

Evaluation von MoS₂-Nanoporen für DNA-Translokationsexperimente mit der Optischen Pinzette

Diplomarbeit

zur Erlangung des Grades eines
Diplom-Physikers

September 2016



Fakultät für Physik der Universität Bielefeld

angefertigt von Dennis Kreft

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und dabei keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit wurde zuvor an keiner anderen Hochschule eingereicht.

Bielefeld, den 30.09.2016

.....
Dennis Kreft

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Dr. Katja Tönsing

INHALTSVERZEICHNISS

1	EINLEITUNG.....	1
2	GRUNDLAGEN	4
2.1	DNA.....	4
2.2	Festkörpernanoporen.....	9
2.3	Optische Pinzette.....	15
3	METHODEN	23
3.1	Versuchsaufbau	23
3.2	Probenpräparation	28
3.2.1	MoS ₂ -Monolagen.....	28
3.2.2	Chip.....	38
3.2.3	Monolagenübertrag	40
3.2.4	Nanopore.....	45
3.2.5	Flusszelle.....	46
3.2.6	Mikrokügelchen.....	49
3.3	AFM-Abbildung.....	50
3.4	Ablauf einer Messung.....	51
4	ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG.....	58
4.1	MoS ₂ -Schichtdicke	58
4.2	DNA-Translokation durch Nanoporen.....	60
4.3	Aufgetretene Schwierigkeiten	73
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	77
6	LITERATURVERZEICHNIS	79
7	DANKSAGUNG	83

1 Einleitung

Die Experimente an einzelnen Molekülen sind ein wesentlicher Bestandteil der Biophysik und helfen dabei Erkenntnisse zur Beschreibung biologischer Systeme auf molekularer Ebene zu erhalten. Durch die Auswertung und den Vergleich sehr vieler auf diesem Weg gewonnener Informationen über biologische Zusammenhänge wird im Laufe der Zeit ein immer allgemeingültigeres Verständnis für die komplexen Abläufe innerhalb von Zellen und biologischen Systemen ermöglicht. Mittels zahlreicher Messungen und unterschiedlichster Methoden wird sich so in kleinen Schritten der vollständigen Beschreibung des relevanten biologischen Systems angenähert.

Die Experimente dieser Arbeit sollen neuer Erkenntnisse im Bereich der kontrollierten Translokation von DNA-Doppelsträngen durch Festkörper-Nanoporen und die hierbei wirkenden Kräfte erzielen. Bei diesen als auch ähnlichen biophysikalischen Versuchen bietet die Verwendung der Optischen Pinzette im Vergleich zu anderen Methoden immense Vorteile. Sie kann sowohl Kräfte im unteren Piconewton-Bereich detektieren als auch ausüben, ebenso stellt es kein Problem dar Biomoleküle unter physiologischen Bedingungen zu studieren. Die Optische Pinzette ermöglicht, unter Verwendung eines fokussierten Laserstrahls, das berührungslose Fangen und nanometergenaue Manipulieren von Mikrokügelchen in verschiedenen Flüssigkeiten. An diese gefangenen Mikrokügelchen können Biomoleküle immobilisiert und deren mechanische Eigenschaften, bestehende Bindungen und eintretende Konformationsänderungen genauer untersucht werden. Bei Translokations-Experimenten mit der Optischen Pinzette wird ein zuvor gefangenes Kügelchen mitsamt einem anhaftenden polaren oder polarisierbaren Biomolekül in die Nähe einer winzigen Pore in einer elektrisch isolierenden Membran gebracht. Ein variierbares Transmembranpotential veranlasst das Biomolekül sich in die Pore einzufädeln ohne diese jedoch komplett zu durchschreiten, da ein Ende des Moleküls noch am Mikrokügelchen anhaftet. Jede eingeleitete Bewegung des Mikrokügelchens überträgt sich demzufolge unmittelbar auf das Biomolekül, dessen Position in der Pore sich daher genau manipulieren lässt. So bietet sich bei der Immobilisierung von DNA-Strängen an das Kügelchen die Möglichkeit für sehr genaue Messungen der wirkenden Kräfte und des durch das Biomolekül beeinflussten Ionenstroms durch die Pore. Darüber hinaus können Energielandschaften des Moleküls studiert werden und eventuell bietet sich langfristig sogar die Möglichkeit zur DNA-Sequenzierung.¹

Für aussagekräftige Messungen werden Nanoporen, also Löcher mit einem Durchmesser weniger Nanometer, in möglichst dünnen Membranen benötigt. Je dünner die verwendete Membran desto sensitiver sind die Experimente und umso besser können aus den gewonnen Daten die

angestrebten Rückschlüsse auf die mechanischen und elektrischen Wechselwirkungen zwischen DNA und Nanopore gezogen werden. Es existiert eine Reihe extrem dünner Materialien, das Bekannteste ist wohl Graphen.² Gerade dieses hat sich jedoch in vorausgegangenen Arbeiten als ungeeignet für Experimente mit der Optischen Pinzette erwiesen.^{3,4} Als alternativer potentieller Kandidat hat sich Molybdändisulfid (MoS_2) herausgestellt.³ Zielsetzung dieser Arbeit ist die ausführliche Evaluierung von Molybdändisulfid-Monolagen für DNA-Translokationsexperimente an Nanoporen. Die hierzu benötigten Nanoporen werden selbst angefertigt, weshalb die Schilderung und Darstellung der vereinzelt recht aufwendigen Präparationsschritte einen gewichtigen Teil der vorliegenden Arbeit ausmacht.

Im Kapitel Grundlagen wird eine Einführung in die theoretischen Hintergründe gegeben die zum Verständnis des Experiments und dessen Auswertung benötigt werden. Einleitend wird auf den genauen molekularen Aufbau von DNA-Molekülen eingegangen, gefolgt von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der zu evaluierenden MoS_2 -Nanoporen. Anschließend wird das Augenmerk auf das Funktionsprinzip der Optischen Pinzette gelegt. Das dritte Kapitel widmet sich zuerst dem Versuchsaufbau der durchgeführten Experimente, dann ausführlich der Präparation der Proben und beschreibt darüber hinaus noch den typischen Ablauf einer Messung. Zur Beantwortung der grundlegenden Fragestellung, der Eignung von MoS_2 -Nanoporen für Translokationsexperimente mit der Optischen Pinzette, werden die gewonnenen Daten im 4. Kapitel analysiert und interpretiert. Das letzte Kapitel zieht schließlich Bilanz über die gewonnenen Erkenntnisse und gibt einen Ausblick auf mögliche Folgeexperimente.

2 Grundlagen

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den theoretischen Grundlagen, die zum Verständnis des Experiments und dessen Auswertung notwendig sind. In dieser Arbeit soll die Möglichkeit erkundet werden, in wie weit sich Molybdändisulfid für Festkörpernanoporen-Experimente eignet. Deshalb wird im ersten Unterkapitel als Grundlage kurz der Aufbau und die Struktur von DNA behandelt. Im anschließenden Teil erfolgt die theoretische Beschreibung von Nanoporen, speziell in Molybdändisulfid, sowie eine Beschreibung der Kräfte, die bei einer Translokation durch eine dünne Membran auf einen DNA-Strang wirken. Der letzte Teil dieses Kapitels beschäftigt sich mit den physikalischen Hintergründen der Optischen Pinzette, die zur Steuerung der Translokation eingesetzt wird.

2.1 DNA

DNA, *desoxyribonucleic acid*, (also Desoxyribonukleinsäure, DNS) ist ein langes Polymer, welches bei allen Lebewesen die Aminosäuresequenz zum Aufbau von Proteinen in kodierter Form enthält. Damit sind in ihr sämtliche genetische Informationen für die biologische Entwicklung von Zellen und Organismen gespeichert.

Doppelsträngige DNA (dsDNA) besteht aus 2 langen Molekülketten, die schraubenförmig umeinander gewunden sind und damit eine Doppelhelix-Struktur einnehmen. Jede dieser beiden Molekülketten besteht dabei aus einer abwechselnden Anordnung von Phosphorsäureresten und Desoxyribosemolekülen (Zucker). An die Zuckermoleküle sind jeweils eine der vier Basen, Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin gebunden, welche zur Innenseite der Doppelhelixstruktur hin ausgerichtet sind und aufgrund der zwei Einzelstränge jeweils ein Basenpaar in der Mitte ausbilden. In dieser Abfolge von Basenpaaren entlang der Doppelhelix sind sämtliche Erbinformationen enthalten, jeweils in Kodierungseinheiten von 3 aufeinander folgenden Basenpaaren (Basentriplett) welches im genetischen Code für eine Aminosäure steht. Ein DNA-Doppelstrang kann in eukaryotischen Zellen, als lange Kette betrachtet, mehrere Meter lang sein und liegt deswegen äußerst organisiert und dicht gepackt im Zellkern vor.

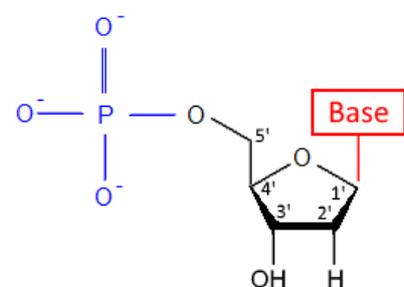


Abb.2.1.1: Aufbau eines Nukleotids (Phosphatrest, Zucker und Base)

Die Nucleinsäuresynthese der einzelnen Nucleotid-Bausteine zu einem DNA-Einzelstrang wird erreicht, indem zwei Verknüpfungsstellen ungebundener Nucleotide, unter Abspaltung von Diphosphat, eine Verbindung eingehen. Diese reaktiven Enden jedes Nucleotids sind zum einen die 3'-Hydroxylgruppe sowie das phosphorylierte 5'-Ende der Desoxyribose. Initial bildet die Hydroxylgruppe des 3'-C-Atoms der Ribose mit dem am 5'-C-Atom gebundenem Phosphat eines benachbarten Nucleotids eine kovalente Phosphodiester-Bindung aus.

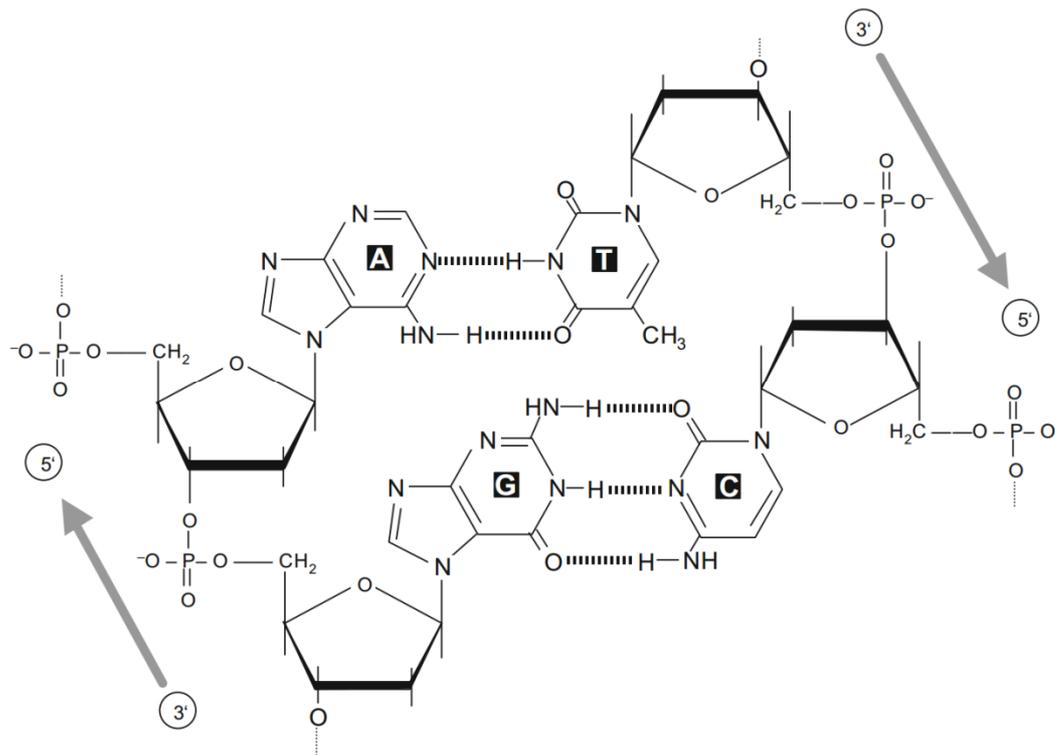


Abb. 2.1.2: Chemische Bindungsverhältnisse eines DNA-Doppelstranges⁵

Durch die eingeführten Bezeichnungen ist es möglich, dem sich bildenden Einzelstrang eine eindeutige Richtung zu geben, die Direktionalität von Nucleinsäuresträngen ist vom 5'- zum 3'-Ende definiert. Zwei auf diese Weise synthetisierte DNA-Einzelstränge formieren sich in der Natur unter physiologischen Bedingungen zu einer B-DNA genannten Doppelhelix-Struktur. Hierbei werden die zwei Einzelstränge durch entgegengesetzte Aneinanderlagerung über Wasserstoffbrückenbindung zwischen den komplementären Basenpaaren zusammen gehalten und über Stapelwechselwirkung benachbarte Paare stabilisiert.⁶ Da jedes DNA-Basenpaar des fertigen Doppelstranges über zwei negativ geladene Phosphatreste verfügt, besitzt der komplette Strang zwei negative Elementarladungen e^- pro Basenpaar.⁷ Aufgrund des negativ geladenen Rückgrats der DNA kann diese im späteren Verlauf mittels eines elektrischen Feldes manipuliert werden. Der Abstand zwischen zwei benachbarten Basenpaaren beträgt üblicherweise 0,34 nm,⁸ der Durchmesser der Doppelhelix, also die horizontale Ausdehnung eines Basenpaares, samt der beiden Zuckermoleküle auf welchen sie verankert sind beträgt dagegen ca. 2 nm.⁵

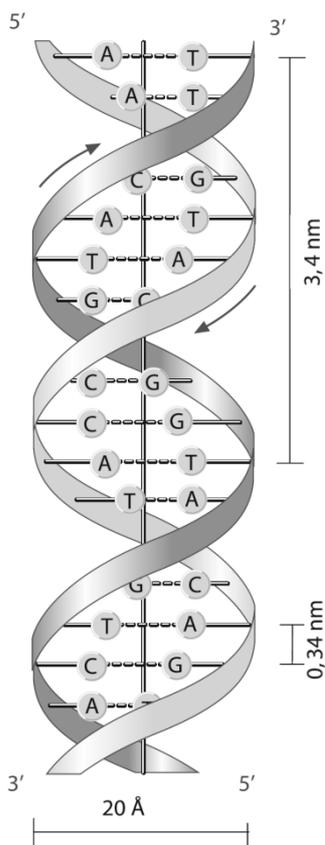


Abb.2.1.3:
DNA-Doppelhelix¹⁰

In sämtlichen in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, wird die doppelsträngige DNA (dsDNA) des Virus Lambda-Phage, welcher das Bakterium *Escherichia coli* als Wirt hat, verwendet. Diese λ -DNA besitzt 48 502 Basenpaare (bp), eine Konturlänge von $L_0 = 16,5 \mu\text{m}$ und liegt ursprünglich, wie für prokaryotische DNA üblich, zirkulär, das heißt in Form eines in sich geschlossenen Ringes vor.⁹ Um die benötigten linearen dsDNA-Stränge zu erhalten, werden die zirkulären DNA-Ringe an einer Stelle aufgebrochen, der so resultierende Strang besitzt an beiden Enden überstehende Basen (*sticky ends*).

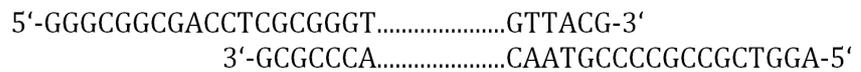


Abb. 2.1.4: Basen eines aufgebrochenen λ -DNA-Doppelstrangs

An den diesen 12 ungepaarten Basen pro Strangende (siehe Abb. 2.1.4) können mit zusätzlichen Molekülen versehendende Nukleotide angebracht werden, um die λ -DNA zu funktionalisieren. In dieser Arbeit wird λ -DNA verwendet die an einem Ende mit Biotin versehen ist. Es ist zu bemerken, dass lineare λ -DNA in einer wässrigen Puffer-

Lösung, die unbedingt notwendig ist, um eine Zerstörung durch Austrocknen zu verhindern, nie als ausgestreckter Strang, sondern stets zusammengeknäuel vorliegt, da dies energetisch günstiger ist. Die umgebenden Wassermoleküle üben einen Impuls auf die DNA aus und knäulen sie so zusammen. Dem entgegen wirkt die Steifigkeit des DNA-Stranges, denn das elektrisch negativ geladene Zucker-Phosphatrest-Rückgrat verhindert durch seine sich selbst abstoßende Kraft, dass der Strang zu stark geknickt werden kann. Aus dem Gleichgewicht zwischen diesen beiden Kräften, dem Wasserimpuls und der Steifigkeit des Rückgrats resultiert ein Knäuel dessen Durchmesser, je nach Ionenzusammensetzung der wässrigen Puffer-Lösung, variiert.

Die theoretische Beschreibung des elastischen Verhaltens eines dsDNA-Strangs erfolgt am besten über das *Worm-Like-Chain-Modell* (WLC).¹¹ Bei diesem Modell wird die Beweglichkeit des Moleküls im Vergleich zu den alternativen Modellen *Freely-Jointed-Chain* (FJC) und *Freely-Rotating-Chain* (FRC) stark eingeschränkt, dieses also versteift. Zur Beschreibung der Biegesteifigkeit wird die Persistenzlänge ℓ_p eingeführt. Diese gibt die mittlere Länge an, über die das theoretisch beschriebene Molekül eine einmal eingenommene Konformation behauptet. Für dsDNA beträgt die Persistenzlänge ℓ_p unter physiologischen Bedingungen $53 \pm 2 \text{ nm}$.¹² Aus der

folgenden, sich aus dem WLC-Modell ergebenden, Interpolationsformel kann die Länge eines DNA-Strangs bei einer anliegenden Kraft berechnet werden:¹³

$$F(x) = \frac{k_B T}{\ell_p} \left[\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L_0}\right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} \right] \quad (I)$$

In den Experimenten dieser Arbeit werden typische Kräfte von 5 pN auf die doppelsträngige λ -DNA mit einer Konturlänge von $L_0 = 16,5 \mu\text{m}$ wirken. Durch Anwendung der obigen Formel kann die Länge, welche die DNA durch ihre elastischen Eigenschaften bei einer anliegenden Kraft von 5 pN einnimmt, auf einen Wert von $15,5 \mu\text{m}$ bestimmt werden. Sie verkürzt sich also um $1,0 \mu\text{m}$.

Wie schon erwähnt, ist die hier verwendete λ -DNA an einem Ende biotinyliert und somit in der Lage hoch affine Bindungen einzugehen. Für die folgenden Experimente wird die Bindung von Biotin an Streptavidin-Komplexen ausgenutzt, welche eine der stärksten bekannten nichtkovalenten biologischen Bindungen darstellt.^{14,15}

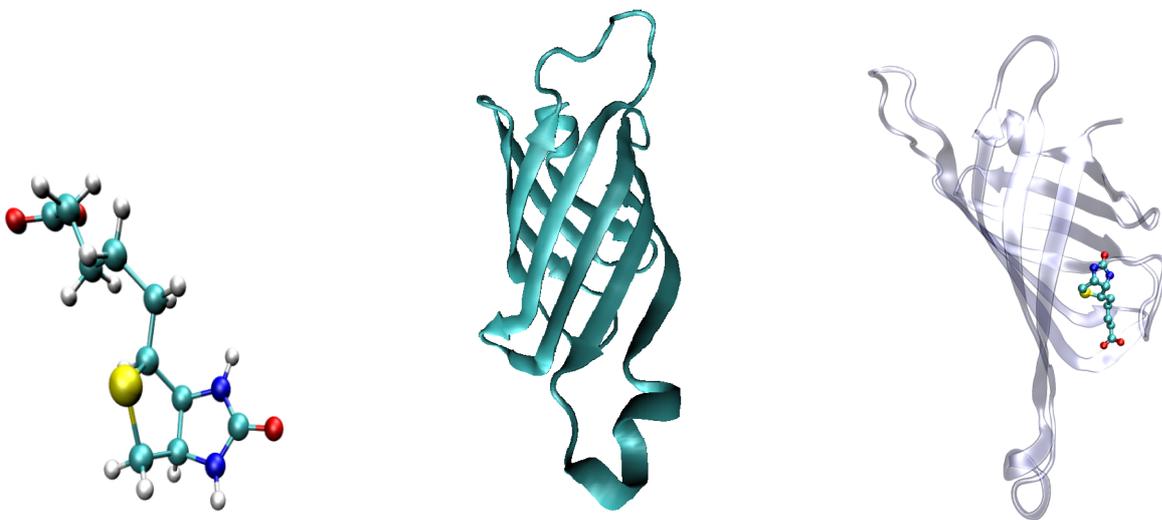


Abb. 2.1.4: Stäbchenmodell eines Biotin-Moleküls (links), Cartoon-Darstellung eines Streptavidin-Monomers (mitte), Biotin in Streptavidin-Bindungstasche (rechts)

Das Protein Streptavidin ist ein aus vier identischen Untereinheiten (Monomere) aufgebauter Tetramer. Die Sekundärstruktur einer einzelnen Untereinheit besteht dabei hauptsächlich aus β -Faltblättern, welche sich taschenförmig umeinander wickeln und aufgrund dieser Form das relativ kleine Biotinmolekül in die Mitte der Tasche einlagern können. Die Oberflächen der später in dieser Arbeit verwendeten Mikrokügelchen sind mit Streptavidin funktionalisiert.

Um von einem gegebenen DNA-Strang auf dessen exakte Abfolge der eingebauten Basen schließen zu können, wird das Verfahren der DNA-Sequenzierung verwendet. Die Sequenzierung kann mittels vieler Verfahren, beruhend auf diversen Methoden¹¹ durchgeführt werden, welche hier nicht alle aufzuführen sind. Allen gemeinsam ist jedoch die Beschränkung der Länge des zu sequenzierenden DNA-Strangs auf etwa 1000 bp.¹⁶ Das kleinste Genom eines Lebewesens besteht aus ca. 500 kbp¹⁷ und das menschliche Genom aus ca. 3,2 Gbp⁵. Aufgrund der Längenbeschränkung der gegenwärtigen Sequenzierungsverfahren müssen die zu untersuchenden DNA-Stränge aktuell zuerst vervielfältigt, dann zerteilt, später die Sequenz bestimmt und hinterher die gewonnenen Informationen wieder zusammengesetzt werden. Da viele Genome hochrepetitive Sequenzen enthalten, also sich häufig wiederholende Basenabfolgen, stellt der letzte Schritt, das Rekonstruieren der korrekten Anordnung der gewonnenen Informationen, augenblicklich die größte Herausforderung dar.¹⁸ Die im nächsten Unterkapitel aufgezeigte DNA-Sequenzierung über Nanoporen, auch Sequenzierung der 3. Generation¹⁹ genannt, unterliegt weder der erwähnten Längeneinschränkung noch müssen im Nachhinein Informationsfragmente aufwändig zusammengesetzt werden.

2.2 Festkörpernanoporen

Unter dem Begriff Festkörpernanoporen sind Löcher von wenigen Nanometern Durchmesser in dünnen Membranen zu verstehen. Im Gegensatz zu natürlich vorkommenden biologischen Nanoporen wie sie auf zellulärer Ebene für Transportprozesse auftreten, müssen Festkörpernanoporen erst in meist aufwendigen Prozessen angefertigt werden. Sie können dann jedoch als Modellsystem in der Grundlagenforschung dienen, um zum Beispiel Austauschprozesse innerhalb von Zellen besser erforschen zu können.

Als Plattform für DNA-Nanoporen-Experimente dienen unter anderem mit Poren präparierte Siliziumoxid (SiO_2) Chips mit dünnen Siliziumnitrid (Si_3N_4) Membranen,²⁰ durch welche bereits 2003 erste DNA Translokationen durchgeführt wurden.²¹ Spätestens seit der Entdeckung von Graphen (Nobelpreis 2004) ist ein zunehmendes Interesse an zwei-dimensionalen Materialien (2D-Materialien) entstanden und deren neuartigen Eigenschaften sind Gegenstand der aktuellen Forschung. In dieser Arbeit wird untersucht, ob sich der Halbleiter Molybdändisulfid²² (MoS_2) als geeignetes extrem dünnes Material für DNA-Translokationen eignet. Im Gegensatz zu Graphen und Graphen-analogen 2D-Materialien wie Bornitrid²³ (BN) oder Germanen²⁴ (Ge) besteht Molybdändisulfid nicht aus einer einzelnen Lage kovalent gebundener Atome, sondern aus einer Sandwichstruktur aus drei Atomlagen. Die Kristallstruktur ist hexagonal und die zentrale Schicht Molybdän-Atome wird kovalent zwischen zwei Lagen von Schwefel-Atomen eingeschlossen (siehe. Abb. 2.2.1). In MoS_2 -Kristallen sind diese dreilagigen Schichten nur durch vergleichsweise schwache nicht-kovalente Wechselwirkungen mit einander verbunden und so ist es relativ einfach möglich einzelne Molybdändisulfid-Schichten gegeneinander zu verschieben oder als Monolage abzutrennen.

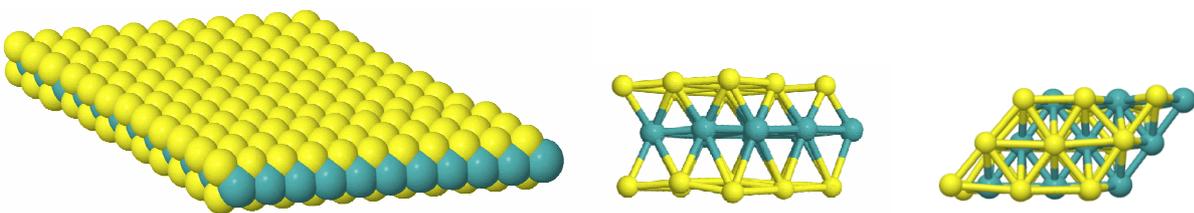


Abb. 2.2.1: Molybdändisulfidmonolage im Kalotten-Modell (links), Seitenansicht (mitte) und Draufsicht (rechts) im Stäbchenmodell, Molybdän (blau) Schwefel (gelb)

Die Schichtdicke einer Molybdändisulfid-Monolage beträgt 0,67 nm.²⁵ Somit bewegt sich das Volumen einer Nanopore dieses Materials in der für DNA-Translokations-Experimente und DNA-Sequenzierung benötigten Größenordnung. Im vorherigen Kapitel wurde der Abstand zweier benachbarter Basenpaare eines DNA-Doppelstranges mit 0,34 nm angegeben, folglich können sich

innerhalb einer MoS₂-Monolagen-Pore geringen Durchmessers während einer DNA-Translokation zwei, im ungünstigsten Fall drei, Basenpaare gleichzeitig befinden.

Um ein Verständnis für die Kräfte zu erhalten, die auf einen DNA-Doppelstrang in einer Nanopore wirken, werden exemplarische Situationen, wie sie in den folgenden Experimenten dieser Arbeit häufiger auftreten, detaillierter betrachtet. Die elektrisch isolierende MoS₂-Membran mit der zuvor präparierten Nanopore trennt zwei Kompartimente. Hierbei handelt es sich um zwei Flüssigkeitsreservoirs, die mit wässrigem Puffer, versetzt mit DNA-Strängen, gefüllt sind. Die genaue Zusammensetzung des Puffers wird in Kapitel 3.2.5 beschrieben. Jegliche Partikel und Ionen müssen, um von einem zum anderen Reservoir zu gelangen, die Nanopore passieren. Oberes und unteres Reservoir sind so kontaktiert, dass eine Spannung angelegt und der induzierte Ionenstromfluss des Puffers durch die Pore gemessen werden kann. Wird eine Transmembranspannung U angelegt, werden die in der wässrigen Lösung befindlichen DNA-Stränge, dem elektrischen Feld folgend, durch die Pore gezogen. Dies ähnelt dem Aufbau und Prinzip der Coulter-Counter,^{26,27} jedoch findet der Porendurchtritt der DNA-Stränge nicht aufgrund eines Druckgradienten, sondern durch die Wirkung des angelegten elektrischen Feldes auf das negativ geladene Rückgrat des DNA-Stranges statt. Dieser Vorgang wird freie Translokation genannt und ist in der folgenden Abbildung skizziert.

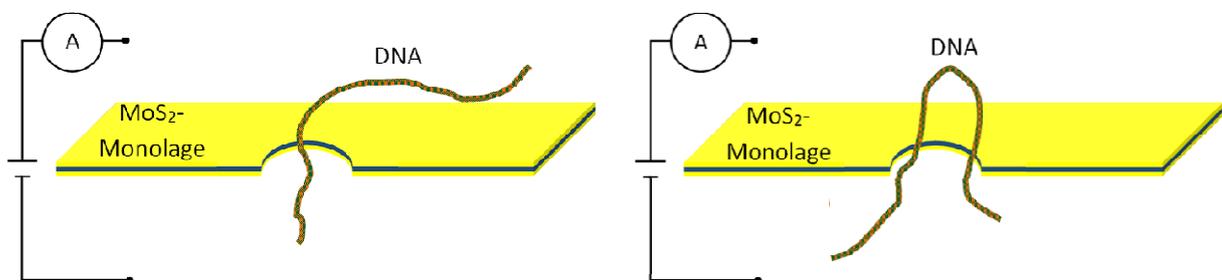


Abb. 2.2.2: Verschiedene Konformationsmöglichkeiten von DNA-Doppelsträngen bei der freien Translokation

Durch die kontinuierliche Messung der Ionenstromstärke während einer DNA-Translokation ist es möglich, die Änderung der Stromstärke in Relation zum aktuellen Abschnitt des Moleküls innerhalb der Pore zu setzen. Eine DNA-Sequenzierung beruhend auf der Messung der Ionenstromstärke¹ wäre theoretisch möglich, wenn die in der Nanopore lokalisierte Base eine eindeutig messbare Änderung des Stroms bewirkt. Für λ -DNA mit ihren 48502 Basenpaaren beträgt die typische freie Translokationszeit durch eine Festkörpnanopore jedoch nur wenige Millisekunden.²⁸ Für eine mögliche Bestimmung der Basen allein aus dem Stromsignal heraus geschieht die freie Translokation somit viel zu schnell. Ferner ist es bei der freien Translokation

nicht kontrollierbar in welcher Konformation der Strang die Pore passiert. Es ist zum Beispiel möglich, dass ein Strang die Pore schlaufenförmig, wie in Abbildung 2.2.2 rechts skizziert, passiert. In diesem Fall können aus der kombinierten Beeinflussung des Stromsignals mehrerer gleichzeitig in der Pore lokalisierter Basenpaare ebenfalls keine Rückschlüsse auf die Basensequenz gezogen werden.

Um einen DNA-Strang für eine möglichst genaue Messung langsam, kontrolliert und sogar reversibel durch die Nanopore zu fädeln werden für diese Arbeit die zu untersuchenden DNA-Stränge an Mikrokügelchen immobilisiert und mit Hilfe einer „Optischen Pinzette“ unter der Nanopore gehalten.

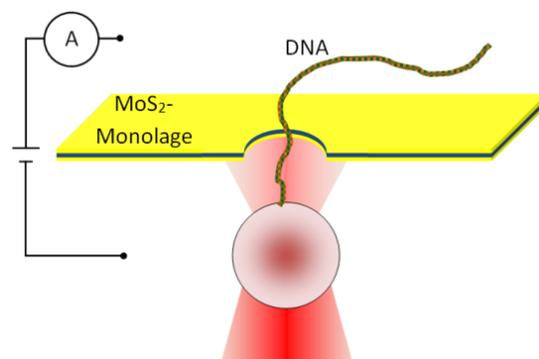


Abb. 2.2.3: Prinzip der kontrollierten Translokation mit Hilfe der Optischen Pinzette

Das Prinzip der Optischen Pinzette wird im nächsten Unterkapitel ausgiebig behandelt, wichtig ist, dass mit ihrer Hilfe ein Mikrokügelchen in Flüssigkeit bewegt oder festgehalten werden kann. Die Immobilisierung des DNA-Strangs an dem Mikrokügelchen geschieht über eine Biotin-Streptavidin Bindung wofür, wie im Kapitel 2.1 beschrieben, die verwendete λ -DNA an einem Ende biotinyliert und die Oberfläche des Kügelchen mit Streptavidin funktionalisiert ist.

Anstatt wie zuvor ungehindert, komplett und viel zu schnell die Pore zu passieren, wird der DNA-Strang ab einer bestimmten Länge von dem anhaftenden Mikrokügelchen gehindert sich weiter durch die Pore zu bewegen und die elektrische Kraft auf den DNA-Strang wird von der Haltekraft des Kügelchens kompensiert. Die Stärke der elektrischen Kraft $F = Q \cdot E$ auf das Kügelchen kann mit einigen bekannten Parametern theoretisch bestimmt werden. Wie schon erwähnt wirkt das, sich durch die angelegte Spannung gebildete, elektrische Feld auf die zwei negativen Elementarladungen pro Basenpaar des DNA-Rückgrats. Da die verwendete MoS₂-Monoalge mit der Dicke d von 0,67 nm elektrisch isolierend ist fällt das komplette E-Feld allein über der Nanopore ab.

Die Netto-Ladung Q dieser Region kann berechnet werden indem die durchschnittliche Anzahl von Basenpaaren (bp) innerhalb der Pore ermittelt wird:

$$Q = \frac{2 \cdot e^-}{\text{bp}} \cdot d = \frac{2 \cdot e^-}{0,34 \text{ nm}} \cdot 0,67 \text{ nm} = 3,94 \cdot e^- = 6,31 \cdot 10^{-19} \text{ C} \quad (\text{II})$$

Bei den Experimenten dieser Arbeit beträgt die angelegte Spannung U durchschnittlich 50 mV, das sich bildende elektrische Feld E in der Pore ergibt sich zu:

$$E = \frac{U}{d} = \frac{50 \text{ mV}}{0,67 \text{ nm}} = 74,63 \frac{\text{MV}}{\text{m}} \quad (\text{III})$$

Die Kraft auf das Kügelchen beläuft sich also auf:

$$F = Q \cdot E = 6,31 \cdot 10^{-19} \text{ C} \cdot 74,63 \frac{\text{MV}}{\text{m}} = 47 \cdot 10^{-12} \frac{\text{V} \cdot \text{C}}{\text{m}} = 47 \text{ pN} \quad (\text{IV})$$

Somit muss von der Optischen Pinzette theoretisch die Kraft von 47 pN aufgebracht werden, um den eingefädelt DNA-Strang daran zu hindern, dem elektrischen Feldes weiter zu folgen und die Pore vollständig zu passieren. Mittels optischer Beobachtung des Kügelchens, detaillierter in Kapitel 3.1 erläutert, kann diese Kraft genau gemessen.

In der Realität unterscheidet sich aufgrund verschiedener Effekte die gemessene von der theoretisch bestimmten Kraft. Eine Hauptursache ist der elektroosmotische Fluss, dieser bildet sich wenn ein elektrisches Feld auf eine Pufferlösung wirkt, welche im Kontakt mit einer geladenen Fläche steht. Dieser Fluss fließt, aufgrund der Zusammensetzung, der in dieser Arbeit verwendeten Pufferlösung, entgegengesetzt der Richtung in der die DNA gezogen wird. Die Geschwindigkeit ist abhängig vom pH-Wert und Ionenkonzentration der Pufferlösung sowie deren Temperatur.²⁹ Durch hydrodynamische Reibungskräfte an dem eingefädelt DNA-Strang sorgt der Fluss dafür, dass die mit der Optischen Pinzette gemessenen Kräfte wesentlich geringer als die mit einem vereinfachten Modell berechneten Werte ausfallen können.³⁰ Bei der Einfädelt von mehr als einem DNA-Strang erfolgt durch kooperative Effekte zwischen den einzelnen elektrochemischen Abschirmschichten der DNA-Stränge eine Verstärkung des elektroosmotischen Flusses. Dieser zusätzliche Fluss ist der Grund, dass die gemessene Kraft nicht proportional mit der Anzahl eingefädelt Stränge ansteigt, sondern leicht geringer ausfällt.³¹

Die Messung der Kraft, die aufgewendet werden muss, um einen zuvor eingefädelt DNA-Strang langsam wieder aus der Pore herauszuziehen, kann mittels der Optischen Pinzette präzise durchgeführt werden und stellt in Kombination mit der Auswertung des parallel hochfrequent aufgezeichneten Ionenstroms einen vielversprechenden Schritt zur DNA-Sequenzierung über Nanoporen dar. Durch die gezielte Steuerung des Mikrokügelchens während der kontrollierten Translokation ist es möglich einen ausgewählten Abschnitt oder den ganzen DNA-Strang beliebig oft, in frei wählbarer Geschwindigkeit und reversibel zu untersuchen.

2.3 Optische Pinzette

In diesem Kapitel wird das Wirkungsprinzip der Optischen Pinzette anschaulich gemacht. Die Optische Pinzette basiert darauf, dass Photonen bei Reflexion und Brechung in einem Medium einen, wenn auch nur sehr geringen, Impuls auf dieses Medium übertragen. Die erste Arbeit, die diesen Effekt der Optischen Falle beschreibt, wurde bereits 1970 vom amerikanischen Physiker Arthur Ashkin veröffentlicht, welcher den Strahlungsdruck von Laserlicht untersuchte. Dabei stellte er fest, dass Teilchen zum Fokus des Strahls hingezogen wurden.³² Später gelang es ihm, Teilchen mit nur einem Laser auch in allen drei Raumdimensionen festzuhalten.³³ Eine Weiterentwicklung dieser Apparatur von Ashkin's ehemaligem Kollegen, dem Physiker Steven Chu, zum Abkühlen und Festhalten von einzelnen neutralen Atomen mit Laserlicht,^{34,35} wurde 1997 mit dem Nobelpreis für Physik ausgezeichnet.

Auf ein Teilchen in einem Laserstrahl wirken mehrere Kräfte, welche auf einem Impulsübertrag der Photonen auf das Teilchen bei Absorption und/oder Brechung/Reflexion des Lichtes beruhen. Erstens wirkt der so genannte Strahlungsdruck in Ausbreitungsrichtung des Laserlichts. Für den Extremfall von einem vollständigen Impulsübertrag des Laserlichts auf das Teilchen (totale Absorption) folgt mit:

$$\vec{F} = \frac{d\vec{p}}{dt} \quad (\text{Newton}) \quad (\text{V}) \quad \text{und} \quad P = \frac{E}{c} \quad (\text{Einstein}) \quad (\text{VI})$$

($F \triangleq$ Kraft, $p \triangleq$ Impuls, $t \triangleq$ Zeit, $E \triangleq$ Energie, $c \triangleq$ Lichtgeschwindigkeit)

eine Abschätzung der auf das Teilchen wirkenden Kraft von:

$$F = \frac{dp}{dt} = \frac{1}{c} \frac{dE}{dt} = \frac{P}{c} \quad (\text{VII})$$

($P \triangleq$ Leistung)

Bei einer Laserleistung von 1 mW ergibt sich daraus eine Kraft von 3,3 pN. Diese Kraft steigt linear mit wachsender Laserleistung und fällt mit zunehmender Transparenz der Teilchen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Teilchen sind transparente Mikrokügelchen mit einem Durchmesser sehr viel größer als das verwendete Laserlicht ($d \gg \lambda$). Die Wechselwirkung mit elektromagnetischen Wellen fällt hierdurch in den Bereich der Mie-Streuung und im Folgenden können alle auftretenden Kräfte anschaulich mittels geometrischer Strahlenoptik beschrieben werden.³⁶

Für die Realisierung der Optischen Falle wird ein Laser in der Grundmode TEM_{00} und damit einem gaußförmigen Strahlenprofil verwendet. Dies bedeutet, dass die Lichtintensität des Laserstrahls nicht über den gesamten Strahlquerschnitt identisch hoch ist und am Rand schlagartig abnimmt, sondern mit dem Abstand vom Strahlzentrum dem Verlauf einer Gauß-Glockenkurve folgt. In einem gaußförmigen Strahlenprofil wirken auf ein Teilchen neben dem zuvor erwähnten Strahlungsdruck auch Kräfte, die das Teilchen zum Intensitätsmaximum des Lasers hinziehen, also zur optischen Achse. Die Ursache dieser Kräfte beruht auf einem Impulsübertrag bei der Brechung, wenn die Strahlen das Teilchen durchlaufen. In Abbildung 2.3.1 ist das Zustandekommen der zum Intensitätsmaximum des Lasers zeigenden Gradientenkräfte, für ein Kügelchen größerer optischer Dichte als das umgebende Medium, schematisch dargestellt.

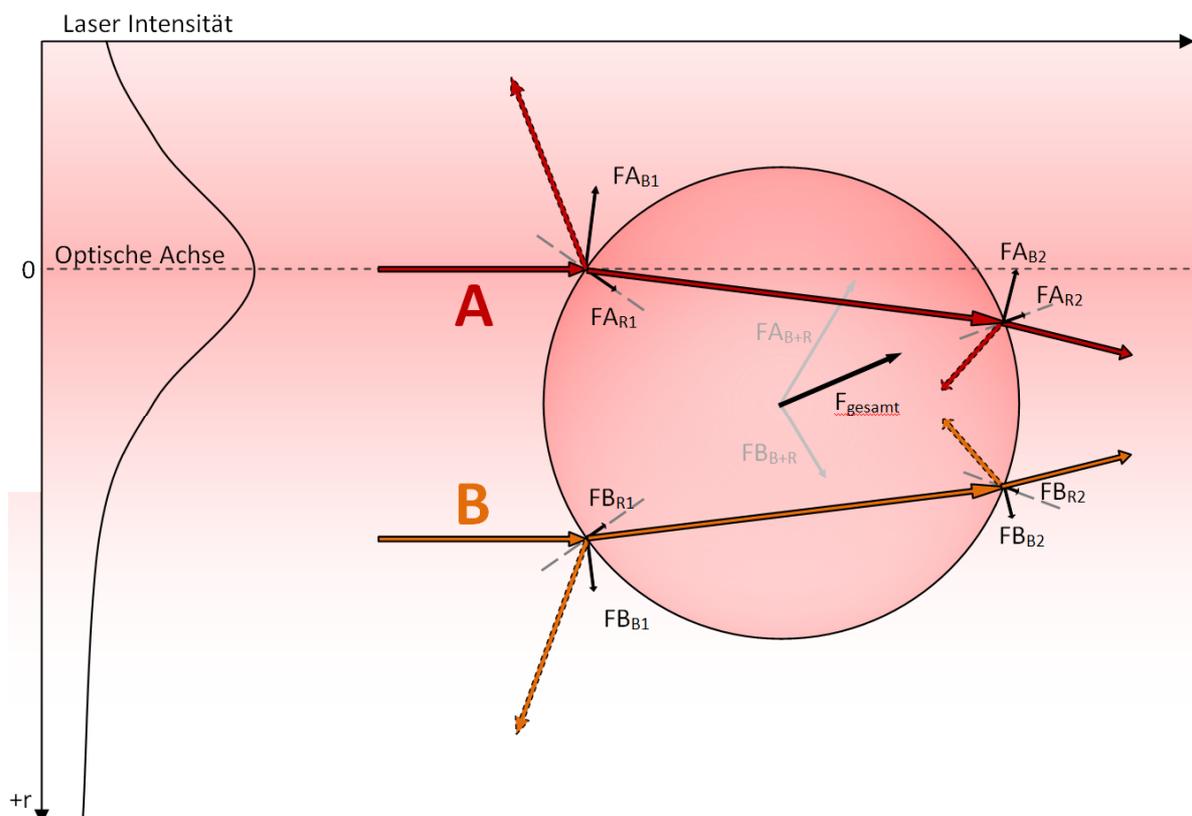


Abb. 2.3.1.: Kügelchen in Gauß'schem Strahlprofil eines Lasers

Die gestrichelte Linie zeigt die optische Achse des horizontal verlaufenden Laserstrahls, das Kügelchen ist also vom Strahlzentrum ausgelenkt dargestellt. Das Intensitätsprofil des Strahles ist durch die Gaußkurve im linken Bildteil skizziert. Das Kügelchen liegt dabei noch vollständig im Laserstrahl, die Strahlen A und B verlaufen also parallel zueinander.

Beim Eintritt z.B. des Strahles A vom umgebenen Medium (mit der Brechzahl n_{Medium}) in das Kügelchen ($n_{\text{Objekt}} > n_{\text{Medium}}$) wird dieser gebrochen. Dies bewirkt eine Geschwindigkeitsänderung

und durch die Impulsübertragung wirkt eine Kraft $F_{A_{B1}}$ auf das Kügelchen, welche aufgrund der Impuls- und Energieerhaltung senkrecht auf dem gebrochenen Strahl steht. Beim Austreten des Strahls aus dem Kügelchen wird ganz analog eine Kraft $F_{A_{B2}}$ erzeugt. Beide Kräfte zeigen zur optischen Achse, sowie entlang der Strahlrichtung. Auch die teilreflektierten, gestrichelt dargestellten Strahlen liefern einen Beitrag $F_{A_{R1}}$ plus $F_{A_{R2}}$, welcher ebenfalls in Strahlrichtung sowie, je nach Winkel, in $-r$ oder $+r$ Richtung wirkt, betragsmäßig aber weit hinter den Kräften des gebrochenen Strahles liegt.

Wie der Strahl A, so bewirkt der Strahl B die gleiche Art von Kräften, welche nun allerdings in der Summe in $+r$ Richtung, also von der optischen Achse weg, sowie in Richtung des Strahls wirken. Da aufgrund des gaußförmigen Strahlprofils der Strahl B eine weitaus schwächere Intensität aufweist als der Strahl A und damit geringere Kräfte erzeugt, resultiert letztlich auf das Teilchen eine starke Beschleunigung in Strahlrichtung, welche mit dem Strahldruck identifiziert werden kann, sowie eine etwas kleinere Beschleunigung immer zur optischen Achse des Strahlenganges hin. Das Teilchen ist also bereits in zwei Dimensionen, in der Ebene senkrecht zur Strahlrichtung, in der Strahlmitte eingefangen.

Um das Teilchen nun auch in der letzten Dimension, entlang des Laserstrahls einzufangen und damit eine stabile 3-dimensionale optische Falle zu realisieren, haben sich im Verlauf der Geschichte mehrere Bauarten von optischen Pinzetten entwickelt, welche hier kurz genannt werden sollen.

Bei der „2-Strahlen-Falle“³² werden zwei einzelne optische Fallen gegeneinander ausgerichtet. Die gegenläufigen Strahldrücke beider Fallen, sowie die zur optischen Achse hin gerichteten Gradientenkräfte, bewirken eine stabile Gleichgewichtslage in der Mitte beider Fallen. Im Zentrum können Teilchen 3-dimensional gefangen werden und sind für weitere Manipulationen zugänglich. Da die zwei gegenläufigen Laserstrahlen immer die gleiche Strahlintensität benötigen, führen Leistungsschwankungen der Laser zu Falleninstabilität und machen eine praktische Realisierung dieses Aufbaus schwieriger als die folgenden zwei Methoden.

Bei der „Schwerkraftfalle“³⁷ ist der Laserstrahl von „unten nach oben“ hin ausgerichtet, sodass die durch den Strahldruck hervorgerufene, nach oben gerichtete Kraft durch die nach unten gerichtete Schwerkraft ausgeglichen wird und in einem Punkt einen Gleichgewichtszustand erzeugt. Je nach Schwankungen in der Strahlintensität, sowie in der horizontalen Auslenkung der Kügelchen im Strahlprofil, ist dieser Gleichgewichtszustand schwer aufzufinden und über längere Zeit aufrecht zu erhalten.

Die eleganteste Möglichkeit zum Fangen der Teilchen in z-Richtung beruht jedoch ebenfalls auf dem Prinzip der Gradientenkräfte und kommt auch in dieser Arbeit zum Einsatz. Ist es möglich in z-Richtung einen Intensitätsgradienten zu erzeugen, so lässt sich eine Gradientenkraft erreichen, welche dem Strahldruck entgegenwirkt und das Teilchen auch in z-Richtung in einem stabilen Gleichgewichtszustand einfängt. Bei der so genannten „single beam gradient trap“³³ wird dieser Intensitätsgradient durch eine starke Fokussierung des Laserstrahls erreicht, woraufhin dessen Strahlen konvergieren und im Fokus das Intensitätsmaximum hat. Der angestrebte extrem konvergente Verlauf des Laserstrahls zum Einfangen von Objekten wird allgemein durch die Verwendung einer Linse zwischen Laser und dem zu fangenden Teilchen erreicht.

In dieser Arbeit wird für die erforderliche Fokussierung ein Mikroskopobjektiv verwendet (vgl. auch Versuchsaufbau in Kapitel 3.1.), wobei die numerische Apertur NA eine zentrale Größe für die Fokussierfähigkeit des Objektivs ist. Die Numerische Apertur NA ist definiert als:³⁸

$$\begin{aligned} NA &:= n \cdot \sin \alpha \\ &= \frac{r}{f} \end{aligned} \tag{VII}$$

Wobei n die Brechzahl des Mediums zwischen Objektiv und Präparat, α der halbe Öffnungswinkel des vom Objektiv fokussierten Laserstrahles, r der Radius der Apertur des Objektivs und f dessen Brennweite ist. Eine hohe numerische Apertur bedeutet für ein normales Mikroskop einen hohen Öffnungswinkel α , Lichtstrahlen können aus einem größeren Winkel noch vom Objektiv aufgefangen werden. Für die Mikroskopoptik im Experiment bedeutet eine hohe numerische Apertur eine starke Fokussierfähigkeit und damit einen niedrigen Abstand des Strahlenfokus vom Objektiv. Durch die geringere Schärfentiefe ergibt sich darüber hinaus eine viel bessere Fokusqualität, was für den Versuch wünschenswert ist. Üblicherweise, wenn sich Luft mit $n=1$ zwischen Objektiv und Präparat befindet, ist die numerische Apertur stets kleiner $\sin(90^\circ) = 1$. In der Praxis werden numerische Aperturen bis maximal 0,95 erreicht. Um sie dennoch weiter zu erhöhen, kann durch Einbringen eines Mediums in den Raum zwischen Objektiv und Präparat, welcher sonst mit Luft gefüllt ist, eine höhere Brechzahl erreicht werden. Mit einem auch in dieser Arbeit verwendeten Wasser-Immersionsobjektiv, in welchem sich Wasser ($n=1,33$) zwischen Objektiv und dem Präparat befindet, lässt sich im Experiment eine Apertur von ca. 1,2 erreichen.

In Abbildung 2.3.2 sind die erzeugten Kräfte F_{A+B} und F_{B+B} dargestellt, welche sich aus der Brechung stark fokussierter, konvergierender Strahlen A und B, im Kügelchen ergeben. Befindet sich das Teilchen zwischen Fokus und Objektiv, wie auf der rechten Seite der obigen Abbildung schematisch gezeigt, sorgt die Summe der resultierenden Kräfte für eine Beschleunigung in

Strahlenrichtung zum Fokus des Lasers. Die rechte Seite der Abbildung 2.3.2 lässt erkennen, dass die Summe F_{gesamt} dieser beiden Kräfte die erwünschte rückstellende Wirkung hat, hin zum Fokus des Strahles und damit dem Strahlungsdruck entgegen. Die teilreflektierten Strahlen, gestrichelt dargestellt, erzeugen wieder eine Netto-Kraft, welche in Strahlrichtung wirkt, vom Betrag her aber weitaus kleiner als die rückstellende Gradientenkraft ist, weswegen das Teilchen stets zum Strahlenfokus hingezogen wird.

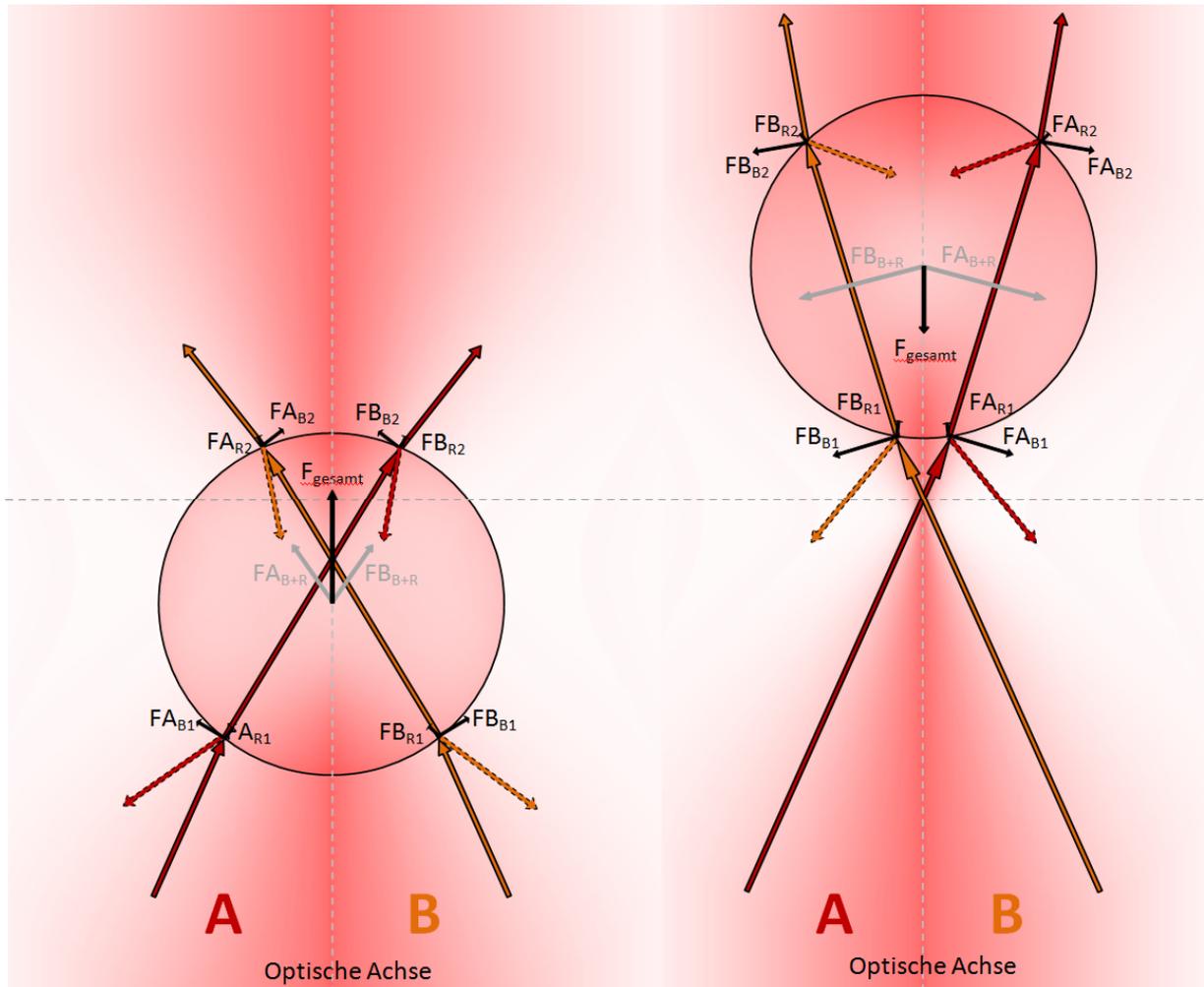


Abb. 2.3.2.: Resultierende Kraft auf eine Kugelchen vor und hinter dem Fokus eines konvergierenden Laserstrahls

Mit diesem Aufbau ist es möglich transparente Teilchen, in den meisten Fällen kleine Kugelchen aus Glas oder Polystyrol, in dieser „Optischen Falle“ fest einzufangen. Die Gradientenkräfte sind dabei trotz einer Größenordnung im Piko-Newton-Bereich stark genug, um frei diffundierende Teilchen z.B. in einer wässrigen Lösung an einem Ort festzuhalten. Wird die Flüssigkeit (also die „Umgebung“ des Teilchens) relativ zum Laserfokus bewegt, verbleibt das gefangene Teilchen stets im Fokus und wird somit in der umgebenden Flüssigkeit mit Hilfe der Optischen Falle

transportiert. Durch diese Möglichkeit der Manipulation von einzelnen kleinen Teilchen wird die Optische Falle auch „Optische Pinzette“ („optical tweezer“³⁹) genannt.

In der Biophysik werden besondere Anforderungen an den verwendeten Laser gestellt. Um ein gutes Verhältnis zwischen Lichtdruck, optischen Gradientenkräften sowie Durchlässigkeit der Probe für die verwendete Wellenlänge zu erhalten, werden für die Optischen Pinzetten hauptsächlich Infrarot-Laser verwendet. Der nahe Infrarotbereich um 1064 nm stellt einen guten Kompromiss zwischen den verschiedenen Absorptionskoeffizienten der häufig in der Biophysik eingesetzten Probenmaterialien dar, sodass keine Bestandteile der Probe durch zu starke Absorption und damit Erhitzung beschädigt werden. Das Absorptionsverhalten für Gewebebestandteile in Abhängigkeit der Wellenlänge ist in der folgenden Abbildung 2.3.3 dargestellt.

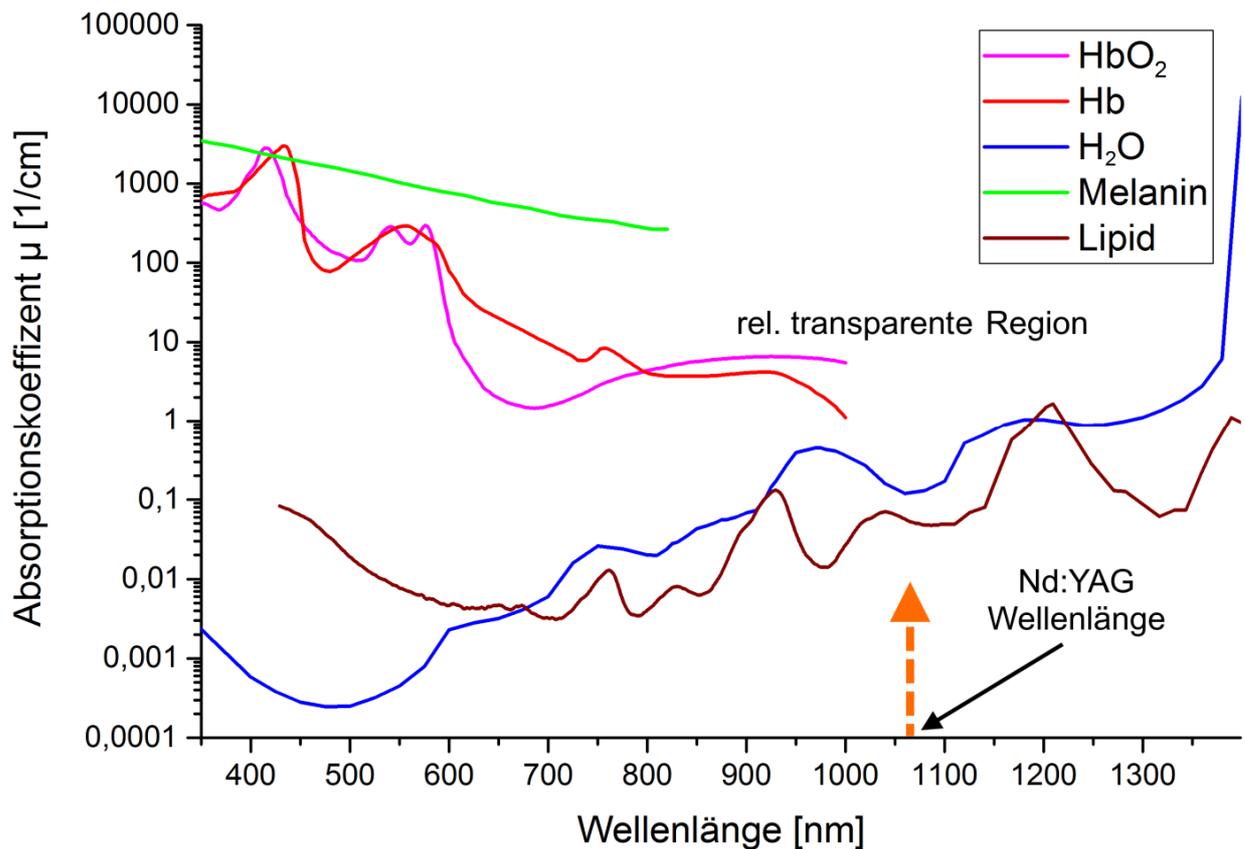


Abb. 2.3.3: Absorptionsspektren von Hämoglobin⁴⁰ (Hb/HbO₂), Melanin⁴¹, Lipid^{42,43} & Wasser⁴⁴

Im Hinblick auf die zuvor genannten Aspekte wird für diese Arbeit ein diodengepumpter Nd:YAG 1 Watt Laser im ungepulsten continuous-wave-Betrieb (Dauerbetrieb) verwendet, welcher bei der Wellenlänge von 1064 nm ein gaußförmiges Strahlprofil aufweist.

Die Optische Pinzette besitzt in der Biophysik weit reichende Anwendungsgebiete. So können z.B. Zellen berührungslos in einer Pufferlösung transportiert und manipuliert werden. Ein zweiter Laser, für dessen Wellenlänge die Probe nicht transparent ist, wird verwendet, wodurch zusätzlich ein schneidendes Werkzeug („Laserskalpell“) zur Verfügung steht.⁴⁵ Es lassen sich kontaminationsfrei Zellstrukturen und -teile isolieren und manipulieren, was gerade in der medizinischen Forschung von erheblichem Vorteil ist.

In den Experimenten dieser Arbeit werden kleine, mit λ -DNA versehene Polystyrolkugeln, in der Optischen Pinzette gefangen und die Zugkräfte, welche bei der Translokation eines DNA-Stranges durch eine Pore auftretenden, werden untersucht. Die Kraft, welche auf das mit der Optischen Pinzette festgehaltene Kugeln wirkt, muss also fortwährend detektiert und ihre genaue Größe bestimmt werden.

Aus den theoretischen Überlegungen zur Optischen Pinzette folgt, dass sich ein mit der Optischen Pinzette gehaltenes Teilchen in einem harmonischen Potential befindet.⁴⁶ Dies bedeutet, dass es umso weiter aus dem Potentialminimum ausgelenkt wird, je größer die Zugkraft F auf das Teilchen ist.⁴⁷ Ähnlich einer Feder, lässt sich so auch eine „Federkonstante“ k bestimmen für die das Hookesche Gesetz gilt:

$$F = -k \cdot x \quad \text{(VIII)}$$

Die auf das Teilchen wirkende Kraft lässt sich berechnen, wenn die Auslenkung des Teilchens aus dem Potentialminimum, also der Strahlmitte des Laserstrahls, bekannt ist. Zur Detektion dieser Auslenkung des Kugeln wird im Experiment eine sCMOS-Kamera verwendet, in Abbildung 3.1.1 ist diese im Versuchsaufbau schematisch dargestellt. Im zugehörigen Kapitel wird zudem das Verfahren zur Bestimmung der Auslenkung mittels videobasierter, computergestützter Kantendetektion erläutert.^{48,49}

Um die Kraft auf das Kugeln zu berechnen, muss sowohl die Auslenkung genau bestimmt werden, als auch die Steifigkeit k der Falle bekannt sein. Letztere wird zuvor experimentell ermittelt. Für die Kalibrierung der Fallensteifigkeit bietet sich die Stokes-Reibungskraft F_R auf ein Kugeln in wässriger Lösung an.

$$F_R = -6\pi \cdot r \cdot \eta \cdot v \quad \text{(IX)}$$

Um eine gewisse Reibungskraft F_R zu erhalten, ist es notwendig das Kugeln laminar durch eine Flüssigkeit zu bewegen, wobei r der Kugelradius, η die Viskosität der umgebenden Lösung und v die Strömungsgeschwindigkeit darstellt. Die Geschwindigkeit, mit der sich das Kugeln durch die Flüssigkeit bewegt um die benötigte Reibungskraft zu erzeugen, lässt sich bei den meisten

experimentellen Aufbauten der Optischen Pinzette mittels Piezoelektrik sehr präzise einstellen. Durch die Messung der exakten Auslenkung des Kügelchens während der gleichförmigen Bewegung durch die Flüssigkeit ist die Kraftkonstante k nach Gleichung I einfach zu berechnen. Die Gleichung (IX) gilt nicht mehr exakt wenn Grenzflächen in der Nähe des sich bewegenden Kügelchens sind. Bei Bewegung des Kügelchens parallel zu einer angrenzenden Fläche kann der Fehler nicht mehr vernachlässigbare Größen annehmen und sollte durch einen Korrekturfaktor ausgeglichen werden. Der Fehler in der Stokes-Reibung liegt bei einem Abstand von 5 Kugelradien bei 10%, bei 2 Kugelradien handelt es sich schon um 40% und bei einem Kugelradius Abstand beträgt der Fehler 300%.⁵⁰ Während der Kalibrierung und Messung ist außerdem zu beachten, dass die Viskosität einer wässrigen Lösung sich stark mit der Temperatur ändern kann und entsprechend in Gleichung (IX) zu berücksichtigen ist. Bei der Erwärmung von Wasser, zum Beispiel durch den Laser oder die Beleuchtung, von 20 °C auf 30 °C sinkt die Viskosität bereits um 20%.⁵¹

Alternativ zur Stokes-Reibung wird noch eine weitere Methode zur Bestimmung der Fallensteifigkeit k in dieser Arbeit verwendet, diese bedient sich der genauen Untersuchung des Rausch-Spektrums des in der Optischen Falle gefangenen Kügelchens.^{52,53} Für die Bestimmung der Fallensteifigkeit nach dieser Methode ist jedoch eine Datenaufzeichnung über einen längeren Zeitraum notwendig, sodass diese erst im Nachhinein bei der Auswertung zum Einsatz kommen kann und nicht zur schnellen Neukalibrierung in Echtzeit während des Experimentes geeignet ist. Das Verfahren beruht auf der Beobachtung der Bewegung des Kügelchens im harmonischen Potential der Optischen Falle. Aufgrund von Stößen mit den Molekülen der Flüssigkeit, welche durch die Brownsche Molekularbewegung hervorgerufen werden, ist die Kraftmessung an einem Kügelchen immer mit einem thermisch induzierten Rauschen behaftet. Durch hochfrequente Messung des Rauschspektrums über einen längeren Zeitraum und einem Vergleich der Daten mit den theoretischen Werten ist es möglich auf die gesuchte Fallensteifigkeit zu schließen. Um diese sehr genaue Methode zur Auswertung verwenden zu können wird eine von Sebastian Knust speziell auf den Versuchsaufbau angepasste Variante der computerbasierten Rausch-Spektrumanalyse genutzt.^{3,49,54,55}

3 Methoden

In diesem Kapitel wird sowohl der Versuchsaufbau beschrieben als auch die zur Präparation der Probe verwendeten Materialien und Chemikalien benannt. Zuerst wird der Aufbau der Optischen Pinzette vorgestellt, anschließend wird näher auf die bei den Versuchen verwendete Flusszelle eingegangen und schließlich die verschiedenen Phasen der Herstellung der Probe detailliert beschrieben.

3.1 Versuchsaufbau

Der Aufbau der Optischen Pinzette, mittels derer die DNA-Translokations-Experimente durchgeführt werden, ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

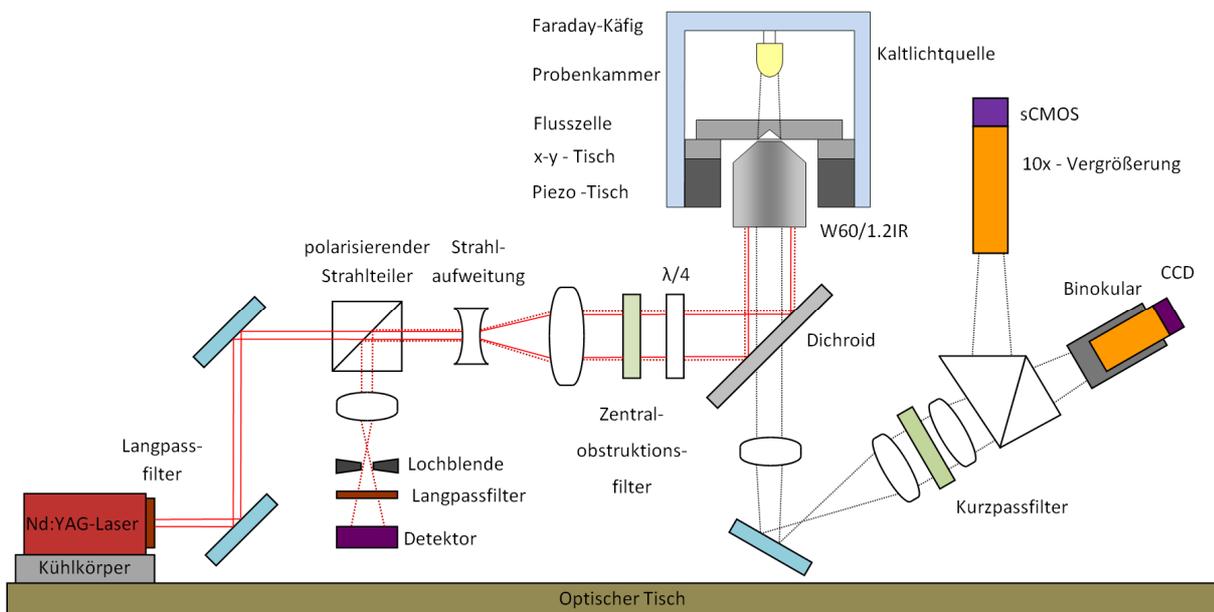


Abb. 3.1.1: Schematischer Aufbau der Optischen Pinzette

Die für den Versuch bedeutsamsten Bauteile und deren Funktion werden nachfolgend genauer beschrieben. Auf eine exakte Auflistung aller verbauten Elemente inklusive Herstellerangaben wird hier verzichtet, diese kann jedoch den dazugehörigen Veröffentlichungen^{53,56} entnommen werden. Der Vollständigkeit halber zeigt die Abbildung 3.1.1 den kompletten Aufbau, welcher größtenteils in ein inverses Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Deutschland) integriert wurde.⁵⁷ In den hier durchgeführten Experimenten wird der noch verbaute Quadrantendioden-Detektor zur Messung der Kügelchenauslenkung aufgrund der eingeführten sehr viel genaueren videobasierten Auswertung nicht mehr verwendet.

Den Hauptbestandteil der Optischen Pinzette bildet ein Nd:YAG-Laser (LCS-DTL-322, Laser 2000, Deutschland; 1064 nm, 1000 mW, linear polarisiert TEM₀₀, Strahldurchmesser 1,2±0,1 mm), dessen aufgeweiteter Laserstrahl durch ein inverses 60-fach Wasserimmersion-Mikroskopobjektiv (UPL-APO60W/IR; NA 1,2) tritt und einen starken Fokus in einer Flusszelle erzeugt. In den Strahlengang ist zusätzlich noch ein Zentralobstruktionsfilter eingebracht, dieser blendet das Zentrum der TEM₀₀-Mode aus und formt so effektiv ein „Doughnut-Profil“ (TEM*₀₁ ähnlich) was die Fallenstärke in axialer Richtung noch einmal erhöht.^{46,58} Die Flusszelle ist innerhalb einer abgeschirmten Probenkammer auf einem Piezotisch (P-517.3CD, Physik Instrumente, Deutschland) befestigt. Die Abschirmung der Probenkammer wirkt als Faraday'scher Käfig und ist notwendig, um die winzigen, die Nanopore passierenden, elektrischen Ströme störungsfrei messen zu können. Der gesamte Messaufbau befindet sich zur Vermeidung von Erschütterungen auf einem mittels Druckluft schwingungsgedämpften Tisch (VH-3660W-OPT, Newport Corporation, Irvine, Kalifornien, USA). Damit die in der Optischen Falle (vgl. Kapitel 2.3) zu manipulierenden Objekte mit der benötigten Präzision bewegt werden können, ist ein äußerst feinmotorisches Bewegungssystem erforderlich. Im Versuch kommt dazu ein Piezotisch zum Einsatz, welcher sich mit Hilfe von Piezoelektrik computergesteuert verschieben lässt. Der Aktionsradius beträgt 100 µm in x-y-Richtung und 20 µm in z-Richtung, wobei die Positionierung jeweils mit einer Präzision von 0,5 nm möglich ist. Der Piezotisch samt Flusszelle wird relativ zur sonst fest installierten Optischen Falle, bestehend aus Laserstrahl und Immersionsobjektiv, bewegt. Zwischen Piezo-Tisch und Flusszelle befindet sich außerdem noch ein manueller x-y-Tisch⁵⁷ mit dessen Hilfe die Zelle relativ zum Fokus der Falle grob ausgerichtet werden kann. So ist es möglich, händisch, ohne Einsatz der Piezoelektrik, Mikrokügelchen innerhalb der Flusszelle in die Optische Falle zu führen. Die in den Experimenten verwendete Flusszelle ist in Abbildung 3.1.2 skizziert, deren genauer Aufbau, Funktion sowie elektrische Kontaktierung wird im späteren Verlauf erläutert.

Um das Experiment optisch beobachten zu können, befindet sich eine Lichtquelle zentral oberhalb der Flusszelle, welche die Vorgänge in ihrem Inneren beleuchtet. Die Einkopplung in die abgeschirmte Probenkammer geschieht über eine Fiberoptik an dessen äußerem Ende sich eine Kaltlichtquelle (KL-2000 LED, Schott, Deutschland; 1000 lm) befindet. Über ein Okular des inversen Mikroskops kann die Probe während des Experiments beobachtet werden, der zweite Okularschacht beherbergt eine USB-CCD-Kamera (DCM130E, 1280x1024, Skopetek Opto-Electric Co., Hangzhou, Zhejiang, China). Die Kamera speist ein Echtzeit-Video des Experiments in das Messprogramm ein, im Folgenden wird dieses Bild als Übersichtsbild bezeichnet. Eine zweite Kamera (Andor Zyla 4.2, Andor Technology Ltd., Belfast, Großbritannien), hinter einer 10-fach Vergrößerungsoptik, ist für die Einspeisung hochfrequenter Bilder des in der Optischen Falle lokalisierten Mikrokügelchen zuständig, nachfolgend als Detailbild bezeichnet. Diese sCMOS

(*scientific CMOS*) Kamera nimmt Bilder des gefangenen Kügelchens mit 1555 Hz auf, welche sowohl für die in Kapitel 2.3 beschriebene Rausch-Spektrum-Analyse, zur Bestimmung der Fallensteifigkeit, als auch für eine (behelfsmäßige) Echtzeit-Kraftauswertung benutzt werden. Wirkt eine Kraft auf das Kügelchen in der Optischen Falle, so wird dieses aus dem Potentialminimum gezogen (vgl. Kapitel 2.3) und die Position verändert sich leicht. Über eine Software³, welche die Kanten des Mikrokügelchens fortlaufend unter Verwendung der Detailbilder detektiert, ist eine Auslenkung in x- oder y-Richtung als Verschiebung des Abbilds relativ zur Gleichgewichtslage zu erkennen. Kräfte in z-Richtung, welche bei den durchgeführten Translokations-Experimenten die wichtigste Rolle spielen, treten durch eine vermeintliche Größenänderung des Kügelchens in Erscheinung. Diese scheinbare Größenänderung wird durch ein Zusammenspiel aus Kontrastverminderung durch Defokussierung, ortsabhängiger Änderung der Lichtverhältnisse und Interferenzeffekten im Kugellinneren hervorgerufen. Tiefergehende Details zur videobasierten Kantendetektion werden an geeigneter Stelle in Kapitel 3.4 folgen.

Wie bereits erwähnt findet das gesamte Experiment in einer Flusszelle innerhalb der Probenkammer statt. In der folgenden Abbildung 3.1.2 ist ein schematischer Querschnitt der Flusszelle aufgezeigt.

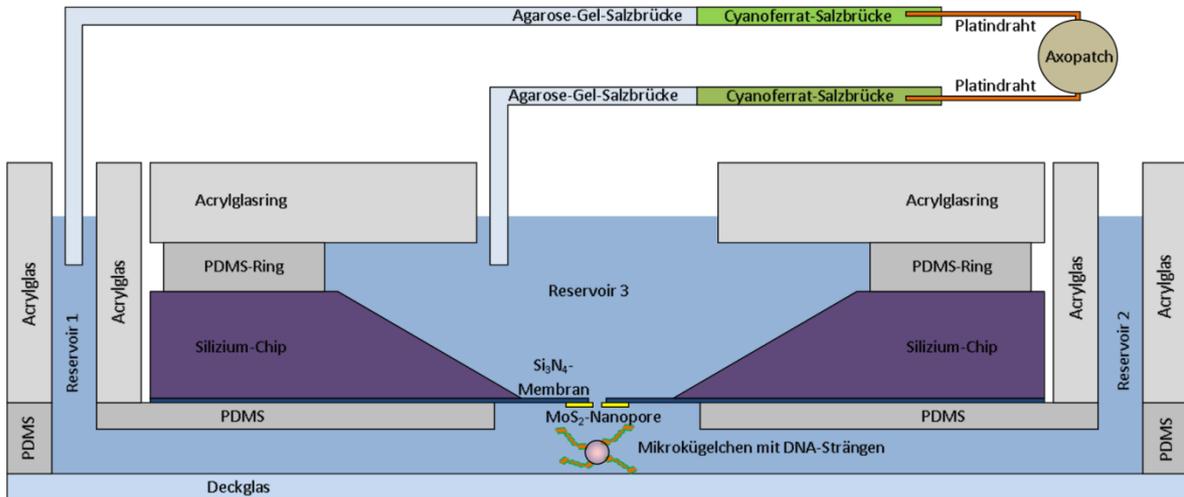


Abb. 3.1.2: Schematischer Querschnitt der verwendeten Flusszelle

Der skizzierte Aufbau ist während der Messung auf einer Metallplatte montiert, in dieser Platte befindet sich zentral ein Loch, das als Zugang für den von unten kommenden, fokussierten Strahl des Lasers dient (vgl. Abb. 3.1.1). Die Unterseite der Flusszelle besteht aus einem dünnen Deckglas, da diese zwangsläufig für infrarotes als auch sichtbares Licht transparent sein muss. Über dem Deckglas befindet sich ein mit salzhaltiger Pufferlösung gefüllter dünner Kanal von circa 40 μm Höhe und 1 mm Breite. In dem Puffer sind mit λ -DNA versehene Polystyrolkügelchen (vgl. Kapitel 2.3) gelöst. Mithilfe des einfallenden Lasers können einzelne Kügelchen eingefangen, kontrolliert durch den Kanal bewegt oder für die Translokations-Experimente an einem Ort gehalten werden. Über zugängliche Flüssigkeitsreservoirs ist vor oder während des Experiments der Inhalt des Kanals beeinflussbar. So ist es beispielsweise möglich neue Kügelchen einzuspülen oder die Pufferlösung auszutauschen. Mittig über dem Kanal befindet sich der Proben-Chip auf dessen Siliziumnitrid-Membran die freistehende MoS_2 -Monolage samt Nanopore haftet. Auf Abbildung 3.1.3 ist ein typischer Proben-Chip während eines Transfers zu sehen, die Ausrichtung (Trichterseite oben, Membranseite unten) entspricht der des Chips in Abbildung 3.1.2. Die Abdichtung des Kanals sowohl gegenüber der Umgebung als auch gegenüber der Si_3N_4 -beschichteten Seite des Chips geschieht durch Polydimethylsiloxan (PDMS), ein elastisches, transparentes und ungiftiges Polymer. Die unbeschichtete Seite des Silizium-Chips besitzt zur Versiegelung ebenfalls eine Dichtung, in



Abb. 3.1.3:
Proben-Chip

Abbildung 3.1.2 als PDMS-Ring zu erkennen. Zur Erhöhung der Stabilität und Sicherstellung der Integrität der Dichtungen ist der Aufbau zusätzlich von einem Acrylglasgehäuse umgeben. Dieses ist fest in der zuvor erwähnten Metallplatte verankert und übt so einen mechanischen Druck auf die verbauten PDMS-Dichtelemente aus. In einer dermaßen aufgebauten Flusszelle müssen sämtliche Ionen und Partikel der Pufferlösung, um zwischen dem Kanal und Reservoir 3 zu wechseln, die Nanopore passieren.

Die elektrische Kontaktierung der Flusszelle, einmal oberhalb und einmal unterhalb der Nanopore, geschieht über die Reservoirs 1 und 3. Hierfür wird jeweils eine speziell präparierte Glaskapillare in das jeweilige Reservoir eingeführt. Die elektrische Leitung innerhalb der Kapillaren geschieht über Agarose-Gel- und Cyanoferrat-Salzbrücken, letztere sind über Platindrähte mit einem Patch-Clamp-Verstärker (Axopatch 200B, Molecular Devices, Kalifornien, USA)(Axopatch) verbunden. Der Axopatch wird im Versuch verwendet um die erforderliche Transmembranspannung für eine Translokation anzulegen und die Ionenstromstärke zu messen (vgl. Kapitel 2.2).

Mit Ausnahme der Einstellung der Laserleistung werden sämtliche für die Messung notwendigen Regelungen, wie die Steuerung der Piezos oder das Anlegen der elektrischen Spannung, über ein LabView-Programm (National Instruments Corporation, Austin, Texas, USA) vorgenommen. Dieses Programm ist ebenfalls für die Aufnahme und Auswertung der Kamerabilder und Speicherung aller gewonnenen Messdaten zuständig.

3.2 Probenpräparation

Die einzelnen Schritte vom Schichtkristall bis zur fertigen Flusszelle mit eingebauter Nanopore sollen in den folgenden Unterkapiteln beschrieben und mit Abbildungen verdeutlicht werden.

3.2.1 MoS₂-Monolagen

Molybdändisulfid-Monolagen werden in dieser Arbeit nach der Methode der Exfoliation² hergestellt. Hierfür werden eine MoS₂-Flocke (HQ Graphene, Groningen, Niederlande), Adhäsions-Klebeband (SPV 224P, Nitto Denko, Japan) und mehrere Siliziumwafer (MTI Corporation, Kalifornien, USA) mit einer 90 nm dicken Siliziumdioxidschicht verwendet.

Es werden zwei unterschiedliche Ansätze bei der Exfoliation verwendet, welche sich jedoch nur beim ersten Schritt leicht unterscheiden. Beim ersten Ansatz wird eine komplette MoS₂-Flocke mittels starkem Druck auf das Adhäsions-Klebeband aufgebracht und durch anschließendes vorsichtiges Abziehen bleibt eine dünne Schicht des Kristalls auf dem Band zurück. Bei der zweiten Methode wird anstatt des kompletten Kristalls nur ein, vorsichtig mit einer Pinzette von der Flocke abgetrenntes Stück, dünner Einkristall auf das Klebeband gelegt und mit diesem dann weiter verfahren (siehe Abb. 3.2.1.1 a). Von hier an sind alle weiteren Schritte wieder identisch. Durch mehrmaliges Zusammenfalten und Auseinanderziehen, der mit Kristallen besetzten Fläche des Adhäsionsbandes, werden die Kristalllagen immer weiter ausgedünnt. Dieser Faltvorgang wird bis zu 10 Mal wiederholt bis sich genügend dünne Lagen und andere Kristallfragmente auf einem Teil des Adhäsionsbandes konzentriert befinden. Die in Bezug auf Monolagen aussichtsreichste Region des Klebebands wird auf ein ca. 3 cm x 1 cm großes, ausgeschnittenes Teilstück des Wafers abgelegt und angepresst. Nach kurzem Verbleib wird das Klebeband wieder abgezogen und Teile des ausgewählten Segments befinden sich nun auf der Oberfläche des Wafers. Das nun nicht mehr benötigte Adhäsionsband wird zur Dokumentation und späterem Vergleich der „Monolagen-Ausbeute“ auf ein Stück Papier aufgebracht, wobei die für die Übertragung genutzte Stelle markiert wird. So wird es im Nachhinein ermöglicht von einer ertragreichen Exfoliation nachzuvollziehen, welche Eigenschaften der ausgewählte Bereich des Bandes nach der Faltung hatte, um zukünftig die Chance auf den Fund möglichst vieler oder auch möglichst großer Monolagen zu maximieren. Die angestrebte Mindestgröße einer einzelnen Monolage sollte circa 3 μm x 3 μm betragen, da im Verlauf der Präparation eine Pore von ca. 1 μm Durchmesser damit komplett bedeckt wird.

Bei den Faltungen und Übertragungen wurden viele Parameter variiert und die Auswirkungen auf die Erzeugung von Monolagen dokumentiert. Im Detail wurde die Variation folgender Schritte der Exfoliation durchgeführt:

- Faltungsvorgang:** Beim Falten des Adhäsionsklebebandes kann der neue Bereich entweder leichten Überlapp mit dem gerade zuvor entstandenen Kristallabdrucks auf dem Band haben, direkt angrenzend zu diesem oder in einigem Abstand gesetzt werden. Des Weiteren kann beim Zusammenführen der beiden Seiten nur die Adhäsionskraft des Klebebandes alleine, ein leichtes Überfahren mit einem Wattestäbchen, ein leichtes Zusammendrücken mit den Fingerspitzen oder ein stärkeres Zusammenpressen zur Verbindung der Seiten ausgenutzt werden. Zusätzlich kann das nachfolgende Auseinanderziehen des Bandes noch in der Geschwindigkeit variiert werden (siehe Abb. 3.2.1.1 b).
- Ablegen:** Bei der Übertragung auf den Wafer kann das Adhäsionsklebeband auf unterschiedliche Weise auf dem Wafer abgelegt werden. Zum einen kann es zentral abgelegt und mit leichter Unterstützung zu beiden Enden des Wafers hin ausgelegt werden oder aber von einer Seite beginnend in Richtung des gegenüberliegenden Ende des Wafers. Bei letzterer Methode ist es einfacher ungewollte Lufteinschlüsse zu vermeiden, da sich beim gleichmäßigen Ablegen nur auf ein fortlaufendes Kontaktgebiet konzentriert wird.
- Anpressen:** Nachdem das Adhäsionsklebeband vollständig abgelegt wurde, werden etwaige Lufteinschlüsse noch etwas verdrängt, da sich das Klebeband über Regionen ohne Kristallfragmente von selbst langsam an den Wafer zieht. Dieser Vorgang kann noch partiell forciert werden, indem mit einer Pinzette oder einem Wattestäbchen an Stellen ohne Kristalle etwas Druck ausgewirkt wird, sodass das Klebeband letztendlich bestmöglich flach auf dem Wafer anliegt. Auf die Kristalllagen wirkt somit allein die Kraft des Adhäsionsklebebandes, welches die Lagen sowohl anzieht, als auch gegen die beschichtete Waferoberfläche drückt. Es besteht nun die Möglichkeit den Wafer in diesem Stadium für eine gewisse Zeit zu belassen, bevor das Klebeband wieder abgezogen wird. Es ist ebenfalls möglich noch zusätzlichen Druck durch Anpressen des Klebebandes auf die Kristalllagen und den Wafer auszuüben. Dies wurde mit unterschiedlicher Intensität und Dauer sowohl mit purem Daumen als auch mit verschiedenen Papier-, Stoff- und Schaumstoffsorten durchgeführt (siehe Abb. 3.2.1.1 c).

Abziehen: Nach einer Zeitspanne, die von Sekunden bis hin zu Stunden reichen kann, bleiben der Wafer, Kristalllagen und Adhäsionsklebeband in Kontakt. Anschließend kann das Klebeband unter Zuhilfenahme einer Pinzette vom Wafer getrennt werden (siehe Abb. 3.2.1.1 d). Hierbei ist es möglich sowohl die Geschwindigkeit als auch die Richtung des Abziehens, relativ zum Auflegen, zu variieren. Der Winkel und die Stärke mit der das Klebeband gelöst wird, sind ebenfalls veränderlich. Beim sehr langsamen, vorsichtigen Ablösen ist zum Beispiel ein spitzer Winkel von Vorteil. Dabei soll sichergestellt werden, dass sich das Klebeband während des Vorgangs nicht wieder mit dem Wafer oder Kristallen partiell verbindet.

Zwei Kombinationen dieser Variationsmöglichkeiten haben sich nach vielen Versuchen als erfolgreicher ausgezeichnet, wobei dies aufgrund der relativ geringen der Anzahl der Exfoliationen (ca. 150 Durchführungen) nicht aussagekräftig sein muss.

Die Monolagen größter Fläche wurden gefunden, nachdem eine „Einkristall-Flocke“ acht Mal eng, aber auf keinen Fall überlappend, vorsichtig zwischen den Fingern gefaltet und beim letzten Vorgang noch etwas mit einem Wattestäbchen angedrückt wurde. Nachfolgend wurde das Klebeband sehr langsam auseinander gezogen, behutsam von einer zur anderen Seite auf den Wafer abgelegt und mit einem Wattestäbchen das Gebiet mit den Kristallen vorsichtig umfahren, sodass das Klebeband straff auf dem Wafer fixiert war. Jetzt wurde mit dem Daumen mittelstark und ohne Zittern für circa 10 Sekunden Druck auf den Verbund ausgeübt. Anschließend ruhte die Probe für einige Minuten bis das Adhäsionsklebeband letztendlich extrem langsam und entgegen der Aufbringrichtung abgezogen wurde.

Die größte Anzahl verwendbaren Monolagen einer Exfoliation wurde nach folgender Methodik erzeugt. Die MoS₂-Flocke wurde kräftig auf das Klebeband gedrückt und vorsichtig mit einer Pinzette wieder entfernt. Dann wurde der erzeugte Abdruck zwei Mal analog zum oben beschriebenen Vorgehen verdoppelt, um eine rechteckige Struktur auf dem Band zu erhalten. Das entstandene Kristall-Rechteck wurde dann seinerseits noch vorsichtig fünf Mal komplett dupliziert und ein Teilstück im Anschluss mit beiden Daumen übereinander sehr stark durch ein doppelt gefaltetes Stück Reinraum-Papier (Texwipe, TechniCloth Cleanroom wipers TX609, Kernersville, North Carolina, USA) auf den Wafer gepresst.

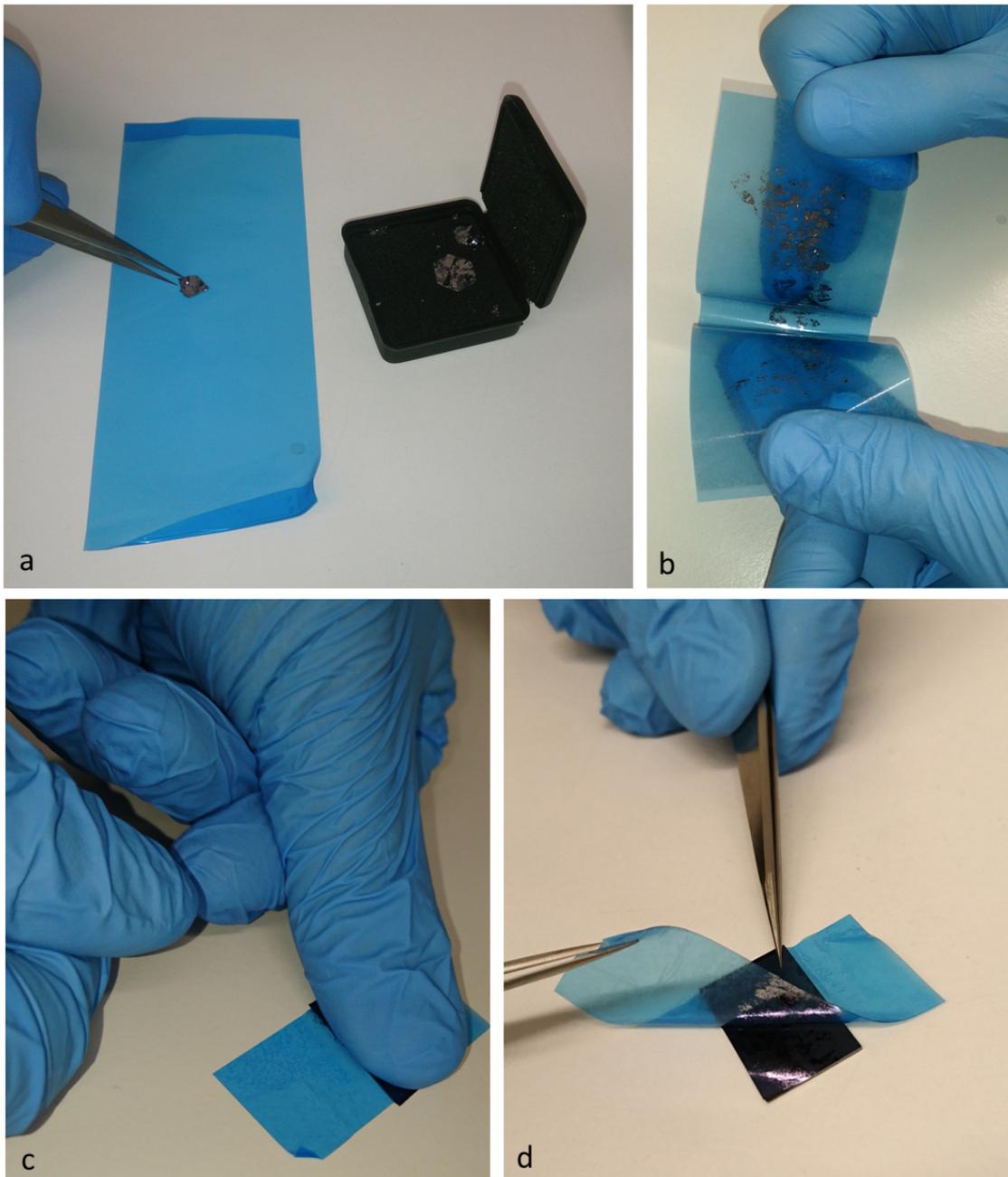


Abb. 3.2.1.1: Einzelschritte der Exfoliation zur Erzeugung von Molybdändisulfid-Monolagen, Auflegen einer MoS₂-Flocke (a), Faltungsvorgang (b), Anpressen (c), Abziehen (d)

Die so präparierten und einige Quadratzentimeter umfassende Siliziumwafer enthalten Tausende kleiner Kristallfragmente, aus denen die begehrten Monolagen zu identifizieren sind. Eine Möglichkeit, dünne Lagen und speziell ihre Schichtdicke zu identifizieren, bietet zum Beispiel die Raman Spektroskopie⁵⁹⁻⁶² die sich mit inelastischer Streuung von Licht an Festkörpern und Molekülen beschäftigt. Hierbei wird die zu untersuchende Probe mit monochromatischem Licht bestrahlt, das Frequenzspektrum des an der Probe gestreuten Lichts untersucht und daraus Rückschlüsse auf das Material gezogen. Die Frequenzverschiebung, die sogenannte Raman-Verschiebung, kommt durch Energieübertragung vom Licht auf Materie beziehungsweise von Materie auf Licht und kann zur Bestimmung einer überschaubaren Anzahl von Lagen von Molybdändisulfid benutzt werden. Ein ähnliches Verfahren ist die Photolumineszenz-Spektroskopie. Hierbei werden durch Lichteinstrahlung Elektronen des zu untersuchenden Materials in angeregte Zustände versetzt und durch Fluoreszenz oder Phosphoreszenz sendet die Substanz Licht aus, wenn die angeregten Elektronen in tiefer liegende Zustände zurückfallen. Die Frequenzen des emittierten Lichts können untersucht werden und analog zur vorherigen Methode, Rückschlüsse auf das Material, sowie die in dieser Arbeit interessierende Lagenanzahl gezogen werden.^{59,60,62-65} Beide Methoden können nicht nur bei der Suche und Identifizierung von MoS₂-Monolagen, sondern auch bei anderen dünnen Schichten wie Graphen eingesetzt werden.

Die Rasterkraftmikroskopie (engl. *AFM – atomic force microscope*) stellt darüber hinaus eine weitere Methode dar, um die Schichtdicke eines Materials auf einer Oberfläche zu bestimmen. Von Nachteil ist, dass diese Methode nur einen kleinen Bereich und diesen auch nur relativ langsam untersuchen kann. Ebenfalls kann eine Beschädigung der Probe durch die verwendete Cantilever-Spitze des AFM's nicht ausgeschlossen werden. Somit ist dieses Verfahren eher zur punktuellen Untersuchung geeignet, als zur Detektion sehr kleiner Lagen auf großem Bereich. Das AFM wird später in dieser Arbeit exemplarisch zur Abklärung der Schichtdicke benutzt und detailliert in Kapitel 3.3 behandelt.

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich ein Verfahren zur Suche der Monolagen verwendet, welches sich optische Effekte zu Nutze macht. Zur genauen Detektion der MoS₂-Monolagen auf den Wafern werden Interferenzeffekte⁶⁶ ausgenutzt, welche die 90 nm dünne SiO₂-Schicht und die sich darüber befindlichen Kristalllagen erzeugen. Im Detail werden ganz spezielle Farbänderungen des Silizium-Wafers erzeugt, dessen natürliche Kolorierung sich durch die abgelagerten MoS₂-Schichten, über Grau bis hin zu einem satten Türkis, ändert. In der folgenden Abbildung 3.2.1.2 ist links die Situation schematisch verdeutlicht. Die dünnen MoS₂-Lagen werden sichtbar indem die ein- und ausfallenden Strahlen A, B und C mehrerer Schichten des Stapels miteinander interferieren. Hierbei führt die Verwendung von Weißlicht zur Interferenz spezifischer Spektralteile was als spezifische Farbänderung wahrgenommen werden kann. Der Effekt ist so

ausgeprägt, dass sogar nur einatomar dünne Schichten wie Graphen, welche nahezu transparent sind, im Zusammenspiel mit der 90nm Silizium-Oxid-Schicht und dem Silizium-Substrat eine eindeutige Farbveränderung hervorruft. Bei den hier gesuchten drei Atomlagen dicken MoS₂-Schichten ist der farbverändernde Effekt dementsprechend noch ausgeprägter und durch Farb- und Kontrastunterschiede sind Einfach- von Mehrfach-Lagen zu unterscheiden.

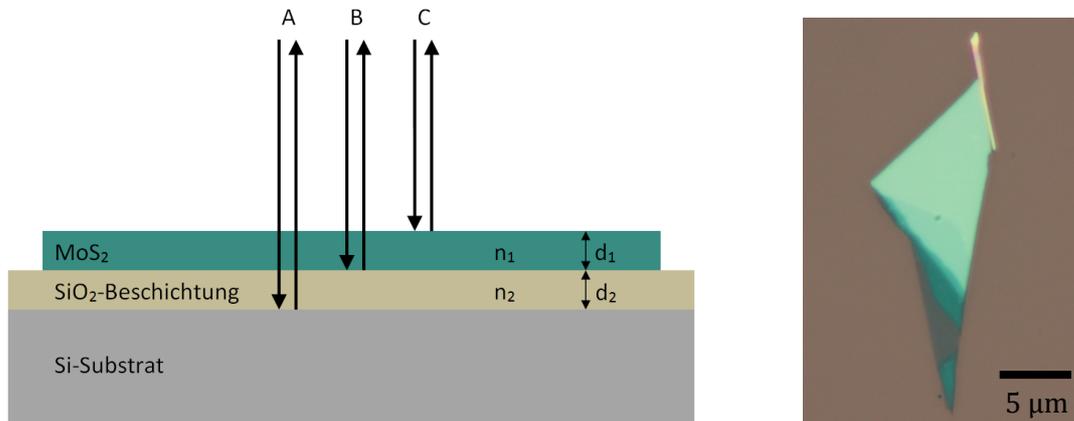


Abb. 3.2.1.2: Durch Interferenz der Strahlen A, B und C werden auch sehr dünne MoS₂-Schichten auf einem Si+SiO₂-Wafer sichtbar (links), mehrlagiger MoS₂-Kristall auf Si+SiO₂-Wafer (rechts)

Die Detektion der Monolagen findet unter einem Auflichtmikroskop (Olympus BX51, Olympus, Japan) statt. Die Suche kann manuell, auf einer in x- und y-Richtung beweglichen, unter dem Mikroskop arretierten Station, durchgeführt werden. Um ein Gefühl für den gesuchten Farbton zu erhalten, ist es anfangs ratsam sein Augenmerk auf Kristallfragmente zu richten, an dessen Kanten sich das charakteristische Stufenmuster, welches durch immer weniger übereinander liegender MoS₂-Schichten hervorgerufen wird, abzeichnet (siehe Abbildung 3.2.1.2 rechts). Wird eine große Anzahl solcher Farbabstufungen gefunden und unter Zuhilfenahme der Vergrößerungsmöglichkeiten des Mikroskops detailliert untersucht, kann aus Erfahrung geschlossen werden, bei welchen Farbtönen es sich definitiv nicht um Monolagen handeln kann. Im Gegenzug ist es möglich, empirisch einen speziellen Farbton der Kristalllagen auszumachen, welcher auf die beobachteten Stufenmuster bezogen, am nächsten an der natürlichen Farbe des Wafers liegt. Durch Untersuchung einer großen Anzahl von Stufenmustern und möglichen Monolagen kann möglichst sichergestellt werden, dass kein Farbton existiert, der zwischen dem so bestimmten und dem Originalfarbton des Wafers anzusiedeln ist. Zur methodischen Abklärung der Lagenstärke, wird in Kapitel 3.3 an einer nach dieser Prozedur bestimmte Monolage, mittels Rasterkraftmikroskopie die Schichtdicke bestimmt.

Mit den so gewonnenen Erkenntnissen ist es möglich relativ eindeutig zwischen Einfach- und Mehrfachlagen zu unterscheiden.

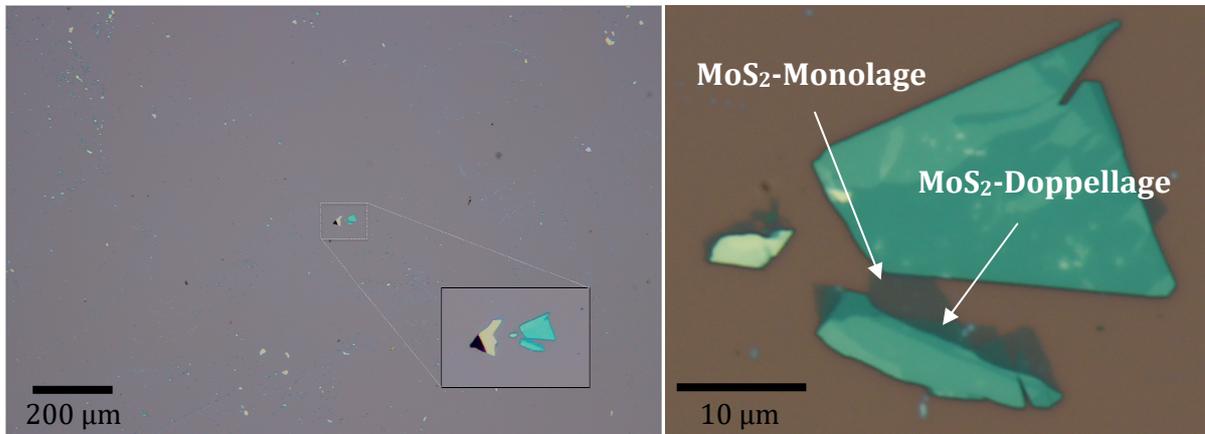


Abb. 3.2.1.4: Ein Kristallverbund mit Mehrfach- und Einfachlagen auf Si+SiO₂ Wafer bei verschiedenen Vergrößerungen unter dem Auflichtmikroskop

Die manuelle Suche nach den nur wenigen Mikrometer kleinen Monolagen mit der charakteristischen Färbung ist für das menschliche Auge jedoch sehr ermüdend, sodass nach dem, Stunden dauernden, systematischen Absuchen der wenigen Quadratcentimeter eines Wafers, eine längere Pause eingelegt werden muss. Darüber hinaus kann durch das lange konzentrierte Beobachten der sich bewegenden Waferoberfläche, durch das Mikroskop, Schwindelgefühl ausgelöst werden. Aus diesen Gründen wird für die zeitaufwendige, umfangreiche Suche nach den seltenen Monolagen der in der Masterarbeit von Sebastian Knust³ entwickelte Monolagendetektor eingesetzt.



Abb. 3.2.1.3: Komponenten des Monolagendetektors im Überblick

Mithilfe einer am Mikroskop angebrachten digitalen Spiegelreflexkamera (EOS 600D, Canon, Japan) und eines steuerbaren Servo-Tisches ist es möglich die gesamte Oberfläche eines präparierten Wafers automatisch abzufahren und dabei zu fotografieren.

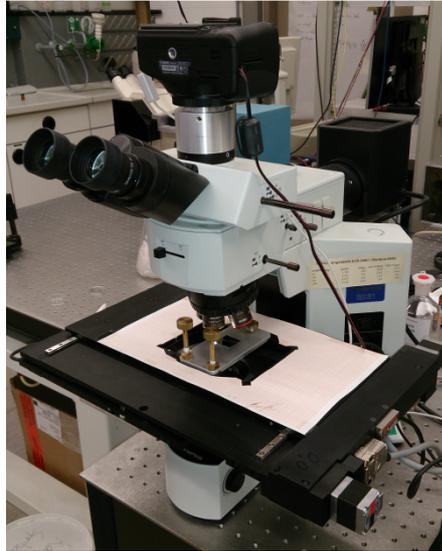


Abb. 3.2.1.4: Mikroskop und Servo-Tisch

Die Ansteuerung der Komponenten geschieht am Computer über ein LabView-Programm.³ Ein so gewonnenes Bild hat eine Auflösung von ungefähr 540 Megapixeln und eine Größe von etwa 1,5 Gigabyte pro Quadratmeter Waferoberfläche. Nach Eingabe der Mindestgröße und der zuvor empirisch erhaltenen Daten für Farbwert, Farbsättigung, Hellwert der Monolagen, sucht das Programm nach entsprechenden Übereinstimmungen auf den zuvor aufgenommenen Bildern. Diese Übereinstimmungen können anschließend am PC ausgewählt und am Mikroskop genauer betrachtet werden. Um minimales Variieren in der Farbe, hervorgerufen durch die Beleuchtung oder einer leichten Fokusverschiebung des Mikroskops, auszugleichen, wird immer ein Intervall für die zu übereinstimmenden Parameter (Farbwert, Farbsättigung, Hellwert) eingestellt. Hierdurch werden dann auch leicht defokussierte Monolagen erkannt, jedoch geben auch Doppellagen und Verunreinigungen auf dem Wafer ein positives Resultat, sodass eine anschließende Kontrolle aller als übereinstimmend erkannten Stellen unumgänglich ist. Die sich als Monolagen ausreichender Größe ausgezeichneten Flecken werden zum späteren Wiederauffinden, vorsichtig und in sicherem Abstand mit einem Stift (Staedtler Lumocolor permanent F, Staedtler Mars GmbH und Co. KG, Nürnberg, Deutschland) markiert und zur Dokumentation noch einmal hochauflösend fotografiert.

Ein Problem bei der automatischen Detektion im Zusammenspiel mit den hier verwendeten beschichteten Siliziumwafer ist, dass die Farbe der Wafer einer Charge (und zuweilen selbst auf einem einzigen Wafer) variieren kann. Zur Abdeckung des gesamten Spektrums aller möglichen gefundenen Farbparameter, in der sich eine Monolage präsentieren kann, muss das Intervall in der Detektionssoftware äußerst großzügig gewählt werden. Dies hat jedoch zur Folge dass hunderte bis tausende mögliche Übereinstimmungen pro Wafer gefunden und kontrolliert werden müssen, selbst wenn auf dem Wafer keine Monolage vorhanden ist. So ist es notwendig, für jeden neuen Wafer die oben beschriebene manuelle Suche nach Monolagen durchzuführen, um auf die genauen Monolagenparameter schließen zu können. Es wäre also von enormem Vorteil nur Wafer oder Teilstücke eines Wafers zu verwenden, auf dem Monolagen den identischen Farbwert erzeugen, um das Suchintervall der Software möglichst klein zu halten und somit die Anzahl nicht zu vermeidender Fehlidentifizierungen zu minimieren.

Eine erprobte Möglichkeit, ausschließlich Wafer mit identischen optischen Eigenschaften zu verwenden, stellt die Reinigung und erneute Präparation von schon verwendeten und sich als negativ herausgestellten Waferstücken dar. Prinzipiell ist eine Wiederverwendung der Wafer ohne Monolagenerzeugung möglich, indem der Wafer mit einem in Aceton (Acetone AnalR Normapur, VWR Internationale S.A.S., Frankreich) getränktem fusselfreiem Tuch zuerst gründlich gereinigt und anschließend für ca. 10 Minuten in einem mit Aceton gefüllten Becherglas im Ultraschallbad gereinigt wird. Beim Herausnehmen sollte jedoch äußerst langsam vorgegangen werden, da sich sonst, durch Restablagerungen des verdampfenden Acetons, kleine Stellen mit Verfärbungen bilden. Diese Regionen können bei der erneuten Verwendung, als mit den Monolagen-Kriterien übereinstimmend, fehldetektiert werden. Aber durch das Reinigen können nicht nur die erwähnten kleinen verfärbten Stellen entstehen, auch eine leichte Farbveränderung der kompletten Waferoberfläche kann beobachtet werden, dessen Ausprägung von dem verwendeten Lösungsmittel zur Reinigung abhängt. Mehrere durchgeführte Probereinigungen, welche die Auswirkungen von drei ausgewählten Lösungsmitteln (Aceton, Isopropanol (2-Propanol AnalR Normapur, VWR Internationale S.A.S., Frankreich) und Ethanol (Ethanol absolute AnalR Normapur, VWR Internationale S.A.S., Frankreich)) auf eine Waferoberfläche untersuchen zeigen, dass Aceton die geringsten Abweichungen von der ursprünglichen Oberflächenfarbgebung verursacht. Jedoch sind auch diese geringen, schon durch einmaliges Reinigen mit Aceton hervorgerufenen Veränderungen ausreichend, um die automatische Monolagendetektion mit den zuvor ermittelten Parametern beträchtlich zu behindern. Mehrmaliges Reinigen verstärkt diesen Effekt noch zusätzlich. Für zukünftige, effizientere Detektionen könnten Siliziumwafer mit einer präziseren, gleichmäßigen Siliziumdioxidbeschichtung über eine ganze Charge hinweg produziert und nur zur einmaligen Verwendung benutzt werden.

3.2.2 Chip

Als Basisträger für die MoS₂-Monolagen und die später da drin erzeugten Nanoporen wurde ein Siliziumchip (Silson Ltd, Northampton, Großbritannien) aus dem Bereich der Elektronenmikroskopie verwendet, dieser ist 3 mm x 3 mm groß und hat eine Stärke von 200 µm. Die Oberfläche des Chips ist mit einer 20 nm dünnen Siliziumnitrid-Schicht überzogen. Zentral auf diesem Chip befindet sich eine rechteckige freistehende Membran von ca. 43 µm x 32 µm unter der ätztechnisch das Silizium entfernt wurde. Das Material und die Geometrie des Chips wurden so ausgewählt, dass sie für den späteren Einbau in die Flusszelle geeignet sind.

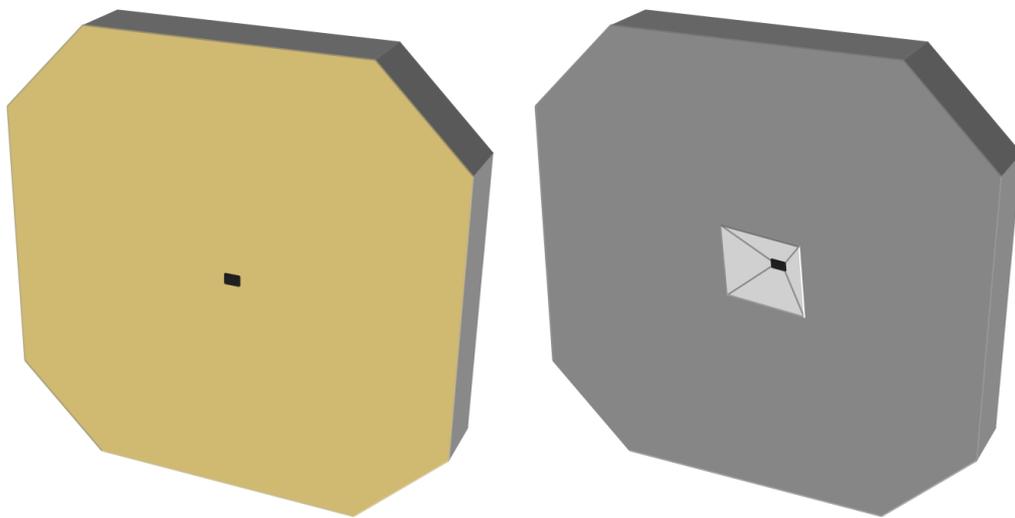


Abb. 3.2.2.1: Ober- und Unterseite des Silizium-Chips

In die freistehende Si₃N₄-Membran, welche als Grundlage für die Monolage dient, wird mittels eines Helium-Ionen-Mikroskops (ORION Plus, Carl Zeiss AG, Deutschland) (HIM) mittig eine circa 1 µm große Pore (Mikropore) erzeugt. Die Bohrung wird durchgeführt, indem der fokussierte Helium-Ionen-Strahl des Mikroskops einen Kreis mit Radius 0,512 µm aus 34 000 einzelnen Punkten abfährt und an jedem Punkt für 6 ms stehen bleibt. Das so vom Strahl umrandete, kreisrunde Stück der Si₃N₄-Membran fällt nach Vollendung aller zuvor einprogrammierten Punkte von alleine in die Probenhalterung hinunter und lässt die gewünscht Mikropore auf dem Chip zurück (siehe Abb. 3.2.2.2 und Abb. 3.2.2.3 a-c).

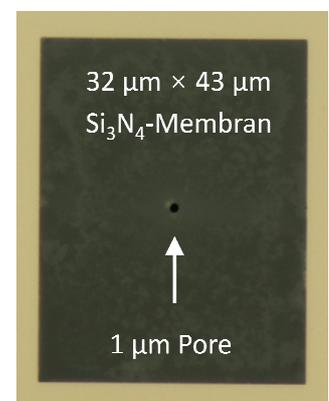


Abb. 3.2.2.2:

Bei diversen Versuchen akkurate Mikroporen in die Membran der verwendeten Chips zu bohren, hat sich gezeigt, dass die mechanischen

Lichtbildaufnahme von Pore in Si₃N₄-Membran

Eigenschaften der Chips der verwendeten Charge variierten. Es muss immer mit bedacht werden, das jedes einzelne Abrastern der Oberfläche einen geringen Materialabtrag zur Folge hat.²⁸ Bei einigen Chips wurde die 20nm dnnen Membran schon alleine beim energiearmen, groben Abrastern zur Lokalisierung der Membranmitte zerstört. Bei den ersten Versuchen eine Pore mit spezifischem Durchmesser zu erhalten, gab es Membranen, die mehrere auch dicht aneinander gesetzte Bohrungen schadlos überstanden, andere Membranen zerbarsten bei der Durchführung einer einzigen Bohrung (siehe Abb. 3.2.2.3 d). Als essenziell bei der Abbildung der erzeugten Pore hat sich die Verwendung der „Floodgun“ erwiesen, diese bietet die Möglichkeit die unvermeidlich auftretenden Oberflächenladungen mittels Elektronenbeschuss der Probe zu kompensieren.

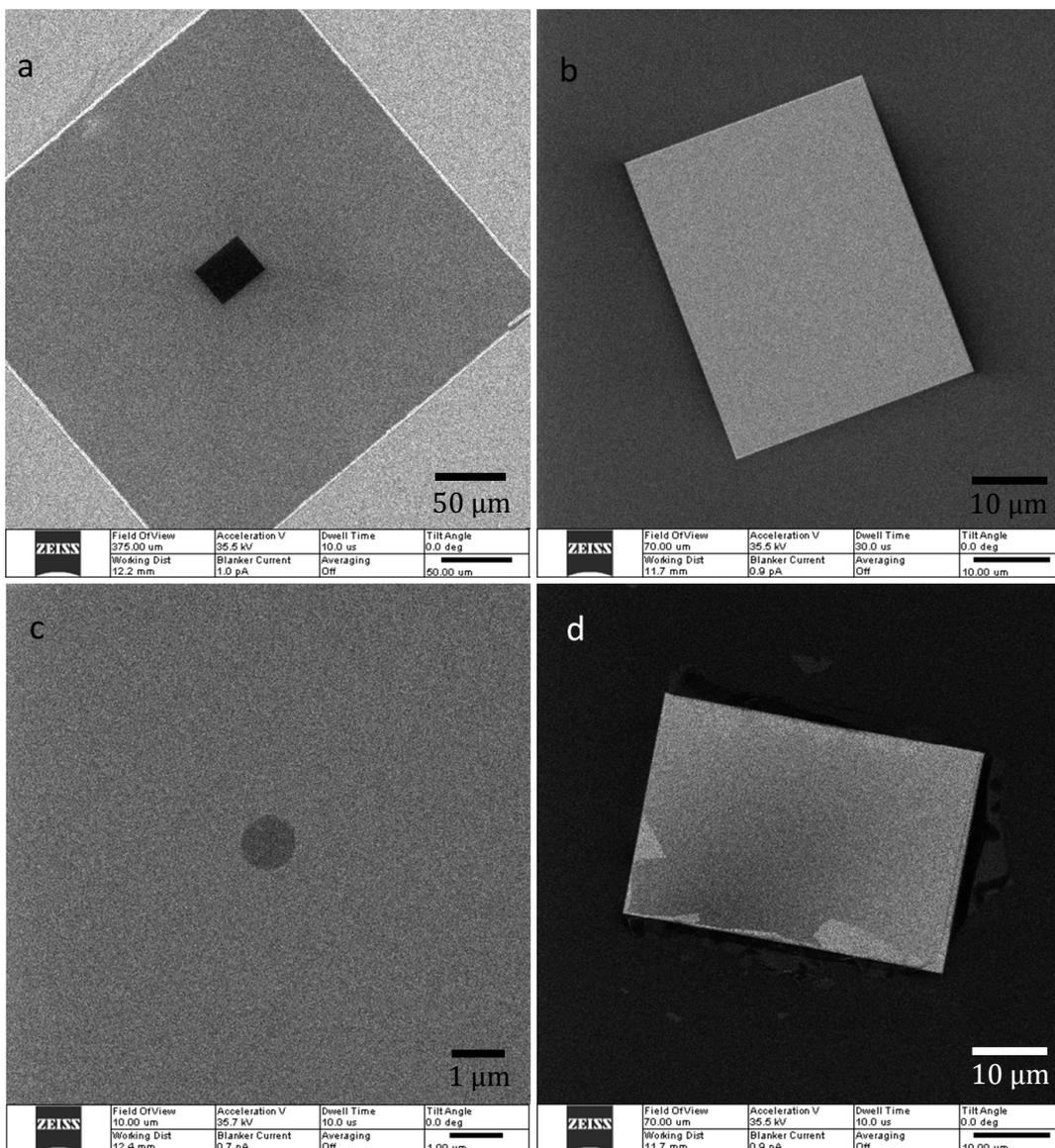


Abb. 3.2.2.3: HIM-Aufnahmen verschiedener Stadien der Mikroporen-Bohrung in eine Siliziumnitrid-Membran (a-c), durch Bohrung zerstörte Chip-Membran (d)

3.2.3 Monlagenübertrag

Die Übertragung, der in Kapitel 3.2.1 detektierten MoS₂-Monolagen, auf den Trägerchip wird mittels Wedging-Transfer⁶⁷ durchgeführt. Hierzu wird eine geeignete Monolage auf einem Siliziumwafer ausgesucht und unter dem Auflichtmikroskop mittels eines feinen Stiftes (Staedtler Lumocolor permanent F) so gekennzeichnet, dass sowohl die Monolage als auch die Markierungen gleichzeitig in der 20-fach Vergrößerung des Mikroskops zu erkennen sind (siehe Abb. 3.2.3.2 a/b). Die Kennzeichnungen erleichtern das spätere Wiederauffinden der nur wenige Mikrometer großen Monolage in den nächsten Präparationsphasen.

Nach Trocknung der gesetzten Markierungen wird der Wafer mit einem dünnen Film Cellulose-Polymer (Cellulose Acetat Butyrat 180963, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

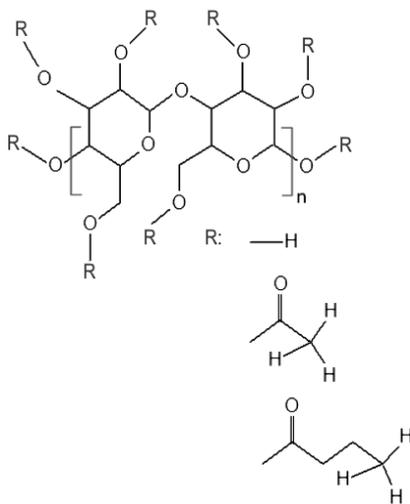


Abb. 3.2.3.1: Strukturformel
des Cellulose-Polymers

(Abb. 3.2.3.1) beschichtet. Dies geschieht, indem der Wafer mit einer Pinzette für kurze Zeit langsam und gleichmäßig in eine Lösung bestehend aus 0,3g Cellulose Acetat Butyrat (65 000 g/mol), gelöst in 10 ml Ethylacetat, getaucht wird. Das sich während des Trocknens bildende Interferenzmuster dient als Indikator für die ungefähre Schichtdicke, umso weiter die Streifen im Interferenzmuster auseinander liegen, desto dünner ist die erzeugte Polymer-Schicht. Die folgenden Schritte der Präparation erfordern, dass im Bereich der ausgewählten Monolage eine Schichtdicke erzeugt wird, die etwa zwei Interferenzstreifen pro Millimeter entspricht. Ist die gewünschte Stärke des Cellulose-Polymers erreicht, wird dem Polymer auf dem Stück Wafer Zeit gegeben, sich komplett zu

verfestigen. Die angestrebte Stärke des Polymers ist, je nachdem mit welcher Geschwindigkeit die Beschichtungen durchgeführt wird, nach ein- bis dreimaligem Eintauchen erreicht. Nachdem das Cellulose-Polymer komplett getrocknet ist, wird mit einem Skalpell ein kleiner, circa 2 mm x 2 mm, rechteckiger Bereich um die Monolage herum ausgeschnitten (siehe Abb. 3.2.3.2 c/d). Hierbei ist penibel zu beachten, dass die Monolage weder durch das Skalpell selbst, als auch durch möglicherweise sich von der Oberfläche lösendes, aufwölbendes oder einreißendes Polymer beschädigt wird. Der rechteckige Bereich, der sowohl die intakte Monolage als auch Teile der Markierungen beinhaltet, ist jetzt vom Rest des am Wafer anhaftenden Polymers isoliert und kann für den nächsten Präparationsschritt verwendet werden.

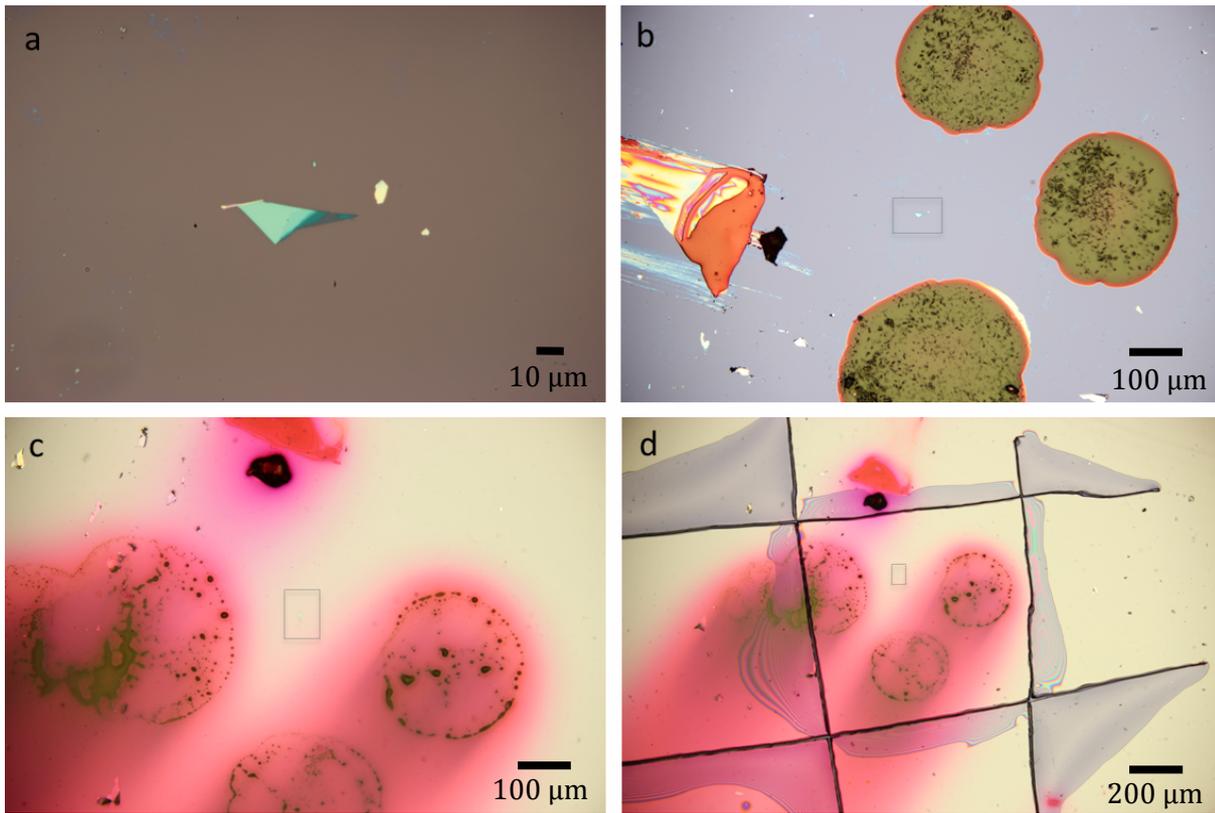


Abb. 3.2.3.2: Unterschiedliche Präparationsschritte einer Monolage für den Transfer auf den Chip, Schichtkristall aus Bild a in Bildern b, c, und d mit Rahmen gekennzeichnet

Um die soweit vorbereitete Monolage über die lediglich einen Mikrometer messende Pore der Siliziumnitridmembran des Chips abzulegen, wird der in Abbildung 3.2.3.3 gezeigte Mikromanipulator verwendet.

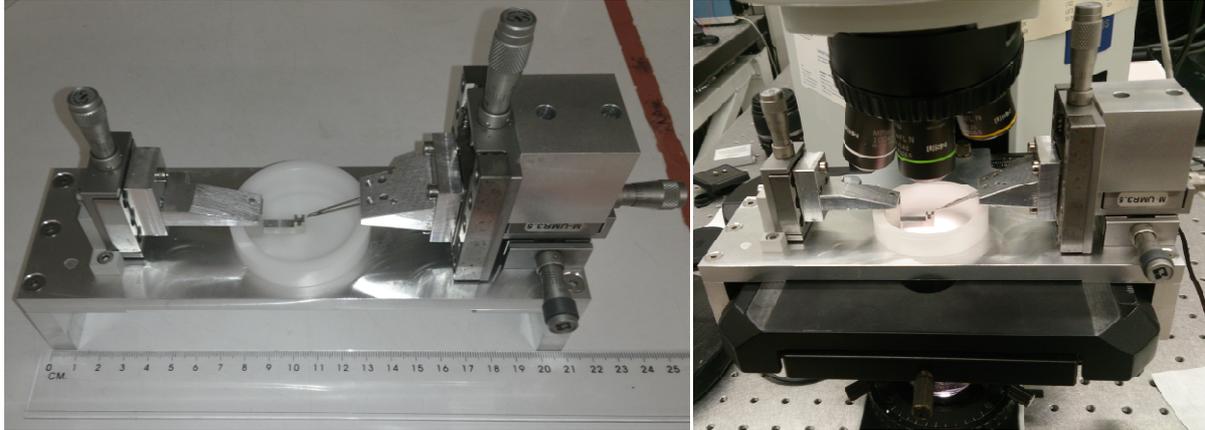


Abb. 3.2.3.3: Mikromanipulator auf Arbeitsfläche (links) und am Auflichtmikroskop fixiert (rechts)

Dieser ermöglicht, über manuelle Regelung von drei Mikrometerschrauben mittels feiner Nadelspitzen, in einem mit Reinstwasser (Millipore Milli-Q, Merk KGaA, Darmstadt, Deutschland) gefülltem Teflon-Behältnis auf und unter der Wasseroberfläche zu agieren. Eine weitere Einheit am Manipulator erlaubt es den Chip aufzunehmen und ebenfalls über eine Mikrometerschraube vom Grund des Teflon-Beckens bis zur Wasseroberfläche zu fahren. Um den mit der Mikropore versehenen Chip, auf die sich unter Wasser befindliche Halterung des Manipulators abzulegen, ist es notwendig, die dünne freistehende Membran des Chips vor den Kräften, welche die relativ große Oberflächenspannung von Wasser ausübt, zu schützen. Zur Vermeidung dieser Kräfte und einer möglichen damit einhergehenden Beschädigung der Membran wird der Chip zuvor vorsichtig hochkant in einen mit Isopropanol gefüllten, abgetrennten Deckel eines Mikroreaktionsgefäßes (Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) (Eppi) gegeben und komplett auf den Grund des Teflon-Behältnisses abgesenkt. Anschließend kann der Chip unter Wasser mittels einer Pinzette aus dem Eppi-Deckel herausgenommen und auf die dafür vorgesehene Halterung des Manipulators gesetzt werden. Jetzt wird der Chip in seiner Halterung noch zentriert und waagrecht ausgerichtet. Hierfür kann der Mikromanipulator am Auflichtmikroskop fixiert werden. Der Chip wird in die Nähe der Wasseroberfläche gefahren und mit Zuhilfenahme des Fokus kann sehr gut abgeschätzt werden, wann der Chip eine komplett horizontale Lage eingenommen hat. Des Weiteren ist es so möglich sich zu vergewissern, dass die Membran mit der Mikropore, den Transfer von Luft über Isopropanol in Wasser schadlos überstanden hat. Für den nächsten Schritt verbleibt der Chip auf seiner Halterung in der niedrigst möglichen Position, um in der Nähe der Wasseroberfläche einem

möglichst großen Aktionsraum zu gewährleisten. Das Stück Wafer mit dem freigestellten Bereich wird nun vorsichtig, wiederholt unter sehr flachem Winkel in das Teflon-Behältnis mit Reinstwasser eingetaucht. Dieser Vorgang wird solange durchgeführt, bis sich das kleine, gehärtete Rechteck Cellulose-Polymer vom Wafer komplett löst und auf der Wasseroberfläche treibt. Das nun frei treibende Polymer darf sich während der Ablösung nicht falten oder umstülpen um Schäden an der auf der Unterseite fixierten Monolage zu vermeiden.

Der komplette Mikromanipulator wird nun vorsichtig aufgenommen und auf die bewegliche Station des Aufrichtmikroskops abgesetzt, welches selbst auf einem vibrationsdämpfenden Tisch ruht. Mittels Einsatz einer Pinzette kann das treibende, und fast nur durch die zuvor gesetzten Markierungen sichtbare Polymer in Richtung der fahrbaren Nadelspitzen des Mikromanipulators gesteuert werden. Unter diesen angekommen, werden die Nadeln langsam gesenkt bis diese das Polymer auf der Wasseroberfläche fixieren. Der Vorgang wird unter dem Mikroskop verfolgt, um die Spitzen nicht versehentlich direkt über der Monolage aufzusetzen. Durch die extreme Dünne und die damit hergehenden optischen Eigenschaften ist es nicht möglich die Monolage durch das Polymer auf der Wasseroberfläche zu erkennen. Hier werden die zuvor gemachten Aufnahmen und die Markierungen zur Hilfe genommen, um die ungefähre Position abzuschätzen. Hierbei hilft es enorm, wenn die Monolage sich in unmittelbarer Nähe an einen Verbund aus mehreren Lagen befindet, da diese durch das Mikroskop erkannt werden können.

Ob die Monolage den Transfer vom Wafer unbeschadet überstanden hat und sich wirklich auf der Unterseite des Polymers befindet, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht ersichtlich. Durch geschicktes Senken und Heben bei gleichzeitigem horizontalem Bewegen der Nadeln ist es möglich, den Bereich mit der Monolage endgültig zwischen den beiden Nadelspitzen des Manipulators und der Wasseroberfläche einzuspannen. Die so auf der Oberfläche fixierte und über die Mikrometerschrauben bewegbare Polymerschicht wird über die Chiphalterung geführt. Der Chip samt Halterung wird daraufhin langsam nach oben gefahren und, um den resultierenden sinkenden Wasserspiegel entgegenzuwirken, die beiden Nadeln welche das Polymer in Position halten nach unten. Es ist wichtig die Nadeln nicht zu weit hinunter zu fahren, da das Polymer sonst unter die Oberfläche gedrückt wird. Ebenfalls kann es bei zu wenig Druck passieren, dass sich das Polymer löst. In beiden Fällen muss, wenn keine Beschädigung entstanden ist, das Einfangen von vorne begonnen werden. Die Annäherung wird nun soweit fortgesetzt, bis die Chipmembran und das Polymer sich so nahe kommen, dass beide gleichzeitig im Fokus des Mikroskops sichtbar sind. Jetzt kann beim weiteren Nähern mittels ständigen Wechsels der Fokusebene zwischen Membran und Polymerunterseite die Pore und der Teil des Polymers, auf dem die Monolage vermutet wird, direkt übereinander gelegt werden. Sobald Chip und Polymer

an der Wasseroberfläche einmal in Kontakt sind, sorgt die Adhäsion dafür, dass das Wasser verdrängt wird und die Trocknung beginnt, ein Lösen ist jetzt nicht mehr möglich.

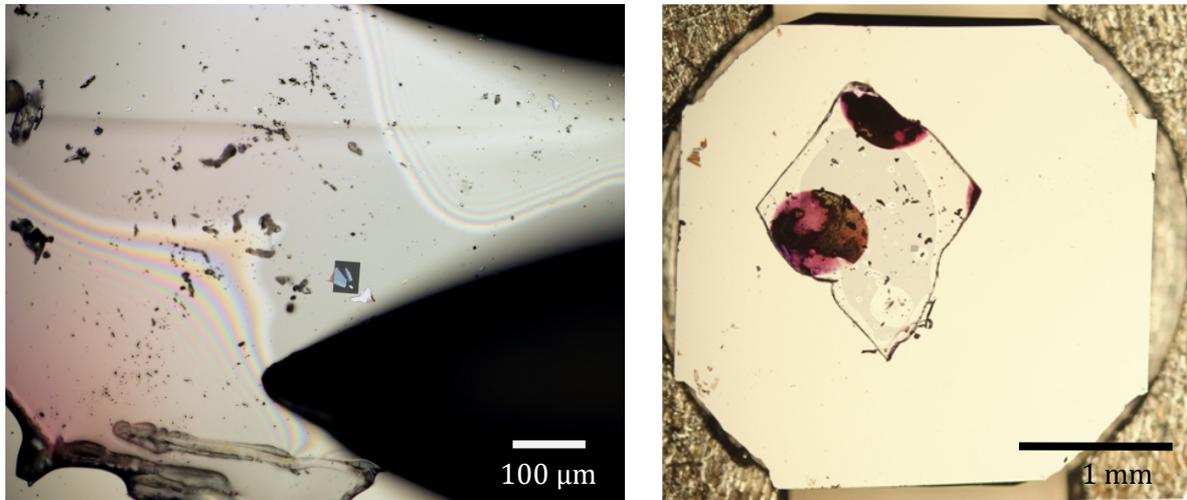


Abb. 3.2.3.4: Chip und Polymer kurz nach dem Kontakt (links), Chip mit getrockneter Polymerschicht in Halterung des Mikromanipulators (rechts)

Erst während der Trocknung, wenn sich kaum noch Wasser zwischen Membran und Polymer befindet, wird die Monolage langsam wieder sichtbar und es zeigt sich ob diese über der Pore platziert werden konnte (Abb. 3.2.3.4 links). Ebenfalls kann jetzt die Erkenntnis gewonnen werden, ob die Monolage beschädigt ist, leider nur Teile der Pore bedeckt sind oder, ob sich überhaupt eine Monolage auf der Unterseite des Polymers befunden hat. Wenn auf einen möglichen erfolgreichen Transfer zu schließen ist, wird das komplette Wasser aus dem Teflon-Becken entfernt und der Verbund für 24 Stunden zum Trocknen unter dem Mikroskop belassen. Während des Trocknungsprozesses kann es durch mechanische Spannungen, hervorgerufen von den Nadelspitzen, vorkommen, dass das Polymer sich anhebt und die Membran samt Monolage zerreißt. Ebenso kann der Markierungsfarbstoff bei der Trocknung eine Kraft auf das Polymer ausüben, sodass dieses sich langsam wieder ablöst und die Monolage nicht mehr über der Pore verbleibt. Nach dem vollständigen Trocknen werden die Nadelspitzen angehoben und der Chip aus der Halterung genommen (Abb. 3.2.3.4 rechts). Um das Cellulose-Polymer vom Chip zu entfernen, wird dieser mit einer Pinzette vertikal in ein Gefäß mit Ethylacetat gegeben. Hier kann der Chip sowohl geschwenkt oder auch, wenn notwendig abgelegt werden. Nach dem vollständigen Auflösen des Polymers bleibt die Monolage über der Pore auf der Membran zurück. Wie zuvor beim Eintauchen wird der Chip jetzt ebenfalls vertikal und äußerst langsam aus der Flüssigkeit gezogen und bis zur vollständigen Verflüchtigung des Lösungsmittels in der Pinzette gehalten. Unter dem Mikroskop wird geklärt ob die Monolage auch diesen Schritt intakt überstanden hat.

3.2.4 Nanopore

Die für das Experiment erforderliche Festkörpernanopore wird mittels eines Helium-Ionen-Mikroskops erzeugt. Hierfür wird der soweit präparierte Chip aus Kapitel 3.2.3 abermals mit der Membran nach unten in das Mikroskop eingelegt. Mit geringer Auflösung und unter Verwendung der „Floodgun“ wird behutsam so lange an die Membran herangefahren bis die zuvor gebohrte Mikropore ausfindig gemacht wird. Um weder die Monolage noch die Membran zu gefährden, werden keine detaillierteren Bilder mehr aufgenommen sobald die Mikropore sichtbar ist (Abb. 3.2.4.1 rechts), zuvor sind schon Mehrfachlagen auf der anderen Seite der Membran schemenhaft zu erkennen (Abb. 3.2.4.1 mitte)

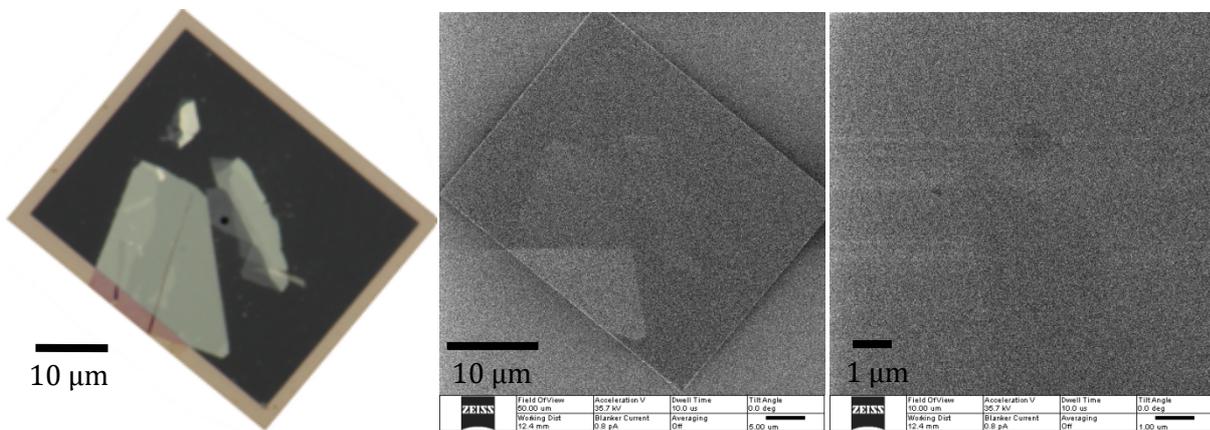


Abb. 3.2.4.1: Auflicht- und HIM-Aufnahmen einer mit Monolage überspannten Mikropore

Anschließend wird der Ionenstrahl auf das Zentrum der Mikropore fokussiert und bei einem Strom von 0,8 pA für 60 Sekunden dort gehalten. Vorausgegangene Arbeiten²⁸ zeigen, dass mit diesem Vorgehen eine Pore von circa 40 nm Größe in der MoS₂-Monolage entsteht. Zwar ist es ohne weiteres möglich analog auch kleinere Poren zu erzeugen. Für dieses Experiment, welches sich primär mit der Realisierbarkeit einer Translokation durch MoS₂-Monolagen beschäftigt, ist die Verwendung einer etwas größeren Pore bei der Einfädung jedoch von Vorteil. Obwohl jetzt die theoretische Möglichkeit besteht die Dimension der gebohrten Nanopore direkt mit dem HIM zu überprüfen, wird davon abgesehen, um das sensible Konstrukt nicht weiter zu gefährden. Eine alternative, später in dieser Arbeit angewandte Methode um auf die Porengröße zu schließen, stellt die Messung des Porenwiderstandes nach Einbau in eine Flusszelle dar^{28,68}.

3.2.5 Flusszelle

Der in den Arbeitsschritten der vorherigen Kapitel hergestellte Chip soll nun in die für das Nanoporen-Experiment verwendete Flusszelle eingebaut werden. Die einzelnen Schritte, die jeweils zur Anfertigung und Zusammenbau einer Flusszelle für eine Messung notwendig sind, werden im Folgenden beschrieben.

Der schematische Aufbau der Flusszelle ist in Abbildung 3.1.2 dargestellt. Die Basis bildet ein dünnes Deckglas (60 mm x 24 mm x 0,15 mm), auf dieses wurde mittels Rotationsbeschichtung eine ca. 40 µm dicke Schicht PDMS (Sylgard 184 Silicone Elastomer, Dow Corning Co., Michigan, USA) aufgebracht (Abb. 3.2.5.1 a). In die PDMS-Schicht wird mit einem Skalpell ein etwa 1 Millimeter breites und ca. 2,6 Zentimeter langes Rechteck geschnitten und der innere Teil mit einer Pinzette entfernt, sodass ein flacher Kanal entsteht (Abb. 3.2.5.1 b). Als nächstes wird ein mit PDMS beschichteter Objektträger verwendet, dessen Oberfläche vor der Rotationsbeschichtung silanisiert wurde, die Schichtdicke beträgt ebenfalls ca. 40 µm. Diese beide PDMS-Lagen sollen jetzt wasserdicht miteinander verbunden und der entstehende Kanal luftblasenfrei mit Puffer befüllt werden. Hierfür ist es notwendig, dass beide PDMS-Schichten zunächst hydrophilisiert werden. Dies geschieht, indem das PDMS unmittelbar vor dem Zusammenbau für 30 Sekunden mit einem Sauerstoff-Plasma behandelt wird. Die Stickstoffatmosphäre der Plasmaanlage wird hierfür bis auf $8 \cdot 10^{-3}$ mbar abgepumpt und darauf mit Sauerstoff bis zu einem Druck von 0,1 mbar bei weiterhin aktivem Abpumpen im Durchstrom geflutet. Das Plasma wird mittels 500 kHz Wechsellspannung zwischen 20 kV und 45 kV gezündet. Nach der Behandlung wird in die unversehrte PDMS-Schicht des Objektträgers zuerst zentral ein ca. 1,3 mm großes Loch gestanzt, der innere Teil entfernt und anschließend mit einem Skalpell ein Rechteck von ca. 4 cm x 1,5 cm um das Loch herum geschnitten (Abb. 3.2.5.1 c). Das Rechteck wird vorsichtig mit zwei Pinzetten vom Objektträger gezogen und in der Luft gedreht, sodass die hydrophile Seite nach unten zeigt. Anschließend wird das PDMS-Rechteck flach über den Kanal des beschichteten Deckglases gelegt, sodass dieser komplett bedeckt und das gestanzte Loch mittig über dem Kanal liegt (Abb. 3.2.5.1 d). Abschließend werden noch zwei weitere 3 mm Löcher durch beide PDMS-Schichten zu den Enden des Kanals gestanzt und mit einer Pinzette von Resten befreit (Abb. 3.2.5.1 e). Um die noch anhaltende Hydrophilie des gebauten Kanals zu nutzen, wird dieser, vom mittleren Zugang beginnend, mit Puffer befüllt. In sämtlichen Experimenten wird, wenn nicht anders angegeben, 20 mM KCl, 2 mM Tris/HCl Puffer mit einem pH-Wert von 8,0 verwendet, der durch Unterdruck entgast wurde. Die hydrophilen Wände des Kanals sorgen dafür, dass der Puffer blitzartig zu beiden Enden des Kanals hin transportiert wird. Nach einer optischen Kontrolle, dass der Kanal bis zu beiden Enden gefüllt und absolut frei von Luftbläschen ist, werden die beiden äußeren Zugänge mit Puffer aufgefüllt.

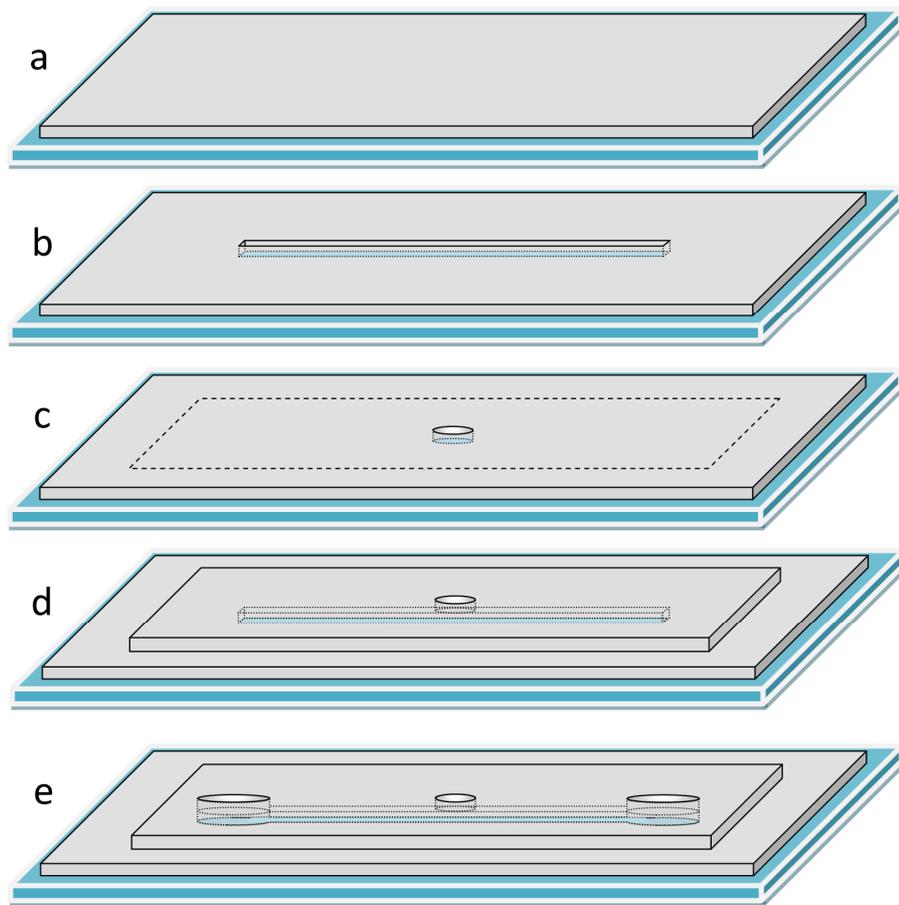


Abb. 3.2.5.1: Schematische Darstellung der nötigen Präparationsschritte zur Erzeugung eines dünnen PDMS-Kanals mit drei Zugängen

Aufgrund der empfindlichen Chip-Membran in Zusammenspiel mit möglich auftretenden Kapillarkräften und Druckgradienten müssen die weiteren Schritte unter Puffer durchgeführt werden. Hierzu wird ein transparentes PET-Behältnis mit einem Liter im Ultraschallbad entgastem Puffer gefüllt. Um jedwede Verunreinigung der Flüssigkeit sowohl durch Staub als auch durch Zellen oder anderen Partikel zu erschweren, wird ausschließlich mit Haarnetz und Mundschutz unter einer Flowbox gearbeitet. Auf dem Grund des Behältnisses wird zuerst der metallende Boden der Flusszelle abgelegt. Der Boden hat ein größeres Loch für den Laserstrahl und eine 0,2 mm tiefe Aussparung, in die das soeben präparierte Deckglas mit den drei Zugängen hineingelegt wird. Um den sensiblen Chip in den Puffer einzutauchen, wird erneut die Methode des mit Isopropanol gefüllten Eppi-Deckels aus Kapitel 3.2.3 angewandt. Der Chip wird vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Eppi-Deckel herausgenommen und mit der Nanopore nach unten auf das Zentrum des mittleren Zugangs gelegt. Der Chip darf auf keinen Fall versehentlich neben dem 1,3 mm messenden Zugangsloch abgelegt werden da jeder mechanische Druck auf die Monolage

oder die 20 nm dünne Membran diese einreißen lassen würde. Über die beiden äußeren Zugänge wird der erste Teil der zweiteiligen Acrylglas-Abdeckung gesetzt und mit Inbus-Schrauben fixiert. Im Acrylglas befinden sich direkt über den beiden Zugängen zwei vertikale, vollständig durchgehende Kanäle, diese beiden Kanäle bilden jetzt zwei größere Flüssigkeitsreservoirs. Um die Oberseite des Chips zu versiegeln, wird aus ca. 0,60 mm dickem PDMS ein 3 mm großer Dichtungsring gestanzt, dessen Innendurchmesser 1,5 mm beträgt. Der Dichtungsring wird zusammen mit der zweiten Acrylglas-Hälfte, bestehend aus einem hohlen Stempel, auf dem Chip platziert und mit Messing-Schrauben behutsam angezogen. Der hohle Stempel stellt Reservoir 3 in der folgenden Abbildung dar.

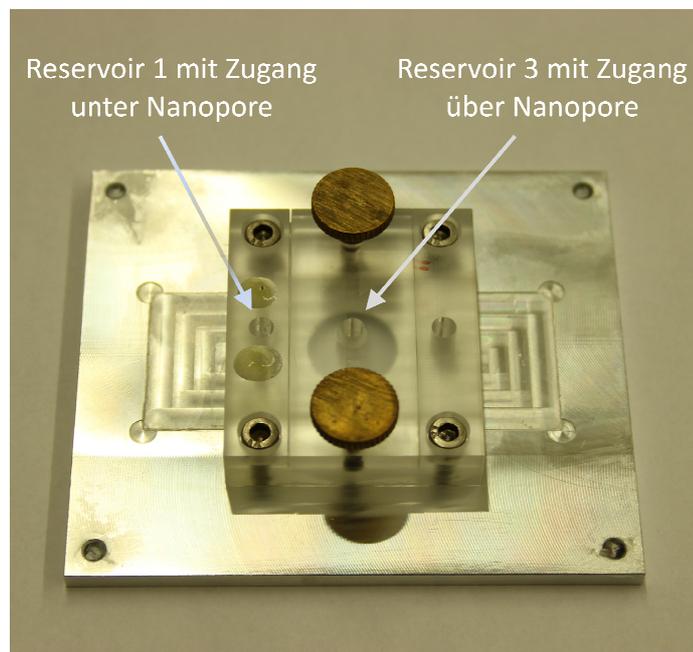


Abb. 3.2.5.2: Vollständig zusammengebaute Flusszelle, bereit zur Kontaktierung und Einbau in die Optische Pinzette

Aufgrund der mittels PDMS erzeugten Dichtigkeit der Flusszelle müssen jegliche Partikel und Ionen, um von einem der äußeren Reservoirs 1/2 in das mittlere Reservoir 3 zu gelangen, die Nanopore passieren.

Alle in dieser Arbeit verwendeten PDMS-Schichten auf Objektträgern und Deckgläsern wurden in einem Reinraum aus entgastem PDMS mittels *Spincoating* hergestellt und anschließend in einem Ofen (APT.Line Serie ED 115, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) 2 Stunden bei 85 °C ausgehärtet.

3.2.6 Mikrokügelchen

Für die Durchführung einer kontrollierten Translokation von DNA in der im letzten Unterkapitel präparierten Flusszelle muss die DNA an ein Mikrokügelchen gebunden werden. In diesem Kapitel wird der Vorgang des Immobilisierens von λ -DNA an ein Polystyrolkügelchen beschrieben. Hierzu werden 0,25 μ l einer 5%igen Lösung aus mit Streptavidin beschichteten Polystyrol-Mikrokügelchen mit einem Durchmesser von 3,05 μ m (Kisker Biotech GmbH, Steinfurt, Deutschland) mit einer Pipette aufgenommen und in einen Eppi (1,5 ml) gegeben. Danach werden 0,5 μ l biotinylierte λ -DNA Lösung (70 ng/ μ l) (Promega Madison, Wisconsin, USA) abgemessen, mit in das Eppi gegeben und vorsichtig vermengt. Anschließend wird das Gemisch für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit DNA und Kügelchen sich verbinden und die Biotin-Streptavidin-Bindungen bilden können. Das gewählte Verhältnis von Kügelchen zu DNA-Strängen beträgt ca. 1:800, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sich nach 10 Minuten an jedem Kügelchen mindestens ein DNA-Strang befindet.

Als letzter Schritt wird das Eppi schließlich mit entgastem Puffer aufgefüllt und für ein bis zwei Sekunden bei kleinster Stufe auf den Vortexmischer (Vortex-Genie-2, Scientific Industries, USA) gehalten. Hierdurch werden mögliche entstandene Aggregate aufgelöst und die Kügelchen gleichmäßig im Eppi verteilt.

3.3 AFM-Abbildung

Zur Überprüfung der rein optisch und empirisch detektierten Monolagen wird als weitere Methode eine Rastersonden-Mikroskopie-Technik eingesetzt, die Rasterkraftmikroskopie (engl.: *atomic force microscopy* – AFM). In Abbildung 3.3.1 ist das Funktionsprinzip eines Rasterkraftmikroskops schematisch dargestellt.

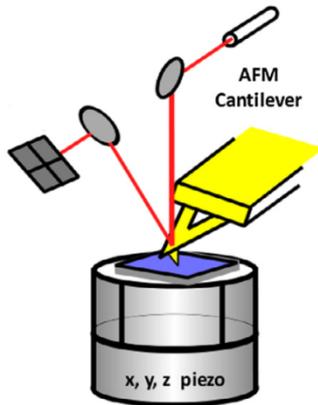


Abb. 3.3.1:
Funktionsprinzip eines
Rasterkraftmikroskops⁶⁹

In Abbildung 3.3.1 ist das Funktionsprinzip eines Rasterkraftmikroskops schematisch dargestellt. Eine feine Nadel, deren Spitze im Idealfall nur wenige Atome umfasst, ist an einer Art Metallfeder befestigt, dem so genannten Cantilever. Mit Hilfe einer Piezoelektrik kann dieser Cantilever nun in allen drei Raumdimensionen in Nanometerschritten über die Probenoberfläche bewegt werden und so abrastern. Je nach Topographie der Probenoberfläche und der damit verbundenen Kräfte auf die Nadel wird der Cantilever dabei mehr oder weniger stark ausgelenkt und liefert dadurch ein topographisches Abbild der Probe. Zur dafür benötigten Messung der Cantileverauslenkung gibt es verschiedene Verfahren, in Abbildung 3.3.1 geschieht dies durch die Bestrahlung der

Cantileveroberseite mit gebündeltem Laserlicht. Der vom Cantilever reflektierte Laserstrahl wird dann auf eine Quadrantendiode geleitet, welche die Auslenkung des Cantilevers detektiert und in ein Spannungssignal umwandelt. Bei der Abrasterung der Probenoberfläche mit der Cantilever-Nadel treten verschiedene Kräfte auf, die in ihrer Summe die Auslenkung des Cantilevers bewirken. Zur Überprüfung der Dicke ausgewählter MoS₂-Lagen wird das AFM im *tapping mode* betrieben, dieser Modus rastert die zu untersuchende Oberfläche materialschonend aber dennoch mit hoher Auflösung ab. Hierbei wird der Cantilever in Schwingung versetzt und in der unmittelbaren Nähe der Probenoberfläche beginnen sich die Atomorbitale der Probenoberfläche sowie der Sondenspitze für sehr kurze Zeit zu überlappen. Diese Überlappung führt zu Repulsivkräften welche eine Verschiebung der Resonanzfrequenz des Systems zur Folge hat, weshalb sich messbare Änderungen in der Schwingungsamplitude und in der Phase (zwischen Anregung und Schwingung) ergeben.

Um die Schichtdicke einer zuvor ausgewählten MoS₂-Lage zu messen, wird der Teil der Wafers, auf dem sich die zu untersuchende Struktur befindet, auf die Maße von ca. 8mm x 8mm zurechtgeschnitten. So präpariert kann das Fragment mittels doppelseitigen Klebebands auf ein AFM-Probenträger, einer ebenen Metallscheibe (Ø 10mm) aus rostfreiem Stahl, fixiert werden. Der Probenträger wird anschließend in die Messapparatur des Rastersonden-Mikroskops (Nanoscope V, Multimode, Bruker, Massachusetts, USA) eingesetzt. Der Scanvorgang erfolgt mit einem Kraftsensor (Tap300AL-G, Ted Pella Inc, Redding, Kalifornien, USA) im *tapping mode*.

3.4 Ablauf einer Messung

In diesem Unterkapitel wird der typische Ablauf eines DNA-Translokations-Experiments an der Optischen Pinzette dargestellt. Ziel der Messung ist es, sowohl Kräfte als auch die Änderungen im Ionenstrom zu detektieren, die während der Translokation eines, an einem Mikrokügelchen immobilisierten, λ -DNA-Doppelstrangs durch eine Nanopore auftreten. Hierzu wird die zuvor präparierte Flusszelle aus Kapitel 3.2.5 in die Halterung der Optischen Pinzette eingebaut und elektrisch kontaktiert (vgl. Kapitel 3.1).

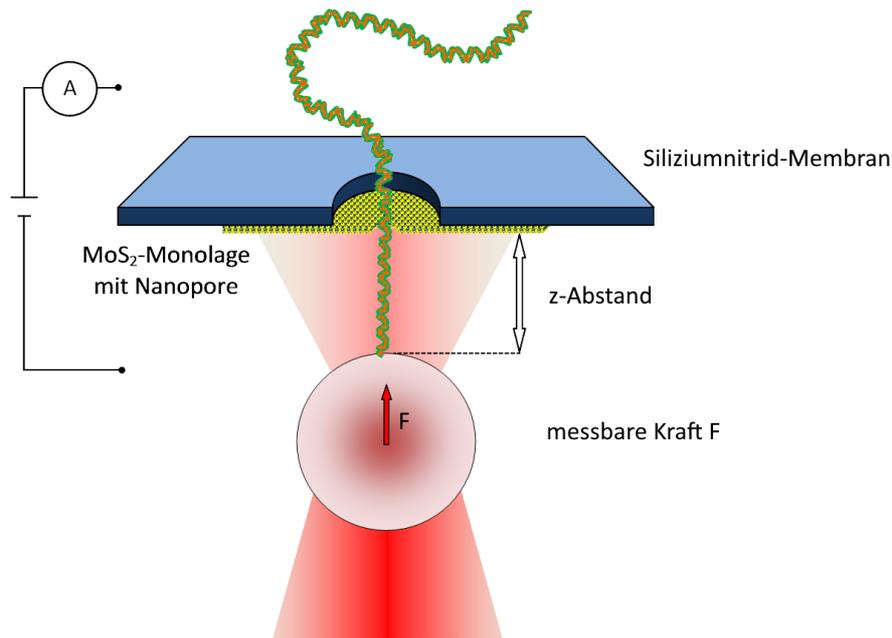


Abb. 3.4.1: Prinzip des DNA-Translokations-Experiments mit der Optischen Pinzette

In der Steuerungssoftware wird als erstes die Messung einer U-I-Kennlinie des verbauten Chips veranlasst, anhand dieser kann sofort ermittelt werden ob der Probenchip den Einbau unbeschadet überstanden hat. Am Patch-Clamp-Verstärker ist es möglich eine Vorspannung einzustellen um eine Offset-Kalibrierung des Stroms durchzuführen und so elektrochemische Prozesse auszugleichen. Aus den Werten des gemessenen Ionenstroms ist sofort ersichtlich, ob die Flusszelle dicht zusammengebaut wurde, die Siliziumnitrid-Membran des Chips samt Nanopore intakt ist oder sich Luftblasen direkt vor oder hinter der Pore befinden. Außerdem wird optisch abgeklärt, ob sich Verunreinigungen vor der Membran oder im Trichter des Chips angesammelt haben. Sofern solche vorhanden sind, müssen diese durch kontinuierliches Spülen mit entgastem Puffer vorsichtig entfernt werden. Diese müssen entfernt werden weil Luftblasen, größere Partikel oder Cluster zum einen die Nanopore verstopfen können, zum anderen beeinflussen sie die spätere Kantendetektion des Kügelchens negativ oder machen diese unmöglich. Außerdem kann durch den verwendeten Laser eine Verunreinigung insoweit

beeinflusst werden, dass diese extrem stark erhitzt, das umgebende Wasser zum Kochen bringt und infolgedessen die Membran oder Nanopore beschädigt.

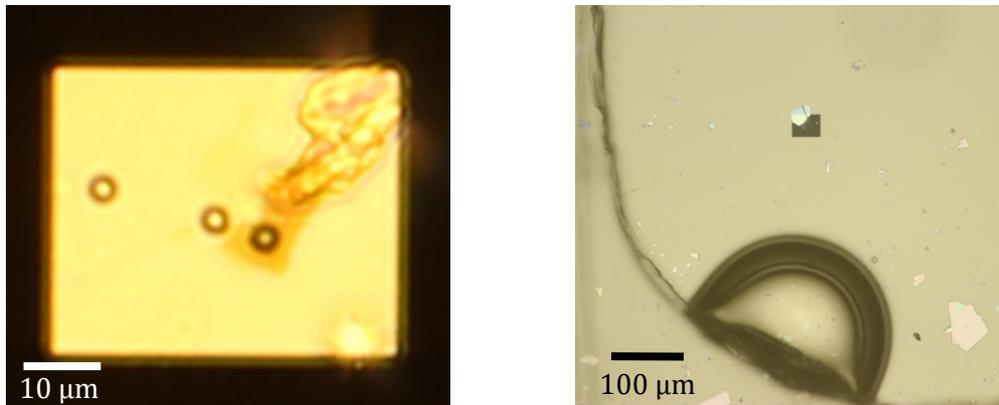


Abb. 3.4.2: Mikroskopische Aufnahme im Durchlicht von einer Verunreinigung im Trichter des Chips und von auf der Membranoberfläche adhärrierender Kügelchen (links), Auflichtaufnahme von einer Luftblase im Kanal in der Nähe des Membranfensters (rechts)

Speziell bei der Beseitigung von Zellen oder anderen Partikeln im Trichter des Chips ist immense Vorsicht geboten (siehe Abb. 3.4.2 links). Jeglicher Austausch von Flüssigkeit in der Nähe der Membran führt zu einer Strömung und damit zu einer Änderung des hydrodynamischen Drucks auf die Membran und die Nanopore. Durch wiederholtes gezieltes Pipettieren von Puffervolumina im Mikroliter-Bereich innerhalb des Trichters ist es vereinzelt möglich die Verunreinigungen zu beseitigen. Bei zu stark adhärrierenden Partikeln ist das Ablösen innerhalb der zusammengebauten Zelle nicht möglich, der Chip muss, soweit die Membran nach den Säuberungsversuchen noch intakt ist, aus der Zelle ausgebaut werden. Hierfür ist das komplette Zerlegen der Flusszelle notwendig. Nur durch eine externe Behandlung mit Lösungsmitteln sind hartnäckige Verschmutzungen zu beseitigen, dies bedeutet den Abbruch des Experiments.

Können jedoch all diese „makroskopischen“ Probleme ausgeschlossen werden, folgt der nächste Schritt des Versuchs. Aus der angelegten Spannung, dem resultierenden Ionenstrom und der bekannten Membrandicke kann der effektive Porenradius²⁸ berechnet und somit auf die Eignung für das Experiment geschlossen werden. Liegt der Durchmesser innerhalb des gewünschten Bereiches von 40 nm, kann mit dem Einspülen, der mit λ -DNA versehenen Polystyrolkügelchen (vgl. Kapitel 3.2.6), begonnen werden.

Das Hinzugeben der Kügelchen-Lösung geschieht, indem aus den beiden äußeren Reservoiren jeweils eine kleine Menge Puffer mit einer Mikropipette heraus pipettiert wird. Danach wird Reservoir 1 mit der Kügelchen-Lösung befüllt, durch den hydrostatischen Druckunterschied der

Reservoire 1 und 3 wird die Flüssigkeit samt Kügelchen langsam durch den Kanal geleitet bis sich ein Gleichgewichtszustand einstellt. Im Mikroskop ist dies durch eine immer weiter abnehmende Fließgeschwindigkeit der Kügelchen zu beobachten. Wenn die Geschwindigkeit der vorbeiströmenden Kügelchen fast zum Erliegen gekommen ist, wird mit dem Einfangen eines vielversprechend aussehenden Exemplars in der Optischen Pinzette begonnen. Alle relevanten Parameter wie Größe und Symmetrie des Kügelchens sollten für eine erfolgreiche Messung den Vorgaben entsprechen. Innerhalb der angesetzten Kügelchen-Lösung kommen immer wieder Exemplare unterschiedlicher Größe mit Defekten oder ungenügenden optischen Eigenschaften vor, diese gilt es zu meiden. Außerdem muss das Kügelchen unbedingt separiert vorliegen, also keinen Teil eines durch DNA zusammengehalten Verbundes mit anderen Kügelchen darstellen. Zeichnet sich das Exemplar als verwendbar aus, kann mit der Annäherung an den späteren Messort begonnen werden. Dies geschieht in der Ebene über den manuell zu bedienenden x-y-Tisch und in z-Richtung, ebenfalls noch manuell, über den Fokus des Mikroskops. Das Kügelchen wird nun derartig platziert, dass die Position etwas weniger als einen Kugelradius Abstand in z-Richtung von der Si₃N₄-Membran entspricht. An diesem Platz sind, für die jetzt anstehende Fokus-Ausgleichs-Kalibrierung (*advanced focus correction calibration*), identische optische Bedingungen vorzufinden, wie sie direkt über der Nanopore herrschen. Die Kalibrierung ist für die genaue Bestimmung der wirkenden Kraft aus der Kügelchen-Auslenkung notwendig.

Wie bereits in Kapitel 3.1 erwähnt, findet eine scheinbare Größenänderung des Kügelchens statt. Diese Änderung ist weder linear noch für unterschiedliche Kügelchen identisch und muss für jedes frisch eingefangene Exemplar erneut betrachtet werden. Zur Berechnung der Auslenkung und somit der anliegenden Kraft ist außer dem durch die Videoauswertung bestimmten Radius r des Kügelchens die Kenntnis dessen Radius ohne Krafteinwirkung r_0 an jedem Ort z der Messung notwendig. Die Auslenkung Δz ergibt sich dann, mit einem Konversionsfaktor β , nach folgender Formel:³

$$\Delta z = \beta \cdot \left(\frac{r_0(z)}{r} - 1 \right)$$

Das Prinzip der videobasierten Größenbestimmung eines gefangenen Kugelchens ist in der folgenden Abbildung 3.4.3 zu sehen. Die Auswertsoftware detektiert die steigenden (pink) und fallenden (bordeauxrot) Kontrastkanten des Objektes und bestimmt aus deren Mittelwert (orange) die scheinbare Kugelgröße (gelber Kreis)⁵⁴.

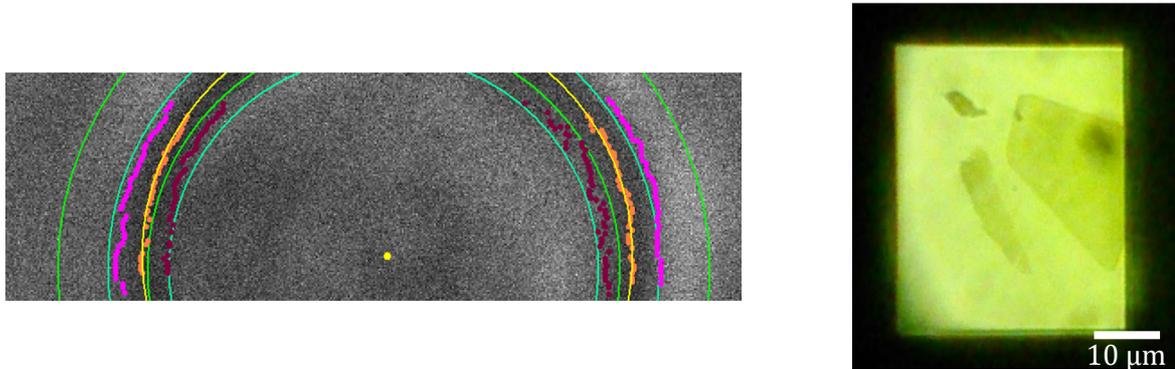


Abb. 3.4.3: Kantendetektion der Software zur Bestimmung des scheinbaren Kugelradius (links), Ansicht des Membranfensters durch das Mikroskop (rechts)

Nach der Fokus-Ausgleichs-Kalibrierung wird das Kugelchen in z-Richtung, durch Verwendung des computergesteuerten Piezotisches, mehrere Male gleichmäßig und laminar durch die Flüssigkeit gefahren. Die vorläufige Kraftkonstante, welche notwendig für die Berechnung der wirkenden Kraft während des laufenden Experiments ist, wird über die wirkende Stokes-Reibungskraft ermittelt. Wie zuvor muss auch dieser Wert für jedes neu gefangene Kugelchen neu bestimmt werden. Alle folgenden präzisen Bewegungen des Kugelchens werden jetzt nur noch mittels der LabView-Steuerungssoftware am Rechner ausgeführt.

Sind die beiden Kalibrierungsprozeduren durchgeführt, wird das Kugelchen in circa 2 µm Abstand direkt unter der Nanopore platziert (vgl. Abb. 3.4.1). Bei der Klärung der Position der Nanopore sind die zuvor sowohl optisch als auch im HIM aufgenommenen Bilder zum Vergleich eine ausgesprochene Hilfe. Die Nanopore allein ist durch ihre Größe natürlich nicht sichtbar, wurde jedoch zentral in die 1 µm Pore gebohrt. Verursacht durch die schlechten Sichtverhältnisse der Flusszelle und der verbauten Infrarotfilter, ist selbst diese größere Pore meistens nicht eindeutig auszumachen und ihre Position deshalb mehr oder weniger nur zu erraten. Bei der Positionierung sollten weder die Membran noch die Monolage berührt werden. Dies kann sich als schwieriger als zunächst gedacht herausstellen, da zu beachten ist, dass die Chip-Membran nicht wie im trockenen Zustand glatt gespannt, sondern mitunter auch gewölbt über dem Fenster liegen kann. Gründe für diese sowohl nach oben als auch nach unten auftretenden Auswölbung sind die Wärme der Beleuchtung, die Absorption der Laserenergie und der elektroosmotische Fluss. Bei

einer Berührung der Membran besteht immer die Möglichkeit, diese unwiderruflich zu beschädigen, selbiges gilt natürlich, jedoch noch brisanter, für die Monolage bzw. die Nanopore. Zusätzlich kann eine Berührung auch zu unerwünschter Adhäsion des Kügelchens an der Membranoberfläche selbst oder an Verunreinigungen auf dieser führen. Ein Wiederablösen ist durch die begrenzte maximale Kraft des eingesetzten Lasers nur selten möglich. Wenn ein Kügelchen in der Nähe der Pore kleben bleibt, beeinflusst dieser Zustand, wie die zuvor im Kapitel erwähnten Verunreinigungen im Trichter des Chips, die Kantendetektion und es kann erst fortgefahren werden, wenn die Messumgebung wieder frei von störenden Einflüssen ist. In den Fällen zu starker Adhäsion muss die Flusszelle für eine Reinigung wieder komplett zerlegt werden.

Direkt unterhalb der Nanopore angelangt, wird jetzt eine Transmembranspannung angelegt und die Translokation initialisiert. Die Spannung wird solange erhöht bis ein Sprung in der Kraft, welcher auf eine Einfädung hindeutet (vgl. Kap. 2.2), detektiert wird. Die Maximalspannung sollte 150mV nicht übersteigen. Ist die angestrebte Translokation eingetreten und ein Sprung in der auf das Kügelchen wirkende Kraft detektiert, wird zur Verifizierung der Einfädung des DNA-Stranges die Spannung etwas herabgesetzt. Das Verringern der angelegten Spannung sollte ein abnehmendes Kraftsignal zur Folge haben. Ist die Verminderung in der Echtzeit-Kraftmessung festzustellen, kann von einer gelungenen Translokation ausgegangen werden.

Ist die DNA eingefädelt, können nun verschiedene Experimente durchgeführt werden, wobei die resultierenden Kräfte auf die DNA und der Ionenstromfluss kontinuierlich aufgezeichnet werden. Ein hier durchgeführtes Experiment, hinsichtlich der Möglichkeit der Gen-Sequenzierung mit MoS₂-Monolagen, ist das kontrollierte langsame Herausziehen und Wiedereinführen eines Teils des DNA-Strangs und späterer Analyse der dafür benötigten Kraft als auch der Änderungen im Ionenstromfluss. Das Ende der Translokation, also die Ausfädung des kompletten DNA-Stranges, ist durch einen abrupten Abfall auf den Grundzustand in der Kraftkurve sichtbar. Zwischenzeitige Sprünge im Kraftsignal, die nicht bis auf den Grundzustand herunterreichen, können auf die Ausfädung eines von möglicherweise mehreren eingefädelt DNA-Strängen schließen lassen. Auch andere, nicht durch kontinuierlichen Zug oder permanente Gleichspannung, hervorgerufene Kräfte und Stromänderungen können untersucht werden. Hierzu gehört die ebenfalls durchgeführte Messung der Auswirkungen einer auf die angelegte Gleichspannung aufmodulierten Wechselspannung beim Durchfahren verschiedener Frequenzen. Viele weitere interessante und lohnenswerte Messungen sind denkbar, wie zum Beispiel die Untersuchung der Auswirkungen verschiedener, an die DNA-Stränge gebundener Liganden. So wurden im Verlauf dieser Arbeit Translokations-Experimente durchgeführt bei denen zuvor das Restriktionsenzym EcoRI an den λ -DNA-Doppelstrang angebracht wurde.

Kommt es bei der oben aufgeführten Prozedur, auch bei maximal angelegter Spannung, zu keiner Einfädung, kann dies verschiedene Gründe haben. Es besteht die Möglichkeit, dass das Kügelchen noch zu weit von der Nanopore entfernt ist. Da ein Kontakt mit der Membran vermieden wurde, ist eine genaue Bestimmung des Abstands nicht möglich und kann nur durch Erfahrung geschätzt werden. In diesem Fall kann sich, entweder bei immer noch angelegter oder gänzlich ohne Spannung, der Nanopore etwas weiter angenähert werden. Dies ist solange möglich, wie noch ein ausreichender Abstand zwischen Pore und Kügelchen vorhanden ist, da bei der abrupten Einfädung das Kügelchen immer zur Nanopore hin ausgelenkt wird. Eine erfolgreiche Einfädung wird wie zuvor durch die markante Änderung im Kraftsignals deutlich. Wenn keine Translokation erfolgt, ist die Position des Kügelchens möglicherweise falsch gewählt. Je nachdem welche Oberflächenbeschaffenheit der Chip nach den diversen Präparationsschritten aufweist, ist es mehr oder weniger gut möglich die Position der Pore einschätzen zu können. Hierbei spielt ebenfalls die mitübertragende Umgebung der Monolage eine gewichtige Rolle, Kristalle mit optischen Charakteristiken können bei der Einschätzung der Position der Pore enorm behilflich sein. Eine weitere Möglichkeit erfolgloser Einfädungsversuche rührt von den, mit der Zeit denaturierenden, DNA-Strängen her, dieses Problem kann durch einfaches Ausspülen des alten Puffers und Zugabe einer frisch angesetzten DNA-Kügelchen-Lösung behoben werden.

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente werden in Kapitel 4.2 aufgezeigt und diskutiert.

4 Ergebnisse und Auswertung

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse vorgestellt, welche mit den im vorigen Kapitel genannten Methoden gewonnen wurden. Zunächst werden in Kapitel 4.1 die Ergebnisse der durchgeführten AFM-Messung zur Bestimmung der Molybdänsulfid-Schichtdicke ausgewertet und diskutiert. Das anschließende Kapitel 4.2 befasst sich mit den Ergebnissen der DNA-Translokations-Experimente durch die angefertigten MoS₂-Nanoporen.

4.1 MoS₂-Schichtdicke

Im Folgenden werden die Ergebnisse der AFM-Messung eines ausgewählten, optisch als Monolage identifizierten, Kristallfragments vorgestellt. Bei der Auswertung muss beachtet werden, dass die Messdaten von Schichtdicken, welche mittels Raster-Kraft-Mikroskopie gewonnen wurden, auch immer von den Eigenschaften der verwendeten Cantilever-Spitze und dem Substrat abhängig sind. Die ermittelte Höhe einer Monolage auf einem Substrat kann sich stark von der Höhe des freistehenden Materials unterscheiden. Bei Graphen, mit einer Monolagenstärke von 0,34 nm,⁷⁰ wurden bei AFM-Messungen von Einzellagen auf SiO₂-Substrat im *tapping mode* Schichtdicken von weit über 0,34 nm bestimmt.⁷¹ Genauere Untersuchungen an Graphen ergaben, dass die attraktiven Wechselwirkungen zwischen Spitze und Graphen sich von denen zwischen Spitze und Substrat soweit unterscheiden, dass bei Messungen ein Offset von ca. 0,33 nm mit einbezogen werden sollte.⁷² Eine Monolage Graphen wird somit auf Siliziumoxid eine mittels AFM gemessene Höhe von ca. 0,7 nm aufweisen. Analoge Überlegungen sollten bei der Betrachtung der Ergebnisse der hier durchgeführten Messungen an MoS₂-Lagen mit einbezogen werden.

In Abbildung 4.1.1 ist links der Bereich eines Wafer markiert, auf dem sich mehrere mutmaßliche Monolagen befinden. Das eingezeichnete Rechteck umschließt den Bereich der zur AFM-Abrasterung ausgewählt wurde. Auf der rechten Seite der Abbildung ist die AFM-Aufnahme des ca. 6 µm x 6 µm großen Ausschnitts zu sehen, die Kristallstrukturen der Lichtbildaufnahme sind auch auf dem korrespondierenden AFM-Bild deutlich zu erkennen. Die weiß Linie zeigt den genauen Ort der Bestimmung des Höhenprofils, welches in Abbildung 4.1.2 wiedergegeben wird. Da sich die Lagen zu den Rändern hin nach oben zu wölben scheinen wurde für das Höhenprofil eine Linie ausgewählt die durch das Zentrum einer Kristallflocke führt, hier scheint die Schichtdicke am geringsten zu sein.

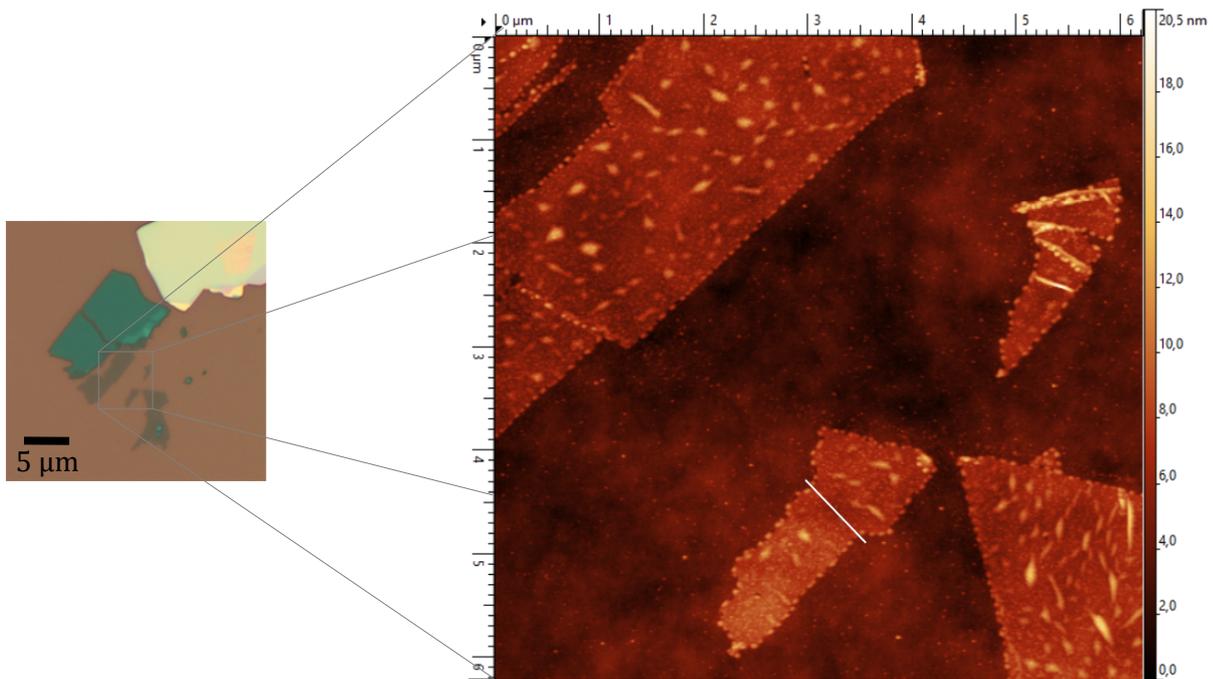


Abb. 4.1.1: Lichtmikroskopische Aufnahme eines dünnen MoS_2 -Kristalls auf SiO_2 -Substrat (links), AFM-Aufnahme eines Teilstücks des MoS_2 -Kristalls auf Substrat (rechts)

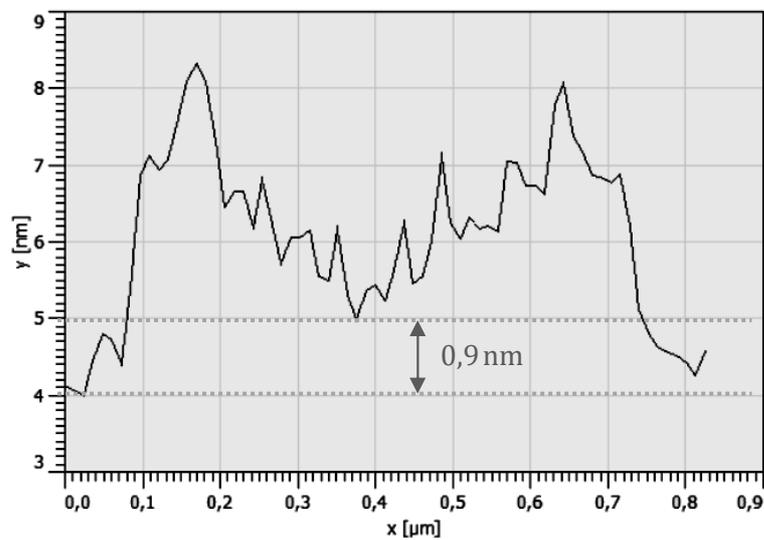


Abb. 4.1.2: Höhenprofil einer MoS_2 -Monolage auf SiO_2 -Substrat

Der geringste gemessene Abstand zum Substrat beläuft sich nach Auswertung der Messkurve auf ca. 0,9 nm. Dieser Wert für die Schichtdicke ist eindeutig geringer als die theoretische Höhe einer MoS_2 -Doppellage, somit kann die zuvor optisch bestimmte Kristallstruktur nun auch durch das AFM als Monolage identifiziert werden. Der geringfügige Höhenunterschied zu einer freistehenden Einzellage kann gut mit dem zuvor im Kapitel angesprochenen Effekt der scheinbaren Zunahme der Höhe von dünnen Schichten auf Substrat erklärt werden.

4.2 DNA-Translokation durch Nanoporen

In diesem Kapitel werden die Daten von zwei erfolgreichen DNA-Translokationsexperimenten vorgestellt. Die erste Messung wurde ausschließlich unter Verwendung von Gleichspannung zum Aufbau des Transmembranpotentials durchgeführt. Bei der zweiten Messung wurde auf die angelegte Gleichspannung während des Experiments zusätzlich noch eine Wechselspannung aufmoduliert. Bevor die Ergebnisse dieser beiden Messungen im vollen Umfang präsentiert werden, wird vorab kurz auf die Aussagekraft des stets ebenfalls aufgezeichneten Ionenstroms eingegangen.

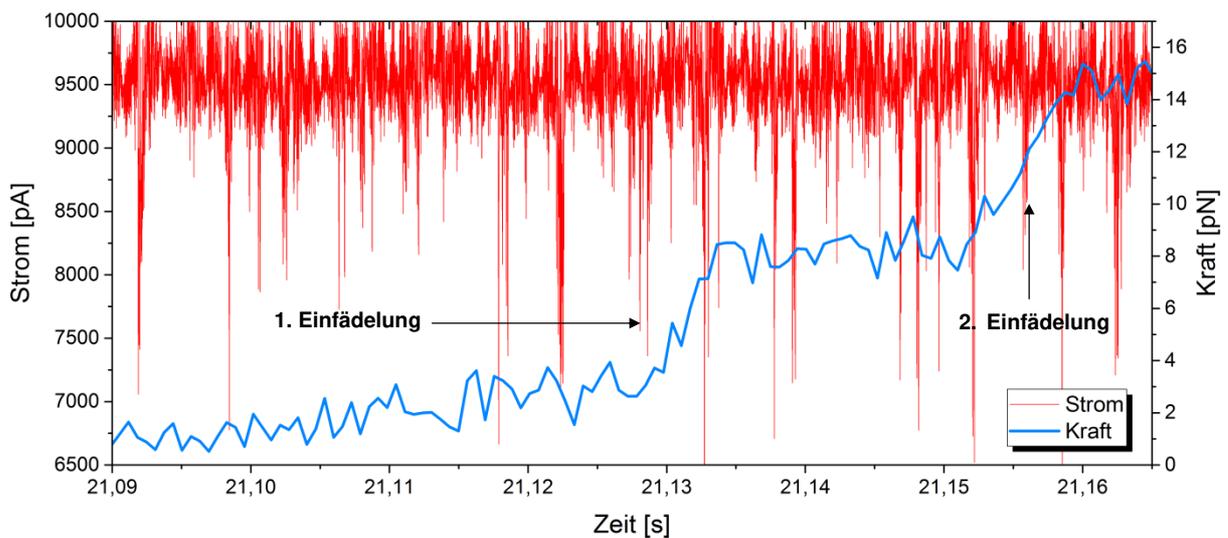


Abb. 4.2.1: Änderungen im Ionenstrom und Kraft während der zeitverzögerten Einfädung von zwei DNA-Strängen in eine Molybdändisulfid-Nanopore

In Abbildung 4.2.1 wird die Änderung des Ionenstroms als auch der gemessenen Kraft während der Einfädung von zwei DNA-Strängen kurz hintereinander dargestellt. Deutlich ist ein Anstieg in der Kraft auszumachen, sobald ein DNA-Strang in die Pore eingefädelt wird. Aus dem in der obigen Grafik gezeigten Verlauf des gemessenen Stroms wird deutlich, dass die Kombination aus Messaufbau und Probe der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente den Anforderungen einer möglichen Gen-Sequenzierung aus der Änderung der Ionenstromstärke heraus, nicht genügt. Der Ionenstrom wird zwar mit 100 kHz aufgenommen und wäre so, bezogen auf die Zeitauflösung, bei weitem in der Lage bei einer Translokation die passierenden Basenpaare deutlich zu differenzieren, aber das gemessene Signal ist so stark mit Rauschen behaftet, dass nicht einmal während der abgebildeten doppelten DNA-Einfädung in die Nanopore eine markante Änderung in der Messkurve auszumachen ist. Dieser Umstand liegt primär an der, als Basis für die Nanopore dienenden, verwendeten Si_3N_4 -Membran des Chips und sekundär an der zur Messung der Kraft notwendigen Beleuchtung und der elektromagnetischen Abschirmung des Experiments. Bei der

gezeigten Messung sind trotzdem einzelne Ereignisse deutlich erkennbar, diese treten in der gezeigten Messkurve durch teilweise erhebliche Änderungen im Stromsignal über mehrere Millisekunden hinweg stark hervor. Hierbei könnte es sich einerseits um freie Translokationen von DNA-Strängen handeln oder auch um Partikel wie Verunreinigungen die die Nanopore passieren. Um derartige Ereignisse genauer untersuchen zu können dürfte bei zukünftigen Messungen die Verwendung einer kleineren Nanopore, deren Durchmesser idealerweise nur wenig über dem eines DNA-Strangs liegt, von Vorteil sein. Bei deren Verwendung sollte sich die Translokationszeit von DNA-Strängen erheblich erhöhen und die messbaren Änderungen im Stromsignal deutlicher vom Rauschen abheben.²⁸ Für Messungen in der relevanten Größenordnung sollte ferner der Einfluss des Lasers und der Kaltlichtlampe auf den zu detektierenden Stromfluss zuvor genau untersucht werden.

Aufgrund der aktuell mangelnden Aussagekraft der Messungen des Ionenstroms wird das Augenmerk in der weiteren Auswertung auf das korrespondierende und eindeutig informationsreichere Kraftsignal der Optischen Pinzette gelegt. Das Kraftsignal ist darüber hinaus auch weitaus unanfälliger gegenüber Beeinflussungen durch mangelhaft Abschirmung oder die Pore passierenden Verschmutzungen. Die aufgezeichneten Stromdaten werden jedoch noch zum nachträglichen Korrigieren der angelegten Transmembranspannung benutzt. Mittels einer Ausgleichsrechnung wird die am Messgerät grob einstellbare Vorspannung zum Kompensieren elektrochemischer Prozesse während der Messung bestimmt und in die Spannungsdaten mit einbezogen. Die Daten werden so korrigiert, dass bei 0 mV angelegter Spannung entsprechend 0 pA Strom fließen.

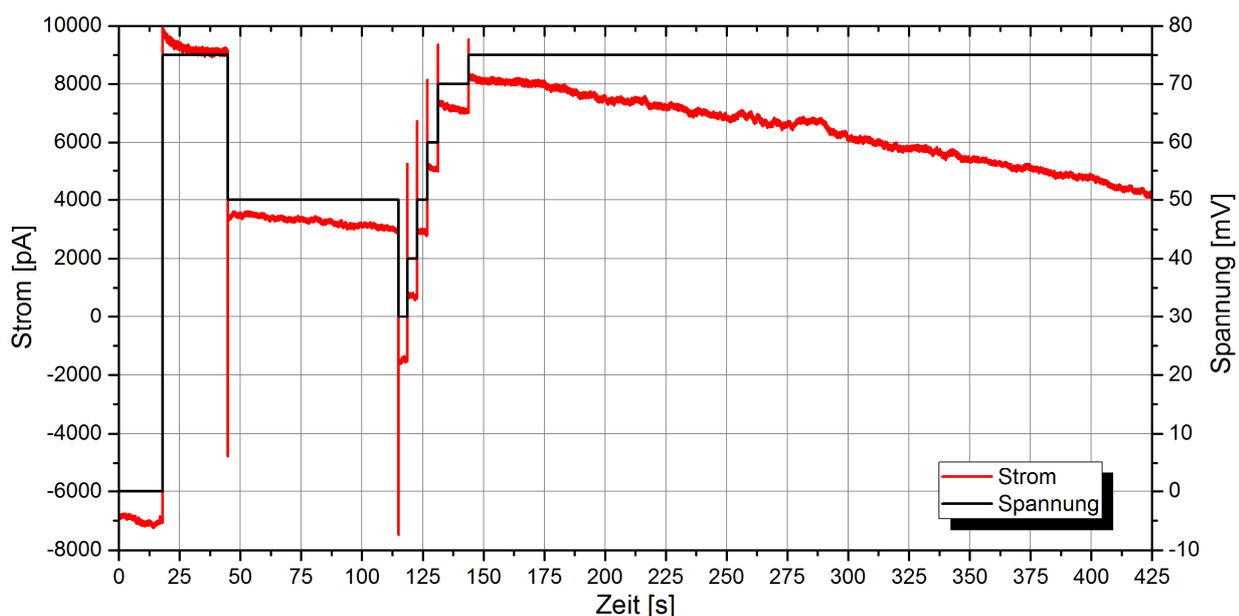


Abb. 4.2.1: Drift des Ionenstroms bei verschiedenen Spannungen vor Offset-Korrektur

Diese Methode zur Bestimmung der real angelegten Transmembranspannung ist allerdings fehlerbehaftet, da der Ionenstrom während einer Messung einen deutlichen, in Abbildung 4.2.1 dargestellten, Drift erfährt und der ausgewählte Zeitpunkt der Nullung infolgedessen einen gewichtigen Einfluss ausübt. Folglich stellen die nachträglich korrigierten Spannungen in den kommenden Graphen der Auswertung keine exakten Messwerte dar und sollten nur unter Vorbehalt quantitativ betrachtet werden.

Eine exakte Bestimmung des Durchmessers der während der Messung verwendeten Nanopore ist im Zuge dessen ebenfalls leider nicht möglich. Hier könnte in Zukunft, für den Fall, dass der Chip das Experiment schadlos überstanden hat, eine nachträgliche AFM-Abrasterung der Pore die gesuchte Information liefern.

Die Kraftdaten der ersten erfolgreichen Messung einer kontrollierten DNA-Translokation durch eine präparierte Nanopore in einer freistehenden MoS₂-Monolage sind in der folgenden Abbildung 4.2.2 dargestellt. Die Ergebnisse werden zuerst kurz beschrieben und später genauer erörtert. Für eine detailliertere Diskussion der beobachtbaren Effekte und Mechanismen sind einige ausgewählte Zeitintervalle der Messung, insbesondere diese mit einem sich deutlich ändernden Kraftsignals, in den darauf folgenden Grafiken höher aufgelöst abgebildet.

Die abgebildete Messung beginnt bei einer z-Position von 4 μm . Die z-Position darf nicht mit dem z-Abstand verwechselt werden. Wie im Kapitel 3.4 beschrieben, wird immer ein Mindestabstand zur Membran eingehalten, um ein Adhärenzen des Kügelchens bzw. der DNA zu vermeiden. Eine Aussage über den absoluten Abstand ist deshalb nicht möglich und dieser kann, aufgrund der möglichen Wölbung der Membran, ausgelöst durch den elektroosmotischen Fluss und der Beleuchtung, nur geschätzt werden. Das Experiment beginnt, indem eine Transmembranspannung von 40 mV angelegt wird, bald darauf ist durch eine auf 15 pN erhöhte wirkenden Kraft auf das Kügelchen sehr deutlich zu erkennen, dass die anhaftende DNA in die Nanopore eingefädelt wurde. Hierbei stellt die relativ hohe Kraft jedoch eher einen Wert dar, der auf das gleichzeitige Einfädeln von mehr als einem DNA-Strang hindeutet. Um einen wirklich ausreichenden Abstand zur Pore zu gewährleisten, wird der Abstand des Kügelchens um 1 μm vergrößert. Dieser Vorgang allein stellt schon eine erste, wenn auch nur kurze, kontrollierte DNA-Translokation über die Länge von 1 μm dar. Bei der folgenden Reduzierung der Spannung auf 15 mV nimmt die gemessene Kraft wie erwartet erheblich ab und kann als Beweis einer zuvor erfolgreich durchgeführten Einfädung erachtet werden. Mit dieser reduzierten Spannung wird die kontrollierte Translokation, also das gezielte langsame Ziehen des DNA-Strangs durch die Nanopore, über mehrere Mikrometer hinweg weiter fortgesetzt.

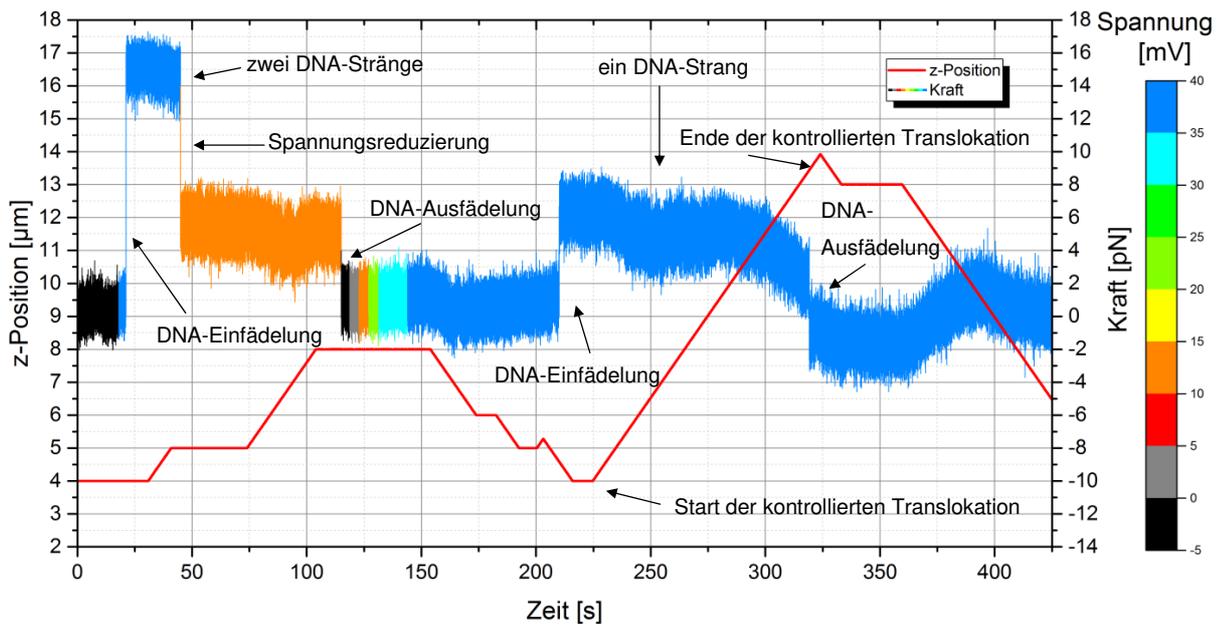


Abb. 4.2.2: Messung einer kontrollierten DNA-Translokation durch eine Nanopore in einer freistehenden MoS₂-Monolage

Danach wird durch das Anlegen einer leicht negativen Spannung die DNA unkontrolliert ausgefädelt, eine anschließende systematische Erhöhung der Transmembranspannung bis zum Ausgangswert von 40 mV verursacht keine erneute Einfädung, die Distanz zwischen Pore und Kügelchen ist hierfür zu groß. Für eine erneute Einfädung wird das Kügelchen bei weiterhin angelegter Spannung wieder langsam näher an die Pore gebracht. Ein abermaliger abrupter Anstieg in der Kraftkurve signalisiert eine erfolgreiche Einfädung. Die Stärke der wirkenden Kraft liegt diesmal bei einem Wert, der sich gut mit dem eines einzelnen DNA-Strangs deckt. Im Anschluss folgt eine komplette kontrollierte Translokation des sich in der Pore befindlichen Strangs. Der deutlich zu erkennende sprunghafte Abfall im Kraftsignal stellt das Ende der kontrollierten Translokation dar, der Strang wurde vollständig aus der Pore ausgefädelt. Die kontrollierte Translokation von doppelsträngiger λ -DNA durch eine Nanopore in einer Monolage Molybdändisulfid mit Hilfe der Optischen Pinzette ist demzufolge möglich.

Die vorausgegangene Beschreibung der Messergebnisse offenbart, dass bei dem ersten Einfädungsprozess die anliegende Kraft deutlich über den erwarteten und auch zuvor an vergleichbaren Poren gemessenen Wert von ca. 5 pN bei der Translokation eines DNA-Doppelstrangs liegt.⁵⁴

In der folgenden Abbildung 4.2.3 wird der relevante Teil des ersten Einfädungsprozesses bei ca. 21 Sekunden detailliert dargestellt.

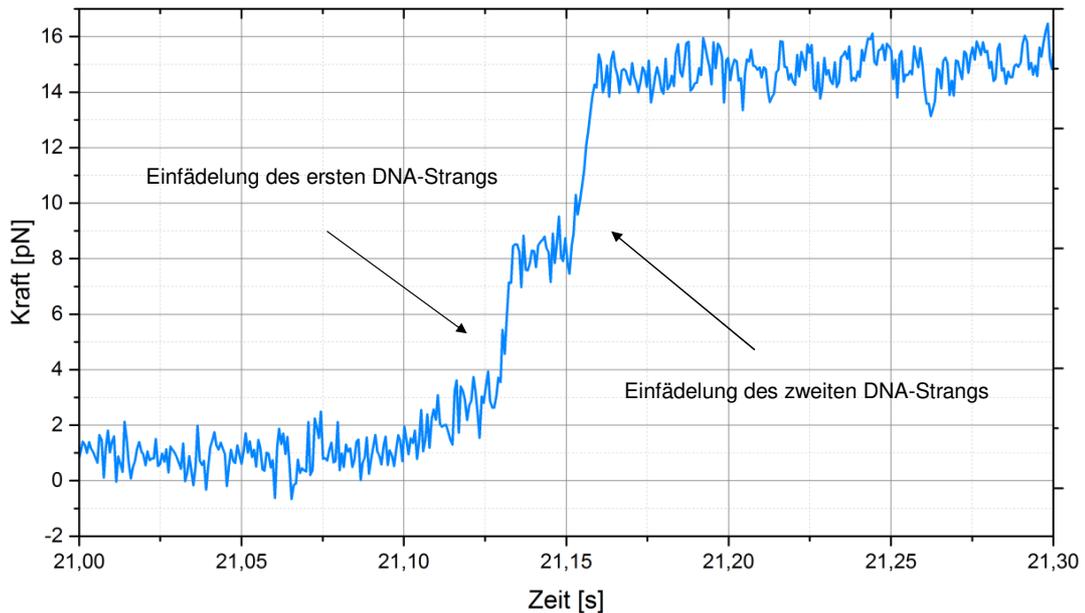


Abb. 4.2.3: Einfädung zweier DNA-Stränge in kurzer Abfolge

Deutlich ist erkennbar, dass sich der Anstieg in der Kraft während der Einfädung über zwei klar differenzierbare Ereignisse erstreckt, wovon jedes einer Einfädung eines separaten DNA-Strang zugeschrieben werden kann. Die relativ große Kraftzunahme von ca. 7 pN bei der Einfädung des ersten Strangs und ca. 6,5 pN für die des zweiten DNA-Strangs kann mit zusätzlichen am Kügelchen haftenden DNA-Molekülen in der Nähe der Porenregion erklärt werden. Diese können als nicht entwirrbares Knäuel vorliegen, was eine Einfädung verhindert, aber als zusätzliche Ladungsansammlung zu der wirkenden Kraft beitragen. Zum Vergleich ist der zweite Einfädungsprozess derselben Messung bei ca. 210 Sekunden in der Abbildung 4.2.4 aufgezeigt.

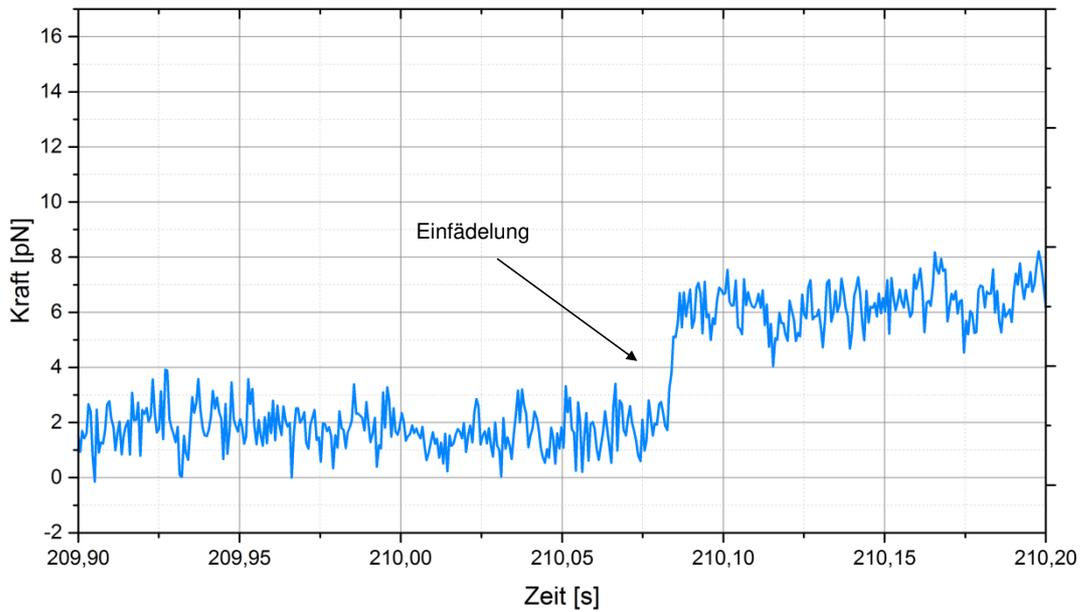


Abb. 4.2.4: Einfädung eines DNA-Strangs in eine Nanopore

In der obigen Grafik ist anders als zuvor nur eine Stufe erkennbar, die Änderung der Kraft beträgt ca. 5 pN und deckt sich gut mit dem zu erwartenden Wert. Es kann geschlussfolgert werden, dass eine Einfädung eines einzelnen DNA-Strangs vorliegt. Neben der Stärke der wirkenden Kraft an sich können durch eine genaue Analyse des Verlaufs des Kraftsignals während der Einfädung somit höchstwahrscheinlich ebenfalls Rückschlüsse auf die Anzahl involvierter DNA-Stränge geschlossen werden. Dies ist nur aufgrund der relativ hohen zeitlichen Auflösung des Kraftsignals von 1555 Hz möglich.

Der Beginn der Messung mitsamt der Einfädung und kontrollierter Translokation zweier DNA-Stränge über eine Länge von $3\ \mu\text{m}$ ist in Abbildung 4.2.5 zu sehen. Gleich am Anfang der Messkurve, bei 18 Sekunden, ist ein leichter Anstieg in der Kraft zu erkennen, sobald eine Transmembranspannung angelegt wird. Diese Zunahme kann durch den Einfluss des elektrischen Feldes auf die Oberflächenladung des Kügelchens selbst sowie auf die dort angebrachten DNA-Moleküle in der Nähe der Pore begründet werden. Im Zeitintervall von 74 bis 104 Sekunden findet die kontrollierte Translokation statt, hier wird das Kügelchen langsam, mit $0,1\ \mu\text{m}$ pro Sekunde, von der Pore entfernt. In diesen 30 Sekunden ist ein recht homogenes Kraftsignal mit leichten Schwankungen auszumachen. Die gemessene Kraft am vorläufigen Ende der Translokation scheint darüber hinaus etwas geringer als am Anfang auszufallen. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um die Auswirkungen der im Kapitel 3.4 besprochenen, nichtlinearen Effekte bei der Bestimmung der scheinbaren Kügelchengröße und der daraus berechneten Kraft.

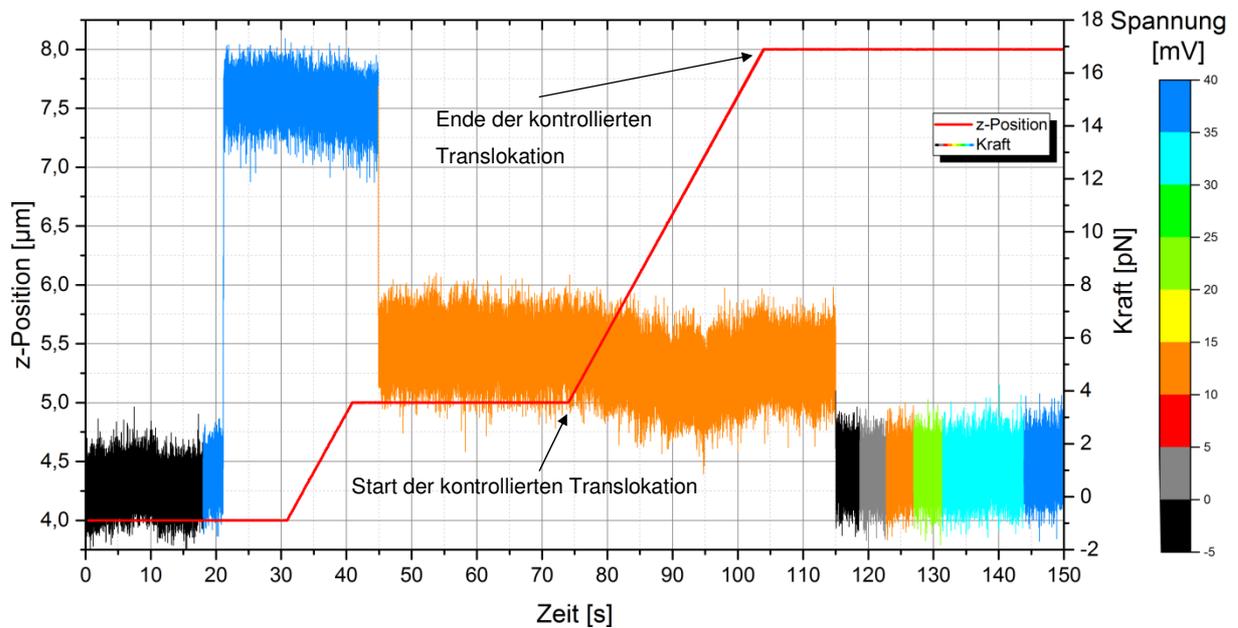


Abb. 4.2.5: Kontrollierte Translokation zweier DNA-Stränge durch Nanopore

Der interessanteste Teil der Messung, mit einer kompletten kontrollierten Translokation eines einzelnen DNA-Strangs, wird im Graphen der Abbildung 4.2.6 detailliert gezeigt. Der vollständige Verlauf des abgebildeten Messintervalls findet bei einer angelegten Transmembranspannung von 40 mV statt. Sowohl die Ein- als auch die Ausfädung sind deutlich zu erkennen. Die Ausfädung des DNA-Strangs zeigt das Ende der kontrollierten Translokation an, diese erstreckte sich über eine Länge von $9,43\ \mu\text{m}$. Die Differenz der Messung zur theoretischen Konturlänge des kompletten λ -DNA-Strangs ergibt sich zu einem Teil aus dem Abstand des Kügelchens zur Pore während der Einfädung. Zu einem kleinen Teil sind ebenfalls die elastischen Eigenschaften der DNA dafür

verantwortlich, der Strang liegt selbst bei einer anliegenden Zugkraft etwas verkürzt vor. Sowohl Abstand als auch Elastizität können aber nicht allein für eine solche Abweichung verantwortlich sein. Es wurde wie beschrieben zwar stets ein Sicherheitsabstand zur Pore eingehalten, dieser ist, selbst bei einer durchgebogenen Chip-Membran, jedoch nicht in dieser Größenordnung anzusiedeln. Gegen einen großen Abstand zwischen Kügelchen und Pore spricht außerdem die erfolgreich durchgeführte Einfädung, über eine Distanz von mehreren Mikrometern würde diese nicht zustande kommen. Die Ergebnisse könnten jedoch auf die Einfädung eines beschädigten DNA-Strangs zurückzuführen sein, auch die Möglichkeit eines teilweise am Kügelchen klebenden und dadurch verkürzt scheinenden DNA-Strangs ist denkbar. Bei Betrachtung des Kraftverlaufs wird deutlich, dass dieser, speziell im letzten Drittel der Translokation, nicht einheitlich ist. Ein qualitativer Vergleich dieses Messabschnitts mit dem zuvor genauer betrachteten in Abbildung 4.2.5 zeigt jeweils zu Beginn der Translokation ein vollkommen deckungsgleiches Verhalten. Eine stetige Abnahme der gemessenen Kraft vom Start der kontrollierten Translokation bis zu einer z-Position von $7\ \mu\text{m}$ mit einem darauf folgenden leichten Anstieg ist in beiden Kurven sichtbar.

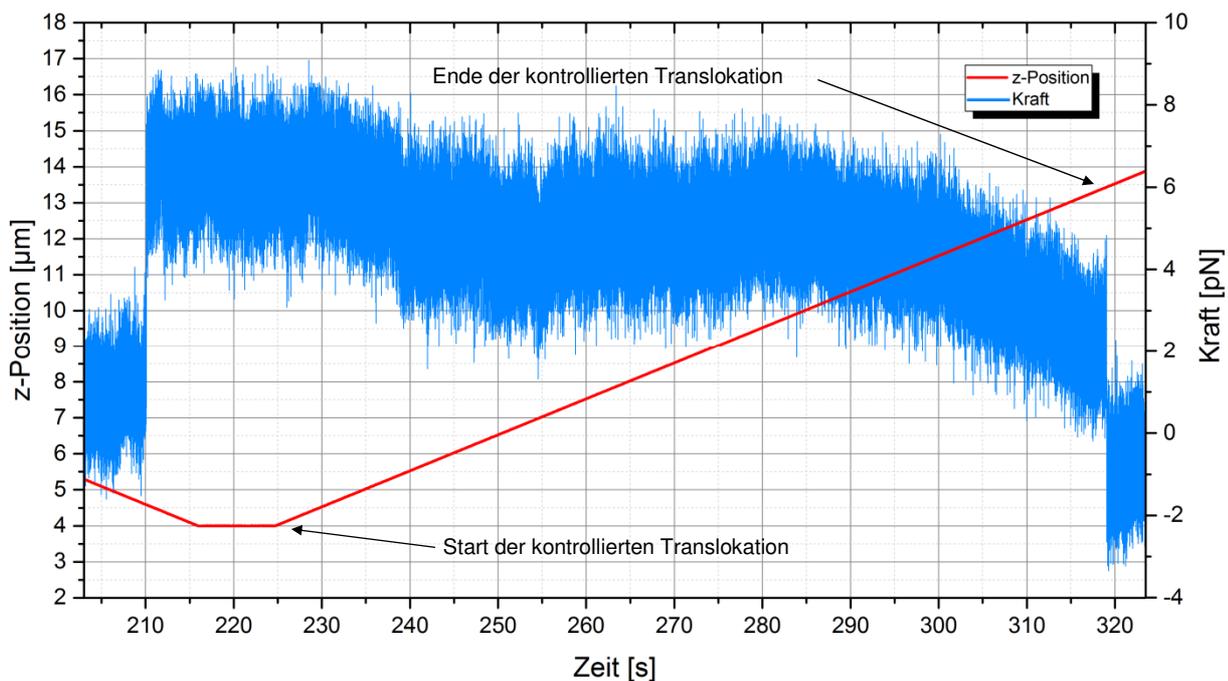


Abb. 4.2.6: Einfädung, kontrollierte Translokation und Ausfädung eines DNA-Strangs

Der weitere Verlauf der Kraft ist von $7\ \mu\text{m}$ bis zu einer z-Position von $10\ \mu\text{m}$ weitestgehend homogen, im Bereich danach bis zur Ausfädung ist jedoch eine auffällige Abnahme zu erkennen. Die sich deckenden Kraftschwankungen zu Beginn der beiden dargestellten Translokationen, zusammen mit der Position der soeben beschriebenen Kraftabnahme im letzten Drittel des obigen Graphen, lassen erneut auf einen Zusammenhang zur detektierten scheinbaren Größe des

Kügelchens schließen. Die für jedes benutzte Kügelchen separat ausgeführte Fokus-Ausgleichskalibrierung (AFCC) (vgl. Kapitel 3.4) war zum Zeitpunkt der Messung in der Steuerungssoftware so festgelegt, dass der Bereich unterhalb von $10\ \mu\text{m}$ feinstufiger als der oberhalb von $10\ \mu\text{m}$ erfasst wurde. Gerade bei dem hier vorliegenden nichtlinearen Verhalten der scheinbaren Größe des Kügelchens können fehlende Informationen einen erheblichen negativen Einfluss auf die Genauigkeit der durchgeführten Kalibrierung haben. Dieser zu spät erkannte und in Folgeexperimenten behobene Missstand spiegelt sich hier vermutlich in der Genauigkeit der berechneten Kraftwerte oberhalb von $10\ \mu\text{m}$ wieder. Bei der deutlich sichtbaren Abnahme der Kraft zum Ende der Translokation kann es sich somit durchaus nur um ein Artefakt der videobasierten Kraftdetektion handeln. Auch bei den beiden identischen, nicht so stark ausgeprägten Schwankungen zu Beginn beider Translokationen, durchgeführt mit demselben Kügelchen, jedoch mit unterschiedlichen DNA-Strängen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich ebenfalls um Artefakte handelt.

Die Messung einer zweiten erfolgreichen Translokation ist der nachstehenden Abbildung 4.2.7 dargestellt. Analog zur ersten besprochenen Messung findet als erstes eine, durch das Anlegen einer positiven Transmembranspannung induzierte, Einfädung statt. Dieser Prozess kann in Abbildung 4.2.8 detaillierter betrachtet werden. Bei einer korrigierten Transmembranspannung von $70\ \text{mV}$ sind drei separate Ereignisse in der vergrößerten Ansicht der Einfädung auszumachen. Die letztlich gemessene Kraft von $14\ \text{pN}$ rührt demnach von drei sich simultan in der Pore befindlichen DNA-Strängen her.

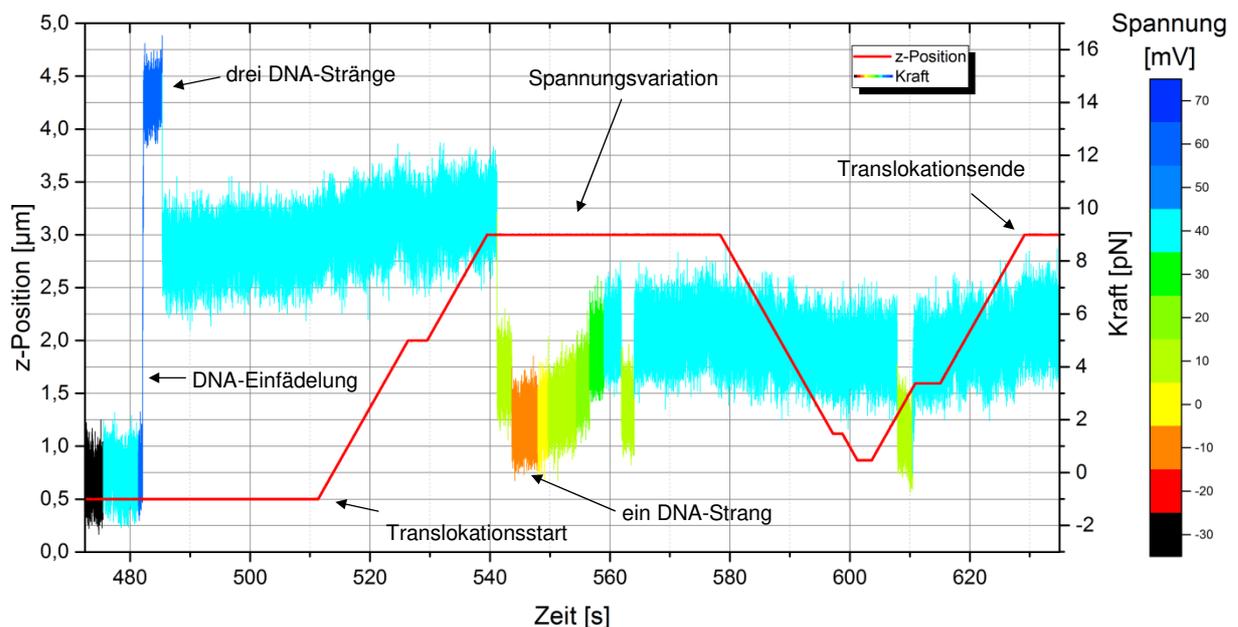


Abb. 4.2.7: Einfädung von DNA-Strängen und kontrollierte Translokation durch eine Nanopore

Nach Validierung der Einfädelerung durch Herabsetzen der Spannung auf 40 mV und einer damit einhergehenden Verminderung der Kraft auf ca. 8 pN erfolgt eine kontrollierte Translokation über eine Distanz von 2,5 μm . Während der anschließend durchgeführten Spannungsvariation werden, dem Kraftverlauf nach wahrscheinlich am lokalen Spannungsminimum, zwei der drei zuvor eingefäderten DNA-Stränge unkontrolliert aus der Pore ausgefädelt, sodass beim erneuten Erreichen der zuvor schon angelegten Transmembranspannung von 40 mV nur noch die einem DNA-Strang zugeschriebene Kraft von ca. 5 pN gemessen werden kann. Eine hinterher für kurze Zeit durchgeführte Spannungsminderung auf 10 mV mit anschließender Rückkehr zum Ursprungswert von 40 mV verursacht keine erkennbare Änderung im Kraftsignal, der DNA-Strang scheint einzeln und stabil in der Pore vorzuliegen. Der weitere Verlauf des Graphen zeigt ein in beide Richtungen kontrolliertes Durchfädeln des DNA-Strangs über eine Distanz von ca. 2,25 μm .

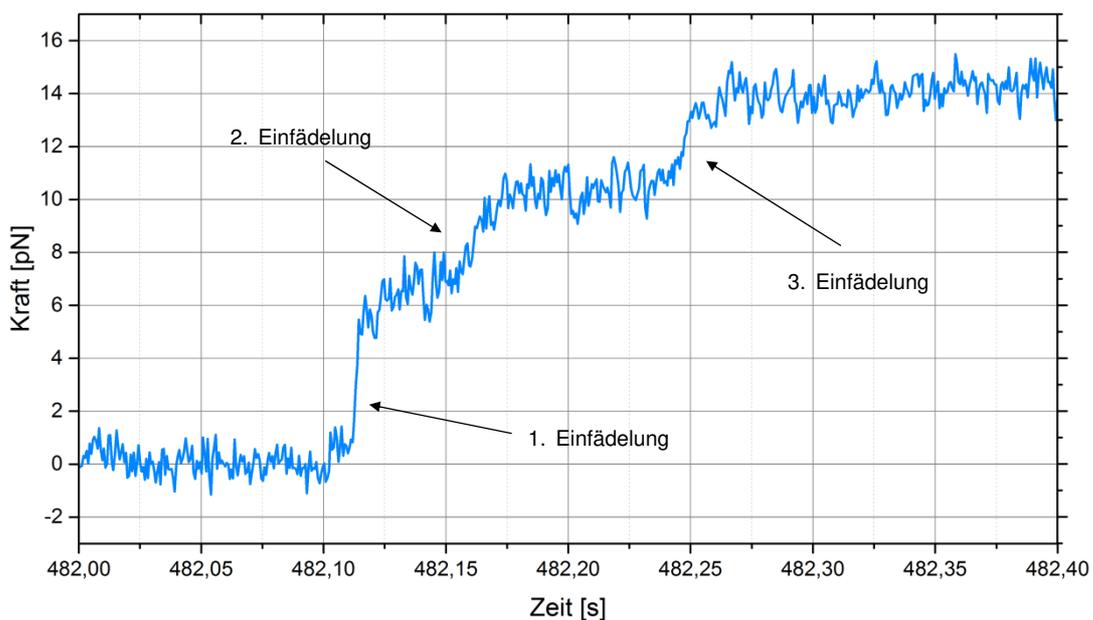


Abb. 4.2.8: Einfädelerung von drei separaten DNA-Strängen in eine Nanopore

Bei der genauen Betrachtung während des Experiments angelegten Spannungen, speziell während der Variation, muss beachtet werden, dass es sich hier, wie bei der zuvor vorgestellten Messung, um nachträglich korrigierte Werte handelt. Wenn die Spannung im Minimum der Variation tatsächlich negativ sein sollte, kann die, dem ungeachtet weiterhin wirkende, Kraft möglicherweise durch entropische Effekte erklärt werden. In der betrachtenden Situation befindet sich das Kügelchen mit mindestens einem, eventuell auch noch allen drei, eingefäderten DNA-Strängen 3 μm plus dem geringen Sicherheitsabstand von der Membran entfernt. Der Großteil dieser ein, zwei oder aller drei DNA-Stränge befindet sich somit auf der trans-Seite der Pore und liegt dort in statistischer Knäuelform vor. Bei keiner oder nur einer geringen angelegten

negativen Spannung ist es denkbar, dass das Knäuel auf der trans-Seite weiterhin eine geringe, durch entropische Effekte erzeugte, Zugkraft auf das anhaftende Kügelchen auswirken kann. Eine zweite sehr viel trivialere mögliche Erklärung ist, dass die Nullung von Strom und Spannung durch den Drift des Ionenstroms soweit verschoben wurde, dass die real angelegte Transmembranspannung doch im positiven Bereich anzutreffen ist.

Bei den folgenden vorgestellten Ergebnissen handelt es sich um die Daten der letzten DNA-Translokationsmessung dieser Arbeit. Bei dem Experiment geht es um die Auswirkungen von Wechselspannung variabler Frequenz auf einen in einer Nanopore eingefädelt DNA-Strang. Hierzu wird auf eine Gleichspannung, welche wie in den vorherigen Experimenten einen DNA-Strang in der Nanopore hält, eine 50 mV Wechselspannung aufmoduliert und die resultierenden Werte der wirkenden Kraft und des Ionenstrom aufgezeichnet. Der Abstand des Kügelchens zur Membran beträgt circa $4\mu\text{m}$. Die Messergebnisse sind in den drei folgenden Abbildungen dargestellt. Bei den angegebenen Spannungen im Text und in den Graphen handelt es sich wie zuvor um korrigierte Werte. Im folgenden Graphen ist links der Übergang von der angelegten 40 mV Gleichspannung zu einer 1 Hertz Wechselspannung zu sehen.

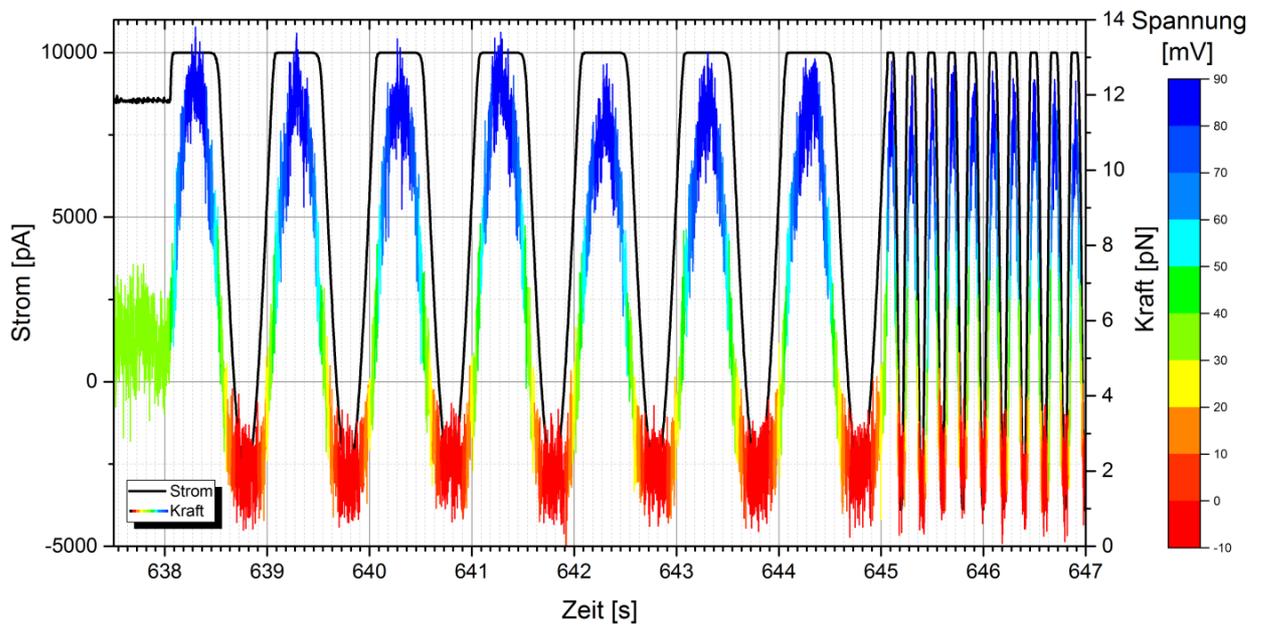


Abb. 4.2.9: Gemessenes Kraftsignal eines DNA-Strangs in einer Nanopore bei angelegter 1 Hz und 5 Hz Wechselspannung

Die Wirkung der variierenden Transmembranspannung auf den DNA-Strang und das Kügelchen ist deutlich im Verlauf der Kraft sichtbar. Wie erwartet, zeigt auch der gemessene Ionenstrom ein korrespondierendes Verhalten, bei 10 000 pA ist das Maximum des vom Gerät messbaren Stroms

erreicht. Nach sieben 1 Hertz-Schwingungen wird die Frequenz auf 5 Hz erhöht, ohne dass dies eine signifikante Auswirkung auf die gemessene Kraft hat. Eine detaillierter Kraftverlauf während einer 1 Hertz-Schwingung ist in Abbildung 4.2.11 gezeigt. Die Frequenz wird im Verlauf des Experiments soweit erhöht bis eine signifikante Änderung im Kraftsignal ausgemacht werden kann. Bei dem in Abbildung 4.2.10 dargestellten Übergang von 10 Hz zu 20 Hz Wechselspannung tritt nach wenigen Schwingungen eine abrupte, nicht mit dem Spannungssignal korrelierte Kraftabnahme auf. In den zwei folgenden Spannungsschwingungen ist noch eine leichte synchrone Kraftänderung auszumachen, bis diese letztendlich auch verschwindet, die DNA hat den Bereich der Pore entweder verlassen oder ist nicht mehr an das Kügelchen gebunden.

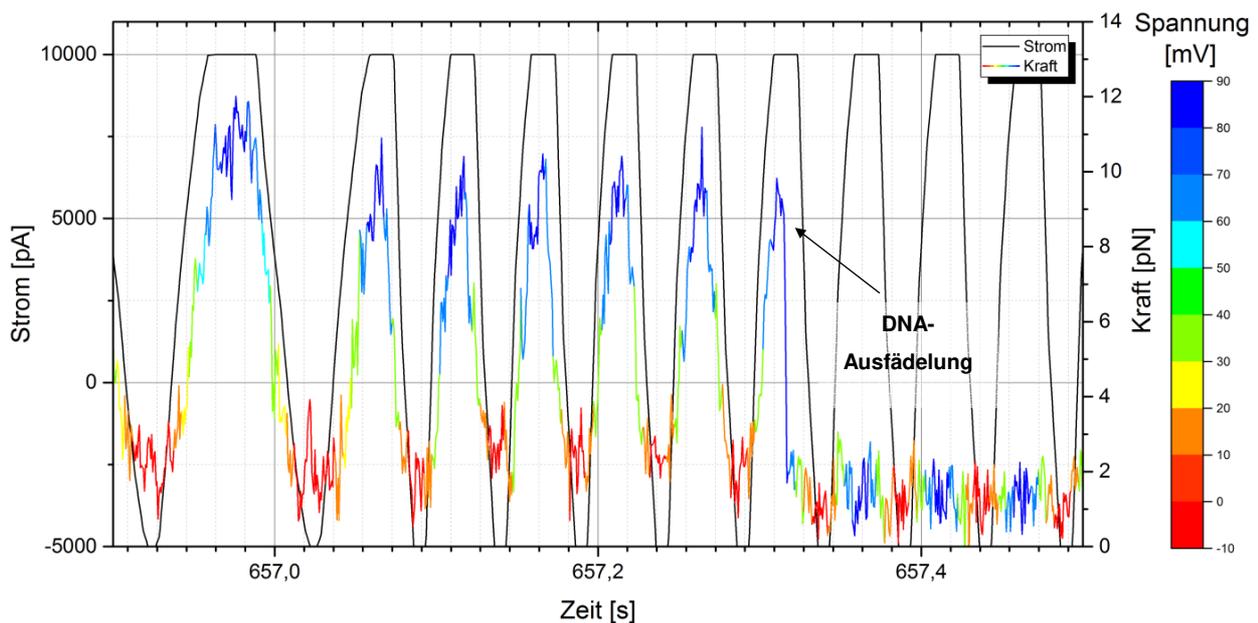


Abb. 4.2.10: Kraftsignal während des Übergangs von 10 Hz zu 20 Hz Wechselspannung

Der Zeitpunkt der abrupten Kraftabnahme beziehungsweise der Wert, der zu diesem Zeitpunkt anliegenden Wechselspannung, ist für eine Ausfädelung sehr ungewöhnlich. Der Prozess der Ausfädelung, nach dem der gesamte DNA-Strang auf der cis-Seite der Pore lokalisiert ist, sollte eher bei einer minimal auf das Kügelchen wirkenden Kraft und deshalb bei einem Minimum der Wechselspannung auftreten.

Die einfachste Erklärung bietet eine Diskrepanz in der Länge des eingefädelten Strangs. Ein generell zu kurzer oder teilweise mehrfach am Kügelchen anhaftender und dadurch verkürzt erscheinender DNA-Strang ist möglich, sodass dieser die ganze Messung über kurz vor einer Ausfädelung stand und diese letztendlich dann entropisch getrieben stattfand. Ebenfalls erdenklich wäre ein Resonanzphänomen, wobei die auf den Strang übertragenden Schwingungen sich so verstärken, dass ein Riss im Strang oder ein Ablösen vom Kügelchen ausgelöst wird. Auch

dielektrophoretische Effekte aufgrund der angelegten Wechselspannung könnten als Ursache dienen. Ob eine dieser Möglichkeiten tatsächlich zutrifft gilt es in weiteren Untersuchungen zu klären.

Bei genauem Vergleich der Messkurven der Abbildung 4.2.10 und der folgenden Abbildung ist ein Anstieg des Ionenstroms (dünne schwarze Linie) mit zunehmender Frequenz festzustellen. Die Membran bildet zusammen mit der Nanopore ein RC-Glied welches ein frequenzabhängiges Verhalten aufweist.

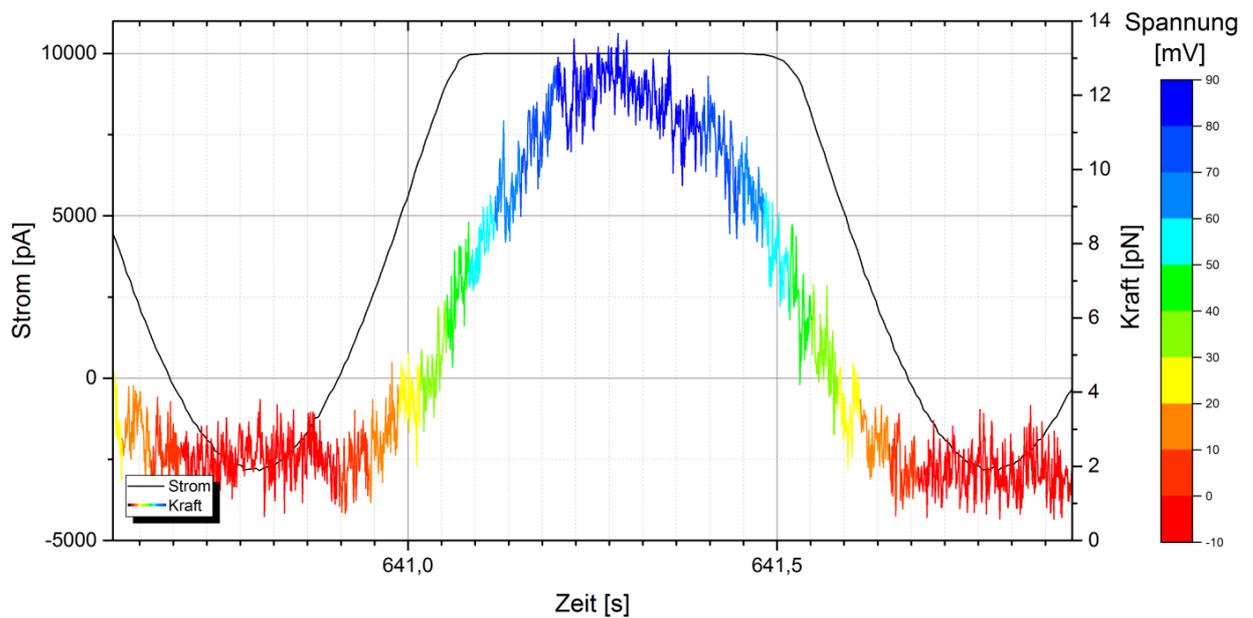


Abb. 4.2.11: Detailansicht des Kraftsignals eines DNA-Strangs bei angelegter 1 Hz Wechselspannung

4.3 Aufgetretene Schwierigkeiten

Zum Ende der Auswertung soll noch auf einige, sich während der Präparation und der Messung ergebende Schwierigkeiten eingegangen und eine Lösung präsentiert werden.

Ein großes Problem sowohl während des Zusammenbaus der Flusszelle als auch bei der Durchführung von Messungen waren die sich in der Flüssigkeit befindlichen Lufteinschlüsse. Wie schon zuvor in Kapitel 3.4 erwähnt, können zu große Bläschen die Kantendetektion stören und die Probe beschädigen. So waren die Bildung und das anschließende Anwachsen der zuerst mit dem bloßen Auge nicht sichtbaren Luftbläschen immer wieder für den Abbruch von Präparationen und laufenden Messungen verantwortlich. Versuche die größeren Mengen Pufferlösung, die für den Zusammenbau der Flusszelle benötigt werden, mittels Ultraschall zu entgasen blieben erfolglos. Letztendlich stellte sich die mehrtägige Lagerung des Puffers bei Raumtemperatur vor der Verwendung als die bis dato effektivste Methode der Entgasung heraus. Dennoch befand sich immer noch ausreichend gelöste Luft in der Flüssigkeit um das Experiment zu stören. Die sich im Kanal der Flusszelle anhäufenden und sich ausdehnenden Luftblasen, speziell an der Stanz-Kante des zentralen Lochs im PDMS, um die Chip-Membran herum, könnten in Zukunft möglicherweise durch eine Änderung im Präparationsablauf vermindert werden. Das Ausstechen des mittleren Lochs noch vor der Plasmabehandlung würde dessen Innenkante im Sauerstoffplasma ebenfalls mit hydrophilieren und so möglicherweise das dortige Entstehen und Akkumulieren größerer Luftblasen verhindern.

Das wohl größte sich aufgetane Hindernis für die erfolgreich Durchführung einer größeren Anzahl von Translokationen war die zuvor in diesem Ausmaß noch nicht aufgetretene Adhäsion der mit DNA funktionalisierten Kügelchen während der Experimente. Genauere Untersuchungen ergaben, dass das verwendete Cellulosepolymer sich nach der Übertragung der Monolage auf den Chip nicht komplett rückstandsfrei von dessen Oberfläche entfernen ließ. Einzelne Chips wiesen auch nach längerem Verweilen in Ethylacetat nach der Trocknung immer noch deutlich sichtbare große wie auch kleine Cluster auf der Oberfläche und in der Porenregion auf. Betrachtet man den Aufbau des in Abbildung 4.3.1 dargestellt Polymers genauer wird deutlich warum es zu der ungewollten Adhäsion kommt. Sämtliche Varianten der auftretenden Reste des Polymers sind partiell positiv geladen und so kann es zu attraktiven elektrostatischen Interaktionen mit dem negativ geladenen Phosphat-Rückgrat eines DNA-Strangs kommen.

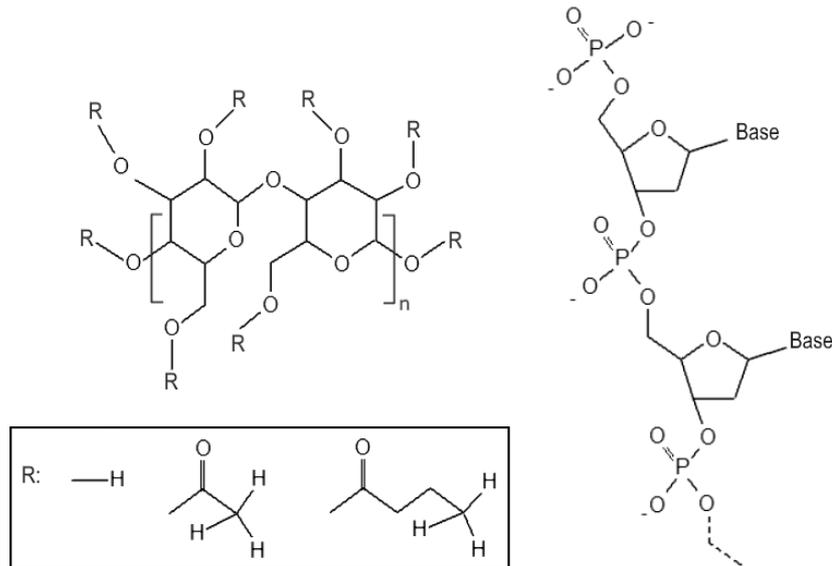


Abb. 4.3.1: Strukturformel von Celluloseacetatbutyrat (links) mit den möglichen auftretenden Resten (Kasten) und DNA-Einzelstrang (rechts)

In Abbildung 4.3.2 sind zwei Auflichtmikroskop-Aufnahmen der Chip-Oberfläche nach der vermeintlichen Auflösung des Polymers in Ethylacetat zu sehen. Deutlich ist eine Vielzahl an Rückständen unterschiedlichster Ausdehnung zu erkennen dessen Anzahl und Ausprägung von Chip zu Chip variiert. Zur Abklärung des Vorhandenseins noch kleinerer, mit dem Lichtmikroskop nicht abbildbarer Ablagerungen, wurde ein Chip mit einer zuvor darauf präparierten Monolage im AFM genauer untersucht. Abbildung 4.3.3 zeigt die Phasenaufnahme der AFM-Abrasterung, diese offenbart etliche blasenförmige Gebilde auf der gesamten untersuchten Einfachlage. Bei dem deutlich die Phase der Cantilever-Schwingung beeinflussenden Material handelt es sich höchstwahrscheinlich ebenfalls um Polymerüberreste. Das Vorkommen auf den Monolagen, also in unmittelbare Umgebung der Nanopore, erklärt die häufig aufgetretene irreversible Adhäsion der immobilisierten DNA-Stränge während der Einfädungsversuche. Anstatt dem elektrischen Feld zu folgen und durch die Pore zu wandern bindet der DNA-Strang auf dem Weg zur Nanopore an den Polymerrückständen auf der Monolage.

Um die Rückstände bis auf ein Minimum zu reduzieren wurden verschiedene Versuche unternommen. Ein sich einmal auf der Oberfläche abgesetztes Polymer-Cluster konnten nur durch lange Einwirkzeit in Ethylacetat weiter verkleinert werden. Hierzu wurden die Chips über mehrere Tage hinweg in einem Gefäß, gefüllt mit einem größeren Volumen Ethylacetat, aufgehängt wobei das Lösungsmittel mit einem Magnetrührstäbchen permanent in leichter Bewegung gehalten wurde. Vor und während des Heraushebens des Chips wurde die Lösungsmitteloberfläche zusätzlich noch mit einer Wasserstrahlpumpe von etwaigen sich dort angesammelten Polymer-Clustern befreit.

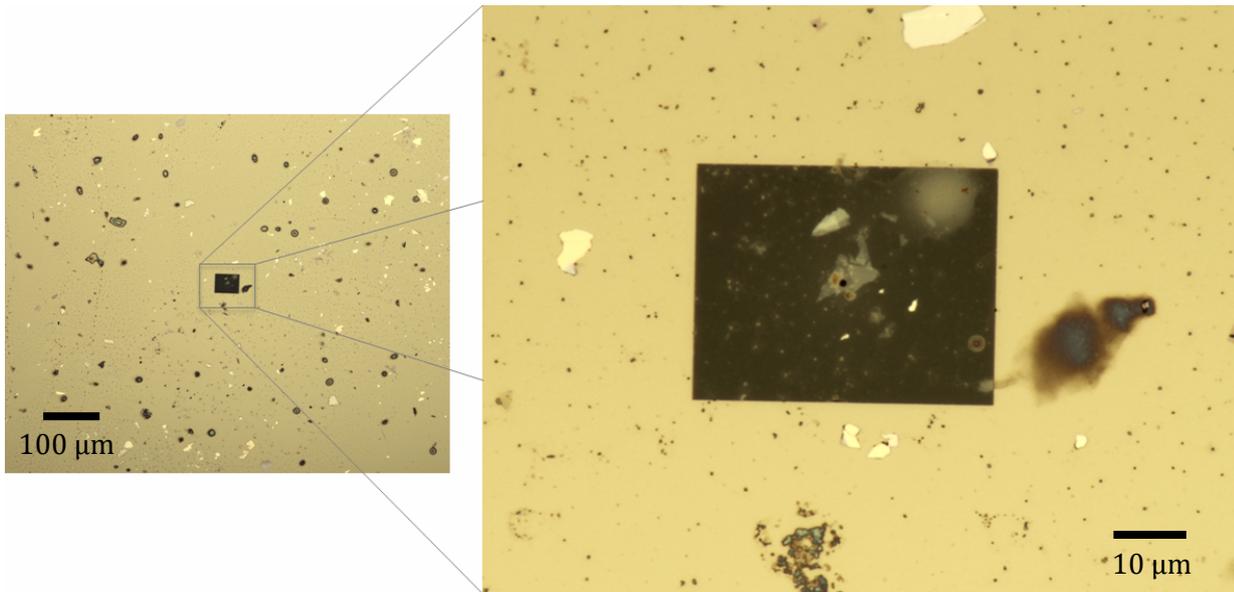


Abb. 4.3.2: Chipoberfläche und Membran mit Polymerüberresten unter dem Auflichtmikroskop

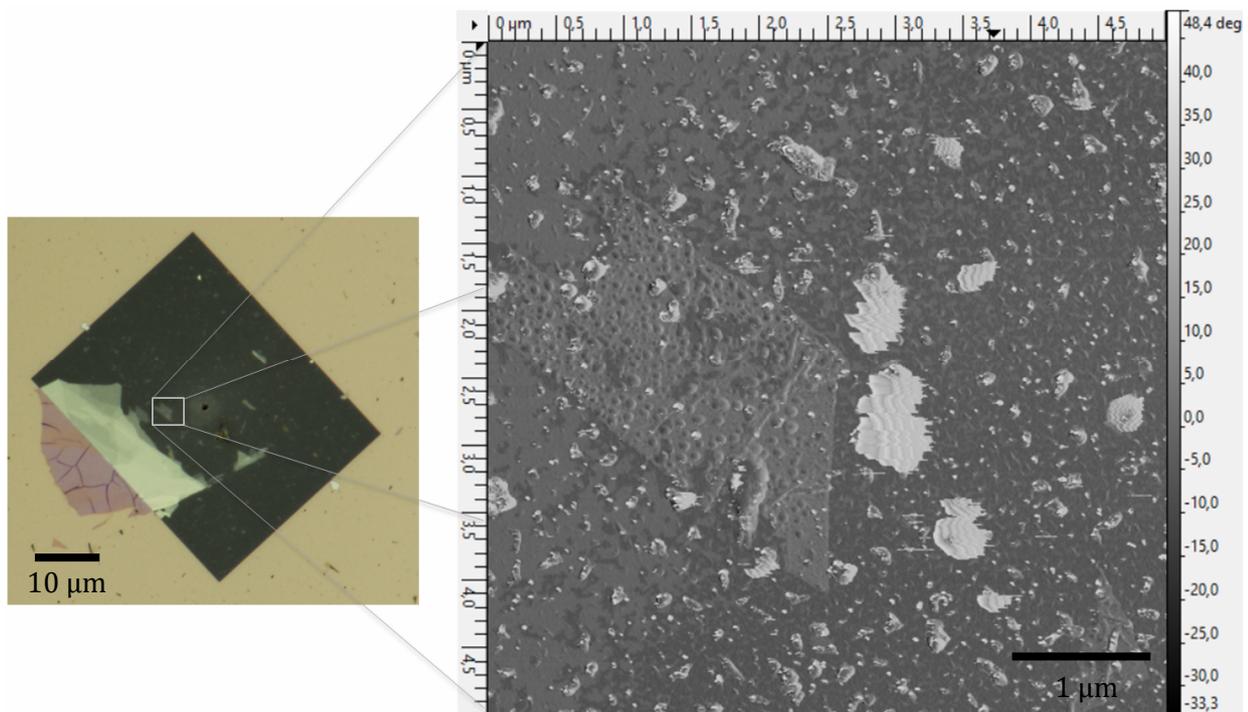


Abb. 4.3.3: Lichtbildaufnahme eines Chips mit einer Monolage neben der Mikropore (links),
AFM-Phasenbild der Monolage (rechts)

Um das Problem der sich an der Chipoberfläche adhärierenden DNA zu lösen oder zumindest weitgehend zu vermindern könnte in Zukunft abgesehen vom gründlicherem Auflösen des Polymers die Verwendung eines alternativen Übertragungsmediums erwogen werden. Andere Polymere sind möglicherweise einfacher zu entfernen oder üben keine so ausgeprägte attraktive Wirkung auf DNA oder Mikrokügelchen aus. Ebenso könnte eine Abkehr von dem in dieser Arbeit durchgeführten Wedging-Transfer hin zu einer komplett trockenen Übertragungsmethode erwogen werden welche gar kein derartiges Transfermedium mehr benötigt.

Als eine relativ neue jedoch außerordentlich erfolgreich angewandte Methode der Übertragung von dünnen Lagen auf ein Substrat hat sich der viskoelastische Transfer erwiesen^{73,74}. Hierbei wird unter einem Mikroskop die ebenfalls durch Exfoliation erzeugte Monolage, mittels einem per Mikromanipulator steuerbaren Stempel, auf ein zuvor dort platziertes Substrat übertragen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Molybdändisulfid-Monolagen ein mögliches Material für DNA-Translokationsexperimente mit der Optischen Pinzette darstellen. Die grundlegende Fragestellung war, ob kontrollierte DNA-Translokationen durch Nanoporen dieses Materials überhaupt durchführbar sind und wenn ja, ob aus den Daten der Messungen Rückschlüsse auf die mechanischen und elektrischen Wechselwirkungen zwischen DNA und Pore ermöglicht werden können.

Im Zuge dieser Arbeit, wurden mehrfach erfolgreiche DNA-Translokationen durchgeführt. Bei den einzelnen Versuchen an den eigens für diese Arbeit hergestellten Proben wurde sowohl mit Gleich- als auch mit Wechselfeld gearbeitet. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die während einer kontrollierten Translokation auftretenden Kräfte mit der erwarteten Genauigkeit zu messen waren. Darüber hinaus konnte, unabhängig von der letztendlich wirkenden Gesamtkraft, durch genaue Analyse der Daten des Einfädungsprozesses auf die Anzahl der DNA-Stränge in der Nanopore geschlossen werden. Die Durchführung einer kompletten Translokation eines λ -DNA-Doppelstrangs von der Einfädung bis zur kontrollierten Ausfädung konnte erfolgreich gezeigt werden. Ebenso wurde die Möglichkeit des wiederholten Abfahrens eines Teilstücks eines zuvor eingefädelten Strangs demonstriert. Überdies hinaus konnte die Kraft auf einen eingefädelten λ -DNA-Doppelstrang in Abhängigkeit von einer angelegten Transmembran-Wechselfeld für verschiedene Frequenzen aufgezeichnet werden.

Grundsätzlich hat sich gezeigt, dass Molybdändisulfid für DNA-Translokationsexperimente gut geeignet zu sein scheint. Einige Herausforderungen, hauptsächlich im Bereich der Präparation, müssen in Zukunft jedoch noch bewältigt werden. Hierzu gehören primär die Probleme mit der Adhäsion der DNA-Stränge an Polymerrückständen. Generell ist die Ausbeute an intakten Proben, aufgrund der vielen oft aufwendigen Präparationsschritte bei dem hier angewandten Wedging-Transfer, eher gering. Deshalb sollte die Verwendung eines vollkommen neuen Übertragungsverfahrens in Erwägung gezogen werden. Dieses könnte der zuvor in Kapitel 4.3 angesprochene viskoelastische Transfer (Stempeln) sein und sollte in Zukunft für die Verwendung der Übertragung von Monolagen auf dünne Chipmembranen evaluiert werden. Sollte sich dieses Transfermethode als geeignet erweisen, könnten in Zukunft wieder Experimente ohne Behinderungen durch Adhäsion durchgeführt werden.

Dem ungeachtet ist zu erwähnen, dass gleichwohl der hier aufgetretenen Hindernisse, selbst bei der weiteren Verwendung des Wedging-Transfers die Möglichkeit gegeben ist weiterführende Messungen an dsDNA, DNA-Liganden-Komplexen und Nanoporen unterhalb von 40 nm

durchzuführen und sich langfristig an der Translokation von einzelsträngiger DNA zu versuchen. Es ist davon auszugehen, dass im spannenden und hochaktuellen Bereich der DNA-Nanoporen-Experimente in Zukunft noch viele interessante Erkenntnisse gewonnen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D. & Deamer, D. W. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13770–3 (1996).
2. K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. J. & Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. F. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science* **306**, 666–669 (2004).
3. Knust, S. Evaluation of ultra thin solid state membranes and very small nanopores for DNA translocation with optical tweezers. (Master-Arbeit Universität Bielefeld, 2015).
4. Kissmer, S. Präparation von freistehenden Graphen-Doppellagen zur Analyse des Schmelzverhaltens von optisch gefangenen Polystyrolpartikeln bei Annäherung an diese. (Bachelor-Arbeit Universität Bielefeld, 2016).
5. Bannwarth, H., Kremer, B. & Schulz, A. *Basiswissen Physik, Chemie und Biochemie*. (Springer Verlag, 2007).
6. Yakovchuk, P., Protozanova, E. & Frank-Kamenetskii, M. D. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Res.* **34**, 564–574 (2006).
7. Watson, J. & Crick, F. H. F. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*. **171**, 737–8 (1953).
8. Mandelkern, M., Elias, J. G., Eden, D. & Crothers, D. M. The dimensions of DNA in solution. *J. Mol. Biol.* **152**, 153–161 (1981).
9. Sanger, F., Coulson, A. R., Hong, G. F., Hill, D. F. & Petersen, G. B. Nucleotide sequence of bacteriophage λ DNA. *J. Mol. Biol.* **162**, 729–773 (1982).
10. Christen, P. & Jaussi, R. *Biochemie*. **1**, (Springer Verlag, 2015).
11. Marko, J. F. & Siggia, E. D. Stretching DNA. *Macromolecules* **28**, 8759–8770 (1995).
12. Lu, Y., Weers, B. & Stellwagen, N. C. DNA persistence length revisited. *Biopolymers* **61**, 261–275 (2001).
13. Bustamante, C., Marko, J. F., Siggia, E. D. & Smith, S. Entropic Elasticity of X-Phage DNA. *Science (80-.)*. **265**, 1599–1600 (1994).
14. Weber, P. C., Ohlendorf, D. H., Wendoloski, J. J. & Salemme, F. R. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* **243**, 85–88 (1989).
15. Holmberg, A. *u. a.* The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis* **26**, 501–510 (2005).
16. Miller, J. R., Koren, S. & Sutton, G. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics* **95**, 315–327 (2010).
17. Hutchison, C. A. *u. a.* Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science (80-.)*. **351**, aad6253-1-aad6253-11 (2016).
18. Baker, M. De novo genome assembly: what every biologist should know. *Nat. Methods* **9**, 333–337 (2012).
19. Lee, H. *u. a.* Third-generation sequencing and the future of genomics. *bioRxiv* 48603 (2016).
20. Wu, M. Y., Krapf, D., Zandbergen, M., Zandbergen, H. & Batson, P. E. Formation of nanopores in a SiN/SiO₂ membrane with an electron beam. *Appl. Phys. Lett.* **87**, (2005).
21. Li, J., Gershow, M., Stein, D., Brandin, E. & Golovchenko, J. a. DNA molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope. *Nat. Mater.* **2**, 611–5 (2003).
22. Bromley, R. a, Murray, R. B. & Yoffe, a D. The band structures of some transition metal dichalcogenides. III. Group VIA: trigonal prism materials. *J. Phys. C Solid State Phys.* **5**, 759–

- 778 (2001).
23. Stehle, Y. u. a. Synthesis of Hexagonal Boron Nitride Monolayer: Control of Nucleation and Crystal Morphology. *Chem. Mater.* **27**, 8041–8047 (2015).
 24. Dávila, M. E., Xian, L., Cahangirov, S., Rubio, A. & Le Lay, G. Germanene: A novel two-dimensional germanium allotrope akin to graphene and silicene. *New J. Phys.* **16**, (2014).
 25. Hu, Y. & Chua, D. H. C. Synthesizing 2D MoS₂ Nanofins on carbon nanospheres as catalyst support for Proton Exchange Membrane Fuel Cells. *Sci. Rep.* **6**, 28088 (2016).
 26. Hogg, W. R. & Coulter, W. H. Apparatus and method for measuring a dividing particle size of a particulate system. *United States Pat. US 3557352* (1971).
 27. DeBlois, R. W. & Bean, C. P. Counting and sizing of submicron particles by the resistive pulse technique. *Rev. Sci. Instrum.* **41**, 909–916 (1970).
 28. Spiering, A. Einzelmolekül-Experimente an Nanoporen mit der Optischen Pinzette. (Dissertation Universität Bielefeld, 2014).
 29. Lottspeich, F. & Zorbas, H. *Bioanalytik*. (Spektrum Akademischer Verlag, 1998).
 30. Ghosal, S. Electrokinetic-flow-induced viscous drag on a tethered DNA inside a nanopore. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **76**, (2007).
 31. Laohakunakorn, N., Ghosal, S., Otto, O., Misiunas, K. & Keyser, U. F. DNA interactions in crowded nanopores. *Nano Lett.* **13**, 2798–2802 (2013).
 32. Ashkin, A. Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Phys. Rev. Lett.* **24**, 156–159 (1970).
 33. Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E. & Chu, S. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.* **11**, 288 (1986).
 34. Chu, S., Bjorkholm, J. E., Ashkin, A. & Cable, A. Experimental observation of optically trapped atoms. *Phys. Rev. Lett.* **57**, 314–317 (1986).
 35. Chu, S., Hollberg, L., Bjorkholm, J. E., Cable, A. & Ashkin, A. Three-Dimensional Viscous Confinement and Cooling of Atoms by Resonance Radiation Pressure. *Phys. Rev. Lett.* **55**, 48–51 (1985).
 36. Demtröder, W. *Experimentalphysik 2*. (Springer Verlag, 2013).
 37. Ashkin, A. & Dziedzic, J. M. Optical levitation by radiation pressure. *Appl. Phys. Lett.* **19**, 283–285 (1971).
 38. Beyerer, Jürgen; Puente Leon, Fernando; Frese, C. *Automatische Sichtprüfung: Grundlagen, Methoden und Praxis der Bildgewinnung und Bildauswertung*. Springer Vieweg (2012).
 39. Ashkin, A. & Dziedzic, J. M. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science* **235**, 1517–1520 (1987).
 40. Oregon Medical Laser Center. <http://omlc.org/spectra/hemoglobin/summary.html>. (29.08.2016)
 41. Oregon Medical Laser Center. <http://omlc.org/spectra/melanin/eumelanin.html>. (29.08.2016)
 42. Oregon Medical Laser Center. <http://omlc.org/spectra/fat/fat.orig.txt>. (29.08.2016)
 43. Gregory B. Altshuler, R. Rox Anderson, D. M. Method and apparatus for the selective targeting of lipid-rich tissues. *United States Pat. US 6605080 B1* (2003).
 44. Hale, G. M. & Querry, M. R. Optical Constants of Water in the 200-nm to 200-microm Wavelength Region. *Appl. Opt.* **12**, 555–563 (1973).
 45. Liang, H., Wright, W. H., Cheng, S., He, W. & Berns, M. W. Micromanipulation of chromosomes

- in PTK2 cells using laser microsurgery (optical scalpel) in combination with laser-induced optical force (optical tweezers). *Experimental cell research* **204**, 110–120 (1993).
46. Ashkin, A. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophys. J.* **61**, 569–82 (1992).
 47. Richardson, A. C., Reihani, S. N. S. & Oddershede, L. B. Non-harmonic potential of a single beam optical trap. *Opt. Express* **16**, 15709–15717 (2008).
 48. Otto, O. u. a. High-speed video-based tracking of optically trapped colloids. *J. Opt.* **13**, 44011 (2011).
 49. Knust, S. Video-based and interference-free axial force detection and analysis for optical tweezers. (Bachelor-Arbeit Universität Bielefeld, 2012).
 50. Ashkin, A., Dziedzic, J. M. & Yamane, T. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature* **330**, 769–771 (1987).
 51. Kestin, J., Sokolov, M. & Wakeham, W. A. Viscosity of liquid water in the range $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $150\text{ }^{\circ}\text{C}$. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **7**, 941–948 (1978).
 52. Svoboda, K. & Block, S. M. Biological applications of optical forces. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Str.* **23**, 247–285 (1994).
 53. Sischka, A. Kraftspektroskopie und Einzelmoleküldetektion mit der Optischen Pinzette. (Dissertation Universität Bielefeld, 2005).
 54. Knust, S. u. a. Video-based and interference-free axial force detection and analysis for optical tweezers. *Rev. Sci. Instrum.* **83**, 103704 (2012).
 55. Lansdorp, B. M. & Saleh, O. A. Power spectrum and Allan variance methods for calibrating single-molecule video-tracking instruments. *Rev. Sci. Instrum.* **83**, (2012).
 56. Sischka, A. u. a. Single beam optical tweezers setup with backscattered light detection for three-dimensional measurements on DNA and nanopores. *Rev. Sci. Instrum.* **79**, (2008).
 57. Sischka, A. Aufbau einer optischen Pinzette. (Diplomarbeit Universität Bielefeld, 2002).
 58. Roosen, G. & Imbert, C. The TEM* 01 mode laser beam-A powerful tool for optical levitation of various types of spheres. *Opt. Commun.* **26**, 432–436 (1978).
 59. Tuschel, D. Resonance Raman and Photoluminescence Spectroscopy and Imaging of Few-Layer MoS₂. *Spectroscopy Volume 30*, (2015).
 60. Buscema, M., Steele, G. A., van der Zant, H. S. J. & Castellanos-Gomez, A. The effect of the substrate on the Raman and photoluminescence emission of single layer MoS₂. *arXiv:1311.3869 [cond-mat]* 1–50 (2013).
 61. Yang, D., Sandoval, S. J., Divigalpitiya, W. M. R., Irwin, J. C. & Frindt, R. F. Structure of single-molecular-layer MoS₂. *Phys. Rev. B* **43**, 12053–12056 (1991).
 62. Xu, H. u. a. Optical identification of MoS₂/graphene heterostructure on SiO₂/Si substrate. *Opt. Express* **22**, 15969–15974 (2014).
 63. Splendiani, A. u. a. Emerging photoluminescence in monolayer MoS₂. *Nano Lett.* **10**, 1271–1275 (2010).
 64. Cao, T. u. a. Valley-selective circular dichroism of monolayer molybdenum disulphide. *Nat. Commun.* **3**, 887 (2012).
 65. Sundaram, R. S. u. a. Electroluminescence in single layer MoS₂. *Nano Lett.* **13**, 1416–1421 (2013).
 66. Chen, Z., Gacem, K. & Boukhicha, M. Visibility of dichalcogenide nanolayers. *Nanotechnology* **22**, (2011).
 67. Schneider, G. F., Calado, V. E., Zandbergen, H., Vandersypen, L. M. K. & Dekker, C. Wedging

- transfer of nanostructures. *Nano Lett.* **10**, 1912–1916 (2010).
68. Yusko, E. C. *u. a.* Controlling protein translocation through nanopores with bio-inspired fluid walls. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 253–260 (2011).
 69. Noy, A. & Friddle, R. W. Practical single molecule force spectroscopy: How to determine fundamental thermodynamic parameters of intermolecular bonds with an atomic force microscope. *Methods* **60**, 142–150 (2013).
 70. Lee, C., Wei, X., Kysar, J. W. & Hone, J. Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene. *Science (80-.).* **321**, 385–388 (2008).
 71. Nemes-Incze & Osváth. Anomalies in thickness measurements of graphene and few layer graphite crystals by tapping mode atomic force microscopy. *Carbon N. Y.* **46**, 1435–1442 (2008).
 72. Gupta, A. *u. a.* Raman Scattering from High-Frequency Phonons in Supported n-Graphene Layer Films. *Nano Lett.* **6**, 2667–2673 (2006).
 73. Castellanos-Gomez, A. *u. a.* Deterministic transfer of two-dimensional materials by all-dry viscoelastic stamping. *2D Mater.* **1**, 11002 (2014).
 74. Yang, R., Zheng, X., Wang, Z., Miller, C. J. & Feng, P. X. L. Multilayer MoS₂ transistors enabled by a facile dry-transfer technique and thermal annealing. *J. Vac. Sci. Technol. B* **32**, 61203 (2014).

7 Danksagung

An dieser Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti für die Möglichkeit an einem sehr interessanten und hochaktuellen Thema arbeiten zu können, für sein Vertrauen, für seine Unterstützung und für die optimalen Arbeitsbedingungen in seiner Abteilung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Sebastian Knust, M.Sc. für die hervorragende Betreuung, die ausgezeichnete Zusammenarbeit im Labor und für die vielen hilfreichen und klärenden Diskussionen, die das letzte Jahr zu einer spannenden und abwechslungsreichen Zeit gemacht haben.

Dipl.-Ing. Christoph Pelargus möchte ich sowohl für seinen fachlichen Rat bei technischen Umsetzungen, als auch für das beharrliche Bohren immer neuer, immer kleinerer Poren danken. Bei Sabrina Kissmer, meiner Mitstreiterin auf der Suche nach „der einen Lage“, möchte ich mich für die Einführung in die Präparation, die vielen interessanten Debatten und zahlreichen Ideen bedanken. Mein Dank geht auch an Dipl.-Phys. Roland Hillmann für die Hilfe am AFM und die zahlreichen mal physikalischen, mal amüsanten Unterhaltungen. Frau Dr. Katja Tönsing danke ich für die stets zuverlässige Hilfe bei auftretenden Problemen, nicht nur chemischer Natur und für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit. Bei der gesamten Arbeitsgruppe „Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften“ möchte ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft bedanken.

Abschließend möchte ich mich noch bei meinen Eltern für die fortwährende Unterstützung und ihren Rückhalt während meines gesamten Ausbildungswegs bedanken. Nicht zuletzt möchte ich mich noch bei meinen Freunden, die mich während des Studiums unterstützten und begleiteten bedanken.