

Universität Bielefeld
Fakultät für Physik
Etage D1
Biophysik und angewandte Nanowissenschaften

**UV-induzierte Polymerisation von Lipiden
auf dem Langmuir-Blodgett Trog
und deren Transfer**

Bachelorarbeit

**Zur Erlangung des Grades
Bachelor of Science**

Marius Dotter

marius.dotter@uni-bielefeld.de

It's a Date ?

1. Gutachter: Roland Hillmann
 2. Gutachter: Prof. Dr. Dario Anselmetti
- Betreuer:
Roland Hillmann

Selbstständigkeitserklärung

Der Verfasser erklärt, dass er die vorliegende Bachelorarbeit selbständig, ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt hat. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche gekennzeichnet. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht vorgelegt worden.

Bielefeld,

Danksagungen

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Einleitung und Motivation	3
3	Theorie	5
3.1	Lipide	5
3.2	Kräfte an Grenzflächen	7
3.3	Der Langmuir-Blodgett Trog	8
3.4	Langmuir-Blodgett und Langmuir-Schäfer Transfer	9
4	Methoden / Präparation	11
4.1	Präparation des Trogs	11
4.2	Quervernetzung von Lipiden durch UV-Absorption	11
4.3	Abhängigkeiten der Vernetzung	12
4.4	Vernetzung und Übertrag von Lipiden	14
4.5	Probenherstellung für die Raman-Spektroskopie	15
4.6	Silicium-Chips	16
4.7	TEM-Netz mit Folie	16
4.8	Hydrophilisierung von Deckgläsern	17
4.9	Hydrophilisierung von Chips	17
5	Ergebnisse und Diskussion	19
5.1	Messungen zu Materialien und Aufbau	19
5.1.1	Isotherme vermessener Lipide	19
5.1.2	Absorptionsspektrum von PTPE	22
5.1.3	Charakteristika der UV-Lampen	23
5.1.4	Charakteristika des Silicium-Chips	24
5.2	Messungen zu Lipidlayern	25
5.2.1	Vernetzung auf dem Langmuir-Blodgett-Trog	25
5.2.2	Fluoreszenz-Untersuchung eines Transfers	25
5.2.3	AFM-Untersuchung eines Transfers	26
5.2.4	HIM	28
5.2.5	Raman-Spektroskopie	30
6	Zusammenfassung und Ausblick	33
6.1	Zusammenfassung	33
6.2	Ausblick	34
6.2.1	Veränderungen am Langmuir-Trog	34
6.2.2	Weitere Messungen zu Lipidlayern	35

Abbildungsverzeichnis

3.1	Strukturformeln der genutzten Lipide: 1) Behensäure ([8]), 2) <i>cis</i> -Ölsäure ([8]), 3) Stearinsäure ([8]), 4) DPPC ([9]), 5) PTPE ([2]), 6) diy-PC ([2]). Das Lipid PTPC unterscheidet sich von PTPE nur hinsichtlich seiner Kopfgruppe	6
3.2	Beispiel einer Isotherme mit Bereich der Koexistenz	6
3.3	links: Langmuir-Blodgett Trog der Firma Nima Technology; rechts: schematischer Aufbau des Trogs mit Subphase und Lipidschicht	8
3.4	Schema eines Wilhelmy-Plättchens mit den zur Bestimmung der Kraft relevanten Größen	9
3.5	links: Langmuir-Blodgett Transfer von Lipiden auf ein Substrat beim Eintauchen, analog dem X-Typ; rechts: Langmuir-Blodgett Transfer von Lipiden auf ein Substrat beim Herausziehen, analog dem Z-Typ.	10
3.6	Langmuir-Schäfer Transfer mit Annäherung von oben: Das Substrat nähert sich der Monolage, die Kopfgruppen binden an das Substrat und werden beim Hochgehen mitgenommen.	10
4.1	(a) Schema einer Quervernetzung bei zwei benachbarten Diacetylene-Gruppen ([4]); (b) Schema einer quervernetzten Lipidschicht. Die Lipide haben hier keine Schrägstellung, auch wenn dies möglich ist.	11
4.2	(a) Vorgang der Ersetzung der Lipide ([3]); (b) Fluoreszenz Erholung nach Photobleaching an verschiedenen Orten in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosen ([3]).	13
4.3	Fluoreszenzmessungen bei 28 °C und 16 °C nach vollständiger Präparation. Die Größenskala entspricht 20 µm ([4]).	13
4.4	AFM-Messungen bei 28 °C und 16 °C mit verschiedenen Größenauflösungen nach vollständiger Präparation ([4]).	14
4.5	(a) Schematischer Aufbau eines Mikroporeenchips; (b) Mikroporeenchip in einer Halterung für das AFM; (c) Lichtmikroskop-Aufnahme des Chipfensters mit 100-facher Vergrößerung. Mittig ist die etwa 7 µm große Pore zu sehen.	16
4.6	HIM Aufnahme eines Gold TEM-Netzes, überspannt mit Kohlenstoffolie. Rechts ist die HIM-Halterung zu sehen. Auf Grund der zu geringen Auflösung ist nicht erkennbar ob eine Pore überspannt ist oder nicht.	16
5.1	Typische Isotherme der vermessenen Lipide. Alle Isotherme wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. Die aufgespreiteten Mengen betragen: Stearinsäure 25 µl, Behensäure 25 µl, Ölsäure 17 µl und DPPC 30 µl.	20
5.2	Typische Isotherme der vernetzbaren Lipide. Alle Isotherme wurden bei etwa 19 °C aufgenommen. Für PTPE wurde die Trogfläche zusätzlich noch auf die Fläche pro Lipidmolekül zurückgerechnet. Die aufgespreiteten Mengen betragen: diy-PC 40 µl, PTPC 15 µl und PTPE 17 µl.	21

5.3	Isotherme von diy-PC für verschiedene Temperaturen. Bei (a) liegt hierbei eine Temperatur unter und bei Messung (b) eine Temperatur oberhalb der Tripelpunkttemperatur von diy-PC vor.	21
5.4	Absorption von PTPE im Bereich von 210 nm bis 280 nm.	22
5.5	Spektrum der beiden genutzten Lampen. Die Skala der Intensität hat hierbei keine genauere Bedeutung und dient nur zur Vergleichbarkeit der Graphen der großen Quecksilberdampfampe (a) und der kleinen (b).	23
5.6	(a) Vorher genutzte, größere Lampe; (b) Mittlerweile genutzte, kleinere Lampe	24
5.7	Vernetzung von PTPE (a) alte Quecksilberdampfampe; (b) neue UV-Lampe. Die Vernetzung mit der kleinen Lampe erfolgt schneller	25
5.8	Fluoreszenzmessung; Kante Glassubstrat mit übertragenem Lipid und Farbstoff	26
5.9	AFM-Aufnahmen von (a) Deckglas; (b) Deckglas mit Lipidmonolage; (c) Deckglas mit vernetzter Lipidmonolage.	26
5.10	Höhenprofil, gelegt von links oben nach rechts unten, von (a) Deckglas; (b) Deckglas mit Lipidmonolage	27
5.11	HIM-Aufnahmen eines Gold TEM-Netzes von (a) einer Masche mit mehreren überspannten Poren; (b) einer Nahaufnahme mit überspannter Pore; (c) einer Nahaufnahme mit gewollt zerstörter Membran.	28
5.12	Ausschnitt eines Kupfer TEM-Netzes. Der größte Teil der Poren wurde hier von der Lipidmembran überspannt. Die Stabilität der überspannenden Membran war dabei ähnlich zu den Messungen des Gold TEM-Netzes. Die Präparation wurde durchgeführt von Roland Hillmann	29
5.13	DOPE mit Rhodamin, Konzentration $2 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$. Messungen an den Begrenzungen. 30	
5.14	PTPE aufgetragen auf ein Substrat mit PDMS-Maske, Konzentration $0,1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ jeweils 4 Tropfen mit 2,5 μl . (a) Messung an oberer Begrenzung; (b) Messung mittig.	31

1 Abkürzungen

Im folgenden werden einige Abkürzungen für Stoffe, Fachwörter und Verfahren definiert, welche im Verlauf der Arbeit genutzt werden.

AFM	Atomic Force Microscope
PTPE	1-palmitoyl-2-10,12-tricosadiynoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
PTPC	1-palmitoyl-2-10,12-tricosadiynoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
diy-PC	1,2-bis(tricosa-10,12-diynoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
HIM	Helium-Ionen-Mikroskop
UV	Ultraviolett (gemeint 200 bis 400 nm)
LB	Langmuir-Blodgett
LS	Langmuir-Schäfer
TEM	Transmissionselektronenmikroskop

2 Einleitung und Motivation

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf den in der Natur vielfältig vorkommenden Lipidmembranen. Durch ihre Eigenschaft, Materie von der Umgebung trennen zu können, ermöglichen sie eine Vielfalt an Leben. Als Abtrennung der Zellen haben sie auch biochemische Aufgaben, da sie für bestimmte Stoffe durchlässig und andere undurchlässig agieren. Dabei bilden die Lipide 4-5 nm dicke Doppelschichten, welche sehr stabil sind und auch Potentialdifferenzen von bis zu $10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ aushalten können. Diese Eigenschaften und ihre Notwendigkeit für die Entstehung von Leben machen Lipidmembranen zu einem wichtigen Thema der physikalischen, biologischen und biochemischen Forschung. Außerdem können sie als natürliche 2-dimensionale Muster für entropische und enthalpische Systeme dienen. In der Membranforschung wird weiterhin der Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion der Lipidmembranen untersucht. Der Mix aus Eigenschaften wie hoher Festigkeit und außergewöhnlicher Biegeelastizität aber gleichzeitiger gezielter Reaktivität mit bestimmten Stoffen und Durchlässigkeit dieser macht diese besonders. Gerade letzteres macht diese Strukturen aus geordneten Lipiden auch für die Medizintechnik zu einem attraktiven Werkstoff für Biosensoren. (Abschnitt aus [1])

Die Motivation dieser eher technisch, präparativ orientierten Arbeit soll, ähnlich dem Vorgehen von D.Shenoy et al. ([2]) und Morigaki et al. ([3], [4]), das Vernetzen von Lipiden durch UV Strahlung sein. Die so entstehenden stabilen Lipidmembranen sollen auf Mikroporen enthaltende Substrate übertragen werden, wobei die Pore von der Membran überspannt wird. Diese können dann, nach weiteren Schritten, zur Lokalisation von SS-DNA dienen. Wichtigste Neuerung für dieses Verfahren ist hier die Vernetzung (Polymerisierung) der Lipide während sie eng zusammengepackt auf einem Langmuir-Blodgett Trog sind. Hierdurch verbinden die Lipide sich untereinander und geben der Lipidmembran ein großes Maß an Stabilität. Bei früheren Verfahren musste das Überspannen der Pore unter Wasser erfolgen und sobald eine Membran entstand musste die Probe durchgehend in Flüssigkeit bleiben, da die Membran sonst nicht stabilisiert wäre. Vor allem der Einbau in die Messvorrichtung (die Flusszelle) zeigte sich als sehr schwierig und als nicht immer erfolgreich. Außerdem musste ein präparierter Chip direkt genutzt werden, da keine längere Lagerung möglich war. Durch das Quervernetzen der Lipidmembran sollen diese Probleme gelöst werden. Nach dem Überspannen der Pore soll die Membran auch an Luft intakt sein und, bei passender Lagerung, eine längere Zeit stabil bleiben. Des Weiteren muss der Einbau anschließend nicht mehr in flüssiger Umgebung stattfinden, welches einen Teil der schwierigen Präparation erübrigen würde.

Fernziel der so hergestellten stabilen Lipidmembranen soll die Lokalisation von SS-DNA sein. Bei dieser Prozedur muss zuerst eine Nanopore in die Membran eingebracht werden. Dies geschieht zum Beispiel durch Zugabe von α -Hemolysin. Anschließend wird der Chip als Trennung zwischen zwei Flüssigkeitsreservoirs gebracht, wobei die Nanopore als einzige Verbindung dieser beiden dient. Durch ein Potential kann ein Fluss zwischen diesen beiden Reservoirs erzeugt werden, welcher einen messbaren Widerstand durch die Nanopore erfährt. Des Weiteren wird eine SS-DNA Probe an ein Kügelchen gebunden und das Kügelchen fixiert (Einfangen mittels Optischer Pinzette). Wird die DNA nun nahe an

die Nanopore gebracht, kann diese durch den herrschenden Fluss in die Pore gezogen werden, wobei sie einen Teil der Öffnung verstopft. Da somit die Fläche der Durchfluss-Öffnung sinkt steigt der Widerstand an. Dank Fixierung an einem Kügelchen kann die SS-DNA bewegt werden, sodass sich verschiedene Abschnitte gerade in der Nanopore befinden. Je nach Aufbau des Abschnitts der DNA kann sich die Widerstandserhöhung ändern. Kann man nun bestimmten Bestandteilen eine Widerstandserhöhung zuordnen kann durch das langsame Durchfädeln (Lokalisation) der DNA ihre Struktur aufgelöst werden.

3 Theorie

3.1 Lipide

Lipide bilden, neben den Proteinen, die lebenswichtigen, vielseitigen Biomembranen (meist Phospholipide). Sie sind amphiphile (altgr., frei: auf beiden Seiten liebend") Moleküle und liegen in großer Vielfalt vor. Charakteristisch bei allen Phospholipiden ist die namensgebende Phosphatgruppe. Ein mehrwertiger Alkohol bildet dabei die Basis (zum Beispiel Glycerin). Weiter bestehen diese auf der einen Seite aus der Kopfgruppe und auf der anderen Seite aus der Schwanzgruppe.

Die Kopfgruppe ist hierbei polar und hydrophil (altgr. "wasserliebend"). Sie besteht aus einem Phosphatrest und kann zum Beispiel mit einem stickstoffhaltigen Alkohol verestert sein. Diese ist immer polar, während im Gesamtmolekül nur eine Ladungstrennung oder aber eine Nettoladung vorliegen kann. Die Schwanzgruppe wird meist durch 2 Fettsäuren gestellt, welche hydrophob und lipophil (altgr. fettliebend") sind. Es handelt sich hierbei um Kohlenstoffwasserketten, wobei die Bindungen zwischen diesen im Bereich von Einfach- bis Dreifachbindung variieren können. Folgt auf eine Dreifachbindung eine Einzel- und anschließend wieder eine Dreifachbindung wird dieser Komplex als Diacetylene-Gruppe beschrieben ([2]). Die Fettsäuren sind dabei parallel ausgerichtet und stehen an einer Grenzfläche senkrecht zu dieser ([5]). Im weiteren Verlauf der Arbeit werden mit dem Wort Lipide eben nur noch diese gemeint, welche amphiphile Eigenschaften aufweisen und sich zur Herstellung von Langmuir Filmen eignen.

Auf Grund ihrer strukturellen Eigenschaften richten sich Lipide an bestimmten Grenzflächen, zum Beispiel Wasser / Luft, automatisch aus. Generell befindet sich die Kopfgruppe zum Wasser hin gerichtet, welches ebenfalls polar ist, und der Rest des Moleküls ragt aus dem Wasser heraus, so dass ein 2-dimensionales System vorliegt. Grund hierfür ist eine Optimierung der Oberflächenenergie, da diese gerichtete Anordnung zu einer Verringerung der Oberflächenenergie führt ([6]). Hierbei dominiert für die hydrophilen Gruppen die Coulomb Wechselwirkung (Reichweite $1/r^2$) und für die hydrophoben Kohlenstoffketten die van der Waals Wechselwirkung (Reichweite $1/r^{12}$ und $1/r^6$). Diese verschiedenen Bindungen eines Moleküls sind ebenfalls eine Begründung für dessen Ausrichtung an der Grenzfläche. ([7]) Der Zustand dieser Monoschicht an der Grenzfläche ist über den Platz, den ein jedes Lipid einnehmen kann, charakterisierbar (analog zu Aggregatzuständen). Eine Oberflächenspannung - Flächen - Kurve, welche diese Zustände darstellt, wird analog als Isotherme bezeichnet.

Existiert auf Grund des Abstandes der Lipide zueinander keine Wechselwirkung, so spricht man von der gasanalogen Phase (2-dimensionales Gas). Hierbei kann das Verhalten der Moleküle durch die Gleichung $P * A = k_B * T$ beschrieben werden, mit P für die Oberflächenspannung, der Fläche A, k_B der Boltzmann-Konstante und der Temperatur T. Eine Verringerung der Grenzfläche, oder eine Erhöhung der Lipidanzahl, lässt diese in die flüssiganaloge Phase (2-dimensionale Flüssigkeit) übergehen. Dabei herrscht schon eine Nahordnung unter den Lipiden. Bei einer weiteren Verkleinerung der Fläche pro Lipid geht die Schicht in die festanaloge Phase über.

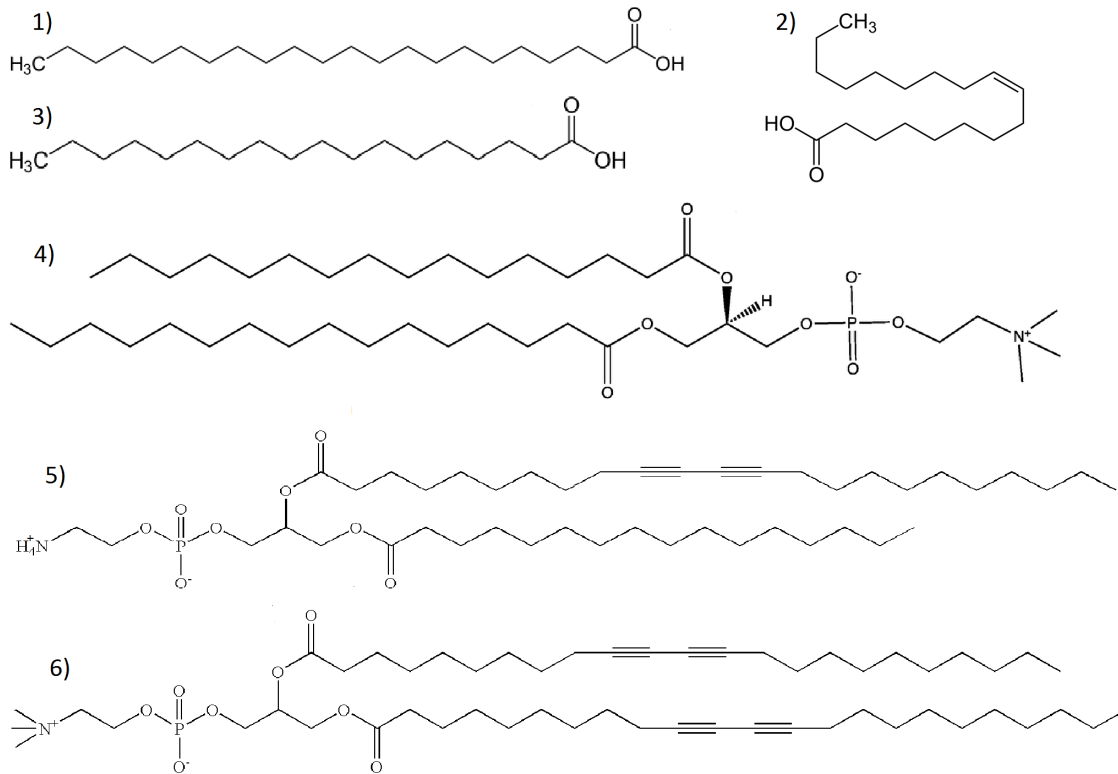


Abbildung 3.1: Strukturformeln der genutzten Lipide: 1) Behensäure ([8]), 2) *cis*-Ölsäure ([8]), 3) Stearinsäure ([8]), 4) DPPC ([9]), 5) PTPE ([2]), 6) diy-PC ([2]). Das Lipid PTPC unterscheidet sich von PTPE nur hinsichtlich seiner Kopfgruppe

Idealisiert sind in diesem Zustand die Lipide, so wie die Atome in einem Festkörper, starr angeordnet und können sich nicht mehr entlang der Grenzfläche bewegen. Das Verhältnis der Oberflächenspannung und der Fläche pro Molekül ist hier annähernd vertikal linear ([7]). Unter bestimmten Bedingungen (Temperatur, Struktur des Lipids) existiert zwischen der flüssig-analogen und fest-analogen Phase ein Bereich der Koexistenz. Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass eine Flächenverminderung einen nur schwachen Druckanstieg hervorruft, eventuell auch ein lokales Maximum in dem Graphen entsteht (Abb. 3.2).

Steigt der Druck auf eine Lipidmonolage, welche bereits in der fest-analogen Phase ist, weiter an, so gibt es einen bestimmten Druck an dem die Schicht zerstört wird. Dieser wird Kollapsdruck genannt. Hierbei ist die Spannung auf die Lipide so groß, dass diese nach unten oder nach oben ausweichen. Die Schicht besitzt dann zu große Spannungen, da

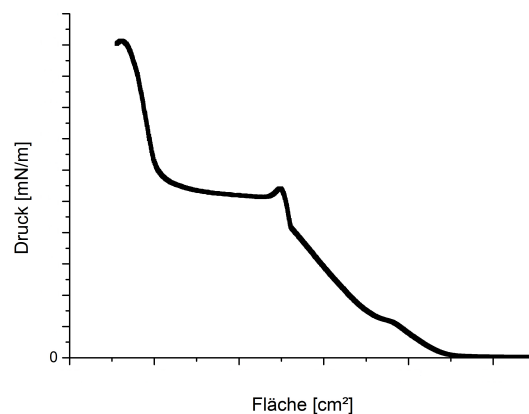


Abbildung 3.2: Beispiel einer Isotherme mit Bereich der Koexistenz

die Fläche, die ein Lipid einnehmen kann, zu gering wird. Hierbei können sich die Lipide nach oben schieben und bergige Strukturen oder eine zweite Lipidlage auf der Monolage bilden. Weichen die Lipide bei einem Kollaps nach unten aus, so ist eine Selbstaggregation möglich, wobei Mizellen und andere Strukturen geformt werden ([6]). Der weitere Verlauf nach einem Kollaps ist dabei Lipidabhängig. Es ist möglich, dass die verbleibende Monolage wieder ein Verhalten der festanalogen Phase aufweist, jedoch ist es auch möglich dass die Schicht zerstört ist und eine weitere Flächenverminderung zu weiterem Druckabfall führt.

3.2 Kräfte an Grenzflächen

Dieses Kapitel orientiert sich an Quelle [5].

Wechselwirkungen zwischen zwei oder mehreren Komponenten, seien es Teilchen, Atome, Moleküle oder Sonstiges, treten ab bestimmten Entfernungen dieser untereinander stets auf. Da zwischen den nächsten Nachbarn generell die größte Wechselwirkung herrscht, ist die resultierende Kraft für homogene Körper anders als bei der Betrachtung einer Grenzfläche zweier Phasen.

Für das Innere einer Flüssigkeit gilt prinzipiell, dass sich die Moleküle in einer homogenen, isotropen Phase befinden. Jedes Molekül wechselwirkt auf bestimmter Entfernung mit den es umgebenden Molekülen, wobei diese untereinander austauschbar sind, da von jedem die selbe Wirkung ausgeht. Sind die Abmessungen der homogenen Umgebung nun groß im Vergleich zu der Reichweite der Wechselwirkung kann angenommen werden, dass sich die Wechselwirkung der relevanten Nachbarn für jedes Molekül wegmittelt. Daher ist es energetisch egal, wo sich das Molekül in der Flüssigkeit befindet. Deutlich anders ist dieses an Grenzflächen zweier unterschiedlicher Phasen (zum Beispiel Wasser - Luft). Die Wechselwirkung eines Wassermoleküls mit anderen Wassermolekülen unterscheidet sich stark von jener mit Luftmolekülen. Es wirken also verschiedene Kräfte und die Energie eines äußeren Wassermoleküls ist höher als derer im homogenen Inneren. Ein genereller, auch aus Film und Fernsehen bekannter, Effekt ist der kugelförmige Wassertropfen, da diese Form die kleinstmögliche Oberfläche besitzt und somit die Anzahl an höher energetischer Grenzfläche reduziert. Da folglich eine größere Grenzfläche mehr Moleküle benötigt, die aus dem Inneren nach Außen wandern, steigt das gesamte Energieniveau. Es muss dem System also Energie zugeführt werden, um diese Änderung durchzuführen. Diese kann als spezifische Oberflächenenergie beschrieben werden und gibt an, wie viel Energie nötig ist, um die Oberfläche einer flüssigen Phase um $1m^2$ gegen Vakuum oder Luft zu erhöhen. Angegeben wird dieser Wert in $\frac{J}{m^2}$, wobei es hier gängiger ist, dieses in $\frac{N}{m}$ anzugeben und als Oberflächenspannung zu bezeichnen.

Für viele Systeme ist die Beeinflussung durch die Wasser - Luft - Wechselwirkung an der Grenzfläche vernachlässigbar. Häufig gibt es Phasengrenzen zweier Komponenten, welche deutlich stärker aufeinander wirken. Im speziellen Falle ist damit die Lipidmonolage gemeint, welche sich an der Wasser - Luft - Grenzschicht automatisch ausrichtet. Diese Grenzflächenspannung ergibt sich dann aus der Differenz der Oberflächenspannungen beider Phasenbestandteile.

3.3 Der Langmuir-Blodgett Trog

Bei dem hier genutzten Trog handelt es sich um den Type 611 der Firma Nima Technology. Kernstück des gesamten Trogs ist die aus Polytetrafluoroethylen (PTFE) bestehende Trogwanne. Die Nutzung von PTFE als Material ist mittlerweile der Standard für alle Langmuir-Blodgett Tröge. PTFE ist von allen bekannten Polymeren das chemisch Inerteste, welches die Möglichkeit einer gründlichsten Reinigung ermöglicht. Weiterhin hat PTFE eine sehr geringe Oberflächenspannung und die Haft- und Gleitreibung sind gleich groß, wodurch ein ruckfreies Anfahren der Barriere ermöglicht wird. Die Barriere, welche zur Änderung der nutzbaren Trogfläche dient, besteht ebenfalls aus PTFE und kann durch eine zugehörige Software gesteuert werden. Die Bestimmung und Anzeige der Oberflächenspannung erfolgt ebenfalls durch die Software. Die Software ermöglicht außerdem ein Aufnehmen der Isotherme und anderer Graphen direkt während des jeweiligen Vorganges. Für die Durchführung von Überträgen der Lipidschichten auf Substrate ist eine Dipautomatik vorhanden, wobei Anfangsrichtung und die Geschwindigkeit einstellbar sind. Es sind verschiedene Methoden des Übertrags möglich. Des weiteren existieren Anschlüsse für den unter der Trogwanne verlaufenden Kühlkreislauf und ein Schutzdeckel, damit die Wanne vor Staub geschützt wird. Um eine Vernetzung durchzuführen ist weiterhin eine UV-Lampe vorhanden, welche mittels Aufsatz über der Trogwanne platziert werden kann.

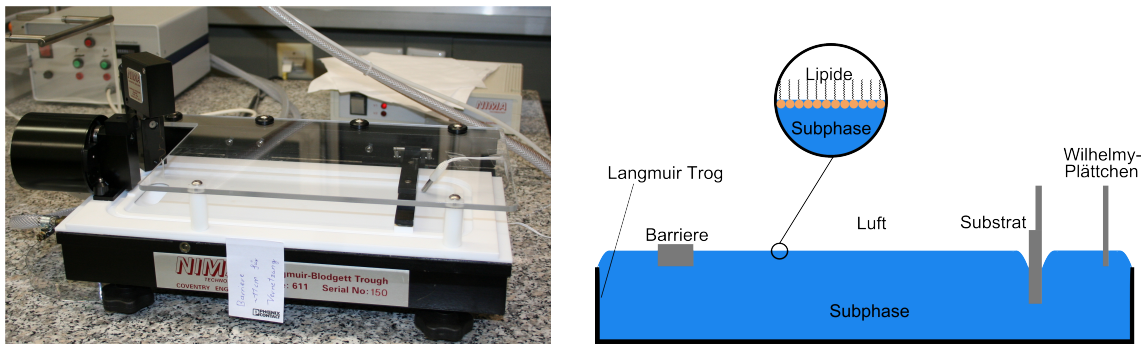


Abbildung 3.3: links: Langmuir-Blodgett Trog der Firma Nima Technology; rechts: schematischer Aufbau des Trogs mit Subphase und Lipidschicht

Um bei der Aufnahme von Messkurven für verschiedene Methoden die Oberflächenspannung der Lipidschicht zu bestimmen, wird die Wilhelmy-Plättchen-Methode verwendet (Abb. 3.4). Mit dieser ist eine Bestimmung der Oberflächenspannung möglich. Als Plättchen dient ein kleines Papierstück, da dieses am besten für die Messung geeignet ist.

Gemessen wird mit dieser Methode tatsächlich die Kraft auf das Plättchen, welche sich aus drei Komponenten zusammensetzt. Zum einen das Gewicht des Plättchens, abhängig von seinen Maßen, der Auftrieb des Plättchens in der Subphase und die auf das Plättchen wirkende Oberflächenspannung in der Subphase. Hierbei sind Gewicht und Oberflächenspannung positiv und der Auftrieb negativ zu nehmen, gemäß ihrer Kraftwirkung auf die das Plättchen haltende Feder:

$$Kraft = Gewicht + Oberflächenspannung - Auftrieb). \quad (3.1)$$

Hieraus ergibt sich die Formel für die Kraft:

$$F = (\rho_P l b h) * g + 2 * (b + h) * (OS) * ((\cos(\alpha)) - (\rho_L h b h) * g. \quad (3.2)$$

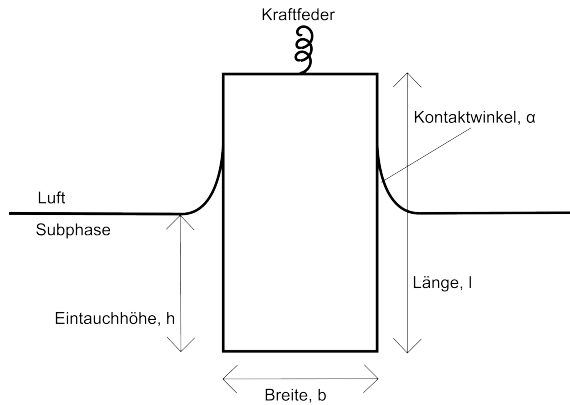


Abbildung 3.4: Schema eines Wilhelmy-Plättchens mit den zur Bestimmung der Kraft relevanten Größen

,wobei F die gemessene Kraft, ρ_P die Dichte, l die Länge, b die Breite und h die Eintauchtiefe des Plättchens sind. Weiter ist OS die Oberflächenspannung der Flüssigkeit, α der Kontaktwinkel, ρ_L die Dichte der Flüssigkeit und g die Gravitationskonstante. Durch ein Nullen der Kontrolleinheit ist der Gewichtsterm in obiger Gleichung eliminierbar und es verbleibt:

$$F = 2 * (b + h) * (OS) * ((\cos(\alpha)) - (\rho_L h b) * g. \quad (3.3)$$

Für den Fall einer absoluten Messung, bei der das untere Ende des Plättchens auf Höhe der Subphasenoberfläche ist, fällt der Term für den Auftrieb weg und es verbleibt lediglich

$$F = 2 * (b + h) * (OS) * ((\cos(\alpha)). \quad (3.4)$$

Da es sich bei dem Plättchen um Papier handelt, zieht sich dieses mit Flüssigkeit voll. Hierdurch ist es möglich, den Kontaktwinkel auf 0° zu reduzieren und die Formel vereinfacht sich zu:

$$F = 2 * (b + h) * (OS). \quad (3.5)$$

Da die Kraft gemessen wird und $2 * (b + h) = u$ der Umfang ist, kann hieraus eine Bestimmung der Oberflächenspannung erfolgen:

$$OS = F / \text{Umfang}. \quad (3.6)$$

Die Einheit der Oberflächenspannung ergibt sich nach der Kraft in mN und dem Umfang in m zu $\frac{mN}{m}$. (Herleitung aus [7])

3.4 Langmuir-Blodgett und Langmuir-Schäfer Transfer

Unter Langmuir-Blodgett und Langmuir-Schäfer Transfer versteht man die Methoden, mit der ein Übertrag einer Lipidmonolage auf ein Substrat geschieht. Die Wahl der Transfermethode hängt dabei von den Eigenschaften des Substrates (hydrophil oder hydrophob) und der Anzahl der gewünschten übereinanderliegenden Monolagen ab.

Bei einem LB Transfer wird das Substrat vertikal zur Trogoberfläche bewegt. Ob das Substrat zuerst in den Trog hinein oder aus den Trog heraus bewegt wird ist abhängig von den Eigenschaften des Materials. Je nachdem, wann ein Transfer (im Optimalfall immer

mit einem Verhältnis von 1 : 1 Substratfläche : Lipidfläche) auf das Substrat stattfindet, kann zwischen drei Transferarten unterschieden werden:

X-Typ: Es findet nur ein Transfer beim Eintauchen statt. Hierbei wäre das Substrat hydrophob, so dass die Kohlenstoffketten binden können.

Y-Typ: Es findet sowohl beim Eintauchen als auch beim Herausheben ein Übertrag auf das Substrat statt.

Z-Typ: Der Transfer findet nur beim Austauchen statt. Dies ist nur bei einem hydrophilen Substrat möglich, da die Kopfgruppen mit dem Substrat binden.

([7])

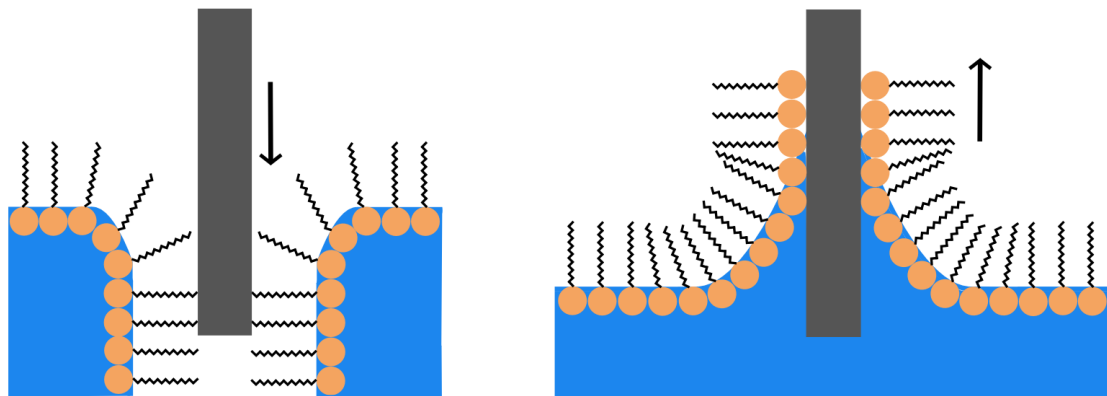


Abbildung 3.5: links: Langmuir-Blodgett Transfer von Lipiden auf ein Substrat beim Eintauchen, analog dem X-Typ; rechts: Langmuir-Blodgett Transfer von Lipiden auf ein Substrat beim Herausziehen, analog dem Z-Typ.

Unter einem LS Transfer versteht man einen Übertrag, bei dem das Substrat horizontal zu der Lipidschicht bewegt wird. Wird das Substrat von oben auf die Monolage gedrückt, kommt dieses generell nicht mit der Subphase in Berührung. Um einen Lipidtransfer zu erhalten, muss das Substrat hydrophob sein. Des Weiteren kann das Substrat auch horizontal aus der Subphase herausbewegt werden und so die Lipide aus der Grenzfläche herausheben. Mit dem Langmuir-Schäfer Transfer ist auf diese Weisen ebenfalls ein Transfer von Lipidmono- oder Multilagen auf das Substrat möglich. ([10])

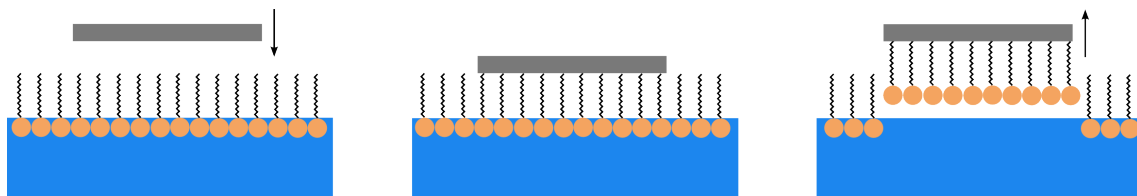


Abbildung 3.6: Langmuir-Schäfer Transfer mit Annäherung von oben: Das Substrat nähert sich der Monolage, die Kopfgruppen binden an das Substrat und werden beim Hochgehen mitgenommen.

4 Methoden / Präparation

4.1 Präparation des Trogs

Durch die richtige Präparation des Trogs ist es möglich, etwaige Fehlerquellen bei Herstellung und Übertrag einer vernetzten Lipidmonolage zu reduzieren. Es empfiehlt sich, in regelmäßigen Abständen den Trog (samt Barriere) mit Chloroform zu reinigen, wodurch die geringe Oberflächenspannung und die kaum vorhandene Haftreibung erhalten bleiben. Hierdurch ist die Bildung eines gewünschten Meniskus und ein ruckfreies Zusammenschieben der Lipide möglich. Des Weiteren sollte der Trog regelmäßig ausgerichtet werden, so dass die Teflonoberfläche keine Neigung aufweist. Hierzu können die Standbeine des Trogs durch Drehung verstellt und die Ausrichtung der Oberfläche durch eine Wasserwaage kontrolliert werden. Für eine gute Subphase wird der Trog mit Flüssigkeit (meistens Milli-Q-Wasser) befüllt, bis ein kleiner aber deutlich sichtbarer Meniskus entsteht. Die Sauberkeit der Subphase kann durch Zusammenschieben der Barriere geprüft werden. Wird der Oberflächendruck, bei der sich am Ende befindlicher Barriere, auf Null gesetzt, sollte er bei maximal zugeschobener Barriere nicht um mehr als $\pm 0,5 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ abweichen. Bei einer größeren Abweichung sollte die Oberfläche vorsichtig abgesaugt und bei zu geringem Flüssigkeitsstand hinter der Barriere aufgefüllt werden. Es sollte außerdem noch einmal optisch geblickt werden, ob sich doch noch störende Partikel auf der Oberfläche befinden, diese sollten dann abgesaugt werden. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, mittels einer Kühlpumpe Wasser durch den Kühlkreislauf des Trogs, welcher unter der Teflonwanne sitzt, zu leiten. Generell sollte dabei zuerst auf ein Temperaturgleichgewicht mit der Subphase gewartet werden, bevor eine weitere Nutzung des Trogs geschieht.

4.2 Quervernetzung von Lipiden durch UV-Absorption

Dieses Kapitel orientiert sich an Quelle [2].

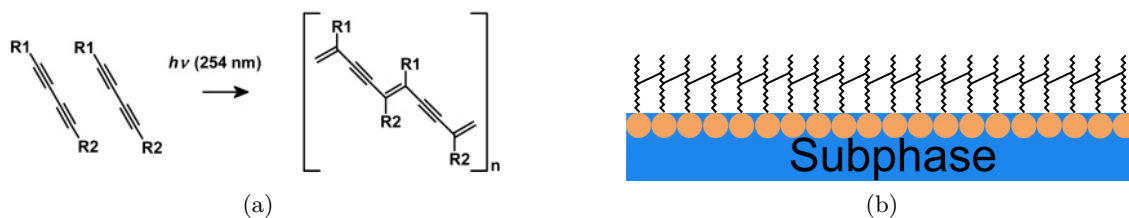


Abbildung 4.1: (a) Schema einer Quervernetzung bei zwei benachbarten Diacetylene-Gruppen ([4]); (b) Schema einer quervernetzten Lipidschicht. Die Lipide haben hier keine Schrägstellung, auch wenn dies möglich ist.

Generell beruht die Absorption eines Moleküls auf seiner chemischen Struktur. So wird diese auch bei Lipiden von der Zusammensetzung der Kopf- und Schwanzgruppe und

der damit einhergehenden Elektronenverteilung bestimmt, wobei das Spektrum im UV-Bereich liegt. Besonders wichtig für PTPE, PTPC und diy-PC ist dabei die Absorption der Diacetylene-Gruppe, welche für die Vernetzbarkeit zuständig ist. Das Spektrum samt Erläuterungen ist in Abschnitt 5.1.2 zu finden.

Unter einer Vernetzung oder auch Polymersisierung ist eine kovalente Bindung zwischen benachbarten Lipiden zu verstehen. Ermöglicht wird dieses durch ein Aufbrechen der Diacetylene-Gruppe mittels UV-Licht. Für eine gleichmäßige, gute Vernetzung sollte sich die Lipidschicht in der festanalogen Phase befinden. So besteht bereits eine Ordnung der Lipide untereinander und jedes Lipid besitzt Nachbarn in direkter Umgebung. Wird diese Schicht nun mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt, brechen die Dreifachbindungen in der Kohlenstoffkette auf. Dies ermöglicht eine neue Bindung mit den ebenfalls aufgebrochenen Diacetylene-Gruppen der benachbarten Lipide. Hierbei entsteht zwischen den Lipiden eine Doppelbindung aus Kohlenstoffen, welche dazu führt, dass die Kohlenstoffkette eine leichte Schrägstellung erfährt. Dieser Effekt zeigt sich auch in Zeit-Druck-Kurven, welche man während einer Vernetzung ähnlich einer Isothermen aufnehmen kann. Durch die zunehmende Verkippung (Änderung der Flächendicke) erhöht sich der laterale Platzbedarf der Lipide entlang der Schicht. Bei einer konstant gehaltenen Trogfläche resultiert dies dann in einem Anstieg des gemessenen Oberflächendruckes bis zum Ende der Vernetzung. Diese Schrägstellung kann zum Beispiel auch durch die elektrische Kapazität bestimmt werden, da diese umgekehrt proportional zu der Schichtdicke ist. Für das Lipid PTPE wird eine, durch die Polymerisierung ausgelöste, Verkippung der Kohlenwasserstoffkette um 36° angenommen. Diese Angabe beruht auf der um 20 % erhöhten Kapazität nach der Vernetzung. Es wird vermutet, dass der Verkippungswinkel lipidspezifisch ist. Dies ist durch eine sterische Hinderung erklärbar. Je nach Struktur der Kohlenstoffkette führt dies auch zu einer anderen Steifigkeit der Monolagen.

4.3 Abhängigkeiten der Vernetzung

Dieses Kapitel orientiert sich an den Arbeiten von Kenichi Morigaki et al. ([3] und [4])

In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2004 stellt Kenichi Morigaki et al. Ergebnisse zur benötigten UV-Dosis für eine erfolgreiche Vernetzung dar. Genutzt wurde dafür das Lipid diy-PC, welches als Bilayer auf ein Substrat übertragen und anschließend vernetzt wurde. Hierzu wurde das Lipid mit einer UV-Lampe, welche eine starke Intensität im Spektrum < 300 nm aufweist, bestrahlt (ungefähr $25 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$ bei 254 nm). Die Vernetzung wurde dabei mit verschiedenen Strahlungsdosen (Änderung der Bestrahlungszeit) durchgeführt. Ein Nachweis der Güte der Vernetzung geschah durch Fluoreszenz. Dabei wurde mit einer Maske vernetzt und daher einige Teile der Lipidschicht nicht bestrahlt. Diese unvernetzten Lipide wurden weggespült und ein fluoreszierendes Lipid (egg-PC mit 1 mol% TR-PE) in die entstandenen Freiräume eingebracht (Abb. 4.2a). Während sich bei einer schlecht vernetzten Schicht die Fluoreszenz auf den gesamten Bereich verteilen konnte, wirkten die ausreichend bestrahlten und damit gut vernetzten diy-PC Lipide wie ein undurchdringlicher Festkörper. Gezeigt wird dieses durch die Messergebnisse in Abb. 4.2b. Dabei wurde Photobleaching einmal mittig in den ersetzten Freiräumen (schwarz) und mittig in der vernetzten diy-PC Schicht (weiss) durchgeführt. Gemessen wurde dabei die Erholung der Floreszenz, wobei bei geringeren Strahlungsdosen Fluoreszenzstoff in die diy-PC Schicht diffundieren konnte. Es konnte ein Grenzwert der Strahlendosis von $1,5 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$ festgestellt werden, welcher mindestens für eine vollständige, funktionierende Vernetzung nötig ist.

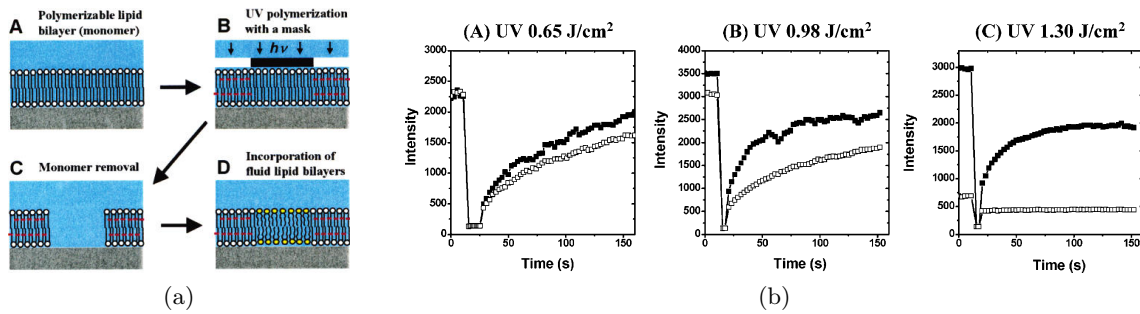


Abbildung 4.2: (a) Vorgang der Ersetzung der Lipide ([3]); (b) Fluoreszenz Erholung nach Photobleaching an verschiedenen Orten in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosen ([3]).

Erweiternd zu der Vernetzung von diy-PC wurde in einer Veröffentlichung von Kenichi Morigaki et al. aus dem Jahr 2007 über den Einfluss der Temperatur berichtet. Hierbei wird die während der Vernetzung vorherrschende Temperatur im Vergleich zum Tripelpunkt hervorgehoben. Dieser ist charakteristisch im Phasendiagramm eines Materials zu finden und gibt die Lage des thermodynamischen Gleichgewichts der drei Aggregatzustände in Abhängigkeit von Druck und Temperatur an.

Bei konstanter Temperatur unterhalb des Tripelpunktes kann das Material durch eine Druckerhöhung aus der Gasphase direkt in die feste Phase übergehen. Bei Temperaturen oberhalb des Tripelpunktes geht das Material erst in die flüssige Phase über, bevor bei ausreichendem Druck die feste Phase erreicht wird. Die Versuche von Morigaki et al. wurden erneut mit diy-PC durchgeführt, welches einen Tripelpunkt bei etwa 20 °C besitzt. Es wurde daher bei Temperaturen von 16 °C und 28 celsius gemessen.

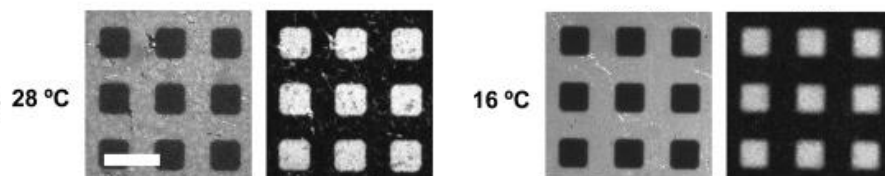


Abbildung 4.3: Fluoreszenzmessungen bei 28 °C und 16 °C nach vollständiger Präparation. Die Größenskala entspricht 20 µm ([4]).

Für die Fluoreszenzuntersuchung wurde wie in Abb. 4.2a dargestellt farbstoffmarkiertes Lipid in Freiräume eingebracht und die Diffusion in die vernetzte diy-PC Monolage beobachtet. Dabei wurden pro Temperatur zwei Bilder gemacht, jeweils mit verschiedenen Filtersets. Wie in Abb. 4.3 erkennbar sind die Lipidkanten bei einer Präparationstemperatur von 16 °C glatt und ordentlich und kein Fluoreszenzstoff konnte in die diy-PC Schicht diffundieren. Bei den Messungen für 28 °C hingegen ist eine Diffusion in die diy-PC Schicht erkennbar.

Für die Messung per AFM wurde lediglich die Maske bei der Vernetzung aufgesetzt und die nicht vernetzten Lipide per Lösung entfernt. Anschließend wurden von den Proben bei Raumtemperatur in wässriger Lösung Höhenskala-Bilder per AFM aufgenommen (Abb. 4.4). Hierauf ist sichtbar, dass die bei 16 °C präparierten Lipide deutlich weniger Fehlstellen aufwiesen.

Durch diese beiden Messungen haben Kenichi Morigaki et al. gezeigt, dass die Präparation der Lipide bei 16 °C, also unter dem Tripelpunkt, besser vernetzte Lipidschichten liefert. In dem Paper wird daher vermutet, dass der direktere Übergang in die festanaloge Phase die Packstruktur der Lipide verbessert und daher eine Vernetzung besser und geordneter möglich ist.

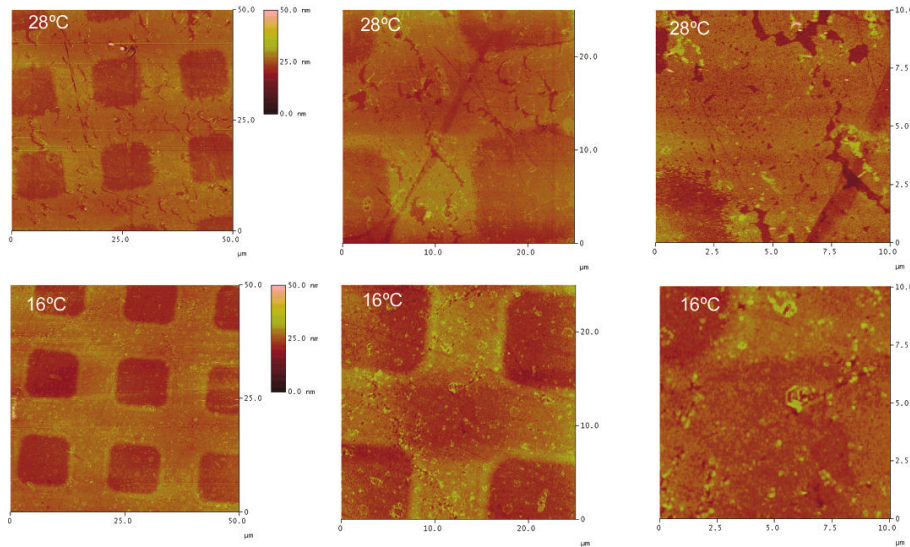


Abbildung 4.4: AFM-Messungen bei 28 °C und 16 °C mit verschiedenen Größenaufösungen nach vollständiger Präparation ([4]).

Um diesen Effekt des Tripelpunktes als Fehlerquelle auszuschließen wurden Isotherme von diy-PC und PTPE bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen und in Abschnitt 5.1.1 erläutert.

4.4 Vernetzung und Übertrag von Lipiden

Für die Herstellung einer vernetzten Lipidmonoschicht wird auf einer sauberen Subphase im Trog Lipid in passender Menge aufgespreitet. Das Lipid ist dabei generell mit einer Konzentration von $2 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ in Chloroform gelöst. Nach dem Aufspreiten wird 2 Minuten gewartet, bis das Lösungsmittel verdunstet ist und die Lipide sich auf der Oberfläche verteilt haben. Anschließend wird die Barriere, welche die den Lipiden zur Verfügung stehende Fläche begrenzt, mit einer Geschwindigkeit von meist $25 \frac{\text{cm}^2}{\text{min}}$ zugefahren, bis der Druck auf den gewünschten Wert angestiegen ist. Dabei sollten sich die Lipide in der festanalogen Phase befinden und ein Oberflächendruck von etwa 80 bis 85 % des Kollapsdruckes vorherrschen. Vor der Bestrahlung der Lipide mit UV-Licht werden diese einige Minuten ruhen gelassen, da generell hiernach der Druck leicht exponentiell abfällt. Eine Erklärung hierfür ist eine Umordnung der Lipide, da bei dem Zusammenschieben Unregelmäßigkeiten in der Schichtstruktur wahrscheinlich sind. An dieser Stelle ist ebenfalls der schwache, lineare Druckabfall zu nennen, der getrennt vom exponentiellen Abfall auftritt. Hierbei handelt es sich um den Effekt, dass Lipide unter der Barriere hindurch kriechen. Bei passender Wahl der Lipidmenge (welche durch vorherige Aufnahme einiger Isotherme feststellbar ist), ist die Restfläche ungefähr so groß beziehungsweise kleiner als die möglichen Fläche die durch die UV-Lampe ausgestrahlt werden kann. Hierdurch wird sichergestellt, dass alle

Lipide bestrahlt und ihre Diacetylene-Gruppe aufgebrochen werden und sie eine Bindung mit anderen Lipiden in Reichweite eingehen. Somit erreicht die entstehende Monoschicht eine hohe Homogenität.

Die abgeschlossene Vernetzung zeigt sich an einer Stagnation des Druckanstiegs, welche unter optimalen Bedingungen etwa 15 min beträgt. Die Lampe sollte, besonders wenn nicht nur ein diskretes Spektrum im UV-Bereich abgestrahlt wird, vor einem Übertrag ausgeschaltet werden, um mögliche Fehlerquellen zu minimieren. Anschließend kann ein Übertrag der vernetzten Lipidmonolage auf ein gewünschtes Substrat erfolgen. Dabei kann es sich zum Beispiel um einfache Deckgläser, Silicium-Chips oder TEM-Netze handeln. Je nach Beschaffenheit des Substrates und der gewünschten Lagenanzahl auf den Substratflächen kann Langmuir-Blodgett oder Langmuir-Schäfer Transfer genutzt werden. Dafür kann es eventuell nötig sein, das Substrat vor dem Aufspreiten teils oder ganz in die Subphase einzutauchen. Dabei ist es nach einem Übertrag nicht nötig, die Probe in flüssiger Umgebung aufzubewahren, da bei einem gelungenen Übertrag die Lipidlage ausreichend am Substrat gebunden ist und auch unter Normalbedingungen stabil bleibt.

4.5 Probenherstellung für die Raman-Spektroskopie

Bei der Raman-Spektroskopie wird die inelastische Streuung von Licht (Raman-Streuung) einer Probe untersucht. Dabei sind Peaks messbar, welche eine Energieverschiebung zum eingestrahlten Licht besitzen, zum Beispiel durch Schwingungs- oder Rotations-Prozesse. Mit dieser Methode soll eine weitere Möglichkeit für den Nachweis einer gelungenen Vernetzung aufgezeigt werden. Während bei unvernetztem Lipid alle Diacetylene Gruppen (C-C Dreifachbindungen) vorhanden sind und ein Signal geben, sollte bei einer vernetzten Lipidschicht dieses Signal deutlich geringer werden. Dafür ist ein Signal zu erwarten, welches eine Erhöhung der Kohlenstoff-Kohlenstoff Doppelbindung angibt.

Damit eine Probe optimal für eine Raman-Messung präpariert ist, sollte eine etwa 100 nm dicke Lipidschicht auf dem Substrat vorhanden sein. Die Dicke einer Lipidmonolage beträgt, je nach Länge des genutzten Lipids, knapp einen bis einige wenige Nanometer, welches einer Stapelanzahl von bis zu 80 Lipidlayern für die benötigte Höhe entsprechen kann. Da ein so häufiger Transfer schwierig durchzuführen ist, wurde ein Weg alternativ zu vielfachem LS oder LB Transfer gesucht. Die Idee war, verschiedene Lipidmengen auf ein durch PDMS begrenztes Deckglas zu pipettieren, um eine flächenmäßig begrenzte, gestapelte Lipidschicht zu bekommen. Im ersten Schritt wurde das Deckglas in Aceton für 10 min im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend wurde das Deckglas 30 s plasmaoxidiert, um eine hydrophile Oberfläche zu bekommen. Dies soll die in Chloroform gelösten Lipiden dazu bringen, sich gleichmäßig zu verteilen und auszurichten. Um den möglichen Platz der Lipide auf einen festen Bereich zu beschränken wurde eine PDMS-Maske erstellt. Hierzu wurde eine etwa einen Zentimeter dicke PDMS-Schicht in einer Petrischale erstellt. Mit einem Locheisen wurde dann ein Loch in die PDMS-Schicht gestochen, welches die für die Lipide begrenzte Fläche darstellt. Mittels Skalpell konnte die Maske ausgeschnitten und von der Petrischale abgelöst werden. Die fertige Maske wird passend auf das hydrophile Substrat gegeben, wobei eine leichte Verbindung auf Grund adhäsiver Kräfte zwischen beiden besteht. Pipettiert man nun das Lipid in das Loch, bleibt es in dem begrenzten Bereich. Um das letzte Lösungsmittel zu entfernen wird die Probe noch für die Dauer von einer Stunde in einen Exsikkator gegeben. Zuletzt kann die PDMS-Maske vorsichtig abgelöst und die Probe untersucht werden.

4.6 Silicium-Chips

Bei den verwendeten Silicium-Chips handelt es sich um ein Schichtsystem aus Silicium und Siliciumnitrid (SiN). Das Silicium, in Form eines $5 \times 5 \text{ mm}^2$ großen Rechteckes mit einer Höhe von etwa $200 \mu\text{m}$, dient hierbei als Rahmen für die Stabilität. Dabei hat dieses mittig einen $1,5 \times 1,5 \text{ mm}^2$ großen rechteckigen Trichter geätzt, welcher bis zu der SiN-Schicht reicht. Diese Schicht ist 500 nm dick. Durch den Trichter entsteht eine freiliegene SiN-Membran, umgangssprachlich Fenster genannt. In das Fenster ist wiederum ein Loch, genannt Mikropore, geschossen worden, zum Beispiel mittels TEM oder schweren Ionen. Diese Poren sind generell rund und haben Durchmesser von $2,5 - 8 \mu\text{m}$. Um einen gewünschten Übertrag auf einen Chip zu verbessern, ist es möglich, die Chips zu hydrophilisieren / -phobisieren. Dabei ist jedoch darauf zu achten, dass das Fenster nicht beschädigt wird. Verschiedene Methoden werden in dem Abschnitt 4.9 erläutert.

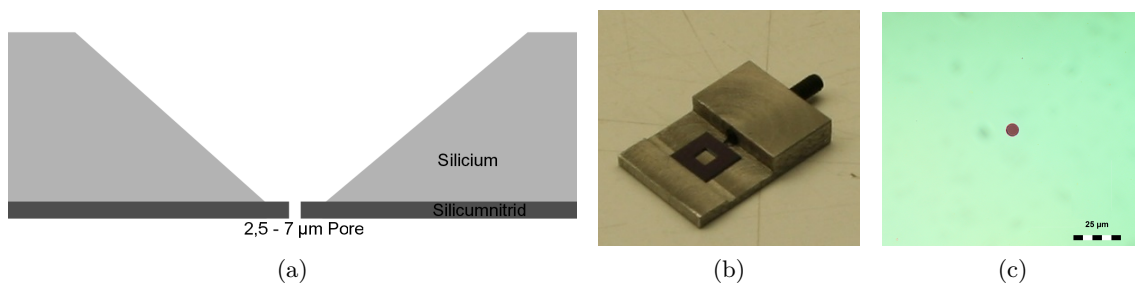


Abbildung 4.5: (a) Schematischer Aufbau eines Mikroporenchips; (b) Mikroporenchip in einer Halterung für das AFM; (c) Lichtmikroskop-Aufnahme des Chipfensters mit 100-facher Vergrößerung. Mittig ist die etwa $7 \mu\text{m}$ große Pore zu sehen.

4.7 TEM-Netz mit Folie

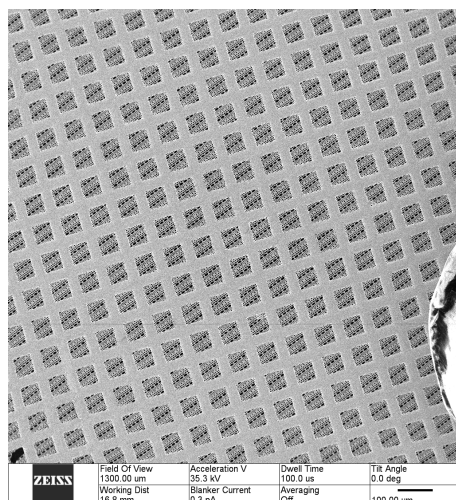


Abbildung 4.6: HIM Aufnahme eines Gold TEM-Netzes, überspannt mit Kohlenstofffolie. Rechts ist die HIM-Halterung zu sehen. Auf Grund der zu geringen Auflösung ist nicht erkennbar ob eine Pore überspannt ist oder nicht.

Bei einem TEM-Netz handelt es sich um ein Gitter, bestehend aus Kupfer, Gold oder anderem Metall, mit einer Maschenweite von $33 \mu\text{m}$. Überspannt wird das Gitter von einer

Kohlenstoffolie (Quantifoil), welche mit vielen, geordneten Mikroporen versehen ist. Die Poren variieren dabei von kreisförmig, mit einem Durchmesser von 1,5 μm , bis 7 x 3,5 μm oval. Die Quantifoil ist leicht hydrophob.

4.8 Hydrophilisierung von Deckgläsern

Für die ersten Versuche eines Übertrages wurden Deckgläser (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) verschiedener Größe beidseitig mittels Säure hydrophilisiert. Hierzu wurden diese zuerst für 20 min mit Aceton in ein Ultraschallbad gegeben. Anschließend wurden die Deckgläser für 10 min, bei einer Temperatur von 65 $^{\circ}\text{C}$, mit einer 0,5 : 9 : 45 25 %ig Ammoniumhydroxid (NH_4OH) : Wasserstoffperoxid (H_2O_2) : Milli-Q-Wasser (H_2O) Lösung behandelt. Zum Trocknen wurden diese dann für eine Stunde in den Exsikkator gegeben.

4.9 Hydrophilisierung von Chips

Bei der Hydrophilisierung ist darauf zu achten, dass nach der Behandlung die Membran des Chips noch intakt ist und nicht durch die Behandlung zerstört wird. Eine Säuberung im Ultraschallbad ist daher nicht möglich. Bei der Nutzung von erhitzten Säuren steigen Luftblasen aus der Lösung auf, welche an der Chipoberfläche entlanglaufen können. Wandert eine Luftblase dabei über eine Membran, kann diese von der Luftblase durchgedrückt und damit zerstört werden. Daher sollten jegliche Chips vor aufsteigenden Luftblasen abgeschirmt werden. Eine Behandlung mit Säure hat bisher stark gestreute Resultate betreffend der Sauberkeit nach der Behandlung ergeben.

Um hydrophile Chips zu erhalten, können diese erst, analog zu den Deckgläsern, mit Säure behandelt werden. Hierfür werden diese 10 min bei einer Temperatur von 65 $^{\circ}\text{C}$, mit einer 0,5 : 9 : 45 25 %iges Ammoniumhydroxid (NH_4OH) : Wasserstoffperoxid (H_2O_2) : Milli-Q-Wasser (H_2O) Lösung behandelt. Um eine ausreichende Sauberkeit und Hydrophilisierung zu erreichen, können diese noch für 30 min in eine auf 100 $^{\circ}\text{C}$ erhitzte Piranha-Lösung (3 : 1 95 %ige Schwefelsäure (H_2SO_4) : Wasserstoffperoxid (H_2O_2)) gegeben werden.

Eine andere für den Chip geeignete Methode diesen zu säubern und hydrophilisieren ist eine Behandlung durch Sauerstoff-Plasma. Es ist hierbei ratsam, den Chip vorher mit Aceton und Ethanol vorzureinigen um somit eventuelle größere Verunreinigungen zu entfernen. Die Chips werden dann in einem leichten Vakuum von ca. 10^{-1} mbar für die Dauer von 30 s plasmaoxidiert. Diese Prozedur ist für das Fenster deutlich schonender, da eigentlich kaum Gefahr der Zerstörung besteht.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Messungen zu Materialien und Aufbau

Alle Messungen wurden, wenn nicht anders angegeben, unter Laborbedingungen durchgeführt. Die Lipide waren im Lösungsmittel Chloroform gelöst, mit einer Konzentration von $2 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$. Die Erstellung der Graphen erfolgte mittels OriginPro 9.0G.

5.1.1 Isotherme vermessener Lipide

Zu Beginn wurden mehrere Isotherme verschiedener Lipide, welche auch für den Fachpraktikum-Versuch Lipidmonoschichten genutzt werden, aufgenommen. Je nach Lipid besitzen diese verschiedene Eigenschaften. Vermessen wurden hierzu die Lipide Stearinsäure, Behensäure, Ölsäure und DPPC.

Behen-, Stearin- und Ölsäure besitzen alle die namensgebende Säure als Kopfgruppe, unterscheiden sich aber deutlich in der Länge ihrer einzelnen Kohlenstoffkette, welche die Schwanzgruppe darstellt. Weiterhin besitzt Ölsäure eine Doppelbindung in der Kohlenstoffkette und kann somit eine cis- und trans-Konfiguration aufweisen. Das Lipid DPPC hat als Verbindungsstück eine Phosphatgruppe und mit dem Cholin eine deutlich größere Kopfgruppe als die anderen drei vermessenen Lipide. Hinzu kommt, dass die Schwanzgruppe aus zwei Kohlenstoffketten besteht und somit deutlich mehr Platz beansprucht (Die Lipide sind in Abb. 3.1 zu sehen). Es ist in Abbildung 5.1 ersichtlich, dass sich die Lipide auf Grund verschiedener Größe und Struktur in ihren Isothermen deutlich voneinander unterscheiden. Der Koexistenzbereich ist hierbei verschieden stark ausgeprägt und reicht von kaum vorhanden (Ölsäure 5.1c und DPPC 5.1d) über eine Änderung der Steigung (Behensäure 5.1b) bis hin zu einem fast horizontalen Verlauf mit lokalem Maximum (Stearinsäure 5.1a). Des Weiteren ist der Kollapsdruck, an dem die Monolage auf dem Trog kollabiert, sehr unterschiedlich und reicht von $27 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ (Ölsäure 5.1c) bis zu $58 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ (Behensäure 5.1b).

Anschließend wurden die für das weitere Vorgehen relevanten, eine Diacetylene-Gruppe enthaltenden Lipide diy-PC, PTPE und PTPC vermessen. Eine genügend große Statistik ist dabei wichtig, um geeignete Aufspreitmengen und den Kollapsdruck für spätere Versuche zu bestimmen. Hierbei sind die Isotherme der beiden Lipide PTPE und PTPC sehr ähnlich, sowohl der allgemeine Verlauf als auch der Wert des Kollapsdruckes von etwa $44 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ (Abb. 5.2c und 5.2b). Es ist jedoch zu erwähnen, dass sich das Lipid PTPE immer gut zusammenschieben lässt, bei PTPC jedoch öfters das Trogbecken überschwemmt wurde und somit die Messung der Isotherme fehl schlug. Der Kollapsdruck von diy-PC liegt mit einem Wert von $37 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ (Abb. 5.2a) deutlich unter dem der beiden anderen Lipide. Des Weiteren ist hier der Übergang von flüssiganaloger Phase zu festanaloger Phase deutlicher zu erkennen.

Bei den durch das Programm aufgenommenen Isothermen stellt die x-Achse den restlichen, den Lipiden zur Verfügung stehenden, Platz dar. Kennt man die aufgespreitete Lipidmenge und die molare Masse, kann hieraus auf die Anzahl an Lipiden in der Schicht

zurückgerechnet werden. Somit ist es möglich, den Oberflächendruck in Abhängigkeit zu der Fläche pro Lipid darzustellen (Abb. 5.2d). Ein Lipid in der festanalogen Phase nimmt hierbei mehrere 10 \AA^2 an der Grenzfläche ein.

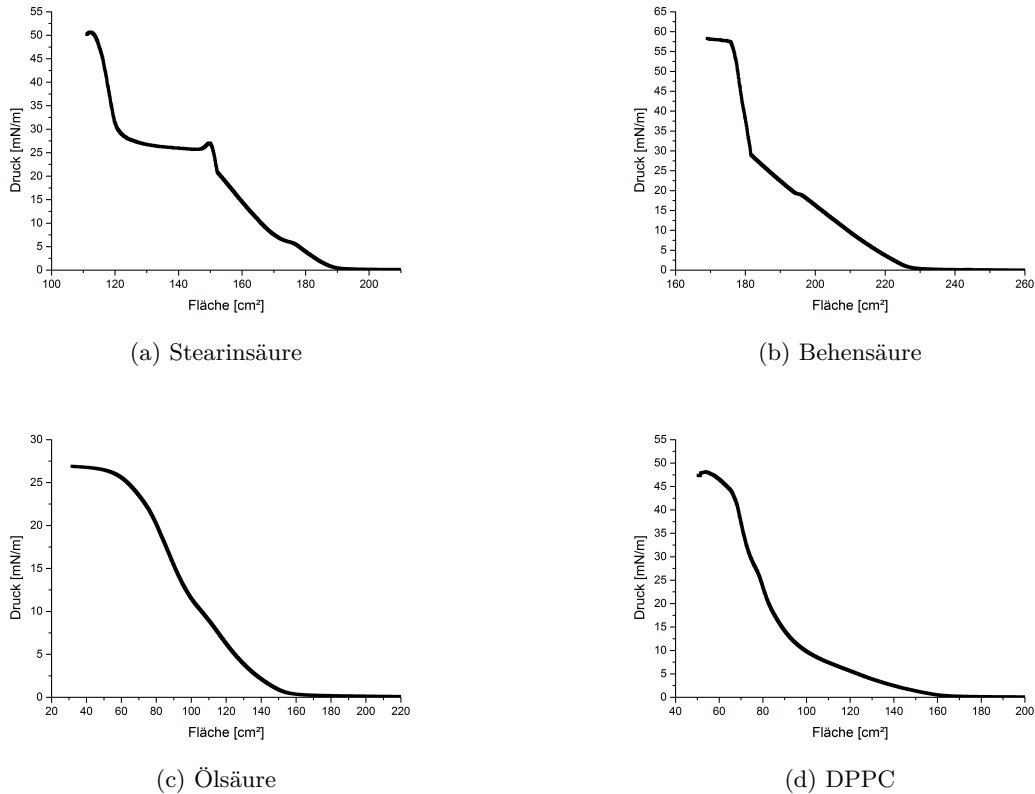


Abbildung 5.1: Typische Isotherme der vermessenen Lipide. Alle Isotherme wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. Die aufgespreiteten Mengen betragen: Stearinsäure 25 μl , Behensäure 25 μl , Ölsäure 17 μl und DPPC 30 μl .

Neben den Isothermen bei Raumtemperatur wurden für die Stoffe diy-PC, PTPC und PTPE ebenfalls Isothermen bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Dies hat den Sinn, etwaige Tripelpunkteffekte, welche in Abschnitt 4.3 erläutert wurden, zu bestimmen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Isothermen von diy-PC für die verschiedenen Temperaturen auch unterschiedliche Verläufe aufweisen. So weist die Isotherme bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ (Abb. 5.3b) ein klares lokales Maximum bei etwa 140 cm^2 auf. Dies bedeutet, dass zwischen der flüssiganalogen und festanalogen Phase ein Bereich der Koexistenz ausgebildet wird. Die bei einer Temperatur von $17,7 \text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommene Isotherme (Abb. 5.3a) zeigt kein derartiges Verhalten der Lipidschicht. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Lage und Auswirkung des Tripelpunktes von diy-PC bei etwa $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Bei PTPC und PTPE war auch bei höherer Temperatur kein solcher Effekt sichtbar und der Verlauf der Isotherme entsprach dem in Abbildung 5.2c. Demnach ist entweder der Tripelpunkt der Lipide klar über $28 \text{ }^\circ\text{C}$ oder das Lipid verhält sich unabhängig vom Tripelpunkt gleich. Es lässt sich auf jeden Fall sagen, dass bei einer Vernetzung dieser beiden Lipide bei Raumtemperatur keine Fehler durch den Tripelpunkteffekt zu erwarten sind.

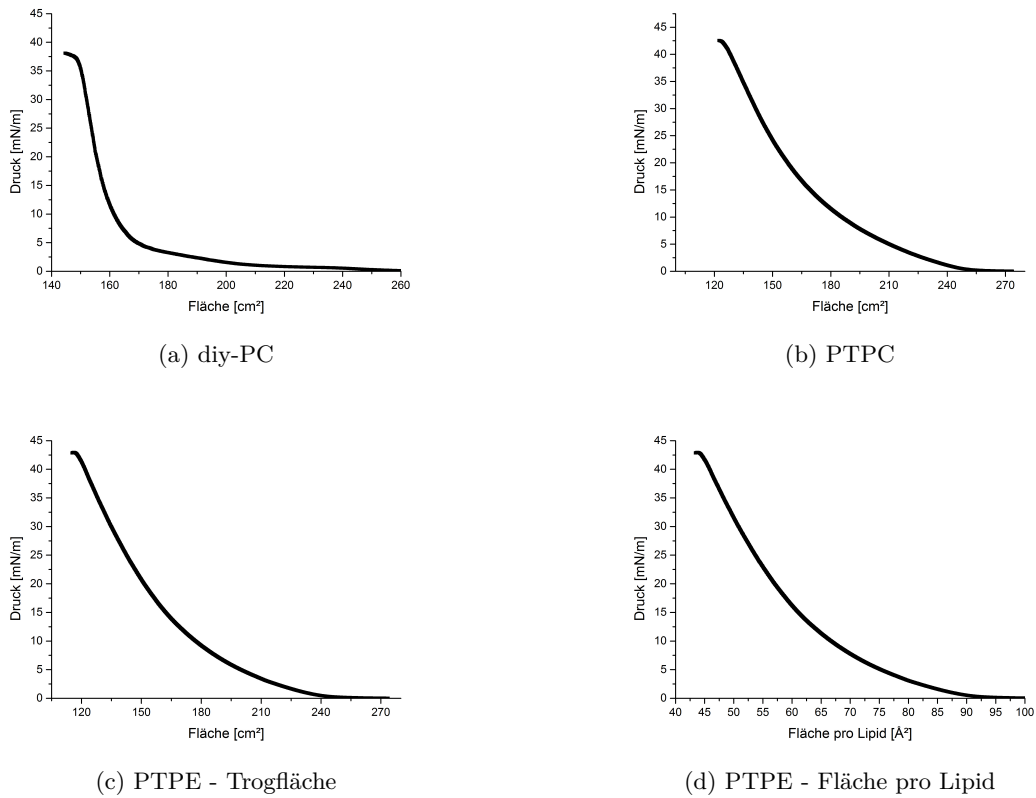


Abbildung 5.2: Typische Isotherme der vernetzbaren Lipide. Alle Isotherme wurden bei etwa 19 °C aufgenommen. Für PTPE wurde die Trogfläche zusätzlich noch auf die Fläche pro Lipidmolekül zurückgerechnet. Die aufgespreiteten Mengen betragen: diy-PC 40 μ l, PTPC 15 μ l und PTPE 17 μ l.

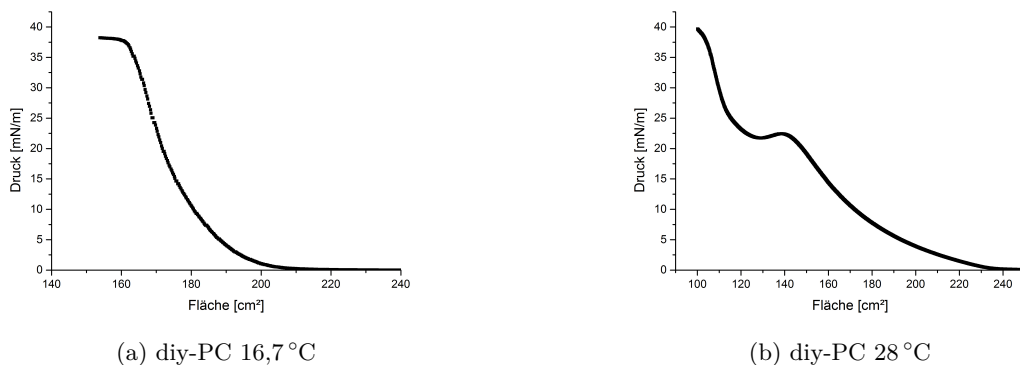


Abbildung 5.3: Isotherme von diy-PC für verschiedene Temperaturen. Bei (a) liegt hierbei eine Temperatur unter und bei Messung (b) eine Temperatur oberhalb der Tripelpunkttemperatur von diy-PC vor.

5.1.2 Absorptionsspektrum von PTPE

Um die von Kenichi Morigaki et al. ([3], [4]) und D. Shenoy ([2]) genannte Wellenlänge von 254 nm, welche für die Vernetzung nötig ist, zu bestätigen, wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Hierbei wurde das Lipid PTPE vermessen, welches für den Großteil der Versuche zur Vernetzung genommen wurde. Das Lipid wurde dabei im Lösungsmittel Chloroform mit einer Konzentration von $2 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ gegen eine Referenzprobe mit reinem Chloroform gemessen.

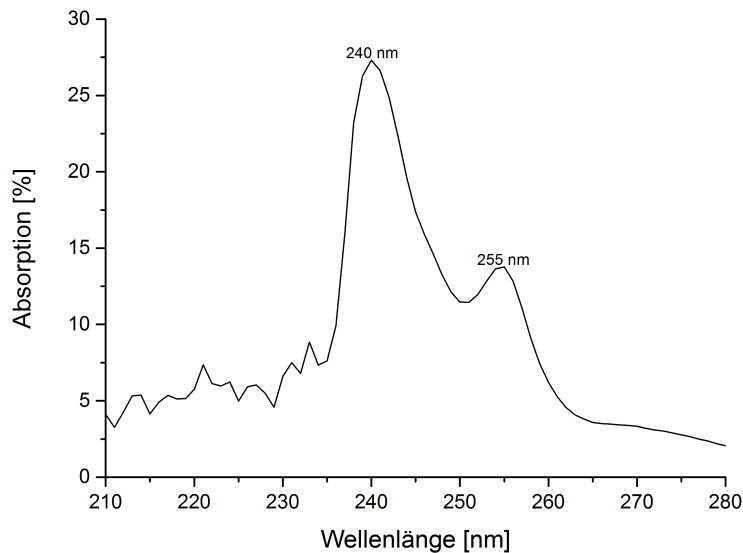


Abbildung 5.4: Absorption von PTPE im Bereich von 210 nm bis 280 nm.

In Abbildung 5.4 sind zwei klare Maxima der Absorption bei 240 nm und 255 nm zu erkennen. Dabei ist der $C \equiv C$ Bindung die Absorption bei einer Wellenlänge von 255 nm zuzuordnen, welche bei dieser Messung gegen die Referenz einen Absorptionsgrad von 13,5% besitzt. Bei der von uns genutzten Wellenlänge von 254 nm existiert ein lokales Minimum der Absorption mit einem Wert von 12%, welches immer noch klar über dem sonstigen Verlauf des Spektrums liegt. Der große Vorteil dieser Wellenlänge ist, dass sie durch eine kommerziell erhältliche Quecksilberdampfampe erzeugt werden kann. Durch diese Messung konnte die genannte Wellenlänge bestätigt und die Nutzung der Lampe gerechtfertigt werden.

5.1.3 Charakteristika der UV-Lampen

Da während der Arbeit die zur Vernetzung genutzte Lampe gewechselt wurde, wird hier der Wechsel der Lampe begründet und damit verbundene Vorteile aufgezeigt.

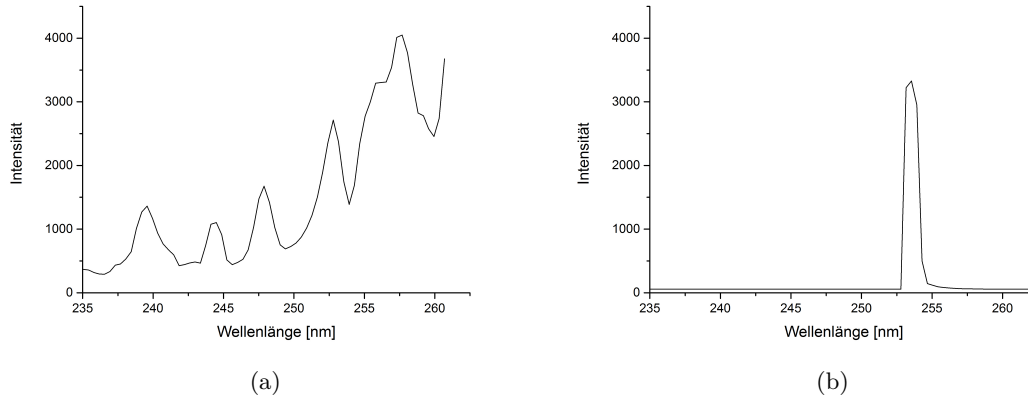


Abbildung 5.5: Spektrum der beiden genutzten Lampen. Die Skala der Intensität hat hierbei keine genauere Bedeutung und dient nur zur Vergleichbarkeit der Graphen der großen Quecksilberdampf-Lampe (a) und der kleinen (b).

Für die ersten Vernetzungen wurde eine Quecksilberdampf-Lampe ohne Filter, welche das Spektrum beschränken, verwendet. Hierbei hatte diese ein Spektrum von Infrarot bis Ultraviolett. Bei der mittlerweile genutzten UV-Lampe (Abb. 5.6(b), UVP, UVS-14, 4 W, 254 nm/Weiß) handelt es sich um ein ähnliches Modell, wie es von D. Shenoy et al. ([2]) genutzt wird. Diese ermöglicht eine gute Handhabung und kann die gesamte relevante Troglfläche ausleuchten. Von D. Shenoy et al. wird die Strahlungsleistung der UV-Lampe mit $1 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$ bei einer Entfernung zur Lipidschicht von 7,6 cm angegeben, was auch für unsere Lampe zutrifft. Für eine weitere Charakterisierung wurde ein Spektrum der UV-Lampen aufgenommen (Abb. 5.5). Für beide Lampen wurde aus etwa der selben Entfernung von der Röhre zu dem Sensor gemessen. Hieraus ist ersichtlich, dass die alte Quecksilberdampf-Lampe ein durchgängiges Spektrum hat, wobei die Intensitäten stark schwanken. Die neue UV-Lampe hingegen besitzt einen diskreten Peak bei einer Wellenlänge von 254 nm, mit einer Halbwertsbreite von etwa 1 nm. Dies hat den Vorteil, dass nur die Wellenlänge emittiert wird, welche die Vernetzung induziert und keine weiteren unbekanntes und eventuell störenden Effekte durch Strahlung anderer Wellenlänge angeregt werden. Zum Beispiel war beim Ausschalten der alten Quecksilberdampf-Lampe ein Abfallen der Oberflächenspannung von $0,3 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ erkennbar, welches bei der neuen Lampe nicht auftritt.

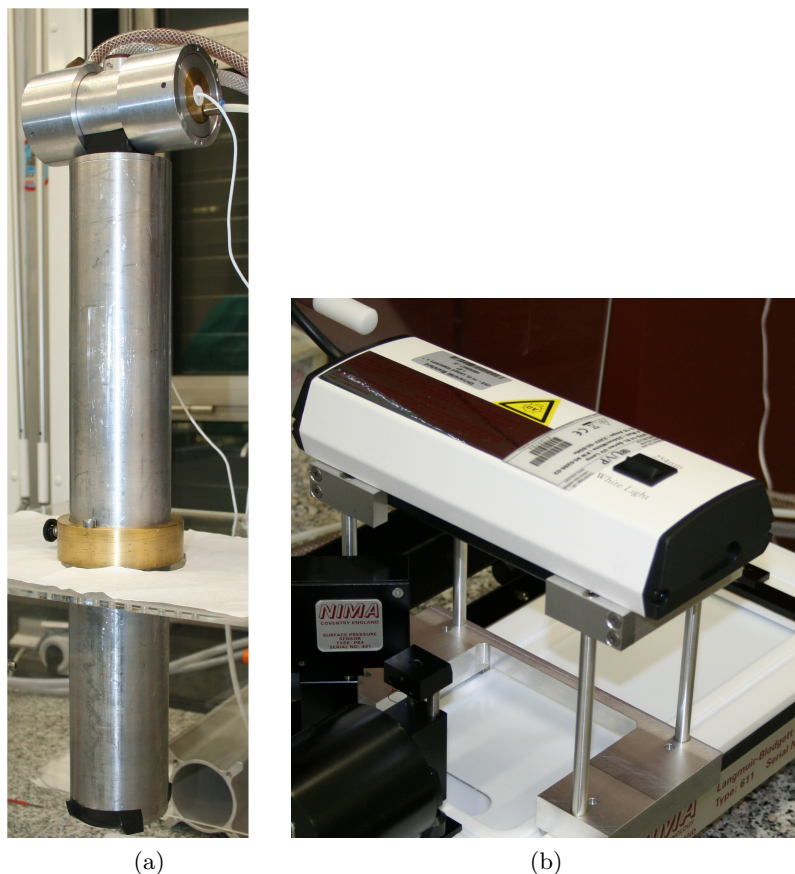


Abbildung 5.6: (a) Vorher genutzte, größere Lampe; (b) Mittlerweile genutzte, kleinere Lampe

5.1.4 Charakteristika des Silicium-Chips

Für ein gutes Arbeiten mit den Silicium-Chips sollten diese sauber und die Lage der Mikropore bekannt sein. Daher wurden die genutzten Chips vorher charakterisiert.

Die Fenster der Silicium-Chips wurden mittels Durchlicht-Mikroskopie auf allgemeine Sauberkeit und Position der Pore untersucht. Durch das Abspülen und Lagern in Isopropanol, Ethanol oder Aceton konnten die meisten Verschmutzungen auf den Chips entfernt werden. Das Behandeln der Chips mit erhitzter Säure hat, wenn das Fenster bei der Prozedur nicht beschädigt wurde, variierende Ergebnisse geliefert.

Weiter sitzen die Mikroporen nicht bei allen Chips mittig im Fenster, sondern können sich überall auf der freistehenden Fläche befinden. Dies erschwert zum Beispiel Messungen mit dem AFM, da die Probe erst lokalisiert werden muss. Der Durchmesser der Pore kann hierbei im Vergleich zur angegebenen Größe um einige wenige μm variieren, die annähernd kreisrunde Form ist aber generell gegeben.

Leider existieren noch keine Messungen mit den Silizium-Chips. Alle bisherigen Versuche eine vermeintlich durch die Lipidmembran verschlossene Mikropore zu charakterisieren schlugen fehl. Dies wurde hauptsächlich mittels AFM probiert (Abs. 5.2.3). Als Fernziel sind jedoch Messungen vorgesehen welche in letzter Instanz zu einer DNA-Translokation führen sollen, wie in Abschnitt 6.2.2 beschrieben.

5.2 Messungen zu Lipidlayern

Als Subphase für den Trog wurde stets MilliQ-Wasser genommen. Falls nicht anders angegeben, wurde die Präparation bei Raumtemperatur durchgeführt.

5.2.1 Vernetzung auf dem Langmuir-Blodgett-Trog

Misst man während der Vernetzung, beschrieben in Abschnitt 4.4, den Oberflächendruck der Lipidmonolage in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer, erhält man eine Sättigungskurve. Druckanstieg und Punkt der Sättigung hängen dabei von der Art und Menge der Lipide und der genutzten Lampe ab. Der Verlauf der Kurve lässt sich dabei durch ein beschränktes Wachstum beschreiben. Die obere Grenze ist dabei der Punkt, an dem alle Diacetylene-Gruppen der Lipide aufgebrochen wurden und Quervernetzungen ausgebildet haben.

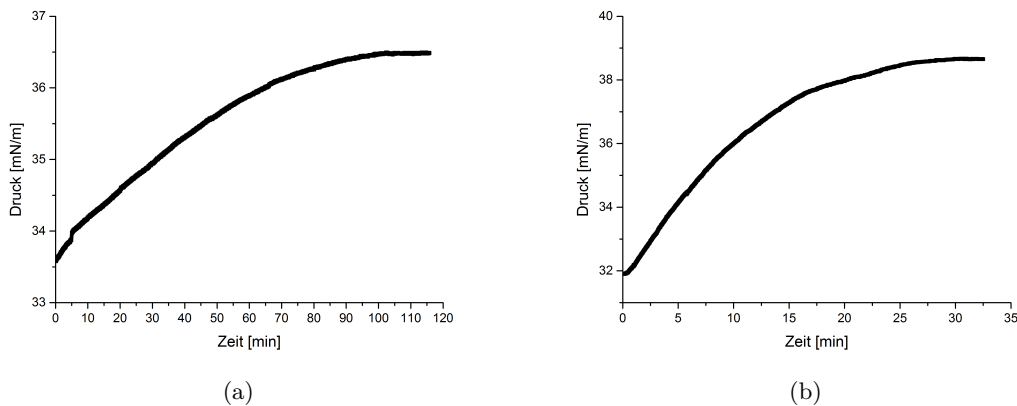


Abbildung 5.7: Vernetzung von PTPE (a) alte Quecksilberdampfampe; (b) neue UV-Lampe. Die Vernetzung mit der kleinen Lampe erfolgt schneller

5.2.2 Fluoreszenz-Untersuchung eines Transfers

Als einer der ersten Versuche wurde eine Mischung aus DOPE und Rhodamin markiertem DOPE mit dem LB-Trog auf ein Glassubstrat übertragen und per Fluoreszenz die Gleichmäßigkeit der Lipidschicht untersucht. Hierzu wurden 25 μl der in Chloroform gelösten Lipid-Fluoreszenzstoff Stammlösung aufgespreitet und bei einem Druck von $30 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ auf ein unbehandeltes Deckglas mittels Langmuir-Blodgett Transfer übertragen. Anschließend wurde die Probe per Fluoreszenz auf Gleichmäßigkeit des Übertrages untersucht.

In Abbildung 5.8 ist deutlich die Fluoreszenz (rechts) im Vergleich zu dem einheitlich schwarzen Hintergrund (links) zu erkennen. Die Kante des Substrates weist hierbei Verunreinigungen auf, welche wahrscheinlich während des Übertrages von der Gesamtfläche zu der Kante hin gespült wurden. Die Innenfläche des Glasträgers fluoresziert großflächig sehr einheitlich. Dies ist ein klares Indiz dafür, dass der Übertrag der Monolage mittels Langmuir-Blodgett Trog funktioniert.

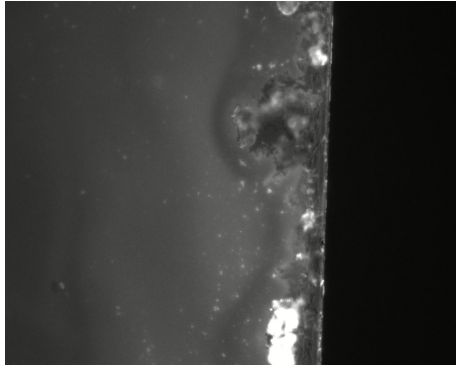


Abbildung 5.8: Fluoreszenzmessung: Kante Glassubstrat mit übertragenem Lipid und Farbstoff

Durch diese einfache Messung kann qualitativ gezeigt werden, dass mittels Langmuir-Blodgett Transfer eine gleichmäßige Lipidschicht auf ein Substrat transferiert werden kann. Eine vorherige Behandlung des Substrates, um diesem hydrophile/-phobe Eigenschaften zu geben, verbessert den Übertrag.

5.2.3 AFM-Untersuchung eines Transfers

Im nächsten Schritt wurde PTPE auf Deckgläser übertragen, welche dann mittels AFM untersucht wurden. Hierzu wurde zuerst $15\ \mu\text{l}$ der $2\ \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Lösung PTPE aufgespreitet und bei einem Transferdruck von $35\ \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ auf das Substrat übertragen. Anschließend wurde die selbe Menge der Lösung auf die Trogfäche gegeben und bei einem Druck von etwa $31\ \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ vernetzt. Bestrahlt wurde dabei mit der größeren, älteren Lampe und nach einer 2 stündigen Zeitspanne wurde alles bestrahlte Lipid vernetzt (Abb. 5.7a) und ein Oberflächendruck von $35\ \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ erreicht. Im Anschluss wurde wieder ein Langmuir Blodgett Transfer auf ein unbehandeltes Deckglas durchgeführt.

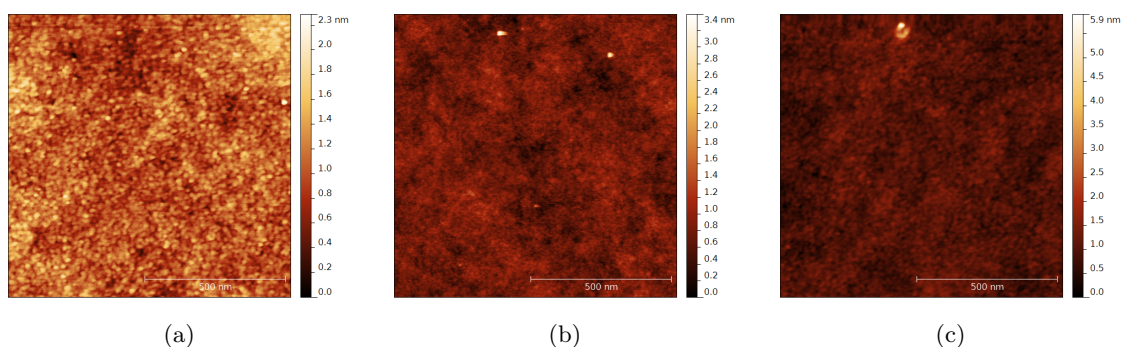


Abbildung 5.9: AFM-Aufnahmen von (a) Deckglas; (b) Deckglas mit Lipidmonolage; (c) Deckglas mit vernetzter Lipidmonolage.

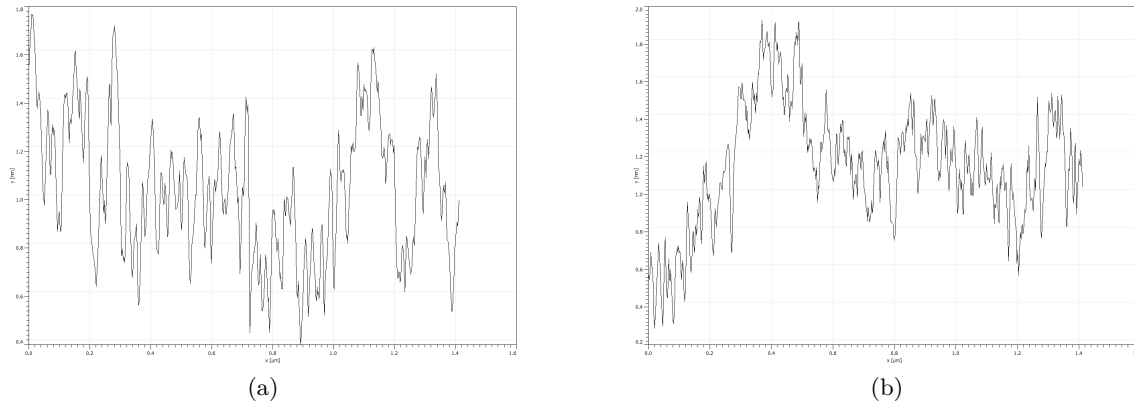


Abbildung 5.10: Höhenprofil, gelegt von links oben nach rechts unten, von (a) Deckglas; (b) Deckglas mit Lipidmonolage

Die so erhaltenen Überträge, sowie ein unbehandeltes Deckglas zum Vergleich, wurden per AFM vermessen und sind in Abbildung 5.9 gezeigt. Abbildung 5.9a zeigt das lipidfreie Substrat, welches sich deutlich sichtbar von beiden anderen unterscheidet. Die Höhenverteilung ist ungleichmäßiger und die maximale Differenz beträgt 2,3 nm. Die Abbildung zeigt eine typische Messung eines Glasobjektträgers. Abbildung 5.9b stellt die nicht vernetzte Lipidschicht dar und 5.9c die vernetzte, übertragene Lipidschicht. Es fällt auf, dass die maximale Höhendifferenz zunimmt, wobei dieses nur auf vereinzelte Punkte und nicht eine größere Unregelmäßigkeit der Gesamtstruktur zurückzuführen ist (bei 5.9b zwei Stellen und bei 5.9c eine Stelle im oberen Teil der Abbildung) (Abb. 5.10). Die wahrscheinlichste Ursache hierfür wären kleine Verunreinigungen, die auf dem Substrat vorhanden waren oder während des Übertrages aufgetreten sind.

Allgemein lassen sich die AFM Aufnahmen des reinen Glassubstrates von denen der Lipide unterscheiden. Während das Glas eine unregelmäßige Oberfläche hat, sieht die Oberfläche des Lipide tragenden Substrates glatter aus. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass das Glassubstrat der Lipide die selbe unregelmäßige Struktur aufweist wie das vermessene Vergleichsstück. Daher ist eine Änderung der Oberflächenstruktur direkt auf das Lipid zurückzuführen. Zwischen beiden Abbildungen von Lipiden (5.9b und 5.9c) ist jedoch kein klarer Unterschied zu erkennen. Daher ist eine simple Bestimmung der Quervernetzung der Lipide durch das AFM schwer möglich.

Im späteren experimentellen Verlauf wurde weiterhin versucht, vernetzte Lipide über die Pore eines Silicium-Chips zu übertragen und den Verschluss der Pore mittels AFM zu messen. Leider konnten keine aussagekräftigen Messungen durchgeführt werden. Begründbar ist dies durch die schlechte Auffindbarkeit der Pore auf der freistehenden Membran, die schlechte Erreichbarkeit der Pore mit dem Cantilever und dem nicht gesicherten Verschließen der Pore bei einem Übertrag. Bei einem LB-Transfer wurde bisher kein gelungener Übertrag verzeichnet. Ein LS-Transfer mit der glatten Seite des Chips oben war zu Beginn der Arbeit nicht möglich und zu einem späteren Zeitpunkt waren keine qualitativ ausreichenden Chips mehr vorhanden.

5.2.4 HIM

Für die Untersuchung mittels Helium-Ionen-Mikroskop wurde ein TEM-Netz, welches auf einer Fläche mit Quantifol Kohlenstoffolie überspannt ist, mit vernetztem Lipid überzogen. Der Vorteil des TEM-Netzes ist die hohe Anzahl an Poren, wodurch die Wahrscheinlichkeit der Überspannung einer Pore durch die Lipidmembran im Vergleich zum Silicium-Chip höher ist.

Für die Probenherstellung wurde gemäß der Handhabung in Abschnitt 4.4 eine polymerisierte PTPE Monolage erzeugt. Übertragen wurde dabei mittels LS-Transfer, wobei aus der Probe herausgehoben wurde. Hierzu musste das TEM-Netz vor dem Aufspalten der Lipide in die Subphase gebracht werden.

In Abbildung 5.11 sind die Messungen des überspannten TEM-Netzes zu sehen. Dabei wurde sowohl eine gesamte Masche (Abb. 5.11a), als auch die Überspannung einer einzelnen Pore und zum Beweis die Zerstörung ihrer Membran (Abb. 5.11b und 5.11c) vermessen.

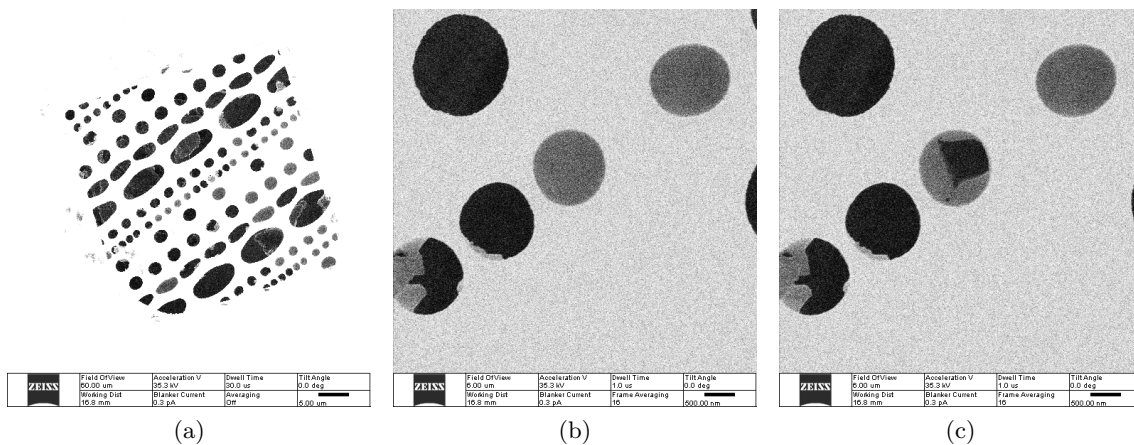


Abbildung 5.11: HIM-Aufnahmen eines Gold TEM-Netzes von (a) einer Masche mit mehreren überspannten Poren; (b) einer Nahaufnahme mit überspannter Pore; (c) einer Nahaufnahme mit gewollt zerstörter Membran.

Wie auf dem Bild der Masche zu sehen ist, sind bis auf die ($7 \times 3,5 \mu\text{m}$) Poren von jeder Größe manche vollständig überspannt. Dabei handelt es sich jedoch um die am weitaus besten überspannte Masche. Die Anzahl an mit einer Membran verschlossenen Poren in Bezug auf alle vorhandenen Poren betrug bei dieser Messung unter 5%. Abbildung 5.11b und 5.11c zeigen die selbe Stelle auf dem Gitter, wobei im zweiten Bild die Lipidmembran durch kleinflächigen Fokus mit dem Heliumionen-Strahl (welcher schon beim normalen Scanvorgang die Membran schädigen kann) zerstört wurde. Durch dieses Verfahren wird jedoch nicht direkt die gesamte Membran, welche die Pore überspannt, zerstört. Zwar reißt die Membran etwas ein, jedoch bleibt ein großer Teil der vernetzten Lipidschicht stabil und überspannt weiter einen Teil der Pore. Leider ist schwer zu sagen wie stabil diese restliche Überspannung ist, da das Loch in dieser sich bei weiteren normalen Scans der selben Stelle leicht vergrößert. Dies könnte jedoch auch durch den Scanvorgang selbst passieren und nicht aus der teilweisen Zerstörung der Lipidmembran folgen.

Die hier sehr geringe Rate an überspannten Poren kann teilweise mit Problemen während der Präparation begründet werden. Das TEM-Netz musste an die Dipvorrichtung

mit einer Einklemmmechanik befestigt werden, welche zur Folge hat, dass das TEM-Netz nicht als erstes die Wasseroberfläche durchbrechen konnte. Des Weiteren war während der Vernetzung ein kleiner Kollaps der Schicht zu vernehmen.

Bei einer Präparation mit einem Kupfer TEM-Netz als Substrat wurde eine Dipvorrichtung mit Halter genommen, auf dem das TEM-Netz nur aufgelegt wird. Somit durchdringt das Substrat in nächster Nähe als erstes die Wasseroberfläche, womit die Möglichkeit besteht eine unbeeinflusste Lipidmembran zu übertragen. Bei dieser Messung wurde ein deutlich besseres Ergebnis erzielt mit einer Überspannungsrate von über 80 % (5.12). Daher ist anzunehmen das bei einem gut funktionierenden und optimierten Transfer auch eine einzelne Pore (wie bei einem Silicium-Chip) mit einer Membran verschlossen werden kann.

Es ist dabei wichtig anzumerken, dass sich nur eine Lipidmonolage auf der Kohlenstoffolie befindet, welches in der Art des Übertrages begründet liegt. Für weitere Untersuchungen wäre dementsprechend ein zweiter LS-Transfer auf die schon bestehende Lipidmembran interessant. Hierdurch könnte beobachtet werden ob und wie ein Bilayer die Stabilität im Vergleich zu einer vernetzten Lipidmonolage beeinflusst.

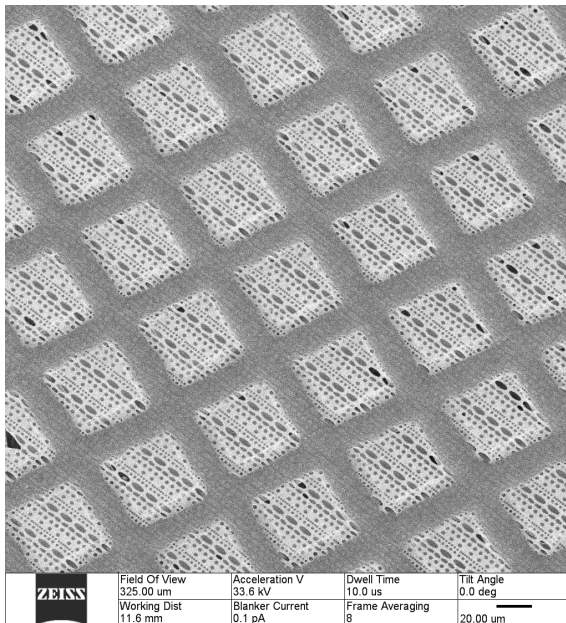


Abbildung 5.12: Ausschnitt eines Kupfer TEM-Netzes. Der größte Teil der Poren wurde hier von der Lipidmembran überspannt. Die Stabilität der überspannenden Membran war dabei ähnlich zu den Messungen des Gold TEM-Netzes. Die Präparation wurde durchgeführt von Roland Hillmann

5.2.5 Raman-Spektroskopie

Zuerst wurde die in Abschnitt 4.5 beschriebene Probenpräparation getestet, indem wie schon bei der Fluoreszenz-Untersuchung (Abs. 5.2.2) eine DOPE und Rhodamin markierte DOPE Lösung mit einer Konzentration von 25 μl aufgetragen wurde. Anschließend wurde die Probe mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Wie in Abbildung 5.13 zu sehen, ist der Rand der Probe klar durch die PDMS-Maske begrenzt worden. Die Fluoreszenz des Randes der Lipidschicht ist hierbei jedoch nicht immer einheitlich, wobei die Fluoreszenz sich als sehr homogen darstellt. Es ist vermutbar, dass sich die Schichthöhe am Rand klar von der in der Mitte unterscheidet. Gründe hierfür sind das Ausbilden eines Meniskus an der PDMS-Grenze und auch mögliche Wechselwirkung zwischen der PDMS-Schicht und dem Lösungsmittel Chloroform.

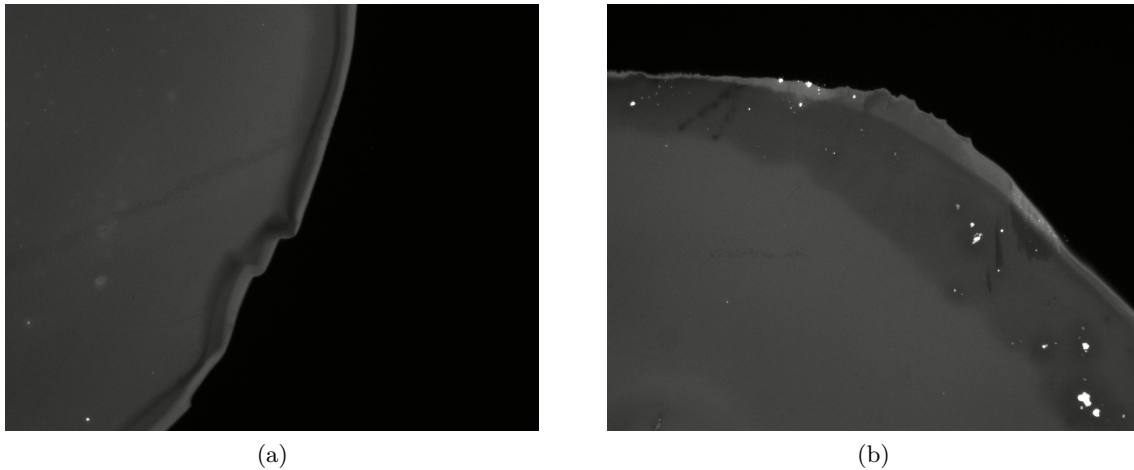


Abbildung 5.13: DOPE mit Rhodamin, Konzentration $2 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$. Messungen an den Begrenzungen.

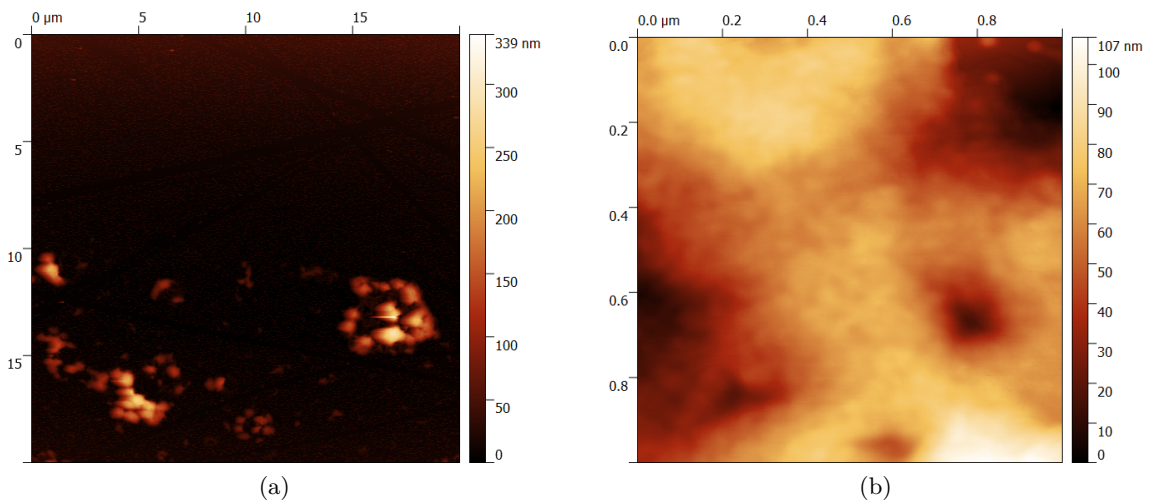


Abbildung 5.14: PTPE aufgetragen auf ein Substrat mit PDMS-Maske, Konzentration $0,1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ jeweils 4 Tropfen mit $2,5 \mu\text{l}$. (a) Messung an oberer Begrenzung; (b) Messung mittig.

Durch die Bestätigung, dass die PDMS-Maske das Lipid klar begrenzt, wurde im nächsten Schritt eine Probe mit dem Lipid PTPE erstellt. Diese wurde dann mittels AFM vermessen, um festzustellen, wie hoch die Lipidschicht auf dem Substrat bei entsprechender Konzentration und Auftragsmenge ist.

Abbildung 5.14 zeigt AFM-Messungen an einer Probe mit dem Lipid PTPE. Von der $0,1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Lösung wurden insgesamt 4 Tropfen von jeweils $2,5 \mu\text{l}$ aufgetragen. Anders als bei der Fluoreszenzmessung ist bei der AFM-Messung keine klare Lipidkante zu sehen (Abb. 5.14a). Vielmehr sind einige bergige Strukturen zu erkennen, welche eine heterogene Struktur der Lipidschicht aufzeigen. Somit wäre die Probe für eine Raman-Messung ungeeignet, wobei die ideale Höhe durch das Ausbilden nur einzelner Strukturen auch klar überschritten wurde. Zwar hat sich mittig der Maske eine Lipidmultilage ausgebildet, jedoch variiert

dort die Oberfläche deutlich (Abb. 5.14b). Die Höhenunterschiede von 100 nm zeigen, dass sich das Lipid nicht gleichmäßig in dem Loch verteilt, sondern verschiedene Strukturen ausbildet. Auch wiederholte Messungen mit variierenden Mengen zeigten keine homogene, vermessbare Lipidschicht auf. Da somit nicht feststellbar ist, welche Höhe die Lipidschicht bei einer bestimmten Konzentration und Auftragungsmenge besitzt, ist die während der Arbeit entwickelte Methode zur Probenpräparation bisher praktisch nicht nutzbar.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

Während der Bachelorarbeit wurden mögliche vernetzbare Lipide, die Ausbildung einer polymerisierten Lipidmonolage und deren Nachweis, sowie der Übertrag dieser auf verschiedene Substrate untersucht und charakterisiert. Das gesetzte Fernziel (SS-DNA Lokalisation) ist auf Grund der Komplexität des Themas nicht erreicht worden, jedoch wurde ein gutes Verständnis über den Vorgang der Polymerisation und deren Problematiken erlangt.

Bei den zur Verfügung stehenden Lipiden, welche für eine Vernetzung in Frage kommen, handelt es sich um diy-PC, PTPC und PTPE. Der Fokus wurde hier relativ schnell auf das Lipid PTPE gelegt, welches schon früh gute Resultate versprach, da das Aufnehmen der Isotherme mit hoher Wahrscheinlichkeit gute und gleichbleibende Resultate lieferte. Die Fähigkeit zur Vernetzung wurde für alle drei Lipide bestätigt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der bei diy-PC auftretende Tripelpunkteffekt während unserer Präparation bei PTPE und PTPC nicht auftritt.

Für den Vorgang der Polymerisation konnte der bereits vorhandene Trog genutzt werden, wobei einige Erweiterungen, zum Beispiel für die Optimierung des Transfers, angefertigt wurden. War die Vernetzung am Anfang aufgrund der alten Lampe noch sehr zeitaufwendig und nicht besonders effektiv (sehr geringer Druckanstieg), konnte durch die Nutzung der neuen Lampe eine klare Verbesserung gezeigt werden. Der Zeitraum einer Vernetzung hat sich deutlich reduziert (von mehreren Stunden zu nur 20 min) und die Ausbeute, da die gesamte Lipidfläche beleuchtbar ist, deutlich erhöht. Dieses bestätigt auch der Anstieg des Oberflächendruckes von mehreren $\frac{\text{mN}}{\text{m}}$.

Für einen Transfer der vernetzten Lipidmonolage auf Substrat wurde eine Hebevorrichtung gebaut, welche einen Langmuir-Schäfer-Transfer ermöglicht. Hierbei war vor allem wichtig, dass die Vorrichtung möglichst zeitgleich oder später als das Substrat ein beziehungsweise je nach Art auftaucht. Falls dieses nicht vermeidbar ist, so soll eine frühere Berührung der Schicht in mehrere Zentimeter Abstand passieren. Hierdurch soll gewährleistet werden, dass eine optimal unversehrte Schicht für den Übertrag vorliegt. Es wurden sowohl LB- als auch LS-Transfers durchgeführt. Hierbei hat sich gezeigt, dass der LS-Transfer für Substrate mit Struktur, wie zum Beispiel TEM-Netze, besser funktioniert, da die Schicht etwaige Poren so direkt überspannen kann. Der LB-Transfer, dessen großer Vorteil das beidseitige Übertragen ist, hat praktisch noch nicht funktioniert.

Für den Nachweis und die Charakterisierung von Überträgen wurde zuerst mit Fluoreszenz gearbeitet. Es wurde gezeigt, dass ein gleichmäßiger Transfer auf das Substrat möglich ist. Die Messungen mittels AFM gaben leider weniger Aufschluss über etwaige Unterschiede zwischen unbehandeltem und vernetztem Lipid und auch der Verschluss einer Pore konnte auf diese Weise nicht nachgewiesen werden. Als sehr gute Möglichkeit, speziell Substrate mit vielen Poren (TEM-Netze mit Folie) zu vermessen, hat sich das HIM gezeigt. Aufgrund der Messungen konnte einmalig eine Ausbeute von über 90% beim verschließen von Poren bis zu $7 \times 3,5 \mu\text{m}$ gezeigt werden. Dass die Lipidmembran

einer Messung im HIM stand hält zeigt auch deren Stabilität, welche ein gewünschter Effekt der Vernetzung ist. Die zuletzt aufgekommene Methode, den Unterschied zwischen unbehandeltem und vernetztem Lipid mittels Raman-Spektroskopie nachzuweisen, ist bisher an der Probenpräparation gescheitert. Jedoch soll diese Art des Nachweises, wie in Abschnitt 6.2.2 genannt, weitergeführt werden, da sie quantitative Daten über die Menge der Polymerisierung geben kann.

Das Ziel, mittels einer einzelnen überspannten Pore Messungen durchzuführen, wurde für weitere Messungen zum Verständnis der Produktion und Arbeit mit vernetzten Lipidschichten zurückgestellt. Erste Versuche mit Flusszellen gestalteten sich als schwierig und das Augenmerk wurde darauf gelegt, mit reproduzierbar Poren überspannen zu können. Somit kann umgangen werden eine nicht geschlossene Pore in eine Flusszelle einzubauen und obwohl der schwierige Einbau gemeistert wurde, trotzdem keine sinnvolle Messung durchführen zu können.

6.2 Ausblick

6.2.1 Veränderungen am Langmuir-Trog

Da es mit der Zeit Neuerungen bei der Konstruktion von Trögen gibt, sollen diese hier kurz vorgestellt werden. Hierbei ist auch an die Besonderheiten gedacht, welche bei der Vernetzung von Lipiden nötig sind.

Um möglichst wenig materielle Schwachstellen zu haben, sollte die Wanne des Langmuir-Blodgett Trog aus einem Stück PTFE gefertigt werden. Eine bei allen neueren Trögen bestehende Verbesserung ist die Konstruktion mit zwei Barrieren, welche sich von den beiden Enden aufeinander zu bewegen. Hierdurch ist eine zum alten Trog äquivalente Flächenreduktion möglich, wobei jede der Barrieren nur die halbe Geschwindigkeit haben muss. Dadurch wird ein sanfteres Zusammenschieben der Lipidschicht an der Grenzfläche ermöglicht, welches einen generellen Qualitätsgewinn darstellt. Fraglich ist hierbei, ob bei neueren Trögen der Effekt des Hindurchkriechens unter der Barriere bei zwei genutzten Barrieren begünstigt wird. Da dieser Effekt schlecht messbar ist und ein neuer Trog optimierte Barrieren hat, ist nicht anzunehmen, hierdurch einen Qualitätsverlust zu erhalten. Einhergehend mit der Nutzung von zwei Barrieren ist die Tatsache, dass sich die Position des Tauchbeckens samt Dipautomatik und des Wilhelmy-Plättchens nicht mehr an einem Ende des Beckens befinden kann. Beide Vorrichtungen befinden sich bei neuen Trögen zwangsläufig mittig. Es muss darauf geachtet werden, dass die Bestrahlung mit UV-Licht ungehindert durchgeführt werden kann und die Lipidschicht nicht stellenweise verdeckt wird. Dies würde direkt negative Auswirkung auf die Güte der vernetzten Lipidmonolage haben. Des Weiteren muss das Tauchbecken groß und lang genug konstruiert sein, um LB- und LS-Transfers in sämtlichen Variationen ordentlich durchführen zu können (Abschnitt 3.4). So sollte das Substrat bei allen möglichen Transfervarianten vollständig in dem Tauchbecken Platz finden.

6.2.2 Weitere Messungen zu Lipidlayern

Da die Messung mit dem HIM bisher gute Ergebnisse liefern konnte, wären weitere Messversuche durchaus interessant. Dabei wäre die Ausbildung eines Bilayers und dessen Untersuchung der nächste sinnvolle Schritt. Während ein Bilayer in Wasser klar stabiler als eine Monolage ist, könnte an Luft das höhere Gewicht mit der zusätzlichen Stabilität der zweiten Lipidlage konkurrieren, da die Membran eher durchhängt als straff über die Pore gespannt zu sein. Es ist hierbei durchaus von Unterschieden auszugehen, je nach genutzter Transfermethode. Am Wahrscheinlichsten würde ein Übertrag mit anschließendem LS-Transfer mittels Drehung der Probe und komplementären zweiten LS-Transfer funktionieren, wie schon in Abschnitt 5.2.4 genutzt. Hierdurch wird das Problem umgangen, dass sich auf der anderen Seite der Kohlenstoffolie das Kupfergitter befindet und dadurch keine ebene Fläche gegeben ist.

Wie schon in Abschnitt 4.5 beschrieben, wäre eine weitere Nachweismöglichkeit für eine Vernetzung wünschenswert. Das größte Problem bei einer Raman-Messung ist die Probenpräparation. Die in Abschnitt 5.2.5 beschriebene alternative Methode ist zur Probenherstellung kaum geeignet. Um die Möglichkeit einer Raman-Messung zur Bestätigung einer Vernetzung zu verifizieren ist daher die aufwendige Probenherstellung mittels vielfachem LB-Transfer eine Überlegung wert. Da etwa 80 Überträge auf das Substrat möglich sind, um eine geeignete Schichtdicke zu erhalten, sollte der Übertrag auf einen gut kontrollierbaren Trog mit sauber präparierter Probe durchgeführt werden. Durch die Barriere muss dabei bei jedem einzelnen Übertrag die Oberflächenspannung nachgeregelt werden, wobei ein Kollaps auftreten kann. Hierbei müsste dann die Probe gesichert und der Trog komplett neu präpariert werden, bevor der Übertrag vorgesetzt werden kann. Des Weiteren ist in der Realität das theoretische Transferverhältnis 1 : 1 nicht immer gegeben. Daher müsste von einer variierenden Schichtdicke ausgegangen werden, wobei etwaige Folgefehler deutlich die lokale Anzahl an Lipidlayern variieren lässt.

Ein weiterführender Schritt in Richtung der SS-DNA Lokalisation wäre die Widerstandsmessung mittels Flusszellen von überspannten Poren. Hierdurch kann sichergestellt werden, dass die Präparation fehlerfrei funktioniert. Als Präparation für solch eine Messung muss eine Lipidmembran über eine Mikropore gespannt werden. Als Substrat dient hierbei ein Silicium-Chip, wie in Abschnitt 4.6 beschrieben. Um zu testen, ob eine auf dem Langmuir-Blodgett-Trog übertragene Lipidschicht die Pore wirklich verschließt, wird die Probe in eine Flusszelle eingebaut. Diese bietet 2 mit Puffer gefüllte Kanäle mit Flüssigkeitsreservoirs, welche durch den Silicium-Chip getrennt sind. Wird nun eine Spannung zwischen diese beiden Reservoirs gelegt, würde bei einer nicht verschlossenen Mikropore ein durch die Porengröße begrenzter Strom fließen können, welches einem bestimmten messbaren Widerstand entspricht. Bei einer verschlossenen Pore wäre der Stromfluss durch die, die Pore verschließende Lipidmembran behindert und ein deutlich höherer Widerstand wäre messbar. Somit wäre also überprüfbar, ob eine Mikropore erfolgreich überzogen wurde und eine weitere Bearbeitung der Probe sinnvoll ist beziehungsweise ob die Präparationsmethode erfolgreich funktioniert.

Literatur

- ¹E. Sackmann und R. Merkel, *Lehrbuch der Biophysik* (Wiley VCH, 2010).
- ²D. K. Shenoy, *Patent: Method of stabilization of functional nanoscale pores for device applications*, 2012.
- ³K. Morigaki, K. Kiyosue und T. Taguchi, “Micropatterned composite membranes of polymerized and fluid lipid bilayers”, *Langmuir* **20**, 7729–7735 (2004).
- ⁴K. Morigaki, H. Schönherr und T. Okazaki, “Polymerization of diacetylene phospholipid bilayers on solid substrate: Influence of the film deposition temperature”, *Langmuir* **23**, 12254–12260 (2007).
- ⁵R. Glaser, *Biophysik*, 4. Auflage (Gustav Fischer Verlag, 1996), S. 332.
- ⁶G. Adam, P. Läger und G. Stark, *Physikalische Chemie und Biophysik*, Bd. 6, 2 (Springer, 2009), S. 631.
- ⁷P. Martin, M. Szablewski und M. Keynes, *Tensimeters and Langmuir-Blodgett Througs - Operating Manual*, 5th (Nima Technology, 1999).
- ⁸“Wikipedia”, [Wikipedia.de](http://www.wikipedia.de).
- ⁹Felix, *New Drug Approvals 2012 - Pt. VII - Lucinactant (Surfaxin™)*, <http://chembl.blogspot.de/2012/03/new-drug-approvals-2012-pt-vii.html>.
- ¹⁰Biolinscientific, *Langmuir-Schaefer Film*, <http://www.biolinscientific.com/ksvnima/applications/?card=KA14>.