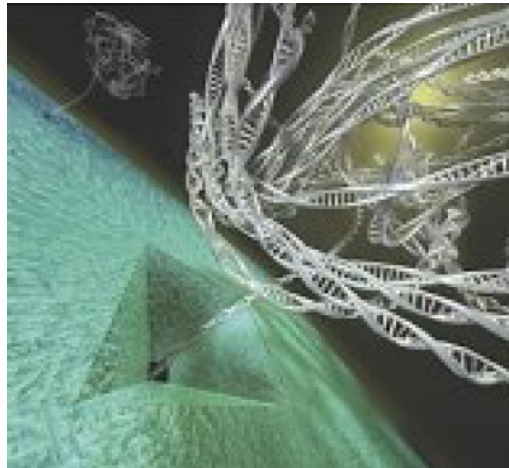


Universität Bielefeld

Diplomarbeit

Thema:

Einzelmolekülbiophysik an Nanoporen



zur Erlangung des Grades eines Diplom-Informatikers
des Studienganges Naturwissenschaftliche Informatik
der Universität Bielefeld

Prüfer:

Prof. Dario Anselmetti (Fakultät der Physik)
Prof. Erwin Flaschel (Technische Fakultät)

Verfasser:

Norman Schellert
Nelkenweg 1
33758 Schloß Holte
Matrikel-Nr.: 1570492

Eingereicht am:

23.10.2007

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere; dass ich die beiliegende Diplomarbeit ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der im Quellenverzeichnis angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder inhaltlich aus veröffentlichten oder noch nicht veröffentlichten Quellen entnommen sind, wurde als solche kenntlich gemacht.

Die Zeichnungen oder Abbildungen in dieser Arbeit sind von mir selbst erstellt worden oder mit einem entsprechenden Quellennachweis versehen.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Ort; Datum

Norman Schellert

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	3
Zusammenfassung.....	7
1 Einleitung.....	8
2 Theoretische Grundlagen.....	10
2.1 Nanoporen.....	10
2.2 DNA-Makromolekül in elektrischem Feld und an einer Nanopore.....	14
2.3 Optische Pinzette.....	16
2.4 Visualisierungsmethoden.....	17
2.4.1 Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	18
2.4.2 Raster Elektronen Mikroskopie (REM).....	20
2.4.3 Transmissions Elektronen Mikroskopie (TEM).....	21
2.5 LabVIEW.....	22
2.6 Energiedispersives Röntgenanalysesystem (EDX).....	23
3 Material und Methoden.....	25
3.1 Chip mit Nanopore.....	25
3.2 DNA.....	25
3.3 AFM.....	26
3.4 REM.....	27
3.5 TEM.....	27
3.6 LabVIEW.....	28
3.7 Verstärker.....	28
3.8 Optische Pinzette.....	29
3.9 SEM mit FIB.....	30
3.10 Benutzte Tools.....	30
4 Ergebnisse.....	31
4.1 Präparation.....	31
4.1.1 PDMS.....	31
4.1.2 Chip.....	34
4.2 Messungen im elektrischen Feld.....	35
4.3 Visualisierung.....	37
4.4 Porenherstellung.....	42
4.5 Optische Pinzette.....	45
4.6 Software.....	47
5 Diskussion.....	49
6 Abkürzungsverzeichnis.....	51
7 Quellenverzeichnis.....	52
7.1 Literaturverzeichnis.....	52
7.2 Internetquellen.....	54
7.3 Abbildungsverzeichnis.....	55
Anhänge.....	58
Danksagung.....	58

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der biophysikalischen Charakterisierung von künstlich erzeugten Nanoporösen Strukturen durch Messung der Ionenstrom während der Translokation von λ -Phagen DNA. Des Weiteren werden Methoden der Präparation der verwendeten Chips vorgestellt, getestet und optimiert.

Es wurden zum einen Nanoporen untersucht, die von der Schweizer Universität Unine in Neuchâtel von der Abteilung von Prof. Stauer zur Verfügung gestellt wurden und zum anderen auch Nanoporen, welche selbst in kommerzielle Chips aus den Vereinigten Staaten erstellt wurden.

Abschließend werden einige Optimierungen, die im Laufe des halben Jahres herausgearbeitet wurden beschrieben und ein kurzer Ausblick auf zukünftig notwendige Experimente gegeben.

1 Einleitung

Die Entdeckung und Entschlüsselung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) sind einige der größten und wichtigsten Ereignisse in der Geschichte der Biologie. Die in ihr enthaltenen Gene bestimmen durch deren Proteincodierung, die Entwicklung eines Organismus.

Erste Strukturen von DNA wurden bereits 1869 von Friedrich Miescher entdeckt. Erst 1919 konnte Phoebus Levene die einzelnen Bestandteile der DNA eindeutig identifizieren. Einen ersten Hinweis auf die genauen Strukturen (repetitiv) gab 1937 eine von William Astbury veröffentlichtes Röntgenbeugungsmuster. 1952 bewiesen Alfred Hershey und Martha Chase, dass die DNA der Phagen eindeutig alle Informationen über das Erbgut enthielten. 1953 entschlüsselten Watson und Crick zum ersten mal den strukturellen Aufbau der DNA. Eine Röntgenaufnahme der DNA interpretierten sie folgerichtig als eine Doppel-Helix Struktur von 2 gegenläufigen Einzelsträngen. In den Jahren danach wurden genauere Analysen des Erbgutes u. a. durch die immer besseren und detaillierteren Bildgebungsverfahren, angefertigt, und ein immer konkreteres Bild der DNA-Aufbau und Sequenzen entstand. Allerdings war es erst die Firma Celera Genomics Corp. aus den Vereinigten Staaten, die im Jahr 2000 das menschliche Erbgut, also deren genaue DNA-Sequenz, zu 99 % entschlüsselte. Das Human Genome Project verkündete schließlich 2001 die vollständige Entschlüsselung des menschlichen Genoms [WIKI].

Mit dem immer konkreter werdenden Bild und Aufbau der DNA stieg auch das Verständnis über den Aufbau einer Zelle inklusive einem Großteil der in ihr ablaufenden Stoffwechselprozesse. Um diese Prozesse betreiben zu können ist ein Transport von (Makro-)Moleküle zum einen innerhalb der Zelle und zum anderen in einem stetigen Austausch mit ihrer Umwelt für eine Zelle lebensnotwendig. Bei diesen Transporten müssen diese (Makro-)Moleküle unter Umständen Zellwände oder -membranen durchqueren, was entweder aktiv über in den Membranen vorhandene Carrier-Proteine oder passiv einem Gradienten folgend (z. B. osmotischer) durch kleinste Kanäle und Poren von statten geht. Die Wechselwirkungen, welche bei einem solchen Durchtritt vorherrschen sind bis heute noch nicht vollständig erforscht.

Nanoporöse Materialien (Porendurchmesser $d = 1 - 50$ nm) haben nicht nur in der biologischen Forschung eine wichtige Rolle, vielmehr werden sie zunehmend auch in der chemischen, pharmazeutischen und Lebensmittelindustrie eingesetzt. Ihre Anwendungsgebiete umfassen

hauptsächlich Filter und Katalysatoren.

Meine Arbeit beinhaltet die Untersuchung der Translokation eines (Makro-)Moleküls, in meinem Fall die DNA eines λ -Phagen, durch eine Nanopore. Dazu sollen Verfahrensweisen herausgefunden werden, die zuverlässig zu einer Messung des Durchtritts (Event) führen. Anschließend sollen diese Methoden und der momentan vorhandene Aufbau der Messung in den Aufbau der optischen Pinzette integriert werden.

Dies ist der geplante Umfang der Diplomarbeit. Sollte noch Zeit bestehen ist der nächste Schritt mit diesem neuen Aufbau Messungen zu starten.

2 Theoretische Grundlagen

Zu Beginn meiner Dokumentation werde ich auf die theoretischen Grundlagen der eingesetzten Materialien und Methoden eingehen. Besonders wichtig sind bei meiner Arbeit die Nanoporen, die DNA, die Visualisierung und LabVIEW.

2.1 Nanoporen

Bei den in dieser Arbeit biophysikalisch zu charakterisierenden Nanoporen handelt es sich vereinfacht gesprochen um ein einzelnes Loch in einer Si_3N_4 -Membran im Nanometer-Bereich. Wie an einem Chip in Abbildung 1 zu sehen, besteht ein Chip aus mehreren übereinander fixierten Schichten aus Silizium (Si), Siliziumdioxid (SiO_2) und Siliziumnitrid (Si_3N_4).

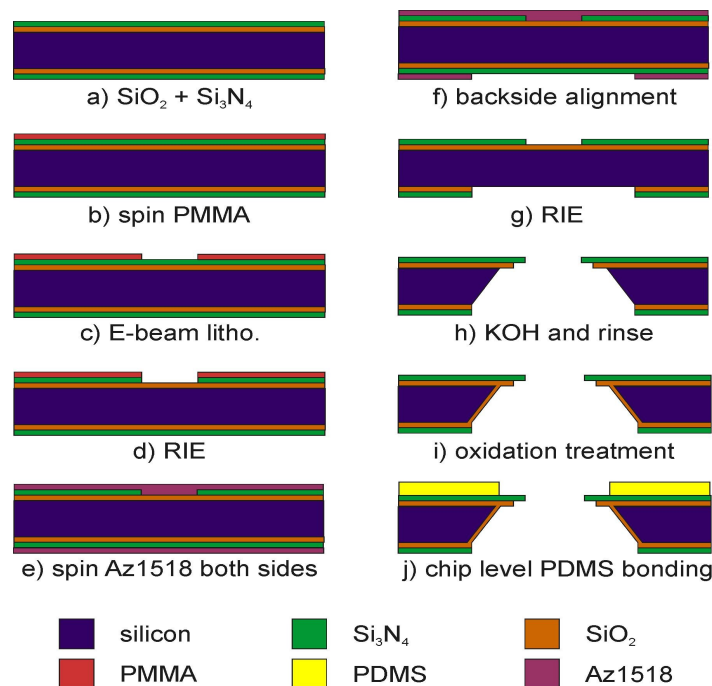


Abb. 1: Aufbau der Chips von Prof. Staufer

Die Pore befindet sich möglichst nahe am Mittelpunkt des Chips in der Si_3N_4 Membran. Die Si und SiO_2 Schichten, welche zum einen der mechanischen Stabilisierung des Chips und zum anderen

Theoretische Grundlagen

zum Schutz bei dem nachfolgend beschriebenen Prozess dienen, werden unter Verwendung von Kaliumhydroxid (KOH) trichterförmig um den Mittelpunkt des Chips weggeätzt. So entsteht ein Trichter mit ca. $30 \mu\text{m}^1$ Durchmesser, der bis auf die Si_3N_4 -Membran herunter reicht.

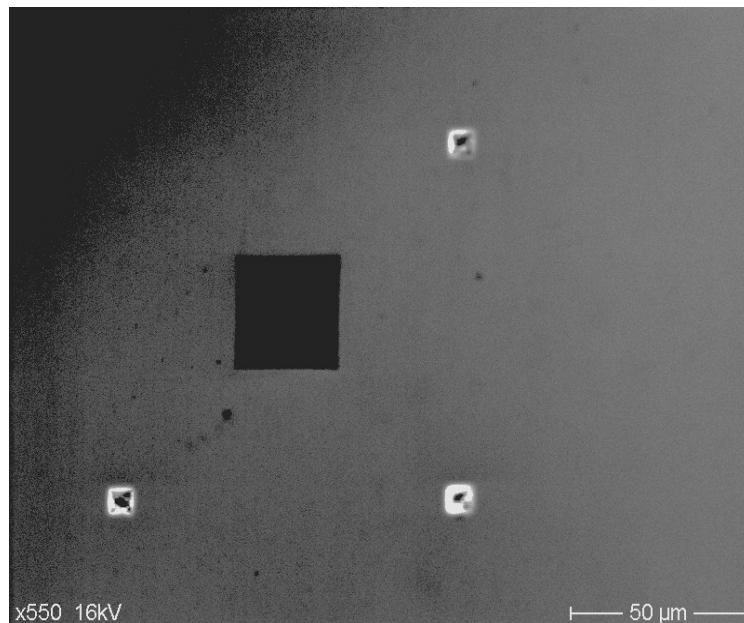


Abb. 2: Oberfläche des Silizium-Chips mit Trichter zur Pore (REM)

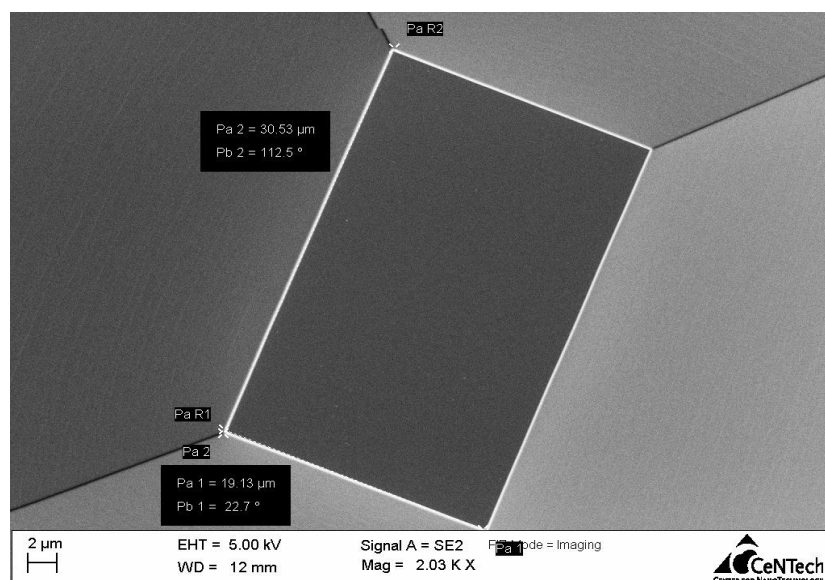


Abb. 3: Trichter, der zu dem rechteckigen Si_3N_4 -Membranfenster führt (SEM)

1 Mikro Meter = 10^{-6} Meter

Theoretische Grundlagen

Anschließend wird die Nanopore in der gewünschten Größe mit einem fokussierten Ionenstrahl in die von beiden Seiten frei liegende Si_3N_4 -Schicht geschossen. Dabei trägt der Ionenstrahl (z.B. Argon oder Gallium) die Atome sukzessive von der Nitridschicht. So dünnt sich die Schicht im Fokus, in Abhängigkeit von der Zeit und der Strahlenintensität, permanent aus, sodass nach einigen Millisekunden ein Loch entsteht.

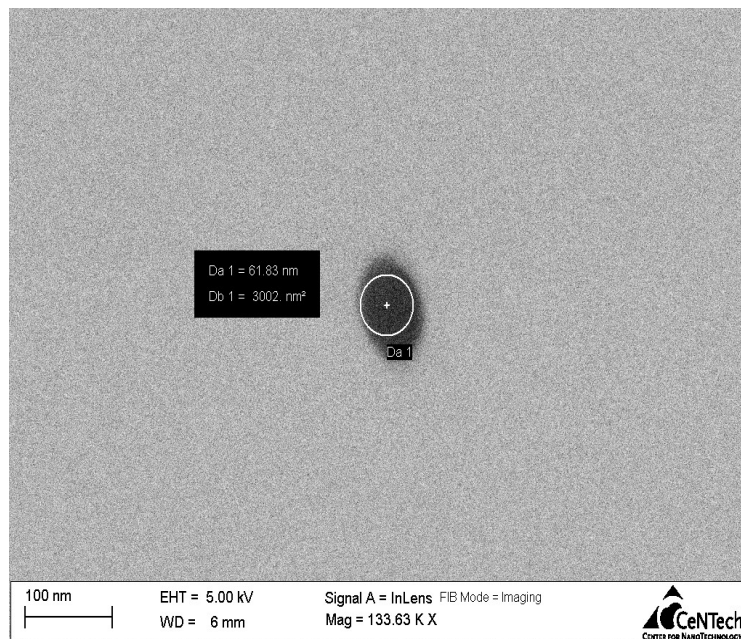


Abb. 4: Mit einem FIB erzeugte Pore in einer Si_3N_4 Membran (SEM)

Sofern ein Lithographie System vorhanden ist, erhöht sich die Variabilität, indem der exakte Durchmesser der Nanopore bis auf ca. 1 nm genau bestimmt werden kann. Dafür ist ein weiterer entscheidender Bestandteil eine SiO_2 -Membran anstelle der Si_3N_4 -Membran. Zuerst wird ein Loch mit einer ungefähr definierten Größe (im nm-Bereich) in diese Membran geschossen. Die Größe lässt sich zwar bei so einem System z. B. durch einen Elektronendetektor / -zähler unterhalb des Chips mit einer Genauigkeit von ca. ± 5 nm bestimmen, aber um eine noch bessere Kontrolle über den Größendurchmesser der Pore zu haben ist ein weiterer Schritt notwendig. Durch einen energiereichen, auf die Pore gerichteten Elektronenstrahl mit einer Intensität von ungefähr 10^5 bis 10^7 Am^{-2} verflüssigt sich das Siliziumoxid. Aufgrund der vorhandenen Oberflächenspannung des SiO_2 an der Pore wird so die Pore zusehends verschlossen. Die Zeit des Beschusses mit dem Elektronenstrahl bestimmt somit die abschließende Endgröße der Pore.

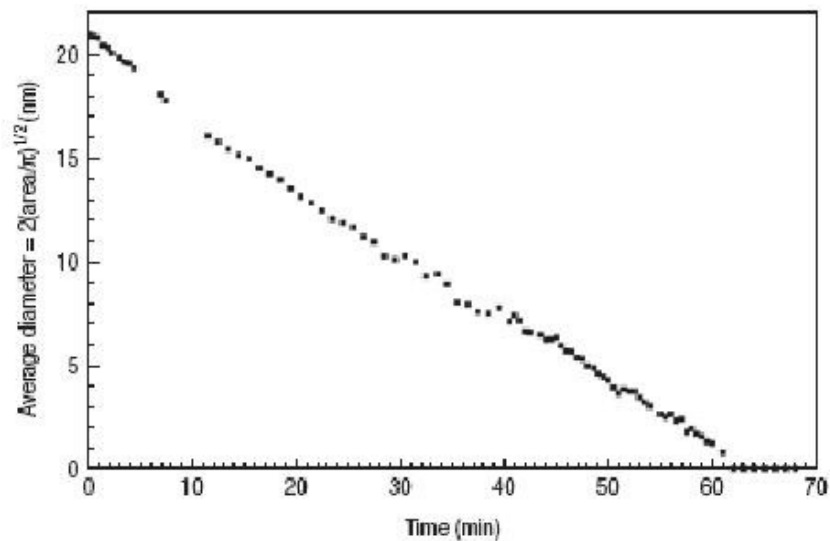


Abb. 5: schrumpfender Porendurchmesser bei andauerndem Ionenbeschuss [STO01]

Die hier erwähnte Oberflächenspannung ist in dieser Form nur bei Poren mit einem Anfangsdurchmesser von 50 nm oder darunter gegeben. Sobald der Durchmesser nach dem ersten Durchschuss bei ca. 80 nm oder darüber liegt, hat dies den Effekt, dass die Pore anstatt sich zu verkleinern eine Vergrößerung dieser sichtbar wird [STO01]. Beweis dieser Vermutung liefert, unter Annahme einer zylindrischen Struktur des Trichters und der Pore, die folgende Formel [AJA]:

$$\Delta F = \gamma \Delta A = 2\pi \gamma (rh - r^2)$$

Der zu berechnende Faktor ist hierbei die Kraft (ΔF) die Einfluss auf den Porendurchmesser nimmt. γ ist hierbei die Oberflächenspannung der Flüssigkeit (in diesem Fall natürlich des Siliziumoxids) und ΔA die Änderung in der Größe der Oberfläche. Mit r als Radius der Pore und h als deren Höhe, ergibt sich für $\Delta F(r)$ die folgende Kurve mit einem Nullpunkt zwischen 50 und 80nm, wo eine Pore bei dem obigen Verfahren nicht mehr schrumpft, sondern sich der Durchmesser wieder vergrößert.

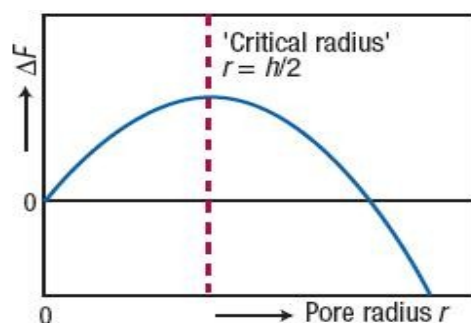


Abb. 6: Anfänglicher Porendurchmesser bestimmt das Verhalten bei andauerndem Ionenbeschuss [STO01]

Die Gründe für die Wahl des Siliziums und des Siliziumnitrids zur Herstellung der Chips liegen bei diesen beiden Elementen in deren biochemischen Eigenschaften. Sie sind bestmöglich resistent gegen die meisten mechanischen, elektrischen und flüssigkeitsabhängigen Faktoren, wie z. B. große Spannungen, Salzgehalt, Temperatur und der pH-Wert. Diese Faktoren treten bei meiner Arbeit mit den Chips an unterschiedlichsten Stellen auf und hätten bei anderen Materialien einen negativen Einfluss auf die Ergebnisse.

2.2 DNA-Makromolekül in elektrischem Feld und an einer Nanopore

Der Durchtritt eines einzelnen DNA-Moleküls durch eine künstliche Nanopore soll biophysikalisch charakterisiert werden, indem der Ionenstrom während der Translokation gemessen wird.

Die DNA wird in einem 10mM Tris-Puffer den Experimenten hinzugefügt. Dieser Puffer hat einen pH-Wert von ca. 7,5 – 8. Der pH-Wert ist äußerst wichtig, damit die DNA während der Experimente ihre ursprüngliche Struktur nicht verändert und so bei allen Experimenten annähernd die gleichen Ausgangsbedingungen herrschen. Generell unterscheidet man 2 Methoden der Annäherung, zum einen ein passiver Drift mit Hilfe eines schwachen angelegten elektrischen Feldes bei einer Spannung in einem Bereich von 20 mV bis einigen Hundert mV, sowie der aktiven Annäherung der DNA, die in diesem Fall an ein Polystyrolkugelchen gebunden ist, mittels einer optischen Pinzette (Kapitel 2.3).

Theoretisch, und auch bereits in einigen Publikationen experimentell bestätigt [STO02], wird bei der passiven Translokation durch die Nanopore, deren Durchmesser dabei nicht die 100nm Grenze überschreiten sollte, ein Abfall der Stromstärke registriert. Dieser Abfall ist kein kontinuierlicher Prozess, vielmehr ist es ein plötzlich auftretendes Ereignis. Das heißt, eine Annäherung eines DNA-Fragments kann nicht anhand der Stromkurve registriert werden. Einzig die Blockade der Nanopore durch die DNA wird durch die Verweilzeit (dwell time) deutlich nachweisbar.

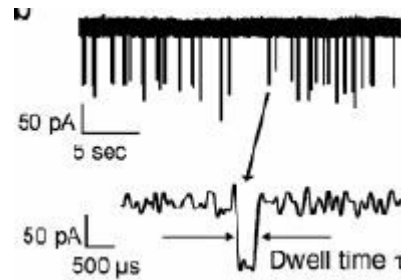


Abb. 7: Translokation dargestellt an der Veränderung im Ionenstrom [STO02]

Sobald die DNA in die Pore gerät, sinkt durch „Verstopfen“ der Pore der Strom sprunghaft um ca. 50 – 100 pA. Dann wird die DNA auf Grund des elektrischen Feldes durch die Pore gezogen und mit deren Austritt steigt der gemessene Strom wieder um ca. 50 – 100 pA an. In Abbildung 7 sieht man mehrere dieser Ereignisse und einen Event in einer erhöhten zeitlichen Auflösung. Diese Events spielen sich in einem zeitlichen Bereich von einigen hundert µsek bis einigen msec ab, in Abhängigkeit von der angelegten Spannung und der Anzahl an Basenpaaren der durchtretenden DNA. Verdeutlicht wird dieser lineare Zusammenhang zwischen Basenpaaren und Eventzeit in der Abbildung 8 [STO02].

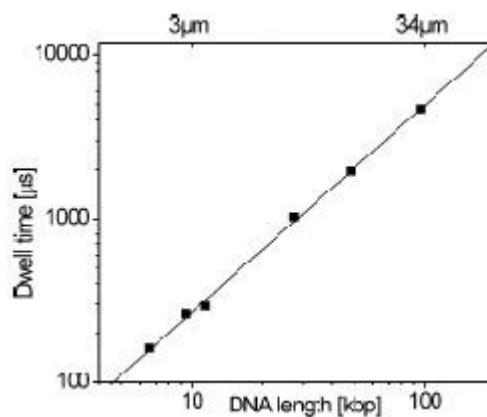


Abb. 8: Dauer des Durchtritts in Abhängigkeit der Basenpaare [STO02]

Wichtig dabei zu beachten ist die Tatsache, dass die DNA auf Grund ihrer negativen Ladung an der Seite der Pore hinzu gegeben werden muss, an der die negative Spannung anliegt.

2.3 Optische Pinzette

Die optische Pinzette ist ein Hilfsmittel um Objekte von einigen Mikrometern bis hin zu einzelnen Atomen zu fangen und dann in alle Richtungen zu bewegen. Weiterhin bietet das System die Möglichkeit diese gefangenen Objekte als eine Art Sensor für auf sie einwirkende äußere Kräfte dient. Der erste, der eine optische Pinzette erfolgreich gebaut und eingesetzt hat [Ash01], und der mit seinen Überlegungen und Experimenten [Ash02] den Weg zur dreidimensionalen optischen Falle ebnete war Arthur Ashkin, der bereits 1969 die Anfänge dieser Technik geprägt hat.

Das Grundprinzip der optischen Pinzette ist das Generieren eines dreidimensionalen Fallenpotentials, die so genannte Optische Falle, welche durch den Strahlungsdruck von Licht erzeugt wird. Dieses Fallenpotential wird mit Hilfe eines stark fokussierten Laserstrahl erzeugt.

Den Hintergrund dieser elektromagnetischen Theorie des Strahlungsdrucks gibt [Gerth], indem er beschreibt, dass das elektrische Feld einer Welle (Licht), eine Stromdichte j in der Materie erzeugt wird, welche in ihrem magnetischem Feld eine Lorentzkraft F zugeordnet wird. Resultierend aus dem Impulserhaltungssatz und der Quantentheorie (Energie eines Photons $E=h\nu$ und deren Impuls $p=h\nu/c=h/\lambda$) ergibt sich dann der Strahlungsdruck bei einer vollständig absorbierenden Oberfläche aus der Summe aller auftreffenden Photonen und deren Impulse, und bei einer vollständig reflektierenden Oberfläche als zweifache Summe desssen. Dieser Strahlungsdruck übt äußerst geringe Kräfte im Bereich von wenigen pN (bei geringen mW) auf Objekte aus, somit ist der unerwünschte Einfluss auf die Messungen äußerst gering. Trotzdem reicht diese Kraft aus, die vom Laser getroffenen Objekte in der Mitte des Strahls zu fangen und deren Richtung frei zu manipulieren.

Der Aufbau einer optischen Pinzette besteht aus einem Mikroskop, einer Laserquelle, einer Probenbeleuchtung, diverser Umlenkspiegel, Linsen, Strahlenteiler, einer CCD-Kamera, einem Beamexpander, einigen unterschiedlichen Filtern und einem Piezotisch, welche allesamt auf einer Optischen Bank zur Dämpfung von niederfrequenten Schwingungen montiert wurden. Den genauen Strahlengang der Apparatur wird in Abbildung 9 dargestellt.

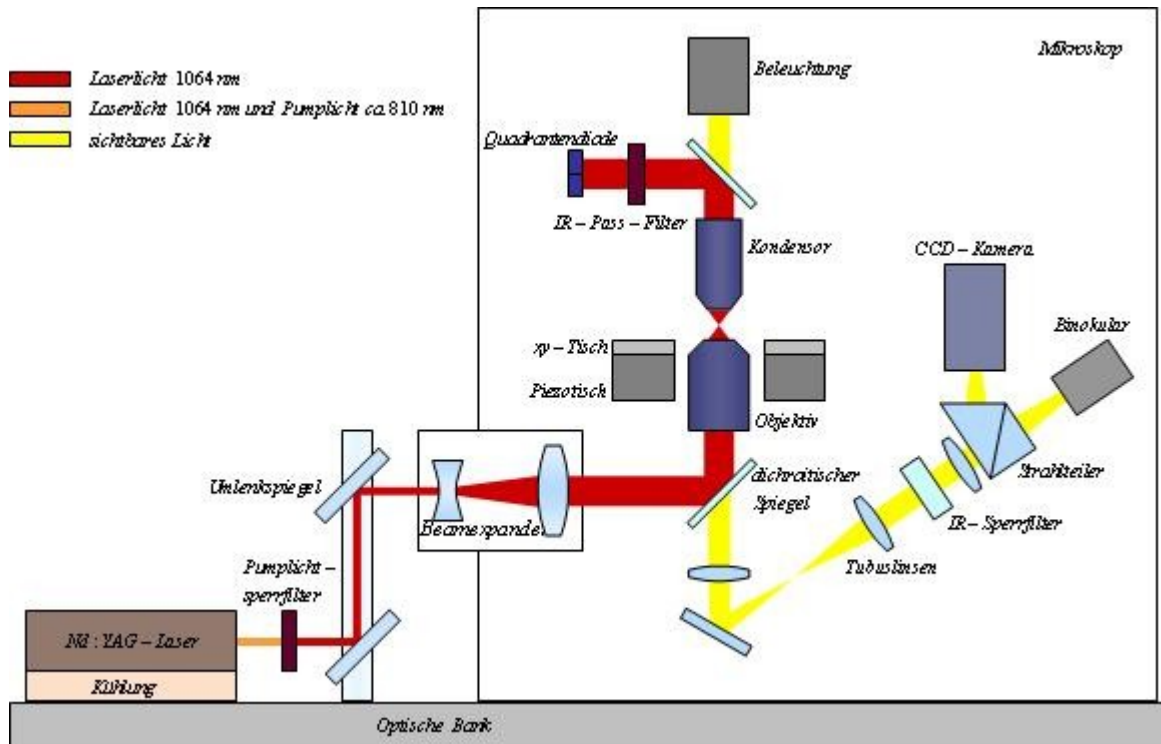


Abb. 9: Schematischer Strahlengang der Optischen Pinzette [AND01]

Was in dieser Abbildung nicht vorhanden ist, ist die Kommunikation mit einem PC. Diese erfolgt an 2 Stellen. Zum einen werden die Spannungs- und Kraftmesswerte von einer analogen Recheneinheit (hergestellt an der Universität Basel) erfasst und über eine PC-Schnittstellenkarte an den Rechner gesendet. Als weiteres Visualisierungswerkzeug wird neben der CCD-Kamera und dem Binokular eine S-Video Karte eingesetzt, welche die Bilder direkt an den Rechner weiterleitet, um so eine optimale Darstellung der Objekte und der ausgeführten Bewegungen zu garantieren.

2.4 Visualisierungsmethoden

Auf Grund der Tatsache, dass keine zufriedenstellenden Ergebnisse gemessen wurden, und der Zustand der Chips untersucht werden musste (Kapitel 4.2), wurde es notwendig die hergestellten und verwendeten Chips einer genaueren Untersuchung zu unterziehen. Hier werde ich nun kurz die eingesetzten Mikroskopie-Methode beschreiben.

2.4.1 Rasterkraftmikroskopie (AFM)²

Die AFM ist neben der Rastertunnelmikroskopie (STM³) eine der beiden primären Anwendungen der Rastersondenmikroskopie (SPM⁴).

Bei der AF-Mikroskopie besitzt man die Möglichkeit, unterschiedlichste Arten von Messungen und bildgebenden Verfahren einzusetzen. Wichtigster Bestandteil dieses Mikroskops ist der Cantilever, ein mikroskopisch dünner Steg an dessen Ende sich eine ca. 90° gewinkelte dreieckige Spitze (Tip) befindet.

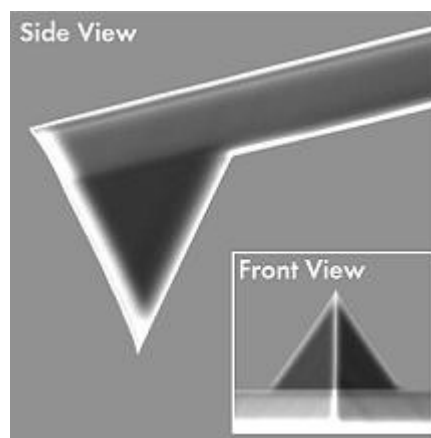


Abb. 10: Cantilever mit Tip [NW]

Gemessen wird immer mit der gleichen Methodik. Der Cantilever wird manuell mechanisch via Stellschrauben in die Nähe der zu untersuchenden Oberfläche gebracht. Die abschließende Annäherung auf wenige Nanometer erfolgt dann elektronisch vom System. Die Messung erfolgt indem der Cantilever mit dem Tip in einem vom Benutzer festgelegten Raster und Geschwindigkeit über die zu untersuchende Probe geführt wird. Dieses Scannen wird umso genauer je kleiner man das Raster und je niedriger die Führungsgeschwindigkeit definiert werden. Der Cantilever wird bei einer Messung durch die Oberflächenstruktur und die daraus resultierenden Wechselwirkungen abgelenkt. Diese Ablenkung wird einem optischen Sensor gemessen und von der Software in ein digitales Bild umgesetzt. Dieser optische Sensor ist ein Laserstrahl, welcher direkt auf die Spitze des Cantilevers gerichtet wird. Dieser Laserstrahl wird von der Spitze reflektiert und wird so durch eine Photodiode in einen Photodetektor geleitet.

2 AFM = Atomic Force Microscopy

3 STM = Scanning Tunneling Microscopy

4 SPM = Scanning Probe Microscopy

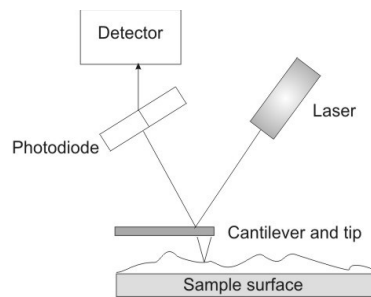


Abb. 11: Strahlengang des Detektionslasers [UT]

Der Detektor misst dann die Änderung des reflektierten Laserstrahls hervorgerufenen Verbiegung des Cantilevers. So können bei optimalen Bedingungen Strukturen von ca. 0,1 bis typischerweise 20 nm aufgelöst werden.

Die möglichen Modi des AFM sind die Bildgebung, Messung der Wechselwirkung oder regelabhängige Systematik. Der für diese Arbeit wichtige Modus ist die Messung der Wechselwirkungen, dies geschieht entweder durch den Kontakt-(a), Nicht-Kontakt-(b) oder den Intermittierenden (Tapping) Modus(c) (Abbildung 12). Gearbeitet wird weitestgehend mit den beiden letztgenannten. Die Begründung hierfür erfolgt im weiteren Verlauf dieser Arbeit in Kapitel 4 anhand deren Vor- und Nachteile.

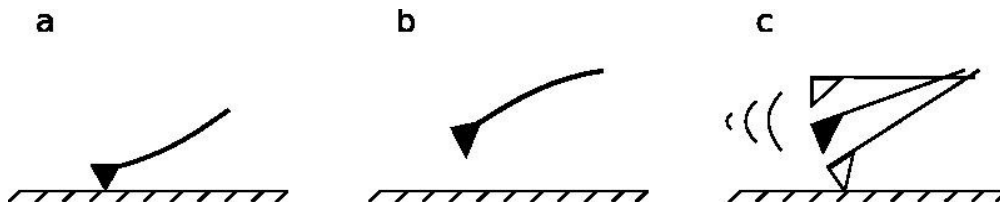


Abb. 12: 3 AFM-Modi [WIKI]

Im Tapping Modus oszilliert der Cantilever so zur Probe, dass er diese nur sehr kurz berührt und dann wieder zurück schwingt. Dies geschieht durch eine sinusförmige Piezoanregung (akustisch oder magnetisch) der Cantileverspitze. Bei der Berührung der Probenoberfläche wird die Oszillation des Cantilevers genau um den Faktor gedämpft, der gleich dem Energieverlust beim Auftreffen auf der Oberfläche ist. Durch diese Reduktion kann ein gutes Eigenschaftenprofil der Probenoberfläche erzeugt werden.

Beim Nicht-Kontakt-Modus berührt der Tip niemals die Oberfläche der Probe. Vielmehr schwebt

der Tip immer in einem Abstand von ca. 50 – 150 Ångström⁵ zu dieser in dem festgelegten Raster entlang. Um das schwache Signal der zwischen Tip und Probenoberfläche herrschenden Van der Waals-Kräfte zuverlässig messen zu können, wird an dem Cantilever eine niedrige Spannung angelegt, welchen selbigen in leicht oszillierende Bewegungen versetzt. Durch die Van der Waals-Kräfte findet dann eine Verschiebung der Amplitude, der Phase, oder der Frequenz statt, die mit den vorhandenen Detektoren erfasst und in ein aussagekräftiges Bild umgewandelt werden kann.

2.4.2 Raster Elektronen Mikroskopie (REM)

Bei dem REM wird ein Elektronenstrahl über die Probe geleitet. Ein Bild des abzubildenden Objektes entsteht durch die Wechselwirkungen der abgeschossenen Elektronen mit dem Objekt. Die Vorteile eines REM liegen in der sehr hohen Tiefenschärfe und in der hohen Vergrößerung von bis zu ca. 1.000.000-fach. Die Nachteile sind die Abhängigkeit der Bildqualität von der Leitfähigkeit des Objektes, denn bei einem nicht oder schlecht leitenden Objekt nimmt der ohnehin nicht gute Kontrast noch weiter ab und verringert so sehr schnell die sonst so gute Tiefenschärfe bei steigender Vergrößerung. Sowohl die Vor- als auch die Nachteile lassen sich gut an der Abbildung 2 aufzeigen.

Elektronen werden bei dem in der Biophysik der Universität Bielefeld vorhandenen Gerät aus einer feinen Wolframkristallspitze mit Hilfe einer sehr hohen elektrischen Spannung von ca. 20 kV heraus geleitet und auf das Objekt beschleunigt. Dieser Elektronenstrahl wird dann in einem hardwarespezifischen Raster über das Objekt geleitet und über die Detektion der Wechselwirkung des Strahls mit dem Objekt Informationen zur Erzeugung eines Bildes gewonnen. Das ganze System arbeitet in einem Vakuum von ca. 10^{-4} bar, um eine Kollision von Luft- oder anderen Schwebeteilchen bestmöglich verhindern zu können.

Die Funktion der optischen Linsen, die Vergrößerung des Objektes in einem gängigen Lichtmikroskop, übernehmen hierbei Elektronenlinsen, die den Elektronenstrahl fokussieren und so die Brennweite manipulieren können.

⁵ 1 Å = 10^{-10} Meter

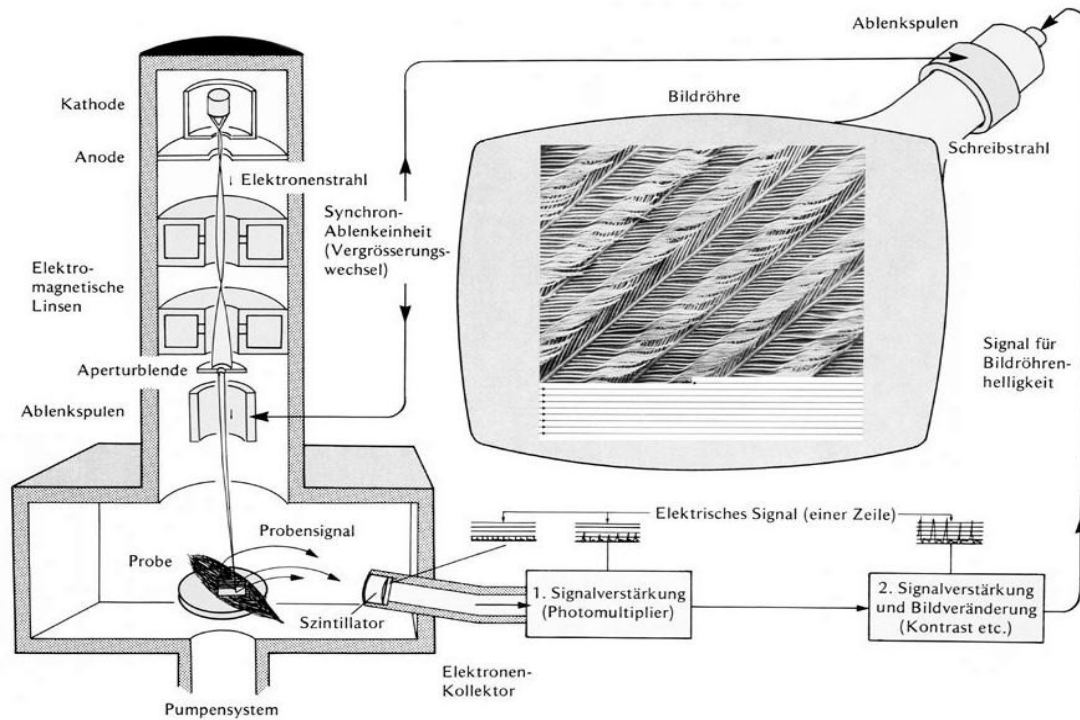


Abb. 13: REM [UB]

2.4.3 Transmissions Elektronen Mikroskopie (TEM)

Ein TEM arbeitet in der Grundstruktur ähnlich wie ein REM. D. h., dass auch bei einem TEM die Elektronen zwischen einer Kathode und einer Anode beschleunigt werden, allerdings mit Hilfe einer Spannung von bis ca. 200 kV bei den gängigen Untersuchungsmethoden. Maximal ist sogar eine Spannung von bis zu 3 MV möglich. Die Manipulation der Brennweite übernehmen auch beim TEM Elektronenlinsen, durch das Fokussieren des Elektronenstrahls. Dieser Elektronenstrahl wird dann auf einen fluoreszierenden Bildschirm auf Film oder auf eine Digitalkamera dargestellt. Auch das TEM arbeitet in einem Vakuumsystem. Wichtigster Unterschied beim TEM ist, der Fakt, dass die Probe von den Elektronen durchstrahlt wird und die Strahlenelektronen hinter der Probe registriert werden. Beeinflussende Faktoren sind somit die Ordnungszahl der Probenatome, sowie die angelegte Beschleunigungsspannung. Diese haben direkten Einfluss auf die nötige Probendicke. Vorteile eines TEM gegenüber einem normalen REM ist die noch größere Tiefenschärfe und der höhere Kontrast. Auch die sinnvolle Erweiterung eines TEM mit weiteren Analysemethoden wie z. B. ein Energiedispersives Röntgenanalysesystem (EDX) kann hinzu gezählt werden.

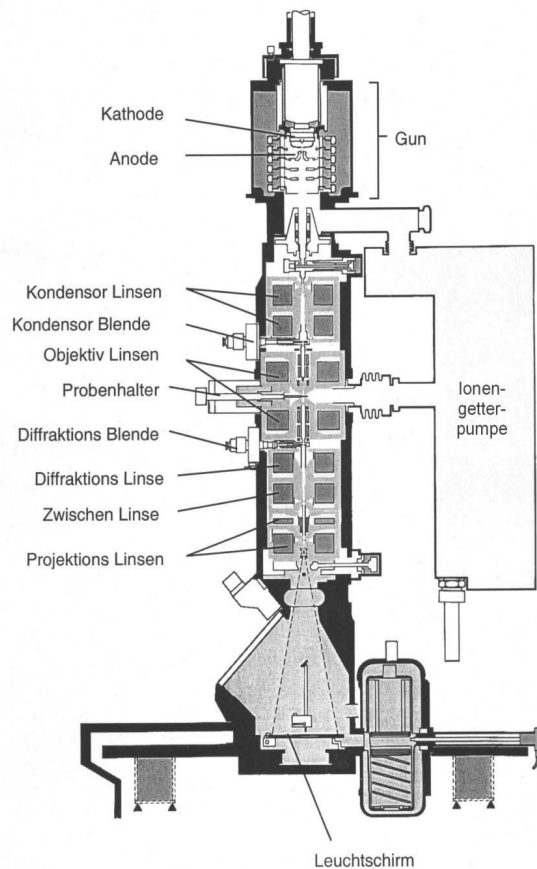


Abb. 14: TEM [ASCH]

2.5 LabVIEW

Im Laufe der Diplomarbeit bestand der Bedarf an einer neuen Software zur Signalerfassung und Steuerung (näheres in Kapitel 4.6). Das gängigste und auch in der Biophysik am häufigsten im Einsatz befindliche Programmierwerkzeug ist LabVIEW von National Instruments.

LabVIEW bedeutet „Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench“. 1986 erschien die erste Version von LabVIEW ausschließlich für Macintosh Computer. Stand heute befindet sich die Software in der Version 8.5 und ist zusätzlich für die Betriebssysteme Windows, Linux sowie Solaris erhältlich.

LabVIEW basiert auf einem graphischen Programmiersystem dessen Basis der Computer und damit verwandte Technologien ist. In Verbindung mit eigens für die Prüf- und Messtechnik konzipierter, bedienfreundlicher Software und modularer Hardware ist LabVIEW eines der am meisten

eingesetzten Ansteuerungstechnik zur Mess- und Automatensteuerung. Die graphische Programmiersprache „G“ basiert auf dem Datenfluss-Modell.

Gründe für den Einsatz der Software in meinem Projekt sind in den gängigen Vorteilen von LabVIEW begründet. Zum einen gestattet es die Software sich einen schnellen Überblick über die Methodik, Logik und Möglichkeiten zu verschaffen, was zu einer vergleichsweise schnellen Programmierung komplexer Strukturen führt. Zum anderen die Möglichkeit, die anzusteuern Elemente und die graphische Benutzeroberfläche für den User zu vereinfachen und so besser handhabbar zu machen. Außerdem wird es durch die große Progammbibliothek und Kommunikationsschnittstellen ermöglicht, mit den meisten naturwissenschaftlichen Instrumenten zu kommunizieren.

2.6 Energiedispersives Röntgenanalysesystem (EDX)

Wie in Kapitel 2.4.3 erwähnt ist es möglich ein TEM mit einem EDX zu erweitern. Ein EDX wird bevorzugt für den Nachweis von Elementen innerhalb einer Probe verwendet, die im Vorfeld nicht exakt bekannt sind.

Um diesen Nachweis erbringen zu können werden die Elektronen aus dem Elektronenstrahl beim Aufprall auf die Atome durch diverse Wechselwirkungen so stark abgebremst, dass eine kontinuierliche Bremsstrahlung entsteht. Die Atome werden von den Elektronen ionisiert, wobei Röntgenstrahlen entstehen, welche eine für jedes Atom unterschiedlich charakteristische Energie aufweisen. Diese Strahlung wird von der Probe emittiert und von dem EDX-System detektiert. So entsteht ein so genanntes EDX-Spektrum. In diesem Spektrum werden alle in der Probe vorhandenen Elemente, vielmehr ihre charakteristische Röntgenstrahlung, als Gaußsche Peaks angezeigt. Die Konzentration des Elementes bestimmt hierbei die Ausprägung eines Peaks. Die Ausprägungen der Peaks unterliegen einigen Störungen, z. B. tritt in Teilen noch die Bremsstrahlung in der Detektion mit auf. Deshalb führt die vorhandenen Software automatisch eine Untergrundkorrektur aus.

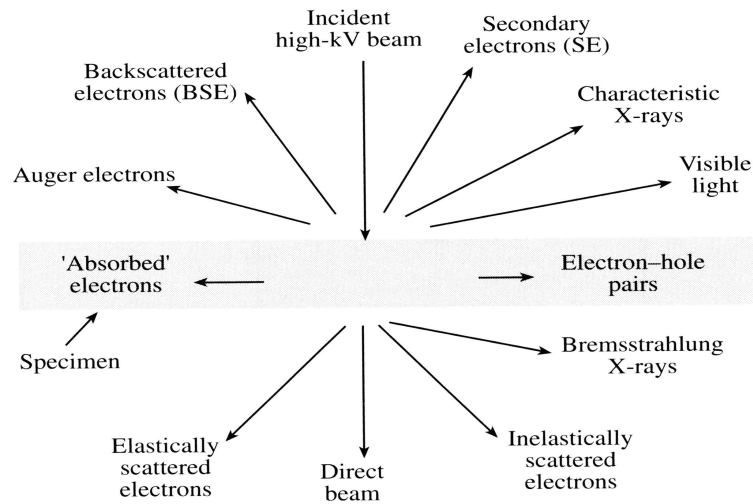


Abb. 15: Effekte bei der Wechselwirkung zwischen Elektronenstrahl und Materie [TUD]

So entsteht ein probenspezifischer Analysegraph, in dem alle vorhandenen Elemente samt Konzentration angezeigt werden. Eine exakte quantitative Analyse kann nun mit Hilfe der Cliff-Lorimer-Gleichung berechnet werden.

$$\frac{C_A}{C_B} = k_{AB} \frac{I_A}{I_B}$$

3 Material und Methoden

Dieses Kapitel skizziert in erster Linie die eingesetzten Materialien und Geräte, die während meiner Diplomarbeit verwendet wurden.

3.1 *Chip mit Nanopore*

Für diese Arbeit wurden Chips mit Nanoporen von der Schweizer Universität Unine in Neuchâtel in der Abteilung von Professor Urs Staufer verwendet. Chips von Prof. Staufer hatten eine Abmessung von 8 x 8 mm in Länge und Breite und eine Dicke von 400 µm.

Des Weiteren wurden Nanoporen in kommerziellen Si₃N₄-Membranen selbst hergestellt. Dafür wurde ein SEM⁶ mit einer fokussierte Ionenstrahl-Anlage (FIB⁷) der Firma Zeiss von der Universität Münster Fakultät für Physik unter der Leitung von Prof. Fuchs verwendet. Da uns Prof. Fuchs das System für einen Test zur Verfügung stellte genügte eine Anschaffung der Chips ohne bereits erzeugte Nanoporen. Somit werden die Chips nun von der Firma SPI Supplies aus West Chester / Pennsylvania (US) bezogen. Diese neuen Chips haben etwas andere Ausmaße als die ursprünglichen. Sie sind in Länge und Breite jeweils 3 mm lang und weisen eine Dicke von ca. 500 µm auf. Der Aufbau der neuen Chips weicht ebenfalls von dem der ursprünglichen ab, denn die Si₃N₄-Membran wird an der Unterseite nicht durch eine Si-Schicht geschützt. Die Ionenstrahl-Anlage musste zur Erzeugung einer Nanopore in Anspruch genommen werden, da in den Chips keine Pore vorhanden ist.

3.2 *DNA*

Für eine biophysikalische Untersuchung des Durchtritts von Makromolekülen durch diese Poren wird mit λ-Phagen DNA gearbeitet. Die Vorteile sind die verhältnismäßig einfache und somit kostengünstige Herstellung dieser DNA, welche für mein Projekt eingekauft wurde. Des Weiteren lässt sich die sehr gut den jeweiligen Anforderung, vor allen Dingen in Puncto Anzahl der

6 SEM = Scanning Elektron Microscope

7 FIB = Focused Ion Beam

Material und Methoden

Basenpaare, anpassen, da die komplette Sequenz der DNA bekannt ist [SANG01] und sie sich so mit Hilfe von Restriktionsenzymen einfach und genau zurecht schneiden lässt. In den gängigen Methoden wird diese λ -DNA aus infizierten E.coli Bakterien gewonnen. Diese DNA besteht aus einem Doppelstrang, wird allerdings im Laufe Präparation für die Ionenstrommessungen für 15 Minuten auf 50°C erhitzt, sodass sich der Doppelstrang in 2 Einzelstränge gleicher Länge spaltet.

In meinem Projekt verwende ich pro Messung ca. 50 μ l DNA mit einer Konzentration von 1 : 10 in einem Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7,8. Die λ -DNA besteht generell aus 48.502 Basenpaare.

3.3 AFM

Meine Untersuchungen fanden an einem MultiMode II der Firma Veeco Instruments Inc. statt.

- Mikroskop: MultiMode SPM head
- Störgeräusch: < 0.3 Å RMS in vertikaler (Z) Dimension w/ Vibrationsisolation
- Probengröße: \leq 15mm Durchmesser; \leq 5mm Dicke
- Tip / Cantilever Halterung:
 - Tapping Mode / Kontakt Mode an Luft (std)
 - Tapping Mode / Kraftregulierung in Flüssigkeit (optional)
 - Kraftregulierung an Luft (optional); elektrische Feld (optional)
 - scanning thermal (optional—verlangt einen größeren Probenkopf oder zusätzliche Programm-Module)
 - STM Konverter (optional)
 - Niedrig-Strom STM Konverter (optional)
 - Kontakt-Mode Flüssigkeitszelle (optional)
 - electrochemischer AFM oder STM Flüssigkeitszelle (optional)
 - electrochemischer Tapping Mode in Flüssigkeitszelle (optional)
- Vibrationsisolation:
 - Silikonpad
- Scanner: AS-12 mit einer Lateral (X-Y) Reichweite von 10 μ m x 10 μ m und einer Vertikalen (Z) Reichweite von 2,5 μ m

3.4 REM

Das REM der Bielefelder Biophysik ist ein JEOL JSM-880 und weist die nachfolgenden Spezifikationen

- Vergrößerung: 10-x bis 300,000-x
- Auflösung: 15 Ångström (mit einer LaB₆-Kathode)
ca. 1,5 nm
- backscattered Elektronendetektor, transmitted Elektronendetektor, Elektronen channelling imaging
- schwenkbarer analytischer Halter
- KeveX Röntgenanalyse-System mit IXRF Software
- Filmsupport für z. B. Sheetfilm oder Polaroid

3.5 TEM

Das eingesetzte TEM ist ein Gemeinschaftsgerät der Fakultät für Physik und Biologie. Es wurde 1996 direkt von der Firma Philips Electron Optics bezogen. 1997 firmierte Philips Electron Optics mit einigen anderen Firmen zur FEI⁸ Tools for Nanotech. Die genaue Bezeichnung lautet Philips CM 200. Die Bilder und die Nanoporen wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV gemacht. Dies sind die weiteren Eigenschaften des TEM:

Hochauflösendes TEM Philips CM 200 Super Twin α

- Emitter: 200kV mit einer LaB₆ - Kathode
- Auflösung: 2.7 Å (Zwillingslinse)
0,24 nm (Punkt) / 0,14 nm (Linie)
- Vergrößerung: 25-x bis 1,1-Mx
- Kameras: gekühlte Slow Scan CCD (1024 x 1024), TV

Analysemöglichkeiten:

⁸ FEI = Focused Electrons and Ions

- HR-TEM
- Feinbereichsbeugung
- Nanoprobe (Doppelkipp-Probenhalter von 3 mm Durchmesser)
- EDX (am CM 200 ist ein Halbleiter-Detektor (Germanium) eingebaut)

- Fine probe and CBED capabilities
- $\pm 70^\circ$ sample tilt ($\pm 45^\circ$ on 2nd tilt)
- Light element X-ray detector

3.6 LabVIEW

Die von mir entwickelten Module wurden komplett in der Version 6i programmiert. Der Grund für die Wahl von LabVIEW ist der, dass es die Software mit der besten Schnittstellen-Ansteuerung ist und die Version 6i ist die am meisten benutzte Version. Außerdem werden die neu entstehenden Programme zunächst auf einem Testrechner installiert, auf dem aus Kompatibilitätsgründen keine weitere Version neben der bereits vorhandenen 6i installiert werden darf.

3.7 Verstärker

Das Hauptarbeitsmittel, mit dessen Hilfe ein Durchtritt der DNA durch die Nanopore gemessen wird ist der Verstärker Axopatch 200 B.

Der Axopatch 200 B weist 3 entscheidende Vorteile auf, welche ihn für einen Einsatz bezüglich meiner Aufgabenstellung prädestinieren.

Das elektrostatische Grundrauschen wurde zu einem vernachlässigbaren Faktor herunter gesetzt, denn bei einem Rauschen von $< 15 \text{ fA}^9$ bei unter 1 kHz, $< 60 \text{ fA}$ bei unter 5kHz und $< 130 \text{ fA}$ bei unter 10 kHz hat dieses einen äußerst geringen Einfluß auf die erhaltenen Messergebnisse.

Der Amplifier erlaubt Feineinstellungen bei der Spannungsanlegung in einem Bereich von unter 1 mV¹⁰ und Feinmessungen des Stroms in einem Bereich von unter 1 pA¹¹. Um hinzugefügte DNA-

9 Femto Ampere = 10^{-15} Ampere

10 Milli Volt = 10^{-3} Volt

11 Pico Ampere = 10^{-12} Ampere

Fragmente in einem elektrischen Feld durch die Nanopore zu treiben, müssen Spannungen von ca. -300 bis +300 mV angelegt werden. Die so zu erwartenden Messergebnisse des Stroms bewegen sich im Rahmen von ca. -200 bis +200 pA.

Eine zusätzliche Eigenschaft des Axopatch 200 B ist der Empfang und die Umsetzung von externen Signalen. Dies bedeutet, dass die Einstellungen und des Amplifiers extern manipuliert werden können. Somit besteht die Möglichkeit einer Ansteuerung durch eine externe Quelle, welche in meinem Fall primär durch eine Datenkarte (National Instruments 6052E mit 333 kSamples/sec und 16 x I / O mit 16-Bit) in einem PC und Sekundär durch eine Instrumentensteuerung als Software (LabVIEW) genutzt wird. Durch die äußerst geringe Abtastfrequenz kann eine Speicherung der Messdaten im μ -Sekundenbereich garantiert werden.

3.8 Optische Pinzette

Die optische Pinzette der Biophysik an der Universität Bielefeld ist ein Eigenbau von Dr. Andy Sischka, welchen er bei der Anfertigung seiner Diplomarbeit und Dissertation aufgebaut hat. Sie besteht aus folgenden Komponenten:

- inverses Mikroskop: „Zeiss Axiovert 100“
- Optische Bank: „Newport“
- Nd:YAG Laser:
 - von „Laser 2000“ Modell LCS-DTL-322; diodengepumpt, im cw-Betrieb mit einer Wellenlänge von 1064 nm
 - TEM₀₀ Strahlquerschnitt beträgt 1,5 mm sowie die Strahldivergenz mit einem halben Öffnungswinkel von 0,8 mrad
- Pumplichtsperrfilter: 2,85 mm dicker RG850 Filter, der bei 810 nm eine Reintransmission von $T < 0,2\%$ hat und bei 1064 nm mehr als 98% hindurchläßt
- Umlenkspiegel: von „New Focus“ mit einer Reflektivität bei 1064 nm von mehr als 95%
- Beamexpander: von „Sill Optics“ mit festem Aufweitungsfaktor von 10x
- dichroitischer Spiegel: 0,9 mm Breite, Reflektivität von 99,6%

- Objektiv: „Olympus UPlanApo / IR 60 x 1,20 W“ mit einem Fokus von 250 μm und einer Transmission bei 1064 nm von $\sim 62\%$
- Kondensator: „Zeiss Epiplan-Neofluar 20 x 0,50“
- Quadrantendiode: „Silicon Detector Corp. SD 380-23-21-051“; effektiver Durchmesser 9,65 mm, spektrale Empfindlichkeit im Bereich von 400 – 1100 nm, allen vier Quadranten ist ein separater Verstärker „OPA-III-Burn-Brown“ nachgeschaltet
- PC-Datenkarte: „National Instruments PCI-6036E“; 16-bit A / D I / O
- CCD-Kamera: „The Imaging Source DMK 3002-IR / C“
- Frame-Grabber-Karte: „The Imaging Source DFG/LC 1“

3.9 SEM mit FIB

Das Gerät der Universität Münster ist ein ZEISS 1540 EsB CrossBeam mit integrierter FIB-Anlage und weist folgende Eigenschaften auf:

- Auflösung: 1,1 nm bei 20 kV
von 512 x 384 bis 3072 x 2304 Pixel
- Vergrößerung: 30-x – 900-kx
- FIB ist ein SIINT 100 mm zeta FIB column mit einer Auflösung von 4 nm bei 30 kV
- 2 Infrarot CCD Kameras

3.10 Benutzte Tools

Für die Steuerung des AFM wurde die mitgelieferte Software Nanoscope III der Firma Veeco Instruments Inc. verwendet. Auch für die Bilddarstellung der so generierten Dateien wird diese Software eingesetzt. Detailliertere Abbildungen der AFM-Dateien werden mit Hilfe der Software **WSxM 4.0 develop 10.3** [HOR] erstellt.

Die Software für den Verstärker ist Axotape in der Version 2.0.2 für MS-DOS.

Dieses Dokument wurde mit Open Office 2.0.3 verfasst.

4 Ergebnisse

Dieses Kapitel greift die in der Einleitung beschriebenen Ziele und Methoden auf und beschreibt deren Abläufe, Problematiken und Ergebnisse in den nachfolgenden Absätzen. Ein Hauptaugenmerk lag dabei bei der Optimierung der Arbeitsabläufe.

4.1 Präparation

Das Hauptaugenmerk meiner Diplomarbeit lag auf dem Nachweis des Translokationsereignisses der DNA durch die Nanopore.

Um diesen Nachweis bringen zu können musste der bestmögliche Ablauf und die besten Verfahrensweisen der Präparation erarbeitet werden und diese in den anschließenden Messungen getestet werden.

Ein paar Dinge sind bei allen Arbeiten mit und an den Chips und den PDMS-Schichten zu beachten. So muss stets darauf geachtet werden, dass kein direkter Hautkontakt mit den Arbeitsmitteln zustande kommt, da diese sonst verschmutzen. Kontakt sollte generell wenn möglich nur mit Handschuhen ohne Puder oder einer speziellen Teflon-Pinzette erfolgen, denn diese fügt den Chips keinerlei mechanische Schäden oder Verschmutzungen zu. Wichtig zu erwähnen bleibt noch die Tatsache, dass nach einer Behandlung der Chips mit Isopropanol äußerst vorsichtig mit der Teflon-Pinzette gearbeitet werden muss, da das Isopropanol das Teflon umgehend zersetzt.

4.1.1 PDMS

Bereits von Prof. Stauer wurde zwingend eine zusätzliche Beschichtung der von seiner Abteilung gelieferten Chips mit einer dünn ca. 300 µm PDMS¹²-Schicht empfohlen. Diese sollte des Weiteren die gleichen Abmessungen wie die Chips und ein Loch an der Stelle des Chip-Trichters haben, damit der Puffer und die DNA ohne Hinderung durch die PDMS-Schicht und dann durch die Pore translokieren können. Gründe für diese Beschichtung sind zum einen der weitere Schutz der Silizium-Schichten und die weitere Verringerung des elektrischen Rauschens sowie der

¹² PDMS (Polydimethylsiloxan) $((\text{CH}_3)_2\text{SiO})_n$ ist ein organisches Polymer auf Siliziumbasis und einem Vernetzer. Es ist farblos; durchsichtig, gilt als ungiftig sowie chemisch inert

mechanischen Belastung. Bei den neuen Chips aus den Vereinigten Staaten [SPI] war dies von weitaus größerer Bedeutung, da die Chips einen etwas anderen Aufbau als die ursprünglichen, von Prof. Staufer gelieferten Chips hatten. Wichtigster Unterschied der beiden Chipsorten war das Fehlen einer der beiden Silizium-Schichten, die die Siliziumnitrid-Schicht schützen. Für die Herstellung des Silikon-Elastomers (PDMS) wird Sylgard 184 (Silikon) mit einem Vernetzer in einer Petri-Schale und in verschiedenen Mischverhältnissen von 10 : 1 bis 5 : 1 gemischt. Das optimale Verhältnis für die Chips liegt bei 8 : 1, denn hierbei ist die Schicht noch flexibel genug um die Druckbelastung durch die Flüssigkeitszelle zum Teil zu absorbieren und starr genug bei diesen Belastungen den ca. 200 µm breiten Kanal nicht zu verschließen. Nach dem Mischen der beiden Substanzen muss die Petri-Schale für ca. 4 Std bei 80°C in einen Ofen, damit sich das eher zähflüssige Gemisch zu einer festen aber flexiblen Masse verbindet. Aus dieser Masse lassen sich, nach dem Abkühlen, zu den Chips passende Stücke inklusive einem ca. 200 µm Kanal durch die Schicht mit einem Skalpell ausschneiden. Wichtig hierbei ist, dass diese Arbeit in einem Reinraum angefertigt werden muss, um eine Verschmutzung größtmöglich zu verhindern. Lagern sich Verschmutzungen auf der PDMS-Schicht ab, führt dies dazu, dass sich der so entstehende PDMS-Chip nur unzureichend mit dem Siliziumchip verbinden lässt. Diese Verbindung wird nach dem gleichen Prinzip erzeugt, wie die zwischen Flüssigkeitskanal und Objektträger welche im letzten Absatz dieses Kapitels beschrieben wird.

Neben den Chips wird PDMS an einer weiteren Stelle eingesetzt. Der Flüssigkeitskanal wird ebenfalls so hergestellt. Das Mischverhältnis ist gleich dem der Chips (8 : 1) und die Modellierung des Kanals muss ebenfalls im Reinraum erfolgen. Folgende Modellierung hat sich bei meinen Arbeiten als optimal herausgestellt:

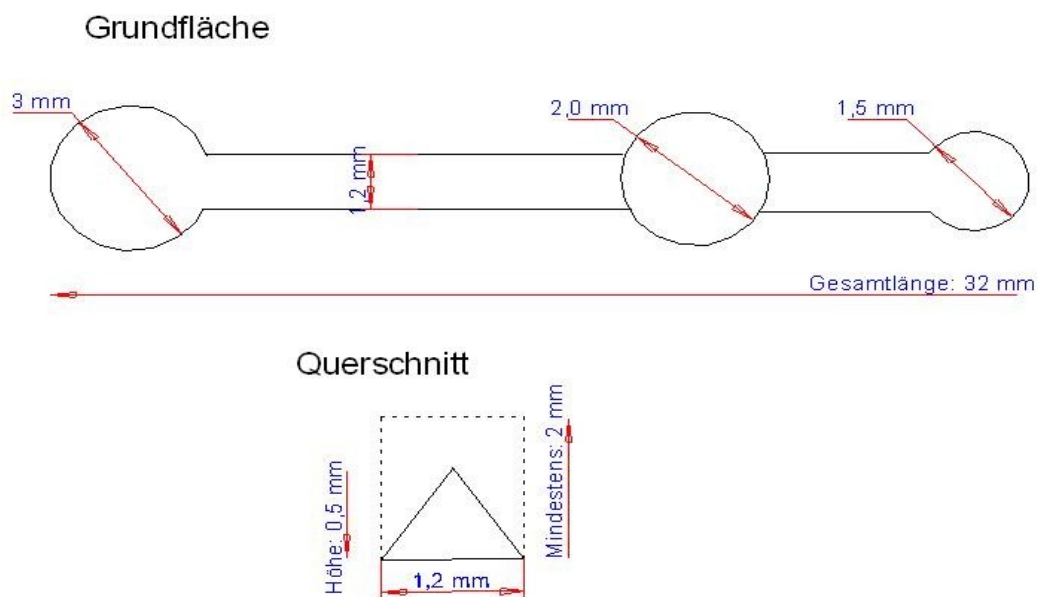


Abb. 16: Kanal-Modell; Herstellungsskizze

Die dargestellten Flächen sind als ausgeschnittene Fläche in der PDMS-Schicht zu interpretieren, in dem später die Flüssigkeit gegeben wird. Diese PDMS-Schicht ist ca. 4 x 2 cm groß. Die Dicke der Schicht ist abhängig von der Größe der Petri-Schale und der Menge des Silikons. Sie sollte sich zwischen 1,5 und 2 mm bewegen, was einer Silikonmenge von 24 g in einer 8,5 cm (im Durchmesser) Petri-Schale entspricht.

In der Grundfläche (Abbildung 16) werden 3 kreisförmige Strukturen deutlich, wobei die rechte (1,5 mm) außer Acht gelassen werden kann. Links wird ein Ausschnitt von 3 mm Durchmesser benötigt um dort die negativ geladenen Elektrode für die Messungen zu platzieren. Auf den Ausschnitt mit einem Durchmesser von 2 mm in der Mitte wird bei der Messung der Chip-Trichter mit der kleineren Öffnung gelegt.

Um den sich häufig wiederholenden Schritt bei der Kanal Modellierung zu vereinfachen ließ ich eine Schablone bei der Mechanischen Werkstatt anfertigen, die 3 der oben beschriebenen Kanäle nebeneinander umfasst und in eine Petri-Schale passt. Während der Ausarbeitung ergab sich ein weiterer Vorteil der Schablone, denn so konnte ich es garantieren, das die schmalen 1,2 mm breiten Stellen des Kanals durch eine hauchdünne PDMS-Schicht bedeckt werden. In dem Querschnitt der Abbildung 16 wird ein Dreiecksstruktur mit einer maximalen Höhe von 0,5 mm deutlich. Aus dieser Struktur ist im Nachhinein eine rechteckige mit selber Höhe und Breite entstanden. Wird die abgekühlte PDMS-Schicht von der Schablone gelöst, entsteht dort ein unten freier Kanal. In diesem

Querschnitt ist weiterhin eine rechteckige Struktur mit einer Mindesthöhe von 2 mm angegeben. Dies bezieht sich auf die in der Grundfläche zu sehenden Kreisstrukturen, die komplett frei bleiben müssen.

Um den Kanal einsatzbereit zu machen wird er zusammen mit einem mit Ethanol gereinigten und mit Stickstoff getrocknetem Objektträger für 30 – 45 Sekunden einem O₂-Plasma ausgesetzt, durch das die Oberfläche gereinigt wird. Zu beachten ist dabei, dass der Kanal mit der oben beschriebenen freien Unterseite dem Plasma ausgesetzt wird, denn diese muss sich dann mit dem Objektträger verbinden. Im direkten Anschluss an diese Aktivierung müssen beide innerhalb von 1 Minute verbunden werden, da sonst die Aktivierung soweit nachlässt, dass sie keine optimale Verbindung garantiert. Beide Teile werden mit der aktivierten Fläche zusammengebracht und durch mechanischen Druck (mit Pinzette oder sauberen Handschuhen ohne Puder) final fixiert. Folgend muss eine Zeit von 30 Minuten, in der sich die kovalenten Bindungen formen und festigen können. Nach dieser Zeit muss der Kanal in Milli-Q bis zur Verwendung gelagert werden um die bei der Behandlung mit dem O₂-Plasma Hydrophilität des Kanals zu erhalten.

4.1.2 Chip

Wenn ein Chip entweder neu ist oder die schützende PDMS-Schicht zur Erneuerung entfernt wurden, sollte man den Chip für ca. 15 Minuten in eine Piranha Lösung¹³ legen. Diese entfernt alle organischen Rückstände von der Oberfläche und der Pore. Anschließend muss der Chip gründlich mit Milli-Q¹⁴ gespült und dann in Milli-Q gelagert werden. Ursprüngliche Arbeitsanweisungen beschrieben als nächsten Schritt die weitere Reinigung des Chips in Ethanol, Aceton und erneut Milli-Q in einem Ultraschallbad. Aufgrund der Erkenntnisse aus Kapitel 4.2 und 4.3 ist eine Reinigung mit Ethanol oder Aceton und anschließend in Milli-Q zu empfehlen, allerdings ist dabei das Ultraschallbad zwingend außer Acht zu lassen. Gelagert werden sollten die Chips dann wieder in Milli-Q.

13 Bestehend aus einer 3 : 1 Mischung aus konzentrierter Schwefelsäure und 30 %-igem Wasserstoffperoxid

14 Destilliertes Wasser mit 18,2 MΩ / cm

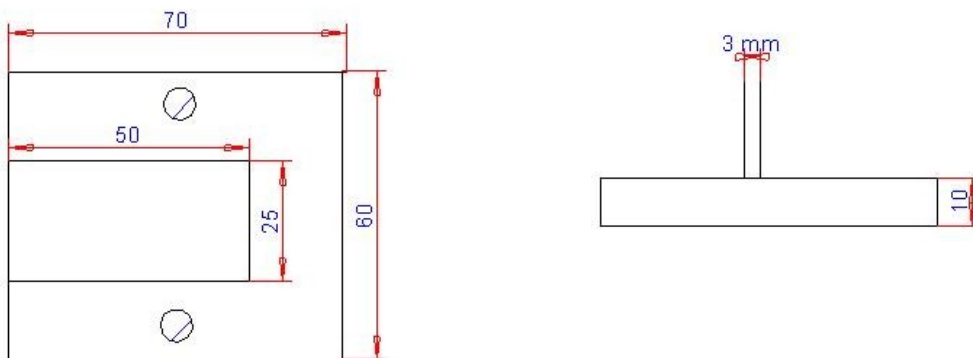
4.2 Messungen im elektrischen Feld

Um einen Chip für Messungen zu präparieren muss zunächst die PDMS-Schicht auf den Chip befestigt werden (Kapitel 4.1.1). Sind bereit vorbereitete Chips in Milli-Q vorhanden, sollte direkt vor dem Zusammenbau der Messzelle nochmals ein Tropfen Isopropanol in den Porentrichter und den Kanal, der durch die PDMS-Schicht führt, gegeben werden, im diese erneut hydrophil zu aktivieren. Der Flüssigkeitskanal, dessen Präparation ebenfalls in Kapitel 4.1.1 beschrieben ist, und der Chip müssen dann so aufeinander gelegt werden, dass die größere und tiefere Öffnung des Chiptrichters von dem Kanal weg zeigt.

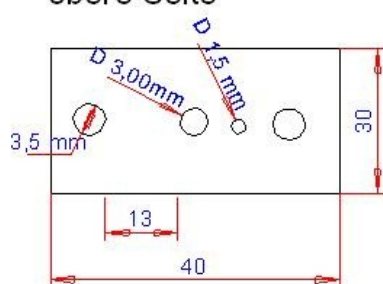
Als nächsten Schritt wird der Objektträger samt Chip in der Messzelle in der dafür vorgesehenen Führung platziert. Entscheidender Aspekt ist, dass der Chiptrichter und das Flüssigkeitsreservoir übereinander liegen, damit die Flüssigkeit von oben und unten an die Pore grenzt. Die Fixierung wird dann mittels der beiden Stellschrauben vorgenommen. Es muss ein gewissen Druck aufgebaut werden, damit keine Flüssigkeit neben den Kanälen oder dem Chip gelangen kann.

Die ursprüngliche Messzelle wird so optimiert, dass folgende Zelle entstanden ist:

UNTERTEIL (Material: PERSPEX)



OBERTEIL (Material: PERSPEX) obere Seite



untere Seite

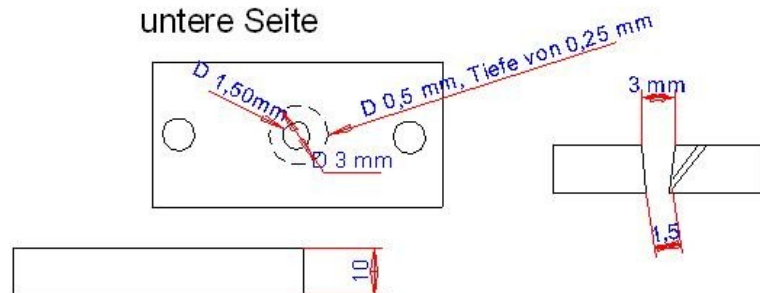


Abb. 17: Bauanleitung der neu konzipierten Messzelle, Herstellungsskizze

Die Optimierungen betrafen das Material (Plexiglas statt Teflon), die Maße (sowohl Ober- als auch Unterteil wurden ein wenig verkleinert) und zusätzliche / modifizierte Führungen. Verändert wurde z. B. das Flüssigkeitsreservoir in dem Oberteil. Dies war in der alten Zelle zylindrisch geformt, während die neue eine Trichterform aufweist. Somit wird weniger Flüssigkeit in das Reservoir gegeben, was die Zeit, welche die später hinzu gegebene DNA benötigt um durch die Flüssigkeitssäule in dem Reservoir zu diffundieren, verkürzt --> kürzere Wartezeit bis zum Eintreten des ersten Events. Weiterhin habe ich einen 1,5 mm breiten Kanal neben dem Reservoir anfertigen lassen. Dieser endet im unteren Drittel des Flüssigkeitssäule und dient als Führung für die positiv geladenen Elektrode. Zusätzlich wurde eine Führung für einen O-Ring mit einem Radius von 3 mm um die kleinere Öffnung des Reservoirs gefräst. Dieser dort zu befestigende O-Ring ist aus Gummi und dient der Absorption des mechanischen Drucks, welche beim festen Anziehen der 2 Schrauben auftritt. Einige vorherige Versuche scheiterten an Rissen durch den Chip, waren allerdings mit bloßem Auge nicht zu erkennen (Kapitel 4.3).

Die Flüssigkeit ist immer ein Puffer mit einem pH-Wert von 7,8 bei 25°C. Er besteht aus 10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl und 1 mM EDTA¹⁵ und beeinflusst nicht die später hinzu gegebene DNA. Mit diesem Puffer werden die ersten Referenzmessungen gemacht, um die Durchlässigkeit der Pore zu kontrollieren. Zu Beginn legt man eine Spannung von 0 mV an und korrigiert den Offset auf 0. Bei einer geöffneten Pore und einem intakten Kanal darf sich dann die Stromstärke nur in einem Bereich von knapp über 0 pA und 3 pA bewegen. Werden diese Werte unterschritten ist entweder die Pore oder der Kanal verstopft, dann muss man die Zelle auseinander bauen und die Durchlässigkeit von beidem erneut kontrollieren. Bei höheren Werten ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass sich die Spannung nicht nur durch die Pore sondern auch um den Chip herum aufbaut. Dies darf nicht sein, da sich dann die DNA nicht zwingend durch die Pore bewegen muss, sondern sich einen anderen Weg gesucht haben kann. Dies ist natürlich nicht das Ziel der Messung. Bewegen sich die Werte in dem oben definierten Bereich erhöht man nach einer konstanten Zeit (ich habe 30 Sekunden gewählt) die Spannung um eine immer gleiche Spannung in mV (bei mir 50). Endspannung sollte in einem Bereich um 500 mV liegen. Das gewünschte Ergebnis ist hierbei eine lineare Volt-Ampere-Charakteristik.

¹⁵ Ethylendiamintetraessigsäure

mV	-500	-450	-400	-350	-300	-250	-200	-150	-100	-50	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
pA	-251	-226	-201	-176	-150	-135	-102	-76	-50	-25	2	27	54	80	106	133	161	189	217	245	303

Tab. 1: Messdaten für Volt-Ampere-Charakteristik

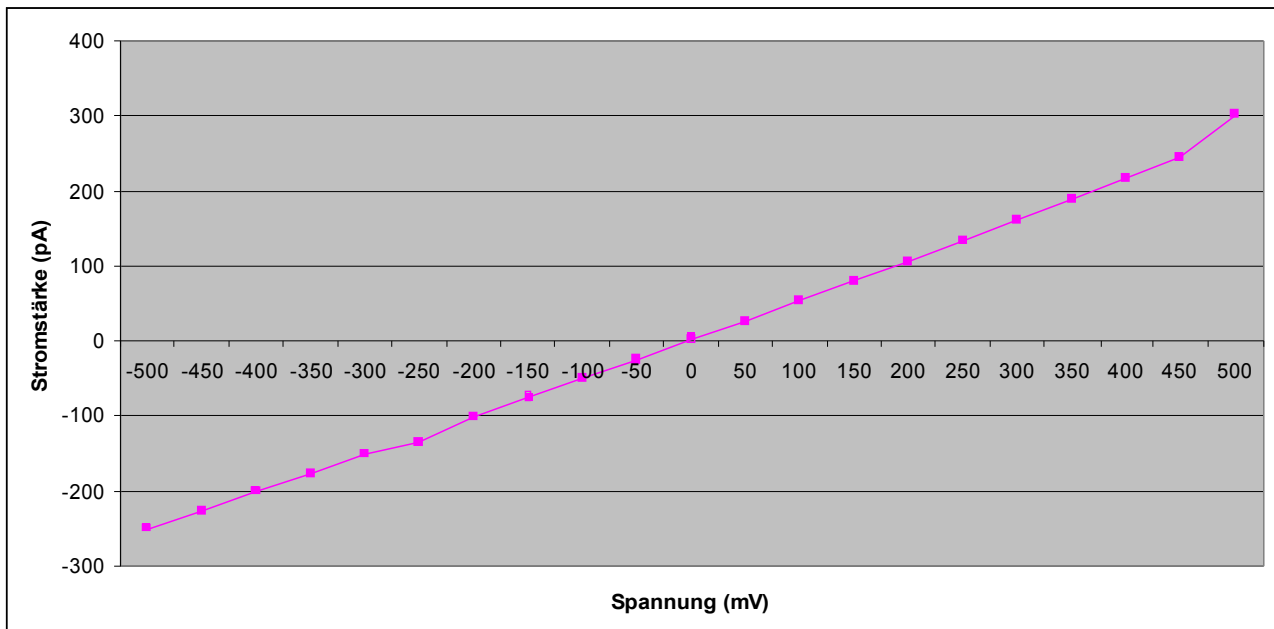


Abb. 18: graphische Darstellung einer gemessenen Volt-Ampere-Charakteristik

Dies ist eine meiner Referenzmessungen, an der man recht gut die Linearität erkennen kann und nach deren erfolgreichen Bestimmung die DNA hinzu gegeben werden kann.

Wichtig ist nun, dass die DNA in das Flüssigkeitsreservoir in der Messzelle gegeben wird und dann dort eine negative Spannung von ca. 100 mV angelegt wird. Dieser in der Literatur [KEY01] beschriebene Wert ließ sich nicht von mir verifizieren, denn die Werte zeigten zu keinem Zeitpunkt der Messungen Anzeichen einer DNA-Translokation durch die Pore an.

4.3 Visualisierung

Alle Versuche adäquate Ergebnisse zu generieren schlugen fehl, ohne dass ein ersichtlicher Grund dafür vorlag. Nachdem ich alle Verfahrensweisen, Herstellungsmethoden und Lösungskonzentrationen nochmals modifiziert und getestet habe, blieben nur noch Chips als mögliche Ursache.

Ergebnisse

Äußerlich waren die Chips intakt, allerdings konnte ich das von den Poren nicht mit Sicherheit sagen. Um dies sicher zu stellen versuchte ich die Poren mittels AFM, REM und TEM sichtbar zu machen.

Als erste Methode setze ich das AFM mit dem Nicht-Kontakt-Modus und dem Tapping-Modus ein. Diese beiden Modi vermeiden eine Zerstörung der äußerst dünnen Si_3N_4 -Schicht dadurch, dass keine mechanische Kraft auf ihr ausgeübt wird. Zusätzlicher Vorteil des Tapping-Modus ist das drastische Höhenunterschiede erfasst werden können, welche bei den Chips an der Stelle des Trichters auftreten. Ergebnis des AFM waren folgende Bilder:

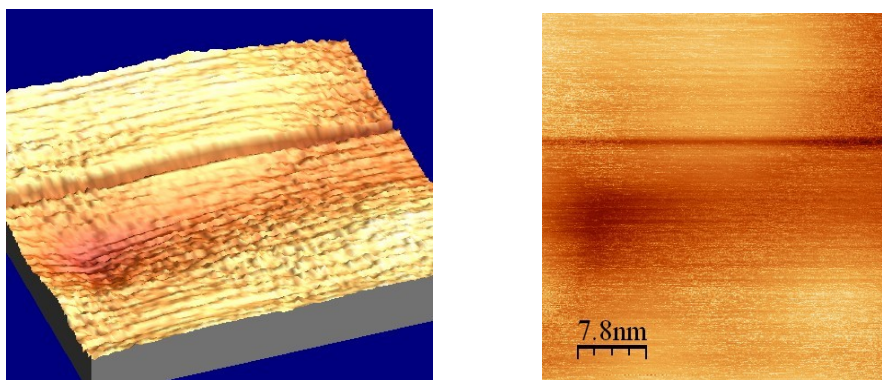


Abb. 19: AFM-Bilder des Chips; Riss in Siliziumschicht

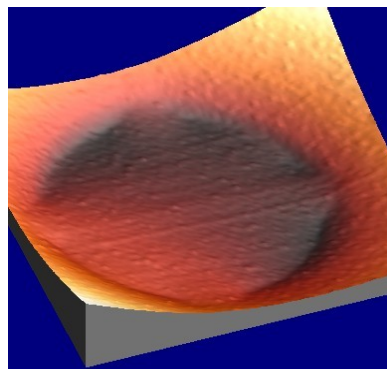


Abb. 20: AFM-Bild des Chips; Trichter

Abbildung 19 zeigt in 2 Versionen deutlich einen Riss, der sich durch große Teile des Chips zieht. Er tritt zumindest in der Oberfläche, also der Siliziumschicht auf. In Abbildung 20 wird eine kreisförmige Vertiefung deutlich, was die Frage aufwarf, welche Struktur das Bild darstellt. Zur Beantwortung genügte ein genauer Blick auf die Maße der Cantilevers und des Tips. Der Tip hat

Ergebnisse

eine Länge von 10 - 15 μm . Wenn man die Tiefe von ca. 200 μm des Chiptrichters hinzunimmt, wird deutlich, dass eine Bildgenerierung der Siliziumnitridschicht und im Speziellen der Nanopore mit dieser Art von Tip nicht möglich ist, denn der Tip reicht nicht ansatzweise bis in die Nähe der Schicht hinunter. Somit ist die Länge des Tips der entscheidend limitierende Faktor bei der AFM. Da die Ausgangsfrage nach dem Zustand der Chips nicht abschließend beantwortet werden konnte wurde eine Bildgebung mittels REM getestet. Auch bei dieser Bildgebung stieß ich schnell an die Grenzen des Systems, denn die Tatsache, dass die Siliziumnitridschicht nur sehr schlecht leitend ist führt zu sehr unscharfen Bildern bei einer hohen Vergrößerung.

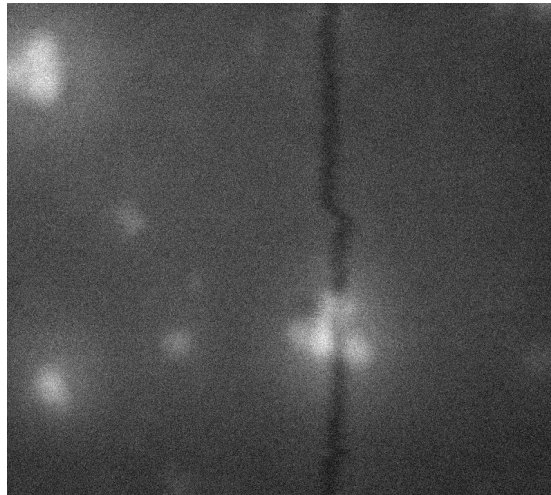


Abb. 21: REM-Bild des Risses; weiße Flecken sind Verunreinigungen

Diese Unschärfe wird in Abbildung 21 deutlich, wie auch die Konturen des bereits beim AFM entdeckte Riss im Chip. Die weißen Flecken sind nicht näher identifizierte Verunreinigungen. Somit wurde als nächstes das TEM mit einem neuen Chip getestet. Um in den Probenhalter des Gerätes zu passen musste der Chip auf eine Größe von 3 x 3 mm mit einer Ultraschallsäge geschnitten werden, was später zu einem weiteren Problem führte. Das Ergebnis (Abbildung 22) war leider ebenso wenig aussagekräftig wie die beiden vorherigen Visualisierungsmethoden, allerdings trat an diesem Punkt erstmals die Vermutung auf, dass die Siliziumnitridschicht zu einem noch nicht näher erkenntlichen Grad beschädigt ist.

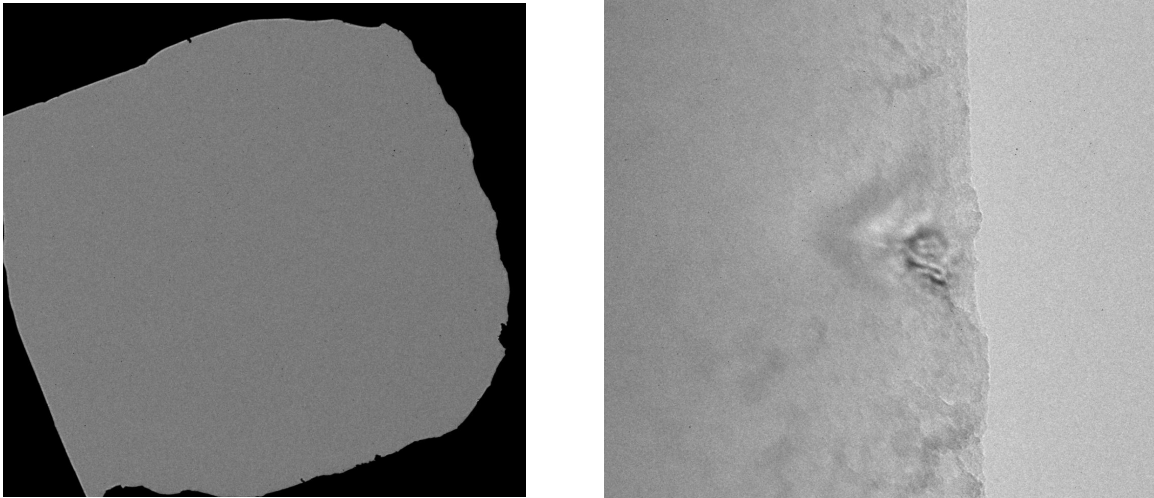


Abb. 22: TEM-Bild der vermeintlichen Si_3N_4 -Membran; rechts: Übergang Trichter und Membran

Gewissheit erlangte ich nachdem das EDX-System die stoffliche Zusammensetzung der Probe analysierte. Das Ergebnis wird in Abbildung 23 und der anschließenden Tabelle verdeutlicht.

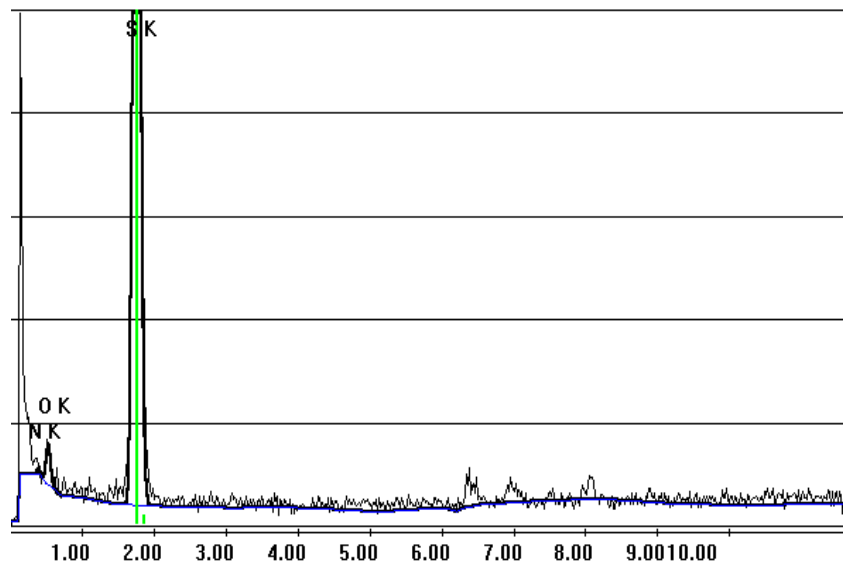


Abb. 23: EDX-Analyse der TEM-Probe

Properties:	N K	O K	S K
Weight % by Element	1.41	5.36	93.23
Atomic % by Element	2.68	8.92	88.40
Xpt	1.083	0.563	0.028
Net Intensities	0.18	1.37	69.86
Background Intensities	1.98	1.59	1.04
Intensity Errors	59.84	9.35	0.90

Tab. 2: EDX-Analyse; Prozentzahlen für das Nitrid und den Sauerstoff zeigt deren minimale Anzahl und deutet auf eine Zerstörung der Nitridschicht hin

Dies bedeutet, dass die Siliziumnitridschicht nahezu komplett entfernt wurde und somit auch kein Loch mehr vorhanden ist. Somit ist die DNA nicht durch eine ca. 20 nm Pore diffundiert, vielmehr war die schmalste Stelle der Probe der Trichter mit einer Breite von ca. 200 μm . Diese Größe des Lochs führt in den Strommessungen zu keinerlei Event, welches die Translokation der DNA anzeigen würde. Die Zerstörung der Schicht verdeutlichte ich nochmals mittels einer Bedampfung des Chips mit einer Goldschicht.

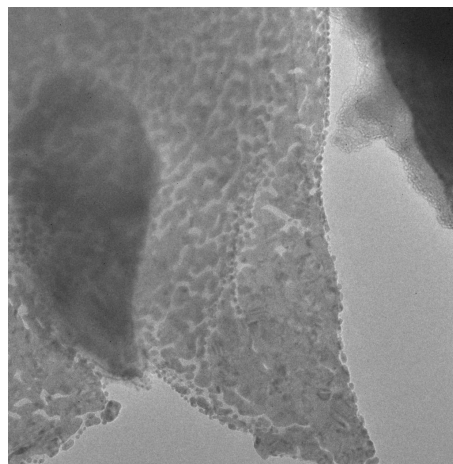


Abb. 24: TEM-Bild der mit Gold bedampften zerstörten Membran

Da nun die Frage nach dem Zustand der Poren geklärt wurde musste der Grund dieser Zerstörung identifiziert werden. Experimentell waren zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Messungen möglich, da alle vorhandenen Poren zerstört wurden. In einer Diskussion mit der Universität in Delft wurde der Verdacht bestätigt, dass die Schicht durch eine Ultraschallbehandlung zerstört wurde. Die Chips

kamen, wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, zur Reinigung in ein Ultraschallbad. Dieses muss gleich zu Beginn die Nitridschicht zerstört haben. Bei dem neuen Chip, welcher ohne das Bad in dem TEM Probenhalter platziert wurde, musste die Größe verkleinert werden und dies geschah mittels Ultraschallsäge. Dies liefert die Erklärung, warum ich keine Translokationsevents messen konnte.

4.4 Porenherstellung

Da davon auszugehen war, dass alle vorhandenen Chips durch eine Ultraschallbehandlung zerstört wurden (Kapitel 4.3), wurde neue Chips aus den Vereinigten Staaten bezogen. Die Eigenart dieser Chips (Kapitel 3.1) war neben dem veränderten Aufbau auch die Tatsache, dass sie ohne Nanopore ausgeliefert wurden. Die Universität Münster stellte uns dafür ihre Ionenstrahl-Anlage zur Verfügung.

Die Verfahren zur sicheren Erzeugung der Pore mit gewünschter Größe (Lithographie und Elektronenzähler; Kapitel 2.1) konnten leider bei den neuen noch keine Anwendung finden, da beide Systeme weder an der Universität Münster, noch an der Universität Bielefeld vorhanden sind. Stattdessen wurde die vorhandene fokussierte Ionenstrahl- bzw. Elektronenstrahl-Anlage verwendet. Die Aufgabe bestand also darin zuerst ein möglichst kleines Loch zu schaffen und anschließend dieses Verfahren zu optimieren.

An der Universität Münster testete ich einmal einen möglichst stark fokussierten Ionenstrahl und einen weniger fokussierten mit längerer Einwirkdauer von mehreren Minuten. Bei der ersten Methode wurde zuverlässig nach wenigen Millisekunden, leider begrenzt durch die Klickgeschwindigkeit der Maus, welche den Ionenstrahl aktivieren und wieder deaktivieren muss, zuverlässig ein Loch in dem Bereich zwischen 50 bis 80 nm erzeugt (siehe Abbildung 4). Diese Methode kann mit einem spontanen „Durchschuss“ der Nitridschicht interpretiert werden. Die zweite Methode ist absolut nicht zuverlässig, da weder die genaue Zeit noch die Anzahl der Löcher auf 1 begrenzt geschweige denn die Größe des Loches bestimmt werden kann. Das Ergebnis dieses Versuchs sehen sie in Abbildung 25 am oberen Rand.

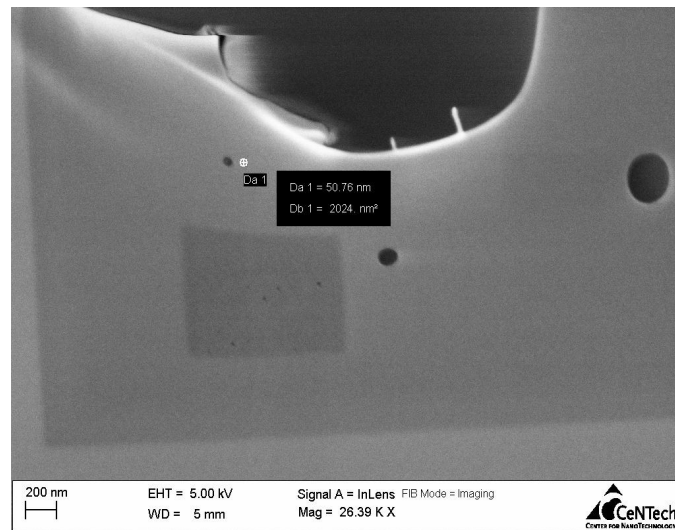


Abb. 25: TEM-Bild einiger Ergebnisse der Porenerstellung

Um im weiteren Verlauf erneut Messungen machen zu können, wurden 10 Poren mit der ersten Methode erzeugt.

Das TEM der Universität Bielefeld arbeitet mit einem fokussierten Elektronenstrahl, welcher aber nicht so variabel zu konfigurieren ist, wie der oben genannte. Dort standen nur 7 Spotdurchmesser des Strahls zur Verfügung. Diese charakterisieren sich so, dass bei einem geringeren Durchmesser die Intensität des Strahls steigt. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen verwendete ich eine Spotgröße von 25 nm und begann mit einer Beschussdauer von 45 Minuten, welche bei einem positiven Ergebnis, also der Erzeugung einer Pore, sukzessive verringert wurde. Das Ergebnis einer Versuchsreihe sehen sie in Abbildung 26.

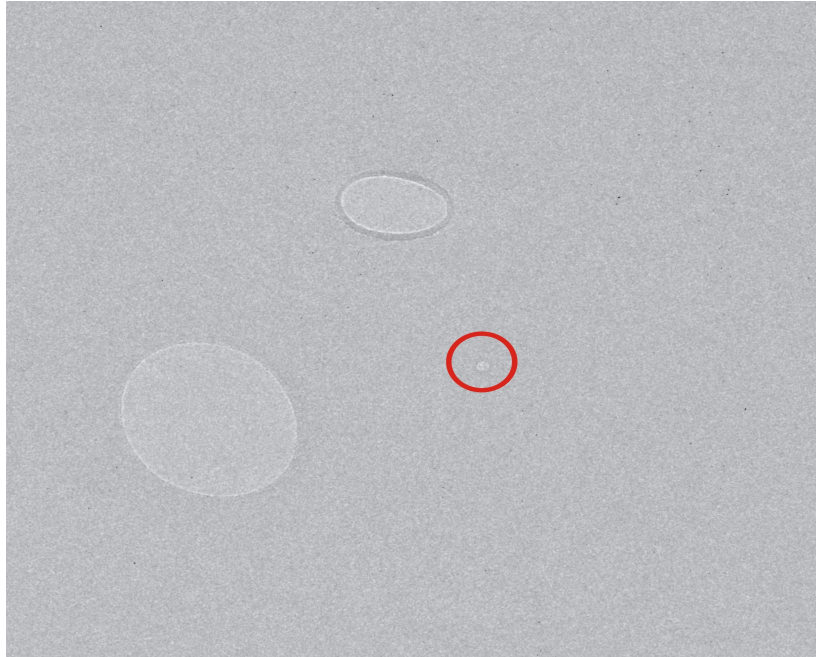


Abb. 26: selbst erstellte Poren mit Durchmessern von 9 nm, 45 nm und 80 nm (SEM)

Die ca. 80 nm große Pore wurde bei einer Beschusszeit von 40 Minuten und die 45 nm Pore bei ca. 30 Minuten erzeugt. Als „Zufallsprodukt“ muss die 9 nm Pore angesehen werden, denn sie entstand nicht während eines Beschusses, sondern durch Umwelteinflüsse. Es gab einen so genannten „Überschlag“ (kurze elektrostatische Entladung durch eine extrem hohe Feldstärke zwischen 2 Leitern). Somit ist dieses eigentlich optimale Ergebnis nicht reproduzierbar.

Eine getestete und bewiesene Zuordnung der Beschusszeit zur erhaltenen Porengröße konnte nicht abschließend ermittelt werden, da der Drift des Gerätes (der Elektronenstrahl „wanderte“ während des Beschusses stetig unkontrollierbar auf der Si_3N_4 -Membran) bewirkte, dass zum größten Teil keine Poren mehr entstanden sind. Eine weitere Auffälligkeit die nicht in meiner Arbeit schlüssig erklärt werden konnte, ist der anscheinend „spontane“ Durchschuss durch die Membran. Bei den Methoden an der Universität Münster wurde schon nach ca. 5 Minuten Beschusszeit eine Ausdünnung der Membran sichtbar, was bei den letzten Versuchen zu keinem Zeitpunkt der Fall war.

Poren mit einem mittleren Durchmesser von 50 – 60 nm wurden zusätzlich mit Aluminium. Ziel dieses Versuches war eine Verkleinerung des Durchmessers zu erreichen. Bei einem Bedampfungszeit con ca. 30 Sekunden wurde eine Verringerung der Durchmessers um ca. 10 nm gemessen.

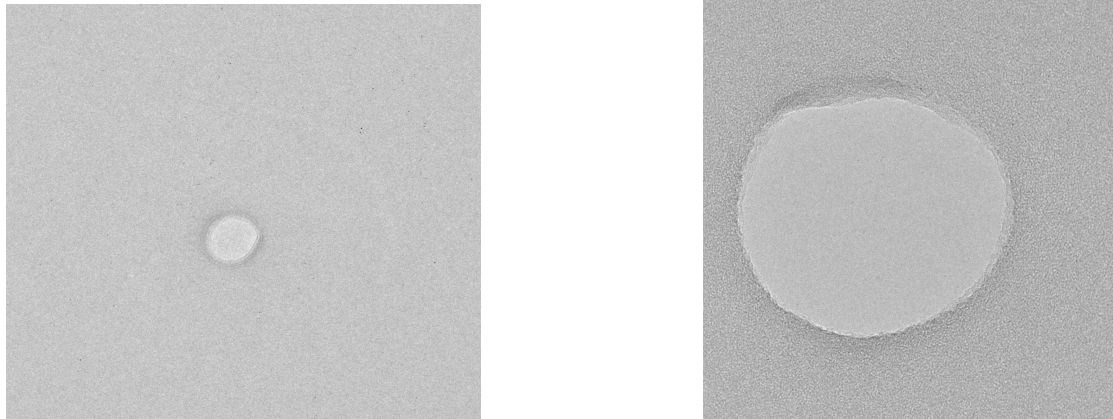


Abb. 27: durch Al-Bedampfung verkleinerte Poren

4.5 Optische Pinzette

Die optische Pinzette musste vom Aufbau soweit geändert werden, dass eine Messung erst ermöglicht wird. Dazu war es notwendig die ursprüngliche Pinzette (Kapitel 2.3 und 3.8) mit dem Messaufbau der Pore (Verstärker, Haltevorrichtung für die Messzelle und Sicherstellung der Flüssigkeitszufuhr und -austausches) zu kombinieren. Die theoretische Konzeption des neuen Aufbaus wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Andy Sischka und Nadja Hristova-Betow angefertigt und letztendlich von Dr. Sischka praktisch umgesetzt.

Um die ursprüngliche optische Pinzette wurde ein Faradayscher Käfig gebaut, der den Innenraum gegen jegliche Art von elektrischen Einflüssen abschirmt und so die Messungen nicht verfälscht. Die Flüssigkeitszufuhr geschieht über 3 Reservoirs außerhalb der Zelle, durch eine Pumpe (PTFE-Tubing) in die Messzelle hinein. Von dort wird sie wieder aus dem Faradayschen Käfig hinaus in ein Auffangbehälter geleitet. Diese 3 Reservoirs beinhalten den üblichen Puffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl und 1 mM EDTA), den Puffer mit den Beads (in diesem Falle Polystyrolkugeln) und den Puffer mit der λ -Phagen DNA. Diese Reservoirs lassen sich über eine Software¹⁶ separat ansteuern.

¹⁶ Entwickelt von Dr. Sischka

4.6 Software

Messungen wurden zu Beginn meiner Arbeit auf einem Rechner unter Windows 98 bzw. MS-DOS angezeigt und abgespeichert. Auch die software-seitig angebotenen Features waren äußerst kompliziert und begrenzt. Dadurch war es notwendig eine eigene Software zu schreiben um ein Update des Rechner Betriebssystems von Windows 98 auf mindestens Windows 2000 gewährleisten zu können.

Die neue Software „Nanopore.vi“, geschrieben unter LabVIEW 6i, ermöglicht eine beliebige Wahl des Betriebssystems. Einzige Voraussetzung ist eine LabVIEW-Installation ab der Version 6i aufwärts, da alle nachfolgenden Versionen abwärtskompatibel¹⁷ sind.

Gegeben ist weiterhin die reine Darstellung der Messungen. Dabei liest das Programm die Daten aus dem Verstärker aus und zeigt sie in einem Graphen in Echtzeit an. Die entscheidendste Neuerung ist die Tatsache, dass nun der Verstärker via PC steuerbar ist. Die Spannung kann so direkt am PC eingestellt und manipuliert werden. Außerdem werden so diverse Automatismen, wie z. B. kann eine automatische Analyse der Volt-Ampere-Charakteristik angefertigt werden, ermöglicht.

Grundlage der Funktionsweise waren zum einen meine Erfahrungen und Erkenntnisse während der Arbeit an der veralteten Software, sowie die Wünsche und Äußerungen von Nadja Hristova-Betow, die ursprünglich weiter an diesem Projekt arbeiten sollte.

Die Abbildung 30 zeigt die Benutzeroberfläche und Abbildung 31 einen Teil des Programmaufbaus.

¹⁷ Möglichkeit Programme älterer Versionen sind ausführbar

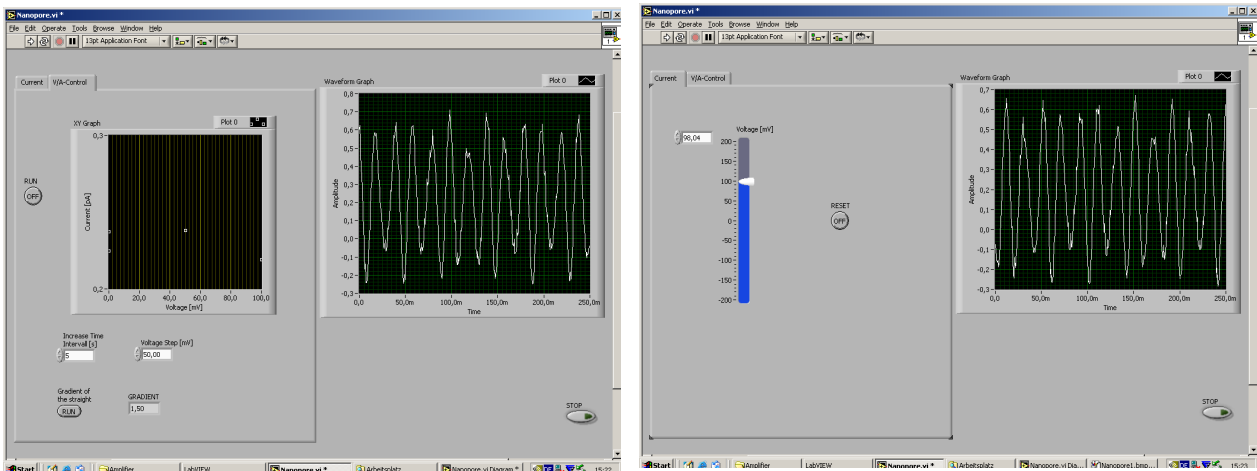


Abb. 30: Benutzeroberfläche der Software, links: automatische Volt-Ampere-Charakteristik; rechts: manuelle Spannungseinstellung

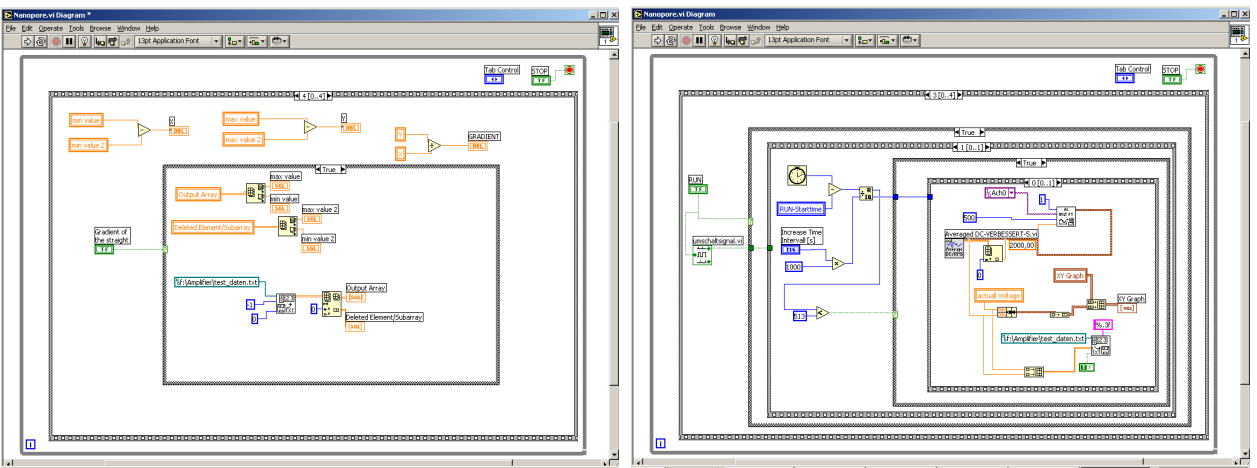


Abb. 31: 2 beispielhafte Programmierungen in der Blockansicht

5 Diskussion

Ein Ziel dieser Arbeit war die Definition einer Verfahrensreihe bei deren Einhaltung sich garantierte Messergebnisse erzielen lassen. Diese Messergebnisse sollten Durchtritte von λ -Phagen DNA durch Nanoporen zuverlässig darstellen.

Leider konnte schon dieses erste Ziel, welches die Grundlage alle weiteren Ziele darstellen sollte, bereits nicht vollständig erreicht werden. Durch Fehler in der Präparation der Chips wurden diese bereits vor dem Beginn meiner Diplomarbeit irreversibel beschädigt. Grund dieses fehlerhaften Umgangs war die angedachte Reinigung der Chips von möglichst vielen organischen und anorganischen Rückständen und Ablagerungen, welche sich beim Transport und bei dem Umgang mit den Chips auf diesen abgesetzt haben. Das Ultraschallbad versetzte die Si_3N_4 -Membran so in Schwingung, dass diese bis auf wenige Rückstände an der Trichterwand zerstört wurde. Somit war keine Pore mehr vorhanden und die DNA konnte ohne Wechselwirkungen durch das jetzt ca. 200 μm Loch wandern. Es konnten deshalb keinerlei Events gemessen werden. Erfolgreich war hingegen die Definition der Verfahrensreihe bis hin zu den abschließenden Messungen. Es wurde die Mischung des Puffers festgelegt und das Mischverhältnis für die PDMS-Schichten optimiert.

Durch diese Schwierigkeiten bereits während der ersten Hälfte der Arbeit musste ich einige Versuche anfertigen um die Gründe dessen festzustellen. Um die Chips und die Pore untersuchen zu können mussten in einer Art „Try-and-Error“ Verfahren eine Möglichkeit gefunden werden ein Bild der Pore zu bekommen. Das AFM und das REM erwiesen sich als wenig hilfreich, allerdings konnte bereits in diesem Stadium eine Beschädigung (Riss) eines Chips erkannt werden. Die Pore bzw. schon die Si_3N_4 -Membran konnte nicht sichtbar gemacht werden. Dies gelang erst nach der Bedampfung eines Chips mit einer dünnen Gold-Schicht und einer anschließenden Darstellung mit Hilfe eines TEM. Dort wurde eindeutig anhand eines alten Chips bewiesen werden, dass die Membran zerstört wurde. Durch einen zweiten, außer einer Anpassung der Probengröße an die Probenhalter des TEM (Ultraschallsäge), unbehandelten Chip konnte ich den Grund für die aufgetretenen Zerstörungen entdecken. Beide Chips unterschieden sich in der Behandlung bis zur Bildgenerierung in allen Punkten, außer der Tatsache, dass beide mit einem Ultraschallgerät in Berührung gekommen sind.

Um neue Messungen starten zu können wurden neue Chips benötigt. So wurde die Herstellung einer nanopösen Struktur ein weiterer nicht geplanter Teil dieser Arbeit. Zwei Möglichkeiten waren

Diskussion

in der kürze der Zeit möglich, wobei beide die gleiche Methode eines FIB anwenden, allerdings mit unterschiedlichen Geräten und Konfigurationen. Nach einigen Tests wurden ca. 20 Chips mit einem genau bekannten Durchmesser der Pore erzeugt, welche in den späteren Tests eingesetzt werden konnten. Diese Tests wurden nicht von mir vorgenommen, da aufgrund von unpraktikablen Softwareprodukten ein Bedarf an einer Aktualisierung auf kam.

Um diese Funktionalität zu gewährleisten programmierte ich ein neues Messmodul nach den Wünschen und Erfahrungen der an dem Projekt beteiligten Personen.

Weiterhin gab es das Ziel, die vorhandenen Aufbauten der Nanoporen-Messung mit der optischen Pinzette zu vereinen. Dies wurde durch eine theoretische Ausarbeitung der involvierten Personen (Dr. Sischka, Nadja Hristova-Betow und mir) und der praktischen Umsetzung von Dr. Sischka erreicht.

Als Fazit kann ich an dieser Stelle leider nur von einer teilweise gelungenen Umsetzung der im Vorfeld definierten Ziele sprechen. Hauptgrund war der mangelnde Kenntnisstand und dadurch ein unsachgemäßer Umgang mit den Poren zum Zeitpunkt der Übergabe an mich. Dieser wurde während meiner Arbeit verbessert was in Zukunft, so bleibt zu hoffen, zu besseren Messungen führen wird. Die neuen Proben müssen abschließend getestet werden. Diese Tests sollten direkt mittels der neuen Software und an der optischen Pinzette erfolgen.

Bezüglich der Porenherstellung bleibt zu sagen, das die einzig zuverlässige Methode, welche momentan im Rahmen der Möglichkeiten der Biophysik sinnvoll ist, die fokussierte Ionenstrahl-Anlage an der Universität Münster ist. Eine weitere Optimierung der Methode in Bielefeld ist weiterhin notwendig und wegen der besseren Flexibilität und Verfügbarkeit ratsam.

6 Abkürzungsverzeichnis

AFM	Raster Kraft Mikroskopie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	Energiedispersiven Röntgenanalysesystems
FIB	Focused Ion Beam
PDMS	Polydimethylsiloxan $((\text{CH}_3)_2\text{SiO})_n$
REM	Raster Elektronen Mikroskopie
SEM	Scanning Electron Microscopy
Si	Silizium
Si₃N₄	Siliziumnitrid
SiO₂	Siliziumoxid
SPM	Rastersondenmikroskopie
TEM	Transmissions Elektronen Mikroskopie

7 Quellenverzeichnis

7.1 Literaturverzeichnis

[SANG01]

Sanger, F. et. Al

Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA.

J. Mo. Biol.; 162; 729 – 730 (1982)

[KEY01]

Ulrich F. Keyser; Bernard N. Koeleman; Stijn van Dorp; Diego Krapf; Ralph M. M. Smeets; Serge G. Lemay; Nynke H. Dekker and Cees Dekker:

Direct Force Measurements on DNA in a solid-state nanopore

nano physics; Vol. 2; (July 2006)

[STO01]

A. J. Storm; J. H. Chen; X. S. Ling; H.W. Zanderbergen and C. Dekker

Fabrication of solid-state nanopores with single-nanometre precision

nature materials; Vol. 2; (August 2003)

[STO02]

Arnold J. Storm; Cornelis Storm; Jianghua Chen; Henny Zandbergen; Jean-Francois Joanny and Cees Dekker

Fast DNA Translocation through a Solid-State Nanopore

American Chemical Society; Vol. 5; No. 7; (July 2005)

[AJA]

Ajayan, P. M. & Iijima, S.

Electron-beam-enhanced flow and instability in amorphous silica fibres and tips.

Phil.Mag. Lett. (1992)

[AND01]

Andy Sischka - Diplomarbeit
Aufbau einer optischen Pinzette
(Juni 2002)

[AND02]

Andy Sischka - Dissertation
Kraftspektroskopie und Einzelmoleküldetektion mit der optischen Pinzette
(November 2005)

[Gerth]

C. Gerthsen, H. Vogel
Physik
17. Auflage, Springer Verlag, (1993)

[Ash01]

A. Ashkin
Acceleration and trapping of particles by radiation pressure
Phys. Rev. Lett. 24, Seite 156-159, (1970)

[Ash02]

A. Ashkin
Optical Trapping and manipulating of neutral particles using lasers
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, Seite 4853-4860, (Mai 1997)

[TUD]

Technische Universität Darmstadt, Praktikum Methoden der Materialwissenschaft
Transmissionselektronenmikroskopie II; Analytisches TEM
(April 2000)

[ASCH]

Andreas Aschentrup, Dissertation

Zusammenhang von strukturellen, chemischen und röntgenoptischen Eigenschaften mittels MOCVD und Elektronenstrahlverdampfung hergestellter Mo/Si und W/Si Multischichten

(November 2003)

7.2 Internetquellen

[WIKI]

<http://de.wikipedia.org/>

[SPI]

<http://www.2spi.com/>

[NW]

<http://www.nanoworld.com/>

[HOR]

I. Horcas; R. Fernandez; J.M. Gomez-Rodriguez; J. Colchero; J. Gomez-Herrero and A. M. Baro

Rev. Sci. Instrum. 78; 013705 (2007)

[UT]

<http://www.uni-tuebingen.de/>

[UB]

Zentrum Mikroskopie der Universität Basel

Biozentrum / Pharmazentrum

7.3 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1: Aufbau der Chips von Prof. Staufer

Abbildung 2: Oberfläche des Silizium-Chips mit Trichter zur Pore (REM)

Abbildung 3: Trichter, der zu dem rechteckigen Si_3N_4 -Membranfenster führt (TEM)

Abbildung 4.: Mit einem FIB erzeugte Pore in einer Si_3N_4 Membran (TEM)

Abbildung 5: schrumpfender Porendurchmesser bei andauerndem Ionenbeschuss

Abbildung 6: Anfänglicher Porendurchmesser bestimmt das Verhalten bei andauerndem Ionenbeschuss

Abbildung 7: Translokation dargestellt an der Veränderung im Ionenstrom

Abbildung 8: Dauer des Durchtritts in Abhängigkeit der Basenpaare

Abbildung 9: Schematischer Strahlengang der Optischen Pinzette

Abbildung 10: Cantilever mit Tip

Abbildung 11: Strahlengang des Detektionslasers

Abbildung 12: 3 AFM-Modi

Permission is granted to copy, distribute and/or modify [this document](#) under the terms of the [GNU Free Documentation License](#), Version 1.2 or any later version published by the [Free Software Foundation](#); with no Invariant Sections, no Front-Cover Texts, and no Back-Cover Texts. A copy of the license is included in the section entitled "[GNU Free Documentation License](#)".

Abbildung 13: REM

Abbildung 14: TEM

Abbildung 15: Effekte bei der Wechselwirkung zwischen Elektronenstrahl und Materie [TUD]

Abbildung 16: Kanal-Modell; Herstellungsskizze

Abbildung 17: Bauanleitung der neu konzipierten Messzelle, Herstellungsskizze

Abbildung 18: graphische Darstellung einer gemessenen Volt-Ampere-Charakteristik

Abbildung 19: AFM-Bilder des Chips; Riss in Siliziumschicht

Abbildung 20: AFM-Bild des Chips; Trichter

Abbildung 21: REM-Bild des Risses; weiße Flecken sind Verunreinigungen

Abbildung 22: TEM-Bild der vermeintlichen Si_3N_4 -Membran; rechts: Übergang Trichter und Membran

Abbildung 23: EDX-Analyse der TEM-Probe

Abbildung 24: TEM-Bild der mit Gold bedampften zerstörten Membran

Abbildung 25: TEM-Bild einiger Ergebnisse der Porenherstellung

Abbildung 26: selbst erstellte Poren mit Durchmessern von 9 nm, 45 nm und 80 nm (TEM)

Abbildung 27: durch Al-Bedampfung verkleinerte Poren

Abbildung 28: Für die Ionenstrommessung an den Nanoporen optimierter Aufbau der optischen Pinzette

Abbildung 29: Polystyrolkugeln neben einer Membran

Abbildung 30: Benutzeroberfläche der Software, link: automatische Volt-Ampere-Charakteristik; recht: manuelle Spannungseinstellung

Abbildung 31: 2 beispielhafte Programmierungen in der Blockansicht

Tabelle 1: Messdaten für Volt-Ampere-Charakteristik

Tabelle 2: EDX-Analyse; Prozentzahlen für das Nitrid und den Sauerstoff zeigt deren minimale Anzahl und deutet auf eine Zerstörung der Nitridschicht hin

Anhänge

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Arbeit in irgendeiner Form unterstützt haben.

Beginnen möchte ich dabei bei Prof. Anselmetti und Prof. Flaschel, für die Betreuung dieser Arbeit und die Bereitstellung aller notwendigen zeitlichen und materiellen Ressourcen.

Ein großer Dank gilt Dr. Katja Tönsing, die immer bereit war mir bei Fragen hilfreich zur Seite zu stehen und Probleme schnellstmöglich zu beheben.

Ohne eine Einführung in die Welt der Physik hätte sich diese Arbeit schwieriger gestaltet, so danke ich meinen Bürokollegen Thorsten Bergmann, Sebastian Horstmeier und Maik Tiemann zum einen für ihre hilfreiche Unterstützung und für die stets sehr lebhaften Diskussionen.

Ein weiterer Dank gilt meinen nanoporösen Mitstreitern Nadja Hristova-Betow und Dr. Andy Sischka, die mich in die Thematik eingeführt haben und die mit immer neuen Ideen diese Arbeit bereichert haben.

Danken möchte ich der gesamten Biophysik, die es schafft in einer äußerst angenehmen Arbeitsatmosphäre hervorragende Arbeit zu leisten.

Geduld bewies auch immer wieder Dr. Wiebke Hachmann, die trotz zeitaufwendigen Arbeiten immer wieder versucht hat gute Ergebnisse beim TEM zu erhalten.

Zum Schluss möchte ich noch denjenigen Danken, die mir nicht nur während dieser Arbeit stets zur Seite standen und mir die nötige Sicherheit verliehen. Ohne meine Familie und meine (zukünftigen) Frau wären die letzten Jahre sicherlich nicht so verlaufen, wie sie es zum Glück waren. Eure Geduld und euer Ansporn hat mir diesen Abschluss erst ermöglicht.