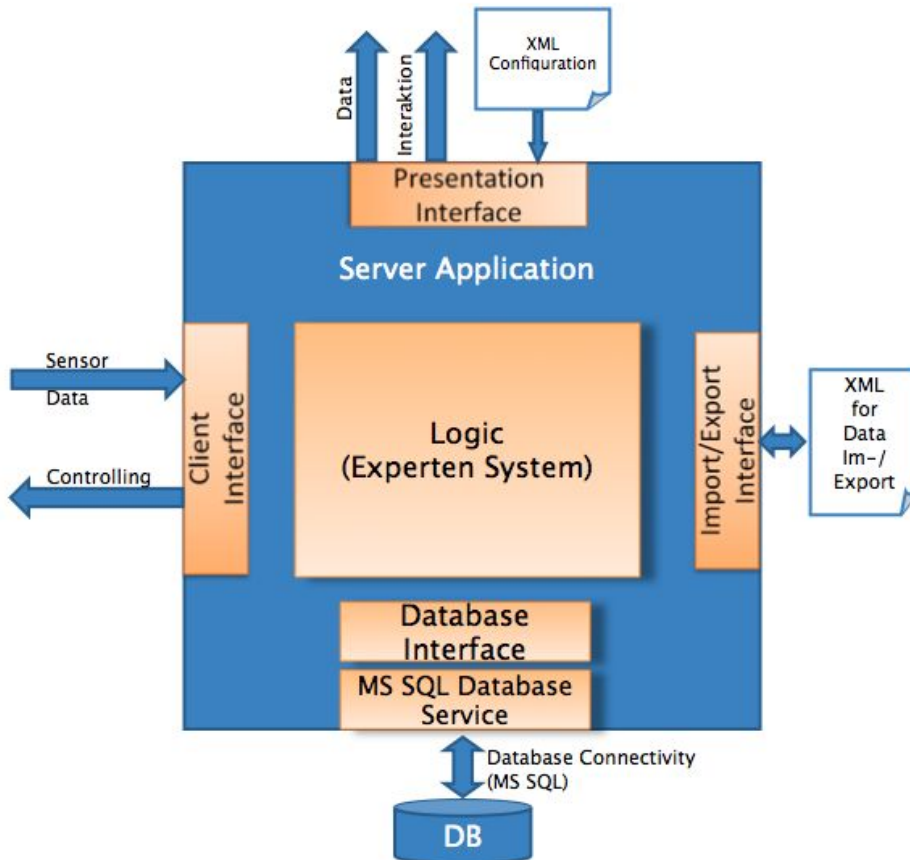


Abb. 4.16.: Serverapplikation von DALiA: Das angeschlossene Clientinterface verwaltet die Geräte, zentrale Schnittstellen sind die MS SQL Datenbank, das Import/Export Interface zum Datenaustausch und die Verbindung zur Präsentationsumgebung. Quelle: [139]

4.6.2. Darstellung der Messergebnisse

Die Webseite der *Präsentationsumgebung* bietet dem Benutzer die Anmeldung mit Benutzername und Passwort. Je nach Rolle des Logins werden unterschiedliche Optionen angezeigt. Die Abb. 4.17 zeigt im linken Frame die Möglichkeit zur Auswahl eines Experiments. Rechts im Fenster werden wahlweise Rohdaten angezeigt. Die Darstellung interpretierter Datensätze wird durch die Auswahl eines Analysealgorithmus im unteren Teil der Präsentationsumgebung möglich.

DALiA Presentation

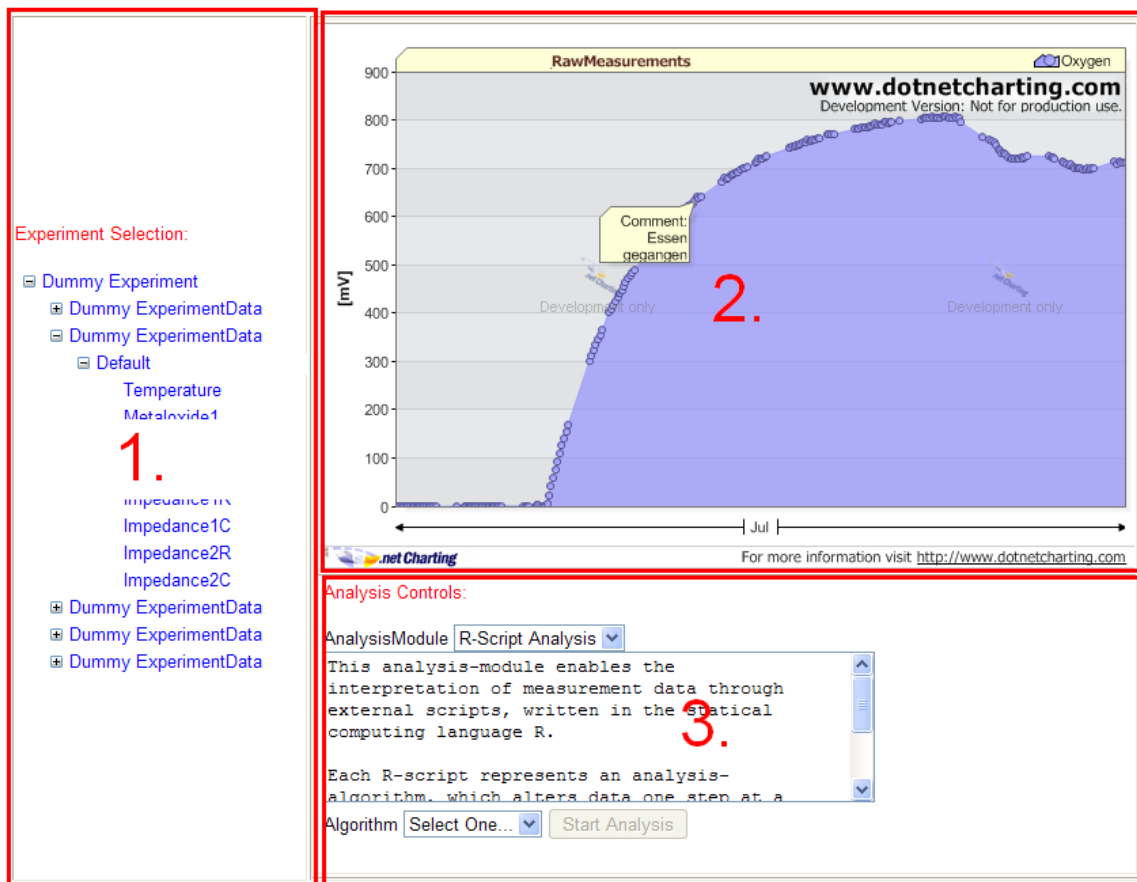


Abb. 4.17.: Präsentationsumgebung von DALiA: Links (1) können die Experimente ausgewählt werden, die Graphik (2) zeigt den Messdatenverlauf, und in (3) kann der Auswertalgorithmus ausgewählt werden. Quellen: [139],[140]

5. Geräteaufbau und Lebenserhaltungssystem

5.1. Kontaktierung des Sensorchips

Die in früheren Entwicklungen des Lehrstuhls für Medizinische Elektronik der Technischen Universität München (z.B. TUM-Screen [141]) eingesetzten PLCC-Testsockel (Yamaichi Electronics Deutschland GmbH, München, Deutschland [142]) hatten sich im praktischen Betrieb als störanfällige Lösung erwiesen, da die Übergangswiderstände bei wiederholtem Einlegen der Chips stark schwankten [48]. Zudem ist diese Lösung zu globig. Deshalb wurden Federkontakteleisten (Samtec Germany, Germering, Deutschland [143]) und Kontaktelemente, wie Zebra Strips mit Kohlenstoff oder Goldleiter und Goldkontaktstreifen (Shin-Etsu Polymer Co. Ltd., Venlo, Niederlande [144]) untersucht. Der Rasterabstand der Kontakte liegt bei 1,27 mm. Diese Sensorchips müssen des öfteren gewechselt werden, wobei der Schwerpunkt der Kontaktierungsanforderungen auf gleichmäßigem, möglichst niederohmigem Übergangswiderstand liegt. Grund hierfür sind die geringen zu übertragenden Ströme im Nano-Ampere Bereich, die in Verbindung mit schwankenden Übergangswiderständen zu unregelmäßigen Messergebnissen führen. Daraus ergibt sich indirekt auch die zweite Forderung, die sich aus dem häufigen Wechsel der Sensorchips ableiten lässt: Die Kontaktierung als solche sollte eine möglichst hohe Stabilität bzw. Standzeit haben und den häufigen Wechsel unbeschadet überstehen. Eine dritte Forderung ist die angestrebte Miniaturisierung bei gleich bleibender Benutzerfreundlichkeit.

Die folgenden Möglichkeiten eignen sich für die Kontaktierung des biohybriden Sensorchips:

- Testsockel PLCC-64 (entfällt, der Vollständigkeit halber aber angeführt)
- Federkontakteleisten
- Heat-Seal Film (entfällt, da nicht-trennbare Verbindung)
- Zebra Strips (Leitgummis) mit eingebetteten senkrechten oder schräg-verlaufenden Golddrähten
- Matrix-ähnlich angeordnete Kontaktfolien
- U-förmig liegende Verbinder mit parallelen Golddrähten
- X-förmig stehende Verbinder mit parallelen Golddrähten

Messungen haben ergeben, dass die Goldkontaktstreifen der Fa. Shin-Etsu Polymer Europe sowohl in der Höhe des Übergangswiderstands (10 m Ω und 20 m Ω) als auch in der Reproduktionsgenauigkeit am besten geeignet sind [48]. Basis des Verbinders ist ein liegender U-förmiger Silikon Schaumkörper, auf den U-förmig ein dünner vergoldeter Draht aufgebracht ist (vgl. Abb. 5.1). Die einzelnen Drahtelemente sind untereinander isoliert und bilden jeweils in Gruppen von 3 bis 4 Einzeldrähten einen leitfähigen Kontakt. Die Stromtragfähigkeit dieser Verbinder liegt jenseits der hier gestellten Anforderungen bei ca. 50 mA pro Draht [145].

Eine Führung der Kontaktstreifen und des Chips wird durch den angefertigten Sockel gewährleistet, der zusammen mit der Kontaktplatine mit dem Gehäuse verschraubt ist. Das Layout der Kontaktplatine ist im Anhang A.1 zu finden. Der Sensorchip wird von oben mit dem Fluidikkopf durch den abnehmbaren Deckel auf den Sockel gespannt. Somit bedarf es keiner weiteren Klemmmechanismen oder Spannvorrichtungen, damit ein zuverlässiger Kontakt hergestellt wird. Die Abb. ?? verdeutlicht in Kapitel 5.3.3 mit einer Querschnittszeichnung den Klemm- und Kontaktmechanismus.

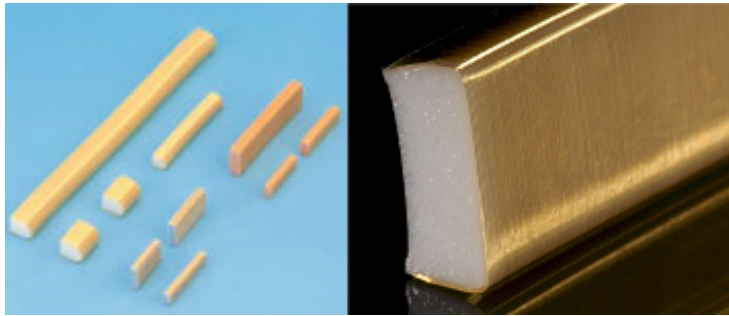


Abb. 5.1.: Kontaktstreifen zur elektrischen Anbindung des Sensorchips. Links: Mögliche Bauformen, rechts: Detaildarstellung der Verbindungstechnik, Quelle: [145]

5.2. Anforderungen an das Gehäuse und Beschreibung des Entwurfs

Der Entwurf und die Konstruktion des Gehäuses erfolgte mit der CAD Software *Catia V5* von Dassault Systems. Die erstellten Baugruppen sind in den Konstruktionsplänen im Anhang abgebildet. Das Gehäuse wurde mit dem Rapid Prototyping-System Dimension 1200 SST im Extrusionsverfahren erstellt. An der Maschine lassen sich Strukturbreiten von 1 mm realisieren. Hinsichtlich Festigkeit in Bezug auf Widerstandsfestigkeit für die Herstellung funktionsfähiger Modelle sind Stegbreiten von weniger als 2 mm zu vermeiden.

Bei einem mobilen Biosensorsystem sind die folgenden Anforderungen bzgl. der mechanischen Konstruktion zu realisieren:

- **Kompakte Ausmaße**
Für den mobilen Einsatz ist es wichtig, ein möglichst kompaktes Gerät zu entwerfen, welches problemlos transportiert werden kann.
- **Robustheit gegenüber Umwelteinflüssen**
Neben Kurzzeitanalysen sind auch Analysen über einen längeren Zeitraum möglich. Alle Komponenten sollten bestmöglich von externen Umwelteinflüssen geschützt sein, um einerseits die Funktion des Gerätes sicherstellen zu können, andererseits, um den Probenträger vor Verunreinigungen zu schützen. Die Form des Gehäuses wurde deshalb so gewählt, dass das Gerät bei kompletter Montage eine geschlossene Einheit bildet.
- **Integration aller Baugruppen**
Der Biosensor wurde in zwei Baugruppen unterteilt: Elektronik und Datenverarbeitung sowie Zellchipeinheit. Für eine einfache Handhabung wurde der Teil mit Zellchip als Dockingmodul konzipiert.
- **Trennung Fluidik von Elektronik**
Zur Kultivierung und Lebenserhaltung der Zellen ist eine Nährlösung notwendig. Hierfür wurden zwei Tanks vorgesehen, die seitlich am Hauptteil des Gerätes angebracht sind. Der Füllstand der Behälter kann ohne Öffnen des Gehäuses durch zwei längliche Sichtfenster kontrolliert werden. Die Fluidik wurde so verbaut, um Elektronikschäden durch evtl. auslaufende Flüssigkeiten zu vermeiden. Die Baugruppe, welche die Fluidik enthält, kann durch montierte Scharniere an den Seiten des Basisteils angedockt werden.
- **Modularer Aufbau**
Die Zellchips verfügen über eine begrenzte Lebensdauer in bezug auf Häufigkeit und Dauer der Anwendung. Durch einen modularen Aufbau kann ein anderer Zellchip eingesetzt werden.
- **Wahl des Werkstoffs**
Als Werkstoff schien Kunststoff am geeignetsten, da das Gehäuse leicht gesäubert werden kann,

wenn es kontaminiert werden sollte. Zusätzlich schirmt Kunststoff das integrierte Funkmodul nicht ab.

Nach Montage der Elektronik im Inneren des Gerätes kann die Rückseite mit einem Deckel verschraubt werden. Die spätere Bedienung des Gerätes erfolgt über vier Taster und ein Display an der Oberseite des Gehäuses. Im Fluidikteil des Gerätes musste der Biochip, eine Pumpe und zwei Behälter für Nährlösung untergebracht werden. Dieser Teil des Gehäuses wurde so entworfen, dass er an der Unterseite des Basisteils des Gerätes angedockt werden kann. Für die Verbindung beider Teile wurden zwei Halteklammern/Hebelverbinder an der Seite des Gerätes vorgesehen, die per Federkraft den zur Kontaktierung des Biochips nötigen Druck aufbringen können. Die Abb. 5.2 zeigt eine Gegenüberstellung der Gehäuseplanung und des realen Aufbaus.

Befinden sich der Fluidikteil und das Basisteil in getrenntem Zustand, kann ein müheloser Wechsel des Biochips und der Nährlösung nach einer Messung durchgeführt werden. Für die zur Versorgung des Biosensors notwendige Nährlösung wurden an der Seite des Gerätes zwei Hohlzylinder eingelassen, in die bei abgenommenem Fluidikteil zwei Zellkulturröhrchen eingeschoben werden können. Diese Behälter sind über Schläuche mit einer Pumpe und dem Biochip verbunden. Durch die Unterbringung von Nährlösung im Gerät kann ein autarker Betrieb des Systemes gewährleistet werden. Zur Kontrolle des aktuellen Füllstands der Behälter wurden Sichtschlitze vorgesehen. Abb. 5.3 zeigt das Gehäuse als Rohkörper aus ABS-Kunststoff.

5.3. Fluidik

5.3.1. Strömungsanalyse

Zur Abschätzung, ob eine laminare Strömung in den Schlauchleitungen des handheld Biosensors vorliegt, wurde die Reynoldszahl¹ berechnet ([146]). Diese Zahl lässt eine Bewertung zu, mit der abgeschätzt werden kann, ob durch die verwendete Fluidik Verwirbelungen in den Kanälen entstehen, so dass das nährstoffverarmte Medium nicht mehr vollständig ausgetauscht wird [48]. Die Reynoldszahl wird für beide einstellbaren Volumenströme des Geräts berechnet.

Es gilt:

$$Re = \frac{\omega \cdot l}{\nu} \quad (5.1)$$

mit:

Re: Reynoldszahl

ω : charakteristische Strömungsgeschwindigkeit

l: Länge des Fluidiksystems und

ν kinematische Viskosität des Mediums.

Der Volumenstrom beträgt 60 $\mu\text{l}/\text{min}$ (maximal 150 $\mu\text{l}/\text{min}$), der Schlauchinnendurchmesser ist 0,8 mm.

Mit

$$\text{Strömungsgeschwindigkeit } \omega = \frac{\text{Volumenstrom}}{\text{Querschnittsfläche}} \quad (5.2)$$

¹Reynoldszahl: Die Reynoldszahl wird in der Strömungslehre verwendet und gibt das Verhältnis von Trägheits- zu Zähigkeitskräften wieder.

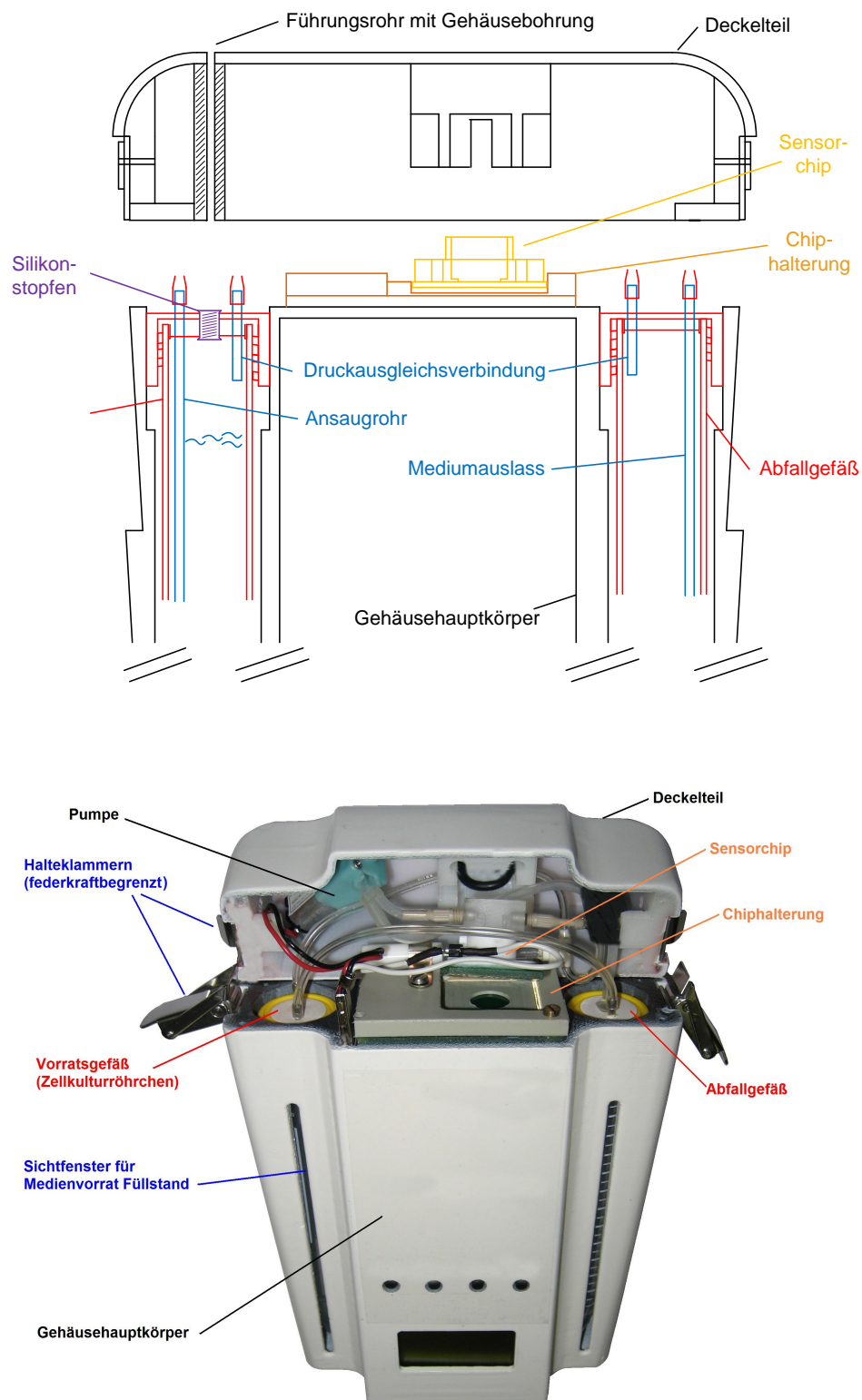
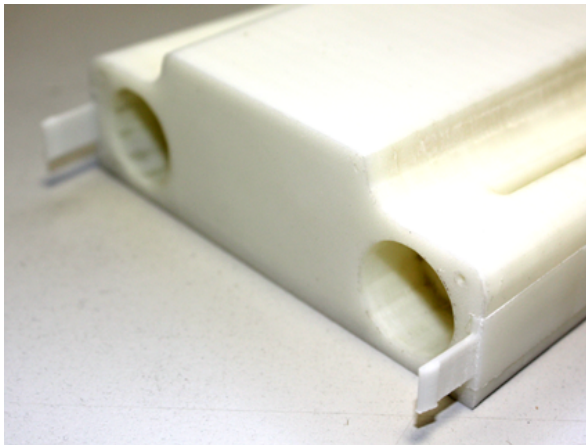
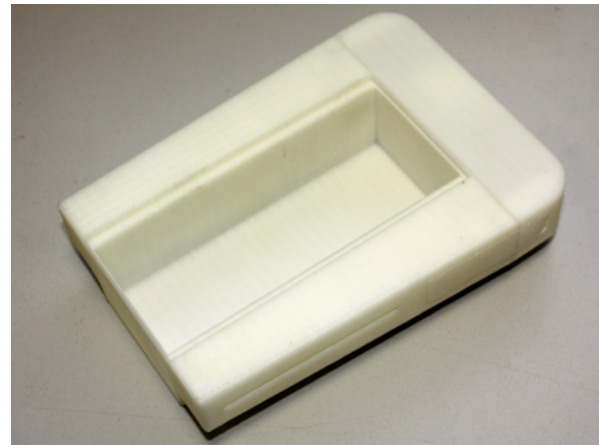


Abb. 5.2.: Konzept des zweiteiligen Gehäuseentwurfs zur Trennung von Elektronik und fluidischen Komponenten. Oben: Querschnittszeichnung der beiden Gehäuseteile; unten: Realansicht des Biosensors



(a) Einschub Fluidtanks im Hauptkörper



(b) Unteransicht ohne Abdeckung

Abb. 5.3.: Detailansicht des Rapid Prototyping Gehäuses.

ergibt sich:

$$\text{Strömungsgeschwindigkeit } \omega_{60\mu\text{l}} = \frac{0,00006 \text{ l/min}}{\frac{1}{4} \cdot \pi \cdot d^2} = \frac{\frac{60 \cdot 10^{-6} \text{ l}}{60 \text{ s}}}{\frac{1}{4} \pi \cdot 0,8 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2} = 2,533 \frac{\text{l}}{\text{s} \cdot \text{m}^2} \quad (5.3)$$

und für 150 $\mu\text{l}/\text{min}$:

$$\text{Strömungsgeschwindigkeit } \omega_{150\mu\text{l}} = 6,332 \frac{\text{l}}{\text{s} \cdot \text{m}^2} \quad (5.4)$$

Mit 1 Liter = 0.001 m³ ergibt sich ein Wert von $\omega_{60\mu\text{l}} = 2.533 \text{ mm/s}$ bei 60 $\mu\text{l}/\text{min}$ und $\omega_{150\mu\text{l}} = 6.332 \text{ mm/s}$ bei 150 $\mu\text{l}/\text{min}$. Als Näherungswert wird dabei die kinematische Viskosität ν von Wasser verwendet. Diese beträgt $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ bei 20°C (nach [147]). Die verwendete Schlauchlänge im Gerät beträgt ca. 25 cm, wobei hier der gesamte zurückgelegte Weg der Flüssigkeit berücksichtigt wurde.

Daraus ergibt sich im vorliegenden Fall eine Reynoldszahl $\text{Re}_{60\mu\text{l}} = 633$ bei 60 $\mu\text{l}/\text{min}$, sowie $\text{Re}_{150\mu\text{l}} = 1583$ bei 150 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Überhalb der Reynoldszahl von circa 2320 wird nicht mehr von einer laminaren Strömung sondern von einer turbulenten Strömung ausgegangen. Diese Fluidik kann daher als laminare Strömung charakterisiert werden.

5.3.2. Referenzelektrode zur pH-Messung

Eine Referenzelektrode ist eine Halbzelle mit einem konstanten Gleichgewichtspotential, welches sich schnell und reproduzierbar einstellt. Sie wird als Bezugspunkt für die Messung von relativen Potentialen anderer Elektroden eingesetzt. Das absolute Potential einer einzelnen Elektrode ist grundsätzlich nicht experimentell bestimmbar, sondern nur die Potentialdifferenz zwischen zwei Elektroden.

In der Abbildung 5.2 ist die Referenzelektrode in das Schlauchsystem des Geräts integriert. Diese Silberchloridelektrode steht nicht direkt mit dem Medium in Kontakt. Durch eine ionenpermeable Membran wird das Zellmedium in einem T-Stück vom Behälter getrennt, in den die Elektrode eintaucht. In diesem sog. Barrel befindet sich eine mit festem AgCl gesättigte 3M KCl-Lösung (siehe Abb. 5.4). Das Diaphragma verhindert, dass Cl-Ionen in das Zellkulturmedium diffundieren. So wird die potentialbestimmende Konzentration konstant gehalten. Nach Sawyer et al. [148] liegt hier eine Referenzelektrode der 2. Art vor.

Folgende Eigenschaften charakterisieren Referenzelektroden für elektrochemische Messungen (nach Sawyer et al.):

- Reversibilität und Nernstsches Verhalten
- Langzeitstabilität
- Keine Hysterese bei geringen Stromflüssen
- Keine Löslichkeit der festen Phase (z.B. Ag/AgCl) im Falle von Referenzelektroden der zweiten Art
- Keine Temperaturabhängigkeit

Der Herstellungsprozess einer Referenzelektrode entscheidet über die Güte der Messwerte. Auf dem verwendeten Sensorchip ist keine derartige Elektrode integriert, so dass auf diese im vorliegenden Fall keineswegs verzichtet werden könnte. Ein leichter Austausch aufgrund von Alterung ist sichergestellt, da diese Referenzelektrode im abnehmbaren Teil des Gehäuses verbaut ist und einfach abgesteckt werden kann. Die Referenzelektrode wird von der Firma cellasys GmbH, München, Germany, erworben (Artikel Nummer 08803 und 08805, [140]).

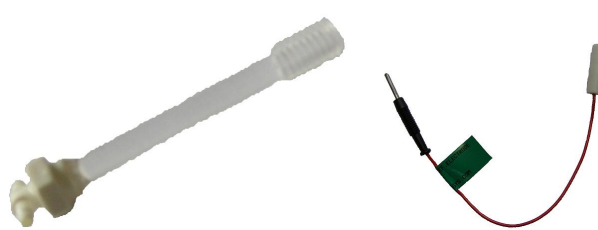


Abb. 5.4.: Barrel und Ag/AgCl Referenzelektrode des mobilen Biosensorgeräts. Der Anschluss wurde mit einem kleineren Stecker versehen, um Platz zu sparen. Foto: cellasys GmbH, Quelle: [140]

5.3.3. Einbringung von Wirkstoff in den geschlossenen Fluidikkreislauf

Der mobile Biosensor besitzt zwei Behälter, einer als Quellgefäß für das Nährmedium der Zellen und ein weiterer als Abfallgefäß für nährstoffdegradiertes Medium. Diese beiden Tanks in Form von Zellkulturröhrchen (Artikelnummer 91253 der Firma TPP AG, Trasadingen, Schweiz) mit einem Volumen von 10 ml finden seitlich in den Flügeln des Geräts Platz. In einem geschlossenen Kreislauf wird sichergestellt, dass weder Luft noch Flüssigkeiten entweichen können. Das Design des Geräts wurde auf die Aufnahme von lediglich zwei Behälter ausgelegt, da dies am meisten Platz spart, flexibel mit der Menge des Mediums umgegangen werden kann (kein Überlauf des Abfallgefäßes bei zwei im Durchschnitt mehr als zur Hälfte gefüllten Quellgefäßen). Ein Dreivegeventil zur Umschaltung zwischen mehreren Quellgefäßen entfällt somit.

Während stationäre Laborgeräte einen Versuch nach vorgegebenem Protokoll durchführen und dementsprechend vorgegeben ist, wann eine Wirkstoffzugabe erfolgt, ist dies hier nicht der Fall. Das mobile Gerät lässt zu beliebiger Zeit die Einbringung von zusätzlichen Reagenzien zu. Dies erfordert aber lediglich eine mechanische Möglichkeit zur Injektion in das Quellgefäß und zum anderen die Berechnung der injizierten Dosis eines zu untersuchenden Toxins.

Zur Einbringung von Wirkstoff in das Quellgefäß wurde das Zellkulturröhrchen im Deckel modifiziert: Ein runder biokompatibler Stopfen aus Silikon mit einem Durchmesser von ca. 3 mm wurde ausgestanzt. Mit einer Dicke von ca. 4 mm klemmt dieser mittig in der Deckelbohrung von 2,5 mm. Durch ein Führungsrohr im abnehmbaren Deckelteil des Geräts kann man mit einer normalen Spritzennadel in das Quellgefäß eindringen, ohne dass die Dichtigkeit beeinträchtigt wird. Pro Versuch wird dieser Vorgang nur ein Mal durchgeführt, da dann Sensorchip und Nährstoffbehälter sowie Abfallgefäß und Schläuche aus Sterilitätsgründen gewechselt werden müssen. In Versuchen zur Dichtigkeit dieses Stopfens zeigte sich, dass mehr

als 10 maliges Durchstechen möglich ist. Die Abb. 5.2 aus dem Kapitel 5.2 zeigt die mechanischen Dimensionen und die Anordnung dieses Systems.

Die Berechnung der Menge, die in das Quellgefäß eingebracht werden muss, lässt sich wie folgt berechnen: Da der Wirkstoff meist in flüssiger Form vorliegt, kann die Dosis, die auf die Zellen wirken soll, als Verhältnis der injizierten Menge zum Volumen im Zellkulturröhrchen des Quellgefäßes berechnet werden. Dazu wurden in den Gehäusehauptkörper des Geräts je zwei Sichtschlitze bei den Behälteraufnahmen gefräst. Die aufgedruckte Skala der Röhrchen kann dadurch abgelesen werden. Eine Überfüllung findet nicht statt, da die injizierte Menge an Toxin in Relation zu der gesamten Nährstoffmenge weniger als 1% beträgt (vgl. „*Pestiziddetektion mit dem handheld Biosensor*“, Kap. 6.6).

5.3.4. Pumpkonzepte

Im Bereich der Mikropumpen gibt es zahlreiche verschiedene Prinzipien. Der Begriff „Mikro“ steht in diesem Zusammenhang weniger für die Abmessungen als für die Dosiermenge. In Tab. 5.1 werden der Übersicht halber auch mikrodosierende Pumpenarten vorgestellt, deren Abmessungen für die gewünschte Anwendung zu groß sind. Die diskutierten Pumpprinzipien sollen dabei nach den folgenden Kriterien bewertet werden:

- Baugröße
- Kosten
- Energieverbrauch
- Fördervolumen
- Fluidkontakt und Austauschbarkeit
- Spülbarkeit

Die gängigsten Mikropumpen sind die Membranpumpe, die Schlauchpumpe, die Mikrozahlringpumpe und die klassischen Axialkolben- und Radialkolbenpumpen sowie die Spritzenpumpe. Auf die Funktionsweise der verschiedenen Lösungen soll hier nicht näher eingegangen werden. Ebenfalls stellen Pumpen wie in [149] beschrieben, die noch nicht kommerziell erhältlich sind, keine Alternative dar. Bis auf eine spezielle Druckpumpe mit Gasentwicklungszellen und die klassische Peristaltikpumpe hat jedes Konzept einen entscheidenden Nachteil: Die Sterilität kann nur durch intensives Spülen mit Desinfekt gewährleistet werden. Durch den Kontakt des Mediums mit nicht austauschbaren Teilen wäre nur noch eine Gamma- oder Plasmabestrahlung der Komponenten denkbar. Dies erlauben aber die elektronischen Komponenten nicht.

Die im Gerät verbaute Peristaltikpumpe erscheint am besten geeignet, da die Stromaufnahme gering ist, es die Baugröße erlaubt, sie im Deckelsystem zu integrieren, das Fördervolumen klein genug und einstellbar ist, nahezu pulsationsfrei arbeitet und bei Bedarf das Schlauchsystem ausgetauscht werden kann.

5.3.5. Schlauchquetschpumpe (Peristaltikpumpe)

Schlauch(quetsch)pumpen, auch Peristaltikpumpen genannt, befördern das Fluid direkt im Schlauch, wobei der Schlauch durch Rollen oder Gleitschuhe abgeklemmt wird. Dadurch ist auch kein Rückschlagventil nötig, das ein Zurückfließen des Mediums verhindert. Durch kontinuierliches Bewegen der Klemmstellen wird das Fluid transportiert (Abb. 5.5).

Der wesentliche Vorteil ist der pulsationsfreie Betrieb sowie die triviale Ansteuerung und die einfache Reinigung des Systems durch Austausch des Schlauches. Die verwendete Pumpe Typ RP-Q1 der Firma Takasago Electric, Inc., Japan, erfüllt die für die Anwendung notwendigen Eigenschaften. Die Leistungsaufnahme beträgt 120 mW bei Vollast. Die Durchflussleistung liegt bei ca. 150 $\mu\text{l}/\text{min}$ und kann durch Reduktion der Betriebsspannung auf bis zu 60 $\mu\text{l}/\text{min}$ reduziert werden. Durch die geringen Abmessungen (vgl. Abb. 5.6) konnte sie in den Fluidikaufsatz des handheld Geräts integriert werden.

Tab. 5.1.: Auflistung der evaluierten Mikropumpen

Typ	Bauart	min. Baugröße [mm]	Kosten (netto, [EUR])	Förderrate (ml/min)
Bartels mp6 micropump	Piezomembran	14x14x3,5	123	50nl-5ml
Thinxxs micropump	Piezomembran	26,2x25,4x12	ca. 100	ab 0,150
Nitto Khoki	Piezomembran	36x36x38	135	0-10
hnp m zr 2521 Niederdruckbaureihe	Mikrozahnring	Ø13, Länge 75	ca. 800-1000 (ausstattungsabhängig)	0,0015 - 9
hnp m zr 2921 Niederdruckbaureihe	Mikrozahnring	Ø13, Länge 75	ca. 800-1000 (ausstattungsabhängig)	0,003-18
hnp m zr 2942 Modulare Baureihe	Mikrozahnring	Ø16, Länge 82	ca. 1000 (mit unten beschriebener Ausstattung)	0,003 - 18
Watson-Marlow 400 F-A1 (Schlauch-Ø: 0,25mm)	Schlauchpumpe	31x48x76,5	ca. 270 (abhängig vom Antrieb)	0,03-0,73
Watson-Marlow 400 F-B1 (Schlauch-Ø: 0,5mm)	Schlauchpumpe	65x70x44,4 (abhängig vom Antrieb)	ca. 225 (abhängig vom Antrieb)	0,04-3,5
Ismatec OEM Einbaupumpen Kassetten-Schlauchpumpe MS/-CA mit DC Motor und Getriebe	Schlauchpumpe	99x88x130	Ca. 500 (Preis orientiert sich an vergleichbarer Pumpe bei Novodirect)	0,001-34,4
Bieri Hydraulik Radialkolbenpumpe 1	Radialkolbenpumpe	Ø50x108	Kein Angebot erhalten	bis zu 60
Bieri Hydraulik Radialkolbenpumpe 2	Radialkolbenpumpe	Ø49x60	Kein Angebot erhalten	bis zu 160
Bieri Hydraulik Axialkolbenpumpe 1	Axialkolbenpumpe	Ø35x100	Kein Angebot erhalten	bis zu 45
Bieri Hydraulik Axialkolbenpumpe 2	Axialkolbenpumpe	Ø30x100	Kein Angebot erhalten	bis zu 96
Bio-Chem Valve Icn. 030 SP	elektromagnetische Membranpumpe	Ø19,5x51	166	0,004-0,96
KNF Membran-Dosierpumpen- System FEM 1.03	elektromagnetische Membranpumpe	129,1x112,8x81,3	173/196	0,03-30
Sapphire Engineering S11 PDP	elektromagnetische Membranpumpe	127x25,4x38,1	Kein Angebot erhalten	0,001-5
Lee Pre-Set Volume Pump Series I	elektromagnetische Membranpumpe	53,34x19,05x15	Kein Angebot erhalten	0,05
Bürkert Typ 7616	elektromagnetische Membranpumpe	41x87,1x23	432	0,005-4,5
Simatec AG Gasentwicklungszelle	Druck	Ø12x5	1/Stück	µl Bereich
cetoni NEMESYS Spritzenpumpe	Gleichstrom Servomotor	310x180x130		500nl - 200µl und mehr
Takasago Electric, Inc. Miniatur Schlauchpumpe RP-Q1	Schlauchpumpe	30x14x12	50	60µl-450µl

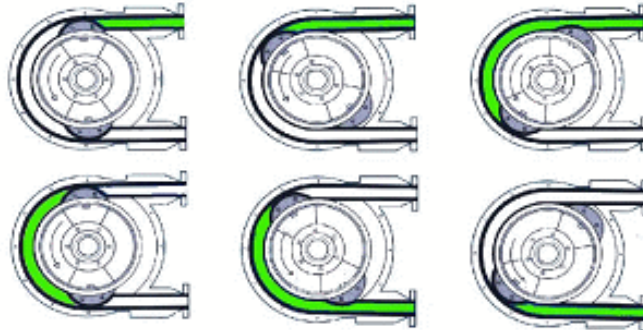


Abb. 5.5.: Prinzip einer peristaltischen Pumpe. Quelle: Steinle Industripumpen GmbH, Düsseldorf

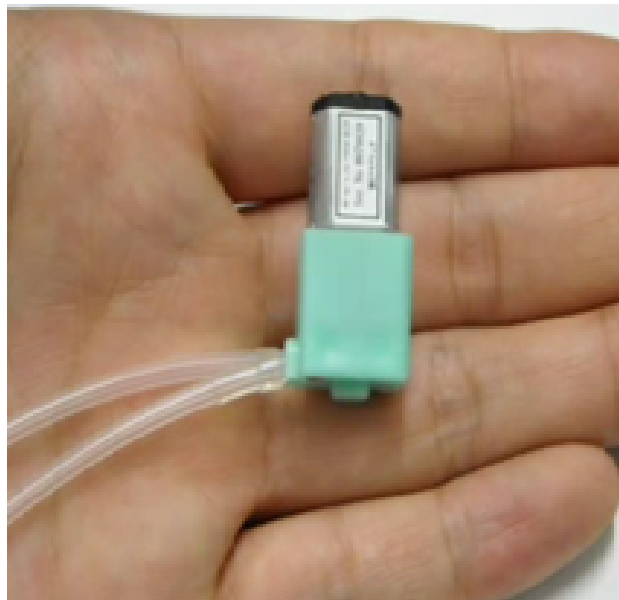
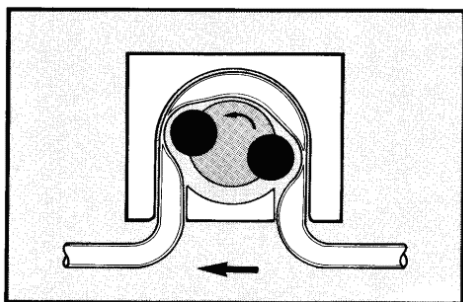


Abb. 5.6.: Schema und Realansicht der verwendeten Mikro-Schlauchquetschpumpe RP-Q1. Quelle: Takasago Electric, Inc.

6. Exemplarische Versuchsreihen zur Demonstration der Leistungsfähigkeit des handheld Biosensors

6.1. Handhabung der Biomaterialien

6.1.1. Chiptest

Um sichergehen zu können, dass die Sensoren des BioChip-C gültige Ergebnisse liefern, muss ein Funktionstest durchgeführt werden. Dieser sog. Chiptest prüft qualitativ, ob die elektrochemischen Sensoren für pH und Sauerstoff sowie der Temperatursensor Ausgangssignale im erwarteten Bereich liefern. Zusätzlich werden die Impedanzwerte ausgegeben, um Sensordefekte zu erfassen. Sämtliche Tests werden mit dem IMOLA-System der Firma cellasys GmbH durchgeführt. Dieses Messgerät ist für die in-vitro Diagnostik an lebenden Zellen zugelassen, arbeitet aber mit den selben Sensorchips, so dass ein Chiptest mit diesen Geräten legitim ist.

Verwendete Geräte und Medien

Zum Test kommen die Geräte IMOLA 1 bis 6 mit den Seriennummern CER-0015 bis CER-0020 inkl. der Auswertesoftware *IMOLA 6port Ceramic Sensor Control V1.1* zum Einsatz. Sie werden mit dem selben Typ an Sensorchips bestückt, die später für die Getränke- und Pestizidtests verwendet werden. Jeder verwendete Chip wird vor der Durchführung der eigentlichen Versuche diesem Test unterzogen. Um eine Fehlfunktion des Testgerätes auszuschließen, liefert ein Dummy feste Werte, die vordefiniert sind.

Die Chips wurden 0,5 Stunden vor dem Test mit ca. 400 μl PBS¹ befüllt und bei Raumtemperatur inkubiert. Bei längerer Vorinkubation (erfahrungsgemäß 3 bis 4 Stunden) verkürzt sich die „Einschwingphase“ zu Beginn der Messung, stabile Werte können schneller akquiriert werden.

Konfiguration des Versuchsaufbaus

Ein absolut detaillierter Versuchsablauf ist hier nicht Gegenstand der Beschreibung, deshalb sollen hier nur die wesentlichen Parameter und Schritte beschrieben werden. Alle genannten Grenzen/Arbeitspunkte sind Erfahrungswerte und basieren auf zahlreichen Messungen mit dem IMOLA-System.

1. Vorbereitung des Fluidiksystems
 - Befüllen des Schlauchsystems
 - Luftblasenfreies Aufsetzen des Sensorchips auf den Fluidikkopf
 - Testlösungen (PBS unterschiedlicher pH Werte und Sauerstoffkonzentrationen) bereitstellen
2. Einstellung der Softwareparameter
 - Konfiguration der Ismatec Pumpe (1min pumpen, 1min Pause)
 - Einstellung des Arbeitspunktes für den Sauerstoffsensoren zu -600mV
 - Impedanz- und Sauerstoffsensorerfassung aktivieren
 - Flussrate der Pumpe zu 150 $\mu\text{l}/\text{min}$
3. Versuch starten
4. Messwerte der Sensoren kontrollieren, ob diese im erwarteten Bereich liegen (aussagekräftig sind hier die nachfolgenden Messgraphiken)

¹PBS: Phosphate Buffered Saline

5. Wechsel der Messmedien (pH Wechsel und Änderung der Gelöstsauerstoffkonzentration)

O₂ -Sensor

Die Werte sollten zwischen 500 mV und 1900 mV liegen. Bei neuen Chips dürfen die Werte bis 2000 mV ansteigen. Je älter der Chip, desto niedriger der Wert (aufgrund von Elektrodenalterung). Werte größer 1500 mV sind gültig für O₂-arme Medien (siehe Abb. 6.1).

Werte über 2080 mV deuten meist auf Flüssigkeit auf den Kontakten oder defekte Sensoren hin. Werte von 0 mV zu Beginn der Messung sind meist Kontaktfehler zwischen der Chipaufnahme und der Sensorplatine (Erfahrung). Bei defekten (zu alten) Sensoren kann der Wert während der Messung auf 0 mV fallen (siehe Abb. 6.2).

Temperatursensor

Die Werte sollten bei 1400 mV bis max. 1880 mV liegen.

Treten Messwerte außerhalb dieses Intervalls auf, liegt ein schlechter Kontakt vor oder der Sensor ist defekt. Eine Beispielmessung zeigt Abb. 6.3, wobei die Oberflächentemperatur auf dem BioChip-C beim IMOLA-System durch einen Rohwert in mV repräsentiert wird.

pH Sensor

Die Werte sollten sich in einem Bereich von 100 mV - 1000 mV (ohne Referenzelektrode) oder 400 mV - 2500 mV (mit Referenzelektrode) einpendeln (vgl. Abb. 6.4).

Sind unplausible Messwerte oder starkes Rauschen zu beobachten, liegt meist ein Kontaktproblem vor (vgl. Abb. 6.5).

Impedanzwerte

Bei allen IMOLAs liegen die Werte für R und C zwischen 800 Ω bzw. 800 pF und 4000 Ω bzw. 4000 pF. Höhere oder niedrigere Werte deuten auf einen schlechten Chipkontakt oder defekte Sensoren hin (z.B. Inhomogenitäten des SU-8 Lacks (Passivierung), abgelöste Bondingdrähte etc.).

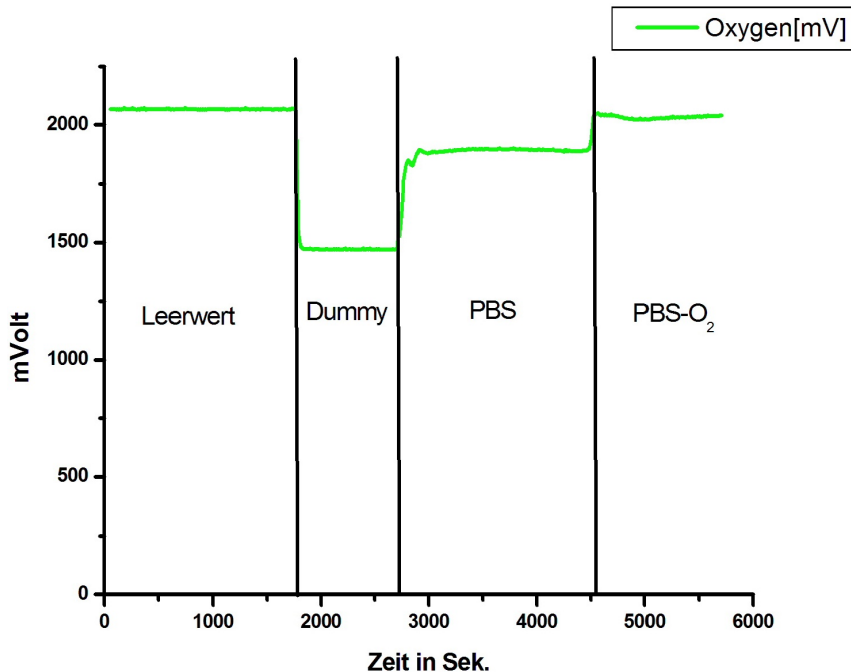


Abb. 6.1.: Sauerstoffkurve beim beim BioChip-C Chiptest.

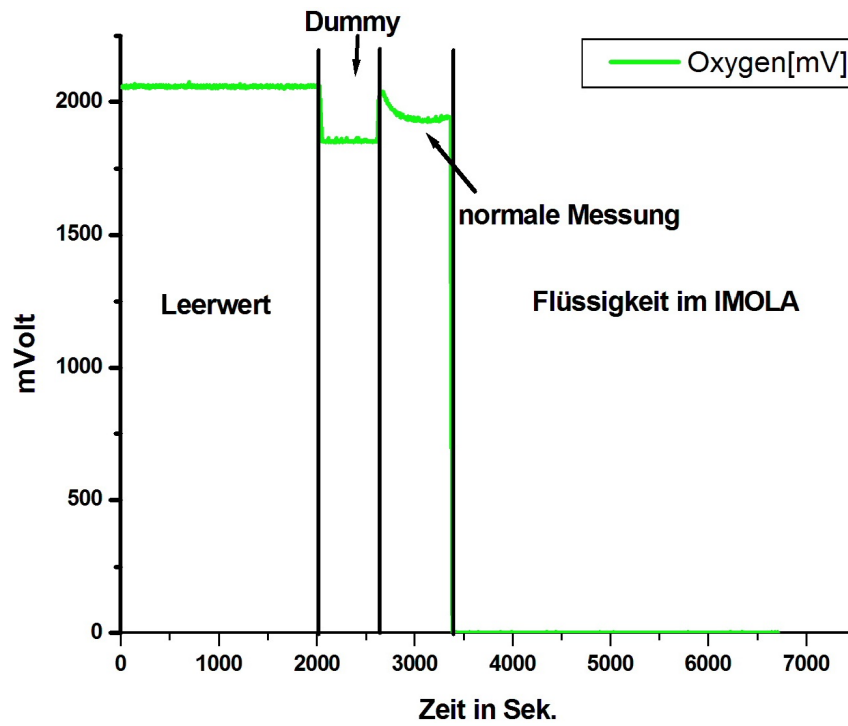


Abb. 6.2.: Sauerstoffkurve beim BioChip-C Chiptest bei verschmutzten Kontaktflächen.

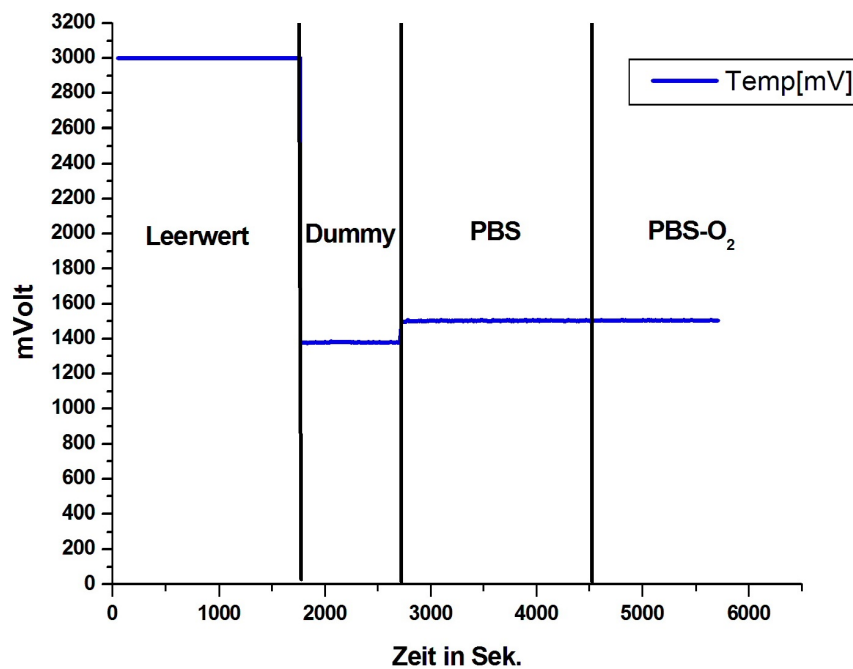


Abb. 6.3.: Temperaturkurve beim BioChip-C Chiptest.

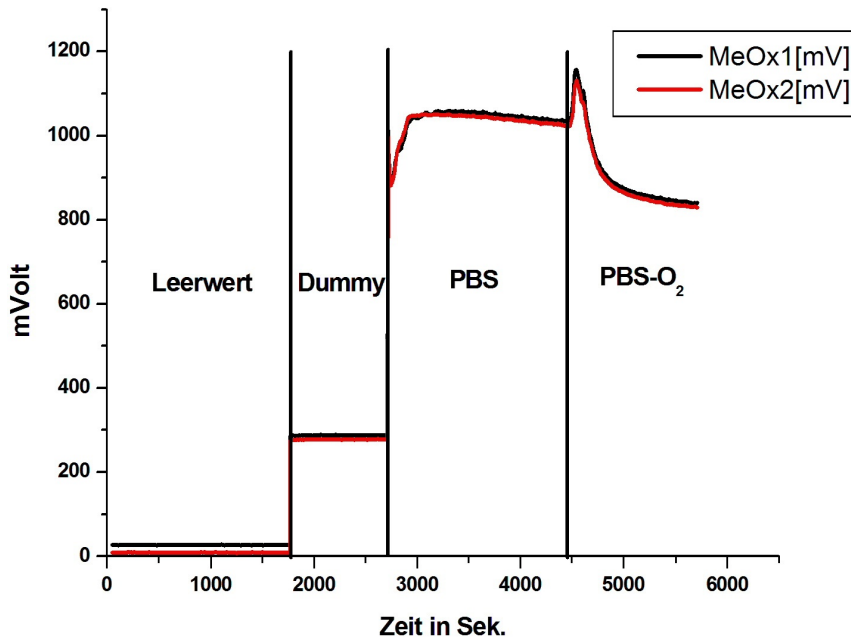


Abb. 6.4.: pH-Wertkurve beim BioChip-C Chiptest.

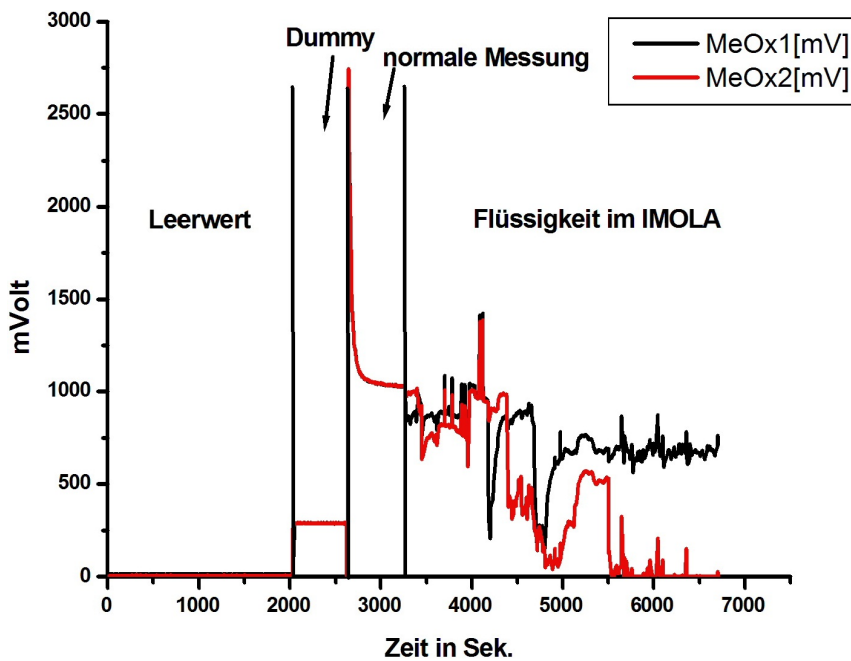


Abb. 6.5.: pH Sensortest bei schlechtem Chipkontakt zur Messplatine

6.1.2. Hefezellen

Hefen sind runde bis ovale Einzeller und gehören zu der Gruppe der Ascomyceten [53]. Dadurch, dass sie fakutativ² anaerob oder aerob sind, können sie bei der Atmung Zucker in Kohlenstoffmonoxid (CO) umwandeln und bei der Fermentation zusätzlich Alkohol bilden.

²fakutativ: Der Stoffwechsel der Hefe kann anaerob aber auch aerob stattfinden

Tab. 6.1.: *Verwendete Hefesorten zur Bestimmung der bestmöglichen Eignung für den BioChip-C*

Trockenhefe	Frischhefe
Vita Vegan	Bioreal
Back-Hefe trocken	Dr. Moormanns
Fabulo	Wieninger Hefe
Dr. Oetker	Dr. Oetker

Die Bäckerhefe (lat. *Saccharomyces cerevisiae*) ist 5-10 μm groß. Sie ist, im Gegensatz zur Sauerteighefe, triebstark und unverträglich auf Säure, Salz, Fett und Kohlenstoff. Die Zellteilung erfolgt bei einer Temperatur zwischen 20°C und 25°C, die Apoptose setzt ab 45°C ein [8]. Anders als bei manchen Tumorzellen setzen sich Hefen nicht an Oberflächen fest (nicht adhärent). Um das Wegspülen von Zellen während des Pumpvorgangs zu verhindern, muss ein *Weißband Filter* mit der Porengröße 4-12 μm eingesetzt werden. Durch die raue Oberflächenstruktur der Zellulose bleiben die Zellen auf Grund ihrer Größe im Gewebe hängen. Auf diese Art kann der Sensorchip die entstandenen Reaktionsprodukte vermessen und in Spannungssignale umwandeln. Membranfilter (wie z.B. von der Firma Millipore angeboten) sind nicht geeignet, da auf Grund der sehr feinen Struktur der einzelnen Filterarten die Zellen weniger gut hängen bleiben.

6.1.3. Lagerung und Reaktivierung von Hefe

Die Versuchsreihen beziehen sich sowohl auf die Zeitspanne der Trockenzeit als auch auf die Lagertemperatur. Diese Tests sind notwendig, da in einem zukünftigen Anwendungsszenario Hefen als Signalwandler bzw. Sensoren in Kombination mit den Sensorchips als Einmalartikel angeboten werden sollen. Verfolgt man dieses Vorhaben, muss genau bekannt sein, ob und in wie weit sich die Lagerung (Temperatur und Dauer) auf die Güte der Zellen auswirkt.

Versuchsbeschreibung

Die gestanzten Zellulosefilter werden für einen Tag in Alkohol sterilisiert und getrocknet. Bei drei Zeitmessungen werden jeweils zwei Filter für den Gefrierschrank (-20°C), zwei für den Kühlschrank (7°C) und zwei bei Raumtemperatur (25°C) benötigt.

Die Filterpapiere werden mit 10 μl Hefesuspension der Konzentration 1 mg/ml bedeckt und anschließend für einen Tag zum Trocknen in den Kühlschrank gelegt. Gemessen wurde am ersten, am achten und am 29. Tag mit jeweils zwei Filter der entsprechenden Aufbewahrungsorte. Die Tabelle 6.1 listet die verwendeten Hefesorten auf.

Auswirkungen von Lagerdauer und Lagertemperatur

Der Einfluss der Lagertemperatur (Raumtemperatur, Kühl- und Gefrierschrank) auf die Zellaktivität konnte als vernachlässigbar eingestuft werden. Die nachfolgenden Messkurven (Abb. 6.6) zeigen, dass sich die Sauerstoffverbrauchsrate nicht mit der Lagerungstemperatur korrelieren lässt. Es wurden stets signifikant große Signalamplituden gemessen. Dabei ist der Gradient der jeweiligen Kurven nahezu identisch (Chip: BioChip-C L800-2a-16, Temp.: 25°C, gleiche Vorinkubationszeit (1 Std.), Vita Vegan).

Die Auswertung des pH-Werts ist hier vernachlässigbar, da die Zellen einen aeroben Stoffwechsel betreiben.

6.1.4. Optimierung der Hefekonzentration und der Pumprate

Die optimale Zellzahl ist die Konzentration an Hefen, mit der der Sensorchip die Stoffwechselprodukte in eindeutige Messwerte umwandeln kann, wobei größtmögliche Signalamplituden bei minimalem Mediumverbrauch wünschenswert sind. Zu wenige Zellen bedeuten eine Unterschreitung der Detektionsschwelle der Sensorchips. Werden zu viele Zellen auf dem Chip kultiviert, entsteht ein dichter Zellrasen mit mehreren

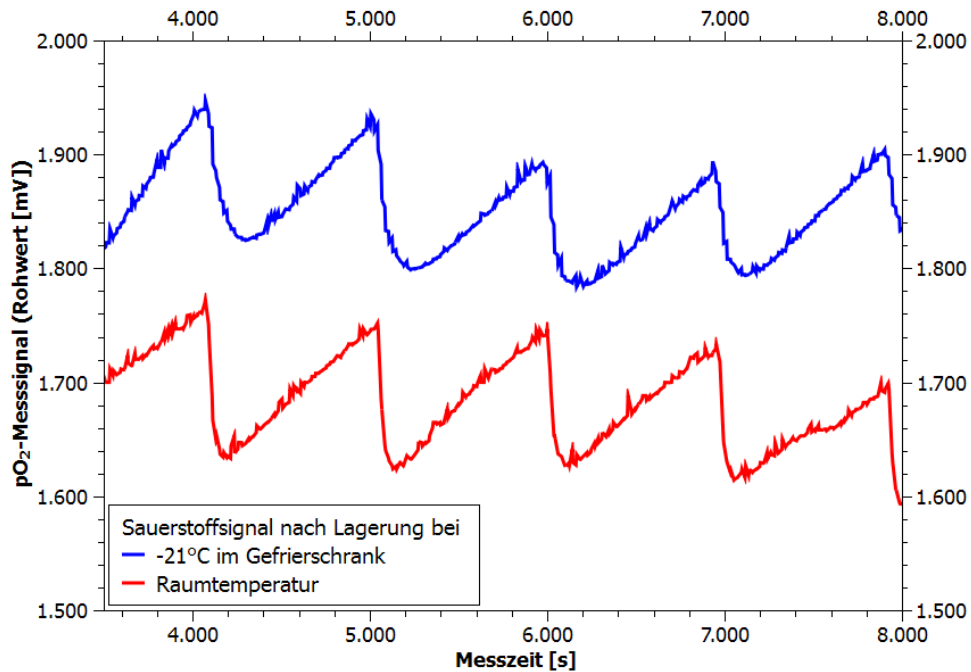


Abb. 6.6.: Gegenüberstellung der Sauerstoffsensorsignale von Hefe nach dreimonatiger Lagerung bei RT und im Gefrierschrank.

übereinander liegenden Schichten. Dieser kann nur noch nahe des Fluidikkopfes mit Medium versorgt werden, während die am Chip anliegenden Schichten aufgrund der Bedeckung unterversorgt sind. Für diesen Versuch wurden zwei Tests mit Dr. Oetker Trockenhefen durchgeführt.

Versuchsbeschreibung

Bei diesen Tests wird die Trockenhefe bei Raumtemperatur verwendet. Die Zeitspanne der Vorinkubation beträgt exakt 30 Minuten. Als Nährmedium wird eine 10 mM Glukose-PBS Lösung verwendet. Suspensionen der Konzentrationen 0,1 mg/ml bis 10 mg/ml werden getestet. Ist die optimale Konzentration durch die Versuchsreihe gefunden, wird mit Hilfe der „Zählkammer“ nach Thoma die genaue Zellzahl ermittelt. Hier ergab die Auszählung der Suspension einen Wert von ca $5,8 \cdot 10^8$ Zellen pro ml.

Ergebnisse

Aufgrund der begrenzten Volumina im Reservoir (Zellkulturröhrchen als Nährstofftank, vgl. Gehäusekonstruktion in Kap. 5) und der Berücksichtigung eines pulsationsmoderaten Betrieb der Pumpe wird eine Fließrate von 150 $\mu\text{l}/\text{min}$ angestrebt. Die Tabelle 6.2 zeigt die Einstellungen, die zu der Messkurve in Abb. 6.7 führten.

Tab. 6.2.: Parameter der Messphasen in Abb. 6.7

Phase	1	2	3	4	5	6	7
Pumprate [$\mu\text{l}/\text{min}$]	1111	150	150	150	150	150	60
Pumpdauer [min]	1	3	1	1	5	3	7
Pumppause [min]	15	10	5	1	5	7	3

Die Beobachtungen der Phasen in Abb. 6.7 lassen darauf schließen, dass bei einer Fließrate von 150 $\mu\text{l}/\text{min}$ ein Pumpintervall von 3 zu 7 Minuten ideal ist.

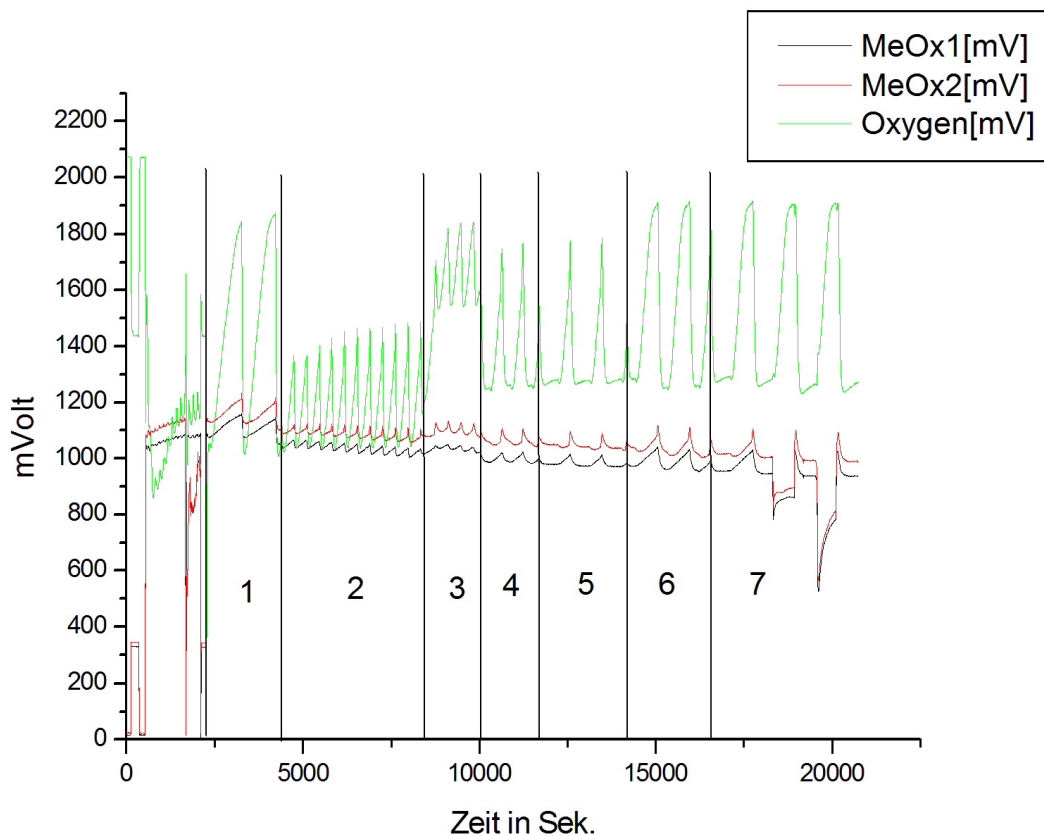


Abb. 6.7.: Hefekonzentration: 100 mg/4ml mit unterschiedlichen Pumpspausen und variabler Pumprate

6.1.5. Reinigung des Systems

Das geschlossene Fluidsystem ist wartungsfrei, muss aber nach jeder Messung ersetzt werden. Sollte die Herstellung des verwendeten Sensorchips sehr kostengünstig möglich sein und zudem der fluidische Aufsatz des Handhelds als Spritzgussteil nur noch einige Cent kosten, kann der Aufsatz als Disposable betrachtet werden. Die Sterilität wäre dann durch Wechsel des biohybriden Aufsatzes stets gewährleistet. Kann eine mehrfache Verwendung trotz allem nicht vermieden werden, muss das System gereinigt bzw. sterilisiert werden [150]:

Nach der Messung werden ca. 3 ml Hypochlorid mit einer Spritze durch das geschlossene Schlauchsystem mit angeschlossenem Chip gezogen und nach ca. 20 Minuten mit Aqua. Dest. nachgespült. Beim verwendeten Chip wird der Dichtungsring mit dem Filterpapier entfernt, dann nochmals mit Aqua. Dest. gespült und zum Trocknen gelegt.

6.2. Getränketests mit Hefen als Signalwandler

Unter der Bekanntmachung Nr. 02/10/51 über die Durchführung eines Forschungsvorhabens im Bereich gesundheitlicher Verbraucherschutz mit dem Titel „Humanstudie zur Wirkung von Koffein und Taurin aus Energy Drinks auf Parameter des Herz-Kreislaufsystems“ forciert die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung seit April 2010 die Lebensmittelanalytik. Die Studie soll erforschen, welche Wirkungen die in Energy Drinks eingesetzten Stoffe Koffein und Taurin auf Parameter des Herz-Kreislauf-Systems junger Erwachsener haben. Die in dieser Arbeit dargestellten Versuche waren bereits im Jahr 2009 ein

Versuch der Arbeitsgruppe um Prof. Bernhard Wolf, Energy Drinks zu charakterisieren. Dabei wurde die Wirkung zweier kommerziell erhältlicher Bio-Drinks auf Hefen untersucht, wobei es lediglich um die Erkenntnis ging, ob zwei unterschiedliche Energy Drinks mittels Hefen als Signalwandler unterschieden werden können. Eine qualitative Auswertung zeigte Erfolg, wobei die Versuche nicht näher quantifiziert wurden, da es praktikabler erschien, weitere Arbeit in die Detektion von Pestiziden zu investieren (siehe Kap. 6.3). Dennoch sollen hier die Energy Drink Versuche erwähnt werden.

6.2.1. Herkömmliche Getränkeanalyse

Die Qualitätskontrolle bei Getränken ist ein aufwendiger und komplizierter Prozess und kann nicht in wenigen Worten dargelegt werden. Dennoch soll hier ein grobes Vorgehen skizziert werden. Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Methoden, um die Qualität eines Getränkes zu testen: Eine chemisch-technische Analyse und eine mikrobiologische Analyse.

In der chemisch-technischen Abteilung erfolgen die Untersuchungen von Rohstoffen, Zwischen- und Nebenprodukten, Fertigerzeugnissen, Hilfs- und Betriebsmitteln mittels der mechanischen und chemisch-technischen Methoden der klassischen Laboranalytik.

Die mikrobiologische Qualitätskontrolle (laut Auskunft der *Adelholzener Heilquelle*) lässt sich in zwei Bereiche unterteilen: Analyse von Mineral- und Heilwasser sowie Untersuchung von Süßgetränken [151]. Auf die letzt genannten wird hier nicht näher eingegangen. Mineral- und Heilwässer werden gemäß MTVO (Mineral- und Tafelwasserverordnung) untersucht, wobei die Untersuchung auf E.coli und coliforme Keime einen wichtigen Parameter darstellt [151]. Die Analyse dauert bis zu drei Tage. Ein wichtiger Parameter zur Freigabe der Ware besteht in der Auswertung der Laktosebouillon-Proben³, welche maßgeblich zur Festlegung einer Karenzfrist von 30 Stunden beiträgt. Allgemein lässt sich behaupten, dass Getränkekeime über eine Bebrütung auf Agarplatten oder Nährkartonscheiben nach vorangegangener Membranfiltration nachgewiesen werden [153].

6.2.2. Versuchsdurchführung und verwendete Energy Drinks

Die Geräte- und Chipvorbereitung erfolgte ähnlich wie in Kapitel 6.3.6: In das IMOLA-System wurden sechs biohybride Sensorchips der Serien L799 und L800 nach vorhergehender Bestückung mit Hefezellsuspension eingesetzt. 20 μ l der Hefezellsuspension, hergestellt aus einer Mischung von 100 mg Hefe (Vita Vegan, Dr. Oetker) in 4 ml PBS, wurden auf das ausgestanzte Filterpapier mittig aufgebracht. Die so vorbereiteten Plättchen wurden mit der Zellunterseite in die Kavitäten der Chips gelegt. Bei 30°C vorgeheizter Inkubatorortemperatur wurde der Versuch nach ca. einer Stunde mit PBS (pH 7,1) mit 10 mM Glucose als Nährmedium gestartet. Die Intervallzyklen der Pumpe zur Nährstoffversorgung wurden auf eine Minute Dispensieren und 14 Minuten Pause gesetzt.

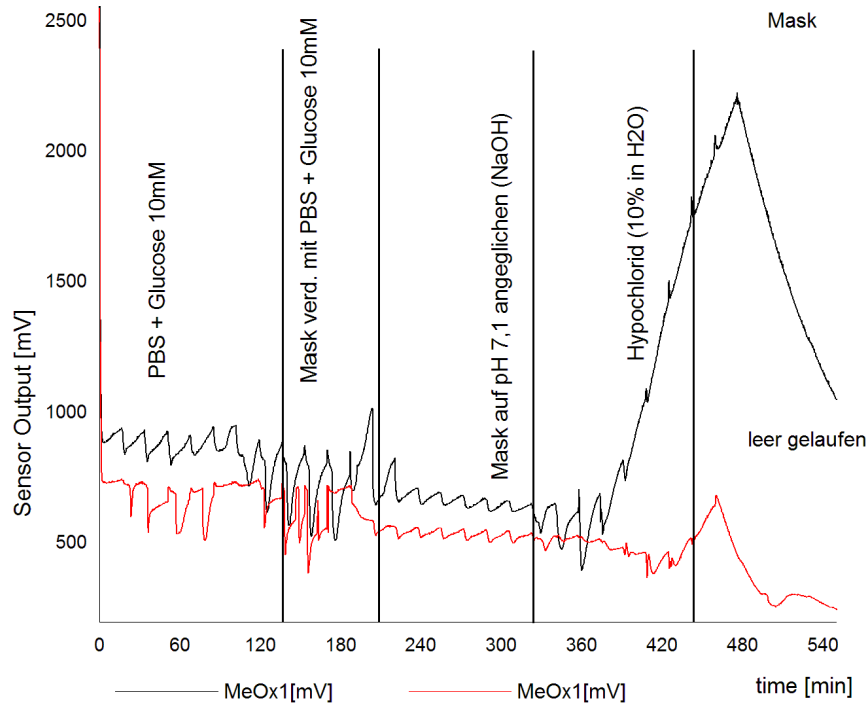
Die beiden für den Versuch benötigten Getränkedosen Typ *Mad Bat* und *Mask* wurden von der Firma EDEKA ZENTRALE AG & Co. KG bezogen. Nachdem die beiden verwendeten Energy Drinks einen gemessenen pH-Wert von ca. 2,1 aufwiesen, wurde diese an einen annähernd physiologischen Wert von 7,0 mit Hilfe von ein-molarer NaOH Lösung gebracht. Die gemessene Osmolarität der beiden Energy Drinks nach Zugabe von NaOH wurde zu 5,49 osmol/kg bestimmt. Die einzelnen Phasen und die Dauer der Mediumzugaben ist aus den Abb. 6.8 und 6.9 ersichtlich.

6.2.3. Ergebnisse und Charakterisierung der Energydrinks (Getränketest)

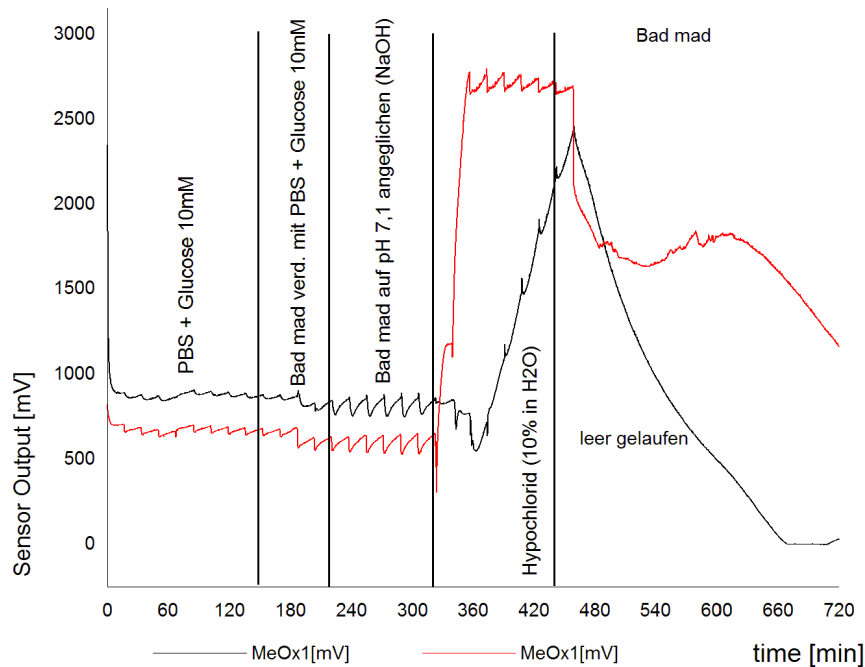
Die Reaktion der verwendeten Energydrinks auf Hefen kann klar gezeigt werden. Die Beeinflussung der Vitalitätsparameter (pH und O₂) ist anhand der Rohdaten deutlich ersichtlich (vgl. Abb. 6.8 und 6.9). Dabei wurden die Phasen der Messung klar durch Trennstriche innerhalb der Graphik gekennzeichnet:

³Test und Nachweismethode von Keimen in der Lebensmittelproduktion durch Bestimmung der Trübung und der Gasblasenbildung der Testsuspension [152]

Zuerst wurde nur reines Medium mit Glukose zyklisch über den Chip mit den Hefen gepumpt, wobei sich eine relativ konstante Stoffwechselaktivität einstellte. Es folgte eine Phase, in der der jeweilige Energydrink direkt dem Medium zugegeben wurde. In der nächsten Phase wurde das Medium komplett durch den Energydrink ersetzt, wobei der pH-Wert durch Zugabe von NaOH auf einen Wert von 7,0 angeglichen wurde. Eine abschließende Desinfektion mit Hypochlorid beendete den Versuch.



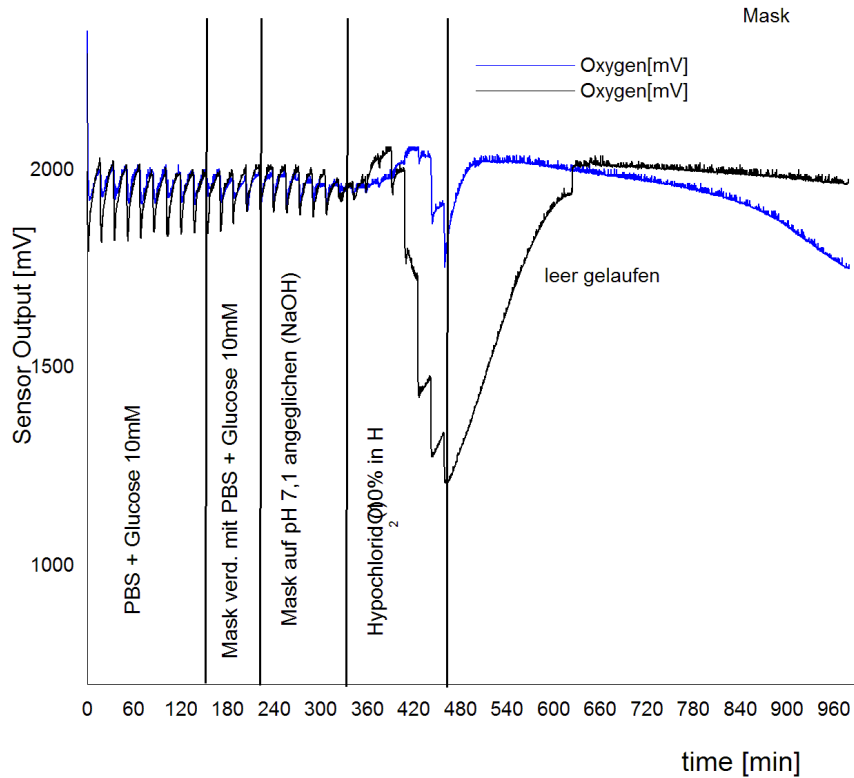
(a) Sensorrohwert des pH von Energydrink „Mask“



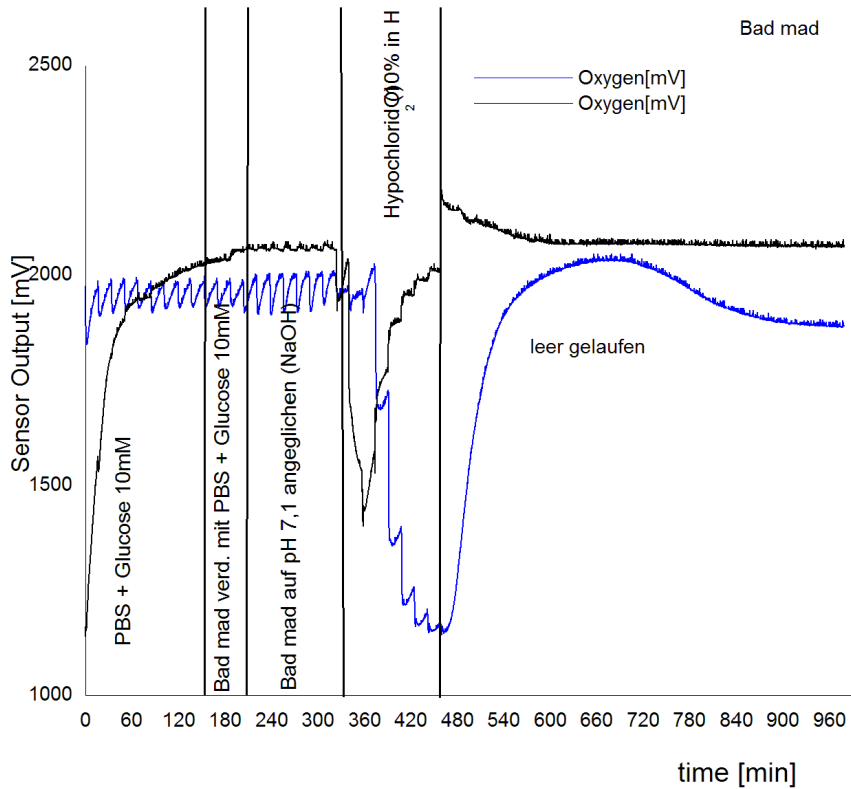
(b) Sensorrohwert des pH von Energydrink „BadMad“

Abb. 6.8.: Darstellung der pH-Wert Rohdaten zweier Energydrinks in verschiedenen Messphasen.

6. Exemplarische Versuchsreihen



(a) Sensorrohwert des Sauerstoffpartialdrucks von Energydrink „Mask“



(b) Sensorrohwert des Sauerstoffpartialdrucks von Energydrink „BadMad“

Abb. 6.9.: Darstellung der Sauerstoffverbrauchs-Rohdaten zweier Energydrinks in verschiedenen Messphasen.

Die Amplituden der dargestellten Daten (Ansäuerungs- und Sauerstoffverbrauchszyklen) wurden erfasst und anschließend normiert. Aus Abb. 6.10 geht hervor, dass unterschiedliche Energydrinks einen unterschiedlichen Einfluss auf das Stoffwechselverhalten von Hefen haben. Dies lässt auf unterschiedliche Bestandteile in den Inhaltsstoffen schließen. Dabei soll nur eine vergleichende Darstellung der Stoffwechselparameter bei Zugabe der Energydrinks auf die Zellen im relevanten Zeitbereich der Messung gezeigt werden. Eine weitere Interpretation der Ergebnisse soll aber dem Leser vorbehalten bleiben, da diese Versuche nicht der Schwerpunkt dieser Arbeit sind. Damit sollte lediglich gezeigt werden, dass es mit dem hier vorgestellten Biosensor mit Hilfe von Hefezellen möglich sein könnte, Lebensmittel zu analysieren. Es sollte auch ein Anstoß sein, in zukünftigen Forschungen dies näher zu beleuchten und auf biologisch fundierte Tatsachen zurückzuführen.

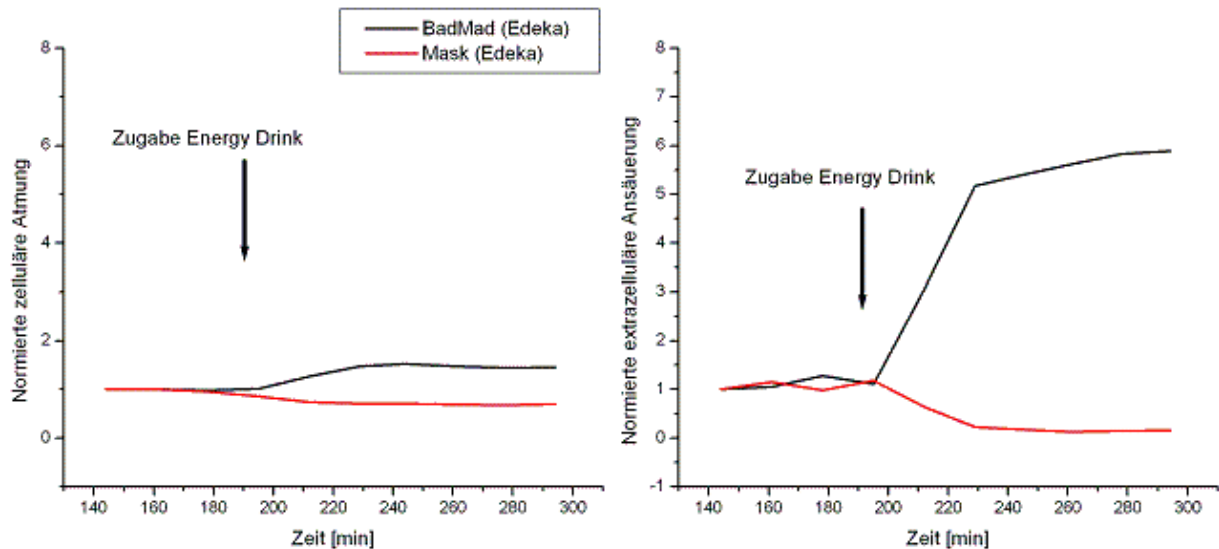


Abb. 6.10.: Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs zweier Energydrinks. Die normierten Kurven der zellulären Atmung (links) und der extrazellulären Ansäuerung (rechts) zeigen einen deutlichen Unterschied.

6.3. Prozessparameter zur Pestiziddetektion mit lebenden Zellen

6.3.1. Messtechnischer Hintergrund

Die Umweltindustrie soll laut [154] bis 2020 die wichtigste deutsche Leitindustrie mit einem Anteil von 14% des Bruttoinlandsprodukts sein. Daher könnte eine mögliche Anwendung des handheld Biosensors die Untersuchung von Waschwasser bei Obst sein. Um hier erste Anhaltspunkte der detektierbaren Konzentration eines Schadstoffeintrags zu bekommen, wurde die Auswirkung von Pestiziden unterschiedlicher Verdünnung im Nährmedium von Hefezellen untersucht.

Die ersten Versuche wurden mit *Neudo*[®]-Vital Obst-Pilzschutz, *Roundup*[®] LB Plus Unkrautfrei, *Dithane NeoTec*, *Universal Pilzfrei M* und *Celaflor*[®] Gemüse-Pilzfrei *Saprol*[®] auf dem IMR System durchgeführt. Die ersten beiden Versuchsreihen dienen zur Orientierung, ob sich Hefezellen grundsätzlich eignen und ob Konzentrationsunterschiede der zugefügten Pestizide detektiert werden können. In Versuchen mit weiteren Pestiziden wurden die Ergebnisse statistisch hinterlegt.

Diese Vorversuche stellen die Basis für die weitere Messung mit dem IMOLA System dar. Hierbei wird gezeigt, dass sich das oben beschriebene Prinzip auf einen anderen Sensortyp (BioChip-C) übertragen lässt. Hierbei wurden jedoch nicht mehr alle oben genannten Pestizide untersucht, da bereits bewiesen werden konnte, dass sich Hefe hierbei generell als Signalwandler eignet. Die Ergebnisse des Versuchs werden ebenfalls statistisch untermauert dargestellt.

Nachdem nun die Versuche mit dem IMR System die biologische Wirkungskette validiert hatten und das IMOLA System die Eignung des BioChip-C unter Beweis stellte, wurden Messungen mit dem in dieser Arbeit beschriebenen handheld Biosensor durchgeführt. In Kapitel 6.6 wird die Tauglichkeit anhand repräsentativer Messungen bewiesen. Hierbei wird das Fungizid *Celaflor*[®] *Gemüse-Pilzfrei Sapro*[®] charakterisiert.

6.3.2. Abschätzung der optimalen Zellkonzentration von Hefe auf Filterpapier im BioChip-C und in der Multiwellplatte

Hefezellen sind nicht adhären. Um sie zu immobilisieren, werden sie mit Hilfe von Filterpapier in den Wells fixiert. Diese werden mit einem Korkbohrer auf 6 mm ausgestanzt, dies entspricht in etwa dem Durchmesser der Wells der Mikrotiterplatten. Die ideale Konzentration von Hefe auf Filterpapier brachte beim BioChip-C folgendes Ergebnis (vgl. Kap. 6):

100 mg Trockenhefe müssen in einer Mischung aus 4 ml PBS zusammen mit 10 mM Glukose als Suspension auf ein Filterpapier aufgebracht werden. Dabei sind 20 μ l dieser Lösung auf ein kreisrundes Filterpapierplättchen mit einem Durchmesser von 9 mm zu tröpfeln. Dies entspricht dem Durchmesser des Zelltöpfchens eines BioChip-Cs. Die Gesamtfläche $A_{\text{BioChip-C}}$ dieser Zellsuspensionswirkfläche beträgt somit $A_{\text{BioChip-C}} = r^2 \cdot \pi = 63,6 \text{ mm}^2$.

Bei der verwendeten sensorbestückten Multiwellplatte beträgt die Fläche eines der ausgestanzten Filterpapiere $A_{\text{Multiwellplatte}} = r^2 \cdot \pi = 28,3 \text{ mm}^2$. In Relation zum BioChip-C beträgt der Flächenanteil nur 44,5%. Damit muss die Menge der auf das Filterpapier aufzubringenden Hefesuspension um 55,5% reduziert werden. Ein Volumen von 8,9 μ l ist zu verwenden.

6.3.3. Nährmedium und Zellorganismus

Als Nährmedium für die Hefe wurde 0,9% KCl-Lösung mit 10 mM Glukose verwendet. Es wurde kein Puffer zugegeben, um die eventuelle Ansäuerung zu detektieren. Das Medium war stets am Vortag hergestellt worden. Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurden alle Wells der Multiwellplatten als auch die Kavität der BioChip-C Sensoren sowie die Vorratsgefäße gefüllt.

Für die Versuche wurde die Trockenhefe *Vita Vegan Back-Hefe trocken* der Charge mit dem Haltbarkeitsdatum 03.06.2010 verwendet. Sie wurde im Gefrierschrank bei ca. -20°C mehrere Wochen gelagert. Als Filter kam S&S Rundfilter, Typ 589² Weißband aschefrei der Firma Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Germany, mit einer Porengröße von 4-12 μ m zum Einsatz. Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurde die Suspension mit 100 mg Hefe, 4 ml PBS mit 10 mM Glukose bei Raumtemperatur angesetzt.

6.3.4. Methodik der Datenauswertung

Auf eine Glättung der Rohdaten oder der Daten, die als Ansäuerungsrate und/oder Sauerstoffverbrauchsrate dargestellt werden, wurde gänzlich verzichtet. Die Glättung der Diagrammdaten mit Hilfe der Anwendung eines Lowess-Algorithmus⁴ ist hier nicht erforderlich, da die Rohdatenwerte kaum rauschen oder Ausreißer aufweisen.

Die gängigste Methode, Rohdaten auszuwerten, ist die Darstellung der Vitalitätsparameter in Form einer Rate (Änderung der Messgröße bezogen auf eine definierte Zeiteinheit). Die Darstellung der Rohdaten gleicht einem Sägezahnmuster. Dieses lässt sich in Messzyklen zergliedern, wobei in einem Messzyklus das Messsignal genau ein Mal stark ansteigt, und dann wieder abflacht.

⁴Lowess: **L**ocally **w**eighted regression

Die Abb. 6.11 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt des gemessenen Sauerstoffpartialdrucks im Zellmilieu von Hefezellen. Dargestellt sind die unverarbeiteten Rohdaten, die innerhalb von ca. 30 min. erfasst wurden.

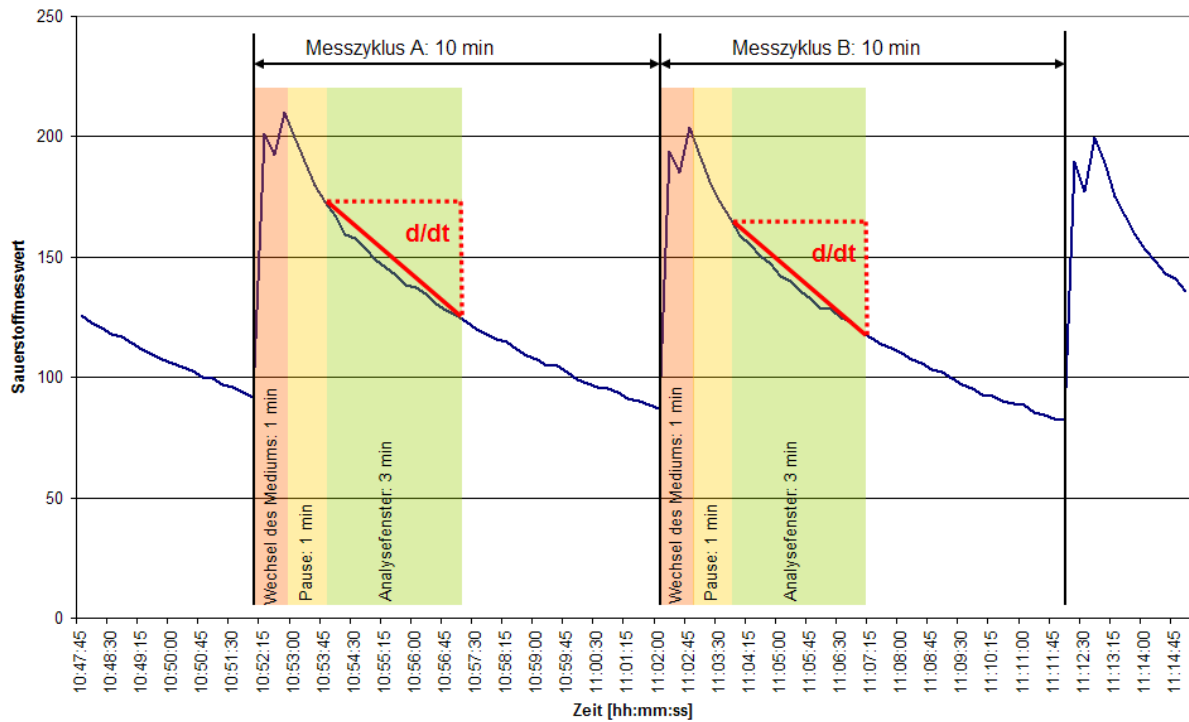


Abb. 6.11.: Exemplarische Darstellung der Zellatmung (Rohdaten) in einem Zeitintervall von ca. 30 min. Die Untergliederung der Messzyklen A und B in Teilintervalle ermöglicht die Berechnung einer Regressionsgeraden (rot), deren Absolutwert der Steigung $\frac{d}{dt}$ als Stoffwechselrate interpretiert werden kann.

Die Abbildung zeigt auch, dass man die Messzyklen in Teilintervalle untergliedern kann. Der Wert der Sauerstoffsättigung wird dann erreicht, wenn das Medium gewechselt wird. Der Wechsel dauert beim IMR System ca. eine Minute, bei Messungen mit IMOLA oder dem in dieser Arbeit entwickelten handheld Biosensor drei Minuten. Nach dieser Zeit verbrauchen die Zellen den Sauerstoff im Medium, wodurch die Konzentration wieder abnimmt. Die Geschwindigkeit der Abnahme spiegelt sich in der Steigung der Regressionsgerade wider, die nach einer weiteren Minute Wartezeit über einen Zeitraum von zwei bzw. drei Minuten konstruiert wird. Der Betragswert der Steigung der Regressionsgerade wird als Rate bezeichnet.

Errechnet man zu jedem Messzyklus die Rate im Analysefenster, entsteht eine neue Messkurve, die den entsprechenden Vitalitätsparameter des Organismus darstellt. Dies wird als Gradientenanalyse bezeichnet. Um die einzelnen Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, müssen die errechneten Kurven zusätzlich normiert werden: Jeder Steigungswert wird durch den selben Wert der eigenen Kurve zum Zeitpunkt $t = t_{\text{Zeitpunkt der Pestizidzugabe}}$ dividiert, so dass jede Abweichung der einzelnen Messkurven zum Ordinatenwert 1 (=100%) gewertet werden kann. Die nachfolgend dargestellten Messkurven sind stets diesem Auswertungsschema unterlegen.

Man beachte: Die oben beschriebene Methodik basiert auf einer Zerlegung der Messzyklen, über deren **Zeitintervall** eine Regressionsgerade berechnet wird. Die Steigung der Geraden kann dann genau genommen nicht auf einen **Zeitpunkt** bezogen werden, sondern nur auf den entsprechenden Messzyklus. Daher wäre es ungenau, bei der Darstellung der Messkurven als Abszissenwert eine absolute Zeit anzugeben. Es wird daher stets die **Anzahl der**

Messzyklen aufgetragen, deren entsprechende Dauer im Diagramm vermerkt ist. Meist be-
laufen sich die Messzyklen zu je 10 min., daher ist es ein leichtes, den zeitlichen Verlauf zu
interpretieren.

6.3.5. Charakterisierung der verwendeten Pestizide

6.3.5.1. Neudo®-Vital Obst-Pilzschutz (Fungizid)

Dieses Fungizid ist ein Pflanzenstärkungsmittel zur Erhöhung der Widerstandsfähigkeit gegen Pilzkrank-
heiten an Obstgehölzen.

Inhaltsstoffe und Wirkungsweise

Die Inhaltsstoffe des Produkts sind nicht genau spezifiziert. Im Datenblatt [155] sind lediglich folgen-
de Stoffe vermerkt: Fettsäuren, Algenextrakte/Pflanzenextrakte und als Lösungsmittel Wasser. Auf die
Verwendung von chemisch hergestellten Bestandteilen wird vollständig verzichtet.

Zur organischen Wirkungsweise des Fungizids konnten keine Quellen gefunden werden.

Abschätzung der Dosierung

Laut Produktdatenblatt [155] soll der Anwender die Pflanzen vor dem Austrieb mit 3%iger Verdünnung
spritzen, danach 1%ig. Für die Verdünnungsreihe ergibt sich somit folgendes:

- 5,0% Fungizid in Nährmedium
- 3,0% Fungizid in Nährmedium (Maximum der Herstellerempfehlung)
- 1,0% Fungizid in Nährmedium (Minimum der Herstellerempfehlung)

Die höchste Konzentration wurde gewählt, falls die Ansprechempfindlichkeit der Zellen zu gering wäre,
um die vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen detektieren zu können.

6.3.5.2. Roundup® LB Plus Unkrautfrei (Herbizid)

Roundup® wurde als Testkandidat gewählt, da es in der Landwirtschaft wegen seiner Eigenschaft als
universell taugliches Mittel gegen Unkraut sehr verbreitet ist. Der weltweite Absatz des Wirkstoffs im
Vergleich zu anderen Herbiziden wird mit über 1,8 Milliarden Dollar als führend dargestellt [156]. Dies
verdeutlicht die nachfolgende Graphik (Abb. 6.12).

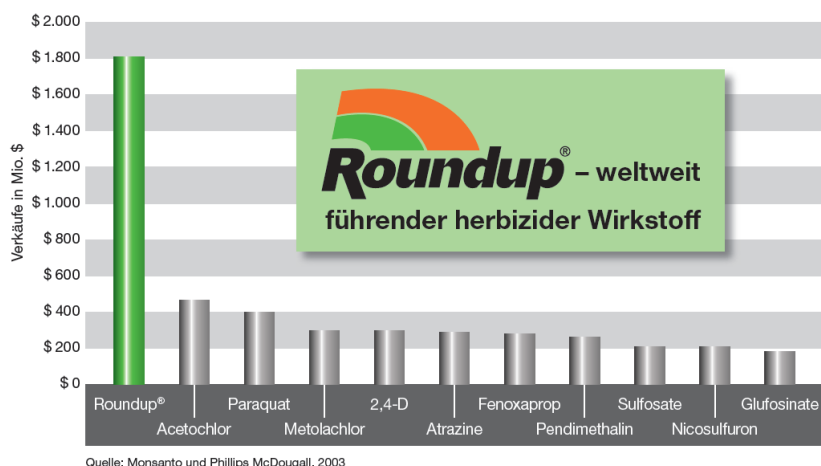


Abb. 6.12.: Verkaufsvolumen der weltweit zugelassenen herbiziden Wirkstoffe im Vergleich, nach [156]

Tab. 6.3.: Gebrauchshinweise laut Produktdatenblatt von Roundup®

Anwendung	Dosierung für die Spritzanwendung
Auf Wegen und Plätzen während der Vegetationsperiode (Abdrift vermeiden, Spritzen mit Spritzschirm) (Nichtkulturland genehmigungspflichtig); Freiland	10ml in 330ml Wasser für 10m ²
Vorbereitung zur Rasenneueinsaat das heißt, Altrasen und Unkräuter werden vernichtet; Freiland	10ml in 250 - 1000ml Wasser für 25m ²
Vorbereitung vor Neueinsaat von Zierpflanzen mit nachfolgendem Umbruch	10ml in 100 - 400ml Wasser für 10m ²
Unter Kernobst, ab Pflanzjahr während der Vegetationsperiode; Freiland	10ml in 200 - 800ml Wasser für 20m ²

Inhaltsstoffe und Wirkungsweise

360g/l Glyphosat (486g/l Isopropylamin-Salz)

Chemische Summenformel: C₃H₈NO₅P

Molare Masse: 169,07 g · mol⁻¹

Chemisch korrekte Bezeichnung von Glyphosat [156]: N-phosphono-methyl-Glycin

Der Wirkstoff [...] wird über die nicht verholzten oberirdischen grünen Pflanzenteile aufgenommen. [...] Im Stoffwechsel aller Pflanzen gibt es eine Schaltstelle, in der sich lebenswichtige chemische Vorgänge abspielen: die Bildung der essenziellen Aminosäuren, die für den Aufbau der pflanzlichen Eiweiße benötigt werden. An der Bildung der essenziellen Aminosäuren ist das Enzym EPSPS beteiligt. Dieses Enzym wird vom Wirkstoff blockiert - die Produktion von Eiweißen wird unterbrochen. Die Pflanze verwelkt.

Auszug aus dem Roundup®-Kompendium ([156]).

Abschätzung der Dosierung

Die empfohlene Dosis zur Benetzung von Unkräutern hängt von der Anwendung ab (vgl. Tabelle 6.3).

Normiert auf 25 m² Anbaufläche und skaliert auf die Menge, die in Multiwellplatten üblich ist, ergeben sich folgende Verdünnungsmischungen:

- Konzentration A (größte empf. Dosierung): 0,625 ml pro 10 ml Wasser, ~ 6,3%ige Lösung
- Konzentration B (kleinste empf. Dosierung): 0,1 ml pro 10 ml Wasser, ~ 1,0%ige Lösung

Für den Versuch mit Hefezellen wurde zusätzlich eine dritte *Konzentration C* (ein zehntel von B, 0,01 ml pro 10 ml Wasser, ~ 0,1%ige Lösung) getestet, um die kleinste detektierbare Grenze zu finden.

Wasser wurde durch das Nährmedium für die Hefezellen ausgetauscht, da sonst die Stoffwechselaktivität zum Erliegen kommt.

6.3.5.3. Dithane NeoTec (Fungizid)

Dieses Fungizid ist ein organisches Spritzmittel. Es kann breitbandig eingesetzt werden, deshalb gilt eine Anwendung im Obstbau als wahrscheinlich und wurde daher für die in Kap. 6.4 beschriebenen Versuche ausgewählt.

Inhaltsstoffe und Wirkungsweise

Das Fungizid ist ein wasserdispergierbares Granulat mit den chemisch wirksamen Bestandteilen Mancozeb (75 %), Hexamethylentetramin (0,9 %) und Formulierungshilfen [157].

Dauderer ([158]) charakterisiert die Wirkungsweise des Stoffes Mancozeb als eine „Denaturierung von Proteinen durch Zerstörung der Disulfidbrücken“. Disulfidbrücken verknüpfen mehrere Aminosäureketten zu einem funktionstüchtigen Protein [159]. Disulfidbrücken stellen eines der wichtigsten Elemente der korrekten Proteinfaltung dar und werden in Eukaryonten⁵ vorwiegend im [...] ER⁶ in das [...] Protein

⁵Eukaryonten: Lebewesen mit Zellkern und Zellmembran

⁶ER: Endoplasmatisches Retikulum

eingeführt (nach [160]). Werden also Proteine in einer Hefezelle nicht mehr korrekt gebildet, so kommt der mitochondriale Stoffwechsel zum Erliegen.

Abschätzung der Dosierung

Der Hersteller empfiehlt laut Produktdatenblatt [157] eine Aufwandmenge von maximal 10 g pro 1,1 l Wasser pro 56 m². Statt Wasser wurde im Versuch Nährmedium benutzt. Für die Verdünnungsreihe wurden folgende Konzentrationen gewählt:

- 0,5 g pro 55 ml pro 56 m² Fungizid in Nährmedium (Maximum der Herstellerempfehlung, ~ 0,9%ige Lösung)
- 0,1 g pro 55 ml pro 56 m² Fungizid in Nährmedium (~ 0,2%ige Lösung)
- 0,05 g pro 55 ml pro 56 m² Fungizid in Nährmedium (~ 0,09%ige Lösung)

Um die Vitalität der Hefen ohne Fungizid zu beobachten, wurde jeweils zusätzlich ein Kontrollorganismus vermessen.

6.3.5.4. Universal Pilzfrei M (Fungizid)

Das Fungizid kann wie Dithane NeoTec breitbandig eingesetzt werden. Die Wirkung gegen Schädlingsbefall auf Obst war ausschlaggebend für die Verwendung als Testsubstanz in den später beschriebenen Versuchen.

Inhaltsstoffe und Wirkungsweise

Das Fungizid ist eine Öl in Wasser Emulsion mit den chemisch wirksamen Bestandteilen Myclobutanil (<5 %), und Acetophenon (<10 %) als Lösungsmittel [161].

Die Wirkungsweise des Inhibitors beruht auf der Hemmung der Sterol-Biosynthese ([162]). Die Hefe ist unter strikt anaeroben Bedingungen sterolauxotroph, d.h. auf Supplementierung⁷ durch sterolhaltiges Medium angewiesen, und es existieren genetisch genau definierte Mutanten, welche an verschiedenen Stellen der Ergosterolbiosynthese geblockt sind (nach [163]).

Ergosterol erfüllt eine wichtige Funktion in der Modulation der Membranfluidität, indem es in den Phospholipid-Bilayer der Zellwand eingebaut wird. In diesem auch als fluidmosaic beschriebenen Modell sorgt Ergosterol für die nötige Festigkeit und Struktur, um eine optimale Funktion der zahlreichen membranständigen Enzyme und der Membranpermeabilität zu gewährleisten (nach [164]). Somit blockiert der Wirkstoff den interzellulären Stoffaustausch als auch die Generierung einer stabilen Zellmembran.

Abschätzung der Dosierung

Der Hersteller empfiehlt laut Produktdatenblatt [161] eine Aufwandmenge von maximal 10 ml pro 1,0 l Wasser pro 10 m². Die Aufwandmenge wurde auf 56 m² hochgerechnet, um besser mit den anderen Pestiziden vergleichen zu können. Statt Wasser wurde im Versuch Nährmedium benutzt. Für die Verdünnungsreihe wurden folgende Konzentrationen gewählt:

- 2,8 ml pro 50 ml pro 56 m² Fungizid in Nährmedium (Maximum der Herstellerempfehlung, ~ 5,6%ige Lösung)
- 0,6 ml pro 50 ml pro 56 m² Fungizid in Nährmedium (~ 1,2%ige Lösung)
- 0,1 ml pro 50 ml pro 56 m² Fungizid in Nährmedium (~ 0,2%ige Lösung)

Um die Vitalität der Hefen ohne Fungizid zu beobachten, wurde jeweils zusätzlich ein Kontrollorganismus vermessen.

⁷Supplementierung: Gezielte und ergänzende Aufnahme einzelner Nährstoffe neben der gewöhnlichen Nahrung

6.3.5.5. Celaflor® Gemüse-Pilzfrei Sapro® (Fungizid)

Dieses Fungizid ist ein breitbandiges Spritzmittel zur Bekämpfung von Pilzkrankheiten an Gemüse und Obst.

Inhaltsstoffe

Das Fungizid ist ein systemisches Spritzmittel mit den chemisch wirksamen Bestandteilen Azoxystrobin (250 g/l) sowie Fettalkoholethoxylat und Naphthalinsulfonsäure als Lösungs- und Benetzungsmittel (nach [165]). Es ist als Suspensionskonzentrat erhältlich.

Der Wirkungsmechanismus von Azoxystrobin hemmt den Elektronentransport in der Mitochondrienatmung. Der Stoff gehört zur Gruppe der Methoxyacrylate [166], der die Sauerstoffaufnahme blockiert.

Abschätzung der Dosierung

Der Hersteller empfiehlt laut Produktdatenblatt [165] eine Aufwandmenge von maximal 4 ml pro 2,4 l Wasser pro 56 m². Die Aufwandmenge wurde wiederum auf 56 m² bezogen, um besser mit den anderen Pestiziden vergleichen zu können. Statt Wasser wurde im Versuch Nährmedium benutzt. Für die Verdünnungsreihe wurden folgende Konzentrationen gewählt:

- 0,1 ml pro 60 ml pro 56 m² Fungizid in Nährmedium (Maximum der Herstellerempfehlung, ~ 0,17%ige Lösung)
- 0,05 g pro 60 ml pro 56 m² Fungizid in Nährmedium (~ 0,08%ige Lösung)
- 0,01 g pro 60 ml pro 56 m² Fungizid in Nährmedium (~ 0,02%ige Lösung)

Um die Vitalität der Hefen ohne Fungizid zu beobachten, wurde jeweils zusätzlich ein Kontrollorganismus vermessen.

6.3.6. Messkonfigurationen der Zellanalysegeräte

Versuchsbeschreibung IMR System

Die Versuche mit *Neudo®-Vital Obst-Pilzschutz* und *Roundup® LB Plus Unkrautfrei* wurden mit einer wiederverwendbaren iMWP⁸ durchgeführt und nach den in Tab. 6.4 dargestellten Prozessschritten verwendet. Auf eine genauere Darstellung wird hier verzichtet, da dies Gegenstand einer fertigungstechnischen Fragestellung ist und hier irrelevant ist. Die Fungizide *Dithane NeoTec*, *Universal Pilzfrei M* und *Gemüse-Pilzfrei Sapro®* wurden mit den 24-Well Spritzgussplatten der Firma *Erwin Quarder Systemtechnik GmbH*, Espelkamp, Germany, durchgeführt. Dabei wurde die Verklebung der Sensorplatten teilweise selbst vorgenommen, die Spots zur Messung von pH und Sauerstoff wurden von der Firma *PreSens – Precision Sensing GmbH*, Regensburg, Germany, aufgebracht. Diese Platten waren nicht beta-bestrahlt. Es wurde in einer unsterilen Umgebung gemessen.

8,9 µl der Hefezellsuspension wurden auf das ausgestanzte Filterpapier mittig aufgebracht. Die so vorbereiteten Plättchen wurden mit der Zellunterseite in die Wells gelegt. Die Wells wurden zuvor zur Hälfte mit Nährmedium befüllt, um Luftblasen zu vermeiden. Sie wurden bei der wiederverwendbaren sensorbestückten Multiwellplatte mit einem Stopfen aus V4A-Stahl verschlossen, so dass nur Zu- und Ablauf frei waren. Bei den einmal verwendbaren Multiwellplatten wurde der Spritzgussdeckel nach dem Einlegen der Plättchen vorsichtig aufgedrückt.

Die Bediensoftware des IMR Systems (Version 17.11.2008) wurde wie folgt konfiguriert: Alle zehn Minuten wird das Medium der Wells ausgetauscht. Das Volumen des Zellmikromilieus ist im Gegensatz zum Volumen der Zu- und Ablaufkavitäten sehr gering, daher kann davon ausgegangen werden, dass ein nahezu vollständiger Medienwechsel stattfindet. Nach einer ausreichenden Messzeit wurde das Nährmedium gegen das mit Pestiziden belastete Medium getauscht. Bei den Wells mit der Kontrollkultur wurde die Konfiguration nicht verändert. Der aufgenommene Messparameter ist die Sauerstoffkonzentration, da aufgrund länger dauernder technischer Schwierigkeiten (intern) mit den pH-Spots nicht gemessen werden konnte.

⁸iMWP: intelligente Multiwellplatte

Tab. 6.4.: *Herstellungs- und Nachbearbeitungsschritte einer sensorbestückten Multiwellplatte (iMWP)*

	Beschreibung	Prozess
1.	Oberflächenbehandlung der Fluidik- und Bodenplatte mit Sauerstoffplasma zur Verbesserung der Haftungseigenschaften	Herstellung
2.	Verbindung von Plattenoberteil und Glasbodenplatte (Klebertechnik bei 35°C bis 40°C mit Epo-Tek 353n)	Herstellung
3.	Silanisierung (Haftungsvermittlung für Sensorspots)	Herstellung
4.	Aufbringen neuer Sensorspots (pH, pO ₂)	Vorbereitung
5.	Verpackung der Platten	Vorbereitung
6.	Sterilisierung (ca. 1 Woche; z.B. Beta-Bestrahlung, 10MeV, 18kGy)	Vorbereitung
7.	Verwendung für jeweils einen Pestizidversuch	Versuch
8.	Ablösung der Zellen, Reinigung der Platten	Nachbereitung
9.	Ablösung der Sensorspots mit Aceton	Nachbereitung
10.	Ablösen von Proteinresten mit Akkutase	Nachbereitung
11.	Sauerstoffplasma und Silanisierung zur Verbesserung der Haftungseigenschaften der Sensorspots	Nachbereitung
12.	Reinigung der Platten mit Destilliertem Wasser und gefilterter Druckluft	Nachbereitung

Die Signale werden durch eine Sonderanfertigung des Geräts Typ SDR der Firma PreSens erfasst. Der Versuch läuft in einem Inkubator Typ B 20 der Firma Heraeus, Hanau, Germany, bei 37°C.

Versuchsbeschreibung IMOLA System

20 µl der Hefezellsuspension wurden auf das ausgestanzte Filterpapier mittig aufgebracht. Die so vorbereiteten Plättchen wurden mit der Zellunterseite in die Töpfchen der Chips gelegt. Diese wurden zuvor zur Hälfte mit Nährmedium befüllt, um Luftblasen beim Aufstecken des Fluidikkopfes zu vermeiden.

Die Bediensoftware des IMOLA Systems wurde mit den selben Parametern konfiguriert, wie bei den Versuchen mit dem IMR System: Alle 10 Minuten wird bei einer Flussrate von 60 µl pro Minute das Medium zyklisch ausgetauscht. Die eine Hälfte der im System betreibbaren Sensorchips dient als Kontrolle und wird nicht mit Pestiziden kontaminiert. Die andere Hälfte wird nach einer Vorlaufzeit (unkontaminiertes Medium) mit dem Inhibitor versetzt, so dass durch Vergleich der Daten (vorher – nachher) eine Aussage getroffen werden kann. Der Versuch wird im Inkubator bei 37°C durchgeführt. Das Medium wird durch eine Pumpe Typ IPC-N der Firma ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Germany, gefördert.

Versuchsbeschreibung handheld Biosensor

Durch den hier gezeigten Funktionstest am Spritzmittel *Celaflor® Gemüse-Pilzfrei Sapro®* wird die Arbeit abgerundet und rechtfertigt den Abschluss der Entwicklung bzw. der Forschungsarbeit, auf die diese Dissertation ausgerichtet war.

Die Zellpräparation erfolgte nach den in Kap. 6.1.4 beschriebenen Vorgaben und gleicht auch nahezu der IMOLA Versuchsbeschreibung (s.o.). Lediglich wurde der Versuch nicht im Inkubator durchgeführt, sondern bei Raumtemperatur. Die Pumpenkonfiguration in den Parametern der Bediensoftware (siehe Kap. 4) wurde ebenfalls identisch eingestellt (Messzyklus: 7 min, pumpen: 3 min), jedoch beträgt die Flussrate hier ca. 150 µl pro Minute. Als Nährlösungen wurden PBS mit 10 mM Glukose mit einem pH-Wert von 7,1 verwendet.

6.4. Pestiziddetektion mit dem IMR-System

6.4.1. Detektion von Neudo[®]-Vital Obst-Pilzschutz (Fungizid)

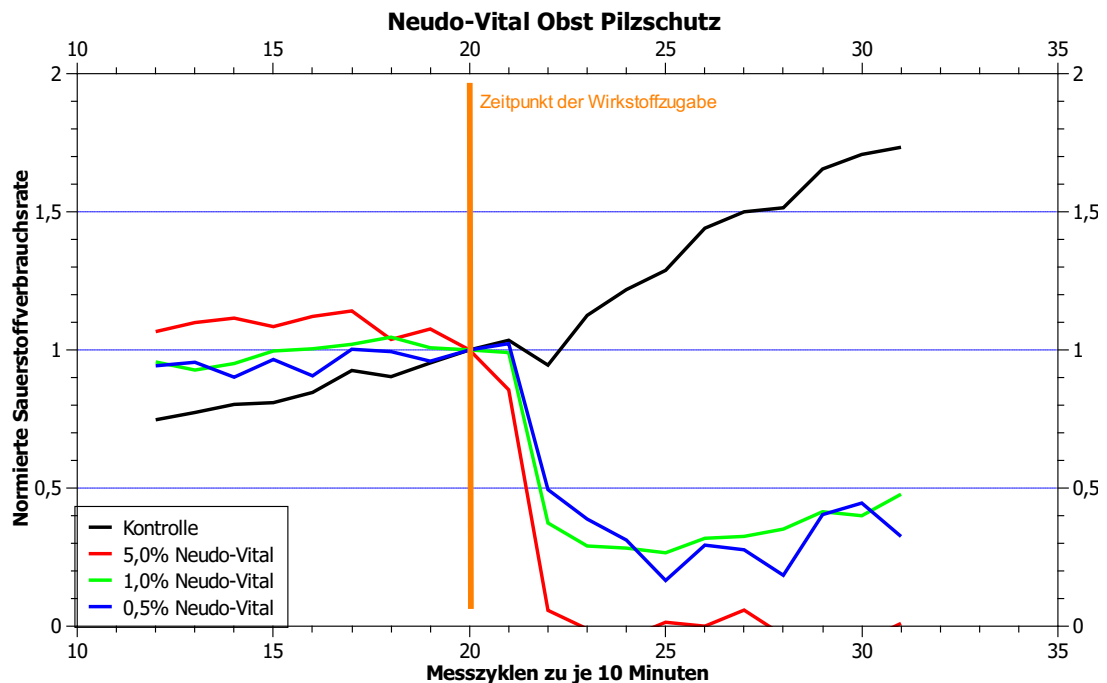


Abb. 6.13.: Normierte Sauerstoffverbrauchsrate der Hefezellen bei Zugabe von Neudo[®]-Vital Obst-Pilzschutz. Zu Beginn des Versuchs war kein Nährmedium mit Fungizid belastet, erst nach knapp vier Stunden wurde es in den Konzentrationen 5,0%, 1,0% und 0,5% zugegeben. Die Kontrolle zeigt eine nahezu stetig steigende Vitalität, während bei denen dem Wirkstoff ausgesetzten Kulturen keine mitochondriale Aktivität zu beobachten ist.

Die Abbildung 6.13 zeigt, dass das in das Nährmedium beigemischte Fungizid den Stoffwechsel der Hefezellen vollständig zum Erliegen bringt. Im ersten Abschnitt der Messgraphik war kein derartiges Toxin in die Vorratsgefäße eingebracht. Die signifikante Abnahme des Sauerstoffverbrauchs und die anhaltende beobachtbare Zellinaktivität beweist, dass das gewählte Fungizid nachhaltig den Organismus schädigt. Dieser Versuch macht auch deutlich, dass die kleinste empfohlene Dosis des Wirkstoffs ausreicht, um die mitochondriale Aktivität der Hefezellen vollständig auszuschalten.

6.4.2. Detektion von Roundup[®] LB Plus Unkrautfrei (Herbizid)

Die Abbildung 6.14 zeigt, dass das in das Nährmedium beigemischte Herbizid den Stoffwechsel der Hefezellen nicht signifikant schwächt. Im ersten Abschnitt der Messgraphik war kein derartiges Toxin in die Vorratsgefäße eingebracht. Eine Abnahme des Sauerstoffverbrauchs war nicht zu beobachten. Vergleicht man den linken Abschnitt der Messgraphik (keine Wirkstoffzugabe) mit dem rechten, so kann trotz der überhöhten Konzentration des Herbizids fast kein Unterschied in der Atmungsaktivität der Hefe festgestellt werden. Die Blockade der Proteinsynthese durch den Wirkstoff Glyphosat hat somit keine Auswirkung auf den Zellstoffwechsel in Hefe. Damit ist Hefe als Signalwandler für dieses Breitband-herbizid nicht geeignet.

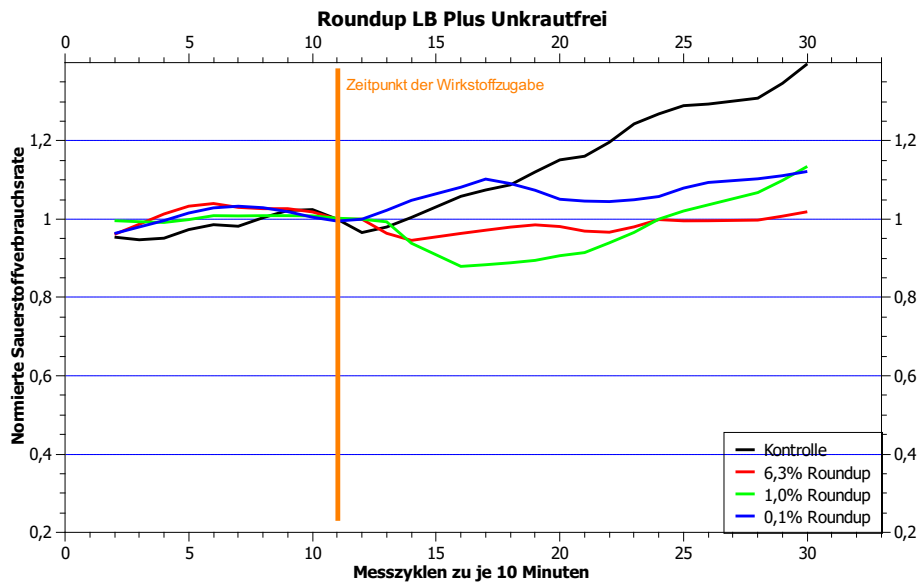


Abb. 6.14.: Normierte Sauerstoffverbrauchsrate der Hefezellen bei Zugabe von Roundup® LB Plus Unkrautfrei. Zu Beginn des Versuchs war kein Nährmedium mit Herbizid belastet, erst nach knapp zwei Stunden wurde es in den Konzentrationen 6,3%, 1,0% und 0,1% zugegeben. Während der gesamten Versuchsdauer war kein signifikanter Einbruch der Vitalität zu beobachten.

6.4.3. Detektion von Dithane NeoTec (Fungizid)

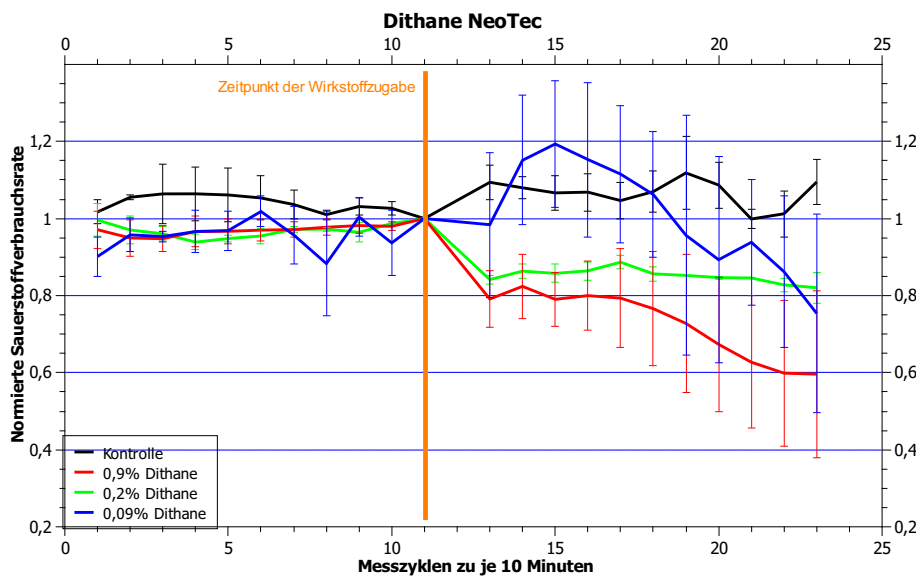


Abb. 6.15.: Normierte Sauerstoffverbrauchsrate der Hefezellen bei Zugabe von Dithane NeoTec. Zu Beginn des Versuchs war kein Nährmedium mit dem Fungizid belastet, erst nach knapp zwei Stunden wurde es in den Konzentrationen 0,9%, 0,2% und 0,09% zugegeben.

Die Abbildung 6.15 zeigt, dass das Fungizid eine signifikante Auswirkung auf den Zellstoffwechsel hat. Die höchste vom Hersteller empfohlene Konzentration (0,9%) lässt die Sauerstoffverbrauchsrate auf 60% einbrechen. Die Graphik zeigt außerdem, dass bei der kleinsten Konzentration (0,09%) intrazelluläre Abwehrmechanismen einsetzen, die durch eine erhöhte Aktivität versuchen, das Toxin zu bekämpfen. Die Dosis ist jedoch immer noch zu stark, um längerfristig eine Schädigung abzuwehren.

6.4.4. Detektion von Universal Pilzfrei M (Fungizid)

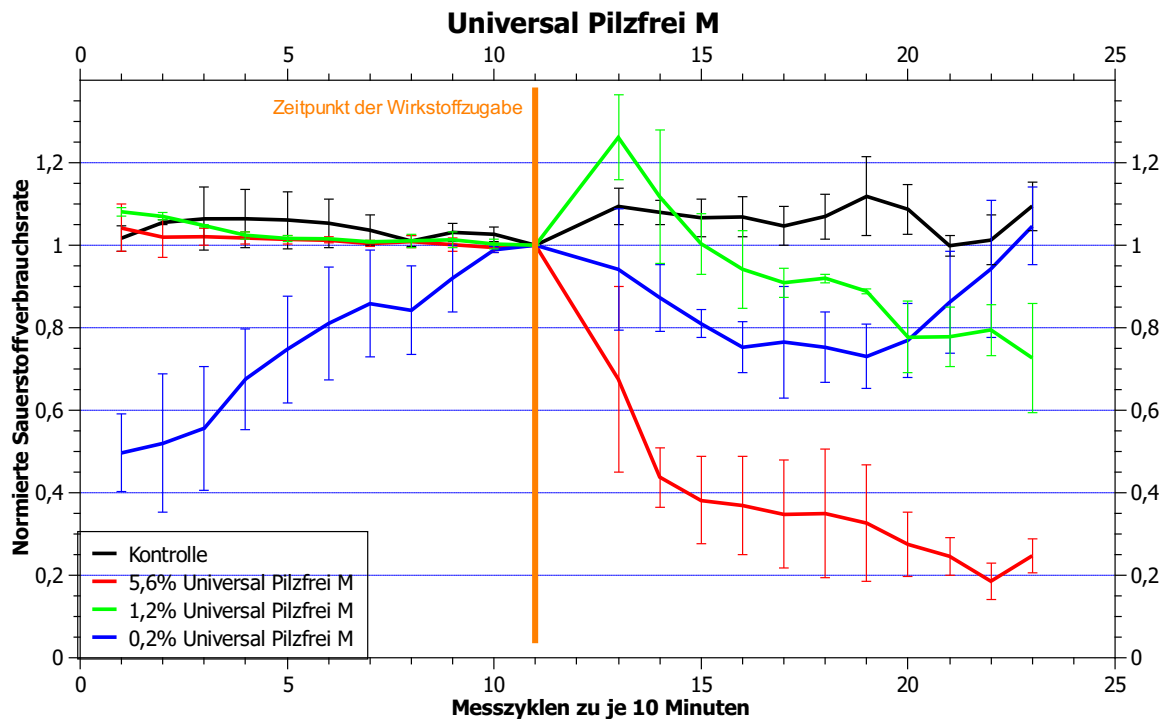


Abb. 6.16.: Normierte Sauerstoffverbrauchsrate der Hefezellen bei Zugabe von Universal Pilzfrei M. Zu Beginn des Versuchs war kein Nährmedium mit dem Fungizid belastet, erst nach knapp zwei Stunden wurde es in den Konzentrationen 5,6%, 1,2% und 0,2% zugegeben.

Die Abbildung 6.16 zeigt ein ähnliches Verhalten der Hefezellen auf das Fungizid Universal Pilzfrei M, wie jenes, das in Abb. 6.15 dargestellt wurde. Bei der höchsten vom Hersteller empfohlenen Konzentration (5,6%) sinkt die Sauerstoffverbrauchsrate auf 20% ab. Der Zellstoffwechsel kommt fast vollständig zum Erliegen. Bei der niedrigsten Konzentration (0,2%) ist ein Überschwingen der Aktivität zu beobachten. Dies deutet wiederum auf eine Mobilisierung der intrazellulären Abwehrmechanismen hin.

6.4.5. Detektion von Celflor[®] Gemüse-Pilzfrei Saprol[®] (Fungizid)

Die Abbildung 6.17 zeigt die Sauerstoffverbrauchsrate von Hefezellen, die nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Celflor[®] verschieden stark einbricht. Während die niedrigste Konzentration (0,02%) den Zellstoffwechsel nur um ca. 20% einbrechen lässt, erwirkt die höchste vom Hersteller empfohlene Dosis einen Einbruch um ca. 70%. Die Graphik lässt einen linearen Zusammenhang der Dosis-Wirk-Beziehung vermuten.

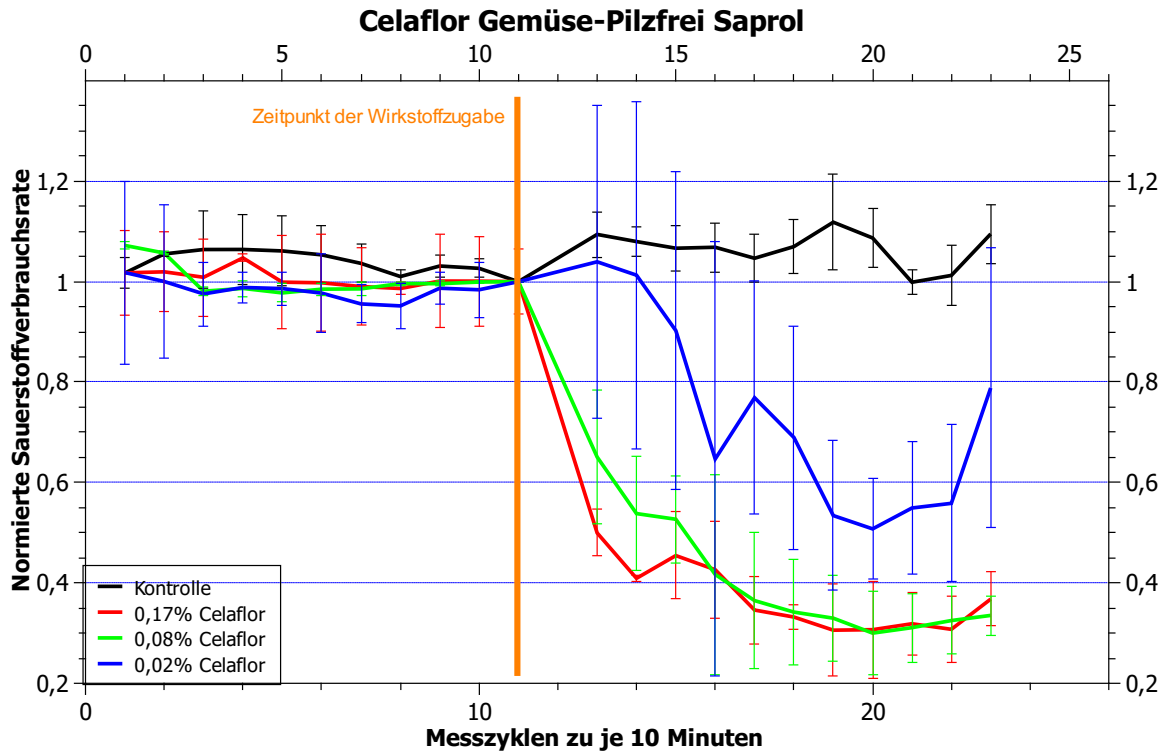


Abb. 6.17.: Normierte Sauerstoffverbrauchsrate der Hefezellen bei Zugabe von Celaflor[®] Gemüse-Pilzfrei Saprol[®]. Zu Beginn des Versuchs war kein Nährmedium mit dem Fungizid belastet, erst nach knapp zwei Stunden wurde es in den Konzentrationen 0,17%, 0,08% und 0,02% zugegeben.

6.5. Pestiziddetektion mit dem IMOLA-System

Die Versuche mit dem IMOLA-System wurden mit dem Pestizid Celaflor[®] Gemüse-Pilzfrei Saprol[®] durchgeführt. Dieses Toxin wurde nach ca. 150 min in 0,05%iger Konzentration dem Medium zugeführt. Die Graphik 6.18 zeigt, dass das System mit dem BioChip-C geeignet ist, Schadstoffeinträge in Höhe der vom Hersteller angegebenen Dosis zu detektieren.

Die berechnete Rate der Ansäuerung fällt während des Versuchs auf ca. 10% ab, wobei die in Abb. 6.19 gezeigte Atmungsaktivität um ca. 55% einbricht. Bei beiden Kurven verhält sich die Kontrolle wie erwartet: Eine stetige Proliferation lässt die gemessenen Vitalitätsparameter der Zellen ansteigen.

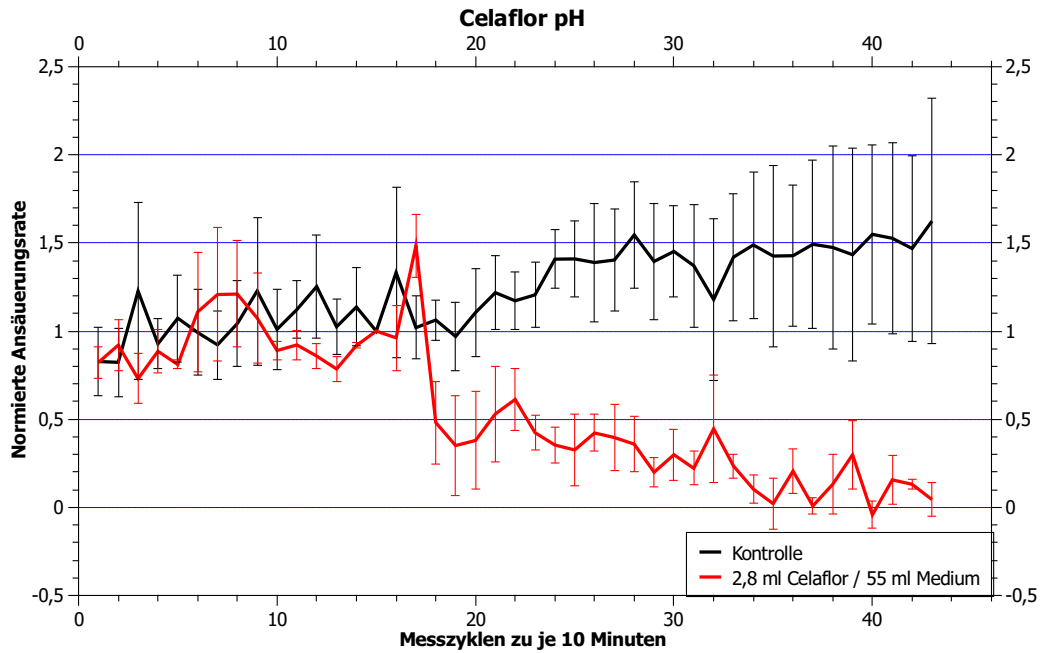


Abb. 6.18.: Berechnete Ansäuerungsrate vor und nach Zugabe von pestizidbelastetem Medium. Beide Kurven (Kontrolle und Wirkstoffsignal) wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe nach ca. 150 min normiert. Der Stoffwechsel, gemessen am pH-Wert der Zellen, kommt nahezu vollständig zum Erliegen.

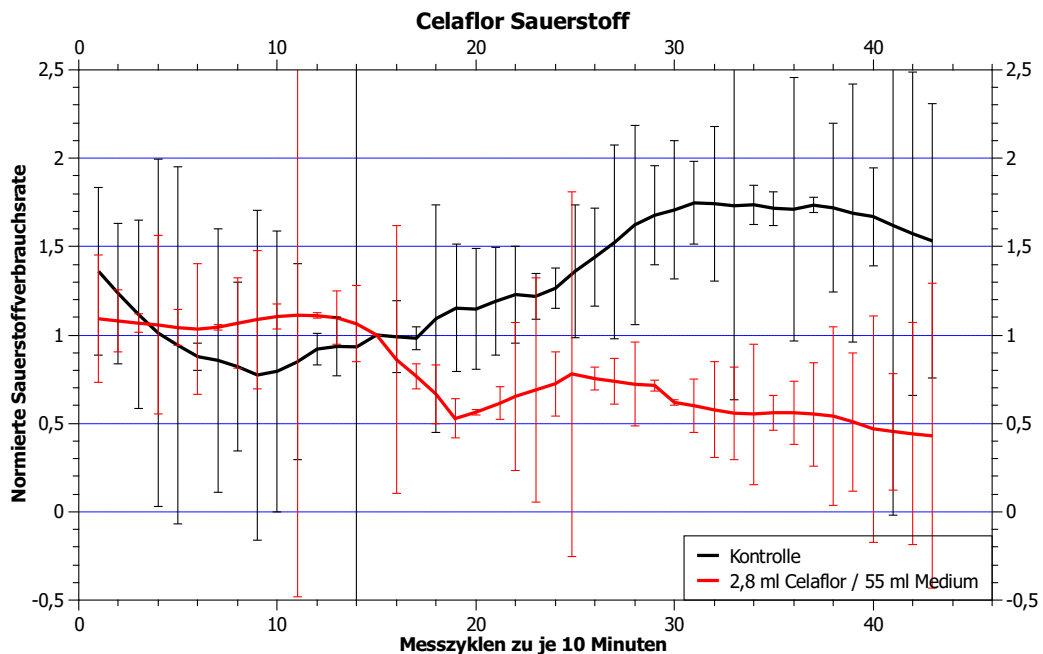


Abb. 6.19.: Berechnete Sauerstoffverbrauchsrate vor und nach Zugabe von pestizidbelastetem Medium. Beide Kurven (Kontrolle und Wirkstoffsignal) wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe nach ca. 150 min normiert. Der Stoffwechsel, gemessen am respiratorischen Signal der Zellen, bricht um mehr als die Hälfte ein.

6.6. Pestiziddetektion mit dem handheld Biosensor

In diesem Abschnitt werden sämtliche Messergebnisse dargestellt, die den Betrieb des handheld Biosensors zur Pestiziddetektion rechtfertigen. Dabei werden exemplarisch die Messungen mit Celaflor[®] Gemüse-Pilzfrei Saprool[®] dargestellt. Die Messungen mit diesem Breitbandfungizid werden durch vorausgehende Versuche validiert, bei denen die rückwirkungsfreie Wechselwirkung des reinen Mediums mit dem Chip (Negativprobe) und die ebenfalls rückwirkungsfreie Wechselwirkung von pestizidbelastetem Medium mit dem Chip (Positivprobe) gezeigt wird. Als Medium wurde stets PBS mit 10 mM Glukose mit einem pH-Wert von 7,1 verwendet. Es folgen dann Darstellungen aus verschiedenen Versuchen, die zeigen, dass das in dieser Arbeit vorgestellte Gesamtsystem als weltweit erster mobiler Biosensor zur Pestiziddetektion eingesetzt werden kann.

6.6.1. Negativprobe

Die Abbildungen 6.20 und 6.21 zeigen die Messsignale der Sensorrohwerter von pH, O₂ und Temperatur. Die Daten wurden mit der in Kap. 3.3 vorgestellten analogen Verstärkerschaltung erfasst und über die Bluetooth Schnittstelle zum PC übertragen. Die dargestellten Werte entsprechen dem direkten Sensorausgangssignal, wobei der angezeigte Temperaturwert aus dem Spannungssignal der Elektronik in der PC-Software QtiPlot (siehe Kap. 4.5.5) berechnet wurde.

Der Versuch beweist, dass durch die Zugabe des Mediums auf die Sensorchips keinerlei Wechselwirkung stattfindet. Das Sensorsignal bleibt absolut konstant. Die Rohwerte nehmen weder ab noch zu.

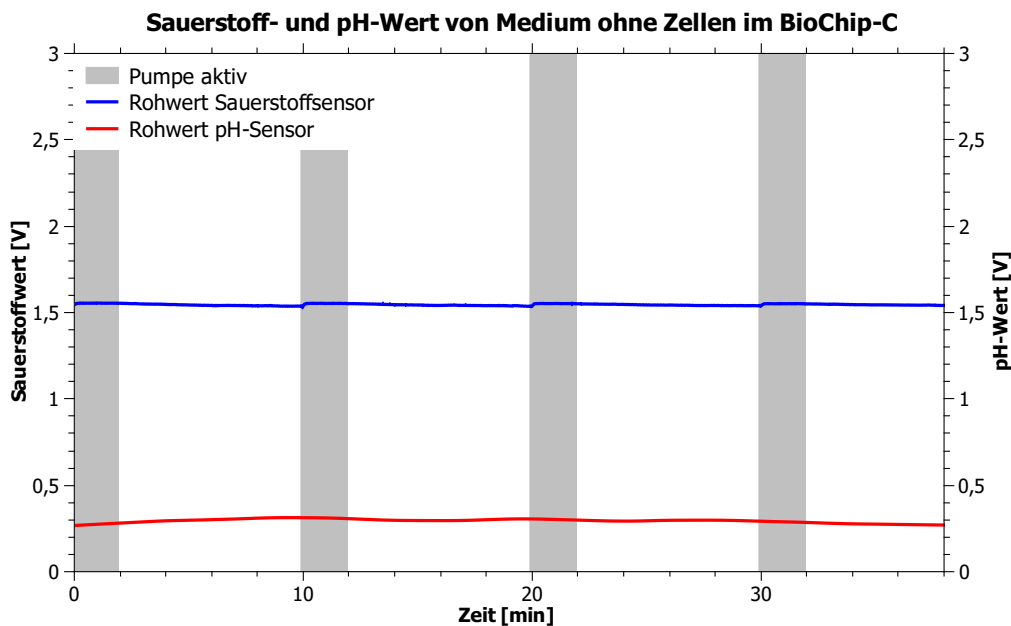


Abb. 6.20.: Rohsignale der Verstärkerausgangsspannungen von pH und O₂. Über einen Zeitraum von mehr als 40 min bleibt das Signal konstant; es findet keine Wechselwirkung zum Sensor statt.

In den beiden Graphiken ist eine geringe Signalschwankung zu beobachten, wenn die Pumpe neues Medium über den Sensor pumpt. Da Gerät, Chip und Fluidik samt Medienreservoir nicht vorinkubiert waren, können die Schwankungen auf Temperaturunterschiede zurückgeführt werden. Das Medium war etwas kühler als das Gerät mitsamt dem Sensorchip, so dass folgendes auftritt:

- **Temperaturwert:** Bei Pumpbeginn läuft kühleres Medium über die Sensoroberfläche, so dass der Wert asymptotisch sinkt. Stoppt die Pumpe, gleicht sich das Mikrovolumen wieder der Chiptemperatur an.
- **Sauerstoffsignal:** Bei Pumpbeginn steigt der Sauerstoffwert (Rohsignal) etwas an, d.h. der Sauerstoffgehalt im Medium sinkt ab. Tatsächlich aber lässt sich diese Abnahme ebenfalls auf die Temperaturabnahme zurückführen, da Sauerstoffmoleküle bei sich erwärmenden Medien freigesetzt werden (das Medium gast aus).

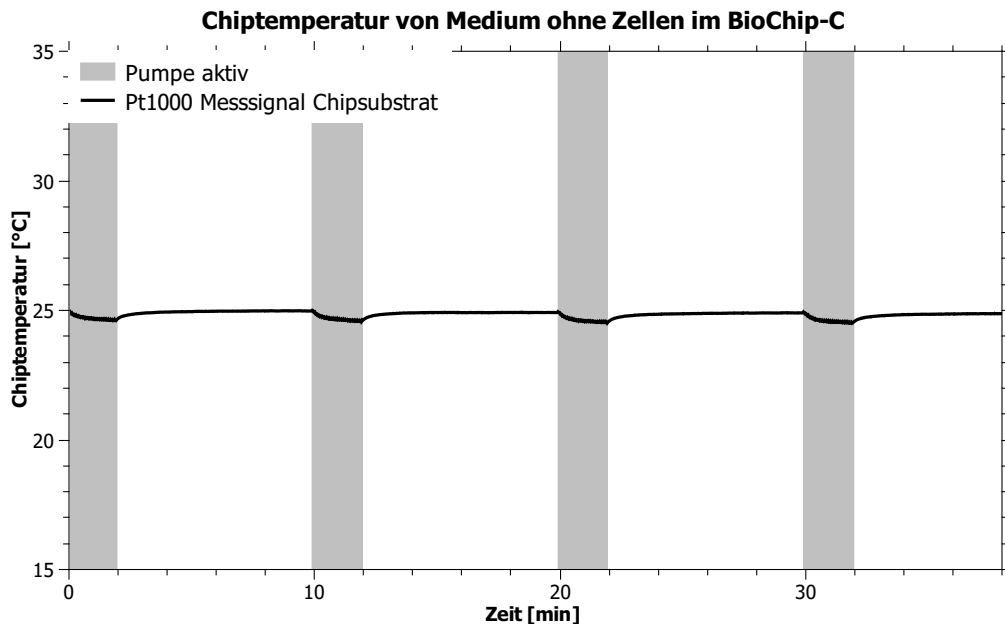


Abb. 6.21.: Rohsignal der Verstärkerausgangsspannung des Pt1000 nach Umrechnung auf °C. Über einen Zeitraum von mehr als 40 min bleibt das Signal konstant; es findet keine Wechselwirkung zum Sensor statt.

6.6.2. Positivprobe

Die Abb. 6.22 zeigt, dass vor und nach Zugabe des pestizidbelasteten Mediums keinerlei Schwankung im Messsignal auftritt. Der Sensorchip wurde wie bei der Negativprobe mit reinem Medium betrieben. Nach zehn Minuten wurde zusätzlich das Fungizid Celaflor® Gemüse-Pilzfrei Saprool® dem Medium beigemischt. Die Dosis entsprach hierbei dem Maximum der Herstellerempfehlung (~ 0,17%ige Lösung, vgl. Kap. 6.3.5.5).

6.6.3. Rauschen der Messwerte

Abb. 6.23 zeigt die Rohwerte der Sensorsignale. Auf Glättung und Driftbereinigung wurde verzichtet. Die Ausschnitte stellen jeweils eine Messperiode zu zehn Minuten dar, wobei zu Beginn jeweils zwei Minuten gepumpt wurde. Die Ausschnitte entsprechen den Darstellungen aus den Unterkapiteln 6.6.1 und 6.6.2, wurden aber zur Abschätzung des Rauschens vergrößert.

Die Ungenauigkeit des gemessenen Signals kann durch Amplitudenbestimmung des Peak-to-Peak Rauschens bestimmt werden und ergibt sich zu:

- pH-Wert: $\Delta V_{\max \text{ p-p}}(\text{pH}) = 5 \text{ mV}$ (vgl. Abb. 6.23a).
- Sauerstoffwert: $\Delta V_{\max \text{ p-p}}(\text{O}_2) = 5 \text{ mV}$ (vgl. Abb. 6.23b).

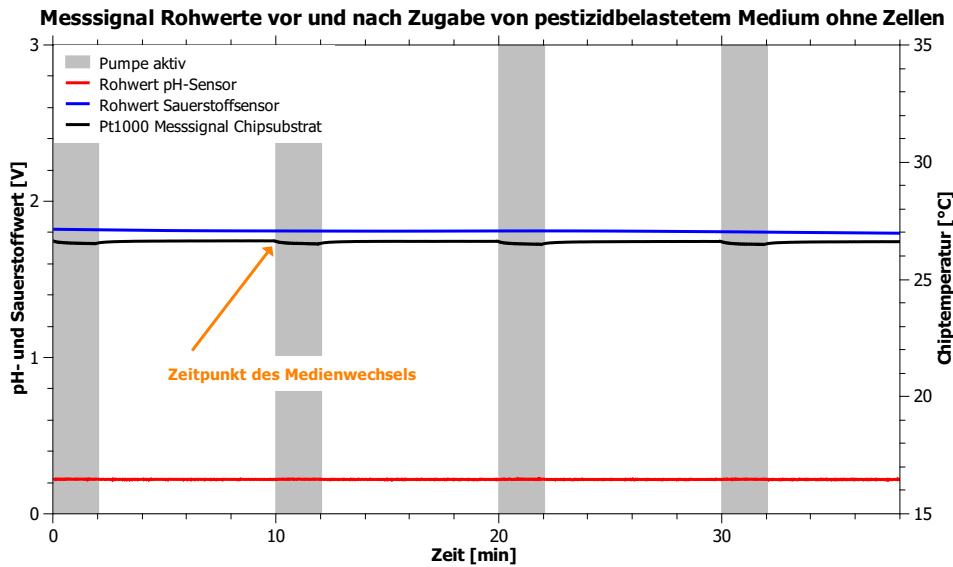


Abb. 6.22.: Rohsignale von pH, O₂ und Temperatur vor und nach Zugabe von pestizidbelastetem Medium. Eine Wechselwirkung der Substanz mit den Sensoren kann nicht nachgewiesen werden.

- Temperaturwert: $\Delta V_{\max \text{ p-p}}(\text{Temp}) = 0,06 \text{ }^\circ\text{C}$ (vgl. Abb. 6.23c). Dieser Wert fällt noch kleiner aus, als der in Kap. 3.3.1.2 theoretisch bestimmte Wert von $0,2^\circ\text{C}$.

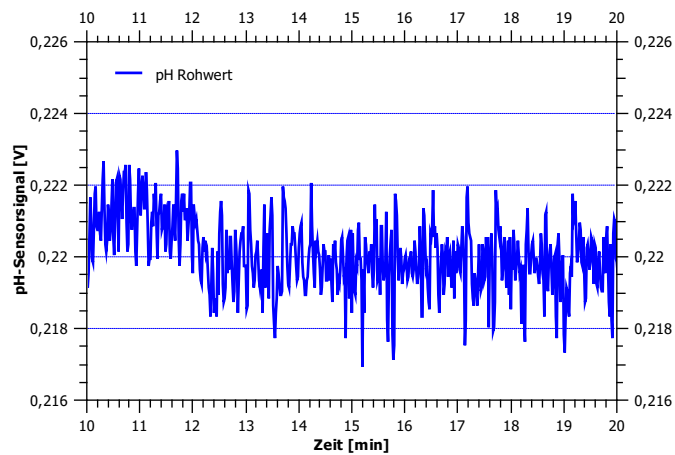
6.6.4. Funktionstest an Zellen (Detektion von Celaflo[®])

Die Ergebnisse eines exemplarischen Pestizidtests an Hefe werden in diesem Kapitel vorgestellt. Die Vorbereitung des verwendeten biohybriden Sensorchips mit den Hefezellen *Vita Vegan* wurde wie in Kap. 6.3.6 beschrieben durchgeführt. Die Messdaten wurden über eine Gesamtdauer von 2,5 Stunden erfasst. Eine Messperiode war zehn Minuten lang, wobei die Pumpe nur in den ersten beiden Minuten mit einer Geschwindigkeit von ca. $150 \mu\text{l}/\text{min}$ betrieben wurde. Nach 80 Minuten wurde das Nährmedium PBS mit 10 mM Glukose durch die mit dem Pestizid Celaflo kontaminierte Lösung ersetzt. Die Hefezellen waren danach einer 0,17%igen Spritzmittellösung ausgesetzt, vergleichbar mit den Konzentrationen, die in den Kapiteln 6.5 und 6.4.5 gezeigt wurden.

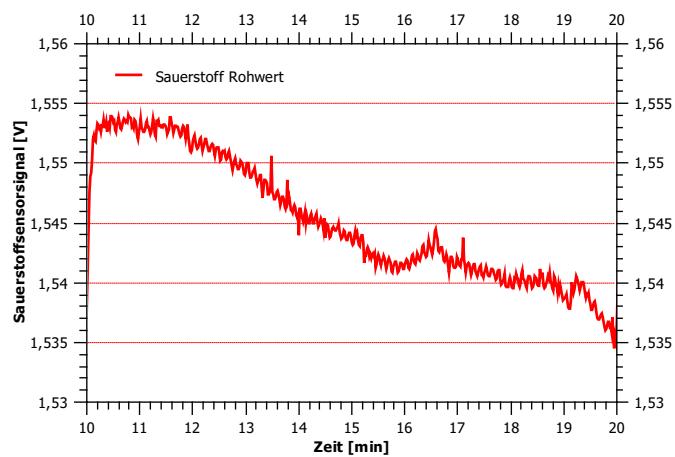
Die Abb. 6.24 zeigt den Verlauf der vom handheld Biosensor ausgegebenen Daten zur Höhe der Temperatur auf dem Sensorchip. Die Graphik zeigt auch, dass der Versuch erfolgreich bei 25°C durchgeführt wurde.

Die Abb. 6.25 und 6.26 stellen die während des Versuchs gemessenen und erfassten Rohdaten des gelösten Sauerstoffs bzw. der zellulären Ansäuerung im Mikromilieu der Hefezellen auf dem Sensorchip dar. Man erkennt die charakteristischen Zacken, die auf die Pumpzyklen zurückzuführen sind, die als vertikale Balken im Diagramm zusätzlich dargestellt sind. Nach dem Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe ($t=80 \text{ min}$, siehe Pfeil in den Diagrammen) kommt der Zellstoffwechsel nahezu vollständig zum Erliegen. Die lokalen Maxima und Minima der Zacken als auch die Steigung (Regression) der Kurven innerhalb eines Messzyklus sinkt mit fortlaufender Versuchszeit.

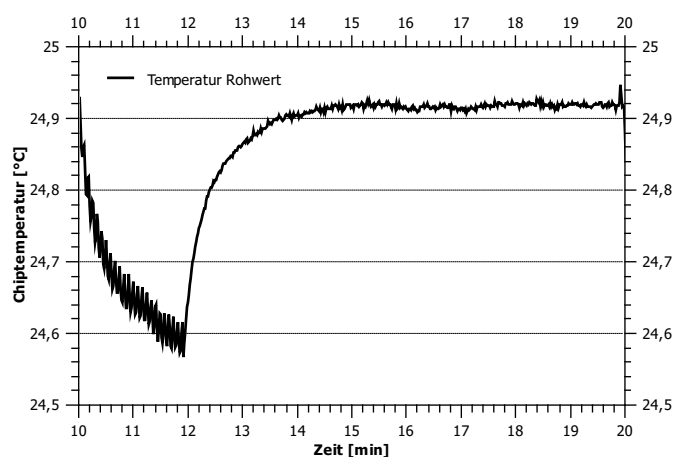
Die Kurven, die Abb. 6.27 zeigt, stellt eine Zusammenfassung sowie eine Datenaufbereitung dar: Die Daten aus den Abbildungen 6.25 und 6.26 wurden mit Hilfe der Gradientenanalyse (vgl. Kap. 6.3.4) aufbereitet, so dass sich der Versuch nun über eine Abnahme der Vitalitätsindikatoren beschreiben lässt. Die Raten über den zellulären Sauerstoffverbrauch und die Ansäuerung lassen erkennen, dass die Aktivität



(a) Sensorrohwert des pH-Signals



(b) Sensorrohwert des Sauerstoffsignals



(c) Absolutwert des Temperatursensors

Abb. 6.23.: Darstellung der vergrößerten Ausschnitte der Sensorsignale. Aus den Graphen der Positiv- und Negativprobe wurde jeweils das rauschbehaftetste Signal genommen, sodass das Peak-to-Peak Rauschen bestimmt werden konnte.

6. Exemplarische Versuchsreihen

des Zellstoffwechsels ca. 20 Minuten nach Zugaben des Pestizids um ca. 70% eingebrochen ist. Am Ende des Versuchs waren die Zellen tot.

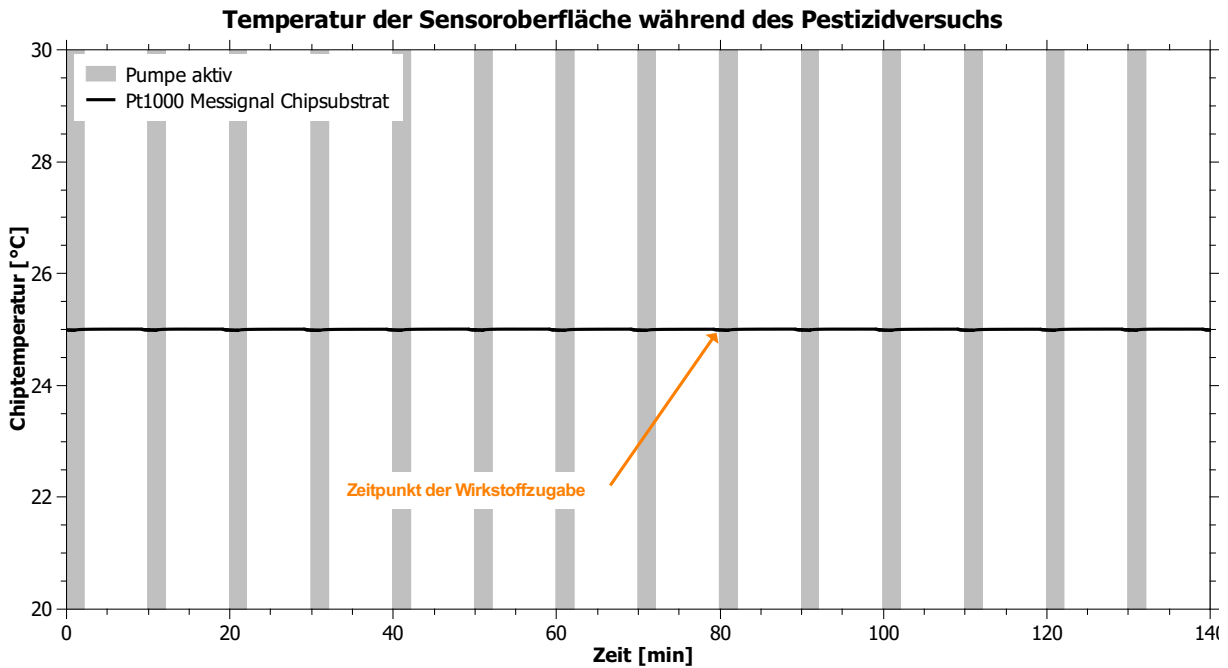


Abb. 6.24.: Gemessenes Ausgangssignal des Pt1000 (Temperatur auf Chipsubstrat) nach Umrechnung auf °C. Die Temperatur schwankte während des Experiments nicht.

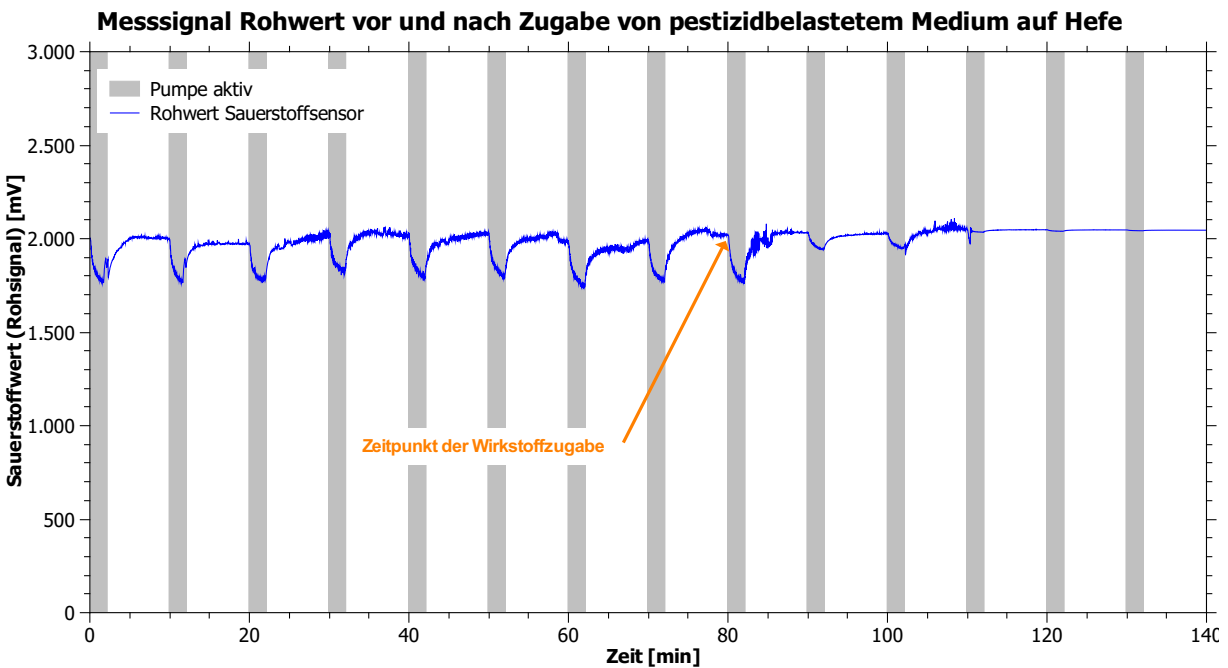


Abb. 6.25.: Gemessenes Ausgangssignal des amperometrischen Sauerstoffsensors. Die zelluläre Atmung bricht nach Zugabe des Pestizids vollständig ein.

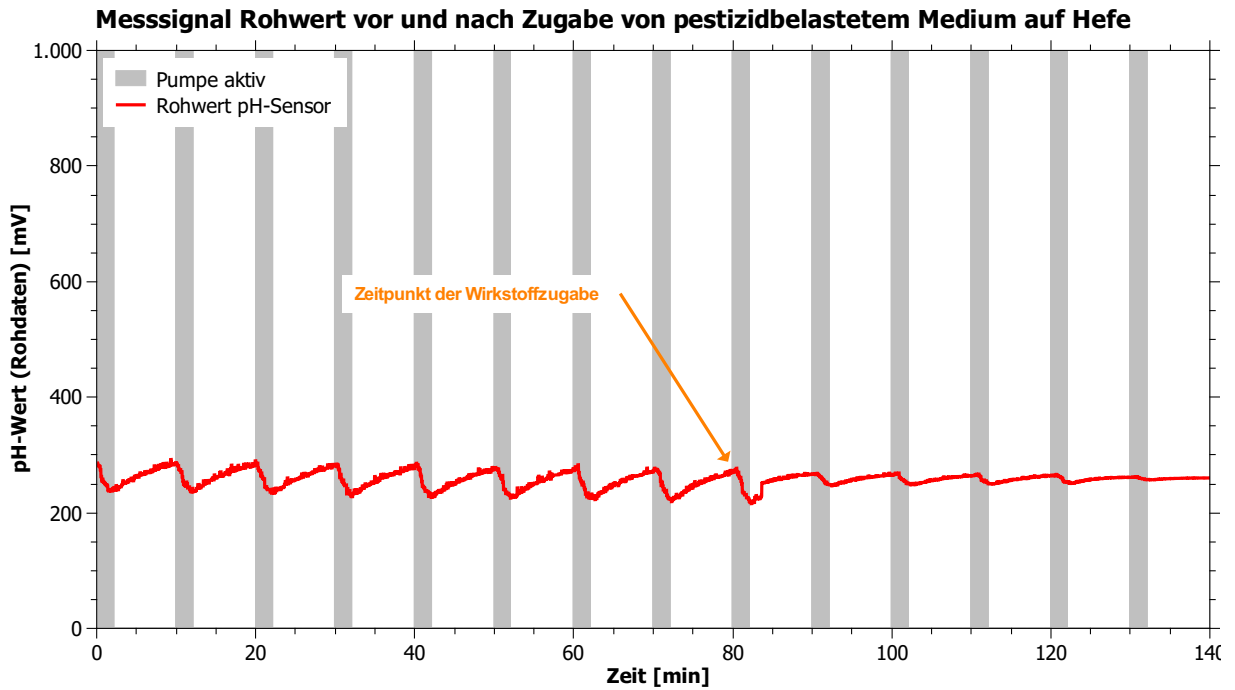


Abb. 6.26.: Gemessenes Ausgangssignal des pH Sensors. Die Hefen können nach Zugabe des pestizidbelasteten Mediums die Umgebung nahezu nicht mehr ansäuern.

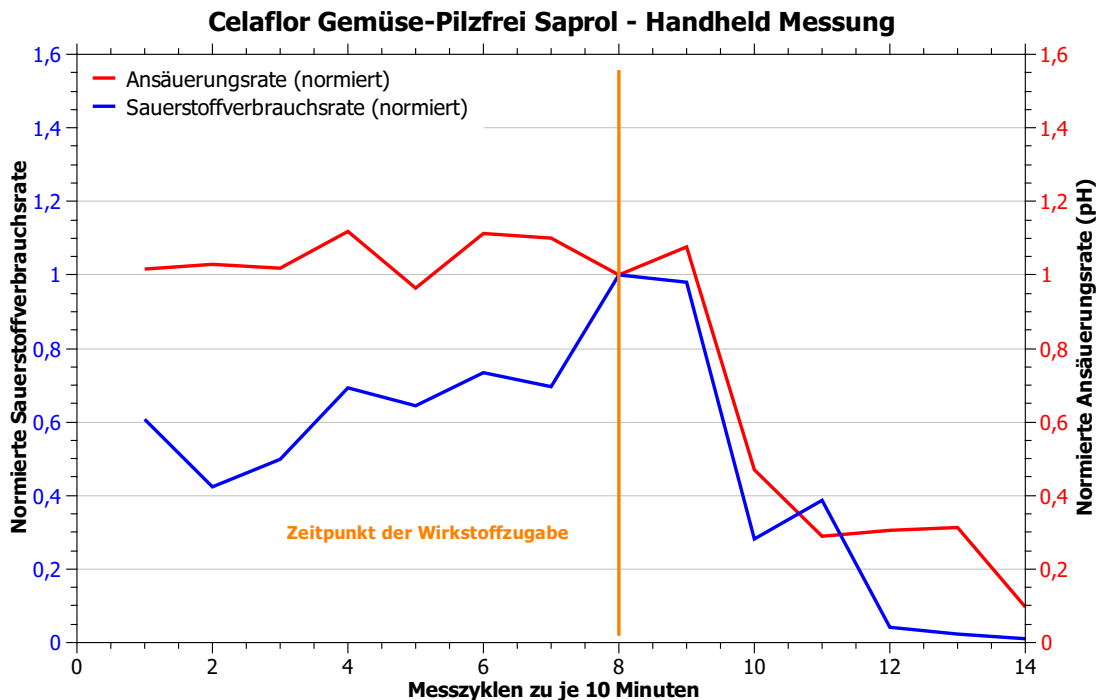


Abb. 6.27.: Berechnete Sauerstoffverbrauchs- und Ansäuerungsrate vor und nach Zugabe von pestizidbelastetem Medium. Beide Kurven wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe nach ca. 80 min normiert. Der Stoffwechsel der Zellen kommt vollständig zum Erliegen.

7. Diskussion

7.1. Möglichkeiten einer weiteren Miniaturisierung und die Diskrepanz zwischen Kosten, Eigenfertigung in der Entwicklung und Platzbedarf

Bei der Entwicklung des handheld Geräts musste ein Kompromiss zwischen der Gehäusegröße und dem Funktionsumfang gefunden werden. Die Größe des Geräts richtet sich hier nach der Platinendichte, wobei EMV und Wärmeentwicklung berücksichtigt werden müssen. Zudem ist die fluidische Ausstattung beliebig erweiterbar (Größe und Anzahl der Reservoirs, Umschaltventile, Heizung etc.).

Einhergehend mit den Platinen ist die Bestückungsdichte, die im Entwicklungs- und Prototypenstadium nicht beliebig klein gewählt werden sollte, da bei einem hochintegrierten Design Fehlersuche und damit verbundene Schaltungsänderungen quasi unmöglich werden.

Der Funktionsumfang richtet sich nach dem Nutzen für den Anwender: Sollten vor Ort Proben genommen werden, die generell auf Toxine untersucht werden sollen, reicht die hier vorgestellte Methodik aus. Eine Spezialisierung auf bestimmte Substanzen, wie es bei Blutzuckermessgeräten der Fall ist, begünstigt die auch hier angestrebte Serienreife erheblich: Die unspezifische Detektion von Schadstoffen mittels lebender Zellen kann durch Anpassung des Sensors im Funktionsumfang und damit in der Größe reduziert werden, wenn die Wirksubstanz genau bekannt ist. Die damit verbundene Anpassung der Fluidik (meist kleinere Behälter, die im Gehäuse integriert und als Disposable angedockt werden könnten) wirkt sich insgesamt auf die Gerätegröße aus. Zudem begünstigt die Massenfertigung der Elektronik und das Absatzpotenzial im Markt eine Miniaturisierung des Produkts. Beispiele hierfür sind Blutzuckermessgeräte, die ohne Flüssigkeit arbeiten und Wasserprüfgeräte, die anhand des pH Werts/Nitratgehalts die Reinheit bestimmen. Zudem seien auch Implantate erwähnt, die lediglich einen einzelnen Parameter als Regelgröße nutzen. Ein Closed Loop System bietet die Firma Medtronic MiniMed, Inc. mit dem Produkt *Paradigm VEO*: Eine Insulinpumpe wird durch die Bestimmung des Zuckergehalts gesteuert. Über einen Katheter wird schnellwirkendes Insulin in das Unterhautfettgewebe (subcutan) abgegeben.

Das hier vorgestellte handheld Biosensor System ist mit einem Gesamtgewicht unter einem halben Kilo (vgl. Tab. 3.9) für den mobilen Einsatz geeignet. Seine Größe entspricht den subjektiven Erwartungen in Bezug auf den Funktionsumfang. Bedienbarkeit und eine weitere Miniaturisierung schließen sich demnach nahezu aus, zumal die Flexibilität der individuellen Anpassung der Sensorelektronik oder auch der Datenschnittstelle verloren gehen würde.

Im Folgenden soll weiter auf die Produktionskosten und die Herausforderungen bzgl. der Größe bei einem Platinendesign im Prototypenstadium eingegangen werden. Die Herstellungskosten des Geräts gliedern sich wie folgt:

- Bauteile
- Bestückungskosten
- Gehäusefertigung
- Biologie/Fluidik
- Platinenherstellung

Dabei sind lediglich die Bauteilkosten in der Entwicklung direkt beeinflussbar. Die Kosten für die Platinenherstellung hängen von mehreren Faktoren ab. Je kleiner die Platine werden soll, umso häufiger

Tab. 7.1.: Bauteildichten pro Platinenmodul im handheld Biosensor

Modulplatine	Anzahl der Bauteile	Dichte (Bauteile pro cm ²)
Analog Modul (50 mm x 50 mm):	83	1,66
FPGA Modul (50 mm x 50 mm):	141	2,82
Impedanz Modul (50 mm x 50 mm):	54	1,08
Display Platine (50 mm x 50 mm):	11	0,22

entstehen Fehler beim Platinendesign und umso mehr re-design Zyklen werden benötigt. Die Handhabbarkeit bei Änderungen des Schaltungsentwurfs wird aufgrund der Bestückungsdichte und kleiner werdenden Bauteilen immer schlechter. Andererseits sinkt der Platzbedarf, wodurch Kosten gespart werden können.

Ein HDI-Projekt als Einzellösung betrachtet ist wirtschaftlich wenig sinnvoll, solange kein Zwang durch Faktoren (wie z.B. Kundenvorgaben) vorliegt. Als kontinuierlich aufgebaute ergänzende Technologie für neue Projekte ist HDI heutzutage wirtschaftlich durchaus sinnvoll und oft (stückzahl- und komplexitätsabhängig) deutlich kostengünstiger als konventionelle Multilayer-Technologie. Die Abb. 7.1 stellt die Kosten einer Standard 8-Lagen Platine einer 4-Lagen HDI Platine gegenüber [167].

Kostenfaktor	Kosteneinfluss	Kostenbewertung	
		8 Lagen Standard	4 Lagen HDI (1-2-1)
Materialaufwand	hoch	-	+
Bearbeitungszeit	hoch	0	+
Anzahl der nötigen Verpressungen	hoch	+	+
Anzahl Galvanik-Durchgänge (DK-Erzeugung)	hoch	+	+
Komplexität Galvanik-Durchgänge (DK-Erzeugung)	mittel	+	0
Bohrkosten (mechanisch / lasergebohrt)	mittel bis hoch	0 / entfällt	+ / ++
Geringste Leiterbahnbreiten/-abstände der Microvia-Lagen	gering*	+	0
Maximales Aspect Ratio	gering*	+	0
Kern-, Laminat- und endgültige Leiterplattendicken	mittel	+	+
Flächenausnutzung auf dem Fertigungsnutzen	hoch	identisch bei vorgegebenem Formfaktor	
Spezielle Anforderungen an den Aufbau z.B. spezifische Impedanzen oder Plugging	hoch	designabhängig; vieles nur in HDI machbar	
Sondermaterialien	hoch	0**	+
Sonstige Sonderanforderungen	hoch	0**	+
Spezielle Oberflächen	hoch	in etwa vergleichbar	
* solange innerhalb der jeweiligen Standardklassen des Herstellers			
** wegen des höheren Gesamt-Materialaufwands			

Abb. 7.1.: Kostenvergleich einer Leiterplatte im klassischen Design mit einer HDI-Ausführung

Bezugnehmend auf die in dieser Arbeit beschriebene Entwicklung ergeben sich die in Tab. 7.1 dargestellten Bauteildichten.

- Platzbedarf Bauteilfootprints: kleinste SMD-Bauteile mit 1,6 mm x 0,8 mm Bauteilgröße
- Handling: durch Bauteilgröße vermutlich grenzwertig
- Entwicklungskosten: Aus Internet-Recherchen s.o. ergibt sich, dass aufgrund viel zu geringer Pin-Dichte eine HDI-Lösung oder eine Multilayer Platine mit mehr als vier Lagen zu kostenintensiv wäre, da kaum Einsparpotential vorliegt. Bei Bauteilen der Größe 0603 passen noch Leiterbahnen zwischen die Pads.

Stellt man in einer Graphik Bauteilhandling, Kosten und Platzbedarf gegenüber, müssen folgende Annahmen getroffen werden, woraus die Abb. 7.2 hervorgeht:

- Kosten der PCB-Herstellung im Vergleich zur Platzensparnis fallen nicht stark ins Gewicht, da auch noch andere Bauteile (ICs etc.) verwendet werden.
- Iterationsschritte: Fünf Layoutentwürfe werden für ein finales Design benötigt, wenn die Bauteil-Packungsdichte hoch ist.
- Handling: Man beachte, dass jede gängige Größe von Kondensatoren in 0805 erhältlich ist, schwierig jedoch bei 0603!
- Diagramm (Abb. 7.2): 1225 entspricht 100% Bauteilgröße, 0201 ergibt 16,4%
- Diagramm (Abb. 7.2): Annahme Handling: 1210 kann man noch gut löten, Abschätzung in %
- Kosten können bei großem Design noch weiter fallen, da Crosstalk und Designrules weniger stark ins Gewicht fallen (→ Analogschaltung).

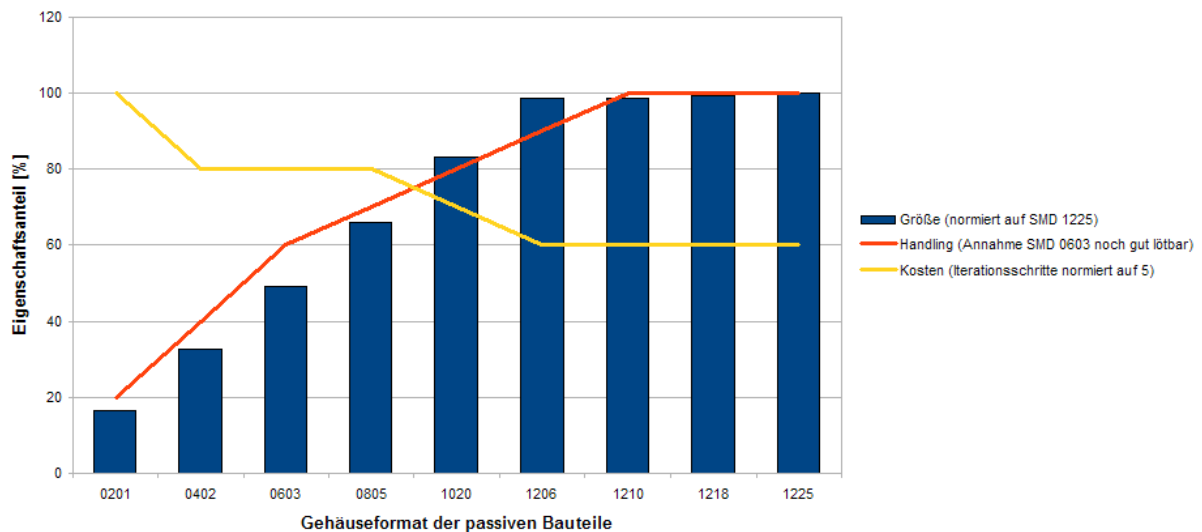


Abb. 7.2.: Gegenüberstellung der Schaltungsentwicklungsfaktoren Handling der Bauteile, Platzbedarf auf der Platine und Kosten der PCB-Herstellung im Prototypenstadium

Bei neuem Design könnten jedoch passive Bauelemente in die Leiterplatte integriert werden, um die Größe weiter zu reduzieren. Dabei wäre das handheld Gerät erneut auf EMV zu testen, weil Signalübersprechen mit der Verkleinerung des Designs exponentiell steigt. Messungen an der Schaltung wären in der Prototypenphase nur noch in begrenztem Rahmen möglich und die Entwicklungskosten stiegen drastisch an (Software, Entwicklung, Herstellung, Bestückung). Durch eine Serienfertigung würden sich diese Kosten später relativieren.

7.2. Umgang mit der Zellimpedanz in den kommerziellen Systemen

Bisher kommt in den IMOLA-Geräten eine Impedanzmesselektronik der Firma RAWE zum Einsatz. Die wesentlichen Kritikpunkte dieser Elektronik sind die statische Einzelfrequenzmessung bei 10 kHz und die Messwertrückgabe in Form eines ohmschen Widerstandes und einer parallelen Kapazität. Das Ergebnis steht vermutlich für einen Real- und Imaginärteil, liefert jedoch ein systematisch falsches Ergebnis: Die

Ursache liegt in einem notwendigen Vorwiderstand, um die 300 mV Ausgangsspannung auf ein zellverträgliches Niveau zu reduzieren. Dieser Vorwiderstand wird zusammen mit der Zellimpedanz gemessen und als Gesamtimpedanz ausgegeben. Es ist daher davon auszugehen, dass sich die alten Ergebnisse aus den RAWE-Messungen nicht mit den neuen Messergebnissen decken werden (nach [36]).

Auch in den Geräten der Firma Applied BioPhysics kommt ein Vorwiderstand zum Einsatz, um die Erregerspannung zu verringern. Die Existenz des Widerstandes wird der möglichen Auswirkungen ungeachtet nicht weiter diskutiert. Ein detailliertes theoretisches Modell zu den Stromwegen über eine Zellschicht ermöglicht es, die Zellimpedanz weit zu abstrahieren und einen Zell-Zell-Index sowie einen Zell-Substrat-Index auszugeben. Damit greift die ECIS-Gruppe als einzige auf eine Modellierung mit Differentialgleichungen zurück. Das Modell basiert aber in der Annahme einer geschlossenen Zellschicht auf den Elektroden und würde bereits bei der beginnenden Ablösung einzelner Zellen oder zu Beginn der Zellkultivierung seine Gültigkeit verlieren.

ACEA Biosciences (Roche) misst die Bioimpedanz bei drei Frequenzen und sucht daraus immer den größten Messwert für die Berechnung des so genannten Zellindex aus. Weil nicht konsistent ein Messwert bei derselben Frequenz gewählt wird, ist die Berechnungsvorschrift äußerst kritisch anzusehen. Außerdem wird für den Zellindex nur dem ohmschen Impedanzanteil Bedeutung zugeschrieben, wobei die Aussage des kapazitiven Anteils, und damit die Phaseninformation, komplett verloren geht. Bemerkenswert ist allerdings der Versuch, die komplexe Thematik der Impedanzinterpretation auf eine sehr einfache Kennzahl zu abstrahieren. Die Auflösungsfähigkeit des ACEA-Systems in der Beobachtung von lebenden Zellen konnte durch mehrere Veröffentlichungen bewiesen werden (z.B. [168]).

Beim CellKey-System wird ein differentielles Ersatzschaltbild anhand von Messergebnissen aus zwölf Frequenzschritten parametrisiert. Damit lassen sich nur Impedanzänderungen detektieren, die jedoch das wesentliche Ziel einer jeden Impedanzspektroskopie sind. Das System ist somit nicht für eine Absolutwertmessung der Zellimpedanz entworfen worden. Für eine Ausgabe der absoluten Zellimpedanz ist das grundlegende Modell eines R-C-Gliedes ohnehin zu abstrakt.

Ähnlich kritisch in diese Diskussion einzubeziehen ist das Gerät von Bionas. Hier wird bei nur einer Messfrequenz gemessen und nur dem imaginären, kapazitiven Impedanzanteil eine Aussage über die Zellimpedanz zugestanden. Bionas berichtet von einer Erregerspannung von 1 mV; ein Spannungsniveau, das sehr viel schaltungstechnischer Raffinesse bedarf. Auf den Biochips der Bionas Gruppe kommen ebenso wie auf dem BioChip-C interdigitale Elektrodenstrukturen zum Einsatz.

7.3. Alternative Impedanzmustererkennung

Während der Literaturrecherche wurde festgestellt, dass sich die Forschungsgruppen in ihrer Interpretation von Zellimpedanz nahezu ausschließlich an die Parametrisierung von Ersatzschaltbildern oder Übertragungsfunktionen klammern [36]. Die elektrotechnische Modellierung von biologischer Zellimpedanz ist jedoch weder sinnvoll noch hilfreich. Nützlich ist aber die Beobachtung von Impedanzmustern bei bekannten Zellzuständen. Anhand der Impedanzspektren können diese Muster leicht detektiert werden:

Mithilfe ausreichend vieler elektrotechnischer Bauelemente kann das gemessene Spektrum durch den Einsatz von Ersatzschaltbildern treffend nachgebildet werden (vgl. [169],[170]). Die Ersatzschaltbilder dienen ausdrücklich nicht der Charakterisierung, sondern sind Mittel zum Zweck der Impedanzmustererkennung! Das Beispiel ist eine Serienschaltung aus einem ohmschen Widerstand und n RC-Gliedern nach folgender Gleichung:

$$Z(\omega) = R_0 + \sum_n \frac{R_n}{j\omega R_n C_n + 1} \tag{7.1}$$

Aus einer Messung liegen k Messwerte zu k Frequenzen vor. Nun ließe sich eine Impedanzmatrix X nach folgender Gleichung erstellen:

$$\underline{Z}(\omega) = \underline{X}(\omega) \cdot \underline{R} = \begin{bmatrix} Z(\omega_1) \\ Z(\omega_2) \\ \dots \\ Z(\omega_k) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & \frac{1}{j\omega_1 R_1 C_{1+1}} & \frac{1}{j\omega_1 R_2 C_{2+1}} & \dots & \frac{1}{j\omega_1 R_n C_{n+1}} \\ 1 & \frac{1}{j\omega_2 R_1 C_{1+1}} & \frac{1}{j\omega_2 R_2 C_{2+1}} & \dots & \frac{1}{j\omega_2 R_n C_{n+1}} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 1 & \frac{1}{j\omega_k R_1 C_{1+1}} & \frac{1}{j\omega_k R_2 C_{2+1}} & \dots & \frac{1}{j\omega_k R_n C_{n+1}} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} R_1 \\ R_2 \\ \dots \\ R_n \end{bmatrix} \quad (7.2)$$

Charakteristische Impedanzmuster sollten nun in der Impedanzmatrix X enthalten sein, die es zu analysieren gilt. Zudem fällt auf, dass $(R_i C_i)^{-1}$ der Grenzfrequenz eines Tiefpassfilters entspricht. Eine derartige Impedanzmatrix enthält also eine Menge Information bezüglich der Frequenzfiltereigenschaften von biologischen Zellen, wie in [171] ebenfalls gezeigt wird.

7.4. Alternative Pumpkonzepte zur Miniaturisierung der Fluidik

Gasentwicklungszelle

Die Gasentwicklungszelle der Schweizer Firma Simatec AG, Wangen a. Aare, Schweiz, (vgl. Abb. 7.3) wurde als weitere Möglichkeit zur Realisierung einer Pumpe für den mobilen Biosensor untersucht. Nachdem die Außenpole der Zelle elektrisch kurzgeschlossen wurden, beginnt diese mit der Gasproduktion und es strömt Wasserstoffgas aus. Befindet sich die Gasentwicklungszelle in einem abgedichteten Kontrollvolumen, so erhöht sich durch die Ausgasung der Zelle der Druck in dem Kontrollvolumen und ein darin befindlicher Kolben wird bewegt.



Abb. 7.3.: Gasentwicklungszelle der Firma Simatec AG, Schweiz. Foto: Simatec AG

Im Versuchsaufbau wurde am oberen Ende einer großvolumigen Spritze eine Verschlusskappe aufgesetzt, in die wiederum ein sog. *Schaltknopf* integriert ist. In diesem Schaltknopf befindet sich die Gasentwicklungszelle. Durch Eindrücken des Schaltknopfes ist der Kontakt geschlossen und die Gasentwicklungszelle beginnt mit dem Ausgasen (vgl. Abb. 7.4).

Ein Vorteil dieses Aufbaus ist, dass das System kippbar und leicht realisierbar ist, kein Kontakt des Gases mit der Flüssigkeit vorliegt und der selbe Aufbau auch mit Gasverzehrzellen anwendbar ist. Der einzige Nachteil besteht in dem Reibungswiderstand des Kolbens, der eine genaue Volumendosierung erheblich erschwert. Soll das System im Intervallmodus betrieben werden, lässt sich der Volumenstrom bei Abschaltung der Zelle nicht abrupt stoppen, da der Druck im Gasvolumen den Reibungswiderstand unterschreiten muss. Demnach kommt es zu einer Verzögerung beim Aktivieren der Pumpe, da erst Druck aufgebaut werden muss. Dennoch sollten hier die Ergebnisse der Evaluierung dargestellt werden:

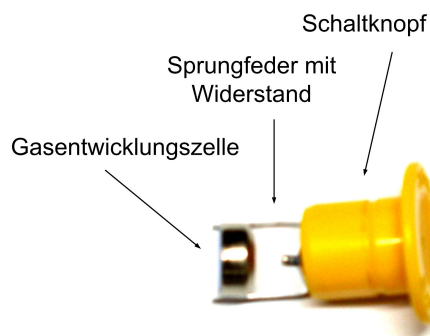


Abb. 7.4.: Schaltknopf zum Einbau in eine Spritze. Durch den Widerstand werden die Pole der Zelle kurzgeschlossen und Wasserstoffgas dringt in den abgedichteten Raum des Kolbens.

Die Versuche wurden stets in einer adiabatischen Umgebung durchgeführt. Der Messaufbau ist wie folgt konstruiert: Die Gasverdrängungszelle wird in einen Spritzenkolben eingelegt (vgl. Abb. 7.5, rechtes Schema). Das geförderte Volumen wird an einer bemaßten Kanüle abgelesen, die mit einem Schlauch verbunden ist. Über das Prinzip der kommunizierenden Röhren wird der Druckverlust kompensiert.

Um die **Linearität** der Gasentwicklungszelle zu testen, wird minütlich der Wasserstand im Kapillarröhrchen abgelesen. Dieser Versuch wird mehrmals mit und ohne Kolben wiederholt. Durch Auftragen der Messwerte gegenüber der Zeit kann grafisch veranschaulicht werden, ob ein lineares Verhalten vorliegt.

Zur Messung der **Temperaturabhängigkeit** befindet sich die Spritze samt Flüssigkeit und Gasentwicklungszelle in einem Inkubator. Lediglich das Kapillarröhrchen wird außerhalb des Inkubators befestigt. Anschließend wird der Inkubator auf $25,7^{\circ}\text{C}$ erhitzt und nach einer Wartezeit von etwa zwei Stunden wird der Versuch gestartet. Über eine Dauer von 15 Minuten wird jede Minute der Wert im Kapillarröhrchen abgelesen.

Die Temperatur wird auf 29°C , 33°C , 37°C , 41°C , 45°C sowie 49°C erhöht, jeweils zwei Stunden gewartet und schließlich wird die Messung durchgeführt.

Für niedrigere Temperaturen wird der Versuch im Labor bzw. im Freien durchgeführt. Dabei werden Messungen bei 4°C , 15°C , 18°C und 21°C gemacht.

Bei den Versuchen zur Linearität und Temperaturabhängigkeit wird zusätzlich jeweils die Zeit gemessen, die benötigt wird, bis sich die Flüssigkeit bewegt (**Zeit zum Starten und Stoppen des Ausgasens**).

Da nicht jede Zelle bei konstantem Widerstand aufgrund von externen Einflüssen die gleiche Gasmenge produziert, wird in das System eine Regelung integriert (siehe Abb. 7.5). Über eine optische Abtastung wird die Position des Kolbens bestimmt.

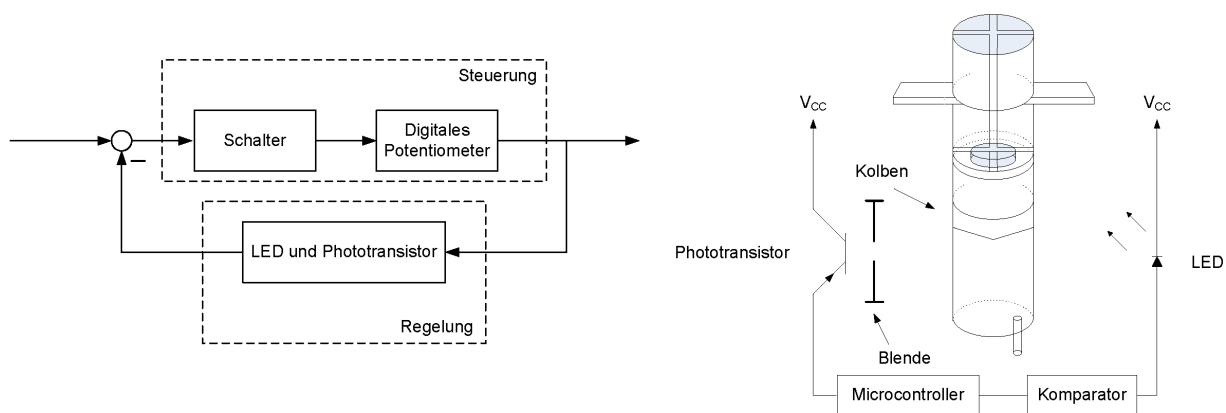


Abb. 7.5.: Links: Regelkreis einer Gasentwicklungszelle. Rechts: Schema der technischen Realisierung über eine optische Abtastung.

Mit Hilfe einer LED ($\lambda = 890\text{nm}$) wird durch das Spritzengehäuse gelehuchtet. Auf der gegenüberliegenden Seite der Diode befindet sich ein Phototransistor (max. Empfindlichkeit bei $\lambda = 930\text{nm}$), der die abgestrahlte Lichtmenge erfasst. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit wird vor dem Phototransistor eine Blende angebracht. Bewegt sich der Kolben in den Lichtkegel der LED, so ist die Lichtintensität geringer. Dies wird am Phototransistor durch Abnahme des Transistorstroms detektiert. Somit ist die Verringerung des Transistorstroms ein Maß für die austretende Flüssigkeitsmenge.

Zur ständigen Erfassung der Kolbenposition wird der Phototransistor mit Hilfe eines Schrittmotors vom Anfang bis zum Ende der Spritze bewegt. Am Ort des Kolbens ist die zu messende Spannung am geringsten.

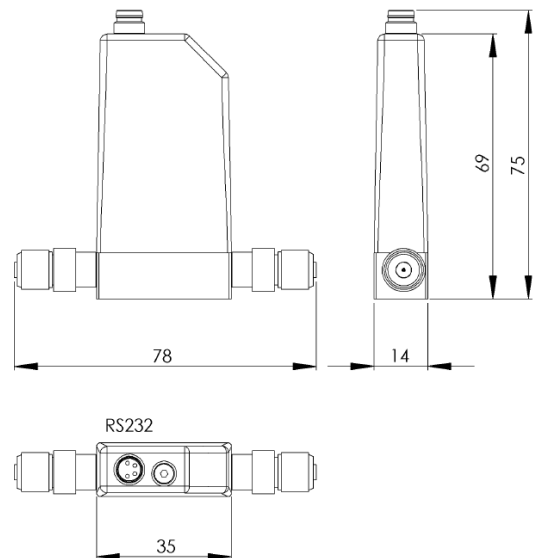
In der Versuchsdurchführung werden sechs LEDs im Abstand von je 1 cm, ein Phototransistor und ein Schrittmotor mit 5 V Versorgungsspannung und 48 Schritten pro Umdrehung verwendet. Der Schrittmotor wird über den PIC16F818 der Firma Microchip Inc. und den Schrittmotortreiber L293D der Firma SGS-Thomson Microelectronics [172], betrieben.

Alternative Feedback-Realisierungen durch eine Scannerzeile eines Flachbettscanners oder der Einsatz einer CCD-Kamera erscheinen für das handheld Gerät zu aufwendig und wurden nicht weiter verfolgt.

Eine weitere Methode, die austretende Flüssigkeitsmenge zu kontrollieren, ist ein Durchflussmesser. Es gibt aber nur wenige Firmen, die ein solches Produkt herstellen, mit dem man im Bereich $\mu\text{l}/\text{min}$ messen kann. Das Unternehmen Sensirion AG, Staefa, Schweiz, bietet ein solches Produkt an (vgl. Abb. 7.6).



(a) Abbildung des Nanodurchflusssensors



(b) Abmessungen des Sensors in mm

Abb. 7.6.: Durchflusssensor der Fa. Sensirion AG zur Messung von kleinsten Volumenströmen.

Die Daten können über eine RS232 Schnittstelle ausgelesen werden. Die Integration des relativ zur restlichen Elektronik doch größeren Systems ist sowohl aus platztechnischen als auch aus wirtschaftlichen Gründen nicht erstrebenswert. Zudem gestaltet sich eine Sterilisierung schwierig, da Medium mit dem System in Kontakt tritt.

Die **Steuerung der Gasentwicklungszelle** und damit der Gasmenge lässt sich proportional zu einem Widerstand regeln. Zur Einstellung des Widerstands wird das digitale Potentiometer AD8402, [173] der Firma Analog Devices verwendet. Dieses hat zwei einstellbare Widerstände von je $1\text{k}\Omega$ mit 1024 Schritten, die über eine SPI-Schnittstelle angesprochen werden können.

Zur Einstellung der Zeitdauer des Gasaustritts muss der Stromkreis unterbrochen werden. Dies geschieht über den elektronischen Schalter Typ ADG620 der Firma Analog Devices [174].

Piezopumpe

Piezopumpen eignen sich zur Förderung kleinster Mengen. Das Prinzip beruht auf einer Membran, die die Flüssigkeit ansaugt und wieder ausstößt. Mikro-Rückschlagventile definieren die Flussrichtung. Die Membran wird durch ein Steuergerät bewegt, wobei ein Hochspannungsgenerator den meisten Platz benötigt. Derzeit bietet die Firma Bartels Mikrotechnik GmbH, Dortmund, Germany, eine leistungsstarke, fast pulsationsfreie Mikropumpe an (Typ mp6, siehe Abb. 7.7). Sie ist die kleinste derzeit auf dem Markt verfügbare Piezopumpe.

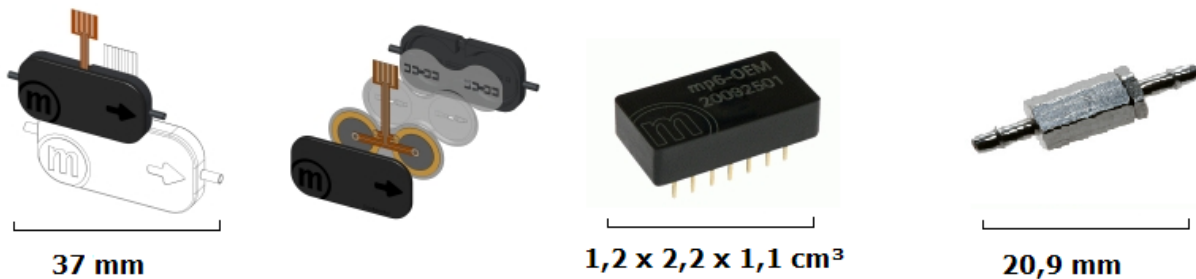


Abb. 7.7.: Links: Doppelkammer-Piezopumpe Typ mp6, daneben eine Explosionszeichnung. Das Steuergerät (3. v.l.) hat ein Volumen von fast 3500 mm³. Ganz rechts ist ein Rückschlagventil abgebildet. Fotos: Fa. Bartels Mikrotechnik GmbH

Wenngleich jeder Hersteller von Piezopumpen angibt, diese seien beständig gegen aggressive Medien, selbst ansaugend und biokompatibel, so ist dies nur bedingt in der vorliegenden Arbeit einsetzbar. Eine Reinigung mit Ethanol ist möglich, jedoch muss jede Flüssigkeit durch einen Vorfilter laufen, damit die Mikroventile nicht durch kleinste Verunreinigungen verstopfen oder nicht mehr ganz schließen. Zudem beeinflusst eine unterschiedliche Viskosität die Förderleistung. Um den Handhabungs- und Verschleißerscheinungen der Membran entgegenzuwirken, kann von der Fa. Bartels eine separate Ersatzmembran geordert werden. Beim Gerätedesign kommen nur zwei Konzepte in Betracht: Entweder man betrachtet die Pumpe als Disposable und vereinfacht das Handling, indem man sich Filter und Reinigung spart. Die Rentabilität muss diskutiert werden. Oder man verbaut die Pumpe im Gerät, wodurch dann zum Platzbedarf die zusätzlichen Komponenten wie Filter und Rückschlagventil gerechnet werden müssen (vgl. Abb. 7.7). Insgesamt betrachtet ist dann einer Miniatur-Schlauchquetschpumpe Vorzug zu geben, da sich der handheld Biosensor im Prototypenstadium befindet.

7.5. Problematik einer Zell- und Gehäusetemperierung

Die für den verwendeten Zelltyp optimale Temperatur liegt bei 22°C bis 37°C. Eine Messung „im freien Feld,“ kann also nur dann erfolgreich sein, wenn sowohl Sensorchip als auch die Fluidik in diesem Temperaturbereich liegen. Dabei sollte die Temperatur nicht schwanken, da dies den Metabolismus unkontrolliert beeinflusst und auch Luftblasen im Schlauchsystem entstehen würden. In dieser Arbeit sollen weitere Methoden diskutiert werden. Letztlich erscheint eine gute Isolation der Behälter, des Geräts während der Messung, und eine Durchführung bei Raumtemperatur am sinnvollsten, da die Alternativen nicht in einem rationalen Aufwand-zu-Nutzen-Verhältnis stehen.

Elektrische Heizung

Eine elektrische Heizung würde man mittels Heizwendeln realisieren, die in die Medienbehälter tauchen und sämtliche Schläuche umschließen. Je nach Außentemperatur müsste eine Temperaturdifferenz durch die elektrische Energie eines Akkus kompensiert werden, der aufgrund der Versuchsdauer in diesem Handheld Gerät kaum mehr Platz findet. Ein zusätzlicher Regler mit Temperaturfühlern vergrößert das System weiterhin.

Chemische Heizung

Eine exotherme Reaktion chemischer Stoffe könnte genutzt werden, wenn man die Reaktion geeigneter flüssiger Stoffpaare ausnutzt. So entsteht bei der Titration einer Säure mit einer Base ohne Zusatz eines

Indikators die sog. Neutralisationswärme. Die Abb. 7.8 zeigt einen Versuch, bei dem 50 ml Salzsäure mit unterschiedlicher Konzentration in einen Behälter gegeben und mit Natronlauge ($c = 5 \text{ mol/l}$) titriert wurde.

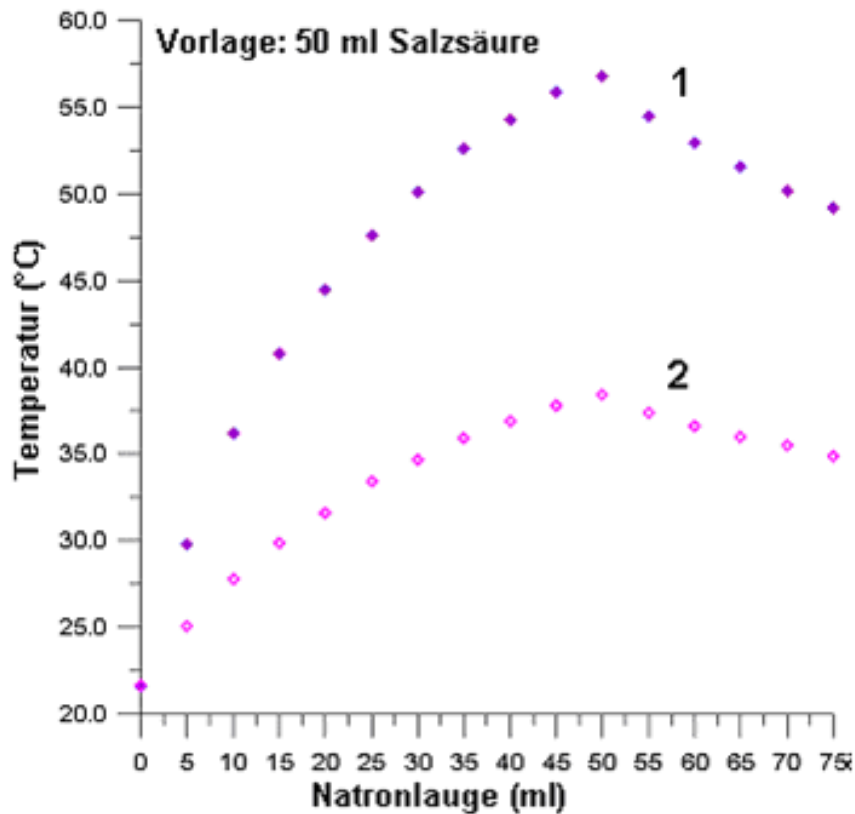


Abb. 7.8.: Titration von Salzsäure bei zwei verschiedenen Konzentrationen (1: $c = 5 \text{ mol/l}$; 2: $c = 2,5 \text{ mol/l}$)

Man erkennt, dass die Kurve bis zu einem gewissen Maximum ansteigt, an dem die Titrationsäquivalenz erreicht ist. Das anschließende Abbiegen der Kurve resultiert aus der abkühlenden Wirkung der kalten Natronlauge [175].

Die Verwendung dieser Neutralisationswärme ist für den handheld Biosensor ungeeignet, da hierfür über einen längeren Zeitpunkt eine konstante Wärmeabgabe nötig ist.

Im Bereich „chemischer„ Heizung ist die Verwendung eines sog. Taschenwärmers ebenfalls möglich. Es handelt sich hierbei um eine Salzlösung aus Wasser und Natriumacetat-Trihydrat im Verhältnis 1:10, eingepackt in eine Plastikfolie [176]. Durch Erhitzen des Wassers löst sich das Salz komplett auf. Bei anschließendem Abkühlen der Flüssigkeit ist die Lösung übersättigt. Es liegt ein metastabiler Zustand vor. Durch Knicken eines in der Folie befindlichen Metallplättchens beginnt an den kleinsten Unebenheiten im Metall die Kristallisation. Dabei wird Kristallisationswärme frei.

Zwar kann mit Hilfe dieses Taschenwärmers eine relativ konstante Temperatur erreicht werden, jedoch passt sich diese nach etwa 30 Minuten langsam der Außentemperatur wieder an [177]. Daher ist diese chemische Heizung nicht für den mobilen Biosensor geeignet.

Taschenofen

Die meisten Taschenöfen werden mit Benzin oder Kohlestäbchen betrieben. Die Brenndauer reicht bis zu vier Stunden. Die Temperatur kann konstruktionsbedingt nicht geregelt werden [177]. Um die Wärme

in die Fluidik zu bekommen, müsste ein zusätzlicher Wärmemittelkreislauf mit Umwälzpumpe installiert werden.

Passive Temperierung und Isolation

Eine passive Temperierung könnte dadurch erreicht werden, dass vor Versuchsbeginn sämtliche Biomaterialien bei ausreichender Temperatur gelagert und vorbereitet werden. Bei Beginn der Messung wird das Gerät mit diesen bestückt. Ein Temperaturabfall könnte dadurch verhindert werden, indem sowohl der Einsatz der Zellkulturröhrchen als auch das abnehmbare Deckelsystem mit geeigneten Materialien isoliert wird. Die im Gerät vorhandenen Hohlräume könnten z.B. mit PU-Schaum ausgespritzt werden und somit ein Auskühlen temporär verhindern.

7.6. Alternativen zum verwendeten FPGA

Die Alternativen zur Realisierung mit einem FPGA besitzen unterschiedliche Vor- und Nachteile. Grundlegende Unterschiede gibt es bei der erreichbaren Miniaturisierung, hinsichtlich des Stromverbrauches und nicht zuletzt beim Preis. Während die Mikrocontroller-Implementierungen sehr stromsparend und preisgünstig zu realisieren sind, bieten die FPGA-Lösungen flexiblere und in der Regel kleinere Strukturen. Mit FPGAs ist es möglich, verschiedene Realisierungsmöglichkeiten sehr schnell zu erproben und damit die optimale Lösung zu finden, während mit Mikrocontrollern die Hardware fest vorgegeben ist. Mit einem Mixed-Signal-FPGA kann ein komplettes System-on-Chip realisiert werden. Die Einschränkung durch die niedrigere Auflösung der AD-Wandler kann durch Oversampling vermieden werden. Da sich die zu messenden Signale zeitlich langsam ändern, ist es möglich, durch Überabtastung und anschließende digitale Filterung und Reduktion die effektive Auflösung auf 16 Bit anzuheben. Die Kapazität des FPGAs bietet genügend Spielraum, dieses Filter in Hardware zu realisieren. Der Stromverbrauch liegt zwar höher als bei der existierenden Lösung, allerdings kann dieser weiter reduziert werden. Die Ursache liegt im hohen statischen Stromverbrauch der analogen Quads und in dem implementierten 32bit ARM Prozessor System. Dieses wurde der Einfachheit halber (da es durch die bestehenden IP-Cores schnell implementiert werden konnte) einer neu programmierten Lösung vorgezogen. Durch Einsatz eines kleineren 8bit Prozessors könnte der Stromverbrauch gesenkt werden.

Eine weitere Stromsparmöglichkeit bietet der Einsatz von Schlafmodi. Nach erfolgter Messung und Verarbeitung könnte der FPGA zeitgesteuert (mit Hilfe des Real-Time-Counters) in den Schlafmodus versetzt und wieder aufgeweckt werden. Die hohe Verarbeitungsgeschwindigkeit macht es möglich, dass der FPGA ca. 60 Prozent der Zeit im Schlafmodus verbringen könnte und bietet somit ein hohes Stromsparpotenzial [93].

Die technologische Entwicklung des Halbleitermarkts zeigt, dass die SoC¹ Entwicklung bzgl. Mixed-Signal-ICs weiter fortschreitet. 80% der Elektronikdesigns werden im Jahr 2012 diese Technik zumindest teilweise nutzen [94]. Sensorschaltungen benötigen immer weniger Energie, womit eine Ansteuerung mit nur einem einzelnen IC vom Schaltungsaufwand immer geringer wird. Die Integration solcher Funktionsgruppen mit einer zusätzlichen Signalverarbeitungseinheit macht die Herstellung kostengünstig, wenn entsprechend große Stückzahlen verkauft werden. Dies bedingt aber wiederum, dass diese ICs maximal flexibel gehalten werden. Das kann nur durch vom Anwender programmierbare Logiken erzeugt werden.

¹System on Chip

8. Ausblick

8.1. Verbesserungen der Gerätetechnik

8.1.1. Gehäuse

Im Verlauf dieser Arbeit sind einige Ideen zur Verbesserung des handheld Biosensors auch in Bezug auf eine spätere Markteinführung entstanden, welche im Folgenden kurz vorgestellt werden.

So hat sich gezeigt, dass Hefezellen als Signalwandler erst ab einer Umgebungstemperatur von über 20°C ausreichend Stoffwechselaktivität aufweisen, um verwertbare Messergebnisse zu produzieren. Da besonders im Feldeinsatz je nach Wetter teils mit erheblich niedrigeren Außentemperaturen zu rechnen ist, sind Maßnahmen zur Erwärmung des Zelltopfs nötig. Da eine elektrische Heizung für ein handheld Gerät zuviel Strom verbraucht und eine chemische Wärmequelle schlecht regelbar ist (vgl. Kapitel 7.5), liegt es nahe, das die Zellen versorgende Medium auf Temperatur zu halten. Das Nährmedium könnte vor dem Einfüllen in den Biosensor erwärmt werden. Um ein zu starkes Abkühlen während des Versuches zu vermeiden, ließe sich der Vorratsbehälter thermisch isolieren. Je nach Versuchsdauer und Außentemperatur könnte es bereits ausreichend sein, die Aufnahme der Medienreservoirs mit geschäumtem Neopren auszukleiden. Die sich im Metabolismus der Zelle widerspiegelnde abnehmende Aktivität durch die dennoch minimal sinkende Temperatur ließe sich durch Algorithmen heraus rechnen. Die Dynamik dieses Verhaltens lässt sich experimentell bestimmen, indem man die Substrattemperatur des Biochips mit den Messkurven korreliert, die man im Labor erzeugt hat.

Ein optimierbarer Teil am aktuellen Gehäusedesign ist das Kopfstück mit der Chipaufnahme. Hier ist der Platz für die Fluidik, für die Referenzelektrode und für den Chipsockel knapp bemessen. Für den Massenvertrieb ist ein spritzgußfähiges Design unabdingbar. Angestrebt ist hier ein Spritzgussdeckel, der elektrische und fluidtechnische Hybridanschlüsse beinhaltet. So wird eine Klips-Lösung realisiert werden, bei der der Bediener vom Anschließen und Einlegen der Medienreservoirs sowie der Integration der biologischen Komponenten (wie z.B. der Hefezellplättchen) entbunden werden kann. Demnach müsste aber auch der Sensorchip selbst modifiziert werden, so dass ähnlich wie bei einem Baukastensystem alle Komponenten kurz vor Versuchsbeginn zusammengesteckt werden können. Durch die in Kap. 5.3.4 angesprochene Gasentwicklungszelle oder einem spannungsaktivierbaren Hydrogel könnte die peristaltische Pumpe gänzlich ersetzt werden.

8.1.2. Elektronik

Eine für die Serienfertigung unverzichtbare Änderung an der zentralen Steuerplatine ist, den FPGA durch einen Standard Mikrocontroller zu ersetzen. Da man durch diese Prototypenentwicklung nun die Parameter bestimmen konnte, die für den Betrieb notwendig sind (RAM, ROM, I/O-Pins, Taktgeschwindigkeit, Schnittstellen, Busanbindung etc.). Dies vereinfacht die Wartung und Weiterentwicklung, da ein Großteil der Komplexität des Systems wegfällt. Darüber hinaus sind mittlerweile durch das rasante Wachstum auf dem Markt der mobilen Kommunikationsgeräte leistungsfähige Mikrocontroller für ein Bruchteil des Preises eines FPGAs erhältlich.

Eine andere Erweiterung für den Feldeinsatz wäre ein Datenloggermodul. Statt aktuelle Messdaten direkt per Funk zu übertragen, könnte ein derartiges Modul die Daten auf einem USB-Stick oder auf einer SD-Karte für eine spätere Analyse im Labor speichern. Derartige Speichermedien sind vergleichsweise preisgünstig und bieten, verglichen mit dem internen Speicher eines FPGAs oder Mikrocontrollers, wesentlich größere Kapazitäten [178].

8.1.3. Biochips

In der Diplomarbeit von Jürgen Milling [179] wurde erstmals ein ein EEPROM (Electrically Erasable Programmable Read-Only Memory) zur Speicherung einer eindeutigen Identifizierungsmöglichkeit direkt auf dem Biochip vorgeschlagen. Über eine solche „Chip-ID“ können nachträglich weitere Daten mit dem Chip verknüpft werden. Da mit der in Kapitel 4 vorgestellten Software dem Endanwender nun erstmalig ein komfortabler Weg zur Umrechnung der Sensorrohdaten in die üblicherweise für eine Größe verwendeten Einheiten vorliegt, bietet es sich an, in einem solchen EEPROM auch Daten zur Sensorkalibrierung abzulegen. Dies ermöglicht den unabhängigen Einsatz des handheld Biosensors.

Eine andere den BioChip-C betreffende Problematik liegt in der Qualität der Referenz-elektrode zur pH-Wert-Messung. Da die Güte der Messergebnisse von dieser Elektrode abhängig sind, kann eine Charakterisierung des Sensors alleine niemals befriedigende Ergebnisse liefern. Abhilfe schaffen könnte hier eine Referenz direkt auf dem Sensorchip. Ein entsprechendes Patent wurde bereits unter anderem vom Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik veröffentlicht.

8.2. Neue Anwendungsgebiete eines handheld Biosensors

8.2.1. Zellchipgeräte allgemein

Mögliche Einsatzbereiche von zellbasierten Biosensoren erstrecken sich quer durch diverse Wirtschaftszweige. Im Gesundheitswesen könnte die Medikamentendosierung individuell an den Patienten angepasst werden, indem vor der Therapie körpereigene Zellen in einem Biosensor den Wirkstoffen ausgesetzt werden [180]. Besonders Krebspatienten könnten davon profitieren, wenn die Wirksamkeit der in Frage kommenden Chemotherapeutika im Vorfeld schnell bestimmt werden könnte [181]. Diese systemische Therapie wird derzeit in einem Verbundprojekt des Heinz Nixdorf-Lehrstuhls für Medizinische Elektronik zusammen mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg (DKFZ) näher beleuchtet. In diesem BMBF Antrag (BioChancePLUS-4, FKZ : 0315114D) geht es auch um eine Validierung der Korrelation von genotypischen und phänotypischen Proben. Da dieses Verfahren dann jedoch eine Diagnose im Sinne des MPG (Medizinproduktegesetz) darstellt, müssen die Ergebnisse statistisch untermauert werden. Dies würde nur mit einer Parallelisierung gelingen, das den Einsatz eines kleinen mobilen Systems nahezu ausschließt.

Während Herzschrittmacher seit langem über eine interne Regelung verfügen, ist es denkbar, durch **Intelligente Implantate** eine Tumorthherapie mit intrakorporalen Sensoren zu etablieren: Im Tumor wird ein biohybrider Sensorchip eingesetzt, der das Wachstum und die Metastasierung über einen längeren Zeitraum überwacht. Proliferation und Aktivität könnten so überwacht werden. Ein Medikamentendosierungssystem würde durch eine elektronische Regelung Chemotherapeutika in entsprechender Dosis abgeben. Ein entsprechendes Forschungsprojekt wird derzeit am Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik unter dem Namen *IntelliTUM* (BMBF FKZ: 16SV3777) bearbeitet.

Aber auch auf weiteren Gebieten ließen sich so wirkungslose Behandlungen einsparen und unangenehme Nebenwirkungen vermeiden: In der Lebensmittelindustrie könnten Biosensoren in der Qualitätssicherung eingesetzt werden, oder um Produktpiraterie und Etikettenschwindel aufzudecken. In entsprechenden Versuchen war es beispielsweise möglich, mittels Hefen zwei verschiedene Energydrinks zu unterscheiden (vgl. Kap. 6.2.3).

Auch in der Landwirtschaft oder im Umweltschutz sind vielfältige Anwendungen denkbar. Wie bereits in der Dissertation von Torsten Stadthagen [20] gezeigt, lassen sich Biosensoren zur Gewässerüberwachung einsetzen. Dieses Verfahren ließe sich auch auf sanitäre Bereiche übertragen, etwa bei Brauchwasseranlagen im Zugverkehr Algenbildung in Wassertanks frühzeitig zu erkennen. Interessant wäre auch die Überwachung der Luftqualität im Straßenverkehr oder bei Industrieanlagen.

8.2.2. Einsatzgebiete für handheld Systeme

Viele dieser Anwendungen können von der Mobilität eines handheld Systems profitieren. Kleine Geräte zur Bestimmung der Medikamentendosierung oder für nicht-invasive Allergietests könnten direkt in der Arztpraxis eingesetzt werden. So würde sich ein Verschicken von Gewebeproben zu einem Speziallabor erübrigen. Mittels spezieller Zellen oder Enzyme auf dem Biochip (siehe Kap. 8.2.4) ließe sich Urin, Speichel

oder ein Wangenabstrich untersuchen. Es könnte sich hieraus auch eine neue Klasse von Geräten für Drogentests in der Polizeiarbeit entwickeln.

In der industriellen Lebensmittelherstellung oder im Einzelhandel sind mobile Systeme für die Überwachung von Produktionsprozessen oder gelagerten Waren denkbar. Hier könnte die Bestimmung der Bakterienkonzentration in einer Probe Rückschlüsse auf die zu erwartende Haltbarkeit von Produkten ermöglichen. Die in jüngster Vergangenheit aufgedeckten Skandale rund um verdorbenes Fleisch ließen sich damit ebenso aufspüren wie der Einsatz unerlaubter Zusatzstoffe. Auch gefälschte Markenware könnte in diesem Zusammenhang frühzeitig erkannt werden. Dass solche Vorhaben auch von anderer Seite kommerziell verfolgt werden, zeigt das Gerät „Freshscan“, das per Laserstrahl und Fluoreszenz die Güte von abgepacktem Fleisch bestimmen kann [182].

Besonders bei der Bestimmung der Güte von Fließgewässern sind mobile Biosensoren interessant, welche über eine drahtlose Datenübertragung über das Mobilfunknetz verfügen. Derartige Geräte könnten im Außeneinsatz verwendet werden, um entsprechende Proben direkt vor Ort analysieren zu können.

In Zeiten, in denen durch chemische Kriegsführung die Angst vor Terror und Anschlägen wächst, wäre es möglich, mobile Biosensoren zur Kampfstoffdetektion einzusetzen (Biosafety). Abgeworfen aus einem Luftfahrzeug würden kostengünstige Geräte, die mit einer drahtlosen Kommunikationsschnittstelle ausgestattet sind, schnell Informationen über Dosis und lokale Verteilung liefern. Gentechnisch veränderte Hefezellen sind bereits in der Lage, Sprengstoff zu detektieren ([183]). Chlorgas in toxischen Konzentrationen aufzuspüren, welches wie ein Fungizid wirkt [184], ist mehr als denkbar (vgl. Kap. 6.4).

8.2.3. Alternative Zelltypen

Bisher wurden für diese grundlegenden Versuche nur Hefezellen als Signalwandler eingesetzt. Als aussagekräftiger Vitalparameter hat sich der durch die Zellatmung eingestellte Sauerstoffverbrauch erwiesen. Verwertbare Ergebnisse sind bereits bei Raumtemperatur zu erzielen, wie in Kap. 6.6 gezeigt werden konnte. Gentechnisch veränderte Hefen lassen sich auch zum Nachweis von Stoffen einsetzen, auf welche herkömmliche Hefestämme nicht reagieren. So konnten beispielsweise Hefen geschaffen werden, welche Östrogene in Umweltproben detektieren können [54]. Derartige Spezialhefen eröffnen dem handheld Biosensor weitere Einsatzgebiete, etwa in Kläranlagen. Ein neben Hefen ebenfalls industriell vielseitig eingesetzter Mikroorganismus ist das Milchsäurebakterium, lat. *Lactobacillus*. Es wandelt Glukose in Milchsäure um [185] und wird hauptsächlich in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Diese Stoffwechselaktivität müsste sich über eine Veränderung des pH-Wertes des Mediums nachweisen lassen und so würde dies Rückschlüsse auf die Vitalität der Zellen zulassen. Im Gegensatz zu Hefen läuft die Milchsäuregärung in der Regel oberhalb von 40°C ab. Aufgrund der bedeutenden Verbreitung der *Lactobacillales* und der großen Erfahrung in der Handhabung würden diese einen leichten Einstieg in dahingehende Forschungsaktivitäten bieten. Für den Einsatz bei niedrigen Temperaturen könnten sich Grünalgen als Signalwandler, neben dem bereits genannten Anwendungen in der Gewässeranalyse, auch für andere Bereiche eignen. Da diese Organismen Photosynthese betreiben, ist eine Erweiterung des Biosensors um eine LED (Light Emitting Diode) im Fluidikkopf nötig, um eine kontrollierbare Beleuchtung zu ermöglichen. Generelle Voraussetzung für den breiten Einsatz eines Zelltyps ist eine unkomplizierte Handhabung.

8.2.4. Enzyme als alternative Signalwandler

Um noch einen Schritt weiter zu gehen, wäre es möglich, die bisher zur Signalwandlung eingesetzten Zellen durch anwendungsspezifische Enzyme zu ersetzen. Da diese nicht wie Zellen permanent mit Nährmedium versorgt werden müssen, könnte so auf ein aufwendiges Fluidiksystem verzichtet werden. Da Enzyme sehr selektiv nur auf bestimmte Stoffe reagieren [185], stellen sie auch von ihrer Wirkungsweise eine interessante Alternative zu zellbasierten Analysen dar. Spezialisierte Biosensoren zur Blutzuckermessung in der Diabetesbehandlung verwenden bereits enzymbasierte Messmethoden [186]. Eine universelle Plattform für mobile Anwendungen auf Basis von Enzymen stellen eine weitere Ausrichtungsmöglichkeit für den in dieser Arbeit vorgestellten handheld Biosensor dar.

8.3. Aspekte zum Einsatz eines handheld Biosensors

Verbraucher in ganz Europa achten immer stärker darauf, woher ihre Lebensmittel kommen und nach welchen Standards sie verarbeitet werden. Daher ist es auch für die Europäische Union von größter Wichtigkeit, Rahmenbedingungen und strenge Vorschriften für die Lebensmittelsicherheit zu schaffen, um sicherzustellen, dass die Lebensmittel der Europäer so sicher wie möglich sind. Vorschriften ermöglichen es, dass die Lebens- und Futtermittel vom Erzeuger bis zum Endverbraucher sorgfältig verfolgt und geprüft werden können. Durch unterschiedliche wissenschaftliche Gutachten auf hohem Niveau wird eine Risikoabwägung getroffen, bevor ein Erzeugnis, eine Zutat, ein Zusatz oder ein gentechnisch veränderter Organismus zugelassen oder verboten wird.

Um diese Sicherheit für Lebensmittel zu gewährleisten, sind sehr viele Kontrollen notwendig. Diese Kontrollen sind sowohl zeit- als auch kostenintensiv. Um diese negativen Faktoren zu minimieren und trotzdem den hohen Standard der Kontrollen aufrecht zu erhalten, könnte ein mobiler Biosensor zum Einsatz kommen.

8.3.1. Die Lebensmittelsicherheitsstrategie der Europäischen Union (EU)

Die EU möchte mit Hilfe einer umfassenden Lebensmittelsicherheitsstrategie und mittels moderner Lebensmittel- und Hygienestandards die Risiken auf ein Mindestmaß begrenzen. Die Lebensmittelsicherheit beginnt in den landwirtschaftlichen Betrieben und erstreckt sich über den gesamten Produktions- und Vertriebsweg bis hin zum Verbraucher.

Die Lebensmittelsicherheitsstrategie der Europäischen Union stützt sich auf vier Pfeiler (Europäische Kommission, 2004):

- Vorschriften für die Sicherheit von Lebens- und Futtermitteln
- Unabhängige und öffentlich zugängliche wissenschaftliche Gutachten
- Maßnahmen zur Durchsetzung der Vorschriften und zur Prozesskontrolle
- Anerkennung des Rechts der Verbraucher, anhand vollständiger Informationen über Herkunft und Inhaltsstoffe der Lebensmittel eine Auswahl zu treffen.

Dies hat jedoch nicht zur Folge, dass alle Lebensmittel gleich sein sollen. Die Europäische Union fördert vielmehr die Produktion traditioneller Lebensmittel und lokaler Spezialitäten und schützt diese vor Nachahmung.

8.3.2. Durchsetzung und Kontrolle der Behörden

Es gibt eine Vielzahl von Behörden und Institutionen, die dazu beitragen, dass unsere Lebensmittel sicherer werden. In Deutschland sind für die primäre Lebensmittelüberwachung die Bundesländer zuständig. Vor Ort werden durch Lebensmittelüberwachungs- und Veterinärämter der Kreise Proben genommen und die Betriebe kontrolliert. Diese Kontrollen werden auf allen Stufen der Lebensmittelherstellung durchgeführt und erfolgen ohne Vorankündigung. In der Verordnung über die fachlichen Anforderungen gemäß §42 Abs. 1 Satz 2 Nr. 3 Buchstabe b ist geregelt, welche Voraussetzungen für Kontrolleure notwendig sind (vgl. [187]).

Die Behörden überprüfen, ob die gesetzlichen Vorschriften hinsichtlich der Zusammensetzung, der gesundheitlichen Unbedenklichkeit und der korrekten Kennzeichnung der Lebensmittel eingehalten werden. Werden Anhaltspunkte für einen Verstoß festgestellt, so wird das entsprechende Produkt beanstandet und gegebenenfalls aus dem Handel entfernt.

8.3.3. Grenzen der Lebensmittelsicherheitspolitik und Chancen eines handheld Biosensors

Mit Hilfe der EU-Basis-Verordnung ist es der Europäischen Union gelungen, dem Verbraucher von Lebensmitteln ein hohes Maß an Sicherheit zu garantieren und ihm ausreichende Informationen an die Hand zu geben. Dennoch stößt auch die Lebensmittelsicherheitspolitik der Europäischen Union an ihre Grenzen.

Zum einen weist die Risikobewertung Unsicherheiten bzgl. Verlässlichkeit und Angemessenheit der Studie und Möglichkeit unerkannter Effekte auf. Zudem ist die Heterogenität der untersuchten Parameter trotz aller Vorkehrungen nicht gewährleistet. Auch sind Streuungen hinsichtlich der definierten Zielpopulation (Männer/Frauen) und des definierten Zeitpunkts (Winter/Sommer) vorhanden.

Zum anderen weist die Rückverfolgbarkeit Mängel auf. Reichweite und Selektivität können durch gewisse Verfahren in der Praxis beeinträchtigt werden. Auch kann sich die Rückverfolgung bei hohem Zerkleinerungs- und Verarbeitungsgrad als schwierig erweisen. Schließlich kann die Infrastruktur vor allem beim Import von Waren aus Dritte Welt Ländern ein Hindernis für die aufwärts gerichtete Rückverfolgbarkeit sein.

Da die Europäische Union nicht alle lebensmittelherstellenden bzw. -verarbeitenden Betriebe ständig kontrollieren kann, verlässt sie sich auf die Eigenkontrollen der Lebensmittelindustrie. Dabei kann es zu unsachgemäßen oder mangelnden Messungen kommen.

Der in dieser Arbeit vorgestellte Biosensor, ein intelligentes mobil einsetzbares Labor, kann einerseits den Kontrolleuren der staatlichen Behörden dienlich sein, schnelle und aussagekräftige Messungen an Lebensmitteln durchzuführen. Dies brächte den Vorteil, dass keine aufwendigen Laborgerätschaften mitgeführt bzw. sämtliche Proben in dafür vorgesehene Labors transportiert werden müssten.

Auf der anderen Seite kann das Gerät auch betriebsintern für die vorgeschriebenen Proben (Qualitätskontrollen von Lebensmitteln, Keimtests, Getränketest, Reinheitstests etc.) verwendet werden. Dadurch können Zeit und Kosten eingespart werden.

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Schematische Darstellung der Funktion des hier vorgestellten mobilen Biosensors.	23
1.2.	Kompartimentierung der Zelle	24
1.3.	Funktionsweise eines Biosensors	25
1.4.	Transformation von molekularen und pharmakologischen Eingangssignalen durch die Zelle	27
1.5.	Messung der Impedanz mit Hilfe von ECIS [34].	29
1.6.	Corning@Epic@System, Quelle: [37]	29
1.7.	Substrat-Konzentrationsabhängigkeit des humanen PepT1 mit SURFE ² R, Quelle: [39]	30
1.8.	MDS Analytical Technologies CellKey TM 384 System, Quelle: [40]	31
1.9.	xCELLigence System, Quelle: [41]	31
1.10.	Prinzip des optischen Sensors im BIND System, Quelle: [32]	32
1.11.	Bioprozessautomat der Firma PAN Systechn GmbH	33
1.12.	Sensorkammersystem des Bioprozessautomaten Pansys 3000	33
1.13.	Übersicht über die am Lehrstuhl entwickelten Geräte und deren verwendete Sensorchips.	35
1.14.	Bezug von Gerätegröße zu Anwendungsflexibilität aufgrund von Mobilität	36
1.15.	Stationärer Aufbau eines am LME entwickelten Biosensorsystems (IMOLA)	37
1.16.	Darstellung der im IMR verwendeten multiparametrischen Sensorplatte	38
1.17.	Darstellung des IMR Gesamtsystems ohne Steuerrechner	39
1.18.	Darstellung des Systems zur Erfassung der Potentiale elektrisch aktiver Nervenzellen	40
1.19.	Darstellung des Sensorchips zur Erfassung der Nervensignale	40
1.20.	Übersicht der am Lehrstuhl für Medizinische Elektronik entwickelten biohybriden Sensorchips	41
1.21.	Foto und keramische Substratstruktur des verwendeten Biosensorchips	42
1.22.	REM-Aufnahme einer Tumorzelle auf einem siliziumbasierten Biosensorchip	42
1.23.	Illustration des portablen Messgerätes CELlectrodeLAB	43
1.24.	Zweigeteiltes Kofferlabor zur in-vitro Analyse von Aktionspotenzialen auf MEAs	44
1.25.	Tragbarer Biosensor zur Erkennung toxischer Verunreinigungen in Gewässern	45
2.1.	Etabliertes Vorgehen bei einer allgemeinen elektro-chemischen Impedanzspektroskopie	48
2.2.	Funktionsblöcke des Impedanzmesssystems AD5933, Quelle: [77]	51
2.3.	Konzeptioneller Schaltungsaufbau mit galvanischer Trennung.	53
2.4.	Funktionsgruppen und Schaltplankonzept für das AD5933- Impedanzmesssystem	54
2.5.	Impedanzspektren von MCF-7 Zellen unter 50%iger Sensorabdeckung	54
2.6.	Impedanzspektren von MCF-7 Zellen unter 50%iger und 100%iger Sensorabdeckung	55
2.7.	Impedanzmessung: Einfluss des Kalibrierwiderstandes auf die Linearität	56
2.8.	Impedanzmessung: Frequenzverlauf des Mittelwertes und der Varianzen	57
2.9.	Impedanzmessplatte mit dem AD5933 zur Verwendung im handheld Biosensor.	58
2.10.	Bodediagramme der Sensoren I, II und III direkt nach begonnener Zellkultivierung in DMEM.	60
2.11.	Bodediagramme der Sensoren I, II und III nach 18-stündiger Inkubationsdauer.	60
2.12.	Bodediagramme der Sensoren I, II und III 1,5 Stunden nach Medienwechsel	61
2.13.	Bodediagramme der Sensoren I, II und III nach Zellbehandlung mit Triton X-100.	61
2.14.	Bodediagramme des Sensors I über die gesamte Versuchsreihe.	62
3.1.	Schematischer Aufbau des handheld Biosensors	63
3.2.	Übersicht der verwendeten Komponenten des handheld Biosensors.	65
3.3.	Schema der Temperaturschaltung	66
3.4.	Aufbau des INA155 [83]	68
3.5.	Temperaturschaltung — Einschwingen bei 37°C	69
3.6.	Temperaturschaltung — V_{CC} -Sweep	70
3.7.	Schema der pH-Schaltung	71

3.8. Betragsverlauf der Filter-Übertragungsfunktion	72
3.9. pH-Schaltung — pH-Sweep	73
3.10. pH-Schaltung — GND-Shift	73
3.11. pH-Schaltung — V_{CC} -Sweep	74
3.12. Clark-Sensor des biohybriden Sensorchips (<i>BioChip-C</i>)	74
3.13. Schema der Sauerstoffschaltung	75
3.14. Schema der Sauerstoffschaltung	75
3.15. Schaltplan der Isolation mit dem HCNR201	76
3.16. Sauerstoffschaltung — pO_2 -Sweep	77
3.17. Sauerstoffschaltung — Einschwingen bei $V_{in} = 2,7V$ (a)	78
3.18. Sauerstoffschaltung — Einschwingen bei $V_{in} = 2,7V$ (b)	79
3.19. Actel Libero Design Flow	81
3.20. Berechnung des Leistungsbedarfs des FPGAs mit <i>Smart Power</i>	83
3.21. Screenshot der Entwicklungsumgebung nach erfolgter Crosstalk-Analyse	84
3.22. Ausgangssignal eines DAC der Digitalplatine	85
3.23. Aktive Backplane für Signalarouting und Spannungsversorgung	85
3.24. Signal-Rausch-Abstand der Temperaturmessung	88
3.25. Schema des ASIC Digitalteils	90
3.26. Schema der Frequenzspannungserzeugung der ASIC Impedanzmessung	91
3.27. Schema der Impedanzmessung im ASIC	91
3.28. Schema der pH-Messschaltung im ASIC	92
3.29. Schema der kapazitiven potentialgetrennten Kopplung von Signalen im ASIC.	93
3.30. Schema der kapazitiven Kopplung des Datentransfers von Registerinhalten im ASIC.	93
3.31. Schema der kapazitiven Ankopplung von Sensormodulen im ASIC.	94
3.32. Übersicht über die Vernetzung der verwendeten Hardwaremodule	95
4.1. Kommunikationspfade im handheld Biosensor	97
4.2. Architektur der zentralen Steuersoftware des handheld Biosensors	98
4.3. Funktionsweise der Messwertaufnahme	100
4.4. Einige Bilder des LC-Displays in Betrieb	102
4.5. Modell der Software des Impedanzmoduls als Zustandsautomaten	104
4.6. Ablaufdiagramm einer Impedanzmessung mit dem AD5933	105
4.7. Prinzip der linearen Interpolation bei der Zweipunktkalibrierung des AD5933	106
4.8. Ablaufdiagramm der Firmware im Mikrocontroller der Impedanzplatine	106
4.9. Screenshot von QtiPlot	109
4.10. Screenshot des Impedanztesters	110
4.11. Screenshot der Steuerung des handheld Biosensors	111
4.12. Screenshot der Parametereingabe für eine Gradientenanalyse	113
4.13. Screenshot der QtiPlot Ergebnisse der Gradientenberechnung	113
4.14. Struktur von DALiA	115
4.15. Clientapplikation von DALiA	115
4.16. Serverapplikation von DALiA	116
4.17. Präsentationsumgebung von DALiA	117
5.1. Kontaktsteifen zur elektrischen Anbindung des Sensorchips	120
5.2. Konzept des zweiteiligen Gehäuseentwurfs	122
5.3. Detailansicht des Rapid Prototyping Gehäuses.	123
5.4. Barrel und Ag/AgCl Referenzelektrode des mobilen Biosensorgeräts	124
5.5. Prinzip einer peristaltischen Pumpe. Quelle: Steinle Industripumpen GmbH, Düsseldorf	127
5.6. Schema und Realansicht der verwendeten Mikro-Schlauchquetschpumpe RP-Q1. Quelle: Takasago Electric, Inc.	127
6.1. Sauerstoffkurve beim BioChip-C Chiptest.	130
6.2. Sauerstoffkurve beim BioChip-C Chiptest bei verschmutzten Kontaktflächen.	131
6.3. Temperaturkurve beim BioChip-C Chiptest.	131
6.4. pH-Wertkurve beim BioChip-C Chiptest.	132
6.5. pH Sensortest bei schlechtem Chipkontakt zur Messplatine	132

6.6.	Gegenüberstellung der Sauerstoffsensorsignale von Hefe nach dreimonatiger Lagerung	134
6.7.	Hefekonzentration: 100 mg/4ml mit unterschiedlichen Pumppausen und variabler Pumprate	135
6.8.	Darstellung der pH-Wert Rohdaten zweier Energydrinks	137
6.9.	Darstellung der Sauerstoffverbrauchs-Rohdaten zweier Energydrinks	138
6.10.	Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs zweier Energydrinks	139
6.11.	Exemplarische Darstellung der Zellatmung (Rohdaten)	141
6.12.	Verkaufsvolumen der weltweit zugelassenen herbiziden Wirkstoffe	142
6.13.	Normierte Sauerstoffverbrauchsrate bei Zugabe von Neudo [®] -Vital Obst-Pilzschutz	147
6.14.	Normierte Sauerstoffverbrauchsrate bei Zugabe von Roundup [®] LB Plus Unkrautfrei	148
6.15.	Normierte Sauerstoffverbrauchsrate bei Zugabe von Dithane NeoTec	148
6.16.	Normierte Sauerstoffverbrauchsrate der Hefezellen bei Zugabe von Universal Pilzfrei M	149
6.17.	Normierte Sauerstoffverbrauchsrate bei Zugabe von Celaflor [®] Gemüse-Pilzfrei Saprol [®]	150
6.18.	Berechnete Ansäuerungsrate vor und nach Zugabe von pestizidbelastetem Medium	151
6.19.	Berechnete Sauerstoffverbrauchsrate vor und nach Zugabe von pestizidbelastetem Medium .	151
6.20.	Rohsignale der Verstärkerausgangsspannungen von pH und O ₂	152
6.21.	Rohsignal der Verstärkerausgangsspannung des Pt1000 nach Umrechnung auf °C	153
6.22.	Rohsignale von pH, O ₂ und Temperatur vor und nach Zugabe von pestizidbelastetem Medium	154
6.23.	Darstellung der vergrößerten Ausschnitte der Sensorsignale	155
6.24.	Gemessenes Ausgangssignal des Pt1000 nach Umrechnung auf °C	156
6.25.	Gemessenes Ausgangssignal des amperometrischen Sauerstoffsensors	156
6.26.	Gemessenes Ausgangssignal des pH Sensors	157
6.27.	Sauerstoffverbrauchs- und Ansäuerungsrate bei Zugabe von pestizidbelastetem Medium . .	157
7.1.	Kostenvergleich einer Leiterplatte im klassischen Design mit einer HDI-Ausführung	160
7.2.	Gegenüberstellung der Schaltungsentwicklungsfaktoren	161
7.3.	Gasentwicklungszelle der Firma Simatec AG	163
7.4.	Schaltknopf zum Einbau in eine Spritze	164
7.5.	Schema einer Gasentwicklungszelle	164
7.6.	Durchflusssensor der Fa. Sensirion AG zur Messung von kleinsten Volumenströmen.	165
7.7.	Doppelkammer-Piezopumpe Typ mp6 mit Explosionszeichnung	166
7.8.	Titration von Salzsäure bei zwei verschiedenen Konzentrationen	167
A.1.	Kommunikationskonzept für den handheld Biosensor	200

Tabellenverzeichnis

1.1. Übersicht von Anbietern mit „Label-free“ Technologie	34
1.2. Anzahl und Typen der verwendeten Sensoren	41
2.1. Vergleich der AD5933 Impedanzplatine mit dem Solartron SI1250	59
3.1. Daten des AD8552	67
3.2. Daten des LT1790-25	67
3.3. Daten des INA155	68
3.4. Daten des LMP7702	72
3.5. Daten des LMC6035	76
3.6. Pinbelegung der aktiven Backplane	86
3.7. Vergleich verschiedener Akkutypen mit Leistungsdichte	87
3.8. Stromverbrauch der einzelnen Komponenten	96
3.9. Gewicht der einzelnen Komponenten	96
4.1. Informationen über die einzelnen Tasks	99
5.1. Aufüstung der evaluierten Mikropumpen	126
6.1. Verwendete Hefesorten zur Bestimmung der bestmöglichen Eignung für den BioChip-C . . .	133
6.2. Parameter der Messphasen in Abb. 6.7	134
6.3. Gebrauchshinweise laut Produktdatenblatt von Roundup®	143
6.4. Herstellungs- und Nachbearbeitungsschritte einer sensorbestückten Multiwellplatte (iMWP)	146
7.1. Bauteildichten pro Platinenmodul im handheld Biosensor	160

A. Anhang

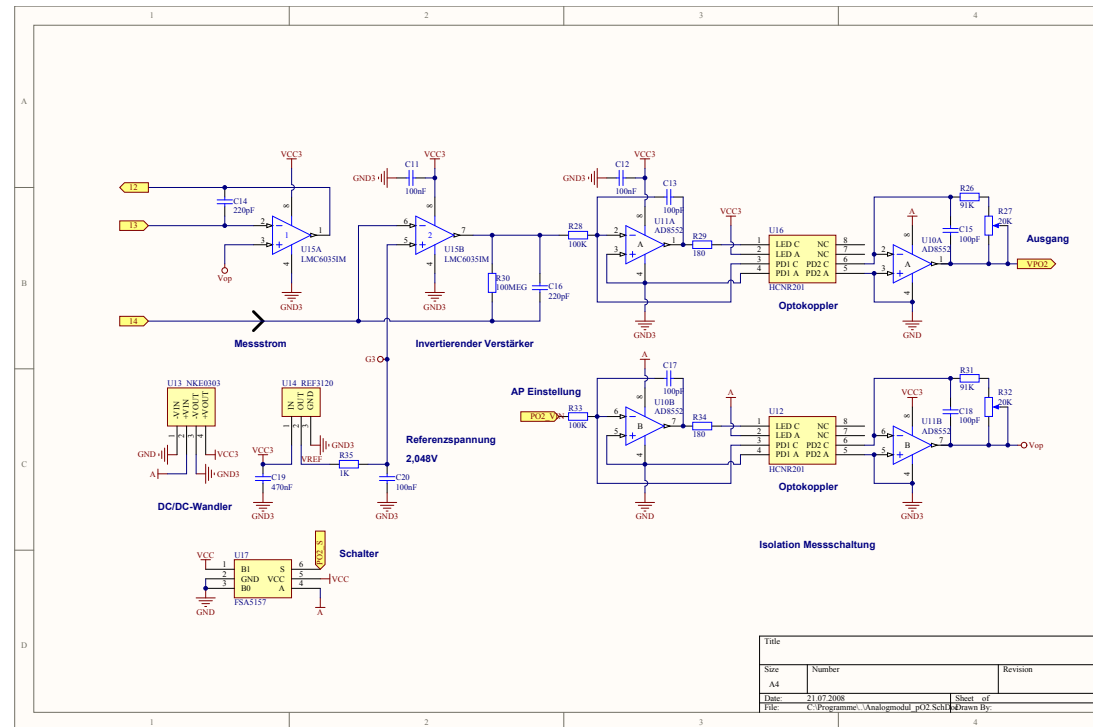
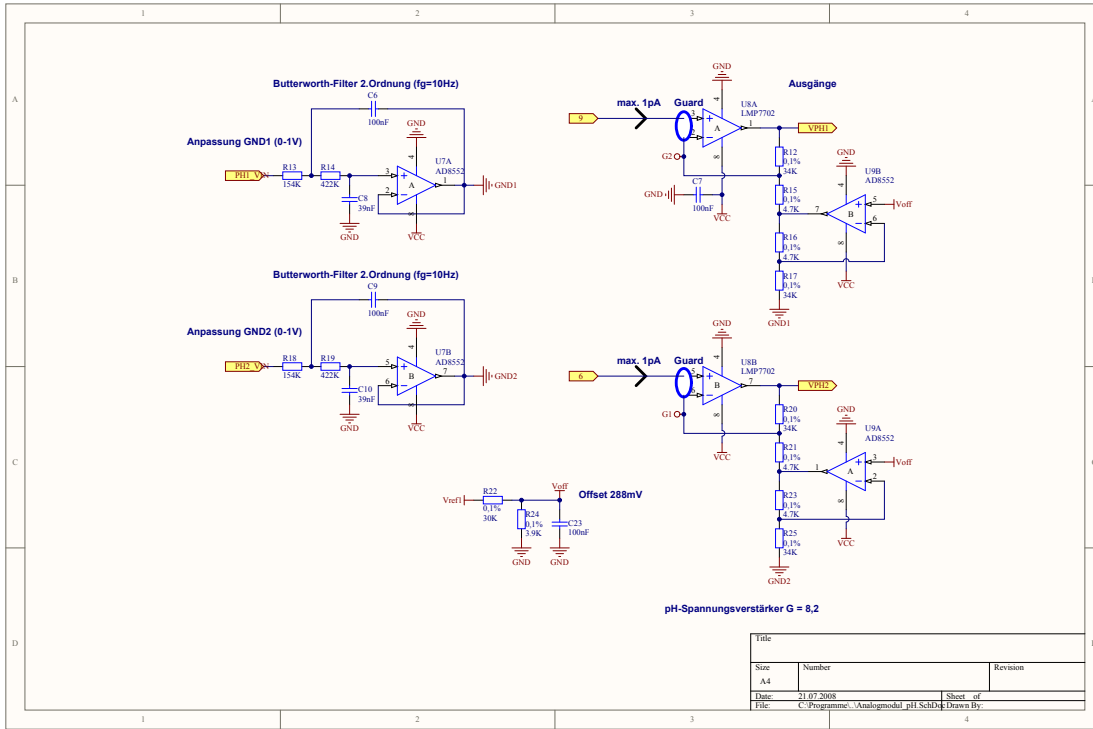
A.1. Schaltpläne und Layouts

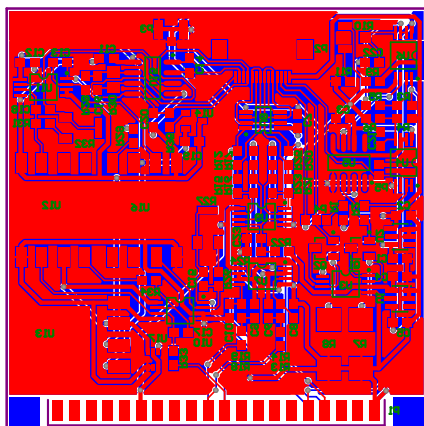
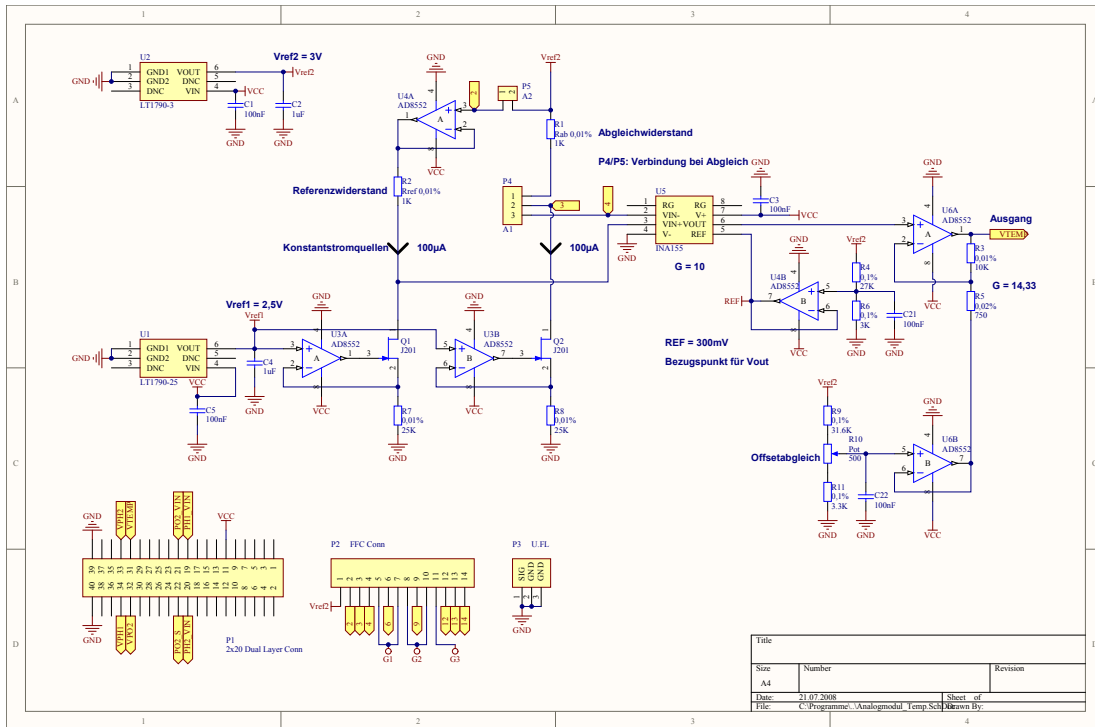
Die folgenden Seiten stellen eine Zusammenfassung der Entwicklungsunterlagen dar. Dabei wird jedes Hardwaremodul mit einem Schaltplan und einem PCB Layout abgebildet. Die nachfolgenden Zeichnungen bilden das Rapid Prototyping Gehäuse ab, welches in der Arbeit umgesetzt wurde.

Folgende Dokumente finden sich in diesem Kapitel:

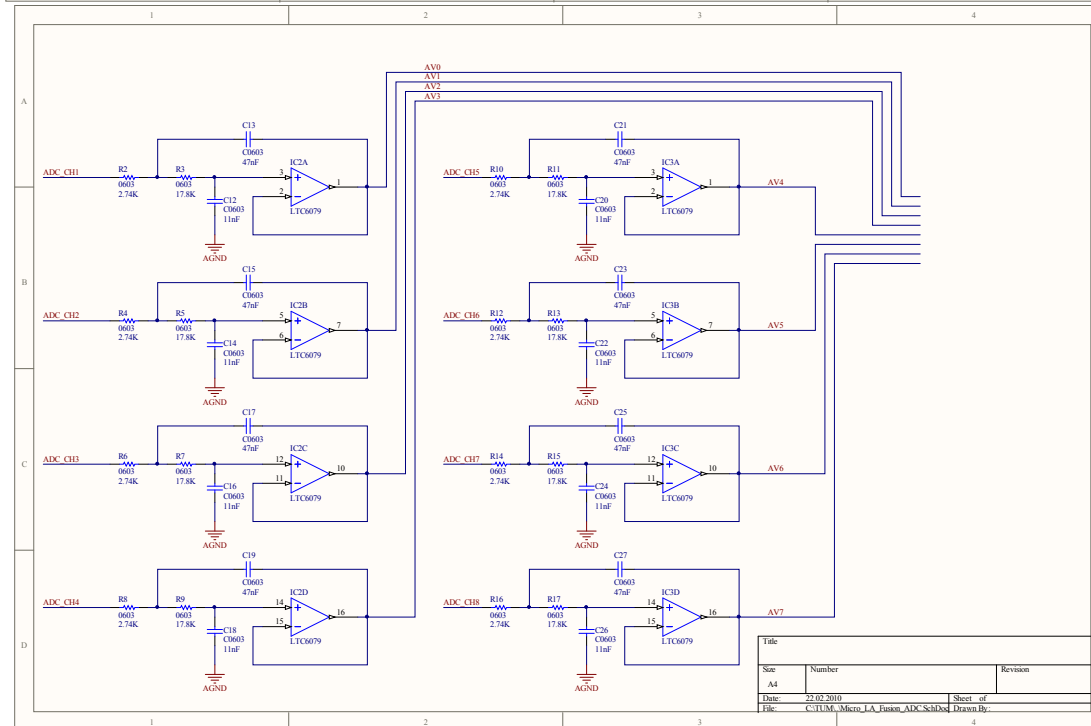
- Analogmodul
- Digitalmodul
- Impedanzmodul
- Funkmodul (Bluetooth und GSM/GPRS)
- User Interface (Display und Bedienung)
- Aktive Backplane (Schnittstelle aller Platinen und Ladeschaltung)
- Chipaufnahme (Kontaktierung des Sensorchips)
- Gehäuse

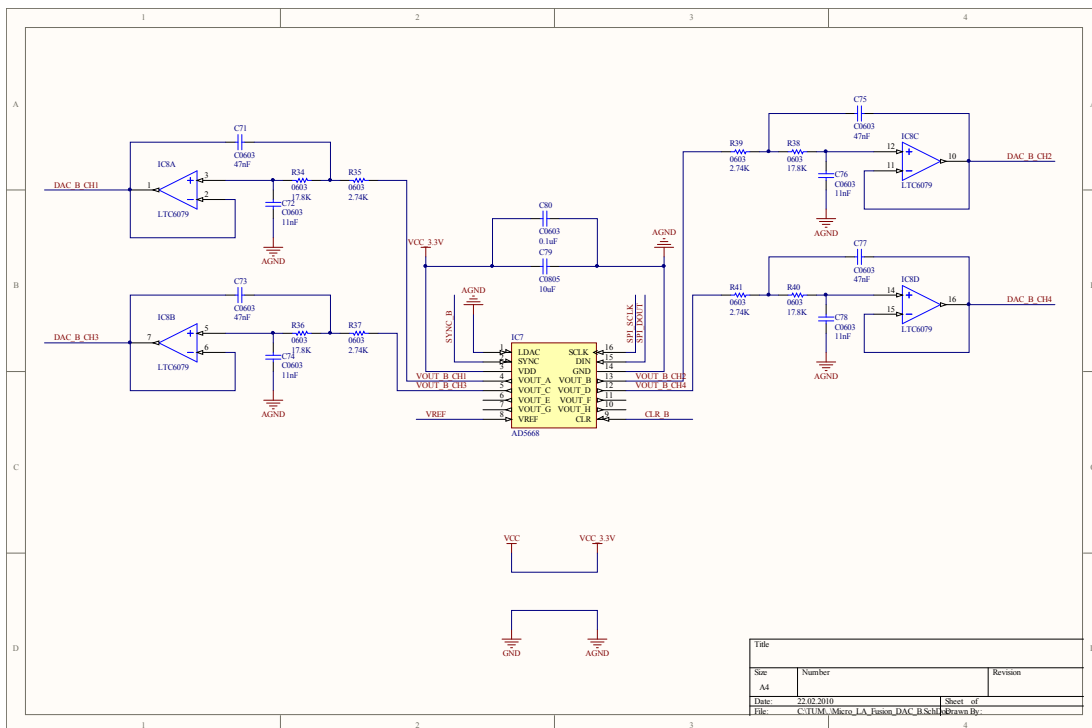
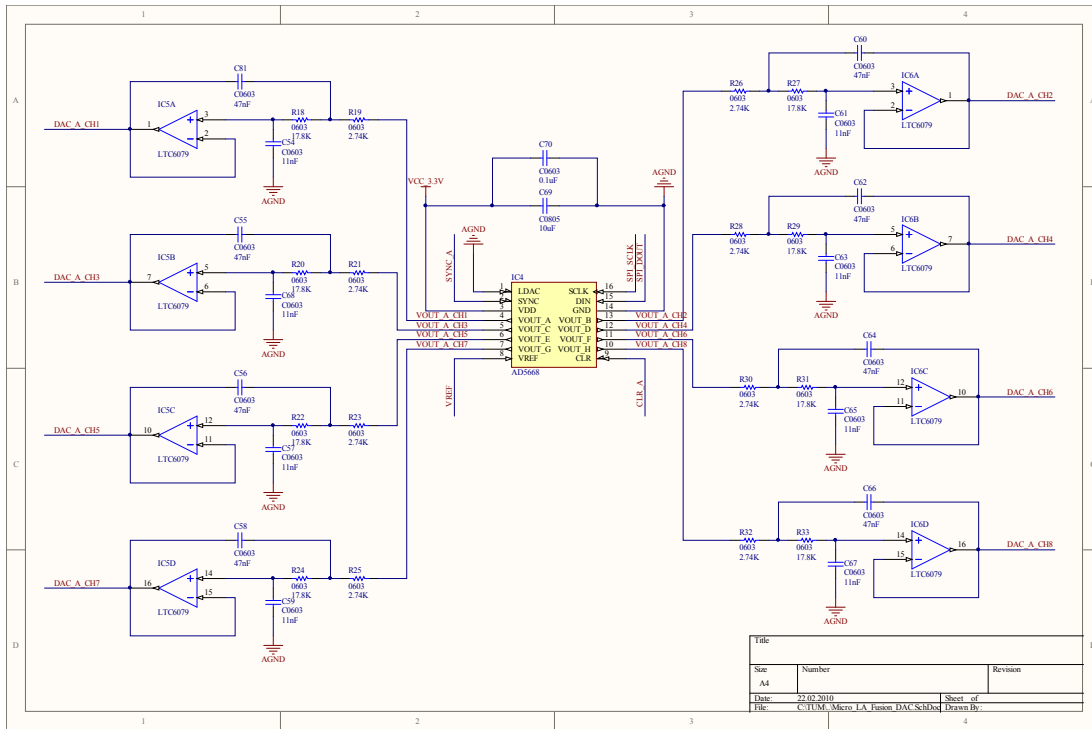
A.2. Analogmodul



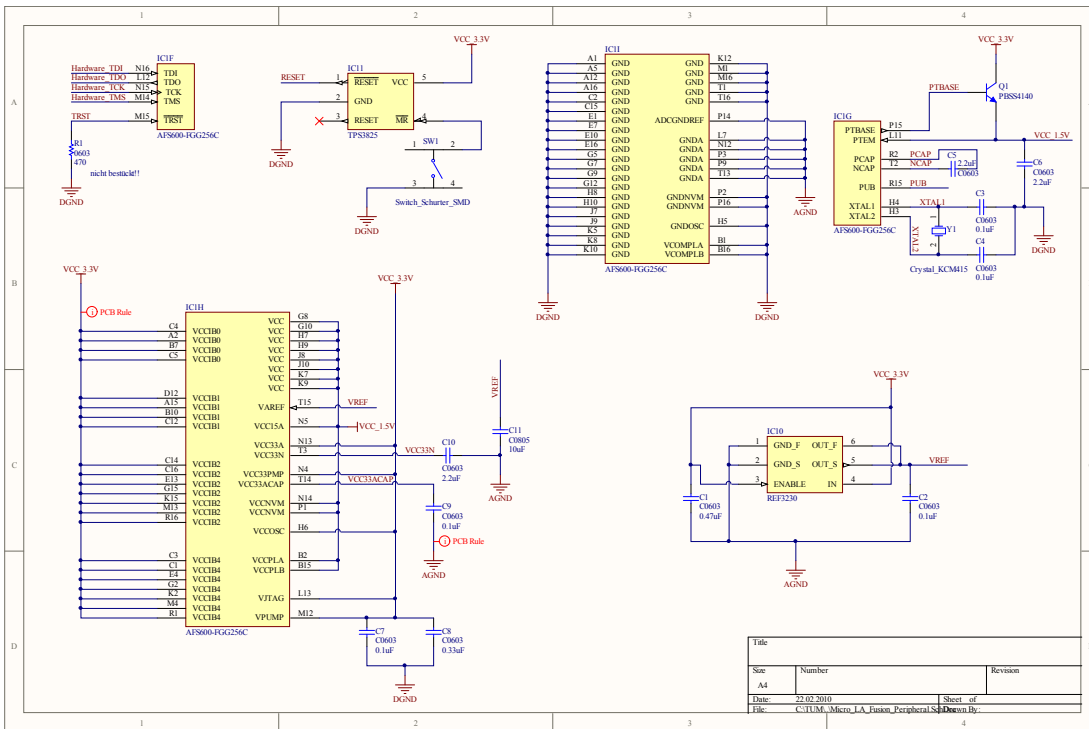
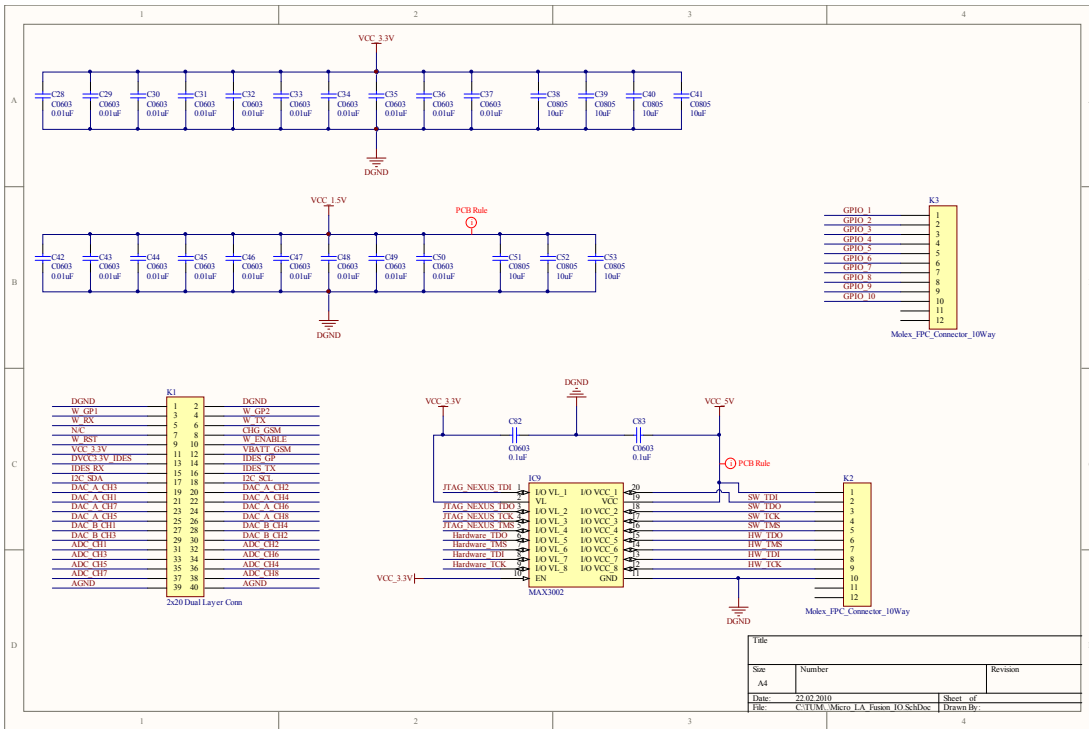


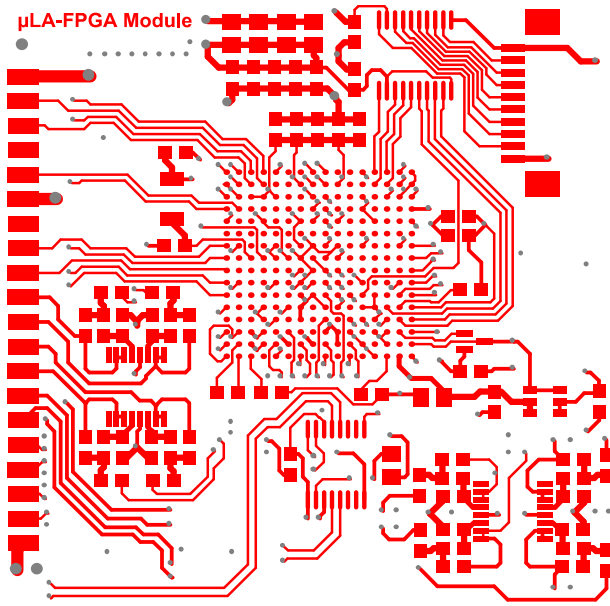
A.3. Digitalmodul



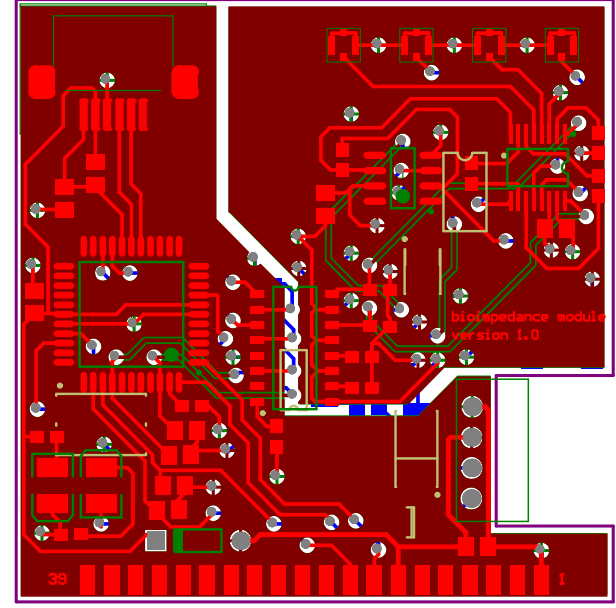
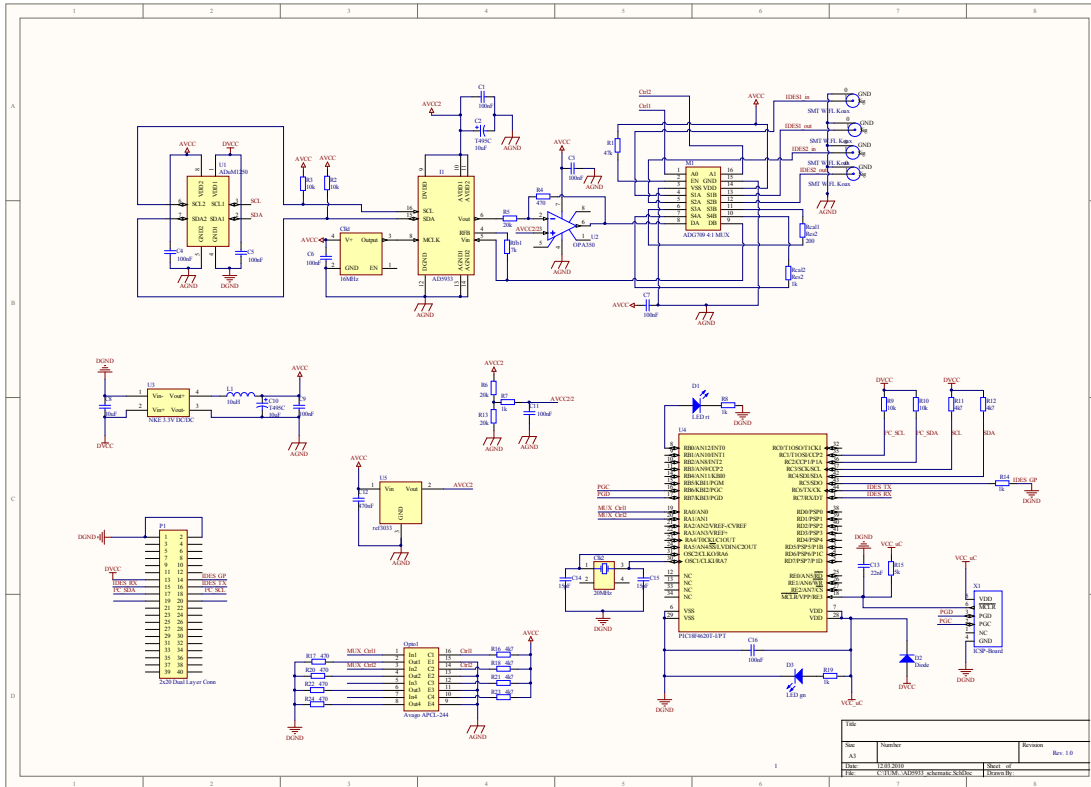


A. Anhang

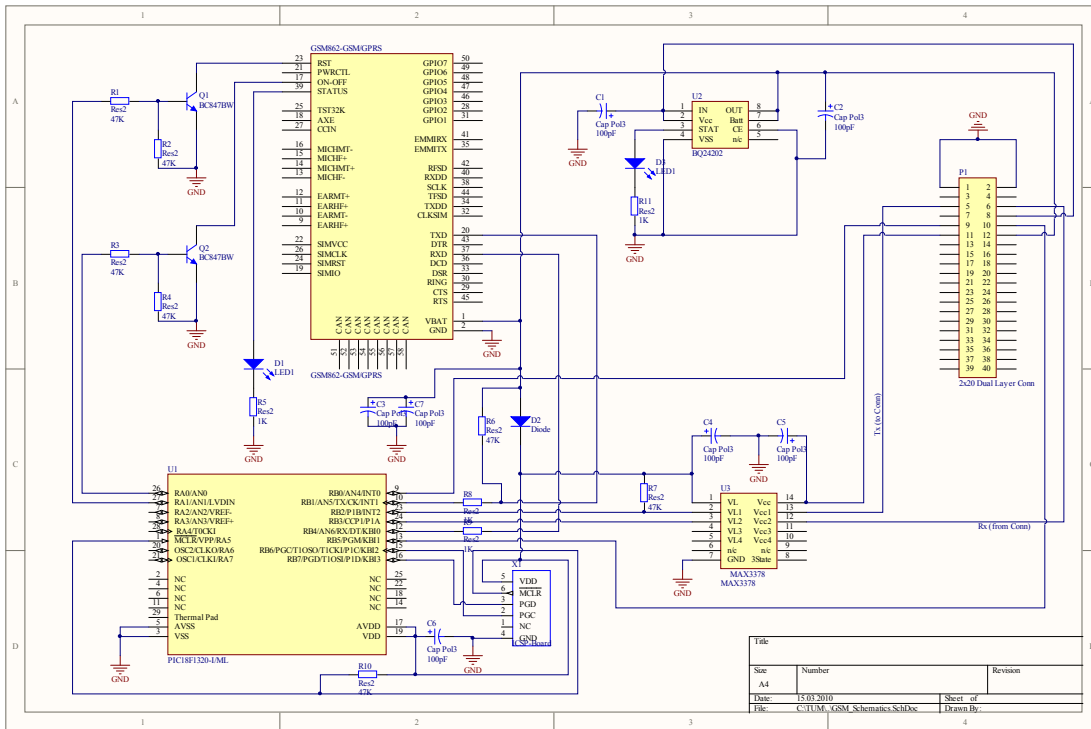




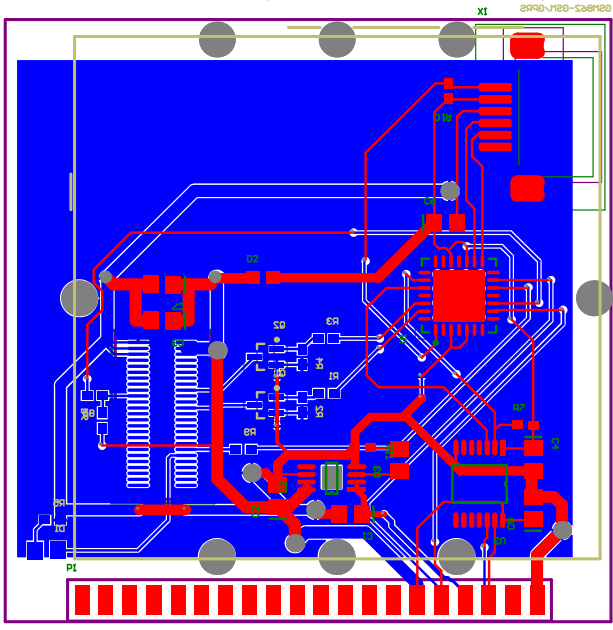
A.4. Impedanzmodul



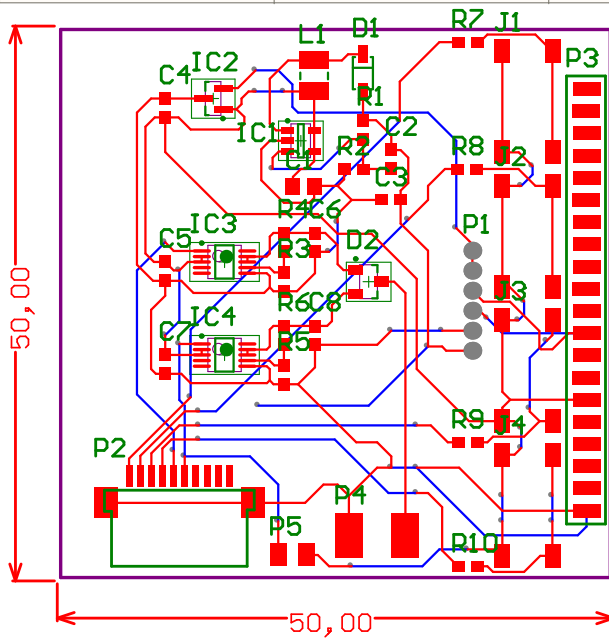
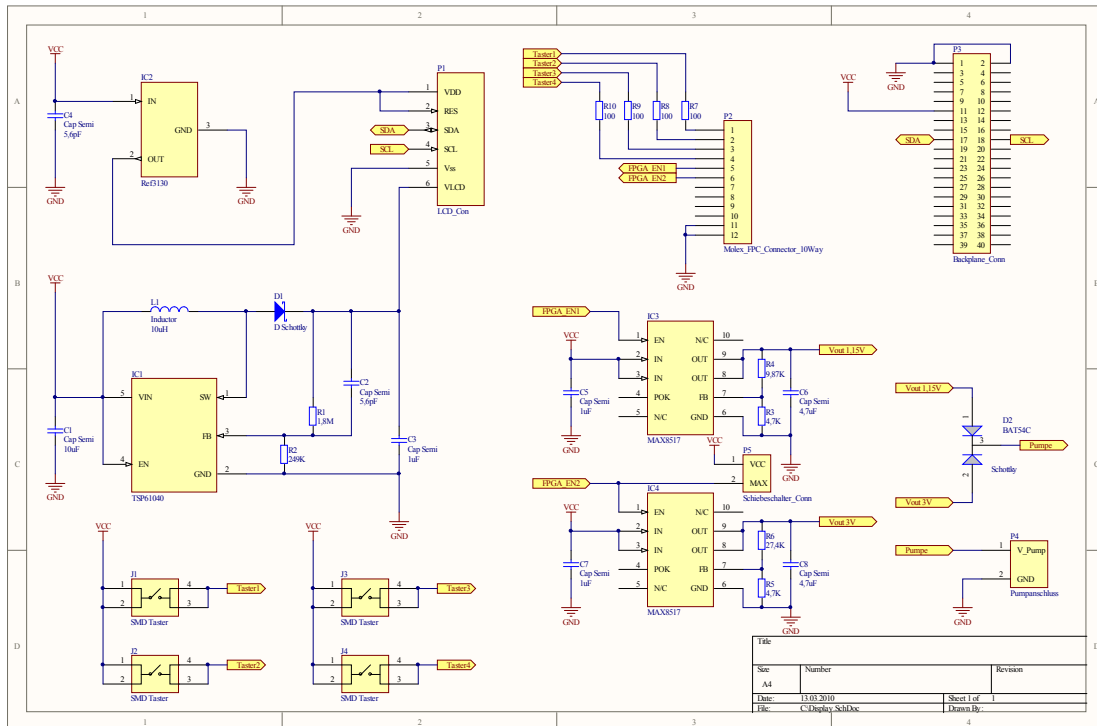
A.6. GSM/GPRS Funkmodul



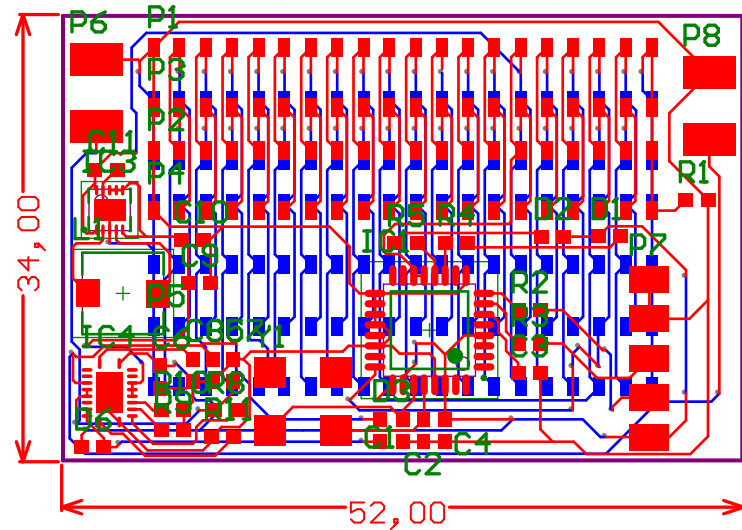
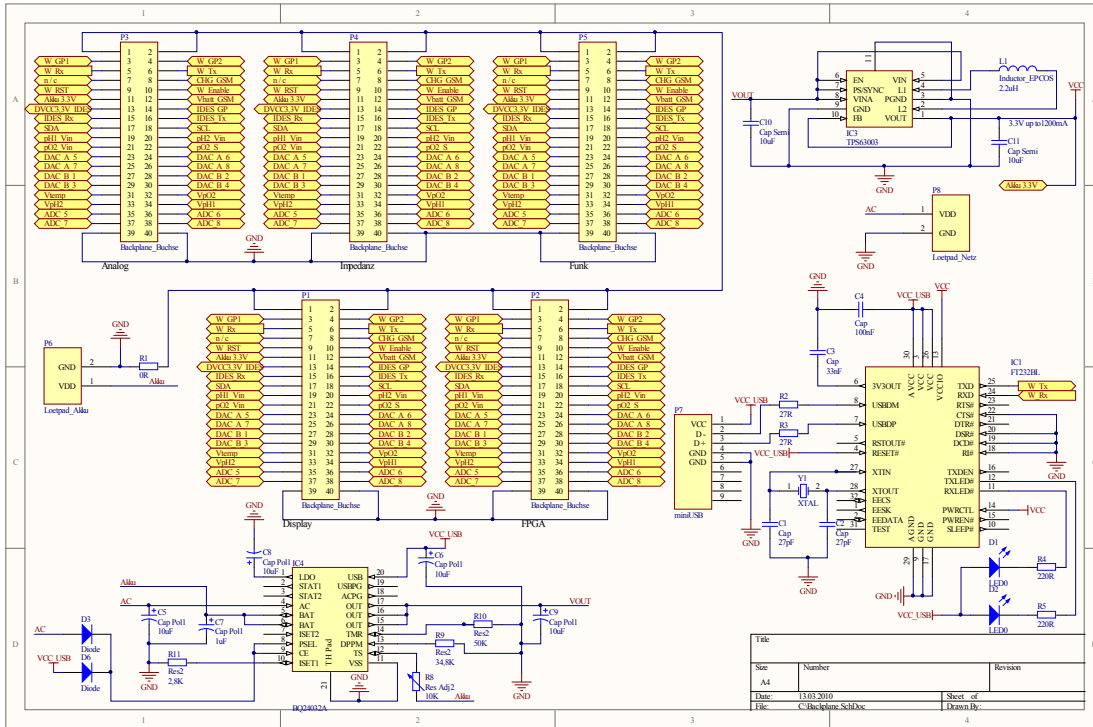
Title		
Size	Number	Revision
A4		
Date:	15.03.2010	Sheet of
File:	C:\TUM_GSM_Schematics\SchDoc	1
		Drawn By:



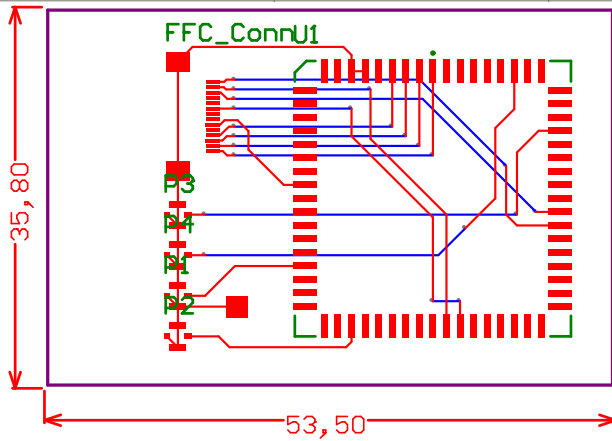
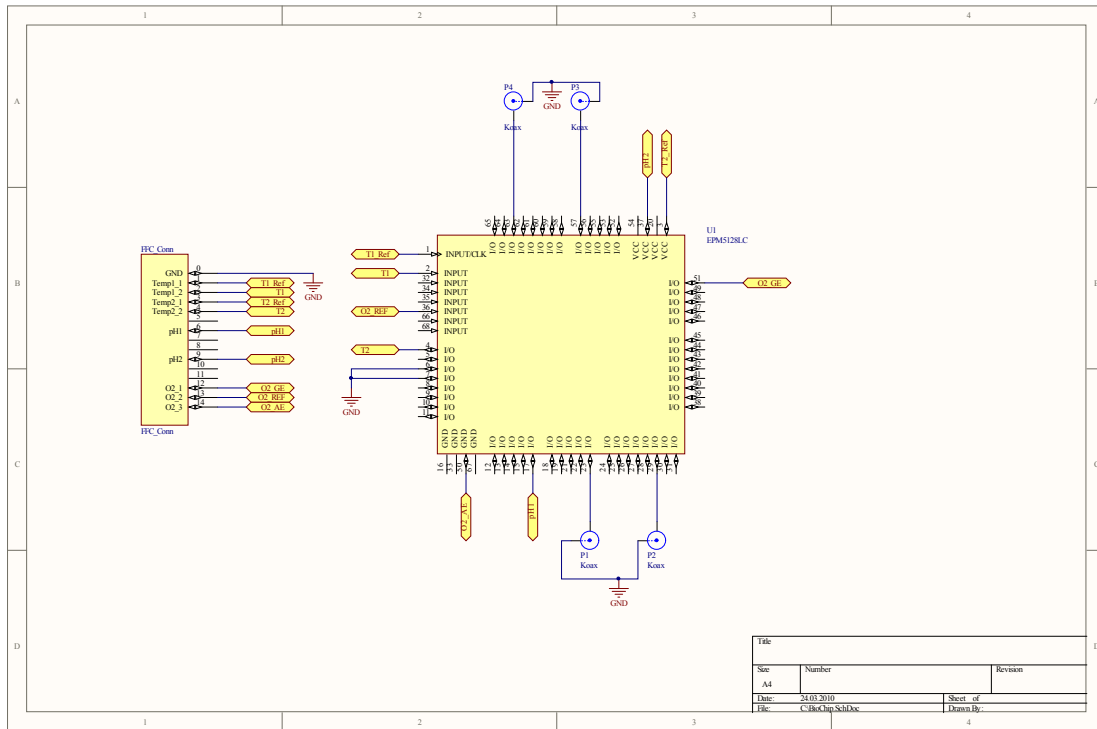
A.7. User Interface



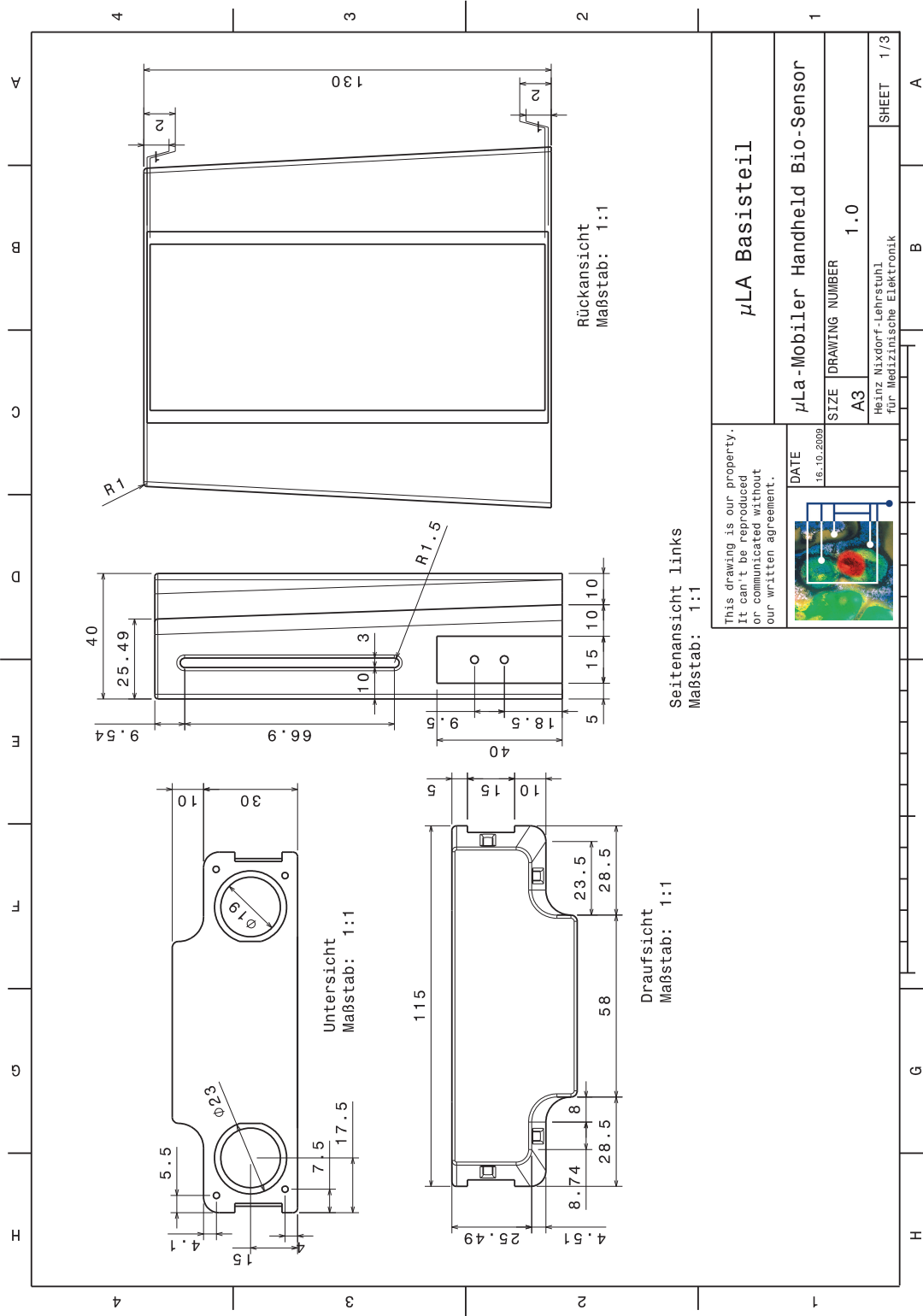
A.8. Aktive Backplane

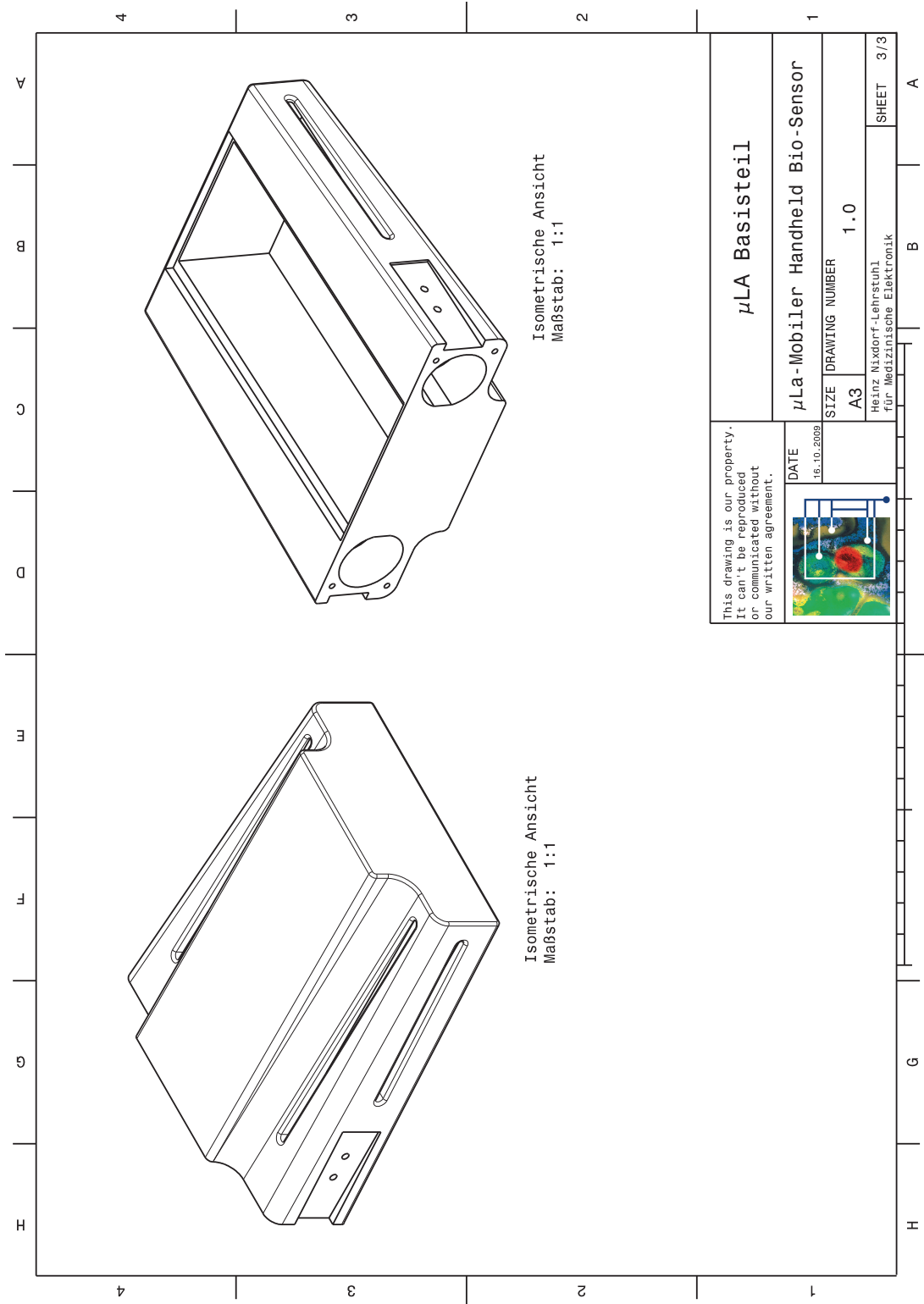


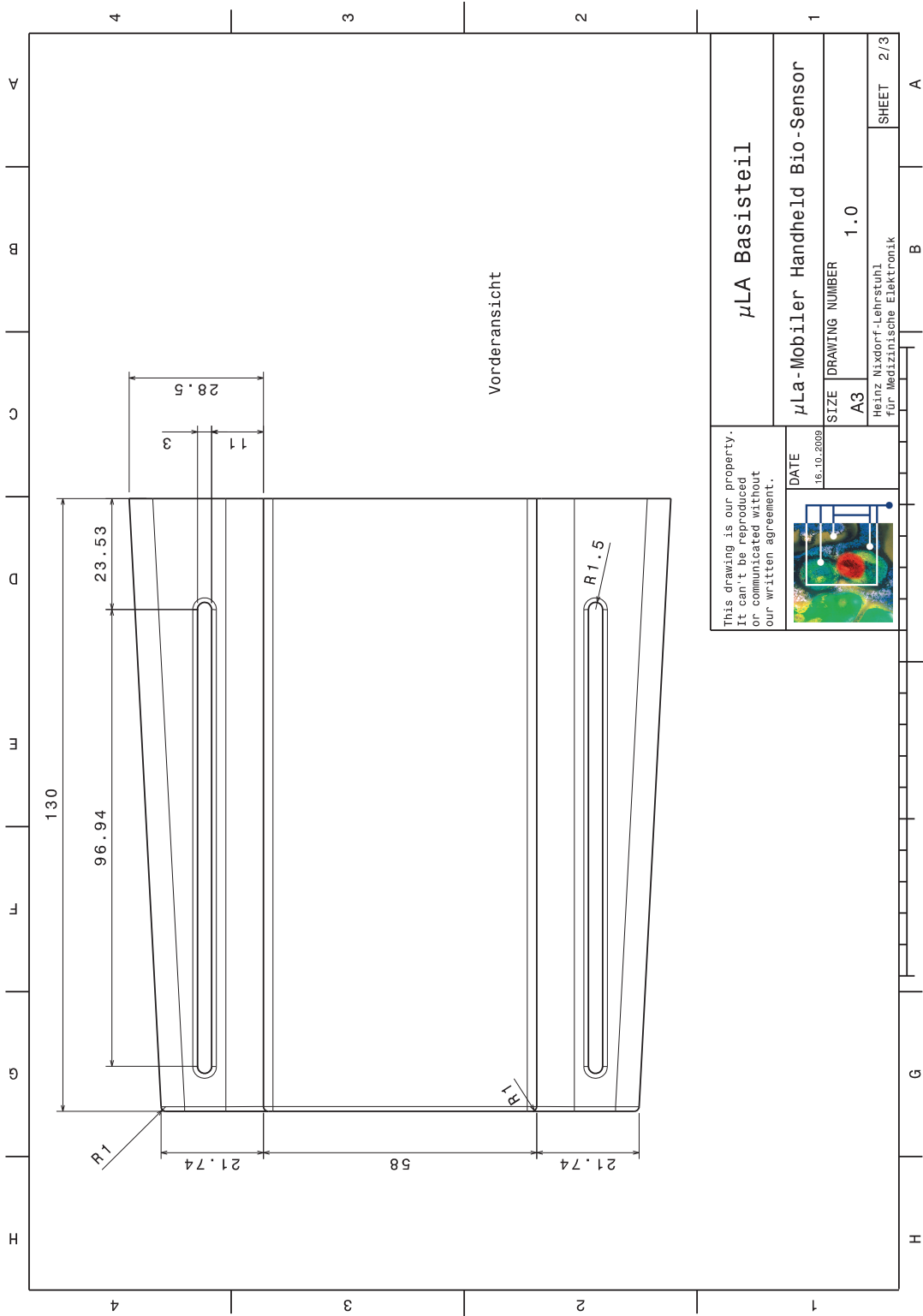
A.9. Kontaktierung des Sensorchips

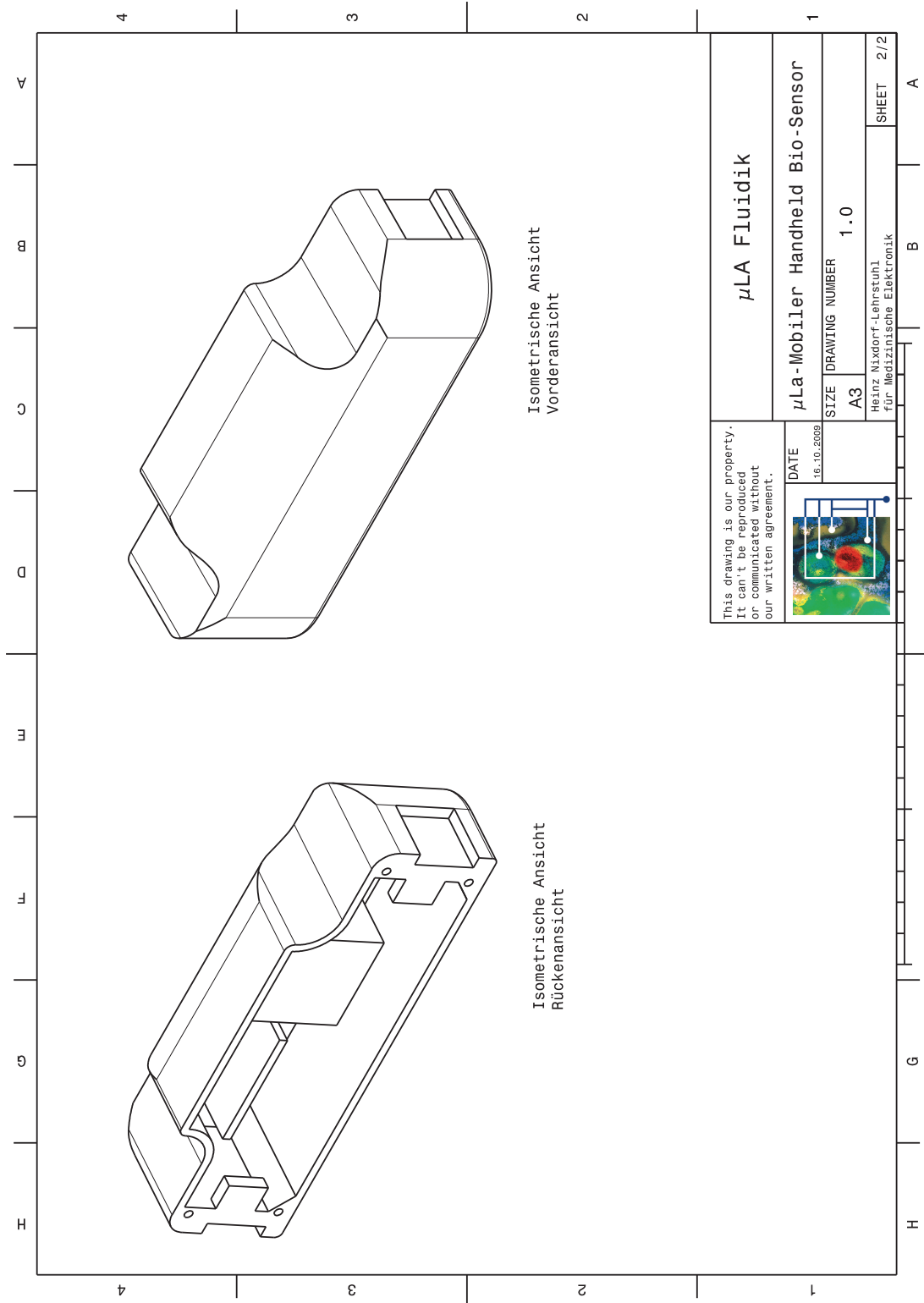


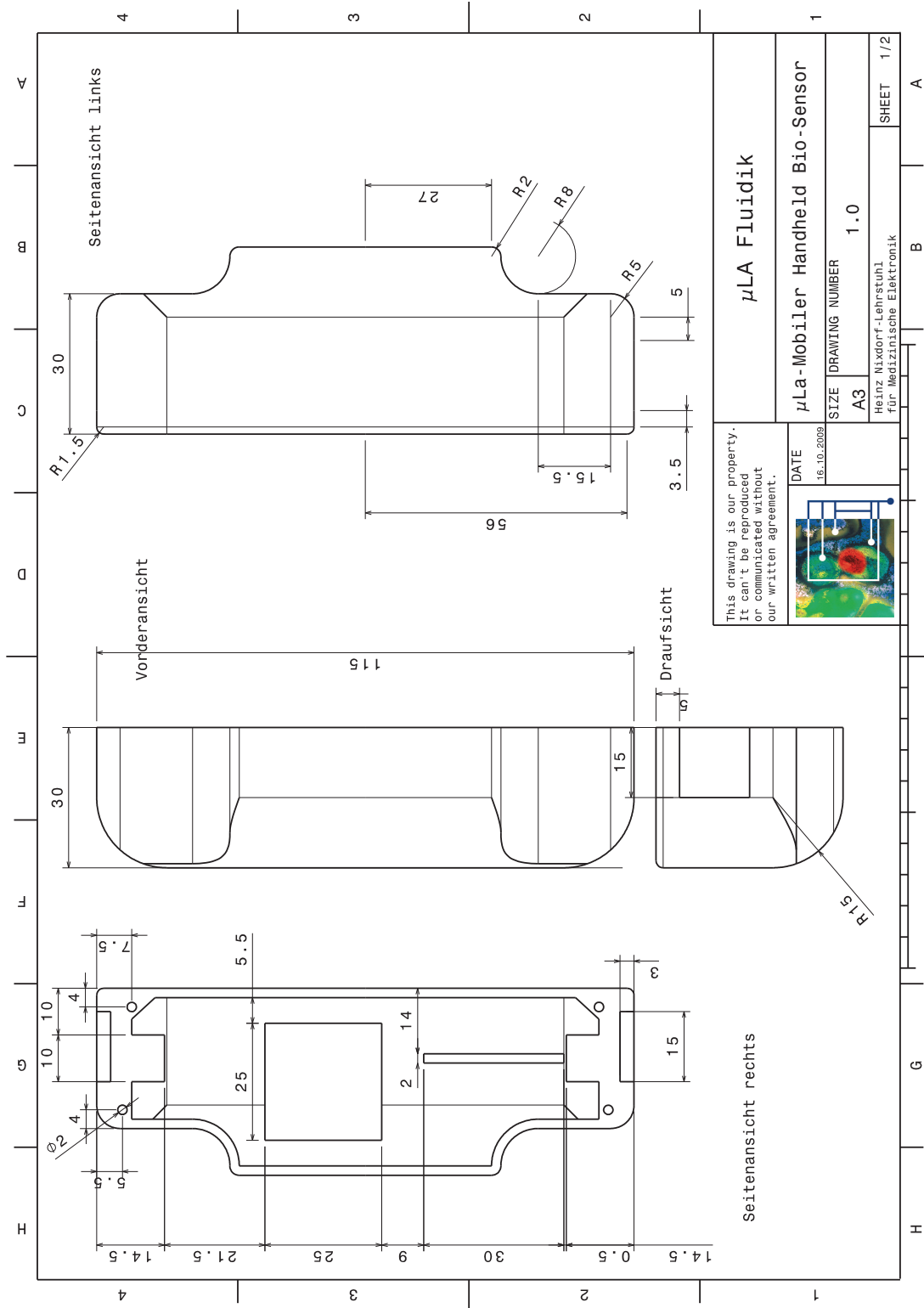
A.10. Gehäuse (CAD Zeichnungen)











A.11. Sedac Protokollfamilie

Das Sedac-Protokoll steht für *Simple Extendable Data and Control Protocol* und ist eine Protokollfamilie für die serielle Kommunikation zweier Geräte. Es weist folgende Eigenschaften auf:

- **Einfachheit.** Um die Implementierung mit begrenzten Ressourcen zu erleichtern, wird auf ein aufwendiges Handshake verzichtet. Eine Aktion besteht immer nur aus *einer* Anfrage und *einer* Antwort. Das Protokoll ist demnach zustandslos.
- **Erweiterbarkeit.** Die Struktur des Protokolls ermöglicht eine einfache Erweiterung des Befehlsatzes, wie auch der Datenstrukturen in einer auf- und abwärts-kompatiblen Weise.
- **Geringer Ressourcenverbrauch.** In einem Mikrocontroller sind Speicher und Rechenleistung begrenzt, weshalb auf aufwendige Berechnungen oder das Parsen von Zeichenketten vollständig verzichtet wird. Zahlen werden z.B. nicht als Zeichenketten sondern in ihrer binären Repräsentation auf die Zielplattform übertragen.
- **Teilweise implementierbar.** Eine Implementierung muss nicht die gesamte Spezifikation eines Protokolls implementieren, um funktionsfähig zu sein. Eine unvollständige *Implementierung* ist zwar nicht unbedingt auf- und abwärtskompatibel zu späteren Erweiterungen, das Protokoll an sich aber schon.

Sedac-Protokolle sind anwendungsorientierte Protokolle, welche in die siebte Schicht (Application Layer) des OSI-Referenzmodells einzuordnen sind.

Die Übertragung erfolgt binär, Zahlen werden auf Byte-Ebene in ihrer nativen Repräsentation auf der Zielplattform übertragen. Dies reduziert die zu übertragende Datenmenge und vereinfacht die Interpretation der Daten im Mikrocontroller. Werden für einen Wert mehr als ein Byte benötigt, wird immer zuerst der höchstwertige Teil übertragen. Diese Reihenfolge wird als *Big Endian* oder auch *Network Byte Order* bezeichnet.

Im Normalfall gehen alle Aktionen vom Master aus; der Slave antwortet nur, wenn er gefragt wurde. Jede Aktion besteht aus einer initialen Nachricht des Masters und einer Antwortnachricht des Slaves.

Eine Initialnachricht besteht aus einem Befehl und gegebenenfalls einem oder mehreren Parametern. Eine Antwortnachricht oder Meldung besteht aus einem Status und eventuell weiteren Daten.

Ein Befehl oder Status ist immer ein Byte lang.

A.11.1. Hauptprotokoll

Das Hauptprotokoll dient der Konfiguration des handheld Biosensors, sowie der Übermittlung der Messdaten an einen angeschlossenen PC. Als Datenkanal kann sowohl die serielle Schnittstelle des PCs bzw. die USB-Emulation einer solchen als auch eine drahtlose Verbindung dienen. In letzterem Falle ist ein Kommunikationsmodul notwendig, wie in Abschnitt 4.1 beschrieben.

Das Protokoll selbst ist ein Sedac-Protokoll, welches die Grundlagen der Kommunikation festlegt und die Auf- und Abwärtskompatibilität bei künftigen Erweiterungen garantiert.

A.11.2. Kommunikationskonzept

Der handheld Biosensor ist in jedem Szenario ein Sedac-Slave, welcher direkt oder, beim Einsatz eines Kommunikationsmoduls, indirekt mit einem PC als Sedac-Master Daten austauscht. Abbildung A.1 veranschaulicht dieses Konzept.

Wird ein solches Modul verwendet, muss dieses zunächst initialisiert werden. Sobald es mit Spannung versorgt wird, besteht zunächst kein Kommunikationskanal. In diesem Zustand ist das Modul selbst ein Sedac-Master und kann so z.B. die Baudrate konfigurieren oder in der zentralen Steuerung, dem Sedac-Slave, hinterlegte Verbindungsdaten abfragen. Anschließend baut das Modul eine Verbindung auf und ist von nun an für die weitere Kommunikation transparent.

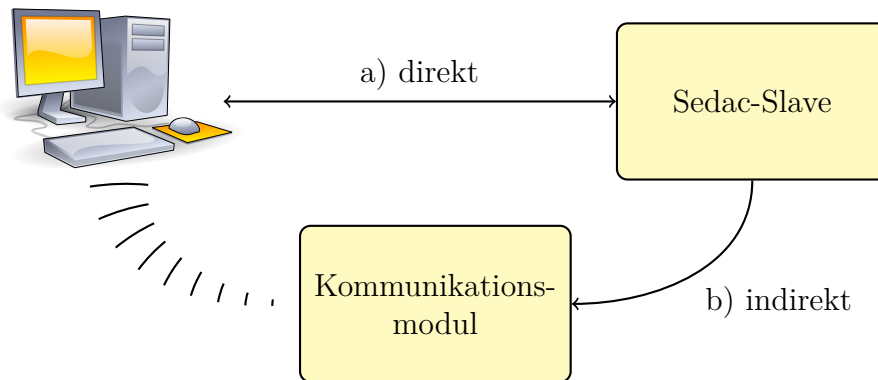


Abb. A.1.: Kommunikationskonzept für den handheld Biosensor:

(a) Direkte Kommunikation per USB

(b) Drahtloser Datenaustausch über ein Kommunikationsmodul

A.11.3. Beispiele

Im Folgenden sind einige Kommunikationsbeispiele aufgezeigt. Den vom Master gesendeten Befehlsfolgen ist das Symbol \boxed{M} vorangestellt, den Antworten des Slaves $\leftarrow \textcircled{S}$. Kommentare, die nicht zur Kommunikation selbst gehören, sind durch ein (#) gekennzeichnet.

Abfrage der Firmware

Der Master, in der Regel der PC, sendet `GET_FIRMWARE`, der Slave antwortet mit `OK_WITH_DATA` und drei Bytes für die Firmwareversion "0.4.1". Dieser Befehl eignet sich auch sehr gut zum Testen der Verbindung.

```

M → 0x01
    Der Befehl GET_FIRMWARE
← S 0x02
    Das Statuswort OK_WITH_DATA
← S 0x00
    Hauptversionsnummer 0
← S 0x04
    Nebenversionsnummer 4
← S 0x01
    Patchlevel 1
  
```

Setzen der Uhrzeit

Der Master sendet `SET_CONFIG` gefolgt von einem *Microla Config* Datensatz. Als neue Uhrzeit soll "2009-09-21 16:36" gesetzt werden. Der Unix Timestamp davon ist 1284050160 (0x4C890CF0). Es ist zu beachten, dass der neue Zeitstempel länger als die für einen Wert zur Verfügung stehenden 3 Byte ist. Daher wird ein weiteres Feld verwendet, um den angefangenen Wert fortzusetzen. Es wird auch deutlich, dass die Konfiguration inkrementell geändert werden kann. In diesem Beispiel werden, wie im Vorangegangenen, andere Konfigurationswerte nicht verändert.

```

M → 0x41
    Der Befehl SET_CONFIG
M → 0x02 0x00 0x00 0x0C
    Datensatz Header; Typ: Microla Config (0x0200), Gesamtlänge 12 Byte (0x000C)
M → 0x07 0x00 0x4C 0x89
    Feld TIMESTAMP, Wert: die oberen 16 bit des neuen Zeitstempels 0x4C89
M → 0xFF 0x00 0x0C 0xF0
    Feld VALUE_CONTINUES, Wert: die unteren 16 bit des neuen Zeitstempels 0x0CF0
← S 0x01
    Das Statuswort OK
  
```


Literaturverzeichnis

- [1] WOLF, Bernhard ; KRAUS, Michael ; BRISCHWEIN, Martin ; EHRET, Ralf ; BAUMANN, Werner ; LEHMANN, Mirko: Biofunctional hybrid structures – cell-silicon hybrids for applications in biomedicine and bioinformatics. In: *Biochemistry and Bioenergetics* 46 (1998), S. 215 – 225
- [2] WIEST, Joachim ; WOLF, Bernhard: High Content Monitoring of Living Cells. In: *BIOforum Europe* 3 (2009), S. 22
- [3] WOLF, B. ; BRISCHWEIN, M. ; GROTHE, H. ; HENNING, T. ; OTTO, A.M.: Cell meets Silicon – Mikrosensorarrays für biomedizinische Forschung, Diagnostik und pharmazeutisches Screening. In: *Bulletin des Schweizerischen Elektrotechnischen Vereins, des Verbandes Schweizerischer Elektrizitätswerke* 94 (2003), Nr. 19, S. 11 – 15
- [4] MOTRESCU, Roza E.: *Analysis of Biological Signals with Multifunctional Bioelectronic Sensor Chips on Living Cells*. Bd. Dissertation. Technische Universität München, 2004. – 101 Seiten
- [5] RESSLER, Johann: *Sensorchips für die multiparametrische zelluläre Bioanalytik und für biohybride Bauelemente*. Bd. Dissertation. Technische Universität München, 2008
- [6] STEPPER, Christoph: *Entwurf, Herstellung und Charakterisierung von Biosensorchips*. Bd. Dissertation. Technische Universität München, 2005. – 144 Seiten
- [7] MUNK, Katharina: *Biochemie - Zellbiologie*. Georg Thieme Verlag, 2008. – ISBN 978-3-13-144831-6
- [8] ALBERTS, Bruce ; JOHNSON, Alexander ; LEWIS, Julian ; RAFF, Martin ; ROBERTS, Keith ; WALTER, Peter: *Molecular Biology of the Cell*. Fifth Edition. Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC, 2008. – ISBN 978-0-8153-4106-2
- [9] WOLF, Bernhard ; GROTHE, Helmut: Mit BioChips Chemosensitivität von Tumorzellen bestimmen. In: *Best practice oncology* 1 (2010), S. 60
- [10] WOLF, B. ; BRISCHWEIN, M. ; OTTO, A.M. ; GROTHE, H.: Chip statt Maus: Zur Bedeutung multiparametrischer biohybrider Bauelemente in Toxikologie und Pharmascreening. In: *Technisches Messen* 70 (2003), Nr. 12, S. 553 – 556
- [11] OTTO, A.M. ; BRISCHWEIN, M. ; NIENDORF, A. ; HENNING, T. ; WOLF, B.: Microphysiological testing for chemosensitivity of living tumor cells with multiparametric microsensor chips. In: *Cancer Detect. Prevent.* 27 (2003), S. 291 – 296
- [12] WIEST, J. ; BRISCHWEIN, M. ; OTTO, A.M. ; WOLF, B.: Cell based assay for label-free, multiparametric, long-term monitoring of cellular vitality. In: *ALTEX* 26 (2009), S. 96
- [13] OTTO, Angela M. ; BRISCHWEIN, Martin ; NIENDORF, Axel ; HENNING, Tobias ; MOTRESCU, Elena ; WOLF, Bernhard: Microphysiological testing for chemosensitivity of living tumor cells with multiparametric microsensor chips. In: *Cancer Detection and Prevention* 27 (2003), Nr. 4, S. 291–296. – ISSN 0361-090X
- [14] GEISLER, Thomas ; RESSLER, Johann ; HARZ, Hartmann ; WOLF, Bernahrd ; UHL, Rainer: Automated Multiparametric Platform for High-Content and High-Throughput Analytical Screening on Living Cells. In: *IEEE Transactions on Automation Science and Engineering* 3 (2006), April, Nr. 2, S. 169 – 176
- [15] METABOLIC PATHWAYS: *Poster – International Union of Biochemistry & Molecular Biology*. Webseite, 2011. – Online verfügbar unter <http://i308.wikispaces.com/file/view/metabolism.jpg/58772752/metabolism.jpg>; aufgerufen am 22.02.2011

- [16] WOLF, Bernhard ; BRISCHWEIN, Martin ; LOB, Volker ; RESSLER, Johann ; WIEST, Joachim: Cellular Signalling: Aspects for Tumor Diagnosis and Therapy. In: *Biomedizinische Technik* 52 (2007), Nr. 1, S. 164 – 168
- [17] KRAUS, Martin ; WOLF, Bernhard: Crosstalk between cellular morphology and calcium oscillation patterns - Insights from a stochastic computer model. In: *Cell Calcium* 19 (1996), S. 461 – 472
- [18] POUYSSEGUR, Jacques ; DAYAN, Frederic ; MAZURE, Nathalie M.: Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. In: *Nature* 441 (2006), May 25, S. 437 – 443
- [19] STADTHAGEN, Torsten ; WIEST, Joachim: Toxische Stoffe durch Biomonitoring erkennen. In: *Die Wasserlinse* (2006), 3, S. 9
- [20] STADTHAGEN, Torsten: *Entwicklung eines online Gewässermonitoringsystems mittels Biosensorchips zum Nachweis ausgewählter Xenobiotika*. Bd. Dissertation. Department für Ökologie und Ökosystemmanagement, Fachgebiet Limnologie an der Limnologischen Station Iffeldorf und Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik – Technische Universität München, 2007
- [21] SCHMIDHUBER, Michael ; BÄHR, Jonas ; ZOTTMANN, Marlies ; EMINAGA, Yazay ; WIEST, Joachim ; WOLF, Bernhard: A mobile biosensor using living cells for detection of pesticide contamination in fruit. In: *Proceedings 20th Anniversary World Congress on Biosensors, Glasgow, UK* (2010)
- [22] CURTIS, Theresa M. ; WIDDER, Mark W. ; BRENNAN, Linda M. ; SCHWAGER, Steven J. ; SCHALIE, William H. d. ; FEYD, Julien ; SALAZAR, Noe: A portable cell-based impedance sensor for toxicity testing of drinking water. In: *Lab Chip* 9 (2009), S. 2176 – 2183
- [23] KLEINHANS, R. ; WIEST, J. ; OTTO, A.M.: Effects of cytokines on growth and energy metabolism of insulin secreting cells. In: *European Journal of Cell Biology* 88 (2009), Nr. Suppl. 59, S. 74
- [24] WIEST, J. ; BRISCHWEIN, M. ; RESSLER, J. ; OTTO, A.M. ; GROTHE, H. ; WOLF, B.: Cellular Assays with Multiparametric Bioelectronic Sensor Chips. In: *Chimia* 59 (2005), S. 243 – 246
- [25] BOYCE, Richard D. ; COLLINS, Carol ; HORN, John ; KALET, Ira: Modelling Drug Mechanism Knowledge Using Evidence and Truth Maintenance. In: *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine* 11 (2007), Nr. 4, S. 386 – 397
- [26] WOLF, B. ; BRISCHWEIN, M. ; OTTO, A.M. ; GROTHE, H.: Microelectronics meets life sciences: Bio-hybrid microelectronic components for multiparametric lab-on-chip systems. In: *mstnews* 1 (2002), S. 37 – 38
- [27] GESCHKE, Oliver ; KLANK, Henning ; TELLEMAN, Pieter: *Microsystem Engineering of Lab-on-a-Chip Devices*. Weinheim : Wiley, 2004
- [28] WOLF, Bernhard ; BRISCHWEIN, Martin ; LOB, Volker ; RESSLER, Johann ; WIEST, Joachim: *Aspekte der zellulären Signalverarbeitung in Tumordiagnostik und Tumorthherapie*. Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, Technische Universität München, 2008. – interner Entwurf eines Papers
- [29] WOLF, B. ; BRISCHWEIN, M. ; GROTHE, H. ; FRIEDRICH, P. ; SCHMIDHUBER, M. ; GRUNDL, D. ; SPITTLER, T. ; CABALA, E. ; BECKER, S. ; GLEICH, B. ; CLAUSS, J. ; SCHOLZ, A. ; WIEST, J. ; BECKER, B. ; WOLF, P.: Komponenten und Systeme für die personalisierte Assistenz. In: *Health Academy* 14 (2010), S. 215 – 234
- [30] BINGGELI, Richard ; WEINSTEIN, Roy C.: Membrane Potentials and Sodium Channels: Hypotheses for Growth Regulation and Cancer Formation Based on changes in Sodium Channels and Gap Junctions. In: *Journal of Theoretical Biology* 123 (1986), S. 377 – 401
- [31] WIEST, J. ; GRUNDL, D. ; SCHMIDHUBER, M. ; BRÜCKL, M. ; LOB, V. ; ILCHMANN, F. ; BRISCHWEIN, M. ; GROTHE, H. ; OTTO, A.M. ; WOLF, B.: Real-time and marker-free investigation of living cells. In: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 46 (2008), Nr. 9, S. A160
- [32] JOHN, Dr. C.: Progress in the implementation of label-free detection – Part 1: cell-based assays. In: *Drug discovery world* (2008), S. 77 – 88

- [33] SILVA, Ariosto S. ; YUNES, Jose A. ; GILLIES, Robert J. ; GATENBY, Robert A.: The Potential Role of Systemic Buffers in Reducing Intratumoral Extracellular pH and Acid-Mediated Invasion. In: *Cancer Res* 69 (2009), March 15, Nr. 6, S. 2677 – 2684
- [34] APPLIED BIOPHYSICS: *Electric Cell-substrate Impedance Sensing*. Website, . – Online verfügbar unter <http://www.biophysics.com>; aufgerufen am 18.02.2011
- [35] ISRAEL, Martin: *BioChip-Impedanzspektroskopie / Entwicklung eines Impedanzmessgerätes auf Basis des AD5933*. Bd. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, Technische Universität München, 2007
- [36] SCHWARZENBERGER, Tobias: *Optimierung, Miniaturisierung und Inbetriebnahme einer Impedanz-elektronik für Messungen in Lab-on-Chip Systemen*. Bd. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, Technische Universität München, 2008
- [37] CORNING INCORPORATED: *Corning Life Sciences – Epic® Technology*. Website, . – Online verfügbar unter <http://www.corning.com/epic>; aufgerufen am 18.02.2011
- [38] FANG, Y. ; LI, G.: Assy Optimization and Performance Evaluation of Cell Assays with Epic System and Bradykinin B2 Receptors in A431 Cells. In: *Corning REDLINES* (2007)
- [39] IONGATE BIOSCIENCES GMBH: *SURFE2R – a new tool for transporter research and screening*. Website, . – Online verfügbar unter <http://www.iongate.de>; aufgerufen am 28.07.2008
- [40] MOLECULAR DEVICES: *CellKey 384 Label-Free Cellular Analysis System*. Website, . – Online verfügbar unter <http://www.moleculardevices.com/Products/Instruments/Label-Free-Analysis/CellKey-384.html>; aufgerufen am 18.02.2011
- [41] ROCHE DIAGNOSTICS: *Roche Applied Science in partnership with ACEA Biosciences Inc. presents the xCELLigence System*. Website, . – Online verfügbar unter <http://www.xcelligence.roche.com/>; aufgerufen am 18.02.2011
- [42] XING, James Z. ; ZHU, Lijun ; JACKSON, Jo A. ; GABOS, Stephan ; SUN, Xue-Jun ; WANG, Xiao bo ; XU, Xiao: Dynamic Monitoring of Cytotoxicity on Microelectronic Sensors. In: *Chem. Res. Toxicol.* 18 (2005), S. 154 – 161
- [43] SRU BIOSYSTEMS, INC.: *BIND Technology*. Website, . – Online verfügbar unter <http://www.srubiosystems.com/tech/index.html>; aufgerufen am 18.02.2011
- [44] PAN SYSTEC: *PAN Systec GmbH - Specialists in Lab Automation*. Webseite, 2009. – Online verfügbar unter <http://www.pan-systech.de/>; aufgerufen am 17.02.2011
- [45] WOLF, Bernhard ; BRISCHWEIN, Martin ; STEPPER, C. ; RESSLER, Johann ; WEYH, Thomas: Lab-on-a-chip Systems for Cellular Assays. In: *Urban, G. (ed.) BioMEMS* (2006), S. 269 – 308
- [46] KNAACK, Andreas: Point-of-care industry takes a page from drug discovery. In: *Drug Discovery & Development Magazine* 10 (2007), April, Nr. 4, S. 36 – 37
- [47] LOB, Volker: *Design und Realisierung eines High-Content-Screeningsystems für lebende Zellen*. Bd. Dissertation. Technische Universität München, 2009. – 142 Seiten
- [48] WIEST, Joachim: *Gelöst-Sauerstoff-Messung in Lab-on-chip-Systemen*. VDM Verlag, 2009. – ISBN 3838103971. – 112 Seiten
- [49] SCHMIDHUBER, Michael: *Design eines Messplatzes zur mobilen Analyse von lebenden Zellen für medizinische Diagnostik und Umweltanalytik*. Bd. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Medizinische Elektronik – Technische Universität München, 2005
- [50] RENHAK, Falk: *Entwicklung eines portablen, zellbasierten Messsystems zur Ermittlung von Umwelteinträgen*. Diplomarbeit, 2005. – Fachhochschule Jena, Fachbereich Elektrotechnik und Informationstechnik
- [51] GILCHRIST, Kristin H. ; BARKER, Valerie N. ; FLETCHER, Lauren E. ; DEREK, B.: General purpose, field-portable cell-based biosensor platform. In: *Biosensors & Bioelectronics* 16 (2001), September, Nr. 7 – 8, S. 557 – 564

- [52] MEYER, Jochen: *Evaluation of new bioelectronic cell based assays for diagnostic and therapeutic systems*. Bd. Dissertation. Technische Universität München, 2010
- [53] JÄHRIG, Silke C.: *Bioaktivitäten von Wertstoffen aus Saccharomyces Hefen*. Bd. Dissertation. Technische Universität Berlin, 2007. – 92 Seiten
- [54] REHMANN, Klaus ; SCHRAMMA, Karl-Werner ; KETTRUP, Antonius A.: Applicability of a yeast oestrogen screen for the detection of oestrogen-like activities in environmental samples. In: *Chemosphere* 38 (1999), Nr. 14, S. 3303–3312. – ISSN 0045–6535
- [55] BARSOUKOV, Evgenij ; MACDONALD, J. R.: *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*. Bd. 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, United States, 2005. – ISBN 0-471-64749-7
- [56] GIAEVER, Ivar ; KEESE, Charles R.: Monitoring Fibroblast Behavior in Tissue Culture with an Applied Electric Field. In: *Cell Biology* 81 (1984), S. 3761 – 3764
- [57] GIAEVER, Ivar ; KEESE, Charles R.: Micromotion of mammalian cells measured electrically. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA – Cell Biology* 88 (1991), S. 7896 – 7900
- [58] LO, Chun-Min ; KEESE, Charles R. ; GIAEVER, Ivar: Impedance Analysis of MDCK Cells Measured by Electric Cell-Substrate. In: *Biophysical Journal* 69 (1995), S. 2800 – 2807
- [59] LO, Chun-Min ; KEESE, Charles R. ; GIAEVER, Ivar: pH Changes in Pulsed CO₂ Incubators Cause Periodic Changes in Cell Morphology. In: *Experimental Cell Research* 213 (1994), S. 391 – 397
- [60] GIAEVER, Ivar ; KEESE, Charles R.: A morphological biosensor for mammalian cells. In: *Nature* 366 (1993), S. 591 – 592
- [61] WEGENER, Joachim ; KEESE, Charles R. ; GIAEVER, Ivar: Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS) as a Noninvasive Means to Monitor the Kinetics of Cell Spreading to Artificial Surfaces. In: *Experimental Cell Research* 259 (2000), S. 158 – 166
- [62] KEESE, Charles R. ; BHAWE, Kaumudi ; WEGENER, Joachim ; GIAEVER, Ivar: Real-Time Impedance Assay to Follow the Invasive Activities of Metastatic Cells in Culture. In: *BioTechniques* 33 (2002), Nr. 4, S. 842 – 850
- [63] WEGENER, Joachim ; SIEBER, Manfred ; GALLA, Hans-Joachim: Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces. In: *J. Biochem. Bio-phys. Methods* 32 (1996), S. 151 – 170
- [64] WEGENER, Joachim ; ZINK, Sigrid ; RÖSEN, Peter ; GALLA, Hans-Joachim: Use of electrochemical impedance measurements to monitor β -adrenergic stimulation of bovine aortic endothelial cells. In: *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 437 (1999), S. 925 – 934
- [65] WEGENER, Joachim ; HAKVOORT, Ansgar ; GALLA, Hans-Joachim: Barrier function of porcine choroid plexus epithelial cells is modulated by cAMP-dependent pathways in vitro. In: *Brain Research* 853 (2000), S. 115 – 124
- [66] ARNDT, Silke ; SEEBACH, Jochen ; PSATHAKI, Katherina ; GALLA, Hans-Joachim ; WEGENER, Joachim: Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis. In: *Biosensors and Bioelectronics* 19 (2004), S. 583 – 594
- [67] ATIENZA, Josephinem ; ZHU, Jenny ; XIAOBOWANG ; XU, Xiao ; ABASSI, Yama: Dynamic Monitoring of Cell Adhesion and Spreading on Microelectronic Sensor Arrays. In: *Journal of Biomolecular Screening* 8 (2005), Nr. 10, S. 795 – 805
- [68] ABASSI, Yama A. ; JACKSON, Jo A. ; ZHU, Jenny ; O'CONNELL, James ; XIAOBOWANG ; XU, Xiao: Label-free, real-time monitoring of IgE-mediated mast cell activation on micro-electronic cell sensor arrays. In: *Journal of Immunological Methods* 292 (2004), S. 195 – 205
- [69] ACEA BIOSCIENCES, SAN DIEGO: *xCELLigence System, Cell Index, E-Plate*. Webseite, 2011. – Online verfügbar unter <http://www.aceabio.com/>; aufgerufen am 23.02.2011

- [70] SOLLY, Kelli ; WANG, Xiaobo ; XU, Xiao ; STRULOVICI, Berta ; ZHENG, Wei: Application of Real-Time Cell Electronic Sensing (RT-CES) Technology to Cell-Based Assays. In: *ASSAY and Drug Development Technologies* 2 (2004), Nr. 4, S. 363 – 371
- [71] XING, James Z. ; ZHU, Lijun ; JACKSON, Jo A. ; GABOS, Stephan ; SUN, Xue-Jun ; WANG, Xiaobo ; XU, Xiao: Dynamic Monitoring of Cytotoxicity on Microelectronic Sensors. In: *Chem. Res. Toxicol.* 18 (2005), S. 154 – 161
- [72] MCGUINNESS, Ryan: Impedance-based cellular assay technologies: recent advances, future promise. In: *Current Opinion in Pharmacology* 7 (2007), S. 535 – 540
- [73] EHRET, Dr. R. ; THEDINGA, Dr. E. ; KOB, Axel ; HOLST, Heiko ; KEUER, Andreas ; DRECHSLER, Sabine ; NIENDORF, Ricarda ; BAUMANN, Dr. W. ; FREUND, Ingo ; LEHMANN, Dr. M.: Biosensorchips für „High Content“ zelluläre Analysen. In: *Veröffentlichung der Bionas GmbH* 292 (2004), S. 195 – 205
- [74] CERIOTTI, L. ; KOB, A. ; DRECHSLER, S. ; PONTI, J. ; THEDINGA, E. ; COLPO, P. ; EHRET, R. ; ROSSI, F.: Biosensorchips für „High Content“ zelluläre Analysen. In: *Anal Biochem.* 371 (2007), S. 92 – 104
- [75] BIONAS GMBH: *Bionas 1500 and 2500 analyzing systems family*. Webseite, 2011. – Online verfügbar unter http://www.bionas.de/files/file/Bionas_analyzing_system_productbrochure.pdf; aufgerufen am 18.02.2011
- [76] BERNEY, Helen ; O’RIORDAN, JJ: Wann gerinnt Blut? / Design & Elektronik. 2010 (3). – Forschungsbericht
- [77] ANALOG DEVICES, INC.: *AD5933 – 1 MSPS, 12-Bit Impedance Converter, Network Analyzer*. Datasheet, . – Online verfügbar unter http://www.analog.com/static/imported-files/data_sheets/AD5933.pdf; aufgerufen am 26.03.2010
- [78] NEUHÄUSLER, Jürgen: Neue Reglerkonzepte für Stromversorgungen – DC/DC-Wandler optimal ausgewählt und eingesetzt / Elektronik. 2010 (16). – Schaltungsdesign
- [79] SCHWAN, H.: Electrical Properties of Tissue and Cell Suspensions. In: *Advances in Biological and Medical Physics* (1957), S. 147 – 209
- [80] ANALOG DEVICES, INC.: *AD8552 – Zero-Drift, Single-Supply, Rail/Rail, Input/Output Operational Dual Amplifier*. Datasheet, . – Online verfügbar unter http://www.analog.com/static/imported-files/data_sheets/AD8551_8552_8554.pdf; aufgerufen am 23.02.2011
- [81] FAIRCHILD SEMICONDUCTOR: *MMBFJ201 – N-Channel General Purpose Amplifier*. Datasheet, . – Online verfügbar unter <http://www.fairchildsemi.com/ds/MM/MMBFJ201.pdf>; aufgerufen am 23.02.2011
- [82] LINEAR TECHNOLOGY: *LT1790 – Micropower SOT-23 Low Dropout Reference Family*. Datasheet, . – Online verfügbar unter <http://cds.linear.com/docs/Datasheet/1790fb.pdf>; aufgerufen am 23.02.2011
- [83] TEXAS INSTRUMENTS INCORPORATED: *INA155 – Single-Supply, Rail-to-Rail Output, CMOS Instrumentation Amplifier*. Datasheet, . – Online verfügbar unter <http://focus.ti.com/lit/ds/symlink/ina155.pdf>; aufgerufen am 23.02.2011
- [84] TIETZE, U. ; SCHENK, Ch. ; GAMM, E.: *Halbleiter-Schaltungstechnik*. Bd. 13. Springer, 2010. – ISBN 978-3-642-01621-9
- [85] NATIONAL SEMICONDUCTOR: *LMP7701/LMP7702/LMP7704 – Precision, CMOS Input, RRIO, Wide Supply Range Amplifiers*. Datasheet, . – Online verfügbar unter <http://www.national.com/ds/LM/LMP7701.pdf>; aufgerufen am 23.02.2011
- [86] NATIONAL SEMICONDUCTOR: *LMC6035 – Low Power 2.7V Single Supply CMOS Operational Amplifier*. Datasheet, . – Online verfügbar unter <http://www.national.com/ds/LM/LMC6035.pdf>; aufgerufen am 23.02.2011

- [87] TEXAS INSTRUMENTS INCORPORATED: *REF3120 – 15ppm/°C Max, 100µA, SOT23-3 Series Voltage Reference*. Datasheet, . – Online verfügbar unter <http://focus.ti.com/lit/ds/symlink/ref3120.pdf>; aufgerufen am 23.02.2011
- [88] AGILENT TECHNOLOGIES: *HCNR201 – High-Linearity Analog Optocouplers*. Datasheet, . – Online verfügbar unter <http://www.datasheetcatalog.org/datasheet/hp/HCNR200.pdf>; aufgerufen am 23.02.2011
- [89] RIEMENSCHNEIDER, Frank: MCU-Entscheidungen – Der Weg zur Auswahl eines Mikrocontrollers aus Sicht eines Designers / *Elektronik*. 2009 (21). – Schaltungsdesign
- [90] NEMA, Rajiv: Intelligente Integration – SmartFusion FPGA vereint Prozessor, Logikelemente und Analogfunktionen auf einem Chip / *Elektronik*. 2010 (12). – Produktdesign kosten-, platz- und energiesparend
- [91] TRÖSCHER, Matthias ; WEIMANN, Marco: Simulationsstudien: Den Ernstfall proben, bevor er eintritt – EMV-Simulation beim Leiterplattendesign / *Elektronik*. 2008 (2). – Schaltungsdesign
- [92] DIRKS, Nils: EMV beginnt auf der Leiterplatte / *Elektronik*. 2007 (26, 27). – Schaltungsdesign
- [93] SEIDL, Dominik: *Biomedizinische Signalverarbeitung mit einem Mixed-Signal FPGA*. Bd. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, Technische Universität München, 2008
- [94] N.N.: Semiconductors – Future Development of Mixed Signal Systems / *ElektronikPraxis – electronic Magazine*. 2008. – Forschungsbericht
- [95] LOTZENBURGER, Lars: SAR oder $\Delta\Sigma$ – Welche Datenwandler-Architektur ist die richtige für meine Anwendung? / *Elektronik*. 2010 (13). – Schaltungsdesign
- [96] ACTEL CORPORATION: *AFS600 – Actel Fusion: Unlock Creativity. Simplify Implementation*. Datasheet, . – Online verfügbar unter <http://www.actel.com/products/fusion/default.aspx>; aufgerufen am 23.02.2011
- [97] ACTEL CORPORATION: *Libero – IDE v9.1 User's Guide*. Designkompodium, . – Online verfügbar unter http://www.actel.com/documents/libero_ug.pdf; aufgerufen am 23.02.2011
- [98] FOTTNER, Johannes ; WERNER, Harald: Energie für Rechenknechte – Entwicklung einer Stromversorgung für FPGAs / *Elektronik*. 2008 (15). – Schaltungsdesign
- [99] MAXIM INTEGRATED PRODUCTS: *MAX4252 – UCSP, Single-Supply, Low-Noise, Low-Distortion, Rail-to-Rail Op Amps*. Datasheet, . – Online verfügbar unter <http://datasheets.maxim-ic.com/en/ds/MAX4249-MAX4257.pdf>; aufgerufen am 23.02.2011
- [100] OPPITZ, Carsten: Von „alles integriert“ bis „ganz flexibel“ – Der Weg zur optimalen Power-Management-Schaltung / *Elektronik*. 2008 (2). – Schaltungsdesign
- [101] FALTIN, Florian: Aktive Backplanes in neuen Applikationen – Mit intelligenten Busplatinen Systemkosten senken und Platz sparen / *Elektronik*. 2009 (2). – Schaltungsdesign
- [102] SCHUBERT, Harry: Neue ICs für Lithium-Ionen-Akkus / *Elektronik*. 2007 (16). – Schaltungsdesign
- [103] SCHUBERT, Harry: Akkus im Griff – Neue Schaltkreise zum Laden und Überwachen von Lithium-Ionen-Akkus / *Elektronik*. 2008 (21). – Schaltungsdesign
- [104] MAXIM INTEGRATED PRODUCTS: *Charging Batteries Using USB Power*. Webseite, 2011. – Online verfügbar unter <http://www.maxim-ic.com/app-notes/index.mvp/id/3241>; aufgerufen am 10.02.2011
- [105] TEXAS INSTRUMENTS INCORPORATED: *BQ24032A – Single Chip Charge and System Power-Path Management IC*. Datasheet, . – Online verfügbar unter <http://www.ti.com/lit/gpn/bq24032a>; aufgerufen am 24.02.2011
- [106] SCOTT, Nigel D.: Akkus umfassend und kostengünstig überwachen / *Elektronik*. 2007 (14). – Schaltungsdesign

- [107] TEXAS INSTRUMENTS INCORPORATED: *TPS63000 buck-boost DC/DC converter*. Datasheet, . – Online verfügbar unter <http://focus.ti.com/lit/ds/symlink/tps63000.pdf>; aufgerufen am 23.02.2011
- [108] HAHN, Robert: Mikrobrennstoffzellen – Herstellung und Charakterisierung / *Elektronik*. 2007 (22, 23). – Forschungsbericht
- [109] WHITEHEAD, Adam H.: Akku im Tank – Die Vanadium-Redox-Durchflussbatterie / *Elektronik*. 2008 (22). – Forschungsbericht
- [110] LEMME, Helmuth: Mikro-Kraftwerke groß im Kommen – Neue Wandler für Energy Harvesting / *Elektronik*. 2010 (19). – Forschungsbericht
- [111] DEL-TOSO, Dr. C. ; LEONE, Andrew: Bluetooth in der Medizin – Diagnosedaten über das Mobilfunknetz versenden / *Elektronik industrie*. 2008 (11). – Special Report: Medizinelektronik
- [112] LANGMANN, Reinhard ; STUHRMANN, Norbert: Zigbee-Funknetz für die Sensor-Technik / *Elektronik*. 2008 (11). – Technologie
- [113] YOUNG, Joel K.: Kombination mehrerer Funknetzwerke – Tipps zur Wahl des jeweils passenden Funkstandards / *Elektronik*. 2008 (wireless). – Forschungsbericht
- [114] PFIRRMANN, PD Dr. O. ; HEINRICH, Dr. S.: *Arzt im Gepäck – Telemedizin und Hochleistungsanalytik sind [...] die neuesten Entwicklungen in der Medizintechnik*. Trendletter, 02/2008. – Prognos Technologiereport 2008, Prognos AG
- [115] N.N.: Pflaster im System (Patientenüberwachung) / *Elektronik*. 2007. – Forschungsbericht
- [116] WIEST, Joachim ; SCHOLZ, Alexander ; SCHMIDHUBER, Michael: Drahtlos-Voltmeter via Bluetooth / *Elektronik*. 2005 (25). – Forschungsbericht
- [117] N.N.: Gesundheit per Funk überwacht / *Elektronik*. 2010 (22). – Forschungsbericht
- [118] MACKENSEN, Elke ; TRÖSCHER, Michael ; FEHRENBACH, Matthias: Entwicklung drahtloser Embedded-Systeme – Auswahl der Funktechnik und Vergleich von Transceiver-Plattformen / *Elektronik*. 2008 (19). – Schaltungsdesign
- [119] SCHULTZ, Stephan: Wireless in Prozessanlagen. In: *Chemische Rundschau* (2009), April, Nr. 4, S. 57 – 58
- [120] BÄHR, Carl Jonas V.: *Hard- und Softwareintegration für biohybride Sensorsysteme*. Bd. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Medizinische Elektronik – Technische Universität München, 2010
- [121] RIEMENSCHNEIDER, Frank: FPGAs gegen ASICs / *Elektronik*. 2008 (11). – Chiptechnologie
- [122] MESSE MÜNCHEN GMBH: *FPGAs schnappen den ASICs ein Stück vom Kuchen weg*. Website electronica Trend Letter 13/2009, . – Online verfügbar unter <http://www.electronica.de/de/home/h/trend-letter-13-2009/embedded/thema-zwei>; aufgerufen am 23.02.2011
- [123] CHEN, Wai-Kai: *The VLSI Handbook*. Bd. 2. CRC Press, 2006. – ISBN 9780849341991
- [124] MICRIUM TECHNOLOGIES CORPORATION: *RTOS and Tools*. Webseite, . – Online verfügbar unter <http://micrium.com>
- [125] LABROSSE, Jean J.: *MicroC/OS-II: The Real Time Kernel*. Second Edition. McGraw-Hill, 2002. – ISBN 978-1-578-20103-7
- [126] FREERTOS: *Professional grade and truly free cross platform standard for microcontrollers*. Webseite, . – Online verfügbar unter <http://www.freertos.org/>
- [127] ORIGINLAB CORPORATION: *Origin and OriginPro – Data Analysis and Graphing Software*. Webseite, . – Online verfügbar unter <http://www.originlab.com/>
- [128] CABALA, Eleonore: *Monitoring multiparametrischer komplexer Mikrosensorarrays für zelluläre Analytik*. Bd. Dissertation. Technische Universtitaet Muenchen, 2007. – 126 Seiten
- [129] LABPLOT: *KDE Data Analysis and Visualisation*. Webseite, . – Online verfügbar unter <http://labplot.sourceforge.net/>

- [130] QTIPLLOT: *Data Analysis and Scientific Visualisation*. Webseite, . – Online verfügbar unter <http://soft.proindependent.com/qtiplot.html>
- [131] SCIDAVIS: *Free application for Scientific Data Analysis and Visualization*. Webseite, . – Online verfügbar unter <http://scidavis.sourceforge.net/>
- [132] QT DEVELOPMENT FRAMEWORKS ABTEILUNG NOKIA: *Qt - A cross-platform application and UI framework*. Webseite, . – Online verfügbar unter <http://qt.nokia.com/>
- [133] LUTZ, Mark: *Programming Python*. O'Reilly & Associates, Inc., 1996. – ISBN 1-56592-197-6
- [134] DEFINITION FREIER SOFTWARE NACH GNU: *GNU Operating System – The Free Software Definition*. Webseite, . – Online verfügbar unter <http://www.gnu.org/philosophy/free-sw.html>
- [135] RIVERBANK COMPUTING LIMITED: *Riverbank Computing Limited Homepage*. Webseite, . – Online verfügbar unter <http://www.riverbankcomputing.co.uk/>
- [136] PYSERIAL PROJEKTWEBSITE: *Welcome to pySerial's documentation*. Webseite, . – Online verfügbar unter <http://pyserial.sourceforge.net/>
- [137] PROJEKTSEITE VON RPY2: *A simple and efficient access to R from Python*. Webseite, . – Online verfügbar unter <http://rpy.sourceforge.net/rpy2.html>
- [138] CLEVELAND, William S.: Robust Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots. In: *Journal of the American Statistical Association* 74 (1979), Nr. 368, S. 829–836
- [139] JONAS, Jasmin: *DALIA: Entwurf und Konzeptionierung eines Softwaresystems zur Erfassung, Verwaltung und Auswertung von Daten von IMOLA und anderen Geräten*. Bd. Diplomarbeit. Technische Universität München, 2008
- [140] CELLASYS GMBH: *cellasys GmbH Homepage*. Webseite, . – Online verfügbar unter <http://www.cellasys.com>
- [141] FAKULTÄT FÜR ELEKTROTECHNIK UND INFORMATIONSTECHNIK – TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN: *Die Fakultät am Beginn des 21. Jahrhunderts*. Broschüre, Joh. Walch GmbH, Augsburg, Mai 2005, . – Online verfügbar unter <http://www.ei.tum.de/FEI/fakultaet/broschuere/tum-ei.pdf>; aufgerufen am 24.02.2011
- [142] YAMAICHI ELECTRONICS DEUTSCHLAND GMBH: *Yamaichi Electronics Homepage*. Webseite, . – Online verfügbar unter www.yeu.com
- [143] SAMTEC GERMANY: *Samtec, Inc. Homepage*. Webseite, . – Online verfügbar unter www.samtec.com
- [144] SHIN-ETSU POLYMER CO. LTD.: *Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. Homepage*. Webseite, . – Online verfügbar unter www.shinetsu.co.jp/e/
- [145] SHIN-POLY CO. LTD.: *GB-U type Inter-Connector*. Webseite, . – Online verfügbar unter <http://www.shinpoly.co.jp/business/connector/english/product/category/detail/gb-u.html>
- [146] KÜMMEL, Wolfgang: *Technische Strömungsmechanik: Theorie und Praxis*. Teubner Verlag, 2008. – ISBN 10:3-8351-0141-2
- [147] INSTITUT FÜR HYDROMECHANIK, UNIVERSITÄT KARLSRUHE: *Hydromechanik Ressourcen Online*. Webseite, . – Online verfügbar unter <http://hydro.ifh.uni-karlsruhe.de/download/Kap01ps.pdf>; aufgerufen am 16.02.2011
- [148] SAWYER, D.T. ; SOBKOWIAK, A. ; JR., J. L. R.: *Electrochemistry for Chemists*. John Wiley, New York, 1995
- [149] METREF, Lynda ; HERRERA, Fernando ; BERDAT, Daniel ; GIJS, Martin A. M.: Contactless Electrochemical Actuator for Microfluidic Dosing. In: *Journal of Microelectromechanical Systems* 16 (2007), August, Nr. 4, S. 885 – 892

- [150] WALLHÄUSSER, Karl-Heinz: *Praxis der Sterilisation, Desinfektion - Konservierung*. Bd. 5. Auflage. Thieme, 1995. – ISBN 3–13–416305–5
- [151] STETTNER, Franz ; REISCHENBÖCK, Albert: Mikrobiologische Qualitätskontrolle – E.coli, Coliforme und gärfähige Hefen zuverlässig analysieren / Getränkeindustrie. 2005 (9). – Forschungsbericht
- [152] MAST GROUP – MAST DIAGNOSTICA LABORATORIUMSPRÄPARATE GMBH: *Lactose-Bouillon*. Webseite, . – Online verfügbar unter http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU411_GER.pdf; aufgerufen am 16.02.2011
- [153] JUST, Elke: Mikrobiologische Qualitätskontrolle – Sartorius / Sonderdruck aus Getränkeindustrie. 1988 (3). – Forschungsbericht
- [154] N.N.: Wichtigste deutsche Leitindustrie – Umwelttechnologien / Elektronik Praxis. 2009 (1). – Marktstudie
- [155] W. NEUDORFF GMBH KG: Sicherheitsdatenblatt (91/155 EWG) Neudo Vital Obst-Pilzschutz. 2005. – Produktdatenblatt
- [156] MONSANTO AGRAR DEUTSCHLAND GMBH: Roundup Kompendium – Mehr Wissen für beste Leistung. 1988 (3). – Produktdatenblatt und Kompendium
- [157] SPIESS-URANIA CHEMICALS GMBH: Dithane NeoTec – Sicherheitsdatenblatt gemäß 1907/2006/EG, Artikel 31. 2009. – Produktdatenblatt
- [158] DAUNDERER, Max: *Klinische Toxikologie*. Ecomed-Verlag, Landsberg am Lech, 1997
- [159] CREIGHTON, TE: *Protein folding coupled to disulphide bond formation*. Biol Chem., 1997
- [160] KETTNER, Karina: *Optimierung von Schizosaccharomyces pombe für die heterologe Genexpression*. Bd. Dissertation. Technische Universität Dresden, 2005
- [161] BAYER CROPSCIENCE AG: BAYER GARTEN UNIVERSAL PILZFREI M – Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. 2007. – Produktdatenblatt
- [162] CARIS, M.: *MYCLOBUTANIL – Biological Data*. Webseite, . – Online verfügbar unter <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v92pr13.htm>; aufgerufen am 16.02.2011
- [163] NES, W.R. ; FULLER, G. ; TSAI, L.: *Isopentenoids in Plants: Biochemistry and Function*. Dekker, New York, 1984
- [164] MÜLLER, Jörg: *Analytik von freien Sterolen und Entwicklung einer Screening-Methode zur Charakterisierung des Inhibitionsverhaltens neuer Sterolbiosyntheseinhibitoren*. Bd. Dissertation. Department für Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2002
- [165] SCOTTS CELAFLOR GMBH & Co. KG: Cellaflor Gemüse-Pilzfrei Saprol – Sicherheitsdatenblatt nach EG-Richtlinie 2001/58/EG. 2005. – Produktdatenblatt
- [166] BÖRNER, Horst ; DEISING, Holger ; SCHLÜTER, Klaus: *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. Bd. 8. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, 2009. – ISBN 978–3–540–49067–8
- [167] MALLOK, Claudia: *ElektronikPraxis – Vogel Business Media*. Webseite, . – Online verfügbar unter <http://www.elektronikpraxis.vogel.de/themen/hardwareentwicklung/leiterplatten/articles/105303/>; aufgerufen am 16.02.2011
- [168] HUANG, Li ; XIE, Li ; BOYD, Jessica M. ; LI, Xing-Fang: Cell-electronic sensing of particle-induced cellular responses. In: *The Analyst* 133 (2008), S. 643 – 648
- [169] POPKIROV, G. S. ; SCHINDLER, R. N.: A new impedance spectrometer for the investigation of electrochemical systems. In: *Rev. Sci. Instrum.* 63 (1992), S. 5366 – 5372
- [170] POPKIROV, G. S. ; SCHINDLER, R. N.: Optimization of the perturbation signal for electrochemical impedance spectroscopy in the time domain. In: *Rev. Sci. Instrum.* 64 (1993), S. 3111 – 3115
- [171] MCADAMS, E. T. ; LACKERMEIER, A. ; MCLAUGHLIN, J. A. ; MACKEN, D.: The linear and non-linear electrical properties of the electrode-electrolyte interface. In: *Biosensors & Bioelectronics* 10 (1995), S. 67 – 74

- [172] TEXAS INSTRUMENTS INCORPORATED: *L293D*. Datenblatt, 2002. – Online verfügbar unter <http://www.datasheetcatalog.org/datasheet/texasinstruments/l293d.pdf>; aufgerufen am 16.02.2011
- [173] ANALOG DEVICES: *AD8402 - 1-/2-/4-Channel Digital Potentiometers*. Datenblatt, 2002. – Online verfügbar unter http://www.datasheetcatalog.org/datasheet/analogdevices/248207866AD8400_2_3_c.pdf; aufgerufen am 16.02.2011
- [174] ANALOG DEVICES: *ADG620 - 4Ω Single SPDT Switches*. Datenblatt, 2001. – Online verfügbar unter http://www.datasheetcatalog.org/datasheet/analogdevices/26646672ADG619_20_0.pdf; aufgerufen am 16.02.2011
- [175] MORTIMER, Charles E. ; MÜLLER, Ulrich: *Chemie*. 8. Georg Thime Verlag, 2003. – ISBN 3-13-484308-0
- [176] ARD MEDIATHEK: *Kopfball*. Website, 2009. – Online verfügbar unter <http://www.kopfball.de/frgevg.phtml?kbsec=frgevg&kbfrgevgsec=dtl4>; aufgerufen am 25.03.2009
- [177] REISER, Oliver: *Taschenheizung - ohne Strom und Feuer, Chemie im Alltag*. Website, 2002. – Online verfügbar unter <http://www.chemie-im-alltag.de/articles/0004/>; aufgerufen am 16.02.2011
- [178] RIEMENSCHNEIDER, Frank: Ein Gedächtnis für alle Fälle – Eine aktuelle Bestandsaufnahme von Speicher-ICs / Elektronik. 2008 (Elektronik scout). – Schaltungsdesign
- [179] MILLING, Jürgen: *Modulare Realisierung von Betriebskomponenten eines „intelligent mobile lab“ Systems*. Bd. Diplomarbeit. Technische Universität München, 2006
- [180] SCHMIDHUBER, M. ; WIEST, J. ; BRISCHWEIN, M. ; GROTHE, H. ; WOLF, B.: Intelligent Mobile Lab for Cellular Analysis. In: *6. Würzburger Medizintechnik Kongress* Fachverband Biomedizinische Technik e.V., Euritim-Verlag, 2005. – ISBN 3-937988-03-3, S. 358ff
- [181] KRAUS, M. ; WOLF, B.: Physicochemical microenvironment as key regulator for tumor microevolution, invasion, and immune response: targets for endocytotechnological approaches in cancer treatment. In: *Endocytobiosis & Cell Res.* 12 (1997), S. 133 – 156
- [182] RICHTER, Wolfgang: Freshscan – Vorkoster im Taschenformat / Technology Review. 2010. – Prototypenvorstellung
- [183] RADHIKA, V. ; PROIKAS-CEZANNE, T. ; JAYARAMAN, M. ; ONESIME, D. ; HA, J. H. ; DHANASEKARAN, D. N.: Chemical sensing of DNT by engineered olfactory yeast strain. In: *Nature Chemical Biology* 3 (2007), S. 325 – 330
- [184] GARRETT, Reginald H. ; GRISHAM, Charles M.: *Biochemistry*. 2nd Edition. Saunders College Publishing, 1999. – ISBN 0-03-022318-0
- [185] CAMPBELL, Neil A. ; REECE, Jane B.: Biologie. In: *Spektrum Akademischer Verlag GmbH* 6 (2003), S. 115 – 201
- [186] MCDOWALL, Jennifer: *Glucose Oxidase and Biosensors*. *European Bioinformatics Institute*. Website, 2006. – Online verfügbar unter http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_5; aufgerufen am 16.02.2011
- [187] BUNDESMINISTERIUM DER JUSTIZ IN ZUSAMMENARBEIT MIT DER JURIS GMBH: *Verordnung über die fachlichen Anforderungen gemäß § 42 Abs. 1 Satz 2 Nr. 3 Buchstabe b des Lebensmittel und Futtermittelgesetzbuches an die in der Überwachung tätigen Lebensmittelkontrolleure (Lebensmittelkontrolleur-Verordnung - LKonV)*. Website, . – Online verfügbar unter <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/lkonv/gesamt.pdf>; aufgerufen am 24.02.2011