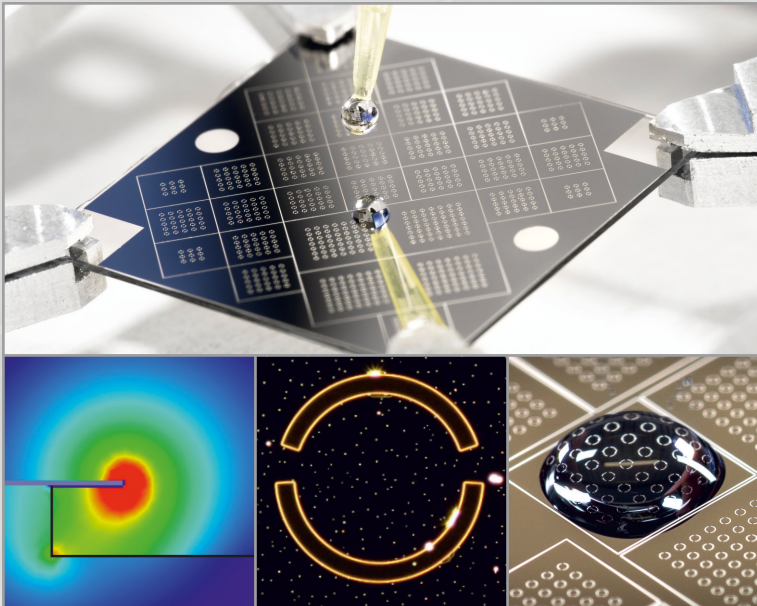


Terahertz-Biosensorik

Metamaterial-basierte THz-Sensoren für biomedizinische Anwendungen

Christian Weisenstein



Höchstfrequenztechnik
und Quantenelektronik



Terahertz-Biosensorik

Metamaterial-basierte THz-Sensoren für biomedizinische Anwendungen

Von der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der
Universität Siegen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften
(Dr.-Ing.)

genehmigte
DISSERTATION
vorgelegt von

M.Sc. Christian Weisenstein
aus Kirchen

1. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Peter Haring Bolívar
 2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Holger Schönherr
- Vorsitzender: Prof. Dr. Ivo Ihrke

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 2023

1. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Peter Haring Bolívar
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Holger Schönherr

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 2023

Band 10 aus der Schriftenreihe
Höchstfrequenztechnik und Quantenelektronik
Prof. Dr.-Ing. Peter Haring Bolívar
Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät
Universität Siegen
57068 Siegen

urn:nbn:de:hbz:467-26710
<http://dx.doi.org/10.25819/ubsi/10458>

Gedruckt auf alterungsbeständigem holz- und säurefreiem Papier.

Abbildung Cover Vorderseite oben und unten rechts: Sascha Hüttenhain

Für Sarah, Emília und Leon

Veröffentlichungen

Verschiedene Teile dieser kumulativen Dissertation wurden bereits im Rahmen von begutachteten wissenschaftlichen Zeitschriften und Konferenzbeiträgen veröffentlicht bzw. vorgestellt.

Fachzeitschriften

- RICHTER, M., LOTH, Y., WIGGER, A.K., NORDHOFF, D., RACHINGER, N., WEISENSTEIN, C., BOSSERHOFF, A.K. AND HARING BOLÍVAR, P., *High specificity THz metamaterial-based biosensor for label-free transcription factor detection in melanoma diagnostics*, Scientific Reports 13 (1), 20708 (2023).
- RICHTER, M., LOTH, Y., WEISENSTEIN, C., WIGGER, A.K., SCHAAR, D., BOSSERHOFF, A.K. AND HARING BOLÍVAR, P., *Ultrasensitive marker-free biomolecular THz-detection for tumor-related analytics*, Frequenz 76 (11-12), 627-637 (2022).
- WEISENSTEIN, C., RICHTER, M., WIGGER, A.K., BOSSERHOFF, A.K. AND HARING BOLÍVAR, P., *Multifrequency investigation of single- and double-stranded DNA with scalable metamaterial-based THz biosensors*, Biosensors 12 (7), 483 (2022).
- WEISENSTEIN, C., RICHTER, M., WIGGER, A.K., BOSSERHOFF, A.K. AND HARING BOLÍVAR, P., *Substrate-integrated microfluidics for sensitive biosensing with complementary THz metamaterials in water*, Applied Physics Letters 120 (5), 053702 (2022).
- WEISENSTEIN, C., WIGGER, A.K., RICHTER, M., SCZECH, R., BOSSERHOFF, A.K. AND HARING BOLÍVAR, P., *THz detection of biomolecules in aqueous environments—Status and perspectives for analysis under physiological conditions and clinical use*, Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves 42 (6), 607-646 (2021).
- WEISENSTEIN, C., SCHAAR, D., WIGGER, A.K., SCHÄFER-EBERWEIN, H., BOSSERHOFF, A.K. AND HARING BOLÍVAR, P., *Ultrasensitive THz biosensor for PCR-free cDNA detection based on frequency selective surfaces*, Biomedical Optics Express, 11, 448-460 (2020).

Konferenzbeiträge und Vorträge

- RICHTER, M., WEISENSTEIN, C., WIGGER, A.K., BOSSERHOFF, A.K. AND HARING BOLÍVAR, P., *Design aspects for sensitive metasurface-based THz biosensing in aqueous solutions*, Proc. and Terahertz Waves (IRMMW-THz) 2022 47th Int. Conf. Infrared, Millimeter, (2022).
- WIGGER, A.K., RICHTER, M., DI, J., WEISENSTEIN, C., BOSSERHOFF, A.K. AND HARING BOLÍVAR, P., *Microfluidic biosensors for THz analysis in aqueous environments*, French-German TeraHertz Conference, (2022).
- RICHTER, M., WEISENSTEIN, C., SCHAAR, D., WIGGER, A.K., BOSSERHOFF, A.K. AND HARING BOLÍVAR, P., *Terahertz biosensor for PCR-free DNA detection in relation to tumor marker MIA*, Biosensors 2021, 31st Anniversary World Congress on Biosensors, (2021).
- WEISENSTEIN, C., SCHMECK, M., SCHAAR, D., WIGGER, A.K., BOSSERHOFF, A.K. AND HARING BOLÍVAR, P., *Quantification of dsDNA functionalization efficiency in THz biosensors*, Proc. and Terahertz Waves (IRMMW-THz) 2019 44th Int. Conf. Infrared, Millimeter, (2019).
- WEISENSTEIN, C., SCHAAR, D., SCHMECK, M., WIGGER, A.K., BOSSERHOFF, A.K. AND HARING BOLÍVAR, P., *Detection of human tumor markers with THz metamaterials*, Proc. and Terahertz Waves (IRMMW-THz) 2018 43rd Int. Conf. Infrared, Millimeter, (2018).
- WIGGER, A.K., SCHMECK, M., WEISENSTEIN, C., SCHAAR, D., BOSSERHOFF, A. AND HARING BOLÍVAR, P., *Fano resonances for advanced biosensing in the terahertz range*, 8th THz Workshop Kaiserslautern, (2018).
- WEISENSTEIN, C., SCHAAR, D., SCHÄFER-EBERWEIN, H., BOSSERHOFF, A. AND HARING BOLÍVAR, P., *Ultra-sensitive marker-free biomolecular THz detection for tumor analysis*, Proceedings of the 47th European Microwave Conference (EuMC), (2017).
- NEUBERGER, A., WEISENSTEIN, C., HARING BOLÍVAR, P., IBÁÑEZ, A., FRAGOSO, M., GONZALO, R., VIEWEG, N. AND LEISCHING, P., *Early invasive fungal infection detection with laser-based Terahertz sensor systems*, Deutsche Biotechnologietage, (2017).
- WEISENSTEIN, C., SCHÄFER-EBERWEIN, H., SCHAAR, D., BOSSERHOFF, A. AND HARING BOLÍVAR, P., *Label-free biomolecular sensing with integrated THz systems*, The 5th Annual Conference of AnalytiX 2017 & The 10th Anniversary of Protein & Peptide Conference, (2017).

Weitere Beiträge in Fachzeitschriften und Vorträge die über den Umfang dieser Arbeit hinaus gehen

- KAHL, M., WEISENSTEIN, C., HUSSUNG, R., KEIL, A., FRIEDERICH, F. AND HARING BOLÍVAR, P., *MIMO design of 12x64 element polarization sensitive SiGe array for 3D in-line detection of defects at 220-260 GHz*, Proc. and Terahertz Waves (IRMMW-THz) 2022 47th Int. Conf. Infrared, Millimeter, (2022).
- HUSSUNG, R., KEIL, A., KAHL, M., SOULIMAN, A., WEISENSTEIN, C., HARING BOLÍVAR, P. AND FRIEDERICH, F., *Aspects of signal processing for multistatic terahertz imaging systems*, Proc. and Terahertz Waves (IRMMW-THz) 2021 46th Int. Conf. Infrared, Millimeter, (2021).
- BACCOUCHE, B., AGOSTINI, P., MOHAMMADZADEH, S., KAHL, M., WEISENSTEIN, C., JONUSCHEIT, J., KEIL, A., LÖFFLER, T., SAUER-GREFF, W., URBANSKY, R., HARING BOLÍVAR, P. AND FRIEDERICH, F., *Three-dimensional terahertz imaging with sparse multistatic line arrays*, IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, vol. 23, no. 4, pp. 1–11, (2017).
- WEISENSTEIN, C., KAHL, M., FRIEDERICH, F. AND HARING BOLÍVAR, P., *Conception and realization of a semiconductor based 240 GHz full 3D MIMO imaging system*, Proceedings Volume 10103, Terahertz, RF, Millimeter, and Submillimeter-Wave Technology and Applications X, vol. 10103, pp. 30 – 36, (2017).
- WAGNER, S., WEISENSTEIN, C., SMITH, A.D., ÖSTLING, M., KATARIA, S. AND LEMME, M.C., *Graphene transfer methods for the fabrication of membrane-based NEMS devices*, Microelectronic Engineering, vol. 159, pp. 108–113, (2016).
- WAGNER, S., WEISENSTEIN, C., KATARIA, S. AND LEMME, M.C., *Graphene membrane fabrication methods for NEMS applications with sealed cavities*, Conference: Micro and Nano Engineering (MNE), (2015).

Kurzfassung

Die COVID-19-Pandemie hat gezeigt, dass schnelle und empfindliche Testmethoden zum Nachweis von Viren und Biomolekülen wichtige Werkzeuge in der medizinischen Labordiagnostik darstellen. Durch die dynamische Entwicklung des Infektionsgeschehens und große Anstrengungen in Forschung und Entwicklung wurden enorme Fortschritte im Bereich der Entwicklung von mRNA-Impfstoffen und in der Einführung von personalisierten Testverfahren erzielt, wovon auch klassische Analysemethoden profitieren konnten. Es hat sich jedoch eindrücklich gezeigt, dass herkömmlich eingesetzte laborbasierte Diagnoseverfahren komplexe und zeitaufwendige Prozesse sind, die im dynamischen Umfeld einer Pandemie eine große Herausforderung für die medizinische Versorgung darstellen. So wird immer offensichtlicher, dass neue analytische Werkzeuge mit höheren Analysegeschwindigkeiten und erweiterten Anwendungsbereichen entwickelt werden müssen, um in Zukunft das Verständnis von Krankheitsmechanismen oder der Wirkung von Medikamenten voranzutreiben. Aufgrund der Existenz biomolekularer Resonanzen im Terahertz-(THz-)Frequenzbereich besteht seit den 2000er Jahren ein großes Interesse an der Untersuchung von Biomolekülen mittels THz-Technologien. Durch den Einsatz von feldverstärkenden Strukturen wie Metamaterialien kann deren Empfindlichkeit erheblich gesteigert werden, sodass THz-Biosensoren das Potential besitzen in physiologisch relevante Konzentrationsbereiche vorzudringen und diese damit zu vielversprechenden Kandidaten für die Entwicklung neuer Testverfahren macht.

In dieser Arbeit wird ein THz-Sensor auf Basis von Metamaterialien in Form von komplementären Schlitz-Ringresonatoren (engl. complementary split ring resonator, CSRR) vorgestellt, der für biomedizinische Anwendungen entwickelt wurde. Die CSRR erzeugen eine scharfe Resonanz im Transmissionsspektrum, welche in Gegenwart einer dielektrischen Beladung zu einer niedrigeren Resonanzfrequenz hin verschoben wird. Durch diesen Mechanismus können die Vorteile von vorhandenen klassischen THz-Analysen wie markierungsfreie und schnelle Erkennung von Biomolekülen mit einer deutlichen Empfindlichkeitssteigerung und Selektivität kombiniert werden. Zusätzlich kann der Biosensor durch das Skalieren der geometrischen Dimensionen spezifisch für die Detektion eines Biomoleküls angepasst werden. Die Polarisations-eigenschaften des Biosensors erlauben außerdem die zusätzliche Integration von mikrofluidischen Strukturen für Messungen in flüssigen Umgebungen. Diese stellen für THz-Analysen aufgrund der hohen Absorption in Wasser grundsätzlich eine große Herausforderung dar, was den Einsatz von dünnen Flüssigkeitsfilmen oder mikrofluidischen Strukturen erforderlich macht.

In dieser Arbeit wird eine im Vergleich zu bisher veröffentlichten Ergebnissen extrem hohe Empfindlichkeit des THz-Biosensors in der Detektion von komplementären

tären DNA-(cDNA-)Proben gezeigt, welche aus der menschlichen Melanom-Zelllinie MIA gewonnen wurden, ohne jedoch eine in der Regel erforderliche Vervielfältigung der DNA (Polymerase Kettenreaktion, engl. polymerase chain reaction, PCR) durchzuführen. In weiterführenden Experimenten kann außerdem nachgewiesen werden, dass sich die Verschiebung der Resonanzfrequenz für einzel- und doppelsträngige DNA unterscheidet und zudem von der Resonanzfrequenz des Sensors abhängig ist. Es wird eine ausführliche Übersicht über biomolekulare THz-Analysen in flüssigen Umgebungen gegeben und eine konzeptuelle Entwicklung und Analyse für Untersuchungen mit Metamaterial-basierten THz-Biosensoren mit Analyten in flüssiger Umgebung beschrieben, welche die Einführung einer in das Substrat integrierten mikrofluidischen Struktur beschreibt. Zusätzlich wird die Entwicklung der Messtechnik und von Designkonzepten ausführlich beschrieben, die für die Realisierung der THz-Biosensoren notwendig sind. Abschließend wird das Potential für die Entwicklung von Metamaterial-basierten THz-Biosensoren diskutiert und ein Ausblick für mögliche zukünftige Entwicklungen gegeben.

Abstract

The COVID-19 pandemic has shown that rapid and sensitive test methods for the detection of viruses and biomolecules are important tools in medical laboratory diagnostics. With the dynamic development of the infectious event and great efforts in research and development, enormous progress has been made in the field of mRNA vaccine development and in the introduction of personalized testing methods, from which classical analytical methods could also benefit. However, it has become impressively clear that conventionally used laboratory-based diagnostic methods are complex and time-consuming processes that constitute a major challenge for medical care in the dynamic environment of a pandemic. Thus, it is becoming increasingly apparent that new analytical tools with increased analytical speeds and expanded application ranges need to be developed to advance future understanding of disease mechanisms or drug action. Due to the existence of biomolecular resonances in the terahertz (THz) frequency range, there has been a great interest in studying biomolecules using THz technologies since the 2000s. The use of field-enhancing structures such as metamaterials can significantly increase their sensitivity, giving THz biosensors the potential to reach physiologically relevant concentration ranges and thus making them promising candidates for the development of new testing methods.

This work presents a THz sensor based on metamaterials in the form of a complementary split ring resonator (CSRR) developed for biomedical applications. The CSRR produce a sharp resonance in the transmission spectrum, which is shifted to a lower resonance frequency in the presence of a dielectric loading. This mechanism can combine the advantages of existing classical THz analyses, such as label-free and rapid detection of biomolecules, with a significant increase in sensitivity and selectivity. In addition, the biosensor can be specifically adapted for the detection of a biomolecule by scaling the geometric dimensions. The polarization properties of the biosensor also allow the additional integration of microfluidic structures for measurements in liquid environments. These are fundamentally challenging for THz analyses due to the high absorption in water, requiring the use of thin liquid films or microfluidic structures.

In this work, an extremely high sensitivity of the THz biosensor in the detection of complementary DNA-(cDNA-)samples obtained from the human melanoma cell line MIA is demonstrated compared to previously published results, but without performing a usually required amplification of the DNA (polymerase chain reaction, PCR). Further experiments also demonstrate that the shift in resonance frequency differs for single- and double-stranded DNA and is also dependent on the resonance frequency of the sensor. A detailed review of biomolecular THz analyses in liquid environments is provided, and a conceptual development and analysis for studies using

metamaterial-based THz biosensors with analytes in liquid environments is presented, describing the introduction of a microfluidic structure integrated into the substrate. In addition, the development of measurement technology and design concepts necessary for the realization of THz biosensors is described in detail. Finally, the potential for the development of metamaterial-based THz biosensors is discussed and an outlook for possible future developments is given.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Metamaterial-basierte THz-Biosensoren	2
1.2	Ziele dieser Arbeit	3
1.3	Aufbau dieser Arbeit	4
2	Grundlagen	7
2.1	THz-Frequenzbereichs-Spektroskopie	7
2.1.1	Elektronische heterodyne Detektion	8
2.1.2	Optische Photomischer	8
2.1.3	Vektorielle Netzwerkanalysatoren	9
2.2	THz-Metamaterialien	11
2.2.1	Schlitz-Ringresonator	13
2.2.2	Komplementärer Schlitz-Ringresonator	14
2.3	Biochemische Grundlagen	15
2.3.1	Selbstorganisierende Monoschichten	16
2.3.2	DNA-Funktionalisierung und -Hybridisierung	17
3	Systemkonzept und Datenanalyse	19
3.1	Messaufbau	19
3.1.1	Elektronische Heterodynsysteme	19
3.1.2	Optische Heterodynsysteme	21
3.2	Design- und Messkonzept	23
3.2.1	Messkonzept	23
3.2.2	Chip- und Wafer-Layout	25
3.2.3	Systemeinrichtung	28
3.2.4	Reproduzierbarkeit Referenzpunktmessung	31
3.2.5	Reproduzierbarkeit Sensorpositionierung	32
3.3	Datenanalyse und Messdatenverarbeitung	33
4	Herstellung und Charakterisierung	37
4.1	Herstellung von THz-Biosensoren	37
4.2	Charakterisierung von THz-Biosensoren	39
4.2.1	Geometrische Dimensionen	39
4.2.2	Freitragende Metallstruktur	41
4.2.3	Elementanalyse	42
4.2.4	Oberflächenrauheit	44

5	Hochempfindlicher THz-Biosensor für PCR-freie cDNA Detektion basierend auf frequenzselektiven Oberflächen	47
5.1	Einleitung, Zusammenfassung und Stand der Forschung	47
5.2	Ultrasensitive THz biosensor for PCR-free cDNA detection based on frequency selective surfaces	51
6	Multifrequenz-Untersuchung von Einzel- und Doppelstrang-DNA mit skalierbaren THz-Biosensoren auf Basis von Metamaterialien	65
6.1	Einleitung, Zusammenfassung und Stand der Forschung	65
6.2	Multifrequency investigation of single- and double-stranded DNA with scalable metamaterial-based THz biosensors	68
7	THz-Detektion von Biomolekülen in wässriger Umgebung – Status und Perspektiven für die Analyse unter physiologischen Bedingungen und dem klinischen Einsatz	85
7.1	Einleitung, Zusammenfassung und Stand der Forschung	85
7.2	THz Detection of Biomolecules in Aqueous Environments – Status and Perspectives for Analysis Under Physiological Conditions and Clinical use	88
8	Substrat integrierte Mikrofluidik für empfindliche Biosensorik mit komplexen THz-Metamaterialien in Wasser	129
8.1	Einleitung, Zusammenfassung und Stand der Forschung	129
8.2	Substrate-integrated microfluidics for sensitive biosensing with complementary THz metamaterials in water	132
9	Zusammenfassung und Ausblick	139
9.1	Zusammenfassung	139
9.2	Ausblick	141
	Literaturverzeichnis	145
	Symbolverzeichnis	155
	Abkürzungsverzeichnis	159
A	CSRR Design	161
A.1	HFSS Model - CSRR	161
A.2	HFSS Model - CSRR in Wasser	162
A.3	MATLAB Code	163
B	Bestimmung des Strahldurchmessers	165
C	Prozessprotokolle	169
C.1	DNA-Vorbereitung	169
C.2	<i>Ex-situ</i> und <i>on-chip</i> Hybridisierung	170

C.3	DNA-Film als Lösungsmittelguss	172
C.4	Pufferherstellung	173
C.5	DNA-Proben	174
D	Stand der Forschung: Metamaterial-basierte Biosensoren für Messungen in flüssigen Umgebungen	175
D.1	Transmission	175
D.2	Reflexion	177
E	Multifrequenz-Untersuchung von DNA	179
	Darstellung der Eigenleistung	189

Kapitel 1

Einleitung

Der THz-Frequenzbereich zwischen 100 GHz und 10 THz liegt im Spektrum der elektromagnetische Strahlung zwischen dem Mikrowellen- und Ferninfrarotbereich und deckt einen Wellenlängenbereich zwischen 3 mm und 30 μm ab. Die Anwendungen der THz-Technologie sind sehr vielfältig und in verschiedenen Disziplinen wie Bildgebung [1], Spektroskopie [2], Datenübertragung [3], Schichtdickenmessungen [4] und dem labelfreien Nachweis von Biomolekülen [5] zu finden. Insbesondere die um die 2000er Jahre aufgekommene Untersuchung von Biomolekülen hat sich zu einem stark wachsenden Forschungsgebiet entwickelt, da verschiedene Biomoleküle wie Proteine sowohl intra- als auch intermolekulare Resonanzen im THz-Bereich besitzen und damit eindeutige spektrale Fingerabdrücke aufweisen [6–8]. Einen wesentlichen Vorteil der THz-Bioanalytik stellen in dieser Hinsicht die vergleichsweise niederenergetischen und nicht-ionisierenden Eigenschaften der THz-Strahlung dar. Diese Eigenschaften ermöglichen die markierungsfreie Analyse von empfindlichen Analyten wie Proteinen, deren komplexe dreidimensionale Struktur durch die Untersuchung mit hochenergetischer elektromagnetischer Strahlung beeinflusst oder zerstört werden kann. Generell werden für klassische THz-Analysen jedoch große Probenvolumen benötigt, da die Differenz zwischen der Wellenlänge der verwendeten Strahlung (1 THz $\hat{=}$ 300 μm) und der Größe typischer Biomoleküle (einige 10 nm) sehr groß ist. Die daraus resultierenden kurzen Interaktionswege limitieren den Einsatz von THz-Analysen auf Grund der eingeschränkten Empfindlichkeit, wobei biomolekulare Standardmethoden um viele Größenordnungen empfindlicher sind. Einen weiteren Nachteil stellt die hohe Absorption der THz-Strahlung durch Wasser dar [9], was den bisherigen Fokus auf Analysen von getrockneten Proben begründet.

Aufgrund der niedrigen Empfindlichkeit von klassischen THz-Analysen wurden feldverstärkende Strukturen in unterschiedlichen Konfigurationen intensiv untersucht, welche die Interaktion der Probe mit der einfallenden THz-Strahlung steigern und somit die Empfindlichkeit verbessern können. In der Anwendung liegt der Fokus der Entwicklung dabei auf der Untersuchung von dünnen Schichten und Biomolekülen [10]. Mögliche Konzepte können beispielsweise in Form von dielektrischen *Long-Range Moden* [11], plasmonischen Strukturen [12], Wellenleiter-Resonatoren [13], Metamaterial-Oberflächen [14], toroidale Dipolresonatoren [15] oder als Metamaterialien [16] realisiert werden. Metamaterial-basierte Sensoren eignen sich insbesondere für die Detektion von Biomolekülen, da diese verschiedene vorteilhafte Eigenschaften vereinen, welche diese Technologie zu einem vielversprechenden Kandidaten für die

Entwicklung einer alternativen Analyseverfahren machen. So können Metamaterial-basierte THz-Biosensoren eine hohe Empfindlichkeit erreichen, obwohl der maximale Gütefaktor limitiert ist [17]. Da typische Strukturgrößen von Metamaterialien bei THz-Frequenzen im μm -Bereich liegen, lassen sich diese mit standardisierten mikro-technologischen Prozessen herstellen. Zusammen mit der Verwendung von Freistrahlmessaufbauten ergeben sich so Möglichkeiten für einfache und kostengünstige Gesamtsysteme für die Volumenproduktion. Weiterhin kann eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz als Biosensor realisiert werden: Bei der Auswahl geeigneter Oberflächenmaterialien wie zum Beispiel Gold, können auf der Sensoroberfläche Biomoleküle chemisch gebunden werden und ermöglichen so eine selektive Detektion durch die Anbindung des Analyten an die Sensoroberfläche [18].

1.1 Metamaterial-basierte THz-Biosensoren

Ein wesentlicher Anteil von THz-Biosensoren basiert auf resonanten Strukturen, welche eine spektral schmale Resonanz im THz-Bereich aufweisen und in Gegenwart einer dielektrischen Beladung eine Verschiebung der Resonanzfrequenz erfahren. Die Ursache dieser Verschiebung liegt fast ausschließlich in der durchschnittlichen Veränderung des dielektrischen Kontrastes in unmittelbarer Nähe zur Oberfläche des Sensors [19]. Der Begriff dielektrische Beladung wird an dieser Stelle allgemein eingeführt und kann für ein beliebiges Material mit einer relativen Permittivität $\epsilon_R > 1$ stehen. Im Kontext dieser Arbeit beschreibt die dielektrische Beladung typischerweise das Aufbringen von Biomolekülen wie Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid, DNA) oder Proteinen auf die Oberfläche eines THz-Biosensors. Auch wenn wie zuvor beschrieben einige Biomoleküle spektrale Fingerabdrücke bei THz-Frequenzen aufweisen, wird deren Nutzung in THz-Biosensoren durch Überlagerungen und Verbreiterung der biomolekularen Resonanz vor allem in wässrigen Lösungen erheblich erschwert. Daher ist die Anregung der biomolekularen Proben auf THz-Biosensoren in der Regel nicht spezifisch und wird nur bei der Resonanzfrequenz der resonanten Struktur wirksam [20].

Somit basiert der größte Teil der mittels THz-Sensoren untersuchten Biomoleküle auf der nicht spezifischen Anregung und einer einfachen Deposition des Analyten auf der Sensoroberfläche. Durch etablierte Verfahren der Funktionalisierung ist es jedoch möglich, eine (Sensor-)Oberfläche durch das Einbringen von funktionellen Gruppen gezielt zu modifizieren. So kann die Sensoroberfläche durch eine chemische Bindung mit Fänger-molekülen funktionalisiert werden, wodurch Biomoleküle wie DNA oder Proteine immobilisiert und somit eine spezifische Detektion ermöglicht wird [21]. Die Anwendung eines solchen Verfahrens wurde im THz-Bereich bisher nur sehr selten demonstriert. So werden in einer Veröffentlichung THz-Messungen an einem Lebertumor-Marker unter Verwendung eines Schlitz-Ringresonator-basierten (engl. split ring resonator, SRR) Sensors mit einer Antikörper-Antigen Bindung gezeigt [16]. Die erreichte Empfindlichkeit von 14.6×10^{-9} mol/l des etwa 150000 g/mol schweren Komplexes stellt einen sehr guten Wert dar. Eine andere Arbeit weißt die Erkennung

von Adenosine triphosphat (ATP) durch die Funktionalisierung von ATP-Aptameren auf einer Goldoberfläche nach [18]. Generell ermöglicht dieses Verfahren eine Erhöhung der Empfindlichkeit und eine spezifische Bindung des Analyten ohne dabei auf Markierung des Biomoleküls zurückgreifen zu müssen.

Für die Anwendung klassischer Metamaterial-Ansätze ist ausschlaggebend, dass die Probe vor der Messung getrocknet wird, da Wasser die THz-Wellen sehr stark absorbiert und somit die durch das Metamaterial erzeugte Resonanz stark dämpft oder zerstört [22]. Generell definiert die Zusammensetzung der Probe und die Art der Messmethode, ob die Untersuchung mit einer getrockneten Probe durchgeführt werden kann, oder ob die Messung in einer flüssigen Umgebung erforderlich ist. Der Bindungszustand von DNA kann beispielsweise getrocknet untersucht werden, während für die funktionale Analyse von Proteinen eine flüssige Umgebung eine essentielle Voraussetzung ist. In jüngster Vergangenheit gab es daher erste experimentelle Versuche zur Implementierung von mikrofluidischen Strukturen in THz-Biosensoren [23–25]. Dabei bedarf es spezieller technischen Lösungen, damit die Funktion der Resonatoren erhalten bleibt. Insbesondere hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang zwei Veröffentlichungen. So wird in [18] die Schichtdicke der untersuchten Flüssigkeit auf 160 nm reduziert, sodass Unterschiede zwischen 2-Propanol, Ethanol, Methanol und Wasser mithilfe von SRR detektiert werden können. In einem anderen Ansatz wird ein THz-Mikrofluidik-Chip auf der Basis eines nichtlinearen optischen Kristalls mit SRR vorgestellt. Demonstriert wird eine bis dahin unerreichte Empfindlichkeit in dem Nachweis von 1.4 fmol Glukose in 128 pL wässriger Lösung. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kombination von Mikrofluidik mit resonanten Strukturen eine erhöhte Empfindlichkeit für THz-Biosensoren ermöglicht, welche zusammen mit der erforderlichen selektiven Funktionalisierung interessante Möglichkeiten für die THz-Biosensorik eröffnet.

1.2 Ziele dieser Arbeit

Wesentliche Inhalte dieser Dissertation sind im Rahmen eines Projekts des von der deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Schwerpunktprogramms 1857 „*Elektromagnetische Sensoren für Life Sciences (ESSENCE)*“ entstanden. Da es sich um ein interdisziplinäres Forschungsthema der Disziplinen Elektrotechnik, Biochemie und molekularen Medizin handelt, teilt sich der Inhalt des Projekts in unterschiedliche Themenkomplexe auf. So liegt der Fokus dieser Arbeit auf dem Entwurf der THz-Biosensoren, Realisierung und Charakterisierung des Messsetups, Modellierung, Simulation und Analyse der entwickelten Sensoren. Über den Umfang dieser Arbeit hinausgehende Aktivitäten werden in einem aktuellen Promotionsvorhaben bearbeitet. In diesem liegt der Schwerpunkt auf der Entwicklung aller Funktionalisierungs- und biomolekularen Prozessschritte, wobei ein Fokus auf die Evaluation von Modellsystemen und Referenzmessungen mit alternativen Analysemethoden gelegt wird, um die Ergebnisse der THz-Messungen zu validieren.

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines Metamaterial-basierten Sensors für die markierungsfreie, biomolekulare Detektion mit elektromagnetischer Strahlung im THz-Frequenzbereich. Angesichts des sehr breiten Spektrums an relevanten Biomolekülen, konzentrieren sich die Untersuchungen in diesem Projekt auf Anwendungen in der Tumoranalyse, welche einen großen Teilbereich der Medizin darstellt. Dabei sollen die grundlegenden Auswirkungen der biomolekularen Proben auf den entwickelten Biosensor unter realen Anwendungsbedingungen untersucht und demonstriert werden, um die Entwicklung von schnellen, hochempfindlichen und selektiven medizinischen Diagnoseinstrumenten über den Stand der Technik hinaus voranzutreiben. Ein Hauptziel ist die Erhöhung der Empfindlichkeit des Sensors, damit die THz-Analyse auf biologisch relevanten Konzentrationsniveaus erfolgen kann. Dazu sollen stabile Frequenzbereichs-Spektroskopie (engl. frequency-domain spectroscopy, FDS) Systeme mit hohem Dynamikbereich konzeptionell entwickelt und aufgebaut werden und ein Biosensor-Design für die spezifische und selektive biomolekulare Detektion optimiert werden. Die Anwendungsevaluation soll anhand von DNA-Proben erfolgen. Grundsätzlich soll die Anwendung jedoch nicht auf die Detektion von DNA limitiert sein. Die Erweiterung und Anpassung für die Detektion anderer biomolekularer Systeme (zum Beispiel Proteine) muss bei der Entwicklung des THz-Biosensors berücksichtigt werden. Ausgehend von diesem ersten Ziel ist eine weitere Zielsetzung die Optimierung der Funktionalisierungs- und Hybridisierungseffizienz, die für die Untersuchung von DNA-Proben eine wichtige Rolle spielen. Die zu Grunde liegenden Mechanismen werden in Abschnitt 2.3 näher erläutert. Damit direkt verknüpft ist die Verbesserung der Zuverlässigkeit und die Erweiterung der Funktionalität durch den Einsatz von mikrofluidischen Strukturen. Dazu soll untersucht werden, welche Methoden, Prozesse und Technologien in THz-Biosensoren integriert werden können, um biomolekulare Untersuchungen in flüssigen Umgebungen zu ermöglichen.

1.3 Aufbau dieser Arbeit

Der Aufbau dieser kumulativen Dissertation ist so gestaltet, dass vier Veröffentlichungen in den Kapiteln 5, 6, 7 und 8 die Ergebnisse dieser Arbeit repräsentieren. Diesen Ergebnissen wird eine umfangreiche Dokumentation über die Grundlagen und entwickelten Methoden vorangestellt. In Kapitel 2 werden dazu die Grundlagen der THz-Frequenzbereichs-Spektroskopie vorgestellt, die sich auf elektronische und optische Heterodynsysteme und Systeme auf Basis von vektoriellen Netzwerkanalysatoren (engl. vector network analyzer, VNA) fokussieren die innerhalb der Bearbeitung dieser Arbeit aufgebaut und charakterisiert wurden. Weiterhin wird eine kurze Einführung in die Funktionsweise von SRR gegeben, die als Grundelemente für die Entwickelten Biosensoren eingesetzt werden. Die für die Funktion der Biosensoren biochemische Funktionalisierung der Goldoberfläche wird außerdem kurz beschrieben.

In Kapitel 3 werden entwickelte Mess- und Designkonzepte vorgestellt, die zur Analyse der THz-Biosensoren erforderlich sind. Das Design der Biosensoren in dieser Arbeit setzt auf eine große Anzahl von Abfragefeldern, um Multianalysen und Referenzmes-

sungen zu ermöglichen. Die damit formulierten Anforderungen an die Messtechnik, das Chipdesign und die Reproduzierbarkeit der Messungen sind im Vergleich zu Biosensoren mit großflächigen Sensoroberflächen eine besondere Herausforderung.

Kapitel 4 beschreibt die Herstellung und die Charakterisierung der THz-Biosensoren. Die CSRR besitzen eine freitragende Metallstruktur, welche primär zur Steigerung der Empfindlichkeit und zur selektiven Funktionalisierung implementiert wurde. Die Qualität dieser Goldoberfläche ist dabei von großer Bedeutung für die Funktionalität des Sensors und wird mit gängigen Analysemethoden wie optische Mikroskopie, Rasterelektronenmikroskop (engl. scanning electron microscope, SEM), Energiedispersive Röntgenspektroskopie (engl. energy dispersive X-ray spectroscopy, EDX) und Rasterkraftmikroskop (engl. atomic force microscope, AFM) charakterisiert.

Die erstmalige Anwendung des THz-Biosensors am Beispiel von komplementären DNA-Proben (engl. complementary-DNA, cDNA), welche aus der menschlichen Melanom Zelllinie MIA gewonnen wurden, wird in Kapitel 5 vorgestellt. Es werden technische Konzepte und Simulationsmodelle erläutert, die zum Erreichen der hohen Empfindlichkeit und Funktionalisierung erforderlich sind. Die Anwendbarkeit des Biosensors für den Nachweis synthetischer und menschlicher DNA-Proben wurde experimentell durch *ex-situ* und *on-chip* Hybridisierung in verschiedenen Konzentrationen verifiziert, die in Modellsimulationen nachvollzogen wurden. Dabei wurde eine außergewöhnlich hohe Empfindlichkeit nachgewiesen kombiniert mit einer sehr hohen Spezifität, die durch biochemische Funktionalisierung erreicht wird.

In Kapitel 6 wird die Entwicklung des THz-Biosensors mit dem Ziel fortgeführt, einen für DNA Erkennung spezialisierten Sensor zu entwickeln und damit die Empfindlichkeit zu optimieren. Dazu wurden die Sensorelemente in den geometrischen Dimensionen skaliert, sodass Biosensoren mit Resonanzfrequenzen mit 0.3 THz, 0.6 THz und 1 THz realisiert wurden. Als Proben wurden Einzelstrang-DNA (ssDNA) und Doppelstrang-DNA (dsDNA) im Volumen proportional zur Sensorfläche unter gleichbleibenden Bedingungen untersucht.

Die vorgestellte Entwicklung des THz-Biosensors wurde exklusiv für Untersuchungen von getrockneten Proben optimiert. Für die Entwicklung eines anwendungsbezogenen Sensors ist die Messung in flüssigen Umgebungen eine wichtige Voraussetzung, die für die THz-Technologie jedoch eine große Herausforderung darstellt. Daher wird in dem in Kapitel 7 vorgestellten Review-Artikel eine umfassende Übersicht über alle bisher durchgeführten THz-Experimente mit Biomolekülen in flüssigen Umgebungen gegeben und analysiert.

Diese gewonnen Erkenntnisse fließen in die Entwicklung eines neuartigen Ansatzes ein, der in Kapitel 8 vorgestellt wird. Diese Arbeit auf Basis von numerischen Simulationsmodellen stellt einen THz-Biosensor vor, der auf komplementären Metamaterialien basiert und mit einer in das Substrat integrierten mikrofluidischen Struktur kombiniert wird. Dadurch bleibt die Resonanz der CSRR auch bei Messungen in stark absorbierenden Flüssigkeiten wie Wasser erhalten. Die mikrofluidischen Kanäle sind parallel zur einfallenden elektromagnetischen Welle orientiert und beeinflussen so die Leistungsfähigkeit des Biosensors nur in vernachlässigbarem Maß.

Zum Abschluss dieser Arbeit werden die gewonnen Ergebnisse zusammengefasst und ein Ausblick auf zukünftige Entwicklungen gegeben. Als Ergänzungen zu den Methoden und Ergebnissen in den Veröffentlichungen sind im Anhang weitere Informationen abgedruckt. Dazu zählen Design-Beschreibungen, Prozessprotokolle, Übersichten über den Stand der Forschung und ergänzende Ergebnisse.

Kapitel 2

Grundlagen

Der Inhalt dieses Kapitels soll grundlegende Prinzipien erläutern, die für das Verständnis der vorgestellten Ergebnisse in den Kapiteln 5, 6, 7 und 8 notwendig sind. Dabei liegt der primäre Fokus auf der Beschreibung der eingesetzten Messtechnik und eine kurze Einführung in das Funktionsprinzip von SRR-basierten THz-Sensoren. Die für die Funktion der Biosensoren essenziellen Grundlagen der biochemischen Funktionalisierung werden in Grundzügen erläutert.

2.1 THz-Frequenzbereichs-Spektroskopie

Frühe und etablierte Systeme auf Basis von Femtosekundenlasern nutzen zur Detektion und Erzeugung von THz-Strahlung entweder photoleitende Antennen [26] oder nichtlineare Kristalle [27]. Dieses Verfahren ist als THz-Zeitbereichs-Spektroskopie (engl. time-domain spectroscopy, TDS) bekannt und wurde lange Zeit aufgrund der Komplexität und Größe der Messaufbauten hauptsächlich in der Forschung eingesetzt. Mit aktuellen kommerziellen fasergebundenen TDS-Systemen ist der Aufbau von kompakten und robusten Messsystemen möglich, die auch im industriellen Umfeld eingesetzt werden können. Fortschritte in den letzten Jahren wurden vor allem in der Entwicklung von THz-TDS Systemen mit hoher Dynamik und Bandbreite [28] oder sehr schnellen Systemen auf Basis einer elektronisch gesteuerten optischen Abtastung erzielt [29]. Dem gegenüber stehen THz-FDS Systeme, die in sehr kompakten Abmessungen realisiert werden können und sehr hohe Frequenzauflösungen von weniger als 5 MHz erreichen können [30]. So wurden bereits vor einigen Jahren THz-Systeme auf Basis von Hohlwellenleitern mit quasi-heterodyner-Detektion für die Anwendung der biomolekularen Sensorik vorgestellt [31]. Vielversprechende Fortschritte sind in der Entwicklungen der SiGe HBT-Technologie zu verzeichnen, die bereits eine maximale Frequenz von über 700 GHz ermöglicht [32]. Eine solche Technologie ermöglicht einen hohen Grad der Integration durch die Implementierung von Oszillatoren, Verstärkern und Sensoren und bietet so das Potential kostengünstige Systeme zu realisieren und damit eine weitere Verbreitung der Technologie zu fördern.

Die Beschreibung in diesem Abschnitt beschränkt sich ausschließlich auf THz-FDS-Systeme auf Basis von elektronischen und optischen Heterodynsystemen und Systeme auf Basis von Netzwerkanalysatoren. Dabei werden im Folgenden die diesen Systemen

zu Grunde liegenden Prinzipien erläutert, eine detaillierte Beschreibung der realisierten Messaufbauten erfolgt in Abschnitt 3.1. Der primäre Grund für die Verwendung von THz-FDS-Systemen liegt in der inhärent hohen Frequenzauflösung und -stabilität dieser Systeme, welche zeitaufgelösten Systemen üblicherweise um mindestens eine Größenordnung überlegen sind. Relevant ist eine hohe Frequenzauflösung für die Untersuchung von Resonatoren mit großen Gütefaktoren und damit für die Erkennung von sehr schmalen Resonanzmerkmalen [13] und für die Detektion von sehr kleinen Verschiebungen der Resonanzfrequenz von Metamaterial-basierten Biosensoren [33].

2.1.1 Elektronische heterodyne Detektion

Die Erzeugung hochfrequenter Signale durch elektronische Quellen stellt in der Regel eine große Herausforderung dar, da deren Ausgangsleistungen im THz-Frequenzbereich stark limitiert sind [34]. Elektronische THz-Systeme auf Basis heterodyner Detektion stellen eine Möglichkeit dar, stabile und rauscharme Systeme zu realisieren. Von heterodyner Detektion spricht man allgemein, wenn für die Mischung eine Referenzfrequenz verwendet wird, die stark von der Frequenz des übertragenen Signals abweicht. Dem gegenüber steht die homodyne Detektion, bei der für die Mischung ein Referenzsignal mit gleicher oder ähnlicher Frequenz wie das übertragene Signal verwendet wird. Für elektronische THz-Systeme ist vor allem die heterodyne Detektion relevant, um die THz-Signale in einen niedrigeren Frequenzbereich zu verschieben. Dieser Prozess erfolgt in Mischern, die beispielsweise Dioden als nichtlineare Bauelemente einsetzen. Schottky-Dioden, welche aus Metall-Halbleiterübergängen aufgebaut sind, eignen sich insbesondere für diese Aufgabe, da diese Dioden sehr hohe Grenzfrequenzen erreichen können. Jedoch begrenzt die sehr limitierte Leistung der harmonischen den erreichbaren Multiplikationsfaktor typischerweise auf $N = 3$ [35]. Anwendung finden diese Dioden außerdem in Frequenzvervielfachern, die zur Generation von hochfrequenten harmonischen Oszillationen eingesetzt werden.

2.1.2 Optische Photomischer

Eine weitere Methode zur Erzeugung von Dauerstrich (engl. continuous wave, cw)-Terahertz-Strahlung stellt die optische heterodyne Konversion (engl. optical heterodyne downconversion) oder Photomischung dar. Wie die englische Bezeichnung andeutet, wird bei diesem Verfahren nicht wie bei elektronischen Systemen eine fundamentale Oszillationsfrequenz eingesetzt, sondern es werden zwei optische Laser miteinander gemischt. Diese Laser mit den Frequenzen ω_1 und ω_2 treffen auf ein photoleitendes Material und resultieren in einer kosinusförmigen Modulation der Photoleitfähigkeit mit der Differenzfrequenz $\Delta\omega = \omega_1 - \omega_2$ der beiden Laser. Die beiden Laser müssen kollimiert und sehr präzise zusammengeführt werden, um eine gute räumliche Überlappung der Moden zu erreichen. Häufig werden dafür fasergekoppelte Diodenlaser im optischen Bereich bei einer Wellenlänge von etwa $0.8 \mu\text{m}$ oder im nahen Infrarot (engl. near infrared, NIR) bei einer Wellenlänge von etwa $1.5 \mu\text{m}$ verwendet. Durch

das Anlegen einer Vorspannung (Bias), wird elektromagnetische Strahlung mit der Differenzfrequenz emittiert, welche bei der entsprechenden Wahl der Laser und der Differenzfrequenz im THz-Frequenzbereich liegt [36].

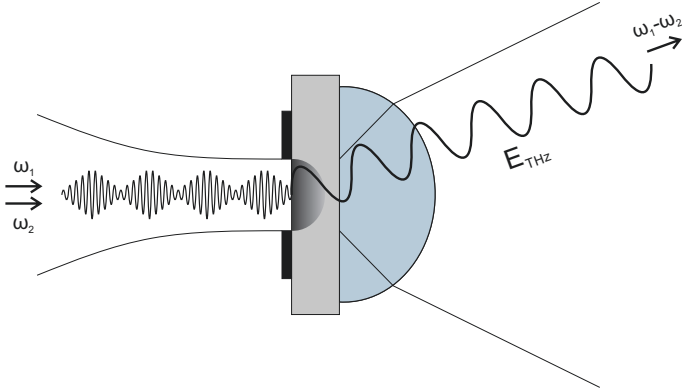


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines typischen Photomischers zur Erzeugung von cw-THz-Strahlung. Auf dem LT-GaAs-Substrat wird eine Antennenstruktur aus Metall (in schwarz dargestellt) und eine (hyper-)hemisphärische Linse aus Silizium platziert. Abbildung in Anlehnung an [37].

Damit das photoleitende Substrat THz-Frequenzen erreichen kann, werden Materialien mit kurzer Ladungsträgerlebensdauer und hoher Ladungsträgerbeweglichkeit benötigt. In frühen Photomischern wurde bei niedrigen Temperaturen gewachsenes Galliumarsenid (engl. low-temperature-grown, LT-GaAs) eingesetzt, mit einer Ladungsträgerlebensdauer von ≈ 0.5 ps und einer Ladungsträgerbeweglichkeit von $\approx 200 \text{ cm}^2/\text{V} \cdot \text{s}$ [38]. Aktuellere Systeme setzen auf Indiumgalliumarsenid (InGaAs) als photoleitendes Material [30]. In das Substrat wird typischerweise eine Antennenstruktur in Form einer Bow-tie- oder Spiralantenne integriert und auf der Rückseite eine (hyper-)hemisphärische Linse aus Silizium platziert. Der Aufbau und das Prinzip wird in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt.

2.1.3 Vektorielle Netzwerkanalysatoren

Ein Standardwerkzeug für die Analyse von Schaltungen und Bauteilen in der Hochfrequenztechnik ist ein vektorieller Netzwerkanalysator (engl. vector network analyzer). Typischerweise ist der Frequenzbereich bis etwa 70 GHz limitiert, konnte in den letzten Jahren jedoch mit Hilfe von Frequenzbereichs-Erweiterungen bis auf 1.1 THz erweitert werden und stellt somit ein alternatives Werkzeug für THz-Analysen dar [39].

Ein VNA misst die Amplitude und Phase von Signalen, die von der untersuchten Probe oder Bauteil transmittiert oder reflektiert werden. Im Wesentlichen wird zwischen einer hinlaufenden Welle a und einer rücklaufenden Welle b unterschieden, wobei der Index das wirksame Tor beschreibt. Man unterscheidet in der Anzahl von Messtoren, typisch sind Ein- oder Zweitore. Werden die Wellengrößen a und b geeignet miteinander in Bezug gesetzt, erhält man für die Beschreibung der Transmission und Reflexion durch eine Probe die sogenannten Streuparameter (S-Parameter). Schematisch werden diese Größen am Beispiel eines Zweitores in Abbildung 2.2 dargestellt. Die Beschreibung der Abhängigkeit der Wellengrößen in Bezug auf die S-Parameter kann als Kurzschreibweise in Matrixform angegeben werden:

$$\begin{pmatrix} b_1 \\ b_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} S_{11} & S_{12} \\ S_{21} & S_{22} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} a_1 \\ a_2 \end{pmatrix} \quad (2.1)$$

und ist gültig für ein Zweitor. In dieser Matrix beschreibt S_{11} den Eingangsreflexionsfaktor, S_{21} den Vorwärts-Transmissionsfaktor, S_{12} den Rückwärts-Transmissionsfaktor und S_{22} den Ausgangsreflexionsfaktor.

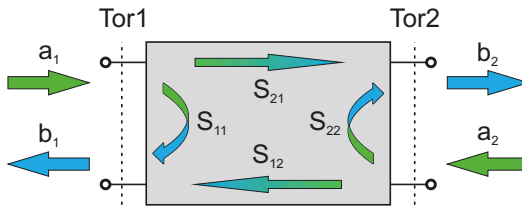


Abb. 2.2: Konzeptuelle Darstellung eines Zweitores und den zugehörigen Wellengrößen. Hinlaufende Wellen sind mit a gekennzeichnet, rücklaufende Wellen mit b . Die Pfeile deuten die Richtung der Wellengrößen und der S-Parameter für verschiedene Fälle der Transmission und Reflexion an. Abbildung in Anlehnung an [40].

Frequenzbereichs-Erweiterungen erlauben die Nutzung von VNAs im THz-Frequenzbereich und werden von etablierten Herstellern angeboten. Mit diesen Erweiterungen wurden in der Literatur bereits experimentelle Freistrahlmessaufbauten realisiert [41, 42] und mit klassischen THz-TDS Messsystemen für die Bestimmung der komplexen Permittivität verglichen [43]. Grundlegend basieren diese Erweiterungen auf der bereits bekannten Rechteckhohlleiter-Technik, bei der der Frequenzbereich durch die geometrischen Dimensionen des Hohlleiters definiert wird. Eine für den THz-Frequenzbereich relevante Übersicht wird in Tabelle 2.1 angegeben.

Vergleichbar mit elektronischen Heterodynsystemen, wird auch hier durch eine Vielfachung des Generatorsignals das Hochfrequenzsignal erzeugt. Das Generatorsignal liegt häufig in einem Bereich zwischen 9 GHz und 20 GHz, der Multiplikationsfaktor kann bis zu $\times 54$ betragen. Die Hochfrequenzsignale werden heterodyn auf eine

Frequenzbereich [GHz]	Querschnitts- bezeichnung	Multiplikations- faktor
220 - 330	WM-864 (WR-3.4)	× 18
330 - 500	WM-570	× 36
500 - 750	WM-380	× 36
750 - 1100	WM-250	× 54

Tab. 2.1: Relevante Bereiche für THz-Frequenzbereichs-Erweiterungen am Beispiel der Serie R&S@ZCxxx Millimeterwellenkonverter. Der Frequenzbereich wird durch die geometrischen Dimensionen des Hohlwellenleiters mit der angegebenen Querschnittsbezeichnung definiert. Der Multiplikationsfaktor gibt an mit welchem Faktor das LO-Signal multipliziert werden muss, um den Zielfrequenzbereich zu erreichen.

Zwischenfrequenz (ZF-Frequenz) im Bereich von 15-300 MHz herunter gemischt und als Referenz- und Messsignal detektiert. Um diese Erweiterungen zu betreiben, ist für gewöhnlich ein voll ausgestatteter VNA mit vier Ports notwendig. Steht dieser nicht zu Verfügung, kann für die Bereitstellung des lokalen Oszillator-Signals (LO) jedoch auch ein synchronisierter externer Generator verwendet werden.

2.2 THz-Metamaterialien

Als Metamaterialien werden im Allgemeinen künstliche Materialien oder Strukturen bezeichnet, welche elektromagnetische Eigenschaften aufweisen, die mit natürlich vorkommenden Materialien nicht erreicht werden können. Dazu gehören vor allem die Eigenschaften einen negativen Wert für Permittivität, Permeabilität oder Brechungsindex annehmen zu können, weshalb diese auch als linkshändige- oder Tarn-Materialien bezeichnet werden. Metamaterialien können als zwei- oder dreidimensionale Strukturen aufgebaut sein und ebenfalls eingesetzt werden, um akustische Wellen zu beeinflussen. Erstmals verwendet wurde der Begriff Metamaterial von Smith et al. im Jahr 2000, der damit ein linkshändiges Material in Form eines Schlitz-Ringresonators bezeichnete, welcher eine negative Permeabilität aufweist [44]. Grundsätzlich werden in dieser Arbeit Metamaterialien behandelt, welche die Manipulation elektromagnetischer Strahlung erlauben und ihre Eigenschaften dabei durch die Struktur und Geometrie definieren. Dies ermöglicht in der Regel eine einfache und flexible Implementierung und die Anpassung auf verschiedenste Anforderungen und Anwendungsbereiche. So kann durch Metamaterialien die Absorption und Transmission elektromagnetischer Strahlung manipuliert werden. Damit können elektromagnetische Filter mit definierter Bandbreite realisiert werden und darüber hinaus charakteristische Eigenschaften wie abgestrahlte Leistung, Richtwirkung oder Polarisation gezielt beeinflusst werden.

Anwendungen in Form von Absorbern, Antennen, Filtern, Sensoren, Energiemanagement Systemen, usw. sind daher in der Medizin, im Automobilbau, in der Luft- und Raumfahrt und in vielen anderen Bereichen zu finden [45].

Im THz-Frequenzbereich können Metamaterialien die oben genannten Eigenschaften und Anwendungen nicht immer erfüllen. Vielmehr werden unter dem Begriff THz-Metamaterialien resonante Strukturen in Subwellenlängen-Größe allgemein zusammengefasst. Diese Strukturen sind überwiegend zweidimensional und werden daher auch als Meta-Oberflächen bezeichnet. Darunter fallen auch sogenannte frequenzselektive Oberflächen (engl. frequency selective surface, FSS) [46]. Diese basieren auf einer sehr ähnlichen Funktionsweise und Technik wie Metamaterialien und haben ihren Ursprung in der Kommunikations- und Radartechnik. Generell ist dieser Begriff im THz-Frequenzbereich weniger weit verbreitet.

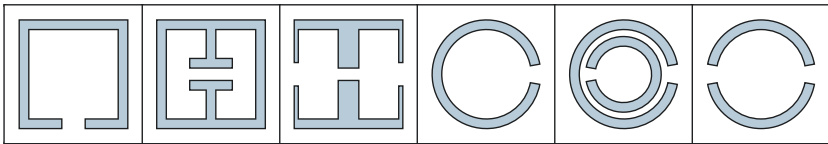


Abb. 2.3: Verschiedene Designs von Metamaterialien, die auf Schlitz-Ringresonatoren basieren. Es wird jeweils ein Element in einer Einheitszelle dargestellt. Jede der dargestellten Varianten ist polarisationssensitiv.

Metamaterialien und FSS bestehen immer aus einer Vielzahl von Einheitszellen (engl. Unit Cell) die periodisch in einem Array angeordnet sind und einem Element innerhalb der Einheitszelle, welches deutlich kleiner als die Wellenlänge ist mit der interagiert wird. Die Elemente bestehen typischerweise aus einer Metallstruktur in Form einer Schleife und einem Spalt und werden auf einem dielektrischen Substrat strukturiert. Grundsätzlich ist eine Vielzahl von Techniken zur Erzeugung der gewünschten Eigenschaften durch verschiedene Formen der Elemente und deren Strukturgrößen denkbar. Eine exemplarische Übersicht über verschiedene Elemente ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Wird diese Struktur durch eine einfallende elektromagnetische Welle angeregt, wird ein oszillierender Strom in der Leiterschleife hervorgerufen und resultiert in einer Resonanzantwort. Diese Antwort ist analog zu derjenigen, die von einer äquivalenten Schaltung mit einer bestimmten Kapazität, Induktivität und Widerstand erzeugt wird. Je nach der Struktur und dem Aufbau der Elemente ergeben sich starke, lokalisierte elektrische Felder, welche sehr empfindlich auf eine Veränderung des umgebenden dielektrischen Materials reagieren. Somit erzeugen Proben, die durch ihre dielektrischen Eigenschaften zu einer Veränderung der Kapazität in den Spalten zwischen den Ringschleifen führen, eine Verschiebung der Resonanzfrequenz. Erstmals wurde ein Schlitz-Ring Zylinder mit negativer Permeabilität im GHz-Frequenzbereich von Pendry et al. im Jahr 1999 beschrieben, welche damit die erste Metamaterial-Struktur in Form eines Schlitz-Ringresonators darstellt [47].

2.2.1 Schlitz-Ringresonator

Die in dieser Arbeit eingesetzten und beschriebenen SRR basieren im wesentlichen alle auf dem asymmetrischen Doppel-Schlitz-Ringresonator (engl. asymmetric double split ring resonator, aDSRR) und dem dazu komplementären Gegenstück. Da innerhalb der Veröffentlichungen in dieser Arbeit verschiedene Bezeichner für ähnliche Strukturen verwendet wurden, erfolgt die funktionale Beschreibung anhand des aDSRR, der innerhalb dieser Arbeit jedoch vereinfacht immer als SRR bezeichnet wird. Äquivalent dazu wird die komplementäre Struktur anhand des komplementären asymmetrischen Schlitz-Ringresonators (engl. complementary asymmetric split ring resonator, CASRR) beschrieben, der vereinfacht als komplementärer Schlitz-Ringresonator (engl. complementary split ring resonator, CSRR) bezeichnet wird.

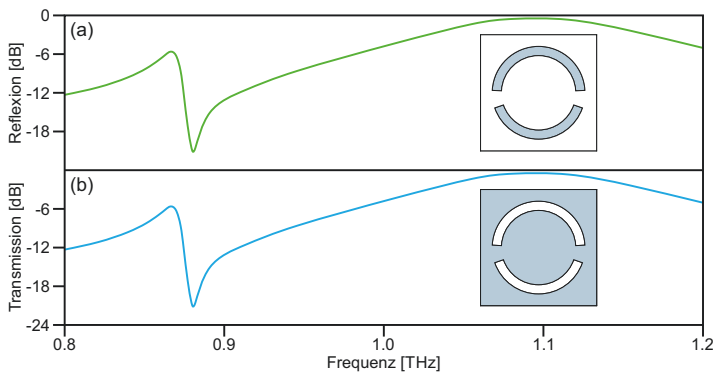


Abb. 2.4: Reflexionsspektrum und schematische Darstellung der Einheitszelle eines Schlitz-Ringresonators (b) und Transmissionsspektrum eines komplementären Schlitz-Ringresonators. Dunkel dargestellt ist jeweils die metallisierte Fläche. So besteht der Schlitz-Ringresonator in (a) aus zwei unterschiedlich langen Ringsegmenten aus Metall und der komplementären Schlitz-Ringresonator in (b) aus zwei unterschiedlich langen Schlitzern in einer Metalloberfläche.

Die SRR Struktur setzt sich aus zwei unterschiedlich langen Ringsegmenten zusammen, welche durch eine Öffnung voneinander getrennt sind. Diese Ringsegmente werden üblicherweise aus Metall hergestellt und sind in Abbildung 2.4(a) dunkel dargestellt. Die geometrischen Dimensionen der in dieser Arbeit entworfenen CSRR werden in den entsprechenden Abschnitten beschrieben. Die Funktionsweise eines SRR kann durch verschiedene Mechanismen erklärt werden, wovon eine davon die Interaktion von Antennenpaaren ist [48]. Dabei verhält sich jedes der beiden Ringsegmente wie eine $\lambda/2$ -Dipolantenne. Die Länge eines Ringsegments definiert die Resonanzfrequenz, wobei ein Ringsegment alleine ein flaches und breites Resonanzmerkmal

im Reflexionsspektrum erzeugt. Dieses befindet sich in Abbildung 2.4(a) etwa bei der Frequenz von 1.1 THz. Durch die unterschiedliche Länge der beiden Ringsegmente ergibt sich für jedes Segment eine leicht unterschiedliche Resonanzfrequenz. Die Kombination dieser beiden Frequenzverläufe ergibt in der Folge jedoch ein zusätzliches Resonanzmerkmal mit einer Resonanzfrequenz unterhalb der Dipolresonanz mit einer sehr steilen Flanke. In Abbildung 2.4 tritt diese Resonanz bei etwa 0.88 THz auf. Diese Resonanz wird im Folgenden als Doppelresonanz Merkmal (engl. double resonance feature, DRF) bezeichnet und weist einen Verlauf in Form einer Fano-Resonanz auf [49, 50].

Die Ursache für dieses zusätzliche Resonanzmerkmal sind die durch das anregende elektrische Feld hervorgerufenen Ströme und die elektromagnetische Interaktion zwischen den beiden Ringsegmenten. Bei einer harmonischen Anregung kann so das erweiterte Durchflutungsgesetz der Maxwell'schen Gleichungen angewendet werden, wonach elektrische Ströme (und ein elektrischer Verschiebungsstrom) zu einem magnetischen Feld führen. Durch dieses magnetische Feld wird in dem jeweilig anderen Ringsegment ein Strom induziert, der dem entgegengesetzt ist, der durch die äußere elektromagnetische Welle hervorgerufen wird. Befindet sich der SRR in Resonanz, ergibt sich ein maximaler Gesamtstrom, der im Frequenzverlauf der Reflexion zu einem lokalen Maximum führt. Durch die unterschiedliche Länge der beiden Ringsegmente gibt es jedoch außerdem eine Frequenz, bei der sich die beiden Ströme gegenseitig nahezu aufheben, was in einem lokalen Minimum im Frequenzverlauf resultiert.

2.2.2 Komplementärer Schlitz-Ringresonator

Innerhalb dieser Arbeit wurden ausschließlich komplementäre SRR eingesetzt. Komplementär bedeutet in Bezug auf einen SRR, dass die metallischen Ringsegmente zu offenen Schlitzten in einer vollständig metallisierten Metalloberfläche werden. Diese Schlitzte sind hell in Abbildung 2.4 in einer dunklen Metalloberfläche dargestellt. Dabei wird das sogenannte „*Babinet'sche Prinzip*“ angewendet, für das Booker [51] die theoretischen Grundlagen am Beispiel von Slot Antennen beschrieben hat. Die Grundvoraussetzung ist die Symmetrie der Maxwell'schen Gleichungen, nach der das elektrische Feld mit dem magnetischen Feld für verlustlose Medien miteinander vertauscht werden kann, wenn dabei der Leiter gegen einen Isolator ausgetauscht wird [52]. Schematisch dargestellt wird dieses Prinzip am Beispiel des Schnittbildes eines SRR in Abbildung 2.5(a) und für den komplementären SRR in Abbildung 2.5(b).

Für den SRR ergibt sich ein vektorielles magnetisches Feld \vec{H} um die Ringsegmente herum, für die CSRR-Struktur ergibt sich ein vektorielles elektrisches Feld \vec{E} zwischen den Schlitzten. Erstmals wurde dieses Prinzip von Falcone et al. für Metamaterialien im Jahr 2004 angewendet [53]. Durch das Vertauschen der elektrischen und magnetischen Felder ergeben sich in der Folge weitere Eigenschaften der komplementären Struktur. So entspricht die Transmission der komplementären Struktur im Idealfall der Reflexion des SRR. In der praktischen Realisierung entstehen vor allem

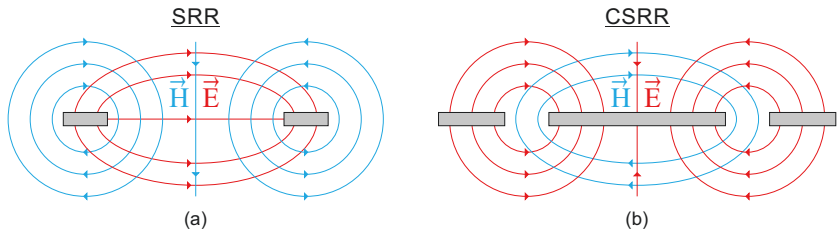


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Feldverteilung für eine (a) SRR-Struktur und (b) die dazu komplementäre CSRR-Struktur. Das Schnittbild zeigt die Vertauschung der elektrischen mit der magnetischen Feldstärke, welche sich durch die Anwendung von Babinet's Prinzip ergibt [52].

durch die endliche Leitfähigkeit der eingesetzten Metalle geringe Unterschiede zwischen den Transmissionsspektren der beiden Strukturen. Weiterhin ändert sich die Polarisationsrichtung der einfallenden Welle zur Anregung des Resonators um 90° . Für den in Abbildung 2.4(a) dargestellten SRR ist die Polarisationsrichtung horizontal, für den CSRR vertikal. Außerdem wird die negative magnetische Permeabilität des SRR durch eine negative elektrische Permittivität in einem CSRR in der Nähe der Resonanzfrequenz ersetzt [53].

2.3 Biochemische Grundlagen

Die Messung von Biomolekülen im THz-Frequenzbereich erfolgt zu einem großen Teil in getrockneter Form und durch eine unspezifische Adsorption des Analyten. Um einen spezifischen Nachweis zu ermöglichen, ist die Bindung des zu detektierenden Biomoleküls ein wichtiger Baustein für Biosensoren. Abhängig davon welche Biomoleküle nachgewiesen werden sollen, können verschiedene Methoden zum Einsatz kommen. Beispiele hierfür sind Antigen-Antikörper-Reaktionen, Transkriptionsfaktoren als DNA-Protein-Bindung, Protein-Protein-Bindungen oder DNA-DNA-Bindungen, bei denen in der Regel zwei zueinander komplementäre ssDNA-Stränge zu dsDNA hybridisieren. Der in dieser Arbeit vorgestellte THz-Biosensor beschränkt sich zunächst auf den spezifischen Nachweis von DNA-DNA-Bindungen, daher werden die zugrunde liegenden Methoden im Folgenden kurz beschrieben.

Das Prinzip des entwickelten THz-Biosensors basiert auf der Modifikation der Sensoroberfläche mit ssDNA-Strängen, welche als Fängermoleküle eingesetzt werden. Der Nachweis erfolgt durch die Exposition der so vorbereiteten Sensorfläche mit einer Probe, die DNA-Moleküle mit unbekannter Sequenz enthält. Ausschließlich die Moleküle, die eine komplementäre Sequenz zu den auf den jeweiligen Abfragefeldern immobilisierten DNA-Fängermolekülen haben, werden mit diesen zu dsDNA-Strängen

hybridisieren. Da sich die relative Permittivität für ssDNA und dsDNA im THz-Frequenzbereich unterscheidet, kann auf diese Weise eine selektive Detektion ohne zusätzliche Markierung realisiert werden.

2.3.1 Selbstorganisierende Monoschichten

Selbstorganisierende Monoschichten (engl. self-assembled monolayer, SAM) bezeichnen in der Regel organische Moleküle, die spontan an eine Oberfläche binden und dabei Filme aus einer Monolage an Molekülen ausbilden. Die Bindung erfolgt durch Chemisorption, welche eine spezielle Form der Adsorption darstellt und die Moleküle vergleichsweise stark an die Oberfläche bindet. Die Formation der SAM kann durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen, die entweder durch Diffusion oder Adsorption gesteuert werden. Die Struktur einer typischen SAM teilt sich in drei Teile auf: (i) Die Kopfgruppe (engl. headgroup), bezeichnet die chemisch aktive Gruppe, die kovalent an die Oberfläche bindet. (ii) Das Rückgrat (engl. backbone) verbindet die Kopfgruppe mit der (iii) Endgruppe (engl. endgroup). Diese Restgruppe definiert die Eigenschaften der neu geformten Oberfläche und erlaubt die Modifikation mit verschiedenen chemischen Funktionalitäten. Daher wird dieser Prozess auch als „Funktionalisierung“ bezeichnet. Generell können die Eigenschaften einer Oberfläche innerhalb gewisser Grenzen durch den Einsatz von SAMs designt werden. Hierbei muss die Kopfgruppe für die vorliegende Oberfläche geeignet sein. Die Auswahl der Endgruppe erlaubt die Anpassung der Eigenschaften der resultierenden Oberfläche nach der Funktionalisierung. Ein umfassender Überblick über die Kombinationsmöglichkeiten wird in einem Übersichtsartikel von Love et al. gegeben [54].

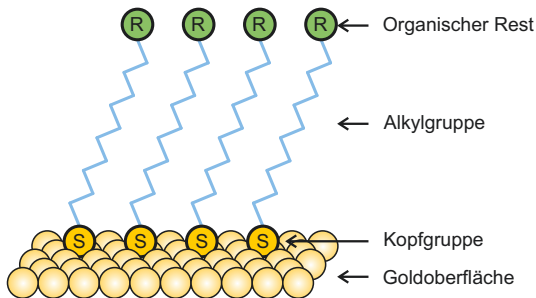


Abb. 2.6: Schematische Darstellung, die beispielhaft den Aufbau einer SAM zeigt (reduziert auf eine Reihe). Die Kopfgruppe bindet über eine kovalente Bindung an die Goldoberfläche. Die funktionale Gruppe, welche meist als organischer Rest vorliegt, wird über eine Alkylgruppe gebunden. Abbildung in Anlehnung an [55].

Der in dieser Arbeit entwickelte THz-Biosensor verwendet für die Funktionalisierung der Goldoberfläche eine Bindung mittels einer Thiolgruppe, die während der Chemisorption zur Kopfgruppe wird. Eine schematische Darstellung der sich bildenden SAM ist in Abbildung 2.6 dargestellt. In organischen Verbindungen haben Thiolgruppen die chemische Struktur R-SH, wobei R für Rest, S für Schwefel und H für Wasserstoff steht. Diese werden auch als „*Mercaptogruppen*“ bezeichnet und bilden aufgrund der hohen Affinität von Gold zu Schwefel eine kovalente Bindung aus [56]. Die Thiolgruppe wird über Alkylketten mit der organischen Restgruppe verbunden, woraus sich die generelle Struktur $R(\text{CH}_2)_n\text{SH}$ für beide Komponenten ableitet. Dabei steht C für Kohlenstoff und n für die Anzahl der Methylen-Einheiten. Über die Alkylgruppen wird außerdem der Abstand zwischen der Endgruppe und der Goldoberfläche eingestellt und damit die Schichtdicke der Monolage definiert. Als organische Restgruppen werden innerhalb dieser Arbeit Hydroxylgruppen und ssDNA eingesetzt.

Der Prozess zur Herstellung einer SAM ist vergleichsweise einfach: Die Thiole werden in einer Flüssigkeit gelöst und damit eine Lösung mit definierter Konzentration hergestellt. Die gereinigte Goldoberfläche wird dieser Lösung ausgesetzt und nach der Adsorption werden überflüssige Thiole abgespült. Durch die hohe Affinität von Schwefel zu Gold entsteht so ein stabiler und dichter Film aus einer molekularen Monolage [55].

2.3.2 DNA-Funktionalisierung und -Hybridisierung

Die Funktionalisierung der THz-Sensoroberfläche erfolgt mit Thiol-modifizierter ssDNA oder dsDNA auf Basis der Ausbildung einer SAM. Die ssDNA stellt entsprechend Abbildung 2.6 die Restgruppe dar und bildet damit die funktionale Gruppe, welche die Eigenschaften der Sensoroberfläche definiert. Mit einem auf diese Weise modifizierten Biosensor ist damit der Nachweis des passenden komplementären Bindungspartners (cDNA) möglich. Da die DNA auf der Goldoberfläche lokal gebunden und somit räumlich fixiert wird, spricht man von der „*Immobilisierung*“ der DNA-Proben.

Abbildung 2.7 zeigt schematisch die Schritte zur DNA-Funktionalisierung und -Hybridisierung. In Abbildung 2.7(a) wird auf die Goldoberfläche zunächst Thiol-modifizierte ssDNA¹ gebunden. Dabei wird die ssDNA spezifisch durch die Schwefelatome kovalent an die Goldatome der Sensoroberfläche gebunden. Dabei kann es jedoch auch zu unspezifischer Adsorption kommen, bei der sich die ssDNA zufällig auf der Goldoberfläche ablagert und damit nicht als Bindungspartner für die Hybridisierung zur Verfügung steht. Um die unspezifisch adsorbierte ssDNA zu entfernen, kann eine SAM aus 6-Mercapto-1-hexanol (MCH) eingesetzt werden, siehe Abbildung 2.7(b). Zu diesem Zweck wird MCH in deutlich höherer Konzentration als nötig eingesetzt,

¹ Alternativ kann zu Testzwecken auch direkt dsDNA auf der Sensoroberfläche immobilisiert werden.

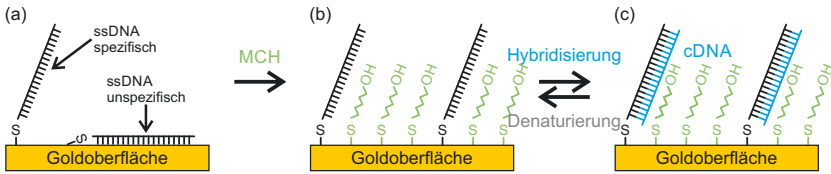


Abb. 2.7: Schematische Darstellung verschiedener Schritte zur DNA-Funktionalisierung des THz-Biosensors. (a) Spezifische und unspezifische Bindung von Thiol-modifizierter ssDNA. (b) Durch die Zugabe von MCH wird unspezifisch gebundene DNA entfernt und offene Bindungsstellen mit MCH besetzt. (c) Komplementäre DNA (cDNA) hybridisiert auf der Sensoroberfläche zu dsDNA.

um die Effizienz der Verdrängung zu erhöhen. Durch diesen zweistufigen Funktionalisierungsprozess werden unspezifisch gebundene Moleküle zuverlässig von der Sensoroberfläche entfernt und ein großer Teil der gebundenen ssDNA steht als Fängermolekül für die Hybridisierung der komplementären DNA zur Verfügung. Bei der Hybridisierung von komplementären ssDNA-Strängen wie in Abbildung 2.7(c) gezeigt, bilden sich zwischen den komplementären Basen Wasserstoffbrückenbindungen aus. Untersuchungen haben nachgewiesen, dass die Effizienz der Hybridisierung wesentlich von der Dichte der Oberflächenfunktionalisierung und der Konzentration der Pufferlösung abhängig ist [21]. Die präzise Kontrolle der Oberflächeneigenschaften durch SAM ist daher ein komplexer und wichtiger Aspekt, der für das Design und die Prozessschritte berücksichtigt und entwickelt werden muss. Die Hybridisierung von komplementären DNA-Strängen kann durch physikalische und chemische Methoden wieder rückgängig gemacht werden. Dieser Prozess wird als „Denaturierung“ bezeichnet. Die Herstellung von Thiol-basierten SAM stellt ein wichtiges und notwendiges Werkzeug für die Entwicklung von Biosensoren dar, um kontrollierte Bedingungen für die Immobilisierung und Hybridisierung von Biomolekülen wie DNA herzustellen.

Kapitel 3

Systemkonzept und Datenanalyse

In diesem Kapitel werden die zu Grunde liegende Messtechnik, Konzepte und Methoden, die zur Analyse der entwickelten Biosensoren notwendig sind, näher beschrieben. Dabei ist insbesondere darauf hinzuweisen, dass Analysen in der wissenschaftlichen Forschung typischerweise auf großflächigen Metamaterial-Oberflächen von mehreren Quadratzentimetern durchgeführt werden. Bedingt durch die große Oberfläche wird der Einfluss von Randeffekten minimiert, jedoch werden große Probenvolumen benötigt und Referenzmessungen sind nur bedingt umsetzbar. Somit wird die maximal erreichbare Empfindlichkeit bereits durch das Chipdesign und das verwendete Messkonzept eingeschränkt. Der innerhalb dieser Arbeit entwickelte und optimierte biosensorische Ansatz setzt hingegen auf ein Chipdesign, welches von Beginn an als Plattform für Multianalysen und Referenzmessungen entwickelt wurde und auf mehreren Abfragefeldern mit einer Größe von einigen Quadratmillimetern basiert. Dieser Ansatz führt zu deutlich erhöhten Anforderungen an die Messtechnik, das Chipdesign und an die Reproduzierbarkeit der Messungen im Vergleich zu Biosensoren mit großflächigen Sensoroberflächen. Im Folgenden werden grundlegende Methoden und Konzepte erläutert, die zur Umsetzung dieses Plattform-basierten biosensorischen Ansatzes verwendet und entwickelt wurden.

3.1 Messaufbau

3.1.1 Elektronische Heterodynsysteme

Eines der in dieser Arbeit verwendeten und aufgebauten Systeme, basierend auf elektronischer heterodyner Detektion, ist schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt und wurde für die in Kapitel 5 erzielten Ergebnisse eingesetzt. Als Quelle für die Frequenz des LO-Signals wird ein spannungsgesteuerter Oszillator (engl. voltage-controlled oscillator, VCO) eingesetzt, der durch eine lineare Spannungsrampe angesteuert wird und auf diese Weise eine kontinuierliche Folge von sägezahnförmigen Sweeps der LO-Frequenz zwischen 12 - 18 GHz erzeugt. Im Sender wird das LO-Signal über eine Kette von Frequenz-Multiplizierern und Verstärkern mit dem Faktor 18 multipliziert, wodurch sich ein Hochfrequenz-Signal (engl. radio frequency, RF) im Bereich von 220-

320 GHz ergibt¹. Diese THz-Strahlung wird über eine Horn Antenne abgestrahlt und über einen quasi-optischen Aufbau in 4f-Konfiguration auf die Probe fokussiert. Dafür werden bikonvexe Linsen mit 2"-Durchmesser mit einem Abbildungsmaßstab von 2:1 verwendet, welche mit einem Strahldurchmesser von etwa 2.5 mm auf die Probe fokussiert werden. Über Lineartische kann die Probe in x-, y- und z-Richtung verfahren und präzise im Fokuspunkt platziert werden.

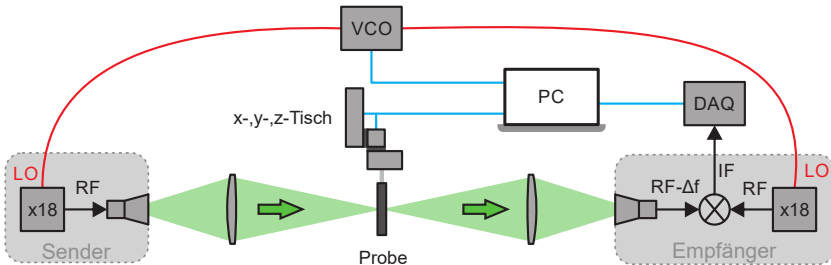


Abb. 3.1: Elektronisches Heterodynsystem in Freistrah Transmission-Konfiguration. Im Sender wird das RF-Signal im Bereich von 220-320 GHz über eine Hornantenne abgestrahlt und über bikonvexe Linsen auf die Probe fokussiert. Der Freistrah Pfad ist in grün dargestellt. Zur Detektion wird das empfangene Signal mit dem LO-Signal gemischt, wodurch sich eine IF ergibt. Abbildung in Anlehnung an [57].

Im Empfänger wird das identische LO-Signal des VCO verwendet und durch Frequenzmultiplikation ein RF-Signal generiert. Daraus wird in einem Mischer zusammen mit dem empfangenen Signal das Zwischenfrequenz-Signal (engl. intermediate frequency, IF) erzeugt, wobei sich für identische LO-Signale an Sender und Empfänger ein Gleichspannungssignal ergibt. Durch die freie Wegstrecke der THz-Strahlung und eine zusätzliche Verlängerung des Signalkabels des Senders ergibt sich jedoch eine Zeitverzögerung Δt . Bedingt durch den sägezahnförmigen Verlauf des LO-Signals folgt ein Frequenzunterschied Δf , welcher durch Mischen im IF-Signal resultiert. Im beschriebenen System beträgt diese IF-Frequenz ca. 2 MHz und wird mit 5 MHz abgetastet. Große Vorteile dieses Systems liegen in der extrem schnellen Messzeit von ca. 110 ms für 100 Messungen inklusive der Signaldatenverarbeitung und der hohen Frequenzauflösung, während Einschränkungen durch die begrenzte Bandbreite des Systems bestehen. Eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus findet sich in [31].

Der beschriebene quasi-optische Setup wurde in dieser Arbeit für den Aufbau eines zweiten elektronischen Heterodynsystems verwendet, welches einen vektoriellen Netzwerkanalysator für die Generation des LO- und RF-Signals einsetzt. Mit zwei Modulen der Frequenzbereichserweiterung R&S@ZVA-Z325 und dem Signalgenerator

¹Bei den angegebenen Frequenzbereichen handelt es idealisierte Werte, da Bereiche des digitalisierten Signals bei der A/D-Wandlung entfernt werden.

R&S®SMF 100A wurde der vektoriellen 2-Port Netzwerkanalysator R&S®ZVA 67 auf den Frequenzbereich von 220-325 GHz erweitert. Damit deckt dieser fast exakt den Frequenzbereich des oben beschriebenen Systems ab und kann daher ohne Änderungen mit dem identischen quasi-optischen Setup betrieben werden. Diese Konfiguration bietet den Vorteil, dass vorhandene, hoch präzise Messtechnik wie ein Netzwerkanalysator für die Generation von cw-THz-Signalen genutzt werden kann. Jedoch sind dieses Systeme sehr teuer, besitzen nur eine geringe Bandbreite und zeigen in Bezug auf die Frequenzstabilität keine wesentlichen Vorteile gegenüber konventionellen Systemen [58].

3.1.2 Optische Heterodynsysteme

Bei dem in dieser Arbeit eingesetzten optischen Heterodynsystems handelt es sich um das TeraScan 1550 System der Firma TOPTICA Photonics AG mit Frequenzerweiterung, womit maximal eine Frequenz von 2.6 THz erreicht werden kann. Auf Basis dieses Systems wurden zwei optische Aufbauten realisiert, a) in Transmissions-Konfiguration und b) in Reflexions-Konfiguration, siehe Abbildung 3.2.

Als Quellen kommen sogenannte Laser mit verteilter Rückkopplung (engl. distributed feedback laser, DFB) zum Einsatz. Dabei handelt es sich um vergleichsweise kostengünstige Telekommunikations-Laser mit zentralen Wellenlängen von 1534 nm, 1538 nm und 1550 nm, welche in einem optischen fasergekoppelten 2×2 Koppler kombiniert werden. Über thermisches Tuning kann die Wellenlänge jedes Lasers variiert werden, wodurch ein Durchstimmen verschiedener Frequenzbereiche ermöglicht wird und so spektroskopische Untersuchungen realisiert werden können. Durch die drei möglichen Kombinationsmöglichkeiten der drei Laser ergeben sich so verschiedene Frequenzbereiche von 0-1150 GHz, 750-2100 GHz und 1150-2600 GHz.

Das überlagerte optische Signal trifft im Sender (Tx) auf eine InGaAs-Photodiode, welche mit einer Bow-tie Antenne kombiniert wird. Beim Anlegen einer Bias-Spannung, welche für die Anwendung der Lock-In-Messtechnik zusätzlich moduliert wird, wird entsprechend der Differenzwellenlänge der aktiven Laser elektromagnetische Strahlung emittiert. Diese wird über Silizium Linsen abgestrahlt und über Off-Axis-Parabolspiegel mit 2"-Durchmesser, mit jeweils 2"-Brennweite in das optische System eingekoppelt und mit Parabolspiegeln mit 4"-Brennweite auf die Probe fokussiert. In der Reflexionsanordnung wird in den Senderpfad ein 5 mm dicker Silizium Wafer eingebaut, welcher als Strahlteiler im Verhältnis 50:50 eingesetzt wird. Die Positionierung der Probe erfolgt durch präzise Lineartische mit Verfahrrichtungen in x-, y- und z-Richtung. Der Empfänger (Rx) besteht aus einem InGaAs-Photomischer und wird von der THz-Strahlung und dem Lasersignal bestrahlt. Die THz-Strahlung generiert dabei eine Spannung in der Antenne, während der Laser die Leitfähigkeit des Photomixers moduliert. Der daraus resultierende Photostrom I_{Ph} ist proportional zur Amplitude des elektrischen Feldes E_{THz} :

$$I_{Ph} \propto E_{THz} \quad (3.1)$$

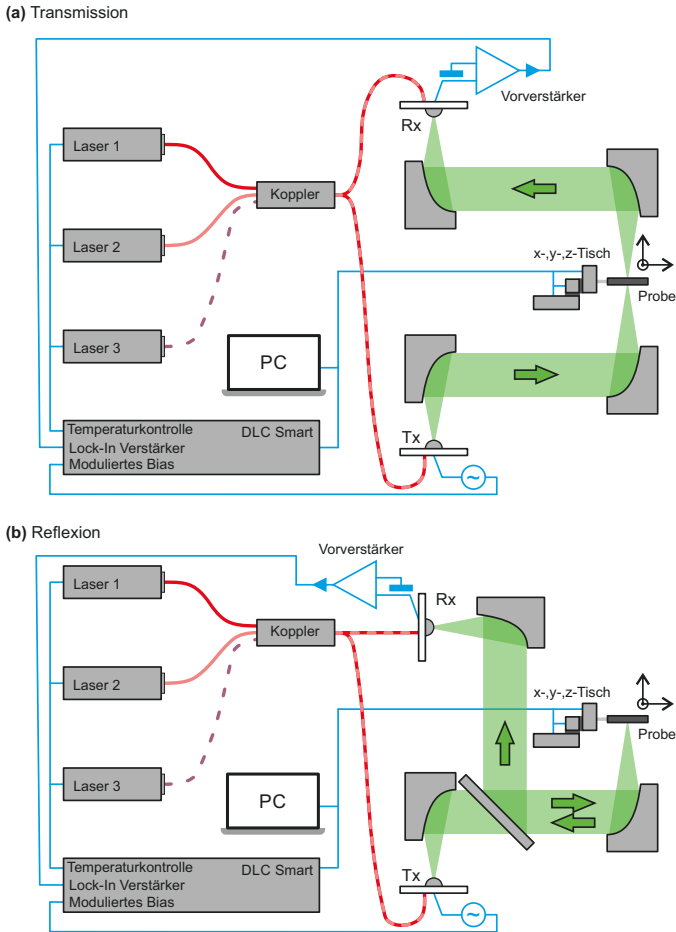


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Messsystems. (a) Zeigt den quasioptischen THz-Pfad in Transmissionskonfiguration, (b) in Reflexionsanordnung. In grün werden THz-Pfade dargestellt, in rot fasergeführte optische Pfade und in blau Datenverbindungen.

und wird mittels Lock-in Messtechnik detektiert. Dieses Signal weist einen kosinusförmigen Verlauf auf und ist damit reellwertig:

$$I_{\text{Ph}} = E_{\text{THz}} \times \cos(2\pi\Delta Lf/c), \quad (3.2)$$

wobei die Pfaddifferenz durch ΔL , die Frequenz durch f und die Lichtgeschwindigkeit durch c dargestellt werden. Die Pfaddifferenz wird berechnet durch:

$$\Delta L = (L_{\text{S}} + L_{\text{THz}}) - L_{\text{D}}, \quad (3.3)$$

wobei sich diese aus der optischen Pfadlänge zur THz-Quelle L_{S} , optischen Pfadlänge zum THz-Empfänger L_{D} und der Pfadlänge der THz-Strahlung L_{THz} zusammensetzt. Die optische Pfadlänge wird also durch die geometrischen Eigenschaften des Aufbaus und der Länge der Lichtwellenleiter definiert [59]. Gegenüber den zuvor vorgestellten elektrischen Heterodynsystemen, erreicht dieses optische Heterodynsystem eine sehr große Bandbreite und hohe Dynamik bei einer vergleichbaren spektralen Auflösung von maximal 1 MHz [30]. Nachteilig ist jedoch die bedingt durch das thermische Tuning vergleichsweise lange Messzeit, die je nach eingestelltem Parameter mehrere Minuten betragen kann.

3.2 Design- und Messkonzept

3.2.1 Messkonzept

Die Idee eines referenzierbaren Sensors mit verschiedenen Abfragefeldern zu entwickeln, ergibt sich aus den Anforderungen des eingesetzten Messkonzeptes, wie in Abbildung 3.3 dargestellt. Grundsätzlich ist der Ablauf einer Messprozedur in vier Phasen zu unterteilen: (1) In der Systemeinrichtung wird die Position eines Biosensors im Messsystem bestimmt. Dazu wird aus dem Chipdesign die Position jedes Abfragefeldes $\#n$ durch eine Transformation des Koordinatensystems im Messsystem berechnet, eine genaue Beschreibung erfolgt in Abschnitt 3.2.3. (2) Jeder Biosensor wird initial vermessen, um eine Referenz für alle nachfolgenden Messungen zu generieren. Hier werden charakteristische Merkmale wie zum Beispiel die Resonanzfrequenz $f_{n,1}$ oder die Maximum- oder Minimum-Amplitude des DRF ermittelt. Dabei bleibt der Biosensor, bis auf eine Vorreinigung mit Isopropanol und Trocknen im Stickstoffstrom, unbehandelt.

(3) Nachfolgend wird der Sensor aus dem Messsystem ausgebaut und funktionalisiert. Die Art der Funktionalisierung wird zunächst nicht genauer definiert und kann zum Beispiel in Form von DNA-Hybridisierung oder einer Protein Adsorption erfolgen.

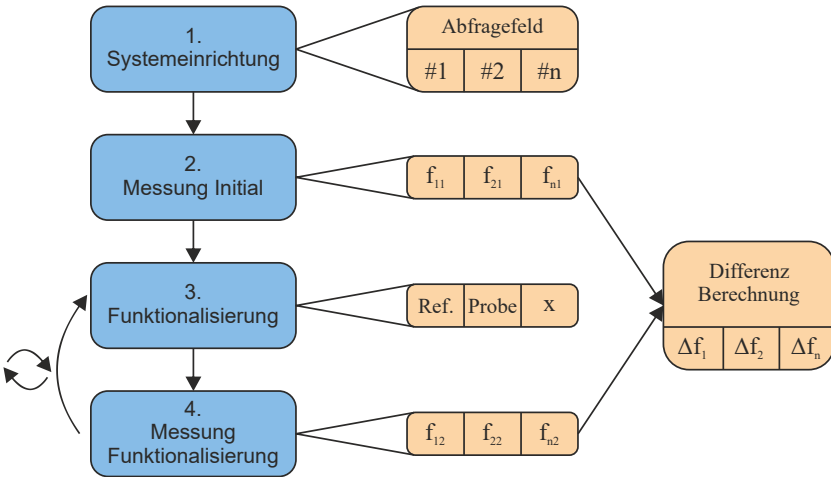


Abb. 3.3: Ablaufdiagramm des eingesetzten Messkonzeptes. Auf der linken Seite sind die jeweiligen Prozessschritte beschrieben, die bei der Durchführung durchlaufen werden. Auf der rechten Seite sind die zu jedem Prozessschritt zugehörigen Aktionen und Ergebnisse am Beispiel der Resonanzfrequenz des Biosensors dargestellt. Während die Systemeinrichtung (1) und initiale Messung (2) nur einmalig für jeden Biosensor ausgeführt wird, werden die Funktionalisierung (3) und die Messung der Funktionalisierung (4) je nach durchgeführtem Experiment mehrmals wiederholt.

Durch den Aufbau jedes Biosensors aus mehreren Abfragefeldern ist es möglich, viele verschiedene Funktionalisierungsschritte und zusätzliche Referenzmessungen aufzunehmen. Als Referenz können Abfragefelder dienen, auf denen kein Funktionalisierungsschritt erfolgt und welche nur mit DI-Wasser oder Puffer beladen werden². Die Referenzierung auf unbeladene Abfragefelder minimiert externe Einflussfaktoren durch beispielsweise unterschiedliche Luftfeuchte und an die Sensoroberfläche gebundenes Wasser. (4) Für den letzten Prozessschritt wird der Biosensor wieder in das Messsystem eingebaut, eine Messung durchgeführt und erneut die charakteristischen Merkmale des DRF ermittelt. Abschließend wird die Differenz berechnet, am Beispiel der Resonanzfrequenz wird diese mittels $\Delta f_1 = f_{n2} - f_{n1}$ gebildet. Die Berechnung dieser Differenz erfolgt für weitere Funktionalisierungsschritte immer auf den jeweils vorangegangenen Schritt.

Durch dieses Konzept wird eine gute Referenzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Er-

²Bei Biosensoren ohne mikrofluidische Funktionalität wird verbliebene Flüssigkeit vor der Messung durch Trocknen entfernt.

gebnisse erzielt, auch bei sehr kleinen Änderungen des Messsignals. Dabei spielt der Vergleich der relativen Änderung auf dem gleichen Abfragefeld eine zentrale Rolle, da jedes Abfragefeld durch Toleranzen und Abweichungen im Fertigungsprozess eine charakteristische Resonanzfrequenz besitzt. Diese Abweichungen werden durch den Vergleich der relativen Änderung kompensiert und bieten weiterhin erweiterte Funktionalität: (i) Wird auf mehreren Abfragefeldern der gleiche Funktionalisierungsschritt durchgeführt, können die Messergebnisse durch diese Messreihe validiert werden. (ii) Wird mehr als ein Funktionalisierungsschritt durchgeführt, können nachfolgende Prozessschritte auf $n - 1$ Abfragefeldern durchgeführt werden und somit steht immer ein Referenzfeld für die Prozessüberwachung zur Verfügung. Diese können wiederum immer mit unbelasteten Referenzfeldern verglichen werden, um prozessbedingte Abweichungen zu erkennen.

3.2.2 Chip- und Wafer-Layout

Innerhalb der Evolution dieser Arbeit und in den Vorarbeiten hat es verschiedenste Entwicklungsstufen der CSR und insbesondere der Biosensoren gegeben. In der Veröffentlichung in Kapitel 5 kommt ein aDSRR als Sensorelement mit einer Resonanzfrequenz von 0.28 THz auf einem Biosensor der 2. Generation zum Einsatz. In der Veröffentlichung in Kapitel 6 werden aDSRR mit Resonanzfrequenzen von 0.28 THz, 0.6 THz und 1 THz auf Biosensoren der 4. Generation verwendet. Biosensoren der 5. Generation basieren auf CASRR als Sensorelemente mit einer Resonanzfrequenz von 0.25 THz. Diese verfügen zusätzlich über eine mikrofluidische Funktionalität und eine Optimierung für die Messung in stark absorbierenden Flüssigkeiten wie Wasser. Das Design wird in Kapitel 8 erläutert. Für eine detaillierte Beschreibung der Funktion und des Designs von CSR wird an dieser Stelle auf die jeweilig entsprechende Veröffentlichung in den nachfolgenden Kapiteln 5, 6 und 8 und auf weiterführende Literatur verwiesen [57, 60]. Für das Design der verwendeten CSR in der Layout-Software CleWin4 wird der MATLAB-Code aus Anhang A.3 verwendet.

Exemplarisch werden relevante Designaspekte anhand von Biosensoren der 4. Generation beschrieben, welche in Abbildung 3.5 für Resonanzfrequenzen von 0.3 THz, 0.6 THz und 1 THz dargestellt sind. Das Layout eines aDSRR-Einzelements mit allen relevanten Designparametern ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Diese sind definiert durch den Ring-Radius r , die Schlitz-Breite w , den Offset-Winkel φ_O und den Winkel zwischen den beiden Schlitz-Ringen φ_G . Die Polarisationsrichtung wird durch die vektorielle elektrische Feldstärke \vec{E} in der Ebene der Sensoroberfläche angezeigt.

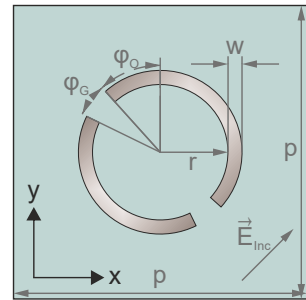


Abb. 3.4: Schematische Darstellung des Layouts eines aDSRR.

Der Abstand der Einzelemente innerhalb eines Arrays wird durch die Größe p der Einheitszelle im Simulationsmodell definiert. Diese ist im Simulationsmodell quadratisch, jedoch sind die aDSRR 45° im Uhrzeigersinn rotiert angeordnet, was zu einem Versatz innerhalb eines Arrays führt. Dieser Versatz führt zu einem größeren Abstand der Elemente und somit zu einer Abschwächung der Kopplung der aDSRR untereinander. Simulationsergebnisse haben gezeigt, dass bei dieser Anordnung bei der Beladung mit einem Dielektrikum größere Verschiebungen der Resonanzfrequenz zu erwarten sind [57].

Die Array- und Feldgröße wird primär durch zwei Bedingungen definiert: (i) Die verwendete Messfrequenz und Quasioptik des THz-Strahlengangs bestimmen den minimalen Strahldurchmesser. (ii) Das Probenvolumen ist durch die manuelle Aufbringungsmethode begrenzt. Für das in Abschnitt 2.1.2 vorgestellte Messsystem wurde entsprechend der Beschreibung in Anhang B der Strahldurchmesser analytisch und experimentell bestimmt. Als Ergebnis dieser Untersuchungen wurden Grenzwerte definiert, die die aktive Arrayfläche mindestens auf den Bereich $\pm 2\sigma$ und die Feldgröße auf $\pm 3\sigma$ begrenzen. Durch diese Definition ist sichergestellt, dass sich benachbarte Felder nicht beeinflussen und somit die Messergebnisse verfälscht werden können. Weiterhin wird nur bei maximaler Ausnutzung der Strahlungsintensität ein Resonanzfeature mit optimalem Gütefaktor durch die aDSRR erzeugt. Bei früheren Chipdesigns wurde diese Vorgabe nicht konsequent berücksichtigt, was dazu führen konnte, dass sich einzelne Messfelder im äußeren Bereich des Strahlengangs überlappen und die Maximum-zu-Maximum Transmissionsamplitude (engl. peak to peak transmission difference, PPTD) verringert wird. Eine Zusammenfassung der empfohlenen Array- und Feldgrößen für 0.25 THz, 0.6 THz und 1 THz ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Für das Design der Feldgröße sollte beachtet werden, dass es sich bei allen Funktionalisierungsschritten um manuelle Prozesse handelt und somit ein Limit für die Größe der Abfragefelder darstellen.

Frequenz [THz]	Arraygröße [mm]	Feldgröße [mm]
0.25	$\pm 2\sigma = 2.91$	$\pm 3\sigma = 4.38$
0.6	$\pm 2\sigma = 2.14$	$\pm 3\sigma = 3.21$
1	$\pm 2\sigma = 1.53$	$\pm 3\sigma = 2.28$

Tab. 3.1: Definierte Array- und Feldgrößen für 0.25 THz, 0.6 THz und 1 THz auf Basis des gemessenen THz-Strahldurchmessers in x-Richtung.

Die Anordnung der Abfragefelder erfolgt symmetrisch vom Zentrum des Biosensors ausgehend. Abbildung 3.5 zeigt Biosensoren mit einer Resonanzfrequenz von 0.28 THz mit 16 Abfragefeldern und Biosensoren mit einer Resonanzfrequenz von 0.6 THz und 1 THz mit jeweils 25 Abfragefeldern. Jeweils auf dem oberen rechten Abfragefeld auf jedem Biosensor sind die CSRR um 90° gedreht platziert, um ein zusätzliches Abfragefeld als Referenz bereitzustellen. Auf diesem Abfragefeld wird durch die Änderung

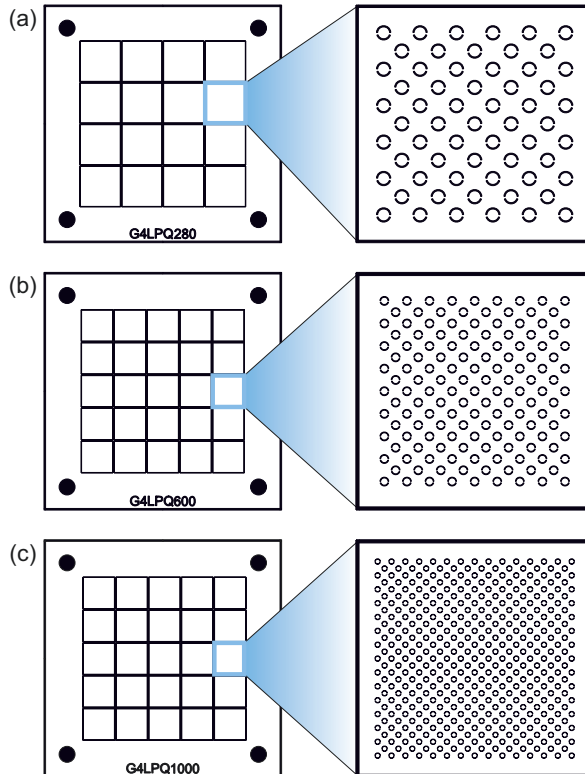


Abb. 3.5: Biosensoren der 4. Generation mit einer Resonanzfrequenz von (a) 0.28 THz, (b) 0.6 THz und (c) 1 THz. Vergrößert dargestellt werden jeweils ein Abfragefeld für 0.28 THz mit einem Array mit 61, für 0.6 THz mit 145 und für 1 THz mit 421 Sensorelementen. In dieser Negativdarstellung werden alle weißen Bereiche metallisiert und nur der Bereich mit Strukturen in schwarz wird photolithografisch strukturiert.

der Polarisationsrichtung keine Resonanz der CSRR angeregt, sodass es nur zu einer Abschwächung der Transmission durch das Verhältnis von Schlitzöffnung zu geschlossener Metalloberfläche kommt. Außerhalb jedes Abfragefeldes befindet sich ein 40 μm breiter Graben, welcher in den Funktionalisierungsschritten als Barriere für die Benetzung der Oberfläche mit einem Tropfen dient. 7 μm breite Brücken zwischen den Feldern stellen eine elektrisch leitfähige Verbindung aller Elemente untereinander sicher, damit im Produktionsprozess der Biosensoren elektrostatische Aufladungen und Potentialdifferenzen minimiert werden. Weiterhin befinden sich auf jedem Biosensor vier Referenzpunkte mit einem Durchmesser von 1.5 mm, die in der Systemeinrichtung für die Positionsbestimmung verwendet werden. Die äußeren Abmaße der Biosensoren betragen etwa 22 mm \times 22 mm. Zwischen einzelnen Biosensoren ist es erforderlich einen Freiraum mit einer Breite von mindestens 200 μm einzuhalten, damit ausreichend Platz für die Vereinzelung der Biosensoren mittels Laser-Cutter zur Verfügung steht.

3.2.3 Systemeinrichtung

Die Systemeinrichtung bildet den Einrichtungs- und Positionierungsprozess der Biosensoren im Messsystem ab. Dazu werden die Mittelpunkte der auf jedem Biosensor vorhandenen vier Referenzpunkte bestimmt, um daraus die Positionen der Abfragefelder zu berechnen. Dieser Ablauf ist zusammen mit den Messergebnissen schematisch in Diagramm 3.6 dargestellt. Die Beschreibung dieses Ablaufs erfolgt exemplarisch am Beispiel des in Abschnitt 3.1.2 vorgestellten optischen Heterodynsystems. Für das elektronische Heterodynsystem aus Abschnitt 3.1.1 können einige der beschriebenen Schritte Prinzipbedingt nicht durchgeführt werden, grundsätzlich bleibt das Verfahren jedoch sehr ähnlich und wird daher nicht separat ausgeführt.

Nachdem ein Biosensor in das Messsystem eingebaut wurde, wird in Schritt (1) das Zentrum des ersten Referenzpunktes mit einem Lineartisch manuell angefahren. In Schritt (2) wird nun ein Sweep der Frequenz zwischen 850 GHz und 852 GHz mit einer Auflösung von 10 MHz durchgeführt. Diese Messdaten werden im Folgenden nicht weiter verarbeitet, sondern dienen ausschließlich dazu, die Frequenz mit der maximalen Signalamplitude zu bestimmen, die im dargestellten Beispiel bei 850.9 GHz liegt. Um Mehrdeutigkeiten zu vermeiden, beschränkt sich der Frequenzbereich auf etwa eine Periode und wurde so gewählt, dass die Wellenlänge des THz-Signals ($\lambda = 352 \mu\text{m}$ bei 850.9 GHz) deutlich kleiner ist, als die Größe des Referenzpunktes ($\phi = 1.5 \text{ mm}$), um Abbildungsfehler z.B. durch Interferenz zu minimieren.

Die in Schritt (2) ermittelte Frequenz wird in Schritt (3) für die Ermittlung der maximalen Signalamplitude in z-Richtung verwendet. Bei dieser Messung wird der Biosensor an der Position des Referenzpunktes in z-Richtung (entspricht der Propagationsrichtung der THz-Welle) linear verschoben. Bedingt durch das Glassubstrat mit einer Dicke $d = 500 \mu\text{m}$ und einem Brechungsindex $n = 1.96$ ergibt sich eine nicht zu vernachlässigende Signalreflexion an den Grenzflächen. Nach Gleichung 3.2 wird der Photostrom des cw-Systems durch einen kosinusförmigen Verlauf mit einer

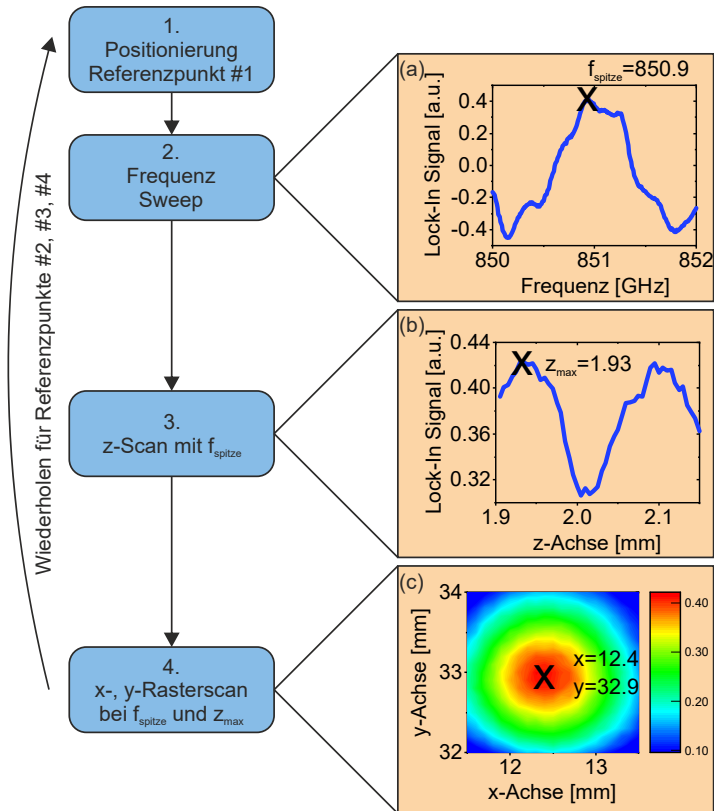


Abb. 3.6: Ablaufdiagramm der Systemeinrichtung. Auf der linken Seite sind die jeweiligen Prozessschritte beschrieben, die bei der Einrichtung durchlaufen werden. Auf der rechten Seite sind die zu jedem Prozessschritt zugeordneten Messergebnisse dargestellt. (a) Zeigt das Lock-in Signal für die Bestimmung der Messfrequenz mit maximaler Signalamplitude. In (b) wird die Signalamplitude als Funktion der Achsenbewegung in z-Richtung dargestellt und in (c) für einen x-, y- Rasterscan eines Referenzpunktes. Nachdem die vier Einrichtungsschritte durchlaufen wurden, ist die Position im Raum eines Referenzpunktes bestimmt und muss anschließend für die drei verbliebenen Referenzpunkte in gleicher Reihenfolge durchgeführt werden.

Phasendifferenz beschrieben, welche durch die optische Pfadlänge nach Gleichung 3.3 definiert wird. Wird eine Probe mit Brechungsindex n und der Dicke d in diesen Pfad eingebracht, ändert sich die optische Pfadlänge und damit das Interferenzmuster [59]. Wird die Probe in z -Richtung verschoben, ändert sich die optische Pfadlänge nicht, jedoch die Position, an der die Phase in die Probe eintritt. Durch konstruktive und destruktive Überlagerung von Mehrfachreflexionen ergibt sich ein sinusförmiger Verlauf wie in Abbildung 3.6(b) dargestellt. Die Periodizität dieser Überlagerung ist ausschließlich von der verwendeten Messfrequenz abhängig und liegt in diesem Beispiel bei 0.164 mm. Bei der Messfrequenz von 850.9 GHz ($\lambda = 352 \mu\text{m}$) entspricht dieser Wert in etwa $\lambda/2$. Das Maximum der Amplitude wird in diesem Beispiel bei $z = 1.93 \text{ mm}$ bestimmt und für den x -, y -Rasterscan verwendet. Da der Biosensor nicht exakt senkrecht zum optischen Pfad ausgerichtet werden kann, ergibt sich für jeden Referenzpunkt eine neue Position der maximalen Signalamplitude in z -Richtung.

In Schritt (4) wird ein Rasterscan des Referenzpunktes durchgeführt mit dem Ziel, dessen Position bzw. Mittelpunkt zu bestimmen. Dazu werden die Messfrequenz und die z -Position mit maximaler Signalamplitude verwendet, die in Schritt (2) und (3) ermittelt wurden. Das Ergebnis dieser Messung ist ein Gauss-förmiges Strahlprofil, welches in Abbildung 3.6(c) dargestellt ist. Diese Messdaten werden mit einer 2D-Gauss-Funktion gefittet, um daraus die Parameter für die x -, y -Position des Zentrums des Referenzpunktes zu ermitteln. Im dargestellten Beispiel liegt die x -Position bei 12.4 mm und die y -Position bei 32.9 mm.

Der beschriebene Ablauf wird im Folgenden für alle vier Referenzpunkte durchgeführt, damit eine ausreichend große Menge Datenpunkte für die Transformation des Koordinatensystems zur Verfügung steht³. Für die Koordinatensystem-Transformation wird folgende Berechnung angewendet [61]:

$$\begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A & B \\ C & D \end{pmatrix}^{-1} \cdot \left[\begin{pmatrix} x' \\ y' \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} E \\ F \end{pmatrix} \right]. \quad (3.4)$$

Diese Gleichung stellt die Matrizen Schreibweise einer allgemeinen Koordinatentransformation dar. In dieser allgemeinen Form werden verschiedene Spezialfälle der Transformationen wie beispielsweise Translation, Rotation oder Skalierung zusammengefasst und können so gleichzeitig abgebildet werden. In der dargestellten Form können mit dieser Gleichung direkt die Positionen der Lineartische x , y berechnet werden, mit x' , y' als Positionen der Referenzpunkte im Biosensor Layout. Mit den Eingabeparametern der Positionen der Abfragefelder aus dem Biosensor Layout, kann die Position jedes Abfragefeldes im Raum berechnet werden.

³Für eine Transformation des Koordinatensystems im zweidimensionalen Raum sind bei sechs unbekanntem Matricelementen die Positionen von drei Referenzpunkten für die Bestimmung ausreichend. Dies ist jedoch nur für eine Transformation in der x -, y -Ebene gültig, da für eine Transformation im dreidimensionalen Raum zusätzlich die Informationen der z -Positionen notwendig sind.

3.2.4 Reproduzierbarkeit Referenzpunktmessung

Um die entwickelte Methodik der Systemeinrichtung auf die Reproduzierbarkeit hin zu untersuchen, wurden Wiederholungsmessungen an Referenzpunkten durchgeführt und ausgewertet. Dazu wurde ein Referenzpunkt 100-mal in Folge in den Schrittweiten 50, 100 und 150 μm im x-, y-Rasterscan vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7(a) in x-Richtung und in 3.7(b) in y-Richtung dargestellt.

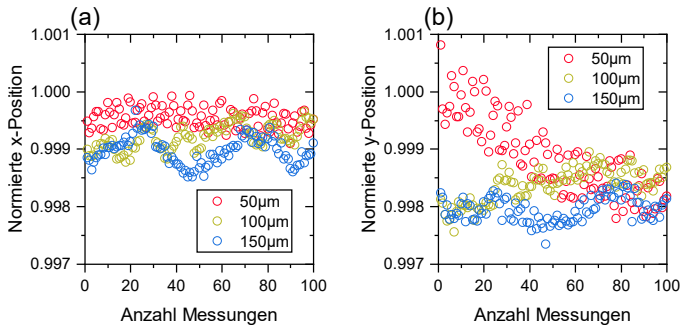


Abb. 3.7: Vergleich der Reproduzierbarkeit der Referenzpunktmessung für unterschiedliche Schrittweiten, jeweils in (a) x-Richtung und (b) y-Richtung. Die normierte Position des Zentrums des Referenzpunktes ist dabei für jeweils 100 Messungen aufgetragen.

In dieser Abbildung ist die berechnete normierte Mittelpunktposition des Referenzpunktes über die Anzahl der Messungen aufgetragen. Eine generelle Schlussfolgerung aus den Ergebnissen dieser Messungen ist, dass ein Rasterscan mit hoher räumlicher Auflösung nur bedingt einen positiven Effekt auf eine genauere Bestimmung der Position des Referenzpunktes hat. So kann eine niedrige Schrittweite sogar kontraproduktiv sein, wie das Beispiel bei einer Schrittweite von 50 μm in y-Richtung zeigt. Bedingt durch die lange Dauer der Messung kommt es zu einem Drift des Signals und zu einer erhöhten Standardabweichung in y-Richtung. Die Ergebnisse der Standardabweichung für verschiedene Schrittweiten sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Die Standardabweichung in Abhängigkeit der Schrittweite verbessert sich für die x-Richtung von 7.4 μm auf 5.6 μm , jedoch vergrößert sich diese in y-Richtung von 7.1 μm auf 22.7 μm . Die Ursache für dieses Verhalten konnte nicht abschließend geklärt werden, eine mögliche Ursache stellt eine Abweichung im mechanischen Aufbau dar. Die ermittelte Reproduzierbarkeit bildet bereits in etwa das Maximum des Erreichbaren ab, welches durch die Genauigkeit der verwendeten Lineartische erreicht werden kann. In dem in Kapitel 6 verwendeten Messsystem werden die Lineartische LS-65 der Firma PI miCos eingesetzt, welche einen bidirektionalen Wiederholfehler von $\pm 5 \mu\text{m}$

Schrittweite in [μm]	Standardabweichung x-Richtung [μm]	Standardabweichung y-Richtung [μm]
50	5.6	22.7
100	6.7	9.7
150	7.4	7.1

Tab. 3.2: Vergleich der Reproduzierbarkeit der Referenzpunktmessung für verschiedene Schrittweiten.

und eine Genauigkeit von $10\ \mu\text{m}$ besitzen. Es ist daher empfehlenswert eine Schrittweite von $150\ \mu\text{m}$ für den x-, y-Raster-Scan des Referenzpunkts zu verwenden, da die erreichte Messgenauigkeit im Bereich der Genauigkeit der eingesetzten Lineartische liegt und eine Erhöhung der Auflösung primär zu zeitlichem Mehraufwand führt.

3.2.5 Reproduzierbarkeit Sensorpositionierung

Neben der Reproduzierbarkeit der Referenzpunktmessung ist die Wiederholpräzision der manuellen Platzierung der Biosensoren auf dem Probenhalter von hoher Bedeutung. Bedingt durch das eingesetzte Messkonzept (vgl. Abschnitt 3.2.1) werden auf jedem Biosensor verschiedene Funktionalisierungsschritte durchgeführt, welche immer mit einer neuen Positionierung des Biosensors im Messsystem verbunden ist⁴. Als geeigneter Probenhalter für die entwickelten Biosensoren hat sich in dieser Arbeit ein drei-Punkt Vakuum Probenhalter mit horizontaler Ebene erwiesen. Diese Anordnung bildet eine quasi kinetische Montierung [62, 63] und ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Dieser Probenhalter wird über eine magnetische kinetische Montierung im Messsystem befestigt und ist so universell einsetzbar.

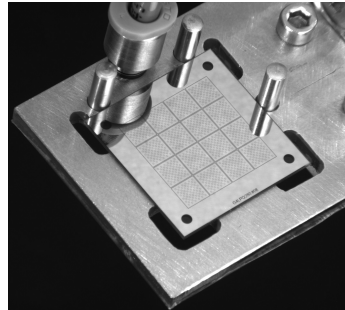


Abb. 3.8: Vakuum-Probenhalter mit montiertem Biosensor der 4. Generation.

Für die Evaluation der Reproduzierbarkeit der Sensorpositionierung wird ein optisches Detektionsverfahren eingesetzt, um die Einflussfaktoren durch das THz-System

⁴Die Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Sensorpositionierung wurde nicht im Rahmen dieser Arbeit abgebildet. Daher wurde dazu auf die Entwicklung und Auswertung von T.A. Pham Tran und E. P. de Santana zurückgegriffen [58].

zunächst ausschließen und separieren zu können. Die Wiederholbarkeit der Bestimmung des Referenzpunktes liegt bei diesem System bei $0.13\ \mu\text{m}$ und ist damit deutlich präziser als die Bestimmung durch das THz-System. Die Wiederholbarkeit wurde durch 25 wiederholende Positionierungen von einem Biosensor auf dem Probenhalter bestimmt. Die Auswertung ergibt eine Standardabweichung von $4.1\ \mu\text{m}$, welche kleiner ist als die Standardabweichung der Referenzpunktmessung. Daher muss nach einmaliger Einrichtung des Messsystems, wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben wurde, keine erneute Bestimmung der Referenzpunkte durchgeführt werden.

3.3 Datenanalyse und Messdatenverarbeitung

In diesem Abschnitt werden grundlegende Analysen zur Verarbeitung der experimentellen Messdaten kurz zusammenfassend beschrieben. Diese Beschreibung kann nur für die Messdaten angewendet werden, die mithilfe des cw-Systems von Toptica generiert wurden. Anwendung findet diese Analyse für die Auswertung und Verarbeitung der Messergebnisse aus Kapitel 6. Die Beschreibung der Datenanalyse der Messergebnisse aus Kapitel 5 ist ähnlich und wird in weiterführender Literatur ausführlich beschrieben [31].

Der Ablauf der Messdatenverarbeitung ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Es kann zwischen den 4 Schritten der (1) Messdatenaufzeichnung, (2) Zeitbereichstransformation, (3) Normalisieren der Messdaten und (4) der Parameteranalyse unterschieden werden. Die Verarbeitung der gewonnenen Daten wird im Folgenden beschrieben.

(1) Das elektrische THz-Feld ist direkt proportional zu der im THz-Detektor gemessenen Amplitude des Photostroms: $I_{\text{Ph}} \propto E_{\text{THz}}$. Das Signal liegt in Kosinus-Form vor und beinhaltet daher nur einen Realteil [59]. Für die nachfolgende Messdatenverarbeitung ist jedoch ein komplexwertiges Signal zwingende Voraussetzung. Daher wird das Signal Hilbert-transformiert \mathcal{H} , um ein analytisches Signal zu generieren:

$$\tilde{I}_{\text{Ph}} = I_{\text{Ph}} + j\mathcal{H}\{I_{\text{Ph}}\} \quad (3.5)$$

Das analytische Signal \tilde{I}_{Ph} setzt sich zusammen aus dem Originalsignal I_{Ph} als Realteil und der Hilbert-Transformierten desselben Signals als Imaginärteil. Der Betrag des analytischen Signals entspricht der Einhüllenden des Originalsignals. Bei dieser Berechnung ist darauf zu achten, dass die Messdaten vor der Hilbert-Transformation zunächst interpoliert werden, damit einheitliche Daten vorliegen. Dies ist insbesondere bei dem in dieser Arbeit verwendeten Messsystem von großer Bedeutung, da das Signal thermisch verstimmt wird und so einer bestimmten Trägheit unterliegt. Weiterhin müssen während der Berechnung Phasenmehrdeutigkeiten („*Phase-Unwrapping*“) aufgelöst werden, was im Bereich mit niedrigem Signal-Rausch-Verhältnis (engl. signal-to-noise ratio, SNR) schwierig ist und bisher nicht gelöst werden kann [64].

(2) Auf das berechnete analytische Signal wird eine inverse schnelle Fourier-Transformation (engl. inverse fast Fourier transform, IFFT) angewendet, um das Signal aus

dem Frequenzbereich in den Zeitbereich zu transformieren. Im eingesetzten Messsystem liegen beispielsweise durch Spiegel verschiedene Grenzflächen vor, welche zu Oszillationen im Messsignal führen und die Analyse des DRF erschweren. Da diese Störsignale jedoch typischerweise höhere Frequenzen als die des Messsignals aufweisen, können diese in einer Zeitbereichsanalyse durch geeignete Filter entfernt werden. Eine geeignete Methode stellt der Entwurf von Filtern mit endlicher Impulsantwort (engl. finite impulse response, FIR) mittels Fenstermethoden für zeitdiskrete Systeme dar, wobei vor allem ein linearer Phasenverlauf dieser Filter von Vorteil ist. In der einfachsten Ausführung kann ein solcher Filter durch die Multiplikation der gewünschten Impulsantwort mit einer Fensterfunktion $w(x)$ umgesetzt werden. Wird diese Fensterfunktion als Rechteckfenster ausgeführt, kommt es jedoch zu signifikanten Über- und Unterschwingungen an den Unstetigkeitsstellen, welche als Gibbssches Phänomen bekannt sind [65]. Durch die Wahl einer geeigneten Filterfunktion, welche das Fenster zur 0 hin auslaufen lässt, kann dieses Verhalten minimiert werden. In dieser Arbeit wurde dazu der „Tukey window“-Filter verwendet, welcher auch als „Tapered Cosine“-Filter bezeichnet wird. Eine mögliche Umsetzung dieses Filters ist wie folgt definiert [66]:

$$w(x) = \begin{cases} \frac{1}{2}\{1 - \cos(2\pi x/s)\}, & 0 \leq x < s/2, \\ 1, & s/2 \leq x < 1 - s/2, \\ \frac{1}{2}\{1 - \cos(2\pi(1-x)/s)\}, & 1 - s/2 \leq x \leq 1. \end{cases}$$

Hier beschreibt s den Anteil des Signales, welcher zu 0 hin ausläuft. Typischerweise liegt dieser Wert in einem Bereich zwischen 10 % und 20 %. Nach der Anwendung des Filters wird das Signal mittels schneller Fourier-Transformation (engl. fast Fourier transform, FFT) zurück in den Frequenzbereich transformiert und der Betrag des komplexen Signals berechnet. Weiterführende Literatur zeigt am Beispiel der Bestimmung der charakteristischen Eigenschaften von nicht-polaren Flüssigkeiten, dass dieses Vorgehen der Datenverarbeitung auch für die Bestimmung von Materialeigenschaften geeignet ist [67].

(3) Für die Normierung wird zusätzlich zur Probenmessung eine Referenzmessung durchgeführt, wobei es sich hier typischerweise um eine Messung ohne Probe handelt und durch das Umgebungsmedium gemessen wird. Die aus diesen beiden Messungen bestimmten Amplituden der Transmission a_{Probe} und $a_{\text{Ref.}}$ werden genutzt, um den Transmissionsfaktor T zu berechnen:

$$T = \frac{a_{\text{Probe}}}{a_{\text{Ref.}}} \quad (3.6)$$

Der Transmissionsfaktor T gibt also das Verhältnis der transmittierten Amplitude zu jener der einfallenden Welle an und besitzt einen Wertebereich zwischen 0 und 1. Häufig wird dieser auch in logarithmischer Form dargestellt:

$$T_{\text{dB}} = 20 \cdot \log_{10} \left(\frac{a_{\text{Probe}}}{a_{\text{Ref.}}} \right) \quad (3.7)$$

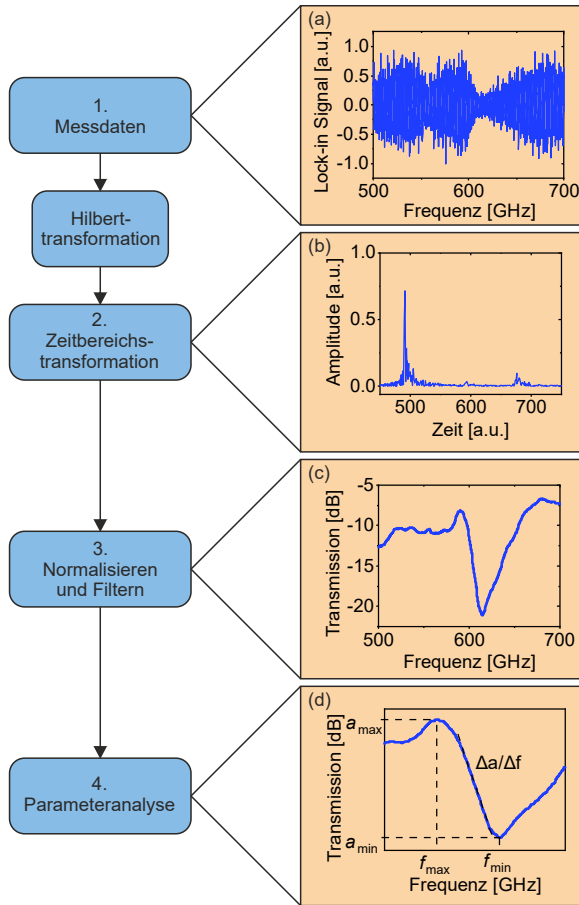


Abb. 3.9: Ablaufdiagramm der Messdatenverarbeitung. (a) Aufgenommenen Messdaten nach der Vorverstärkung und Transimpedanzwandlung. Diese Daten werden zunächst mittels IFFT in den Zeitbereich transformiert und gefiltert (b). In (c) ist bei etwa 600 GHz das DRF im normalisierten und gefilterten Transmissionsspektrum dargestellt. Aus dieser Darstellung werden die charakteristischen Merkmale des DRF bestimmt (d).

Bedingt durch die Normierung beträgt das erreichbare Maximum einen Wert von 0 dB. Eine vorteilhafte Option kann an dieser Stelle eine Normierung auf ein um 90° rotiertes Abfragefeld darstellen, welches in Biosensoren der 4. Generation realisiert wurde. Da durch die Polarisationsabhängigkeit der CSRR in diesem Fall keine Resonanzfrequenz angeregt wird, werden alle Materialeigenschaften des Biosensors für die Normierung berücksichtigt und ermöglicht dadurch eine ungestörte Abbildung des DRF. Nachteilig ist jedoch die signifikante Reduktion der Signalamplitude, weshalb dieses Verfahren letztendlich nicht eingesetzt wurde. Nach der Normierung wird ein gleitender Mittelwert auf das Ergebnis angewendet, um fehlerhafte Auswertungen vor allem bei kleinen Amplitudenänderungen zu vermeiden und um die Standardabweichung zu verringern. Hier gilt wieder zu beachten, dass sich die Frequenzauflösung durch die Anwendung des Filters reduziert.

(4) In der Parameteranalyse wird das Transmissionsspektrum auf den relevanten Bereich des DRF begrenzt und es werden die charakteristischen Eigenschaften bestimmt. Basierend auf diesen Eigenschaften werden in den Veröffentlichungen die Wirkung unterschiedlicher Proben und Analyten untersucht. Zu den wichtigsten Eigenschaften gehören: (i) Die Amplitude a_{\max} und die Frequenzposition f_{\max} an der Maximumposition des DRF. (ii) Die Amplitude a_{\min} und die Frequenzposition f_{\min} an der Minimumposition des DRF. (iii) Die Frequenzposition der maximalen Steigung, welche durch den Differenzenquotient $\Delta a/\Delta f$ ausgewertet werden kann. (iv) Einen Schnittpunkt an der Steigung des DRF, welche bei 0.5 im linearen Spektrum liegt. Eine detaillierte Analyse der unterschiedlichen charakteristischen Eigenschaften hat ergeben, dass die am meisten geeignete Methode an einem Schnittpunkt der Steigung liegt. Diese Analyse wird in der Veröffentlichung in Kapitel 6 beschrieben und durch zusätzliche Messergebnisse in Anhang E ergänzt. So könnten vertiefende Informationen über die Probe gewonnen werden, für eine systematische Auswertung ist jedoch die Analyse mithilfe einer Fit-Funktion notwendig. Dazu können analytische Ansätze auf Basis von gekoppelten photonischen Resonatoren [68] oder Modellen mithilfe von Ersatzschaltbildern abgebildet werden, in denen ein elektrischer Schwingkreis die Resonatorstruktur abbildet [69, 70].

Kapitel 4

Herstellung und Charakterisierung

Die Herstellung und die technologische Charakterisierung der entwickelten Biosensoren wird in diesem Kapitel beschrieben. Die in dieser Arbeit verwendeten Biosensoren wurden von Beginn an als biosensorischer Plattform-Ansatz entwickelt, daher werden für die Herstellung technologische Standardverfahren eingesetzt. Jedoch weist das Design einige spezifische Merkmale auf, die bei der Fabrikation berücksichtigt werden müssen. Zur Sicherstellung der korrekten Funktion der Biosensoren und zur Überprüfung der Umsetzung der Design Geometrie werden verschiedene Standardverfahren zur technologischen Charakterisierung eingesetzt.

4.1 Herstellung von THz-Biosensoren

Die Herstellung der THz-Biosensoren wurde durch die Firma Micronit GmbH (Dortmund) in einem proprietären Prozess durchgeführt. Aus diesem Grund können an dieser Stelle keine Prozessparameter angegeben werden, daher wird ein typischer Produktionsprozess auf Basis der Herstellerspezifikation beschrieben. Gefertigt werden die Biosensoren auf einem Quarzglas-Wafer (Siegert Wafer GmbH, Aachen) mit 150 mm Durchmesser (6"-Wafer), 500 μm Dicke und in der Oberflächenqualität beidseitig poliert. Das Maskendesign wurde mit der Software CleWin, das Design der CSRR aus dem in Anhang A.3 angegebenen Code erzeugt und auf einer 7"-Maske realisiert. Die Biosensoren haben ein äußeres Abmaß von etwa 22 mm \times 22 mm, sodass auf einem Wafer 24 Biosensoren gefertigt werden können. Die zur Herstellung der THz-Biosensoren typischen Prozessschritte sind in Abbildung 4.1 schematisch (nicht maßstabgetreu) als Schnittbild dargestellt.

(a) Im ersten Schritt werden Metallschichten aus Chrom und Gold auf das Glassubstrat beschichtet. Für die Beschichtung können Standardprozesse wie Verdampfen oder Sputtern zur Anwendung kommen. Zunächst wird eine 20 nm dicke Chromschicht auf dem Wafer beschichtet, die als Haftvermittler zur darüber liegenden Goldschicht dient. Diese 200 nm dicke Goldschicht stellt die funktionale Schicht für die CSRR dar, welche in der Anwendung mit Biomolekülen funktionalisiert wird. Daher ist die Oberflächenqualität für die Funktionalisierung und die Leitfähigkeit für den Qualitätsfaktor (Q -Faktor) der CSRR von zentraler Bedeutung. Abschließend wird eine 10 nm dicke Chromschicht als Oberflächenpassivierung aufgebracht. Dadurch wird

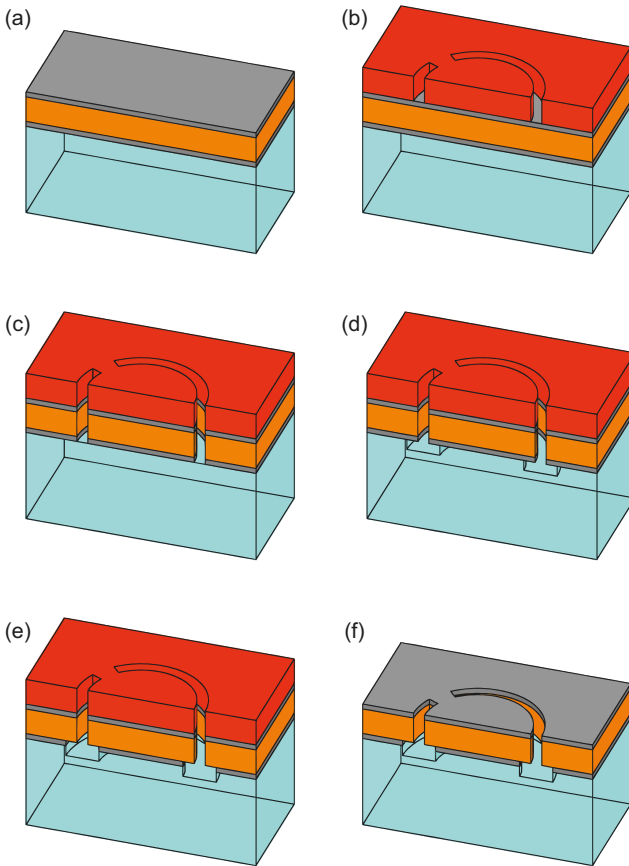


Abb. 4.1: Typische Prozessschritte zur Herstellung der CSRR-basierten Biosensoren (nicht maßstabsgetreu). (a) Metallisierung der Chrom-Gold-Chromschichten. (b) Lithografische Strukturierung des beschichteten Photolacks (rot). (c) Die drei Metallschichten werden durch nasschemisches Ätzen strukturiert. (d) In das Glassubstrat wird ein $3\mu\text{m}$ tiefer Graben geätzt. (e) In einen zusätzlichen Schritt wird Chrom entfernt, um die Goldschicht freizulegen. (f) Im letzten Schritt wird der Photolack entfernt.

eine selektive Funktionalisierung sichergestellt, die biomolekulare Bindungen nur dort ermöglicht, wo die Empfindlichkeit der Biosensoren besonders groß ist.

(b) Im zweiten Schritt wird ein Photolack mittels Rotationsbeschichtung aufgebracht und lithografisch strukturiert. Mit dem eingesetzten Verfahren sind kleinste Strukturgrößen bis $1\ \mu\text{m}$ möglich, wobei die Schlitzweite der CSRR nicht unter $3\ \mu\text{m}$ betragen sollte.

(c) Im dritten Schritt werden die drei Metallschichten mit dem gleichen Photolack nacheinander nasschemisch geätzt. Als Ergebnis werden bereits in diesem Prozessschritt die CSRR erzeugt, alle weiteren Prozessschritte dienen nur noch zur Freilegung der Goldoberfläche.

(d) In Schritt vier wird das Glassubstrat nasschemisch mit Flußsäure (HF) geätzt. Durch dieses isotrope Ätzen wird ein $3\ \mu\text{m}$ tiefer Graben im Substrat mit einer freitragenden Metallstruktur erzeugt. Diese hat zwei Funktionen: (i) Durch den im Vergleich zu Luft höheren Brechungsindex des Glassubstrates ($n = 1.96$ [71]), ist die elektrische Feldkonzentration im Graben größer als auf der Oberfläche und erhöht so die Empfindlichkeit des Biosensors [33]. (ii) Die partielle Freilegung der Goldoberfläche erlaubt eine selektive Funktionalisierung, welche ebenfalls die Empfindlichkeit erhöht.

(e) In Schritt fünf wird die Chromschicht auf der Unterseite der freitragenden Metallstruktur nasschemisch geätzt und so die Goldoberfläche partiell freigelegt. Dieser Schritt ist essentiell für die Anwendung als Biosensor und muss zeitlich streng kontrolliert werden, da es bei zu langem Ätzen zu Unterwanderungen und bei zu kurzem Ätzen zur nicht vollständigen Entfernung der Chromschicht kommen kann.

(f) Im sechsten Schritt wird der Photolack entfernt und der Wafer von Prozessrückständen gereinigt. Dabei darf keine Ultraschallreinigung eingesetzt werden, da die freitragende Metallstruktur empfindlich auf mechanische Einflüsse reagiert und zerstört wird. Abschließend werden die Biosensoren mittels Laserschneiden vereinzelt. Dieser Schritt ist eine wichtige Verbesserung im Vergleich zur Vereinzeln mithilfe einer Wafersäge, die bei vorherigen Biosensoren eingesetzt wurde. Das dazu eingesetzte Kühlwasser konnte zu erheblichen Deformierungen oder zur Zerstörung der freitragenden Strukturen führen, da auch eine Platzierung oder ein Ablegen der Sensoren auf der strukturierten Seite unbedingt vermieden werden sollte. Für das Versenden werden die Wafer mit einer Prozessfolie in eine Waferbox geklebt, da Membranboxen beide Seiten der Sensoren berühren und daher nicht geeignet sind.

4.2 Charakterisierung von THz-Biosensoren

4.2.1 Geometrische Dimensionen

Die optische Inspektion mittels eines Lichtmikroskops in Hell- oder Dunkelfeld-Aufnahmemodus ist ein Standardinstrument für alle optischen Untersuchungen. Bei der Hellfeld Mikroskopie wird üblicherweise eine Auflicht- oder Durchlicht-Beleuchtung eingesetzt. Die Dunkelfeld Mikroskopie beruht auf dem Prinzip, dass das Licht der

Beleuchtung an kleinen Teilchen gestreut und abgelenkt wird. Wird nun das direkt einfallende Licht der Beleuchtung mit einer Zentralblende ausgeblendet, bleibt nur das abgelenkte Licht sichtbar. Dabei werden Defekte und Partikel wie in Abbildung 4.2(d) auf der Metalloberfläche und eine Veränderung der freitragenden Metallstruktur besonders hell dargestellt und lassen sich auf diese Weise sehr gut von intakten Strukturen unterscheiden. Da die Strukturen der THz-Biosensoren eine Größe von einige Mikrometern nicht unterschreiten, können häufig eingesetzte Optiken mit einer 5- bis 100-fachen Vergrößerung verwendet werden. Diese lassen Rückschlüsse auf die Homogenität der Herstellung und die Erkennung einiger Defekte zu, dazu sind verschiedene Beispiele in Abbildung 4.2 dargestellt.

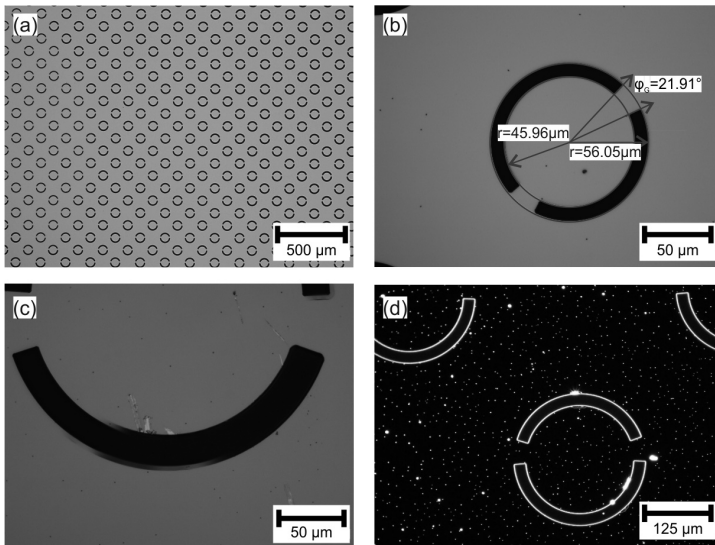


Abb. 4.2: Mikroskopbilder verschiedener Generationen und Typen von THz-Biosensoren. (a) Array eines Gen4 Biosensors mit einer Resonanzfrequenz von 1 THz. (b) Geometrische Dimensionen eines Gen3 Biosensors mit einer Resonanzfrequenz von 0.6 THz. In (c) und (d) wird der typische Defekt einer Verbiegung der freitragenden Metallstruktur dargestellt. In der Hellfeld-Aufnahme (c) sind diese Bereiche dunkler, während sich ein ähnlicher Defekt in der Dunkelfeld-Aufnahme (d) hell von den restlichen Strukturen abhebt.

Abbildung 4.2(a) zeigt ein Array mit Gen4 Biosensoren mit einer Resonanzfrequenz von 1 THz. In Abbildung 4.2(b) werden die geometrischen Dimensionen eines 0.6 THz

Biosensors bestimmt. Der gemessene Ring Radius r beträgt $45.96\ \mu\text{m}$, wobei der im Design vorgegebene Werte bei $46\ \mu\text{m}$ liegt. Die Schlitzbreite w wird aus der Differenz der beiden Radien berechnet und ergibt sich zu $10.09\ \mu\text{m}$, bei einer Vorgabe im Design von $10\ \mu\text{m}$. Der gemessene Winkel zwischen den beiden Schlitz-Ringen φ_G beträgt 21.91° , wobei der im Design vorgegebene Werte 22° beträgt. Diese Werte zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den Designvorgaben und erlauben so einen guten Vergleich mit den Simulationsergebnissen.

Ein häufig auftretender Defekt stellt die Verbiegung der freitragenden Metallstruktur dar, siehe Abbildung 4.2(c) und (d). Dieser Defekt ist von großer Relevanz, da die Resonanzfrequenz der CSRR durch die Geometrie definiert wird. Bei der Verbiegung ändert sich der Radius, genauso wie die Schlitzweite des CSRR und somit die Resonanzfrequenz. Da der Vergleich der Resonanzfrequenz das wichtigste Merkmal für die Detektion von biomolekularen Proben darstellt, muss eine Veränderung der freitragenden Metallstruktur über den ganzen Prozess hinweg verhindert werden. Durch die große Empfindlichkeit dieser Struktur auf mechanische Einflüsse ist dies ein typischer Defekt, der durch starke mechanische Beanspruchungen, hohe Temperaturen und einen hohen Gas- oder Flüssigkeitsdruck entstehen kann. Im Hellfeld einer Mikroskopaufnahme kann dieser Defekt als dunkler Rand beobachtet werden. Bei geringen Vergrößerungen ist die Unterscheidung zwischen dem Defekt und dem eigentlichen Schlitz des CSRR eine Herausforderung, weshalb sich in der Praxis die Anwendung der Dunkelfeld Mikroskopie als vorteilhaft erwiesen hat.

4.2.2 Freitragende Metallstruktur

Die optische Inspektion ermöglicht eine schnelle und zerstörungsfreie Prüfung der THz-Biosensoren. Jedoch liegt die für die Funktion essentielle Goldoberfläche auf der Rückseite der freitragenden Metallstruktur und ist daher von oben nicht direkt beobachtbar. In dieser Arbeit wurden THz-Biosensoren zerstörend und mittels SEM untersucht, um zum Einen die korrekte Fertigung der isotropen Ätzung zu kontrollieren und zum Anderen die Goldoberfläche zu charakterisieren. Für diese Probenvorbereitung wurden einzelne Sensoren gebrochen und die Bruchstücke in einem Probenhalter mit 45° Winkel montiert. Durch die große Anzahl von vorhandenen CSRR auf einem Biosensor ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Schnitt durch einen CSRR in einem Bruchstück vorhanden.

Abbildung 4.3(a) zeigt ein solches Bruchstück, welches in Blickrichtung parallel zur Oberfläche aufgenommen wurde. Gut zu erkennen ist das runde Profil der isotropen Ätzung des Glassubstrates und die körnige Struktur der Goldschicht. Die Distanz zwischen den beiden vertikalen Linien beträgt $2.7\ \mu\text{m}$, wobei dieser Wert die Weite der Unterätzung angibt und im Design mit $3\ \mu\text{m}$ festgelegt wurde. Diese stichprobenartigen Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Wert für verschiedene THz-Biosensoren immer sehr ähnlich ist und somit einen zuverlässigen Herstellungsprozess beschreibt. In Abbildung 4.3(b) wurde ein Sensor mit der Oberseite auf einem Probenhalter befestigt, um eine Untersuchung von der Rückseite zu ermöglichen. In

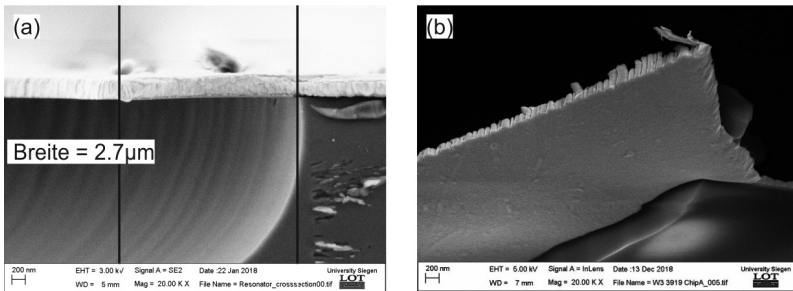


Abb. 4.3: SEM-Schnittbilder an einem Bruchstück eines THz-Biosensors an einer Position der freitragenden Metallstruktur. (a) Zeigt die freitragenden Metallstruktur in Blickrichtung parallel zur Oberfläche. Die beiden vertikalen Linien dienen zur Bestimmung der Weite der Unterätzung. (b) Die freitragende Metallstruktur von unten zeigt die Struktur des Goldes.

diesem SEM-Bild wird die Struktur des Goldes sichtbar, die bei der Deposition unterschiedlich große Körner ausbildet. Diese Korngröße ist dabei von dem verwendeten Depositionsverfahren wie Verdampfen oder Sputtern und den verwendeten Prozessparametern abhängig [72]. Nachfolgend wird die Charakterisierung dieser Oberfläche genauer beschrieben.

4.2.3 Elementanalyse

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, ermöglicht die Untersuchung mittels SEM die Beurteilung der Struktur auf der Unterseite der freitragenden Metallstruktur. Um einen eindeutigen Nachweis zu erbringen, dass die Chromschicht auf der Goldoberfläche entfernt wurde und diese damit für die Funktionalisierung zur Verfügung steht, ist die Analyse der dort vorhandenen Elemente erforderlich. Für diese Analyse bietet sich die EDX an, welche häufig Bestandteil moderner Elektronenmikroskope ist und daher zusammen mit der Aufnahme von SEM-Bildern erfolgen kann. Dabei beruht die Funktionsweise auf dem Prinzip, dass die Atome der Probe mit dem Elektronenstrahl des SEM angeregt werden und dabei Elektronen aus einer inneren Schale eines Atoms herausgeschlagen werden. Die entstehende Lücke wird durch ein Elektron aus einem energetisch höheren Zustand aufgefüllt und sendet dabei eine für das Element spezifische Röntgenstrahlung aus (Elektronen induzierte Röntgenstrahlung). Die Energie dieser Röntgenstrahlung ist abhängig davon, welche energetische Zustandsänderung die Elektronen bei diesem Übergang erfahren. Die Zuordnung der charakteristischen Röntgenstrahlung orientiert sich an den Namen der Schalen im Bohrschen Atommodell K , L , M , auf die das Elektron zurückfällt. Zusätzliche Indizes α , β , γ usw. beschreiben den Ursprung des Elektrons, welches den

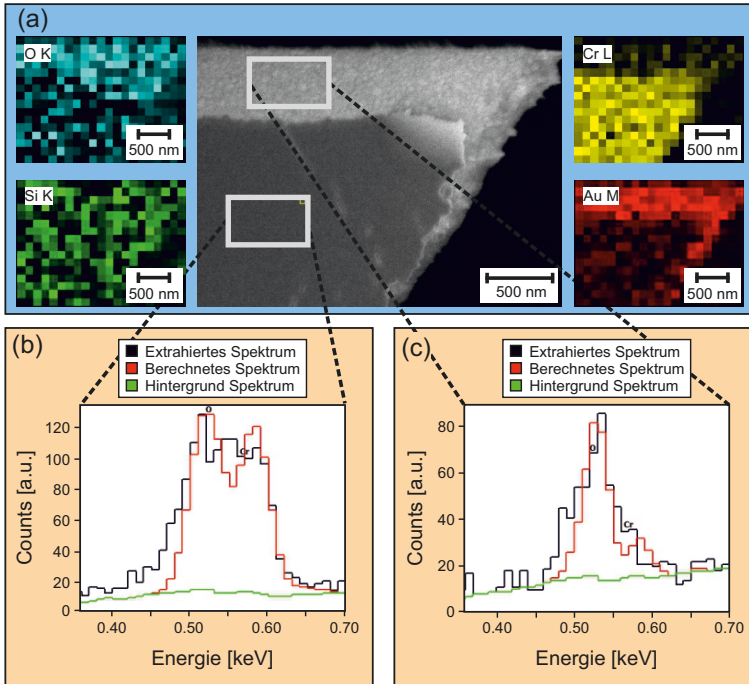


Abb. 4.4: SEM- und EDX-Untersuchungen auf der Unterseite der freitragenden Metallstruktur. (a) Zeigt die räumlich aufgelöste Signatur für die Elemente Sauerstoff (blau), Silizium (grün), Chrom (gelb) und Gold (rot). Der Ausschnitt ist jeweils identisch mit dem der SEM-Aufnahme in der Mitte. (b) und (c) zeigen jeweils das Röntgenspektrum für die grau markierten Flächen. In (b) können die beiden Peaks den Elementen Sauerstoff (O) und Chrom (Cr) zugeordnet werden. Für den äußeren Bereich der freitragenden Metallstruktur kann der Peak im Röntgenspektrum in (c) nur dem Element Sauerstoff zugeordnet werden, das in (b) zugeordnete Signal von Chrom ist nicht mehr detektierbar.

frei werdenden Platz einnimmt. Mit dieser vereinfachten Notation können übliche Übergänge beschrieben und somit die charakteristische Röntgenstrahlung als Peak in einem Spektrum verschiedenen Elementen zugeordnet werden [73, 74]. Neben der direkten Interaktion mit Elektronen, kann der Elektronenstrahl des SEM auch mit dem Atomkern interagieren. Hierbei werden die einfallenden Elektronen elektrostatisch von dem positiv geladenen Kern angezogen und abgelenkt. Dabei erfahren die Elektronen eine Beschleunigung und emittieren in der Folge Bremsstrahlung, welche als kontinuierlicher Untergrund im Röntgenspektrum sichtbar ist [73].

Mit dieser Methode können Fehler bei der Prozessierung der Biosensoren auf der Unterseite der freitragenden Metallstruktur analysiert werden. Ein Beispiel für eine nicht vollständig entfernte Chromschicht ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Das SEM-Bild in (a) zeigt eine sich stark verändernde Struktur der Oberfläche am Rand der freitragenden Metallstruktur. In Abbildung 4.4(a) ist weiterhin die räumliche Verteilung der detektierten Röntgenstrahlung dargestellt, jeweils separiert für verschiedene Elemente. In blau dargestellt ist das Element Sauerstoff des K_{α} -Übergangs mit einer Energie von 0.525 keV und in grün Silizium des K_{α} -Übergangs mit einer Energie von 1.739 keV. Diese beiden Elemente sind relativ regelmäßig räumlich verteilt und das Signal hat den Ursprung im verwendeten Quarzglas Substrat. In gelb dargestellt ist das Element Chrom des L_{α} -Übergangs mit einer Energie von 0.573 keV und in rot Gold des M -Übergangs mit einer Energie von 2.120 keV. Hier zeigen sich deutliche Unterschiede in der räumlichen Verteilung: Während Chrom vorwiegend auf der dunklen Oberfläche nachgewiesen werden kann, ist die Intensität der Röntgenstrahlung für Gold auf der hellen Struktur der SEM-Aufnahme am höchsten. Werden die Röntgenspektren (Abbildung 4.4(b) und (c)) für die beiden in Abbildung 4.4(a) grau markieren Bereiche verglichen, ist nur für die dunkle Struktur ein Signal des Elements Chrom bei einer Energie von 0.573 keV detektierbar, während dieses Signal für den hellen Bereich verschwindet. Die grüne Kurve in den Röntgenspektren zeigt die kontinuierliche Röntgenstrahlung, die aus der Bremsstrahlung resultiert. Diese Analyse zeigt, dass die als Haftvermittler eingesetzte Chromschicht auf der Unterseite der freitragenden Metallstruktur in diesem Beispiel nicht vollständig entfernt wurde und diese Analyse damit ein wichtiges Werkzeug für die Charakterisierung der Biosensoren darstellt.

4.2.4 Oberflächenrauheit

Ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung von Oberflächen und deren Eigenschaften stellt das AFM dar, welches durch die Messung von atomaren Kräften ein bildgebendes Verfahren mit einer Auflösung im Nanometerbereich darstellt [75]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein AFM verwendet, um die Topologie der Goldoberfläche zu vermessen und die Rauheit zu bestimmen. Als Referenzwert dient ein kommerziell erhältlicher Sensor einer Quarzkristall-Mikrowaage (engl. quartz crystal microbalance, QCM), der als Modellsystem für den THz-Biosensor verwendet werden kann [76]. Als Maß für die Rauheit einer Oberfläche sind die beiden Parameter mittlere Rauheit R_a und die gemittelte Rautiefe R_z häufig angewendete Größen. Für die biochemische

Funktionalisierung ist die Qualität der Oberfläche von zentraler Bedeutung, da diese einen wesentlichen Einfluss auf die Ausbildung einer SAM und damit auch auf die erreichbare Funktionalisierungsdichte hat [54].

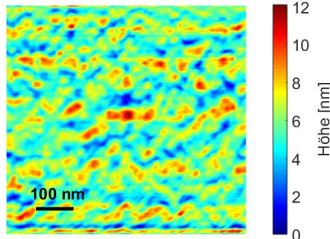


Abb. 4.5: AFM Darstellung der Oberflächenstruktur eines THz-Biosensors.

Parameter	THz-Sensor	QCM-Sensor
R_a	1.27 nm	0.65 nm
R_z	11.75 nm	8.27 nm

Tab. 4.1: Mittlere Rauheit R_a und die gemittelte Rautiefe R_z für THz-Biosensoren und einen QCM-Sensor.

Für die Funktionalisierung ist ausschließlich die Unterseite der freitragenden Metallstruktur relevant, da nur hier die Goldoberfläche freigelegt wurde und für die gezielte Bindung von DNA zur Verfügung steht. Da die Unterseite für die AFM-Untersuchung nicht zugänglich ist, muss die Metallschicht zunächst abgelöst und umgedreht werden. Dazu werden die beiden Chromschichten nasschemisch geätzt, wodurch sich die 200 nm dicke Goldschicht von dem Glassubstrat ablöst und in der Ätzlösung schwimmt. Diese kann nun umgedreht und mit einem Glassubstrat eingefangen werden. Nach einer Reinigung und dem Trocknen im Stickstoffstrom kann die Probe im AFM untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind als Topologie in Abbildung 4.5 für einen Scanbereich von $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ und einer Auflösung von 256×256 Pixel dargestellt. Die Farbskala gibt die Höhe der Topologie in Nanometer an. In Tabelle 4.1 werden die Werte für die mittlere Rauheit R_a und die gemittelte Rautiefe R_z für THz-Biosensoren und einen QCM-Sensor gegenübergestellt. Der Wert für die mittlere Rauheit des THz-Biosensors liegt in etwa bei dem Zweifachen des QCM-Sensors und wird wahrscheinlich durch die Rauheit der unter der Goldschicht liegenden Chromschicht und durch das Glassubstrat mit $R_a < 1\ \text{nm}$ definiert. Den Benchmark für Goldoberflächen stellt ein sogenanntes „*template stripped Gold*“ dar, welches mittels spezieller Fertigungstechnik eine Rauheit deutlich unter einem Nanometer ermöglicht [77].

Kapitel 5

Hochempfindlicher THz-Biosensor für PCR-freie cDNA Detektion basierend auf frequenzselektiven Oberflächen

Der Inhalt dieses Kapitels wurde veröffentlicht in:

Weisenstein, C., Schaar, D., Wigger, A.K., Schäfer-Eberwein, H., Bossert-Hoff, A.K. and Haring Bolívar, P., Ultrasensitive THz biosensor for PCR-free cDNA detection based on frequency selective surfaces, Biomedical Optics Express, 11, 448-460 (2020).¹ Der nachfolgende Abschnitt gibt eine übersetzte Zusammenfassung des referenzierten Artikels wieder.

5.1 Einleitung, Zusammenfassung und Stand der Forschung

Resonanzen von Biomolekülen, welche auf makro- oder biomolekularen Wechselwirkungen zurückzuführen sind und im Terahertz-Frequenzbereich liegen, wurden bereits vor einigen Jahrzehnten untersucht [78, 79]. In den frühen 2000er Jahren wurde die markierungsfreie Erkennung und Analyse von Biomolekülen (primär DNA-Proben) mithilfe von THz-Strahlung demonstriert, was die THz-Technologie zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Entwicklung einer alternativen Nachweismethode gemacht hat [5, 6, 80, 81]. Der Nachweis durch ein spektroskopisches THz-System schränkt die Empfindlichkeit jedoch stark ein, da die große Wellenlänge der THz-Strahlung (300 μm bei 1 THz) im Vergleich zur Größe der untersuchten Biomoleküle (typischerweise $< 100 \text{ nm}$) sehr groß ist und in einer geringen Interaktionslänge resultiert.

FSS in Form von aDSRR mit einer Resonanzfrequenz im THz-Bereich können die Empfindlichkeit biomolekularer Analysen erheblich verbessern [48, 82]. Trotz solcher Fortschritte müssen diese Biosensoren noch erheblich verbessert werden, um die für die Anwendungen erforderliche Nachweisempfindlichkeit zu erreichen. In diesem Beitrag wird ein hochempfindlicher THz-Biosensor vorgestellt, der auf selektiv funktionalisierten FSS für den Nachweis von DNA basiert. Die FSS-Sensorstruktur wurde

¹Abgedruckt mit Genehmigung der ©Optica Publishing Group (Ehemalig: ©The Optical Society).
Informationen zur Lizenz: https://doi.org/10.1364/OA_License_v1
Link zum Artikel: <https://doi.org/10.1364/BOE.380818>

entwickelt, um die Empfindlichkeit zu maximieren und Messungen in physiologisch relevanten Größenordnungen zu ermöglichen.

Die Grundlagen des Designs der aDSRR und der Biosensoren wurde bereits in Abschnitt 3.2.2 erläutert, daher wird an dieser Stelle der Fokus auf die Beschreibung der technischen Eigenschaften zum Erreichen der hohen Empfindlichkeit und Spezifität gelegt. Zur Veranschaulichung des Layouts ist in Abbildung 4.3 der Querschnitt der freitragenden Metallstruktur dargestellt. Bedingt durch den komplementären Aufbau der aDSRR ist das elektrische Feld am Rand der Schlitz-Ringen konzentriert und erreicht dort ein lokales Maximum. Da der Brechungsindex des Quarzsubstrats höher ist als der der umgebenden Luft, ist die Kopplung des elektrischen Feldes mit dem Glassubstrat effizienter, was zu einer Asymmetrie des elektrischen Feldes führt. Durch eine lokalisierte Funktionalisierung mit Fänger-DNA auf der Unterseite der freitragenden Metallstruktur kann so eine Verbesserung der Empfindlichkeit erreicht werden, da nur an Positionen Probenmaterial platziert wird, an denen der Sensor die höchste Empfindlichkeit besitzt. Weiterhin bietet das komplementäre Design der aDSRR den Vorteil, dass die Messung in Transmissionskonfiguration erfolgt, welche einfacher zu realisieren und handzuhaben ist, als eine Messung in Reflexionsanordnung. Zu beachten ist jedoch, dass die Verwendung einer freitragenden Struktur immer mit einem Kompromiss bei der mechanischen Stabilität einhergeht, was in jedem Handhabungs-, Reinigungs- und Präparationsschritt und der Anzahl der Wiederverwendungen berücksichtigt werden muss.

Für die experimentelle Umsetzung wurden zwei verschiedene Versuche durchgeführt: (i) Bei der *ex-situ* Hybridisierung erfolgt die Erzeugung von dsDNA-Proben in einem Mikroreaktionsgefäß. (ii) Bei der *on-chip* Hybridisierung erfolgt die Erzeugung der dsDNA-Proben direkt auf der Sensoroberfläche. Die für diese Arbeit relevanten Vorbereitungsschritte sind in Anhang C.1, die Prozessprotokolle in Anhang C.2 und die Sequenzen der verwendeten DNA-Proben in Anhang C.5 dargestellt.

(i) Im ersten Experiment wird eine Messreihe mit einer 24 Basenpaare (bp) langen dsDNA-Sequenz MIA in Konzentrationen zwischen $20\ \mu\text{M}$ und $0.1\ \mu\text{M}$ untersucht. Die unterschiedlichen Konzentrationen wurden zuvor *ex-situ* hybridisiert und auf verschiedene Abfragefelder eines Biosensors platziert. Da die dsDNA-Sequenzen eine Thiol-Modifikation besitzen, binden diese an die Goldoberfläche des Biosensors. Wird nun die Frequenzverschiebung als Funktion der dsDNA Konzentration aufgetragen, ergibt sich ein linearer Zusammenhang in einer doppel-logarithmischen Darstellung zwischen der Frequenzverschiebung und Konzentration. Dabei reicht die Frequenzverschiebung von $801\ \text{MHz}$ für $20\ \mu\text{M}$ dsDNA bis $5.5\ \text{MHz}$ für $0.1\ \mu\text{M}$ dsDNA, wobei die niedrigsten Konzentrationen bereits die untere Grenze des Nachweisbereichs erreichen. Die niedrigste zuverlässig nachweisbare *ex-situ* hybridisierte dsDNA-Konzentration ist $1\ \mu\text{M}$. Bei diesem Versuch ist jedoch zu beachten, dass die Untersuchung der Messreihe ausschließlich ein Maß für die Funktionalisierungseffizienz darstellt und nicht die anwendungsrelevante Effizienz der *on-chip* Hybridisierung.

(ii) Im zweiten Versuch wurde ein für die Anwendung relevantes *on-chip* Hybridisierungsexperiment durchgeführt, um die Effizienz für den dsDNA-Nachweis zu

demonstrieren. Das Probenmaterial für diesen Versuch ist die aus dem vorherigen Versuch bekannte synthetische DNA-Sequenz MIA, welche mit einer aus Gesamt-Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid, RNA) (ohne Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) Amplifikation) hergestellten cDNA-Probe der menschlichen Melanom Zelllinie MIA verglichen wird. Die Stoffmenge der cDNA Probe beträgt nur 4.64×10^{-18} mol mit einem Molekulargewicht von 7378 g/mol, was einer Konzentration von 1.55×10^{-12} mol/l entspricht. Für die Auswertung werden drei unterschiedliche Abfragefelder ausgewählt: Ein Referenzfeld, ein Feld mit *on-chip* hybridisierter synthetischer MIA-DNA und ein Feld mit *on-chip* hybridisierter cDNA. Im Folgenden wird die Frequenzverschiebung infolge der Funktionalisierung verglichen mit der ursprünglichen Messung des Abfragefeldes. Die Resonanzfrequenz des Referenzfeldes bleibt im Vergleich zu den funktionalisierten Feldern nahezu identisch. Infolge der Funktionalisierung mit Fänger-DNA kann auf den beiden anderen Abfragefeldern eine Frequenzverschiebung von -36 MHz für MIA und -85 MHz für cDNA beobachtet werden. Nach der Entfernung von unspezifischen Bindungen mittels MCH wird die komplementäre DNA auf diesen beiden Feldern *on-chip* hybridisiert. Die Frequenzverschiebung beträgt -270 MHz für die MIA-Sequenz und -230 MHz für die cDNA, bezogen auf die ursprüngliche Messung des Biosensors. Verglichen mit der funktionalisierten Resonanzfrequenz beträgt die Verschiebung -234 MHz für MIA und -145 MHz für cDNA. Die durch die *on-chip*-Hybridisierung mit cDNA verursachte Frequenzverschiebung ist bemerkenswert, da deren Konzentration um sieben Größenordnungen geringer ist als die der synthetischen MIA-Sequenz. Dies deutet auf eine nahezu perfekte *on-chip*-Hybridisierungseffizienz, jedoch auf eine begrenzte Effizienz des Funktionalisierungsprozesses hin, da die Anzahl der hybridisierten Moleküle der cDNA-Probe und der synthetischen MIA-Sequenz trotz der geringeren Konzentration von cDNA fast identisch ist.

Im Vergleich zu aktuellen Forschungsergebnissen der THz-Biosensorik ist die erreichte Empfindlichkeit der Messung von cDNA bemerkenswert. Eine in Bezug auf die verwendete Probe vergleichbare Arbeit, stellen die Untersuchungen in [83, 84] dar, welche jedoch ohne feldverstärkende Strukturen gemessen wurden. In der ersten Arbeit wird DNA aus vier 16-Mer-Sequenzen mit einem Molekulargewicht von ca. 19527 g/mol und einer Konzentration von 4×10^{-6} mol/l in wässriger Lösung mittels THz-Spektroskopie nachgewiesen [83]. Für DNA-Stränge mit einer Länge von 133 bp und einem Molekulargewicht von ca. 80942.1 g/mol, wurde eine minimale Konzentration von 1.23×10^{-9} mol/l erreicht [84]. In einer neueren Veröffentlichung wurden THz-Messungen an einem Lebertumormarker durchgeführt, wobei ein Metamaterial-basierter Biosensor mit einer mikrofluidischen Struktur eingesetzt wurde [16]. Als Probenmaterial wurde Anti-alpha 1-Fetoprotein-Antikörper und Antigen mit einem Molekulargewicht von ca. 150000 g/mol verwendet, wovon eine minimale Konzentration von 14.6×10^{-9} mol/l nachgewiesen werden konnte. Im Ergebnis zeigt sich für die in dieser Arbeit erreichte PCR-freie cDNA Messung eine Empfindlichkeit, die etwa sechs Größenordnungen besser ist, als bei bestehenden THz-Ansätzen für DNA-Proben mit vergleichbarem Molekulargewicht. Dieses Ergebnisse zeigen, dass Metamaterial-basierte THz-Biosensoren im Vergleich zu spektroskopischen THz-

Techniken deutlich höhere Empfindlichkeiten erreichen können und weiterhin durch selektive Funktionalisierungs- und Hybridisierungsprozesse außerdem sehr spezifisch für den zu detektierenden Analyten sein können.



Ultrasensitive THz biosensor for PCR-free cDNA detection based on frequency selective surfaces

CHRISTIAN WEISENSTEIN,^{1,*}  DOMINIK SCHAAR,² ANNA KATHARINA WIGGER,¹ HEIKO SCHÄFER-EBERWEIN,¹ ANJA K. BOSSERHOFF,² AND PETER HARING BOLÍVAR¹

¹Institute of High Frequency and Quantum Electronics HQE, University of Siegen, Germany

²Institute of Biochemistry, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg, Germany

*christian.weisenstein@uni-siegen.de

Abstract: THz technologies are a powerful tool for label-free detection of biomolecules. However, significant reduction of the lower detection limit is required to apply THz-sensors in biomedical diagnosis. This paper reports an ultrasensitive THz-biosensor based on asymmetric double split ring resonators (aDSRR) for the direct label- and PCR-free detection of DNA at physiologically relevant concentrations. We introduce selective functionalization and localized electric field concentration to enhance aDSRR sensitivity and specificity. The sensor characteristics are demonstrated using the human tumor marker MIA in cDNA samples produced from total RNA without PCR-amplification. Measurements of DNA samples with concentrations as low as 1.55×10^{-12} mol/l are presented.

© 2019 Optical Society of America under the terms of the [OSA Open Access Publishing Agreement](#)

1. Introduction

Recent substantial developments in genomic technologies have provided possibilities for widespread future health applications, e.g., predictive, preventive, and personalized medicine. These advances are closely coupled with the development of powerful, reliable, and efficient methods that can detect, analyze, and identify biomolecules, and assess their complex interactions in biological networks. Standard bioanalytical techniques for DNA analysis still rely on amplification techniques like polymerase chain reaction (PCR) in order to obtain higher detectable quantities and on fluorescently labeled DNA targets. Although sensitive and established, these techniques are time consuming and require extreme caution during preparation and analysis. There have been many attempts to develop biosensors using the so-called Lab-on-Chip technology as it promises to be a powerful, fast, and simple tool for DNA analysis [1–3]. However, the current methods still rely on fluorescence labeling with high system complexity. Fluorescence labeling, as well as PCR amplification, can modify the DNA strand configuration which can introduce diverse and unwanted interference with DNA samples, thereby corrupting the analysis [4–7].

Since resonances related to both macro- and bio-molecular interactions lie in the Terahertz (THz) frequency range, THz sensing and analysis of biomolecules has become an attractive alternative detection method. Vibration, torsion, and libration modes, as well as binding states cause resonant absorptions in the THz frequency range that result in characteristic material-specific spectral fingerprints, allowing for label-free THz analysis of biomolecules [8,9]. The label-free sensing and analysis of biomolecules using THz radiation has already been demonstrated in the early 2000s [10–13], proving THz sensing to be a promising technique.

The relatively large wavelength of THz waves ($300 \mu\text{m}$ at 1 THz) compared to the size of biomolecules (typically $< 100 \text{ nm}$) strongly limits its sensitivity in terms of the minimum number of biomolecules that can be detected by a spectroscopic THz sensing approach. Frequency-selective surfaces (FSS) with a resonance frequency in the THz range may significantly enhance

THz sensitivity [14]. FSS are based on a periodic array of resonant metallic structures, designed to create a sharp resonance in the frequency response [15]. By applying a dielectric load to the FSS, the resonance frequency is detuned, resulting in a shift in resonance frequency compared to the unloaded FSS. In THz biosensing, this sensitive mechanism is used to detect biomolecules [14,16].

However, despite of such advances, the sensitivity of THz sensing techniques is still several orders of magnitude lower than state-of-the-art bioanalytical sensing techniques. THz techniques still require significant improvements in order to reach relevant detection sensitivities needed for real-world applications. Numerous publications on THz analyses have measured biomolecules with comparable molecular weights (MW) in aqueous solution and found that the sensitivity is strongly dependent on MW: as MW increases, the minimum detectable concentration decreases because heavier and larger biomolecules are detected more easily.

DNA composed of four 16-mer sequences with an MW of approx. 19527 g/mol, and a concentration of 4×10^{-6} mol/l can be measured in aqueous solution using THz spectroscopy [17], and for larger DNA strands with 133 base pairs (bp) with an MW of approx. 80942.1 g/mol a minimum concentration of 1.23×10^{-9} mol/l has been reported [18]. At the protein level, bovine serum albumin (BSA) (MW of 66400 g/mol and concentration of 7.5×10^{-5} mol/l) has been detected with THz spectroscopy in aqueous solution [19]. In contrast, established bioanalytical tools like Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) determine human serum albumin (HSA) (MW of 66437 g/mol) at concentrations as low as 3.16×10^{-12} mol/l, however by using signal amplification [20]. A recent publication applied THz measurements to a liver tumor marker using an FSS-based chip with a microfluidic structure for sample loading [21]. Prior to the measurement, the authors removed the microfluidic channel from the FSS structure and dried the samples using N_2 . Anti-alpha 1 fetoprotein antibody and antigen were measured with an MW of approx. 150000 g/mol and a concentration of 14.6×10^{-9} mol/l. This result demonstrates the sensitivity enhancement enabled by FSS-based chips in comparison to spectroscopic THz techniques. Despite of such advances, THz detection limits are still about a factor of 4000 less sensitive than other established bioanalytical techniques [20].

In this paper, we present a newly developed highly sensitive THz biosensor based on selectively functionalized FSS for the detection of DNA and an experimental evaluation of its detection capabilities. The FSS sensing structure has been carefully designed to maximize sensitivity to enable measurements at physiologically relevant scales. Specificity to the target biomolecule is achieved by selective hybridization of complementary DNA (cDNA) strands. Selective functionalization of the FSS structure is used to chemically bind single-stranded (ss) oligo- or polynucleotide probe molecules to the biosensor surface.

High frequency excitation of the biosensor exhibits a strong concentration of the electric field at selectively functionalized resonant structures of the FSS. We measure synthetic and human DNA samples on our THz biosensor in ambient air using an all-electronic room temperature THz system. We provide experimental evidence of the high sensitivity of the THz biosensor using tumor markers produced from human RNA samples without requiring labeling nor a PCR amplification procedure.

2. Biosensor and reader setup

2.1. Biosensor concept and design

The design of the biosensor is based on asymmetric double split ring resonator (aDSRR) arrays (Fig. 1(a)). The size of the unit cell has a periodicity of $p = 416 \mu\text{m}$. The inner radius is $r = 96 \mu\text{m}$, the arc width $w = 20 \mu\text{m}$, the angle $\varphi_1 = 42^\circ$, and the opening angle $\varphi_2 = 22^\circ$. The design is symmetrical to an imaginary line inclined by 45° between the x- and y-axis (red line in

Fig. 1(a)). The design assumes a certain polarization direction of the incident wave denoted as \vec{E}_{Inc} (Fig. 1(a)). The wave propagates in a direction perpendicular to the sensor surface.

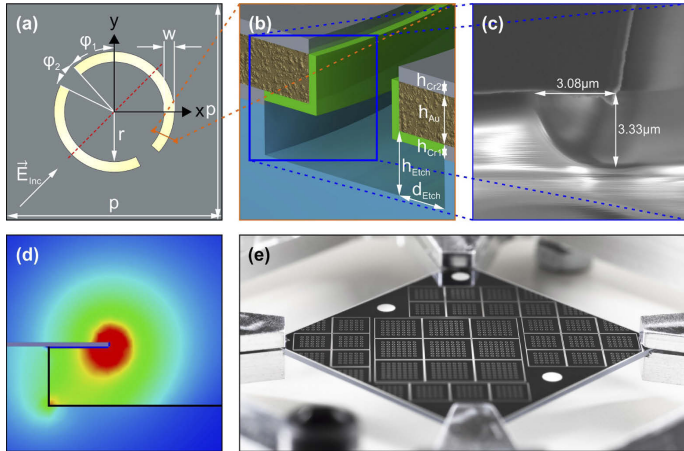


Fig. 1. (a) Schematic layout of the aDSRR structure and (b) cross section of one arc of the aDSRR (not to scale), showing the quartz substrate with the etched profile (blue) and the lithographic chromium layers (grey) enclosing the gold layer. The biofilm (green) is selectively functionalized on the open gold surfaces. (c) Cross-sectional SEM image of a fabricated biosensor with the undercut etched profile. (d) Simulated distribution of the electric field in the cross section of the aDSRR long arc. The maximum of the asymmetric E-field is concentrated at the edge of the free-standing metallic structure. (e) Complete biosensor with query fields consisting of aDSRR arrays of 5x5 and 7x7 elements.

Similar structures of gold aDSRRs on glass substrates were presented previously [14]. Here, we designed the complementary structure, i.e., aDSRRs as slits in a chromium/gold/chromium layer on a quartz glass substrate, by applying Babinet's principle [22,23]. This complementary design has several advantages: (i) aDSRRs are measured in transmission mode, which is easier to realize and handle than reflection mode; (ii) this design allows for additional optimization through an undercut etched into the substrate, a key design feature that results in a higher sensitivity by enabling the selective functionalization of open gold surfaces in those areas where electric field is maximal.

To visualize the layout of the etched undercut, a schematic cross section of the freestanding metallic structure is shown in Fig. 1(b). The E-field is highly confined at the edge of the arcs of the aDSRRs and asymmetric towards the substrate, thereby concentrated underneath the freestanding metal. Figure 1(d) shows the distribution of the electric field of the long arc. The refractive index of the quartz substrate is higher than for surrounding air, making the coupling of the E-field to the glass substrate more efficient. This results in the asymmetry of the E-field towards the substrate. The field enhancement in the lower left edge of Fig. 1(d) is a simulation artefact due to the sharp geometrical shape of the simulation model, which can be neglected, since the etching process during fabrication results in a round shape (cf. Figure 1(c)). The localized functionalization with capture DNA is depicted in Fig. 1(b) as a thin film on the Au surface. Utilizing a

freestanding structure to increase sensitivity has a tradeoff with mechanical stability. This fact has to be considered during each handling, cleaning, and preparation step.

The aDSRRs are arranged in groups of 5x5 and 7x7 elements in separated areas (query fields) (Fig. 1(e)). The compact design allows for the configuration of up to 30 query fields, allowing for reference and multiple experiments on one biosensor within a single measurement cycle.

2.2. Fabrication

The metallization of the aDSRR structures are fabricated on top of a 500 μm quartz substrate (Fused Silica UV grade). The THz refractive index of fused silica is $n \approx 1.96$ and remains constant in the THz range [24]. The deposited metallization consists of a $h_{Cr1} = 10$ nm chromium layer which is the adhesive agent for a $h_{Au} = 200$ nm gold layer. As surface passivation, an additional $h_{Cr2} = 10$ nm chromium layer is placed on top (cf. Figure 1(b)). The metal is structured using standard photolithography and wet etching processes. Subsequently, an additional wet etching process with hydrofluoric acid (HF) is applied to make a $d_{Etch} = 3 \mu\text{m}$ deep isotropic undercut etch ($d_{Etch} = h_{Etch}$) in the quartz substrate. This etching process creates a freestanding metal structure (Fig. 1(c)). The isotropic HF etching profile results in an undercut of 3.08 μm by 3.33 μm , which agrees very well with the design objective. The chromium layer underneath the freestanding metal is wet etched to uncover the gold surface at this undercut area only, in order to allow selective biomolecular functionalization of this area. Finally, photoresist is removed and the wafer is cleaned.

2.3. Modeling results

To evaluate and optimize the properties of the aDSRR, we used the Maxwell solver ANSYS HFSS for electromagnetic modeling. The aDSRR unit cell was simulated as a repetitive element with periodicity p and periodic boundary conditions. Gold was modeled with a dielectric constant $\epsilon_r = -1.12 \times 10^5$ and conductivity $\sigma = 4.01 \times 10^7$ S/m. These parameters were calculated from the complex dielectric function of the Drude model [25]. Chromium layers were not modeled, as due to the low thickness of the layer, no influence on the simulation results can be observed. The material properties of quartz glass are $\epsilon_r = 3.81$ with a dielectric loss tangent $\delta = 0.0001$ [24,26]. The modeling of the dielectric loading applied through the DNA film is particularly challenging due to the vast difference in DNA molecule size compared to the THz wavelength, and the shortage of reliable data on the dielectric properties of DNA in the THz range.

Few attempts have been made to determine the physical properties of DNA in the THz frequency range. In [11] the refractive index of large DNA with a mass of $\sim 12 \times 10^6$ g/mol was measured as $n \leq 1.5$. Brucherseifer et al. [10] worked out the difference between denatured and hybridized DNA samples for large DNA molecules (5.4 kb) in thick layers (30 μm). It was obtained $n \approx 1.05$ for denatured and $n \approx 1.175$ for hybridized DNA at a frequency of 1.25 THz. However, the DNA samples were arranged differently in our study: as short DNA strands (24 - 25 bp) functionalized on a gold surface. The DNA molecules self-assembled on a film but not all binding sites were occupied. Therefore, these samples act in a different manner than dry disordered samples of 30 μm bulk DNA. Previous experiments with denatured and hybridized DNA on a stripline dipole resonator have shown a frequency shift that is 2600 times larger than expected by simulation results [27,28]. These experiments clearly demonstrate the different behaviour of bulk DNA compared to self-assembled monolayers of DNA on a sensor surface. As a consequence, a comparative simulation and experimental analysis loading the sensors with DNA and with a polymer film was performed [29]. The resulting frequency shift caused by the dielectric loading with a polymer film is comparable to the shift caused by the self-assembled DNA film. This demonstrates that it is viable to simplify simulations by exchanging the extremely thin DNA film by a 100 nm PMMA film [30]. Our model for the DNA film is approximated as a 100 nm thick PMMA layer with the material parameters $\epsilon_{rDNA} = 2.6$, bulk conductivity

$\sigma = 100 \text{ kS/m}$, and dielectric loss tangent $\delta = 0.001$ [31], therefore. This model was verified by comparing simulation results with measurements to ensure that it correctly describes the dielectric loading of DNA on the aDSRR in simulations. In order to determine the shift of the position of the resonance frequency as a result of the dielectric loading with the DNA model system, the DNA (blue curve in Fig. 2) in the simulation model was exchanged with air as a reference (green curve in Fig. 2, $\epsilon_{rAir} = 1$). The shift of the resonance frequency was then calculated by the difference of reference and DNA model system.

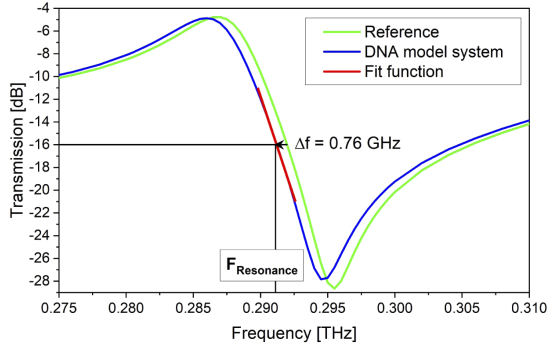


Fig. 2. Simulated transmission spectra for the designed aDSRR structure of reference and simulated DNA loading. The peak-to-peak transmission intensity difference of both resonance features is ~ 23 dB with an 8.5 GHz width. Comparing the center frequencies of both simulations, a shift of $\Delta f = 0.76$ GHz towards lower frequencies is observed as a result of DNA loading.

The superposition of the resonances of each split ring arc results in a Fano-type double resonance feature (DRF) in the simulated transmission spectrum (Fig. 2). The properties of the DRF are given by the maximum and minimum transmissions, the peak-to-peak transmission intensity difference (~ 23 dB), width 8.5 GHz, and flank steepness -2.71 dB/GHz. The position of the resonance feature was determined through a linear fit function of the resonance flank between 289.8 and 292.6 GHz, which contains the inflection point. We determined the position of the resonance frequency exclusively from the linear part of the resonance feature at $F_{Resonance} = 291$ GHz with the inflection point at -16 dB. This fitting method is essential to determine the position of the resonance frequency at the intersection level at -16 dB, which is in the center between maximum and minimum of the DRF. The linear fitting ensures the robust detection of the resonance frequency and thus a reproducible and repeatable determination of the frequency shift. As a result of the dielectric loading with the DNA model system, its resonance frequency was shifted by about 0.76 GHz towards lower frequencies compared to the reference. Please note that the absolute position of the DRF in the measurement results was lower (see Section 3) as a result of the shape variation of the fabrication process in comparison to the simulation model. However, as we are interested in relative frequency shifts, the absolute DRF position is irrelevant.

2.4. Measurement setup: biosensor reader

Traditional THz measurement systems for material analysis and characterization typically use time domain spectroscopy (THz-TDS) consisting of photoconductive antennas for THz generation

and electro-optical sampling [26,32,33]. These systems generate a frequency spectrum that has a bandwidth of several THz, but limited resolution. Therefore, THz-TDS systems are not suitable to detect small resonance shifts.

We used a robust and frequency-stable all-electronic THz spectroscopy system in transmission mode for our biosensor measurements, therefore. This system provides a signal-to-noise ratio over 40 dB and can detect small frequency shifts below 6 MHz. The biosensor was positioned by motorized stages with 5 μm position repeatability in all three directions, allowing a very high measurement reproducibility for consecutive measurements after different biochemical procedures. The all-electronic measurement scheme is based on quasi-heterodyne detection: a voltage-controlled oscillator (VCO), modulated by a continuous saw-tooth signal, generating a local oscillator (LO) frequency of 12 – 18 GHz. The LO signal is multiplied by a factor of 18 in a frequency multiplier chain, which results in an operating frequency range of 220 – 320 GHz. Consequently, measuring one query field takes 110 ms, including signal processing. A more detailed description of the setup is provided in [34].

2.5. Sample preparation and methods

Two kinds of measurements were performed: (1) using *ex-situ* hybridized synthetic DNA to test functionalization dependencies, and (2) using total RNA derived from pathological samples of human origin (including melanoma inhibitory activity (MIA) mRNA) in an *on-chip* hybridization to mimic typical biosensor applications.

Initially, the chips were cleaned of residues, especially organics, with piranha solution (H_2SO_4 : H_2O_2 , 3:1) for 2 h at 75 °C. After cleaning, the remaining piranha solution was washed away by intensive rinsing with deionized (DI) water. The chip was dried in a nitrogen flow and placed in an oven at 50 °C for 45 min.

The functionalization of the capture oligonucleotides is based on thiol-gold binding [35]. All capture probes were modified at their 5'-ends with a thiol group, allowing for localized functionalization to the undercut etched gold surface due to the specific binding of thiol to gold. The functional thiol group was protected by mercaptohexanol (MCH), forming a disulfide bond. Prior to use, the disulfide was deprotected with tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP). After each functionalization step, 1 mM MCH solution removed unspecific bindings of adsorbed DNA. The MCH forms a self-assembling monolayer (SAM) and improves the accessibility of the captured oligonucleotides for the target DNA. Therefore, the hybridization efficiency is maximized and the fully covered surface suppresses nonspecific adsorption to the gold surface [36].

Each functionalization and hybridization steps involved manually pipetting 3 μl sample volumes, forming a droplet, which was left for 45 min on the biosensor at room temperature to ensure functionalization and hybridization were successful. After, the biosensor was rinsed with DI water to remove residues. In the last step the biosensor was dried with nitrogen and tempered at 50 °C for 45 min, followed by biosensor measurement. All measurements were performed in dry state to prevent distortion caused by water molecules. The drying process of the double-stranded (ds) DNA does not affect the bound cDNA, having no influence on results.

For the unequivocal identification of frequency shifts in a query field, each biochemical process step was followed by a complete measurement of the biosensor. The frequency shift of each query field was determined by comparing the positions of the resonance feature of two measurements. The frequency shift on unloaded query fields were used as reference. Reference measurements are vital to control and monitor shifts, which may result from unwanted chemical or mechanical effects.

2.5.1. Preparation of ex-situ hybridized synthetic DNA.

Ex-situ, in this context, is the hybridization process of capture and target DNA in buffer solution. The hybridization process was performed in a tube filled with buffer solution in a thermoshaker

for 8 h at 50 °C, below the melting temperature for this dsDNA (67.8 °C). Once hybridization was complete, separated sulfides were removed in Bio-Spin P-6 Gel Columns centrifuged at 1000 g for 4 min with hybridization buffer (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, and NaOH to adjust to pH 7.5). Denaturation of dsDNA was performed with 8 M solution of CO(NH₂)₂ (UREA) for 45 min.

The 25 bp DNA sequence derived from beta-actin mRNA is: 5'-THI-TGG-CAC-CAC-ACC-TTC-TAC-AAT-GAG-C-3' for the capture and 5'-G-CTC-ATT-GTA-GAA-GGT-GTG-GTG-CCA-FLU-3' for target probes, hereinafter referred to as SYN1. The 24 bp DNA sequence derived from MIA mRNA is: 5'-THI-GGT-CCT-ATG-CCC-AAG-CTG-GCT-GAC-3' for the capture and 5'-GTC-AGC-CAG-CTT-GGG-CAT-AGG-ACC-FLU-3' for target probes, hereinafter referred to as SYN2. The fluorescence marker at the 3'-end of the target probe enables further analysis without affecting THz measurements. The oligonucleotides were ordered from Eurofins Genomics GmbH.

2.5.2. Preparation of on-chip hybridized copy DNA.

On-chip hybridization is the process of cDNA strands hybridizing to the biosensor surface. Functionalization was performed with the thiol modified synthetic capture probe SYN2, described above. This sequence is able to capture one specific cDNA, MIA, of the total cDNA sequences prepared from total RNA isolated from the human melanoma cell line (with the share of MIA cDNA being as low as 0.000048%). The specific detection of one of these cDNA molecules covers the typical case of application of medical diagnosis. To measure endogenous DNA molecules, aliquots of 100 µl containing cDNA from the melanoma cell line Mel Im were produced. Isolation of the total RNA was carried out after pelleting the melanoma cells cultured *in vitro* (~ 3 million cells per pellet). To perform the isolation, the manufacturer's protocol of the E.Z.N.A. Total RNA Kit I (Omega Bio-tek) was followed. Subsequently, 500 ng RNA was reverse transcribed in a volume of 20 µl following the manufacturer's protocol of reverse transcriptase SuperScript II (Invitrogen AG) at 37 °C for 45 min using dN₆ primer. The reverse transcriptase reaction buffer system contains 1 µl reverse transcriptase II, 4 µl First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl 0.1 M DTT, 1 µl 10 µM dNTPs (Genaxxon bioscience GmbH), 1 µl random primer dN₆ (Roche Deutschland Holding GmbH) and H₂O bidest. adding up to 20 µl. Subsequently, the remaining RNA was digested by adding 1 µl RNase and incubating for 30 min at 37 °C. No additional PCR amplification was performed in this study, therefore the generated amount of cDNA reflects 1:1 the endogenous amount of RNA.

The functionalization and measurement process begins with the initial functionalization of the query fields with 20 µM ssDNA of the synthetic capture SYN2 sequence. The measurement fields were subsequently treated with 1 mM MCH for 45 min to remove unspecific bound ssDNA. Next, 8 M UREA was pipetted on query fields which were initially functionalized with dsDNA (data not shown). Finally, the *on-chip* hybridization occurred by adding the complementary ssDNA sequence of 3 µl cDNA generated as described above. Each process step was followed by cleaning: DI water rinse, nitrogen drying, and tempering at 50 °C for 45 min. Measurement of the biosensor followed each step.

3. Results and discussion

3.1. Functionalization dependency test with *ex-situ* hybridized dsDNA

To verify functionalization and hybridization processes, the biosensor was tested with the *ex-situ* hybridized dsDNA sequences SYN1 and SYN2. *Ex-situ* dsDNA is particularly convenient because hybridization efficiency in solution is high compared to *on-chip* hybridization. Additionally, it is an established preparation step prior to *on-chip* hybridization.

Prior to the experiment, the biosensor was cleaned with piranha solution. The first measurement is the reference for all measurements, referred to as "Clean Ref. Field" and "Clean Meas. Field", see the transmission spectra in Fig. 3(a). In the following measurement, one field (green curves) was untreated while the second query field was functionalized with the *ex-situ* hybridized 5 μM dsDNA sequence SYN1 (blue curves). The DRF on the second query field is shifted by $\Delta f_1 = 314$ MHz towards lower frequencies in relation to the clean measurement field (cf. in Fig. 3(a) "Clean Meas. Field" and "5 μM dsDNA"). Comparing the measurements "Clean Ref. Field" and "Ref. Field", the frequency shift Δf_2 for the reference field increases by 15 MHz. Figure 3(b) represents the frequency shifts Δf_1 for the query field functionalized with 5 μM dsDNA and Δf_2 used as reference. In order to determine statistically relevant data, each biosensor was measured ten times consecutively. These values were used to calculate the mean and experimental standard deviation (maximum 6 MHz, see Fig. 3(b)).

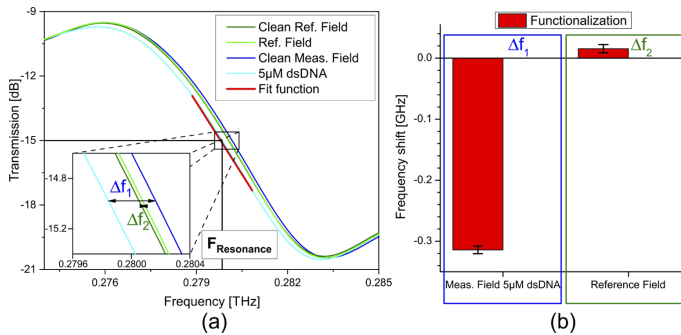


Fig. 3. (a) Representative transmission spectra of four measurements at two query fields. The resonance frequency F_R of each measurement was determined by a fitting and analyzed at -15 dB. A frequency shift of $\Delta f_1 = -314$ MHz is observed for the query field loaded with 5 μM dsDNA in comparison the frequency shift Δf_2 of the reference field is negligibly small (b).

The second experiment was a series of measurements using the 24 bp dsDNA sequence SYN2 derived from MIA with concentrations varying between 20 μM and 0.1 μM . Figure 4 depicts the measured frequency shift towards lower frequencies dependent on dsDNA concentration in order to assess the selective functionalization efficiency. The experiment was performed on one biosensor in different query fields, which were functionalized with *ex-situ* hybridized dsDNA. The frequency shift reaches from 801 MHz for 20 μM dsDNA concentration to 5.5 MHz for 0.1 μM dsDNA. A distinct correlation between surface occupation and the shift of the position of the resonance frequency is evident. The lowest concentration reaches the lower limit of our detection range and the lowest reliable detectable *ex-situ* hybridized dsDNA concentration is 1 μM . Please note that this variation of the density thiol group containing dsDNA does measure the functionalization efficiency and not the application relevant *on-chip* hybridization detection concentration requirements, as shown below.

3.2. Application evaluation with *on-chip* hybridized cDNA

On-chip hybridization experiments were performed to demonstrate the application relevant levels for dsDNA detection. Experiments with the synthetic DNA sequence SYN2 and with human

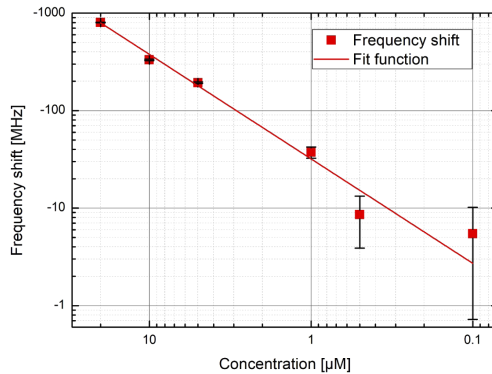


Fig. 4. Measured frequency shift caused by loading the biosensor with hybridized 24 bp dsDNA SYN2. Variation in DNA concentration between 20 and 0.1 μM has a dependency related to the frequency shift towards lower resonance frequencies.

melanoma cell line MIA cDNA sample produced from total RNA (without PCR-amplification) are carried out. The amount of MIA cDNA in the sample is as low as 4.64×10^{-18} mol with a molecular weight of 7378 g/mol. This amount was calculated by determining the share of MIA mRNA in the isolated total RNA samples using RNA-Seq data sets of the melanoma cell line Mel Im as 0.000048% and the amount of total RNA used in the experiment. The measurement results are shown in Fig. 5(a). The colored boxes define different query fields, whereby the green box is the untreated reference field, the red is the *on-chip* hybridization with 20 μM synthetic SYN2 sequence, and the blue box is the *on-chip* hybridization with 1.55×10^{-12} mol/l PCR-free MIA cDNA sample. Figure 5(b) depicts the biosensor query fields loaded with various samples.

The red bars in Fig. 5(a) are the frequency shifts as a result of the functionalization, compared to the initial measurement of the query field. The resonance frequency on the reference field remains at the same position, compared to the fields which were functionalized: a shift of -36 MHz on the SYN2 field and -85 MHz on the MIA cDNA field. The blue bars (MCH treatment) depict an additional slight shift towards lower resonance frequencies when compared to the functionalized case. Since the same shift appears on all measured fields, including the reference field, it must be due to mechanical and chemical handling. UREA was used to denature dsDNA and had no influence on the ssDNA, resulting in negligible changes in resonance frequency. The frequency shift from the hybridization process is shown in green, yielding to -270 MHz for the SYN2 sequence and -230 MHz for MIA cDNA, relative to the initial measurement of the biosensor. Compared to the functionalized resonance frequency (blue bars), the shift is -234 MHz and -145 MHz for SYN2 and MIA cDNA, respectively.

3.3. Discussion

The transmission spectra of simulation and experimental results are consistent. The peak-to-peak transmission intensity differences of the measured aDSRR structure is 10 dB over a frequency range of 7 GHz. Compared to simulations, the peak-to-peak transmission intensity is lower, as a result of the finite array, the losses from the materials and limited conductivity of gold

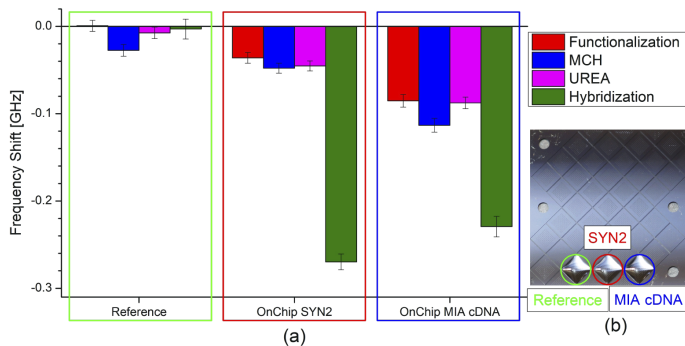


Fig. 5. (a) Relative frequency shifts towards lower frequencies as a consequence of different DNA sequences which are functionalized on different query fields (indicated by green, red, and blue boxes) on one biosensor. The colored bars indicate the process steps: red is the functionalization with thiol modified capture DNA, blue the treatment with MCH, pink rinsing with UREA, and green the *on-chip* hybridization with the target sequences SYN2 and MIA cDNA. The biosensor loaded with various analytes is illustrated in (b).

and chromium. However, the width and relative frequency shift of the resonance feature are in agreement with model results.

The first experiments are performed to verify the efficiency of the functionalization procedures. Experimental functionalization dependencies with the *ex-situ* hybridized 25 bp dsDNA SYN1 and the 24 bp dsDNA SYN2 sequence, show a distinct frequency shift, while the simultaneously measured reference field displays no significant shift. The correlation between frequency shift and dsDNA concentration clearly demonstrates the capability of the biosensor to detect short dsDNA strands at various concentrations, down to a limit of $1 \mu\text{M}$ for *ex-situ* hybridized dsDNA. The efficiency of *ex-situ* hybridization in these experiments is at its maximum due to the long interaction time span, controlled temperature, and mixture with buffer solution. The detectable frequency shift is therefore only limited by the number of functionalized capture DNA molecules, which are bound to the gold surface and is directly proportional to dsDNA concentration. Higher absolute shift levels would be expected. The reason for the limitation in the functionalization process is not fully understood since the query fields are loaded with similar probes and processed consecutively. Conceivable reasons are that the single query fields were not fully cleaned of residues from the fabrication. Furthermore, the efficiency of the functionalization process is unknown, since the gold surface on the bottom of the freestanding metal is hard to access for the thiol-modified DNA. We also assume that the texture of the gold surface reduces the functionalization density and the efficiency of the process. Therefore, the functionalization process needs to be optimized for improved reproducibility. However, the experiments verify the functionalization and hybridization capability of the sensor fabrication process and demonstrate the selective functionalization efficiency of our biosensor.

The second experiment represents an application evaluation with pathological samples produced from the human melanoma cell line Mel Im. The *on-chip* hybridization experiment was performed with the synthetic DNA SYN2 and the MIA cDNA as target probes, hybridized on the biosensor surface. The shift caused by the *on-chip* hybridization with MIA cDNA is remarkable, since the MIA cDNA shift reaches 62% in comparison to the synthetic SYN2 results. This is particularly

notable in view of future THz biosensor applications since the concentration of MIA cDNA is seven orders of magnitude smaller than the one of the synthetic SYN2 sequence. This clearly indicates a close to perfect *on-chip* hybridization efficiency (on the order of 62%) and a limited efficiency of the functionalization process. The absolute number of capture DNA molecules, which are available for the *on-chip* hybridization process, is equivalent to the number of dsDNA molecules during the *ex-situ* hybridization experiments. The results indicate that we reached a saturation level in the measurements with *ex-situ* hybridized synthetic SYN2, whereas in the *on-chip* hybridization, the ratio of available capture molecules to applied MIA cDNA allows for an almost equivalent frequency shift. The number of hybridized molecules of MIA cDNA and synthetic SYN2 is therefore almost the same despite the lower concentration of MIA cDNA (1.55×10^{-12} mol/l).

In comparison to state-of-the-art research results of biosensing in the THz range, the detection of MIA cDNA at a PCR-free concentration of 1.55×10^{-12} mol/l is remarkable. The total amount of molecules is as low as 4.64×10^{-18} mol of MIA cDNA, with a droplet size of $3 \mu\text{l}$. Figure 6(a) shows a collection of best of class THz measurements of biomolecules (red dots) with different MW indicating the lower detection limit of these analyses [17,18,21,37]. The dashed line in Fig. 6(a) indicates the dependency of the minimum detectable concentration on MW with the slope of $m = -1.45$ [38]. A clear trend is visible: the higher MW, the lower the detectable concentration of biomolecules.

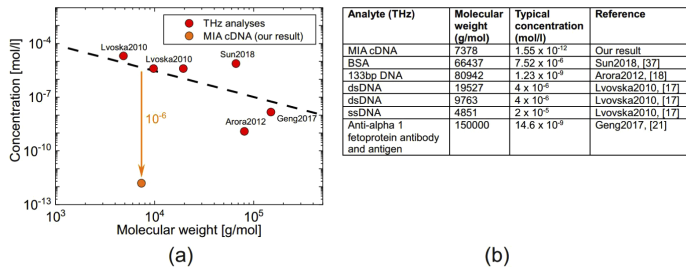


Fig. 6. (a) In comparison to published THz results, our measurements show increased sensitivity by six orders of magnitude at comparable molecular weights. The dashed line represents the overall trend of decreasing detection limits with increasing molecular weight. (b) Table with best of class THz analyses of biomolecules.

Our result for PCR-free MIA cDNA reaches a sensitivity roughly six orders of magnitude better than existing approaches for biomolecules with comparable MW. On top of the high sensitivity, our approach is highly specific to the target DNA by utilizing the highly selective hybridization process of cDNA strands. Specificity, achieved by functionalization of the sensor surface using capture probe molecules (i.e. ss oligonucleotides), which are chemically bound to the biosensor surface, is a second key feature for bioanalytical applications addressed with our biosensor.

4. Conclusion

In this work, we present the development, fabrication, and practical use of a THz biosensor for the tumor-related analysis of DNA samples. Based on electromagnetic field simulations, the design was optimized to maximize sensitivity through selective functionalization, undercut etched structures, and resonance of the split ring resonators. The resonance frequency was determined with an accuracy of 6 MHz in an all-electronic spectroscopic system at a center frequency of

280 GHz. The use of the biosensor for the detection of synthetic and human DNA samples was experimentally verified by *ex-situ* and *on-chip* hybridization in different concentrations which were reproduced in model simulations. We detected a frequency shift of 230 MHz for MIA cDNA and 270 MHz for a synthetically produced DNA sequence. Highly specific hybridization of MIA cDNA enables the detection out of a vast number of various DNA molecules, which mimics the typical case of real-world applications for medical diagnosis. Most importantly, the experimentally determined lower detection limit is 1.55×10^{-12} mol/l for MIA cDNA without PCR amplification, equal to 4.64×10^{-18} mol of molecules. These results are by six orders of magnitude better than published THz results. With the demonstrated exceptionally high PCR-free sensitivity combined with a very high specificity, achieved by biochemical sensor functionalization, we addressed two key features for biosensor application. Our biosensor outperforms existing approaches in two essential aspects: PCR-free sensitivity and specificity, paving the way for a broader implementation and use of THz biosensing techniques.

Funding

Deutsche Forschungsgemeinschaft (BO 1573/27-1, BO 1573/27-2, HA 3022/8-1, HA 3022/8-2, SCH 1970/1-1, WI 5209/1-2).

Acknowledgment

This work is part of the national priority program SPP 1857 ESSENCE.

Disclosures

The authors declare that there are no conflicts of interest related to this article.

References

1. T. Vo-Dinh, B. M. Cullum, and D. L. Stokes, "Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostics," *Sens. Actuators, B* **74**(1-3), 2–11 (2001).
2. R. H. Liu, J. Yang, R. Lenigk, J. Bonanno, and P. Grodzinski, "Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection," *Anal. Chem.* **76**(7), 1824–1831 (2004).
3. J. Wang, "Survey and summary: from DNA biosensors to gene chips," *Nucleic Acids Res.* **28**(16), 3011–3016 (2000).
4. H. Ozaki and L. W. McLaughlin, "The estimation of distances between specific backbone-labeled sites in DNA using fluorescence resonance energy transfer," *Nucleic Acids Res.* **20**(19), 5205–5214 (1992).
5. Z. Zhu, J. Chao, H. Yu, and A. S. Waggoner, "Directly labeled DNA probes using fluorescent nucleotides with different length linkers," *Nucleic Acids Res.* **22**(16), 3418–3422 (1994).
6. Z. Zhu and A. Waggoner, "Molecular mechanism controlling the incorporation of fluorescent nucleotides into DNA by PCR," *Cytometry* **28**(3), 206–211 (1997).
7. M. L. Larramendy, W. El-Rifai, and S. Knuutila, "Comparison of fluorescein isothiocyanate- and texas red-conjugated nucleotides for direct labeling in comparative genomic hybridization," *Cytometry* **31**(3), 174–179 (1998).
8. H. Froehlich, "Long-range coherence and energy storage in biological systems," *Int. J. Quantum Chem.* **2**(5), 641–649 (1968).
9. W. Zhuang, Y. Feng, and E. W. Prohofsky, "Self-consistent calculation of localized DNA vibrational properties at a double-helix-single-strand junction with anharmonic potential," *Phys. Rev. A* **41**(12), 7033–7042 (1990).
10. M. Brucherseifer, M. Nagel, P. H. Bolívar, H. Kurz, A. Bosserhoff, and R. Büttner, "Label-free probing of the binding state of DNA by time-domain terahertz sensing," *Appl. Phys. Lett.* **77**(24), 4049–4051 (2000).
11. A. Markelz, A. Roitberg, and E. J. Heilweil, "Pulsed terahertz spectroscopy of DNA, bovine serum albumin and collagen between 0.1 and 2.0 THz," *Chem. Phys. Lett.* **320**(1-2), 42–48 (2000).
12. S. P. Mickan, A. Menikh, H. Liu, C. A. Mannella, R. MacColl, D. Abbott, J. Munch, and X.-C. Zhang, "Label-free bioaffinity detection using terahertz technology," *Phys. Med. Biol.* **47**(21), 3789–3795 (2002).
13. B. Fischer, M. Walther, and P. U. Jepsen, "Far-infrared vibrational modes of DNA components studied by terahertz time-domain spectroscopy," *Phys. Med. Biol.* **47**(21), 3807–3814 (2002).
14. C. Debus and P. H. Bolívar, "Frequency selective surfaces for high sensitivity terahertz sensing," *Appl. Phys. Lett.* **91**(18), 184102 (2007).
15. V. A. Fedotov, M. Rose, S. L. Prosvirnin, N. Papisimakis, and N. I. Zheludev, "Sharp trapped-mode resonances in planar metamaterials with a broken structural symmetry," *Phys. Rev. Lett.* **99**(14), 147401 (2007).

16. C. Debus, M. Awad, M. Nagel, and P. H. Bolívar, "Terahertz biochip technology: Toward high-sensitivity label-free DNA sensors," *Am. Biotechnol. Lab.* **27**, 8–11 (2009).
17. M. I. Lvovska, N. C. Seeman, R. Sha, T. R. Globus, T. B. Khromova, and T. S. Dorofeeva, "THz characterization of DNA four-way junction and its components," *IEEE Trans. Nanotechnol.* **9**(5), 610–617 (2010).
18. A. Arora, T. Q. Luong, M. Krüger, Y. J. Kim, C.-H. Nam, A. Manz, and M. Havenith, "Terahertz-time domain spectroscopy for the detection of PCR amplified DNA in aqueous solution," *Analyst* **137**(3), 575–579 (2012).
19. S. Laurette, A. Treizebre, A. Elagli, B. Hatirnaz, R. Froidevaux, F. Affouard, L. Duponchel, and B. Bocquet, "Highly sensitive terahertz spectroscopy in microsystem," *RSC Adv.* **2**(26), 10064–10071 (2012).
20. Company Abcam plc, "Human albumin elisa kit (ab179887)," (2019).
21. Z. Geng, X. Zhang, Z. Fan, X. Lv, and H. Chen, "A route to terahertz metamaterial biosensor integrated with microfluidics for liver cancer biomarker testing in early stage," *Sci. Rep.* **7**(1), 16378 (2017).
22. F. Falcone, T. Lopetegui, M. Laso, J. Baena, J. Bonache, M. Beruete, R. Marqués, F. Martín, and M. Sorolla, "Babinet principle applied to the design of metasurfaces and metamaterials," *Phys. Rev. Lett.* **93**(19), 197401 (2004).
23. C. Debus and P. H. Bolívar, "Terahertz biosensors based on double split ring arrays," in *Photonics Europe*, (International Society for Optics and Photonics, 2008), p. 69870U.
24. M. Naftaly and R. E. Miles, "Terahertz time-domain spectroscopy for material characterization," *Proc. IEEE* **95**(8), 1658–1665 (2007).
25. P. B. Johnson and R. W. Christy, "Optical constants of the noble metals," *Phys. Rev. B* **6**(12), 4370–4379 (1972).
26. D. Grischkowsky, S. Keiding, M. Van Exter, and C. Fattinger, "Far-infrared time-domain spectroscopy with terahertz beams of dielectrics and semiconductors," *J. Opt. Soc. Am. B* **7**(10), 2006–2015 (1990).
27. M. Nagel, P. H. Bolívar, M. Brucherseifer, H. Kurz, A. Bosserhoff, and R. Büttner, "Integrated THz technology for label-free genetic diagnostics," *Appl. Phys. Lett.* **80**(1), 154–156 (2002).
28. T. Baras, T. Kleine-Ostmann, and M. Koch, "On-chip THz detection of biomaterials: A numerical study," *J. Biol. Phys.* **29**(2/3), 187–194 (2003).
29. M. Nagel, F. Richter, P. Haring Bolívar, and H. Kurz, "A functionalized THz sensor for marker-free DNA analysis," *Phys. Med. Biol.* **48**(22), 3625–3636 (2003).
30. C. Debus, "A high-sensitivity THz-sensing technology for DNA detection with split-ring resonator based biochips," Ph.D. thesis, Siegen, Universität Siegen, Diss., 2013 (2013).
31. Y.-S. Jin, G.-J. Kim, and S.-G. Jeon, "Terahertz dielectric properties of polymers," *J. Korean Phys. Soc.* **49**, 513–517 (2006).
32. D. H. Auston, K. Cheung, J. Valdmanis, and D. Kleinman, "Cherenkov radiation from femtosecond optical pulses in electro-optic media," *Phys. Rev. Lett.* **53**(16), 1555–1558 (1984).
33. K. Cheung and D. Auston, "Excitation of coherent phonon polaritons with femtosecond optical pulses," *Phys. Rev. Lett.* **55**(20), 2152–2155 (1985).
34. C. Debus, G. Spickermann, M. Nagel, and P. H. Bolívar, "All-electronic terahertz spectrometer for biosensing," *Microw. Opt. Technol. Lett.* **53**(12), 2899–2902 (2011).
35. J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, and G. M. Whitesides, "Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology," *Chem. Rev.* **105**(4), 1103–1170 (2005).
36. T. M. Herne and M. J. Tarlov, "Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces," *J. Am. Chem. Soc.* **119**(38), 8916–8920 (1997).
37. Y. Sun, P. Du, X. Lu, P. Xie, Z. Qian, S. Fan, and Z. Zhu, "Quantitative characterization of bovine serum albumin thin-films using terahertz spectroscopy and machine learning methods," *Biomed. Opt. Express* **9**(7), 2917–2929 (2018).
38. C. Weisenstein, D. Schaar, M. Schmeck, A. K. Wigger, A. K. Bosserhoff, and P. H. Bolívar, "Detection of human tumor markers with THz metamaterials," in *2018 43rd International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves (IRMMW-THz)*, (2018), pp. 1–2.

Kapitel 6

Multifrequenz-Untersuchung von Einzel- und Doppelstrang-DNA mit skalierbaren THz-Biosensoren auf Basis von Metamaterialien

Der Inhalt dieses Kapitels wurde veröffentlicht in:

Weisenstein, C., Richter, M., Wigger, A.K., Bosserhoff, A.K. and Haring Bolívar, P., Multifrequency investigation of single- and double-stranded DNA with scalable metamaterial-based THz biosensors, Biosensors, 483 (2022).¹

Der nachfolgende Abschnitt gibt eine übersetzte Zusammenfassung des referenzierten Artikels wieder.

6.1 Einleitung, Zusammenfassung und Stand der Forschung

Ein Biosensor ist in der Regel für den Nachweis eines bestimmten Biomoleküls ausgelegt, wie im vorangegangenen Kapitel am Beispiel eines Tumormarkers gezeigt wurde. Um die Empfindlichkeit eines Biosensors zu optimieren ist es daher vorteilhaft, den Biosensor so zu konzipieren und anzupassen, dass die Empfindlichkeit für genau eine bestimmte Analyseaufgabe maximiert wird. Bislang konzentriert sich der Forschungsschwerpunkt bei der Entwicklung von THz-Biosensoren jedoch überwiegend auf die Verbesserung der Empfindlichkeit von Metamaterialien, während die Optimierung des Biosensors im Hinblick auf einen bestimmten Analyten niedriger priorisiert wird. So können THz-Metamaterial-basierte Biosensoren im Allgemeinen eine hohe Empfindlichkeit erreichen, sind jedoch nicht spezifisch für die Detektion eines Analyten ausgelegt.

Die in diesem Kapitel vorgestellte Veröffentlichung greift die Idee eines THz-Biosensors auf, der auf eine Anwendung in der DNA-Erkennung spezialisiert ist und die

¹Veröffentlicht als Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative-Commons-Lizenz CC BY 4.0 verbreitet wird, die die uneingeschränkte Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in jedem Medium erlaubt, sofern das Originalwerk ordnungsgemäß zitiert wird. Für die Wiederverwendung dieses Artikels ist keine gesonderte Genehmigung erforderlich. Informationen zur Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
Link zum Artikel: <https://doi.org/10.3390/bios12070483>

Detektion von Biomolekülen wie Tumormarkern weiter verbessern kann. Dazu werden die in Kapitel 5 eingeführten aDSRR als Sensorelemente für drei verschiedene Biosensor-Layouts angepasst. Die Form der Resonatoren bleibt dabei identisch, diese wurden jedoch in ihren geometrischen Abmessungen skaliert, sodass Biosensoren mit Resonanzfrequenzen mit 0.3 THz, 0.6 THz und 1 THz realisiert wurden. Da sich der Strahldurchmesser im THz-Transmissionsaufbau mit zunehmender Frequenz verkleinert, wird die Größe der Abfragefelder und deren Anzahl umgekehrt proportional skaliert, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben wurde. Auf jeden Biosensor werden identische Proben ssDNA und dsDNA im Volumen proportional zur Sensorfläche unter gleichbleibenden Bedingungen untersucht. Das Ziel dieses Experiments ist die Analyse von Unterschieden zwischen den beiden DNA-Proben und deren Anwendbarkeit für eine spezifische Detektion und damit eine mögliche Erhöhung der Empfindlichkeit von Biosensoren.

Zunächst werden dazu die charakteristischen Eigenschaften des DRF am Beispiel des 1 THz Biosensors untersucht und jeweils für den Fall der Referenzmessung und einer Messung mit einer 30 pmol dsDNA-Probe verglichen. Für diese quantitative Analyse werden drei charakteristische Merkmale des DRF definiert: (i) Die Maximumposition, an der die Frequenzverschiebung und die Amplitudenänderung analysiert werden. (ii) Die Minimumposition, an der die Frequenzverschiebung und die Amplitudenänderung analysiert werden. (iii) Ein Schnittpunkt innerhalb der Steigung der Resonanz, an dem eine Frequenzverschiebung beobachtet werden kann. Dieser Schnittpunkt liegt bei 0.5 im linearen Transmissionsspektrum das auf 0/1 normiert wurde, um den Einfluss von Amplitudenänderungen zu minimieren. Bei einem Vergleich in der Höhe der Frequenzverschiebung zeigt sich, dass diese an der Maximumposition im Betrag weniger als 50 % gegenüber jener der Minimumposition beträgt. Der Betrag der Frequenzverschiebung an der Minimumposition und Schnittpunkt liegt hingegen auf einem vergleichbaren Niveau. Da für die Schnittpunkt-Methode die Frequenzverschiebung am größten und die Standardabweichung am kleinsten ist, wurde diese charakteristische Eigenschaft für die nachfolgenden Analysen verwendet. Dies stellt bereits eine interessante Erkenntnis dar, da die Frequenzverschiebung typischerweise an der Minimumposition eines Resonanzmerkmals bestimmt wird [18,85]. Die aus dieser Analyse gewonnenen Schlussfolgerungen lassen sich auf die drei Biosensor-Designs anwenden und besitzen für alle untersuchten Frequenzbereiche Gültigkeit.

Nachfolgend vergleichen wir die Frequenzverschiebung mithilfe der Schnittpunkt-Methode für ssDNA und für dsDNA für verschiedene Stoffmengen für die drei Biosensor-Varianten. Dieser Vergleich wurde ebenfalls für alle anderen charakteristischen Merkmale durchgeführt, diese Ergebnisse sind in der Veröffentlichung jedoch nicht abgedruckt. Daher werden diese zur Ergänzung in Anhang E zur Verfügung gestellt und beschrieben. Zur Analyse der unterschiedlichen DNA-Proben wird die Frequenzverschiebung als Funktion der Resonanzfrequenz der Biosensoren in doppelt logarithmischer Darstellung aufgetragen und mit der scheinbar linearen Funktion $y = a + k \cdot x$ gefittet. Der wichtigste Parameter dieser Funktion wird durch die Steigung k repräsentiert. Wird diese Darstellung in ein lineares Koordinatensystem übertragen, beschreibt k den Grad der sich ergebenden Potenzfunktion. Es wird nachgewiesen,

dass sich k für ssDNA und für dsDNA deutlich unterscheidet. Für dsDNA wird eine Steigung von $k = 1.53 \pm 0.06$ beobachtet, während diese für ssDNA nur bei $k = 0.34 \pm 0.11$ liegt.² Übertragen auf den Grad der Potenzfunktion ergibt sich daraus eine Abhängigkeit für dsDNA von etwa $x^{3/2}$ (nur für die maximale Stoffmenge) und für ssDNA von etwa $x^{1/3}$. Dieser signifikante Unterschied in der Steigung erlaubt die direkte Unterscheidung zwischen ssDNA und dsDNA in Abhängigkeit von der Resonanzfrequenz des verwendeten Biosensors.

In der biomolekularen THz-Forschung war die Untersuchung von DNA in den frühen 2000er Jahren eines der ersten Anwendungsgebiete [5, 6, 81]. Dennoch wurde erst in jüngster Vergangenheit damit begonnen, DNA mit Biosensoren auf Metamaterialbasis zu untersuchen. Diese Arbeiten aus den Jahren ab 2018 konzentrieren sich in erster Linie darauf, die Empfindlichkeit des DNA-Nachweises zu erhöhen, wie beispielsweise in [86] mit Nanoschlitz-basierten Terahertz-Sensoren gezeigt wurde. Andere Arbeiten befassen sich mit der Untersuchung von Mutationen von DNA-Basen, zum Beispiel mit mikrofluidischen Strukturen [25] oder mit abgeschwächte Totalreflexion (engl. attenuated total reflection, ATR) THz Mikrofluidikzellen [87]. Ein direkter Vergleich dieser Arbeit mit anderen THz-Biosensoren ist an dieser Stelle schwierig, da es keinen vergleichbaren Ansatz mit skalierbaren THz-Biosensoren und Untersuchung von DNA gibt. Vergleichbare Untersuchungen hinsichtlich der verwendeten Proben wurden lediglich in der Arbeit von Shih et al. [18] durchgeführt. Dort wird ein ATP-Aptamer mit einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ mit einem nanofluidischen THz-Biosensor nachgewiesen. Die dort untersuchte Probe liegt hinsichtlich der Konzentration ($1 \mu\text{M}$ entspricht der Stoffmenge von $2.5/1.5 \text{ pmol}$) auf einem vergleichbaren Niveau der in dieser Arbeit verwendeten Stoffmenge. Eine mögliche Erweiterung des vorgestellten Konzepts auf Basis von skalierbaren Biosensoren stellen durchstimmbare Metamaterial-basierte Resonatoren dar, jedoch konzentriert sich dort die Anwendung hauptsächlich auf Filter [70, 88].

²Die Steigung wird für die im Versuch maximal verwendete Stoffmenge von $50/30 \text{ pmol}$ angegeben, weitere Stoffmengen wurden ebenfalls untersucht.



Article

Multifrequency Investigation of Single- and Double-Stranded DNA with Scalable Metamaterial-Based THz Biosensors

Christian Weisenstein ^{1,*} , Merle Richter ¹ , Anna Katharina Wigger ¹ , Anja K. Bosserhoff ² and Peter Haring Bolívar ¹

- ¹ Institute of High Frequency and Quantum Electronics HQE, University of Siegen, 57076 Siegen, Germany; merle.richter@uni-siegen.de (M.R.); anna.wigger@uni-siegen.de (A.K.W.); peter.haring@uni-siegen.de (P.H.B.)
- ² Institute of Biochemistry and Molecular Medicine, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg, 91054 Erlangen, Germany; anja.bosserhoff@fau.de
- * Correspondence: christian.weisenstein@uni-siegen.de

Abstract: Due to the occurrence of THz-excited vibrational modes in biomacromolecules, the THz frequency range has been identified as particularly suitable for developing and applying new bio-analytical methods. We present a scalable THz metamaterial-based biosensor being utilized for the multifrequency investigation of single- and double-stranded DNA (ssDNA and dsDNA) samples. It is demonstrated that the metamaterial resonance frequency shift by the DNA's presence depends on frequency. Our experiments with the scalable THz biosensors demonstrate a major change in the degree of the power function for dsDNA by 1.53 ± 0.06 and, in comparison, 0.34 ± 0.11 for ssDNA as a function of metamaterial resonance frequency. Thus, there is a significant advantage for dsDNA detection that can be used for increased sensitivity of biomolecular detection at higher frequencies. This work represents a first step for application-specific biosensors with potential advantages in sensitivity, specificity, and robustness.



Citation: Weisenstein, C.; Richter, M.; Wigger, A.K.; Bosserhoff, A.K.; Haring Bolívar, P. Multifrequency Investigation of Single- and Double-Stranded DNA with Scalable Metamaterial-Based THz Biosensors. *Biosensors* **2022**, *12*, 483. <https://doi.org/10.3390/bios12070483>

Received: 7 June 2022

Accepted: 29 June 2022

Published: 1 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: metamaterial; DNA; THz; terahertz; biosensor; biomolecular; sensitivity; FSS; biomolecules; sensor

1. Introduction

As resonance frequencies in the THz range are associated with macro- and biomolecular interactions [1,2], this frequency range is considered suitable for the development of new bioanalytical methods. The first THz experiments with label-free detection of biomolecules had already been demonstrated in the early 2000s [3–6]. However, the sensitivity of spectroscopic THz investigations as used in these early experiments is limited since the wavelength at THz frequencies (300 μm at 1 THz) is typically orders of magnitude larger than the size of the investigated biomolecules (<10 nm). This leads to the fact that, for many real-world bioanalytic applications, macroscopic state-of-the-art THz setups are either not sensitive enough, lack in performance, or do not show the required selectivity in bioanalyte detection when compared to established biosensing technologies. Consequently, various methods and concepts have been introduced in recent years to improve the interaction of sample and analyzing THz radiation. Metamaterial-based THz biosensors have proven to be particularly suitable, as these biosensors are relatively easy to fabricate using standard lithographic processes and significantly enhance sensitivity for biomolecular detection [7,8]. The ability to immobilize biomolecules on the surface of these biosensors represents a further important step towards their application as competitive biosensors [9,10].

A biosensor, in a general sense, is typically designed for the detection of a specific biomolecule such as a tumor marker. It is therefore advantageous to design and adapt the biosensor in such a way that the sensitivity is maximized for exactly one specific analytic task. However, to date, the focus of THz-biosensor development has been solely on improving the sensitivity of metamaterials and not on optimizing the biosensor with

respect to a particular analyte. More precisely, most THz metamaterial-based biosensors generally offer a highly sensitive, but non-specific, solution to an analytic task.

Amino acids and nucleotides are of particular physiological relevance, as they represent the building blocks of more complex molecules, such as proteins and DNA, and are widely investigated with THz analytic methods. A large number of vibrational modes can be excited by THz waves within and between these molecules [11]. In the past, many THz investigations of DNA have been performed in aqueous environments with relatively large sample densities and volumes, in order to gain insights into the characteristics of these molecules. These include, among others, the dielectric response of molecular solutions [12,13], modification of the molecular structure and spectral signatures as a function of both the polarization state of incident radiation [14] and the hydration level [15].

Only in the recent past have research activities started investigating DNA with metamaterial-based biosensors. These are primarily focused on enhancing the sensitivity of DNA detection, e.g., with a THz metamaterial biosensor based on gold nanoparticles [16] or graphene-combined nanoslot-based terahertz sensors [17]. Other works address the mutation of DNA bases, for example, with microfluidic structures [18] or with terahertz-attenuated total-reflection microfluidic cells [19], while binding experiments are also performed [20]. Various metamaterial-based sensors for DNA detection have been presented; however, to our knowledge, there is no scalability approach and investigation of DNA, as presented in this work.

The approach we introduce in this work addresses the idea of a THz biosensor based on scalable asymmetric double split ring resonators (aDSRR), which is specialized for DNA-sensing applications such as tumor marker detection. We present three different biosensor layouts using aDSRR as sensing elements with identical shapes but scaled in their geometric dimensions to realize resonance frequencies of 0.3 THz, 0.6 THz and 1 THz. A constant sample amount of ssDNA and dsDNA proportional to the sensor area was applied on these biosensors under identical conditions. We demonstrate that the frequency shift as a function of resonance frequency of the aDSRR differs significantly for ss- and dsDNA. This allows to enhance the detection capability of the binding state of DNA for a high resonator frequency in comparison with lower resonator frequencies and thus represents a first step in the development of molecule- or application-specific metamaterial-based biosensors.

2. Materials and Methods

2.1. Structure

The schematic structure of the proposed scalable biosensor is shown in Figure 1a, for the simulation model with a resonance frequency of 0.6 THz. Microscopic images of aDSRR arrays with resonance frequencies of 0.3 THz in Figure 1b, 0.6 THz in Figure 1c and 1 THz in Figure 1d. We have chosen these three frequency ranges as they are sufficiently far apart to provide information about the frequency dependency and also provide favorable spectroscopic analysis windows. Each biosensor consists of the metamaterial structure in form of aDSRR, which was introduced in our previous publication [10]. This metallic structure is deposited on an $h_{\text{Sub}} = 500 \mu\text{m}$ fused silica substrate. Each of the three biosensor types is designed in such a way that an array of aDSRR forms a field on which a measurement query can be performed. The biosensor for 0.3 THz consists of 16 query fields, each about $3.7 \times 3.7 \text{ mm}^2$ in size. The biosensors for 0.6 THz and 1 THz consist of 25 query fields, each of which is about $2.9 \times 2.9 \text{ mm}^2$ in size. The query fields for 0.3 THz are larger than for 0.6 THz and 1 THz because the focal diameter in the measurement setup is significantly larger at this frequency. Each of the query fields is separated by a trench etched into the substrate, so that solutions dropped onto the query fields do not mix.

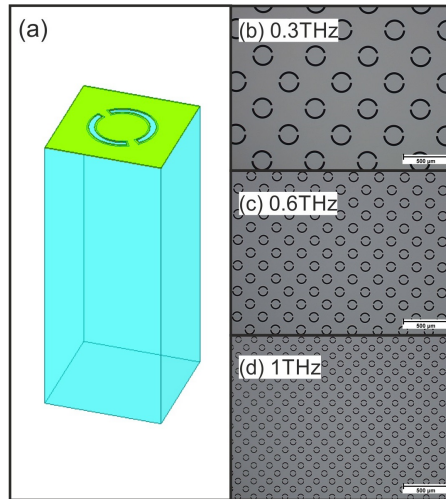


Figure 1. (a) Simulation model of the aDSRR structure (for 0.6 THz). The structure is scaled from 0.3 THz to 0.6 THz by a factor of 2.2 and from 0.6 THz to 1 THz by a factor of 1.7. Microscopic images of the fabricated structures for (b) 0.3 THz, (c) 0.6 THz and (d) 1 THz.

2.2. Fabrication

The aDSRR structures were fabricated by metallization on top of the 500 μm fused silica UV grade substrate. The THz refractive index of fused silica was $n \approx 1.96$ and remained constant in the THz range [21]. The metallization was based on a 10 nm chromium layer which acted as adhesive agent for the 200 nm gold layer. An additional 10 nm chromium layer was used as surface passivation. The metal was structured using standard photolithography and wet-etching processes. Subsequently, a wet-etching process with hydrofluoric acid was utilized in order to perform a 3 μm deep isotropic undercut etch into the quartz substrate. This etching process creates a freestanding metal structure, which was used for the field separation trenches. This allows a selective functionalization, which was not used in this work, but has already been presented in detail [10]. Microscopic images show the fabricated aDSRR arrays for 0.3 THz in Figure 1b, for 0.6 THz in Figure 1c and 1 THz in Figure 1d.

2.3. Dimensioning

The metamaterial aDSRR structure, i.e., two curved slits with different lengths in the metal surface, is depicted in Figure 2. The basic structure has been presented previously [10], but has now been extended to provide a frequency-scalable biosensor platform. We show and explain the design parameter exemplary for the biosensor with a resonance frequency of 0.3 THz, as the dimensional parameters for 0.6 THz and 1 THz are reciprocally linearly scaled with frequency.

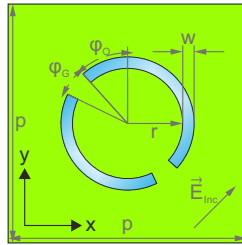


Figure 2. aDSRR unit cell with dimensioning.

The unit cell periodicity for the 0.3 THz structure is $p = 416 \mu\text{m}$, the ring radius is $r = 96 \mu\text{m}$ and the width of the two arcs is $w = 20 \mu\text{m}$. The design is symmetrical to a line at a 45° angle between the x - and y -axes. The lengths of the two arcs are defined by the offset angle $\varphi_O = 42^\circ$ and the gap angle $\varphi_G = 22^\circ$. The wave vector \vec{E} in Figure 2 denotes the polarization of the incident wave normal to the sensor surface. The design parameters are summarized in Table 1. As the cell periodicity decreases with increasing frequency, the array size A increases from 61 elements for the 0.3 THz biosensor to 145 elements for 0.6 THz and to 421 elements for 1 THz.

Table 1. Geometric parameters of the aDSRR biosensors with resonance frequencies of 0.3 THz, 0.6 THz and 1 THz.

Frequency	0.3 THz	0.6 THz	1 THz
Cell size p	416 μm	202 μm	124 μm
Ring radius r	96 μm	46 μm	29 μm
Slot width w	20 μm	10 μm	6 μm
Offset angle φ_O	42°	42°	42°
Gap angle φ_G	22°	22°	22°
Array size A	61	145	421

The sensing mechanism of the frequency scalable aDSRR finds its origin in the Fano resonance of the two asymmetric slits in the metal surface. The fundamental principle can be explained on the basis of the positive aDSRR structure, which consists of two asymmetric arcs typically made of metal. An antiparallel current flows in these two metal arcs at the resonant frequency, caused by the interaction of the asymmetric arcs. This principle is commonly known under the term Fano resonance [22], but also explained as trapped modes [23], electromagnetically induced transparency (EIT) [24], resonance hybridization model [25] and antenna pair interaction [7]. By applying Babinet's principle, the positive structure can be transformed into the complementary structure, assuming perfect conductors and infinitely thin metal layers [26,27]. Thereby, the reflection is interchanged with transmission and electric field with magnetic field, resulting in a 90° change in polarization direction.

2.4. Simulation and Material Model

For the simulation and modeling of the scalable aDSRR structures, we used the 3D electromagnetic simulation software Ansys HFSS Electronics Desktop 2021R1. Each aDSRR unit cell was simulated as a repetitive element with periodicity p , periodic boundary conditions and Floquet port excitation. The material parameter for the simulation model for gold were calculated from the complex dielectric function of the Drude model, resulting, for the dielectric constant, in $\epsilon_r = -1.12 \times 10^5$ and, for the conductivity, in $\sigma = 4.01 \times 10^7 \text{ S/m}$ [28]. The quartz substrate was modeled with $\epsilon_r = 3.81$ and a dielectric loss tangent of $\delta = 0.0001$ [21,29]. The material parameters for DNA were gained from comparative experimental approaches and resulted in a layer thickness of $0.1 \mu\text{m}$, a dielectric constant of $\epsilon_r = 2.6$, a bulk conductivity of $\sigma = 100 \text{ kS/m}$ and a dielectric loss tangent of

$\delta = 0.001$ [30]. The parameters specified here were obtained from previous studies with a functionalized DNA film and are therefore not directly transferable to the experiments in this work, especially in terms of film thickness. We adjusted the DNA layer thickness, therefore, to 1 μm .

2.5. Measurement Setup and Data Processing

In order to detect small frequency shifts as a result of the biosensor measurements with DNA, we utilized the TeraScan 1550 system from TOPTICA Photonics AG. This system provides a THz frequency-domain platform with high bandwidth, high dynamic range and a spectral resolution of 1 MHz [31], which allows the detection of small frequency shifts. The system uses thermal tuning of telecommunication-distributed feedback (DFB) lasers and InGaAs-based photomixers for CW-terahertz generation and detection. We used this system to build up a quasi-optical transmission setup for the biosensor measurements with off-axis parabolic mirrors and motorized stages for precise positioning of the biosensors and each query field in the center of the transmission focus. Each frequency sweep was set in such a way that the resonance frequency of each biosensor was in the center of the sweep range. We set the step size to 40 MHz and the integration time to 10 ms.

The processing of the obtained data is described in the following. The measured photo current in the THz detector is in the form of a cosine and directly proportional to the THz electric field. As this cosine signal only contains a real part, we used the Hilbert transform for the calculation of complex data. After this, we applied an inverse fast Fourier transform (IFFT) to transform the frequency-domain signal into the time domain. The measured signal contains many oscillations which typically have a higher frequency than the sample signal. These oscillations were eliminated by the implementation of a tapered cosine window. This filter sets all signals to zero, except for the main signal, and calculates a cosine-weighted transition from the measured signal to the zero signal outside the window function. FFT is then used to transform the data back to the frequency domain. Finally, we normalized the data to an air measurement. Similar data handling can also be found in further literature [32].

To obtain statistically relevant data, each of the 25 (for 0.6 THz and 1 THz biosensors) or 16 (for the 0.3 THz biosensor) query fields was measured five times in succession. From each of these measurements, the Fano resonance parameters relevant for the analysis were determined. The arithmetic mean and the standard error of the mean (SEM) were then calculated from the five measurements of the parameter values. Since the query fields can differ slightly in resonance frequency due to deviations in fabrication, a complete measurement of the biosensor was carried out after each biochemical process step. From this, different characteristic values were calculated, for example, the frequency shift in a query field was then determined by comparing the position of the resonance feature of two measurements of one query field. The calculation of the error of this difference is based on the maximum error. Details of the error calculations are described in Appendix A Equations (A1)–(A4).

Reference fields were loaded with deionized water (DI water) to provide a monitoring capability during each process step. Reference measurements are essential to control and monitor changes that may occur due to unwanted chemical or mechanical effects. Changes in the reference fields were averaged and subtracted from the measurement fields.

2.6. Sample Preparation

2.6.1. Materials

Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP), 95%, 0.5 mol/L in H_2O was purchased at Alfa Aesar and used without further purification. Water was purified until it reached a conductance of $\leq 0.058 \mu\text{S}/\text{cm}$ before use and is therefore designated as DI water. DNA oligomers were synthesized by Eurofins Genomics, Ebersberg and used without further purification.

tssDNAsequence (AP1/cJun): 5' thi-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'

ssDNA sequence (AP1/cJun): 5'-TTCCGGCTGACTCATCAAGCG-3'

2.6.2. Procedures

dsDNA solution: TCEP (1 μL , 1 mmol/L solution in DI water) was added to a solution of tssDNA (500 pmol) in DI water (11.5 μL). ssDNA (500 pmol) solved in DI water (12.5 μL) was combined with the tssDNA solution and homogenized for 45 min at 25 $^{\circ}\text{C}$ in a thermal shaker. The resulting stock solution ($c_{d1} = 20 \mu\text{mol/L}$) was diluted with DI water in order to obtain solutions with the concentrations $c_{d2} = 10 \mu\text{mol/L}$, $c_{d3} = 5 \mu\text{mol/L}$, and $c_{d4} = 1 \mu\text{mol/L}$.

ssDNA solution: TCEP (1 μL , 1 mmol/L solution in DI water) was added to a solution of tssDNA (500 pmol) in DI water (24 μL). The resulting stock solution ($c_{s1} = 20 \mu\text{mol/L}$) was diluted with DI water in order to obtain solutions with the concentrations $c_{s2} = 10 \mu\text{mol/L}$, $c_{s3} = 5 \mu\text{mol/L}$, and $c_{s4} = 1 \mu\text{mol/L}$. The composition of the diluted ssDNA and dsDNA solutions are summarized in Appendix C Table A1.

For THz measurements, a solvent casting [33] technique was used, in which a small volume of the corresponding DNA solution or DI water as reference sample was placed each on a query field of the sensor (see Appendix B Figures A1 and A2 for occupancy scheme) and the solvent was removed under reduced pressure at 20–22 $^{\circ}\text{C}$ in order to form a solid DNA film. As the query fields for the 0.3 THz biosensors are larger in area than the 0.6 THz and 1 THz biosensors and in order to obtain a similar DNA film thickness, the resulting sample droplet sizes are 2.5 μL and 1.5 μL , respectively. The DNA film thickness was measured with the stylus profiler Bruker DektakXT.

3. Results

3.1. Simulation and Measurement Comparison

The simulation results for the scalable aDSRR structure are shown in Figure 3a–c, respectively, for the three different frequency ranges. Each simulation distinguishes between the empty reference case (Ref) and the case with a DNA layer (DNA). For the three simulation models, a typical Fano-resonance double-resonance feature (DRF) can be observed in the transmission spectra. The peak-to-peak transmission difference (PPTD) and the shape of the resonance for the reference case is at a comparable level for all three models. The 1 THz biosensor shows a broadened transmission maximum of the DRF resulting from the Farbrý–Peróť resonance of the substrate. When we compare the reference and the DNA-layer simulation results, a shift in the resonance frequency and a reduction in the PPTD is observed, which is a direct result of the dielectric loading of the resonators with DNA. The changes in these properties have a nonlinear relationship as a function of the resonance frequency and will be discussed in detail in the next sections. As a consequence of the attenuated PPTD, the maximum negative slope of the DRF is reduced. Comparing the simulation results with the measurement results with respect to the PPTD attenuation, the assumed DNA-layer thickness seems to be not fitted perfectly, as the PPTD reduction in the measurements is smaller compared to the simulation. A summary and comparison with the measurement results is shown in Table 2. Here, the maximum negative slope at higher resonance frequencies is reduced, while the PPTD remains at the same level, which leads to a broader DRF.

Table 2. Comparison of the maximum negative slope of the DRF for the simulation and measurement results for biosensors with resonance frequencies of 0.3 THz, 0.6 THz and 1 THz.

Freq./THz	Simulation		Measurement	
	Ref./dB/GHz	DNA/dB/GHz	Ref./dB/GHz	dsDNA/dB/GHz
0.3	−3.18	−2.69	−0.90	−0.87
0.6	−1.57	−1.00	−0.86	−0.78
1	−1.15	−0.52	−0.61	−0.48

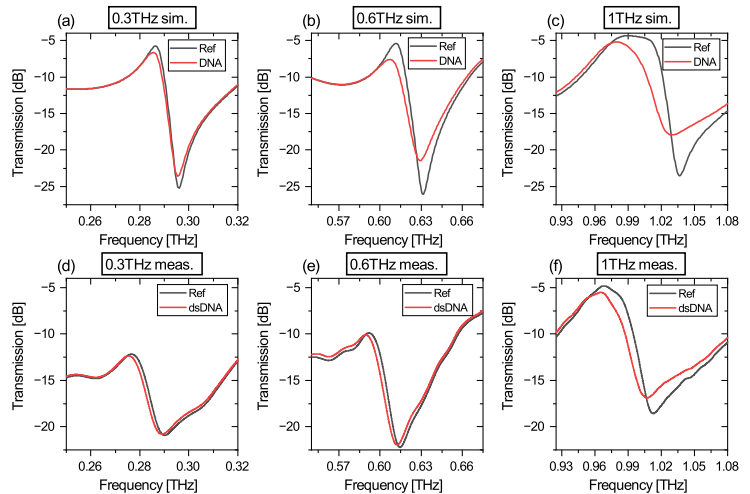


Figure 3. Comparison of simulation (upper row) and measurement results (bottom row). For each diagram, the reference is indicated in black and for DNA in red. (a) shows the simulation result for 0.3 THz biosensors, (b) for 0.6 THz and (c) for 1 THz. The measurement results of the biosensors are shown for (d) 0.3 THz, (e) 0.6 THz and (f) for 1 THz.

The measurement results for the scalable aDSRR structure are depicted in Figure 3d–f, for the empty reference case (Ref) and for the case with 50/30 pmol dsDNA (dsDNA), respectively. Similar to the simulation results, a typical DRF is observed for the three biosensor layouts. The shape and the relative PPTD are similar for the three biosensor models, except for the 0.3 THz biosensor, which has a smaller PPTD compared to the other biosensors. It is considered that this results from the relative transmission amplitudes, which are changing as a function of frequency and the absolute transmitted power of the measurement system decreases for higher frequencies. Furthermore, signal reflections in the THz path are more significant at lower measurement frequencies than at higher measurement frequencies and can also have an additional negative influence on the DRF amplitude. Comparing each biosensor in the reference case and loaded with 50/30 pmol dsDNA, we observe a nonlinear relationship of the frequency shift as a function of the resonance frequency, as is expected from the simulation model. The maximum negative slope of the DRF changes by loading with DNA, which is compared to the simulation results in Table 2.

3.2. Parameter Analysis

To quantitatively evaluate the effects of loading DNA on the three biosensors, we first investigate an exemplary measurement of the 1 THz biosensor loaded with 30 pmol dsDNA (cf. Figure 4a). This acts as an example analysis, which is representative for all measurements that were examined in the exact same fashion. We first define three characteristic positions in the DRF of the Fano resonance: (i) The maximum position at which the frequency shift ΔF_{Max} , and the amplitude change ΔA_{Max} , are analyzed. (ii) The minimum position at which the frequency shift ΔF_{Min} , and the amplitude change ΔA_{Min} , are analyzed. (iii) An intersection point of the slope of the resonance at which the frequency shift ΔF_{Int} can be observed. This intersection point is at 0.5 in the linear transmission spectrum, which has been normalized to 0/1 to minimize influences of amplitude changes.

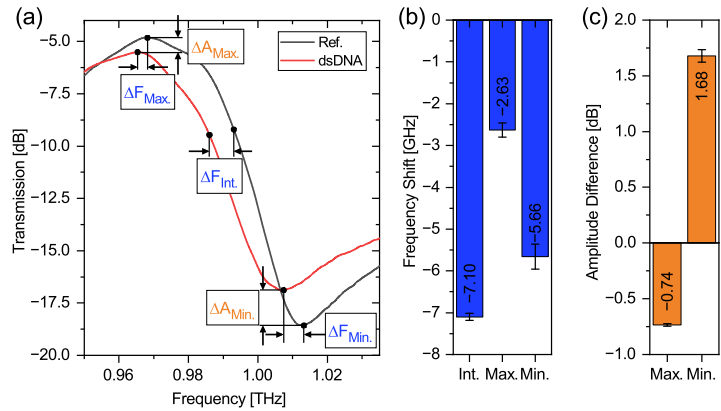


Figure 4. Parametric evaluation of the DRF, using an example measurement with the 1 THz biosensor with 30 pmol dsDNA. The transmission spectra of the reference and dsDNA measurement are featured in (a). The extracted parameters are highlighted in (b,c). (b) shows the frequency shift as a result of the dsDNA loading at the intersection point of the slope $\Delta F_{Int.}$, the maximum position $\Delta F_{Max.}$ and minimum position $\Delta F_{Min.}$. (c) shows the amplitude difference between the reference and the dsDNA at the maximum position $\Delta A_{Max.}$ and minimum position $\Delta A_{Min.}$.

The changes in frequency shift are summarized in Figure 4b and the changes in amplitude are shown in Figure 4c. From Figure 4b, we obtain a frequency shift of -7.10 ± 0.08 GHz for the intersection, -2.63 ± 0.17 GHz for the maximum- and -5.66 ± 0.30 GHz for the minimum position. The large difference in the magnitude of the frequency shift between minimum and maximum is clearly evident, while the shift between minimum and intersection point is at a comparable level. Furthermore, the standard deviation of the frequency shift at the intersection point is lowest with approx. 80 MHz, while that of the frequency shift at the minimum position is largest with approx. 300 MHz, as the signal-to-noise ratio is at a minimum at this point. Since the frequency shift is largest and the standard deviation is smallest for the intersection point, subsequent investigations will be based exclusively on this parameter. This already represents an interesting finding, since the frequency shift is typically determined at the minimum position of the resonance feature [20,34]. The conclusions drawn from this analysis can be applied to the three biosensor designs and remain valid for all frequency ranges.

Additionally, Figure 4c shows changes in amplitude of the maximum and minimum transmission. Thus, for the maximum position, we observe a decrease in amplitude by -0.74 ± 0.01 dB, while at the minimum position, the amplitude increases by 1.68 ± 0.06 dB. What was already true for the frequency shift is also true for the amplitude: The larger relative change is observed at the minimum position. The change in amplitude causes a reduction of the PPTD and is thus responsible for the reduction in the slope when loading the biosensor with DNA. This is attributable to the dielectric losses of DNA, which reduces the Q factor of a resonator [23]. We concentrate, in the following, on the frequency shift at the intersection point which represents the most significant and reliable parameter.

3.3. Frequency-Dependent Frequency Shift of ss- and dsDNA

In the following, we compare the frequency shift at the intersection point for ssDNA and for dsDNA for different sample amounts for the three biosensor variants, as depicted in Figure 5. Due to the logarithmic representation, the shift to lower frequencies caused by the loading of the sensor is shown as a positive number in this figure. To obtain statistically

reliable results, each sample configuration was measured on five different query fields on one biosensor (for 0.6 THz and 1 THz) or on three different query fields (0.3 THz), for the substance amounts 50/30 pmol (red), 25/15 pmol (green) and 12.5/7.5 pmol (blue). The sample amount 2.5/1.5 pmol was also measured but not evaluated, as the sample amount was too low and produced results with less significance and clarity. Since each query field was measured five times, each measuring point in Figure 5 is subject to error. However, no error bar is depicted for reasons of clarity.

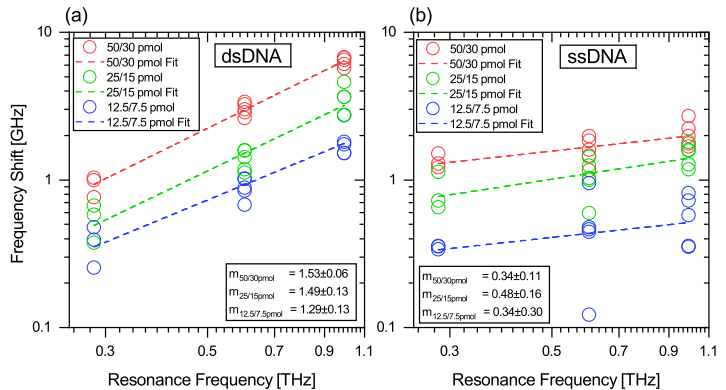


Figure 5. Negative frequency shift as a function of the resonance frequency for (a) dsDNA and (b) ssDNA. The frequency shift is fitted with a linear function on the double logarithmic scale and indicated in dashed lines for sample amounts of 50/30 pmol in red, for 25/15 pmol in green and for 12.5/7.5 pmol in blue. The parameter m describes the slope of the fit function. The first number and the second number for the used sample material for the 0.3 THz sensors and the second number for 0.6 THz and 1 THz, respectively.

The results of this experiment for dsDNA are shown in Figure 5a and for ssDNA in Figure 5b in log–log plots. We choose this representation as the differences between the two DNA conformations are highlighted well and, more importantly, it allows to extract the degree of the power function which is a result of the relationship between the frequency shift and resonance frequency of the biosensors. For the experiment with dsDNA, the exemplary presented maximum frequency shift for the 1 THz biosensor is -6.78 ± 0.08 GHz, for the 0.6 THz biosensor -3.38 ± 0.02 GHz and for the 0.3 THz biosensor -1.04 ± 0.01 GHz with the sample amount of 50/30 pmol. For ssDNA, the exemplary presented maximum frequency shift for the 1 THz biosensor is -2.71 ± 0.05 GHz, for the 0.6 THz biosensor -1.99 ± 0.01 GHz and for the 0.3 THz biosensor -1.52 ± 0.01 GHz with the sample amount of 50/30 pmol. It should be noted that each amount of substance was measured independently on five (three) query fields of each biosensor and deviations in the measured frequency shift can occur due to the manual processing. For the 25/15 pmol and 12.5/7.5 pmol sample amounts, it is observed that the frequency shifts are reduced for the three biosensor variants. This occurs as the DNA-layer thickness is decreasing for smaller sample amounts.

We then analyzed the frequency shifts caused by DNA as a function of the resonance frequency of the biosensors with a fit function. These fit functions are depicted as dotted lines in Figure 5 and appear as linear functions in the log–log plot. We have used the linear function $y = a + m \cdot x$ for the fit, where a represents the vertical intercept and m is then the slope of the function. Calculating this function into a linear coordinate system results in $y = A \cdot x^m$. Here, A describes the coefficient of the power function and is not considered further in the analysis, while the exponent m defines the degree of the power

function. From this conversion, it becomes clear that, from the slope m in the log–log plot, the degree of the power function can be derived. It is found that m undergoes a major change when we compare ss- and dsDNA. For the dsDNA we observe a slope of $m_{50/30\text{pmol}} = 1.53 \pm 0.06$, $m_{25/15\text{pmol}} = 1.49 \pm 0.13$ and $m_{12.5/7.5\text{pmol}} = 1.29 \pm 0.13$, while for ssDNA it was $m_{50/30\text{pmol}} = 0.34 \pm 0.11$, $m_{25/15\text{pmol}} = 0.48 \pm 0.16$ and $m_{12.5/7.5\text{pmol}} = 0.34 \pm 0.30$. Transferred to the degree of the power function, this results in a dependence for dsDNA of about $x^{3/2}$ (for the maximum sample amount only) and for ssDNA of about $x^{1/3}$. From these results, three important findings can be derived. (i) The significant difference in the slope allows the direct differentiation between ss- and dsDNA as a function of the resonance frequency. (ii) For the three tested sample amounts, the slope m remains close to the same value, which proves the reliability of the measurement methods and procedures. (iii) With a Pearson R correlation coefficient of 0.9917–0.9460 for dsDNA, these results indicate a strong-to-perfect linear relation between frequency shift and resonance frequency at the log–log scale [35]. Only for ssDNA does the Pearson R drop to strong to moderate (0.6955–0.325), as the absolute frequency shifts are smaller, which results in larger deviations.

4. Discussion

The comparison between simulation and measurement results reveals differences in the PPTD and in the frequency shift when loading the biosensors with DNA. Nevertheless, the simulation results represent the basic response in a good way. The shape of the resonance and its steepness is influenced by many factors. These include the finite size of the aDSRR arrays used, the limited conductivity of the metals, the variations between design and fabricated structures, signal reflections in the THz path, and the frequency-dependent performance of the measurement system used. The modeling of DNA is also significantly different compared to our previous works, since the DNA layer is not functionalized as a monolayer, but is applied as a solid film instead. Furthermore, the DNA film is simulated without frequency dependence based on the initial assumption, that the DNA material parameters remain constant in the observed frequency range. However, the results of this work show that this assumption is not valid.

In order to understand the origin of the frequency shift and the absorption due to the DNA loading of the biosensors, we focus our discussion on the analysis of the change in the slope and amplitude and, in particular, on the frequency shift. From the measurement analysis summarized in Table 2, it is clear that there is a significant change in the maximum negative slope due to the loading with dsDNA. This change is related to dsDNA only and originates from the reduction in the maximum amplitude and an increase in the minimum amplitude. Experience from analyzing the Q factors for lossy THz metamaterials [23] suggests that the observed changes result from induced losses by the DNA sample. This statement is supported by previous studies with hybridized and denatured DNA, where a frequency-dependent change in transmission was exclusively observed for hybridized DNA [3].

By analyzing the frequency shift, we consider three parameters of the DRF: maximum-, minimum- and intersection-point, chosen to be equidistant to the maximum and minimum points with regard to signal intensity. For the evaluation, we decided to focus on the intersection point, as this frequency shift, in general, delivers greater insights with small error, when compared to the other two characteristic attributes. The investigation of the maximum position does not provide any further information for the comparison of ss- and dsDNA, since the frequency shift for both samples is at comparable levels. The reason for this behavior is not yet fully understood. If we consider the dependence of the frequency shift at the intersection point for dsDNA as a function of the resonance frequency, we can conclude that the degree of the power function with $m > 1$ results from a refractive index of dsDNA that remains constant as a function of frequency in the observed range. This statement is supported by the simulation results, which use a DNA model that is not frequency-dependent and also achieves a degree with $m > 1$. However, since the DNA

model used in the simulation was not intended to be applied as a bulk DNA-layer model, the results should be treated as an approximation, which allows a quantitative evaluation only. The $m < 1$ observed for ssDNA allows the assumption that the refractive index is reduced as a function of frequency. However, it should be noted at this point that further investigations are necessary to understand the origin of the differences between the two DNA sample conformations. However, the results already point at interesting differences in the THz properties as a function of hybridization state, indicating the stark advantages of the THz sensing of biomolecular binding, which is very attractive for robust biomolecular recognition analytics.

At this point, it should be noted that the molecular weight of ssDNA amounts to only half of the molecular weight of dsDNA. Moreover, short oligomers such as the ones that are used in this work, tend to denature when dissolved in DI water. It is reasonable to assume a certain hybridization effect upon solvent evaporation, as can be deduced from [36,37]. In order to interpret the resonance frequency shift and amplitude data more precisely, the DNA-layer thicknesses on the sensor surface were traced with a stylus profiler. The approximate volume of each film was derived from these profiles. It was found that the volume of the ssDNA films amounts to 17% of the corresponding dsDNA film. However, the films were found to be shaped inhomogeneously, resulting from the solvent casting method that was used in the formation of the samples. To minimize the influence of the DNA film thickness inhomogeneity, an average film thickness was used for the calculation of the volume and five (three) independent experiments were performed with each sample amount on each biosensor. The significant difference in volume between ssDNA and dsDNA could possibly originate from the different flexibility of single strands as opposed to double strands [38]. This can lead to differences in density considering the short time in which the film formation took place, which would not allow for crystallization to occur. At the same time, ssDNA tends to bind more water molecules per nucleobase than dsDNA [37]. Although the measurements were conducted after evaporating the solvent, it is certain that some moisture remained in close vicinity to the DNA molecules and thus influenced the refractive index of the DNA layer and the shift in resonance frequency. No indication of this effect on the measurement results can be given at this point, but it is clear that low absorption as a function of frequency is evident for ssDNA, which then indicates lower absorption of the ssDNA itself.

A direct comparison with state-of-the-art THz biosensors is a difficult task at this point, since there are only few comparable works with similar sample types. For example, the work of Yang et al. [16] describes an extremely sensitive THz biosensor with a limit of detection (LOD) of 2.77 fM but employs gold nanoparticles and rolling circle amplification on a THz metamaterial surface and is therefore not directly comparable. In the work of Shih et al. [20], an ATP aptamer is detected at a minimum concentration of 1 μM using a nanofluidic THz biosensor. In comparison, the sample resulting from the minimum concentration we measured is 1 μM (corresponding to the amount of substance 2.5/1.5 pmol) at a comparable level. However, we would like to note that the minimization of the LOD was not the aim of this work and can only be considered on the side. A more detailed description about the potential sensitivity of our biosensor and how extremely low amounts of substance can be detected by methods such as selective functionalization has been shown in our previous work [10].

It is generally proven that a larger amount of a dielectric load leads to a larger shift in resonance frequency. This can be seen separately for dsDNA data and for ssDNA data by comparing the different sample amounts. When comparing dsDNA with ssDNA it becomes apparent that, especially at lower resonance frequencies, ssDNA generates a distinct shift in the DRF which is much larger than could be expected. We assume that this might result from a frequency-dependent refractive index of the ssDNA, as the interaction with the THz radiation is typically lower for ssDNA compared to dsDNA. The different volumes of ssDNA and dsDNA films are further parameters that have to be taken into account when analyzing the frequency shifts. However, by varying the sample amount within the same

DNA conformation, the thickness of the DNA film was also modified. In the analysis of the fit parameters, however, only an influence on the amplitude of the frequency shift is observed, which is represented by parameter A in the fit function. The influence on the degree of the power function, parameter m of the fit function, is weak. Nevertheless, it can be concluded that biosensors with high resonance frequencies, such as 1 THz, are suited very well to distinguishing between ssDNA and dsDNA, leading to promising applications in biochemical analysis.

5. Conclusions

The aim of this work, which includes the development, fabrication and application evaluation of a scalable THz biosensor system, was successfully achieved. With the detailed DRF parameter analysis, the calculated intersection point method provides benefits in the detection of small frequency shifts with high accuracy, which plays an important role in the application of biosensors for the detection of minute amounts of biomolecular substances. With the presented measurement results of ssDNA and dsDNA with THz biosensors operating at resonance frequencies of 0.3 THz, 0.6 THz and 1 THz, we worked out the difference in the degree of the power function which is a result of the relationship between frequency shift and resonance frequency. A major change in the degree of the power function was observed, which was at a maximum of 1.53 ± 0.06 for dsDNA, compared to a maximum of 0.48 ± 0.16 for ssDNA. This significant difference allows the direct identification of the DNA binding state as a function of the biosensors resonance frequency. To our knowledge, such a multifrequency analysis in the THz range has not been performed before. The frequency shift in dsDNA detected by this method, which depends on the biosensor's resonance frequency, is an important finding for the application in THz biosensors. However, further investigations of this behavior are necessary for a detailed understanding of the nature of the frequency shift and absorption by ssDNA and dsDNA. Collectively, our work represents a first step towards applying specific THz biosensors, which enables potentially significant advances in sensitivity, specificity and robustness for biomedical applications.

Author Contributions: Conceptualization, C.W., A.K.B. and P.H.B.; methodology, C.W.; software, C.W.; validation, M.R.; formal analysis, C.W.; investigation, C.W. and M.R.; resources, A.K.B., A.K.W. and P.H.B.; data curation, C.W.; writing—original draft preparation, C.W. and M.R.; writing—review and editing, C.W., M.R., A.K.W., A.K.B. and P.H.B.; visualization, C.W.; supervision, project administration, funding acquisition, A.K.B., A.K.W. and P.H.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work is part of the national priority program SPP 1857 ESSENCE and funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under contract numbers HA 3022/8, BO 1573/27 and WI 5209/1.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We would like to thank Domenic Gust for assistance in executing the measurements and we acknowledge the support of the TOPTICA Photonics AG by building up our THz frequency domain setup.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

DNA	Deoxyribonucleic acid
ssDNA	Single stranded DNA
dsDNA	Double stranded DNA
aDSRR	Asymmetric double split ring resonator
UV	Ultraviolet
EIT	Electromagnetically induced transparency
HFSS	High-frequency structure simulator
DFB	Distributed feedback
CW	Continuous wave
FFT	Fast Fourier transform
IFFT	Inverse FFT
SD	Standard deviation of the mean
SEM	Standard error of the mean
DI	Deionized
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride
DRF	Double resonance feature
PPTD	Peak-to-peak transmission difference
LOD	Limit of detection

Appendix A. Error Calculation

Each of the 25 (0.6 THz and 1 THz biosensors) and 16 (0.3 THz biosensor) query fields was measured five times in succession, in order to obtain statistically relevant data. The parameter resonance frequency, and minimum and maximum amplitude were determined from each measurement. From this, the arithmetic mean was determined for each parameter:

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \\ &= \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_N}{N}.\end{aligned}\quad (\text{A1})$$

N denotes, here, the number of measurements, and x_i is the resonance parameter. With the help of the mean, we could then calculate the standard deviation of the mean (SD):

$$\begin{aligned}\sigma_x &= \sqrt{\frac{1}{N-1} \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \\ &= \sqrt{\frac{1}{N-1} \cdot [(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_N - \bar{x})^2]},\end{aligned}\quad (\text{A2})$$

which defines the standard deviation of a single measured value of the mean. As we are interested in the deviation of the real value, we then calculated the standard error of the mean (SEM):

$$\sigma_{\bar{x}} = \frac{1}{\sqrt{N}} \cdot \sigma_x. \quad (\text{A3})$$

All quantities subject to error within this work are reported as SEM values. If the difference in two values with errors was calculated, we always assume the maximum error, which is defined as follows:

$$\Delta z = \sum_{j=1}^m \left| \frac{\delta f}{\delta x_j} \cdot \Delta x_j \right| \tag{A4}$$

$$= \left| \frac{\delta f}{\delta x_1} \cdot \Delta x_1 \right| + \left| \frac{\delta f}{\delta x_2} \cdot \Delta x_2 \right| + \dots + \left| \frac{\delta f}{\delta x_m} \cdot \Delta x_m \right|$$

Appendix B. Biosensor Occupation Scheme

Two basic biosensor designs were made, one for the 0.3 THz biosensors and one for the 0.6 THz and 1 THz biosensors. The main difference is the number of query fields, which are 16 and 25, the size of each query field, which are about 13.69 mm² and 8.41 mm² and the number of aDSRR elements, 61 (0.3 THz), 145 (0.6 THz) and 421 (1 THz). The query fields are arranged in a checkerboard pattern, where the row is numbered with consecutive letters and the column with a consecutive number. Figure A1 shows the design layout for the 0.3 THz biosensors and Figure A2 for the 0.6 THz and 1 THz biosensors. The number in each query field indicates the amount of substance used and is distributed randomly in order to avoid systematic errors. The sample amounts are 50 pmol, 25 pmol, 12.5 pmol and 2.5 pmol for the 0.3 THz biosensor, while the 0 pmol fields were loaded with DI water as a reference. The amount of substance was adjusted for the 0.6 THz and 1 THz biosensors as the area of the query fields was reduced and to achieve a comparable DNA film thickness. This results in an amount of substance of 30 pmol, 15 pmol, 7.5 pmol and 1.5 pmol for the 0.6 THz and 1 THz biosensor, while the 0 pmol fields were loaded with DI water as a reference. As was mentioned in the main article, the 2.5/1.5 pmol experiments were not used for further analysis, as this sample amount attained the limit of detection.

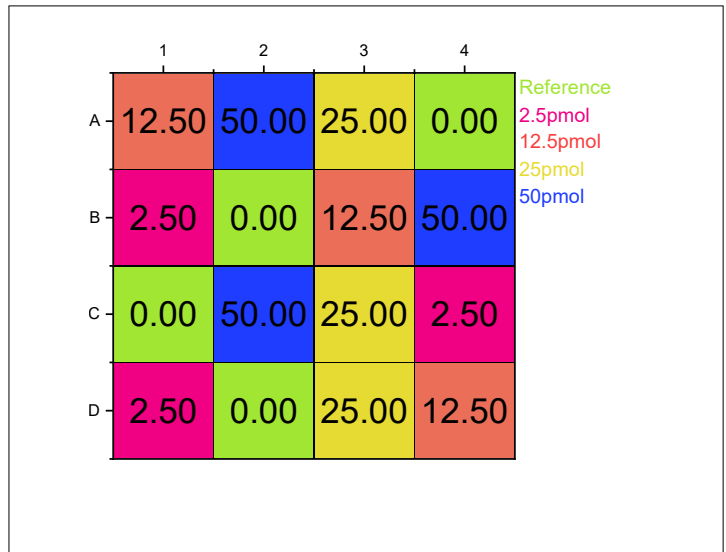


Figure A1. Occupation scheme for the 0.3 THz biosensors. The number in each query field indicates the deposited amount of substance for each field.

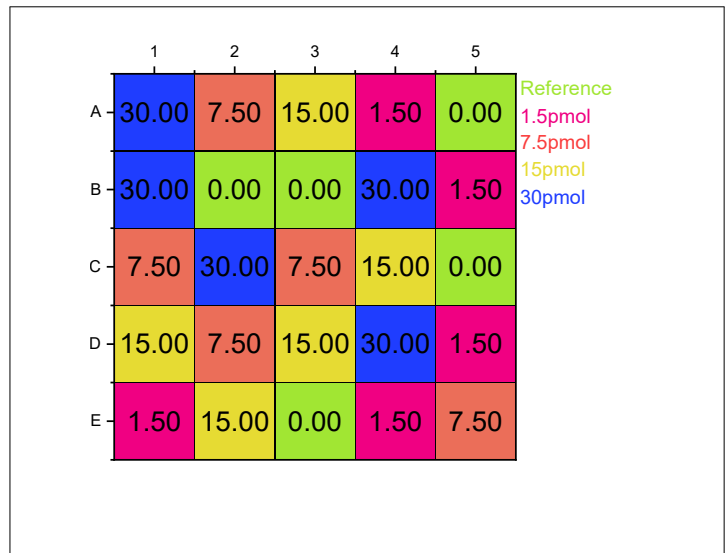


Figure A2. Occupation scheme for the 0.6 THz and 1 THz biosensors. The number in each query field indicates the deposited amount of substance for each field.

Appendix C. DNA Sample Composition

The ssDNA and dsDNA diluted solutions were prepared as indicated in Table A1. The subscript *d* represents the dsDNA samples and the subscript *s* represents the ssDNA samples, each at four different concentrations, *c*. In addition to the amounts of substance *n* for tssDNA and ssDNA, TCEP was added to the solution used to deprotect the DNA. The total volume of the solution is denoted by *V*.

Table A1. Composition of DNA samples including sample concentration *c*, amount of substance *n* and volume *V*.

Sample	<i>c</i> / $\mu\text{mol L}^{-1}$	n_{ssDNA} / pmol	n_{TCEP} / pmol	n_{ssDNA} / pmol	<i>V</i> / μL
<i>c</i> _{d1}	20	500	1000	500	25
<i>c</i> _{d2}	10	250	500	250	25
<i>c</i> _{d3}	5	125	250	125	25
<i>c</i> _{d4}	1	25	50	25	25
<i>c</i> _{s1}	20	500	1000	0	25
<i>c</i> _{s2}	10	250	500	0	25
<i>c</i> _{s3}	5	125	250	0	25
<i>c</i> _{s4}	1	25	50	0	25

References

1. Froehlich, H. Long-range coherence and energy storage in biological systems. *Int. J. Quantum Chem.* **1968**, *2*, 641–649. [[CrossRef](#)]
2. Zhuang, W.; Feng, Y.; Prohofsky, E.W. Self-consistent calculation of localized DNA vibrational properties at a double-helix-single-strand junction with anharmonic potential. *Phys. Rev. A* **1990**, *41*, 7033–7042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Brucherseifer, M.; Nagel, M.; Bolivar, P.H.; Kurz, H.; Bosserhoff, A.; Büttner, R.M. Label-free probing of the binding state of DNA by time-domain terahertz sensing. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, *77*, 4049–4051. [[CrossRef](#)]
4. Markelz, A.G.; Roitberg, A.; Heilweil, E.J. Pulsed terahertz spectroscopy of DNA, bovine serum albumin and collagen between 0.1 and 2.0 THz. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *320*, 42–48. [[CrossRef](#)]

5. Fischer, B.M.; Walther, M.; Jepsen, P.U. Far-infrared vibrational modes of DNA components studied by terahertz time-domain spectroscopy. *Phys. Med. Biol.* **2002**, *47*, 3807. [[CrossRef](#)]
6. Mickan, S.P.; Menikh, A.; Liu, H.; Mannella, C.A.; MacColl, R.; Abbott, D.; Munch, J.; Zhang, X.C. Label-free bioaffinity detection using terahertz technology. *Phys. Med. Biol.* **2002**, *47*, 3789. [[CrossRef](#)]
7. Debus, C.; Bolívar, P.H. Frequency selective surfaces for high sensitivity terahertz sensing. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91*, 184102. [[CrossRef](#)]
8. O'Hara, J.F.; Withayachumnankul, W.; Al-Naib, I. A review on thin-film sensing with terahertz waves. *J. Infrared Millim. Terahertz Waves* **2012**, *33*, 245–291. [[CrossRef](#)]
9. Herne, T.M.; Tarlov, M.J. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8916–8920. [[CrossRef](#)]
10. Weisenstein, C.; Schaar, D.; Katharina Wigger, A.; Schäfer-Eberwein, H.; Bosserhoff, A.K.; Haring Bolívar, P. Ultrasensitive THz biosensor for PCR-free cDNA detection based on frequency selective surfaces. *Biomed. Opt. Express* **2020**, *11*, 448–460. [[CrossRef](#)]
11. Plusquellic, D.F.; Siegrist, K.; Heilweil, E.J.; Esenturk, O. Applications of Terahertz Spectroscopy in Biosystems. *Chem. Phys. Chem.* **2007**, *8*, 2412–2431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Arora, A.; Luong, T.Q.; Krüger, M.; Kim, Y.J.; Nam, C.H.; Manz, A.; Havenith, M. Terahertz-time domain spectroscopy for the detection of PCR amplified DNA in aqueous solution. *Analyst* **2012**, *137*, 575–579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Jeong, S.Y.; Cheon, H.; Lee, D.; Son, J.H. Determining terahertz resonant peaks of biomolecules in aqueous environment. *Opt. Express* **2020**, *28*, 3854–3863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Globus, T.; Woolard, D.; Crowe, T.W.; Khromova, T.; Gelmont, B.; Hesler, J. Terahertz Fourier transform characterization of biological materials in a liquid phase. *J. Phys. Appl. Phys.* **2006**, *39*, 3405–3413. [[CrossRef](#)]
15. Lvovska, M.I.; Seeman, N.C.; Sha, R.; Globus, T.R.; Khromova, T.B.; Dorofeeva, T.S. THz Characterization of DNA Four-Way Junction and Its Components. *IEEE Trans. Nanotechnol.* **2010**, *9*, 610–617. [[CrossRef](#)]
16. Yang, K.; Yu, W.; Huang, G.; Zhou, J.; Yang, X.; Fu, W. Highly sensitive detection of *Staphylococcus aureus* by a THz metamaterial biosensor based on gold nanoparticles and rolling circle amplification. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 26824–26833. [[CrossRef](#)]
17. Lee, S.H.; Choe, J.H.; Kim, C.; Bae, S.; Kim, J.S.; Park, Q.H.; Seo, M. Graphene assisted terahertz metamaterials for sensitive bio-sensing. *Sens. Actuators Chem.* **2020**, *310*, 127841. [[CrossRef](#)]
18. Tang, M.; Zhang, M.; Yan, S.; Xia, L.; Yang, Z.; Du, C.; Cui, H.L.; Wei, D. Detection of DNA oligonucleotides with base mutations by terahertz spectroscopy and microstructures. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0191515. [[CrossRef](#)]
19. Tang, M.; Zhang, M.; Xia, L.; Yang, Z.; Yan, S.; Wang, H.; Wei, D.; Du, C.; Cui, H.L. Detection of single-base mutation of DNA oligonucleotides with different lengths by terahertz attenuated total reflection microfluidic cell. *Biomed. Opt. Express* **2020**, *11*, 5362. [[CrossRef](#)]
20. Shih, K.; Pitchappa, P.; Jin, L.; Chen, C.H.; Singh, R.; Lee, C. Nanofluidic terahertz metasensor for sensing in aqueous environment. *Appl. Phys. Lett.* **2018**, *113*, 071105. [[CrossRef](#)]
21. Naftaly, M.; Miles, R.E. Terahertz time-domain spectroscopy for material characterization. *Proc. IEEE* **2007**, *95*, 1658–1665. [[CrossRef](#)]
22. Singh, R.; Al-Naib, I.A.I.; Koch, M.; Zhang, W. Sharp Fano resonances in THz metamaterials. *Opt. Express* **2011**, *19*, 6312–6319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Fedotov, V.A.; Rose, M.; Prosvirnin, S.L.; Papasimakis, N.; Zheludev, N.I. Sharp Trapped-Mode Resonances in Planar Metamaterials with a Broken Structural Symmetry. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *99*, 147401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Papasimakis, N.; Fedotov, V.A.; Zheludev, N.I.; Prosvirnin, S.L. Metamaterial analog of electromagnetically induced transparency. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *101*, 253903. [[CrossRef](#)]
25. Lahiri, B.; McMeekin, S.G.; de La Rue, R.M.; Johnson, N.P. Resonance hybridization in nanoantenna arrays based on asymmetric split-ring resonators. *Appl. Phys. Lett.* **2011**, *98*, 153116. [[CrossRef](#)]
26. Falcone, F.; Lopetegi, T.; Laso, M.A.; Baena, J.D.; Bonache, J.; Beruete, M.; Marqués, R.; Martín, F.; Sorolla, M. Babinet principle applied to the design of metasurfaces and metamaterials. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 197401. [[CrossRef](#)]
27. Booker, H.G. Slot aerials and their relation to complementary wire aerials (Babinet's principle). *J. Inst. Electr. Eng.-Part Iiia Radiolocation* **1946**, *93*, 620–626. [[CrossRef](#)]
28. Johnson, P.B.; Christy, R.W. Optical Constants of the Noble Metals. *Phys. Rev. B* **1972**, *6*, 4370–4379. [[CrossRef](#)]
29. Grischkowsky, D.; Keiding, S.; van Exter, M.; Fattinger, C. Far-infrared time-domain spectroscopy with terahertz beams of dielectrics and semiconductors. *JOSA B* **1990**, *7*, 2006–2015. [[CrossRef](#)]
30. Debus, C. A high-Sensitivity THz-Sensing Technology for DNA Detection with Split-Ring Resonator Based Biochips. Ph.D. Thesis, Universität Siegen, Siegen, Germany, 2013.
31. Deninger, A.J.; Roggenbuck, A.; Schindler, S.; Preu, S. 2.75 THz tuning with a triple-DFB laser system at 1550 nm and InGaAs photomixers. *J. Infrared Millim. Terahertz Waves* **2015**, *36*, 269–277. [[CrossRef](#)]
32. Guo, S.J.; Ruan, C.J.; Kong, D.Y.; Dai, J.; Zhang, Y.; He, W.L. Research on terahertz transmission characteristics of nonpolar liquid based on frequency-domain spectroscopy. *JOSA B* **2020**, *37*, 1942. [[CrossRef](#)]
33. Inutsuka, M.; Horinouchi, A.; Tanaka, K. Aggregation States of Polymers at Hydrophobic and Hydrophilic Solid Interfaces. *ACS Macro Lett.* **2015**, *4*, 1174–1178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Serita, K.; Murakami, H.; Kawayama, I.; Tonouchi, M. A Terahertz-Microfluidic Chip with a Few Arrays of Asymmetric Meta-Atoms for the Ultra-Trace Sensing of Solutions. *Photonics* **2019**, *6*, 12. [[CrossRef](#)]
35. Akoglu, H. User's guide to correlation coefficients. *Turk. J. Emerg. Med.* **2018**, *18*, 91–93. [[CrossRef](#)]
36. Arcella, A.; Portella, G.; Collepardo-Guevara, R.; Chakraborty, D.; Wales, D.J.; Orozco, M. Structure and properties of DNA in apolar solvents. *J. Phys. Chem.* **2014**, *118*, 8540–8548. [[CrossRef](#)]
37. Domínguez, C.M.; Ramos, D.; Mendieta-Moreno, J.I.; Fierro, J.L.G.; Mendieta, J.; Tamayo, J.; Calleja, M. Effect of water-DNA interactions on elastic properties of DNA self-assembled monolayers. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zhang, N.H.; Chen, J.Z. Mechanical properties of double-stranded DNA biolayers immobilized on microcantilever under axial compression. *J. Biomech.* **2009**, *42*, 1483–1487. [[CrossRef](#)]

Kapitel 7

THz-Detektion von Biomolekülen in wässriger Umgebung – Status und Perspektiven für die Analyse unter physiologischen Bedingungen und dem klinischen Einsatz

Der Inhalt dieses Kapitels wurde veröffentlicht in:

Weisenstein, C., Wigger, A.K., Richter, M., Sczech, R., Bosserhoff, A.K. and Haring Bolívar, P., THz detection of biomolecules in aqueous environments—Status and perspectives for analysis under physiological conditions and clinical use, Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves 42 (6), 607-646 (2021).¹ Der nachfolgende Abschnitt gibt eine übersetzte Zusammenfassung des referenzierten Artikels wieder.

7.1 Einleitung, Zusammenfassung und Stand der Forschung

In den Kapiteln 5 und 6 wurde die Entwicklung und Anwendung eines hochempfindlichen THz-Biosensors für die Detektion von Biomolekülen beschrieben. Die Entwicklung dieses Biosensors wurde auf die Untersuchung von getrockneten Proben design und optimiert. Auf robuste Biomoleküle wie DNA hat die Trocknung keinen oder nur geringen Einfluss. Komplexe Bio-(makro)-Moleküle wie Proteine verändern jedoch ihre komplexe dreidimensionale Struktur (Konformation) in Abhängigkeit von externen Einflussfaktoren und können durch Trocknen in der ursprünglichen Funktion eingeschränkt oder zerstört werden. Das Design und die Entwicklung eines anwendungsbezogenen THz-Biosensors setzt daher die Messung in flüssigen Umgebungen, unter physiologisch relevanten Bedingungen und weiterhin ein umfangreiches Wissen über das zu analysierende Biomolekül voraus. Diese Notwendigkeit

¹Veröffentlicht als Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative-Commons-Lizenz CC BY verbreitet wird, die die uneingeschränkte Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in jedem Medium erlaubt, sofern das Originalwerk ordnungsgemäß zitiert wird. Für die Wiederverwendung dieses Artikels ist keine gesonderte Genehmigung erforderlich. Informationen zur Lizenz: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
Link zum Artikel: <https://doi.org/10.1007/s10762-021-00792-9>

stellt für die klassische THz-Bioanalytik eine große Herausforderung dar, da die Absorption der THz-Strahlung in Wasser sehr groß ist und Messungen in der natürlichen flüssigen Umgebung eines Analyten in Bezug auf die Empfindlichkeit limitiert sind. Um eine Übersicht darüber zu geben, welche biochemisch relevanten Analyten bereits mit THz-Analysemethoden in wässrigen Medien untersucht wurden, rekapituliert der in diesem Kapitel vorgestellte Review-Artikel den aktuellen Status von THz-Untersuchungen und formuliert Anforderungen für die zukünftige Etablierung der THz-Bioanalytik als ergänzendes Werkzeug im Repertoire der bioanalytischen Standardmethoden. Unter diesen Gesichtspunkten werden die nachweisbaren Konzentrationen von Ionen, Kohlenhydraten, (Poly-)Nukleotiden, Wirkstoffen, Proteinen und verschiedenen Biomakromolekülen aus THz-Experimenten mit physiologischen Konzentrationen und unteren Nachweisgrenzen moderner bioanalytischer Methoden verglichen.

Für diese Übersicht wird dazu zunächst eine Zusammenfassung über alle biomolekularen THz-Experimente in flüssigen Umgebungen gegeben, die bis zum Erscheinen dieser Veröffentlichung publiziert wurden. Dazu wird die untere Nachweisgrenze (engl. lower detection limit, LDL) eines gemessenen Biomoleküls in der Einheit [mol/L] als Funktion des Molekulargewichts in der Einheit [g/mol] in einer doppel-logarithmischen Darstellung gezeigt. Um eine Einordnung der Ergebnisse zu ermöglichen, werden zusätzlich physiologische Konzentrationen für einige repräsentative Analyten angegeben. Um einen Vergleich mit etablierten bioanalytischen Standardmethoden zu ermöglichen, werden Nachweisgrenzen der repräsentativen Analyten mit Methoden wie Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) angegeben. Diese Methoden stellen damit den Benchmark für die THz-Technologie dar. Grundsätzlich zeigt diese Übersicht physiologisch relevante Biomoleküle, die Funktionen erfüllen oder künstliche Moleküle mit biologisch relevanten Eigenschaften. Um eine übersichtliche Auswertung der Experimente zu ermöglichen, erfolgt eine Klassifizierung der Analyten in sechs funktionale Gruppen: (A) Ionen, (B) Kohlenhydrate, (C) Aminosäuren, (D) Wirkstoffe, (E) leichte und mittelschwere Proteine und (F) große Proteine und schwere Biomakromoleküle. Aus dieser Übersicht und der doppel-logarithmischen Darstellung können bereits allgemeingültige Aussagen abgeleitet werden. So erreichen bioanalytische Standardmethoden im Mittel eine um etwa sieben Größenordnungen höhere Empfindlichkeit als veröffentlichte THz-Analysen. Weiterhin gibt es sowohl für biomolekulare THz-Analysen, als auch für etablierte bioanalytische Standardmethoden einen übergeordneten Trend, nachdem Biomoleküle mit niedrigerem Molekulargewicht eine hohe Konzentration für die Detektion voraussetzen und Biomoleküle mit hohem Molekulargewicht in niedrigerer Konzentration detektiert werden können. Die Auswertung dieses Trends ergibt eine Skalierung mit $LDL \propto k^{-1.53 \pm 0.13}$, wobei k die Steigung einer Geraden in doppel-logarithmischer Darstellung beschreibt. Da die Steigung deutlich kleiner als -1 ist liegt ein superlinearer Verlauf vor, der vermutlich auf delokalisierte Moden zurückzuführen ist, die mit der Größe des untersuchten Moleküls zunehmen. Daraus resultiert ein Potential für höhere Empfindlichkeit von THz-Analysen vor allem für große Proteine und Makromoleküle, die für die Optimierung des LDL vorteilhaft ist.

Innerhalb dieser Zusammenfassung kann keine detaillierte Analyse der einzelnen funktionalen Gruppen abgebildet werden, vielmehr sollen allgemein gültige Aussagen aus den Untersuchungen des breiten Spektrums der mittels THz-Analysen untersuchten Biomolekülen abgeleitet werden. Der Vergleich zwischen der physiologisch Konzentrationen und der unteren Nachweisgrenzen, die mittels THz-Sensorik erreicht wurden zeigt, dass nur teilweise eine adäquate Empfindlichkeit erreicht wird, welche in manchen Fällen sogar um einige Größenordnungen von der für eine Detektion erforderlichen Empfindlichkeit abweicht. Im Gegensatz dazu sind die etablierten modernen bioanalytischen Methoden generell so empfindlich, sodass die physiologisch Konzentrationen weit unterschritten wird und damit die Anforderungen im Bereich der klinischen Diagnostik erfüllt werden. Damit ist klar, dass in der THz-Sensorik technologische Verfahren benötigt werden, welche die Empfindlichkeit signifikant verbessern oder zusätzliche Eigenschaften und Funktionen bereitstellen, um ein wettbewerbsfähiges analytisches Potenzial zu entwickeln.

Da bei der Untersuchung von Biomolekülen mit THz-Strahlung mehrere Schwingungsmoden gleichzeitig angeregt werden, zählt diese zu den „*ensemble averaging*“-Methoden, wodurch die daraus resultierende Unspezifität eine große Herausforderung für die Etablierung von THz-basierten Analysetechniken für den Nachweis von Biomolekülen in wässrigen Medien darstellt. Wie bereits erwähnt, besteht außerdem häufig ein großer Unterschied zwischen der Empfindlichkeit, die mit THz-Sensortechniken direkt detektierbar ist und dem physiologischen Konzentrationsniveau. Daher sind Ansätze zur deutlichen Erhöhung der Empfindlichkeit erforderlich. Ein vielversprechendes Konzept zur Erhöhung der Empfindlichkeit ist die Verwendung von feldverstärkenden Elementen, zum Beispiel in Form von Metamaterialien oder Nanoslot-Antennen. Einen guten Überblick geben hier die Review-Artikel von O´Hara et al. [10] und von Adak et al. [89], wobei die dort vorgestellten Arbeiten fast ausschließlich mit getrockneten Proben durchgeführt wurden. Die größte Herausforderung bei der Verwendung von Metamaterial-basierten Sensoren ist die hohe THz-Absorption von Wasser, die üblicherweise die für die Biosensorik verwendete Resonanz des Metamaterials vollständig dämpft und damit auslöscht. Erst in jüngerer Vergangenheit wurden erste Forschungsergebnisse vorgestellt, in denen Konzepte für mikro- und nanofluidische Strukturen in Kombination mit Metamaterialien verwendet wurden, um den Einfluss der Wasserabsorption zu verringern [18,25,85]. Insbesondere hervorzuheben ist an dieser Stelle die Arbeit von Serita et al. [85], in der die vorgestellten Ergebnisse um etwa zwei Größenordnungen empfindlicher sind, als vergleichbare klassische THz-Techniken und damit das große Potenzial von mikrofluidischen THz-Sensoren auf Basis von Metamaterialien demonstrieren. Aufgrund des großen Interesses an dieser Arbeit gehen wir davon aus, dass dieses Thema Gegenstand intensiverer Forschung sein wird und das Potenzial hat, die Empfindlichkeit von biomolekularen THz-Analysen zu erhöhen.



THz Detection of Biomolecules in Aqueous Environments—Status and Perspectives for Analysis Under Physiological Conditions and Clinical use

Christian Weisenstein¹  · Anna Katharina Wigger¹ · Merle Richter¹ · Robert Sczech¹ · Anja Katrin Bosserhoff² · Peter Haring Bolívar¹

Received: 8 January 2021 / Accepted: 7 April 2021 / Published online: 31 May 2021

© The Author(s) 2021

Abstract

Bioanalytical THz sensing techniques have proven to be an interesting and viable tool for the label-free detection and analysis of biomolecules. However, a major challenge for THz bioanalytics is to perform investigations in the native aqueous environments of the analytes. This review recapitulates the status and future requirements for establishing THz biosensing as a complementary toolbox in the repertoire of standard bioanalytic methods. The potential use in medical research and clinical diagnosis is discussed. Under these considerations, this article presents a comprehensive categorization of biochemically relevant analytes that have been investigated by THz sensing techniques in aqueous media. The detectable concentration levels of ions, carbohydrates, (poly-)nucleotides, active agents, proteins and different biomacromolecules from THz experiments are compared to characteristic physiological concentrations and lower detection limits of state-of-the-art bioanalytical methods. Finally, recent experimental developments and achievements are discussed, which potentially pave the way for THz analysis of biomolecules under clinically relevant conditions.

Keywords Biological · Medical imaging · Spectroscopy · Hydration · Water-protein interactions · Spectral methods · Analysis

1 Introduction

Over the past three decades, significant advances in the development of widely usable THz systems have generated a plethora of research activities by a rapidly growing

✉ Christian Weisenstein
christian.weisenstein@uni-siegen.de

THz community in numerous application fields. For several years, the THz community has demonstrated in a large number of articles that, in the electromagnetic spectrum, the long-wavelength end of the far-infrared range shows a huge potential for industrial utilisation and scientific research [5, 69, 109, 151]. The combination of low-energy radiation with the terahertz transparency of various materials provides ample opportunities for versatile fields of applications [46, 47, 167]. Due to the characteristic resonances of many biomolecules at THz frequencies, life sciences are a major target field of THz research. In this respect, one of the primary objectives is the development of analytical tools for biomolecular research and disease diagnostics. In addition to the potential application in the bioanalytical field [148, 163, 191], in life sciences, there is a general cross-platform interest to quantitatively record and qualitatively describe physiological relevant analytes, in particular functional units like proteins. Therefore, the main aim is the detection of a desired molecule and the characterization of its properties and interactions in the native and complex biomolecular network [45, 54, 124]. In this overview, we concentrate on an assessment and evaluation of the current state of THz-based bioanalytic experimental tools, which show a potential application in the fields of clinical diagnostics and medical research.

The main part of the article presents a review of the minimal detected concentration of physiologically relevant analytes in their native aqueous environments that have been investigated by state-of-the-art THz measurement techniques. Although the determination of the lower detection limit (LDL) in the sense of its precise definition requires more information on the chemical measurement process for each technique and analyte involving for instance elaborate serial dilution experiments [32, 65, 105], the minimal reported concentration will be referred to as attained LDL over the course of this article, as the wide majority of THz analysis to date do not perform dilution experiments. Presenting a systematic categorization of biomarkers and considering representative analytes, the (patho-)physiological relevance of these biomarkers is defined and typical physiological concentrations or typical reference ranges are provided. Subsequently, the sensitivities measured by THz techniques are compared to established state-of-the-art bioanalytical methods. This comparison helps to set a quantitative target to increase both the sensitivity and the selectivity of THz sensing techniques. Evidently, this is essential in order to establish them as a competitive label-free alternative detection technique, which can be appropriate for *in vivo* and real-time application in clinical diagnostics and medical research.

In the last part of the article, we invite the THz community to participate in this critical discussion, assessing the current state-of-the-art of THz sensing of biomolecules in native aqueous environments. Valuable experimental insights reflect important steps and partially outstanding contributions towards THz analysis of biomolecules in aqueous environments under physiological conditions. Nevertheless, recommendations on the prospective THz sensing of biomolecules in absorbing/aqueous media are proposed. These recommendations are intended to promote the broader use of THz radiation in the biomedical and clinical context.

2 Experimental Approaches for THz Sensing of Biomolecular Analytes in Aqueous Environments

In this section, we review and evaluate the potential of THz sensing techniques for the detection and characterization of biomolecular compounds in their native absorbing environments. The following evaluation is formatted as a dialogue in order to illustrate the varied aspects and requirements which need to be addressed before a widespread application of THz techniques can be envisaged.

Which Analytes Are of Fundamental Interest, Independently from the Sensing Platform? Biomolecular analytes of fundamental interest have a significant (patho)physiological relevance and are accessible to analytic procedures and instruments. Therefore, their occurrence in an easily accessible natural context like body fluids is of paramount importance and is a major concern in clinical diagnostics. Furthermore, it is interesting to investigate biomolecules that are associated with specific biochemical functionalities (i.e. *biomarkers*). Molecules like enzymes, antibodies, other proteins, DNA or biomacromolecules in general are often characterized by a higher degree of structural complexity closely associated with their unique and selective biochemical function.

Which Established Techniques Do Support the Quantitative Detection and Qualitative Description of Biomacromolecules? There is a wide variety of established bioanalytical tools that can be used for molecular detection and characterization. The application of these techniques in a general sense are summarized in Table 1.

While the described bioanalytical tools focus mainly on the detection and characterization of proteins, other selective analytical techniques are available for the analysis of nucleic acids (e.g. reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for the qualitative detection of gene expression products [19], DNA sequencing techniques [145] and fluorescence-based DNA-microchip arrays [143]).

As shown by the immense literature on biosensing techniques [62, 168] there are many established and emerging bioanalytical methods that can be used for the detection and characterization of biomolecules.

Which Opportunities Can Be Exploited by THz Radiation for Detecting and Characterizing Biomolecules? In comparison to established bioanalytical techniques, important characteristics of THz technology are provided by intrinsic biomolecular resonances that can be excited and detected at THz frequencies [18, 130, 170, 172]. The capability of far infrared electromagnetic radiation to induce intra- and intermolecular oscillations is a unique advantage and a prominent attribute of macromolecules due to the excitation of vibrational modes that are delocalized over a large group of atoms [15, 18]. This fact is specifically interesting for molecular characterization under physiological conditions because the molecules permanently interact with their complex environment. One important aspect of these interactions are hydrogen bonds whose dynamics can be observed along with hydration dynamics [15, 18]. This may help in decoding complex molecular functionalities and reaction

Table 1 Selection of the main established techniques for the quantitative detection and qualitative description of biomacromolecules

Identification of molecules	– Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) [187]
	– High-performance liquid chromatography (HPLC) [187]
	– UV-Vis spectroscopy [17]
	– Immunoassays [92]
Evaluation of size and mass	– Affinity chromatography [73]
	– Mass spectrometry [187]
	– Gel chromatography [97]
Observation of the shape and structure	– Centrifugation [86]
	– X-ray diffraction (XRD) analysis [169]
	– Nuclear magnetic resonance (NMR) [74]
Investigation of the function	– Circular dichroism (CD) [22]
	– Ligand-binding assay via surface plasmon resonance (SPR) [63]
	– Comparing the amino acid sequence with entries in databases such as basic local alignment search tool (BLAST) [4]
Determination of the quantity	– Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [87]
	– Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) [67]
	– Western Blotting [186]

mechanisms. Based on this, THz techniques could uniquely and significantly contribute in developing new tools in biomedical diagnostics in order to gain information about unknown or complicated diseases such as cancer and neurodegenerative or cardiovascular disorders.

Apart from a desired reliable quantitative determination and characterization of molecular binding events, there is an ongoing demand for developing therapeutic applications, too [153, 166]. Generally, THz radiation would be showing its complete potential when applied, for instance, in the label-free and real-time monitoring of therapeutically relevant analytes within complex matrices *in vivo* to ensure accurate dosage during chemotherapeutical treatments [79]. In a scenario closer to realization, THz radiation may be used for assisting probing the effectiveness of binding events of therapeutic agents of purified samples. Yet, some challenges remain until these visions can be achieved.

What Aspects Aggravate Analyses of Biomolecules in Aqueous Media? Many interesting target molecules are embedded in intracellular processes which are generally difficult to access with any direct bioanalytical method. This may always demand sample preparation and purification to some extent prior to analysis. Apart from this, there are two main issues preventing widespread THz-based detection of

biomolecules. First, the THz excitation of large biomolecular entities generates many excited vibrational modes simultaneously. As a result, both the non-specificity of the THz excitation and the THz response generally tend to increase the inhomogeneous broadening of the spectrum with increasing intra- and intermolecular sample complexity and/or disorder [84]. The selectivity, or—in its ultimate form—specificity, of a technique describes the extent to which other stimuli (chemical or physical) can interfere with an analyte's signal. If such a signal cannot be explicitly assigned to one analyte species, the corresponding method must be denoted as “non-specific” or even “non-selective”. As mentioned above, THz radiation has the capability to excite a multitude of, e.g. vibrational or rotational modes which in many cases are not distinguishable and will therefore be referred to as the “non-specificity of THz excitation” within this manuscript [34, 105]. This effect depends on the molecular conformation and crystallinity. Although there is a good possibility of observing the spectral features of small molecules [126], the spectral features of large molecules tend to vanish in the broadened THz spectral response [99]. Consequently, it becomes difficult to distinguish complex molecules that exhibit similar structures. This directly affects the THz detection and characterization potential. In addition, some important biomolecular investigations are performed under physiological conditions that are significantly influenced by the molecular interplay [13]. The term physiological indicates *inter alia* in aqueous environments leading to a second obstacle of investigation techniques in the THz range. Water in liquid form exhibits a high absorption coefficient at THz frequencies [80, 89]. Therefore, the dominant dielectric response of water can easily mask the analytes dielectric response. To counteract this problem and in order to discriminate both the spectral responses of the biomolecular aqueous solution and water, highly concentrated sample solutions are presently needed. Consequently, as shown in more detail in Sect. III, the values of typical sample concentrations (or densities, etc.) measured so far are well beyond physiological concentrations and typically close to saturation. Depending on the experiment design, the dielectric response can also be affected by overall charge [132] or partially be a function of the significant water displacement [85]. At this point, it must be emphasized that in contrast to the term “physiological concentration”, to perform an experiment under physiological conditions requires the mimicry of an *in vivo* environment in all relevant factors such as, but not limited to, temperature, pressure, pH, dielectric potential and presence of all components of a cell-like matrix.

In summary, the direct detection (by differentiation of vibrational modes) of complex biomolecules using available state-of-the-art THz sensing approaches is currently a challenging task due to high water absorption as well as low THz excitation and detection selectivity.

Which THz Techniques Are Traditionally Applied for Biomolecular Detection and Characterization in Aqueous Media? For THz investigation of polar liquids, such as aqueous solutions, or more specifically bioanalytes in their native aqueous environment, the transmission [80] and reflection [72] setups as well as the modified schematic derivatives (i.e. attenuated total reflection [113], transmission through reverse micelles that are distributed in non-polar solvents [108] and waveguide-based sensors [121]) are the widely adopted techniques (Fig. 1). Other alternative

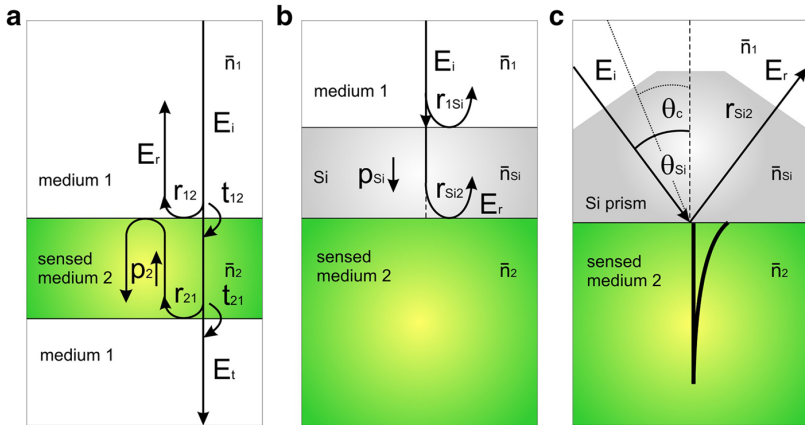


Fig. 1 Schematic of the traditionally employed THz sensing techniques for spectroscopy of absorbing liquids. **a** Transmission through a stratified film consisting of three homogeneous media with the complex refractive index \bar{n}_1 , \bar{n}_2 , and \bar{n}_3 . The transmission (t) and reflection (r) coefficient indices represent the medium interfaces. Each completed field propagation through medium 2 is taken into account with the propagation term p_2 . **b** The intensity of the reflected beam is changed according to the refractive index inside sensed medium 2. A self-referencing system is established by using additional interfaces introduced by a window (e.g. silicon). Expressions r_{Si2} and r_{Si1} are used to calculate the reflectivity R . **c** Attenuated total reflection (ATR): the incident field is totally reflected internally at the prism/sensed medium interface for angles θ_{Si} larger than the critical angle θ_c . The evanescent field reduces the intensity of the reflected beam by penetrating and interacting with the solution. The reflectivity can be calculated by $ATR = r_{Si2}$ and r_{Siair} , which represents the reference situation

techniques are being developed, such as THz ellipsometry approaches for the determination of refractive indices of liquids [9, 37, 152], which, however, have not yet been widely used for the detection of biomolecules. Furthermore, first experiments have been performed recently using a THz near-field setup for the detection of biomolecules [58]. For more technical details on the traditional THz sensing approaches of transmission and reflection, we would like to refer to a comprehensive review article from Jepsen et al. [69]. The following paragraphs summarize the analytical formulas that describe such experiments in order to allow quantitative sensitivity assessment of the corresponding techniques.

Throughout the article, we refer to the Fresnel transmission (t_{mn}^p) and reflection (r_{mn}^p) coefficients for a p-polarized plane-wave incident at an interface that separates two homogeneous media m and n determined by

$$r_{mn}^p = \frac{E_r}{E_i} = \frac{\bar{n}_m \cos(\theta_n) - \bar{n}_n \cos(\theta_m)}{\bar{n}_m \cos(\theta_n) + \bar{n}_n \cos(\theta_m)}, \quad (1)$$

$$t_{mn}^p = \frac{E_t}{E_i} = \frac{2\bar{n}_n \cos(\theta_n)}{\bar{n}_n \cos(\theta_m) + \bar{n}_m \cos(\theta_n)}, \quad (2)$$

from which the ratio of the reflected (transmitted) and incident electric fields E_r (E_t) and E_i can be calculated, respectively. The complex refractive index is denoted by \bar{n} while θ describes the angle between the incident and transmitted waves [104].

The transmission configuration is the most popular spectroscopic approach. In most cases, a thin cuvette is loaded with the liquid being analyzed that produces a homogeneous stratified medium as shown in Fig. 1(a). Considering the Fresnel coefficients, the transmitted electric field for a sample (E_{sam}) and a reference using an empty cuvette (E_{ref}) can be expressed as

$$E_{\text{sam}}(\omega) = t_{12}p_2t_{23} \sum_{k=0}^{\infty} [r_{12}p_2^2r_{23}]^k E_i(\omega), \quad (3)$$

$$E_{\text{ref}}(\omega) = t_{1a}p_a t_{a3} \sum_{k=0}^{\infty} [r_{1a}p_a^2r_{a3}]^k E_i(\omega). \quad (4)$$

The sum term represents Fabry-Pérot resonances and the propagation term is denoted by

$$p_2 = \exp\{-i\bar{n}_2\omega d/c\}, \quad (5)$$

where ω is the angular frequency, d is the film thickness and c is the speed of light.

Depending on the experimental conditions, Fabry-Pérot resonances may occur inside the thin layers. The order of k in Eqs. 3 and 4 refers to the number of the total forward and backward reflections inside the thin film. The impact of such etalon effects gains importance with decreasing layer thickness [38, 39]. The complex field transmission coefficient of the sample $T(\omega)$ can be obtained from $E_{\text{sam}}(\omega)/E_{\text{ref}}(\omega)$ when both the amplitude and phase of the electromagnetic wave are recorded. In order to obtain the complex refractive index $\bar{n}_2 = n - i\kappa$, fitting algorithms can be used to numerically approach the measured value of $T(\omega)$ [42].

The ideal thickness of the sample strongly depends on the absorption coefficient of the liquid under test considering the transmission configuration in Fig. 1a. The sampling of non-polar liquids helps extend the thicknesses of the sample in the range of millimeter to centimeter [78, 125]. The thickness is usually reduced to $d \leq 200 \mu\text{m}$ in the case of water and other high absorbing liquids [8, 12, 60, 80, 136, 171, 188]. A sophisticated approach to extend the propagation path length is shown by inverse micelles, which reduce the overall absorption of the system [16, 108]. In order to characterize absorbing liquids, the general requirement of short propagation distances has also led to the development of wave guiding structures for tuning electromagnetic field liquid interactions [24, 121, 140].

An alternative to measure liquids that are difficult to access in a transmission configuration is the THz reflection technique. As depicted in Fig. 1b, reflection helps establish a self-referencing system. One single scan can simultaneously detect two reflected pulses in the sample when a second interface is introduced (e.g. a silicon window). The first pulse can be used as a reference if both signals are separated to a sufficient degree from each other in time domain. Then, the reflectivity at normal incidence is calculated from $R = t_{1\text{Si}}t_{\text{Si}1}r_{\text{Si}2}p_{\text{Si}1}^2/r_{1\text{Si}}$ with $\theta_n = 0^\circ$. Using this approach (Fig. 1b), one single THz scan can also help determine the optical constants of an analyte as introduced by [70, 110, 134, 164].

Another alternative, terahertz attenuated total reflection, has been developed to analyze high absorbing materials [61]. A typical setup is shown in Fig. 1c. Contrary to the optical frequency range, as the penetration length roughly increases with the wavelength, the penetration depth of the evanescent field in the sensed medium becomes significantly larger in the THz regime. The three system configurations presented are used, among other things, depending on the absorption coefficient and thickness of the sample. The measurement time can vary greatly depending on the type of measurement system used. For typical commercial available systems, it can vary from 33 ms per scan [77] to 36 s per scan for a homemade THz-TDS system [159] independent from the measurement configuration. Faster measurement systems are also available, but it should be noted here that the absolute measurement time is not the decisive factor, since typical preparatory steps of biochemical analyses such as purification, immobilization or absorption take significantly more time.

According to Fig. 1c, by applying Snell's law, Eq. 1 can be represented by the expression

$$r_{Si,2} = \frac{n_{Si} \sqrt{n_2^2 - n_{Si}^2 \sin^2 \theta_{Si}} - n_2 \cos \theta_{Si}}{n_{Si} \sqrt{n_2^2 - n_{Si}^2 \sin^2 \theta_{Si}} + n_2 \cos \theta_{Si}}. \quad (6)$$

Then, the attenuated total reflectivity $ATR = r_{Si2}/r_{Si,air}$ is used to calculate amplitude and phase, considering the reference situation of the prism exposed to air ($n_{air} = 1$) [113]. In case of an unknown liquid below the prism, this configuration can help determine the optical constants for angles larger than the critical angle. This method has been applied in several liquids, especially aqueous bioanalyte solutions [30, 103, 113, 184, 185].

Under What Circumstances Are THz Measurements Typically Performed? In order to avoid the signal amplitude to decay to the noise floor, the interaction path length between THz waves and absorbing medium is reduced within traditional THz sensing approaches. In most cases, the short interaction length is compensated by high analyte concentrations to yield a measurable signal response. For traditional THz sensing techniques, a typical measurement is performed under idealized conditions (enrich analyte concentrations, purify sample matrices, decrease temperature, etc.) and therefore non-physiologically.

3 Overview and Categorization of Biomolecular Analytes Studied by THz Techniques in Aqueous Environments

In the following sections, physiological relevant analytes, e.g. molecules that are a meaningful part of signal cascading, immune response, metabolisms and synthesis processing, are considered and classified in typical subcategories. To some extent, artificial molecules with biologically relevant properties are also considered. Basically, the study of such candidates at the molecular level can reveal valuable mechanistic information. In the scope of this article, experiments with organic solvent solutions such as methanol, acetonitrile and kerosene were excluded in order to

focus on bioanalytes in their native aqueous environment. These analytes have been measured using one of the traditional THz measurement techniques (Fig. 1) or their schematic derivatives.

An overall assessment (to the best of our knowledge) of all THz biomolecular sensing experiments performed in aqueous environments to date is presented. For this purpose, in Fig. 2, the measured analyte concentrations that are considered in all reviewed THz studies are depicted as a function of the molecular weight (depicted as white circles). The lower detection limit (LDL) is plotted for the THz experiments, which is defined by the lower concentration level that generates a measurable and distinguishable signal change. For those cases in which analyte concentrations were only reported by weight ρ [g/L], the molar concentration c [mol/L] (equivalent to molarity c [M]) is calculated to compare all reported values. Furthermore, we depict (patho-)physiological concentration levels of representative analyte candidates (red squares) which were taken from reference ranges and indicating typical

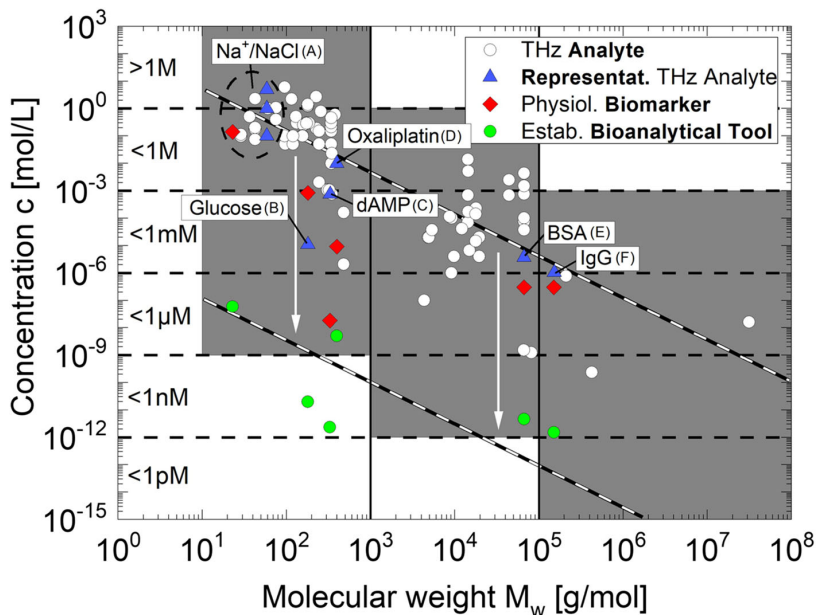


Fig. 2 Diagram of the reported sensitivities (LDL values) of physiological relevant analytes measured using the traditional THz sensing techniques (white dots). The upper dashed line represents the overall trend of decreasing detection limits with increasing molecular weights. The representative analytes are highlighted (blue triangles). Different concentration levels of the same analyte refer to different reported values from different groups (e.g. NaCl). For comparison, the representative physiological concentration levels are marked (red squares). Typical detection limits are shown for relevant state-of-the-art bioanalytical sensing techniques (green dots). The lower line shows the parallel shifted average THz sensitivity line. The spacing between both lines (indicated by the white arrows) represents the average sensitivity distance between established bioanalytical assays and THz sensing techniques. (An active version of this plot, indicating a citation for every measured point can be accessed online under [176] and will provide actualization capabilities for new data)

analyte concentration levels. The LDL values of the selected representative bioanalytical state-of-the-art sensing techniques (green circles) are also depicted in order to illustrate the detection limit performance intercomparison between these methods and the established THz measurement techniques. All statements derived from this diagram are generally true for all analytes within the ambit of this review, resulting in the conclusion that the selection of representative analytes and reviewed studies in aqueous environments at THz frequencies is consistent.

For a clear data visibility, we subdivide the analytes in Fig. 2 with vertical lines into three informal categories *light* ($M_w < 10^3$ g/mol), *medium-weight* ($M_w \leq 10^5$ g/mol) and *heavy* ($M_w > 10^5$ g/mol) molecules according to their molecular weights. Generally, the molecular weight correlates with the molecular size. Therefore, in the ambit of this review article, it is reasonable to use both expressions synonymously in the following discussion. In addition to the rough weight category, we systematically classify the analytes into one of the following six biomolecular functional categories: (A) the ion group that are considered as the analytes of the lowest complexity, (B) carbohydrates that are considered as important energy carriers for synthesis processes, (C) amino acids which act as building blocks for proteins as well as mono- and oligonucleotides, (D) active agents that are considered to have particular relevance in the development of therapeutic drugs, (E) light- and medium-weight proteins ($M_w \leq 10^5$ g/mol) that have multiple active functions in the cell and (F) large proteins as well as other complex and heavy biomacromolecules ($M_w > 10^5$ g/mol).

Some general inferences can be drawn considering the sensitivity diagram in Fig. 2. (i) For light molecules, the concentrations of the THz-investigated analyte range between the mM and M levels. For molecules of lowest complexity such as ions, the physiological concentration levels can be partially detected by using the traditional THz sensing techniques. This is indicated by the red and white symbols within the elliptic dashed line (Fig. 2). (ii) In the case of heavy macromolecules, the experimentally accessible concentration levels decrease significantly for higher molecular weights. In comparison to low molecular weight compounds, this difference can be up to ten orders of magnitude lower for compounds with high molecular weight. (iii) Considering medium weight molecules (10^3 g/mol $\leq M_w \leq 10^5$ g/mol and partially $M_w < 10^3$ g/mol), such as carbohydrates, nucleotides, active agents and proteins, the overall trend shows that the detectable concentration levels decrease with increasing molecular weight. (iv) The reported THz concentration levels (white circles) are several orders of magnitude higher (distance blue triangles to red squares) than the physiological concentration levels (red squares). (v) In general, state-of-the-art bioanalytical techniques (green circles) are also several orders of magnitude more sensitive than traditional THz sensing techniques (blue triangles). In general, deviations from this standard in (iv) are discussed below in the corresponding analyte group. (vi) For both, THz sensing and state-of-the-art bioanalytical methods, the overall trend of decreasing detection limits with increasing molecular weight is indicated by black dashed lines. The analysis of this wide collection of measurements indicates together with the fitting of the lines that the lower detection limit scales with $LDL \propto M_w^{-1.53 \pm 0.13}$, which is a significantly smaller exponent than $m \approx -1$ and indicates a super linear relationship between LDL and molecular size or mass. At this point, the determination of an exact relationship between LDL and molecular weight is difficult because of the extremely variational nature of the items in the analyte

library. Still, an exponent of -1.53 indicates the capability of THz approaches for sensing more delocalized molecular modes that increasingly affect analytes and their environments with growing molecular size.

Based on the diagram in Fig. 2, the detection and characterization potential of biomolecules in their native aqueous environments by using THz spectroscopy is discussed in more detail in the following sections. At least one representative molecule is presented for each of the six groups for discussion of (patho-)physiological relevance and concentrations in more detail. Furthermore, the sensitivity obtained by using THz-based techniques is compared to the LDL value of established bioanalytical systems for each corresponding analyte type. Subsequently, the prospective THz detection and characterization potential are evaluated with regard to the analyte group in question.

3.1 Ions

For the THz-based investigation of aqueous media, ions are suitable analytes because they can significantly change the status of charge inside the liquid. This has a direct impact on the dynamics of the interaction of water molecules, which leads to a large THz response [150]. An overview of the existing investigations on ions is shown in Fig. 3 (presenting a sub-selection of datapoints for ions from Fig. 2).

3.1.1 Subject of THz Studies

It has been experimentally shown that the addition of salt ions to aqueous solutions can significantly change the dielectric response. The dielectric constants can subsequently be calculated from the recorded spectrum [181]. Generally, for the

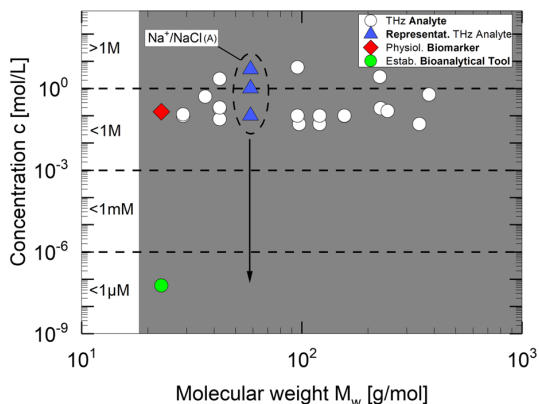


Fig. 3 Diagram of the reported LDL values of ions using traditional THz techniques (white dots), representative analytes (blue triangles), representative physiological concentration levels (red squares) and relevant state-of-the-art bioanalytical techniques (green dots)

theoretical description of the frequency-dependent dielectric function, the permittivity is calculated from multi Debye modeling approaches. From the modeled dielectric response, the dynamic parameters of the environment (H_2O molecules in the ambit of this review) that are adjacent to the ionic analyte can be estimated [8, 71, 82, 129, 132, 141, 179, 180]. Beyond that, attempts have been made to categorize ions into structure-strengthening and structure-weakening compounds according to systemized THz spectroscopic data [77]. It is observed that the interpretation of the dielectric response of comparatively simple solutions under test is not trivial. A major contribution to the overall dielectric response of the salt modes rather than the water network modes has been indicated by an experiment investigating the impact of alkali halide salts on water network dynamics [138]. A direct classification of chaotropic and kosmotropic analytes solely based on THz spectroscopy data is difficult to realize according to this finding. In addition, detailed models are developed to support the determination of the origin of the changed dynamics. For example, the dissection of LaBr_3 and LaCl_3 broadband THz spectra into anion, cation and ion pair contributions was demonstrated using a chemical equilibrium model [144].

3.1.2 (Patho-)physiological Relevance and Concentration Level of Na^+ Ions

In this review article, Na^+ ions are selected as representative analytes. For example, they are a significant constituent part of ion transporting systems, which is important for maintaining or creating concentration gradients, electrical potential, or regulating the cellular transfer of substances through the cell membrane [111]. An unbalanced sodium concentration level, e.g. hyponatremia ($c < 136$ mM serum level) [3], can indicate a number of life-threatening diseases, such as chronic renal failure [75] and cancer [1]. Generally, in healthy bodies the physiological Na^+ concentration level depends on the location. In the extracellular space, the reference range is approximately given in the range between $c = 120$ mM and 150 mM [95, 96, 158], whereas the intracellular concentration is significantly lower ($c = 8\text{--}15$ mM) [11, 95, 135].

3.1.3 THz Spectroscopy Versus Established Bioanalytical Measurement System for Na^+ Ions

The relevance of Na^+ ions as a biomarker in clinical diagnostics can be considered high. In fact, using traditional THz sensing techniques, the physiological concentrations of Na^+ ions can be detected. Experimentally detected concentrations have been reported in the 100 mM range [132, 138]. However, the comparison between THz-detected Na^+ sensitivities in Fig. 3 and a typical polymer membrane ion-selective electrode sensor shows a sensitivity offset of six orders of magnitude. In clinical diagnosis setups, a high sensitivity of any applied measurement technique is crucial as concentration levels should be detectable not only above but also below an analyte

reference range. Ion-selective electrodes are very effective sensors that have shown a detection limit of $c = 59 \text{ nM}$ for Na^+ ions [98]. Such sensitivities have not been demonstrated with THz sensing tools, yet.

3.1.4 Perspectives of THz Sensing of Ions

In summary, it is interesting to raise the question if there is a demand for alternative THz-based techniques to detect biochemically relevant ions at physiologically relevant concentrations. Considering the above-explained hyponatremia, the determination of the medical cause supported by differential diagnostic method algorithms is a major challenge for the medical staff. In order to achieve successful treatment by the choice of an effective therapeutic approach, it is important to be able to make well-founded decisions at an early stage already. As a matter of fact, established detection techniques work well for the complete determination of Na^+ concentrations.

The THz-based measurement technique is an ensemble averaging method [82]. Since it introduces non-specificity, the THz-based detection of Na^+ ions can become difficult. It is not trivial to assign the origin of a multimodal-modified dielectric response from the THz data alone because of the non-specificity. Therefore, the capability of the THz ion detection is clearly restricted to applications that are based on high ionic contrasts. Masson et al. [102] reported a potential THz application for imaging. They introduced a near-field ion contrast microscopy scheme for imaging neuronal tubes obtained from worms and preserved in physiological solutions. However, these experiments have not been demonstrated *in vivo* yet. It would be very interesting to see this technique working under more complex physiological conditions.

In the near future, we do not expect Na^+ ions to be used as a biomarker in THz applications for clinical diagnostics directly, unless solutions to the non-specificity of the existing THz excitation and probing methods are provided.

3.2 Carbohydrates

Carbohydrates are one example for molecular energy carriers. Especially pentose- and hexose-based compounds are important candidates as indicated by their large number of derivatives. For example, glycoproteins which are conjugates of oligosaccharides and membrane proteins are important constituents of enormous structural diversity. In addition, they play an important role in cell-to-cell communication by creation of cell-selective surfaces. Thus, they can be considered as an information storage medium. Glycoproteins can also function as antigen determining groups. Probably, the most well-known carbohydrate derivative is 2-deoxy-D-ribose which is one of the three structural elements of DNA and DNA nucleotides (cf. [11, 64]).

Scientific questions, such as “how are carbohydrates linked to proteins on a functional level?” and “how are they recognized in a complex biochemically relevant

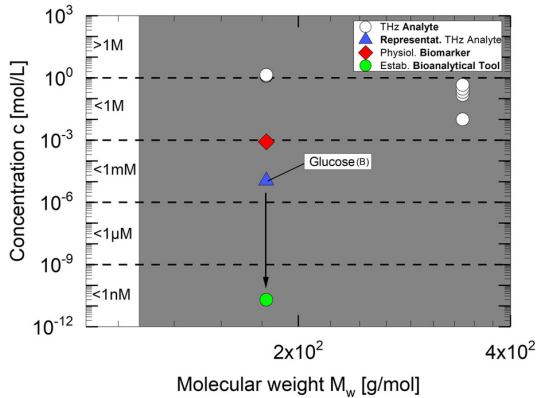


Fig. 4 Diagram of the reported LDL values of carbohydrates using traditional THz techniques (white dots), representative analytes (blue triangles), representative physiological concentration levels (red squares) and relevant state-of-the-art bioanalytical techniques (green dots)

medium?”, took part in the development of glycobiology as an autonomous field of research. In the analytical context of glycobiology, the THz community has intensely examined carbohydrate derivatives in aqueous environments. An overview of the existing investigations on carbohydrates is shown in Fig. 4.

3.2.1 Subject of THz Studies

For the successful spectroscopic detection of carbohydrates, experimental investigations proved the feasibility of traditional THz sensing schemes. To detect and characterize glucose and sucrose, both transmission and reflection geometries are used according to their optical constants [24, 72, 113, 142, 154]. The characterization of solvated lactose hydration shells [59] and the estimation of hydration states of sucrose as well as trehalose have also been demonstrated [6].

3.2.2 (Patho-)physiological Relevance and Concentration Level of Glucose

In this review article, for the representative physiologically relevant analyte, glucose was chosen from the carbohydrate group. In the carbohydrate metabolism of an organism, glucose plays a crucial role. It is either supplied with food or synthesized by gluconeogenesis in the liver [11]. The reference ranges of glucose can differ from one another depending on the body fluid of interest (e.g. plasma, whole blood, and urine). On average, the typical concentrations of glucose range in the low mM levels [53]. An unstable glucose metabolism can lead to glycemia [31]. For example, hyperglycemia ($c > 6.1$ mM in whole blood) indicates diabetes mellitus, which is an endemic disease that affects millions of people [53, 57]. High glucose concentration levels in the non-diabetic regime ($c > 5.5$ mM) indicate an increased risk of heart diseases in non-diabetic subjects as shown by [83].

3.2.3 THz Spectroscopy Versus Established Bioanalytical Measurement Systems for Glucose

Since the early 1960s, an ongoing research, development, and improvement program is being carried out in numerous electrochemical sensor schemes that are suitable for glucose detection [57, 165, 174]. Based on electrochemical detection of H_2O_2 , a widespread scheme is generated during the glucose oxidase method. Generally, concentrations in the nM to the lower μM range can be accessed with electrochemical biosensors [20, 57].

In addition, fluorometric assays are available in which glucose concentrations of 20 pM can be detected in blood, plasma or urine [149]. As it can be seen from Fig. 4, the glucose concentration detection limit measured using electrochemical sensors or fluorometric assay kits is six orders of magnitude better than the most sensitive THz spectroscopy approach reported by Serita et al. ($c = 11.1 \mu\text{M}$, [142]). Nevertheless, their introduced non-linear optical crystal (NLOC)-based THz-microfluidic chip with asymmetric metamaterials has an at least two orders of magnitude lower detection limit compared to previous published THz results. With this technique, it is therefore already possible to reliably detect mM glucose concentrations as they occur in blood.

3.2.4 Perspectives of THz Sensing of Carbohydrates

What is the potential for THz applications in clinical diagnostics for bioanalytical applications linked to carbohydrates? Basically, a biosensor is characterized by not only multiple properties, like detection limit, selectivity, robustness, long-term stability, performance and response behavior, but also application specific aspects such as invasiveness, analytic complexity or temporal response. Electrochemical state-of-the-art biosensor techniques demonstrate good detection limits considering the sensitivity issue. However, before achieving a highly stable and reliable operation by monitoring the glucose level, there are still many challenges to overcome. Toward the suitability for daily life healthcare applications, moment-to-moment monitoring is considered to be a crucial step (cf. [174]). The determined glucose concentration levels may also help in monitoring the decreased lactase activities that indicate lactose intolerance. THz techniques seem to be very interesting to this regard as no direct contact between sensor and medium is required. The recently published work of Serita et al. [142] is a promising approach for detecting carbohydrates at physiological concentrations. However, the non-specificity is potentially problematic and hinders the straightforward implementation as a tool to detect carbohydrates in complex physiologic liquids that is useful for clinical diagnostics or healthcare applications. Current developments using advanced numerical procedures indicate the feasibility to overcome such obstacles [100], which is extremely attractive with regard to an extension of THz analyses by a selective detection capability in order to enable an actual use for widespread clinical diagnosis.

Apart from the clinical THz detection of carbohydrates, a huge effort has been put in understanding functional mechanisms at the molecular level in more detail. For the investigation of carbohydrates, it has become evident that THz radiation can be a strong characterization instrument to measure the size of hydration shells of

molecules like lactose. Regarding bioprotection, which is mediated by constrained water shells, the important functionalities of the solvation shell have been confirmed by comparing experimental data and theoretical considerations [59, 101]. Such THz investigations can be precious tools to understand and determine the impact of solvation dynamics on molecular functionality, not only for carbohydrates but also for other physiologically relevant compounds. These interesting results might be a basis for future experiments since more specific analysis will be required to discern solvation in significantly more complex molecular embeddings closer to physiological conditions, yet.

3.3 Amino Acids and Nucleotides

The members of the amino acid and nucleotide group are of particular physiological relevance, since they represent the building blocks of more complex molecular units. Chemically speaking in a simplified form, nucleotides are monomers for the resulting polymer called DNA on whose sequence a beings genome depends. There are closely related derivatives forming RNA, both of which get translated into proteins in a living cell in the last consequence [11, 90]. Proteins on the other hand are composed of amino acid precursor units [11].

A large number of vibrational modes can be excited by THz waves within and between these molecules [128]. In addition, because of their atomic and structural composition, these biomolecules contain a significant amount of charge as soon as they are dissolved in water [90]. There is negative charge in case of nucleotides due to phosphate in the backbone, while the charge state for amino acids depends on the functional groups and on the pH of the medium [90]. Therefore, amino acids and nucleotides are considered attractive targets for THz-based analysis in aqueous media because of the high interaction potential with THz waves. An overview of the existing investigations on amino acids and nucleotides is shown in Fig. 5.

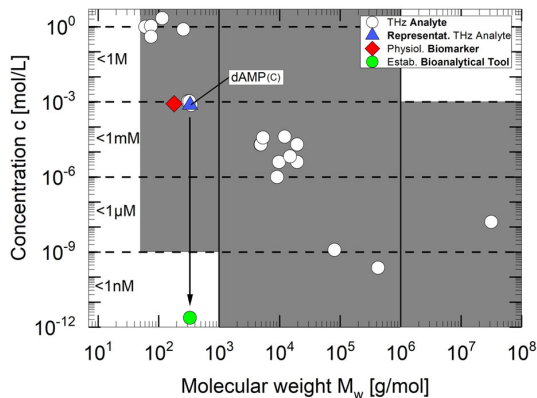


Fig. 5 Diagram of the reported LDL values of amino acids and nucleotides using traditional THz techniques (white dots), representative analytes (blue triangles), representative physiological concentration levels (red squares) and relevant state-of-the-art bioanalytical techniques (green dots)

3.3.1 Subject of THz Studies

Consequently, molecules such as amino acids (and urea as a metabolite), nucleosides, nucleotides and nucleic acids are investigated by the THz community. The characteristics of these molecules, such as temperature-dependent absorption spectra [28, 48], the dielectric response of molecular solutions such as completely solvated mono- and oligonucleotides [7, 51, 68, 119, 146, 155, 160–162], modifications of the molecular structure and spectral signatures as a function of both the polarization state of incident radiation [52] and the hydration level [94], have been reported.

3.3.2 (Patho-)physiological Relevance and Concentration Level of Nucleotides

We primarily focused on deoxyadenosine monophosphate (dAMP) among the group of deoxyribonucleotides. Since concentration levels of the analyte range significantly below saturation, the investigation of deoxyribonucleotides in aqueous environment carried out by Glancy et al. [51] is particularly interesting. The structurally closely related cyclic adenosine monophosphate (cAMP) also has a (patho-)physiological relevance. Pseudohypoparathyroidism is indicated by anomalies in the reference range, which is generally associated with tumor diseases [115]. The physiological concentrations range around the lower nM levels (18.3–45.5 nmol/L) [53] considering glomerular-filtrated cAMP.

3.3.3 THz Spectroscopy Versus Established Bioanalytical Measurement System for Nucleotides

The comparison in Fig. 5 reveals that the LDL value of an exemplary ELISA [43] for the detection of cAMP is by nine orders of magnitude better than the LDL value detected with a THz-TDS-Spectrometer of dAMP in solution [51].

3.3.4 Perspectives of THz Sensing of Nucleic Acids and Nucleotides

There is a large difference in the sensitivity of THz sensing of nucleic acids. Arora et al. for example have reported significantly enhanced LDL values for THz-supported detection of polymerase chain reaction (PCR) amplified DNA in aqueous media [7]. They have shown sensitivities in the nM-pM range. This LDL value represents a record-breaking number independently of its molecular when compared to all other experiments that are taken into account in the scope of this review. We consider two aspects here. Firstly, the high sensitivity follows a fragile balanced differential measurement technique [12] that has a capability of recognizing even smallest differences in a sample by removing the water absorption, and thereby significantly reducing the background signal. This differential technique can detect spectacularly low LDL values compared with standard THz measurement techniques. Secondly, for detection of the nucleic acid sequence, there seems to be an ongoing demand for the development of label-free and sensitive DNA detection strategies in order to reduce preparation steps and time besides avoiding costly chemical procedures like fluorescent labeling, for instance. This perception is widely accepted in the THz

community. However, colorimetry-based analytical methods enable single-base discrimination [88]. The detection of DNA presence in a solution plays an insignificant role in nucleic acid analytics. Therefore, many researchers focus on further exploration of technical potential to detect single-base mismatches with biochip arrays. Promising results have been obtained in dried aqueous samples since the early analysis of label-free THz detection of DNA samples and single-base mutations [55, 56, 114]. By providing the necessary THz sensitivity and selectivity to measure DNA sequences from complete cell lysates at physiological concentrations, and obviating the need for PCR amplification, another milestone was achieved recently [175]. Precisely, if such THz-based sensing is developed as a powerful alternative for bio-analytical standard assays and techniques, its detection and characterization potential in a standard aqueous environment needs to be clearly evaluated against established techniques.

3.4 Active Agents

Since active agents can have different targets, such as macromolecular nucleic acids or proteins (e.g. enzymes), these compounds play a significant role in the development of pharmaceutical drugs. The significance of active agents in therapeutic treatment of diseases is very high, accordingly. In particular, a strong interest exists in revealing functional mechanisms at the molecular level, which are not entirely understood in many cases [76]. In this regard, a contribution to a more comprehensive mechanistic knowledge, for example by enhanced screening methodologies might improve the efficiency of pharmaceutical drug development. An overview of the existing investigations on active agents is shown in Fig. 6.

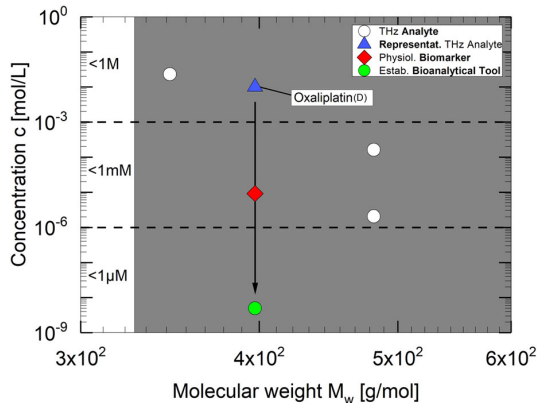


Fig. 6 Diagram of the reported LDL values of active agents using traditional THz techniques (white dots), representative analytes (blue triangles), representative physiological concentration levels (red squares) and relevant state-of-the-art bioanalytical techniques (green dots)

3.4.1 Subject of THz Studies

First THz spectroscopy experiments have been carried out using a drug that is used to reduce blood pressure called nifedipine. These experiments have shown that the structural composition of crystallite depends on the water content in the analytic environment [159]. Moreover, THz investigations focused on characterizing the reaction dynamics between DNA and oxaliplatin, which is an anticancer substance [178]. THz applications in this field emerge but are not widely addressed, yet. In the field of the frequently used antibiotics, the two active ingredients doxycycline hydrochloride (DCH) and tetracycline hydrochloride (TCH) have been studied using metallic mesh based reflection terahertz spectroscopy and attenuated total reflection terahertz spectroscopy, respectively [133, 173].

3.4.2 (Patho-)physiological Relevance and Concentration Level of Oxaliplatin

For this section, we have selected oxaliplatin as a representative active agent because of its high pathophysiological importance being an anticancer drug. In the chemotherapeutical treatment of cancer, the investigation of platinum-based antitumor compounds such as oxaliplatin attracts a high degree of attention. The metabolites of this substance can be activated in aqueous environments. They subsequently bind to DNA, thus modifying the macromolecule by intra- and inter-molecular strand connections. Cell activities including DNA (e.g. DNA replication and transcription) are effectively inhibited by these modifications (cf. [29]). The concentration of oxaliplatin has been reported in the lower μM range during a 2-h infusion as shown by pharmacokinetic investigations. Ip et al. reported a mean maximum value of $c = 9.2 \pm 1.4 \mu\text{M}$ [66].

3.4.3 THz Spectroscopy Versus Established Bioanalytical Measurement System for Oxaliplatin

A high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) assay is used for detection of oxaliplatin levels in the plasma of the patient [66]. The LOD value for this HPLC-ICP-MS assay ($c = 5 \text{ nM}$) is six orders of magnitude smaller than the sensitivity obtained by using a THz spectroscopy sensing platform as demonstrated by Wu et al. ($c = 10 \text{ mM}$) [178], see Fig. 6. However, it should be noted that an HPLC-ICP-MS assay is suitable for medical analyses to a limited extent, as sample preparation is very time-consuming and expensive.

3.4.4 Perspective of THz Sensing of Oxaliplatin

Active agents such as oxaliplatin have a high pharmaceutical relevance. For medical research as well as for treatment applications, their reliable, robust and fast detection in body fluids at a molecular level is of very high importance. THz sensing considered as a potential scheme for real-time and in vivo monitoring of the concentration levels

of an active agent during chemotherapeutical treatment appears very attractive for adjusting optimally matched drug profiles during infusions. Here, the emphasis is entirely on the selective target molecule detection, while a possible *in vivo*, real-time and label-free THz application would represent a huge impact scenario. In this regard, the THz community needs to develop strategies to overcome limitations imposed by non-specificity issues under physiological conditions.

Moreover, there is a great deal of interest in decoding reaction mechanisms at the molecular level. One of the biggest challenges in the scientific world is the characterization of reaction mechanisms and dynamics at the sub-molecular level in real time. In this regard, a better understanding of active agents would also improve the pharmaceutical drug development and optimization. With first valuable THz sensing experiments, initial steps are already made in this direction.

3.5 Proteins

In the biochemical context of a living organism, proteins play the role of the functional units. In order to explain pathogenic factors or disease progression, for instance, a lot of effort is put in understanding the complex biochemical processes at the molecular level, which are generally found closely related to protein dysfunctions [25, 33]. Proteins also play a major role in the development of pharmaceutical drugs because most drug targets are built up from protein structures [122]. Additionally, in clinical diagnostics, proteins have a very high impact because the concentration levels of relevant biomarkers, when outside of pathophysiological reference ranges, often indicate physiological malfunction [53]. There is still an ongoing requirement for precise, robust, sensitive, and fast alternative measurement techniques to detect biomarkers, despite of the wide range of established bioanalytic tools. This is essential because of the complexity of the sample purification and preparation procedures of existing approaches. The evaluation of the THz sensing potential for label-free protein detection deserves special attention, therefore. An overview of the existing investigations on proteins is shown in Fig. 7.

3.5.1 Subject of THz Studies

The globular proteins human serum albumin (HSA) [91] and bovine serum albumin (BSA) [35, 50, 81, 85, 139, 157, 183, 190], the enzyme lysozyme [21, 85, 157, 177, 182], the prosthetic group biotin [10], the oxygen-carrying muscle protein myoglobin [23, 112, 157, 189], the biotin-binding protein avidin [192], the antifreeze protein DAFP-1 [106], the photoactive yellow protein [49], alanine-rich peptides [36], the peptide amyloid beta [58] and the artificial peptide sequences P-NIPAAm [116, 147] have been investigated with traditional THz techniques. Absorption spectra and optical constants have been recorded and determined considering the requirement for reduced interaction between THz fields and absorbing aqueous media [10, 21, 35, 49, 50, 81, 91, 112, 117]. Moreover, the dynamics of collective modes [182] or temperature-dependent structural changes [116] have been investigated. In addition, a lot of scientific work is dealing with the problems of quantitative analysis and the parameters that affect hydration and solvation dynamics [14, 36, 41, 85, 106, 177,

183, 189]. Furthermore, the energy flow from dialanine molecules into the aqueous environment has been studied in the infrared and far-infrared region, respectively [118].

3.5.2 (Patho-)physiological Relevance and Concentration Level of Serum Albumin

Serum albumin is the representative candidate that has been selected for this bio-analyte group. It is a large molecule with a molecular weight of 66,400 g/mol and has numerous functionalities in living organisms [44]. For example, it helps in maintaining the colloid-osmotic pressure, which is responsible for regulating the water distribution between inter- and extravascular space [131]. Secondly, albumin is considered a highly charged molecule in blood at physiological pH=7.2, and thus enables the transport [107] of substances with lower solubility. Renal disorder is indicated for physiological densities with values $\rho > 20 \text{ mg/L}$ ($c \approx 0.3 \mu\text{M}$). An increase in the glomerular filtration of serum albumin has been observed in case of albuminuria [53].

3.5.3 THz Spectroscopy Versus Established Bioanalytical Measurement System for Serum Albumin

For the detection of serum albumin with high sensitivity, a colorimetric ELISA with lower detection limits in the pM range [26] can be employed. Alternatively, in order to obtain higher detection limits as well, test stripes with a detection limit of approximately $\rho = 20 \text{ mg/L}$ ($c \approx 0.3 \mu\text{M}$) can be used. This helps in determining the concentrations of serum albumin in urine (Fig. 7, $c_{\text{urine}} = 0.31 \mu\text{M}$) [53]. These higher densities have not been demonstrated with THz sensing techniques yet. However, considerably higher concentration levels of $\rho = 35 - 50 \text{ g/L}$ ($c \approx 0.53 - 0.75 \text{ mM}$)

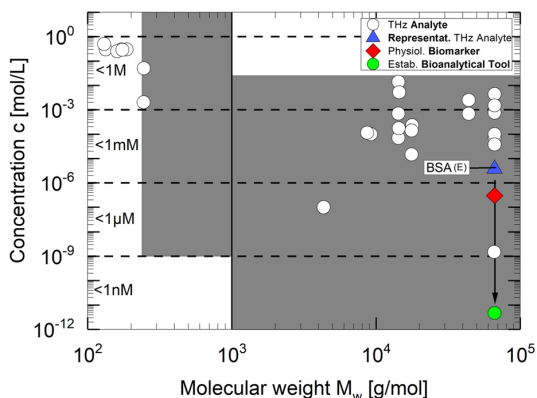


Fig. 7 Diagram of the reported LDL values of proteins using traditional THz techniques (white dots), representative analytes (blue triangles), representative physiological concentration levels (red squares) and relevant state-of-the-art bioanalytical techniques (green dots)

[127] are accessible with traditional THz sensing techniques ($c_{LDL} = 3.8 \mu\text{M}$) [190] as can be seen from the comparison in Fig. 7. Basically, at physiologically relevant concentrations, this helps in the THz investigation of complex functional molecules.

3.5.4 Perspective of THz Sensing of Proteins

The high degree of non-specific THz excitation is still a big issue and the selective discrimination under physiological conditions is extremely difficult in application-orientated diagnostic detection. Accordingly, for an alternative label-free detection strategy that is suitable for *in vivo* applications, the potential of THz sensing is currently not yet fulfilled; the community needs to find out other scenarios that can be competitively applicable for THz characterization. The term proteomics exists since late 1970s, which summarizes the attempt to detect all expressed proteins under defined conditions at a particular time with bioanalytical methods [123]. This approach is based on the idea of identifying and analyzing the full proteome (e.g. of a cell). Ideally, specific expression profiles of gene products are associated with diseases. In reality, of course, this approach has several limitations that are indicated by restrictions related to the measurement techniques or by the high complexity of the medium under physiological conditions. A great amount of analytical effort is required for protein characterization irrespective of type of the bioanalytical tool employed.

Besides proteome characterization, there are well-known approaches for analyzing protein-protein interactions in the field of proteomics. For example, highly selective affinity assays or high-throughput suitable yeast 2-hybrid systems can indicate protein interaction by the transcription of reporter genes [123]. Still, such analyses are limited to the detection of binding events only. High sensitivity detection principles in combination with very low detection limits are the best characteristics of state-of-the-art bioanalytical tools. However, it is hardly possible to make substantial statements regarding dynamical processes using such assays. On the contrary, THz energies provide the opportunity to excite and record dynamical processes at the molecular level. This is one of the obvious conditions that could preferentially be occupied by THz sensing. Note that THz-excited delocalized collective modes of complex molecules also enable potential access to the analyte environment. In order to reveal mediating properties, functionalities or even molecular malfunctions, the highest characterization potential for THz sensing of proteins in aqueous solutions is possibly to investigate the reciprocal interplay between proteins and their surrounding environment.

In terms of assisting the diagnosis of diseases, the determination of protein mutations could be monitored with THz radiation in addition to the pure detection of unusual molecular concentration levels. For instance, Ebbinghaus et al. have demonstrated that THz spectroscopy can allow for detecting different molecular properties, which are related to solvation dynamics around site-selective mutated proteins [40]. This is a remarkable result which clearly demonstrates the THz potential for discriminating between well-functioning and defective functional units in the physiological context.

3.6 Heavy Biomacromolecules

One can assume a high complexity in the dielectric response due to the increasing number of excitable molecular modes considering the THz investigation of heavy macromolecules (i.e. large double stranded nucleic acids and conjugated antibodies in this review). Moreover, the interpretation of the dielectric response is expected to become more difficult with increasing molecular complexity. In addition, an increasing complexity of the reciprocal interaction between an analyte with equally increased complexity and its environment (mostly surrounding water molecules) has to be taken into account. This is a big challenge for the characterization of especially large biomacromolecules with THz radiation. On the other hand, considering solely the LDL, both the molecular weight and the complexity are rather advantageous because of an increased amount of charge and oscillating vibrational modes. An overview of the existing investigations on heavy macromolecules is shown in Fig. 8.

3.6.1 Subject of THz Studies

The change in dielectric response as a function of an antibodies structure, which is modified by fluorescence and peroxidase conjugates, has been recorded in aqueous environments. Moreover, the optical constants that depend on the modified antibody concentrations have been determined [156]. In addition, the dielectric response of aqueous embedded double-stranded DNA sequences of significant base-pair lengths producing higher molecular weights $M_w > 10^5$ g/mol has been investigated [7, 178].

3.6.2 (Patho-)physiological Relevance and Concentration Level of IgG Antibodies

Immunoglobulin G (IgG) has been selected to function as representative bioanalyte for the group of heavy biomacromolecules. The IgG antibody production is

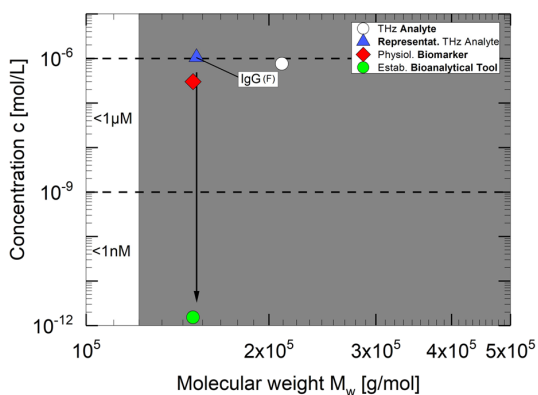


Fig. 8 Diagram of the reported LDL values of heavy biomacromolecules using traditional THz techniques (white dots), representative analytes (blue triangles), representative physiological concentration levels (red squares) and relevant state-of-the-art bioanalytical techniques (green dots)

considered as primary response to bacterial or viral infections. Generally, concentration values that are out of reference ranges can be associated with immunodeficiency diseases [53]. IgG antibodies are subdivided into the classes IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 according to the gamma heavy chain [93]. Different (amounts of) subclasses of IgGs are synthesized depending on the type of antigen, place of incursion and time of exposition [53]. Deficiencies in certain subclasses can indicate infections of the respiratory tract or autoimmune diseases. The determination of the overall IgG concentration does not necessarily provide substantial statements regarding possible deficiencies in subclasses. Therefore, individual differentiated concentration dependence is required. The (patho-)physiological reference ranges strongly depend on age and sex. For example, the density reference range for 12–18-year old children is given as follows: IgG1: $\rho = 2.8 - 8.0 \text{ g/L}$ ($c \approx 18.7 - 53.3 \mu\text{M}$), IgG2: $\rho = 1.15 - 5.70 \text{ g/L}$ ($c \approx 7.6 - 38 \mu\text{M}$), IgG3: $\rho = 0.24 - 1.25 \text{ g/L}$ ($c \approx 1.6 - 8.3 \mu\text{M}$) and IgG4: $\rho = 0.052 - 1.25 \text{ g/L}$ ($c \approx 0.3 - 8.3 \mu\text{M}$) [137].

3.6.3 THz Spectroscopy Versus Established Bioanalytical Measurement System for IgG Antibodies

The concentrations of subclasses of IgG have been determined by ELISA [27]. The use of such assays helps in identifying the concentration levels far below the physiological reference range. For example, the Human IgG ELISA Kit (ab195215) enables a detection within a density range between $\rho = 0.23$ and 15 ng/mL ($c \approx 1.53 - 100 \text{ pM}$) with a sensitivity of 0.02 ng/mL ($c \approx 0.13 \text{ pM}$), see Fig. 8. Although THz detection is less sensitive compared to modern ELISA Kits, it is already reaching physiological concentrations: Sun et al. show a clearly distinguishable signal for the total IgG densities in the range between $\rho = 160 \text{ mg/L}$ ($c \approx 1.1 \mu\text{M}$) and $\rho = 270 \text{ mg/L}$ ($c \approx 1.8 \mu\text{M}$) [156]. Apart from the sensitivity difference, it remains to be demonstrated if THz spectroscopy is capable of distinguishing IgG at the subclass level and selectively detecting IgG in a complex physiological matrix.

3.6.4 Perspectives of THz Sensing of Heavy Biomacromolecules

THz spectroscopy is far from being a serious competitor with regard to sensitivity in comparison to established bioanalytical assays in medical diagnostics. However, the conjugate modifications significantly influence the observed concentration-dependent change of the IgG refractive index constants embedded in a polar liquid. This produces an increased contrast that is favorable for enhancing sensitivity and selectivity. It therefore supports detection by significantly decreasing the lower detection limit. More importantly, it demonstrates the potential for conformational macromolecular analysis with THz systems as the collective vibrational modes are associated with the tertiary structure of proteins and intermolecular interactions. At the same time, the potential for label-free THz detection remains elusive given the broad nature of the electromagnetic response. However, in aqueous environments, the discrimination between unlabeled IgG isoforms in the mM-range could be very significant for clinical diagnostics. Therefore, it remains to be shown if THz

spectroscopy is capable of distinguishability at the subclass level for the detection of antibody subclass deficiencies.

Sun et al. show that THz techniques have the fundamental suitability to analyze any biomolecular entity, independent of their molecular weight [156]. For this, a significant change in the dielectric response is a prerequisite. Such a change can be introduced by water substitution in the case of large macromolecules. In addition, generally a considerable amount of charge is carried and exposed by large macromolecules surfaces where they can interact with the water molecules in the adjacent surrounding, significantly influencing the vicinal water dielectric response. Furthermore, the THz response of a more complex molecule itself contributes to the overall spectral response with increased significance. The trend of superlinear decreasing lower detection limit with increasing molecular weight is explained by adding up all these influences. In aqueous environments, the THz analysis of large and heavy analytes requires cumbersome numerical analysis of the spectral response to cope with these combined influencing parameters and the high degree of macromolecular complexity, therefore.

Summary of Reviewed Biomolecular Analytes Which Have Been Investigated in Aqueous Environments A wide range of biochemically relevant analytes has been reviewed in the ambit of this survey. The comparison of physiologically relevant concentration levels with lower detection limits that have been obtained with THz sensing approaches partially shows not only an adequate detection limit in several cases but also a difference of many orders of magnitude in others. In general, it is important to note that established state-of-the-art bioanalytical techniques are in most cases sensitive enough to meet the requirements in the field of clinical diagnostics. THz technologies have to demonstrate additional features to develop a competitive analytic potential, therefore. In this context, it is relevant that THz-based tools are potentially label-free, less complex, more robust and non-invasive. At a matured technological level, competitive THz devices can therefore be advantageous in terms of easier sample handling, simpler opportunities for automation, faster analysis and affordability due to the usage of less consumables.

What Is the THz Characterization Potential for Biomedically Relevant Investigations Under Physiological Conditions? The THz characterization potential for biomolecules in the biomedical research field is very high because THz excitations are directly and uniquely associated with delocalized vibrational modes. The excitation of both the molecular analyte and its environment can thereby help in discovering structurally mediated biochemical processes and their sub-ps dynamics. With the THz characterization of hydration shells and the estimation of solvation dynamics, promising results have been obtained. As explained above, the most interesting biological samples for THz examinations are information-carrying molecules, such as oligopeptides and nucleotides, active agents, proteins and heavy biomacromolecules. To understand the biochemical processes in a much more detailed fashion is a cross-community concern. For gaining more insight into physiological functionalities at the molecular level, the THz community has begun to design and develop suitable analytic tools including advanced numerical deconvolution analysis.

Presently, most of these THz investigations are carried out under non-physiological conditions but the robustness and performance of THz instrumentation and analytic procedures is becoming mature enough to address such complex environments in the near future.

What Is the Key Challenge for Establishing THz-Based Analytical Techniques for Biomolecular Detection in Aqueous Media? Basically, the development of efficient and selective THz detection principles has been strongly restricted by the ensemble averaging property and the resulting non-specificity of biomolecular THz excitations. This is mostly true for ions, amino acids, nucleotides, active agents, small proteins and heavy biomacromolecules. This needs to be addressed, as it is problematic for the development of competitive, fast, reliable and label-free direct detection THz techniques that are suitable as an alternative of the established cross-platform biosensor assays or detection approaches. Many THz analysis methods are based on high analyte contrast and remain to be demonstrated under physiological conditions. Especially, the non-specificity of the THz response strongly limits the potential for *in vivo* real-time applications. Generally, the detection of biomolecular compounds using state-of-the-art bioanalytical tools is a complex procedure that will need to involve also other techniques. Any alternative to shorten preparatory or analytic procedures is strongly desired. It is therefore also plausible to consider and develop THz-radiation-based sensing as a helpful complementary assistive procedure rather than as a complete independent technique replacing established biosensing schemes. In any case, we recommend the THz community to carefully ascertain general statements that imply or even promise fast and complete THz-based sensing solutions in the bioanalytical context without taking full account of the application relevant detection limits and procedural context.

Which One Is the Next Logical Step Towards THz-Assisted Sensing in Aqueous Solutions or Even Under Physiological Conditions? The investigation under physiological conditions is an important step which needs to be addressed. Often, there is a large difference between the sensitivities that are directly accessible with THz sensing techniques and the physiological concentration level as discussed before. Approaches to significantly increase the sensitivity are therefore highly desirable. For instance, as demonstrated for DNA detection, the differential technique is extremely useful to enhance the signal contrast, thereby increasing the sensitivity by several orders of magnitude [7]. The recently issued dielectric long-range guided mode with absorption could provide another possible construct [139, 140]. Possibly, prospective experiments will demonstrate a sensitivity increase due to significantly increased interaction lengths between coupled THz waves and absorbing medium by using this mode. Another promising approach to increase sensitivity is the use of field enhancing elements for example in the form of metamaterials or nanoslot antennas. These have been used for the detection of biomolecules for at least a decade. A good overview of the field of metamaterials is given in the review article by O'Hara et al. [120]. The nanoslot antenna technology is lucidly summarized in a review article by Adak et al. [2]. However, these studies and most metamaterial analysis are performed exclusively with dried analytes and thus under non-physiological conditions.

The main problem for using metamaterial approaches is the high THz absorption of water which in most designs completely dampens and annihilates the metamaterials resonance used for biosensing. Work recently presented in [142, 146, 162] addresses this problem by using microfluidic and nanofluidic structures in combination with metamaterials to reduce the influence of water absorption. The result presented in [142] is two orders of magnitude more sensitive than classical THz techniques and thus demonstrate the great potential of microfluidic metamaterial-based THz sensors. Due to the high interest in this work, we believe that this topic will be the subject of more intensive research in the future and has the potential to significantly increase the sensitivity of THz analyses. Furthermore, a significant effort to increase selectivity of the adopted analytic procedures needs to be put in place. For this, a plethora of new approaches is needed, which will most certainly need to be tailored to the specific application field. Differential techniques might have a great potential in this regard, given the unspecific spectra of most biomacromolecules.

4 Final Remarks on the Prospective THz Sensing of Biochemically Relevant Analytes in Aqueous Solution

The review of THz biomolecular sensing experiments is essentially driven by two major motivations:

Firstly, we consider that after a series of initiatives in the past years, it is time for evaluating not only qualitatively but also quantitatively the potential of THz detection applications in the biomedical context in comparison to established methods. Unfortunately, the direct proclamation of an application potential is stated too early on several occasions, i.e. when a first spectral response of an analyte is detected in an aqueous system, regardless of concentrations orders of magnitude beyond realistic application scenarios. What has been ignored frequently in past reports is that solutions are required to enhance the selectivity of the THz response towards actual specificity without abandoning the appeal of a potential label-free THz sensing technique. This is essential for pursuing the idea of real-time and *in vivo* measurements. Therefore, it is necessary to demonstrate the feasibility of highly selective detection and discrimination of biomolecules within a pool consisting of structurally similar analytes. This challenge is significant and far from being realized in the near future. We would like to encourage the THz community (and this also includes the authors of the present article) to assess the application situation more precisely, and be careful before THz-based solutions are proclaimed in the biomedical field without carefully analyzing application relevant concentrations, selectivity in the complex analyte environment, influence of sample variability and alternative techniques.

Secondly, in order to characterize aqueous solutions that are influenced by the interaction with biomolecular solutes, a significant effort is put in the observation of dynamic changes. These approaches are very interesting because they have the potential to better understand mechanisms of signal cascades or communication pathways which are possibly triggered by the biomolecular environment. It is widely accepted that it is necessary to consider the complex biomolecular interplay under real

physiological conditions in the era of genomics, proteomics and glycomics. The logical way of approaching these native conditions has already been addressed by the THz community. The complexity must be increased stepwise by starting from a simple system and the results must be validated by using complementary techniques at all times. Simultaneously, computer-assisted modeling is a reasonable choice to validate experimentally recorded data. In order to reflect the reality, it must be ensured that modeling should be as accurate as possible. The associated risk to oversimplify the situation is high if the modeling assumptions are hypothetical. In reality, the existing models must be precise and the complexity of the experimental situation should not be increased too quickly.

The characterization of biomolecular (-ly induced) resonances in native aqueous environments is highly desirable after the initial THz investigation of dried and powdered samples. In fact, the complex interpretation of biomolecular measurement results needs to be confirmed by experiments at varied complexity levels and using complementary analytic tools. This is important as we in the THz community are still at the threshold of understanding which basic molecularly induced or solvent related effects contribute to the measured overall dielectric response in the THz frequency range. By targeting physiological concentrations, one can make a relevant step towards analysis under physiological conditions. In this case, a significant increase in sensitivity is required by applying appropriate sensing strategies. The THz investigation by using differential techniques is an option for the THz analysis of biomolecules in aqueous environments at physiological concentrations.

In addition, we suggest to substantially focus on the (patho-)physiological significance of the investigated molecules. Generally, the analysis of biomarkers that are clearly linked to widespread diseases, such as Alzheimer disease, cardiac disease or cancer is prioritized. In this regard, we also suggest a stronger exchange of information across the THz community borders into relevant neighboring communities (i.e. cell biologists, neuroscientists and oncologists). This exchange of information is crucial to validate and understand the value and unique potential of THz analysis. In addition, such exchange of information assists in the formulation of a large number of relevant (patho-)physiological research questions. In order to find answers to such questions, the efforts put in may lead us toward the development of more target-oriented THz tools.

Finally, it is evident from the large increase of publications that there is a profound interest of the THz community to further explore bioanalytical application and research areas. This critical overview of the present status intends to encourage and guide taking up the relevant and critical steps needed for the development of competitive, substantial and significant THz biosensing tools.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This work is part of the national priority program SPP 1857 ESSENCE and funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under contract numbers HA 3022/8, BO 1573/27 and WI 5209/1.

Declarations

Conflict of Interests The authors declare no competing interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Abu Zeinah, G., Al-Kindi, S., Hassan, A., Allam, A.: Hyponatraemia in cancer: association with type of cancer and mortality. *European Journal of Cancer Care* **24**(2), 224–231 (2015). <https://doi.org/10.1111/ecc.12187>.
2. Adak, S., Tripathi, L.N.: Nanoantenna enhanced terahertz interaction of biomolecules. *The Analyst* **144**(21), 6172–6192 (2019). <https://doi.org/10.1039/c9an00798a>.
3. Adroge, H.J., Madias, N.E.: Hyponatremia. *New England Journal of Medicine* **342**(21), 1581–1589 (2000). <https://doi.org/10.1056/NEJM200005253422107>.
4. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.: Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**(3), 403–410 (1990). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283605803602>.
5. Amenabar, I., Lopez, F., Mendikute, A.: In Introductory Review to THz Non-Destructive Testing of Composite Matter. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves* **34**(2), 152–169 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10762-012-9949-z>.
6. Arikawa, T., Nagai, M., Tanaka, K.: Characterizing hydration state in solution using terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy. *Chemical Physics Letters* **457**(1–3), 12–17 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2008.03.062>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009261408004260>.
7. Arora, A., Luong, T.Q., Krueger, M., Kim, Y.J., Nam, C.H., Manz, A., Havenith, M.: Terahertz-time domain spectroscopy for the detection of PCR amplified DNA in aqueous solution. *Analyst* **137**(3), 575–579 (2012). <https://doi.org/10.1039/c2an15820e>.
8. Asaki, M., Redondo, A., Zawodzinski, T., Taylor, A.: Dielectric relaxation of electrolyte solutions using terahertz transmission spectroscopy. *Journal of Chemical Physics* **116**(19), 8469–8482 (2002). <https://doi.org/10.1063/1.1468888>.
9. Azarov, I.A., Choporova, Y.Y., Shvets, V.A., Knyazev, B.A.: An ellipsometric technique with an ATR module and a monochromatic source of radiation for measurement of optical constants of liquids in the terahertz range. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves* **40**(2), 200–209 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10762-018-0549-4>.
10. Baragwanath, A.J., Swift, P., Dai, D., Gallant, A., Chamberlain, M.: Silicon Based Microfluidic Device for THz Frequencies. In: *35th International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves IRMMW-THZ 2010*(2010).
11. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.: *Stryer Biochemie*. Springer (2013). <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2989-6>.
12. Bergner, A., Heugen, U., Bründermann, E., Schwaab, G., Havenith, M., Chamberlin, D.R., Haller, E.: New p-Ge THz laser spectrometer for the study of solutions: Thz absorption spectroscopy of water. *Review of Scientific Instruments* **76**(6), 063110 (2005).
13. Born, B., Havenith, M.: Terahertz dance of proteins and sugars with water. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves* **30**(12), 1245–1254 (2009). <https://doi.org/10.1007/s10762-009-9514-6>.
14. Born, B., Weingärtner, H., Bründermann, E., Havenith, M.: Solvation dynamics of model peptides probed by terahertz spectroscopy. observation of the onset of collective network motions. *Journal of the American Chemical Society* **131**(10), 3752–3755 (2009). <https://doi.org/10.1021/ja808997y>.
15. Born, B.P.: Terahertz spectroscopy of proteins - hydration dynamics of proteins during folding, enzyme catalysis and in chemical equilibrium. Ph.D. thesis, Ruhruniversität Bochum, Fakultät für Chemie und Biochemie (2010).

16. Boyd, J.E., Briskman, A., Sayes, C.M., Mittleman, D., Colvin, V.: Terahertz vibrational modes of inverse micelles. *The Journal of Physical Chemistry B* **106**(24), 6346–6353 (2002). <https://doi.org/10.1021/jp0255740>.
17. Brown, J.Q., Vishwanath, K., Palmer, G.M., Ramanujam, N.: Advances in quantitative uv–visible spectroscopy for clinical and pre-clinical application in cancer. *Current Opinion in Biotechnology* **20**(1), 119–131 (2009). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.02.004>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166909000159>. Analytical biotechnology.
18. Brucherseifer, M., Nagel, M., Haring Bolivar, P., Kurz, H., Bosserhoff, A., Büttner, R.: Label-free probing of the binding state of DNA by time-domain terahertz sensing. *Applied Physics Letters* **77**(24), 4049–4051 (2000).
19. Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W.: Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* **34**(3), 597–601 (2005). <http://jme.endocrinology-journals.org/content/34/3/597>.
20. Chen, C., Xie, Q., Yang, D., Xiao, H., Fu, Y., Tan, Y., Yao, S.: Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review. *Royal Society of Chemistry Advances* **3**, 4473–4491 (2013). <https://doi.org/10.1039/C2RA22351A>.
21. Chen, J.Y., Knab, J., Ye, S., He, Y., Markelz, A.: Terahertz dielectric assay of solution phase protein binding. *Applied Physics Letters* **90**(24), 243901 (2007).
22. Chen, Y.H., Yang, J.T., Martinez, H.M.: Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochemistry* **11**(22), 4120–4131 (1972). <https://doi.org/10.1021/bi00772a015>.
23. Cheng, J., Jones, R.C., Sushko, O., Tashiro, Y., Donnan, R.: Quasi-optical sub-thz circular dichroism spectroscopy of solvated myoglobin. *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology* **10**(4), 348–357 (2020). <https://doi.org/10.1109/TTHZ.2020.2985642>.
24. Cheng, L., Hayashi, S., Dobroui, A., Otani, C., Kawase, K., Miyazawa, T., Ogawa, Y.: Terahertz-wave absorption in liquids measured using the evanescent field of a silicon waveguide. *Applied Physics Letters* **92**(18), 181104 (2008).
25. Chiti, F., Dobson, C.M.: Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry* **75**(1), 333–366 (2006). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>.
26. Company Abcam plc: Albumin human elisa kit (ab179887) (2019). <https://www.abcam.com/human-albumin-elisa-kit-ab179887.html>. Accessed 07/19 at <http://www.abcam.com>.
27. Company Abcam plc: Albumin human elisa kit (ab195215) (2019). <https://www.abcam.com/human-igg-elisa-kit-ab195215.html>. Accessed 07/19 at <http://www.abcam.com>.
28. Cooksey, C.C., Greer, B.J., Heilweil, E.J.: Terahertz spectroscopy of l-proline in reverse aqueous micelles. *Chemical Physics Letters* **467**(4–6), 424–429 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2008.11.041>.
29. Crisafuli, F.A.P., Cesconetto, E.C., Ramos, E.B., Rocha, M.S.: DNA-cisplatin binding mechanism peculiarities studied with single molecule stretching experiments. *Applied Physics Letters* **100**(8), 083701 (2012). <https://doi.org/10.1063/1.3689774>. <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/apl/100/8/10.1063/1.3689774>.
30. Crompton, D., Vickers, A.: Assigning the characteristics of an ATR dove prism for use with terahertz frequencies: Supplemented with molecular dynamic simulations. In: 4th Computer Science and Electronic Engineering Conference (CEEC), pp. 47–52 (2012).
31. Cryer, P.E., Davis, S.N., Shamoon, H.: Hypoglycemia in diabetes. *Diabetes Care* **26**(6), 1902–1912 (2003).
32. Currie, L.A.: Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure and Applied Chemistry* **67**(10), 1699–1723 (1995). <https://doi.org/10.1351/pac199567101699>. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/pac199567101699/html>.
33. Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A.: Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **10**(2), 389–406 (2006). <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00407.x>.
34. Den Boef, G., Hulanicki, A.G.: Recommendations for the usage of selective, selectivity and related terms in analytical chemistry. *Pure and Applied Chemistry* **55**(3), 553–556 (1983). <https://doi.org/https://doi.org/10.1351/pac198855030553>. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/pac198855030553/html>.

35. Dinca, M.P., Leca, A., Apostol, D., Mernea, M., Calborean, O., Mihailescu, D., Dascalu, T.: Transmission THz time domain system for biomolecules spectroscopy. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* **12**(1), 110–114 (2010).
36. Ding, T., Li, R., Zeidler, J.A., Huber, T.L., Gladden, L.F., Middelberg, A.P.J., Falconer, R.J.: Terahertz and far infrared spectroscopy of alanine-rich peptides having variable ellipticity. *Optics Express* **18**(26), 27431–27444 (2010). <https://doi.org/10.1364/OE.18.027431>. <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=oe-18-26-27431>.
37. Dobroiu, A., Otani, C.: Measurement of the complex refractive index of liquids in the terahertz range using ellipsometry. In: 35th International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, pp. 1–1 (2010). <https://doi.org/10.1109/ICIMW.2010.5613053>.
38. Duvillaret, L., Garet, F., Coutaz, J.: Highly precise determination of optical constants and sample thickness in terahertz time-domain spectroscopy. *Applied optics* **38**, 409–415 (1999).
39. Duvillaret, L., Garet, F., Coutaz, J.L.: A reliable method for extraction of material parameters in terahertz time-domain spectroscopy. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* **2**(3), 739–746 (1996). <https://doi.org/10.1109/2944.571775>.
40. Ebbinghaus, S., Kim, S.J., Heyden, M., Yu, X., Gruebele, M., Leitner, D.M., Havenith, M.: Protein sequence- and ph-dependent hydration probed by terahertz spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **130**(8), 2374–2375 (2008). <https://doi.org/10.1021/ja0746520>.
41. Ebbinghaus, S., Kim, S.J., Heyden, M., Yu, X., Heugen, U., Gruebele, M., Leitner, D.M., Havenith, M.: An extended dynamical hydration shell around proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(52), 20749–20752 (2007). <https://doi.org/10.1073/pnas.0709207104>. <http://www.pnas.org/content/104/52/20749.abstract>.
42. Ebeling, K.: *Integrierte Optoelektronik: Wellenleiteroptik, Photonik, Halbleiter*. Springer (1989). http://books.google.de/books?id=6Vs_PwAACAAJ.
43. Enzo Life Sciences, Inc.: cAMP complete ELISA kit (2019). <http://www.enzolifesciences.com/ADI-900-163/camp-complete-elisa-kit/html>. Accessed 07/19 at <http://www.enzolifesciences.com/>.
44. Evans, T.W.: Review article - albumin as a drug - biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **16**, 6–11 (2002). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.16.s5.2.x>.
45. Fan, X., White, I.M., Shopova, S.I., Zhu, H., Suter, J.D., Sun, Y.: Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytica Chimica Acta* **620**(1–2), 8–26 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.022>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267008009343>.
46. Ferguson, B., Zhang, X.C.: Materials for terahertz science and technology. *Nature Materials* **1**(1), 26–33 (2002). <https://doi.org/10.1038/nmat708>.
47. Fischer, B., Wietzke, S., Reuter, M., Peters, O., Gente, R., Jansen, C., Vieweg, N., Koch, M.: Investigating material characteristics and morphology of polymers using terahertz technologies. *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology* **3**(3), 259–268 (2013).
48. Funkner, S., Havenith, M., Schwaab, G.: Urea, a structure breaker? answers from THz absorption spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* **116**(45), 13374–13380 (2012). <https://doi.org/10.1021/jp308699w>.
49. George, D., Knab, J., He, Y., Kumauchi, M., Birge, R., Hoff, W., Markelz, A.: Photoactive yellow protein terahertz response: Hydration, heating and intermediate states. *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology* **3**(3), 288–294 (2013).
50. George, P.A., Hui, W., Rana, F., Hawkins, B.G., Smith, A.E., Kirby, B.J.: Microfluidic devices for terahertz spectroscopy of biomolecules. *Optics Express* **16**(3), 1577–1582 (2008). <https://doi.org/10.1364/OE.16.001577>. <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=oe-16-3-1577>.
51. Glancy, P., Beyermann, W.P.: Dielectric properties of fully hydrated nucleotides in the terahertz frequency range. *The Journal of Chemical Physics* **132**(24), 245102 (2010). <https://doi.org/10.1063/1.3457941>. <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jcp/132/24/10.1063/1.3457941>.
52. Globus, T., Woolard, D., Crowe, T.W., Khromova, T., Gelmont, B., Hesler, J.: Terahertz fourier transform characterization of biological materials in a liquid phase. *Journal of Physics D: Applied Physics* **39**(15), 3405–3413 (2006). <http://stacks.iop.org/0022-3727/39/i=15/a=028>.
53. Gressner, A.M., Arndt, T.: *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer (2013).

54. Hansma, H., Kim, K., Laney, D., Garcia, R., Argaman, M., Allen, M., Parsons, S.: Properties of biomolecules measured from atomic force microscope images: A review. *Journal of Structural Biology* **119**(2), 99–108 (1997). <https://doi.org/10.1006/jsbi.1997.3855>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847797938557>.
55. Haring Bolívar, P., Brucherseifer, M., Nagel, M., Kurz, H., Bosserhoff, A., Büttner, R.: Label-free probing of genes by time-domain terahertz sensing. *Physics in Medicine and Biology* **47**(21), 3815–3821 (2002). <http://stacks.iop.org/0031-9155/47/i=21/a=320>.
56. Haring Bolívar, P., Nagel, M., Richter, F., Brucherseifer, M., Kurz, H., Bosserhoff, A., Büttner, R.: Label-free THz sensing of genetic sequences: towards ‘THz biochips’. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **362**(1815), 323–335 (2004). <https://doi.org/10.1098/rsta.2003.1318>.
57. Harper, A., Anderson, M.R.: Electrochemical glucose sensors - developments using electrostatic assembly and carbon nanotubes for biosensor construction. *Sensors* **10**(9), 8248–8274 (2010). <https://doi.org/10.3390/s100908248>. <http://www.mdpi.com/1424-8220/10/9/8248>.
58. Heo, C., Ha, T., You, C., Huynh, T., Lim, H., Kim, J., Kesama, M.R., Lee, J., Kim, T.T., Lee, Y.H.: Identifying fibrillization state of $\alpha\beta$ protein via near-field thz conductance measurement. *ACS Nano* **14**(6), 6548–6558 (2020). <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b08572>. PMID: 32167289.
59. Heugen, U., Schwaab, G., Bründermann, E., Heyden, M., Yu, X., Leitner, D.M., Havenith, M.: Solute-induced retardation of water dynamics probed directly by terahertz spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(33), 12301–12306 (2006). <https://doi.org/10.1073/pnas.0604897103>. <http://www.pnas.org/content/103/33/12301.abstract>.
60. Hideaki Kitahara Takuma Yagi, K.M., Takeda, M.W.: Dielectric characteristics of water solutions of ethanol in the terahertz region. *Journal of the Korean Physical Society* **46**, 82–85 (2005).
61. Hirori, H., Yamashita, K., Nagai, M., Tanaka, K.: Attenuated total reflection spectroscopy in time domain using terahertz coherent pulses. *Japanese Journal of Applied Physics* **43**(10A), L1287–L1289 (2004). <http://stacks.iop.org/1347-4065/43/i=10A/a=L1287>.
62. Holzinger, M., Le Goff, A., Cosnier, S.: Nanomaterials for biosensing applications: a review. *Frontiers in chemistry* **2**, 63 (2014).
63. Homola, J.: Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chemical Reviews* **108**(2), 462–493 (2008). <https://doi.org/10.1021/cr068107d>.
64. Horst Bannwarth Bruno P. Kremer, A.S.: *Basiswissen Physik, Chemie und Biochemie*. Springer Spektrum (2013).
65. Inczedy, J., Lengyel, T., Ure, A.M.: *IUPAC on Analytical Nomenclature, Definitive Rules 1997, 3rd ed. (the "Orange Book")*. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1998). https://media.iupac.org/publications/analytical_compedium/.
66. Ip, V., McKeage, M.J., Thompson, P., Damianovich, D., Findlay, M., Liu, J.J.: Platinum-specific detection and quantification of oxaliplatin and Pt(R,R-diaminocyclohexane)Cl₂ in the blood plasma of colorectal cancer patients. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **23**, 881–884 (2008). <https://doi.org/10.1039/B716925F>.
67. Issaq, H.J., Veenstra, T.D.: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques* **44**(5), 697–700 (2008).
68. Jeong, S.Y., Cheon, H., Lee, D., Son, J.H.: Determining terahertz resonant peaks of biomolecules in aqueous environment. *Opt. Express* **28**(3), 3854–3863 (2020). <https://doi.org/10.1364/OE.381529>. <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=oe-28-3-3854>.
69. Jepsen, P., Cooke, D., Koch, M.: Terahertz spectroscopy and imaging - modern techniques and applications. *Laser & Photonics Reviews* **5**(1), 124–166 (2011). <https://doi.org/10.1002/lpor.201000011>.
70. Jepsen, P.U., Jensen, J.K., Møller, U.: Characterization of aqueous alcohol solutions in bottles with thz reflection spectroscopy. *Optics Express* **16**(13), 9318–9331 (2008). <https://doi.org/10.1364/OE.16.009318>. <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=oe-16-13-9318>.
71. Jepsen, P.U., Merbold, H.: Terahertz Reflection Spectroscopy of Aqueous NaCl and LiCl Solutions. *Journal of Infrared Millimeter and Terahertz Waves* **31**(4), 430–440 (2010). <https://doi.org/10.1007/s10762-009-9603-6>.
72. Jepsen, P.U., Møller, U., Merbold, H.: Investigation of aqueous alcohol and sugar solutions with reflection terahertz time-domain spectroscopy. *Optics Express* **15**(22), 14717–14737 (2007). <https://doi.org/10.1364/OE.15.014717>. <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=oe-15-22-14717>.

73. Jin, W., Brennan, J.D.: Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. *Analytica Chimica Acta* **461**(1), 1–36 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00229-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00229-5). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267002002295>.
74. Kainosho, M., Torizawa, T., Iwashita, Y., Terauchi, T., Mei Ono, A., Güntert, P.: Optimal isotope labelling for NMR protein structure determinations. *Nature* **440**(7080), 52–57 (2006). <https://doi.org/10.1038/nature04525>.
75. Kaji, D., Thomas, K.: Na⁺-K⁺ pump in chronic renal failure. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **252**(5), F785–F793 (1987).
76. Karimi, D., Karimi, R.: *Biomedical & Pharmaceutical Sciences with Patient Care Correlations*. Jones & Bartlett Learning (2014). <https://books.google.de/books?id=nJnpAgAAQBAJ>.
77. Kaun, N., Baena, J.R., Newnham, D., Lendl, B.: Terahertz pulsed spectroscopy as a new tool for measuring the structuring effect of solutes on water. *Applied Spectroscopy* **59**(4), 505–510 (2005). <http://as.osa.org/abstract.cfm?URI=as-59-4-505>.
78. Keiding, S.R.: Dipole correlation functions in liquid benzenes measured with terahertz time domain spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry A* **101**(29), 5250–5254 (1997). <https://doi.org/10.1021/jp970605q>. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp970605q>.
79. Kelland, L.: The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* **7**(8), 573–584 (2007). <https://doi.org/10.1038/nrc2167>.
80. Kindt, J.T., Schmuttenmaer, C.A.: Far-infrared dielectric properties of polar liquids probed by femtosecond terahertz pulse spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry* **100**(24), 10373–10379 (1996). <https://doi.org/10.1021/jp960141g>.
81. Kitagawa, J., Ohkubo, T., Onuma, M., Kadoya, Y.: THz spectroscopic characterization of biomolecule/water systems by compact sensor chips. *Applied Physics Letters* **89**(4), 041114 (2006).
82. Koeberg, M., Wu, C.C., Kim, D., Bonn, M.: THz dielectric relaxation of ionic liquid: water mixtures. *Chemical Physics Letters* **439**(1–3), 60–64 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2007.03.075>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009261407003843>.
83. Laakso, M.: Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes* **48**(5), 937–942 (1999). <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/48/5/937>.
84. Laman, N., Harsha, S.S., Grischkowsky, D., Melingery, J.S.: High-resolution waveguide THz spectroscopy of biological molecules. *Biophysical Journal* **94**(3), 1010–1020 (2008). <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.113647>.
85. Laurette, S., Treizebre, A., Elaghi, A., Hatirnaz, B., Froidevaux, R., Affouard, F., Duponchel, L., Bocquet, B.: Highly sensitive terahertz spectroscopy in microsystem. *Royal Society of Chemistry Advanced 2*, 10064–10071 (2012). <https://doi.org/10.1039/C2RA21320F>.
86. Lebowitz, J., Lewis, M.S., Schuck, P.: Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Science* **11**(9), 2067–2079 (2002). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2373601/>.
87. Lequin, R.M.: Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry* **51**(12), 2415–2418 (2005). <http://www.clinchem.org/content/51/12/2415>.
88. Li, J., Chu, X., Liu, Y., Jiang, J.H., He, Z., Zhang, Z., Shen, G., Yu, R.Q.: A colorimetric method for point mutation detection using high-fidelity DNA ligase. *Nucleic Acids Research* **33**(19), e168–e168 (2005). <http://nar.oxfordjournals.org/content/33/19/e168.abstract>.
89. Liebe, H.J., Hufford, G.A., Manabe, T.: A model for the complex permittivity of water at frequencies below 1 THz. *International Journal of Infrared and Millimeter Waves* **12**(7), 659–675 (1991). <https://doi.org/10.1007/BF01008897>.
90. Lottspeich, F., Zorbas, H.: *Bioanalytik. Spektrum-Lehrbuch. Spektrum* (1998). <http://books.google.de/books?id=3EszOgAACAAJ>.
91. Luong, T.Q., Verma, P.K., Mitra, R.K., Havenith, M.: Do hydration dynamics follow the structural perturbation during thermal denaturation of a protein: A terahertz absorption study. *Biophysical Journal* **101**(4), 925–933 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.05.011>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349511005819>.
92. Luppia, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W.: Immunosensors - principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* **314**(1–2), 1–26 (2001). [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00629-5](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00629-5). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898101006295>.
93. Luttmann, W., Bratke, K., Kupper, M., Myrtek, D.: *Der Experimentator - Immunologie*. Springer (2014). <http://books.google.de/books?id=oF9OnwEACAAJ>.

94. Lvovska, M.I., Seeman, N.C., Sha, R., Globus, T.R., Khromova, T.B., Dorofeeva, T.S.: THz Characterization of DNA Four-Way Junction and Its Components. *IEEE Transactions on Nanotechnology* **9**(5, SI), 610–617 (2010). <https://doi.org/10.1109/TNANO.2010.2049498>.
95. Madelin, G., Babb, J., Xia, D., Regatte, R.R.: Repeatability of quantitative sodium magnetic resonance imaging for estimating pseudo-intracellular sodium concentration and pseudo-extracellular volume fraction in brain at 3 T. *PLOS ONE* **10**(3), 1–15 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118692>.
96. Madelin, G., Kline, R., Walvick, R., Regatte, R.R.: A method for estimating intracellular sodium concentration and extracellular volume fraction in brain in vivo using sodium magnetic resonance imaging. *Scientific reports* **4**, 4763 (2014). <https://doi.org/10.1038/srep04763>.
97. le Maire, M., Rivas, E., Möller, J.V.: Use of gel chromatography for determination of size and molecular weight of proteins: Further caution. *Analytical Biochemistry* **106**(1), 12–21 (1980). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90112-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90112-8). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269780901128>.
98. Malon, A., Vigassy, T., Bakker, E., Pretsch, E.: Potentiometry at trace levels in confined samples: Ion-selective electrodes with subfemtomole detection limits. *Journal of the American Chemical Society* **128**(25), 8154–8155 (2006). <https://doi.org/10.1021/ja0625780>. PMID: 16787077.
99. Markelz, A., Roitberg, A., Heilweil, E.: Pulsed terahertz spectroscopy of DNA, bovine serum albumin and collagen between 0.1 and 2.0 THz. *Chemical Physics Letters* **320**(1–2), 42–48 (2000). [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(00\)00227-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(00)00227-X). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000926140000227X>.
100. Martín-Mateos, P., Dornuf, F., Duarte, B., Hills, B., Moreno-Oyervides, A., Bonilla-Manrique, O.E., Larcher, F., Krozer, V., Acedo, P.: In-vivo, non-invasive detection of hyperglycemic states in animal models using mm-wave spectroscopy. *Scientific reports* **6**(1), 1–8 (2016).
101. Massari, A.M., Finkelstein, I.J., McClain, B.L., Goj, A., Wen, X., Bren, K.L., Loring, R.F., Fayer, M.D.: The influence of aqueous versus glassy solvents on protein dynamics: Vibrational echo experiments and molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society* **127**(41), 14279–14289 (2005). <https://doi.org/10.1021/ja053627w>.
102. Masson, J.B., Sauviat, M.P., Martin, J.L., Gallot, G.: Ionic contrast terahertz near-field imaging of axonal water fluxes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(13), 4808–4812 (2006). <https://doi.org/10.1073/pnas.0510945103>. <http://www.pnas.org/content/103/13/4808.abstract>.
103. Max, J.J., Chapados, C.: Isotope effects in liquid water by infrared spectroscopy. iii. H₂O and D₂O spectra from 6000 to 0 cm⁻¹. *The Journal of Chemical Physics* **131**(18), 184505 (2009). <https://doi.org/10.1063/1.3258646>. <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jcp/131/18/10.1063/1.3258646>.
104. Max Born, E.W.: *Principles of optics*, 7th (expanded) edition edn. The Press Syndicate of the University of Cambridge (2003).
105. McNaught, A.D., Wilkinson, A.: *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the “Gold Book”). Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). <https://doi.org/10.1351/goldbook.L03540>.
106. Meister, K., Ebbinghaus, S., Xu, Y., Duman, J.G., DeVries, A., Gruebele, M., Leitner, D.M., Havenith, M.: Long-range protein-water dynamics in hyperactive insect antifreeze proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**(5), 1617–1622 (2013). <https://doi.org/10.1073/pnas.1214911110>. <http://www.pnas.org/content/110/5/1617.abstract>.
107. Merlot, A.M., Kalinowski, D.S., Richardson, D.R.: Unraveling the mysteries of serum albumin – more than just a serum protein. *Frontiers in Physiology* **5**, 1–7 (2014). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4129365/>.
108. Mittleman, D., Nuss, M., Colvin, V.: Terahertz spectroscopy of water in inverse micelles. *Chemical Physics Letters* **275**(3–4), 332–338 (1997). [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(97\)00760-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(97)00760-4).
109. Mittleman, D.M., Jacobsen, R.H., Nuss, M.C.: T-Ray imaging. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* **2**, 679–692 (1996).
110. Möller, U., Cooke, D.G., Tanaka, K., Jepsen, P.U.: Terahertz reflection spectroscopy of debye relaxation in polar liquids. *Journal of the Optical Society of America B* **26**(9), A113–A125 (2009). <https://doi.org/10.1364/JOSAB.26.00A113>. <http://josab.osa.org/abstract.cfm?URI=josab-26-9-A113>.

111. Morth, J.P., Pedersen, B.P., Buch-Pedersen, M.J., Andersen, J.P., Vilsen, B., Palmgren, M.G., Nissen, P.: A structural overview of the plasma membrane Na^+ , K^+ -atpase and H^+ -atpase ion pumps. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**(1), 60–70 (2011). <https://doi.org/10.1038/nrm3031>.
112. Murakami, H., Toyota, Y., Nishi, T., Nashima, S.: Terahertz absorption spectroscopy of protein-containing reverse micellar solution. *Chemical Physics Letters* **519–520**(0), 105–109 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2011.11.029>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009261411013935>.
113. Nagai, M., Yada, H., Arikawa, T., Tanaka, K.: Terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy in water and biological solution. *International Journal of Infrared and Millimeter Waves* **27**(4), 505–515 (2006). <https://doi.org/10.1007/s10762-006-9098-3>.
114. Nagel, M., Haring Bolívar, P., Brucherseifer, M., Kurz, H., Bosserhoff, A., Büttner, R.: Integrated THz technology for label-free genetic diagnostics. *Applied Physics Letters* **80**(1), 154–156 (2002). <https://doi.org/10.1063/1.1428619>. <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/apl/80/1/10.1063/1.1428619>.
115. Naide, W., Matz, R., Spear, P.: Cholangiocarcinoma causing hypercalcemia and hypophosphatemia without skeletal metastases (pseudohyperparathyroidism). *The American Journal of Digestive Diseases* **13**(8), 705–708 (1968). <https://doi.org/10.1007/BF02232994>.
116. Naito, H., Ogawa, Y., Hoshina, H., Sultana, S., Kondo, N.: Analysis of intermolecular interaction of poly(*n*-isopropylacrylamide) solution with attenuated total reflectance terahertz spectroscopy. *Applied Physics Letters* **100**(19), 191102 (2012).
117. Naito, H., Ogawa, Y., Shiraga, K., Kondo, N., Hirai, T., Osaka, I., Kubota, A.: Inspection of milk components by terahertz attenuated total reflectance (THz-ATR) spectrometer equipped temperature controller. In: *IEEE/SICE International Symposium on System Integration (SII)*, pp. 192–196 (2011).
118. Niehues, G., Kaledin, A.L., Bowman, J.M., Havenith, M.: Driving of a small solvated peptide in the IR and THz range - a comparative study of energy flow. *The Journal of Physical Chemistry B* **116**(33), 10020–10025 (2012). <https://doi.org/10.1021/jp3021358>.
119. Ogawa, Y., Cheng, L., Hayashi, S., Fukunaga, K.: Attenuated total reflection spectra of aqueous glycine in the terahertz region. *IEICE Electronics Express* **6**(2), 117–121 (2009).
120. O'Hara, J.F., Withayachumnankul, W., Al-Naib, I.: A Review on Thin-film Sensing with Terahertz Waves. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves* **33**(3), 245–291 (2012). <https://doi.org/10.1007/s10762-012-9878-x>.
121. Ohkubo, T., Onuma, M., Kitagawa, J., Kadoya, Y.: Micro-strip-line-based sensing chips for characterization of polar liquids in terahertz regime. *Applied Physics Letters* **88**(21), 212511 (2006).
122. Overington, J.P., Al-Lazikani, B., Hopkins, A.L.: How many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery* **5**(12), 993–996 (2006). <https://doi.org/10.1038/nrd2199>.
123. Pandey, A., Mann, M.: Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**(6788), 837–846 (2000). <https://doi.org/10.1038/35015709>.
124. Patton, W.F.: Detection technologies in proteome analysis. *Journal of Chromatography B* **771**(1–2), 3–31 (2002). [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00043-0](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00043-0). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023202000430>.
125. Pedersen, J.E., Keiding, S.: THz time-domain spectroscopy of nonpolar liquids. *IEEE Journal of Quantum Electronics* **28**(10), 2518–2522 (1992).
126. Peiponen, K., Zeitler, A., Kuwata-Gonokami, M.: *Terahertz Spectroscopy and Imaging*. Springer Series in Optical Sciences. Springer (2012). <https://books.google.de/books?id=wYK5BQAAQBAJ>.
127. Peters, T.: *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. Elsevier Science (1995). <https://doi.org/10.1016/B978-012552110-9/50008-8>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125521109500088>.
128. Plusquellic, D.F., Siegrist, K., Heilweil, E.J., Esenturk, O.: Applications of terahertz spectroscopy in biosystems. *ChemPhysChem* **8**(17), 2412–2431 (2007). <https://doi.org/10.1002/cphc.200700332>.
129. van der Post, S.T., Tielrooij, K.J., Hunger, J., Backus, E.H.G., Bakker, H.J.: Femtosecond study of the effects of ions and hydrophobes on the dynamics of water. *Faraday Discussions* **160**, 171–189 (2013). <https://doi.org/10.1039/C2FD20097J>.
130. Powell, J., Edwards, G., Genzel, L., Kremer, F., Wittlin, A., Kubasek, W., Peticolas, W.: Investigation of far-infrared vibrational modes in polynucleotides. *Physical Review A* **35**(9), 3929 (1987).
131. Prinsen, B.H., de Sain-van der Velden, M.G.: Albumin turnover: experimental approach and its application in health and renal diseases. *Clinica Chimica Acta* **347**(1–2), 1–14

- (2004). <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.04.005>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898104002050>.
132. Qiao, W., Yang, K., Thoma, A., Dekorsy, T.: Dielectric relaxation of HCl and NaCl solutions investigated by terahertz time-domain spectroscopy. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves* **33**(10), 1029–1038 (2012). <https://doi.org/10.1007/s10762-012-9920-z>.
133. Qin, J., Xie, L., Ying, Y.: Rapid analysis of tetracycline hydrochloride solution by attenuated total reflection terahertz time-domain spectroscopy. *Food Chemistry* **224**, 262–269 (2017). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.064>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616320854>.
134. Rønne, C., Thrane, L., Åstrand, P.O., Wallqvist, A., Mikkelsen, K.V., Keiding, S.R.: Investigation of the temperature dependence of dielectric relaxation in liquid water by THz reflection spectroscopy and molecular dynamics simulation. *The Journal of Chemical Physics* **107**(14), 5319–5331 (1997). <https://doi.org/10.1063/1.474242>. <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jcp/107/14/10.1063/1.474242>.
135. Rottman, A., Gilboa, H., Schechter, Y., Silver, B.L.: The determination of intracellular sodium concentration in human red blood cells: Nuclear magnetic resonance measurements. *Analytical Biochemistry* **201**(1), 48–51 (1992). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90172-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90172-4). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269792901724>.
136. Saha, S.C., Grant, J.P., Ma, Y., Khalid, A., Hong, F., Cumming, D.: Terahertz frequency-domain spectroscopy method for vector characterization of liquid using an artificial dielectric. *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology* **2**(1), 113–122 (2012).
137. Schauer, U., Stemberg, F., Rieger, C.H., Borte, M., Schubert, S., Riedel, F., Herz, U., Renz, H., Wick, M., Carr-Smith, H.D., Bradwell, A.R., Herzog, W.: IgG subclass concentrations in certified reference material 470 and reference values for children and adults determined with the binding site reagents. *Clinical Chemistry* **49**(11), 1924–1929 (2003). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.022350>. <http://www.clinchem.org/content/49/11/1924.abstract>.
138. Schmidt, D.A., Birer, Ö., Funkner, S., Born, B.P., Gnanasekaran, R., Schwaab, G.W., Leitner, D.M., Havenith, M.: Rattling in the cage: Ions as probes of sub-picosecond water network dynamics. *Journal of the American Chemical Society* **131**(51), 18512–18517 (2009). <https://doi.org/10.1021/ja9083545>.
139. Szezech, R., Haring Bolívar, P.: THz spectroscopy of bovine serum albumin solution using the long-range guided mode supported by thin liquid films. In: 2014 Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO) - Laser Science to Photonic Applications, pp. 1–2 (2014). https://doi.org/10.1364/CLEO_SI.2014.SF1F.4.
140. Szezech, R., Rivas, J.G., Berrier, A., Giannini, V., Pirruccio, G., Debus, C., Schäfer-Eberwein, H., Haring Bolívar, P.: Long-range guided thz radiation by thin layers of water. *Optics express* **20**(25), 27781–27791 (2012).
141. Sebastiani, F., Verde, A.V., Heyden, M., Schwaab, G., Havenith, M.: Cooperativity and ion pairing in magnesium sulfate aqueous solutions from the dilute regime to the solubility limit. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **22**, 12140–12153 (2020). <https://doi.org/10.1039/C9CP06845G>.
142. Serita, K., Murakami, H., Kawayama, I., Tonouchi, M.: A Terahertz-Microfluidic Chip with a Few Arrays of Asymmetric Meta-Atoms for the Ultra-Trace Sensing of Solutions. *Photonics* **6**(1), 12 (2019). <https://doi.org/10.3390/photonics6010012>.
143. Shalon, D., Smith, S.J., Brown, P.O.: A DNA microarray system for analyzing complex dna samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Research* **6**(7), 639–645 (1996). <http://genome.cshlp.org/content/6/7/639>.
144. Sharma, V., Boehm, F., Seitz, M., Schwaab, G., Havenith, M.: From solvated ions to ion-pairing: a THz study of lanthanum(III) hydration. *Physical Chemistry Chemical Physics* **15**(21), 8383–8391 (2013). <https://doi.org/10.1039/c3cp50865j>.
145. Shendure, J., Ji, H.: Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotech* **26**(10), 1135–1145 (2008). <https://doi.org/10.1038/nbt1486>.
146. Shih, K., Pitchappa, P., Jin, L., Chen, C.H., Singh, R., Lee, C.: Nanofluidic terahertz metasensor for sensing in aqueous environment. *Applied Physics Letters* **113**(7), 071105 (2018). <https://doi.org/10.1063/1.5041485>.
147. Shiraga, K., Naito, H., Suzuki, T., Kondo, N., Ogawa, Y.: Hydration and hydrogen bond network of water during the coil-to-globule transition in Poly(N-isopropylacrylamide) aqueous solution

- at cloud point temperature. *The Journal of Physical Chemistry B* **119**(17), 5576–5587 (2015). <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b01021>. PMID: 25865253.
148. Siegel, P.: Terahertz technology. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques* **50**(3), 910–928 (2002).
149. Sigma-Aldrich: Mak181 - high sensitivity glucose assay kit (2019). <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/mak181>. Accessed 08/19 at www.sigmaaldrich.com.
150. Smiechowski, M., Forbert, H., Marx, D.: Spatial decomposition and assignment of infrared spectra of simple ions in water from mid-infrared to thz frequencies: $\text{Li}^+(\text{aq})$ and $\text{F}^-(\text{aq})$. *The Journal of Chemical Physics* **139**(1), 014506 (2013). <https://doi.org/10.1063/1.4812396>. <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jcp/139/1/10.1063/1.4812396>.
151. Smith, R.M., Arnold, M.A.: Terahertz Time-Domain Spectroscopy of Solid Samples: Principles, Applications, and Challenges. *Applied Spectroscopy Reviews* **46**(8), 636–679 (2011). <https://doi.org/10.1080/05704928.2011.614305>.
152. Smith, S., Rohwer, E., Neethling, P.: Novel self-referencing time-domain thz ellipsometer for measurement of samples in aqueous environments. In: 2019 Conference on Lasers and Electro-Optics Europe European Quantum Electronics Conference (CLEO/Europe-EQEC), pp. 1–1 (2019). <https://doi.org/10.1109/CLEOE-EQEC.2019.8872771>.
153. Son, J.H., Oh, S.J., Cheon, H.: Potential clinical applications of terahertz radiation. *Journal of Applied Physics* **125**(19), 190901 (2019).
154. Song, C., Fan, W.H., Ding, L., Chen, X., Chen, Z.Y., Wang, K.: Terahertz and infrared characteristic absorption spectra of aqueous glucose and fructose solutions. *Scientific Reports* **8**(1) (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27310-7>.
155. Sun, J., Niehues, G., Forbert, H., Decka, D., Schwaab, G., Marx, D., Havenith, M.: Understanding THz spectra of aqueous solutions: Glycine in light and heavy water. *Journal of the American Chemical Society* **136**(13), 5031–5038 (2014). <https://doi.org/10.1021/ja4129857>. PMID: 24606118.
156. Sun, Y., Zhang, Y., Pickwell-MacPherson, E.: Investigating antibody interactions with a polar liquid using terahertz pulsed spectroscopy. *Biophysical Journal* **100**(1), 225–231 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.11.020>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349510014189>.
157. Sushko, O., Dubrovka, R., Donnan, R.S.: Sub-terahertz spectroscopy reveals that proteins influence the properties of water at greater distances than previously detected. *The Journal of Chemical Physics* **142**(5), 055101 (2015). <https://doi.org/10.1063/1.4907271>.
158. Taguchi, R., Terai, T., Ueno, T., Komatsu, T., Hanaoka, K., Urano, Y.: A protein-coupled fluorescent probe for organelle-specific imaging of Na^+ . *Sensors and Actuators B: Chemical* **265**, 575–581 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.090>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092540051830580X>.
159. Takebe, G., Kawada, Y., Akiyama, K., Takahashi, H., Takamoto, H., Hiramatsu, M.: Evaluation of drug crystallinity in aqueous suspension using terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **102**(11), 4065–4071 (2013). <https://doi.org/10.1002/jps.23716>.
160. Tang, M., Zhang, M., Xia, L., Wei, D., Yang, Z., Yan, S., Du, C., Cui, H.L.: Detection of gene mutation responsible for huntington's disease by terahertz attenuated total reflection microfluidic spectroscopy. *Journal of Biophotonics* (2020). <https://doi.org/10.1002/jbio.202000315>. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbio.202000315>.
161. Tang, M., Zhang, M., Xia, L., Yang, Z., Yan, S., Wang, H., Wei, D., Du, C., Cui, H.L.: Detection of single-base mutation of dna oligonucleotides with different lengths by terahertz attenuated total reflection microfluidic cell. *Biomed. Opt. Express* **11**(9), 5362–5372 (2020). <https://doi.org/10.1364/BOE.400487>. <http://www.osapublishing.org/boe/abstract.cfm?URI=boe-11-9-5362>.
162. Tang, M., Zhang, M., Yan, S., Xia, L., Yang, Z., Du, C., Cui, H.L., Wei, D.: Detection of DNA oligonucleotides with base mutations by terahertz spectroscopy and microstructures. *PLOS ONE* **13**(1), 1–12 (2018). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191515>.
163. Taylor, Z., Singh, R., Bennett, D., Tewari, P., Kealey, C., Bajwa, N., Culjat, M., Stojadinovic, A., Lee, H., Hubschman, J., Brown, E., Grundfest, W.: THz medical imaging: in vivo hydration sensing. *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology* **1**(1), 201–219 (2011).

164. Thrane, L., Jacobsen, R., Jepsen, P.U., Keiding, S.: THz reflection spectroscopy of liquid water. *Chemical Physics Letters* **240**(4), 330–333 (1995). [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(95\)00543-D](https://doi.org/10.1016/0009-2614(95)00543-D). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000926149500543D>.
165. Tian, K., Prestgard, M., Tiwari, A.: A review of recent advances in nonenzymatic glucose sensors. *Materials Science and Engineering: C* **41**(0), 100–118 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.013>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493114002057>.
166. Titova, L.V., Ayesheshim, A.K., Golubov, A., Rodriguez-Juarez, R., Woycicki, R., Hegmann, F.A., Kovalchuk, O.: Intense THz pulses down-regulate genes associated with skin cancer and psoriasis: a new therapeutic avenue? *Scientific Reports* **3**, 2363– (2013). <https://doi.org/10.1038/srep02363>.
167. Tonouchi, M.: Cutting-edge terahertz technology. *Nature Photonics* **1**(2), 97–105 (2007). <https://doi.org/10.1038/nphoton.2007.3>.
168. Turner, A., Karube, I., Wilson, G.S.: *Biosensors: fundamentals and applications*. Oxford university press (1987).
169. Uson, I., Sheldrick, G.M.: Advances in direct methods for protein crystallography. *Current Opinion in Structural Biology* **9**(5), 643–648 (1999). [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00020-2](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00020-2). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X99000202>.
170. Van Zandt, L., Saxena, V.: Millimeter-microwave spectrum of DNA: Six predictions for spectroscopy. *Physical Review A* **39**(5), 2672 (1989).
171. Venables, D.S., Chiu, A., Schmuttenmaer, C.A.: Structure and dynamics of nonaqueous mixtures of dipolar liquids. i. infrared and far-infrared spectroscopy. *The Journal of Chemical Physics* **113**(8), 3243–3248 (2000). <https://doi.org/10.1063/1.1287145>. <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jcp/113/8/10.1063/1.1287145>.
172. Walther, M., Fischer, B., Schall, M., Helm, H., Jepsen, P.U.: Far-infrared vibrational spectra of all-trans, 9-cis and 13-cis retinal measured by THz time-domain spectroscopy. *Chemical Physics Letters* **332**(3–4), 389–395 (2000).
173. Wang, C., Huang, Y., Zhou, R., Xie, L., Ying, Y.: Rapid analysis of a doxycycline hydrochloride solution by metallic mesh device-based reflection terahertz spectroscopy. *Opt. Express* **28**(8), 12001–12010 (2020). <https://doi.org/10.1364/OE.389517>. <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=oe-28-8-12001>.
174. Wang, J.: Electrochemical glucose biosensors. *Chemical Reviews* **108**(2), 814–825 (2008). <https://doi.org/10.1021/cr068123a>.
175. Weisenstein, C., Schaar, D., Wigger, A.K., Schäfer-Eberwein, H., Bosserhoff, A.K., Haring Bolívar, P.: Ultrasensitive THz biosensor for PCR-free cDNA detection based on frequency selective surfaces. *Biomedical Optics Express* **11**(1), 448–460 (2020). <https://doi.org/10.1364/BOE.380818>.
176. Weisenstein, C., Wigger, A.K., Richter, M., Szczech, R., Bosserhoff, A.K., Haring Bolívar, P.: Lower detection limit (2021). <https://www.hqe.eti.uni-siegen.de/en/LDL.html>.
177. Woods, K.N.: Solvent-induced backbone fluctuations and the collective librational dynamics of lysozyme studied by terahertz spectroscopy. *Physical Review E* **81**, 031915 (2010). <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.81.031915>.
178. Wu, X., E, Y., Xu, X., Wang, L.: Label-free monitoring of interaction between DNA and oxaliplatin in aqueous solution by terahertz spectroscopy. *Applied Physics Letters* **101**(3), 033704 (2012).
179. Wu, X., Pan, X., Quan, B., Xu, X., Gu, C., Wang, L.: Self-referenced sensing based on terahertz metamaterial for aqueous solutions. *Applied Physics Letters* **102**(15), 151109 (2013). <https://doi.org/10.1063/1.4802236>.
180. Xu, J., Plaxco, K., Allen, S., Bjarnason, J., Brown, E.: 0.15 - 3.72 THz absorption of aqueous salts and saline solutions. *Applied Physics Letters* **90**(3), 031908 (2007).
181. Xu, J., Plaxco, K.W., Allen, S.J.: Absorption spectra of liquid water and aqueous buffers between 0.3 and 3.72 THz. *The Journal of Chemical Physics* **124**(3), 036101 (2006). <https://doi.org/10.1063/1.2151267>. <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jcp/124/3/10.1063/1.2151267>.
182. Xu, J., Plaxco, K.W., Allen, S.J.: Collective dynamics of lysozyme in water terahertz absorption spectroscopy and comparison with theory. *The Journal of Physical Chemistry B* **110**(47), 24255–24259 (2006). <https://doi.org/10.1021/jp064830w>.
183. Xu, J., Plaxco, K.W., Allen, S.J.: Probing the collective vibrational dynamics of a protein in liquid water by terahertz absorption spectroscopy. *Protein Science* **15**(5), 1175–1181 (2009). <https://doi.org/10.1110/ps.062073506>.

184. Yada, H., Nagai, M., Tanaka, K.: Origin of the fast relaxation component of water and heavy water revealed by terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy. *Chemical Physics Letters* **464**(4–6), 166–170 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2008.09.015>.
185. Yada, H., Nagai, M., Tanaka, K.: The intermolecular stretching vibration mode in water isotopes investigated with broadband terahertz time-domain spectroscopy. *Chemical Physics Letters* **473**(4–6), 279–283 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2009.03.075>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009261409003972>.
186. Yang, P.C., Mahmood, T.: Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* **4**(9), 429 (2012). <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>.
187. Yates, J.R.: Mass spectrometry and the age of the proteome. *Journal of Mass Spectrometry* **33**(1), 1–19 (1998). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199801\)33:1<1::AID-JMS624>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199801)33:1<1::AID-JMS624>3.0.CO;2-9).
188. Yomogida, Y., Iwasaki, T., Matsumoto, M., Mishina, T., Nozaki, R.: High-frequency dielectric response of hydrogen-bonded liquids between 0.2 and 2.5 THz. In: Y.P. Kalmykov (ed.) *Recent Advances in Broadband Dielectric Spectroscopy*, pp. 19–36. Springer (2013). https://doi.org/10.1007/978-94-007-5012-8_2.
189. Zhang, C., Tarhan, E., Ramdas, A.K., Weiner, A.M., Durbin, S.M.: Broadened far-infrared absorption spectra for hydrated and dehydrated myoglobin. *The Journal of Physical Chemistry B* **108**(28), 10077–10082 (2004). <https://doi.org/10.1021/jp049933y>.
190. Zhang, R., Chen, Q., Liu, K., Chen, Z., Li, K., Zhang, X., Xu, J., Pickwell-MacPherson, E.: Terahertz microfluidic metamaterial biosensor for sensitive detection of small-volume liquid samples. *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology* **9**(2), 209–214 (2019). <https://doi.org/10.1109/TTHZ.2019.2898390>.
191. Zhang, X.C.: Terahertz wave imaging: horizons and hurdles. *Physics In Medicine and Biology* **47**(21), PII S0031–9155(02)39663–5 (2002). <https://doi.org/10.1088/0031-9155/47/21/301>.
192. Zhou, R., Wang, C., Huang, Y., Xu, W., Xie, L., Ying, Y.: Optically enhanced terahertz modulation and sensing in aqueous environment with gold nanorods. *Optics and Lasers in Engineering* **133**, 106147 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2020.106147>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143816619317348>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Affiliations

Christian Weisenstein¹  · **Anna Katharina Wigger¹** · **Merle Richter¹** ·
Robert Sczech¹ · **Anja Katrin Bosserhoff²** · **Peter Haring Bolívar¹**

Anna Katharina Wigger
anna.wigger@uni-siegen.de

Merle Richter
merle.richter@uni-siegen.de

Robert Sczech
robert.sczech@uni-siegen.de

Anja Katrin Bosserhoff
anja.bosserhoff@fau.de

Peter Haring Bolívar
peter.haring@uni-siegen.de

- ¹ Institute of High Frequency and Quantum Electronics, University of Siegen, Hölderlinstrasse 3, 57076, Siegen, Germany
- ² Institute of Biochemistry and Molecular Medicine, Friedrich Alexander University Erlangen-Nürnberg, Fahrstrasse 17, 91054, Erlangen, Germany

Kapitel 8

Substrat integrierte Mikrofluidik für empfindliche Biosensorik mit komplementären THz-Metamaterialien in Wasser

Der Inhalt dieses Kapitels wurde veröffentlicht in:

Weisenstein, C., Richter, M., Wigger, A.K., Bosserhoff, A.K. and Haring Bolívar, P., Substrate-integrated microfluidics for sensitive biosensing with complementary THz metamaterials in water, Applied Physics Letters 120 (5), 053702 (2022).¹ Der nachfolgende Abschnitt gibt eine übersetzte Zusammenfassung des referenzierten Artikels wieder.

8.1 Einleitung, Zusammenfassung und Stand der Forschung

Die Entwicklung eines empfindlichen und anpassbaren THz-Biosensors auf Basis von Metamaterialien in Kapitel 5 und 6 hat gezeigt, dass dieser Ansatz sehr gut geeignet ist, um Biomoleküle wie DNA markierungsfrei nachzuweisen. Gegenstand aktueller THz-Forschung sind Untersuchungen an unterschiedlichsten Biomolekülen aus den Gruppen von Kohlenhydraten, Polynukleotiden, Proteinen und anderen schweren Makromolekülen in der natürlichen flüssigen Umgebung des Analyten, wie in Kapitel 7 umfassend analysiert wurde. Die Messung unter der natürlichen physiologischen Bedingungen ist dabei eine Grundvoraussetzung für die Realisierung eines wettbewerbsfähigen Biosensors, insbesondere für die Analyse von biomolekularen Interaktionen, Bindungs- und Adsorptionsprozessen. In dieser fundamentalen Analyse hat sich jedoch unter anderem gezeigt, dass die LDL typischer biomolekularer THz-Analysen in flüssigen Umgebungen um viele Größenordnungen weniger sensitiv als die von etablierten bioanalytischen Werkzeugen ist. Daher werden seit einiger Zeit verschiedene Methoden untersucht, um die Interaktion zwischen einfallender THz-Strahlung und der Probe zu verbessern. Zu diesen Ansätzen gehören unter anderem

¹Veröffentlicht als Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative-Commons-Lizenz CC BY 4.0 verbreitet wird, die die uneingeschränkte Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in jedem Medium erlaubt, sofern das Originalwerk ordnungsgemäß zitiert wird. Für die Wiederverwendung dieses Artikels ist keine gesonderte Genehmigung erforderlich. Informationen zur Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
Link zum Artikel: <https://doi.org/10.1063/5.0076379>

dielektrische *Long-Range Moden* [11], plasmonische Strukturen [12], Scheiben Mikroresonatoren [13] und Metamaterialien [10].

In diesem Kapitel wird ein neuartiger Ansatz vorgestellt, der aus einem komplementären Metamaterial-basierten THz-Biosensor mit einer in das Substrat integrierten mikrofluidischen Struktur besteht. Diese Arbeit basiert dabei ausschließlich auf den Ergebnissen aus numerischen Simulationsmodellen, welche mit der finite Elemente Simulationssoftware HFSS (engl. high-frequency structure simulator) von Ansys erstellt wurden. Die entwickelte Metaoberfläche ist als CASRR realisiert, wobei dessen Resonanz auch bei Messungen in stark absorbierenden Flüssigkeiten wie Wasser erhalten bleibt. Dies wird durch die in das Substrat integrierte mikrofluidische Struktur ermöglicht, welche parallel zur einfallenden elektromagnetischen Welle orientiert ist und so die Performance des Biosensors nur in vernachlässigbarem Maß beeinflusst. So liegt der Q -Faktor für den leeren Biosensor bei $Q = 3.2$ und für den mit Wasser gefüllten Fall bei $Q = 2.9$; die Empfindlichkeit jeweils bei $S = 7.40$ GHz/RIU bzw. $S = 6.74$ GHz/RIU (engl. refractive index unit, RIU). Da diese beiden Performance Indikatoren nur die Wirksamkeit der Wechselwirkung des externen Feldes mit der Resonatormode quantifizieren und nicht die Wirksamkeit der Wechselwirkung der Moden mit dem Analyten darstellen, sind diese als Optimierungskriterium für die reale Anwendung als Biosensor daher nicht geeignet. Stattdessen wurde die Steigung der Fano-Resonanz für die Optimierung genutzt. Die Empfindlichkeit lässt sich für mikrofluidische Metamaterial-basierte Biosensoren besser als Empfindlichkeit pro Volumeneinheit darstellen [90] und erreicht in dieser Arbeit einen Wert von $S_{\text{vol}} = 43766$ GHz/RIU/ μl .

In dem aktuellen Stand der Forschung gibt es nur wenige vergleichbare Arbeiten, in denen Metamaterial-basierte Sensoren für Messungen in wässrigen Umgebungen eingesetzt wurden. Grundsätzlich ist die größte Herausforderung die sehr hohe Absorption von THz-Wellen durch Wasser [9], welche die Resonanz von Metamaterialien zerstören kann. Dennoch wurden in jüngerer Vergangenheit Metamaterial-basierte Biosensoren entwickelt die in der Lage sind, Biomoleküle in wässrigen Umgebungen nachzuweisen [24, 25]. Die in diesen Arbeiten untersuchten Analytschichten entsprechen in ihrer Dicke mit 15-50 μm jedoch der Größe von typischen mikrofluidischen Strukturen. Damit wird der Q -Faktor und vor allem die Spitze-zu-Spitze Transmissionsdifferenz des eingesetzten Metamaterials entweder drastisch reduziert [90–93] oder die Resonanz verschwindet vollständig [22] in Anwesenheit von Wasser. Andere Ansätze versuchen dieses Problem zu umgehen, indem die Analytschichten auf einige hundert Nanometer reduziert werden [18, 94] oder ein Experimentaufbau in einer Reflexionsanordnung realisiert wird [95–97].

Ein quantitativer Vergleich des hier vorgestellten Biosensors mit dem aktuellen Stand der Forschung ist nur sehr eingeschränkt möglich. Verschiedene Performance Indikatoren wie Q -Faktor, Empfindlichkeit oder Figure of Merit (FoM) sind für die Bewertung vorhanden, diese spielen für die Anwendung als Biosensor jedoch nur eine untergeordnete Rolle und sind nicht einheitlich definiert. Dennoch werden eine Vielzahl von theoretischen Biosensoren anhand dieser Indikatoren optimiert und sind in der Praxis nur schwer realisierbar. Daher müssen sich Arbeiten, welche ausschließlich auf

numerischen Simulationen basieren, immer auch in der Anwendung als Biosensor für physiologisch relevante Biomoleküle unter Beweis stellen, wobei die hier vorgestellte Arbeit davon nicht ausgenommen werden soll. In der Literatur gibt es nur eine vergleichbare Arbeit, in der die Empfindlichkeit pro Volumeneinheit angegeben wird und mit einem Wert von $S_{\text{vol}} = 552 \text{ GHz/RIU}/\mu\text{l}$ deutlich unter der Empfindlichkeit des in dieser Arbeit entwickelten Biosensors liegt. Hier muss jedoch beachtet werden, dass die Empfindlichkeit pro Volumeneinheit immer nur für eine Einheitszelle angegeben wird und sich für Arrays entsprechend der Arraygröße reduziert.

Eine tabellarische Übersicht über den Stand der Forschung von Metamaterial-basierten Biosensoren für Messungen in flüssigen Umgebungen ist in Anhang D in Tabelle D.1 (Transmission) und Tabelle D.2 (Reflexion) dargestellt.

Substrate-integrated microfluidics for sensitive biosensing with complementary THz metamaterials in water

Cite as: Appl. Phys. Lett. **120**, 053702 (2022); doi:10.1063/5.0076379

Submitted: 24 October 2021 · Accepted: 21 January 2022 ·

Published Online: 2 February 2022



Christian Weisenstein,^{1,a)} Merle Richter,¹ Anna Katharina Wigger,¹ Anja Bosserhoff,² and Peter Haring Bolívar¹

AFFILIATIONS

¹Institute of High Frequency and Quantum Electronics (HQE), University of Siegen, Siegen, Germany

²Institute of Biochemistry and Molecular Medicine, Friedrich Alexander University Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

^{a)} Author to whom correspondence should be addressed: christian.weisenstein@uni-siegen.de

ABSTRACT

Metamaterials can be utilized for a variety of applications and have emerged as a valuable tool in THz technologies. Used as THz biosensors, metasurfaces can significantly improve the sensitivity in the detection of biomolecules, but the high THz absorption of water represents a major challenge for the realization of a sensor for measurements in liquids. In this article, we propose an approach where the resonance feature of complementary asymmetric split ring resonators (CASRR) is maintained even for measurements in water, allowing highly sensitive detection of biomolecules in strongly absorbing liquids. This is enabled by the introduction of substrate-integrated microfluidics, which are shown to have a minimal effect on the transmission properties of the metamaterial. Due to this approach, the metamaterial structure design is independent from the microfluidic channels. Our simulations also show that the sensitivity of CASRR changes only marginally for lossless and highly absorbing materials. At the same time, the presented concept is easy to fabricate by standard lithography methods and can be applied to other metamaterial structures as well.

© 2022 Author(s). All article content, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). <https://doi.org/10.1063/5.0076379>

THz technology has applications in various disciplines such as imaging,¹ spectroscopy,² layer thickness measurements,³ and the detection of biomolecules.⁴ Since some biomolecules such as DNA and proteins have unique spectral fingerprints in the form of vibrational frequencies in the THz range,^{5,6} this frequency range is considered suitable for developing bioanalytical methods. Already in the early 2000s, the label-free THz detection of DNA was demonstrated.⁷ However, since there is a large difference in the wavelength of the radiation used (1 THz = 300 μm) and the size of biomolecules (typically a few 10 nm), standard spectroscopic THz measurements require a large quantity of sample material, which results in low sensitivity. Various methods and concepts have been introduced in recent years to improve the interaction of sample and incident radiation, such as the long-range guided mode,⁸ plasmonic structures,⁹ waveguide resonators,¹⁰ metasurface cavities,¹¹ toroidal dipole resonances with bound states in the continuum,¹² or metamaterials.¹³ Metamaterial-based sensors are particularly suitable since they are relatively easy to fabricate using standardized lithographic processes. Furthermore, it is

possible to immobilize biomolecules on the sensor surface and, thus, enable selective detection, which is a key requirement for the application as a biosensor.¹⁴

THz metamaterial approaches mainly rely on the sample being dried before measurement, since bulk water absorbs THz waves very strongly¹⁵ and, thus, destroys the metamaterial resonance. However, measurement under physiological conditions is key for the realization of a competitive biosensor, particularly for the analysis of biomolecular interaction, binding, and absorption processes, which is impossible in dry state. There have been recent attempts to realize metamaterial-based sensors that can also operate in water.^{16,17} However, it is found that for the water film thicknesses used, i.e., 15–50 μm , which corresponds to the typical range of microfluidic structures, the Q-factor and the peak-to-peak transmission difference of the resonance feature are significantly reduced^{18–21} or disappear completely.²² Other approaches try to preserve the resonance by applying metamaterials in a reflection setup²³ or to reduce the water film thickness to 50 nm²⁴ or 160 nm.²⁵ However, these approaches suffer from limitations in functionality or

an increase in the complexity of structure or setup. A quantitative evaluation of the Q-factor or the peak-to-peak transmission difference is hard to access since these values are hardly found in publications of THz metamaterials in water.

In this paper, we present simulations of an approach based on substrate-integrated microfluidic channels that allow to maintain the THz metamaterial resonance in the presence of highly absorbing liquids. We describe the concept and design of a complementary asymmetric split ring resonator (CASRR), which is relatively easy to fabricate as a microfluidic sensor for the selective detection of biomolecules under physiological conditions in water.

The structure of the proposed microfluidic sensor is shown in Fig. 1(a). It consists of a metamaterial made of gold deposited on a substrate with microfluidic channels, which are sealed with a cover directly bonded to the metasurface. Both, substrate and cover, consist of $h_{\text{Sub}} = h_{\text{Cover}} = 500 \mu\text{m}$ fused silica glass. The cross section in Fig. 1(b) shows the substrate-integrated microfluidics. The metamaterial and microfluidic structures are implemented as slits in the gold surface. The microfluidic channel in the substrate ($h_{\text{Etch}} = d_{\text{Etch}} = 3 \mu\text{m}$) is used for transport and storage of liquids and could be realized using an isotropic wet etching process. The resulting structure has the advantage that the analyte under investigation is only located at positions with a high electric field concentration. The microfluidic sensor is designed in such a way that the metamaterial structure is primarily oriented in the x-direction, while the microfluidic channels are oriented in the y-direction [cf. Fig. 1(c)]. The incident electric field is polarized in the y-direction and, thus, excites a Fano resonance in the CASRR. As the microfluidic channel is oriented in the same y-direction, the interaction of the channel with the incident wave is minimized, which is important in order to maintain the sensing characteristics of the CASRR.

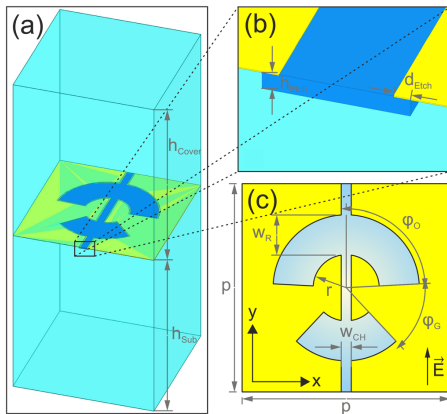


FIG. 1. Schematic of the microfluidic sensor. (a) Sensor structure with quartz substrate, metamaterial, and quartz cover. (b) Cross-sectional view of the substrate-integrated microfluidic channel. (c) CASRR unit cell and dimensioning.

The feasibility of manufacturing with standard lithographic methods is an important aspect in the sensor design, to obtain high reproducibility and potentially low-cost sensors. Our proposed microfluidic THz biosensor is designed in a way that a well-known standard manufacturing process, which we successfully used for THz biosensors in the past, can be adapted.²⁶ One of the key features of our sensor design is the intrinsic self-alignment of microfluidics and metamaterial, since both can be fabricated in one lithographic step. This is an essential asset, as demonstrated earlier,²⁶ to maximize fabrication homogeneity and consequently the intercomparability of sensed signals, which are always related to minute modifications of signals. A significant challenge in comparison to earlier work²⁶ will be bonding the cover to the substrate-integrated microfluidic structure, particularly concerning reliable sealing. From the different bonding processes available,²⁷ the most promising appears to be adhesive transfer bonding, which can be performed at room temperature with biocompatible polymers.^{28–32}

The metamaterial design consists of CASRR, i.e., two curved slits in a metal surface with different lengths as depicted in Fig. 1(c). The periodicity of the unit cell is $p = 416 \mu\text{m}$, the radius of the ring is $r = 66 \mu\text{m}$, and the width of the two arcs is $w_R = 80 \mu\text{m}$. The design is symmetrical to the y-axis, the length of the two arcs is defined by the offset angle $\phi_O = 87^\circ$, and the gap angle is $\phi_G = 50^\circ$. The width of the microfluidic channel integrated into the substrate is $w_{\text{CH}} = 20 \mu\text{m}$ plus two times the etch depth $d_{\text{Etch}} = 3 \mu\text{m}$ and oriented exclusively in the y-direction. The height of the microfluidic channel is $h_{\text{Etch}} = 3 \mu\text{m}$. The design assumes an incident wave with wave vector normal to the sensor surface and a polarization in the y-direction denoted as \vec{E} in Fig. 1(c).

We first study the positive ASRR structure, which consists of two asymmetric arcs typically made of metal. The origin of the resonance in positive ASRR is explained in different ways as trapped modes,³³ electromagnetically induced transparency (EIT),³⁴ Fano resonance,³⁵ resonance hybridization model,³⁶ and antenna pair interaction,³⁷ whereas the fundamental principle is based on antiparallel currents in the two ring segments. Since the term Fano resonance has become established, it will be used in the following. Here, the current in the opposite direction to the excitation is caused by the interaction between the two arcs. Assuming perfect conductors and infinitely thin metal layers, Babinet's principle can be applied for designing CASRR.^{38,39} As opposed to positive ASRR, reflection is interchanged with transmission and electric field with magnetic field, resulting in a 90° change of polarization direction.

The simulation and modeling was performed with the 3D electromagnetic simulation software Ansys HFSS Electronics Desktop 2021R1. The CASRR unit cell was simulated as a repetitive element with periodicity p , periodic boundary conditions, and Floquet port excitation. The parameters for gold are calculated from the complex dielectric function of the Drude model, resulting in the dielectric constant to be $\epsilon_r = -1.12 \times 10^5$ and the conductivity to be $\sigma = 4.01 \times 10^7 \text{ S/m}$.⁴⁰ The material properties for the quartz substrate and cover are $\epsilon_r = 3.81$ with a dielectric loss tangent $\delta = 0.0001$.^{41,42} The basis for the material simulation of water is the seven parameter double Debye model from Liebe *et al.*,⁴³ which shows very good agreement with measured data and, therefore, adequately describes relative permittivity and dielectric losses. Thus, the complex dielectric function results in

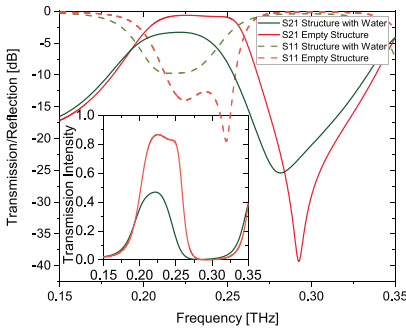


FIG. 2. Transmission and reflection spectra of the microfluidic sensor. The S21 and S11 parameters for the empty structure are shown in the solid and dashed red curves. For the water-filled case, the S21 and S11 parameters are shown in the solid and dashed green curves. The inset shows the S21 parameters for the two cases on the linear scale.

$$\varepsilon(f) = \varepsilon_0 - f \left[\frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_1}{f + i\gamma_1} + \frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_2}{f + i\gamma_2} \right], \quad (1)$$

where $\Theta = 1 - \frac{300}{273.15 + T}$, $\varepsilon_0 = 77.66 - (103.3 \times \Theta)$, $\varepsilon_1 = 0.0671 \times \varepsilon_0$, $\gamma_1 = 20.20 + 146.4 \times \Theta + 316 \times \Theta^2$ in (GHz), $\varepsilon_2 = 3.52 + 7.52 \times \Theta$, and $\gamma_2 = 39.8 \times \gamma_1$. Here, f describes the frequency in (GHz) and T is the temperature, which is set to $T = 21^\circ\text{C}$.

Simulation results of transmission and reflection spectra are shown in Fig. 2, distinguishing between the empty (vacuum) and water-filled structures. For both cases, a Fano-type double resonance feature (DRF) is observed in the transmission spectrum. For the water-filled case, the peak-to-peak transmission difference is damped, and the position of the resonance frequency is slightly shifted. For the empty case, the maximum negative slope is 2.4 dB/GHz and the resonance frequency is 292.5 GHz, while for the water-filled case, the slope is 0.7 dB/GHz and the resonance frequency is 281.5 GHz. In both spectra, the maximum of the resonance is broadened at about 225 GHz due to the Fabry–Perot resonance of the fused silica substrate and cover.

The quality of a resonator is described by the Q-factor⁴⁴

$$Q = \frac{f_r}{\Delta f}, \quad (2)$$

where f_r describes the resonant frequency and Δf is the full width at half maximum (FWHM). The Q-factor is $Q = 3.2$ for the empty case and $Q = 2.9$ when filled with water. It should be noted that the structure is exclusively optimized for the water-filled case to develop the steepest possible slope in the DRF in order to both maintain the DRF and enhance sensitivity. It is advantageous that the Q-factor remains almost the same when comparing the two operating states. Good detectability of the resonance is also ensured in water since the peak-to-peak transmission difference is 22 dB.

To analyze why this particular design is suited very well for studies in highly absorbing fluids, we analyzed the field and current

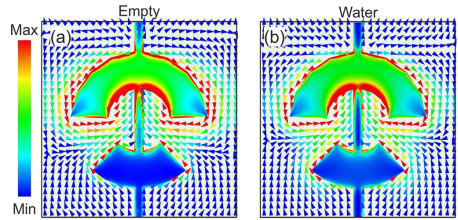


FIG. 3. Comparison of the electric field in the slit arcs and surface current distributions on the metal of the CASRR structure. (a) Empty case and (b) water-filled case at 230 GHz (approximately transmission maximum for both cases).

distributions in air [Fig. 3(a)] and in water [Fig. 3(b)]. First, Fig. 3 shows the antiparallel current distribution on the gold surface: the current around the short arc flows into the same direction as the excitation current, while the current around the long arc flows in the opposite direction. The electric field amplitude is shown in the slit arcs and in the microfluidic channel. The electric field for the empty case is about 1.76 times larger than that for the case in water. In contrast to that, the surface current is only about 1.06 times larger for an empty structure compared to the water-filled one. The same factor as for the surface current is also obtained for the magnetic field in the slit arcs. We assume this to be the reason, why the Fano resonance is preserved even for very strongly absorbing liquids like water. Due to the high dielectric losses, the resonance broadens and the Q-factor decreases slightly, but the resonance is still excited and clearly detectable. This is a great advantage compared to previous publications that rely on positive metasurfaces, whose Q-factors are significantly reduced or completely vanished in contact with water.

In order to achieve a high-performance THz metamaterial, a high Q-factor with a narrow linewidth and good detectability is required.⁴⁵ However, these requirements are somewhat contradictory since (i) the Q-factor is not directly proportional to sensitivity and (ii) for applications in transmission configuration, the transmission amplitude decreases for high Q-factors. This leads to an increased standard deviation for a given signal-to-noise ratio and, thus, impedes analyte detection. Therefore, we did not optimize our biosensor for a maximum Q-factor alone since mode quantification measures, such as Q-factor, finesse, or FoM,^{12,44} are not ideally suited as quality criteria to optimize biosensors regarding their application. The Q-factor only quantifies the effectiveness of the interaction of external field with the mode and not the effectiveness of the interaction of the mode with the analyte. Consequently, we focus on the frequency shift using the slope of the Fano resonance, which has the additional advantage of having a much smaller standard deviation than the minimum position of the resonance frequency.²⁶ For the optimization, we, therefore, performed in-depth simulations aiming to achieve the maximum negative slope of the Fano resonance. For each case, the maximum negative slope is determined by the first derivative of the transmission spectrum. An overview of these results is shown in Fig. 4.

Gap and offset angle are the two essential parameters responsible for expression and characteristics of the DRF. Differently sized individual arcs result in a slightly different resonant frequency for each arc

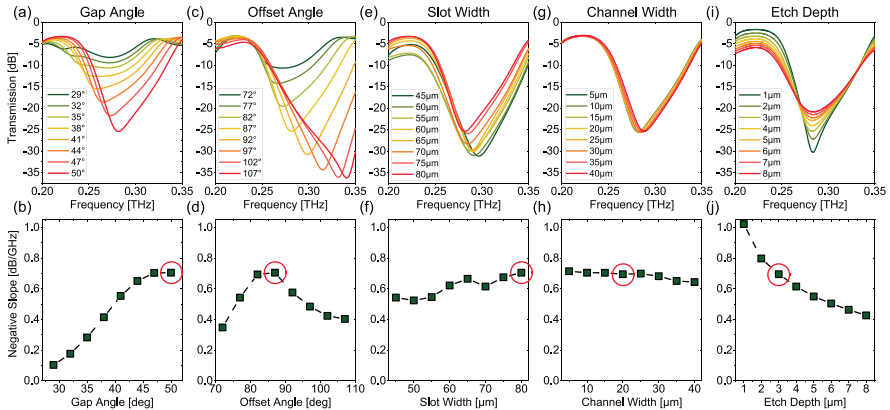


FIG. 4. Transmission spectra for different parameter variations (upper row) and maximum negative slope as a function of the respective parameter (lower row). (a) and (b) Gap angle variation from 29° to 50° ; (c) and (d) offset angle variation from 72° to 107° ; (e) and (f) slot width variation from 45 to $80\ \mu\text{m}$; (g) and (h) channel width variation from 5 to $40\ \mu\text{m}$; (i) and (j) etch depth variation from 1 to $8\ \mu\text{m}$. The red circle indicates the nominal value for each particular parameter.

and the superposition of both produces the DRF. The gap angle describes the length of the short arc. The larger the gap angle, the shorter the short arc and the higher its resonance frequency. The length of the long arc is defined by the offset angle. A larger offset angle results in a longer arc and a lower resonance frequency. Figure 4(a) shows the transmission spectra for a changing gap angle from 29° to 50° . The sharp change in the resonance slope in Fig. 4(b), resulting in a local maximum at 50° with a slope of $0.7\ \text{dB}/\text{GHz}$, is clearly visible. For gap angles smaller than 35° , the role of dissipative losses increases, thus, no significant DRF is formed. A reduction of asymmetry, accordingly, causes the resonance to become weaker and broader until it disappears for a completely symmetrical structure.³³ A Fano resonance starts to form with increasing the gap angle, and distinct resonance frequencies of the two arcs become more different. For the offset angle in Figs. 4(c) and 4(d), in addition to the change in slope, a distinct increase in peak-to-peak transmission difference with increasing offset angle can be observed. The reason for this is the large difference in the individual resonance frequencies of the two arcs, which significantly reduces the transmission minimum. Nevertheless, the prioritization of the steepest-slope feature determines the choice of the nominal design. It should also be noted that the intensity of the Fano resonance is increased at the expense of the Q-factor.⁴⁴

Changing the slot width from 45 to $80\ \mu\text{m}$ has only a small effect on the maximum negative slope of the resonance [see Fig. 4(f)]. It reaches the local maximum negative slope at $80\ \mu\text{m}$. Still, the total transmission amplitude increases with increasing slot width [cf. Fig. 4(e)]. Varying the channel width between 5 and $40\ \mu\text{m}$ shows significant changes neither in the maximum negative slope nor in transmission [cf. Figs. 4(g) and 4(h)]. This suggests that the substrate-integrated channel width can be adjusted in a wide range without affecting the functionality of the CASRR and provides a wide degree of freedom for the design of

the microfluidic structure. The etch depth, on the contrary, has a large influence on the transmission amplitude [Fig. 4(i)] and on the maximum negative slope [Fig. 4(j)] since it defines the thickness of the water film. Thus, for an etch depth of $1\ \mu\text{m}$, a large peak-to-peak transmission difference and a large negative slope can be achieved, but such a thin water film poses a great challenge for microfluidics. We think that a $3\ \mu\text{m}$ thick water film is a good compromise between feasibility and performance and represents a technically proven solution.⁴⁵

In order to compare the performance of our sensor for air and water, we determined the sensitivity in terms of the refractive index unit (RIU),

$$S = \frac{\Delta f}{\Delta n} [\text{GHz}/\text{RIU}], \quad (3)$$

where Δf describes the frequency shift and Δn is the change in the refractive index. We determined the sensitivity of our structure for two cases: (i) the lossless case, where the structure is filled with a lossless medium and (ii) the lossy case, where the medium contains the frequency dependent losses of water calculated from Eq. (1). The refractive index was varied for both cases from $n = 1$ to $n = 2.5$ (approximately the refractive index of water at $300\ \text{GHz}$).⁴⁶ For the case with water losses [Fig. 5(c)], a change in minimum transmission amplitude can be observed in addition to the shift in position of the resonance frequency. This originates from the dielectric loss of water, which increases at lower frequencies. When the shift of resonance frequency is plotted as a function of the change of refractive index, a linear relationship can be derived for both the lossless case [Fig. 5(b)] and the case with water losses [Fig. 5(d)]. The sensitivity for the structure with nominal geometry is $7.4\ \text{GHz}/\text{RIU}$ for the lossless case and $6.74\ \text{GHz}/\text{RIU}$ for the lossy case. As the etch depth is considered to have a large impact on the biosensors performance, the sensitivity is

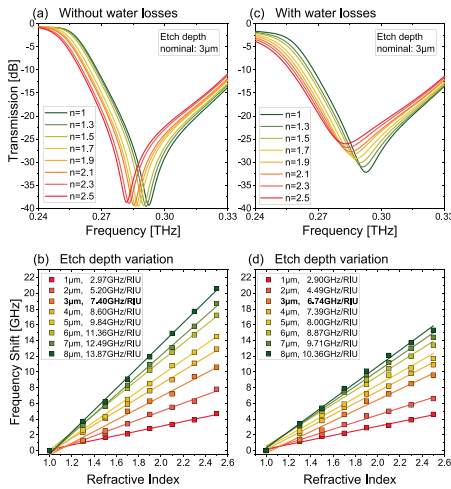


FIG. 5. Amplitude transmission spectra when the structure is filled with (a) a lossless medium and (c) with water losses, for different refractive indices at the nominal etch depth of $3 \mu\text{m}$. (b) Frequency shift over change in the refractive index for the case without losses and (d) with water losses and for different etch depths.

analyzed for a variation of the etch depth between 1 and $8 \mu\text{m}$. The results show that the sensitivity for larger etch depths increases, but this increase is smaller for the case with water losses than for the case without water losses. Nevertheless, the sensitivity can be improved by increasing the etch depth at the expense of the peak-to-peak transmission difference. Thus, despite the reduced slope due to the high losses of water, the performance for both cases remains close to each other. This is a significant advantage compared to other approaches, where the Fano resonance often disappears in the presence of water, or the sensitivity is significantly reduced.

It is important to note here that this simulation does not use selective functionalization in areas with a high E-field concentration, which generally leads to an increase in sensitivity, as it was shown in our previous publication.²⁶ Furthermore, we assume that the sensitivity S described here is only an incomplete description of the performance of a sensor for biochemical applications, as no information about the absolute sample amount and the layer thickness is included. In biomedical applications, the minimum detectable analyte concentration is crucial.³⁷ Since the sensitivity is limited compared to other works,⁴⁸ the detection of smaller frequency shifts demands a higher frequency resolution of the measurement system used in order to detect smallest changes caused by the biomolecular analyte. However, the sensitivity still gives a first indication on a sensors performance and allows to compare the lossless and lossy case.

Furthermore, the very small sample volume of only 0.154 nl in the water reservoir of each unit cell should be emphasized. For array sizes with 7×7 elements commonly used in this frequency range, the

total volume is only 7.55 nl , for a focused transmission configuration. Calculating the sensitivity per unit volume by $S_{\text{vol}} = S/V$ [GHz/RIU/ μl] results in $S_{\text{vol}} = 43\,766 \text{ GHz/RIU}/\mu\text{l}$ considering the volume of a single element and $S_{\text{vol}} = 893 \text{ GHz/RIU}/\mu\text{l}$ for the volume of an array with 7×7 elements. Both sensitivities per unit volume are much higher compared to previous publications results, which only achieved $S_{\text{vol}} = 552 \text{ GHz/RIU}/\mu\text{l}$.²⁰

In summary, we have presented a metamaterial-based biosensor composed of a CASRR structure with substrate-integrated microfluidics. The sensor can be fabricated in a single lithography step, providing an intrinsic alignment of microfluidic channels and metasurface, guaranteeing high reproducibility in manufacturing. Our presented structure is able to detect minute changes in refractive index in nanoliter sample volumes and is, therefore, perfectly suitable as a sensor for biomedical applications. Our numerical simulations demonstrate that the CASRR resonance and the sensitivity are maintained even when using water, a very strongly absorbing liquid in the THz range. The design can be adapted to other metamaterial structures and, thus, accelerate the development of sensitive biosensors for smallest amounts of liquids. Our proposed concept is very promising for ultra-sensitive studies of biomolecules under physiological conditions in the THz range and, thus, enables analyses of biomolecular interactions, binding and absorption processes, and opening up possibilities in biomedical research.

This work is part of the national priority program SPP 1857 ESSENCE and was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Contract Nos. HA 3022/8, BO 1573/27, and WI 5209/1. We thank the University of Siegen for providing the OMNI cluster for high performance computing (HPC).

AUTHOR DECLARATIONS

Conflict of Interest

The authors have no conflicts to disclose.

DATA AVAILABILITY

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

- F. Friederich, W. von Spiegel, M. Bauer, F. Meng, M. D. Thomson, S. Boppel, A. Lissauskas, B. Hils, V. Krozer, A. Keil, T. Löffler, R. Henneberger, A. K. Huhn, G. Spickermann, P. H. Bolívar, and H. G. Roskos, "THz active imaging systems with real-time capabilities," *IEEE Trans. Terahertz Sci. Technol.* **1**, 183–200 (2011).
- P. U. Jepsen, D. G. Cooke, and M. Koch, "Terahertz spectroscopy and imaging—Modern techniques and applications," *Laser Photonics Rev.* **5**, 124–166 (2011).
- F. Ellrich, M. Bauer, N. Schreiner, A. Keil, T. Pfeiffer, J. Klier, S. Weber, J. Jonscheit, F. Friederich, and D. Molter, "Terahertz quality inspection for automotive and aviation industries," *J. Infrared, Millimeter, Terahertz Waves* **41**, 470–489 (2020).
- P. H. Siegel, "Terahertz technology in biology and medicine," *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.* **52**, 2438–2447 (2004).
- H. Froehlich, "Long-range coherence and energy storage in biological systems," *Int. J. Quantum Chem.* **2**, 641–649 (1968).
- W. Zhuang, Y. Feng, and E. W. Prohofsky, "Self-consistent calculation of localized DNA vibrational properties at a double-helix-single-strand junction with anharmonic potential," *Phys. Rev. A* **41**, 7033–7042 (1990).
- M. Brucherseifer, M. Nagel, P. H. Bolívar, H. Kurz, A. Bosserhoff, and R. M. Büttner, "Label-free probing of the binding state of DNA by time-domain terahertz sensing," *Appl. Phys. Lett.* **77**, 4049–4051 (2000).

- ⁸R. Sczech, J. G. Rivas, A. Berrier, V. Giannini, G. Pirruccio, C. Debus, H. Schäfer-Eberwein, and P. H. Bolívar, "Long-range guided THz radiation by thin layers of water," *Opt. Express* **20**, 27781–27791 (2012).
- ⁹A. Ahmadivand, B. Gerislioglu, R. Ahuja, and Y. Kumar Mishra, "Terahertz plasmonics: The rise of toroidal metadevices towards immunobiosensings," *Mater. Today* **32**, 108–130 (2020).
- ¹⁰D. W. Vogt, A. H. Jones, T. A. Haase, and R. Leonhardt, "Subwavelength thick ultrahigh-Q terahertz disc microresonators," *Photonics Res.* **8**, 1183 (2020).
- ¹¹M. Gupta and R. Singh, "Terahertz sensing with optimized Q/V_{eff} metasurface cavities," *Adv. Opt. Mater.* **8**, 1902255 (2020).
- ¹²Y. Wang, Z. Han, Y. Du, and J. Qin, "Ultrasensitive terahertz sensing with high-Q toroidal dipole resonance governed by bound states in the continuum in all-dielectric metasurface," *Nanophotonics* **10**, 1295–1307 (2021).
- ¹³J. F. O'Hara, W. Withayachumnanukul, and I. Al-Naib, "A review on thin-film sensing with terahertz waves," *J. Infrared, Millimeter, Terahertz Waves* **33**, 245–291 (2012).
- ¹⁴T. M. Herne and M. J. Tarlov, "Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces," *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8916–8920 (1997).
- ¹⁵T. Arikawa, M. Nagai, and K. Tanaka, "Characterizing hydration state in solution using terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy," *Chem. Phys. Lett.* **457**, 12–17 (2008).
- ¹⁶S. A. Yoon, S. H. Cha, S. W. Jun, S. J. Park, J.-Y. Park, S. Lee, H. S. Kim, and Y. H. Ahn, "Identifying different types of microorganisms with terahertz spectroscopy," *Biomed. Opt. Express* **11**, 406 (2020).
- ¹⁷M. Tang, M. Zhang, S. Yan, L. Xia, Z. Yang, C. Du, H.-L. Cui, and D. Wei, "Detection of DNA oligonucleotides with base mutations by terahertz spectroscopy and microstructures," *PLoS One* **13**, e0191515 (2018).
- ¹⁸X. Chen and W. Fan, "Toroidal metasurfaces integrated with microfluidic for terahertz refractive index sensing," *J. Phys. D: Appl. Phys.* **52**, 485104 (2019).
- ¹⁹S. J. Park, S. A. Yoon, and Y. H. Ahn, "Dielectric constant measurements of thin films and liquids using terahertz metamaterials," *RSC Adv.* **6**, 69381–69386 (2016).
- ²⁰R. Zhang, Q. Chen, K. Liu, Z. Chen, K. Li, X. Zhang, J. Xu, and E. Pickwell-MacPherson, "Terahertz microfluidic metamaterial biosensor for sensitive detection of small-volume liquid samples," *IEEE Trans. Terahertz Sci. Technol.* **9**, 209–214 (2019).
- ²¹M. Chen, L. Singh, N. Xu, R. Singh, W. Zhang, and L. Xie, "Terahertz sensing of highly absorptive water-methanol mixtures with multiple resonances in metamaterials," *Opt. Express* **25**, 14089–14097 (2017).
- ²²K. Shih, P. Pitchappa, M. Manjappa, C. P. Ho, R. Singh, and C. Lee, "Microfluidic metamaterial sensor: Selective trapping and remote sensing of microparticles," *J. Appl. Phys.* **121**, 023102 (2017).
- ²³F. Miyamaru, K. Hattori, K. Shiraga, S. Kawashima, S. Suga, T. Nishida, M. W. Takeda, and Y. Ogawa, "Highly sensitive terahertz sensing of glycerol-water mixtures with metamaterials," *J. Infrared, Millimeter, Terahertz Waves* **35**, 198–207 (2014).
- ²⁴Y. Sun, X. Xia, H. Feng, H. Yang, C. Gu, and L. Wang, "Modulated terahertz responses of split ring resonator by nanometer thick liquid layers," *Appl. Phys. Lett.* **92**, 221101 (2008).
- ²⁵K. Shih, P. Pitchappa, L. Jin, C.-H. Chen, R. Singh, and C. Lee, "Nanofluidic terahertz metasensor for sensing in aqueous environment," *Appl. Phys. Lett.* **113**, 071105 (2018).
- ²⁶C. Weisenstein, D. Schaar, A. Katharina Wigger, H. Schäfer-Eberwein, A. K. Bosserhoff, and P. Haring Bolívar, "Ultrasensitive THz biosensor for PCR-free cDNA detection based on frequency selective surfaces," *Biomed. Opt. Express* **11**, 448–460 (2020).
- ²⁷S. Carroll, M. M. Crain, J. F. Naber, R. S. Keynton, K. M. Walsh, and R. P. Baldwin, "Room temperature UV adhesive bonding of CE devices," *Lab Chip* **8**, 1564–1569 (2008).
- ²⁸L. Riegger, O. Strohmeier, B. Faltin, R. Zengerle, and P. Koltay, "Adhesive bonding of microfluidic chips: Influence of process parameters," *J. Micromech. Microeng.* **20**, 087003 (2010).
- ²⁹J. Kentsch, S. Breisch, and M. Stelzle, "Low temperature adhesive bonding for BioMEMS," *J. Micromech. Microeng.* **16**, 802–807 (2006).
- ³⁰Y.-J. Pan and R.-J. Yang, "A glass microfluidic chip adhesive bonding method at room temperature," *J. Micromech. Microeng.* **16**, 2666–2672 (2006).
- ³¹L. Yu, F. E. H. Tay, G. Xu, B. Chen, M. Avram, and C. Iliescu, "Adhesive bonding with SU-8 at wafer level for microfluidic devices," *J. Phys.: Conf. Ser.* **34**, 776–781 (2006).
- ³²M. Agirregabiria, F. J. Blanco, J. Berganzo, M. T. Arroyo, A. Fullaondo, K. Mayora, and J. M. Ruano-López, "Fabrication of SU-8 multilayer microstructures based on successive CMOS compatible adhesive bonding and releasing steps," *Lab Chip* **5**, 545–552 (2005).
- ³³V. A. Fedotov, M. Rose, S. L. Prosvirnin, N. Papisimakis, and N. I. Zheludev, "Sharp trapped-mode resonances in planar metamaterials with a broken structural symmetry," *Phys. Rev. Lett.* **99**, 147401 (2007).
- ³⁴N. Papisimakis, V. A. Fedotov, N. I. Zheludev, and S. L. Prosvirnin, "Metamaterial analog of electromagnetically induced transparency," *Phys. Rev. Lett.* **101**, 253903 (2008).
- ³⁵R. Singh, I. A. I. Al-Naib, M. Koch, and W. Zhang, "Sharp Fano resonances in THz metamaterials," *Opt. Express* **19**, 6312–6319 (2011).
- ³⁶B. Lahiri, S. G. McMeekin, R. M. de La Rue, and N. P. Johnson, "Resonance hybridization in nanoantenna arrays based on asymmetric split-ring resonators," *Appl. Phys. Lett.* **98**, 153116 (2011).
- ³⁷C. Debus and P. H. Bolívar, "Frequency selective surfaces for high sensitivity terahertz sensing," *Appl. Phys. Lett.* **91**, 184102 (2007).
- ³⁸F. Falcone, T. Lopetegui, M. A. Laso, J. D. Baena, J. Bonache, M. Beruete, R. Marqués, F. Martin, and M. Sorolla, "Babinet principle applied to the design of metasurfaces and metamaterials," *Phys. Rev. Lett.* **93**, 197401 (2004).
- ³⁹H. G. Booker, "Slot aerials and their relation to complementary wire aerials (Babinet's principle)," *J. Inst. Electr. Eng.—Part IIIA: Radiolocation* **93**, 620–626 (1946).
- ⁴⁰P. B. Johnson and R. W. Christy, "Optical constants of the noble metals," *Phys. Rev. B* **6**, 4370–4379 (1972).
- ⁴¹M. Naftaly and R. E. Miles, "Terahertz time-domain spectroscopy for material characterization," *Proc. IEEE* **95**, 1658–1665 (2007).
- ⁴²D. Grischkowsky, S. Keiding, M. van Exter, and C. Fattinger, "Far-infrared time-domain spectroscopy with terahertz beams of dielectrics and semiconductors," *JOSA B* **7**, 2006–2015 (1990).
- ⁴³H. J. Liebe, G. A. Hufford, and T. Manabe, "A model for the complex permittivity of water at frequencies below 1 THz," *Int. J. Infrared Millimeter Waves* **12**, 659–675 (1991).
- ⁴⁴L. Cong, M. Manjappa, N. Xu, I. Al-Naib, W. Zhang, and R. Singh, "Fano resonances in terahertz metasurfaces: A figure of merit optimization," *Adv. Opt. Mater.* **3**, 1537–1543 (2015).
- ⁴⁵R. Singh, W. Cao, I. Al-Naib, L. Cong, W. Withayachumnanukul, and W. Zhang, "Ultrasensitive terahertz sensing with high-Q Fano resonances in metasurfaces," *Appl. Phys. Lett.* **105**, 171101 (2014).
- ⁴⁶L. Thrane, R. H. Jacobsen, P. U. Jepsen, and S. R. Keiding, "THz reflection spectroscopy of liquid water," *Chem. Phys. Lett.* **240**, 330–333 (1995).
- ⁴⁷L. A. Currie, "Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995)," *Pure Appl. Chem.* **67**, 1699–1723 (1995).
- ⁴⁸Xu, D. Liao, M. Gupta, Y. Zhu, S. Zhuang, R. Singh, and L. Chen, "Terahertz microfluidic sensing with dual-torus toroidal metasurfaces," *Adv. Opt. Mater.* **9**, 2100024 (2021).

Kapitel 9

Zusammenfassung und Ausblick

In diesem abschließenden Kapitel werden die Ergebnisse aus den vier Veröffentlichungen dieser kumulativen Dissertation zusammengefasst. Aus diesen Arbeiten werden Anforderungen für zukünftige Entwicklungen abgeleitet und darüber hinaus ein Ausblick auf das Potential von THz-Systemen und Biosensoren für biomedizinische Anwendungen gegeben.

9.1 Zusammenfassung

Metamaterial-basierte THz-Biosensoren stellen ein wichtiges und notwendiges Werkzeug dar, um empfindliche, schnelle und markierungsfreie Analysen von Biomolekülen zu ermöglichen. Innerhalb dieser Arbeit wurden THz-Biosensoren für Anwendungen in der Tumoranalyse auf der Basis von CSRR umfassend untersucht. Das Hauptaugenmerk lag neben der Realisierung und Charakterisierung der eingesetzten Messsetups, auf dem Entwurf und der Entwicklung des Layouts und Designs der THz-Biosensoren. Die Ergebnisse der Modellierungen, Simulationen und Analysen der untersuchten Proben, sowie der entwickelten Biosensoren werden im Folgenden zusammengefasst.

Die Entwicklung und das Design eines THz-Biosensors auf Basis von CSRR wird in Kapitel 3, 5 und 6 beschrieben. Die Anwendungsevaluation erfolgte anhand von DNA-Proben, welche markierungsfrei nachgewiesen wurden. Der Fokus der Entwicklung wurde dabei von Beginn an auf ein Biosensor Plattformkonzept gelegt, welches ein Design- und Messkonzept für Multianalysen und Referenzmessungen durch mehrere Abfragefelder beinhaltet. Um eine hohe Empfindlichkeit des Biosensors zu erreichen, werden die CSRR aus einer freitragenden Goldoberfläche aufgebaut, welche eine lokale und selektive Funktionalisierung mit Biomolekülen mit Thiol-Modifikation erlaubt. Dieses Design erlaubt die Immobilisierung von Molekülen ausschließlich an Positionen mit maximaler elektrischer Feldkonzentration. So gelang der experimentelle Nachweis einer 24 bp langen DNA-Sequenz, welche aus der menschlichen Melanom-Zelllinie MIA gewonnen wurde. Dieser Nachweis stellt ein bemerkenswertes Ergebnis dar, da die Probe ohne die üblicherweise notwendige PCR-Vervielfältigung vorbereitet wurde. Damit wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen, dass die Empfindlichkeit des entwickelten Metamaterial-basierten THz-Biosensors auf biologisch relevanten Konzentrationsniveaus erfolgen kann. Diese Ergebnisse haben jedoch auch gezeigt, dass die Effizienz der Funktionalisierung der Goldoberfläche für

ex-situ und *on-chip* Hybridisierung stark unterschiedlich zu sein scheint. Eine mögliche Ursache stellt der Aufbau der freitragenden Metallstruktur dar, durch die die Goldoberfläche nur von unten durch eine Unterätzung zugänglich ist und damit die Funktionalisierung mit Biomolekülen nicht mit alternativen Analysemethoden untersucht werden kann. Der Funktionalisierungsprozess kann daher nicht unabhängig vom THz-Messsystem untersucht werden und stellt damit einen unbekanntem Faktor für die Analyse der Ergebnisse dar. Aus diesem Grund wurden für die Beurteilung der THz-Messungen Referenzanalysen mittels QCM durchgeführt, da die QCM eine vergleichbare Funktionalisierung der Sensoroberfläche verwendet und so mit Einschränkungen als Modellsystem eingesetzt werden kann. Für die Entwicklung der THz-Biosensoren wurden zunächst numerische Simulationsmodelle erstellt, um die Metamaterial Struktur zu optimieren und Messergebnisse zu validieren. Die Modellierung von DNA in numerischen Simulationsmodellen stellte insbesondere für die *Mesh*-Erstellung eine große Herausforderung dar, da die DNA nur eine Schichtdicke von wenigen nm besitzt, während die Strukturgröße von Metamaterialien im μm -Bereich liegt. Mithilfe von Modellsystemen, welche auf experimentellen Ergebnissen basieren, kann die Wirkung der dielektrischen Beladung jedoch nachgebildet werden. Insbesondere bei Parametervariationen gerät dieses Modell jedoch an Grenzen, welche beim Entwurf von THz-Biosensoren berücksichtigt werden müssen. Für Messungen von getrockneten Proben hat sich das Biosensor-Layout mit vielen Abfrage- und Referenzfeldern als wichtiges Werkzeug bei der Analyse von Biomolekülen erwiesen. Systematische Fehler können so sicher detektiert werden, wenn zum Beispiel ein Sensor nicht korrekt im System positioniert worden ist. Jedoch stellen sich auch auf Referenzfeldern immer wieder kleine Verschiebungen der Resonanzfrequenz ein, deren Ursache nicht abschließend bestimmt werden konnte. Möglich wäre eine Verunreinigung der Sensoroberfläche durch Rückstände aus Prozessierungsschritten oder durch Umgebungseinflüsse wie Temperatur oder Luftfeuchtigkeit.

In der in Kapitel 6 vorgestellten Arbeit wurde das Design und Grundkonzept des THz-Biosensors für unterschiedliche Frequenzbereiche angepasst und in der Anwendung anhand identischer ssDNA- und dsDNA-Proben evaluiert. Dabei wurde beobachtet, dass sich die beiden DNA-Proben auf dem THz-Biosensor deutlich voneinander unterscheiden: Als Funktion der Resonanzfrequenz der THz-Biosensoren ergibt sich eine deutlich größere Steigung im Grad der Potenzfunktion für dsDNA im Vergleich zu ssDNA. Diese neue Erkenntnis erlaubt die direkte Unterscheidung des Bindungszustands von DNA als Funktion der Resonanzfrequenz. Für die Analyse dieser Ergebnisse wurde die Schnittpunkt-Methode zur Bestimmung der Resonanzfrequenz eingeführt, welche deutlich zuverlässiger ist und eine genauere Bestimmung der Frequenzverschiebung ermöglicht, als die üblicherweise eingesetzte Bestimmung an der Minimumposition.

Proben wie DNA können getrocknet untersucht werden, während für die Analyse von Proteinen eine flüssigen Umgebung eine essentielle Voraussetzung ist. Um die Funktionalität zu erweitern und zur Verbesserung der Zuverlässigkeit wurde in Kapitel 8 umfassend untersucht, wie ein THz-Biosensor aufgebaut sein muss, damit dieser für Untersuchungen von Biomolekülen in flüssigen Umgebungen angewendet werden

kann. Für die Optimierung des CSRR-Designs wurden in numerischen Simulationsmodellen umfangreiche Parametervariationen durchgeführt, deren Ergebnis eine für Messungen in flüssigen Umgebungen optimierten Struktur ist. Diese ermöglicht, dass die Resonanz des CSRR erhalten bleibt und das Design zudem weitestgehend unabhängig von mikrofluidischen Kanälen modelliert und eingesetzt werden kann. Das Konzept wurde mit Hinblick auf eine einfache lithografische Realisierbarkeit entwickelt, die eine schnelle experimentelle Umsetzung ermöglicht. Durch die Verbindung von mikrofluidischen Strukturen mit Metamaterialien kann vielen Herausforderungen, die sich bei der Messung von trocknen Proben ergeben, begegnet werden. So ist der Bereich innerhalb der mikrofluidischen Struktur fortlaufend in einem kontrollierten Zustand und die Biosensoren müssen für die biochemische Prozessierung nicht aus dem Messsystem ausgebaut werden, wodurch die Zuverlässigkeit verbessert wird. Mit der in Kapitel 8 vorgestellten Arbeit, wurde ein wichtiger Grundstein für die Entwicklung von mikrofluidischen Metamaterial-basierten THz-Biosensoren gelegt, welche als Gesamtkonzept das Potential besitzen (ergänzt durch die zuvor eingeführte selektive und lokalisierte Funktionalisierung), die Entwicklung in der Detektion von anderen biomolekularen Systemen voranzutreiben. Mit diesem Konzept besteht das Potential, dass Anwendungsspektrum über die Erkennung von DNA-Protein Bindungen bis hin zur Virus Detektion signifikant zu erweitern und damit die personalisierte Medizin der Zukunft zu ermöglichen. Mit diesem System wäre es in Zukunft außerdem möglich, zeitvariante Prozesse wie Absorptionen von Biomolekülen an eine Sensoroberfläche aufzulösen und zu beobachten. Dafür wären jedoch sehr schnelle THz-Systeme mit hoher Frequenzauflösung erforderlich, die über den aktuell verfügbaren Stand der Technik hinausgehen. Jedoch gibt es im Bereich der integrierten elektronischen Systeme und optischen Heterodynsysteme vielversprechende Weiterentwicklungen, welche die erforderlichen Eigenschaften erfüllen könnten.

9.2 Ausblick

In den vergangenen 25 Jahren hat sich der Bereich biologischer und medizinischer Anwendungen zu einem Hauptgebiet in der THz-Forschung entwickelt. In dieser Zeit wurden große Fortschritte in der Untersuchung von biomolekularen Resonanzen und Dynamiken, biomedizinischer Bildgebung und THz-Biosensoren erzielt. Dennoch gibt es innerhalb der THz-Forschungsgemeinschaft kritische Stimmen, die auf Fehlentwicklungen hinweisen. So werden in einem sehr aktuellen kritischen Review von Markelz et al. [20] fehlgeleitete Ideen aus dem Bereich THz-Biologie und Medizin betrachtet und von guten Konzepten abgegrenzt. Eine solche Vorgehensweise ist im wissenschaftlichen Kontext eher ungewöhnlich und zeugt davon, dass gerade in diesem Forschungsgebiet Arbeiten veröffentlicht werden, die fragwürdige Konzepte und Methoden verwenden und Behauptungen aufstellen, die bei eingehender Betrachtung nur wenig Bestand haben. Diese Entwicklung kann im speziellen auch für den Bereich der THz-Biosensoren beobachtet werden. So werden immer wieder ausschließlich auf numerischen Simulationen basierte THz-Biosensoren vorgestellt, deren Realisierbarkeit kaum erreichbar ist oder aus der Analyse von Proben Perspektiven abgeleitet, die

für praktische Anwendungen nur sehr begrenzt relevant sind oder keinerlei Spezifität aufweisen .

Von diesen negativen, eher vereinzelt Beispielen abgesehen, gibt es jedoch eine Vielzahl von positiven Entwicklungen und Erkenntnissen, welche die Analyse und Detektion von Biomolekülen im THz-Frequenzbereich auch in Zukunft zu einem vielversprechenden Forschungsgebiet mit Potential für kommerzielle Anwendungen macht. Grundsätzlich muss bei der Detektion von Biomolekülen mittels THz-Biosensoren berücksichtigt werden, dass in der Regel keine charakteristischen resonanten Merkmale von Biomolekülen untersucht werden, sondern nur der durchschnittliche dielektrische Kontrast zu dem Signal beiträgt. Unter anderem gibt es für THz-Biosensoren zwei vielversprechende Ansätze, die aus anderen Disziplinen bereits bekannt sind, jedoch in der THz-Forschung bislang nur sehr begrenzt eingesetzt wurden. (i) So kann die spezifische Detektion eines Biomoleküls durch die Funktionalisierung der Sensoroberfläche erreicht werden. Diese Strategie dient zur Immobilisierung von Biomolekülen und kann auf alle Proben angewendet werden, die einen dielektrischen Kontrast im THz-Bereich aufweisen. Hierbei ist insbesondere darauf hinzuweisen, dass der Vorteil der markierungsfreien Detektion dabei erhalten bleibt. Durch die Nutzung von anderen Verfahren, die über die in dieser Arbeit genutzte DNA-DNA-Bindung hinausgehen, wie Antigen-Antikörper-Bindung, DNA-Protein-Bindung oder Protein-Protein-Bindungen, können THz-Biosensoren ein weites Anwendungsspektrum abdecken. (ii) Mit der Einführung von mikrofluidischen Strukturen kann die Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit von THz-Biosensoren gesteigert werden und diese stellen außerdem eine Notwendigkeit für die Untersuchung einiger Biomoleküle wie Proteine dar. Insbesondere kann so die Wiederholbarkeit von Messungen verbessert werden, da Faktoren wie die Verdunstung und die Dynamik innerhalb eines Tropfens, welche zu ungleichmäßigen Ablagerungen bei getrockneten Proben führen können, in einem mikrofluidischen System keine Rolle mehr spielen. Die hohe Absorption von Wasser im THz-Frequenzbereich wird mit der Einführung geeigneter mikrofluidischer Strukturen ein lösbares Problem darstellen. Essentiell für die Gewinnung von quantitativen Informationen wird jedoch eine sorgfältige Kalibrierung des Gesamtsystems sein und der Nachweis der Quantifizierung durch geeignete Messreihen. Erst damit wird das vollständige Verständnis des komplexen Zusammenspiels von THz-Biosensor, THz-Anregung und der Interaktion des Analyten mit der Oberfläche des Sensors und der Umgebung ermöglicht.

Dennoch ist der größte Teil der Arbeiten auf dem Gebiet der THz-Biosensoren darauf beschränkt, aufwendig vorbereitete Proben (beispielsweise durch Aufreinigung) zu verwenden, welche nicht aus dem direkten Umfeld einer klinischen Umgebung stammen. Bevor also Analysegeräte für biomedizinische Anwendungen basierend auf THz-Technologie in Krankenhäusern, Arztpraxen und Analyselaboren Einzug finden, muss noch ein weiter Weg gegangen werden. Zunächst müssen die bereits beschriebenen Ansätze von Metamaterial-basierten Biosensoren, biomolekularer Funktionalisierung und Mikrofluidik zu einem THz-Analysesystem kombiniert werden, welches zuverlässig medizinisch relevante Biomoleküle in physiologisch relevanten Konzentrationsbereichen erfassen kann. Erst dann können weiterführende Feldtests vorge-

nommen werden, um die Leistungsfähigkeit unter realen Anwendungsbedingungen zu demonstrieren und zu validieren.

Ein wichtiger Aspekt für die mögliche Verbreitung dieser Technologie werden außerdem die Kosten eines Analysesystems sein. Durch große Fortschritte in der integrierten Schaltungstechnik konnten in den letzten Jahren bereits Grenzfrequenzen von Transistoren mit 700 GHz und mehr realisiert werden [98]. Wird diese *State of the Art*-Technologie zu einer integrierten Gesamtlösung für THz-biosensorische Anwendungen weiterentwickelt, können sich völlig neue Möglichkeiten ergeben, zuverlässige, kostenoptimierte, empfindliche und spezifische Biosensoren zu entwickeln. Bis zu diesem Punkt ist noch viel Forschungsarbeit notwendig, jedoch sind bereits heute die richtigen Ansätze vorhanden, um integrierte THz-Biosensoren für zukünftige biomedizinische Anwendungen entwickeln und realisieren zu können. So trägt diese Arbeit durch umfangreiche Untersuchungen in der Systemanalyse, dem Biosensor Entwurf und der mikrofluidische Implementierung dazu bei, eine Basis für die Entwicklung der personalisierten Medizin der Zukunft mittels THz-Technologien bereitzustellen. Ein wichtiger Baustein wird dafür die Zusammenarbeit von Forschern unterschiedlicher Disziplinen sein, um die THz-Technologie zu einem konkurrenzfähigen Werkzeug für etablierte biotechnologische Standardwerkzeuge werden zu lassen. Gelingt dies, kann die THz-Technologie einen bedeutenden Einfluss auf den biomedizinischen Bereich haben und einen zusätzlichen Beitrag für Anwendungen in der Diagnose von Krankheiten und in der Untersuchung der Wirkung von Medikamenten leisten.

Literaturverzeichnis

- [1] FRIEDERICH, F., VON SPIEGEL, W., BAUER, M., MENG, F., THOMSON, M.D., BOPPEL, S., LISAIUSKAS, A., HILS, B., KROZER, V., KEIL, A., LOFFLER, T., HENNEBERGER, R., HUHN, A.K., SPICKERMANN, G., HARING BOLÍVAR, P., and ROSKOS, H.G., *THz active imaging systems with real-time capabilities*, IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology, 1, 183–200 (2011).
- [2] JEPSEN, P.U., COOKE, D.G., and KOCH, M., *Terahertz spectroscopy and imaging - Modern techniques and applications*, Laser & Photonics Reviews, 5, 124–166 (2011).
- [3] RODRIGUEZ-VAZQUEZ, P., GRZYB, J., HEINEMANN, B., and PFEIFFER, U.R., *A 16-QAM 100-Gb/s 1-M wireless link with an EVM of 17% at 230 GHz in an SiGe technology*, IEEE Microwave and Wireless Components Letters, 29, 297–299 (2019).
- [4] ELLRICH, F., BAUER, M., SCHREINER, N., KEIL, A., PFEIFFER, T., KLIER, J., WEBER, S., JONUSCHEIT, J., FRIEDERICH, F., and MOLTER, D., *Terahertz quality inspection for automotive and aviation industries*, Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, 41, 470–489 (2020).
- [5] BRUCHERSEIFER, M., NAGEL, M., HARING BOLÍVAR, P., KURZ, H., BOSSERHOFF, A., and BÜTTNER, R.M., *Label-free probing of the binding state of DNA by time-domain terahertz sensing*, Applied physics letters, 77, 4049–4051 (2000).
- [6] MARKELZ, A.G., ROITBERG, A., and HEILWEIL, E.J., *Pulsed terahertz spectroscopy of DNA, bovine serum albumin and collagen between 0.1 and 2.0 THz*, Chemical Physics Letters, 320, 42–48 (2000).
- [7] WALTHER, M., FISCHER, B., SCHALL, M., HELM, H., and JEPSEN, P., *Far-infrared vibrational spectra of all-trans, 9-cis and 13-cis retinal measured by THz time-domain spectroscopy*, Chemical Physics Letters, 332, 389–395 (2000).
- [8] FALCONER, R.J. and MARKELZ, A.G., *Terahertz spectroscopic analysis of peptides and proteins*, Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, 33, 973–988 (2012).
- [9] ARIKAWA, T., NAGAI, M., and TANAKA, K., *Characterizing hydration state in solution using terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy*, Chemical Physics Letters, 457, 12–17 (2008).
- [10] O'HARA, J.F., WITHAYACHUMNANKUL, W., and AL-NAIB, I., *A review on thin-film sensing with terahertz waves*, Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, 33, 245–291 (2012).

- [11] SCZECH, R., RIVAS, J.G., BERRIER, A., GIANNINI, V., PIRRUCCIO, G., DEBUS, C., SCHÄFER-EBERWEIN, H., and HARING BOLÍVAR, P., *Long-range guided THz radiation by thin layers of water*, Optics Express, 20, 27781–27791 (2012).
- [12] AHMADIVAND, A., GERISLIOGLU, B., AHUJA, R., and KUMAR MISHRA, Y., *Terahertz plasmonics: The rise of toroidal metadevices towards immunobiosensings*, Materials Today, 32, 108–130 (2020).
- [13] VOGT, D.W., JONES, A.H., and LEONHARDT, R., *Terahertz gas-phase spectroscopy using a sub-wavelength thick ultrahigh-Q microresonator*, Sensors (Basel, Switzerland), 20 (2020).
- [14] GUPTA, M. and SINGH, R., *Terahertz sensing with optimized Q/V_{eff} metasurface cavities*, Advanced Optical Materials, 8, 1902025 (2020).
- [15] WANG, Y., HAN, Z., DU, Y., and QIN, J., *Ultrasensitive terahertz sensing with high-Q toroidal dipole resonance governed by bound states in the continuum in all-dielectric metasurface*, Nanophotonics, 10, 1295–1307 (2021).
- [16] GENG, Z., ZHANG, X., FAN, Z., LV, X., and CHEN, H., *A route to terahertz metamaterial biosensor integrated with microfluidics for liver cancer biomarker testing in early stage*, Scientific Reports, 7, 16378 (2017).
- [17] CONG, L., MANJAPPA, M., XU, N., AL-NAIB, I., ZHANG, W., and SINGH, R., *Fano resonances in terahertz metasurfaces: A figure of merit optimization*, Advanced Optical Materials, 3, 1537–1543 (2015).
- [18] SHIH, K., PITCHAPPA, P., JIN, L., CHEN, C.H., SINGH, R., and LEE, C., *Nanofluidic terahertz metasensor for sensing in aqueous environment*, Applied physics letters, 113, 071105 (2018).
- [19] HARING BOLÍVAR, P., BRUCHERSEIFER, M., NAGEL, M., KURZ, H., BOSSERHOFF, A., and BÜTTNER, R., *Label-free probing of genes by time-domain terahertz sensing*, Physics in Medicine and Biology, 47, 3815–3821 (2002).
- [20] MARKELZ, A.G. and MITTLEMAN, D.M., *Perspective on terahertz applications in bioscience and biotechnology*, ACS Photonics, 9, 1117–1126 (2022).
- [21] HERNE, T.M. and TARLOV, M.J., *Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces*, Journal of the American Chemical Society, 119, 8916–8920 (1997).
- [22] SHIH, K., PITCHAPPA, P., MANJAPPA, M., HO, C.P., SINGH, R., and LEE, C., *Microfluidic metamaterial sensor: Selective trapping and remote sensing of microparticles*, Journal of Applied Physics, 121, 023102 (2017).
- [23] EMAMINEJAD, H., MIR, A., and FARMANI, A., *Design and simulation of a novel tunable terahertz biosensor based on metamaterials for simultaneous monitoring of blood and urine components*, Plasmonics, 16, 1537–1548 (2021).
- [24] YOON, S.A., CHA, S.H., JUN, S.W., PARK, S.J., PARK, J.Y., LEE, S., KIM, H.S., and AHN, Y.H., *Identifying different types of microorganisms with terahertz spectroscopy*, Biomed. Opt. Express, 11, 406 (2020).

-
- [25] TANG, M., ZHANG, M., YAN, S., XIA, L., YANG, Z., DU, C., CUI, H.L., and WEI, D., *Detection of DNA oligonucleotides with base mutations by terahertz spectroscopy and microstructures*, PloS one, 13, e0191515 (2018).
- [26] AUSTON, D.H., CHEUNG, K.P., VALDMANIS, J.A., and KLEINMAN, D.A., *Cherenkov radiation from femtosecond optical pulses in electro-optic media*, Physical review letters, 53, 1555 (1984).
- [27] WU, Q. and ZHANG, X.C., *Free-space electro-optic sampling of terahertz beams*, Applied physics letters, 67, 3523–3525 (1995).
- [28] NAFTALY, M., VIEWEG, N., and DENINGER, A., *Industrial applications of terahertz sensing: State of play*, Sensors (Basel, Switzerland), 19 (2019).
- [29] YAHYAPOUR, M., JAHN, A., DUTZI, K., PUPPE, T., LEISCHING, P., SCHMAUSS, B., VIEWEG, N., and DENINGER, A., *Fastest thickness measurements with a terahertz time-domain system based on electronically controlled optical sampling*, Applied Sciences, 9, 1283 (2019).
- [30] DENINGER, A.J., ROGGENBUCK, A., SCHINDLER, S., and PREU, S., *2.75 THz tuning with a triple-DFB laser system at 1550 nm and InGaAs photomixers*, Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, 36, 269–277 (2015).
- [31] DEBUS, C., SPICKERMANN, G., NAGEL, M., and HARING BOLÍVAR, P., *All-electronic terahertz spectrometer for biosensing*, Microwave and Optical Technology Letters, 53, 2899–2902 (2011).
- [32] HEINEMANN, B., RUCKER, H., BARTH, R., BARWOLF, F., DREWS, J., FISCHER, G.G., FOX, A., FURSENKO, O., GRABOLLA, T., HERZEL, F., KATZER, J., KORN, J., KRUGER, A., KULSE, P., LENKE, T., LISKER, M., MARSCHMEYER, S., SCHEIT, A., SCHMIDT, D., SCHMIDT, J., SCHUBERT, M.A., TRUSCH, A., WIPF, C., and WOLANSKY, D., *SiGe HBT with f_x/f_{max} of 505 GHz/720 GHz*, in 2016 IEEE International Electron Devices Meeting (IEDM), 3.1.1–3.1.4 (IEEE, 2016).
- [33] WEISENSTEIN, C., SCHAAR, D., WIGGER, A.K., SCHÄFER-EBERWEIN, H., BOSSEHOFF, A.K., and HARING BOLÍVAR, P., *Ultrasensitive THz biosensor for PCR-free cDNA detection based on frequency selective surfaces*, Biomedical Optics Express, 11, 448–460 (2020).
- [34] SIZOV, F., *THz radiation sensors*, Opto-Electronics Review, 18 (2010).
- [35] MAESTRINI, A., THOMAS, B., WANG, H., JUNG, C., TREUTTEL, J., JIN, Y., CHATTOPADHYAY, G., MEHDI, I., and BEAUDIN, G., *Schottky diode-based terahertz frequency multipliers and mixers*, Comptes Rendus Physique, 11, 480–495 (2010).
- [36] MCINTOSH, K.A., BROWN, E.R., NICHOLS, K.B., MCMAHON, O.B., DiNATALE, W.F., and LYSZCZARZ, T.M., *Terahertz photomixing with diode lasers in low-temperature-grown GaAs*, Applied physics letters, 67, 3844–3846 (1995).
- [37] LEE, Y.S., *Continuous-wave terahertz sources and detectors*, 1–41 (Springer US, Boston, MA, 2009).
-

- [38] MATSUURA, S. and ITO, H., *Generation of CW terahertz radiation with photo-mixing*, 157–202 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2005).
- [39] NAFTALY, M., CLARKE, R.G., HUMPHREYS, D.A., and RIDLER, N.M., *Metrology state-of-the-art and challenges in broadband phase-sensitive terahertz measurements*, Proceedings of the IEEE, PP, 1–15 (2017).
- [40] HIEBEL, M., *Grundlagen der vektoriellen Netzwerkanalyse* (Rhode & Schwarz, M, 2006).
- [41] YANG, B., WANG, X., ZHANG, Y., and DONNAN, R.S., *Experimental characterization of hexaferrite ceramics from 100 GHz to 1 THz using vector network analysis and terahertz-time domain spectroscopy*, Journal of Applied Physics, 109, 033509 (2011).
- [42] SUN, W., YANG, B., WANG, X., ZHANG, Y., and DONNAN, R., *Accurate determination of terahertz optical constants by vector network analyzer of Fabry–Perot response*, Opt. Lett., 38, 5438–5441 (2013).
- [43] TOSAKA, T., FUJII, K., FUKUNAGA, K., and KASAMATSU, A., *Development of complex relative permittivity measurement system based on free-space in 220–330-GHz range*, IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology, 5, 102–109 (2015).
- [44] SMITH, D.R., VIER, D.C., KROLL, N., and SCHULTZ, S., *Direct calculation of permeability and permittivity for a left-handed metamaterial*, Applied Physics Letters, 77, 2246–2248 (2000).
- [45] KUMAR, R., KUMAR, M., CHOCHAN, J.S., and KUMAR, S., *Overview on metamaterial: History, types and applications*, Materials Today: Proceedings, 56, 3016–3024 (2022), 3rd International Conference on Contemporary Advances in Mechanical Engineering.
- [46] MUNK, B.A., *Frequency selective surfaces – Theory and design* (John Wiley & Sons Inc, 2000).
- [47] PENDRY, J.B., HOLDEN, A.J., ROBBINS, D.J., and STEWART, W.J., *Magnetism from conductors and enhanced nonlinear phenomena*, IEEE transactions on microwave theory and techniques, 47, 2075–2084 (1999).
- [48] DEBUS, C. and HARING BOLÍVAR, P., *Frequency selective surfaces for high sensitivity terahertz sensing*, Applied physics letters, 91, 184102 (2007).
- [49] LUK’YANCHUK, B., ZHELUDEV, N.I., MAIER, S.A., HALAS, N.J., NORDLANDER, P., GIESSEN, H., and CHONG, C.T., *The Fano resonance in plasmonic nanostructures and metamaterials*, Nature materials, 9, 707–715 (2010).
- [50] GALLINET, B. and MARTIN, O.J.F., *Ab initio theory of Fano resonances in plasmonic nanostructures and metamaterials*, Phys. Rev. B, 83 (2011).
- [51] BOOKER, H.G., *Slot aerials and their relation to complementary wire aerials (Babinet’s principle)*, Journal of the Institution of Electrical Engineers - Part IIIA: Radiolocation, 93, 620–626 (1946).

- [52] ZINKE, O., VLCEK, A., BRUNSWIG, H., and HARTNAGEL, H., *Hochfrequenztechnik 1: Hochfrequenzfilter, Leitungen, Antennen*, Springer-Lehrbuch (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
- [53] FALCONE, F., LOPETEGI, T., LASO, M.A., BAENA, J.D., BONACHE, J., BERUETE, M., MARQUÉS, R., MARTÍN, F., and SOROLLA, M., *Babinet principle applied to the design of metasurfaces and metamaterials*, Physical review letters, 93, 197401 (2004).
- [54] LOVE, J.C., ESTROFF, L.A., KRIEBEL, J.K., NUZZO, R.G., and WHITESIDES, G.M., *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology*, Chemical Reviews, 105, 1103–1170 (2005).
- [55] BUTT, H.J., GRAF, K., and KAPPL, M., *Physics and chemistry of interfaces*, Physics textbook (Wiley-VCH, Weinheim, 2006), 2., rev. and enl. ed. edn.
- [56] ULMAN, A., *Formation and structure of self-assembled monolayers*, Chemical Reviews, 96, 1533–1554 (1996).
- [57] DEBUS, C., *A high-sensitivity THz-sensing technology for DNA detection with split-ring resonator based biochips*, Ph.D. thesis, Siegen, Universität Siegen (2013).
- [58] PHAM TRAN, T.A., DE SANTANA, E.P., and HARING BOLÍVAR, P., *Uncertainty quantization of fano resonance frequency shift measurement*, in 2019 44th International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves (IRMMW-THz), 1–2 (2019).
- [59] ROGGENBUCK, A., SCHMITZ, H., DENINGER, A., MAYORGA, I.C., HEMBERGER, J., GÜSTEN, R., and GRÜNINGER, M., *Coherent broadband continuous-wave terahertz spectroscopy on solid-state samples*, New Journal of Physics, 12, 043017 (2010).
- [60] O’HARA, J.F., SINGH, R., BRENER, I., SMIRNOVA, E., HAN, J., TAYLOR, A.J., and ZHANG, W., *Thin-film sensing with planar terahertz metamaterials: Sensitivity and limitations*, Optics express, 16, 1786–1795 (2008).
- [61] PARENT, R., *Computer animation: Algorithms and techniques*, The Morgan Kaufmann Series in Computer Graphics (Elsevier Science, 2012).
- [62] CULPEPPER, M.L., *Design of quasi-kinematic couplings*, Precision Engineering, 28, 338–357 (2004).
- [63] YODER, P.R., *Mounting optics in optical instruments* (SPIE, 1000 20th Street, Bellingham, WA 98227-0010 USA, 2008).
- [64] KONG, D.Y., WU, X.J., WANG, B., GAO, Y., DAI, J., WANG, L., RUAN, C.J., and MIAO, J.G., *High resolution continuous wave terahertz spectroscopy on solid-state samples with coherent detection*, Opt. Express, 26, 17964–17976 (2018).

- [65] OPPENHEIM, A.V. and SCHAFER, R.W., *Zeitdiskrete Signalverarbeitung: Mit 19 Tabellen, 112 Beispielen und 403 Aufgaben* (Oldenbourg, München, 1999), 3., durchges. Aufl. edn.
- [66] BLOOMFIELD, P., *Fourier analysis of time series: An introduction*, Wiley series in probability and statistics applied probability and statistics section (Wiley, New York, NY, 2000), 2. ed. edn.
- [67] GUO, S.J., RUAN, C.J., KONG, D.Y., DAI, J., ZHANG, Y., and HE, W.L., *Research on terahertz transmission characteristics of nonpolar liquid based on frequency-domain spectroscopy*, *JOSA B*, 37, 1942 (2020).
- [68] KHANIKAEV, A.B., WU, C., and SHVETS, G., *Fano-resonant metamaterials and their applications*, *Nanophotonics*, 2, 247–264 (2013).
- [69] LV, B., LI, R., FU, J., WU, Q., ZHANG, K., CHEN, W., WANG, Z., and MA, R., *Analysis and modeling of Fano resonances using equivalent circuit elements*, *Scientific Reports*, 6, 31884 (2016).
- [70] PHAM TRAN, T.A. and HARING BOLÍVAR, P., *Terahertz modulator based on vertically coupled fano metamaterial*, *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology*, 8, 502–508 (2018).
- [71] NAFTALY, M. and MILES, R.E., *Terahertz time-domain spectroscopy for material characterization*, *Proceedings of the IEEE*, 95, 1658–1665 (2007).
- [72] ADAMOV, M., PEROVIĆ, B., and NENADOVIĆ, T., *Electrical and structural properties of thin gold films obtained by vacuum evaporation and sputtering*, *Thin Solid Films*, 24, 89–100 (1974).
- [73] GARRATT-REED, A.J. and BELL, D.C., *Energy-dispersive X-ray analysis in the electron microscope* (BIOS, Oxford, UK, 2003).
- [74] GOLDSTEIN, J.I., NEWBURY, D.E., ECHLIN, P., JOY, D.C., LYMAN, C.E., LIFS-HIN, E., SAWYER, L., and MICHAEL, J.R., *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis: Third edition*, Springer eBook Collection (Springer, Boston, MA, 2003).
- [75] BINNIG, G., QUATE, C.F., and GERBER, C., *Atomic force microscope*, *Phys. Rev. Lett.*, 56, 930–933 (1986).
- [76] WEISENSTEIN, C., SCHMECK, M., SCHAAR, D., WIGGER, A.K., BOSSERHOFF, A.K., and HARING BOLÍVAR, P., *Quantification of dsDNA functionalization efficiency in THz biosensors*, in 2019 44th International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves (IRMMW-THz), 1–2 (2019).
- [77] WAGNER, P., HEGNER, M., GUENTHERODT, H.J., and SEMENZA, G., *Formation and in situ modification of monolayers chemisorbed on ultraflat template-stripped gold surfaces*, *Langmuir*, 11, 3867–3875 (1995).
- [78] FROEHLICH, H., *Long-range coherence and energy storage in biological systems*, *International Journal of Quantum Chemistry*, 2, 641–649 (1968).

-
- [79] ZHUANG, W., FENG, Y., and PROHOFSKY, E.W., *Self-consistent calculation of localized DNA vibrational properties at a double-helix-single-strand junction with anharmonic potential*, Phys. Rev. A, 41, 7033–7042 (1990).
- [80] SAMUEL P MICKAN, ABDELLAH MENIKH, HAIBO LIU, CARMEN A MANNELLA, ROBERT MACCOLL, DEREK ABBOTT, JESPER MUNCH, and X-C ZHANG, *Label-free bioaffinity detection using terahertz technology*, Physics in Medicine & Biology, 47, 3789 (2002).
- [81] FISCHER, B.M., WALTHER, M., and JEPSEN, P.U., *Far-infrared vibrational modes of DNA components studied by terahertz time-domain spectroscopy*, Physics in Medicine & Biology, 47, 3807 (2002).
- [82] DEBUS, C., AWAD, M., NAGEL, M., and HARING BOLÍVAR, P., *Terahertz biochip technology: Toward high-sensitivity label-free DNA sensors*, Am. Biotechnol. Lab, 27, 8–11 (2009).
- [83] LVOVSKA, M.I., SEEMAN, N.C., SHA, R., GLOBUS, T.R., KHROMOVA, T.B., and DOROFEEVA, T.S., *THz characterization of DNA four-way junction and its components*, IEEE Transactions on Nanotechnology, 9, 610–617 (2010).
- [84] ARORA, A., LUONG, T.Q., KRÜGER, M., KIM, Y.J., NAM, C.H., MANZ, A., and HAVENITH, M., *Terahertz-time domain spectroscopy for the detection of PCR amplified DNA in aqueous solution*, Analyst, 137, 575–579 (2012).
- [85] SERITA, K., MURAKAMI, H., KAWAYAMA, I., and TONOUCHI, M., *A terahertz-microfluidic chip with a few arrays of asymmetric meta-atoms for the ultra-trace sensing of solutions*, Photonics, 6, 12 (2019).
- [86] LEE, S.H., CHOE, J.H., KIM, C., BAE, S., KIM, J.S., PARK, Q.H., and SEO, M., *Graphene assisted terahertz metamaterials for sensitive bio-sensing*, Sensors and Actuators B: Chemical, 310, 127841 (2020).
- [87] TANG, M., ZHANG, M., XIA, L., YANG, Z., YAN, S., WANG, H., WEI, D., DU, C., and CUI, H.L., *Detection of single-base mutation of DNA oligonucleotides with different lengths by terahertz attenuated total reflection microfluidic cell*, Biomed. Opt. Express, 11, 5362 (2020).
- [88] YANG, J. and LIN, Y.S., *Design of tunable terahertz metamaterial sensor with single- and dual-resonance characteristic*, Nanomaterials, 11, 2212 (2021).
- [89] ADAK, S. and TRIPATHI, L.N., *Nanoantenna enhanced terahertz interaction of biomolecules*, Analyst, 144, 6172–6192 (2019).
- [90] ZHANG, R., CHEN, Q., LIU, K., CHEN, Z., LI, K., ZHANG, X., XU, J., and PICKWELL-MACPHERSON, E., *Terahertz microfluidic metamaterial biosensor for sensitive detection of small-volume liquid samples*, IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology, 9, 209–214 (2019).
- [91] CHEN, X. and FAN, W., *Toroidal metasurfaces integrated with microfluidic for terahertz refractive index sensing*, Journal of Physics D: Applied Physics, 52, 485104 (2019).

- [92] PARK, S.J., YOON, S.A., and AHN, Y.H., *Dielectric constant measurements of thin films and liquids using terahertz metamaterials*, RSC Advances, 6, 69381–69386 (2016).
- [93] CHEN, M., SINGH, L., XU, N., SINGH, R., ZHANG, W., and XIE, L., *Terahertz sensing of highly absorptive water-methanol mixtures with multiple resonances in metamaterials*, Optics Express, 25, 14089–14097 (2017).
- [94] SUN, Y., XIA, X., FENG, H., YANG, H., GU, C., and WANG, L., *Modulated terahertz responses of split ring resonators by nanometer thick liquid layers*, Applied physics letters, 92, 221101 (2008).
- [95] WU, X., PAN, X., QUAN, B., XU, X., GU, C., and WANG, L., *Self-referenced sensing based on terahertz metamaterial for aqueous solutions*, Applied Physics Letters, 102, 151109 (2013).
- [96] MIYAMARU, F., HATTORI, K., SHIRAGA, K., KAWASHIMA, S., SUGA, S., NISHIDA, T., TAKEDA, M.W., and OGAWA, Y., *Highly sensitive terahertz sensing of glycerol-water mixtures with metamaterials*, Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, 35, 198–207 (2014).
- [97] YAN, X., LIANG, L.J., DING, X., and YAO, J.Q., *Solid analyte and aqueous solutions sensing based on a flexible terahertz dual-band metamaterial absorber*, Optical Engineering, 56, 027104 (2017).
- [98] KISSINGER, D., KAYNAK, M., and MAI, A., *Integrated millimeter-wave and terahertz analyzers for biomedical applications*, IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques, 70, 5141–5158 (2022).
- [99] SALEH, B.E.A. and TEICH, M.C., *Fundamentals of photonics*, Wiley series in pure and applied optics (Wiley, New York, 1991).
- [100] GONZÁLEZ-CARDEL, M., ARGUIJO, P., and DÍAZ-URIBE, R., *Gaussian beam radius measurement with a knife-edge: a polynomial approximation to the inverse error function*, Appl. Opt., 52, 3849–3855 (2013).
- [101] WEISENSTEIN, C., RICHTER, M., WIGGER, A.K., BOSSERHOFF, A., and HARRING BOLÍVAR, P., *Substrate-integrated microfluidics for sensitive biosensing with complementary THz metamaterials in water*, Applied Physics Letters, 120, 053702 (2022).
- [102] TANG, C., YANG, J., WANG, Y., CHENG, J., LI, X., CHANG, C., HU, J., and LÜ, J., *Integrating terahertz metamaterial and water nanodroplets for ultra-sensitive detection of amyloid β aggregates in liquids*, Sensors and Actuators B: Chemical, 329, 129113 (2021).
- [103] HU, X., XU, G., WEN, L., WANG, H., ZHAO, Y., ZHANG, Y., CUMMING, D.R.S., and CHEN, Q., *Metamaterial absorber integrated microfluidic terahertz sensors*, Laser & Photonics Reviews, 10, 962–969 (2016).
- [104] ZHANG, W.D., BYKHOVSKI, A., DEIBEL, J.A., and BROWN, E.R., *Experimental and theoretical study of strong low-terahertz absorption of thymine*, Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, 1–9 (2017).

- [105] REINHARD, B., SCHMITT, K.M., WOLLRAB, V., NEU, J., BEIGANG, R., and RAHM, M., *Metamaterial near-field sensor for deep-subwavelength thickness measurements and sensitive refractometry in the terahertz frequency range*, Applied Physics Letters, 100, 221101 (2012).
- [106] DUAN, G., SCHALCH, J., ZHAO, X., LI, A., AVERITT, R., and ZHANG, X., *A high sensitivity microfluidic channel enabled terahertz metamaterial absorber for sensing and detection*, in 2019 20th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems & Eurosensors XXXIII (TRANSDUCERS & EUROSENSORS XXXIII) (IEEE, 2019).
- [107] LAN, F., LUO, F., MAZUMDER, P., YANG, Z., MENG, L., BAO, Z., ZHOU, J., ZHANG, Y., LIANG, S., SHI, Z., KHAN, A.R., ZHANG, Z., WANG, L., YIN, J., and ZENG, H., *Dual-band refractometric terahertz biosensing with intense wave-matter-overlap microfluidic channel*, Biomedical Optics Express, 10, 3789–3799 (2019).
- [108] WEISENSTEIN, C., WIGGER, A.K., RICHTER, M., SCZECH, R., BOSSERHOFF, A.K., and HARING BOLÍVAR, P., *THz detection of biomolecules in aqueous environments—Status and perspectives for analysis under physiological conditions and clinical use*, Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves (2021).
- [109] WEISENSTEIN, C., RICHTER, M., WIGGER, A.K., BOSSERHOFF, A.K., and HARING BOLÍVAR, P., *Multifrequency investigation of single- and double-stranded DNA with scalable metamaterial-based THz biosensors*, Biosensors, 12, 483 (2022).

Symbolverzeichnis

a Hinlaufende Welle
a_{\max} Amplitude an der Maximumposition des DRF
a_{\min} Amplitude an der Minimumposition des DRF
a_{Probe} Amplitude der Transmission durch die Probe
$a_{\text{Ref.}}$ Amplitude der Referenzmessung
b Rücklaufende Welle
c Lichtgeschwindigkeit
C Konzentration
d (Schicht-)Dicke
D Durchmesser (Optik)
Δa Amplitudenunterschied
Δf Frequenzunterschied
Δt Zeitverzögerung
$\Delta\omega$ Differenzfrequenz Laser
E_{THz} Amplitude des elektrischen Feldes
\vec{E} Vektorielle elektrische Feldstärke
ϵ_{R} Relative Permittivität
f Frequenz
f_0 Resonanzfrequenz
f_{\max} Frequenzposition an der Maximumposition des DRF
f_{\min} Frequenzposition an der Minimumposition des DRF
$f_{\text{Mess.}}$ Resonanzfrequenz einer gemessenen Struktur
$f_{\text{Sim.}}$ Resonanzfrequenz einer simulierten Struktur
F Brennweite
\vec{H} Vektorielle magnetische Feldstärke
\mathcal{H} Hilbert-Transformation
I_{Ph} Photostrom

\tilde{I}_{Ph} Analytische Signal
j Imaginäre Einheit
k Steigung einer linearen Funktion
ΔL Pfaddifferenz
L_D Optische Pfadlänge zum THz-Empfänger
L_S Optische Pfadlänge zur THz-Quelle
L_{THz} Pfadlänge der THz-Strahlung
λ Wellenlänge
m Masse
M Molare Masse
μ Position der Normalverteilung
n Brechungsindex
N Stoffmenge
p Größe einer Einheitszelle
Q Qualitätsfaktor
r Ring Radius
r_0 Radius einer Strahltaile
R_a Mittlere Rauheit
R_z Gemittelte Rautiefe
s Parameter der Fensterfunktion
S_{11} Eingangsreflexionsfaktor
S_{21} Vorwärts-Transmissionsfaktor
S_{12} Rückwärts-Transmissionsfaktor
S_{22} Ausgangsreflexionsfaktor
S Empfindlichkeit
$S_{Mess.}$ Empfindlichkeit einer gemessenen Struktur
$S_{Sim.}$ Empfindlichkeit einer simulierten Struktur
S_{vol} Empfindlichkeit pro Volumeneinheit
σ Breite der Normalverteilung
T Transmissionsfaktor
T_{dB} Transmissionsfaktor in logarithmischer Form
V Volumen
φ_O Offset-Winkel

φ_G Schlitz-Winkel
$\varphi(x)$ Dichtefunktion der Normalverteilung
$\Phi(x)$ Verteilungsfunktion der Normalverteilung
w Schlitz-Breite
$w(x)$ Fensterfunktion
ω_n Frequenz Laser

Abkürzungsverzeichnis

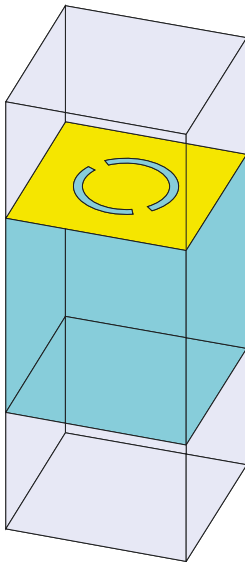
aDSRR	Asymmetrischer Doppel-Schlitz-Ringresonator (engl. asymmetric double split ring resonator)
AFM	Rasterkraftmikroskop (engl. atomic force microscope)
a.u.	Willkürliche Einheit (engl. arbitrary unit)
ATP	Adenosine triphosphat
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion (engl. attenuated total reflection)
bp	Basenpaare
CASRR	Komplementärer asymmetrischer Schlitz-Ringresonator (engl. complementary asymmetric split ring resonator)
cDNA	Komplementäre DNA (engl. complementary-DNA)
CSRR	Komplementärer Schlitz-Ringresonator (engl. complementary split ring resonator)
cw	Dauerstrich (engl. continuous wave)
DFB-Laser	Laser mit verteilter Rückkopplung (engl. distributed feedback laser)
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DRF	Doppelresonanz Merkmal (engl. double resonance feature)
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (engl. energy dispersive X-ray spectroscopy)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FDS	Frequenzbereichs-Spektroskopie (engl. frequency-domain spectroscopy)
FFT	Schnelle Fourier-Transformation (engl. fast Fourier transform)
FIR-Filter	Filter mit endlicher Impulsantwort (engl. finite impuls response)
FoM	Engl. figure of merit

FSS Frequenzselektive Oberflächen (engl. frequency selective surface)
GaAs Galliumarsenid
HFFlusssäure
HFSS Engl. high-frequency structure simulator
IF Zwischenfrequenz (engl. intermediate frequency)
IFFTInverse FFT
InGaAs Indiumgalliumarsenid
LDL Untere Nachweisgrenze (engl. lower detection limit)
LOLokaler Oszillator
LT-GaAs Bei niedrigen Temperaturen gewachsenes GaAs (engl. low-temperature-grown GaAs)
MCH 6-Mercapto-1-hexanol
NIR Nahes Infrarot (engl. near infrared)
PCR Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PPTD Maximum-zu-Maximum Transmissionsamplitude (engl. peak to peak transmission difference)
QCM Quarzkristall-Mikrowaage (engl. quartz crystal microbalance)
RFHochfrequenz (engl. radio frequency)
RIU Engl. refractive index unit
RNA Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
SAMSelbstorganisierende Monoschicht (engl. self-assembled monolayer)
SEM Rasterelektronenmikroskop (engl. scanning electron microscope)
SNR Signal-Rausch-Verhältnis (engl. signal-to-noise ratio)
SRR Schlitz-Ringresonator (engl. split ring resonator)
ssDNA Einzelstrang-DNA
TDS Zeitbereichs-Spektroskopie (engl. time-domain spectroscopy)
THz Terahertz
VCO Spannungsgesteuerter Oszillator (engl. voltage-controlled oscillator)
VNA Vektorieller Netzwerkanalysator (engl. vector network analyzer)

Anhang A

CSRR Design

A.1 HFSS Model - CSRR



Design Parameter			
Frequenz	0.3 THz	0.6 THz	1 THz
Einheitszelle	416 μm	202 μm	124 μm
Ring Radius	96 μm	46 μm	29 μm
Schlitz Breite	20 μm	10 μm	6 μm
Offset-Winkel	42°	42°	42°
Schlitz-Winkel	22°	22°	22°
Ätztiefe	3 μm	3 μm	3 μm
Simulation			
Excitation	Floquet Port		
Boundaries	Master und Slave		
Sweep	Interpolating		
Materialparameter Gold			
Dicke	d = 200 nm		
Permittivität	$\epsilon_r = -1.12 \times 10^5$		
Leitfähigkeit	4.01 x 10 ⁷ S/m		
Materialparameter Substrat			
Dicke	d = 500 μm		
Permittivität	$\epsilon_r = 3.81$		
tan δ	0.0001		
Materialparameter DNA			
Dicke	d = 100 nm		
Permittivität	$\epsilon_r = 2.6$		
tan δ	0.001		
Leitfähigkeit	100 kS/m		

Abb. A.1: HFSS-Modell und die wichtigsten Design- und Materialparameter der Simulation. Diese Simulationsmodelle wurden für die Untersuchung von getrockneter DNA in den Kapiteln 5 und 6 verwendet.

A.2 HFSS Model - CSRR in Wasser

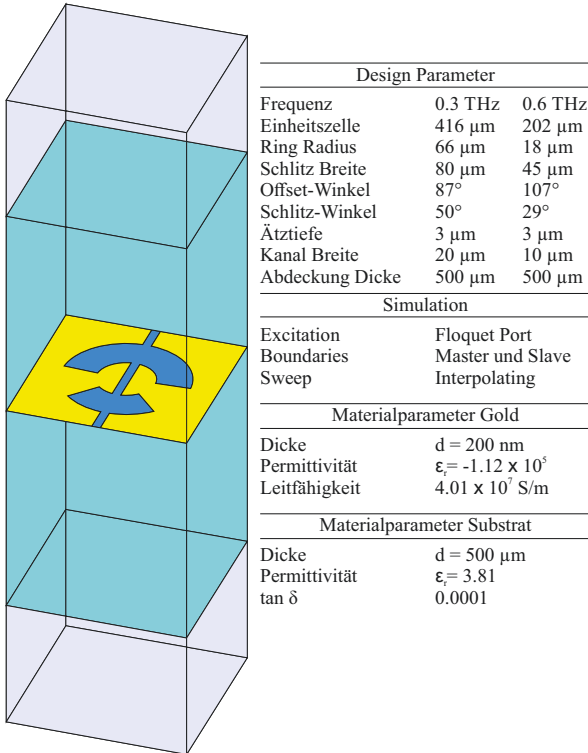


Abb. A.2: HFSS-Modell und die wichtigsten Design- und Materialparameter der Simulation. Dieses Simulationsmodell wurde für Untersuchungen in flüssigen Umgebungen in Kapitel 8 verwendet.

A.3 MATLAB Code

Der im Folgenden gezeigte MATLAB-Code zeigt die Implementierung eines Skripts für die Erstellung eines CSRR Designs in der Layout Software CleWin.

```
% Divide the model into 2 parts: upper from -phi1 to phi1, lower from -phi2
    to phi2 (symmetric)
phi1 = 87      %deg    90deg+ phi2(According to aDSR Layout, -3deg)
phi2 = 109     %deg    90deg+ phi1(According to aDSR Layout, 19deg)
rInner = 96;   %um
rOuter = 116;  %um
rotAngle = 90; %deg

% Make the upper half ()
% Create a vector consisting of 100 elements with values ranging from -phi1
    to phi1
phi = linspace(-phi1 * pi/180, phi1 * pi/180, 100);
% Create the nodes in cartesian
nodes1 = [rInner*cos(phi); rInner*sin(phi)]; %inner
nodes2 = [rOuter*cos(phi); rOuter*sin(phi)]; %outer
upperPartNodes = [nodes1'; (fliplr(nodes2))'];

% Make the lower half ()
% Create a vector consisting of 100 elements with values ranging from -phi2
    to phi2
phi = linspace(phi2 * pi/180, (360-phi2) * pi/180, 100);
% Create the nodes in cartesian
nodes1 = [rInner*cos(phi); rInner*sin(phi)]; %inner
nodes2 = [rOuter*cos(phi); rOuter*sin(phi)]; %outer
lowerPartNodes = [nodes1'; (fliplr(nodes2))'];

% Rotate the parts
% Create a transformation matrix:
rotangle=rotAngle*pi/180;
T=[cos(rotangle) -sin(rotangle); sin(rotangle) cos(rotangle)]
% Transform the nodes and generate the polygon:
rotUpperPart = (T*upperPartNodes)';
rotLowerPart = (T*lowerPartNodes)';

% Generate the polygon in CleWin:
polygon(rotUpperPart);
% Generate the polygon in CleWin:
polygon(rotLowerPart);
```


Anhang B

Bestimmung des Strahldurchmessers

Die minimale Größe eines Abfragefeldes eines Biosensors wird primär durch den Durchmesser des THz-Strahls im Fokuspunkt definiert. Limitiert wird der minimal erreichbare Durchmesser durch die Wellenlänge λ der einfallenden Strahlung und den Eigenschaften der verwendeten Optik. Grundsätzlich gilt außerdem die Annahme einer Gauß-Optik, die eine gaußförmige Verteilung der Strahlungsintensität voraussetzt. In dem unter Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Messsystem kommen für die Fokussierung des THz-Strahls Off-Axis-Parabolspiegel mit einer Brennweite von $F = 101.6$ mm und einem Durchmesser von $D = 50.8$ mm von Edmund Optics zum Einsatz. Der damit maximal erreichbare Strahldurchmesser lässt sich damit wie folgt berechnen [99]:

$$2r_0 = \left(\frac{4\lambda}{\pi}\right) \cdot \left(\frac{F}{D}\right). \quad (\text{B.1})$$

Dabei beschreibt r_0 den Radius der Strahltaile. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind in Abbildung B.1(d) dargestellt und werden mit dem gemessenen Durchmesser in x- und y-Richtung verglichen.

Um den Strahldurchmesser messtechnisch zu erfassen, hat sich die Knife-Edge Methode etabliert [100]. Bei dieser Methode wird in Transmissionskonfiguration die scharfe Kante einer Metalloberfläche, häufig eine Rasierklinge, durch den Strahlengang bewegt. Diese schattet den Strahlengang schrittweise ab und die verbleibende Intensität wird als Funktion der Klingenposition aufgezeichnet. Für das in der Arbeit aus Kapitel 6 verwendete Messsystem wird am photoleitenden Detektor ein Photostrom gemessen und mittels Transimpedanzverstärker in eine Spannung umgewandelt. Diese Spannung ist proportional zum elektrischen Feld und in Abbildung B.1(a) dargestellt. Das Quadrat des elektrischen Feldes ist proportional zur Intensität und in Abbildung B.1(b) auf Amplitude 1 normiert dargestellt. Diese Messpunkte können mit der Verteilungsfunktion der Normalverteilung gefittet werden:

$$\Phi(x) = \frac{1}{2} \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x - \mu}{\sigma \cdot \sqrt{2}} \right) \right). \quad (\text{B.2})$$

In dieser Funktion beschreibt μ die Position und σ gibt die Breite der Normalverteilung an. Wird die Verteilungsfunktion abgeleitet, ergibt sich daraus die Dichtefunktion der Normalverteilung (Abbildung B.1(c)):

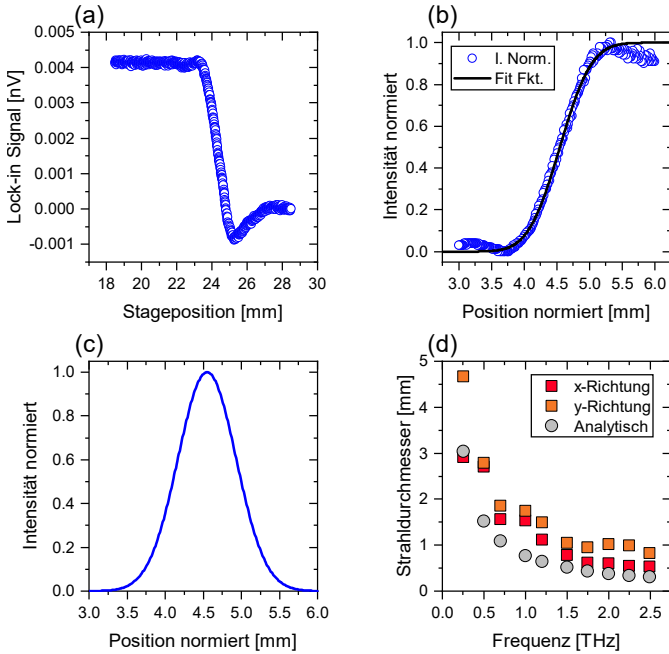


Abb. B.1: Messung und Bestimmung des Strahldurchmessers mithilfe einer Rasierklinge. (a) Die im Lock-in Verstärker gemessene Amplitude des elektrischen Feldes, als Funktion der Position der Blende (Hier eine Rasierklinge) bei einer fixierten Frequenz. (b) Die normierte Intensität wird mithilfe der Verteilungsfunktion der Normalverteilung gefittet. (c) Die Ableitung der Verteilungsfunktion ergibt die Dichtefunktion der Normalverteilung. (d) Vergleich der Strahldurchmesser in x- und y-Richtung mit einem analytisch berechneten Wert als Funktion der Messfrequenz.

$$\varphi(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \left(1 + \exp\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right) \right), \quad (\text{B.3})$$

anhand derer der Strahldurchmesser ausgewertet wird. Hierzu wird die Breite der Normalverteilung mit $\pm 2\sigma$ verwendet, das bedeutet, dass ca. 95.45% der Strahlungsleistung innerhalb dieses Bereichs liegen. Der so ermittelte Strahldurchmesser entspricht sehr genau dem Wert, bei dem die Intensität auf $1/e^2$ abgefallen ist, welcher üblicherweise als Maß zur Beschreibung des Strahldurchmessers verwendet wird [99].

Die Zusammenfassung dieser Messergebnisse in x- und y-Richtung ist in Abbildung B.1(d) dargestellt. Die Abweichung des Strahldurchmessers in x- und y-Richtung lässt darauf schließen, dass nicht exakt im Fokuspunkt gemessen wurde und somit kein 2D-symmetrisches gaußförmiges Strahlprofil vorliegt, da die Abbildung der verwendeten Spiegel außerhalb des Fokuspunktes einen starken Astigmatismus aufweisen. Für die Abschätzung einer minimalen Feldgröße für das Design des Abfragefeldes eines Biosensors ist die beschriebene Methode jedoch hinreichend genau.

Anhang C

Prozessprotokolle

C.1 DNA-Vorbereitung

Nr.	Schritt	Beschreibung
1	Lösen der DNA	Lyophilisierte DNA in DI-Wasser auflösen für 100 $\mu\text{mol/l}$. Für die Berechnung der Konzentration die Stoffmenge aus Synthese Report beachten.
2	Aliquotieren	Abmessen und abfüllen von je 20 μl pro Mikroreaktionsgefäß.
3	Gefrieren	Tauchbad in flüssigem Stickstoff für je 2 min.
4	Lyophilisieren	In Vakuumzentrifuge für mindestens 8 h.
5	Lagerung	Haltbarkeit bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ca. 6 Monate, bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ca. 12 Monate
<i>Vorbereitung unmittelbar vor Experiment</i>		
6	Lösen der DNA	20 μl pro Mikroreaktionsgefäß in TE-Puffer
7	Homogenisieren	Shaker für mindestens 5 s, anschließend Mikrozentrifuge für mindestens 3 s
8	Definition der Zielkonzentration	Einstellen mittels: $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ Index 1: Zielvolumen und Konzentration Index 2: Ursprungsvolumen und Konzentration Einstellung gemäß DNA-Vorbereitung

Tab. C.1: Prozessschritte zur Vorbereitung von kommerziell erworbener synthetisierter Einzel- und Doppelstrang-DNA.

C.2 *Ex-situ* und *on-chip* Hybridisierung

Nr.	Schritt	Beschreibung
1	Herstellung Thiol modifizierte DNA-Lösung $V_{\text{Ziel}} = 200 \mu\text{l}$ $C_{\text{Ziel}} = 10 \mu\text{M}$	TE-Puffer (170 μl) DNA-Lösung (100 $\mu\text{mol/l}$, in 20 μl TE-Puffer) TCEP-Lösung (1 mmol/l in 10 μl DI-Wasser) 5 s homogenisieren
2	Herstellung komplementärer DNA-Lösung $V_{\text{Ziel}} = 200 \mu\text{l}$ $C_{\text{Ziel}} = 10 \mu\text{M}$	TE-Puffer (180 μl) DNA-Lösung (100 $\mu\text{mol/l}$, in 20 μl TE-Puffer) 5 s homogenisieren
<i>Ex-situ Hybridisierung</i>		
3a	Ex-situ hybridisieren	Thiol-modifizierte ssDNA-Lösung (200 μl) Komplementäre ssDNA-Lösung (200 μl) 5 s homogenisieren Hybridisierung für 8 h bei 50 °C auf Thermorüttler
4a	Abzentrifugieren (Hybridisierungs-lösung)	Vorbereitung: Equilibrieren der Bio-Spin P-6 Gel Säulen mit TE-Puffer. Abzentrifugieren: 1000 g für 4 min um separierte Sulfide aus Lösung zu entfernen
5a	Pipetieren (Hybridisierungs-lösung)	7 \times 7 Split-Ring-Gruppe je 5 μl für 45 min 5 \times 5 Split-Ring-Gruppe je 3 μl für 45 min
6a	Reinigen und trocknen	Vorsichtig unter DI-Wasser abspülen und mit Stickstoff trocknen. Trocknen im Ofen für 45 min bei 50 °C
7a	Messung	Einbau in Messsystem, durchführen der Messroutine
<i>On-Chip Hybridisierung</i>		
3b	Abzentrifugieren (Thiol-modifizierte ssDNA-Lösung)	Vorbereitung: Equilibrieren der Bio-Spin P-6 Gel Säulen mit TE-Puffer. Abzentrifugieren: 1000 g für 4 min um separierte Sulfide aus Lösung zu entfernen

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Nr.	Schritt	Beschreibung
4b	Pipetieren (Thiol modifizierte ssDNA-Lösung)	7 × 7 Split-Ring-Gruppe je 5 µl für 45 min 5 × 5 Split-Ring-Gruppe je 3 µl für 45 min
5b	Reinigen und trocknen	Vorsichtig unter DI-Wasser abspülen und mit Stickstoff trocknen. Trocknen im Ofen für 45 min bei 50 °C
6b	Entfernen unspezi- fischer Bindungen	MCH-Lösung (1 mM in DI-Wasser). Je 3 µl oder 5 µl pipettieren und einwirken für 45 min
7b	Reinigen und trocknen	Schritt 5b wiederholen
8b	Messung	Einbau in Messsystem, durchführen der Messroutine
9b	On-Chip Hybridisierung	Komplementäre DNA-Lösung, je 3 µl oder 5 µl pipettieren und einwirken für 45 min
10b	Reinigen und trocknen	Schritt 5b wiederholen
11b	Messung	Einbau in Messsystem, durchführen der Messroutine
12b	On-Chip Denaturierung	Harnstoff (UREA)-Lösung (8 M in DI-Wasser), je 3 µl oder 5 µl pipettieren und einwirken für 45 min
13b	Reinigen und trocknen	Schritt 5b wiederholen
14b	Messung	Einbau in Messsystem, durchführen der Messroutine

Tab. C.2: Prozessschritte für die Verarbeitung von DNA, welche in einem Mikroreaktionsgefäß hybridisiert wird (*ex-situ*) und für die Hybridisierung auf der Sensoroberfläche (*on-chip*). Zur Anwendung kommen beide Verfahren in der Arbeit aus Kapitel 5.

C.3 DNA-Film als Lösungsmittelguss

Nr.	Schritt	Beschreibung
<i>dsDNA-Lösung</i>		
1a	Herstellung dsDNA-Lösung $V_{\text{Ziel}} = 25 \mu\text{l}$ $C_{\text{Ziel}} = 20 \mu\text{M}$	TCEP (1 mmol/l, 1 μl in DI-Wasser) tssDNA (500 pmol, in 11.5 μl DI-Wasser) ssDNA (500 pmol, in 12.5 μl DI-Wasser) 45 min homogenisieren bei 25 °C auf Thermorüttler
2a	Verdünnungsreihe	Mit DI-Wasser verdünnen auf Konzentration: $C_{\text{Ziel}} = 1, 5, 10, 20 \mu\text{M}$
3a	Pipetieren	Menge für 0.3 THz: 2.5 μl Menge für 0.6 THz und 1 THz: 1.5 μl Stoffmenge pro Feld: 0.3 THz: 0.6 THz und 1 THz: 20 $\mu\text{M} \hat{=} 50 \text{ pmol}$ 20 $\mu\text{M} \hat{=} 30 \text{ pmol}$ 10 $\mu\text{M} \hat{=} 25 \text{ pmol}$ 10 $\mu\text{M} \hat{=} 15 \text{ pmol}$ 5 $\mu\text{M} \hat{=} 12.5 \text{ pmol}$ 5 $\mu\text{M} \hat{=} 7.5 \text{ pmol}$ 1 $\mu\text{M} \hat{=} 2.5 \text{ pmol}$ 1 $\mu\text{M} \hat{=} 1.5 \text{ pmol}$
4a	Trocknen	Die Sensoren werden in einer Vakuumkammer platziert, um unter vermindertem Druck das Lösungsmittel zu entfernen.
5a	Messung	Einbau in Messsystem, durchführen der Messroutine
<i>ssDNA-Lösung</i>		
1b	Herstellung ssDNA-Lösung $V_{\text{Ziel}} = 25 \mu\text{l}$ $C_{\text{Ziel}} = 20 \mu\text{M}$	TCEP (1 mmol/l, 1 μl in DI-Wasser) tssDNA (500 pmol, in 24 μl DI-Wasser) Homogenisieren für 5 s
2b-5b		Identisch mit Schritten 2a-5a

Tab. C.3: Prozessschritte für die Verarbeitung von DNA, die als sogenannter Lösungsmittelguss (engl. solvent casting) appliziert wird. Diese Technik wird für die Herstellung von ss- und dsDNA-Schichten mit definierter Dicke für die Charakterisierung eingesetzt. Zur Anwendung kommt das Verfahren in der Arbeit aus Kapitel 6.

C.4 Pufferherstellung

Für die Experimente in Kapitel 5 wurde für die Hybridisierung und Immobilisierung eine Pufferlösung hergestellt. Folgende Vorschrift wird für die Berechnung der Konzentration C herangezogen:

$$C = \frac{M \cdot N}{V} \text{ in [g/l]} = \frac{m}{M \cdot V} \text{ in [mol/l]}, \quad (\text{C.1})$$

wobei M die molare Masse, N die Stoffmenge und V das Volumen ist. Da die Zielkonzentration vorgegeben ist, kann die Masse m für die Einwaage der verschiedenen Substanzen für ein vorgegebenes Volumen berechnet werden:

$$m = C \cdot V \cdot M. \quad (\text{C.2})$$

Der hier verwendete TE-Puffer¹ ist ein Puffer für biochemische Anwendungen, der aus einer wässrigen Lösung von NaCl (Merck), Tris-HCl (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid, Sigma-Aldrich), EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure, Sigma-Aldrich) besteht. Die berechneten Mengen für die Einwaage werden in Tabelle C.4 für ein Zielvolumen $V = 0.1\text{l}$ zusammengefasst. Nach der Einwaage werden alle Substanzen unter Rühren in DI-Wasser (Zielvolumen) gelöst und der pH-Wert durch Zugabe von NaOH auf einen Wert zwischen 7.5 und 8.0 eingestellt. Vor der Verwendung werden mittels Vakuumentgasung gelöste Gase aus dem Puffer entfernt.

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Zielkonzentration [mmol/l]	Masse [g]
NaCl	58.44	1000	5.84
Tris-HCl	157.6	10	0.158
EDTA	292.24	1	0.029

Tab. C.4: Materialzusammensetzung der TE-Pufferlösung für ein Zielvolumen von $V = 0.1\text{l}$.

¹Die Abkürzung TE ergibt sich aus den beiden Puffer Bestandteilen TRIS und EDTA

C.5 DNA-Proben

Oligoname	Sequenz (5' → 3')	Stoffmenge [nmol]	Molekulargewicht [g/mol]
Beta Aktin Forward	[ThiolC6]TGGCACCACAC CTTCTACAATGAGC (25)	50.0	7766
Beta Aktin Reverse	GCTCATTGTAGAAGGT GTGGTGCCA[FLU] (25)	80.2	8320
MIA Forward	[ThiolC6]GGTCCTATGC CCAAGCTGGCTGAC (24)	68.9	7524
MIA Reverse	GTCAGCCAGCTTGGGC ATAGGACC[FLU] (24)	23.1	7945
AP1/cJun Forward	[ThiolC6]CGCTTGATGA GTCAGCCGGAA (21)	41.5	6666
AP1/cJun Reverse	TTCCGGCTGACTCATC AAGCG (21)	180.7	6382

Tab. C.5: Sequenz, Stoffmenge und Molekulargewicht der in dieser Arbeit verwendete DNA-Proben. Beta Aktin und MIA sind die in Kapitel 5 synthetischen eingesetzten Oligonukleotide, AP1/cJun wurden in den Experimenten in Kapitel 6 verwendet. Alle eingesetzten Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics GmbH hergestellt.

Anhang D

Stand der Forschung: Metamaterial-basierte Biosensoren für Messungen in flüssigen Umgebungen

Im Folgenden wird tabellarisch der aktuelle Forschungsstand für Metamaterial-basierte Biosensoren für Messungen in flüssigen Umgebungen dargestellt und stellt eine Erweiterung der Veröffentlichung aus Kapitel 8 dar. Grundsätzlich wird zwischen Simulation und Messungen in Transmissions- (D.1) und Reflexionsanordnung (D.2) unterschieden. Es wird eine Übersicht gegeben über die Autoren und das Jahr der Veröffentlichung, die Resonanzfrequenz(en) der simulierten ($f_{\text{Sim.}}$) und gemessenen Struktur ($f_{\text{Mess.}}$) und des Strukturtyps, die Empfindlichkeit der simulierten ($S_{\text{Sim.}}$) und gemessenen Struktur ($S_{\text{Mess.}}$) als Frequenz- oder Wellenlängenverschiebung pro RIU oder FoM und welcher Analyt in welcher Dicke untersucht wurde. Hier ist insbesondere darauf hinzuweisen, dass einige Beiträge auf die Verwendung von Wasser als Medium verzichten und Materialien mit geringerer Absorption verwendet wurden, was für die Optimierung und Empfindlichkeit von Biosensoren entscheidend ist.

D.1 Transmission

Autor/ Jahr/Ref.	Resonanzfrequenz/ Struktur	Empfindlichkeit	Medium/ Dicke
Weisenstein 2022 [101]	$f_{\text{Sim.}} = 281.5$ GHz Komplementärer asymmetrischer Ringresonator	$S_{\text{Sim.}} = 7.40$ GHz/RIU für Luft $S_{\text{Sim.}} = 6.74$ GHz/RIU für Wasser	Wasser $d = 1 - 8$ μm
Chen 2017 [93]	$f_{\text{Sim.}}/f_{\text{Mess.}} = 1.1/1.7$ THz Asymmetrischer Doppeldraht-Resonator	$S_{\text{Mess.}} = 93/160/$ 305 GHz/RIU	Wasser- Methanol Mix $d = 38$ μm

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Autor/ Jahr/Ref.	Resonanzfrequenz/ Struktur	Empfindlichkeit	Medium/ Dicke
Emaminejad 2021 [23]	$f_{\text{Sim.}} = 1.4$ THz Ringresonator	$S_{\text{Sim.}} = 136$ $\mu\text{m}/\text{RIU}$ FoM = 50 - 150	Glukose, Albumin, Urea d = 5 - 100 μm
Sun 2008 [94]	$f_{\text{Mess.}} = 0.6/1.75$ THz Ringresonator	$S = \text{k.A.}$	Wasser, Ethanol, Trichlor- methan d = 50 nm
Shih 2017 [22]	$f_{\text{Sim.}}/f_{\text{Mess.}} = 1.05$ THz Ringresonator	$S = \text{k.A.}$ Messung: 20 μm Polystyrol Perlen	Wasser 2-Propanol d = 50 μm
Tang 2021 [102]	$f_{\text{Mess.}} = 0.68$ THz Dipol	$S = \text{k.A.}$ Messung: 1 nM Beta-Amyloid	Wasser in Öl Nanotropfen d = k.A.
Park 2016 [92]	$f_{\text{Sim.}}/f_{\text{Mess.}} = 0.8$ THz Quadratischer Schlitzresonator	$S_{\text{Mess.}} = 81.4$ GHz/RIU	Ethanol, Methanol, Wasser d = 50 μm
Shih 2018 [18]	$f_{\text{Sim.}}/f_{\text{Mess.}} = 0.85$ THz Rechteckiger- und Fano- Ringresonator	$S_{\text{Mess.}} = 76/95$ GHz/RIU Messung: ATP Aptamer	2-Propanol Ethanol Methanol Wasser d = 160 nm
Yoon 2020 [24]	$f_{\text{Mess.}} = 0.8$ THz Quadratischer Schlitzresonator	$S = \text{k.A.}$ Messung: Pilze (Schimmel und Hefe) und Bakterien	Wasser d = 20 μm
Zhang 2019 [90]	$f_{\text{Sim.}} = 2.06$ THz $f_{\text{Mess.}} = 1.96$ THz Bow-tie	$S_{\text{Mess.}} = 72/223$ GHz/RIU Messung: BSA	Wasser 2-Propanol- Wasser Mix d = 15 μm

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Autor/ Jahr/Ref.	Resonanzfrequenz/ Struktur	Empfindlichkeit	Medium/ Dicke
Chen 2019 [91]	$f_{\text{Sim.}} = 2.39 \text{ THz}$ Doppel E Schlitzresonator	$S_{\text{Sim.}} = 520.5 \text{ GHz/RIU}$ für Luft $S_{\text{Sim.}} = 37.88 \text{ GHz/RIU}$ für Flüssigkeiten	Ethanol Methanol Wasser $d = 8 \mu\text{m}$
Tang 2018 [25]	$f_{\text{Mess.}} = 1.34 \text{ THz}$ Rechteckiger Schlitzresonator	$S = \text{k.A.}$ Messung: $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{L DNA (17b)}$	Pufferlösung $d = 50 \mu\text{m}$

Tab. D.1: Übersicht über den Forschungsstand von Metamaterial-basierten Biosensoren für Simulation und Messungen in flüssigen Umgebungen bei der Verwendung einer Transmissionsanordnung.

D.2 Reflexion

Autor/ Jahr/Ref.	Resonanzfrequenz/ Struktur	Empfindlichkeit	Medium/ Dicke
Hu 2016 [103]	$f_{\text{Sim.}} = 5 \text{ THz}$ $f_{\text{Mess.}} = 0.9 \text{ THz}$ Absorber Kreuzstruktur	$S_{\text{Sim.}} = 3.5 \text{ THz/RIU}$ $S_{\text{Mess.}} = 0.2 \text{ THz/RIU}$	Wasser, Ethanol, Glukose $d = 1 \mu\text{m}$
Wu 2013 [95]	$f_{\text{Mess.}} = 0.41 \text{ THz}$ Rechteckiger Ringresonator	$S = \text{k.A.}$ Messung: NaCl Lösungen	Wasser Ethanol $d = \text{k.A.}$
Zhang 2017 [104]	$f_{\text{Sim.}}/f_{\text{Mess.}} = 0.51/$ 1.04 THz Doppelring Paare	$f_{\text{Sim.}}/f_{\text{Mess.}} =$ $0.58/0.64 \text{ THz/RIU}$	Luft $d = 5 \mu\text{m}$

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Autor/ Jahr/Ref.	Resonanzfrequenz/ Struktur	Empfindlichkeit	Medium/ Dicke
Miyamaru 2014 [96]	$f_{\text{Sim.}}/f_{\text{Mess.}} = 0.85$ THz Komplementärer Rechteckiger Ringresonator	$S = \text{k.A.}$ Messung: Wasser- Glycerin Mix	Wasser Glycerin $d = 1$ mm
Reinhard 2012 [105]	$f_{\text{Sim.}} = 1.3$ THz $f_{\text{Mess.}} = 1.6 - 1.3$ THz Kreuzstruktur	$S_{\text{Mess.}} = 0.43$ THz/RIU	Isopropanol, Glycerin, Paraffin, Ethanol, Butanol, Canolaöl, Cyclohexan, N-ethyl-2-pyr- rolidone (NEP) $d = \text{k.A.}$
Duan 2019 [106]	$f_{\text{Sim.}}/f_{\text{Mess.}} = 1.3$ THz Rechteckiger Schlitzresonator	$S = \text{k.A.}$ Messung: Methanol	Methanol $d = 120$ μm
Yan 2017 [97]	$f_{\text{Sim.}}/f_{\text{Mess.}} =$ $1.04/2.73$ THz Absorber Sternstruktur	$FoM = 1.2/17.2$	Ethanol- Wasser Mix $d = 15$ μm
Lan 2019 [107]	$f_{\text{Sim.}}/f_{\text{Mess.}} =$ $0.76/1.28$ THz Doppelring Paare	$f_{\text{Sim.}}/f_{\text{Mess.}} =$ $0.47/0.51$ THz/RIU Messung: BSA	Wasser $d = 5$ μm

Tab. D.2: Übersicht über den Forschungsstand von Metamaterial-basierten Biosensoren für Simulation und Messungen in flüssigen Umgebungen bei der Verwendung einer Reflexionsanordnung.

Anhang E

Multifrequenz-Untersuchung von DNA

Dieser Anhang beinhaltet Messergebnisse als Ergänzung zu der Veröffentlichung in Kapitel 6. Die Ergebnisse der Messungen sind in den Abbildungen E.1-E.7(a)-(c) jeweils für dsDNA dargestellt, für ssDNA in den Abbildungen E.1-E.7(d)-(f). Auf den Biosensor-Varianten mit einer Resonanzfrequenz von 0.3 THz stehen 15 Abfragefelder zur Verfügung, von denen jeweils drei mit 50 pmol, 25 pmol, 12.5 pmol, 2.5 pmol und DI-Wasser (Referenz) beladen wurden. Auf den Biosensor-Varianten mit einer Resonanzfrequenz von 0.6 THz und 1 THz stehen jeweils 24 Abfragefelder zur Verfügung, von denen jeweils fünf mit 30 pmol, 15 pmol, 7.5 pmol, 1.5 pmol und DI-Wasser (Referenz) beladen wurden.

Die Parameteranalyse des Resonanzfeatures in dieser Arbeit hat ergeben, dass sich die Frequenzverschiebung an dem Schnittpunkt 0.5 mit auf 0/1 normierten Messdaten im linearen Transmissionsspektrum als zuverlässigster und genauester Parameter für die Detektion von dsDNA eignet. Mit diesem Parameter können Änderungen in der Resonanzfrequenz mit dsDNA bis 7.5 pmol und ssDNA bis 15 pmol für 0.6 THz und 1 THz sicher detektiert werden, siehe Abbildung E.1. Wird hingegen die Frequenzverschiebung an der Maximumposition des DRF analysiert, wie in Abbildung E.2 gezeigt, kann ssDNA von dsDNA nicht unterschieden werden, da die Frequenzverschiebung für beide Proben in etwa gleich groß ist. Eine Unterscheidung der beiden Proben ist an der Minimumposition des DRF möglich (Abbildung E.3). Hier ist der Betrag der Frequenzverschiebung vergleichbar mit der Verschiebung am Schnittpunkt, jedoch bei deutlich größerem Fehler.

Eine weitere untersuchte Methode ist die Analyse der Verschiebung der Frequenz an der Position des DRF mit der größten negativen Steigung (Abbildung E.4) und der Änderung des Maximalwerts der Steigung (Abbildung E.5). Zur Berechnung wird der Differenzenquotient aus den Messdaten berechnet und entsprechend der beiden Merkmale ausgewertet. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Unabhängigkeit von den frequenzabhängigen Parametern des DRF und zeigt für dsDNA eine gute Übereinstimmung mit der Auswertung am Schnittpunkt 0.5. Jedoch besteht nur teilweise eine Übereinstimmung mit Ergebnissen aus der Analyse anderer Parameter für ssDNA. Gut geeignet für stark absorbierende Proben (dsDNA) bei hohen Frequenzen zeigt sich die Analyse der maximalen Steigung, hier ist bis zu einer Stoffmenge von 7.5 pmol bei 1 THz eine klare Unterscheidung zur Referenz möglich.

Diese Erkenntnisse decken sich mit den Ergebnissen der Änderung der Amplitude an der Maximumposition des DRF in Abbildung E.6 und an der Minimumposition in Abbildung E.7. Für beide Merkmale zeigt sich nur für große Stoffmengen und hohe Frequenzen eine verlässlich auswertbare Änderung in der Amplitude, wobei an der Minimumposition eine größere relative Änderung beobachtet werden kann. Insgesamt lassen große und unspezifische Änderungen in der Amplitude auf Referenzfeldern jedoch Fehlinterpretationen zu, was die Frequenzverschiebung zur priorisierten Methode macht. Die Änderung der Amplitude kann jedoch als zusätzliches Merkmal für stark absorbierende Proben angewendet werden.

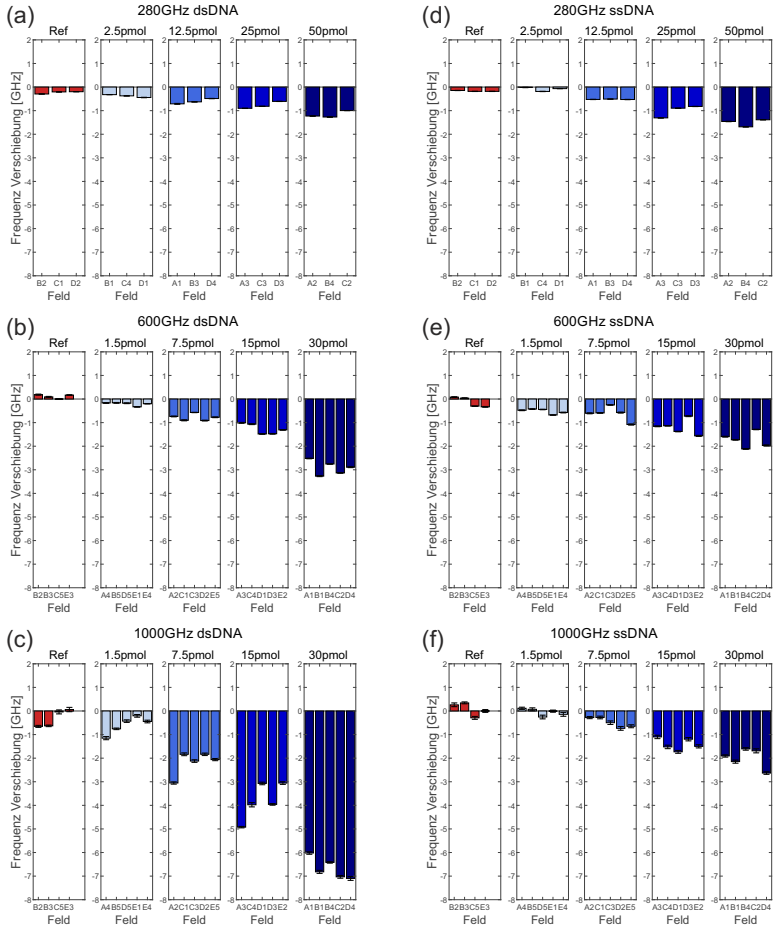


Abb. E.1: Die Verschiebung der Frequenz an dem Schnittpunkt 0.5 mit auf 0/1 normieren Messdaten des Resonanzfeatures für dsDNA (a)-(c) und ssDNA (d)-(f), jeweils mit drei Biosensor-Varianten in den Frequenzbereichen 0.3 THz, 0.6 THz und 1 THz. Auf jedem Biosensor werden die Stoffmengen 50/30 pmol, 25/15 pmol, 12.5/7.5 pmol und 2.5/1.5 pmol untersucht, die Referenzfelder sind jeweils mit DI-Wasser beladen.

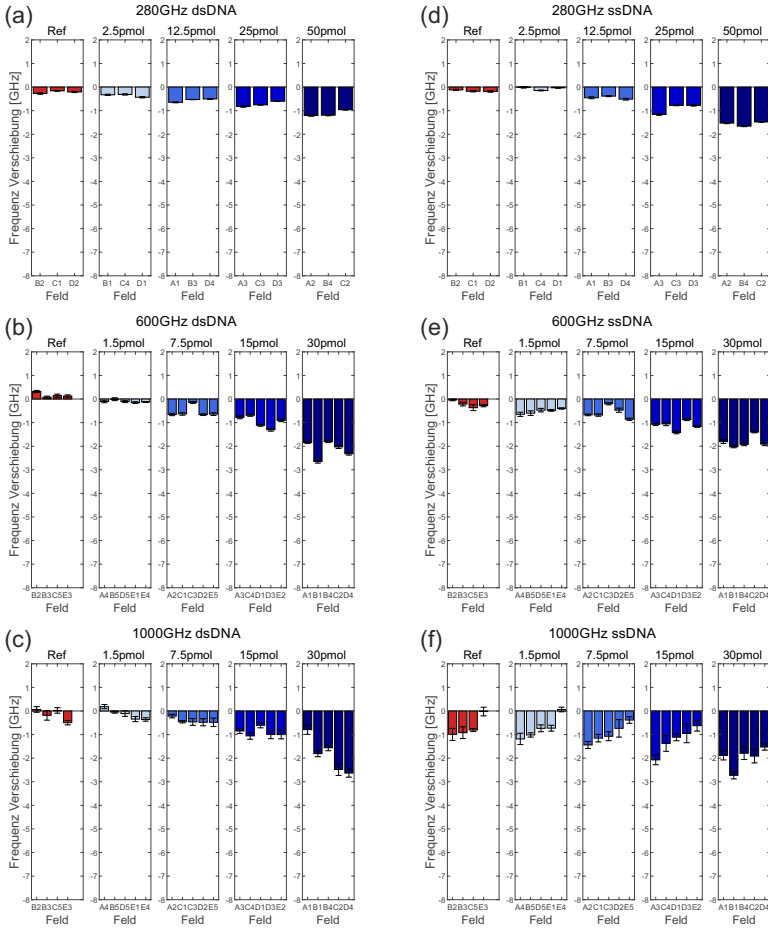


Abb. E.2: Die Verschiebung der Frequenz an der Maximumposition des Resonanzfeatures für dsDNA (a)-(c) und ssDNA (d)-(f), jeweils mit drei Biosensor-Varianten in den Frequenzbereichen 0.3 THz, 0.6 THz und 1 THz. Auf jedem Biosensor werden die die Stoffmengen 50/30 pmol, 25/15 pmol, 12.5/7.5 pmol und 2.5/1.5 pmol untersucht, die Referenzfelder sind jeweils mit DI-Wasser beladen.

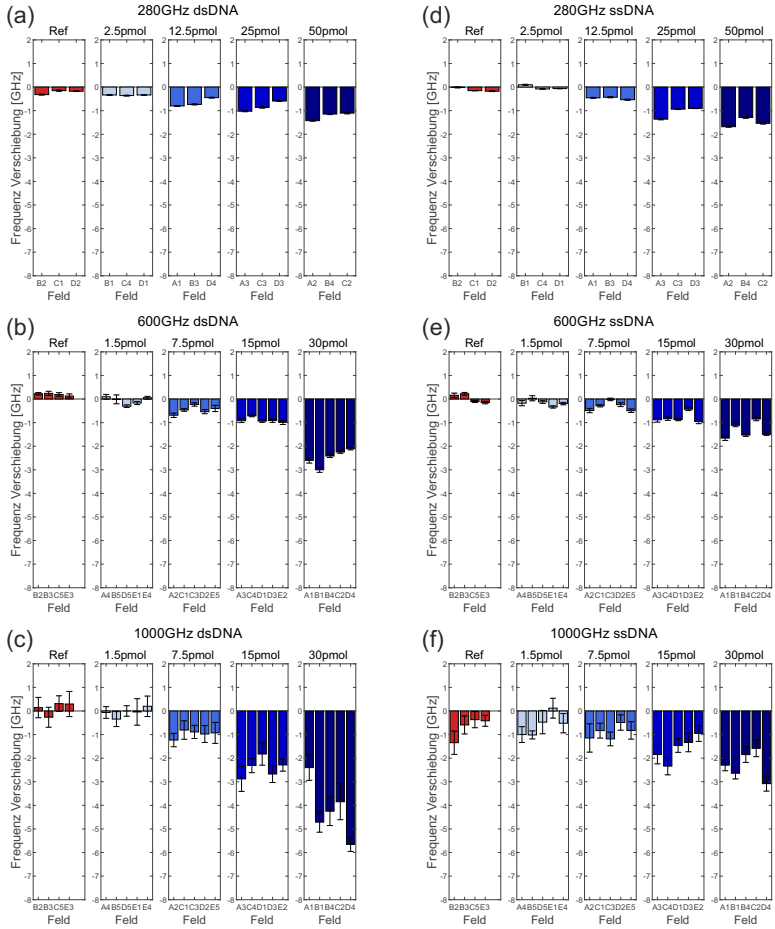


Abb. E.3: Die Verschiebung der Frequenz an der Minimumposition des Resonanzfeatures für dsDNA (a)-(c) und ssDNA (d)-(f), jeweils mit drei Biosensor-Varianten in den Frequenzbereichen 0.3 THz, 0.6 THz und 1 THz. Auf jedem Biosensor werden die die Stoffmengen die 50/30 pmol, 25/15 pmol, 12.5/7.5 pmol und 2.5/1.5 pmol untersucht, die Referenzfelder sind jeweils mit DI-Wasser beladen.

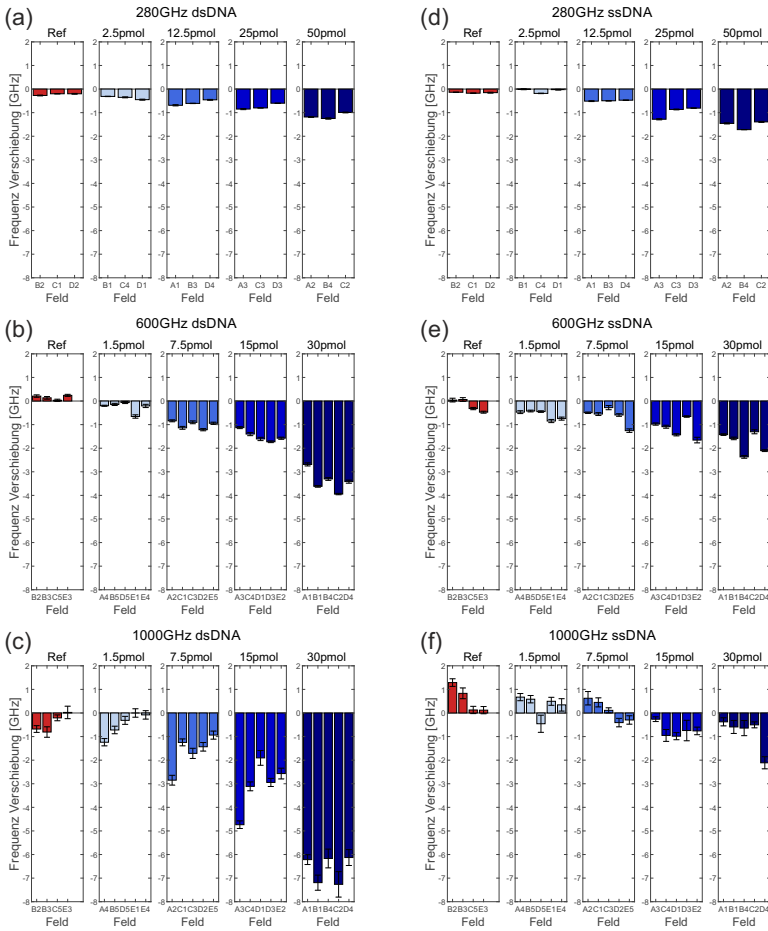


Abb. E.4: Die Verschiebung der Frequenz an der Position des Resonanzfeatures mit der größten negativen Steigung für dsDNA (a)-(c) und ssDNA (d)-(f), jeweils mit drei Biosensor-Varianten in den Frequenzbereichen 0.3 THz, 0.6 THz und 1 THz. Auf jedem Biosensor werden die Stoffmengen 50/30 pmol, 25/15 pmol, 12.5/7.5 pmol und 2.5/1.5 pmol untersucht, die Referenzfelder sind jeweils mit DI-Wasser beladen.

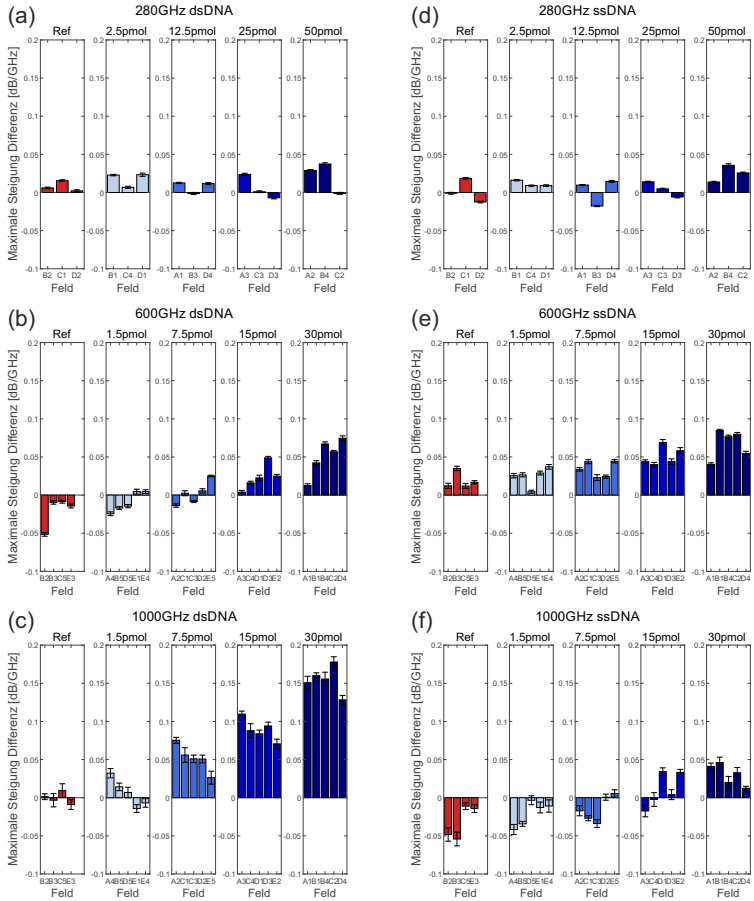


Abb. E.5: Die Änderung des Maximalwerts der Steigung des Resonanzfeatures für dsDNA (a)-(c) und ssDNA (d)-(f), jeweils mit drei Biosensor-Varianten in den Frequenzbereichen 0.3 THz, 0.6 THz und 1 THz. Da die Steigung negativ ist, bedeutet eine positive Differenz Verringerung der Steigung und eine negative Differenz eine Vergrößerung. Auf jedem Biosensor werden die die Stoffmengen 50/30 pmol, 25/15 pmol, 12.5/7.5 pmol und 2.5/1.5 pmol untersucht, die Referenzfelder sind jeweils mit DI-Wasser beladen.

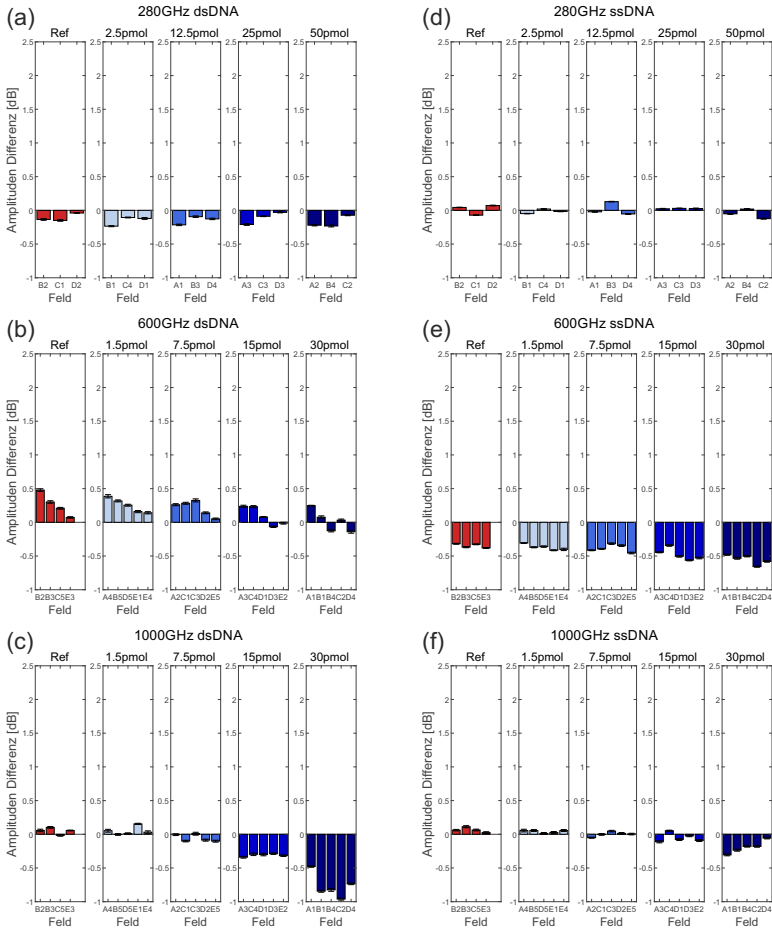


Abb. E.6: Die Änderung der Amplitude an der Maximumposition des Resonanzfeatures für dsDNA (a)-(c) und ssDNA (d)-(f), jeweils mit drei Biosensor-Varianten in den Frequenzbereichen 0.3 THz, 0.6 THz und 1 THz. Auf jedem Biosensor werden die die Stoffmengen 50/30 pmol, 25/15 pmol, 12.5/7.5 pmol und 2.5/1.5 pmol untersucht, die Referenzfelder sind jeweils mit DI-Wasser beladen.

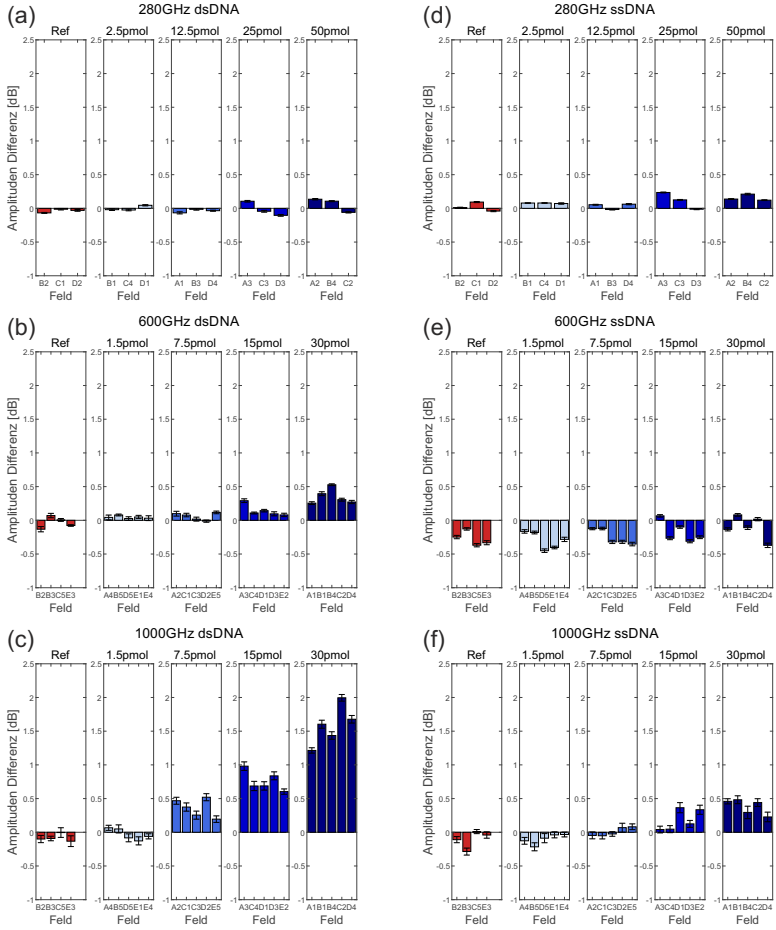


Abb. E.7: Die Änderung der Amplitude an der Minimumposition des Resonanzfeatures für dsDNA (a)-(c) und ssDNA (d)-(f), jeweils mit drei Biosensor-Varianten in den Frequenzbereichen 0.3 THz, 0.6 THz und 1 THz. Auf jedem Biosensor werden die die Stoffmengen 50/30 pmol, 25/15 pmol, 12.5/7.5 pmol und 2.5/1.5 pmol untersucht, die Referenzfelder sind jeweils mit DI-Wasser beladen.

Darstellung der Eigenleistung

In dieser Übersicht werden die für den kumulativen Anteil dieser Dissertation relevanten Publikationen und die Eigenleistung dokumentiert. Alle vier Veröffentlichungen sind vom Autor dieser Dissertation in Erstautorenschaft federführend verfasste Artikel.

Bibliographische Angabe	Eigenanteile
[33] Weisenstein, C., Schaar, D., Wigger, A.K., Schäfer-Eberwein, H., Bosserhoff, A.K. and Haring Bolívar, P., <i>Ultrasensitive THz biosensor for PCR-free cDNA detection based on frequency selective surfaces</i> , Biomedical Optics Express, 11, 448-460 (2020).	Idee: C. Weisenstein, A.K. Wigger, A.K. Bosserhoff, P. Haring Bolívar Versuchsdurchführung: H. Schäfer-Eberwein Schriftliche Ausarbeitung: C. Weisenstein, D. Schaar Visualisierungen: C. Weisenstein Datenanalyse: C. Weisenstein, H. Schäfer-Eberwein
[108] Weisenstein, C., Wigger, A.K., Richter, M., Sczech, R., Bosserhoff, A.K. and Haring Bolívar, P., <i>THz detection of biomolecules in aqueous environments —Status and perspectives for analysis under physiological conditions and clinical use</i> , Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves 42 (6), 607-646 (2021).	Idee: C. Weisenstein, A.K. Wigger, A.K. Bosserhoff, P. Haring Bolívar Versuchsdurchführung: — ¹ Schriftliche Ausarbeitung: C. Weisenstein, R. Sczech Visualisierungen: C. Weisenstein, R. Sczech Datenanalyse: C. Weisenstein, R. Sczech, M. Richter

Fortsetzung auf der nächsten Seite

¹Es handelt sich bei dieser Veröffentlichung um ein Literatur-Review, daher entfällt eine Versuchsdurchführung.

Bibliographische Angabe	Eigenanteile
[101] Weisenstein, C., Richter, M., Wigger, A.K., Bosserhoff, A.K. and Haring Bolívar, P., <i>Substrate-integrated microfluidics for sensitive biosensing with complementary THz metamaterials in water</i> , Applied Physics Letters 120 (5), 053702 (2022).	Idee: C. Weisenstein, A.K. Bosserhoff, P. Haring Bolívar Versuchsdurchführung: C. Weisenstein ² Schriftliche Ausarbeitung: C. Weisenstein, M. Richter, A.K. Wigger Visualisierungen: C. Weisenstein Datenanalyse: C. Weisenstein
[109] Weisenstein, C., Richter, M., Wigger, A.K., Bosserhoff, A.K. and Haring Bolívar, P., <i>Multifrequency investigation of single- and double-stranded DNA with scalable metamaterial-based THz biosensors</i> , Biosensors 12 (7), 483 (2022).	Idee: C. Weisenstein, A.K. Bosserhoff, P. Haring Bolívar Versuchsdurchführung: C. Weisenstein, D. Gust ³ , M. Richter Schriftliche Ausarbeitung: C. Weisenstein, A.K. Wigger, M. Richter Visualisierungen: C. Weisenstein Datenanalyse: C. Weisenstein

Tab. E.1: Darstellung der Eigenleistung für den kumulativen Teil dieser Dissertation relevanten Publikationen.

²Es handelt sich bei dieser Veröffentlichung um eine Untersuchung mithilfe von Finite-Elemente-Simulationssoftware, daher basiert die Versuchsdurchführung auf Simulationsmodellen.

³Nicht als Co-Autor aufgeführt

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr.-Ing. Peter Haring Bolívar, der mich zunächst als studentische Hilfskraft und nach meinem Masterabschluss als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Höchstfrequenztechnik und Quantenelektronik aufgenommen hat. Das entgegengebrachte Vertrauen, die Begeisterung für das Thema der Arbeit und die wertvollen Anregungen und Diskussionen der Ergebnisse haben diese Arbeit erst möglich gemacht. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Holger Schönherr danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit. Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Hartmut Roskos als drittem Mitglied der Promotionskommission und Prof. Dr. Ivo Ihrke für die Übernahme des Vorsitzes.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitgliedern des DFG geförderten Schwerpunktprogramms ESSENCE, die auf Statusmeetings und Workshops durch Diskussionen und Gespräche zu neuen Denkanstößen und Lösungsansätzen beigetragen haben. Außerdem danke ich unseren Projektpartnern von der FAU Erlangen-Nürnberg des Lehrstuhls für Biochemie und Molekulare Medizin Prof. Dr. Anja Bosserhoff und Dominik Schaar für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung von Probenmaterial. Weiterhin danke ich der Nachwuchsforschergruppe Dr. Nöll für die Bereitstellung der QCM und insbesondere Stephan Vogt für die wertvolle Unterstützung und Anregungen zu allen Themen rund um DNA-Hybridisierung und -Funktionalisierung.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen meinen Kollegen am Lehrstuhl für Höchstfrequenztechnik und Quantenelektronik für die immer sehr gute Arbeitsatmosphäre bedanken. Man konnte sich stets auf eure Hilfe verlassen, egal ob es dabei um eine Frage zum Versuchsaufbau ging oder auch um Themen außerhalb der Universität. Besonders danke ich Anna Wigger, die durch zahlreiche Anregungen, Diskussionen und Tipps wesentlich zu dieser Arbeit und den daraus entstandenen Veröffentlichungen beigetragen hat. Daniel Stock danke ich für seine Hilfe im kleinen Optiklabor bei der Realisierung des Toptica-Setups und dem Korrekturlesen dieser Arbeit. Merle Richter danke ich für die Übernahme und ihre Expertise bei allen biochemischen Fragestellungen dieser Arbeit und ihrer ruhigen Hand beim pipettieren. Meinem Bürokollegen Matthias Kahl danke ich für die entspannte Büroatmosphäre, die fachkundigen Schrauber Gespräche und dem immer rechtzeitigen Läuten der Aufzug Klingel. Bei Heike Brandt bedanke ich mich für die Unterstützung bei allen administrativen Angelegenheiten und bei Elana Pereira de Santana, Stephan Schäffer, Aya Souliman und Rainer Bornemann für die angenehme Zusammenarbeit.

Zudem möchte ich mich bei allen Ehemaligen bedanken. Allen voran Heiko Schäfer-Eberwein für die Einführung in die Thematik und anfängliche Betreuung, Tuan Anh Pham Tran für die Hilfe bei dem Aufbau und der Software des Messsetups und

Danksagung

Christoph Süßmeier. Den ehemaligen Studenten und nun neuen Kollegen Felix Thiel, Yannik Loth und Maurice Müller wünsche ich viel Erfolg bei der Umsetzung ihrer Projekte. Für die wertvolle Unterstützung bei Messungen und der Programmierung von LabVIEW-Software möchte ich mich bei meinen Studenten Christoph Radine, Natalie Raupach, Jingyun Di, Domenic Gust und Daniela Nordhoff bedanken. Paul Kienitz, Andreas Bablich und Deborah Amazu aus dem GNT-Nachbarschaftsinstitut danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meiner Frau Sarah, die meine extra Stunden für das Erstellen dieser Arbeit stets geduldig akzeptiert und die Betreuung unserer beiden Kinder übernommen hat. Außerdem möchte ich meinen Eltern und Geschwistern danken, die mich auf verschiedene Art und Weise unterstützt und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.



Christian Weisenstein wurde 1989 in Siegen geboren. Seinen Bachelor- und Master-Abschluss in Elektrotechnik erlangte er an der Universität Siegen im Jahr 2013 und 2016. Das Thema seiner Masterarbeit war die Simulation eines 3D MIMO THz-Bildgebungssystems. Bis 2021 war er als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Höchstfrequenztechnik und Quantenelektronik (HQE) an der Universität Siegen beschäftigt. Innerhalb eines DFG geförderten Projekts arbeitete er an der Entwicklung eines THz-Biosensors für den Nachweis von DNA-Proben für Anwendungen in der Tumoranalyse und schloss diese Arbeit 2023 mit seiner Dissertation ab.

Aufgrund der Existenz biomolekularer Resonanzen im Terahertz-Frequenzbereich besteht seit den 2000er Jahren ein großes Interesse an der Untersuchung von Biomolekülen mittels THz-Technologien. Durch den Einsatz von feldverstärkenden Strukturen wie Metamaterialien kann deren Empfindlichkeit erheblich gesteigert werden, sodass THz-Biosensoren das Potential besitzen in physiologisch relevante Konzentrationsbereiche vorzudringen und diese damit zu vielversprechenden Kandidaten für die Entwicklung neuer Testverfahren macht.

In dieser Arbeit wird ein THz-Biosensor auf Basis von Metamaterialien in Form von komplementären Schlitz-Ringresonatoren vorgestellt, der für die Erkennung von DNA-Proben eingesetzt werden kann, insbesondere mit möglichen Anwendungen in der Tumoranalyse. Der entwickelte THz-Biosensor ermöglicht die markierungsfreie und schnelle Erkennung von komplementären DNA-Proben mit sehr hoher Empfindlichkeit. So wurden experimentell DNA-Proben nachgewiesen, welche aus der menschlichen Melanom-Zelllinie MIA gewonnen wurden, jedoch ohne eine in der Regel erforderliche Vervielfältigung der DNA durchzuführen. Durch weiterführende Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die Verschiebung der Resonanzfrequenz für einzel- und doppelsträngige DNA unterscheidet und zudem von der Resonanzfrequenz des Sensors abhängig ist. Durch die umfassende Analyse von Simulationsmodellen kann gezeigt werden, dass durch die Einführung einer in das Substrat-integrierten mikrofluidischen Struktur der THz-Biosensor so erweitert werden kann, sodass Messungen in stark absorbierenden Flüssigkeiten wie Wasser ermöglicht werden. Damit ergibt sich für zukünftige Entwicklungen die Möglichkeit, komplexe Biomoleküle wie Proteine mit hoher Empfindlichkeit unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen und eröffnet so neue Einsatzmöglichkeiten für THz-Biosensoren.