

Untersuchung und Kontrolle biofunktioneller Mikro- und Nanostrukturen auf Oberflächen: Von der Nano-Tinte bis zur „Functionality-on-a-Stick“

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
von der Fakultät für Physik des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Alexander Förste
aus Pforzheim

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 2013

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Schimmel

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Gerd Ulrich Nienhaus

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen des Probensystems	5
2.1	Polymere	5
2.1.1	Grundbegriffe der Polymerphysik	5
2.1.2	Phasenseparation eines Polymerblends in isotropen Systemen	8
2.1.3	Phasenseparation eines Polymerblends unter Oberflächeneinfluss	11
2.2	Selbstorganisierende Monolagen (SAM)	13
2.2.1	Struktur und Funktion selbstorganisierender Monolagen	13
2.2.2	Bildung selbstorganisierender Monolagen	14
2.3	Substratkonsumierende metallorganische Schichten (SCMOL)	16
2.3.1	Schichtbildende Moleküle	16
2.3.2	Mechanismus des Schichtwachstums	17
2.4	DNA-Einzelstränge	19
2.4.1	Struktur und Funktion von DNA und RNA	19
2.4.2	Struktur und Funktion von DNA-Linkern	22
2.5	Tabakmosaikviren (TMV)	22
2.5.1	Grundbegriffe der Virologie	22
2.5.2	Tabakmosaikviren als Nano-Bausteine definierter Dimension mit chemisch modifizierbarer Oberfläche	23
3	Präparative Methoden	25
3.1	Substrat-Herstellung	25
3.2	Snowjet-Verfahren	25
3.3	Spincoating-Verfahren	27
3.3.1	Funktionsprinzip des Spincoating-Verfahrens	27
3.3.2	Apparativer Aufbau und Bedienungsführung beim luftfeuchtigkeitsgeregelten Spincoating-Verfahren	29
3.4	Aufdampfprozess	30
3.4.1	Funktionsprinzip des Elektronenstrahlverdampfers	30
3.4.2	Apparativer Aufbau und Bedienungsführung der Aufdampfanlage	31
3.5	Plasma-Modifizierung	33
4	Analytische Methoden	35
4.1	Optische Mikroskopie	35
4.2	UV/Vis-Spektroskopie	35
4.3	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	36
4.3.1	Funktionsprinzip des Rasterelektronenmikroskops	36
4.3.2	Wechselwirkungen zwischen Primärelektronen und Probenatomen	36

4.3.3	Apparativer Aufbau des Rasterelektronenmikroskops	38
4.4	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	39
4.4.1	Funktionsprinzip des Rasterkraftmikroskops	39
4.4.2	Wechselwirkungen zwischen Messspitze und Probenoberfläche . .	40
4.4.3	Betriebsmodi des Rasterkraftmikroskops	43
4.4.4	Apparativer Aufbau des Rasterkraftmikroskops	45
5	Large-Scale-AFM zur Nano-Mikro-Analytik unterschiedlichster Oberflächen-	49
	messgrößen	
5.1	Large-Scale-AFM-Messungen in konventionellen Betriebsmodi	49
5.1.1	Vorbereitung und Parameter der Messung	50
5.1.2	Messung topographischer Absolutwerte	50
5.1.3	Analyse mittels digitalem oder sequentiellm Zoomen	52
5.1.4	Untersuchung hierarchischer Strukturen	52
5.1.5	In-situ-Untersuchung pflanzlicher Strukturen	56
5.2	Large-Scale-AFM-Messungen im Force-Mapping-Mode	57
5.2.1	Modifizierung des Force-Mapping-Mode	57
5.2.2	Vorbereitung der Messung im Force-Mapping-Mode	58
5.2.3	Durchführung der Messung im Force-Mapping-Mode auf ultragroßer Skala	59
5.3	Zusammenfassung	61
6	Large-Scale-AFM zur Analyse des Tintenübertrags bei der DPN von Phos-	63
	pholipiden	
6.1	DPN-Erstellung von Phospholipid-Punktmustern	63
6.1.1	Funktionsprinzip der Dip-Pen-Nanolithographie (DPN)	64
6.1.2	Phospholipide als DPN-Tinte	65
6.1.3	Phospholipid-Punktmuster mit variabler Benetzungszeit	66
6.2	Large-Scale-AFM-Analyse von Phospholipid-Punktmustern auf der Mil- limeterskala	67
6.2.1	Einsatz des Large-Scale-AFM zur Erhöhung von Messgenauigkeit und statistischer Absicherung	67
6.2.2	Durchführung von Large-Scale-AFM-Messungen zur Ermittlung mittels DPN mit variabler Benetzungszeit geschriebener Phospholipid- Volumina	68
6.3	Benetzungszeit-Abhängigkeit und Regelmäßigkeit des DPN-Phospholipid- Übertrags	71
6.3.1	Einfluss der variierenden Benetzungszeit	71
6.3.2	Effekte der variierenden Wartezeit	73
6.3.3	Quantitative Auswertung der Benetzungszeit-Abhängigkeit des über- tragenen Volumens	76
6.3.4	Quantitative Auswertung der Regelmäßigkeit des übertragenen Volumens	78
6.4	Zusammenfassung	81

7	Herstellung sterisch ideal zugänglicher Nano-Sonden mit hoher Nachweisempfindlichkeit	83
7.1	Idee: Trägersysteme für Nano-Sonden durch Anbindung und Aufrichtung von TMV	83
7.2	Methoden der Probenpräparation	86
7.2.1	Polymerblend-Lithographie (PBL)	86
7.2.2	SCMOL-Schichtdickenverstärkung	88
7.2.3	DNA-Linker-Präparation	89
7.2.4	DNA-Goldkolloid-Präparation	90
7.2.5	Viren-Assemblierung	92
7.3	AFM-Untersuchung mittels PBL nanostrukturierter SAMs	93
7.4	Großflächige Herstellung mittels PBL nanostrukturierter Metallmasken .	94
7.4.1	Lift-off-Prozess der PMMA-Komponente	95
7.4.2	Lift-off-Prozess der PS-Komponente	98
7.5	Kombination von DNA-basierten Kopplungsverfahren und Strukturbildungsverfahren	101
7.5.1	Präparation von DNA-Linkern auf Silber- und Kupferschichten .	101
7.5.2	Präparation von DNA-Linkern auf SCMOL-Schichten aus DTE und Kupfer	104
7.5.3	Präparation von DNA-Linkern auf Goldschichten	105
7.5.4	Präparation von Metallschichten auf DNA-Linkern	105
7.6	Ortsselektive Immobilisierung von DNA-funktionalisierten Goldkolloiden	105
7.6.1	Spektroskopische Analyse von synthetisierten DNA-Goldkolloiden	106
7.6.2	Präparation von synthetisierten DNA-Goldkolloiden auf mittels PBL vorstrukturierten, mit DNA-Linkern versehenen Goldmasken	107
7.7	Einseitige Anbindung und vertikale Aufrichtung von TMV-Derivaten . .	111
7.8	SCMOL-Schichtbildung mit Monothiolen	114
7.8.1	Elementzusammensetzung von MCH-SCMOLs	114
7.8.2	Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Schichtdicke von MCH-SCMOLs	115
7.9	Zusammenfassung	120
8	Zusammenfassung	121

Inhaltsverzeichnis

Akronyme

AFM	Atomic Force Microscope; Rasterkraftmikroskop
DNA	Deoxyribonucleic Acid; Desoxyribonukleinsäure
DOPC	1,2-Dioleoyl-syn-glycero-3-phosphocholin
DPN	Dip-Pen-Nanolithographie
DTE	1,4-Dithioerythritol
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
LFM	Lateral Force Mode; Lateralkraftsignal
MCH	6-Mercapto-1-hexanol
MEK	Methylethylketon; 2-Butanon
NFM	Normal Force Mode; Normalkraftsignal
PBL	Polymerblend-Lithographie
PMMA	Polymethylmethacrylat
PS	Polystyrol
PVD	Physical Vapour Deposition; Physikalische Gasphasenabscheidung
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonucleic Acid; Ribonukleinsäure
SAM	Self-Assembled Monolayer; Selbstorganisierende Monolage
SCMOL	Substrate Consuming Metal Organic Layer; Substratkonsumierende metallorganische Schicht
SPM	Scanning Probe Microscopy; Rastersondenmikroskopie
STM	Scanning Tunneling Microscope; Rastertunnelmikroskop
TMV	Tabakmosaikvirus
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

Die hochaufgelöste Aufnahme und Erfassung quantitativer Daten zu verschiedensten Messgrößen ist auch und gerade in Messbereichen bis in die Größenordnung von Millimetern von großem Interesse, in denen konventionelle Messtechniken bislang keine befriedigenden Lösungsansätze bieten konnten. Das Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM), das sich durch eine mittels Piezoaktoren gesteuerte, höchstauflösende Abtastung von Probenoberflächen durch den mechanischen Kontakt mit einer feinen Spitze auszeichnet [1], konnte diesen Voraussetzungen bisher zumindest auf Längenskalen von 100 μm Rechnung tragen. Das AFM ist seit seiner Erfindung einem stetigen Wandel durch zahlreiche Neuentwicklungen unterworfen. Gerade die technischen Fortschritte auf dem Gebiet der Piezoaktorken erlauben unter anderem ein Vordringen des AFM in Messbereiche, in denen quantitative Ergebnisse wie bei rein bildgebenden Verfahren wie dem Lichtmikroskop oder dem Rasterelektronenmikroskop oft nicht oder wie bei Profilometern nur mit ungenügender Auflösung möglich sind. Hinzu kommt die beim AFM ohnehin zusätzlich vorhandene Option der Untersuchung tribologischer, elastischer, chemischer, magnetischer oder elektrischer Oberflächeneigenschaften [2, 3]. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass ein AFM mit ultragroßem Scanbereich ein geeignetes Werkzeug zur Erfüllung der genannten Voraussetzungen darstellen kann, indem es hauptsächlich in Kombination mit der Erprobung von Verfahren zur Herstellung biofunktioneller Oberflächen für biosensorische Anwendungen eingesetzt wird.

Der Ausgangspunkt dieser Arbeit liegt im Aufbau eines Large-Scale-AFM zur Ausdehnung des Scanbereichs auf Scanweiten von bis zu 800 μm . Das aufgebaute AFM-System basiert auf bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Rasterkraftmikroskopen, mit denen bereits atomare Auflösung demonstriert werden konnte [4]. Die zuvor eingesetzten Röhrenpiezoaktoren wurden durch Stapelpiezoaktoren ersetzt und die AFM-Messeinheit dementsprechend neu konzipiert, weshalb das gesamte System in allen seinen Komponenten zu modifizieren war. Mit dem eingesetzten x-y-Scantisch erhöhte sich der Messbereich auf 800 μm x 800 μm , der im AFM-Bereich als bislang einmalig anzusehen ist.

Mit dem so entstandenen Large-Scale-AFM wurden zunächst Aufnahmen mit Scanfeldgrößen von 800 μm bis hinab zu 5 μm getätigt, um dessen Funktionalität in bei der Konzeption vorgesehenen großen Messbereichen, aber auch in für konventionelle AFM typischen Größenordnungen zu untersuchen. Dabei waren vor allem die Driftstabilität, sowie die laterale und vertikale Sensitivität wichtige Kriterien. Der Force-Mapping-Mode, der der simultanen Ermittlung von Topographie und Adhäsionskräften durch die punktuelle Aufnahme von Kraft-Abstands-Kurven dient, wurde im ultragroßen Messbereich implementiert und angewendet und auf diese Weise die Vielfältigkeit der Messmethoden des AFM auch bei bisher für dieses Messverfahren untypischen Größenordnungen angedeutet.

Das Large-Scale-AFM wurde in dieser Arbeit hauptsächlich zur Analyse biofunktio-

1 Einleitung

neller Oberflächen herangezogen, deren Herstellung eine Schlüsselrolle in der Nanotechnologie zukommt. In enger Kooperation mit biologischen Arbeitsgruppen befasst sich unsere Arbeitsgruppe mit dem Design funktioneller Oberflächen für die biologische Anwendung. Dies reicht von Untersuchungen zur Methodik und Anwendung der Dip-Pen-Nanolithographie (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Fuchs und Dr. Hirtz am Institut für Nanotechnologie am Karlsruher Institut für Technologie) über die Untersuchung von funktionellen, nanostrukturierten Pflanzenoberflächen (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Barthlott an der Universität Bonn) bis zu einem ganz neuen Konzept der Aufrichtung von am Ende funktionalisierten Tabakmosaikviren (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Jeske und Prof. Wege an der Universität Stuttgart).

Die Dip-Pen-Nanolithographie (DPN) ist ein häufig genutztes Werkzeug zur Herstellung von Biosensoren, wobei die biofunktionellen Moleküle in der Regel zusammen mit Lipiden als Trägermaterial die auf die Oberfläche geschriebene Tinte darstellen. Bei dieser Technik existieren trotz ihrer vielfältig genutzten Einsatzmöglichkeiten bislang kaum quantitative Angaben bezüglich des Tintenübertrags. Da für eine breitere Anwendung des Verfahrens jedoch gerade diesbezüglich eine genauere Kenntnis notwendig wäre, sind quantitative Untersuchungen des DPN-Tinentransports von großem Interesse. Hier bietet das Large-Scale-AFM mit einer gegenüber konventionellen AFM-Systemen um etwa den Faktor 100 reduzierten Anzahl notwendiger Aufnahmen entscheidende Vorteile. Aufgrund der Möglichkeit eine Vielzahl geschriebener Strukturen mit nur einer einzigen Aufnahme vermessen zu können, fördert das Large-Scale-AFM hohe Messgenauigkeit und hohe statistische Absicherung gleichermaßen. Daher stellte das aufgebaute AFM ein ideales Werkzeug zur Untersuchung von Benetzungszeit-Abhängigkeit und Regelmäßigkeit des Tintenvolumens von mittels DPN großflächig geschriebenen Lipid-Punkten dar und lieferte mit seinen Messresultaten einen erheblichen Beitrag zu einem vorhersehbareren Schreibergebnis und damit zu einer verbesserten Herstellung von Biosensoren.

Auf dem Gebiet der Nanosensorik gibt es seit Jahren Bestrebungen die Immobilisierung biochemisch aktiver Moleküle, die zur Detektion verschiedenster Targets wie beispielsweise unterschiedlicher Krankheitserreger- oder Schadstoff-Typen eingesetzt werden können, nicht nur ortsselektiv zu gestalten, sondern auch hinsichtlich ihrer räumlichen Positionierung zu optimieren. Durch die exponierte Präparation dieser Detektor-Moleküle auf annähernd senkrecht stehenden, nanoskaligen Trägersystemen könnten sterisch optimal zugängliche Nano-Sonden durch die in dieser Position vorhandene konformative Freiheit der Moleküle realisiert werden, was zu einer erhöhten Sensitivität und Flächenausnutzung solcher Detektionsverfahren beitragen würde. In diesem Zusammenhang entstand die Idee, nicht-infektiöse Derivate stäbchenförmiger Tabakmosaikviren (TMV) als ein solches Trägersystem zu nutzen und innerhalb einer zu diesem Zweck maßgeschneiderten, nanoskaligen Lochstruktur mit DNA-basiertem Ankersystem anzukoppeln und aufrecht stehend zu installieren. TMV sind dabei nicht nur wegen ihrer vergleichsweise einfachen Synthese und ihrer starren, tubulären Gestalt von wohldefinierter Länge ideal geeignet, sondern können aufgrund ihrer genetisch modifizierbaren Protein-Oberfläche zudem mit entsprechenden Funktionsträgern versehen werden. Letztere besitzen bei dieser Art der Anbindung die Freiheit Konformationen zu bilden und zu ändern und weisen damit eine maximale Funktionalität auf. Mit der einseitigen, kovalenten Oberflächen-Bindung, der ebenfalls einseitigen Funktionalisierung und der

aufrechten Oberflächen-Ausrichtung der Virus-Derivate wird der eingesetzten funktionellen Einheit letztlich eine Wechselwirkung von hoher Zugänglichkeit und ohne sterische Hinderung mit einer entsprechenden Lösung oder Flüssigkeit ermöglicht. Dieses neue, als „Functionality-on-a-Stick“ bezeichnete Konzept wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich demonstriert. Die Herausforderung bei der Umsetzung dieser Idee lag in der Anpassung der Vielzahl von eingesetzten Präparationstechniken zur Realisierung von Kopplung und notwendiger Strukturbildung. Hierzu wurden DNA-assoziierte Präparationstechniken, sowie eine polymerbasierte Nanolithographie mit anschließendem Schichtdickenverstärkungs-Mechanismus genutzt. Mit der Entwicklung der vorgestellten Lithographie-Methode wurde an die vorhergehenden AFM-Untersuchungen biofunktionalisierter Oberflächen angeknüpft und die Sensitivität des Large-Scale-AFM-Systems auch in für konventionelle AFM typischen Messbereichen unter Beweis gestellt.

Neben der Einleitung und der Zusammenfassung gliedert sich diese Arbeit in sechs Kapitel. In Kapitel 2 werden die Grundlagen des verwendeten Probensystems erläutert. Es werden neben der Phasenseparation von Polymerblends, die Bildung von selbstorganisierenden Monolagen (SAM) und substratkonsumierenden metallorganischen Schichten (SCMOL), sowie die Präparation von als DNA-Linker bezeichneten thiolterminierten Oligonukleotiden und von Tabakmosaikviren thematisiert. In Kapitel 3 wird auf die verschiedenen Präparationstechniken eingegangen, die für die Probenstrukturierung verwendet wurden. Dabei handelt es sich um die Snowjet-Reinigung, das Spincoating-Verfahren zur Herstellung dünner Polymerfilme, das Elektronenstrahlverdampfen und die Plasma-Modifizierung. Die für die Analyse der derart strukturierten Proben notwendigen Techniken werden in Kapitel 4 rekapituliert. Neben der in dieser Arbeit dominierenden Rasterkraftmikroskopie, wurde Rasterelektronenmikroskopie, optische Mikroskopie und UV-Vis-NIR-Spektroskopie eingesetzt. In Kapitel 5 werden erste Messergebnisse mit dem Large-Scale-AFM gezeigt. Diese verdeutlichen, dass das System bei ultragroßen wie auch bei für konventionelle AFM gängigen Messbereichen eine hohe Sensitivität aufweist. Neben der Nutzung der Standard-Messmodi werden im Force-Mapping-Mode zusätzlich zur Topographie auch Adhäsionskräfte in Messbereichen von $800\ \mu\text{m} \times 800\ \mu\text{m}$ kartiert und absolut bestimmt. In Kapitel 6 erfolgt die Large-Scale-AFM-Untersuchung von mittels DPN geschriebenen Lipid-Strukturen, bei der insbesondere die Abhängigkeit des übertragenen Tintenvolumens von der Benetzungszeit beim Schreiben, sowie dessen Regelmäßigkeit quantitativ ausgewertet wird. In Kapitel 7 wird die ortsselektive, einseitige Anbindung und anschließende Aufrichtung von Tabakmosaikviren auf dem Substrat vorgestellt, die die Basis für deren Nutzung als Trägersystem für sterisch ideal zugängliche Nano-Sonden mit hoher Nachweisempfindlichkeit darstellt.

1 Einleitung

2 Grundlagen des Probensystems

Zur Herstellung biofunktioneller Oberflächen in Form von ortsselektiv gebundenen, aufrecht stehenden Tabakmosaikviren als Trägersystem für sterisch ideal zugängliche Nano-Sonden mit hoher Nachweisempfindlichkeit wurden nicht nur Viren und als DNA-Linker bezeichnete Oligonukleotide mit Thiol-Terminierung benötigt, sondern auch zusätzliche organische Monolagen zur Oberflächenpassivierung, sowie eine spezielle Polymermischung, anhand deren Morphologie eine Metall-Lochmaske als heterogene Oberflächenvorstrukturierung erzeugt werden konnte, und eine sogenannte substratkonsumierende metallorganische Schicht zur Erhöhung der Schichtdicken jener Metall-Lochmasken.

2.1 Polymere

2.1.1 Grundbegriffe der Polymerphysik

Polymere sind lineare oder verzweigte Kettenmoleküle sich wiederholender Bausteine, die als Monomere bezeichnet werden. Der Hauptstrang der Kette wird über kovalente Bindungen meist zwischen Kohlenstoffatomen gebildet, wobei auch eine Vielzahl von Nebengruppen möglich ist.

Die Synthese von Polymeren geschieht durch Polymerisation, Polykondensation oder Polyaddition. Den Ausgangspunkt der Polymerisation bilden Monomere mit Doppelbindungen, die mit Hilfe von Katalysatoren ohne großen Energieaufwand aufgebrochen werden können, sodass die entstandenen freien Enden neue Bindungen mit anderen Monomeren eingehen können. Bei der Polykondensation schließen sich Monomere über reaktionsfähige Endgruppen zusammen, wobei als Spaltprodukt meistens Wasser entsteht. Die Polyaddition läuft ebenfalls unter Zusammenschluss von Monomeren über reaktionsfähige Endgruppen ab, wobei allerdings keine Spaltprodukte entstehen, was die Reaktionssteuerung erschwert. Polymere können sowohl künstlich hergestellt werden als auch natürlich vorkommen. Neben den synthetischen Polymeren wie beispielsweise Polystyrol (PS) oder Polymethylmethacrylat (PMMA, Handelsname Plexiglas), die zu den Kunststoffen zählen, gibt es beispielsweise mit Polysacchariden wie Cellulose und Proteinen wie der DNA auch Biopolymere.

Die Konfiguration eines Polymers ist wie in Abbildung 2.1(a) gezeigt durch die Verteilung der Monomere innerhalb der Kette charakterisiert. Anhand ihrer kann eine Unterteilung in Homopolymere wie beispielsweise PS und PMMA, die aus einer einzigen Monomersorte aufgebaut sind, und aus mehreren Monomersorten bestehende Copolymere wie Polyester vorgenommen werden.

Die Konformation von Polymeren charakterisiert deren räumliche Struktur, die durch die Ausrichtung der einzelnen Monomere zueinander bestimmt wird. Polymere können entweder in Lösung oder im Massenpolymerisat vorliegen, wo sie sich unterhalb der Glasübergangstemperatur zu einem amorphen oder teilweise kristallinen Festkörper an-

2 Grundlagen des Probensystems

ordnen und oberhalb dieser eine Schmelze bilden. Die Kettenmoleküle sind in beiden Fällen nicht ausgestreckt, sondern ineinander verknäult, da der durch die Atombindung festgelegte Bindungswinkel α zwar nahezu konstant ist, der Rotationswinkel φ aber nur diverse Vorzugswinkel annehmen kann, die von den beteiligten Nebengruppen abhängen. Dieser Sachverhalt wird durch Abbildung 2.1(b) veranschaulicht.

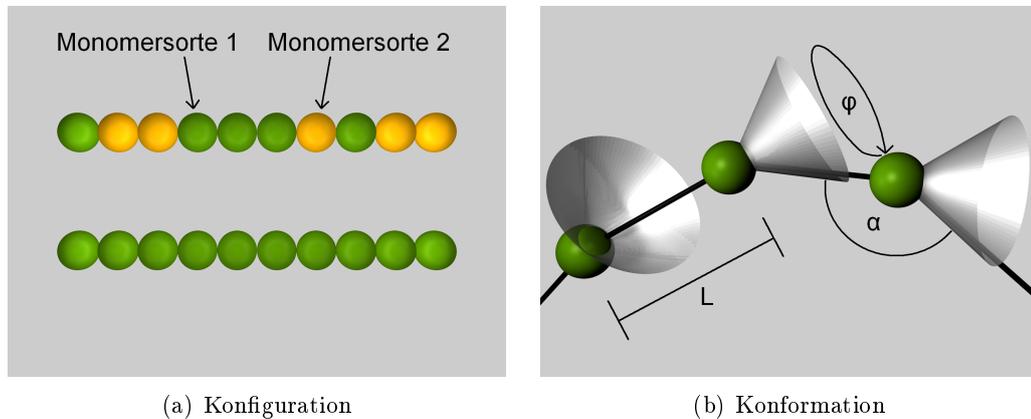


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Polymerkonfiguration und -konformation. (a) Die Polymerkonfiguration wird durch die Verteilung der Monomere innerhalb des Moleküls bestimmt. Es wird zwischen Homopolymeren aus einer Monomersorte (unteres Molekül) und Copolymeren aus mehreren Monomersorten (oberes Molekül) unterschieden. (b) Die Polymerkonformation wird durch die räumliche Ausrichtung der einzelnen Monomere zueinander bestimmt. Während der Bindungswinkel α zwar nahezu konstant ist, nimmt der Rotationswinkel φ aber nur diverse Vorzugswinkel an, was durch die eingezeichneten Kegel angedeutet wird.

Der Vernetzungsgrad der Polymere bestimmt in starkem Maße dessen physikalische Eigenschaften, weshalb abhängig von seiner Ausprägung zwischen Thermoplasten, Duroplasten und Elastomeren unterschieden wird. Thermoplaste wie PS und PMMA weisen keine Vernetzungsstellen auf und lassen sich deshalb in einem bestimmten Temperaturbereich reversibel verformen. Duroplaste wie beispielsweise ausgehärteter Epoxidharz besitzen Vernetzungsstellen und können deshalb nach ihrer Aushärtung nicht mehr verformt werden. Elastomere wie Gummi weisen ebenfalls Vernetzungsstellen auf, wobei deren Netzstruktur jedoch weitmaschiger als die der Duroplaste ist. Daher lassen sie sich verformen, kehren aber anschließend wieder in ihre ursprüngliche, unverformte Gestalt zurück.

In dieser Arbeit wurden mit PS und PMMA synthetische Homopolymere und Thermoplaste verwendet. Ihre Strukturformeln sind in Abbildung 2.2 dargestellt.

Wichtige Größen zur weiteren Beschreibung einer bestimmten Polymersorte sind der durch die Konfiguration bestimmte Polymerisationsgrad N als Kennzahl der zusammengeschlossenen Monomere und das Molekulargewicht M , sowie der durch die Konformation bestimmte Gyrationradius R_g als durchschnittlicher Abstand eines Monomers vom Molekülschwerpunkt.

Der typischerweise im Bereich von hundert bis zu mehreren zehntausend liegende Polymerisationsgrad kann aufgrund der nicht vorhandenen Monodispersität der Poly-

mere in starkem Maße streuen, weshalb für eine Polymercharge kein festes, sondern nur das mittlere Molekulargewicht sowie der Polydispersitätsindex PDI angegeben werden kann:

$$PDI = \frac{M_w}{M_n} \text{ mit } M_w = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i^2}{\sum_i N_i \cdot M_i}, M_n = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i}{\sum_i N_i}. \quad (2.1)$$

Dabei bezeichnet N_i die Anzahl der Moleküle mit dem Molekulargewicht M_i . Zur Bestimmung der Molekulargewichte können chromatographische Messmethoden [5] und Laser-Kleinwinkel-Streuung (Low-Angle Laser-Light Scattering, LALLS) [6] herangezogen werden.

Der Gyrationradius des Polymers beschreibt dessen Ausdehnung bei Vorliegen in Form des Gaußschen Knäuels als wahrscheinlichste Konformation. Er kann durch Röntgen-Kleinwinkel-Streuung oder Rayleigh-Streuung experimentell ermittelt [7] und über die Formel

$$R_g = \sqrt{C \cdot N \cdot L^2} \quad (2.2)$$

berechnet werden, wobei C eine mittels RIS-Theorie (RIS: Rotational Isomeric State) [8] über diskrete isomere Rotationszustände ermittelte, empirische Konstante, N der Polymerisationsgrad und L die Segmentlänge beziehungsweise der effektive Bindungsabstand ist. Mit typischen Werten von $N = 1000$, $L = 0,5 \text{ nm}$ und $C = 1,1$, ergibt sich $R_g = 8 \text{ nm}$, was deutlich geringer ist als die Länge des ausgestreckten Kettenmoleküls von etwa 500 nm und die Knäuelform bestätigt. Da die Dichte einzeln liegender Knäuel mehr als eine Größenordnung unter den tatsächlichen Dichten liegt, müssen sich die Polymerknäuel gegenseitig durchdringen. Befindet sich ein Polymer in einem geeigneten Lösungsmittel, lagern sich Lösungsmittelmoleküle an die Kettenglieder an, weshalb das Polymer aufquillt oder schrumpft. Der Gyrationradius R_g ist dann proportional zu $N^{3/5}$.

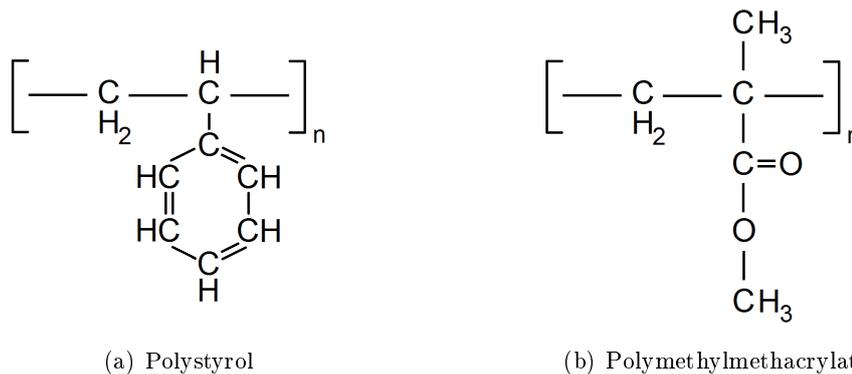


Abbildung 2.2: Strukturformeln der Monomere von Polystyrol (PS) und Polymethylmethacrylat (PMMA). Die Polymere sind aus n dieser in der jeweiligen Klammer dargestellten Monomere aufgebaut.

2.1.2 Phasenseparation eines Polymerblends in isotropen Systemen

Unter einem Polymerblend versteht man eine Mischung von zwei oder mehreren Polymerarten, die aus einem rein physikalischen Mischungsprozess resultiert, bei dem keine chemischen Bindungen zwischen den Polymeren eingegangen werden. Unterschiedliche Polymere sind wegen des geringen Entropiegewinns allerdings generell fast nie mischbar, weshalb nach Verdampfung des Lösungsmittels eine Phasenmorphologie im Mikrometerbereich entsteht, deren Ausprägung und Längenskala in starkem Maße prozessabhängig und verantwortlich für die mechanischen Eigenschaften des Materials ist.

Die Phasenseparation von Polymerblends für ein dreidimensional-isotropes System unter Vernachlässigung von Oberflächeneinflüssen wird durch die Flory-Huggins-Theorie beschrieben [9, 10]. Die Polymerphasenseparation als isobarer, isothermer Prozess verläuft so, dass das Gibbs'sche Potential beziehungsweise die Freie Enthalpie G_m , die sich aus einem enthalpischen und einem entropischen Anteil zusammensetzt, minimiert wird:

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T \cdot \Delta S_m. \quad (2.3)$$

Bei gegebener Temperatur T ist die Mischungsentropie ΔS_m dabei verantwortlich für den Mischungsprozess in einer Lösung. Ihm entgegen wirkt die Mischungsenthalpie ΔH_m , die die Unterschiede der Monomere in ihrer Polarisierbarkeit oder permanenten Polarisierung beschreibt, weshalb Kontakte unter gleichartigen Monomeren gegenüber andersartigen bevorzugt werden. In den meisten Fällen werden diese enthalpischen Wechselwirkungen durch die große Entropiezunahme aufgrund der dann weitaus größeren Anzahl möglicher Konstellationen überkompensiert. Im Fall von Polymeren ist der entropische Term aufgrund des Zusammenschlusses der Monomere jedoch um den Faktor $1/N$ reduziert, was bei typischen Polymerisationsgraden von 1000 eine große Rolle spielt.

Der enthalpische Anteil lässt sich durch die phänomenologische Relation

$$\Delta H_m = n \cdot k_B \cdot T \cdot \chi \cdot \phi_A \cdot \phi_B \quad (2.4)$$

ausdrücken, wobei $\phi_A = \frac{n_A}{n_A+n_B}$ und $\phi_B = \frac{n_B}{n_A+n_B}$ die Volumenbruchteile sind, n die Gesamtanzahl der Monomere und χ der phänomenologische Flory-Huggins-Parameter ist, der den energetischen Unterschied in den Wechselwirkungen gleichartiger und verschiedener Monomere erfasst und eine empirisch festgestellte Temperaturabhängigkeit der Form $\chi = A + \frac{B}{T}$ mit den für das jeweilige Polymersystem konstanten Werten A und B besitzt.

Der entropische Anteil lässt sich durch die Relation

$$\Delta S_m = -n \cdot k_B \cdot \left(\frac{\phi_A}{N_A} \cdot \ln \phi_A + \frac{\phi_B}{N_B} \cdot \ln \phi_B \right) \quad (2.5)$$

ausdrücken, die unter Betrachtung der bei einem Mischungsprozess zusätzlich entstehen Realisierungsmöglichkeiten hergeleitet werden kann. Dabei bestätigt der bereits oben erwähnte Faktor $1/N_i$ den großen Einfluss der Kettenlänge auf das Mischungsverhalten der Polymere.

Durch Einsetzen der beiden Gleichungen ergibt sich die Flory-Huggins-Relation:

$$\Delta G_m = n \cdot k_B \cdot T \cdot \left(\frac{\phi_A}{N_A} \cdot \ln \phi_A + \frac{\phi_B}{N_B} \cdot \ln \phi_B + \chi(\phi_A, \phi_B, T) \cdot \phi_A \cdot \phi_B \right). \quad (2.6)$$

Durch Auftragen der Änderung der Freien Enthalpie über einem der beiden Volumenbruchteile ergeben sich wie in Abbildung 2.3 gezeigt entweder zwei Minima oder nur eins, welche den möglichen Gleichgewichtskompositionen der beiden koexistierenden Phasen entsprechen. Im Falle von zwei existierenden Minima gibt es zwischen ihnen einen instabilen Bereich, in dem die Phasenseparation stattfindet. Die Existenz nur eines Minimums entspricht einer Vermischung der Polymere. Dies tritt für $\chi \cdot N \leq 2$, also bei kleinerem Polymerisationsgrad oder kleinerem Wechselwirkungsparameter und somit bei höherer Temperatur auf. Die Phasenseparation ist also temperaturabhängig. Durch Auftragen der Temperatur über den entsprechenden Volumenverhältnissen der Tief- und Wendepunkte von ΔG_m lässt sich die Situation anhand von Abbildung 2.4(a) folgendermaßen beschreiben. Oberhalb der kritischen Temperatur T_C ist der Polymerblend mischbar. Diese ist für technische Mischungen von Polymeren allerdings praktisch nie erreichbar. Innerhalb der Binodalen, die einer Koexistenzlinie entspricht, befindet sich das Zweiphasengebiet. Innerhalb der Spinodalen ist der instabile Bereich, in dem nach Quenchen unterhalb der kritischen Temperatur spinodale Entmischung stattfindet. Beide Kurven liefern eine qualitativ sehr gute Beschreibung der Phasenseparation.

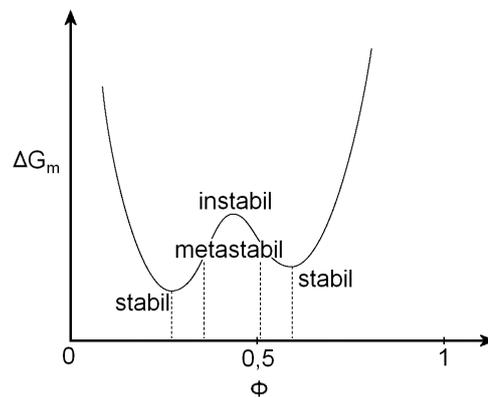
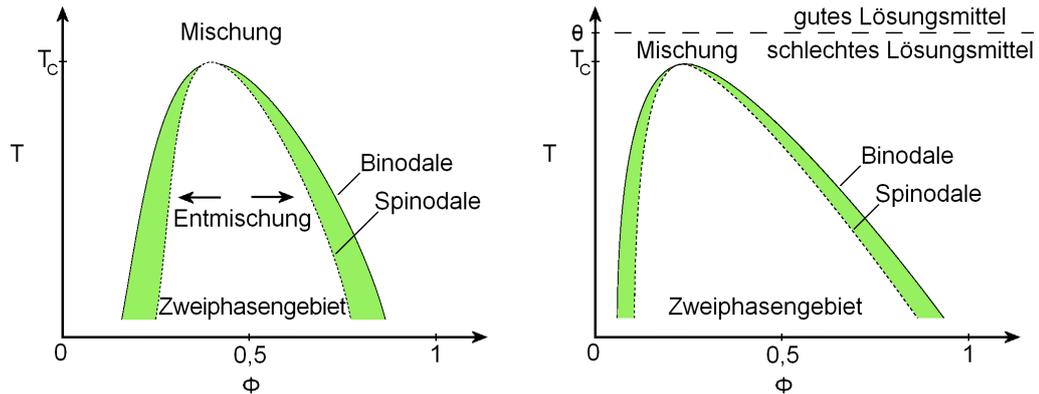


Abbildung 2.3: Schaubild von Freier Enthalpieänderung und Volumenverhältnis bei der Polymer-Phasenseparation, die im Bereich der Entmischung zwei Minima aufweist, die den Gleichgewichtskompositionen der beiden koexistierenden Phasen entsprechen. Nach [11].

Völlig analog lässt sich wie in Abbildung 2.4(b) gezeigt die Phasenseparation einer einzigen Polymersorte in einem Lösungsmittel beschreiben. Mit der Flory-Huggins-Relation und den Volumenanteilen ϕ_A und ϕ_C von Polymer und Lösungsmittel ergibt sich folgender Ausdruck:

$$\Delta G_m = n \cdot k_B \cdot T \cdot \left(\frac{\phi_A}{N_A} \cdot \ln \phi_A + \frac{\phi_C}{1} \cdot \ln \phi_C + \chi(\phi_A, \phi_C, T) \cdot \phi_A \cdot \phi_C \right). \quad (2.7)$$



(a) Einfluss der Temperatur auf die Polymer-Phasenseparation

(b) Einfluss der Temperatur auf die Löslichkeit eines Polymers

Abbildung 2.4: Phasendiagramme von Polymerblends und Polymer-Lösungen. (a) Phasendiagramm eines Polymerblends mit der Binodalen, der die Tiefpunkte der Relation aus Abbildung 2.3 entsprechen, und der Spinodalen, der die Wendepunkte dieses Zusammenhangs entsprechen. Innerhalb der Binodalen liegt das Zweiphasengebiet, innerhalb der Spinodalen findet aufgrund der instabilen Mischung nach rascher Temperaturabsenkung die spinodale Entmischung statt, die durch die Pfeile verdeutlicht wird. Oberhalb der kritischen Temperatur T_C ist der Polymerblend mischbar. (b) Phasendiagramm einer Polymer-Lösung mit Binodaler und Spinodaler, wobei sich unter- und oberhalb der kritischen Temperatur T_C dasselbe Verhalten wie beim Polymerblend in (a) ergibt. Die Temperatur θ trennt die Bereiche, in denen ein Lösungsmittel als gut oder schlecht definiert wird. Nach [11].

Die Mischbarkeit ist hier stark erhöht, weil nur die Polymerkomponente den Faktor $1/N_A$ im entropischen Anteil enthält und deshalb auch die kritische Temperatur T_C wesentlich geringer ausfällt.

Der Gyrationradius ist im Vergleich zu der im Massenpolymerisat vorliegenden Konformation verändert, weil die Monomere je nach Qualität des Lösungsmittels mehr oder weniger Kontakte mit den Lösungsmittelmolekülen eingehen und somit aufquellen oder schrumpfen. Der damit einhergehende Entropieverlust wegen Abweichung vom Gaußschen Knäuel wird durch enthalpische Wechselwirkung zwischen Monomeren und Lösungsmittelmolekülen kompensiert.

Ebenfalls analog zu obigen Überlegungen kann ein zweikomponentiger Polymerblend in einem Lösungsmittel, das erneut wie ein Monomer behandelt wird, beschrieben werden. Die Flory-Huggins-Relation lautet nun:

$$\Delta G_m = n \cdot k_B \cdot T \cdot \left(\frac{\phi_A}{N_A} \cdot \ln \phi_A + \frac{\phi_B}{N_B} \cdot \ln \phi_B + \frac{\phi_C}{1} \cdot \ln \phi_C \right) + \chi(\phi_A, \phi_B, T) \cdot \phi_A \cdot \phi_B + \chi(\phi_B, \phi_C, T) \cdot \phi_B \cdot \phi_C + \chi(\phi_C, \phi_A, T) \cdot \phi_C \cdot \phi_A. \quad (2.8)$$

Durch Auftragen der Lösungsmittelkonzentration bei einer bestimmten Temperatur über einem der beiden Volumenverhältnisse der Polymere ergibt sich eine Koexistenzlinie, unterhalb derer aufgrund von Domänenbildung mit unterschiedlichem Brechungs-

index Lichtstreuung an den beiden Phasen auftritt, während die Lösung oberhalb dieser Linie klar ist.

Bisher wurde eingehend erläutert wie die Phasenseparation zu Stande kommt, aber nicht in welcher räumlichen oder zeitlichen Größenordnung. Die Cahn-Hilliard-Theorie skizziert indes den räumlichen und zeitlichen Entstehungsmechanismus der Phasenseparation. Im Bereich innerhalb der Spinodalen des Phasendiagramms ist die Polymermischung instabil. Konzentrationsschwankungen, die durch thermische Effekte als homogene Keimbildung oder durch Verunreinigungen als heterogene Keimbildung zu Stande kommen, führen zu einer Absenkung der Freien Enthalpie G , die zu einer weiteren Verstärkung beiträgt, und schließlich zur Phasenseparation.

Durch Erweiterung der Flory-Huggins-Relation um einen zu $(\text{grad } \phi)^2$ proportionalen Term ist eine räumliche und zeitliche Beschreibung des Entmischungsmechanismus möglich. Zu Beginn der Entmischung werden die Konzentrationsschwankungen wie durch die Diffusionsgleichung beschrieben exponentiell verstärkt und ihre charakteristische Wellenlänge durch eine Dispersionsrelation gegeben, welche eine maximale Verstärkung der Fluktuationen für eine Wellenlänge λ_{max} vorhersagt. Diese wachsen zunächst proportional zu $t^{1/5}$ und nahe der Gleichgewichtslage proportional zu $t^{1/3}$. Hydrodynamische Prozesse ermöglichen im Anschluss an die Phasenseparation ein weiteres Domänenwachstum, dessen Geschwindigkeit von der Viskosität abhängt.

2.1.3 Phasenseparation eines Polymerblends unter Oberflächeneinfluss

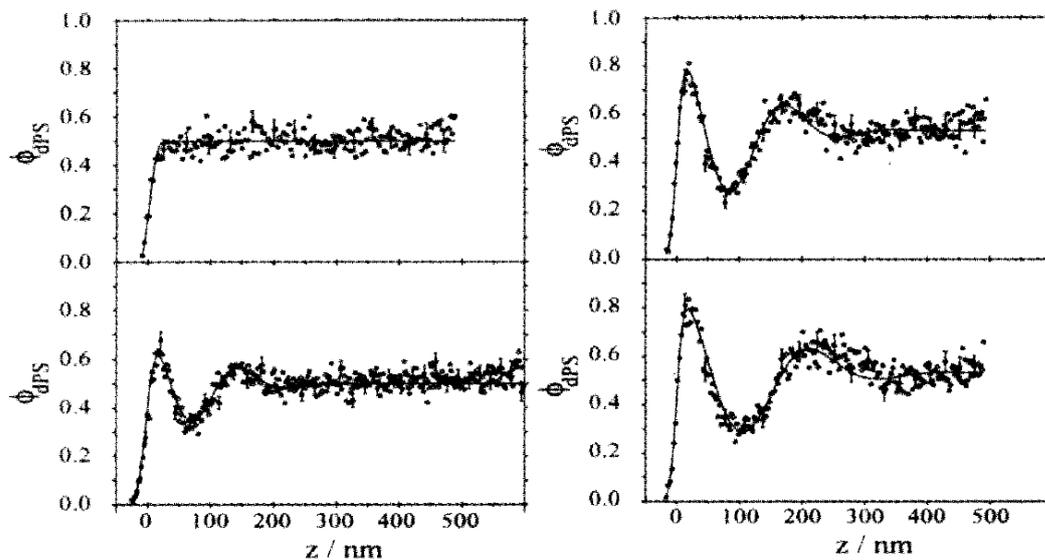


Abbildung 2.5: Schaubilder der räumlichen Konzentrationswellen von deuteriertem Polystyrol (dPS) in einem dünnen Polymerfilm, der als weitere Komponente bromiertes Polystyrol (PBrxS) enthält. Die Zunahme von Wellenlänge und Amplitude der spinodalen Konzentrationswellen kann anhand der Messbilder als Funktion der Zeit verfolgt werden. Die Messungen erfolgten (a) direkt nach dem Aufspinnen, (b) nach 60 min, (c) nach 80 min und (d) nach 120 min. Aus [12].

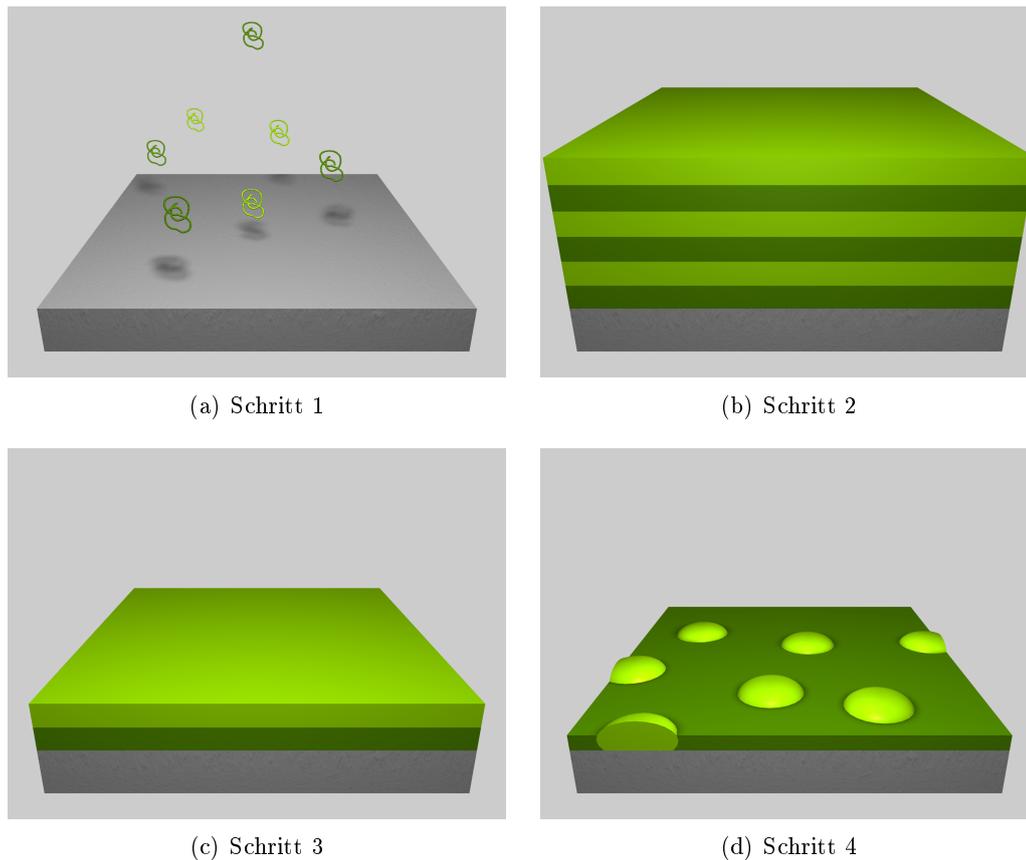


Abbildung 2.6: Schematische Phasenseparation eines Polymerblends unter Oberflächeneinfluss wie sie beispielsweise beim Spincoating eines PS-PMMA-Polymerblends auf Siliziumsubstraten erfolgt. (a) Zunächst wird die Substratoberfläche durch das Lösungsmittel benetzt und es gelangen die ersten Polymermoleküle auf die Oberfläche. (b) Die Adsorption der jeweiligen Polymerkomponente an deren bevorzugte Grenzfläche führt zur Ausbildung spinodaler Konzentrationswellen, was die Bildung vertikal angeordneter, separater Polymerschichten verursacht. (c) Bei weiterer Schichtdickenabnahme bildet sich zunächst ein Zweischichtensystem, (d) bis die spinodalen Konzentrationswellen schließlich unterdrückt werden und sich eine laterale Anordnung der Komponenten ergibt, wobei eine Vielzahl möglicher Morphologien existiert. Die gezeigte Morphologie entspricht der in dieser Arbeit erwünschten Struktur, die bei Entmischung eines speziellen PS-PMMA-Polymerblends und speziellen Umgebungsbedingungen entsteht.

Im letzten Abschnitt wurde die Phasenseparation von Polymerblends für ein dreidimensional-isotropes System unter Vernachlässigung von Oberflächeneinflüssen beschrieben. In Systemen mit Schichtdicken, die wesentlich geringer als die laterale Ausdehnung der Domänenstruktur sind, ist die räumliche Isotropie jedoch gebrochen. Oberflächeneffekte sind nicht länger vernachlässigbar und können als ausgedehnte heterogene Keimbildung angesehen werden [13–16], weil jede Grenzfläche stets eine der beiden Polymerkomponenten bevorzugt. Diese bevorzugte Polymersorte lagert sich nach einem Diffusionsprozess an dieser Grenzfläche an und hinterlässt eine Verarmungszone, wel-

che mit der jeweils anderen Polymersorte aufgefüllt wird. In dieser Verarmungszone diffundieren die Moleküle der bevorzugten Polymersorte wiederum entgegen ihres Konzentrationsgefälles weiter aus diesem Bereich, weil sich das Polymersystem im Phasendiagramm innerhalb der Spinodalen befindet. So entsteht ein weiterer Anreicherungshorizont dieser Komponente. Der Prozess kann auf diese Weise fortgeführt werden, wobei die Amplitude dieser sogenannten spinodalen Konzentrationswellen (Surface-Directed Spinodal Concentration Waves, SDW) räumlich exponentiell abfällt. Ihre charakteristische Wellenlänge h_{SDW} liegt in der Größenordnung der Entmischungswellenlänge λ des Massenpolymerisats und nimmt ebenso wie die Amplitude während der Phasenseparation wie in Abbildung 2.5 gezeigt zeitlich zu. Dünne Polymerfilme besitzen mit dem Ausgangssubstrat und der Umgebungsluft zwei Grenzflächen, an denen jeweils SDWs induziert werden können, was ein interferenzartiges Verhalten zur Folge haben kann. Bei Experimenten mit Filmdicken im Bereich der charakteristischen Entmischungslänge wurde die Bildung von zwei Schichten und bei Filmdicken weit unterhalb dieser Wellenlänge die Unterdrückung der SDW-Bildung festgestellt [16]. Derartige Morphologien werden beim Spincoating-Verfahren mit großer Rotationsgeschwindigkeit nacheinander durchlaufen und sind in Abbildung 2.6 schematisch dargestellt.

Für diese Arbeit wurde eine Polymer-Phasenmorphologie benötigt, bei der in eine Matrix eingebettete Inseln mit einem Durchmesser von bis hinab zu 50 nm auftreten. Dazu wurde eine Mischung der Polymere PS und PMMA mit einem jeweiligen Molekulargewicht von ungefähr 10000 g/mol und einem Mischungsverhältnis von 3:7 verwendet. Als Lösungsmittel diente 2-Butanon, das auch als Methylethylketon (MEK) bezeichnet wird, wobei die Konzentration der Lösung stets bei 15 mg/ml gewählt wurde. Zur besseren Mischung wurde die Lösung für 15 min bei 60 °C im Wärmeschrank gelagert und zur Entfernung nicht gelöster Bestandteile sowie unerwünschter Fremdpartikel abschließend noch mehrmals filtriert.

2.2 Selbstorganisierende Monolagen (SAM)

2.2.1 Struktur und Funktion selbstorganisierender Monolagen

Als selbstorganisierende Monolagen (Self-assembled Monolayers, SAM) werden hochgeordnete Molekülmonolagen bezeichnet, die sich wie in Abbildung 2.7(b) beschrieben durch Physi- oder Chemisorption auf einem idealerweise atomar flachen Ausgangssubstrat bilden. Sie eignen sich zur chemischen Oberflächen-Modifizierung oder als Anker für weitere konstruktive Lithographieschritte und sind deshalb für zahlreiche Anwendungen von großem Interesse [17]. Ihre Präparation auf einem geeigneten Substrat erfolgt über einen Selbstassemblierungsprozess und ist damit vergleichsweise einfach.

SAM-bildende Moleküle bestehen wie in Abbildung 2.7(a) gezeigt aus einer Kopfgruppe, einer Hauptgruppe und einer Endgruppe. Die Kopfgruppe ist für die Bindung des Moleküls an das Substrat verantwortlich. Viele SAMs sind mit einer SH-Gruppe thiolterminiert und binden an Münzmetalloberflächen oder mit einer CH₃-Gruppe methylterminiert, weshalb sie an Siliziumoxid binden. Der Hauptteil des Moleküls wird meist durch eine Alkankette gebildet und bestimmt im Wesentlichen die spätere Schichtdicke des SAM. Die Endgruppe zeigt aufgrund der vertikalen Aufrichtung des Moleküls vom Substrat weg und beeinflusst deshalb entscheidend die chemischen Oberflächeneigen-

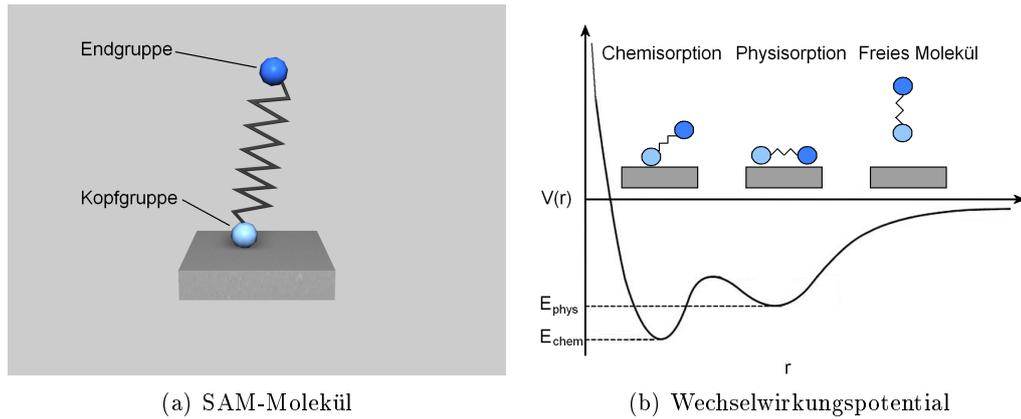


Abbildung 2.7: Schematischer Aufbau und Schaubild des Wechselwirkungspotentials von SAM-Molekülen. (a) Ein SAM-Molekül besteht aus einer Kopf-, einer Haupt- und einer Endgruppe. (b) Die Bindung zwischen SAM-Molekülen und Substrat kann durch Chemi- oder Physisorption erfolgen.

schaften der Monolage wie die Polarität. Durch eine geeignete Wahl der Endgruppe lassen sich somit funktionelle Oberflächen für die biologische Zellforschung oder auch Biosensoren erstellen [18]. Auch als Resist für einen Ätzprozess des darunter liegenden Substrats kann ein SAM dienen [19–21].

2.2.2 Bildung selbstorganisierender Monolagen

SAMs werden in der Regel aus einer Lösung oder aus der Gasphase präpariert. Beim zunächst ablaufenden Wachstumsprozess wird anfangs nur ein kleiner Anteil der SAM-Moleküle adsorbiert. Im Fall von Chemisorption entstehen dabei Reaktionsprodukte. Bei SAMs mit Thiolterminierung adsorbieren die gelösten Moleküle auf der Münzmetalloberfläche, indem das Schwefelatom der Thiolgruppe kovalent an ein Metallatom bindet, während das Wasserstoffatom in Lösung geht. Die Alkankette liegt wegen der Van-der-Waals-Wechselwirkung mit den Substratatomen zunächst flach auf der Oberfläche. Durch die fortschreitende Adsorption weiterer Moleküle lagern sich diese aneinander an, um eine für sie aufgrund der Van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen benachbarten Alkanketten energetisch günstigere Situation zu schaffen. Nach lokaler Überschreitung einer kritischen Belegungsichte richten sie sich auf und bilden eine geordnete Schicht mit einem bestimmten Neigungswinkel zur Oberflächennormalen des Ausgangssubstrats. Diese inselartigen Schichten wachsen im letzten Abschnitt zu einem homogenen SAM zusammen, der die komplette Oberfläche des Ausgangssubstrats bedeckt. Der gesamte Wachstumsprozess ist in Abbildung 2.8 dargestellt. Zur Abschätzung der Wachstumsdauer wird die Belegungsichte Θ herangezogen, die in erster Näherung durch die Langmuir-Adsorption beschrieben wird [17]:

$$\Theta = 1 - \exp(-R \cdot (t - t_c)). \quad (2.9)$$

Der Wachstumsparameter R ist charakteristisch für das betrachtete System und t_c beschreibt ein eventuell verzögertes Einsetzen des Wachstumsprozesses, wobei die Wech-

2.2 Selbstorganisierende Monolagen (SAM)

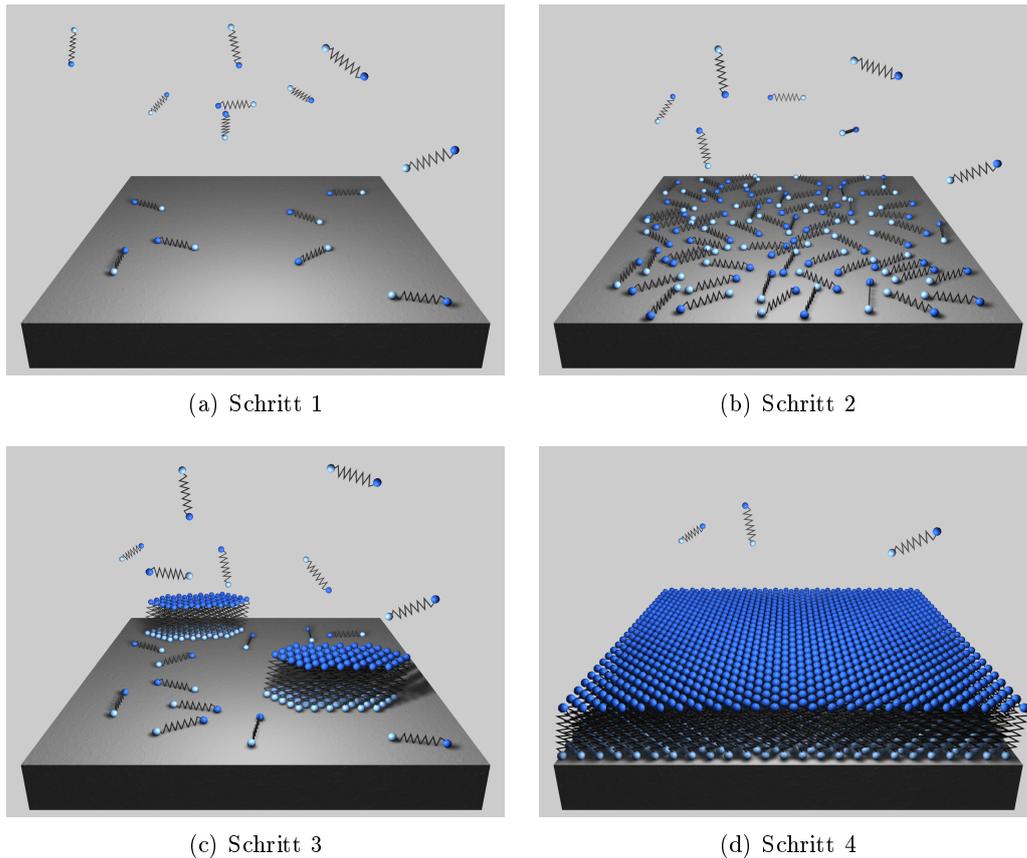


Abbildung 2.8: Schematischer Wachstumsprozess eines SAM. (a) Zunächst adsorbieren die SAM-Moleküle sukzessive auf der Substratoberfläche. (b) Bei geringer Belegungsichte liegen die Moleküle aufgrund von Van-der-Waals-Wechselwirkungen noch flach auf der Oberfläche. (c) Ab einer gewissen Belegungsichte ist es für die SAM-Moleküle energetisch günstiger, sich stellenweise aufzurichten. (d) Durch weitere Zufuhr von Molekülen entsteht auf diese Weise schließlich eine hochgeordnete Monolage.

selwirkung der SAM-Moleküle untereinander nicht berücksichtigt wird. Durch die exponentielle Zunahme der Belegungsichte sind bereits nach einigen Minuten 80 % bis 90 % der Oberfläche bedeckt. Nach dem Wachstumsprozess finden jedoch noch weitere Ordnungs- und Umordnungsprozesse statt, die sich im Bereich von Stunden und Tagen abspielen [22].

In dieser Arbeit wurde das SAM-Molekül 6-Mercapto-1-hexanol (MCH) mit der Strukturformel $\text{HS}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ eingesetzt, welches mit seiner Thiolgruppe kovalent an die verwendeten Münzmetalloberflächen bindet. Die Hydroxy-Gruppe wird zur Oberflächenpassivierung gegenüber anschließend präparierten DNA-Linkern benötigt. Die Herstellung und Verwendung der zugehörigen, sogenannten Blockier-Lösung wird in Kapitel 7.2 erläutert.

2.3 Substratkonsumierende metallorganische Schichten (SCMOL)

2.3.1 Schichtbildende Moleküle

In unserer Arbeitsgruppe wurde entdeckt, dass sich bei der Präparation von Coumarinthiol-Molekülen auf Kupfersubstraten statt der erwarteten Monolagen mehrere 100 nm dicke Schichten ausbildeten. Daran anknüpfende Untersuchungen ergaben, dass in diesem Fall bei komplett ausgewachsenen Schichten Kupfer- und Schwefelatome im festen Verhältnis von 1:1 auftreten und die Korrelationslänge metallenthaltender Bereiche jener Länge entspricht, die ein zum Photodimer verbundenes Monomer des ursprünglichen Coumarinthiolmoleküls annehmen kann [23,24]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein solcher Wachstumsprozess auch auf anderen Metallen und mit anderen Molekülen möglich ist [25]. Eine sogenannte substratkonsumierende metallorganische Schicht (Substrate Consuming Metal Organic Layer, SCMOL) entsteht demnach durch den Einbau von diversen mit Thiolgruppen behafteten, organischen Molekülen in eine ursprünglich wesentlich dünnere Metallschicht und besitzt dabei eine feste Stöchiometrie. Die Zusammensetzung einer solchen Schicht ist in Abbildung 2.9 gezeigt. Die resultierende Schichtdicke ist von der Wachstumsdauer und der Wachstumsgeschwindigkeit abhängig, die wiederum von den verwendeten Materialien, der Temperatur und der Oxidation der Metalle abhängt [25]. Das Wachstum lässt sich über die optische Analyse der jeweiligen Interferenzfarbe leicht kontrollieren [26].

Die bisherige Ansicht der Notwendigkeit von mindestens zwei Thiolgruppen wurde in dieser Arbeit widerlegt, indem das SCMOL-Schichtwachstum auch mit einem Molekül mit nur einer Thiolgruppe demonstriert wurde (siehe Kapitel 7.8).

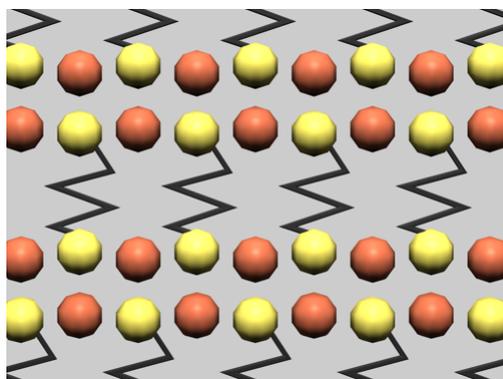
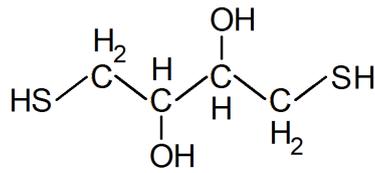


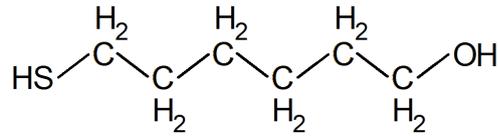
Abbildung 2.9: Schematische Struktur einer mittels Dithiolen gebildeten SCMOL-Schicht. Durch den Einbau von Dithiol-Molekülen erhöht sich der Abstand zwischen zwei Kupferatom-Lagen in Abhängigkeit von der Länge der Alkankette (schwarz) und es kommt zu einer als SCMOL-Wachstum bezeichneten Schichtdickenverstärkung. Die Bindung erfolgt dabei zwischen den Kupferatomen (rot) und den Schwefelatomen (gelb), die aufgrund ihrer dreidimensionalen Ausprägung hier jedoch nicht explizit dargestellt ist.

Zur SCMOL-Bildung auf Kupfer- oder Silberschichten eignen sich aufgrund ihrer beiden Thiolgruppen die Photodimere des Coumarinderivats (CD) 6-Mercaptohexyl Coumarin-3-carboxylat, sowie die Moleküle Diamino-2,6-dimercaptopyrimidin (DDP) und 1,4-Dithioerythritol (DTE) [25]. DTE beispielsweise besteht aus einer vieratomigen Kohlenstoffkette, an deren beiden mittleren Atomen sich jeweils eine Hydroxygruppe und an deren beiden Enden sich die zur SCMOL-Bildung notwendigen Thiolgruppen befinden. Die außerdem vorhandenen Hydroxygruppen sorgen für eine sehr gute Wasserlöslichkeit. DTE besitzt ein Molekulargewicht von 154,35 g/mol und eine Länge von 757 pm, was mittels Dichtefunktionaltheorie ermittelt wurde. Wegen seines niedrigen

2.3 Substratkonsumierende metallorganische Schichten (SCMOL)



(a) 1,4-Dithioerythritol



(b) 6-Mercapto-1-hexanol

Abbildung 2.10: Strukturformeln von 1,4-Dithioerythritol (DTE) und 6-Mercapto-1-hexanol (MCH). DTE besitzt an beiden Enden eine Thiolgruppe, MCH eine Hydroxy- und nur eine Thiolgruppe.

Redoxpotentials von $-0,33\text{ V}$ wird es auch zur Spaltung von Disulfidbindungen eingesetzt [27, 28].

In dieser Arbeit wurde außerdem entdeckt, dass auch 6-Mercapto-1-hexanol (MCH) eine SCMOL bilden kann, obwohl dieses Molekül lediglich eine Thiolgruppe besitzt. MCH umfasst mit seiner sechsatomigen Kohlenstoffkette am gegenüberliegenden Ende noch eine Hydroxygruppe und weist ein Molekulargewicht von $134,24\text{ g/mol}$ auf.

Die Strukturformeln von DTE und MCH sind in Abbildung 2.10 dargestellt.

2.3.2 Mechanismus des Schichtwachstums

Beim Wachstumsprozess einer SCMOL entsteht zunächst eine dünne metallorganische Schicht durch Bindung der in Lösung vorliegenden SCMOL-bildenden Moleküle an die Metalloberfläche mittels ihrer Thiolgruppen. Durch die bereits entstandene Schicht diffundieren weitere Moleküle und bilden gemeinsam mit den Atomen der dünner werdenden Metallschicht eine weitere Lage, die die bereits entstandene Schicht weiter nach oben schiebt. Das Schichtwachstum endet nach der vollständigen Aufzehrung der zuvor vorhandenen Metallschicht oder nach vorzeitiger Entnahme der Schicht aus der Lösung. Mit einem solchen Wachstumsmechanismus sind zahlreiche Varianten von Bottom-Up-Lithographie-Methoden denkbar [24–26].

Die Tatsache, dass nach der Ausbildung einer anfänglichen Monolage das weitere Wachstum durch die Diffusion der organischen Moleküle an die Unterseite des SCMOL und nicht durch den Transport von Metallatomen an dessen Oberfläche von statten geht, wurde unter Verwendung einer speziellen Metallschicht nachgewiesen. Als Ausgangssubstrat wurde eine 10 nm dicke Kupferschicht verwendet, die sich über einer 10 nm dicken Silberschicht befand. Nach der Immersion in die SCMOL-Lösung zeigten Messungen mit Energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX), dass sich die Kupfer-SCMOL über der Silber-SCMOL befand und die Reihenfolge der Metalle somit eingehalten wurde [25]. Folglich muss das SCMOL-Wachstum an der Grenzfläche zwischen entstehender SCMOL und Metallschicht stattfinden. Der Wachstumsvorgang ist in Abbildung 2.11 schematisch dargestellt.

Die Schicht, die nach Zugabe von α - ω -Dithiolen entsteht, gleicht der Struktur eines Dithiolats, bei dem beide Thiolgruppen mit jeweils einem Metallatom verbunden sind und sich zwischen den Metallebenen immer ein organisches Molekül befindet [29]. Bei Zugabe von Thiolen mit nur einem Schwefelatom bildet sich dagegen ein Thiolat aus,

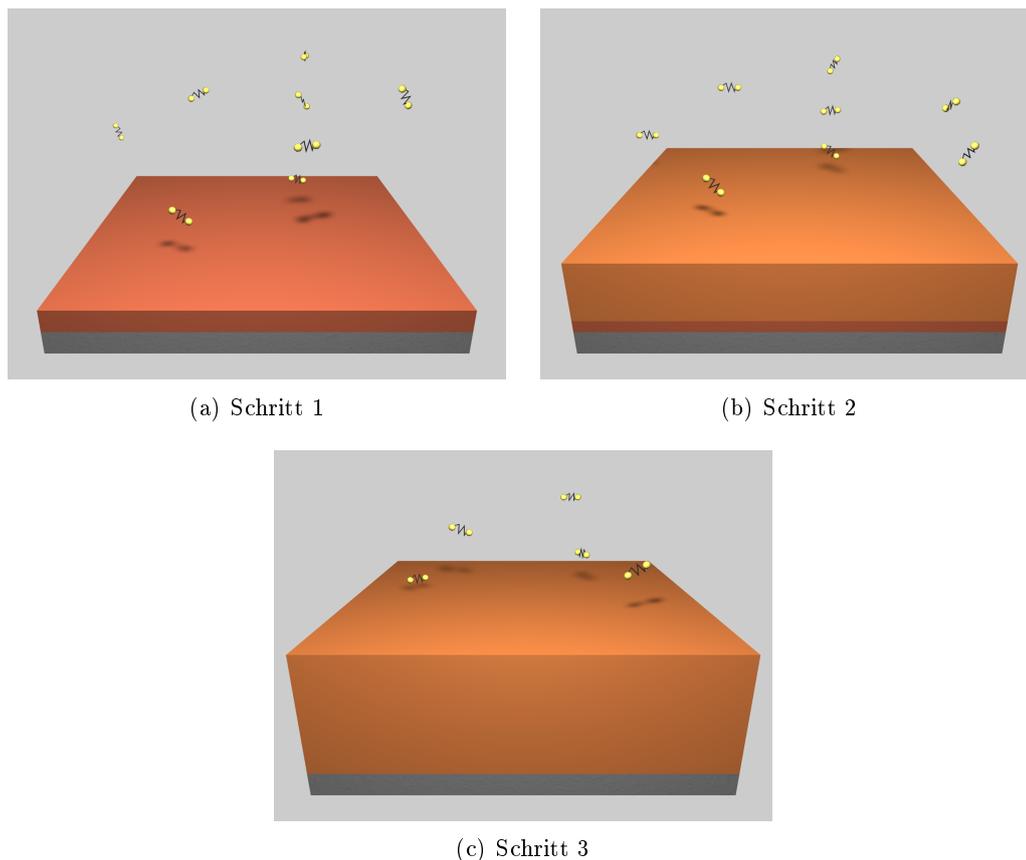


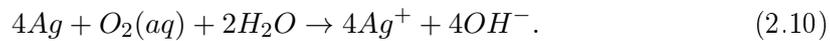
Abbildung 2.11: Schematischer Mechanismus des SCMOL-Schichtwachstums. (a) Zunächst gelangen erste in Lösung befindliche SCMOL-bildende Moleküle an die Oberfläche und reagieren mit den Atomen der rötlich dargestellten Kupferschicht. (b) Die dabei entstehende, orange dargestellte, noch dünne SCMOL-Schicht wird von weiteren Molekülen durchdrungen und das Schichtwachstum auf der Kupferoberfläche fortgesetzt. (c) Das Schichtwachstum endet nach dem kompletten Verbrauch der Kupferschicht.

bei dem sich zwischen den Metallebenen jeweils zwei Thiolmoleküle befinden, deren Alkankettenenden über Van-der-Waals-Wechselwirkungen miteinander verzahnt und die an ihrem anderen Ende mit den Metallatomen verbunden sind [30–34].

Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Wachstumsgeschwindigkeit eines SCMOL neben dem verwendeten Ausgangssubstrat auch in großem Maße von der Umgebungstemperatur abhängig ist. So ergab sich für DTE, das mit einer Konzentration von 3,48 mmol/l in bidestilliertem Wasser gelöst war, bei einer Temperatur von 60 °C eine etwa doppelt so große Wachstumsgeschwindigkeit als bei Raumtemperatur. Außerdem ging das Wachstum mit Kupfer- schneller als mit Silberschichten von statten. Bei einigen SCMOL-bildenden Molekülen kann sich jedoch bei höherer Temperatur die Oberflächenrauigkeit der Schicht verschlechtern [25].

Da die SCMOL-Bildung auf anderen Münzmetalloberflächen wie Gold ausbleibt, lag die Vermutung nahe, dass die Oxidationseigenschaften der Metalle ebenfalls eine Rolle spielen. Dazu wurde ein elektrochemischer Aufbau verwendet, bei dem ein Golddraht

als Kathode und die mit der zu untersuchenden Metallschicht beschichtete Probe als Anode fungierte. Die Lösung umfasste DTE-Moleküle und Kochsalz NaCl als Elektrolyt. Durch Anlegen einer Gleichspannung von 1 V wurde das SCMOL-Wachstum des DTE auf Kupfer um den Faktor 28, auf Silber um den Faktor 34 gesteigert. Dies kann im Fall von Silber mittels folgender Reaktionsgleichung begründet werden:



Die Metallschicht wird demnach durch die positive Spannung stärker oxidiert und der Wachstumsprozess dadurch beschleunigt. Die Metalloxidation scheint demnach eine Grundvoraussetzung für das SCMOL-Wachstum zu sein [25].

Für das SCMOL-Wachstum wurden im Rahmen dieser Arbeit Lösungen des schichtbildenden Moleküls DTE verwendet, wobei die Konzentration in bidestilliertem Wasser bei 3,3 mmol/l lag und die Lösung stets unmittelbar vor ihrer Benutzung hergestellt wurde. Die Immersion der mit einer Metallschicht versehenen Proben wurde bei 60 °C in einem Wärmeschrank durchgeführt, um das Schichtwachstum zu beschleunigen. Nach einer für die gewünschte Schichtdicke charakteristischen Zeit wurden die Proben wieder entnommen und unter destilliertem Wasser abgespült. Nach Entdeckung der Möglichkeit des Schichtwachstums mit MCH wurde der exakt gleiche Prozess auch mit diesem Molekül durchgeführt, wobei hier als Konzentration 1 mmol/l gewählt wurde.

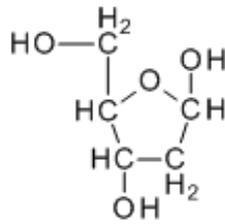
2.4 DNA-Einzelstränge

2.4.1 Struktur und Funktion von DNA und RNA

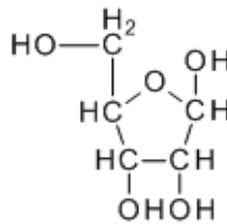
Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid, DNA) und Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid, RNA) sind in den Zellen aller Lebewesen und auch in Viren vorkommende Makromoleküle. Bei Eukaryoten, zu denen Tiere, Pflanzen und Pilze gehören, liegt ein Großteil der DNA im Zellkern in Form von Chromosomen vor. Bei Prokaryoten, die sich von den Eukaryoten durch ihren fehlenden Zellkern abgrenzen lassen und zu denen beispielsweise Bakterien zählen, befindet sich die DNA im Cytoplasma. Viren, die nach gängiger Ansicht nicht zu den Lebewesen zählen, besitzen je nach Art DNA oder lediglich RNA [35].

Die Grundbausteine der allgemein als Nukleinsäuren bezeichneten DNA und RNA sind die sogenannten Nukleotide, bei denen es sich um Verbindungen mit einem Phosphat-, einem Zucker- und einem Basenbestandteil handelt. Die Strukturformeln der einzelnen Bestandteile sind in Abbildung 2.12 dargestellt, die Strukturformeln eines exemplarischen Nukleotids und eines exemplarischen Oligonukleotids in Abbildung 2.13. Beim Zucker handelt es sich um ein Monosaccharid, das fünf Kohlenstoffatome enthält und deshalb als Pentose bezeichnet wird. Die Kohlenstoffatome werden zur einfacheren Beschreibung durchnummeriert und mit der jeweiligen Zahl und einem Hochstrich versehen. Im engeren Sinn handelt es sich bei diesem Zucker immer um entweder eine Ribose oder eine Desoxyribose. Diese unterscheiden sich nur darin, ob sich am 2'-Kohlenstoffatom eine OH-Gruppe oder eine H-Gruppe befindet. Bei den Nukleotidbasen handelt es sich um insgesamt fünf verschiedene stickstoffhaltige Ringverbindungen. Dazu zählen die Pyrimidin-Derivate Cytosin (C), Thymin (T) und Uracil (U), sowie die

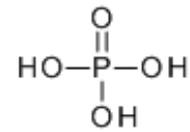
2 Grundlagen des Probensystems



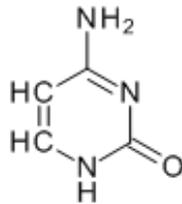
(a) Desoxyribose



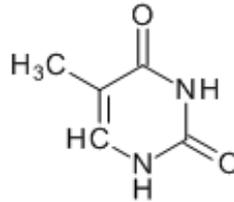
(b) Ribose



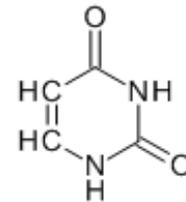
(c) Phosphorsäure



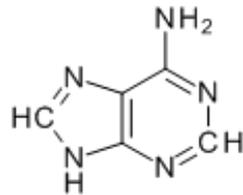
(d) Cytosin



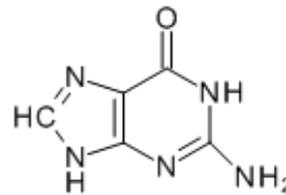
(e) Thymin



(f) Uracil



(g) Adenin



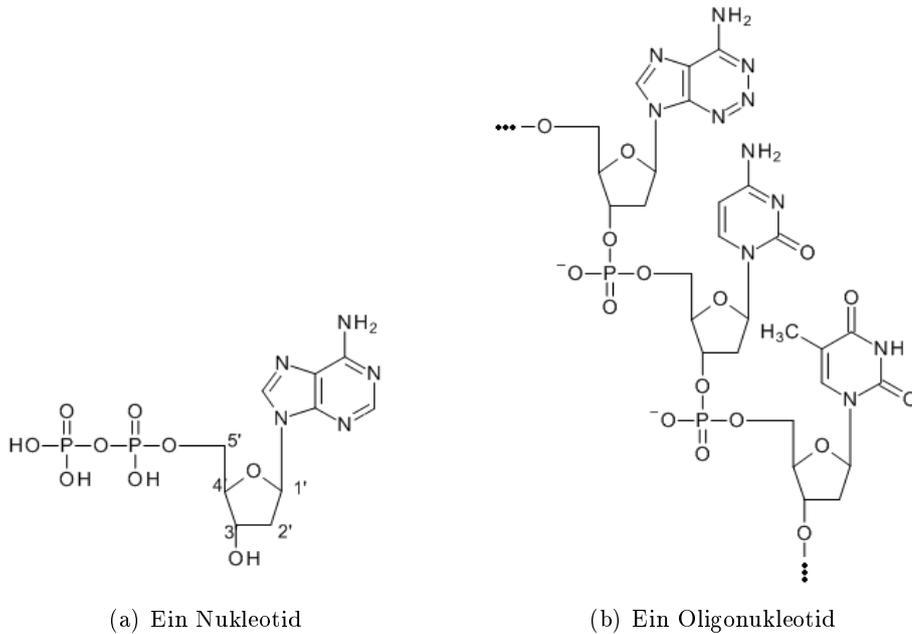
(h) Guanin

Abbildung 2.12: Strukturformeln der Nucleotid-Bestandteile. Ein Nucleotid besitzt (a)-(b) einen Zucker-, (c) einen Phosphat- und (d)-(h) einen Basenbestandteil.

Purin-Derivate Adenin (A) und Guanin (G). Dabei sind Pyrimidine aus einem sechsatomigen Ring aus Kohlenstoff und Stickstoff aufgebaut, während Purine aus einer Kombination eines sechs- und eines fünfatomigen Rings bestehen, die ebenfalls beide aus Kohlenstoff und Stickstoff bestehen. Die Basen sind über eine glykosidische Bindung an das 1'-Kohlenstoffatom des Zuckers gebunden. Die Phosphorsäure H_3PO_4 ist über eine Esterbindung an das 5'-Kohlenstoffatom des Zuckers gebunden. Potentiell weitere Phosphorsäuremoleküle sind über Anhydridbindungen verknüpft.

Die Nucleotide lassen sich aufgrund der erwähnten möglichen Basen in fünf verschiedene Grundtypen differenzieren. Handelt es sich beispielsweise um eine Adenin-Basis, so wird das gesamte Molekül je nach Anzahl der Phosphatgruppen und der Ausprägung des Zuckermoleküls als (Desoxy-) Adenosinmono-/di-/triphosphat bezeichnet.

Die Bindung der Nucleotide untereinander entsteht durch eine Phosphodiesterbindung zwischen der Phosphatgruppe am 5'-Ende und der Hydroxygruppe am 3'-Ende des Zuckers und läuft im Rahmen einer Kondensationsreaktion ab. Die so entstandenen Makromoleküle heißen Desoxyribonucleinsäure bzw. DNA, wenn sie aus Nucleotiden



(a) Ein Nukleotid

(b) Ein Oligonukleotid

Abbildung 2.13: Strukturformeln von exemplarischen Nukleotiden und Oligonukleotiden, deren Bindung stets über eine Phosphodiesterbindung zwischen der Phosphatgruppe am 5'-Ende und der Hydroxygruppe am 3'-Ende des Zuckers erfolgt. Bei dem Nukleotid handelt es sich um Desoxyadenosindiphosphat.

mit Desoxyribosen bestehen, oder Ribonukleinsäure bzw. RNA, wenn sie aus Nukleotiden mit Ribosen aufgebaut sind. DNA-Moleküle enthalten die Basen A, G, C und T, RNA-Moleküle die Basen A, G, C und U. Während die RNA als Einzelstrang vorliegt, ist die DNA im Allgemeinen als Doppelhelix ausgebildet. Das bedeutet, dass sich zwei Einzelstränge über Wasserstoffbrücken zwischen den Basen A und T, sowie G und C gebildet haben.

Die Funktion der DNA liegt in der Speicherung der Erbinformation, da mit ihrer Hilfe die RNA hergestellt wird, in deren Basensequenz wiederum der Bauplan zur Proteinsynthese codiert ist. Bei manchen Virenarten wie beispielsweise dem in dieser Arbeit verwendeten Tabakmosaikvirus existieren keine DNA-Moleküle, weshalb die Gene direkt in der RNA verankert sind. Ebenso wie DNA und RNA sind Proteine lange Kettenmoleküle, die allerdings nicht aus Nukleotiden, die durch ihre Basen charakterisiert sind, sondern aus Aminosäuren bestehen. Dies ist eine Klasse organischer Verbindungen mit mindestens einer Carboxy- und einer Aminogruppe. Die Zuordnung des genetischen Codes der RNA zu der Vielzahl verschiedener Proteine erfolgt über eine feste Zuordnung von jeweils drei Basen des RNA-Strangs zu jeweils einer der 20 in lebenden Organismen vorkommenden Aminosäuren. Die auf diese Weise erzeugten Proteine sind für den Zellhaushalt verantwortlich und steuern letztlich die biologische Entwicklung des gesamten Organismus.

2.4.2 Struktur und Funktion von DNA-Linkern

Bei DNA-Linkern handelt es sich um Oligonukleotide, also um kurze, einsträngige DNA-Sequenzen, die sich aus einer geringen Anzahl an Nukleotiden und einer Endgruppe zusammensetzen, weshalb sie sowohl Bindungen zu einer komplementären DNA-Sequenz als auch zu einem passend gewählten Ausgangssubstrat eingehen können. Ihre Herstellung erfolgt entweder über eine chemische DNA-Synthese [36] oder aber durch die Anwendung von Enzymen, die DNA-Sequenzen an vorbestimmten Stellen schneiden können und als Restriktionsendonukleasen bezeichnet werden.

5' - HS - ttt ttt ttt ttt ttt gca cca cgt gtg att acg gac aca atc cg - 3'

(a) DNA-Linker FEB-HS-6245

5' - HS - ttt ttt ttt ttt ttt cgg att gtg tcc gta atc aca cgt ggt gc - 3'

(b) DNA-Linker FEB-HS-c6245

Abbildung 2.14: Schematischer Aufbau der verwendeten DNA-Linker. Neben der Thiolgruppe bestehen diese aus einer Abfolge von Nukleotiden, die in ihrer biologischen Funktionalität und deshalb auch in ihrer Schreibweise durch ihren Basenanteil charakterisiert sind. Da Adenin (a) an Thymin (t) und Cytosin (c) an Guanin (g) bindet, sind die beiden gezeigten Linker zueinander abschnittsweise komplementär.

In dieser Arbeit wurden die DNA-Linker neben der Anbindung von Tabakmosaikviren hauptsächlich zur ortsselektiven Fixierung von Goldkolloiden auf dem jeweilig verwendeten Ausgangssubstrat benötigt. Dies geschieht zum einen über die einseitige Bindung an die Substratoberfläche beziehungsweise an die Goldkolloide mittels ihrer Endgruppe und zum anderen durch ihren Einsatz als Primer, also als Ausgangspunkt einer DNA-Replikation. Die beiden eingesetzten Linker weisen daher eine aus 44 Nukleotiden aufgebaute Basensequenz auf, die zu einem Abschnitt der Basenabfolge der Tabakmosaikviren-RNA komplementär beziehungsweise identisch ist und deshalb nicht nur gegenseitig, sondern auch an die RNA dieser Viren binden können.

Zur Bindung an Goldoberflächen wurde der thiolterminierte Linker FEB-HS-6245, zur Bindung an Goldkolloide der ebenfalls thiolterminierte, aber abschnittsweise komplementäre Linker FEB-HS-c6245 der Firma Biomers (Ulm) verwendet. Der Aufbau beider DNA-Linker ist in Abbildung 2.14 schematisch dargestellt. Die Herstellung der notwendigen Lösungen sowie die Präparation der Oligonukleotide sind aufgrund ihrer Komplexität in Kapitel 7.2 beschrieben.

2.5 Tabakmosaikviren (TMV)

2.5.1 Grundbegriffe der Virologie

Viren sind für Eukaryoten wie Prokaryoten infektiöse Partikel, die sich zwar extrazellulär verbreiten, aber nur intrazellulär vermehren können. Sie besitzen ein Programm zu

ihrer Vermehrung und Ausbreitung, bestehen aber selbst nicht aus einer Zelle und besitzen demnach unter anderem kein Cytoplasma, das ein Medium für Stoffwechselforgänge darstellen könnte. Daher sind keine Proteinsynthese, Energieumwandlung und Selbstreplikation möglich, weshalb Viren auf den Stoffwechsel einer Wirtszelle angewiesen sind. Aus diesem Grund werden sie im Allgemeinen nicht als Lebewesen angesehen.

Viren treten in zwei Erscheinungsformen auf. Ein außerhalb einer Wirtszelle existentes Virus wird als Virion bezeichnet. Es umfasst stets Nukleinsäuren in Form von DNA oder RNA und neben weiteren möglichen Bestandteilen in einigen Fällen auch eine Proteinhülle oder eine von Proteinen durchsetzte Lipiddoppelschicht. Innerhalb der Wirtszelle liegt das Virus lediglich in Form einer Nukleinsäure vor, welche die Informationen zur Replikation und zur Reproduktion neuer Virionen enthält, die zur Verbreitung des Virus aus den Wirtszellen ausgeschleust werden. Im Wesentlichen ist ein Virus also eine Nukleinsäure, auf der die Informationen zur Steuerung des Stoffwechsels einer Wirtszelle codiert sind, die insbesondere der eigenen Replikation sowie der weiteren Ausstattung der zu bildenden Virionen dient.

2.5.2 Tabakmosaikviren als Nano-Bausteine definierter Dimension mit chemisch modifizierbarer Oberfläche

Das Tabakmosaikvirus (TMV) bildet wie in Abbildung 2.15 gezeigt hohlzylindrische Virionen mit einer Länge von etwa 300 nm und einem Durchmesser von 18 nm. Die RNA umfasst etwa 6400 Nukleotide und ist von etwa 2100 identischen Hüllproteinen umgeben. Das TMV infiziert ausschließlich Pflanzen, insbesondere die Tabakpflanze mit der namensgebenden Tabakmosaikkrankheit. In diesem Zusammenhang erlangte es historische Bedeutung, weil in diesem Fall erstmals eine Krankheitsübertragung durch Bakterien, die wesentlich größer sind, ausgeschlossen werden konnte.

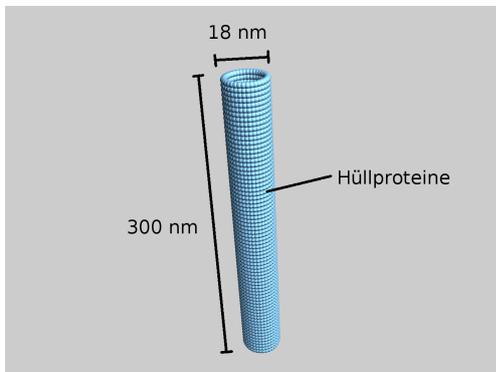


Abbildung 2.15: Schematischer Aufbau des Tabakmosaikvirus. Mit seinen 6400 Nukleotiden und 2100 identischen Hüllproteinen besitzt das Virion eine wohldefinierte Gestalt von 300 nm Länge und 18 nm Durchmesser und eignet sich damit und aufgrund der zusätzlichen Möglichkeit der Oberflächenmodifizierung für den Einsatz als Nano-Baustein. In dieser Arbeit wurden nicht-infektiöse TMV-Derivate mit verkürzter Länge eingesetzt.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Viren sind durch Mutagenese des ursprünglichen TMV entstanden und deshalb nicht infektiös. Diese TMV-Derivate wiesen eine verkürzte Länge von 135 nm sowie den üblichen Durchmesser von 18 nm auf.

Derzeit werden mit solchen Nano-Bausteinen variabler, wohldefinierter Längen und verschiedenartiger chemischer Oberflächeneigenschaften Nanobürsten und dreidimensional verzweigte Röhrengerüste entwickelt, die Grundlage für zukünftige robuste, bioaktive Nano-Hybridssysteme sein könnten. In dieser Arbeit wurde ein Verfahren entwickelt, um Tabakmosaikviren innerhalb von nanoskaligen, maßgeschneiderten Lochstrukturen

2 Grundlagen des Probensystems

einseitig anzubinden und anschließend senkrecht aufzurichten. Solche aufrecht stehenden TMV wären bei zusätzlicher Funktionalisierung ihrer Oberfläche für Anwendungen in der Sensorik geeignet. Im Vergleich zu direkt am Substrat gebundenen Funktionsträgern wäre deren Zugänglichkeit erhöht, der sterische Einfluss stark vermindert und vor allem deren Funktionalität aufgrund konformativer Freiheit maximiert. Als Funktionsträger wären beispielsweise Enzyme oder Integrine denkbar, die für die Verbindung von Zellen mit anderen Zellen und mit der Extrazellulären Matrix verantwortlich sind.

Die Assemblierung der TMV-Derivate aus zugehöriger RNA und gereinigtem Protein wurde von Herrn Fabian Eber am Biologischen Institut der Universität Stuttgart durchgeführt und ist in Kapitel 7.2 beschrieben [37].

3 Präparative Methoden

Zur ortsselektiven Anbindung und vertikalen Aufrichtung von Tabakmosaikviren als Trägersystem für sterisch ideal zugängliche Nano-Sonden mit hoher Nachweisempfindlichkeit wurden eine Vielzahl aufwändiger Präparationstechniken eingesetzt, die sich hauptsächlich zur Vorstrukturierung des Substrats mittels der in Kapitel 7.2 vorgestellten Polymerblend-Lithographie herangezogen wurden. Das Spincoating-Verfahren wurde zur Herstellung einer lateralen Polymermorphologie verwendet, die nach Behandlung mit einem selektiven Lösungsmittel als Maske für einen Aufdampfprozess diente, bei dem Gold-, Silber- und Kupferschichten mit Dicken in der Größenordnung von 10 nm erzeugt wurden. Das Snowjet-Verfahren wurde sowohl zur abschließenden Entfernung der zweiten Polymerkomponente, als auch zur Reinigung der verwendeten Siliziumsubstrate zu Beginn des Strukturierungsprozesses eingesetzt. Die Plasma-Modifizierung wurde zur Reinigung von Goldoberflächen vor Anwendung der ebenfalls in Kapitel 7.2 beschriebenen DNA-Linker-Präparation eingesetzt. Bei allen weiteren Prozessschritten von DNA-Linker- und DNA-Goldkolloid-Präparation kamen Methoden wie beispielsweise Zentrifugieren zum Einsatz, deren Funktionsweise keiner weiteren Erläuterung bedarf.

3.1 Substrat-Herstellung

Als Ausgangssubstrate wurden stets etwa 1 cm x 1 cm große quadratische Stücke von polierten, einkristallinen Siliziumwafern der Firma Siltronic (Burghausen) mit einem Durchmesser von 150 mm und einer Dicke von $750 \pm 250 \mu\text{m}$ verwendet. Unter Ausnutzung der mit der [110]-Orientierung einhergehenden orthogonalen Oberflächensymmetrie der Wafer wurden diese Proben über Anreißen mit einem Diamantstift parallel zu einer der Kristallachsen und Brechen über einer scharfen Kante hergestellt. Die Siliziumoberfläche weist durch den Einfluss des Luftsauerstoffs stets eine stabile, passivierende Siliziumoxidschicht auf, deren Dicke im Bereich von 1 nm bis 2,5 nm liegt [38–40]. Polierkratzer spielten ebenso wenig eine Rolle wie Dotierung und Leitfähigkeit und wurden nicht berücksichtigt. Die Siliziumoberflächen mussten allerdings vor dem ersten Präparationsschritt gereinigt werden.

3.2 Snowjet-Verfahren

Die Reinigungswirkung des zerstörungs- und rückstandsfreien Snowjet-Verfahrens basiert auf der Wechselwirkung eines CO_2 -Trockeneiskristallstrahls mit Partikeln verschiedener Größen und organischen Verunreinigungen auf einer Substratoberfläche. Das Kohlenstoffdioxid wird dazu bei einem Druck von 58,5 bar aus der Gasflasche entnommen und wie in Abbildung 3.1 dargestellt durch eine enge Düse mit einem Durchmesser von

3 Präparative Methoden

ca. 1 mm auf die zu reinigende Probe gerichtet. Durch den raschen Druck- und Temperaturabfall aufgrund der schnellen Expansion des Gases bilden sich im Strahl Trockeneiskristalle aus. Es ergibt sich also ein Strahl aus CO_2 -Schnee, weshalb die gesamte Apparatur als Snowjet bezeichnet wird.

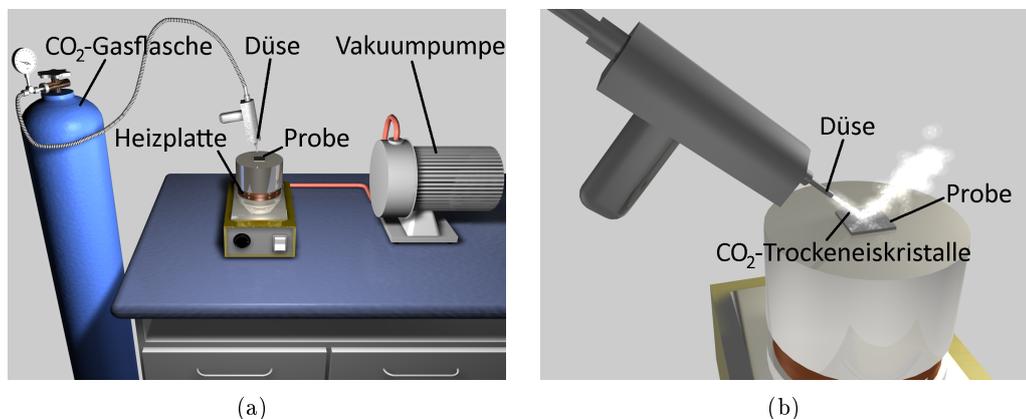


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung (a) des apparativen Aufbaus und (b) des Funktionsprinzips des Snowjets. Der CO_2 -Strahl wird über eine Düse aus einer Gasflasche entnommen, die Probe befindet sich zur Verhinderung von Vereisung und Kondenswasserbildung auf einem mit einer Heizplatte im thermischen Kontakt befindlichen Aluminiumzylinder, über dessen mittige Bohrung die Probe mittels einer Vakuumpumpe fixiert wird. Schmutzpartikel werden ihrer Größe entsprechend entweder durch ihren aerodynamischen Widerstand oder durch Impulsübertrag von der Probenoberfläche, organische Verunreinigungen durch ihre Löslichkeit in flüssigem Kohlenstoffdioxid entfernt.

Partikel ab einer Größenordnung von Mikrometern werden vom Gasstrahl aufgrund ihres aerodynamischen Widerstands von der Oberfläche entfernt. Bei Partikel mit noch geringeren Ausmaßen wird die den Luftwiderstand kompensierende Oberflächenhaftung durch den Impulsübertrag bei der Kollision mit den Schneekristallen überwunden, weshalb diese anschließend vom Gasstrahl entfernt werden. An der Probe adsorbierte organische Verunreinigungen werden durch ihre Löslichkeit in flüssigem Kohlenstoffdioxid entfernt, das beim Auftreffen der CO_2 -Trockeneiskristalle auf der Oberfläche durch die beim Aufprall ablaufende Umwandlung der kinetischen Energie in Wärme kurzzeitig entsteht. In der flüssigen Phase des Kohlenstoffdioxids werden die organischen Verunreinigungen gelöst und beim erneuten Erstarren der CO_2 -Tröpfchen in diesen eingeschlossen und mit dem Gasstrahl von der Oberfläche entfernt [41, 42].

Zur Verhinderung der Vereisung und Kondenswasserbildung wird die Probe während der Reinigung auf einem Aluminiumzylinder platziert, der von einer Heizplatte auf $80\text{ }^\circ\text{C}$ bis $100\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt wird. Dadurch ist das Snowjet-Verfahren auf die Reinigung thermisch gut leitfähiger Proben begrenzt, was bei Siliziumwafern gegeben ist. Um das Wegblasen der gesamten Probe zu vermeiden, wird sie auf einer Bohrung im Aluminiumzylinder positioniert, in dessen Innenraum mit einer Vakuumpumpe ein Unterdruck erzeugt wird.

Die Prozessführung beim Snowjet-Verfahren gestaltet sich folgendermaßen. Nach der Aufheizung des Aluminiumzylinders wird die Probe mit der Pinzette auf dessen Bohrung platziert und die Vakuumpumpe eingeschaltet, so dass sich sofort der benötigte

Unterdruck einstellt. Nach Öffnen des Gasflaschenventils wird die Düse im Idealfall gerade so dicht über die Probe geführt, dass deren Oberfläche nicht sichtbar vereist. Der ideale Abstand hängt von der Wärmeleitfähigkeit der jeweiligen Probe sowie der Temperatur der Heizplatte ab und liegt im Bereich von 1 cm. Zur gleichmäßigen Reinigung der Probe wird der Snowjet in einem Raster über diese hinweg bewegt, wobei sein Einfall nicht genau senkrecht von oben sein sollte, damit der mit Verunreinigungen versehene reflektierte Strahl die Probenoberfläche in einer anderen Richtung verlässt.

Das Snowjet-Verfahren wurde sowohl zur Entfernung von Polymerstrukturen, als auch zur Reinigung von Siliziumsubstraten eingesetzt.

3.3 Spincoating-Verfahren

3.3.1 Funktionsprinzip des Spincoating-Verfahrens

Mit dem auch kommerziell in der Halbleiterindustrie angewendeten Spincoating-Verfahren lassen sich innerhalb weniger Sekunden dünne Polymerfilme auf glatten Substratoberflächen erzeugen. Dies geschieht durch die mittige Benetzung des Substrats mit der entsprechenden Polymerlösung, welches mit Hilfe eines Unterdrucks auf einem drehbaren Teller fixiert ist, der als Chuck bezeichnet wird. Bei der anschließenden schnellen Rotation wird die Polymerlösung aufgrund der Zentrifugalkraft radial nach außen katapultiert, wobei das Lösungsmittel verdunstet und die Polymere sich zu einem gleichmäßigen, glatten Film formieren. Das verwendete Lösungsmittel sollte das Substrat gut benetzen, da es sonst samt Polymeren weggeschleudert wird, was sonst nur bei überschüssiger Lösung der Fall ist. Der Vorgang wird in Abbildung 3.2 gezeigt.

Die Schichtdicke verringert sich während des Spincoating-Prozesses aufgrund der Lösungsmittelverdunstung in signifikanter Weise. Die resultierende Schichtdicke d ist abhängig von der Rotationsfrequenz ω , der Viskosität η der Lösung und der Polymerkonzentration c_0 [43]:

$$d(c_0, \eta, \omega) = c_0 \cdot \eta^{1/3} \cdot \omega^{-(1/2)}. \quad (3.1)$$

Es ist möglich, Polymerfilme mit Schichtdicken von einigen Mikrometern bis hinab zu einigen Ångström herzustellen [44]. Ihre Oberflächenrauigkeit lässt sich durch die Verwendung gut benetzender, hochsiedender Lösungsmittel auf wenige Ångström reduzieren [11].

Die theoretische Beschreibung der beim Spincoating-Verfahren entstehenden Phasenmorphologie gestaltet sich schwierig. Dies liegt nicht nur an ihrer Beeinflussung durch zahlreiche äußere Faktoren, sondern auch durch ihr Erstarren in einem metastabilen Zustand. Aufgrund der hohen Geschwindigkeit des Vorgangs entstehen beim Durchlaufen der verschiedenen Konzentrationsbereiche des verdunstenden Lösungsmittels unterschiedliche Morphologien, die nicht denen des jeweiligen thermodynamischen Gleichgewichts entsprechen. Zudem wird die Diffusion der Polymere durch die bei hohen Verdampfungsraten übliche Verdampfungskälte des Lösungsmittels zusätzlich behindert. Der letztendlich entstandene Polymerfilm befindet sich demnach in einem eingefrorenen, metastabilen Zustand, in dem eine Relaxation in die Gleichgewichtslage durch die stark eingeschränkte Diffusion nicht möglich ist. Dies kann lediglich nachträglich durch

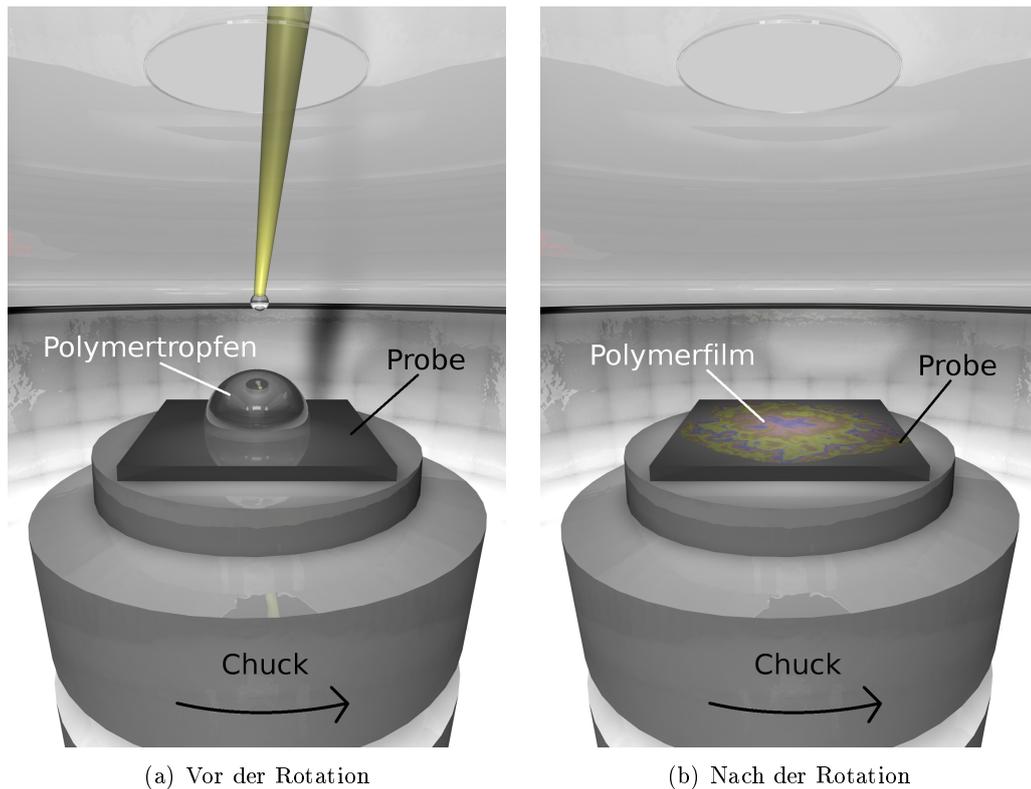


Abbildung 3.2: Schematisches Funktionsprinzip des Spincoaters. Das zu beschichtende Ausgangssubstrat wird durch einen Unterdruck auf dem drehbaren Chuck fixiert. (a) Nach Aufpipettieren des die Polymerelemente enthaltenden Lösungsmitteltropfens wird der Chuck für wenige Sekunden in schnelle Rotation versetzt (in Pfeilrichtung), (b) wodurch ein dünner Polymerfilm an der Substratoberfläche entsteht.

Thermal Annealing, bei dem der Polymerfilm auf eine Temperatur oberhalb der entsprechenden Glasübergangstemperaturen erwärmt wird, oder durch Vapour Annealing ermöglicht werden, wo die Polymerschicht in eine Lösungsmittelatmosphäre eingebracht wird. Wie bereits angedeutet, ist die entstehende Morphologie bei einem bestimmten Polymerblend von vielen äußeren Parametern abhängig. Dazu gehört neben den vergleichsweise einfach einstellbaren Molekulargewichten, dem Massenverhältnis, der Lösungsmittelkonzentration und der Rotationsgeschwindigkeit auch die relative Luftfeuchtigkeit der Probenumgebung. Dabei sind verschiedene Mechanismen der Einflussnahme auf die Schichtbildung denkbar. Dies kann beispielsweise durch die mit der Luftfeuchtigkeit variierende Polarität der Luftgrenzschicht zu Stande kommen. Es kann aber auch einfach zu einer Ablagerung von Wassertröpfchen auf dem Substrat kommen, die sich als Lochstruktur in der entstandenen Morphologie bemerkbar machen. Um die relative Luftfeuchtigkeit kontrollieren zu können, wurde die verwendete Spincoating-Apparatur um eine spezielle Vorrichtung erweitert, die eine beliebige Mischung eines Stroms trockenen und eines mit Wasserdampf gesättigten Stickstoffs erlaubt.

3.3.2 Apparativer Aufbau und Bedienungsführung beim luftfeuchtigkeitsgeregelten Spincoating-Verfahren

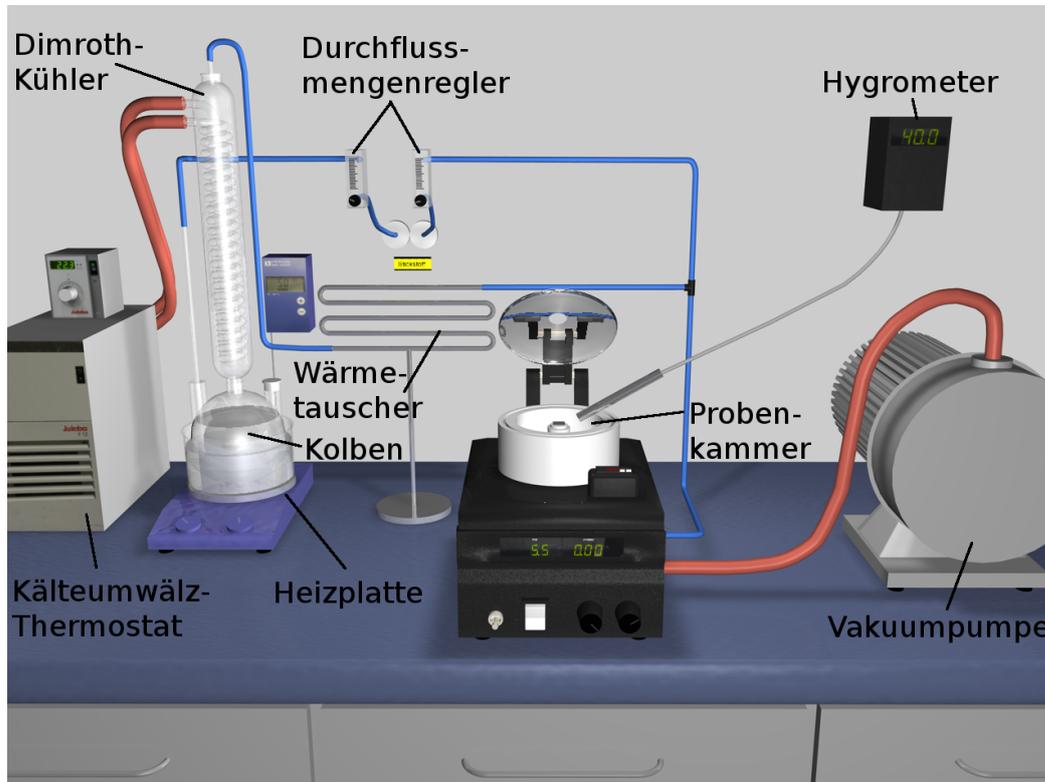


Abbildung 3.3: Schematischer apparativer Aufbau des Spincoaters. Die Kammer, in welcher sich der Chuck und das zu beschichtende Substrat befinden, enthält neben der zur Probenfixierung mittels einer Vakuumpumpe angebrachten Öffnung eine weitere Düse und einen Glasdeckel zur Einstellung der benötigten relativen Luftfeuchtigkeit. Diese erfolgt über die Mischung eines trockenen mit einem mit Wasser versehenen Stickstoffstrahl. Zur Erzeugung des feuchten Stickstoffstroms wird Stickstoff durch einen Kolben mit etwa 50 °C warmem Wasser geführt und anschließend in einem mit einem Kälteumwälz-Thermostat verbundenen Dimroth-Kühler auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Luftfeuchtigkeit wird über ein Hygrometer mit externem Sensor gemessen.

Um die Luftfeuchtigkeit in der Probenkammer des Spincoater-Aufbaus kontrollieren zu können, wird eine zusätzliche Apparatur benötigt. Ein mit bidestilliertem Wasser gefüllter Dreihalskolben befindet sich in einem zylindrischen, ebenfalls mit Wasser gefüllten Behälter, der auf einer ca. 50 °C warmen Heizplatte steht. Durch den ersten Gefäßhals führt ein Glasröhrchen, das bis fast auf den Boden des Kolbens reicht. Auf diese Weise gelangt der zunächst noch trockene Stickstoff in den mit Wasser gefüllten Kolben und wird mit Wasserdampf gesättigt. Auf dem zweiten Gefäßhals befindet sich ein Dimrothkühler, durch dessen Kühlspirale mit Hilfe eines Kälteumwälzthermostats auf Raumtemperatur gehaltenes Wasser fließt, sodass der Stickstoff annähernd auf diese zurück gekühlt wird. Anschließend gelangt der Stickstoff durch einen angeschlossenen Schlauch zu einem Wärmetauscher, wo er seine Restwärme an die Umgebungsluft übertragen

kann. Zuletzt wird er mit dem Strahl trockenen Stickstoffs vereint und in die Probenkammer geleitet. Beide Ströme lassen sich separat über je einen Durchflussmengenregler einstellen, sodass die relative Luftfeuchtigkeit auf einen beliebigen Wert eingestellt werden kann. Im dritten, nicht abgedichteten Gefäßhals befindet sich ein Deckelstopfen, wo Wasser nachgefüllt oder ein evtl. auftretender Überdruck abgebaut werden kann.

Die Spincoating-Apparatur selbst besteht aus der Probenkammer samt Chuck und einer Steuerungselektronik. Der Chuck wird von einem Elektromotor gedreht und besitzt eine Bohrung, über die die Probe mittels eines durch eine Vakuumpumpe erzeugten Unterdrucks während der Rotation festgehalten wird. Die Probenkammer wird zur Vermeidung der Absetzung von aufgewirbeltem Staub und zur Kontrolle der relativen Luftfeuchtigkeit durch eine Glashaube abgeschlossen, die eine kleine Öffnung für den Sensor der Luftfeuchtmessung und die zum Auftropfen notwendige Pipette aufweist.

Die Prozessführung beim luftfeuchtigkeitsgeregelten Spincoating verläuft folgendermaßen. Vorab müssen die Heizplatte auf ca. 50 °C und der Kälteumwälzthermostat auf ca. 22 °C eingestellt und die beiden Durchflussmengenregler für den trockenen und feuchten Stickstoff geöffnet werden. Unter Beobachtung der Luftfeuchtigkeitsanzeige wird einer von beiden Reglern variiert, bis sich die gewünschte relative Luftfeuchtigkeit einstellt. Das zu beschichtende Substrat wird im nächsten Schritt auf die Bohrung im Chuck gelegt und die Vakuumpumpe zu seiner dortigen Fixierung zugeschaltet. Anschließend wird die gewünschte Rotationsfrequenz, die typischerweise im Bereich von einigen 100 bis einigen 1000 Umdrehungen pro Minute liegt, über einen Stromstärkeregel an der Steuerungselektronik festgelegt. Nach erneuter Kontrolle der relativen Luftfeuchtigkeit werden mit der Pipette 50 µl bis 100 µl der Polymerlösung auf das Substrat getropft und die Rotation durch Betätigung eines Fußpedals unmittelbar danach gestartet. Wenn sich nach wenigen Sekunden die von der Probe ausgehende Interferenzfarbe und damit ihre Schichtdicke nicht mehr ändern, kann die Rotation gestoppt und die fertig beschichtete Probe nach Abschaltung der Pumpe entnommen werden. Der gesamte Aufbau ist in Abbildung 3.3 nochmals dargestellt.

Das Spincoating-Verfahren wurde zur Erzeugung einer lateralen Polymormorphologie verwendet, die nach Behandlung mit einem selektiven Lösungsmittel als Maske für einen Aufdampfprozess fungierte.

3.4 Aufdampfprozess

3.4.1 Funktionsprinzip des Elektronenstrahlverdampfers

Die Funktionsweise der verwendeten Aufdampfanlage basiert auf dem Verfahren der Elektronenstrahlverdampfung. Diese Methode ist eine spezielle Realisierung der Physikalischen Gasphasenabscheidung (Physical Vapour Deposition, PVD), die als Oberbegriff für alle vakuumbasierten Beschichtungsverfahren verwendet wird, bei denen das Ausgangsmaterial mittels physikalischer Methoden in die Gasphase überführt wird. Bei der Elektronenstrahlverdampfung geschieht dies durch das Auftreffen eines Elektronenstrahls auf einen mit dem gewünschten Metall gefüllten Tiegel und die damit verbundene Umwandlung von kinetischer Energie in Wärmeenergie [45]. Die Elektronen werden dazu zunächst durch Glühemission frei gesetzt, durch elektrische Felder zu einer Anode beschleunigt und durch Magnetfelder auf den Tiegel gelenkt, der sich über der Kathode

befindet. Das darin enthaltene Material wird dadurch so weit erhitzt, dass es innerhalb kürzester Zeit schmilzt und schließlich ein Gas bildet, das sich in der Verdampfungskammer ausbreitet und somit auch auf das zu beschichtende Substrat gelangt. Der gesamte Prozess findet im oberen Hochvakuum (HV) statt, um einen ungehinderten Materialtransport zu ermöglichen und die Adsorption von Fremdatomen zu vermeiden [46]. Der beim Aufdampfen ablaufende Prozess ist in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt.

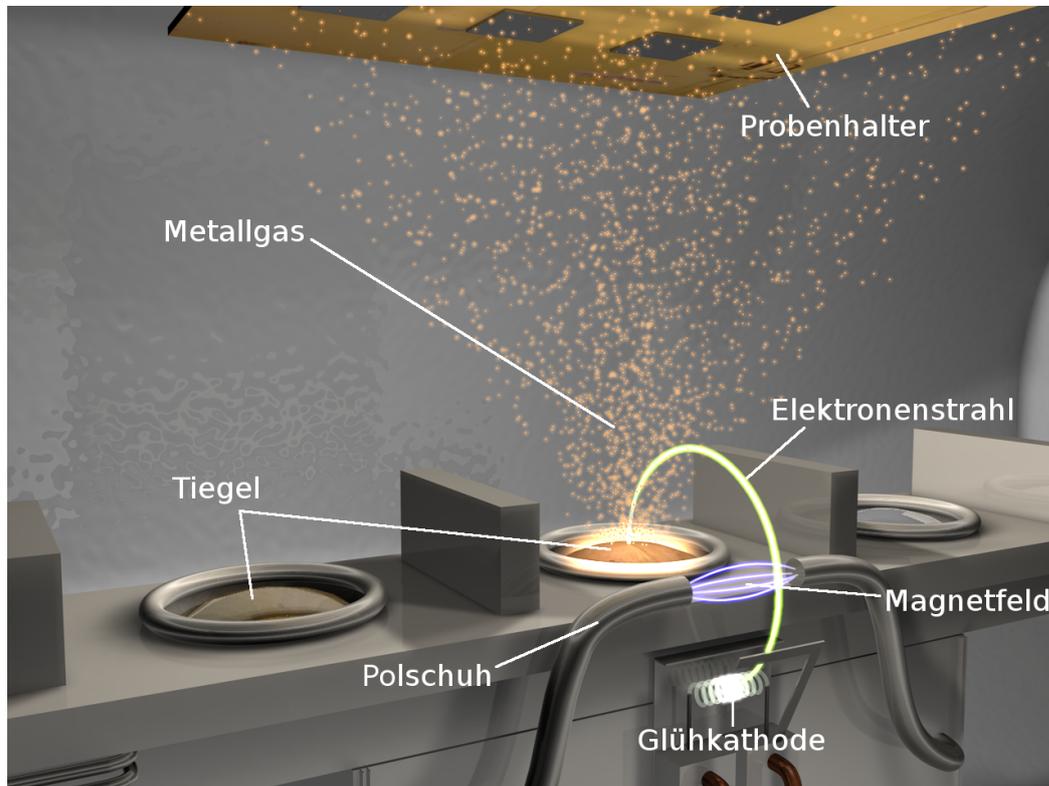


Abbildung 3.4: Schematisches Funktionsprinzip der Aufdampfanlage mit Elektronenstrahlverdampfer. Die Elektronen werden im Filament durch Glühemission frei gesetzt und durch Magnetfelder auf den gewünschten Metalltiegel gelenkt, der als Anode fungiert. Das darin enthaltene Metall bildet durch die enorme Erhitzung schließlich ein Gas, das sich in der evakuierten Verdampfungskammer ausbreitet und sich auf dem zu beschichtenden Substrat absetzt.

3.4.2 Apparativer Aufbau und Bedienungsführung der Aufdampfanlage

Die Aufdampfanlage besteht aus einer Vor- und einer Hauptkammer, die separat über jeweils eine für das Vorvakuum verantwortliche Scrollpumpe und eine für das Hauptvakuum von 10^{-8} mbar bis 10^{-9} mbar zuständige Turbomolekularpumpe evakuiert werden, welches durch Glühkathoden-Ionisationsvakuummeter kontrolliert wird. Die Hauptkammer lässt sich in Proben- und Verdampfungskammer einteilen. Daneben umfasst die Anlage eine Vielzahl von Steuergeräten für Pumpen, Druck- und Schichtdickenmessgeräte, sowie für die Erzeugung und Ablenkung des Elektronenstrahls.

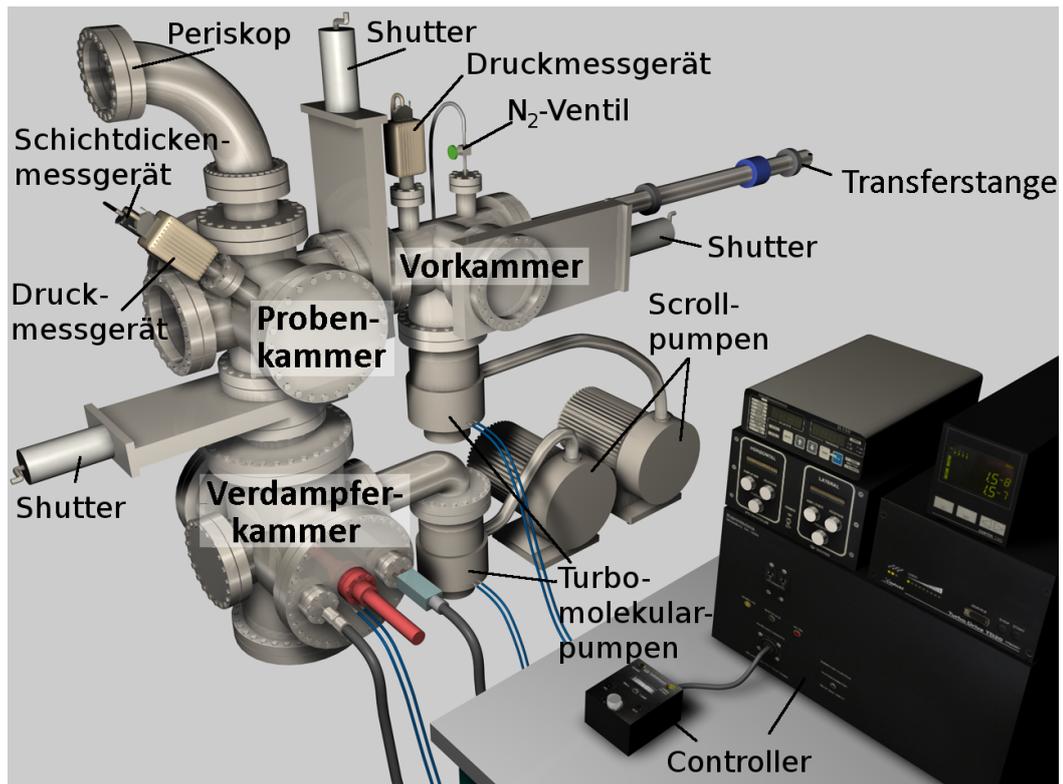


Abbildung 3.5: Schematischer apparativer Aufbau der Aufdampfanlage. Dieser besteht aus Vor- und Hauptkammer, die mittels jeweils einer Kombination aus Scroll- und Turbomolekularpumpe getrennt voneinander evakuiert werden. Letztere Kammer ist nochmals in Proben- und Verdampferkammer unterteilt. Die Vorkammer dient der teilweisen Belüftung der Anlage zur Probeneinschleusung, die Probenkammer beinhaltet die Proben während des Aufdampfvorgangs, welcher in der Verdampferkammer ausgeführt wird. Die räumliche Anordnung dieser Kammern ist durch ihre Abgrenzung durch die einzelnen Shutter zu erkennen. Die Transferstange dient der Positionierung des Probenhalters innerhalb der Anlage, an der zusätzlich Druck- und Schichtdickenmessgeräte, sowie ein Stickstoffventil zur Belüftung angebracht sind. Die Verdampferinheit sowie die Pumpeinheit wird von zugehörigen Controllern gesteuert.

Die Vorkammer besitzt die Funktion einer Schleuse. Zu diesem Zweck umfasst sie jeweils ein Ventil zur Hauptkammer und zum Außenbereich, die abgesehen von der Probenein- und -ausschleusung stets geschlossen sind, um das Hochvakuum der wesentlich größeren Hauptkammer zu erhalten. Zum Einschleusen der Proben wird die Vorkammer zunächst bei geschlossenem Hauptkammerventil durch kontrollierte Stickstoffzufuhr belüftet. Diese bleibt auch während des Öffnens des zweiten Ventils zum Außenbereich erhalten, um eine den Evakuierungsprozess verzögernde Adhäsion von Wassermolekülen zu vermeiden. Der zuvor mit den zu beschichtenden Substraten versehene Probenhalter wird in der Vorkammer über eine Madenschraube auf einer Transferstange befestigt, die Stickstoffzufuhr abgedreht und das Außenbereichsventil geschlossen. Die Vorkammer wird anschließend evakuiert bis deren Druck größenordnungsmäßig dem der Hauptkammer entspricht, was in der Regel etwa eine halbe Stunde dauert. Dann kann das

Hauptkammerventil geöffnet werden und der Probenhalter über die Transferstange in die Probenkammer überführt werden.

Die Verdampfungskammer umfasst zwei Elektronenstrahlverdampfer der Firma Thermionics (Hayward, Kalifornien, USA) mit jeweils einer Wolfram-Kathode und je fünf wassergekühlten Graphit-Tiegeln, die die unterschiedlichen, aufzudampfenden Metalle beinhalten. Die wesentlichen Parameter für den Ablauf des Aufdampfprozesses sind neben der relativen Position von Elektronenstrahl und Metalltiegel der Druck in der Hauptkammer und die Stromstärke in der Glühkathode, die auch als Filament bezeichnet wird. Die Position des Tiegels kann ebenso wie die Nullpunktslage und die Amplitude des räumlich oszillierenden Elektronenstrahls manuell bzw. über eine magnetische Ablenkeinheit eingestellt und über ein Periskop kontrolliert werden. Der Elektronenstrahl sollte dabei einen möglichst großen Bereich der Metallschmelze abdecken, ohne jedoch das Tiegelmaterial zu erhitzen. Der Tiegel könnte sonst mitverdampft oder sogar zerstört werden. Der Druck in der Hauptkammer sollte keinesfalls mehr als 10^{-4} mbar betragen, da sonst nicht nur die Qualität der Schichtbildung stark vermindert wäre [46], sondern auch das Filament verbrennen könnte. Ebenso sollte der für die Glühemission verantwortliche elektrische Strom einen Wert von etwa 300 mA nicht überschreiten und auch nicht ruckartig erhöht werden, um eine Beschädigung der Glühkathode zu vermeiden. Dieser Aspekt limitiert die Aufdampfrate, die für jedes Metall unterschiedlich ist. Für Kupferschichten wurden in dieser Arbeit maximale Raten im Bereich von 0,05 nm/s, für Goldlagen im Bereich von 0,1 nm/s erzielt. Bei den gewünschten Schichtdicken von rund 10 nm dauerte der eigentliche Aufdampfvorgang demzufolge nur wenige Minuten.

In der darüber liegenden Probenkammer befindet neben dem bereits erwähnten Periskop und dem während des Aufdampfprozesses dort befindlichen, nach unten ausgerichteten Probenhalter auch noch ein Schwingquarz. Die kontinuierliche Abnahme seiner Resonanzfrequenz aufgrund seiner durch die Bedampfung erhöhten Masse eignet sich zur aktuellen Schichtdickenbestimmung, die auf dem Schwingquarz und dem zu bedampfenden Substrat mit gleicher Geschwindigkeit erfolgt. Bei Erreichen der gewünschten Schichtdicke wird der Glühemissionsstrom abgeschaltet oder bei sehr hohen Verdampfungsraten der Shutter zwischen Proben- und Verdampfungskammer per Druckluft geschlossen. Das anschließende Ausschleusen der beschichteten Substrate verläuft nach demselben Prinzip wie der oben beschriebene Einschleusungsvorgang.

Der komplette apparative Aufbau der Aufdampfanlage ist in Abbildung 3.5 zu sehen.

Beim Aufdampfprozess wurden Gold-, Silber- und Kupfer-Lochschichten mit Dicken in der Größenordnung von 10 nm erzeugt, wobei zuvor mittels Spincoating-Verfahren präparierte PS-Inseln als Maske dienten.

3.5 Plasma-Modifizierung

Ein Plasma ist ein leitfähiges Gas, das sich teilweise oder vollständig aus Ionen und Elektronen zusammensetzt und durch verschiedene Formen der äußeren Energiezufuhr entsteht. Das Einbringen eines Substrats in ein solches Plasma ermöglicht das Reinigen und Aktivieren seiner Oberfläche. Die Oberflächenreinigung erfolgt wie in Abbildung 3.6 gezeigt entweder durch einen physikalischen Impulsübertrag beim Ionenbeschuss oder durch auftretende chemische Reaktionen, wobei die von der Oberfläche entfernten Be-

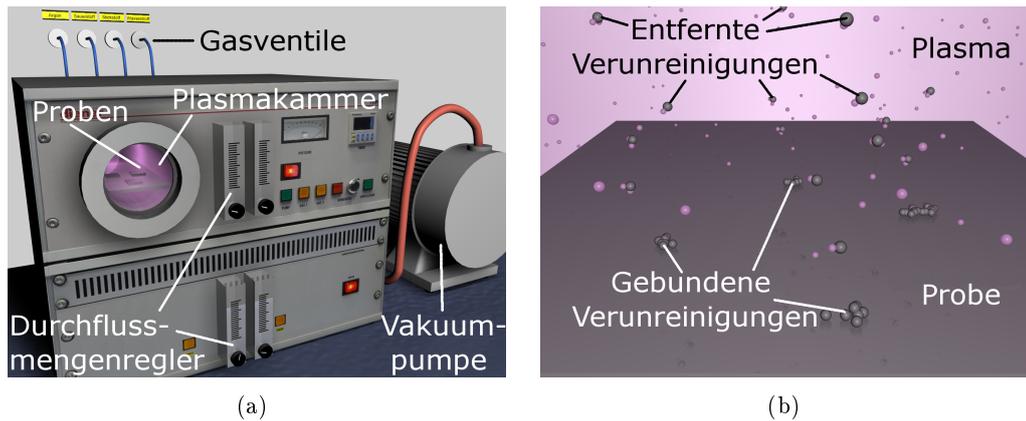


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung (a) des apparativen Aufbaus und (b) des Funktionsprinzips des Plasmacleaners. Die Plasmakammer wird nach Einbringen der zu reinigenden Proben zunächst evakuiert, mit dem notwendigen Gas befüllt und das Plasma anschließend gezündet. Während die Oberflächenreinigung beim Ionenbeschuss entweder durch einen Impulsübertrag oder durch chemische Reaktionen erfolgt, läuft die Oberflächenaktivierung entweder über eine Oxidation oder eine Reduktion ab.

standteile anschließend in die Gasphase übergehen. Die Oberflächenaktivierung läuft entweder über eine Oxidation oder über eine Reduktion ab. Ersteres erfolgt beispielsweise im Sauerstoffplasma, letzteres im Wasserstoffplasma. Im Argonplasma kommt es zu keiner Aktivierung.

In dieser Arbeit wurde der Plasma Cleaner Femto der Firma Diener Electronic (Ebhausen) verwendet. Nach Beladung der Plasmakammer mit den zu reinigenden Proben wird diese zunächst evakuiert und im nächsten Schritt mit dem gewünschten Gas befüllt. Anschließend wird das Plasma gezündet und der Reinigungsvorgang somit gestartet. Nach der vorgewählten Zeit, die in der Regel im Bereich von einigen Minuten liegt, wird das Plasma gestoppt und die gereinigten Proben nach Belüftung entnommen.

Die Plasma-Modifizierung wurde zur Reinigung von zuvor aufgedampften Goldoberflächen eingesetzt, um anschließend DNA-Linker auf ihnen präparieren zu können.

4 Analytische Methoden

In diesem Kapitel werden die Messmethoden vorgestellt, welche zur Untersuchung der hergestellten, meist biofunktionalisierten Probenoberflächen verwendet wurden. Der Fokus liegt hierbei auf dem Rasterkraftmikroskop. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Typ mit besonders großem Scanbereich entwickelt, aufgebaut und zur Analyse verschiedenster Probenoberflächen herangezogen. Mit dem Lichtmikroskop wurden zudem einzelne Zwischenschritte bei der Probenpräparation und mit dem UV-Vis-Spektroskop die Synthese mit DNA-Linkern behafteter Goldkolloide kontrolliert. Mit dem Rasterelektronenmikroskop wurde die Elementzusammensetzung von mittels Mercaptohexanol gebildeter SCMOL-Schichten analysiert.

4.1 Optische Mikroskopie

Das Lichtmikroskop eignet sich vor allem zur Untersuchung nichttransparenter Proben bis zu einer Auflösung im Mikrometerbereich, kann jedoch auch zur Untersuchung dünner Polymerfilme, sowie metallorganischer Schichten verwendet werden. In beiden Fällen liegen Schichtdicken im Nanometerbereich und damit auch schichtdickenabhängige Interferenzfarben vor, weil es durch Überlagerung des an der Schichtunterseite und an der Schichtoberseite reflektierten Lichts je nach Wellenlänge und Schichtdicke zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz und damit zur Verstärkung oder Auslöschung bestimmter Wellenlängen kommt. Diese Unterschiede lassen somit Rückschlüsse auf die Topographie von Polymerfilmen zu und gestatten eine näherungsweise Bestimmung der absoluten Schichtdicke einer metallorganischen Schicht. Daher diente die Lichtmikroskopie im Rahmen dieser Arbeit als rasche Kontrollmethode während der Probenpräparation.

4.2 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie ist eine Form der Spektroskopie, bei der elektromagnetische Wellen des ultravioletten (UV) und des sichtbaren (visible, Vis) Lichts zur Anregung von Valenzelektronen der zu untersuchenden Probe genutzt werden, um über deren damit verbundene energie- und damit frequenzabhängige Absorption bzw. Transmission die chemischen Bestandteile des Probenmaterials näher charakterisieren zu können.

Die zu untersuchende Lösung befindet sich in einer Küvette. Zur Erhöhung der Messgenauigkeit wird neben der zu analysierenden Lösung meist parallel eine Referenzlösung untersucht, die lediglich aus dem verwendeten Lösungsmittel besteht. Beide Küvetten werden während der Analyse mit UV-Licht bestrahlt, die transmittierten Intensitäten von einem Detektor gemessen und anschließend verglichen. Auf diese Weise entsteht

ein genaues wellenlängenabhängiges Absorptions- oder Transmissionsspektrum, dessen charakteristische Elemente auf eine bestimmte chemische Substanz hindeuten können.

Mit dem UV-Vis-Spektroskop wurde in dieser Arbeit die Herstellung mit DNA-Linkern behafteter Goldkolloide kontrolliert, indem ein für DNA-Sequenzen charakteristischer Absorptionspeak gesucht wurde. Zur Vermeidung von Absorptionsverlusten bei der eingesetzten Strahlung mit Wellenlängen von bis hinab zu 250 nm wurden Küvetten aus Quarzglas von besonderer Reinheit verwendet.

4.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

4.3.1 Funktionsprinzip des Rasterelektronenmikroskops

Beim bereits in den 1930er Jahren entwickelten Rasterelektronenmikroskop (REM) wird ein fein gebündelter Elektronenstrahl mit einem typischen Durchmesser von 0,5 nm bis 10 nm mittels elektromagnetischer Felder zeilenweise über eine im Hochvakuum befindliche, elektrisch leitfähige Probenoberfläche geführt und die Wechselwirkung dieser Primärelektronen mit den Probenatomen analysiert, indem die bei der inelastischen Streuung entstehenden Sekundär- und Auger-Elektronen und Röntgenstrahlen, sowie die rückgestreuten Elektronen von einem Detektor orts aufgelöst aufgezeichnet werden, um Topographie und Materialbeschaffenheit der Probe zu charakterisieren. Die Auflösung ist dabei nicht unmittelbar von der Wellenlänge der Elektronen abhängig, sondern von der Größe des Wechselwirkungsbereichs, der Feinheit des Strahls und der gewählten Bildgröße [47–49].

4.3.2 Wechselwirkungen zwischen Primärelektronen und Probenatomen

Sekundärelektronen sind die wichtigste und gängigste Signalquelle des Rasterelektronenmikroskops. Sie entstehen bei inelastischer Streuung von Primärelektronen an schwach gebundenen Elektronen, die anschließend nicht nur das Atom, sondern die gesamte Probe verlassen. Sie besitzen eine kontinuierliche Energieverteilung, die unterhalb von 50 eV auftritt, weshalb sie eine sehr kurze Reichweite in Materie besitzen. Sie stammen aus einem vergleichsweise kleinen Tiefenbereich von 5 nm bis 50 nm und verlassen die Probe lediglich am Eintrittsort des Primärstrahls und am Austrittsort von Rückstreuelektronen, wobei der erstgenannte Anteil dominiert. Die laterale Auflösung bei Detektion von Sekundärelektronen ist deshalb hoch und entspricht in etwa der Querschnittsfläche des Elektronenstrahls beim Auftreffen auf die Probenoberfläche. Für die Detektion von Materialkontrasten ist diese Methode wegen der geringen Ordnungszahlabhängigkeit der Sekundärelektronenausbeute nicht geeignet.

Rückstreuelektronen sind im Probenmaterial teilweise mehrfach elastisch oder inelastisch gestreute Primärelektronen, die das Material wieder verlassen konnten. Ihre Energieverteilung ist kontinuierlich und hat ihr Maximum bei 80 % bis 90 % der Energie der Primärelektronen und liegt damit üblicherweise im Bereich von 1 keV bis 20 keV. Sie können die Probe insbesondere im Fall von Mehrfachstreuung in großem Abstand zum Primärstrahl verlassen, was der lateralen Auflösung ihrer Detektion abträglich ist. Da sie je nach Beschleunigungsspannung und Probenmaterial teilweise aus großer Probentiefe

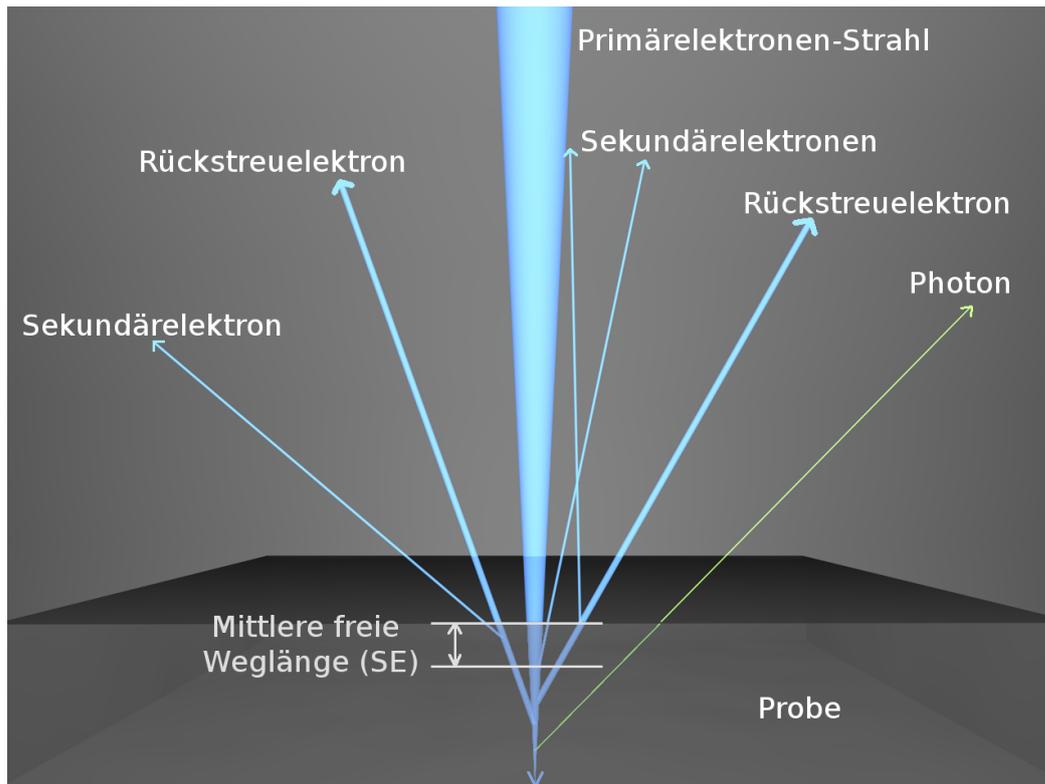


Abbildung 4.1: Schematisches Funktionsprinzip des REM. Ein fokussierter Strahl von Primärelektronen wird über die zu untersuchende Probenoberfläche geführt, wobei Sekundärelektronen emittiert werden und Rückstreuelektronen auftreten, die wiederum Sekundärelektronen herauslösen können. Die Detektion dieser Elektronen kann für das bildgebende Verfahren des REM herangezogen werden. Die Detektion der ebenfalls erzeugten Photonen dient der elementspezifischen Analyse. Alle Teilchen sind als Strahlen entlang ihrer Bewegungsrichtung dargestellt, deren Farbe über die Teilchenart und deren Breite über die Energie Auskunft gibt. Elektronen sind blau dargestellt, Photonen grün. Je höher die Energie des Teilchens ist, desto breiter ist der Strahl dargestellt.

bis in den Bereich von $1\ \mu\text{m}$ stammen können, sind mit ihrer Analyse Untersuchungen über die Probenoberfläche hinaus möglich.

Auger-Elektronen entstehen bei der inelastischen Streuung von Primärelektronen an stark gebundenen Elektronen, wobei das beim anschließenden Übergang eines anderen, schwächer gebundenen Elektrons in das frei gewordene Energieniveau entstehende Photon ein weiteres Elektron aus diesem Atom entfernt. Entfernt das erzeugte Photon kein weiteres Elektron, sondern verlässt das Atom und die Probe gleichermaßen, entsteht charakteristische Röntgenstrahlung. In beiden Fällen haben die detektierten Teilchen charakteristische Energien und können deshalb zu einer elementspezifischen Analyse herangezogen werden. Dies geschieht im Rahmen der Energiedispersiven Röntgenspektroskopie (EDX). Der Tiefenbereich der Röntgenquanten entspricht dem der Primärelektronen und ist damit noch größer als der der Rückstreuelektronen, jener der schwachenergetischen Auger-Elektronen ist geringer als der der Sekundärelektronen.

Neben diesen in Abbildung 4.1 schematisch dargestellten Sekundärteilchen entstehen bei der inelastischen Streuung der Primärelektronen auch Bremsstrahlung und Phononen. Diese Phänomene spielen für die Analyse zwar keine Rolle, sind jedoch unter dem Aspekt der Probenaufheizung nicht zu vernachlässigen.

4.3.3 Apparativer Aufbau des Rasterelektronenmikroskops

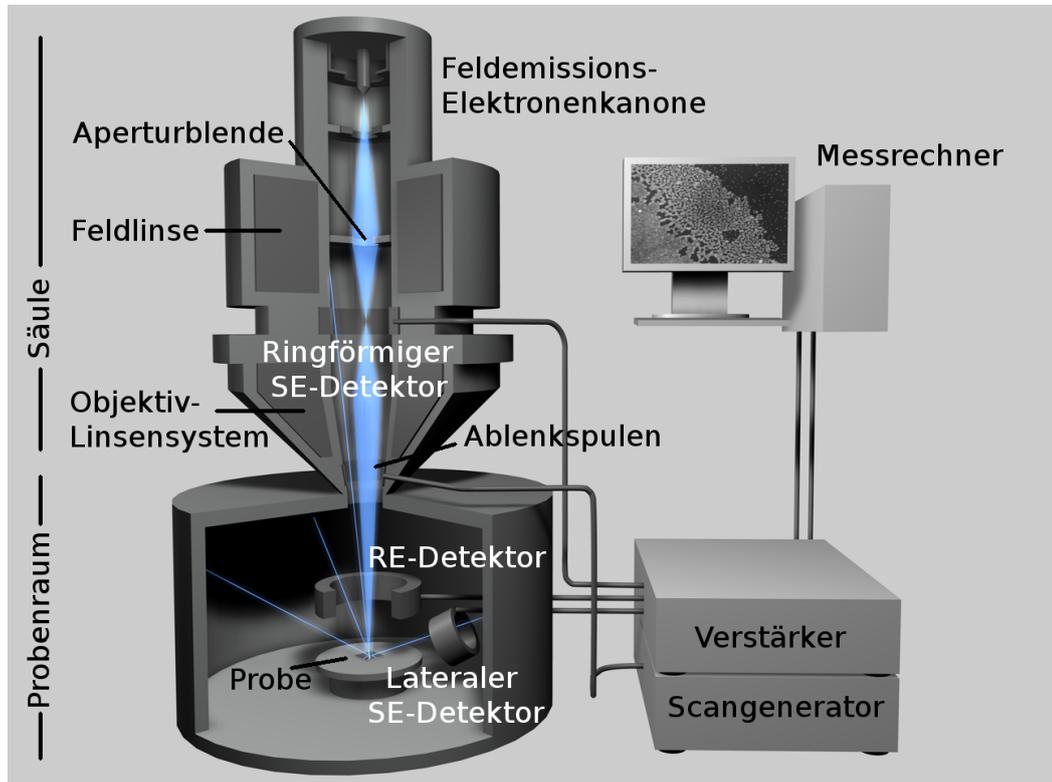


Abbildung 4.2: Schematischer apparativer Aufbau des REM. Die aus der Kathode emittierten Elektronen werden innerhalb der Säule durch die auf magnetischen Feldern basierenden Linsensysteme gebündelt und fokussiert und durch Ablenkspulen rasterförmig über die Probenoberfläche geführt, die sich wie auch die die verschiedenen Sekundärteilchen analysierenden Detektoren in der Probenkammer befindet.

Der Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops gliedert sich in den Probenraum und die darüber liegende Säule, die den Strahlerzeuger, das Linsensystem, die Ablenkeinheit und die Detektoren, mit denen die Erzeugung, Fokussierung und Rasterbewegung des Primärelektronenstrahls, sowie der Nachweis der Wechselwirkungsprodukte möglich ist [50]. Der Elektronenstrahl wird erzeugt durch thermische Emission, Feldemission oder Schottky-Feldemission als Kombination der beiden erst genannten Verfahren. Die Fokussierung der Elektronen erfolgt durch elektromagnetische Linsen. Aperturblenden dienen der Festlegung von Stärke und Durchmesser des Primärstrahls, die Objektivlinse fokussiert den Strahl auf die Probenoberfläche und zur Aufhebung des Astigmatismus erzeugt der Stigmator ein elektrostatisches Quadrupolfeld, welches Effekte wie die Asym-

metrie der Polschuhe, Aperturblende und durch Aufladung erzeugte Unrundheiten von Blenden ausgleicht. Er befindet sich unterhalb der Ablenkeinheit, die aus diversen Ablenkspulen besteht und die eigentliche Rasterung des zu untersuchenden Probenbereichs ermöglicht.

Ein Rasterelektronenmikroskop enthält in der Regel Detektoren für Sekundärelektronen, Rückstreuелеktronen und Röntgenquanten zur Ermittlung von Topographie- und Materialkontrast, sowie zur elementspezifischen Analyse. Als Sekundärelektronen-Detektoren kommen entweder eine Kombination aus Szintillator und Photomultiplier, die Everhart-Thornley-Detektor genannt wird, oder ein Halbleiterdetektor zum Einsatz. Die orts aufgelöste Helligkeit der Aufnahme variiert mit der Intensität des vom Detektor ausgehenden Signals, weshalb Probenbereiche mit hoher Emission heller erscheinen als Bereiche mit geringerer Emission. Kanten und zunehmende Flächenneigungen erscheinen besonders hell, wodurch Topographiekontraste entstehen.

Das REM vom Typ LEO 1530 wurde zur Untersuchung der Elementzusammensetzung von MCH-SCMOL-Proben mittels EDX eingesetzt und ist in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt.

4.4 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

4.4.1 Funktionsprinzip des Rasterkraftmikroskops

Das Auflösungsvermögen optischer Mikroskope ist neben dem Blendendurchmesser aufgrund von Beugungseffekten durch die Wellenlänge des sichtbaren Lichts bestimmt. Da diese zu kleinen Werten hin begrenzt ist, gilt dies auch für das Auflösungsvermögen. Eine Untersuchung beliebig kleiner Strukturen ist deshalb mit optischen Instrumenten nicht möglich. Ohne die Ausnutzung nichtlinearer Wechselwirkungseffekte zwischen Licht und Materie ist lediglich eine Analyse von Strukturen bis zu einer Größe der halben Wellenlänge des sichtbaren Lichts von ungefähr 200 nm möglich.

Mit der Einführung der Rastersondenmikroskopie (Scanning Probe Microscopy, SPM) wurde durch zeilenweises Abtasten einer Probenoberfläche mittels einer lokalen Sonde erstmals die orts aufgelöste Oberflächenanalyse im Nanometerbereich und unter bestimmten Bedingungen sogar im Subnanometerbereich möglich.

Erster Vertreter dieses Mikroskoptyps war das Rastertunnelmikroskop (Scanning Tunneling Microscope, STM), welches 1982 von Binnig und Rohrer erfunden wurde [51]. Durch die Detektion des elektrischen Stroms aufgrund des Tunneleffekts zwischen einer feinen Messspitze und der Probenoberfläche konnten erstmals Oberflächenanalysen mit atomarer Auflösung durchgeführt werden.

Die Funktionsweise des im Jahr 1986 von Binnig, Quate und Gerber vorgestellten Rasterkraftmikroskops (Scanning Force Microscope bzw. Atomic Force Microscope, SFM bzw. AFM) [1] beruht wie in Abbildung 4.3 gezeigt auf dem mechanischen Kontakt zwischen einer feinen, harten Spitze und der Probenoberfläche und somit auf der Detektion einer Vielzahl von Wechselwirkungen. Mit dieser Methode konnten somit nicht nur erstmals elektrisch nichtleitende Oberflächen untersucht werden, sondern neben den topographischen auch mechanische, tribologische, chemische, elektrostatische, magnetische und eine Vielzahl von weiteren Eigenschaften. Die Untersuchung kann im Ultrahochvakuum (UHV) und in diversen Umgebungsmedien durchgeführt werden [52], wobei die

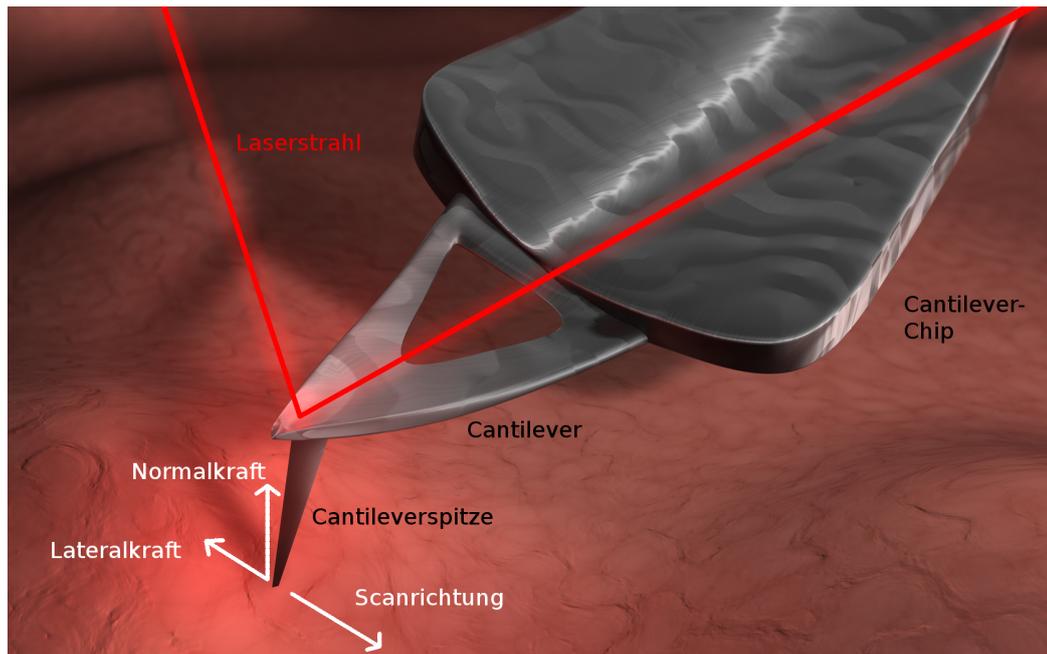


Abbildung 4.3: Schematisches Funktionsprinzip des AFM. Eine an der Unterseite einer Blattfeder befindliche Spitze wird mittels Piezoaktoren in direktem Kontakt über die zu untersuchende Probenoberfläche geführt, wobei deren Wechselwirkung im einfachsten Betriebsmodus zu einer Verbiegung oder Verdrehung der Blattfeder führt, die über die veränderte Richtung des auf ihr reflektierten Laserstrahls detektiert wird. Das gesamte Bauteil samt Chip wird als Cantilever bezeichnet.

vor allem durch die Spitzengeometrie begrenzte Auflösung in atomaren Dimensionen liegen kann [4]. Auch eine in-vivo-Untersuchung ist möglich.

Das zeilenweise Abrastern der Probe funktioniert durch einen unter ihr positionierten Piezoscanner unter Ausnutzung des inversen piezoelektrischen Effekts, das Abtasten der Probe durch eine über ihr befestigte Messsonde, die aus einer Spitze mit kleinstmöglichem Spitzenradius und Öffnungswinkel an der Unterseite einer als Cantilever bezeichneten Blattfeder und dem sogenannten Cantilverchip zur Befestigung besteht.

Die zu detektierende Wechselwirkungskraft zwischen Spitze und Probe hat nun je nach Betriebsmodus eine Veränderung von Verbiegung und Torsion oder des Schwingungsverhaltens des Cantilevers zur Folge. Diese wird mit der sogenannten Lichtzeigerdetektion anhand der Änderung des Reflexionswinkels eines auf ihn fokussierten Laserstrahls mittels einer Viersegment-Photodiode detektiert. Die Verarbeitung der dort generierten Signalströme durch analoge und digitale Elektronikschaltungen ermöglicht eine farblich kontrastierte, zweidimensionale Aufnahme am Messrechner. Der gesamte prinzipielle Aufbau eines AFM ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

4.4.2 Wechselwirkungen zwischen Messspitze und Probenoberfläche

Die zwischen Messspitze und Probenoberfläche wirkenden Kräfte werden in normale und laterale Kräfte unterteilt. Bei ersteren wird weiterhin zwischen attraktiven und repul-

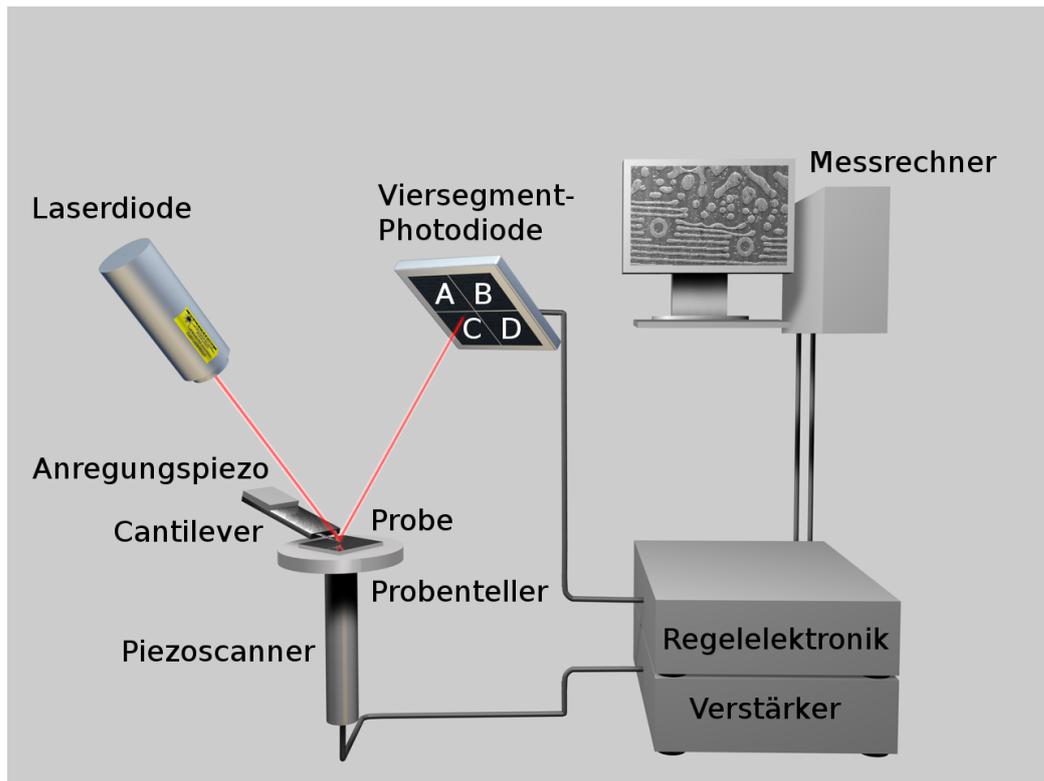


Abbildung 4.4: Schematischer apparativer Aufbau des AFM. Die Probenpositionierung erfolgt über in der Messbasis befindliche Piezoaktoren. Die Detektion der im einfachsten Betriebsmodus mit dem direkten Kontakt von Cantileverspitze und Probenoberfläche verbundenen Verbiegung und Verdrehung der Cantileverrückseite wird über die im Messkopf befindliche, orts aufgelöste Detektion des dort reflektierten Laserstrahls mittels einer Viersegment-Photodiode realisiert.

siven sowie zwischen lang- und kurzreichweitigen unterschieden. Die wirkenden Kräfte sind abhängig von der Spitzengeometrie, dem Abstand zwischen Spitze und Probe, den verwendeten Materialien und vom Umgebungsmedium.

Lennard-Jones-Potential

Die attraktiven und mit einem Wirkungsbereich in der Größenordnung von 1 nm als langreichweitig zu bezeichnenden Van-der-Waals-Kräfte entstehen durch die Energieabsenkung bei der Ausrichtung von Dipolmomenten. Bei der Dipol-Dipol-Wechselwirkung existieren bereits permanente Dipolmomente, bei der induzierten Dipol-Dipol-Wechselwirkung werden Moleküle ohne permanentes Dipolmoment durch Moleküle mit permanentem Dipolmoment polarisiert und bei der durch die Quantenmechanik begründeten Dispersionswechselwirkung entstehen Dipole aufgrund fluktuierender Ladungsverteilungen. Das Wechselwirkungspotential wird durch eine Abhängigkeit im Bereich von r^{-6} bis r^{-7} beschrieben.

Die repulsiven und mit 0,1 nm kurzreichweitigen Kräfte, die bei der Überlappung von

Elektronenwolken entstehen, haben ihren Ursprung in der Coulombabstoßung wegen der unvollständigen Abschirmung der Kernladung und wegen der dem Pauli-Prinzip entsprechenden Anhebung von Elektronen in höhere Energieniveaus. Sie sind die Ursache dafür, dass Festkörper einander nicht durchdringen können. Ihr Wechselwirkungspotential besitzt eine Ortsabhängigkeit im Bereich von r^{-8} bis r^{-15} .

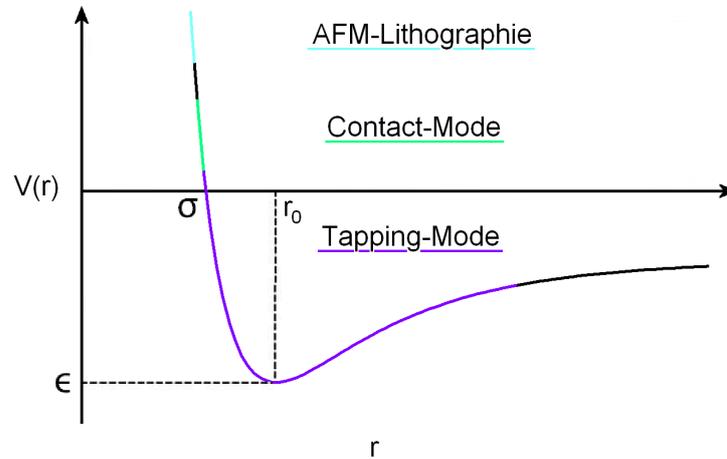


Abbildung 4.5: Schaubild des Lennard-Jones-Potentials, welches die Wechselwirkung zwischen der Cantileverspitze und der Probenoberfläche beschreibt. Die Abstoßung der Elektronenwolken und die Auswirkungen des Pauli-Prinzips werden durch einen r^{-12} -Term, die anziehende Van-der-Waals-Wechselwirkung durch einen r^{-6} -Term repräsentiert. Die Potentialbereiche des Contact-Modus sind grün, die des Tapping-Modus violett und die der AFM-Lithographie blau dargestellt.

Da die beiden genannten Kräfte zwischen allen Arten von Atomen oder Molekülen auftreten, empfiehlt es sich, diese durch ein gemeinsames Potential zu beschreiben. Dieses wird als Lennard-Jones-Potential bezeichnet und besitzt demnach einen attraktiven und einen stark repulsiven Term [53]:

$$V(r) = 4 \cdot \epsilon \cdot \left(\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right). \quad (4.1)$$

Dabei bestimmt σ den Nulldurchgang des Potentials und ϵ entspricht der Potentialtiefe im Gleichgewichtsabstand r_0 . Das Potential ist in Abbildung 4.5 dargestellt.

Kapillar- und Reibungskraft

Findet die Messung nicht im UHV statt, dominieren im Allgemeinen die ebenfalls attraktiven Kapillarkräfte. Sie entstehen beim Eintauchen der Spitze in hauptsächlich aus Wasser bestehende Adsorbatfilme auf der Probenoberfläche unter Bildung eines Flüssigkeitsmeniskus zur Minimierung der Oberflächenenergie des Wasserfilms. Ihre Reichweite ist abhängig von der Dicke des Adsorbatfilms, die in der Regel im Bereich von wenigen Nanometern liegt [54].

Die einzige laterale Kraft ist die Reibungskraft, die ihren Ursprung in der Tribologie findet. Ihre Aufzeichnung ermöglicht die Ermittlung orts aufgelöster chemischer Materialkontraste.

Weitere Kräfte

Darüber hinaus gibt es abhängig von der untersuchten Probe noch weitere senkrecht zu deren Oberfläche wirkende Kräfte, deren Detektion weiteren Aufschluss über die Probenbeschaffenheit gibt. Dies sind die langreichweitigen elektrostatischen und magnetischen Kräfte, die mit elektrisch geladenen [3] und ferromagnetischen Spitzen [2] gemessen werden, sowie die kurzreichweitige ionische Bindung bei polaren Medien [55] und die metallische Adhäsion bei metallischen Proben, die mit metallischen Spitzen [56] gemessen werden.

4.4.3 Betriebsmodi des Rasterkraftmikroskops

Die Vielzahl möglicher Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe erlaubt eine Vielzahl möglicher Betriebsmodi. Diese werden im Folgenden vorgestellt.

Contact-Mode

Beim Contact-Mode als ursprünglichem Standardmessmodus befindet sich die Spitze in direktem Kontakt mit der Oberfläche und somit permanent im Bereich der kurzreichweitigen, stark repulsiven Atomkräfte. Eine Änderung der Proben-Topographie oder Tribologie hat stets eine Änderung der Verbiegung oder der Torsion des Cantilevers zur Folge, die als Normalkraft- (Normal Force Mode, NFM) und Lateralkraftsignal (Lateral Force Mode, LFM) detektiert wird. Diese werden bereits im Messkopf in der Vorverstärkerplatine aus den Stromstärken der vier Photodiodensegmente A , B , C , D nach dem Schema $NFM = (A + B) - (C + D)$, $LFM = (A + C) - (B + D)$ generiert. Es gibt zwei prinzipielle Möglichkeiten den Modus zu realisieren. Beim Constant-Height-Mode bleibt die Höhe der Probe während des Scanvorgangs unverändert und die Verbiegung des Cantilevers variiert entsprechend den Gegebenheiten der Probenoberfläche. Beim Constant-Force-Mode wird die Verbiegung des Cantilevers über den Piezoscanner und einen Regelkreis konstant gehalten und die Probenhöhe variiert. Letztere Variante hat eine im Allgemeinen wesentlich geringere Belastung für Spitze und Probenstrukturen zur Folge.

Tapping-Mode

Beim mittlerweile als Standardmessmodus etablierten Tapping-Mode oder Intermittent-Contact-Mode wird der Cantilever zu Schwingungen im Bereich seiner Resonanzfrequenz angeregt, die im Bereich von 100 kHz bis 400 kHz liegt, mit Amplituden von 10 nm bis 100 nm [57]. Daher befindet sich die Spitze nicht ununterbrochen im direkten Kontakt mit der Probe, weshalb Scherkräfte und letztlich eine eventuelle Zerstörung empfindlicher Proben vermieden werden [58, 59]. Eine Änderung der Proben-Topographie oder Tribologie hat stets eine Änderung der Schwingungsamplitude und der Phasenverschiebung des Cantilevers zur Folge, die mittels Lock-In-Technik separat detektiert werden können. Die von der Probenelastizität abhängige Phasenverschiebung [60] erlaubt demnach analog zur von der Reibung abhängigen Torsion eine Ermittlung orts aufgelöster chemischer Materialkontraste. Der Tapping Mode wird nur im geregelten Modus angewendet, wobei lediglich der NFM-Kanal ausgelesen werden muss.

Kraft-Abstands-Kurven und Force-Mapping-Mode

Bei der Aufnahme von Kraft-Abstands-Kurven wird die während einer AFM-Messung im Contact Mode zwischen Cantileverspitze und Probenoberfläche in vertikaler Richtung wirkende Kraft bestimmt, indem die Spannung des NFM-Signals in Abhängigkeit vom Abstand zwischen Cantilever und Probe variiert wird. Es handelt sich dabei nicht um ein bildgebendes Messverfahren, da die Probenoberfläche lediglich an jeweils einer diskreten Stelle untersucht wird. Die Probe wird über den z-Piezoaktor gegen die Cantileverspitze gefahren, bis eine vorgewählte, über das NFM-Signal detektierte Auflagekraft erreicht ist und fährt anschließend in seine Ausgangsposition zurück.

Vor der Analyse der so gewonnenen Daten gilt es die inverse Steigung dieser Kurve zu bestimmen, die beim eingesetzten AFM-System als InvOLS (Inverse Optical Lever Sensitivity) bezeichnet wird, um den Zusammenhang zwischen der Spannung des NFM-Signals und der räumlichen Auslenkung des Cantilevers herzustellen. Diese Sensitivität hängt dabei von der Intensität des Laserstrahls, der Reflektivität des Cantilevers, der Position des Laserpunktes auf dem Cantilever, sowie der Position und Sensitivität der Diode ab und ist daher nach jedem Justiervorgang neu zu bestimmen. Durch die Aufnahme eines thermischen Rauschspektrums kann zusätzlich die Federkonstante des Cantilevers ermittelt werden. Sind diese beiden Größen bekannt, kann letztendlich eine Zuordnung von NFM-Signal und vorherrschender Auflagekraft vorgenommen werden. Der Kurvenverlauf besitzt mit dem sogenannten Snap-In-Prozess beim Annähern und dem Snap-Off-Prozess beim Entfernen aufgrund attraktiver Kräfte zwei Unstetigkeiten [61]. Bei Messungen unter Umgebungsbedingungen ist der Snap-Off- aufgrund zusätzlicher attraktiver Kapillarkräfte größer als der Snap-In-Prozess. Der Betrag des Sprungs ist ein Maß für die im Kontakt wirkenden Adhäsionskräfte, die bekannt sein müssen, um die tatsächliche Auflagekraft zu bestimmen.

Beim Force-Mapping-Mode wird die Aufnahme von Kraft-Abstands-Kurven auch für ein bildgebendes Verfahren herangezogen. Bei diesem Betriebsmodus, der eine vergleichsweise große Messdauer aufweist, wird an jedem einzelnen Bildpunkt eine Kraft-Abstandskurve erstellt. Auf diese Weise entsteht neben dem analog zum Contact-Mode erzeugten Topographiebild zusätzlich ein Adhäsionsbild, das bei zuvor erfolgter Ermittlung der Cantilever-Sensitivität auch absolute Messwerte für die jeweils vorherrschende Kraft enthält.

AFM-Lithographie

Bei der AFM-Lithographie handelt es sich um ein präparatives und kein analytisches Verfahren, das wegen seines Bezugs zum AFM dennoch an dieser Stelle kurz erläutert werden soll.

Die bisher beschriebenen Betriebsmodi dienen dem Zweck der zerstörungsfreien Oberflächencharakterisierung. Der insbesondere im Contact-Mode mögliche Nebeneffekt des unerwünschten Abtragens von Probenstrukturen bei zu hoher Auflagekraft kann jedoch bei der AFM-Lithographie auch gezielt zur Manipulation von Oberflächen eingesetzt werden. Im Gegensatz zum Contact-Mode wird bei der AFM-Lithographie in der Regel auch kein linienförmiges Raster abgefahren und die zu schreibenden Strukturen zuvor in Abschnitte unterteilt, die ohne Absetzen des Cantilveres geschrieben werden. Nach

der Fertigstellung eines einzelnen Abschnitts mit hoher und möglichst genau bekannter Auflagekraft wird der Startpunkt des nächsten zu schreibenden Abschnitts mit einer wesentlich geringeren Auflagekraft angefahren. Für die genaue Kenntnis der vorliegenden Auflagekraft empfiehlt sich die vorherige Aufnahme von Kraft-Abstands-Kurven.

Die lithographisch genutzten Spitzen unterliegen aufgrund der hohen mechanischen Belastungen einem hohen Verschleiß, weshalb in der Regel harte Spitzen mit einer Si_3N_4 -Beschichtung und hoher Federkonstante zur Vermeidung starker Torsion eingesetzt werden. Durch einen Closed-Loop-Betrieb mit Regelung der Piezoaktorik durch kapazitive Positionssensoren werden eine hohe Reproduzierbarkeit der Lithographiesegmente und die Möglichkeit des mehrmaligen Abfahrens einzelner Strukturen erwirkt. Die minimale Linienbreite ist je nach Probenmaterial durch die geometrischen Gegebenheiten der Cantileverspitze auf etwa 20 nm begrenzt und erhöht sich mit steigender Abnutzung.

Weitere Betriebsmodi

Darüber hinaus gibt es noch eine Vielzahl von Messmodi, die der Klärung von mehr oder weniger speziellen Probenaspekten dienen. Dazu zählen beispielsweise der Pulsed-Force-Mode, der Magnetic-Force-Mode und der Electric-Force-Mode, bei denen die elastischen, magnetischen und elektrostatischen Eigenschaften von Probenoberflächen untersucht werden. Da diese jedoch im Rahmen dieser Arbeit keine Anwendung fanden, wird an dieser Stelle nicht weiter auf sie eingegangen.

4.4.4 Apparativer Aufbau des Rasterkraftmikroskops

Der experimentelle Aufbau eines Rasterkraftmikroskops kann in die Module Messeinheit - bestehend aus Kopf und Basis -, Messelektronik und Messrechner gegliedert werden.

Messeinheit

Der Messkopf umfasst im Wesentlichen die Komponenten zur Detektion der zu untersuchenden Wechselwirkungen, also Laserdiode, Cantileverhalter, Viersegment-Photodiode, sowie eine Vorverstärker-Platine, welche die schwachen Photoströme ortsnahe verstärken und mittels Differenzverstärker zum NFM- und LFM-Signal zusammensetzen soll. Der Cantilever selbst muss eine große Spitzenhärte und -schärfe, sowie eine definierte Federkonstante und eine hohe Resonanzfrequenz aufweisen. Cantilever aus Silizium sind mit Spitzenradien von weniger als 20 nm und halben Öffnungswinkeln im Bereich von 20° sehr scharf, aber auch sehr empfindlich. Deshalb werden auch Cantilever aus Siliziumnitrid verwendet, die wesentlich härter und aufgrund ihres großen halben Öffnungswinkels von 35° oftmals mit einer oxidgeschärften Spitze versehen werden. Die Federkonstante liegt bei Cantilevern, die für den Contact-Mode ausgelegt sind, meist bei weniger als $0,5 \text{ N/m}$, während sie für solche, die für den Tapping-Mode geeignet sind, in der Größenordnung von 10 bis 50 N/m liegt, um hohe Resonanzfrequenzen zu ermöglichen. Der Cantileverhalter ist um etwa 15° gegenüber der Probenebene geneigt, um den Einfall von Laser-Streulicht von der Probenoberfläche in die Photodiode zu vermeiden. Er beinhaltet zudem einen Piezoaktor zur Schwingungsanregung im Tapping-Mode, der zwischen Cantileverchip und Messkopfgehäuse angebracht ist.

Die Messbasis beinhaltet die Elemente zur exakten Probenpositionierung. Da deren Genauigkeit je nach Anforderung mindestens im Bereich von Nanometern liegen sollte, kann die Konstruktion einer Basis als anspruchsvollste Aufgabe angesehen werden. Die Positionierung wird von Piezoscannern unterschiedlicher Bauweise übernommen, auf denen der Probenhalter und somit die zu untersuchende Probe fixiert sind. Als Piezoscanner werden entweder Röhrenpiezos oder Stapelpiezos verwendet, deren Aufbau in Abbildung 4.6 schematisch dargestellt ist. Bei Röhrenpiezos handelt es sich um piezokeramische Hohlzylinder mit einer Innen- und vier Außenelektroden. Bei Anlegen einer Spannung U_x bzw. U_y zwischen zwei gegenüberliegenden Elektroden erfolgt in erster Näherung eine lineare Verbiegung Δx bzw. Δy , bei Anlegen einer Spannung U_z zwischen der Innenelektrode und allen vier Außenelektroden ergibt sich eine Dehnung oder Stauchung Δz des Röhrenpiezos [62, 63].

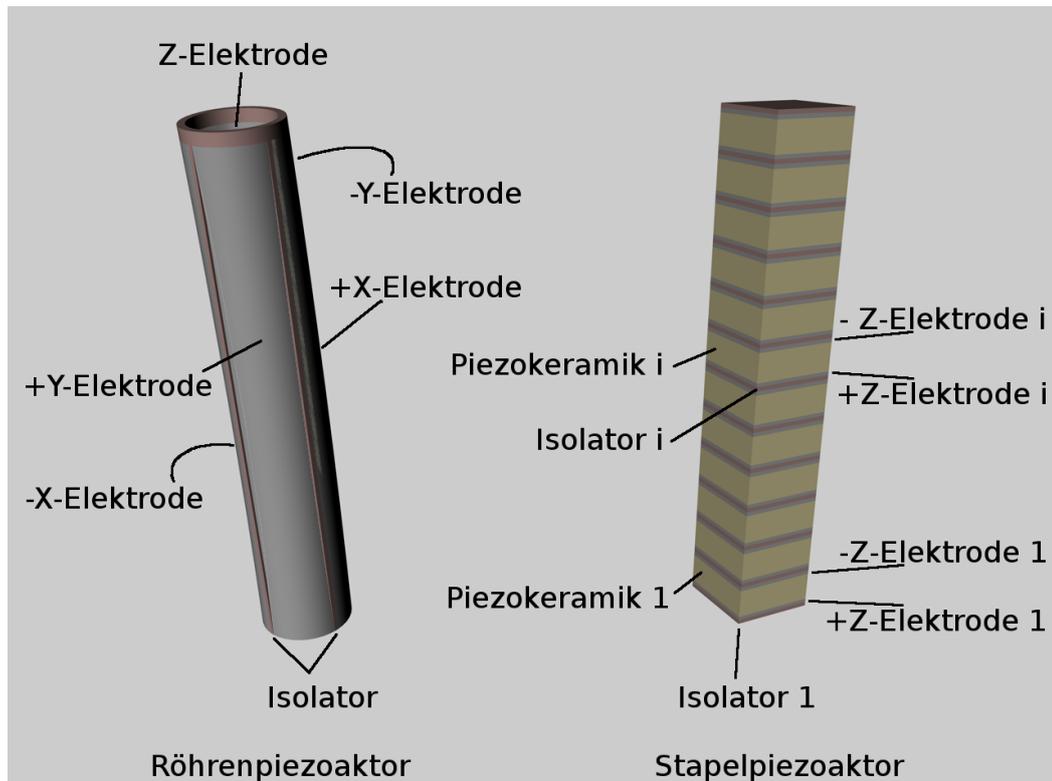


Abbildung 4.6: Schematischer Aufbau der beim AFM eingesetzten Piezoaktortypen. Während mit einem Röhrenpiezoaktor unter Benutzung der Innen- und der vier Außenelektroden Bewegungen in allen drei Raumrichtungen möglich sind, ist der Stapelpiezoaktor lediglich in einer Richtung beweglich, kann dafür durch die wiederholte parallele Beschaltung jedoch größere Stellwege bei gleichzeitig geringeren Spannungen bewältigen.

Mit Röhrenpiezoaktoren ist eine Bewegung in allen drei Raumrichtungen gleichzeitig möglich. Große Scanweiten von über $100 \mu\text{m}$ sind mit ihnen jedoch nicht zu realisieren.

Stapelpiezos dagegen sind piezokeramische Schichtsysteme mit zwischenliegenden, abwechselnd parallel geschalteten Elektroden. Sie können sich stets nur in einer Raumrichtung ausdehnen und zusammenziehen, weshalb für einen Piezoscanner immer mehrere

Stapelpiezos benötigt werden. Oft sind diese gleich in einem x-y-Scantisch für die horizontale Probenpositionierung oder in einem x-y-z-Scantisch sogar für alle drei Raumrichtungen zusammengefasst. Neben der Achsenseparation weisen sie den Vorteil auf, dass mit ihnen auch Scanweiten von weit über 100 μm realisiert werden können.

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Piezoscanner bestehen aus Blei-Zirkonat-Titanat (PZT), dessen maximale relative Ausdehnung vom Faktor 10^{-3} die von natürlich vorkommenden piezoelektrischen Materialien wie Quarz mit 10^{-6} weit übertrifft. Das dynamische Verhalten der Piezoaktoren unterliegt Hysterese, Kriecheffekten, intrinsischen Nichtlinearitäten und Alterungsphänomenen. Daher sind Piezoscanner in der Regel mit kapazitiven Sensoren und einem entsprechenden Regelkreis zur bestmöglichen Korrektur der Fehlpositionierung ausgestattet, was als Closed-Loop-Betrieb bezeichnet wird. Demgegenüber steht der Open-Loop-Betrieb ohne Positionsregelung.

Sowohl am Messkopf als auch an der Messbasis befinden sich Mikrometerschrauben als Positionierelemente für die Laserdiode, die Photodiode, die horizontale Position des Probenhalters und die vertikale Position des Cantileverhalters. Vor Beginn der Messung muss nach Einbau der Probe zunächst der Strahl der Laserdiode auf den Cantilever fokussiert werden, der zu diesem Zweck meist mit einer hochreflektiven Aluminiumbeschichtung versehen wurde. Anschließend ist die Photodiode so zu platzieren, dass sie vom reflektierten Laserstrahl mittig getroffen wird. Im letzten Justierschritt kann die Probe horizontal unter der Messspitze zur Untersuchung der gewünschten Probenstelle verschoben werden und der Cantilever abschließend bis zum direkten mechanischen Kontakt vertikal angenähert werden. Die gesamte Messeinheit befindet sich zum Schutz vor Gebäudeschwankungen oder anderen Vibrationen üblicherweise auf einem schwingungs isolierten Tisch.

Messelektronik

Die Messelektronik, die die Messeinheit und den Messrechner miteinander verbindet, umfasst einen Digital-Signal-Processor (DSP) und ein Field-Programmable-Gate-Array (FPGA), mehrere Hochspannungsverstärker, sowie Digital/Analog- und Analog/Digital-Wandler. Die Elektronik besitzt im Wesentlichen drei Aufgabenbereiche: Die Verarbeitung der am Rechner eingestellten Messparameter, die Verarbeitung der Messwerte, sowie die Spannungsversorgung aller Bauteile der Messeinheit.

Messrechner

Am Rechner sind die Messparameter wie Scanfeldgröße, -geschwindigkeit, -offset, -winkel und Bildauflösung, sowie die Regelkreisparameter Auflagekraft und Regelkreisgeschwindigkeit vor und teilweise auch noch während der Messung einzustellen. Die eingehenden Messsignale werden als Höhenbild mit linearer Farbskala dargestellt, welche nach Beendigung der Messung nachbearbeitet werden. Auf diese Weise ergibt sich je nach gewähltem Messmodus eine Kartierung unterschiedlichster Eigenschaften der untersuchten Probenoberfläche.

5 Large-Scale-AFM zur hochaufgelösten, quantitativen Nano-Mikro-Analytik unterschiedlichster Oberflächenmessgrößen

Im Zuge des gestiegenen Interesses an hochaufgelösten Aufnahmen mit Messbereich bis in die Größenordnung von Millimetern mit quantifizierbaren Ergebnissen wurde in dieser Arbeit ein Large-Scale-AFM-System entwickelt, das sich durch Scanweiten von bis zu 800 μm auszeichnet. Die Messeinheit wurde im Eigenbau realisiert, Messelektronik und Messrechner von der Firma Asylum Research (Santa Barbara, Kalifornien, USA) beschafft. Die Entwicklungsarbeiten wurden im Zusammenhang mit der Diplomarbeit von Herrn Manuel Rothenberger [64] und den Staatsexamensarbeiten von Herrn Tobias Meier [65] und Herrn Henrik Schulz [66] durchgeführt.

Zur Inbetriebnahme des Large-Scale-AFM in der vorgesehenen Größenordnung galt es zunächst geeignete Messparameter und Umgebungsbedingungen zu finden. Das entwickelte AFM wurde an verschiedensten Probensystemen angewendet und hierbei seine Funktionalität hinsichtlich unterschiedlichster Aspekte unter Beweis gestellt. Auf diesen Untersuchungen aufbauend wurde auch die Large-Scale-AFM-Analyse der Benetzungszeit-Abhängigkeit des Tintenübertrags bei der Dip-Pen-Nanolithographie in Kapitel 6.2 durchgeführt. Zudem wurde mit der zusätzlichen Nutzung des Force-Mapping-Mode zur simultanen Kartierung von Topographie und Adhäsionskräften angedeutet, wie die für AFM typischen vielfältigen Messmethoden in einen für AFM neuen Messbereich übertragen werden können. Die Untersuchungen wurden im Zusammenhang mit der Diplomarbeit von Herrn Manuel Rothenberger [64] sowie der Bachelorarbeit von Herrn Manuel Rommel durchgeführt [67].

5.1 Large-Scale-AFM-Messungen in konventionellen Betriebsmodi

Zur Aufnahme von Large-Scale-AFM-Bildern war zunächst die Definition geeigneter Messparameter und geeigneter Umgebungsbedingungen notwendig, da bedingt durch den langen Weg des Cantilevers während der Messung, der im Vergleich zu typischen AFM-Aufnahmen um zwei bis drei Größenordnungen erhöht ist, die Möglichkeit des zwischenzeitlichen Abspringens oder des erhöhten Spitzenverschleißes besteht.

5.1.1 Vorbereitung und Parameter der Messung

Beim Erstellen von Large-Scale-AFM-Aufnahmen empfiehlt sich die Verwendung des Tapping-Modes, weil hierbei durch die Absenz von Scherkräften zwischen Spitze und Probe der Cantileververschleiß am geringsten ausfällt und auch bei einer Scanfeldgröße von 800 μm bei richtiger Wahl der Auflagekraft nicht ins Gewicht fällt [68, 69].

Für die Large-Scale-AFM-Messungen konnten mit dem NSC11 und dem NSC15 der Firma MikroMasch standardmäßige Cantilever-Typen eingesetzt werden. Während der NSC15-Cantilever eine typische Federkonstante von 46 N/m und eine typische Resonanzfrequenz von 325 kHz aufweist, betragen dieselben Größen beim NSC11-Cantilever 48 N/m und 330 kHz [70, 71]. Der NSC15-Cantilever besteht aus einem geraden Balken, der NSC11-Cantilever aus zwei zusammenlaufenden Balken, die zusammen mit dem Rand des Cantileverchips ein Dreieck bilden.

Die standardmäßige Wahl der Messparameter für Large-Scale-AFM-Aufnahmen konnte ebenfalls im Rahmen von Testmessungen abgeschätzt werden. Die Scanfrequenz ist hierbei so einzustellen, dass die Scangeschwindigkeit wie im Normalbetrieb je nach typischen Aspektverhältnissen der zu untersuchenden Probe zwischen 50 $\mu\text{m/s}$ und 100 $\mu\text{m/s}$ liegt. Dies hat auch zur Folge, dass für eine Large-Scale-Aufnahme mehrere Stunden benötigt werden. Weiterhin kann die Auflösung von standardmäßigen 512 x 512 Pixeln auf bis zu 1984 x 1984 Pixel erhöht werden. Eine weitere Erhöhung wäre durch eine Nachrüstung des Messrechner-Arbeitsspeichers von derzeit 2 GB möglich. Die wichtigste Größe bei der Wahl der Messparameter ist die Auflagekraft, die durch Wahl des sogenannten Setpoints eingestellt wird. Ein sehr kleiner Wert bedeutet im Tapping-Mode eine sehr hohe Dämpfung der Cantilever-Schwingung. Je höher die Dämpfung ist, umso eher kann ein Verschleiß der Spitze auftreten. Ein sehr großer Wert bedeutet einen minimalen mechanischen Kontakt des Cantilevers mit der Probenoberfläche und ist mit der Gefahr des vor- oder zwischenzeitlichen Abspringens verbunden. Die Faustregel einen Setpoint von 80 % der Anregungsamplitude zu wählen, stellte sich als nicht ganz ideal dar. Im Large-Scale-Betrieb wurde meist eher in einem Bereich von 70 % gearbeitet, wobei allerdings auch deutlich andere Werte zum Einsatz kamen und somit eine standardmäßige Vorauswahl für diese Größe nicht anzugeben ist. Alle weiteren Messparameter sind wie im Normalbetrieb einzustellen [68, 69].

Da eine Large-Scale-AFM-Messung wie bereits erwähnt in der Regel mehrere Stunden dauert, wurde zur Gewährleistung der Temperaturstabilität und zum Schutz vor weiteren äußeren Einflüssen unmittelbar nach dem Starten der Messung eine Haube über die AFM-Messeinheit gestülpt. Die Verwendung einer simplen Haube aus Schaumstoff führte bereits zu einer signifikanten Verbesserung der Stabilität [68, 69].

Mit dem Large-Scale-AFM-System wurden im Folgenden einige Aufnahmen verschiedener Probensysteme erstellt, die nicht nur Auskunft über die Probenbeschaffenheit, sondern vor allem über die Eigenschaften des Messsystems selbst geben sollten.

5.1.2 Messung topographischer Absolutwerte

In Abbildung 5.1 ist ein AFM-Höhenbild eines EPROM-Speicherchips mit 500 μm Scanweite und 1024 x 1024 Pixeln Auflösung gezeigt, das mit einem vergleichsweise hohen Setpoint von etwa 89 % der Anregungsamplitude aufgenommen wurde [64].

5.1 Large-Scale-AFM-Messungen in konventionellen Betriebsmodi

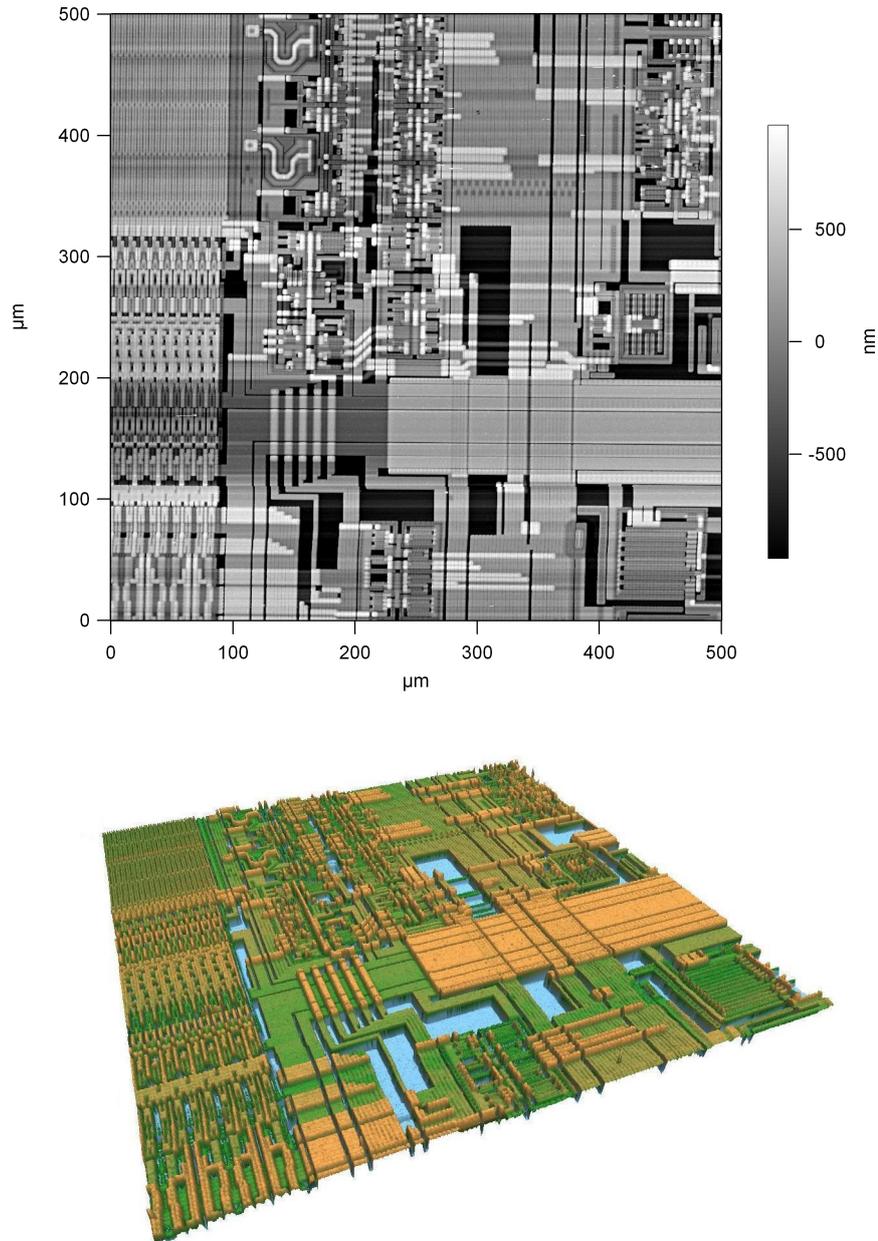


Abbildung 5.1: AFM-Höhenbild und 3D-Visualisierung eines EPROM-Speicherchips mit einer Scanfeldgröße von $500\ \mu\text{m}$. Die abgebildeten Bauelemente und Leiterbahnen der Schaltungen weisen keinerlei Artefakte auf. Trotz Verzicht auf einen Flatten-Prozess liefern Punkte derselben Ebenen identische Höhendaten, was die Messung von topographischen Absolutwerten bestätigt [64].

Die senkrechten, bis zu 2 μm hohen Stufen stellten hohe Anforderungen an den Cantilever und den Regelkreis des z-Piezoscanners, weshalb die Scangeschwindigkeit auf 30 $\mu\text{m}/\text{s}$ reduziert wurde. Die Abbildung zeigt dennoch keinerlei Defekte oder Artefakte. Es ist weder eine Abnahme der Bildqualität während der Messung noch ein zwischenzeitliches Abspringen der Cantileverspitze erkennbar. Sämtliche Bauelemente und Leiterbahnen des Mikrochips sind sehr gut erkennbar. Diese sind in Abbildung 5.1 noch einmal in einer mit Hilfe der gezeigten AFM-Aufnahme erstellten 3D-Darstellung visualisiert. Bei der Nachbearbeitung wurde auf den Flatten-Prozess verzichtet, die unterschiedlichen Scanlinien zu identischen Probenebenen befinden sich dennoch auf gleicher Höhe. Damit sind die Höhen unterschiedlicher Bildpunkte direkt vergleichbar und somit Messungen räumlicher Absolutwerte möglich.

5.1.3 Analyse mittels digitalem oder sequentielltem Zoomen

In Abbildung 5.2 ist ein 400 μm x 400 μm großes AFM-Höhenbild mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Bildpunkten von einer Messingoberfläche gezeigt, in der mittels eines ultrakurzen Laserspulses ein periodisches Lochmuster erzeugt wurde [64].

Die Kraterränder zeigen die Erkaltung des zuvor verflüssigten Messings innerhalb seines damit verbundenen Bewegungsablaufs. Der gezeigte Querschnitt dokumentiert, dass diese Kraterränder bis 10 μm über den Boden der erzeugten Löcher und etwa 3 μm bis 4 μm über die ursprüngliche Messingoberfläche hinausragen. Solch enorme Topographieunterschiede erfordern wie beim eingesetzten Large-Scale-AFM-System realisiert die Nutzung von Stapelpiezoaktoren auch in vertikaler Positionierichtung, da sie bei gleicher Baulänge einen wesentlich höheren Hub im Vergleich zu Röhrenpiezoaktoren erreichen.

Ein großer Vorteil des hohen Messbereichs des Large-Scale-AFM ist die Möglichkeit zunächst Übersichtsbilder von der Probenoberfläche zu erstellen und anschließend in interessierende Bereiche zu zoomen. Dies kann beim hier aufgebauten AFM auf zwei Arten erfolgen. Beim wie in Abbildung 5.3(a) gezeigten digitalen Zoomen auf einen einzelnen Laserkrater wird aufgrund der hohen Auflösung noch immer ein scharfes Bild erzielt. Zum direkten Vergleich ist in Abbildung 5.3(b) eine 100 x 100 μm^2 große AFM-Aufnahme eines solchen Kraters gezeigt, die in Abbildung 5.3(c) in dreidimensionaler Darstellung zu sehen ist [64]. Somit ergeben sich zwei Möglichkeiten der Probenuntersuchung, die bei konventionellen AFM-Systemen in dieser Größenordnung nicht vorhanden sind: Durch die Möglichkeit der Erstellung eines großen, hochaufgelösten Übersichtsscans können interessante Probenstellen erstens durch digitales Zoomen und zweitens durch entsprechende Wahl des Offsets nochmals mit kleinerer Scanfeldgröße untersucht werden.

5.1.4 Untersuchung hierarchischer Strukturen

In Abbildung 5.4 ist eine 200 μm x 200 μm große AFM-Aufnahme eines Arrays aus Mikrolinsen auf einer Glasoberfläche gezeigt [64].

Solche Mikrolinsen können elektromagnetische Strahlung bei Vorliegen einer periodischen Anordnung gezielt beugen und kommen deshalb nicht nur in der Natur als Sinnesorgan von Insekten vor, sondern werden nach künstlicher Herstellung vor allem

5.1 Large-Scale-AFM-Messungen in konventionellen Betriebsmodi

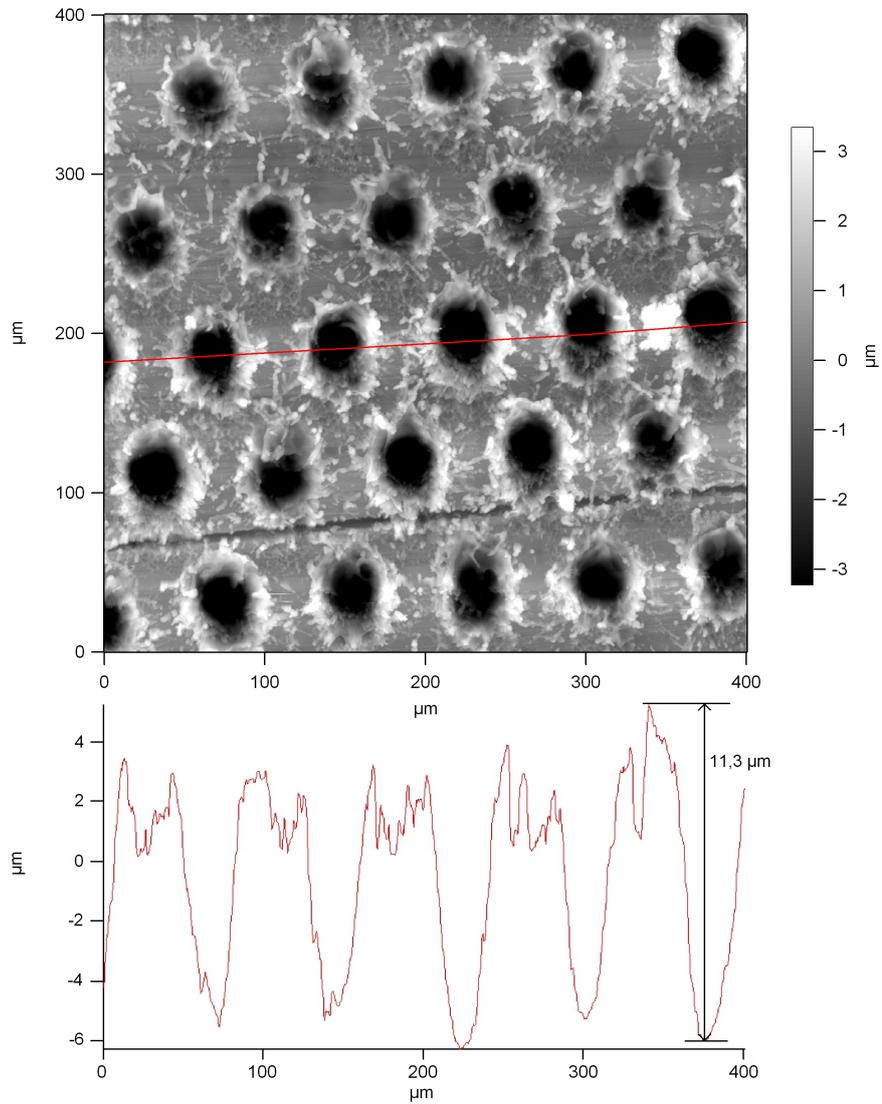
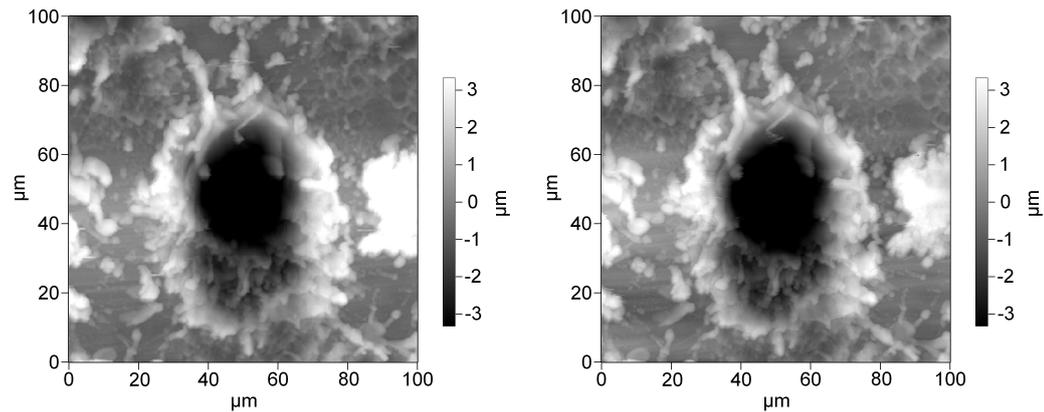
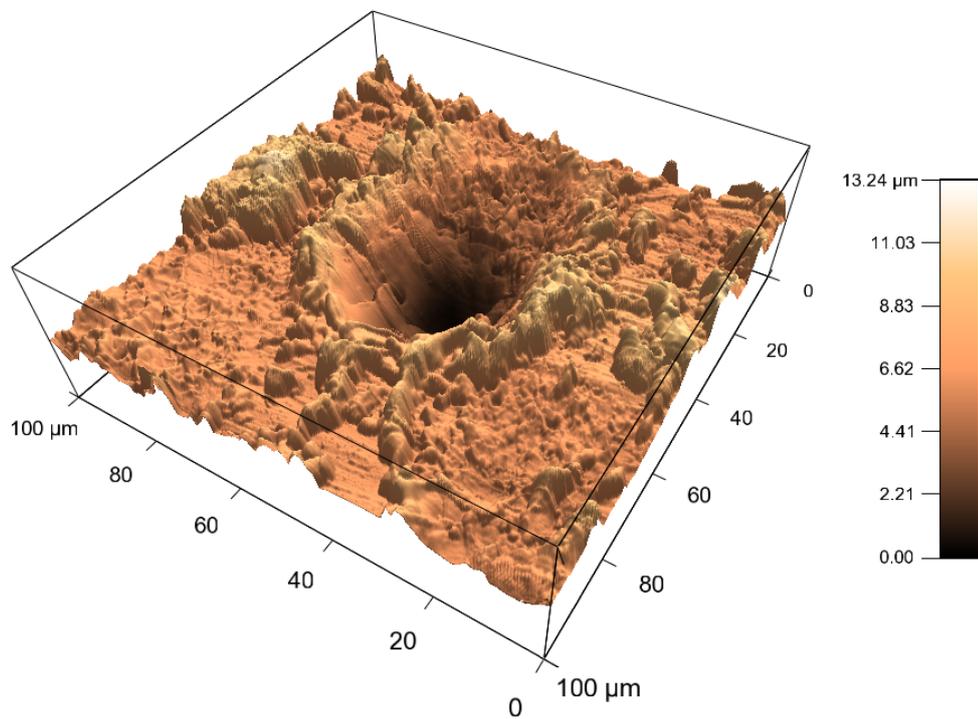


Abbildung 5.2: AFM-Höhenbild einer lokal periodisch per Laserstrahl strukturierten Messingoberfläche mit einer Scanfeldgröße von $400\ \mu\text{m}$. Die im zugehörigen Querschnitt dokumentierten maximalen Topographie-Unterschiede liegen in der Größenordnung von $10\ \mu\text{m}$ und erfordern damit auch in vertikaler Dimension den Einsatz eines Large-Scale-Piezoaktors [64].



(a) Digitales Zoomen

(b) Sequentielles Zoomen



(c) 3D-Visualisierung

Abbildung 5.3: Vergleich der durch digitales und sequentielles Zoomen entstandenen AFM-Höhenbilder einer lokal periodisch per Laserstrahl strukturierten Messingoberfläche mit einer Bildgröße von $100\ \mu\text{m}$. Die Aufnahmen wurden (a) durch digitales Zoomen der in Abbildung 5.2 gezeigten $500\ \mu\text{m}$ großen Aufnahme und (b) durch zielgerichtete Neu-Aufnahme der interessierenden Probenstelle erzeugt. Aufgrund der enormen Auflösung sind bei dieser Größenordnung keine Unterschiede festzustellen, bei noch weiterem Hineinzoomen empfiehlt sich jedoch die zweitgenannte Variante. (c) 3D-Visualisierung des in (b) gezeigten AFM-Höhenbilds [64].

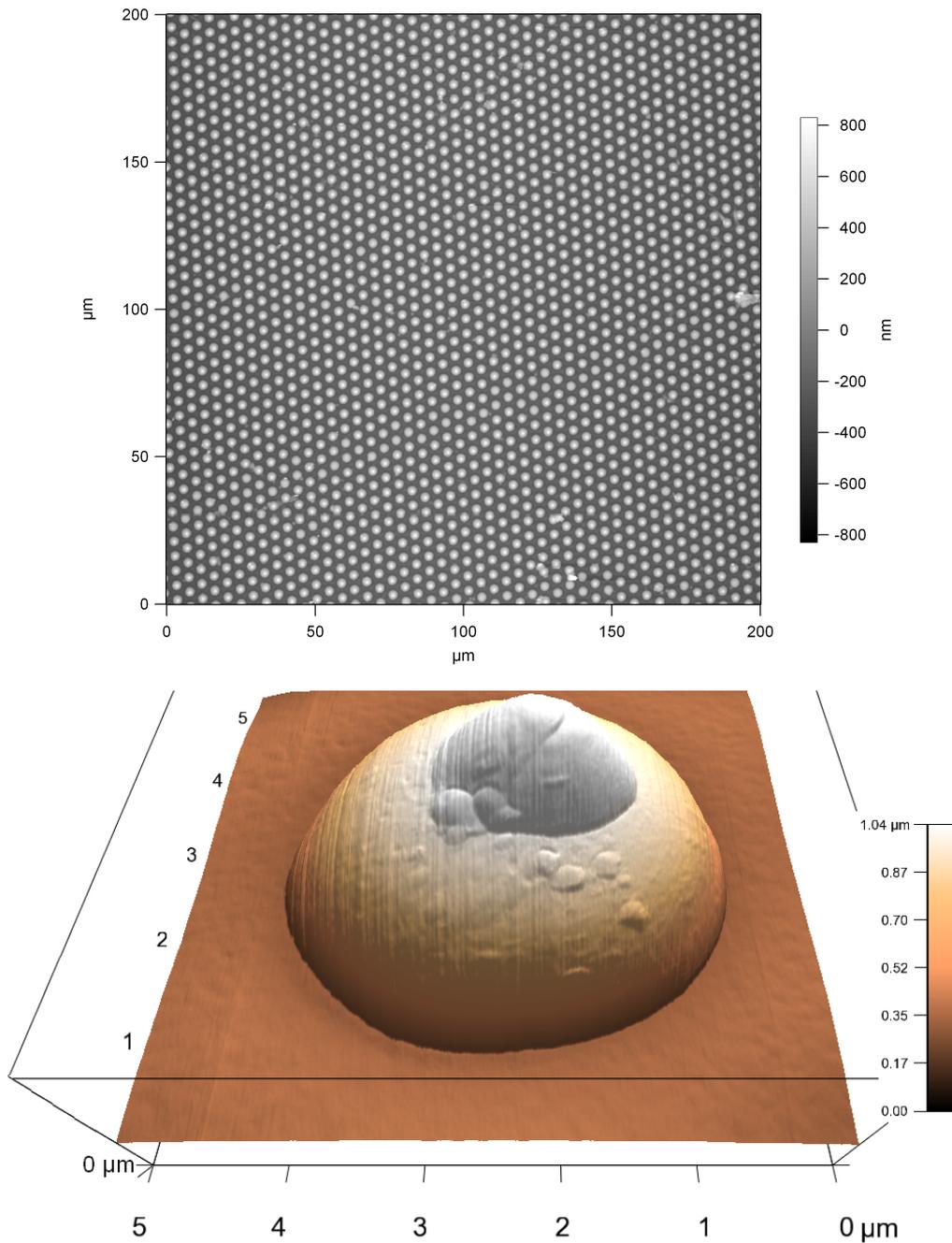


Abbildung 5.4: AFM-Höhenbild und 3D-Visualisierung eines Mikrolinsen-Arrays mit einer Scanfeldgröße von $200\ \mu\text{m}$ beziehungsweise $5\ \mu\text{m}$. Die abgebildeten Linsen folgen einer periodischen Anordnung und erscheinen im Übersichtsbild vollkommen regelmäßig und identisch. In der detaillierteren Betrachtung ist eine differenzierte Oberflächenstruktur mit partiell auftretenden Unebenheiten auf der Linsenoberfläche zu erkennen. Aufgrund der hohen Sensitivität des Large-Scale-AFM ist die systematische Untersuchung solcher hierarchischer Strukturen problemlos möglich [64].

in der Mikroskopie, der Fotografie und der Medizintechnik eingesetzt.

Die Untersuchung dieser Linsen erfolgte bei einer Auflösung von 512×512 Bildpunkten. Die Regelmäßigkeit der zahlreich vorhandenen Linsen ist gut zu erkennen. Die in der unteren Hälfte von Abbildung 5.4 gezeigte AFM-Aufnahme desselben Probenausschnitts mit einer verringerten Scanfeldgröße von $5 \mu\text{m}$ zeigt in der 3D-Visualisierung jedoch auch sehr feine Details wie beispielsweise die unregelmäßig auftretenden Unebenheiten auf der Linsenoberfläche. Das Large-Scale-AFM zeigt demnach auch in der Größenordnung von Nanometern eine hohe Sensitivität und stellt somit das ideale Messinstrument zur Untersuchung solcher hierarchischer Strukturen dar.

5.1.5 In-situ-Untersuchung pflanzlicher Strukturen

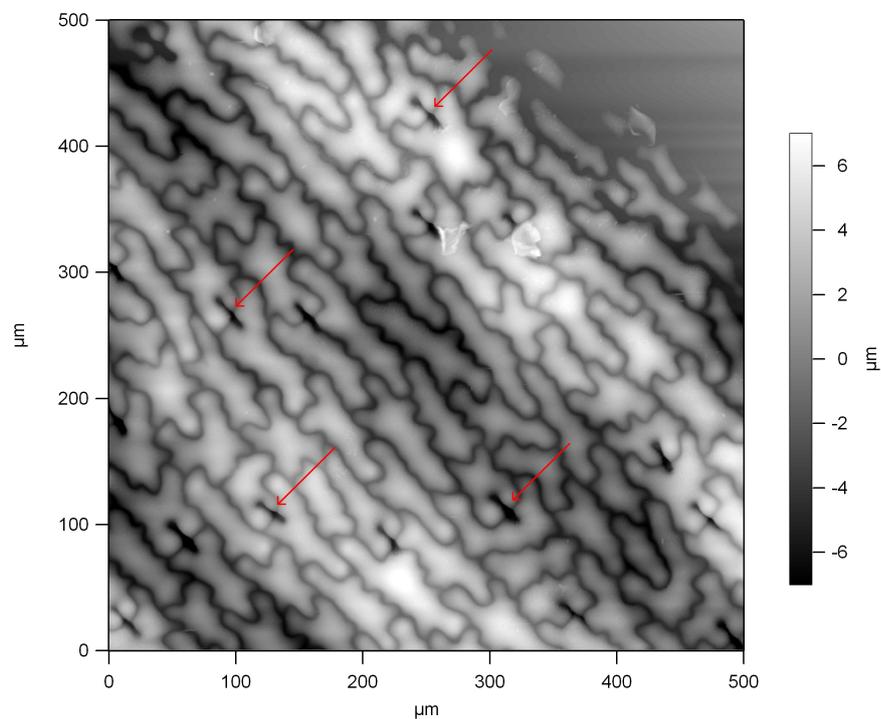


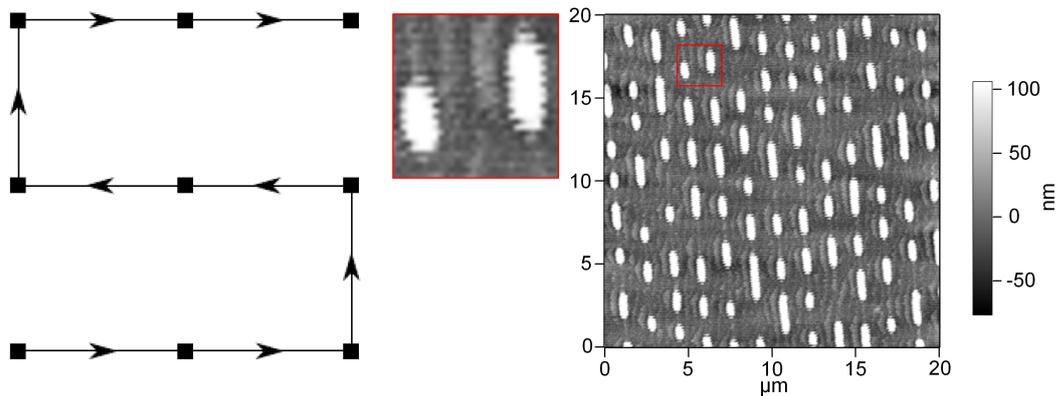
Abbildung 5.5: AFM-Höhenbild einer Blattunterseite der Farnpflanze *Marsilea hirsuta* mit einer Scanfeldgröße von $500 \mu\text{m}$. Die Aufnahme ist trotz der Untersuchung am lebenden Objekt vollkommen fehlerfrei und zeigt insbesondere die Porenstruktur (Pfeile) des Blatts [72].

Abbildung 5.5 zeigt eine $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ große AFM-Aufnahme der Blattunterseite der Farnpflanze *Marsilea hirsuta*. Die von Shengyuan Zhang im Rahmen seiner Diplomarbeit [72] mit einer Auflösung von 1024×1024 Messpunkten erstellte Topographie-Aufnahme zeigt keinerlei Artefakte, obwohl diese in-situ an einer lebenden Pflanze durchgeführt wurde. Gut zu erkennen sind die Porenöffnungen des abgebildeten Pflanzenblattes. Die Untersuchung könnte an einem unter Wasser getauchten Blatt wiederholt werden, um eine potentielle Änderung des Porendurchmessers zu dokumentieren.

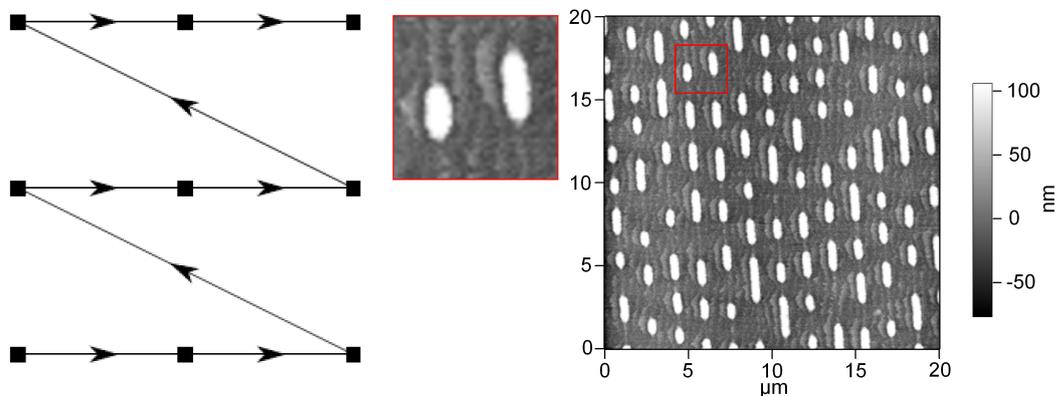
5.2 Kombinierte Large-Scale-AFM-Messungen von Topographie und Adhäsionskraft im Force-Mapping-Mode

5.2.1 Modifizierung des Force-Mapping-Mode

Zur Einführung des bereits im Messprogramm implementierten Force-Mapping-Mode beim in dieser Arbeit entwickelten Large-Scale-AFM-System waren aufgrund der Verwendung von Eigenbau-Komponenten Änderungen in der Software des Messprogramms notwendig, deren Ursache und Behebung hier dokumentiert werden. Es handelt sich um eine Änderung des Rasterwegs, sowie von erlaubtem Messbereich und -geschwindigkeit.



(a) Ursprüngliches Messraster



(b) Geändertes Messraster

Abbildung 5.6: AFM-Höhenbilder einer CD-Unterseite im Force-Mapping-Mode bei unterschiedlichen Messrastern. (a) Beim schematisch dargestellten ursprünglichen Messraster weist das AFM-Höhenbild zwischen den einzelnen Scanlinien jeweils einen deutlichen Versatz auf. (b) Beim geänderten Messraster ist im AFM-Höhenbild zwischen den einzelnen Scanlinien kein Versatz mehr zu erkennen [67].

Im in Abbildung 5.6(a) dargestellten AFM-Höhenbild einer CD-Unterseite ist ein zu behebendes Problem des Force-Mapping-Modes zu erkennen [67]. Entlang der schnellen

Scan-Achse, die in der Aufnahme horizontal ausgerichtet ist, ist zwischen zwei benachbarten Zeilen stets ein Versatz zu beobachten, der von der momentan vorherrschenden Bewegungsrichtung abzuhängen scheint. Zur Beseitigung dieser Fehlerquelle wurde die Reihenfolge der Messpunkte geändert, sodass alle Zeilen in derselben Richtung gerastert werden. Die Auswirkungen dieser Software-Modifizierungen sind im in Abbildung 5.6(b) gezeigten und ebenfalls im Force-Mapping-Mode erstellten AFM-Höhenbild derselben Stelle einer CD-Unterseite demonstriert, in der nun kein Versatz mehr zwischen den einzelnen Scanlinien festzustellen ist [67].

Ein weiteres Ziel lag in der Erhöhung der Messgeschwindigkeit. Die Gesamtzeit t_{ges} , die für eine Aufnahme im Force-Mapping-Mode notwendig ist, berechnet sich näherungsweise über die Formel:

$$t_{ges} = t_z + t_{x,y} \quad (5.1)$$

$$\approx \frac{2 \cdot M \cdot N \cdot d_z}{v_z} + \frac{d_{x,y}}{v_{x,y}} \quad (5.2)$$

$$= \frac{2 \cdot M \cdot N \cdot d_z}{v_z} + \frac{s \cdot M + (M - 1) \cdot \sqrt{s^2 + \left(\frac{s}{M-1}\right)^2}}{v_{x,y}} \quad (5.3)$$

mit der Scanfeldgröße s , der Rasterdistanz $d_{x,y}$, der Kraft-Abstands-Kurven-Distanz d_z , der mittleren x-y-Geschwindigkeit $v_{x,y}$, der z-Geschwindigkeit v_z , der Anzahl von Scan-Linien M und der Anzahl von Scan-Punkten pro Linie N . Es handelt sich um eine Abschätzung, weil der z-Hub aufgrund der Proben-Topographie nicht genau bekannt ist.

Da die laterale Geschwindigkeit $v_{x,y}$ aufgrund der mechanischen Eigenschaften der Piezoaktoren begrenzt ist, wurde testweise die softwareseitige Begrenzung der vertikalen Geschwindigkeit v_z von maximal 2 Hz auf 8 Hz angehoben. Bei anschließenden Testmessungen wurde eine Abnahme der Bildqualität bei einer Geschwindigkeit von über 4 Hz festgestellt. Bei einer Analyse der Steuersignale für die x-, y- und z-Piezoaktoren mit Hilfe eines Oszilloskops stellte sich heraus, dass ab dieser Geschwindigkeit eine zunehmende Anzahl von Messpunkten nicht mehr an der korrekten Stelle, sondern oftmals an derselben Stelle wie zuvor aufgenommen wurde. Messungen bei etwa 4 Hz sind nur dann stabil möglich, wenn die Echtzeitanzeige der Kraft-Abstands-Kurven deaktiviert ist und die Kraft-Abstands-Kurven nicht während sondern erst nach ihrer Aufnahme angezeigt werden. Die Echtzeitanzeige wurde deshalb für Force-Mapping-Aufnahmen deaktiviert [67].

5.2.2 Vorbereitung der Messung im Force-Mapping-Mode

Neben der einmalig zu bestimmenden und daher im Normalfall bereits gespeicherten Kalibrierung des Systems bezüglich der Topographie ist nach dem Einbau des Cantilevers, sowie nach erfolgter Justierung von Laser- und Photodiode noch eine Kalibrierung bezüglich der Adhäsion durchzuführen, um die relativen Werte des bildgebenden Verfahrens auch mit absoluten Werten der jeweils vorherrschenden Adhäsionskraft verknüpfen zu können. Zur Bestimmung dieser Kraft sind die Kenntnis von räumlicher Auslenkung des Cantilevers und dessen Federkonstante unabdingbar. Aus der Annäherungs- oder

Abnäherungsbewegung bei der Aufnahme einer einzelnen Kraft-Abstands-Kurve auf einer möglichst harten Probenoberfläche kann der Zusammenhang zwischen räumlicher Auslenkung des Cantilevers und Deflection-Spannung der Photodiode als linearer Fit berechnet werden. Aus der Aufnahme eines thermischen Spektrums des nicht im Probenkontakt befindlichen Cantilevers kann durch Fitten der Resonanzkurve zusätzlich dessen Federkonstante berechnet werden.

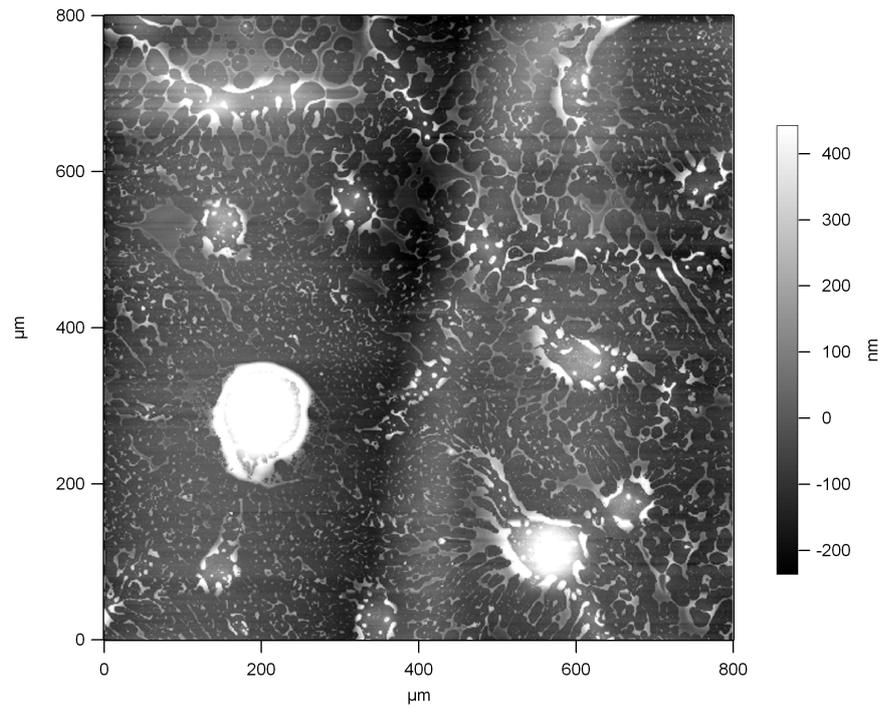
Die Parameter für das Abscannen der Probenoberfläche im Force-Mapping-Mode entsprechen denen konventioneller Betriebsmodi. Scanfeldgröße, mittlere x-y-Geschwindigkeit, Bildauflösung oder Auflagekraft sind in gewohnter Weise zu wählen. Zusätzlich sind die Parameter wie der z-Hub oder die z-Geschwindigkeit einzustellen, die speziell die Kraft-Abstands-Kurven betreffen. Dabei sollte der z-Hub größer sein als die Summe aus der höchsten Erhebung der Probenoberfläche und dem Weg, um den die Spitze auf die Probe gedrückt wird, und die z-Geschwindigkeit wie im letzten Abschnitt erläutert einen Wert von 4 Hz nicht überschreiten.

Die Richtung der meist geringfügigen Verkipfung der zu untersuchenden Probenoberfläche, die durch eine zuvor durchgeführte Messung im Contact-Mode ermittelt werden kann, bestimmt die Scanrichtung. Die Ursache hierfür liegt in der Vermeidung der Beschädigung von Spitze und Probe durch konsequentes Scannen in absteigender Richtung, bei der die Spitze nach jeder Kraft-Abstands-Kurve in jedem Fall wieder weit genug angehoben wird. Lediglich bei kleineren Scanbereichen und ausreichend groß gewähltem z-Hub kann dieser Effekt vernachlässigt werden [67].

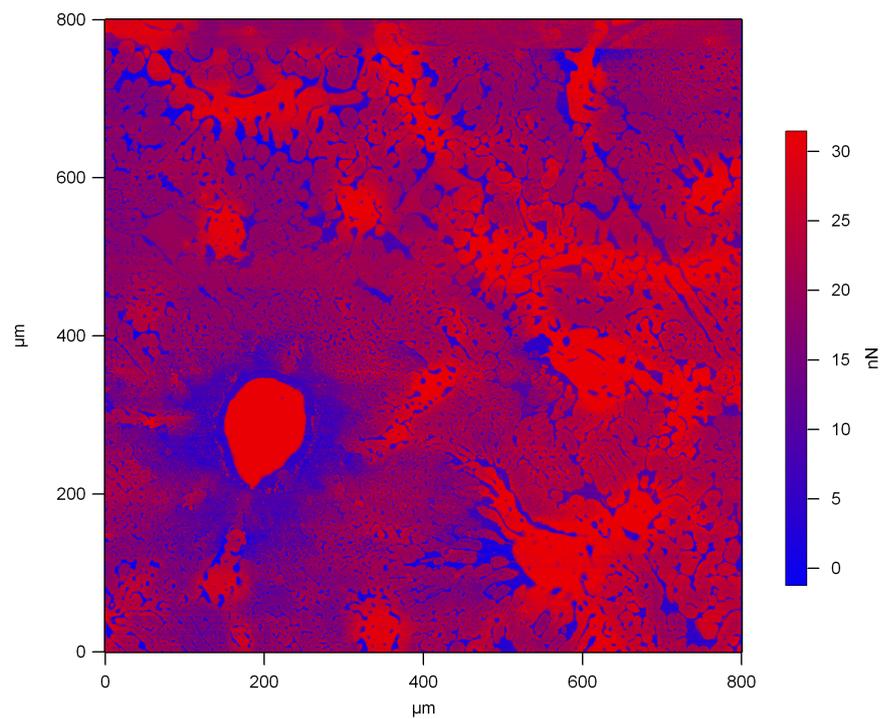
5.2.3 Durchführung der Messung im Force-Mapping-Mode auf ultragroßer Skala

Zur Demonstration des Force-Mapping-Mode in ultragroßen Messbereichen wurde eine mit einem Polymerblend aus Polystyrol (PS) und Polydimethylsiloxan (PDMS) beschichtete Probe untersucht. Die in der Abbildung 5.7 dargestellte AFM-Aufnahme mit Topographie- und Adhäsions-Signal wurde mit folgenden Messparametern erstellt. Die Scanfeldgröße lag bei 800 μm und die Auflösung bei 512 x 512 Bildpunkten. Der z-Hub wurde bei 1,5 μm , die z-Geschwindigkeit bei 4,2 Hz gewählt und der Trigger bei einer 0,5 V entsprechenden Verbiegung ausgelöst. Die Durchführung der Messung dauerte mit diesen Parametern etwa 20 h. Aufgrund der vergleichsweise hohen Geschwindigkeiten wurde die Probe mit einem Klebestreifen auf dem Probenhalter fixiert [67].

Das Höhenbild gibt Aufschluss über die räumliche Ausprägung der Phasenmorphologie, während anhand der Analyse des Adhäsionsbilds zusätzliche Aussagen über den Materialkontrast des Polymerfilms getroffen und die Informationen beider Messkanäle in Bezug zueinander gesetzt werden können. Die tiefer liegenden Bereiche der untersuchten Oberfläche weisen eine deutlich höhere Adhäsion auf und setzen sich demnach aus der stärker haftenden PDMS-Komponente zusammen, während die erhöhten Bereiche mit geringer Adhäsion aus PS bestehen. In den beiden Bereichen, die sowohl hohe Topographie- als auch Adhäsionswerte aufweisen, könnte sich statt der sonst dominierenden lateralen Phasenmorphologie eine Multilage ausgebildet haben, deren oberste Schicht aus PDMS besteht. Die während der Messung wirkenden Adhäsionskräfte zwischen der Cantileverspitze und der Probenoberfläche variieren in einem Bereich von 30 nN. Mit dieser Vorgehensweise kann die Polymer-Phasenmorphologie nicht nur in ih-



(a) Force-Mapping-Höhenbild



(b) Force-Mapping-Adhäsionsbild

Abbildung 5.7: (a) AFM-Höhenbild und (b) AFM-Adhäsionsbild im Force-Mapping-Mode mit einer Scanfeldgröße von 800 μm zur gleichzeitigen Ermittlung von Topographie und Zusammensetzung eines PS-PDMS-Polymerblends. Die Adhäsionskraft im stärker haftenden PDMS-Bereich (violett bis rot) ist um maximal 30 nN größer als im PS-Bereich (blau) [67].

rer räumlichen Struktur, sondern auch in ihrer chemischen Zusammensetzung bestimmt werden. Die gewonnenen Ergebnisse unterstreichen die Eignung des Large-Scale-AFM zur großflächigen Detektion von Materialkontrasten mittels Force-Mapping-Mode.

5.3 Zusammenfassung

Mit dem Large-Scale-AFM wurden Aufnahmen mit Scanfeldgrößen von 800 μm bis hinab zu 5 μm durchgeführt, die die Funktionalität des Large-Scale-AFM in bei der Konzeption vorgesehenen großen Messbereichen, aber auch in für kommerzielle AFM typischen Größenordnungen unterstreichen. Die Topographiewerte mussten hierbei keinem Flatten-Prozess unterzogen werden und die einzelnen Messwerte sind damit als absolut anzusehen und daher direkt miteinander vergleichbar. Es wurde die Möglichkeit aufgezeigt, zunächst ein Übersichtsbild mit großer Scanfeldgröße aufzunehmen und anschließend relevante Probenbereiche entweder durch eine erneute Aufnahme mit kleinerer Scanweite oder durch digitales Zoomen gezielt zu untersuchen, was sich vor allem bei der systematischen Untersuchung hierarchischer Strukturen empfiehlt. Die bei kleinen Scanweiten in der Größenordnung von 1 μm demonstrierte hohe Sensitivität des AFM-Systems (siehe auch Kapitel 7.3) ist es, die ein solches Vorgehen möglich macht.

Die zusätzliche Implementierung durch Modifizierungen der Messsoftware und anschließende großflächige Anwendung des Force-Mapping-Modus zur Ermittlung der zwischen Cantileverspitze und Probenoberfläche wirkenden Adhäsionskräfte durch die zusätzliche Aufnahme von Kraft-Abstands-Kurven kann als erster Schritt zur Übertragung der für AFM typischen vielfältigen Messmethoden in einen für AFM neuen Messbereich angesehen werden.

6 Large-Scale-AFM zur Analyse des Tintenübertrags bei der Dip-Pen-Nanolithographie von Phospholipiden

Bei der Dip-Pen-Nanolithographie (DPN) ist der Tintentransport neben der verwendeten Molekülsorte vor allem von den Umgebungsbedingungen wie der relativen Luftfeuchtigkeit und den Schreibparametern wie der Benetzungszeit abhängig. Mit der DPN-Apparatur ist es zwar ohne weiteres möglich und auch üblich Strukturen auf einer Gesamtfläche von über 1 mm^2 zu schreiben, jedoch unmöglich diese auch zu analysieren. Die DPN-Positioniereinheit, die in der Regel wie auch das in dieser Arbeit aufgebaute Large-Scale-AFM räumlich entkoppelte Stapelpiezoaktoren enthält, verfügt nicht über die für eine bildhafte Analyse notwendige Genauigkeit. Andere Analysemethoden mit passendem Messbereich verfügen nicht über die Möglichkeit der quantitativen Vermessung der Probenstrukturen in allen drei Raumdimensionen bei gleichzeitig hoher Auflösung. Während mit einem konventionellen AFM zwar die hochaufgelöste Aufnahme und Vermessung der Probenoberfläche möglich ist, beträgt dessen Scanbereich jedoch maximal $0,01\text{ mm}^2$. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Large-Scale-AFM dagegen ist die hochaufgelöste Vermessung der Oberflächenstrukturen mit nur einer einzigen Aufnahme möglich, wodurch sich die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Probenstrukturen erhöht und die Gefahr von Messfehlern verringert. Besonders im Hinblick auf die für die kommerzielle Anwendung gewünschte hohe Regelmäßigkeit der geschriebenen Strukturen ist dieser Aspekt von enormer Bedeutung. Die Untersuchungen wurden im Zusammenhang mit den Bachelorarbeiten von Herrn Marco Pfirrmann [68] und Herrn Johannes Sachs [69] durchgeführt.

6.1 DPN-Erstellung von Phospholipid-Punktmustern

Mit Dip-Pen-Nanolithographie wurden Lipid-Strukturen des Moleküls DOPC mit variierenden Benetzungszeiten in einem Bereich von etwa 1 mm^2 geschrieben, die anschließend mit dem entwickelten Large-Scale-AFM untersucht wurden. Die Strukturierung wurde am Institut für Nanotechnologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harald Fuchs durch Herrn Falko Brinkmann und Herrn Dr. Michael Hirtz durchgeführt. Die DPN-Lithographie-Methode soll zunächst kurz vorgestellt werden, um dann näher auf die speziellere Strukturierung mit Lipiden einzugehen.

6.1.1 Funktionsprinzip der Dip-Pen-Nanolithographie (DPN)

Eine der AFM-Strukturierung sehr ähnliche Methode der Oberflächenlithographie [73] ist die 1999 von Piner et al. vorgestellte Dip-Pen-Nanolithographie [74], bei der eine oder mehrere mit einer bestimmten Molekülsorte benetzte Cantileverspitzen im Kontakt zur Probenoberfläche ein gewünschtes Muster abfahren. Dabei werden die Moleküle in schmalen Streifen auf die Oberfläche übertragen. Das Verfahren stellt demnach eine Übersetzung des klassischen Schreibvorgangs mit Feder und Tinte in den Mikro- oder sogar Nanometerbereich dar.

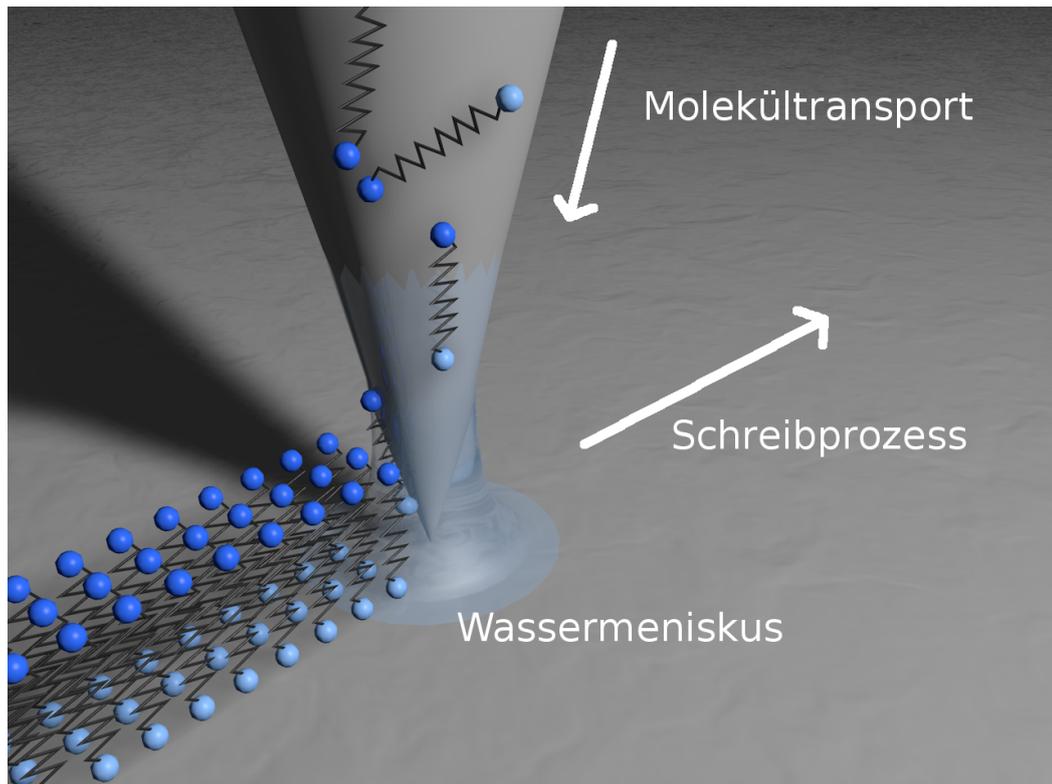


Abbildung 6.1: Schematisches Funktionsprinzip der DPN. Eine mit einer als Tinte bezeichneten Molekülsorte benetzte Cantileverspitze fährt in direktem Kontakt mit der Probenoberfläche ein gewünschtes Muster auf dieser ab, wobei die Tintenmoleküle über den vor allem von der Luftfeuchtigkeit abhängigen Wassermeniskus übertragen werden. Nach [74].

Der Schreibvorgang wird durch das auch Dipping genannte Eintauchen der einzelnen Cantileverspitzen in ein Reservoir vorbereitet, das mit einer speziellen Molekülsorte befüllt ist, die ihrem Funktionszweck entsprechend als Tinte bezeichnet wird. Danach wird zunächst überschüssiges Material abgestreift und die Spitzen anschließend mit der Probenoberfläche in Kontakt gebracht [75]. Die Tinte wird durch den Wassermeniskus zwischen Spitze und Probe kontinuierlich auf deren Oberfläche übertragen [74]. Durch die laterale Bewegung der Probe lassen sich mit dieser Technik wie in Abbildung 6.1 dargestellt beliebige Muster erzeugen [75]. Die Ausdehnung der geschriebenen Strukturen wird neben der Wahl der Tintensorte vor allem durch den beschriebenen Wassermeniskus

beeinflusst, wobei dessen Breite und Aufenthaltsdauer an einer bestimmten Probenstelle entscheidend sind. Die Breite des Meniskus wird neben der Spitzengeometrie vor allem durch die Luftfeuchtigkeit bestimmt. Die Aufenthaltsdauer, die bei den im Folgenden untersuchten Punktmustern auch als Benetzungszeit bezeichnet wird, kann individuell gesteuert werden.

Für die Dip-Pen-Nanolithographie existieren zahlreiche Anwendungsgebiete. Für biologische und medizinische Untersuchungen ist die Erstellung von biofunktionellen Oberflächen von besonderem Interesse. Durch Beimischung von Enzymen oder Antikörpern zur eigentlichen Trägertinte ist die Erzeugung von Biosensoren möglich, die durch die Verwendung verschiedener Tinten für verschiedene Spitzen auch ortsselektiv sein können. Auf diese Weise wurde beispielsweise die Untersuchung von Blutproben auf HIV möglich. Dazu wurden die DPN-Spitzen in Tinten mit unterschiedlichen Antikörpern getaucht und mit ihnen ein ortsselektives Antikörper-Muster auf die Probenoberfläche geschrieben. Nach Aufbringen der Blutprobe konnten die Antigene mit HIV infizierter Zellen in den mit den passenden Antikörpern versehenen Bereichen mit dem AFM nachgewiesen werden [76].

6.1.2 Phospholipide als DPN-Tinte

An die als DPN-Tinte einzusetzende Molekülsorte sind einige Anforderungen gestellt. Während des Eintauchvorgangs soll sie die Spitze und während des Schreibvorgangs soll sie die Probenoberfläche benetzen. Anschließend soll ihre räumliche Struktur weitestgehend erhalten bleiben. Für biofunktionelle Anwendungen wie in dieser Untersuchung muss sie außerdem mit zusätzlichen biologischen Substanzen kombinierbar sein, so dass die geschriebenen Muster eine bestimmte chemische Funktionalität besitzen [77, 78]. Als besonders geeignet hat sich in diesem Zusammenhang die Verwendung von Phospholipiden gezeigt, wobei das in dieser Arbeit verwendete 1,2-Dioleoyl-syn-glycero-3-phosphocholin (DOPC) als Standard-Trägertinte für biologische DPN-Anwendungen anzusehen ist. Seine Strukturformel ist in Abbildung 6.2 dargestellt.

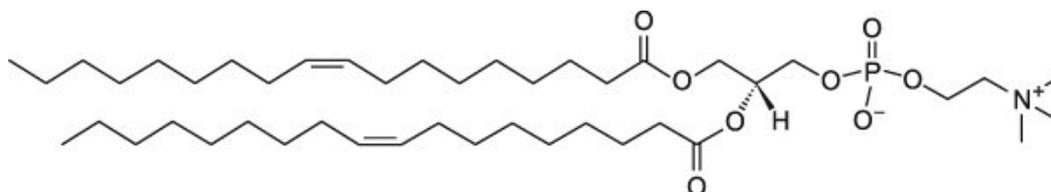


Abbildung 6.2: Strukturformel des als DPN-Tinte verwendeten DOPC-Moleküls. Dieses zeigt, dass die beiden hydrophoben Alkanketten und die hydrophile Phosphordiestergruppe für die Amphiphilie des Moleküls verantwortlich sind.

Unter Lipiden versteht man Naturstoffe, die aufgrund ihrer langen Kohlenwasserstoffketten größtenteils hydrophob sind. Zahlreiche Lipide besitzen zusätzlich eine hydrophile Kopfgruppe und sind damit amphiphil, weshalb sie in polaren Lösungsmitteln Mizellen oder Membranen bilden. Lipide können in zahlreiche Untergruppen eingeteilt werden, zu denen neben den als Fette bezeichneten Triglyceriden auch die in dieser Arbeit verwendeten Phospholipide zählen. Diese sind aus den erwähnten hydrophoben Kohlenwasserstoffketten und einer hydrophilen Phosphorsäurediestergruppe aufgebaut.

Die deshalb in wässriger Lösung abgesehen von Mizellen und Liposomen entstehenden Lipid-Doppelschichten sind Grundlage für die Bildung von Biomembranen.

Die mit DOPC geschriebenen DPN-Strukturen sind demnach aus übereinander liegenden Lipid-Doppelschichten aufgebaut. Durch ihre hydrophile Kopfgruppe haften sie sowohl an der polaren Cantileverspitze aus oberflächlich oxidiertem Silizium als auch auf dem verwendeten polaren Glassubstrat. Die Viskosität von DOPC ist von der relativen Luftfeuchtigkeit abhängig, da es insbesondere bei einer Feuchtigkeit von 42 % einen Phasenübergang zwischen der festen und flüssigen Phase gibt. Aus diesem Grund wird das Dipping bei etwa 70 % und der Schreibprozess bei 45 % bis 65 % relativer Luftfeuchte durchgeführt. Zur Herstellung möglichst kleiner Strukturen ist es jedoch möglich auch noch bei Luftfechtigkeiten von unter 42 % zu schreiben, da DOPC keinen perfekten Festkörper bildet [79]. Um die Stabilität der geschriebenen Strukturen zu gewährleisten, sind diese anschließend bei Luftfechtigkeiten von unter 40 % aufzubewahren. Da diese Voraussetzung bei einer AFM-Messung durch die allgemeine Wetterlage bedingt nicht immer erfüllt sein kann, sollte die Messung zumindest möglichst zeitnah zur Herstellung erfolgen.

6.1.3 Phospholipid-Punktmuster mit variabler Benetzungszeit

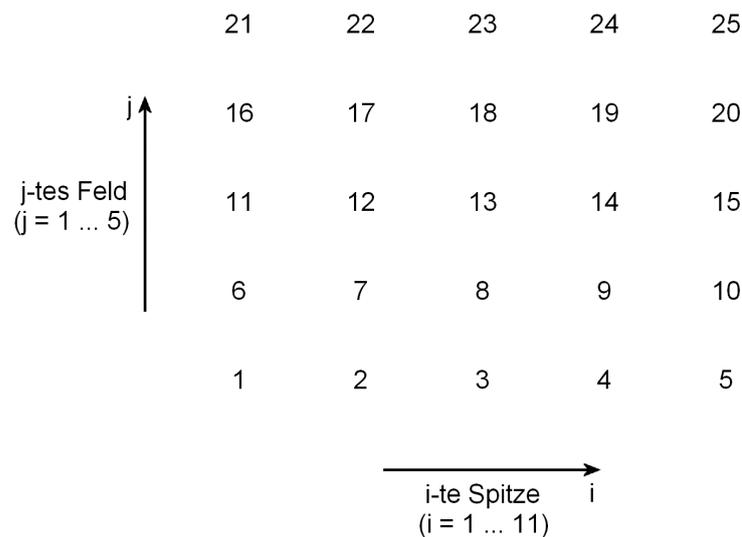


Abbildung 6.3: Schematische Schreibreihenfolge der Lipid-Punkt-Probe mit variabler Benetzungszeit. Die geschriebenen Strukturen sind in quadratischen Feldern aus jeweils 25 Punkten angeordnet, die zeilenweise von unten nach oben und innerhalb der Zeilen von links nach rechts geschrieben wurden. Jeder zu einer bestimmten Benetzungszeit gehörende Probenteil wurde mit elf DPN-Spitzen aus jeweils fünf solchen Feldern erstellt.

Zur Untersuchung der Regelmäßigkeit und der Benetzungszeitabhängigkeit des Tintenübertrags bei der DPN wurde mit dem NLP2000-System der Firma NanoINK (Skoie, Illinois, USA) und der Standardtinte DOPC ein Punktmuster auf einem Glassubstrat geschrieben, wobei die relative Luftfeuchtigkeit permanent bei 35 % lag und demgegenüber die Schreibparameter variiert wurden. Das geschriebene Muster wurde in drei

Teile untergliedert, wobei die Benetzungszeit für den ersten Teil bei 1,0 s, für den zweiten bei 0,5 s und für den dritten bei 0,1 s gewählt wurde. Jeder Teil gliedert sich zudem in jeweils fünf Felder, innerhalb derer die Punkte entsprechend einer quadratischen Matrix mit fünf Zeilen und fünf Spalten angeordnet sind. Die Punkte wurden dabei wie in Abbildung 6.3 dargestellt Zeile für Zeile von unten nach oben und innerhalb einer Zeile stets von links nach rechts geschrieben. Die Kenntnis der Schreibreihenfolge ist für die spätere Auswertung unerlässlich, da der Volumenverlauf während des Schreibprozesses ermittelt werden sollte. Neben der Benetzungszeit ist auch die Wartezeit zwischen dem Schreiben der einzelnen Punkte ein zu berücksichtigender Schreibparameter. Zwischen den verschiedenen Probesteilen ist sie länger als zwischen den verschiedenen Feldern desselben Probesteils. Der gesamte Prozess wurde nicht nur mit einer Cantileverspitze, sondern parallel mit elf Spitzen durchgeführt. Auf diese Weise entstand ein etwa 1,15 mm langes und 0,71 mm breites Muster aus elf Reihen mit jeweils drei Probesteilen aus je 125 Punkten, das mit dem in dieser Arbeit aufgebauten Large-Scale-AFM systematisch untersucht wurde.

6.2 Large-Scale-AFM-Analyse von Phospholipid-Punktmustern auf der Millimeterskala

Die DOPC-Lipid-Punkte, die mittels DPN mit variierenden Benetzungszeiten in einem Bereich von etwa 1 mm^2 geschrieben wurden, sollten auf ihr Volumen hin untersucht werden. Dabei wurden systematische Abhängigkeiten der Benetzungszeit, der Verweilzeit zwischen individuellen Schreibpunkten und die Abweichungen von Schreibspitze zu Schreibspitze untersucht.

6.2.1 Einsatz des Large-Scale-AFM zur Erhöhung von Messgenauigkeit und statistischer Absicherung

Für die Volumenuntersuchung des mittels DPN großflächig geschriebenen DOPC-Punktmusters stellt das entwickelte Large-Scale-AFM die ideale Analyseverfahren dar. Dies liegt zum einen an der mit der AFM-Aufnahme verbundenen Vermessung der Probenstrukturen, wobei im Gegensatz zu anderen Messmethoden insbesondere auch deren jeweilige Höhe ermittelt wird. Zum anderen verlangt die typische Größe solcher Biosensoren den Einsatz eines Messgeräts mit adäquatem Scanbereich. Mit dem Punktmuster der Größe von $1,15 \text{ mm} \times 0,71 \text{ mm}$ ist das in dieser Arbeit entwickelte Large-Scale-AFM mit einem Scanfeld von $800 \mu\text{m} \times 800 \mu\text{m}$ bestens für diese Untersuchung geeignet.

Durch die Möglichkeit alle Probenstrukturen mit nur einer Aufnahme vermessen zu können, ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei der Auswertung deutlich erhöht und auch die Gefahr von Messfehlern deutlich verringert. Es werden beispielsweise alle Strukturen mit derselben Cantileverspitze mit nahezu gleichbleibender Beschaffenheit, sowie bei vergleichbarer Luftfeuchtigkeit gemessen, die einen großen Einfluss auf die Gestalt der geschriebenen Lipid-Punkte besitzt. Um den strukturierten Bereich zu analysieren, wären selbst mit einem für konventionelle AFM großen Scanbereich von $100 \mu\text{m}$ mindestens 64 Abbildungen notwendig. Im Gegenzug wird durch die Erfassung von insgesamt

4125 Lipid-Punkten, die parallel mit elf Spitzen geschrieben wurden, eine aussagekräftige Statistik erzielt.

6.2.2 Durchführung von Large-Scale-AFM-Messungen zur Ermittlung mittels DPN mit variabler Benetzungszeit geschriebener Phospholipid-Volumina

Um die Volumina von mit verschiedenen Benetzungszeiten geschriebenen DOPC-Punkten quantitativ zu untersuchen, wurde die wie im Kapitel 6.1 beschrieben hergestellte Punktmuster-Probe mit dem im Rahmen dieser Arbeit aufgebauten Large-Scale-AFM im Tapping-Mode untersucht. Da die gesamte geschriebene Struktur eine Größe von 1,15 mm x 0,71 mm aufwies, wurden zwei AFM-Aufnahmen mit einer Scanfeldgröße von jeweils 800 μm durchgeführt, die in Abbildung 6.4 gezeigt sind. Die erste Aufnahme umfasst den ersten und zweiten Probeneteil, die zweite Aufnahme den dritten Probeneteil [68, 69].

Aufgrund der enormen Gesamtstrukturbreite von etwa 710 μm war eine genaue Justierung der Probe vor Beginn der Messung notwendig, um die langsame Scanachse parallel zur ursprünglichen Hauptschreibrichtung auszurichten. Um zusätzlich zwei Probenstücke mit einer Aufnahme abzudecken, musste die Probe zudem so positioniert werden, dass die Messung nahezu an derselben Stelle wie der Schreibvorgang gestartet wurde. Dazu wurden ein über der Messeinheit aufgebautes Lichtmikroskop verwendet und kurze Testmessungen zur Kontrolle der Probenausrichtung als Hilfsmittel eingesetzt. Bei der Durchführung der Messung wurde auf die Erfahrungen aus den im letzten Kapitel beschriebenen Testmessungen zurückgegriffen. Die Analyse wurde mit Hilfe eines NSC11-Cantilevers durchgeführt. Bei der Wahl der Messparameter wurde die Scangeschwindigkeit auf etwa 50 $\mu\text{m}/\text{s}$, die Auflösung auf 1536 x 1536 Pixel eingestellt. Durch die exakte Probenjustierung war es möglich den Scanoffset und den Scanwinkel auf null zu setzen und damit den gesamten Scanbereich auszunutzen. Bei der Einstellung der Regelkreisparameter mussten zwei gegensätzlichen Aspekten Rechnung getragen werden. Einerseits durfte die Cantileverspitze unter keinen Umständen in die Lipid-Tropfen eintauchen, da dies unweigerlich eine dauerhafte Verschmutzung der Messsonde und damit eine deutliche Verschlechterung der Bildqualität, sowie große Ungenauigkeiten bei der Vermessung der Punkte nach sich gezogen hätte. Andererseits ist wie bereits mehrfach erwähnt bei AFM-Messungen mit ultragroßem Scanweg die Möglichkeit eines zwischenzeitlichen oder sogar endgültigen Abspringens der Cantileverspitze von der Probenoberfläche nicht zu vernachlässigen. Daher wurde bei der Wahl der Auflagekraft erst nach zahlreichen Versuchen der für diese Analyse ideale Setpoint von 60 % der Anregungsamplitude gefunden. Die Regelkreisgeschwindigkeit wurde standardmäßig bei laufender Messung auf den optimalen Wert gestellt. Nach Beginn der Messung wurde der Messeinheit wieder eine Haube zum Schutz vor Vibrationen oder Temperaturschwankungen übergestülpt [68, 69].

Die beiden auf diese Weise entstandenen AFM-Aufnahmen lassen bereits einige qualitative Aussagen über den zuvor erfolgten Schreibprozess zu. Zunächst ist auffällig, dass sich der Tintenübertrag der einzelnen Spitzen teils drastisch unterscheidet, obwohl sie alle dieselben Spezifikationen aufweisen. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist die ungleichmäßige Benetzung der einzelnen Spitzen. Außerdem ist zu erkennen, dass

6.2 Large-Scale-AFM-Analyse von Phospholipid-Punktmustern auf der Millimeterskala

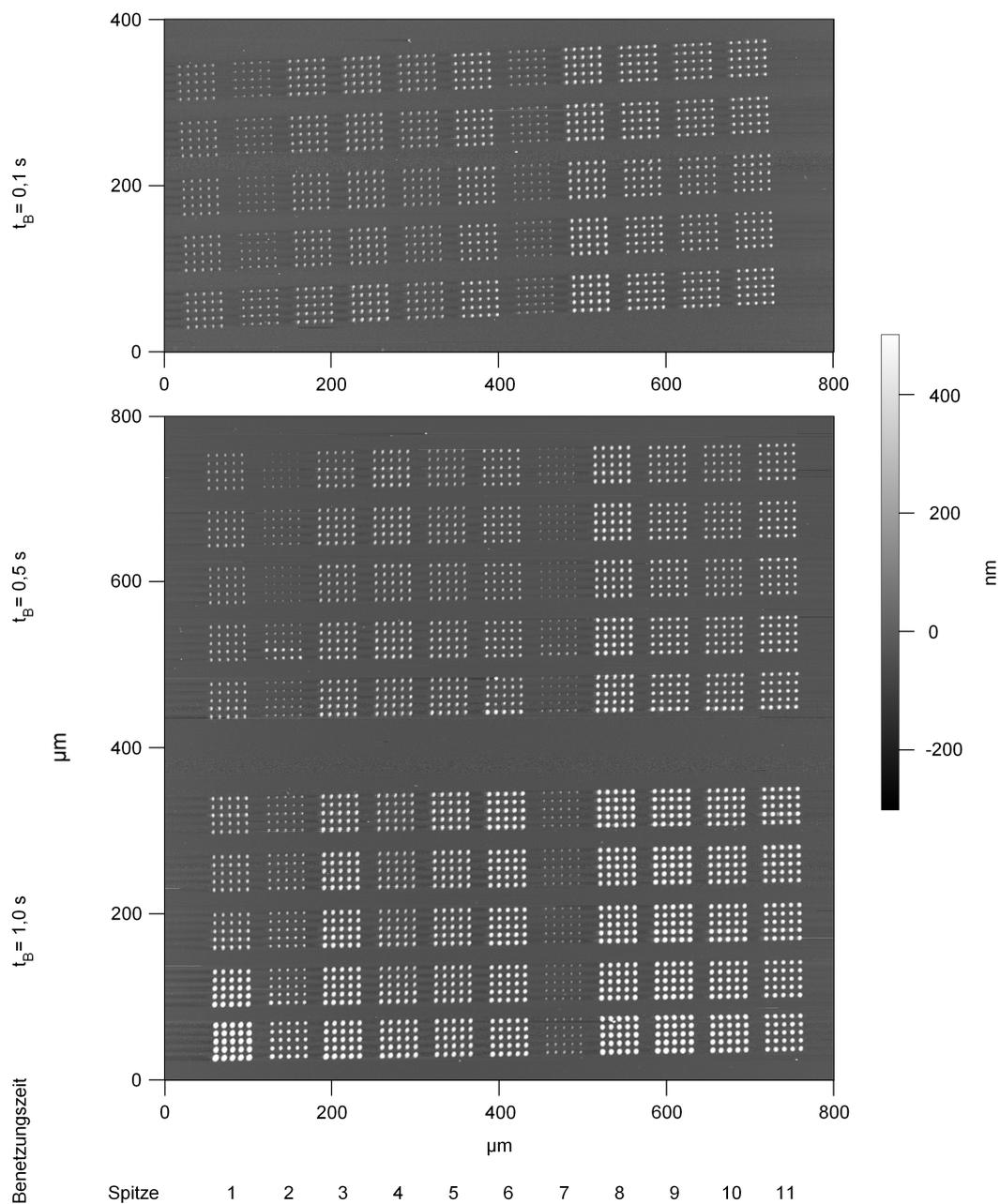


Abbildung 6.4: AFM-Höhenbilder der Lipid-Punkt-Probe mit variabler Benetzungszeit t_B mit Scanfeldgrößen von $800 \mu\text{m}$. Die drei Probenteile wurden mittels DPN mit Benetzungszeiten von $1,0 \text{ s}$, $0,5 \text{ s}$ beziehungsweise $0,1 \text{ s}$ geschrieben. Es ist bereits entsprechend der abnehmenden Benetzungszeit der Trend in Schreibreihenfolge abnehmender Lipid-Volumina zu erkennen. Außerdem variiert der Tintenübertrag von Spitze zu Spitze. Bei der zweiten und siebten Spitze ist dieser deutlich geringer als bei den anderen Spitzen. Die hohe Genauigkeit bei der Messung der Lipid-Punkte ist anhand des 3D-Zooms in Abbildung 6.5 gut nachzuvollziehen, der sich aus der unteren der beiden AFM-Aufnahmen ergibt [68, 69].

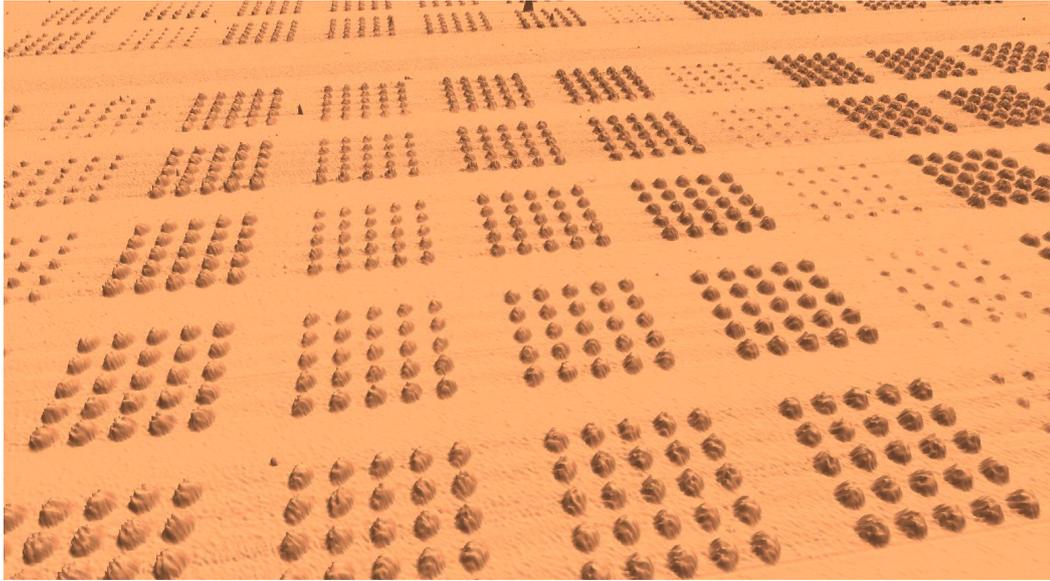


Abbildung 6.5: 3D-Visualisierung des bereits in Abbildung 6.4 dargestellten AFM-Höhenbilds der Lipid-Punkt-Probenspitze mit variabler Benetzungszeit. Die Regelmäßigkeit der im ersten Probenteil geschriebenen Strukturen ist ebenso zu erkennen wie der geringe Tintenübertrag der zweiten und siebten Spitze. Die feine Rauigkeit der Lipid-Punkt-Oberflächen konnte durch die AFM-Messung mit $800\ \mu\text{m}$ Scanweite wiedergegeben werden, was für eine hohe Genauigkeit bei der anschließenden Volumenanalyse spricht [68, 69].

die Höhe und zum Teil auch der Durchmesser der geschriebenen DOPC-Punkte von Probenteil zu Probenteil geringer wird. Das Volumen der Punkte des ersten Probenteils, der mit einer Benetzungszeit von 1 s geschrieben wurde, ist um einiges größer als das der Punkte des dritten Probenteils, der mit einer Benetzungszeit von nur 0,1 s erstellt wurde. Damit scheint die Benetzungszeit das übertragene Lipid-Volumen wie erwartet in starkem Maße zu beeinflussen. Zudem nehmen Höhe und Durchmesser der Punkte auch im Verlauf eines einzigen Probenteils ab. Dies könnte jedoch nicht nur daran liegen, dass der Tintenübertrag proportional zu der noch der Spitze anhaftenden Tintenmenge ist, sondern auch an der Möglichkeit eines zusätzlichen Einflusses der Wartezeit zwischen den einzelnen Punkten. Die 3D-Darstellung in Abbildung 6.5 verdeutlicht durch ihre vergrößerte Darstellung der Lipid-Punkte die hohe Genauigkeit bei deren Vermessung im Zuge der AFM-Aufnahmen aus Abbildung 6.4.

Eine umfangreiche Auswertung der mit den AFM-Abbildungen einhergehenden Daten wird in den folgenden Abschnitten durchgeführt, um obige Aussagen auch quantitativ belegen zu können. Dabei wird vor allem der Einfluss der Benetzungszeit, der Wartezeit und die Abweichungen individueller Spitzen untersucht.

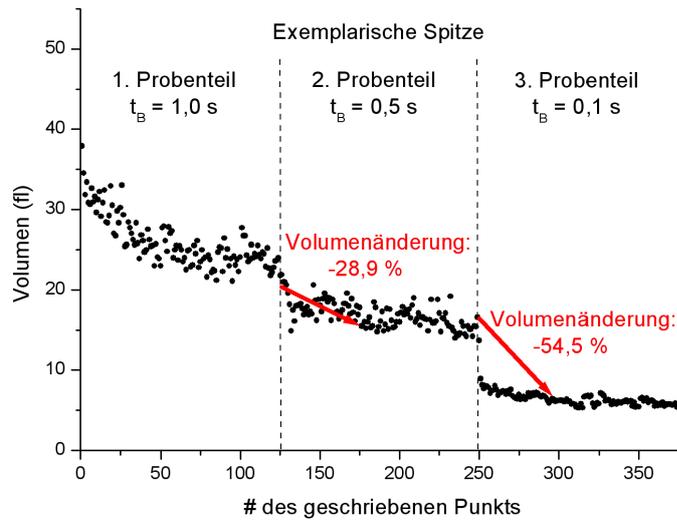


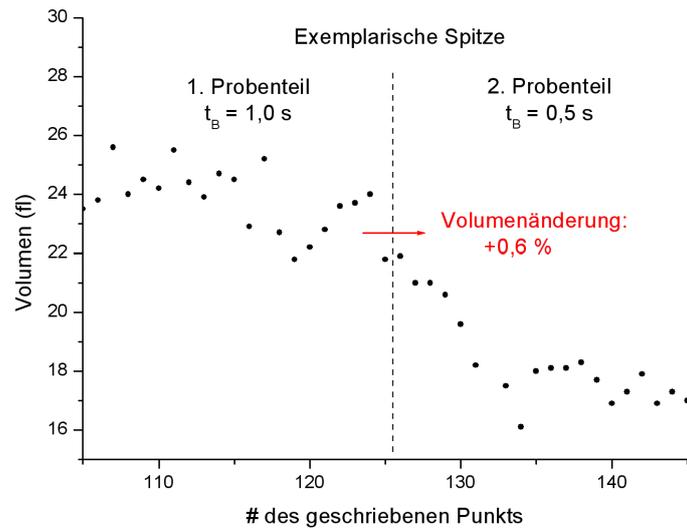
Abbildung 6.6: Schaubild des gesamten Verlaufs der geschriebenen Lipid-Volumina für eine exemplarische Spitze über alle Probenteile hinweg und damit für alle drei Benetzungszeiten t_B . Dieser zeigt eine insgesamt deutliche Abnahme, die nicht nur unmittelbar nach Verringerung der Benetzungszeit erfolgt. Beim Übergang vom zweiten zum dritten Probenteil, bei dem die Benetzungszeit um 80 % reduziert wird, ist die Abnahme unmittelbar zu erkennen, beim Übergang vom ersten zum zweiten Probenteil mit nur 50 % Benetzungszeit-Reduzierung erst nach einigen weiteren Punkten. Die Reduzierung beträgt nach den jeweils ersten 50 Punkten des neuen Probenteils 28,9 % beziehungsweise 54,5 %. Gezeigt sind alle Probenteile der achten Spitze.

6.3 Ermittlung von Benetzungszeit-Abhängigkeit und Regelmäßigkeit des DPN-Phospholipid-Übertrags

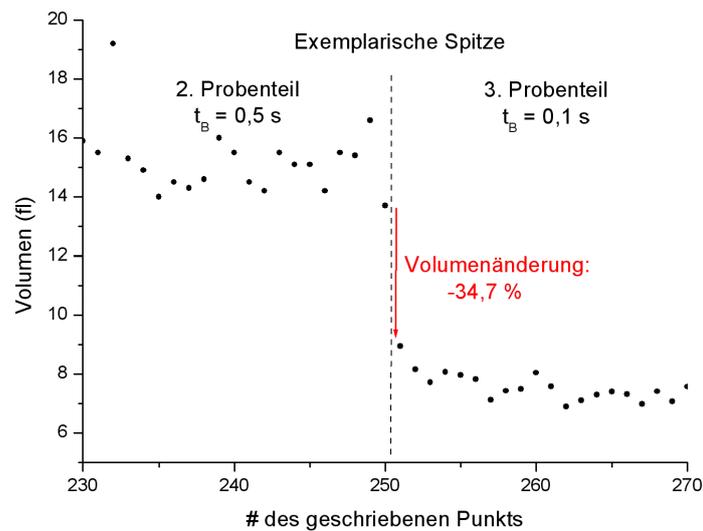
Die weitere Auswertung der im Zuge der beiden Large-Scale-AFM-Aufnahmen gewonnenen Daten wurde mit Hilfe des Open-Source-Programms Gwyddion durchgeführt, das unter anderem Volumenberechnungen nach Auslesen der entsprechenden Höhendaten ermöglicht. Dazu wurden die einzelnen Punkte des geschriebenen Musters Pixel für Pixel markiert und somit sämtliche Höhendaten ermittelt. Nach der Festlegung eines Referenzpunktes auf der umliegenden Ebene des abgebildeten Glassubstrats wurde das Volumen jedes einzelnen Punktes berechnet und die resultierenden Werte der Schreibreihenfolge entsprechend sortiert, um den zeitlichen Ablauf der Punktvolumina dokumentieren zu können [68,69].

6.3.1 Einfluss der variierenden Benetzungszeit

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der geschriebenen Lipidstrukturen von der Benetzungszeit wurden die Volumenverläufe über alle drei Probenteile der jeweiligen Spitze betrachtet. In den Abbildungen 6.6 und 6.7 ist der Verlauf über alle von der achten



(a)



(b)

Abbildung 6.7: Schaubild des Verlaufs der geschriebenen Lipid-Volumina für eine exemplarische Spitze an den Übergängen zwischen einzelnen in Abbildung 6.6 gezeigten Probenteilen und damit bei Änderungen der Benetzungszeit t_B . (a) Bei der Halbierung der Benetzungszeit von 1,0 s auf 0,5 s wird die Abnahme des Tintenvolumens erst nach einigen weiteren geschriebenen Punkten deutlich. Zwischen den beiden Randpunkten ist sogar eine Zunahme um 0,6 % zu verzeichnen. (b) Bei der noch deutlicheren Abnahme der Benetzungszeit von 0,5 s auf 0,1 s ist die Abnahme des Tintenvolumens sofort zu erkennen und liegt bei 34,7 % zwischen den Randpunkten. Gezeigt sind die Übergänge aller Probenteile der achten Spitze.

Spitze geschriebenen Probenteile gezeigt, bei denen die Benetzungszeit bei 1 s, 0,5 s und 0,1 s lag.

Insgesamt ist eine deutliche Abnahme des Tintenvolumens erkennbar, die nicht nur unmittelbar nach Verringerung der Benetzungszeit auftritt. Zwischen dem zweiten und dritten Probenteil ist zwar eine deutliche Abnahme des Punktvolumens feststellbar, die zwischen dem ersten und zweiten Teil jedoch nicht unmittelbar zu erkennen ist. Während das Volumen des 251. Punktes nur noch 34,7 % desjenigen des vorangegangenen Punktes aufweist, liegt das Volumen des 126. Punktes sogar bei 100,6 % seines Vorgängers [68,69].

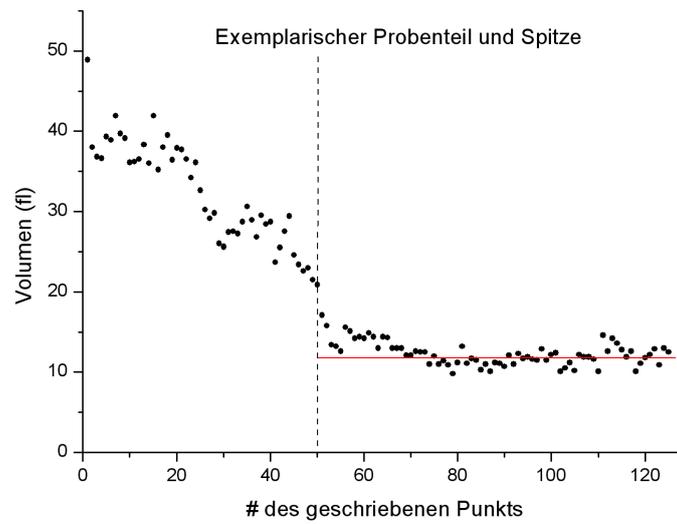
In allen drei Probenteilen ist zudem eine deutliche Abnahme des Volumens im ersten Drittel mit einem anschließend nahezu konstanten Niveau zu erkennen. Eine mögliche Ursache dieses Effekts ist die erhöhte Wartezeit zwischen dem Schreiben einzelner Punkte, wie sie bei der Einstellung einer neuen Benetzungszeit und damit beim Übergang zwischen zwei Probenteilen auftritt. Eine mit der Benetzungszeitabnahme einhergehende Volumenabnahme könnte durch das verlängerte Nachfließen von Tinte ans untere Ende der DPN-Spitze überlagert werden. Die Reduzierung der Benetzungszeit liegt beim Übergang zwischen den ersten beiden Probenteilen bei 50 % und beim Übergang zwischen den letzten beiden Probenteilen sogar bei 80 %. Daher findet die Volumenabnahme bei letzterem Übergang unmittelbar nach der Änderung statt und wird nun nicht mehr durch die zusätzliche Wartezeit beim Wechsel des Probenteils kompensiert.

Um den Einfluss der variierenden Wartezeit im Hinblick auf die Analyse der Benetzungszeit-Abhängigkeit isolieren zu können, soll dieser im Folgenden genauer untersucht werden.

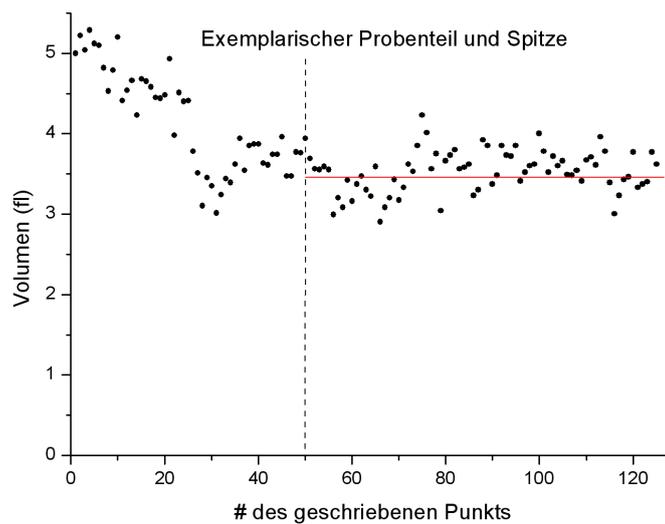
6.3.2 Effekte der variierenden Wartezeit

Zur genaueren Untersuchung der durch punktuelle Variation der Wartezeit auftretenden Effekte wurden zunächst die Volumenverläufe für jede Spitze und jeden Probenteil separat betrachtet. In Abbildung 6.8 sind exemplarisch die nach der Schreibreihenfolge sortierten Volumina der Lipid-Punkte des mit der ersten Spitze erstellten ersten Probenteils und des mit der vierten Spitze geschriebenen dritten Probenteils dargestellt. Der Verlauf beschreibt zunächst einen steilen Abfall, bevor er in ein konstantes Plateau übergeht, das jeweils durch die eingezeichnete Regressionsgerade verdeutlicht wird. Während beispielsweise das Verhältnis zwischen Startvolumen und Plateaувolumen von Spitze zu Spitze und von Probenteil zu Probenteil variieren kann, ist allen Schaubildern der charakteristische Knick nach etwa 50 von insgesamt 125 geschriebenen Punkten gemein. Dieser wird mittels der gestrichelten Geraden in den Schaubildern hervorgehoben. Eine mögliche Interpretation des ermittelten Volumenverlaufs ist die Existenz einer Relation zwischen Tintenübertrag und an der Spitze haftender Tintenmenge. Damit ist jedoch nicht die gesamte Tintenmenge gemeint, sondern diejenige, die sich am untersten Ende der Spitze befindet und auch von der Wartezeit zwischen dem Schreiben der einzelnen Punkte abhängt. Dies würde erklären, warum der verstärkte Tinentransport zu Beginn jedes Probenteils zu beobachten ist und nicht nur beim allerersten.

Diese Vermutung wird auch durch das in der Abbildung 6.9 dargestellte Schaubild des Volumenverlaufs des mit der vierten Spitze geschriebenen ersten Probenteils bestätigt. Nach dem 25., 50., 75. und 100. Punkt ist stets ein kurzzeitiger Anstieg des Volumens zu erkennen, der durch die eingezeichneten Pfeile verdeutlicht wird. Diese Punkte markie-



(a)



(b)

Abbildung 6.8: Schaubild des Verlaufs der geschriebenen Lipid-Volumina in exemplarischen Probenteilen, in denen stets ein charakteristisches Muster erkennbar ist. Nach einem steilen Abfall im Bereich der ersten beiden Felder eines jeden Probenteils pendeln die Volumina innerhalb der übrigen drei Felder um ein konstantes Niveau herum, wobei sich der Übergang zwischen beiden Bereichen um den 50. Punkt herum befindet. Gezeigt sind (a) der erste Probenteil der ersten Spitze, sowie (b) der dritte Probenteil der vierten Spitze.

6.3 Benetzungszeit-Abhängigkeit und Regelmäßigkeit des DPN-Phospholipid-Übertrags

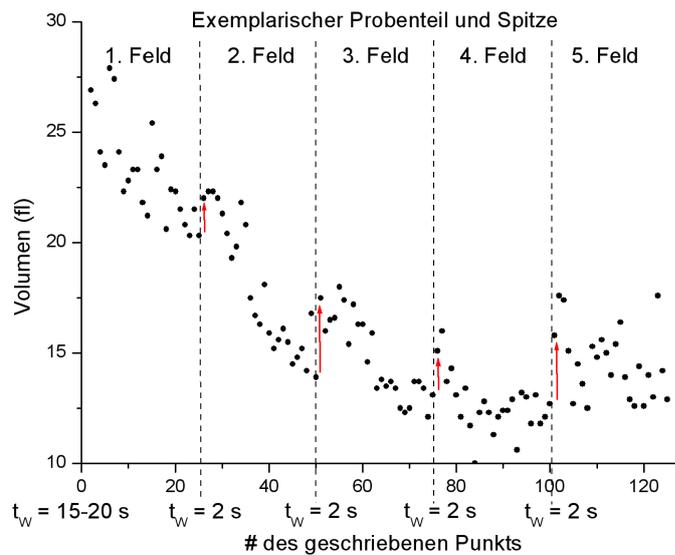


Abbildung 6.9: Schaubild des detaillierten Verlaufs der geschriebenen Lipid-Volumina in einem exemplarischen Probesteil, in dem ein zusätzliches charakteristisches Muster erkennbar ist. Im Anschluss an jedes der geschriebenen Felder innerhalb eines Probesteils ist ein kurzzeitiger Anstieg des Lipid-Volumens bemerkbar (Pfeile). Die Ursache hierfür ist die punktuell von 0,5 s auf 2 s erhöhte Wartezeit. Der bereits erläuterte steile Abfall zu Beginn des Probesteils resultiert aus der erhöhten Wartezeit t_W von 15-20 s. Im letzten Feld ist ein zusätzlicher Anstieg des übertragenen Volumens zu erkennen, der durch einen nachlaufenden Tropfen oder Probenheterogenitäten verursacht worden sein könnte. Gezeigt ist der erste Probesteil der vierten Spitze.

ren gerade die Übergänge zwischen den einzelnen Feldern des jeweiligen Probesteils, an denen die Wartezeit im Vergleich zu den restlichen Punkten - abgesehen vom allerersten Punkt jedes Probesteils - mit etwa 2 s statt 0,5 s erhöht ist und sich somit der angestellten Vermutung gemäß mehr Tinte im unteren Bereich der Spitze ansammeln kann. Vor dem Schreiben eines neuen Probesteils ist die Wartezeit mit 15 s bis 20 s nochmals deutlich höher, so dass deren Auswirkungen zu aller erst sichtbar werden [68, 69].

Diese Ergebnisse sind konsistent mit den anhand der Abbildungen 6.6 und 6.7 gestellten Interpretationen. Ein verstärktes Nachfließen von Tinte während der zu Beginn jedes Probesteils punktuell erhöhten Wartezeit kann eine gleichzeitige Verringerung der Benetzungszeit ganz oder zumindest teilweise kompensieren. Um diesen Effekt im Hinblick auf die Analyse der Benetzungszeit-Abhängigkeit bestmöglich zu minimieren, wurden bei der weiteren Auswertung die ersten 50 Punkte eines jeden Probesteils nicht mehr berücksichtigt, sondern nur noch die Volumina des konstanten Niveaus [68, 69].

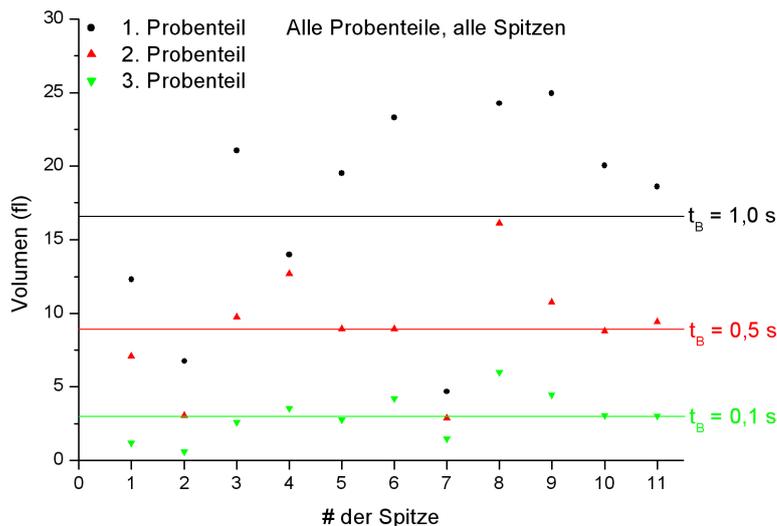


Abbildung 6.10: Schaubild der Mittelwerte der geschriebenen Lipid-Volumina aller Spitzen und Probenstücke und damit aller Benetzungszeiten t_B . Die jeweils ersten 50 Punkte wurden nicht berücksichtigt, da deren Volumina aufgrund der verlängerten Wartezeit erhöhte Werte besitzen. Die Mittelwerte für die mit 1,0 s, 0,5 s und 0,1 s Benetzungszeit geschriebenen Probenstücke liegen bei 17,2 fl, 8,9 fl und 3,0 fl. Gerade der letzte Wert ist für die Annahme eines proportionalen Zusammenhangs zwischen übertragenem Tintenvolumen und gewählter Benetzungszeit etwas zu hoch.

6.3.3 Quantitative Auswertung der Benetzungszeit-Abhängigkeit des übertragenen Volumens

Zur quantitativen Erfassung des in die geschriebenen Punkte übertragenen Lipid-Volumens wurden für die drei zu den unterschiedlichen Benetzungszeiten zugehörigen Probenstücke zunächst für jede Spitze separat und anschließend für alle Spitzen zusammen die jeweiligen Mittelwerte der Volumina berechnet und in Abbildung 6.10 in einem gemeinsamen Schaubild dargestellt. Dabei wurden wie bereits erwähnt nur die Punkte 51 bis 125 des konstanten Niveaus nach Abklingen des durch die Wartezeit zwischen den Probenstücken verursachten, erhöhten Tintenübertrags berücksichtigt. Die Wartezeit zwischen den einzelnen Punkten hängt nicht von der gewählten Benetzungszeit, sondern von der lateralen Verschiebung und vor allem vom vertikalen Sicherheitsstellweg ab, der in der Regel größer ist als die seitliche Translation. Beide Parameter wurden für alle drei unterschiedlichen Benetzungszeiten konstant gehalten, weshalb auch die Wartezeit als konstant anzusehen ist.

Für den ersten Probenstück mit einer Benetzungszeit von 1 s ergab sich ein durchschnittliches Lipid-Punkt-Volumen von $17,2 \pm 6,9$ fl, für den mit 0,5 s Benetzungszeit geschriebenen zweiten Teil ein Durchschnittsvolumen von $8,9 \pm 3,8$ fl und für den dritten mit einer Benetzungszeit von 0,1 s erstellten Probenstück ein mittleres Volumen von $3,0 \pm 1,6$ fl [68, 69]. Die Mittelwerte der jeweiligen Probenstücke sind in Abbildung 6.10 als waagerechte Gerade dargestellt.

6.3 Benetzungszeit-Abhängigkeit und Regelmäßigkeit des DPN-Phospholipid-Übertrags

Der Verlauf der Mittelwerte weist auf eine Proportionalität zwischen dem übertragenen Punktvolumen und der Benetzungszeit hin. Bei einem durchschnittlichen Volumen von 17,2 fl im ersten Probenanteil wären bei den mit auf 50 % bzw. auf 10 % reduzierter Benetzungszeit geschriebenen Probenanteilen dementsprechend Durchschnittswerte von 8,6 fl bzw. 1,7 fl zu erwarten. Während diese Forderung für den zweiten Probenanteil fast exakt erfüllt wird, ist der Mittelwert des dritten Bereichs um etwa 75 % zu groß. Dieses Messergebnis steht jedoch nicht im unmittelbaren Widerspruch zum angenommenen proportionalen Zusammenhang, da die tatsächliche Benetzungszeit stets etwas größer ist als die eingestellte Benetzungszeit. Dies liegt daran, dass zusätzlich zu der Zeit, während derer sich die Spitze in Ruhe und in direktem Kontakt zur Probenoberfläche befindet, nochmals eine Zeitspanne hinzukommt, während der die Spitze bis zu ihrer Endposition auf der Oberfläche angenähert wird und dabei bereits Tinte überträgt. Da diese Annäherungszeit im Bereich von wenigen Zehntelsekunden liegt, ist ihr Einfluss bei einer reinen Benetzungszeit von 0,1 s am deutlichsten wahrnehmbar und das gemessene Durchschnittsvolumen an dieser Stelle erhöht.

t_B (s)	V (fl)
1,0	17,2
0,5	8,9
0,1	3,0

Tabelle 6.1: Durchschnittliches Volumen V der mittels DPN übertragenen Lipid-Punkte für unterschiedliche Benetzungszeiten t_B .

Wird unter Berücksichtigung dieser zusätzlichen Benetzung allgemeiner von einer linearen, statt von einer proportionalen Abhängigkeit zwischen Tintenübertrag V und Benetzungszeit t_B ausgegangen, ergibt sich zwischen ihnen der Zusammenhang

$$V = k \cdot t_B + V_0 \quad (t_B > 0), \quad (6.1)$$

wobei die Flussrate $k = 15,8 \pm 0,5$ fl/s und das von der zusätzlichen Benetzung während der Spitzenannäherung verursachte Mindestvolumen $V_0 = 1,3 \pm 0,3$ fl bei Verwendung von DOPC als Tinte bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 35 % Gültigkeit besitzen.

Die im folgenden Abschnitt thematisierte Unregelmäßigkeit im Tintenübertrag verschiedener Spitzen ist bereits in Abbildung 6.10 zu erkennen, weshalb zusätzlich die Flussraten der Spitzen mit minimalem und maximalem Tintentransport separat ermittelt wurden. Diese liegen bei $k = 6,9 \pm 0,4$ fl/s für die zweite Spitze und bei $k = 20,1 \pm 2,6$ fl/s für die achte Spitze. Für die einzelnen Spitzen wurde hierfür wiederum eine lineare Abhängigkeit angenommen. Dieser Ansatz ist gerechtfertigt, da trotz der starken Schwankungen zwischen verschiedenen Spitzen das Verhältnis der drei Mittelwerte einzelner Spitzen mit Ausnahme der vierten Spitze jeweils gewahrt ist. Die Abhängigkeit der Flussrate von der Spitzenbenetzung und der Luftfeuchtigkeit könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

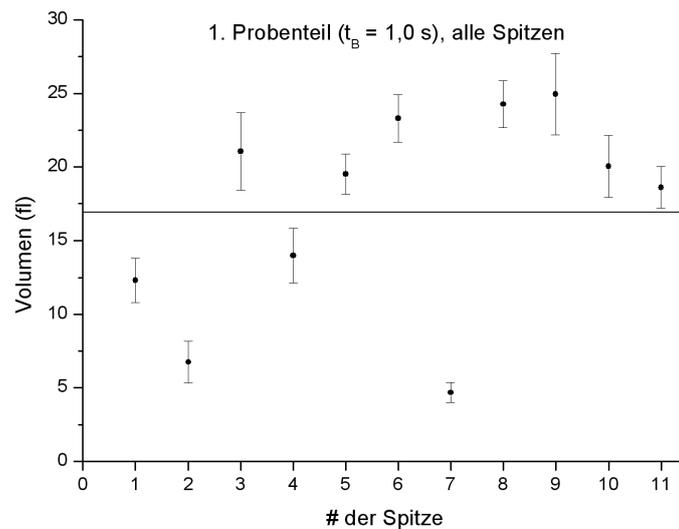


Abbildung 6.11: Schaubild der Mittelwerte und Standardabweichungen der Lipid-Volumina des ersten, mit einer Benetzungszeit t_B von 1,0s geschriebenen Probesteils für alle Spitzen. Die jeweils ersten 50 Punkte wurden nicht berücksichtigt, da deren Volumina aufgrund der verlängerten Wartezeit erhöhte Werte besitzen. Die Durchschnittswerte der zweiten und siebten Spitze weichen vom Mittelwert aller Spitzen am weitesten nach unten, die der achten und neunten Spitze am weitesten nach oben ab. Die zweite Spitze weist bezüglich ihrem Mittelwert die größte prozentuale Standardabweichung auf, die achte Spitze die kleinste.

6.3.4 Quantitative Auswertung der Regelmäßigkeit des übertragenen Volumens

Im ersten Probesteil, der mit einer Benetzungszeit von 1s geschrieben wurde und dessen statistische Auswertung in Abbildung 6.11 dargestellt ist, weist die achte Spitze mit 6,6 % die geringste relativ zum Mittelwert ausgedrückte Standardabweichung auf, während die zweite Spitze mit 21,0 % die größte Abweichung liefert. Selbst in der zugehörigen AFM-Aufnahme in der Abbildung 6.4 ist zu erkennen, dass die zweite Spitze zusammen mit der siebten Spitze die geringsten Punktvolumina übertragen hat. Möglicherweise ist also die schlechte Benetzung der Spitze beim Dipping-Prozess vor dem eigentlichen Schreibvorgang die Ursache für die vergleichsweise großen Unregelmäßigkeiten. Im Durchschnitt aller Spitzen ergibt sich eine Standardabweichung von 11,2 %.

Diese Tendenz setzt sich auch in den anderen beiden Probesteilen fort, die mit Benetzungszeiten von 0,5 s und 0,1 s erstellt wurden. Im zweiten Probesteil, dessen Auswertung in Abbildung 6.12 gezeigt ist, liegt die geringste Standardabweichung bei 7,2 % bei der elften Spitze, während die größte Standardabweichung von 29,7 % wieder von der zweiten Spitze verursacht wurde. Die durchschnittliche Standardabweichung liegt bei 12,7 %. Im dritten Probesteil, dessen statistisch relevante Volumenparameter in Abbildung 6.13 gezeigt sind, weist wiederum die achte Spitze mit 7,2 % die geringste Standardabweichung auf, während die zweite Spitze mit 29,6 % wieder die größte Ab-

6.3 Benetzungszeit-Abhängigkeit und Regelmäßigkeit des DPN-Phospholipid-Übertrags

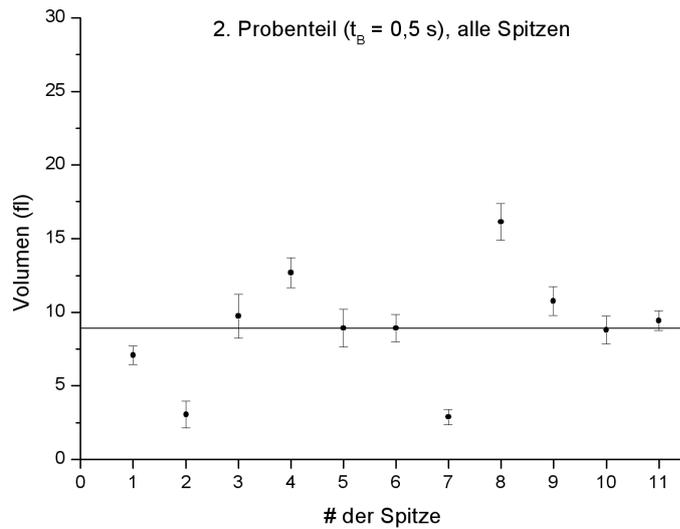


Abbildung 6.12: Schaubild der Mittelwerte und Standardabweichungen der Lipid-Volumina des zweiten, mit einer Benetzungszeit t_B von 0,5 s geschriebenen Probenteils für alle Spitzen. Die jeweils ersten 50 Punkte wurden nicht berücksichtigt, da deren Volumina aufgrund der verlängerten Wartezeit erhöhte Werte besitzen. Die Durchschnittswerte der zweiten und siebten Spitze weichen vom Mittelwert aller Spitzen am weitesten nach unten, die der achten Spitze am weitesten nach oben ab. Die zweite Spitze weist bezüglich ihrem Mittelwert erneut die größte prozentuale Standardabweichung auf, während die elfte Spitze die kleinste besitzt.

weichung besitzt. Im Durchschnitt aller Spitzen liegt die Standardabweichung erneut bei rund 12,8 % [68,69].

Es ist demnach nur ein leichter Anstieg der Abweichungen zwischen dem ersten und zweiten Probenteil zu erkennen, während sie im dritten Probenteil fast dieselben Werte aufweisen. Demzufolge ist keine Abhängigkeit der Regelmäßigkeit des Tintenübertrags von der gewählten Benetzungszeit beim Schreiben festzustellen. Es ist lediglich erkennbar, dass die Abweichungen mit allgemein steigendem Tintenübertrag und damit auch mit der Benetzungszeit sehr geringfügig abnehmen.

Bereits in Abbildung 6.10 war zu erkennen, dass es große Unregelmäßigkeiten im Tintenübertrag zwischen den einzelnen Spitzen gibt. Da für die drei Probenteile durchschnittliche Lipid-Punkt-Volumina von $17,2 \pm 6,9$ fl, von $8,9 \pm 3,8$ fl und von $3,0 \pm 1,6$ fl ermittelt wurden, liegen die relativen Standardabweichungen bei der Betrachtung aller Spitzen bei 40,1 % für den ersten, 42,5 % für den zweiten und 52,2 % für den dritten Probenteil. Im Verhältnis sind demnach in jedem der drei Probenteile die Standardabweichungen vom Gesamtmittelwert aller Spitzen deutlich größer als die Abweichungen von den jeweiligen Spitzenmittelwerten. Durch das Schreiben mit mehreren statt mit nur einer Spitze erhöht sich die prozentuale Standardabweichung demnach durchschnittlich von 12,2 % auf 44,9 %.

Es ist zu konstatieren, dass die statistischen Unregelmäßigkeiten im Schreibprozess

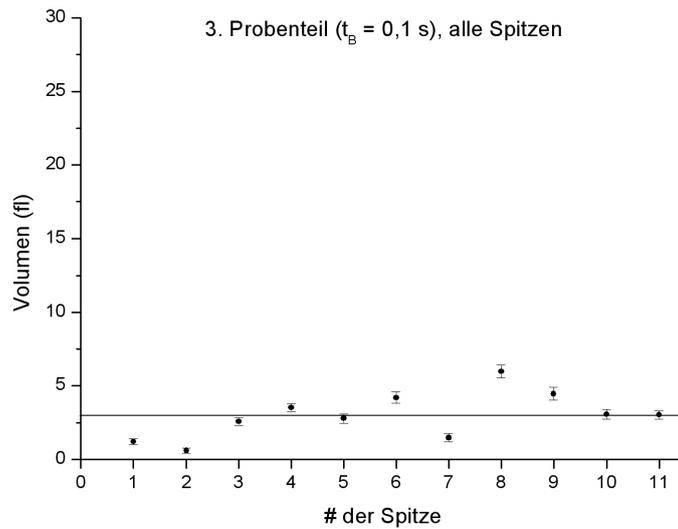


Abbildung 6.13: Schaubild der Mittelwerte und Standardabweichungen der Lipid-Volumina des dritten, mit einer Benetzungszeit t_B von 0,1 s geschriebenen Proben teils für alle Spitzen. Die jeweils ersten 50 Punkte wurden nicht berücksichtigt, da deren Volumina aufgrund der verlängerten Wartezeit erhöhte Werte besitzen. Die Durchschnittswerte der ersten, zweiten und siebten Spitze weichen vom Mittelwert aller Spitzen am weitesten nach unten, die der achten Spitze am weitesten nach oben ab. Die zweite Spitze weist bezüglich ihrem Mittelwert wiederum die größte prozentuale Standardabweichung auf, die achte Spitze die kleinste.

t_B (s)	$(\Delta V/V)_{8.Spitze}$ (%)	$(\Delta V/V)_{2.Spitze}$ (%)	$(\Delta V/V)_{med}$ (%)
1,0	6,6	21,0	11,2
0,5	7,2	29,7	12,7
0,1	7,2	29,6	12,8

Tabelle 6.2: Minimale, maximale und durchschnittliche Abweichungen vom jeweiligen Durchschnittsvolumen $(\Delta V/V)_{8.Spitze}$, $(\Delta V/V)_{2.Spitze}$ und $(\Delta V/V)_{med}$ der mittels DPN übertragenen Lipid-Punkte für unterschiedliche Benetzungszeiten t_B bei Betrachtung einzelner Spitzen.

t_B (s)	$(\Delta V/V)_{med,ges}$ (%)
1,0	40,1
0,5	42,5
0,1	52,2

Tabelle 6.3: Durchschnittliche Volumenabweichungen $(\Delta V/V)_{med,ges}$ der mittels DPN übertragenen Lipid-Punkte für unterschiedliche Benetzungszeiten t_B bei Betrachtung aller Spitzen.

nicht von der Benetzungszeit beim eigentlichen Schreibvorgang, wohl aber vom Benetzungsverhalten der einzelnen Spitzen beim zuvor erfolgenden Dipping-Prozess abhängen. Durch die unterschiedliche Menge anfangs aufgenommener Tinte kann der Volumenübertrag verschiedener Spitzen in starkem Maße variieren. Die relativen Schwankungen im Volumenübertrag zwischen den Punktabfolgen verschiedener Spitzen sind deshalb deutlich größer als zwischen den Punkten derselben Spitze. Zudem nehmen die Unregelmäßigkeiten einer einzelnen Spitze bei verringertem Tintentransport geringfügig zu, der durch schlechte Benetzung beim Dipping oder eine kürzere Benetzungszeit beim Schreiben zu Stande kommen kann.

Es existieren bereits diverse Ansätze zur Vermeidung der inhomogenen Spitzenbenetzung. Es könnte eine chemische Vorbehandlung der Spitzen zur verbesserten Tintenaufnahme oder der Einsatz von Spitzen mit einer innen liegenden, für die Tintenzufuhr zuständigen Kapillare erfolgen. Letztere als Fountain-Pens bezeichnete Spitzen befinden sich jedoch noch in der Entwicklung.

6.4 Zusammenfassung

Zur quantitativen Untersuchung des bei der DPN übertragenen Tintenvolumens anhand großflächig und mit unterschiedlichen Benetzungszeiten geschriebener, punktförmiger Lipidstrukturen eignete sich das in dieser Arbeit entwickelte AFM-System insbesondere aus zwei Gründen. Neben der mit allen AFM möglichen Ermittlung topographisch quantitativer Ergebnisse konnte beim Large-Scale-AFM-System zusätzlich auf einen Messbereich von $800\ \mu\text{m} \times 800\ \mu\text{m}$ zurückgegriffen werden. Somit konnten alle 4125 geschriebenen Punkte mit nur zwei Aufnahmen abgebildet werden, anstatt mit mindestens 64 Aufnahmen bei der Verwendung eines $100\ \mu\text{m}$ -Scanners eines konventionellen AFM. Dadurch wurde nicht nur die statistische Aussagekraft, sondern auch die Messgenauigkeit erhöht, da sämtliche Strukturen mit vergleichbarer Beschaffenheit des Cantilevers und vergleichbarer Luftfeuchtigkeit abgebildet werden konnten, die einen großen Einfluss auf die Gestalt der Lipidstrukturen besitzt.

Bei der Auswertung der Messergebnisse wurde festgestellt, dass sich nach einer beim Schreibvorgang auftretenden Wartezeit erst nach einer stets ähnlichen Anzahl von Punkten ein konstantes Tintenvolumen und zuvor ein erhöhtes und gleichsam abfallendes Volumen ergab. Bei der weiteren Auswertung wurden daher nur die Punkte dieses konstanten Niveaus berücksichtigt. Der Einfluss der Benetzungszeit auf das Tintenvolumen war deutlich erkennbar und folgte einem linearen Zusammenhang. Bei der beim Schreibprozess vorherrschenden Luftfeuchtigkeit von 35 % wurden DOPC-Tintenvolumen von 17,2 fl, 8,9 fl und 3,0 fl bei 1 s, 0,5 s beziehungsweise 0,1 s Benetzungszeit übertragen. Die prozentualen Abweichungen der Punktvolumina innerhalb der einzelnen am Schreibvorgang beteiligten Spitzen lagen bei 12 % und waren über den gesamten Schreibvorgang hinweg nahezu konstant. Die Abweichungen der Punktvolumina verschiedener Spitzen waren mit etwa 45 % deutlich größer. Demnach ist das unterschiedliche Benetzungsverhalten der einzelnen Spitzen verantwortlich für die größten Schwankungen beim Tintenübertrag. Dieser Aspekt der Lithographie könnte durch eine chemische Vorbehandlung der Spitzen in seinen Ausmaßen eingegrenzt werden. Eine Abhängigkeit der Regelmäßigkeit des Tintentransports von der gewählten Benetzungszeit konnte nicht festgestellt

werden. Die Wartezeitabhängigkeit des Tintenvolumens konnte ermittelt werden und könnte zukünftig durch entsprechende Programmierung beim Schreibvorgang berücksichtigt werden. Damit sollte es zusammen mit einer chemischen Konditionierung der Schreibspitzen gelingen ein wesentlich homogeneres und vorhersehbareres Schreibergebnis bei der Dip-Pen-Nanolithographie zu erreichen.

7 Herstellung sterisch ideal zugänglicher Nano-Sonden mit hoher Nachweisempfindlichkeit - Nano-Analytik mit dem Large-Scale-AFM

Nanosensoren sind meist künstlich hergestellte, oftmals jedoch auf biologischen Vorbildern beruhende Nanostrukturen, die Informationen über eine jeweilige Gattung von Nanopartikeln liefern sollen und die in der Anwendung vornehmlich aber nicht ausschließlich medizinischen Zwecken dienen. Da in den letzten Jahren vermehrt Verfahren mit substratassoziierten, bioaktiven Molekülen zur simultanen Detektion verschiedener Targets wie unterschiedlicher Krankheitserreger- oder Schadstoff-Typen eingesetzt wurden, kommt der Herstellung nanoskaliger Nukleationszentren zur ortsselektiven Anbindung solcher Detektor-Moleküle eine Schlüsselrolle zu. Darüber hinaus gibt es Bestrebungen die Immobilisierung der Detektor-Moleküle auch hinsichtlich ihrer räumlichen Positionierung zu optimieren. Durch deren Präparation auf annähernd senkrecht stehenden Distanzstücken wäre ihre Funktionalität durch ihre dortige konformative Freiheit maximiert und es könnten sterisch optimal zugängliche Nano-Sonden realisiert werden, was eine Erhöhung von Sensitivität und Flächenausnutzung, sowie die Minderung unspezifischer Wechselwirkungen mit dem Substrat zur Folge hätte.

In dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur ortsselektiven Anbindung und vertikalen Aufrichtung eines solchen im Folgenden als Trägersystem bezeichneten Distanzstücks realisiert. Unter Kombination zahlreicher Präparationsverfahren zur Realisierung von Kopplung und notwendiger Strukturbildung wurden dazu DNA-basierte Anker- und Trägersysteme, sowie eine polymerbasierte Nanolithographie und ein Mechanismus zur Schichtdickenverstärkung genutzt.

7.1 Idee: Trägersysteme für Nano-Sonden durch Anbindung und Aufrichtung von TMV auf Oberflächen

Um bioaktive Moleküle zur Detektion unterschiedlichster Target-Typen wie in Abbildung 7.1 gezeigt zur Minderung sterischer Einflüsse, unspezifischer Wechselwirkungen und vor allem konformativer Einschränkungen in möglichst großer Entfernung zum Substrat immobilisieren zu können, bedarf es der Auswahl und Synthese maßgeschneiderter nanoskaliger Bauteile.

Das als Distanzstück fungierende Trägersystem hat zur Erfüllung seiner Funktion eine stäbchenförmige Gestalt, sowie eine hohe chemische Modifizierbarkeit seiner Oberfläche

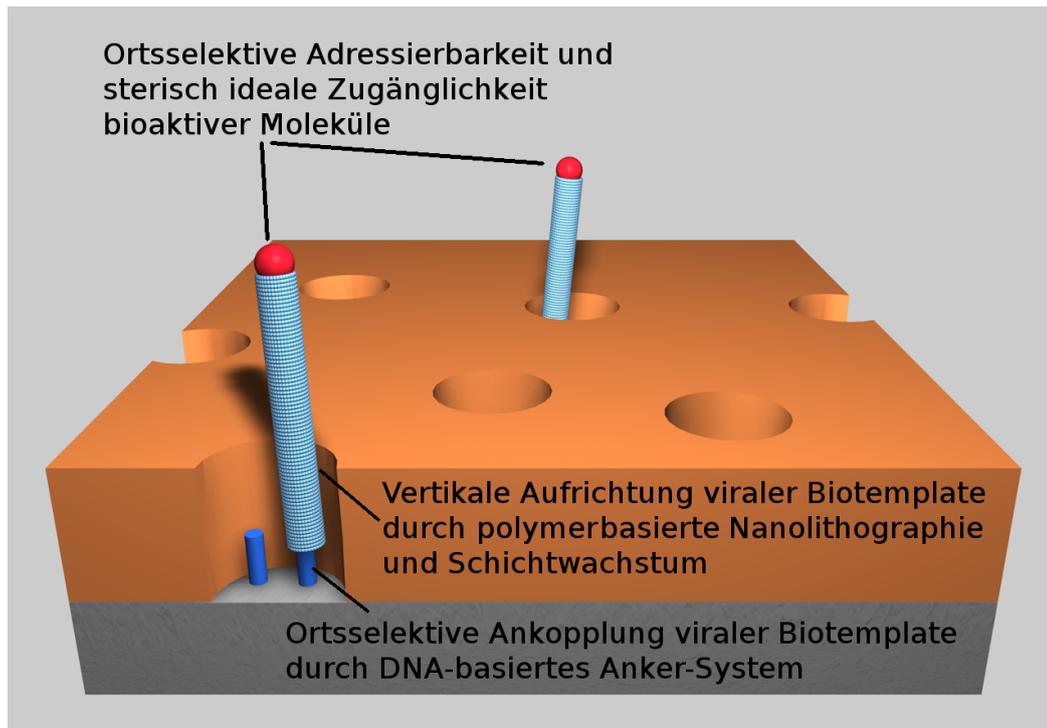


Abbildung 7.1: Idee zur Herstellung ortsselektiv adressierbarer und zugleich sterisch ideal zugänglicher Nano-Sonden-Systeme mit hoher Nachweisempfindlichkeit. Bioaktive Moleküle (rot) zur Detektion unterschiedlichster Target-Typen könnten durch ein geeignetes Trägersystem (hellblau) in großer Entfernung zum Substrat platziert werden, um durch ihre dort vorhandene konformative Freiheit die Sensitivität und die Flächenausnutzung des Detektionsverfahrens zu erhöhen. Das als Distanzstück fungierende Trägersystem könnte dabei nach einseitiger Substrat-Fixierung von einer Lochschicht maßgeschneiderter Tiefen und Durchmesser in vertikaler Position gehalten werden. In dieser Arbeit wurden mit Tabakmosaikviren als Trägersystem experimentiert, die durch DNA-Hybridisierung mit substratgebundenen Oligonukleotiden (dunkelblau) angekoppelt und durch nanolithographisch erzeugte substratkonsumierende metallorganische Schichten (SCMOL) (orange) aufgerichtet werden sollten.

aufzuweisen. In dieser Arbeit wurden hierzu in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Holger Jeske und Frau Prof. Christina Wege aus der Abteilung Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen des Biologischen Instituts der Universität Stuttgart Derivate des Tabakmosaikvirus (TMV) eingesetzt, die mit ihrer starren tubulären Gestalt wohldefinierter Abmessung und ihrer genetisch modifizierbaren Protein-Oberfläche ein ideales Trägersystem darstellen. Die Herausforderung liegt in der Anbindung und vor allem in der Aufrichtung der Biotemplate durch geeignete lithographische Mechanismen.

Das Ankersystem wurde durch die Verwendung von als DNA-Linker bezeichneten, oberflächenfixierten Oligonukleotiden realisiert, deren Basensequenz zu jener des Anfangsabschnitts der TMV-RNA komplementär ist. Nach der Anbindung der DNA-Linker auf dem Substrat ist durch Hybridisierung von TMV-RNA und anschließender Assem-

7.1 Idee: Trägersysteme für Nano-Sonden durch Anbindung und Aufrichtung von TMV

blierung von Hüllproteinen eine direkte und ortsselektiv steuerbare Präparation der TMV-Virionen auf der Oberfläche mit einseitiger Ortsfixierung möglich.

Zur Aufrichtung der TMV wurde eine maßgeschneiderte metallorganische Lochmaske nanolithographisch erzeugt, in deren Löcher die stäbchenförmigen Virionen nach ihrer Assemblierung bedingt durch die sie umgebende Struktur nahezu aufrecht stehen sollten. Bei einer TMV-Länge von 135 nm sind dazu Löcher mit Durchmessern von höchstens 50 nm und Tiefen von 50 nm bis 100 nm notwendig. Mit der als Polymerblend-Lithographie (PBL) bezeichneten phasenseparationsinduzierten Herstellung dünner Metall-Lochmasken können solch kleine Durchmesser bei spezieller Prozessführung erzielt werden. Da die erreichbaren Schichtdicken der Metallfilme bei diesem Verfahren auf etwa 25 nm limitiert sind, wurde ein anschließendes Wachstum einer substratkonsumierenden metallorganischen Schicht (SCMOL) eingesetzt. Bei diesem Prozess kann unter Erhaltung lateraler Strukturen eine Schichtdickenverstärkung von bis zum Faktor 20 erreicht werden kann. Die DNA-Linker sind ebenso wie die TMV innerhalb dieser Löcher zu präparieren, wobei das SCMOL-Wachstum auch als letzter Präparationsschritt eingesetzt werden könnte, um diesen Mechanismus zur Aufrichtung der Virionen nach dem Prinzip eines Wagenhebers zu nutzen.

Da die Präparation von TMV sehr zeitaufwändig ist, wurde mit der Verwendung von mit DNA-Linkern versehenen Goldkolloiden ein alternatives, als Vorstufe für die Viren-Aufrichtung anzusehendes Konzept mit schnellerer Präparationsmöglichkeit verfolgt, um zunächst eine auf DNA-Hybridisierung basierende, ortsselektive Immobilisierung von Nanopartikeln zu realisieren.

Zur Herstellung der maßgeschneiderten Lochmasken sowie zur Realisierung der DNA-basierten Kopplung war die Kombination zahlreicher Präparationsverfahren notwendig. Es wurden die Verfahren Polymerblend-Lithographie, SCMOL-Schichtdickenverstärkung, DNA-Linker-Präparation, DNA-Goldkolloid-Präparation und Viren-Assemblierung eingesetzt, die sich wiederum mitunter aus der Anwendung einer Vielzahl separater Präparationstechniken zusammensetzen und im nächsten Abschnitt 7.2 erläutert werden. Nach der Demonstration der Funktionalität und Sensitivität des Large-Scale-AFM in nanoskaligen Dimensionen anhand der Untersuchung mittels PBL strukturierter SAMs in Abschnitt 7.3 wurde in Abschnitt 7.4 eine Analyse mittels PBL hergestellter Metall-Lochmasken durchgeführt, da zu deren Herstellung mit besonders kleinen Lochdurchmessern von bis hinab zu 50 nm die Lithographie-Methode in ihrem Grenzbereich betrieben und daher in ihren Präparationsparametern optimiert werden musste. In Abschnitt 7.5 wurden Untersuchungen zur Kompatibilität der zahlreichen Einzelverfahren hinsichtlich der Vertauschung ihrer Reihenfolge und des Austauschs chemischer Komponenten durchgeführt. In den Abschnitten 7.6 und 7.7 wurden zunächst die ortsselektive, DNA-gekoppelte Anbindung von Goldkolloiden und anschließend darüber hinaus die zusätzliche senkrechte Aufrichtung von TMV-Derivaten demonstriert. Da im Zuge der Entwicklung dieser Lithographie-Methode zudem entdeckt wurde, dass sich SCMOL-Schichten aus Mercaptohexanol-Molekülen mit nur einer statt wie bisher mindestens zwei Thiolgruppen bilden lassen, wurde deren Wachstum in Abschnitt 7.8 näher quantifiziert. Die Untersuchungen der Abschnitte 7.4 und 7.5 wurden im Zusammenhang mit der Bachelorarbeit von Herrn Joel Cramer durchgeführt [80].

7.2 Methoden der Probenpräparation

Zur Herstellung von Trägersystemen für ortsselektiv adressierbare und sterisch ideal zugängliche Nano-Sonden mit hoher Nachweisempfindlichkeit sind eine Vielzahl präparativer Verfahren zur Realisierung von Kopplung und notwendiger Strukturbildung zu kombinieren und aufeinander abzustimmen. Zur Herstellung der maßgeschneiderten Lochmaske wurden Polymerblend-Lithographie und SCMOL-Schichtdickenverstärkung eingesetzt. Für die Realisierung des Ankersystems kam die DNA-Linker-Präparation zum Einsatz. Mittels Viren-Assemblierung beziehungsweise DNA-Goldkolloid-Präparation wurden abschließend die jeweiligen Trägersysteme präpariert.

7.2.1 Polymerblend-Lithographie (PBL)

Bei der Polymerblend-Lithographie (PBL) handelt es sich um ein Verfahren zur Erzeugung löchriger, ultradünner Schichten, deren Struktur durch einen zuvor präparierten und seriell entfernten Polymerblend erreicht wird. Mit dieser auf Selbstorganisation basierenden Technik lassen sich sowohl SAMs als auch Metalle strukturieren. Die Lochdurchmesser und -tiefen lassen sich durch veränderte Prozessführung über einen weiten Bereich variieren [81]. Für die in dieser Arbeit durchgeführte Probenstrukturierung sollten Metallmasken mit einer Dicke von etwa 10 nm und extrem kleinen Lochdurchmessern von bis hinab zu 50 nm hergestellt und das Verfahren daher in seinem Grenzbereich betrieben werden. Das Verfahren stellt eine Kombination aus Phasenseparation und PVD-Verfahren dar und gliedert sich in vier, in Abbildung 7.2(a)-(d) gezeigte Einzelschritte.

Nach erfolgter Snowjet-Reinigung des Siliziumsubstrats entsteht bei der Phasenseparation eines PS-PMMA-Polymerblends während des Spincoating-Verfahrens bei geeigneter Polymerlösung und Umgebungsbedingungen eine laterale Morphologie aus PS-Inseln in einer PMMA-Matrix. Der Durchmesser der PS-Bereiche bestimmt den Durchmesser der Löcher des späteren Metallfilms und ist über einen gewissen Größenbereich verteilt. Um Lochdurchmesser unter 100 nm zu erhalten, ist nach der in unserer Arbeitsgruppe angefertigten Diplomarbeit von Frau Maryam Haghighi eine Lösung von PS und PMMA in MEK notwendig, bei der die Molekulargewichte jeweils 10000 g/mol, das Mischungsverhältnis 3:7 und die Konzentration 15 mg/ml betragen. Beim Spincoating-Prozess kommt es erst im Endstadium der Filmbildung bei etwa 1-2 µm Schichtdicke zu einer lateralen Entmischung der Polymerkomponenten. Die Schichtdicke hängt dabei von der Rotationsgeschwindigkeit ab, die für die gewünschte Lochgröße 1500 U/min betragen muss, während die relative Luftfeuchtigkeit im Bereich von 40 % zu liegen hat [82]. Allgemeinere Untersuchungen der mit Parameteränderung variierenden Polymermorphologien wurden von Frau Jin Jihong in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt [81,83].

Der zweite Prozessschritt ist durch das selektive Lösen der PMMA-Komponente während eines Waschprozesses in Essigsäure gegeben. Dabei wird die Probe jeweils dreimal für etwa 10 s in einem mit Essigsäure gefüllten Becherglas geschwenkt und anschließend mit einem Stickstoffstrahl getrocknet. Der letzte Durchgang findet zur Erhöhung der Reinheit stets in einem separaten Becherglas statt.

Anschließend werden die auf dem Substrat verbliebenen PS-Tropfen mit einer dünnen Metallschicht durch Elektronenstrahlverdampfen beschichtet. Die Schichtdicke wird durch die Dauer des Aufdampfprozesses bestimmt und kann daher im Prinzip frei ge-

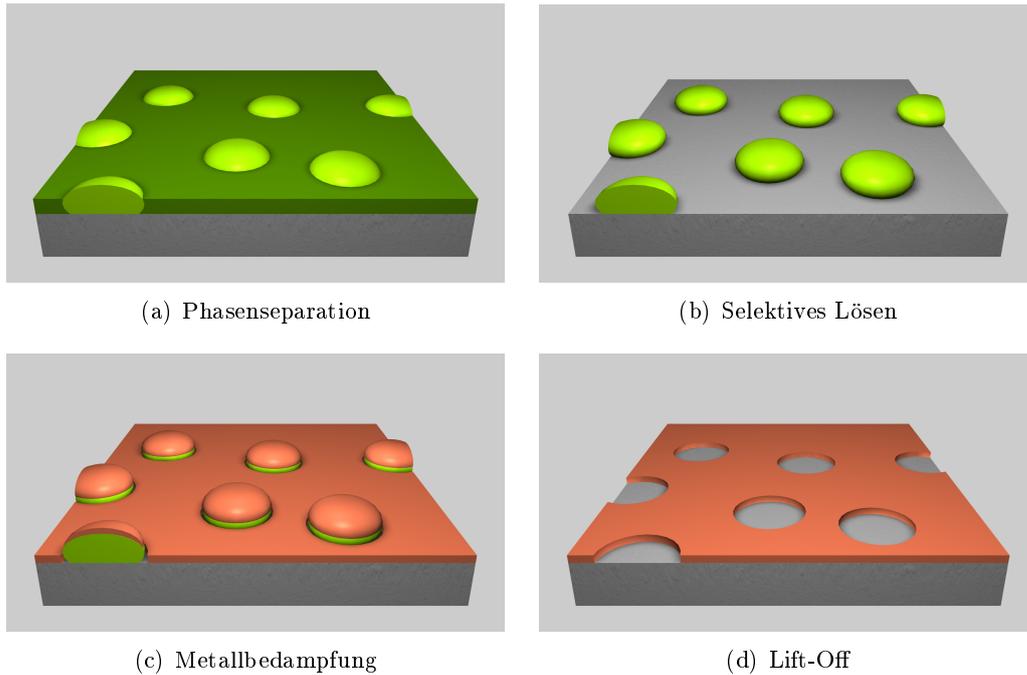


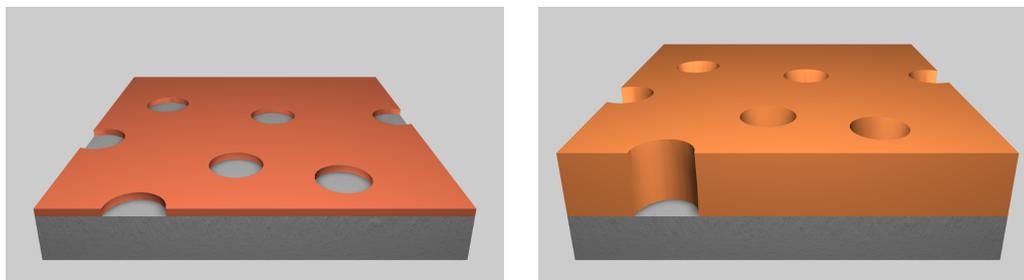
Abbildung 7.2: Schematischer Prozessverlauf der Polymerblend-Lithographie bestehend aus Phasenseparation beim Spincoating-Verfahren, selektivem Lösen, Metallbedampfung und einem Lift-Off-Prozess mittels Snowjet-Reinigung. Die Selbstorganisation von Polymeren wird zur großflächigen Strukturierung von Metall-Lochmasken genutzt. PS (hellgrün), PMMA (dunkelgrün), Metall (rotbraun).

wählt werden. Sie sollte jedoch aufgrund von Körnerbildung eine gewisse Höhe nicht unter-, sowie eine bestimmte Höhe nicht überschreiten, um die linsenförmige Gestalt der PS-Inseln optimal zu nutzen. Die überhängende Struktur der Polymer-Inseln ermöglicht ein perfektes Ergebnis für Schichtdicken bis etwa zur halben Linsenhöhe, da sich hierbei eine unterbrochene Metallschicht einstellt und die Polymere anschließend rückstandslos entfernt werden können. Da die PS-Inseln eine durchschnittliche Höhe von etwa 50 nm aufweisen, wurde die Dicke des jeweiligen Metallfilms bei 12 nm gewählt. Sie lag damit auch im Bereich der in einem anderen Verfahren hinzugefügten Goldkolloide, die einen Durchmesser von 10 nm besitzen. Es wurden Kupfer-, Silber- und Goldfilme aufgedampft, wobei für die beiden letzten Elemente zuvor eine 1 nm dicke Haftvermittlerschicht aus Titan benötigt wurde. Aufgrund der hohen Temperaturen bei der Metallbedampfung ist die Dauer des Prozesses zu begrenzen, um einen Schmelzprozess der PS-Inseln zu verhindern. Kupfer- und Silber-Lochmasken haben den Vorteil, dass auf ihnen ein anschließendes SCMO-L-Wachstum erfolgen kann. Goldschichten sind aufgrund ihrer Robustheit zu bevorzugen, wenn im Anschluss mit Puffer-Lösungen oder Säuren gearbeitet wird.

Im vierten und letzten Schritt wurde mit den PS-Inseln auch die zweite Polymerkomponente von der Probe durch das Snowjet-Verfahren entfernt, wodurch die gewünschte löchrige Metallschicht fertig gestellt wurde.

7.2.2 SCMOL-Schichtdickenverstärkung

Bei der SCMOL-Schichtdickenverstärkung handelt es sich um ein Verfahren zur Erhöhung der Schichtdicke dünner metallischer Filme durch den sukzessiven Einbau Thiol-terminierter, organischer Moleküle, bei dem wie in Abbildung 7.3 gezeigt eine laterale Vorstrukturierung des Films erhalten bleiben kann.



(a) Nanostrukturierte Metallschicht als Ausgangssubstrat

(b) Nanostrukturierte SCMOL mit erhöhter Schichtdicke

Abbildung 7.3: Schematischer Prozessverlauf der SCMOL-Schichtdickenverstärkung eines vorstrukturierten Metallfilms durch Immersion in eine Lösung Thiol-terminierter Moleküle. Es lässt sich eine Schichtdickenverstärkung von bis zum Faktor 20 erreichen, wobei die zuvor nanolithographisch erzeugten Strukturen erhalten bleiben. Metallschicht (rotbraun), SCMOL-Schicht (orange).

Eine substratkonsumierende metallorganische Schicht (Substrate Consuming Metal Organic Layer, SCMOL) entsteht durch den Einbau von diversen mit Thiolgruppen behafteten, organischen Molekülen aus einer Lösung in eine ursprünglich wesentlich dünnere Metallschicht. Die SCMOL besitzt dabei eine feste Stöchiometrie und ihre resultierende Schichtdicke ist von der Wachstumsdauer und der Wachstumsgeschwindigkeit abhängig, die wiederum von den verwendeten Materialien, der Temperatur und der Oxidation der Metalle abhängt [23–25].

Beim Wachstumsprozess einer SCMOL entsteht zunächst eine dünne metallorganische Schicht durch Bindung der in Lösung vorliegenden SCMOL-bildenden Moleküle an die Metalloberfläche mittels ihrer Thiolgruppen. Durch die bereits entstandene Schicht diffundieren weitere Moleküle und bilden gemeinsam mit den Atomen der dünner werdenden Metallschicht eine weitere Lage, die die bereits entstandene Schicht weiter nach oben schiebt. Dieses Bottom-Up-Wachstum endet nach vollständigem Verbrauch der zuvor vorhandenen Metallschicht oder nach vorzeitiger Entnahme der Schicht aus der Lösung. Das Wachstum lässt sich über die optische Analyse der jeweiligen Interferenzfarbe leicht kontrollieren.

Für die SCMOL-Schichtdickenverstärkung wurde hier eine Lösung des schichtbildenden Moleküls 1,4-Dithioerythritol (DTE) verwendet, wobei die Konzentration in bidestilliertem Wasser bei 3,3 mmol/l lag und die Lösung stets unmittelbar vor ihrer Benutzung hergestellt wurde. Die Immersion der mit einer Metallschicht versehenen Proben wurde bei 60 °C in einem Wärmeschrank durchgeführt, um das Schichtwachstum zu beschleunigen. Das SCMOL-Wachstum wurde auf Kupfer- und Silber-Substraten durchgeführt. Ein SCMOL-Wachstum auf Goldschichten ist nicht möglich.

7.2.3 DNA-Linker-Präparation

Bei der DNA-Linker-Präparation handelt es sich um ein Verfahren zum Aufbringen von DNA-Linkern auf ein beispielsweise chemisch heterogen vorstrukturiertes Substrat, die über ihre Endgruppe kovalent an die Probenoberfläche binden und über ihren Oligonukleotid-Anteil eine Anknüpfung weiterer DNA-Sequenzen mittels DNA-Hybridisierung ermöglichen. Zur potentiellen Anbindung von Virionen wurde eine der RNA von Tabakmosaikviren komplementäre Basensequenz und zur Anbindung an Münzmetalloberflächen eine Thiol-Endgruppe gewählt. Es wurde der entsprechende DNA-Linker FEB-HS-6245 der Firma Biomers (Ulm) verwendet. Das Verfahren gliedert sich in eine Inkubation mit der so genannten Spotting-Lösung und eine Immersion in der Blockier-Lösung, wobei die erstgenannte Lösung unter anderem die zu präparierenden DNA-Linker und die zweite Lösung Moleküle zur anschließenden vollständigen Oberflächenpassivierung enthält. Davor und danach finden zudem jeweils Waschprozesse statt.

Noch vor der Herstellung der Spotting-Lösung ist eine Lagerungslösung für die DNA-Linker zu präparieren. Die in getrocknetem Zustand gelieferten Oligonukleotide werden hierzu in einer Pufferlösung aus Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) $C_4H_{11}NO_3$ und Chlorwasserstoff HCl mit einem neutralen pH-Wert von 7 und einer Konzentration von 10 mmol/l in bidestilliertem Wasser gelöst. Die für die gewünschte DNA-Linker-Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ notwendige Menge des TRIS-HCl-Puffers hängt von der exakt gelieferten Menge von Oligonukleotiden ab und ist dem beigefügten Datenblatt zu entnehmen. Nach der Pufferzugabe und einer anschließenden 30- bis 60-minütigen Standzeit bei gelegentlicher Durchmischung wird die Lösung aliquotiert, bei -20°C eingefroren und auf diese Weise für etwa zwei Monate haltbar gemacht.

Aus der Lagerungslösung wird zeitnah vor ihrer Präparation die Spotting-Lösung der DNA-Linker durch Zugabe von Magnesiumchlorid MgCl_2 und bidestilliertem Wasser hergestellt. Der Einbau von Mg^+ -Ionen zwischen den negativen Phosphorsäureresten der Oligonukleotide ermöglicht dabei eine dichtere Oberflächenbelegung. Die Konzentration der DNA-Linker in der Spotting-Lösung hat 1 $\mu\text{mol/l}$, die von Magnesiumchlorid 20 mmol/l zu betragen.

Parallel zur Spotting-Lösung ist die Blockier-Lösung zu präparieren, deren Aufgabe in der Passivierung von Goldatomen ohne gebundene DNA-Linker liegt. Dazu wird 6-Mercapto-1-hexanol (MCH) mit einer Konzentration von 1 mmol/l in bidestilliertem Wasser verwendet. Das Molekül besitzt neben der Alkankette eine für die Bindung an die Goldoberfläche notwendige Thiolgruppe und eine Hydroxygruppe, die für eine OH-Terminierung der Oberfläche außerhalb der DNA-Linker-Bereiche und somit für die Unterbindung späterer Reaktionen der mit Oligonukleotiden versehenen Goldkolloide beziehungsweise der TMV-RNA mit den Goldatomen sorgt.

Die eigentliche Präparation der DNA-Linker, die in Abbildung 7.4(a)-(b) dargestellt ist, beginnt mit einem Reinigungsprozess der Probe, deren Oberfläche vollständig oder teilweise aus Gold besteht. Die Probe wird zunächst in einem Sauerstoff-Plasma für 15 min gereinigt und anschließend 5 min in Ethanol gewaschen und mit einem Stickstoffstrahl getrocknet. Danach erfolgt nach Aufbringen von 4 μl der Spotting-Lösung eine 90-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, während der die Anlagerung der DNA-Linker an die Goldoberfläche erfolgt. Nach einem einminütigen Waschprozess in bidestilliertem Wasser wird die Probe für 60 min in die Blockier-Lösung gebracht, um

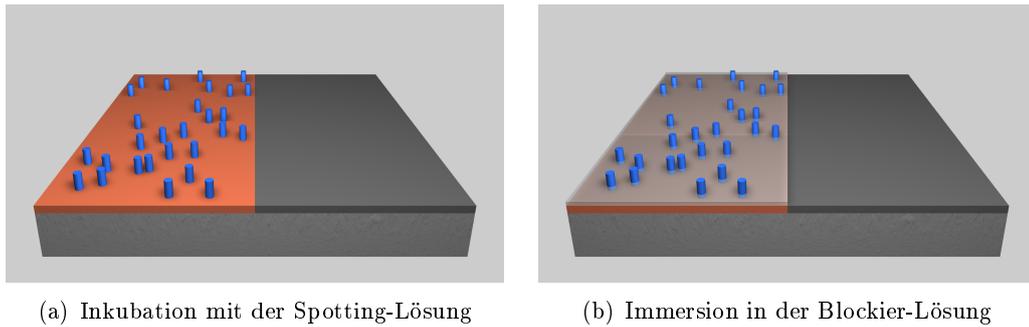


Abbildung 7.4: Schematischer Prozessverlauf der DNA-Linker-Präparation auf einem vorstrukturierten Substrat bestehend aus Inkubation mit der Spotting-Lösung und Immersion in der Blockier-Lösung. Die in letztgenannter Lösung enthaltenen MCH-Moleküle dienen der Oberflächenpassivierung, so dass in weiteren optionalen Prozessschritten hinzugefügte Oligonukleotide ausschließlich mit den zu diesem Zweck präparierten DNA-Linkern reagieren. Thiol-terminierter DNA-Linker (blau), MCH-Schicht (hellgrau), Münzmetallschicht (rotbraun), Nicht-Münzmetallschicht (dunkelgrau).

auf den noch freien Bereichen der Goldoberfläche eine Monolage aus Mercaptohexanol-Molekülen zu schaffen, um die unspezifische Anlagerung von zu einem späteren Zeitpunkt präparierten DNA-Sequenzen zu verhindern. Anschließend wird die Probe erneut für 1 min und nochmals für 5 min in bidestilliertem Wasser gewaschen und mit einem Stickstoffstrahl getrocknet [84]. Die Probe weist schließlich eine heterogene Monolage aus DNA-Linkern und Mercaptohexanol-Molekülen auf und ermöglicht die Anbindung von Oligonukleotiden komplementärer Basensequenz. Durch eine Vorstrukturierung des Ausgangssubstrats kann diese Monolage zusätzlich räumlich unterbrochen gestaltet werden und die Anbindung von mit komplementären Oligonukleotiden versehenen Nanopartikeln in diesem Fall ortsselektiv erfolgen.

7.2.4 DNA-Goldkolloid-Präparation

Bei der DNA-Goldkolloid-Präparation handelt es sich wie in Abbildung 7.5 gezeigt um ein Verfahren zur Platzierung von mit DNA-Linkern versehenen Goldkolloiden auf einem mit komplementären DNA-Linkern präparierten Substrat. Zur Anbindung an mit dem DNA-Linker FEB-HS-6245 versehenen Probenoberflächen wurde der DNA-Linker FEB-HS-c6245 der Firma Biomers (Ulm) mit komplementärer Basensequenz gewählt, der außerdem wieder eine Thiol-Endgruppe zur Anbindung an die Goldkolloide besitzt.

Die Herstellung der DNA-Goldkolloid-Lösung ist wesentlich aufwändiger als deren anschließende Präparation auf der Probe. Es werden zwei Ausgangslösungen mit DNA-Linkern und Goldkolloiden gemischt und nach gegebenen Standzeiten zur Reaktion und Reinigung mehrfach gepuffert und zentrifugiert. Zunächst wird einerseits aus den im getrockneten Zustand gelieferten DNA-Linkern in analoger Weise zum letzten Abschnitt eine etwa zwei Monate haltbare Lagerungslösung hergestellt, in der sie mit einer Konzentration von $50 \mu\text{mol/l}$ in einem TRIS-HCl-Puffer von wiederum 10mmol/l und neutralem pH-Wert vorliegen. Andererseits liegen die benötigten 10nm großen Goldkolloide mit einer Konzentration von 3nmol/l in einer bei der Firma Sigma Aldrich (Taufkir-

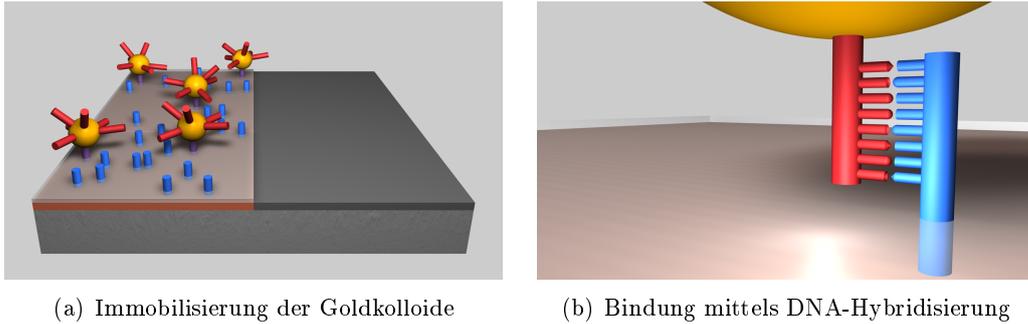


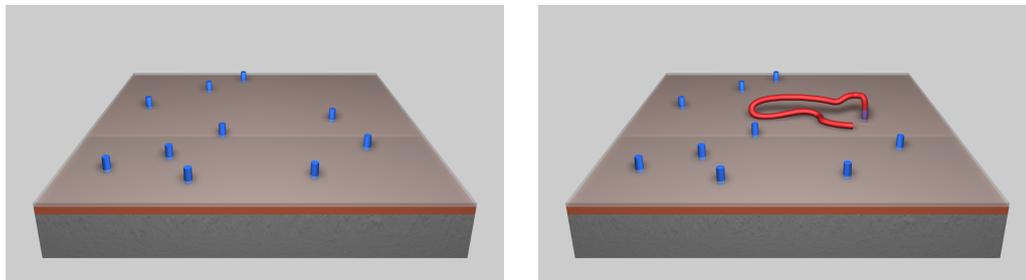
Abbildung 7.5: Schematische Darstellung der DNA-Goldkolloid-Präparation auf der Grundlage eines mit komplementären DNA-Linkern versehenen Substrats. (a) Die Goldkolloide befinden sich nach dem abschließenden Spülvorgang lediglich auf der mit DNA-Linkern behafteten Probenhälfte. (b) Ihre Bindung erfolgt über die beiden DNA-Linkern mittels DNA-Hybridisierung, bei der Adenin und Thymin, sowie Guanin und Cytosin Bindungen eingehen können. Thiol-terminierter DNA-Linker (blau), Thiol-terminierter, komplementärer DNA-Linker (rot), MCH-Schicht (hellgrau), Münzmetallschicht (rotbraun), Nicht-Münzmetallschicht (dunkelgrau), Goldkolloide (gelb).

chen) erhältlichen Suspension vor, die Kaliumkarbonat von 0,26 mmol/l, 0,01 % Tetrachloridogoldsäure, 0,01 % Gerbsäure, 0,04 % Trinatriumcitrat und 0,02 % Natriumazid NaN_3 enthält. Es werden 8 μl der Lagerungslösung mit 72 μl der Goldkolloid-Suspension vermischt und nach sofortigem Schütteln für 8 h bei Raumtemperatur und 300 Schüttelvorgängen pro Minute im Eppendorf-Thermomixer gelagert. Um eine Bindung der DNA-Linker an die Goldkolloide zu ermöglichen, erfolgt anschließend eine zweimalige Pufferzugabe von 0,5 mol/l Natriumhydrogenphosphat-Puffer Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 , sowie 1 mol/l Natriumchlorid-Lösung NaCl zum Abbau der die Goldkolloide umgebenden Azid-Schicht. Beim ersten Durchgang werden jeweils 2 μl und 10 μl hinzugegeben, beim zweiten Durchgang jeweils 1 μl und 25 μl , wobei die Lösung zur Vermeidung von Salzaggregation jeweils sofort geschüttelt und anschließend für 12 h bei Raumtemperatur und 300 Schüttelvorgängen pro Minute im Eppendorf-Thermomixer gelagert wird. Zur Entfernung ungebundener DNA-Linker wird im Anschluss daran ein dreifacher Zentrifugierprozess mit Entfernung des Überstandes und anschließendem Auffüllen des Lösungsmittels durchgeführt. Der Zentrifugierprozess dauert jeweils 15 min und erfolgt bei einer Zentripetalbeschleunigung von 16000 g. Anschließend wird der Überstand mit äußerster Vorsicht abpipettiert, um die am Boden des Eppendorf-Tubes befindlichen, dunkelroten Goldkolloide dabei nicht aufzuwirbeln. Aufgefüllt wird mit einer Lösung aus 20 mmol/l TRIS-HCl mit neutralem pH-Wert und 150 mmol/l NaCl in bidestilliertem Wasser, wobei nach dem letzten Durchgang noch 0,01 % NaN_3 zur Lagerung hinzugegeben werden. Im ersten und letzten Schritt werden 200 μl nachgefüllt, im zweiten nur 100 μl . Auf diese Weise entsteht eine DNA-Goldkolloid-Lösung mit einer Konzentration von etwa 1 nmol/l [85].

Bei der eigentlichen DNA-Goldkolloid-Präparation werden 7 μl dieser DNA-Goldkolloid-Lösung auf die Probenoberfläche pipettiert und anschließend für 2 h eine Inkubation bei einer Temperatur von 37 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % durchgeführt, ehe die Probe mit destilliertem Wasser abgespült und mit einem Stickstoff-

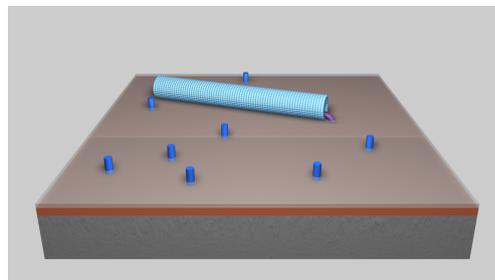
strahl getrocknet wird. Das Ergebnis dieser Präparationsmethode ist in Abbildung 7.5 dargestellt.

7.2.5 Viren-Assemblierung



(a) Mit DNA-Linkern versehenes Ausgangssubstrat

(b) Anbindung der Viren-RNA



(c) Anbindung der Hüllproteine

Abbildung 7.6: Schematischer Prozessverlauf der Viren-Assemblierung auf einem zuvor bereits mit DNA-Linkern versehenen Substrat durch sequentielle Anbindung von RNA und Hüllproteinen. Auf diese Weise lassen sich die Virionen direkt und ortsselektiv auf dem Substrat präparieren. Thiol-terminierter DNA-Linker (dunkelblau), Viren-RNA (rot), Virus/Proteine (hellblau), MCH-Schicht (hellgrau), Metallschicht (rotbraun).

Bei der Viren-Assemblierung handelt es sich wie in Abbildung 7.6 gezeigt um ein Verfahren zur Präparation von Virionen auf einer Substratoberfläche durch sequentielle Anbindung von RNA und Hüllproteinen.

Nach der Präparation der RNA-Lösung in Natriumcitrat-Puffer (Saline-Sodium Citrate, SSC) mit 50 ng/ μ l RNA und 18,5 μ l mit Dimethyldicarbonat versetztem Wasser ist eine Vorpräparation der RNA durchzuführen. Dabei wird die RNA-Lösung 5 min bei 65 °C denaturiert, anschließend auf Eis gekühlt und 0,5 μ l RNase-Inhibitor hinzugefügt.

Anschließend kann die Hybridisierung der RNA auf der bereits mit komplementären DNA-Linkern versehenen Substratoberfläche erfolgen. Dazu werden 20 μ l der denaturierten RNA-Lösung auf die Probe pipettiert, die sich dabei auf einem Deckglas und einem feuchtem Labortuch befindet und anschließend mit einem zweiten Deckglas abgedeckt wird. Dann erfolgt eine Inkubation von 16 h bei 37 °C und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und abschließend Waschprozesse mit SSC und Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS).

Nach der Hybridisierung erfolgt die eigentliche Assemblierung der Viren durch Anbindung der Hüllproteine an die auf der Oberfläche gebundenen RNA-Stränge. Im Anschluss an eine Äquilibration von 5-10 min mit 75 mM Natriumhydrogenphosphat-Kaliumhydrogenphosphat-Puffer Na_2HPO_4 und KH_2PO_4 (NKP-Puffer) mit einem pH-Wert von 7,2 beginnt eine Inkubation mit dem Hüllprotein für 16 h bei 30 °C und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit, bei der die Probe mit ihrer Oberseite nach unten ausgerichtet ist. Dabei wird eine Lösung von 1,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Hüllprotein und 75 mM NKP-Puffer mit einem pH-Wert von 7,2 in Wasser verwendet. Abschließend finden wiederum Waschprozesse mit SDS, bidestilliertem Wasser und Ethanol, sowie ein Trocknungsprozess statt. Die Viren-Assemblierung wurde von Herrn Fabian Eber am Biologischen Institut der Universität Stuttgart durchgeführt [37].

7.3 Nanoskalige Untersuchung mittels PBL nanostrukturierter SAMs mit dem Large-Scale-AFM

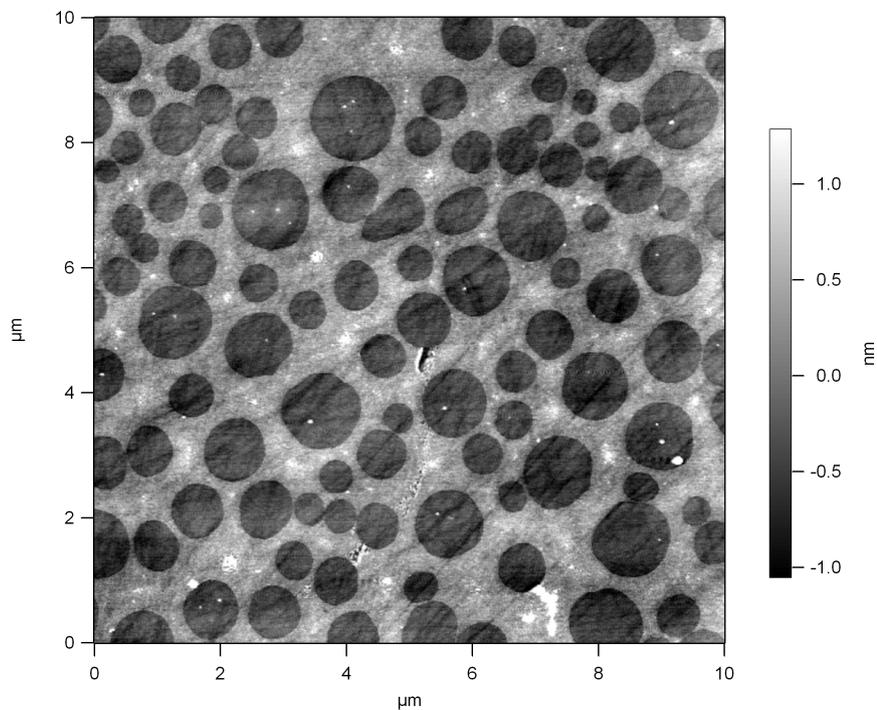


Abbildung 7.7: AFM-Höhenbild eines löchrigen Perfluordekyltrichlorsilan-SAM mit einer Scanfeldgröße von 10 μm . Zur Strukturierung dieser Monolage wurde eine Polymerblend-Lösung verwendet, bei der PS mit einem erhöhten Molekulargewicht von 100000 g/mol statt der sonst in dieser Arbeit üblichen 10000 g/mol zum Einsatz kam. Dadurch sind die Lochdurchmesser in diesem Fall einmalig erhöht und bis zu 1,5 μm groß. Die etwa 1 nm tiefen Siliziumoxid-Löcher und selbst unter der Monolage befindliche Polierkratzer im Subnanometerbereich sind noch deutlich zu erkennen. Die Sensitivität des Large-Scale-Eigenbau-AFM gestattet demnach auch Messungen an Probensystemen mit Strukturen in der Größenordnung von unter 1 nm.

Vor der umfangreichen Analyse der in diesem Kapitel erzeugten nanoskaligen Oberflächenstrukturen sollte die Funktionalität und Sensitivität des Large-Scale-AFM in diesen Dimensionen unter Beweis gestellt werden.

Mit der Polymerblend-Lithographie wurden bisher nicht nur wie in dieser Arbeit demonstriert dünne Metallfilme auf der Nanometer-Skala strukturiert, sondern auch organische Monolagen [81]. In Abbildung 7.7 ist eine 10 μm große, im Tapping-Mode erstellte AFM-Aufnahme eines solchen mit Löchern versehenen Perfluorodekyltrichlorsilan-SAM auf Siliziumoxid zu sehen. Bei der Präparation wurde eine Lösung von PS und PMMA in MEK verwendet, bei der das Molekulargewicht von PMMA bei 10000 g/mol und das von PS bei 100000 g/mol, das Mischungsverhältnis bei 3:7 und die Konzentration bei 15 mg/ml lagen. Das Spincoating-Verfahren wurde mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 1500 U/min und einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 40 % durchgeführt. Gegenüber der Vorgehensweise zur Herstellung kleinster Löcher wurde ein erhöhtes Molekulargewicht bei PS verwendet, was eine Vergrößerung der PS-Domänen und damit auch der Lochdurchmesser zur Folge hat. Die 500 nm bis 1500 nm großen Löcher, in denen das Siliziumoxidsubstrat frei gegeben ist, wurden fehler- und artefaktfrei abgebildet.

Bemerkenswert ist vor allem die vertikale Auflösung, die sich nicht nur in der Abbildung des etwa 1 nm hohen SAM äußert, sondern vor allem darin, dass selbst die Polierkratzer im unter der Monolage befindlichen Siliziumoxid zu erkennen sind. Diese weisen typischerweise Tiefen von etwa 2 \AA auf.

Mit dem hier aufgebauten AFM mit seiner Large-Scale-Basis sind demnach sogar Messungen im Subnanometerbereich und somit auch die angestrebte Untersuchung der ortselektiv zu platzierenden Nanopartikel und Biotemplate möglich. Alle AFM-Aufnahmen in diesem Kapitel erfolgten im Tapping-Mode.

7.4 Großflächige Herstellung mittels PBL nanostrukturierter Metallmasken mit kleinsten Lochdurchmessern bis zu 50 nm

Nachdem im letzten Abschnitt die Funktionalität und Sensitivität des Large-Scale-AFM in nanoskaligen Dimensionen anhand der Untersuchung mittels PBL strukturierter SAMs unter Beweis gestellt werden konnte, soll nun wieder die Analyse mittels PBL hergestellter Metall-Lochmasken im Vordergrund stehen. Diese können mit variablen Durchmessern und Dicken hergestellt werden, wobei ihre Gesamtfläche lediglich von der Größe des verwendeten Spincoaters abhängt. Der auftretende Durchmesserbereich wird vor allem durch die Zusammensetzung der verwendeten Polymerblend-Lösung bestimmt. Eine geringfügige Variation der Lösungs- oder Umgebungsparameter kann eine völlig veränderte Phasenmorphologie zur Folge haben [81, 83].

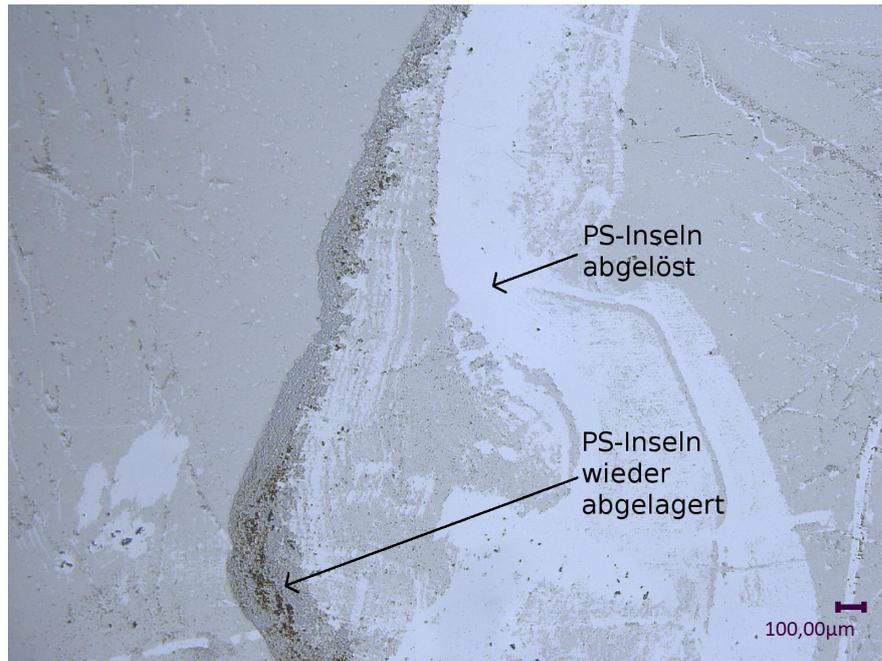
Zur Erzeugung von Metallmasken mit besonders kleinen Lochdurchmessern von bis hinab zu 50 nm, die einem späteren Aufrichtprozess einseitig gebundener TMV-Stäbchen dienen können, sind besonders kleine PS-Inselbereiche in der PMMA-Matrix zu erzeugen. Dies stellt eine große Herausforderung dar, da das Verfahren hierbei in seinem Grenzbereich betrieben werden muss. Einige Parameter waren jedoch bereits bekannt. Es wird eine Lösung von PS und PMMA in MEK benötigt, bei der die Molekulargewichte jeweils 10000 g/mol, das Mischungsverhältnis 3:7 und die Konzentration 15 mg/ml betra-

gen. Das Spincoating-Verfahren ist mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 1500 U/min und einer relativen Luftfeuchtigkeit im Bereich von 40 % durchzuführen [82]. Zur Anwendung dieses Verfahrens zur Herstellung kleinster Lochstrukturen mit hoher Reproduzierbarkeit waren jedoch noch einige Korrekturen der Umgebungsbedingungen und Präparationstechniken notwendig, die im Folgenden erläutert werden. Die Wahl des Metalls ist in diesem Zusammenhang von untergeordneter Bedeutung. In diesem Abschnitt wurde stets Kupfer verwendet, da dieses sich besonders gut für ein anschließendes SCMOL-Wachstum eignet.

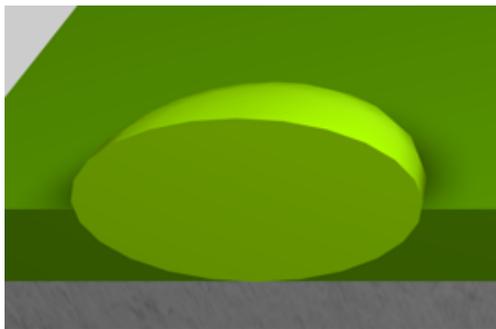
7.4.1 Lift-off-Prozess der PMMA-Komponente

Bei dem im zweiten Schritt der Polymerblend-Lithographie durchgeführten selektiven Lösen der PMMA-Komponente konnte in vielen Fällen bereits mit dem Auge eine Schlierenbildung auf der Probe beobachtet werden. Eine genauere Betrachtung mit dem Lichtmikroskop zeigte wie in Abbildung 7.8(a) zu sehen in Teilbereichen der Probe die Freilegung des Siliziumsubstrats und die damit verbundene Anhäufung von Polymer-Inseln in anderen Bereichen. Es wurde also nicht nur die PMMA- sondern gleichzeitig auch die PS-Komponente von der Probenoberfläche entfernt, wodurch die Probe für weitere Prozessschritte unbrauchbar wurde. Da dieses Phänomen vermehrt bei neu gelieferten Silizium-Wafern auftrat, wurde die hohe Polarität des Substrats als Ursache vermutet. Messungen des Wasserkontaktwinkels ergaben nach erfolgter Snowjet-Reinigung einen Kontaktwinkel von etwa 35° für neu gelieferte Silizium-Wafer und 45° für rund ein Jahr gelagerte Siliziumsubstrate. Bei den neuen, hydrophileren Substraten ergibt sich deshalb für die PS-Domänen ein höherer Kontaktwinkel, da sie im Vergleich zur PMMA-Komponente eine geringere Polarität aufweisen. Damit besitzen die PS-Inseln eine geringere Kontaktfläche, was insbesondere bei den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, besonders kleinen PS-Strukturen die Gefahr des vorzeitigen Entfernens mit sich bringt. Die unerwünschte Morphologie, die sich auf besonders hydrophilen Siliziumsubstraten bildet, ist im Vergleich mit der idealen Morphologie schematisch in Abbildung 7.8(b)-(c) dargestellt. Um nicht zu sehr in den prinzipiellen Ablauf des Verfahrens einzugreifen, wurde auf eine zusätzliche hydrophobere Beschichtung der Wafer verzichtet und stattdessen der Waschprozess beim selektiven Lösen optimiert. Beim bisherigen Waschprozess wurde die Probe jeweils dreimal für 10 s in Essigsäure geschwenkt und anschließend mit einem Stickstoffstrahl getrocknet.

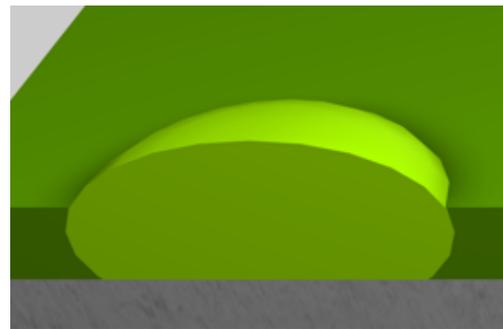
Zunächst wurde eine völlig neue Variante des Waschprozesses durchgeführt, bei der auf die intensive Stickstoffstrahl-Trocknung verzichtet wurde. Dazu wurde die mit dem PS-PMMA-Polymerblend beschichtete Probe für 10 min in Essigsäure gelegt und zur Trocknung anschließend hochkant auf ein saugfähiges Labortuch gestellt. Bei der trockenen Probe war keine Schlierenbildung mehr zu erkennen. Dies wurde auch durch das in Abbildung 7.9(a) dargestellte Höhenbild einer AFM-Aufnahme bestätigt, die erst nach der vollständigen Polymerblend-Lithographie von der 12 nm hohen Kupferschicht durchgeführt wurde [80]. Es ist eine Art Lochstruktur in der erwarteten Größenordnung erkennbar, wobei viele Löcher zusammenhängend sind. Dieser Effekt hängt vermutlich mit der erhöhten Hydrophilie des Ausgangssubstrats zusammen. Die mit diesem Waschprozess verbundene lange Wartezeit führte zur Untersuchung einer weiteren Variante des Waschprozesses.



(a) Ergebnis nach dem Waschprozess auf einem zu hydrophilen Substrat

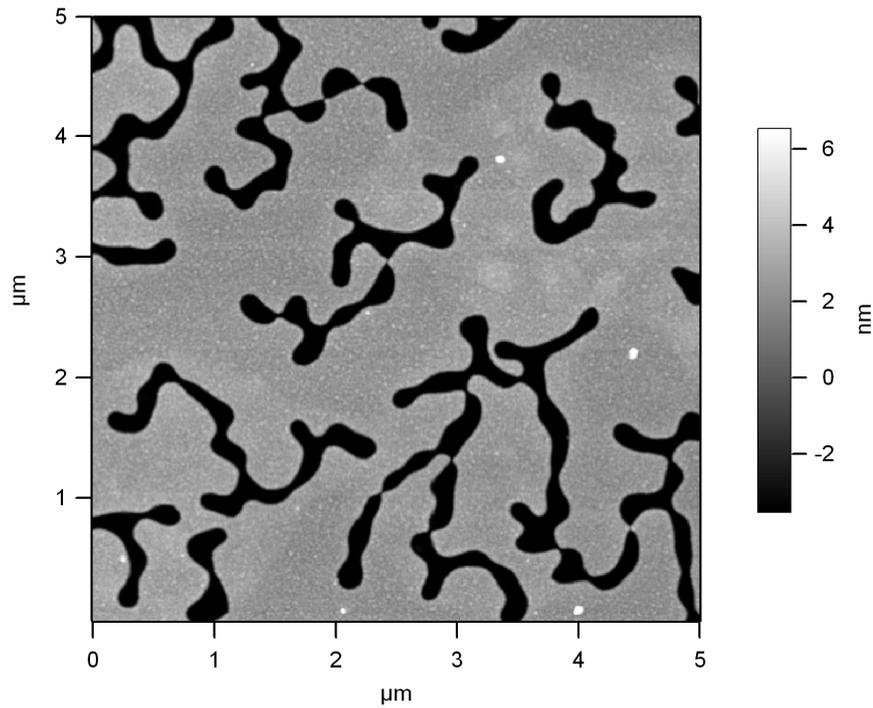


(b) Für die PBL ungeeignete Morphologie vor dem Waschprozess

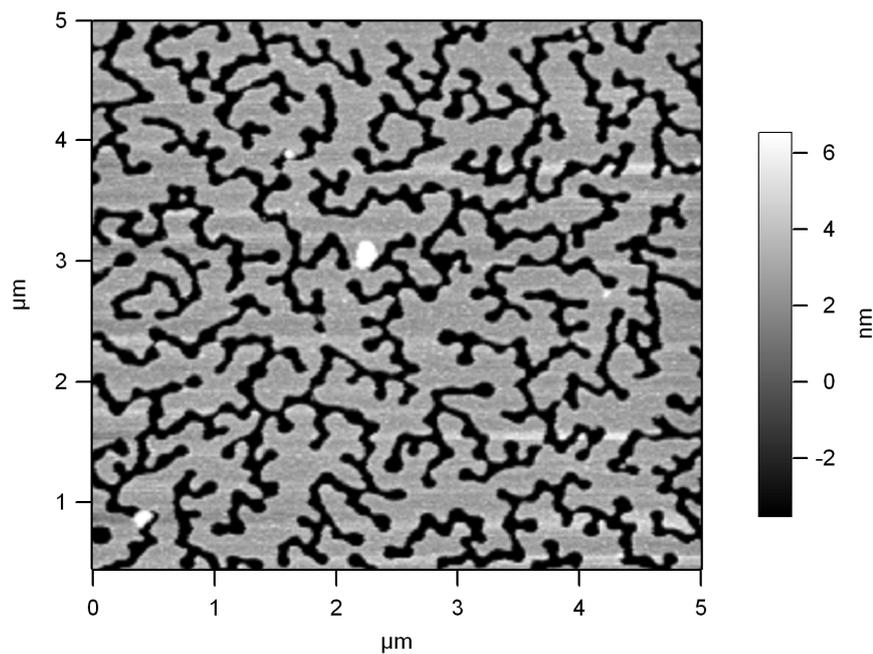


(c) Für die PBL ideale Morphologie vor dem Waschprozess

Abbildung 7.8: Lichtmikroskop-Aufnahme und schematische Darstellung eines Prozessverlaufs bei der Polymerblend-Lithographie vor beziehungsweise nach dem Waschprozess auf einem zu hydrophilen Substrat. (a) Lichtmikroskop-Aufnahme eines mit PS-PMMA beschichteten Siliziumwafers nach der Behandlung mit Essigsäure. In den hell erscheinenden Probenbereichen wurden beide Polymerkomponenten entfernt und die PS-Inseln in den nun dunkler erscheinenden wieder abgelagert. Diese Schlierenbildung ist bereits mit dem Auge erkennbar. (b) Schematische Darstellung einer für die PBL ungeeigneten Morphologie. Die PS-Inseln besitzen aufgrund der hohen Polarität des Substrats einen großen Kontaktwinkel und damit eine sehr geringe Kontaktfläche zum Substrat. Beim selektiven Lösen werden daher unerwünschter Weise beide Polymerkomponenten vom Substrat entfernt. (c) Schematische Darstellung einer für die PBL idealen Morphologie. Die PS-Inseln besitzen einen nicht zu großen Kontaktwinkel und damit eine genügend große Kontaktfläche zum Substrat. PS (hellgrün), PMMA (dunkelgrün).



(a) Nach dem Waschprozess ohne mechanische Belastungen



(b) Nach dem Waschprozess mit veränderter Pinzettentechnik

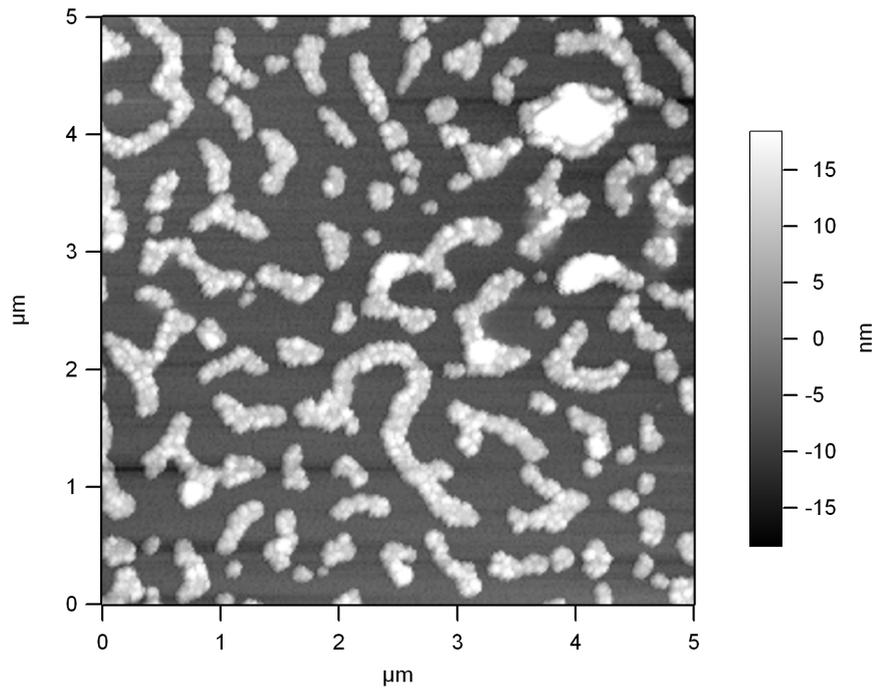
Abbildung 7.9: AFM-Höhenbilder von Kupfermasken nach Waschprozessen (a) ohne mechanische Belastungen und (b) mit veränderter Pinzettentechnik. In (a) wurde auf Stickstoffstrahl-Trocknung und Schwenken im Lösungsmittel verzichtet und dafür die Einwirkzeit von 30 s auf 10 min erhöht. In beiden Fällen ist eine Lochstruktur erkennbar, wobei in (a) jedoch trotz sonst gleicher Präparation deutlich größere Strukturen auftreten. Dies kann mit dem Modell dieser Arbeit nicht erklärt werden, ist aber für die weitere Umsetzung der PBL von untergeordneter Bedeutung [80].

Bei der zweiten Variante des Waschprozesses wurde wieder auf die Trocknung mittels Stickstoffstrahl zurückgegriffen, jedoch dessen Handhabung im Vergleich zum bisherigen Waschprozess verändert. Es wurden wieder drei Durchgänge aus kombiniertem Schwenken in Essigsäure und Trocknen mittels Stickstoff durchgeführt. Da die Schlierenbildung oftmals durch von der Pinzette geblasene Lösungsmitteltropfen induziert wurde, wurde nun eine Pinzette mit geraden, spitz zu laufenden Enden verwendet und der Stickstoffstrahl stets von der der Pinzette gegenüberliegenden Seite entlang der Probe geführt. Die Pinzette wurde dabei senkrecht zu Probenrand gehalten, um keine Probenbereiche bezüglich des Stickstoffstrahls abzuschatten. Beim letzten Durchgang wurde die Probe zwischenzeitlich abgelegt und die Pinzette selbst getrocknet, um die Probe anschließend vollständig trocknen zu können. Bei dieser Variante bildeten sich lediglich Schlieren am Rand im Bereich des Lösungsmitteleniskus der Pinzettenspitze, der jedoch nicht über die Probe geblasen wurde und am Rand eintrocknen konnte. Das Höhenbild der AFM-Aufnahme der darauf basierenden, komplett strukturierten Kupferprobe ist in Abbildung 7.9(b) zu sehen [80]. Auch in diesem Fall sind zusammenhängende Löcher erkennbar, deren Durchmesser in der gewünschten Größenordnung liegen. Aufgrund der wesentlich kürzeren Anwendungszeit wurde diese Variante der ersten im Folgenden vorgezogen. Je nach Alter und Hydrophilie des verwendeten Siliziumsubstrats waren die entstandenen Löcherstrukturen mehr oder weniger zusammenhängend und vor allem zuverlässig und großflächig herstellbar.

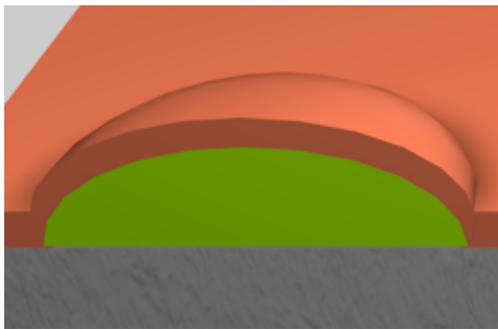
7.4.2 Lift-off-Prozess der PS-Komponente

Mit der Polymerblend-Lithographie lassen sich vielfältige Dünnschichtsysteme mit einstellbarem Bereich der Lochdurchmesser strukturieren. Bei der Herstellung von Metallmasken mit kleinsten Lochdurchmessern konnten die PS-Inseln beim Lift-Off-Prozess mittels Snowjet-Verfahren allerdings wie im Höhenbild der AFM-Aufnahme in Abbildung 7.10(a) gezeigt oftmals erst nach mehreren Durchgängen und auch lediglich in Teilbereichen der Probe entfernt werden [80]. Für die weitere Verwendung der Proben wie beispielsweise für eine DNA-Linker-Präparation war dieses Ergebnis äußerst unbefriedigend, da einerseits meist viele Proben gleichzeitig präpariert wurden und deren Reinigung somit sehr zeitintensiv war und andererseits bei den weiteren Schritten verbliebene PS-Moleküle von der Probe hätten gelöst werden und den Gesamtprozess damit erheblich hätten beeinflussen können. Aus diesem Grund wurde dieser Effekt genauer untersucht, um seine Auswirkungen im Hinblick auf den Prozessverlauf der PBL beheben zu können.

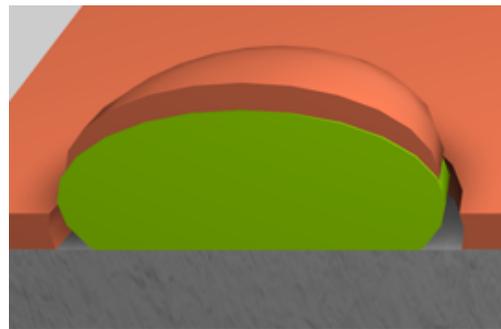
Als mögliche Ursache für die unvollständige Entfernung der PS-Inseln wurde die bereits im Prozessschritt zuvor erfolgte große Aufheizung der Probe während des Aufdampfprozesses ausgemacht. Durch den bereits im letzten Abschnitt angesprochenen, großen Kontaktwinkel zwischen der unpolaren PS-Komponente und dem polaren Siliziumsubstrat bilden sich Polymerinseln aus, deren linsenförmige Gestalt einen gewissen Bereich des Substrats bezüglich der Metallbedampfung abschattet. Auf diese Weise wird eine zusammenhängende Metallschicht vermieden und ein anschließender Lift-off-Prozess des Polymers ermöglicht. Bei zu großer Aufheizung der Probe könnten die PS-Inseln durch den Schmelzvorgang ihre linsenförmige Gestalt verlieren und sich eine geschlossene Metalldecke bilden, die mit dem Snowjet-Verfahren kaum zu entfernen



(a) Ergebnis nach dem Aufdampfprozess mit zu hoher Temperatureinwirkung



(b) Für die PBL ungeeignete Morphologie nach dem Aufdampfprozess



(c) Für die PBL ideale Morphologie nach dem Aufdampfprozess

Abbildung 7.10: AFM-Höhenbild und schematische Darstellung eines Prozessverlaufs der Polymerblend-Lithographie beim Aufdampfprozess mit zu hoher Temperatureinwirkung. (a) AFM-Höhenbild einer mittels Polymerblend-Lithographie hergestellten Kupfer-Probe. Es ist zu erkennen, dass bei der zuvor einmalig erfolgten Snowjet-Behandlung keine einzige PS-Insel entfernt werden konnte. Ursache könnte das Entstehen einer zusammenhängenden Metallschicht aufgrund der beim Bedampfen möglicherweise geschmolzenen Polymerbereiche sein. Die Aufdampfrate lag bei 0,01 nm/s. (b) Schematische Darstellung einer für die PBL ungeeigneten Morphologie. Beim Bedampfen verändern die PS-Inseln durch zu große Aufheizung bei der Bedampfung ihre Form. Dadurch wird eine geschlossene Metaldecke erzeugt, deren Erhebungen mit dem Snowjet-Verfahren nicht mehr zu entfernen sind. (c) Schematische Darstellung einer für die PBL idealen Morphologie. Die PS-Inseln besitzen einen genügend großen Kontaktwinkel und damit eine bauchige Gestalt, die eine unterbrochene Metallschicht garantiert. PS (hellgrün), PMMA (dunkelgrün), Metall (rotbraun) [80].

ist. Dieser unerwünschte Prozessablauf ist im Vergleich zum idealen Verlauf in Abbildung 7.10(b)-(c) veranschaulicht.

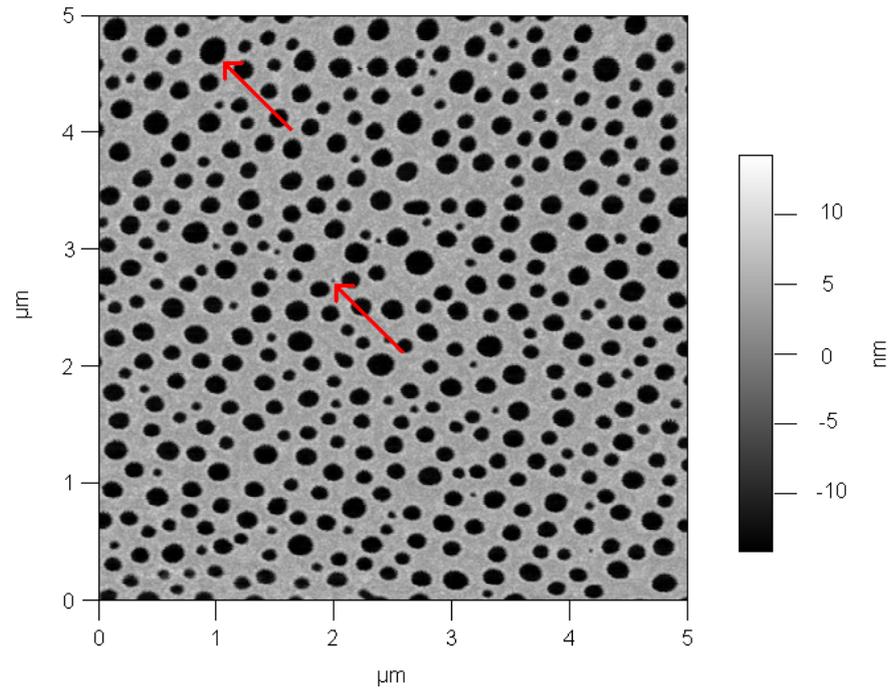


Abbildung 7.11: AFM-Höhenbild einer Kupfermaske nach einem Aufdampfprozess mit auf 0,1 nm/s erhöhter Aufdampfrate. Auf diese Weise konnten sämtliche PS-Inseln mit einmaliger Snowjet-Reinigung entfernt und die gewünschte Metallochmaske hergestellt werden. Die Lochdurchmesser variieren zwischen 250 nm und 50 nm (Pfeile). Die Kupfermaske wurde auf einer Fläche von 1 cm² erstellt [80].

Als Gegenmaßnahme wurde daher eine Erhöhung der Aufdampfrate ins Auge gefasst. Diese wird begrenzt durch die technischen Begebenheiten der eingesetzten Aufdampf-anlage. Die für die Elektronenemission zuständige Stromstärke sollte nicht zu schnell erhöht werden, um einerseits das Filament nicht zu zerstören und andererseits die Gefahr einer explosionsartigen Tiegelentleerung zu minimieren. Die Stromstärke sollte außerdem nicht mehr als 300 mA betragen. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren war es dennoch möglich bei Abwarten eines sehr guten Drucks in der Kammer die Aufdampf-rate von bisher 0,01 nm/s auf 0,1 nm/s zu steigern, wodurch sich die Verweildauer der Probe im heißen Metall Dampf ebenso um etwa eine Größenordnung verringerte. In der Abbildung 7.11 ist das AFM-Höhenbild einer einmalig mit dem Snowjet behandelten Kupfer-Lochmaske zu sehen, die mit einer Rate von 0,1 nm/s bedampft wurde [80]. Während auf der mit 0,01 nm/s bedampften Probe alle PS-Inseln noch vollständig vorhanden waren, wurden diese bei der mit erhöhter Aufdampfrate bearbeiteten Probe bereits im ersten Durchgang großflächig und komplett entfernt. Die PS-Bereiche können der hohen Temperatur des Metall damps demnach für 2 min statt wie bisher für 20 min ausgesetzt werden ohne ihre Gestalt zu sehr zu verändern. Es wurde im Folgenden stets mit Aufdampf-raten von rund 0,1 nm/s gearbeitet, die lediglich eine längere Wartezeit

nach dem Einschleusen der Proben in die Aufdampfanlage zum Erreichen eines besseren Enddruckes erforderten.

Mit Hilfe der geänderten Vorgehensweise beim selektiven Lösen und dem Einsatz höherer Metall-Aufdampfraten ist es nun möglich nanostrukturierte Lochmasken beliebiger Metalle mit Durchmessern von bis hinab zu 50 nm herzustellen. Das auf Selbstorganisation beruhende Verfahren wurde auf großen Flächen von über 1 cm² demonstriert. Es bildet im weiteren Verlauf der Arbeit die Grundlage für die Strukturbildung bei der Herstellung von sterisch ideal zugänglichen Trägersystemen mittels TMV für potentielle Nano-Sonden-Verfahren mit hoher Nachweisempfindlichkeit.

7.5 Kombination von DNA-basierten Kopplungsverfahren und Strukturbildungsverfahren

Zur Kombination von DNA-Linker- und DNA-Goldkolloid-Präparation mit Polymerblend-Lithographie und SCMOL-Schichtdickenverstärkung bedurfte es einer Abstimmung der hierbei verwendeten Substanzen aufeinander. Bei der Präparation von DNA-Linkern und benötigter Passivierungsschicht auf zuvor mittels PBL vorstrukturierten Kupfer- oder Silberschichten wurde nach der Pufferzugabe deren teilweiser oder sogar vollständiger Abbau festgestellt, der im Folgenden quantifiziert werden soll. Die vorrangige Verwendung von Substraten dieser Metalle rührte von der mit ihnen verbundenen Möglichkeit des Wachstums substratkonsumierender metallorganischer Schichten her, welches im Verlauf des weiteren Strukturierungsprozesses ebenfalls zum Einsatz kommen sollte.

7.5.1 Präparation von DNA-Linkern auf Silber- und Kupferschichten

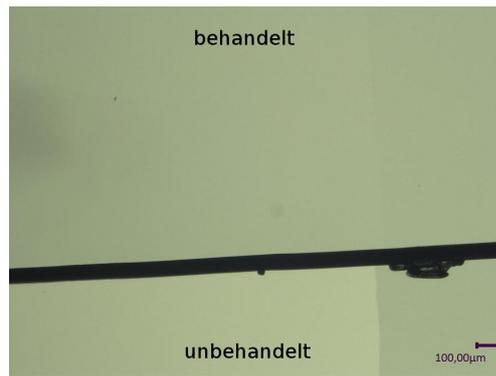
Bei der Anwendung der DNA-Linker-Präparation nach erfolgter Polymerblend-Lithographie wurden die zwischenzeitlich erzeugten Kupfermasken beschädigt. Mögliche Ursachen wurden im Angriff durch Säuren und Ablagerungen von Salzen vermutet, die bei der Spotting- und Blockier-Lösung zum Einsatz kommen. Um zu ermitteln, welche Substanzen für den Großteil des Schadens verantwortlich sind, wurde eine Immersion von mit 12 nm Kupfer bedampften Proben in die einzelnen Lösungen durchgeführt. Die Proben wurden mittig gebrochen und jeweils nur eine der beiden Hälften für 16 h bei Raumtemperatur in die jeweilige Lösung gelegt, um potentielle Veränderungen bereits im Lichtmikroskop betrachten zu können. Nach erfolgter Immersion wurden die Probenstücke mit destilliertem Wasser abgespült. Es wurden mit 1 mol/l TRIS-HCl, 20 mmol/l Magnesiumchlorid und 1 mmol/l Mercaptohexanol drei Lösungen angesetzt, wobei als Lösungsmittel stets bidestilliertes Wasser diente [80].

In Abbildung 7.12(a) ist eine Photographie der Kupferprobe zu sehen, deren eine Hälfte in die TRIS-HCl-Lösung getaucht wurde. Die behandelte Seite erscheint fast einheitlich blank. Die Kupferschicht wurde demnach fast vollständig entfernt. Dieser Eindruck wird durch die Lichtmikroskop-Aufnahme in Abbildung 7.12(b) nochmals bestätigt [80].

In Abbildung 7.12(c) ist eine Photographie der Kupferschicht gezeigt, die zur Hälfte in der MgCl₂-Lösung gelagert wurde. Auch hier sind große Teile der behandelten Hälfte blank, was wiederum ein Indiz für die Entfernung der Metallschicht ist. An den



(a) TRIS-HCl, Photographie



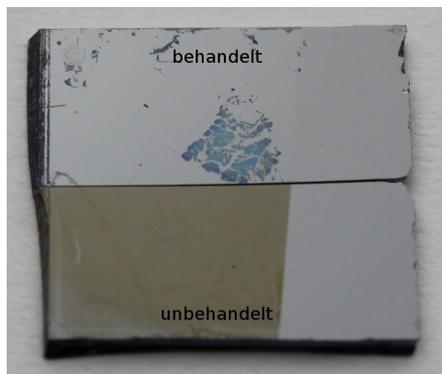
(b) TRIS-HCl, Lichtmikroskop-Aufnahme



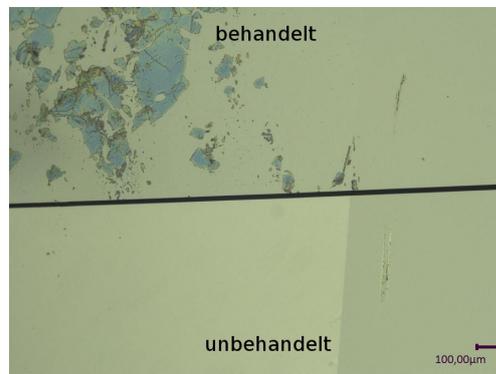
(c) MgCl₂, Photographie



(d) MgCl₂, Lichtmikroskop-Aufnahme



(e) MCH, Photographie



(f) MCH, Lichtmikroskop-Aufnahme

Abbildung 7.12: Photographische und lichtmikroskopische Aufnahmen von für 16 h bei Raumtemperatur halbseitig in bei der DNA-Linker-Präparation verwendeten Lösungen gelagerten Kupferschichten. Es ist zu erkennen, dass die Metallschicht in den TRIS-HCl- und MgCl₂-Lösungen großflächig und fast vollständig entfernt wurde. Bei der Immersion in MCH setzte jedoch ein SCMO-L-Wachstum auf der verbliebenen Kupferschicht ein und es bildete sich ein blauer, teilweise gerissener Film, der sich aufgrund der langen Einwirkzeit in der Lösung zwischenzeitlich vom Substrat gelöst hat [80].

7.5 Kombination von DNA-basierten Kopplungsverfahren und Strukturbildungsverfahren

Rändern erscheint die Schicht etwas dunkler als zuvor, was auf beim Abspülen nicht entfernte Salzurückstände hindeutet und auch in der Lichtmikroskop-Aufnahme aus Abbildung 7.12(d) zu erkennen ist [80].

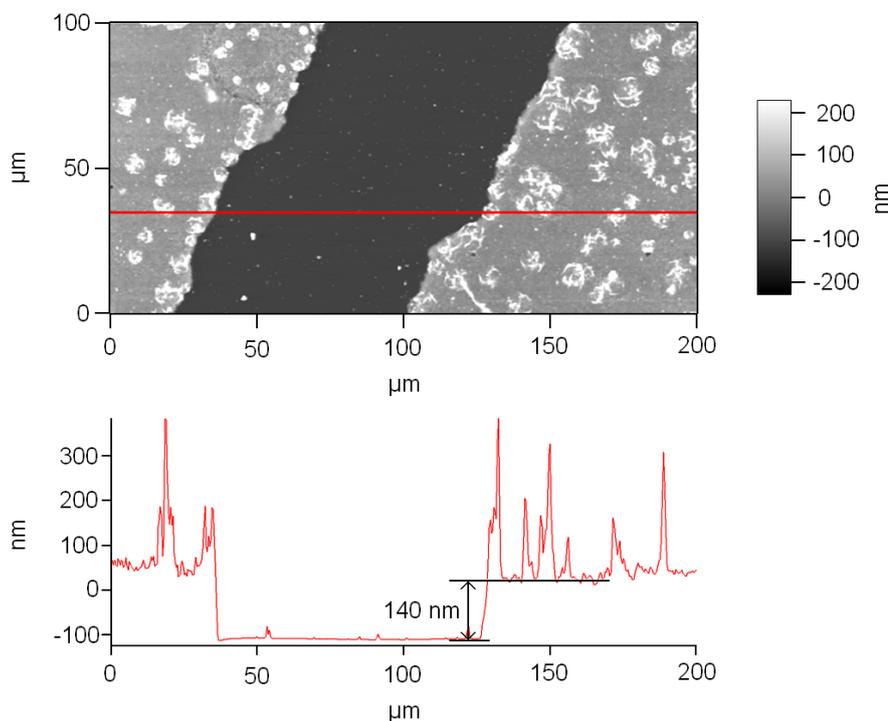


Abbildung 7.13: AFM-Höhenbild einer für 16 h bei Raumtemperatur in 1 mmol/l Mercaptohexanol-Lösung gelagerten 12 nm dicken Kupferschicht mit einer Scanfeldgröße von $200\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$. Der zugehörige Querschnitt zeigt, dass die Schichtdicke bei beiden vermessenen Kanten bei etwa 140 nm liegt, was auf die Bildung einer substratkonsumierenden metallorganischen Schicht (SCMOL) hindeutet [80].

Bei der halbseitig in Mercaptohexanol aufbewahrten Probe, deren Photographie in Abbildung 7.12(e) zu sehen ist, sind vereinzelt auf dem wiederum größtenteils blanken Substrat mehrfarbige, hauptsächlich bläuliche Strukturen zu erkennen. In der in Abbildung 7.12(f) gezeigten zugehörigen Lichtmikroskop-Aufnahme ist dieses Phänomen noch deutlicher zu erkennen [80]. Die beobachteten Strukturen weisen eine große Ähnlichkeit mit einer abgelösten SCMOL-Schicht auf, deren Wachstum und Aufbau in Kapitel 2.3 erläutert wurde. Zu einer solchen Ablösung kann es nach dem Aufbrauchen der kompletten Metallschicht kommen, was bei einer 16-stündigen Immersion einer Kupferschicht in einer SCMOL-bildenden Lösung der Fall wäre. SCMOL-Wachstum wurde bisher allerdings lediglich bei Dithiolen beobachtet, während Mercaptohexanol lediglich eine Thiolgruppe besitzt. Zur Klärung dieses Sachverhalts wurde das in Abbildung 7.13 dargestellte Höhenbild einer Large-Scale-AFM-Aufnahme mit einer Scanfeldgröße von $200\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ über zwei Schichtkanten hinweg durchgeführt und deren Höhe vermessen. Beide Schichtstücke wiesen die nahezu identische Höhe von etwa 140 nm auf [80]. Bei einer ursprünglichen Kupferschichtdicke von 12 nm entspricht dies einem Verstärkungsfaktor

von 12. Mit dem Dithiol DTE werden beispielsweise Schichtdickenverstärkungsfaktoren von etwa 10 erreicht, was ein weiteres Indiz für die Bildung einer SCMOL-Schicht darstellt. Die Frage nach einer SCMOL-Bildung mit MCH soll jedoch erst im späteren Abschnitt 7.8 durch Untersuchung der Elementverhältnisse der gebildeten Schichten abschließend beantwortet werden, um zunächst der eigentlichen Fragestellung dieses Kapitels nachgehen zu können.

Es lässt sich konstatieren, dass Kupferschichten durch jede der bei der DNA-Linker-Präparation verwendeten Komponenten verändert werden. Während die Bildung einer SCMOL durch den Einsatz von MCH kein Problem darstellt, da die ursprüngliche Lochmaske erhalten bleiben und sich nur deren Höhe verändern würde, ist der Einsatz von TRIS-HCl und $MgCl_2$ nicht geeignet, auch wenn der Verbleib der Probe in den entsprechenden Lösungen während der DNA-Linker-Präparation nur bei 1,5 h liegt. Aufgrund der hohen Säureempfindlichkeit von Kupfer würde sich diese Problematik zudem bei der Anwendung der DNA-Goldkolloid-Präparation wiederholen. Folglich bietet sich eher die Verwendung eines resistenten Schichtsystems als der Austausch sämtlicher Komponenten der bei späteren Präparationsverfahren eingesetzten Lösungen an. Auf Silberschichten wurden bei weiteren Experimenten abgesehen von der SCMOL-Bildung bei Immersion in MCH analoge Ergebnisse erhalten, weshalb dieses Schichtsystem nicht in Betracht gezogen und auch hinsichtlich seiner Beständigkeit gegenüber den verwendeten Puffer-Lösungen nicht weiter quantifiziert wurde. Stattdessen wurden im Folgenden analoge Experimente mit SCMOL-geschützten Kupferschichten sowie mit Goldschichten durchgeführt.

7.5.2 Präparation von DNA-Linkern auf SCMOL-Schichten aus DTE und Kupfer

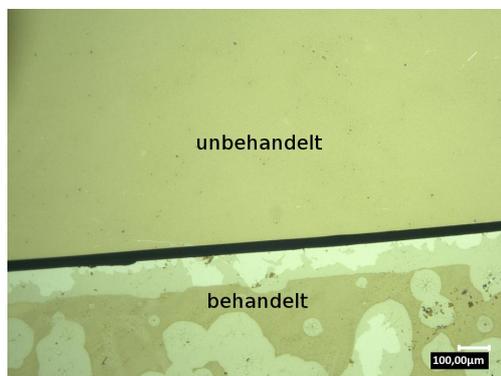


Abbildung 7.14: Lichtmikroskop-Aufnahme einer für 16 h bei Raumtemperatur halbseitig in 1 mol/l TRIS-HCl-Lösung gelagerten Kupferschicht, die zuvor mit einer DTE-SCMOL versehen wurde. Es ist zu erkennen, dass die präparierte Schicht von punktuellen Defekten ausgehend kreisförmig und vom Rand her angegriffen wurde [80].

Aufgrund der Unverträglichkeit der bei der Polymerblend-Lithographie hergestellten Kupferschichten mit den bei der DNA-Linker-Präparation verwendeten Lösungen, wurden diese Schichten in einem weiteren Versuch nun gezielt mit einer bekannten SCMOL-Schicht aus dem Molekül Dithioerythritol (DTE) geschützt. Die wiederum 12 nm hohen Kupferschichten wurden hierzu für etwa 20 min bei 60 °C in eine DTE-Lösung gelegt, wodurch sich auf ihnen eine etwa 20 nm hohe SCMOL-Schicht ausbildete. Die Probe wurde erneut halbiert und für 16 h bei Raumtemperatur in 1 mol/l TRIS-HCl in wässriger Lösung gelegt. Die Lichtmikroskop-Aufnahme in Abbildung 7.14 zeigt eine partielle

Veränderung der SCMOL-Schicht. Sie weist zahlreiche hellere Kreise und einen helleren Streifen am Probenrand auf, die in sich nochmals hellere Strukturen zeigen [80]. Als Ursache ist die von Defektstellen der SCMOL ausgehende Auflösung der Kupferschicht anzunehmen. Die Verwendung einer DTE-SCMOL als Schutzschicht für die darunter liegende Kupfermaske ist demnach ebenfalls keine Alternative für die Kombination von Polymerblend-Lithographie und DNA-Linker-Präparation. Eventuell könnten andere SCMOL-bildende Moleküle hier in Zukunft bessere Resultate liefern.

7.5.3 Präparation von DNA-Linkern auf Goldschichten

Aufgrund der Unverträglichkeit der bisher verwendeten Silber- und Kupferschichten gegenüber den bei der DNA-Linker-Präparation verwendeten Lösungen wurden die Versuche der letzten Abschnitte mit 12 nm dicken Goldschichten wiederholt und auch diese mit den Spotting- und Blockier-Lösungen behandelt. Da keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Goldschichten zu erkennen war, wurden die für die Anwendung der DNA-Linker-Präparation untauglichen Silber- und Kupferlochmasken bei der nanoskalig ortsselektiven Immobilisierung von DNA-Goldkolloiden in Abschnitt 7.6, bei der keine SCMOL-Schichtdickenverstärkung benötigt wurde, durch solche aus Gold ersetzt.

7.5.4 Präparation von Metallschichten auf DNA-Linkern

Um SCMOL-taugliche Kupfer- oder Silbersubstrate nutzen zu können, besteht die Möglichkeit die DNA-Linker-Präparation vor der Polymerblend-Lithographie durchzuführen, bei der diese Metallschichten erzeugt werden. Dies ist dann sinnvoll, wenn anschließend nicht DNA-Gollkolloide sondern TMV präpariert werden sollen, da bei der Präparation der Kolloide ähnliche Lösungen wie bei jener der DNA-Linker zum Einsatz kommen.

Diese Vertauschung im Präparationsablauf ist jedoch nicht als unkritisch anzusehen. Bei dieser Vorgehensweise sind die auf der Probe präparierten DNA-Linker bei der Durchführung der Polymerblend-Lithographie einer hohen thermischen Beanspruchung bei der Metallbedampfung, sowie großen mechanischen Belastungen beim Spincoating-Verfahren und der Snowjet-Reinigung ausgesetzt.

Diese Alternative wurde in Abschnitt 7.7 im Rahmen des gesamten Strukturierungsprozesses aus DNA-Linker-Präparation, Polymerblend-Lithographie, SCMOL-Schichtdickenverstärkung und Viren-Assemblierung untersucht.

7.6 Ortsselektive Immobilisierung von DNA-funktionalisierten Goldkolloiden

Um eine auf DNA-Hybridisierung basierende, ortsselektive Immobilisierung von Nanopartikeln zu realisieren, wurden mit DNA-Linkern versehene Goldkolloide aufgrund ihrer schnellen Präparationsmöglichkeit als Vorstufe für spätere Experimente mit TMV-Derivaten verwendet und um hierbei gewonnene Erkenntnisse zu übertragen.

7.6.1 Spektroskopische Analyse von synthetisierten DNA-Goldkolloiden

Vor dem Einsatz der DNA-Goldkolloid-Präparation stellte sich die Frage nach der erfolgreichen Synthese der mit thiolterminierten DNA-Linkern versehenen Gold-Nanopartikel. Neben einer einfachen optischen Kontrollmöglichkeit wurde die Option einer spektroskopischen Analyse herangezogen.

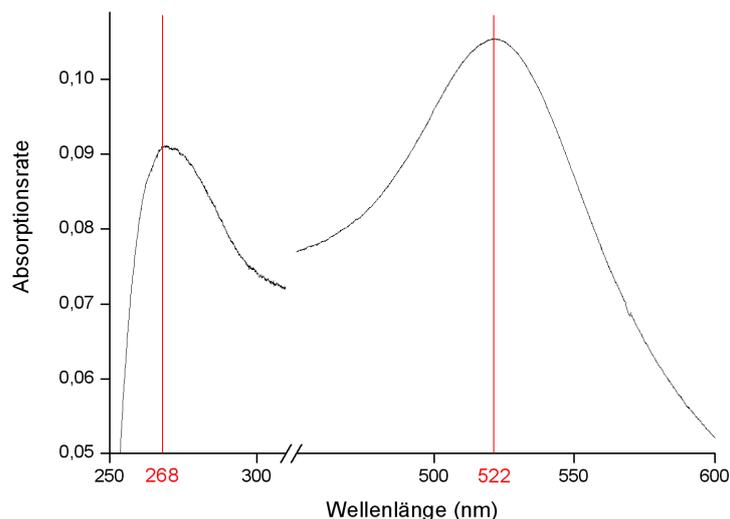


Abbildung 7.15: Absorptionsspektrum der synthetisierten DNA-Goldkolloid-Lösung. Es ist ein von der DNA verursachter Peak bei 268 nm sowie der Peak der Plasmonenresonanz des Goldes bei 522 nm zu erkennen. Demnach sind in der Lösung sowohl DNA-Linker als auch stabilisierte Goldkolloide vorhanden, was auf eine erfolgreiche Anbindung der beiden Komponenten schließen lässt.

Bei der optischen Kontrolle ist eine schnelle Überprüfung hinsichtlich der bei der Präparation am häufigsten auftretenden Fehlerquellen möglich. Die aufgrund der Plasmonenresonanz auftretende rote Farbe der Goldkolloid-Suspension sollte auch bei der fertigen DNA-Goldkolloid-Lösung noch vorhanden sein. Weist die Lösung dagegen einen schwarzen Farbton auf, deutet dies auf ein Fehlen von DNA-Linkern hin. Diese verhindern nach der Pufferzugabe und der damit einhergehenden Zerstörung der die Goldkolloide umgebenden Azid-Schicht deren Ausfällen aus der Lösung. Ist die Lösung durchsichtig, sind keine oder nur noch sehr wenige Goldnanopartikel enthalten. Häufigste Ursache hierfür ist deren Entfernung bei unachtsamem Entfernen des Überstands im Anschluss an den Zentrifugierprozess.

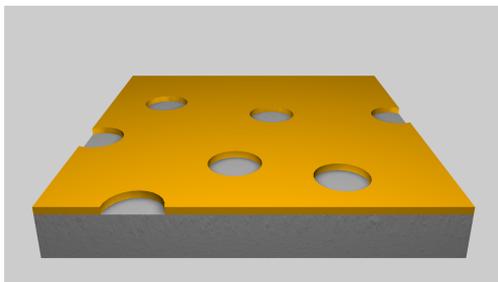
Die bei den Experimenten eingesetzten DNA-Goldkolloid-Lösungen zeigten eine leicht rötliche Farbe. Der im Vergleich zur Ausgangslösung schwächere Farbton ist mit Sicherheit der verringerten Konzentration der Gold-Nanopartikel geschuldet. Die verwendeten Lösungen enthalten demnach sowohl Goldkolloide als auch DNA-Linker.

Um weitere Gewissheit zu schaffen, wurden die DNA-Goldkolloid-Lösungen einer zusätzlichen spektroskopischen Analyse unterzogen. Erwartet wurden Absorptionspeaks

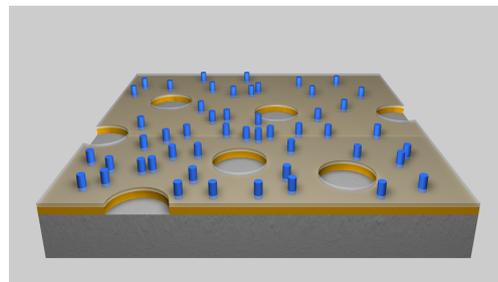
bei etwa 260 nm wegen der enthaltenen DNA-Einzelstränge, sowie bei etwa 520 nm aufgrund der Plasmonenresonanz des Goldes, was bereits anhand der Farbe der Lösung verifiziert werden konnte.

Die spektroskopische Untersuchung wurde mit dem UV-Vis-NIR-Absorptionsspektrometer CARY 500 Scan der Firma Varian (Milpitas, Kalifornien, USA) unter Verwendung von Küvetten aus Quarzglas mit hoher UV-Transmission durchgeführt. Das aufgenommene Spektrum ist in Abbildung 7.15 dargestellt und umfasst zwei Absorptionsmaxima. Neben dem vom Gold verursachten Absorptionspeak von etwa 522 nm ist auch ein Maximum bei etwa 268 nm zu verzeichnen, was dem erwarteten Wert von 260 nm sehr nahe kommt. Es ist also davon auszugehen, dass sich sowohl stabilisierte Goldkolloide als auch DNA-Linker in der Lösung befinden und somit eine erfolgreiche Anbindung stattgefunden hat. Alle weiteren Experimente wurden mit den hier untersuchten DNA-Goldkolloid-Lösungen durchgeführt.

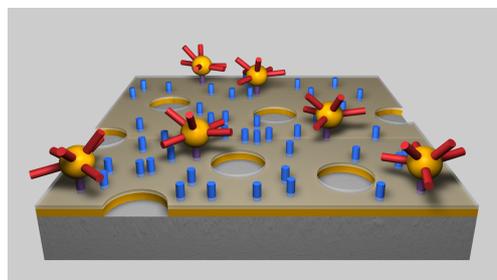
7.6.2 Präparation von synthetisierten DNA-Goldkolloiden auf mittels PBL vorstrukturierten, mit DNA-Linkern versehenen Goldmasken



(a) Polymerblend-Lithographie



(b) DNA-Linker-Präparation



(c) DNA-Goldkolloid-Präparation

Abbildung 7.16: Schematischer Prozessverlauf der ortsselektiven Immobilisierung von DNA-Goldkolloiden auf einem mit DNA-Einzelsträngen versehenen Substrat mit einer metallischen Lochstruktur. Goldmaske (gelb), DNA-Linker (blau), komplementärer DNA-Linker (rot), MCH-Schicht (grau), Goldkolloide (gelb).

Nach Optimierung und Anpassung der Polymerblend-Lithographie an die DNA-Linker- und die DNA-Goldkolloid-Präparation in Form einer veränderten Prozessführung beim selektiven PMMA-Lift-Off und bei der Metallbedampfung, sowie eines Austauschs des verwendeten Metalls wurden diese Präparationsverfahren zu einem gesamten Strukturi-

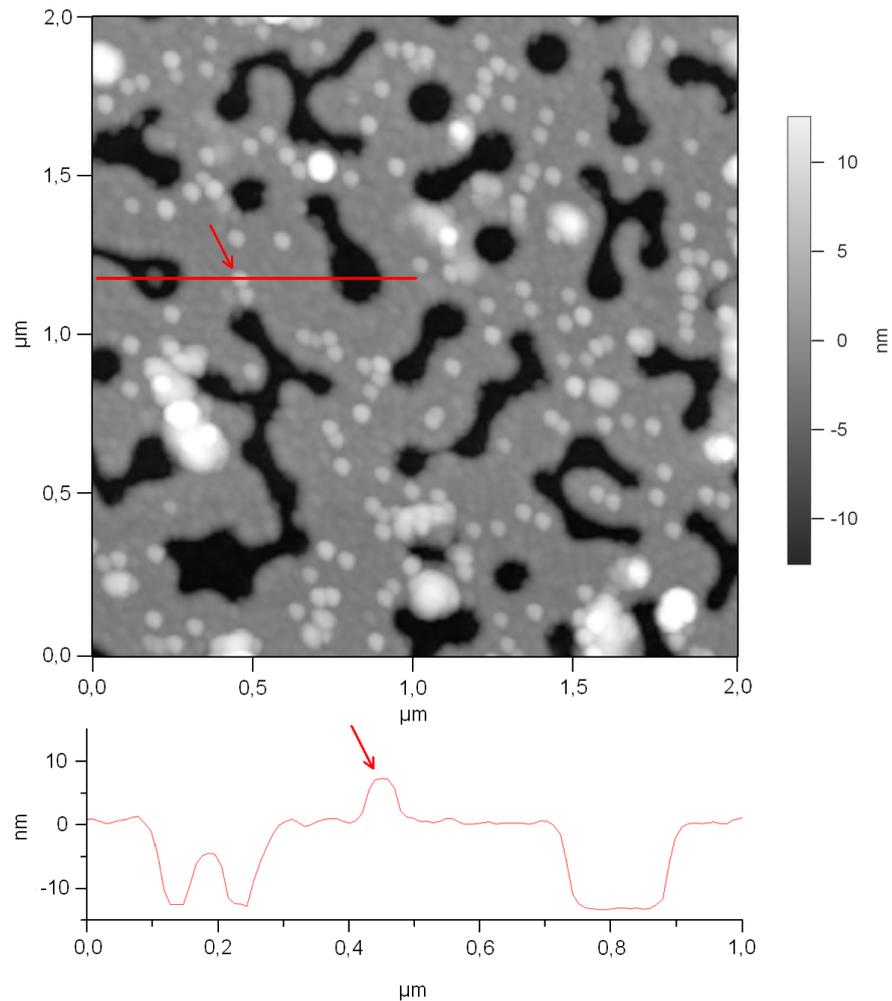


Abbildung 7.17: AFM-Höhenbild einer mittels Polymerblend-Lithographie, DNA-Linker-Präparation und DNA-Goldkolloid-Präparation strukturierten Oberfläche mit einer Scanfeldgröße von 2 µm. Die Goldschicht weist eine teilweise zusammenhängende Lochstruktur auf. Die Goldkolloide sind bis auf eine einzige Ausnahme nur außerhalb der Löcher oder in direktem Kontakt zur Goldmaske zu erkennen. Die Höhenmessung zeigt, dass es sich bei den kugelförmigen Objekten um die präparierten Goldkolloide handelt. Während sie in der Abbildung aufgrund der Spitzegeometrie verbreitert erscheinen, ist im Querschnitt eine korrekte Höhe von 10 nm festzustellen.

rierungsverfahren kombiniert. Sämtliche verwendeten Lösungen, Umgebungsbedingungen und Strukturierungsparameter entsprachen den in den Abschnitten 7.4 und 7.5 ermittelten, sowie den im einführenden Abschnitt 7.2 erwähnten. Auf den zuvor mittels Snowjet-Verfahren gereinigten Siliziumsubstraten wurde demnach zunächst mittels Polymerblend-Lithographie eine 12 nm dicke Goldschicht mit Lochdurchmessern von teilweise unter 100 nm erzeugt. Anschließend wurde bei der DNA-Linker-Präparation auf der Goldoberfläche ein SAM aus thiolterminierten DNA-Linkern und Mercaptohexanol erzeugt. Dadurch sollte die dortige Anbindung der bei der darauf folgenden

7.6 Ortsselektive Immobilisierung von DNA-funktionalisierten Goldkolloiden

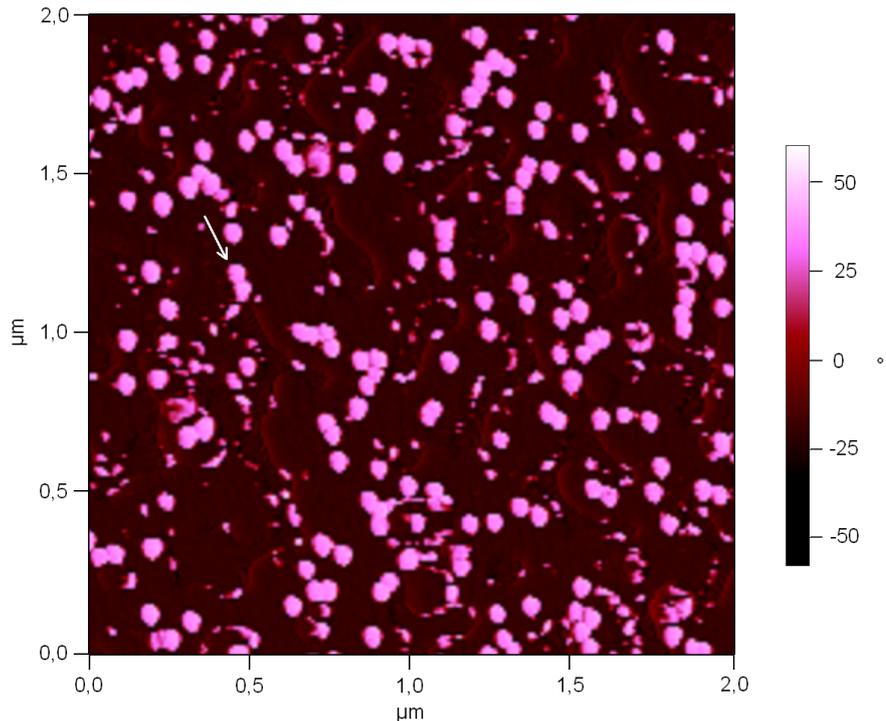


Abbildung 7.18: AFM-Phasenbild der mittels DNA-Hybridisierung auf einer Goldmaske präparierten Goldkolloide, das zur Aufnahme aus Abbildung 7.17 gehört. Die Goldkolloide weisen gegenüber der Goldfläche einen Phasenkontrast auf, der auf die daran gebundenen DNA-Linker zurückgeführt werden kann.

DNA-Goldkolloid-Präparation aufgebracht werden. Deren DNA-Linker wiesen die zu den bereits auf der Probe befindlichen Oligonukleotiden komplementäre Basenabfolge auf und konnten damit durch die mit der DNA-Hybridisierung einhergehende Bildung von Wasserstoffbrücken an diese binden. Bei einem optimal verlaufenen Strukturierungsprozess wäre zu erwarten, dass sich die Goldkolloide demzufolge lediglich auf der Goldoberfläche jedoch nicht auf dem innerhalb der Löcher frei liegenden Siliziumsubstrat befinden. Der schematische Ablauf der gesamten Lithographie-Methode ist in Abbildung 7.16 veranschaulicht.

Abbildung 7.17 zeigt das Höhenbild einer AFM-Aufnahme von einer so strukturierten Probe, wobei die Scanfeldgröße $2 \mu\text{m}$ beträgt. Die Goldmaske weist eine Lochstruktur auf, die teilweise zusammenhängend ist. Der kleinste Lochdurchmesser liegt bei 90 nm . In der Goldschicht ist die Korngröße des aufgedampften Metalls noch deutlich erkennbar. Außerdem befinden sich die präparierten Goldkolloide auf der Probe, die aufgrund des endlichen Spitzenradius des Cantilevers etwas verbreitert erscheinen. In der Höhenmessung ist jedoch der korrekte Durchmesser von 10 nm festzustellen. Die Goldkolloide befinden sich fast ausschließlich auf der Goldoberfläche, während fast alle Löcher leer sind. Eine genauere Betrachtung ergibt, dass sich im gezeigten Probenausschnitt 156 Kolloide auf der Goldoberfläche und nur ein Kolloid auf der Siliziumoxidoberfläche befinden. Dies ist ein eindeutiges Indiz für die erfolgreiche Bindung zwischen den Gold-

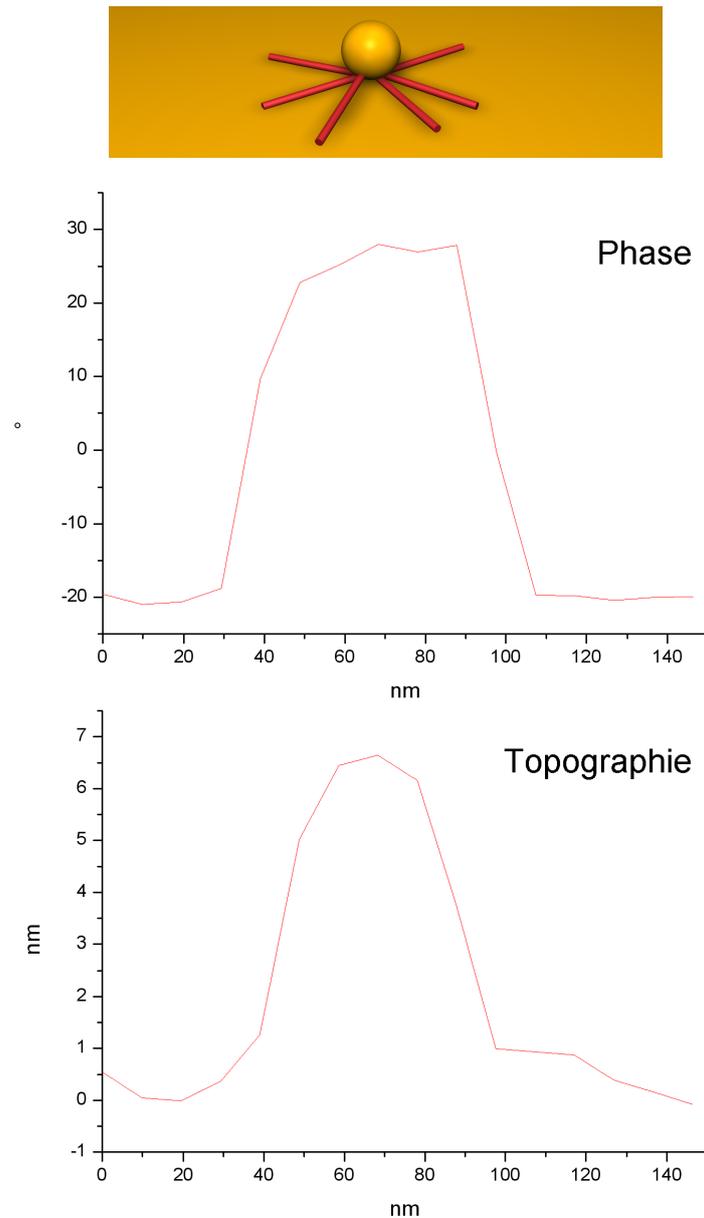


Abbildung 7.19: Querschnitte von AFM-Phasenbild und zugehörigem Höhenbild des in den Abbildungen 7.17 und 7.18 mit dem Pfeil markierten Goldkolloids. Während die Phasenmessung aufgrund ihrer Sensitivität für die DNA-Linker einen Kolloid-Durchmesser von etwa 60 nm liefert, kann mit der Messung der Topographie lediglich der Goldkolloid ohne die angebundenen Linker vermessen werden, weshalb sich ein Durchmesser von etwa 10 nm ergibt. Dieser Wert wurde anhand der Kolloid-Höhe ermittelt, um durch Spitzenverbreiterung bedingte Effekte zu umgehen.

kolloiden und der Goldschicht, die beide mit komplementären DNA-Sequenzen versehen wurden.

Es ist erkennbar, dass sich noch zahlreiche weitere Goldkolloide in den Löchern befinden, allerdings ausschließlich an deren Rändern und damit wiederum in direktem Kontakt zur Goldschicht. Dies steht im Einklang mit der aufgestellten These, wonach die Goldkolloide ausschließlich an die Goldschicht binden.

Eine weitere wichtige Information enthält das Phasenbild dieser AFM-Aufnahme, das in Abbildung 7.18 gezeigt ist. Hier sind die Goldkolloide als helle Punkte identifizierbar und weisen damit einen Phasenkontrast zur Goldoberfläche auf. Dieser Unterschied könnte durch die Anbindung der DNA-Linker zu Stande kommen, was ein weiteres Indiz für eine erfolgreiche DNA-Linker-Präparation sowie eine erfolgreiche Herstellung von DNA-behafteten Goldkolloiden ist.

Der Durchmesser der Goldkolloide im Phasenbild ist im Vergleich zum Höhenbild deutlich vergrößert. Eine Gegenüberstellung der beiden zugehörigen Querschnitte ist in Abbildung 7.19 gezeigt. Der Durchmesser der Kolloide liegt im Phasenbild bei etwa 60 nm statt der tatsächlichen 10 nm. Der verwendete DNA-Linker ist aus 44 Nukleotiden mit Konturlängen von jeweils etwa 0,5 nm aufgebaut. Somit ergibt sich für die DNA-Linker eine Gesamtlänge von etwa 22 nm, was bei beiderseitiger Anbindung an die Goldkolloide zu einem Gesamtdurchmesser von rund 54 nm führt. Dieser Wert steht im Einklang mit dem gemessenen Wert von etwa 60 nm. Somit kann bei der AFM-basierten Detektion von DNA [86–89] die Messung des Phasenkontrasts eine wertvolle Alternative zur Topographie-Messung darstellen.

Es lässt sich festhalten, dass durch die Einführung des kombinierten Strukturierungsverfahrens aus Polymerblend-Lithographie, DNA-Linker-Präparation und DNA-Goldkolloid-Präparation auf den hierbei in Dimensionen von unter 100 nm lateral heterogen vorstrukturierten Substraten eine ortsselektive Immobilisierung von mit DNA-Einzelsträngen versehenen Nanopartikeln auf der Grundlage der DNA-Hybridisierung demonstriert wurde. Die ortsselektive Immobilisierung erfolgte dabei unter Berücksichtigung des Flächenverhältnisses von Siliziumoxid und Gold von etwa 1:4 zu über 97 % gemäß der durch die nanoskalige Vorstrukturierung bedingten kleinräumigen chemischen Oberflächenkartierung.

7.7 Einseitige Anbindung und vertikale Aufrichtung von TMV-Derivaten auf Oberflächen

Nachdem die ortsselektive Anbindung eines DNA-basierten Trägersystems in Form einer Immobilisierung von DNA-Goldkolloiden auf nanolithographisch vordefinierten Positionen demonstriert wurde, sollte nun zusätzlich zur ortsspezifischen Kopplung eine vertikale Aufrichtung der TMV realisiert werden, um ein Trägersystem für sterisch ideal zugängliche, bioaktive Sensor-Moleküle mit konformativer Freiheit und erhaltener Funktionalität zu schaffen.

Da wie in Abschnitt 7.5 gezeigt die bei der DNA-Linker-Präparation eingesetzten Puffer-Systeme für den teilweisen oder sogar vollständigen Abbau von Kupfer- und Silberschichten verantwortlich sind, wurde dieser Präparationsschritt zu Beginn der Strukturierung durchgeführt. Eine 12 nm dicke Goldschicht, die nach einer 1 nm dicken

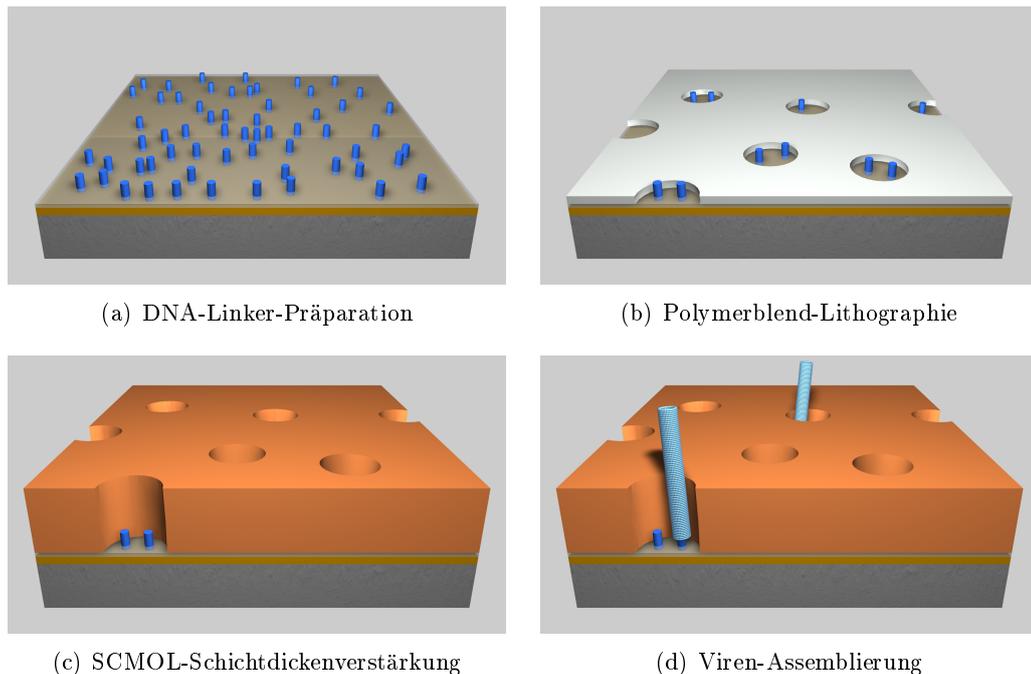


Abbildung 7.20: Schematischer Prozessverlauf der ortsselektiven Immobilisierung und Aufrichtung von TMV-Derivaten auf einem Substrat mit maßgeschneiderter Lochstruktur und darin befindlichen, kopplungsaktiven DNA-Einzelsträngen. Silbermaske (weiß), DNA-Linker (dunkelblau), Viren (hellblau), Goldschicht (gelb), MCH-Schicht (grau), SCMOL-Schicht (orange).

Titanschicht als Haftvermittler auf einen mittels Snowjet gesäuberten Silizium-Wafer aufgedampft wurde, bildete dabei das Ausgangssubstrat für die verwendeten Thiolterminierten DNA-Linker und die Oberflächenpassivierungsschicht aus Mercaptohexanol. Im zweiten Schritt wurde mittels PBL eine Silbermaske mit Lochdurchmessern von bis hinab zu 50 nm hergestellt. Die Lochtiefe wurde im dritten Schritt mittels SCMOL-Schichtdickenverstärkung von 12 nm auf 60 nm erhöht, indem die Probe für 3 h bei 60 °C in einer DTE-Lösung gelagert wurde. Im letzten Schritt wurde die Viren-Assemblierung von Herrn Fabian Eber am Biologischen Institut der Universität Stuttgart durchgeführt [37]. Dabei wurde das Ziel einer einseitigen Anbindung der TMV innerhalb der Löcher, sowie einer Aufrichtung entlang der SCMOL-Strukturen mit hohem Aspektverhältnis verfolgt. Sämtliche verwendeten Lösungen, Umgebungsbedingungen und Strukturierungsparameter entsprachen den in den Abschnitten 7.4 und 7.5 ermittelten, sowie den im einführenden Abschnitt 7.2 erwähnten. Der gesamte Präparationsprozess ist in Abbildung 7.20 in seinem Ablauf veranschaulicht.

Abbildung 7.21 zeigt das Höhenbild einer AFM-Aufnahme von einer mit der beschriebenen Lithographie-Methode strukturierten Probe, wobei die Scanfeldgröße 2 μm beträgt. Die SCMOL-Schicht weist eine Lochstruktur auf, deren Tiefe bei etwa 60 nm liegt. Es ragen zwei TMV aus den SCMOL-Löchern hervor, deren Länge 135 nm betragen sollte. Da die Durchmesser der beiden SCMOL-Löcher bei etwa 150 nm liegen, wäre eine Anbindung der aufgerichteten TMV auf dem Substrat mit den genannten

7.7 Einseitige Anbindung und vertikale Aufrichtung von TMV-Derivaten

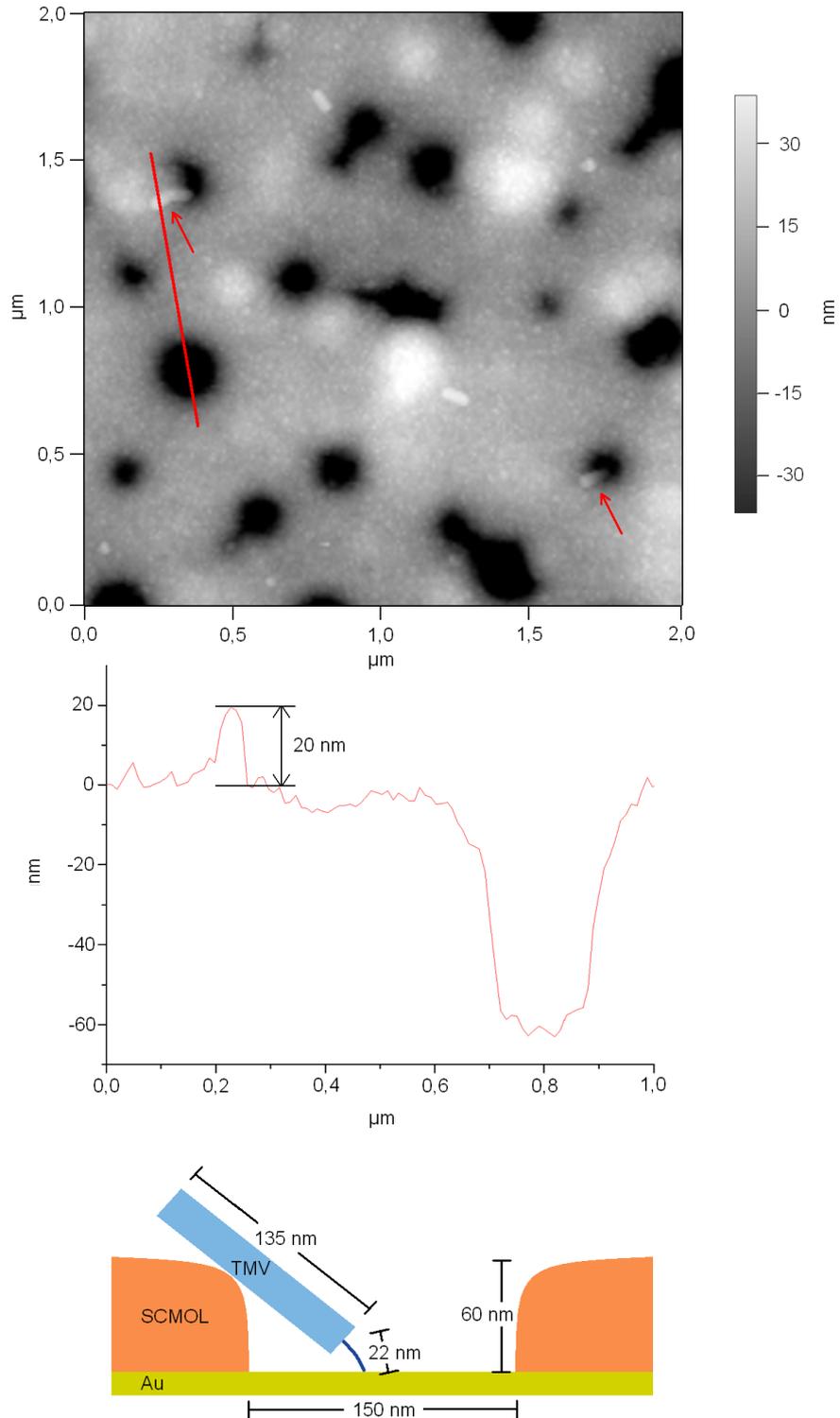


Abbildung 7.21: AFM-Höhenbild von mittels DNA-Hybridisierung ortsselektiv immobilisierten und mittels PBL und SCMOL-Wachstum aufgerichteten Tabakmosaikviren mit einer Scanfeldgröße von 2 μm . In der Aufnahme sind zwei 135 nm lange TMV (Pfeile) zu erkennen, die aus den 60 nm tiefen und hier speziell 150 nm breiten Löchern der strukturierten SCMOL-Schicht herausragen. Dem gezeigten Querschnitt ist zu entnehmen, dass sich die höchste Stelle des TMV 20 nm über der umgebenden SCMOL-Maske befindet.

Größenverhältnissen vereinbar. Es ist zu berücksichtigen, dass die DNA-Linker selbst eine nicht zu vernachlässigende Länge von 22 nm besitzen, die zu den 135 nm der TMV noch hinzukommt.

Die Betrachtung des gezeigten Querschnitts ergibt einen Höhenunterschied von etwa 20 nm zwischen dem höchsten Punkt des aufgerichteten TMV und der umgebenden SCMOL-Matrix. Die Lochdurchmesser variieren von 200 nm bis hinab zu 50 nm. Durch das geringfügige Zuwachsen der Lochstrukturen bei der SCMOL-Schichtdickenverstärkung fallen die auftretenden Durchmesser noch etwas geringer als bei der Polymerblend-Lithographie aus und eignen sich somit ideal für die Aufrichtung der TMV. Da die beiden aufgerichteten TMV in Löchern mit Durchmessern von 150 nm gebunden sind, sind sie unter einem etwas flacheren Winkel aufgestellt.

In der AFM-Aufnahme sind auf der SCMOL-Oberfläche zwei weitere virenartige Gebilde zu erkennen. Mit Längen von 75 nm und 100 nm sind sie kürzer als TMV, weshalb es sich lediglich um Fragmente derselben handelt.

Da ein an der obersten Stelle des TMV gebundenes, bioaktives Molekül mit 20 nm Distanz fernab von Substrateinflüssen an einer Position hoher Zugänglichkeit und insbesondere konformativer Freiheit immobilisiert wäre, könnte mit der vorgestellten Präparationsmethode aus strukturbildender Polymerblend-Lithographie und SCMOL-Schichtdickenverstärkung, sowie aus für die Ankopplung verantwortlicher DNA-Linker-Präparation und Viren-Assemblierung ein hochsensitives Detektionsverfahren durch Herstellung von Nano-Sonden auf der Basis von ortsselektiv gebundenen, aufrecht stehenden TMV als Trägersystem realisiert werden. Dabei steht auch die Möglichkeit zur Verfügung die SCMOL-Schichtdickenverstärkung erst nach erfolgter Viren-Assemblierung einzusetzen, um die noch flach auf dem Substrat liegenden, einseitig gebundenen Virionen an einer Materialgrenze nach dem Wagenheber-Prinzip aufzurichten und den Strukturierungsprozess auf diese Weise noch zu verbessern.

7.8 SCMOL-Schichtbildung mit Monothiolen

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei den in Abschnitt 7.5 beschriebenen Schichten, die sich auf Kupfersubstraten gebildet haben, um substratkonsumierende metallorganische Schichten (SCMOL) handelt, wurden diese eingehend untersucht. Das Besondere ist, dass sie sich aus einem Molekül bilden, das nur eine Thiolgruppe besitzt. Bisher wurde das SCMOL-Wachstum nur für zwei- oder mehrfach thiofunktionalisierte Moleküle beschrieben. Die aus Kupfer und dem Monothiol Mercaptohexanol (MCH) gebildeten Schichten wurden mittels EDX auf ihre Elementzusammensetzung und mittels AFM auf ihr Wachstumsverhalten hin untersucht.

7.8.1 Elementzusammensetzung von MCH-SCMOLs

Zunächst wurden die durch Immersion von Kupfersubstraten in Mercaptohexanol-Lösungen gebildeten Schichten mittels EDX auf ihre Elementzusammensetzung hin analysiert. Bei Vorliegen einer SCMOL-Schicht ist ein bestimmtes stöchiometrisches Verhältnis zwischen den in der Schicht enthaltenen Kupferatomen und den in den Mercaptohexanol-Molekülen enthaltenen Schwefelatomen zu erwarten, das bei einem für SCMOL typischen Aufbau bei 1:1 liegen sollte.

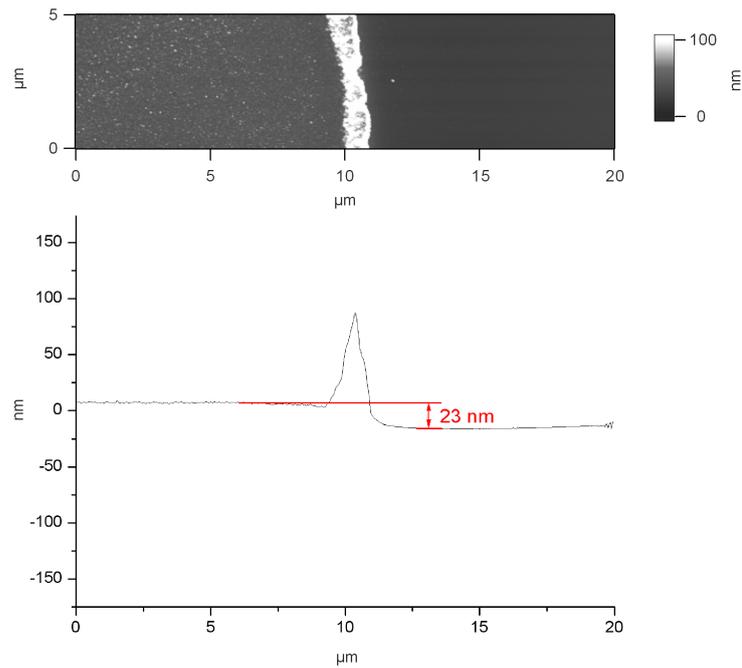
Für die Untersuchung wurden zunächst zwei Proben mit unterschiedlichen Wachstumsdauern hergestellt. Nach einer Bedampfung von gereinigten Siliziumstücken mit jeweils 12 nm Kupfer wurden diese bei 60 °C für 1 h beziehungsweise 3 h in eine wässrige Mercaptohexanol-Lösung mit einer Konzentration von 1 mmol/l gebracht, mit Wasser abgespült und mit einem Stickstoffstrahl getrocknet. Anschließend wurden die beiden Proben ins Rasterelektronenmikroskop eingeschleust und eine EDX-Messung mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV vorgenommen. Für die Probe mit einstündiger Immersion in MCH ergab sich ein Verhältnis zwischen den Kupfer- und Schwefelatomen von 74 % und 26 %. Bei der für drei Stunden eingetauchten Probe lag der prozentuale Anteil der Kupferatome bei 57 % und jener der Schwefelatome bei 43 %. Bei längerer Wachstumsdauer und damit bei erhöhter Schichtdicke gleichen sich die Elementverhältnisse aneinander an. Die Abnahme des relativen Anteils der Kupferatome liegt am zunehmenden Abbau der Kupferschicht bei gleichzeitigem Einbau von Schwefelatomen aus der MCH-Lösung. Bei einer vollständig durchgewachsenen Schicht sollte der Anteil beider Atomsorten demnach bei jeweils 50 % liegen. Damit wäre die oben genannte Voraussetzung für den Nachweis einer SCMOL-Schicht erbracht. Es ist mit Mercaptohexanol demnach erstmals möglich SCMOL-Schichten mit einem Monothiol zu erzeugen. Eine genauere Untersuchung der Wachstumsparameter wird im folgenden Abschnitt durchgeführt.

7.8.2 Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Schichtdicke von MCH-SCMOLs

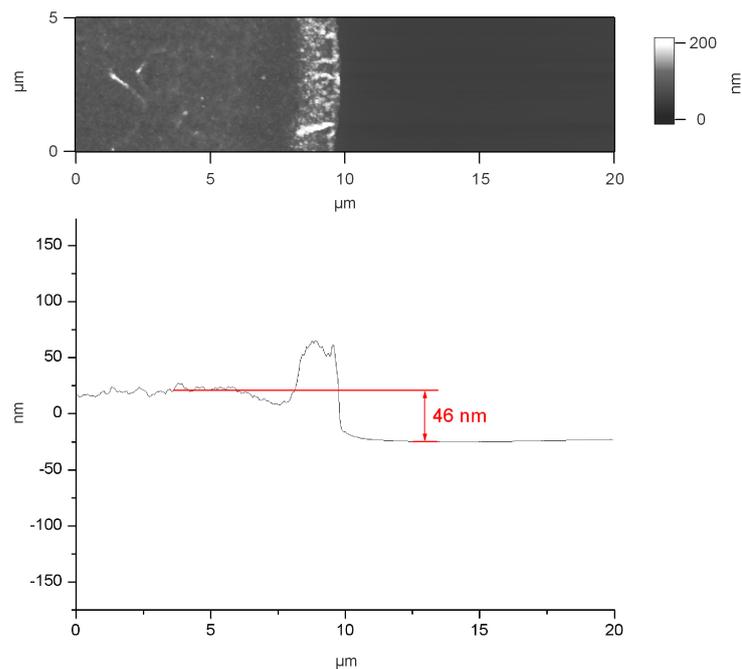
Um den Wachstumsprozess der mittels Mercaptohexanol gebildeten Schichten mit dem bereits bekannter SCMOLs vergleichen zu können, wurde die Abhängigkeit der resultierenden Schichtdicke von der Wachstumsdauer und der Umgebungstemperatur bei dieser Art der Schichtbildung untersucht.

Dazu wurden mehrere mit 12 nm Kupfer bedampfte Siliziumproben für unterschiedlich lange Zeiten bei Raumtemperatur in die wässrige 1 mmol/l MCH-Lösung gelegt. Es wurden Wachstumszeiten von 0,5, 1, 2 und 3 h gewählt. Die Kanten der gebildeten Schichten wurden zur Höhenbestimmung anschließend mit dem AFM untersucht. Bei den Proben mit halb- und einstündiger Wachstumszeit konnte keine Schichtbildung beobachtet werden. Das in Abbildung 7.22(a) gezeigte Höhenbild einer AFM-Aufnahme der Schichtkante der für zwei Stunden eingetauchten Kupferprobe zeigt mit etwa 23 nm zwar lediglich eine leicht erhöhte Schichtdicke, weist jedoch einen etwa 100 nm hohen Wulst am Rand der Schicht auf. Bei dem in Abbildung 7.22(b) dargestellten Höhenbild einer AFM-Aufnahme der Probe mit dreistündiger Wachstumsdauer ist ein Höhenunterschied von 46 nm statt der ursprünglichen 12 nm festzustellen. Auch hier ist ein Wulst mit etwa 100 nm Höhe am Schichttrand zu erkennen. Dieser könnte durch die erhöhte Rauigkeit am Rand der aufgedampften Kupferschicht und die damit an dieser Stelle erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit entstanden sein. Das eigentliche Schichtwachstum ist bei Raumtemperatur abgesehen von der Wulstbildung also erst nach einigen Stunden als solches zu erkennen und damit für eine Verwendung in der Probenpräparation sehr langsam. Da sich der Wachstumsprozess bei bereits bekannten SCMOL-Schichten durch die Zufuhr von Wärme beschleunigen lässt, wurde die obige Untersuchung noch einmal im Wärmeschrank bei 60 °C wiederholt.

7 Herstellung sterisch ideal zugänglicher Nano-Sonden mit hoher Nachweisempfindlichkeit



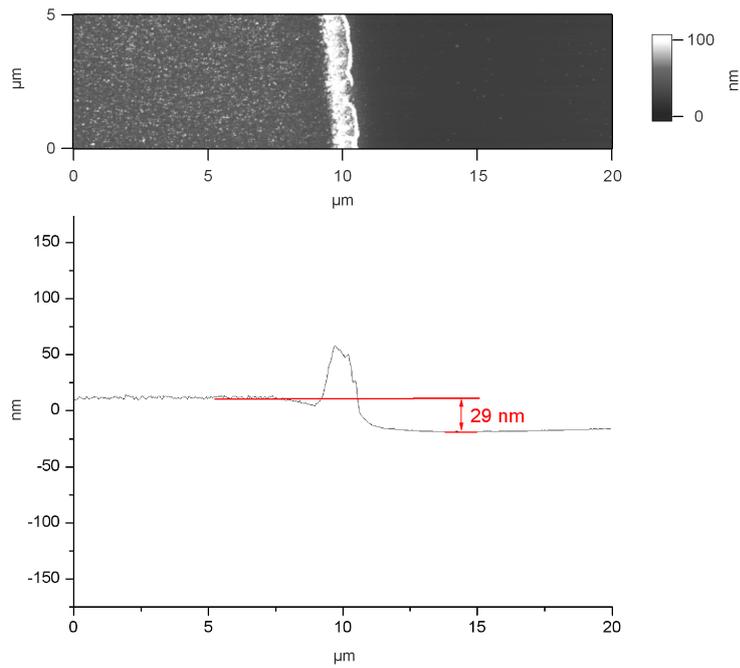
(a) 22 °C, 2 h



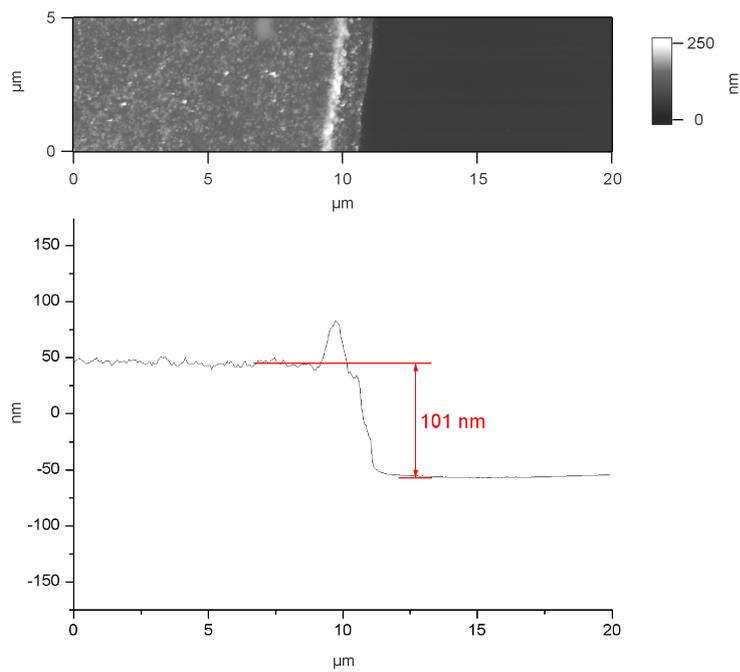
(b) 22 °C, 3 h

Abbildung 7.22: AFM-Höhenbilder von bei Raumtemperatur in 1 mmol/l Mercaptohexanol-Lösung gelagerten 12 nm dicken Kupferschichten. (a) Bei der für 2 h eingetauchten Kupferschicht ist mit 23 nm eine geringe Schichtbildung zu erkennen. (b) Bei der für 3 h eingetauchten Kupferschicht ist eine etwa 46 nm hohe Schicht erkennbar. Bei beiden Proben ist zudem ein etwa 100 nm hoher Wulst am Rand der ursprünglichen Kupferschicht zu sehen, der durch die an dieser Stelle erhöhte Rauigkeit und die damit verbundene erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit entstanden sein könnte.

7.8 SCMOL-Schichtbildung mit Monothiolen



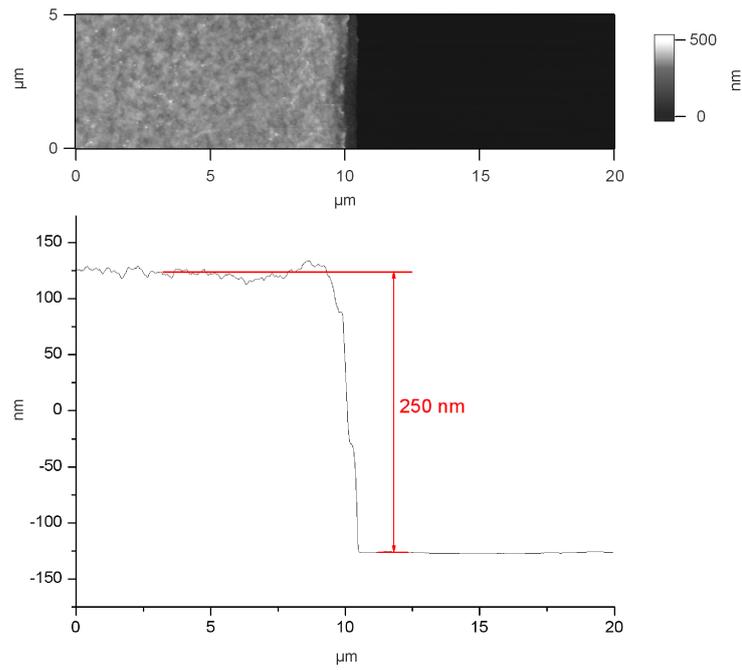
(a) 60 °C, 0,5 h



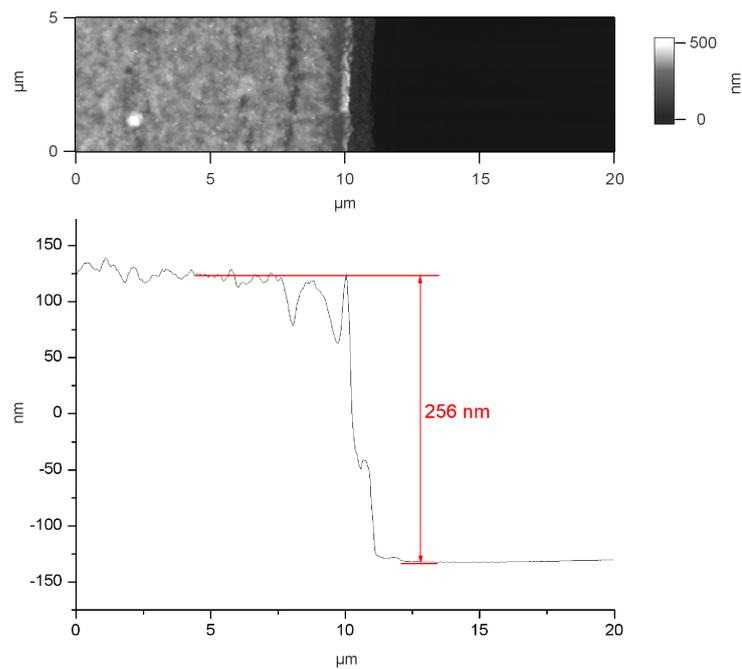
(b) 60 °C, 1 h

Abbildung 7.23: AFM-Höhenbilder von bei 60 °C in 1 mmol/l Mercaptohexanol-Lösung gelagerten 12 nm dicken Kupferschichten. (a) Bei der für 0,5 h eingetauchten Kupferschicht ist mit 29 nm eine geringe Schichtbildung, sowie ein etwa 70 nm hoher Wulst am Rand der ursprünglichen Kupferschicht zu erkennen. (b) Bei der für 1 h eingetauchten Kupferschicht ist zu erkennen, dass sich neben dem Wulst am Rand der ursprünglichen Kupferschicht eine etwa 101 nm hohe Schicht gebildet hat.

7 Herstellung sterisch ideal zugänglicher Nano-Sonden mit hoher Nachweisempfindlichkeit



(a) 60 °C, 2 h



(b) 60 °C, 3 h

Abbildung 7.24: AFM-Höhenbilder von bei 60 °C in 1 mmol/l Mercaptohexanol-Lösung gelagerten 12 nm dicken Kupferschichten. (a) Bei der für 2 h eingetauchten Kupferschicht beträgt die Schichtdicke bereits 250 nm. (b) Bei der für 3 h eingetauchten Kupferschicht hat sich die Schichtdicke mit 256 nm gegenüber der zweistündigen Immersion nur noch leicht erhöht, was auf das Erreichen der maximalen Schichtdicke schließen lässt.

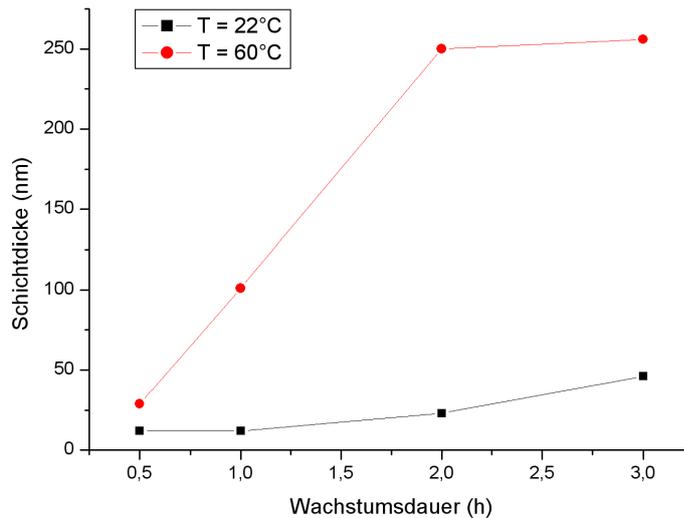


Abbildung 7.25: Schaubild der mit dem AFM bestimmten Schichtdicken von MCH-SCMOLs auf Kupfer für unterschiedliche Temperaturen und Wachstumsdauern.

Die mit Wachstumszeiten von 0,5, 1, 2 und 3 h bei 60 °C in 1 mmol/l MCH-Lösung eingetauchten 12 nm dicken Kupferschichten wurden wiederum mit dem AFM auf ihre resultierende Schichtdicke hin untersucht. Die in Abbildung 7.23(a) gezeigte Schichtkante der für 30 min eingetauchten Kupferprobe im Höhenbild einer AFM-Aufnahme zeigt mit etwa 29 nm bereits eine leicht erhöhte Schichtdicke, sowie abermals einen etwa 70 nm hohen Wulst am Rand der Schicht. Bei dem in Abbildung 7.23(b) dargestellten AFM-Höhenbild der für eine Stunde eingetauchten Probe ist bereits eine 101 nm hohe Schicht zu erkennen, so dass der am Rand übliche Wulst sich von der restlichen Schicht nur noch leicht abhebt. Das in Abbildung 7.24(a) gezeigte Höhenbild einer AFM-Aufnahme der für zwei Stunden behandelten Kupferschicht illustriert das weiter voran schreitende Schichtwachstum. Die Höhendifferenz zwischen der MCH-SCMOL und dem Siliziumsubstrat beträgt hier bereits 250 nm. Die dreistündige Immersion, deren Resultat im in Abbildung 7.24(b) dargestellten AFM-Höhenbild der zugehörigen Probe zu sehen ist, zeigt nur noch geringe Veränderungen. Mit einer Schichtdicke von 256 nm ist eine geringe Zunahme der Schichtdicke zu verzeichnen und die Endhöhe der SCMOL damit erreicht. Alle ermittelten Schichtdicken sind nochmals in Abbildung 7.25 zusammengefasst.

Es lässt sich demnach konstatieren, dass mittels Mercaptohexanol-Lösungen auf Kupferschichten gebildete SCMOL-Schichten einen maximalen Schichtdickenverstärkungsfaktor von etwa 20 besitzen und ihre Endhöhe bei 60 °C bereits nach rund 3 h erreichen. Demnach wäre mit MCH die Bildung höherer und schneller wachsender SCMOL-Schichten als mit DTE möglich. Bei DTE beträgt die maximale Verstärkung der Schichtdicke etwa 10 und wird nach etwa 3,5 h im Wärmeschränk bei 60 °C erreicht. Bisher konnte ein erfolgreiches SCMOL-Wachstum mit Mercaptohexanol allerdings nur auf Kupfer- und nicht auf Silberschichten demonstriert werden, was mit DTE beispielsweise ebenfalls möglich ist. Mercaptohexanol stellt demzufolge zumindest auf Kupferschichten eine interessante Alternative zu dem ebenfalls in Wasser löslichen DTE dar.

7.9 Zusammenfassung

Durch die Kombination von Polymerblend-Lithographie, DNA-Linker-Präparation und DNA-Goldkolloid-Präparation wurde eine Lithographie-Methode entwickelt, welche die ortsselektive Immobilisierung von Gold-Nanopartikeln unter Ausnutzung der DNA-Hybridisierung entsprechend einer nanoskaligen chemischen Oberflächenkartierung ermöglicht. Vor der Präparation der mit DNA-Linkern versehenen, 10 nm großen Goldkolloide und der komplementären DNA-Linker auf der Probenoberfläche wurde diese mittels Polymer-Phasenseparation vorstrukturiert, wodurch nach Metallbedampfung und Polymer-Lift-off-Prozessen eine Gold-Lochmaske mit besonders kleinen Durchmessern im Bereich von unter 100 nm und Tiefen von 12 nm entstand. Mit dieser Methode der Nanolithographie ist durch die Selbstorganisation von Polymeren die großflächige Herstellung von Metallmasken möglich. Bei dem darauffolgenden DNA-basierten Immobilisierungsprozess zeigte sich eine hohe Ortsselektivität. Während sich mehr als 97 % der DNA-Goldkolloide im Kontakt mit der DNA-behafteten Goldschicht befanden, wurden weniger als 3 % der Goldkolloide innerhalb der Siliziumoxid-Löcher ohne Kontakt zur Goldmaske nachgewiesen.

Darauf aufbauend wurde eine Präparationsmethode entwickelt, anhand derer 135 nm lange, hohlzylindrische Tabakmosaikviren nicht nur ortsselektiv immobilisiert, sondern sogar auf dem Substrat annähernd senkrecht aufgerichtet werden können. Mit PBL wurden dabei Silber-Lochmasken mit den gewünscht kleinen Durchmessern von bis hinab zu 50 nm hergestellt und die Tiefe anschließend mittels SCMOL-Schichtdickenverstärkung von ursprünglich 12 nm auf die benötigten 50 nm bis 100 nm erhöht. Die Kopplung wurde mittels DNA-Linker-Präparation und abschließender Viren-Assemblierung realisiert. Mit ihrer genetisch modifizierbaren Protein-Ummantelung und ihrer starren zylindrischen Gestalt wohldefinierter Länge wären die mit dieser Methode immobilisierten und aufgerichteten Virus-Derivate durch Kombination mit bioaktiven Detektor-Molekülen, die aufgrund ihrer somit exponierten Position konformative Freiheit aufwiesen, als ortsselektiv adressierbare und gleichzeitig sterisch optimal zugängliche SONDENSYSTEME mit hoher Nachweisempfindlichkeit ideal geeignet.

Im Rahmen der Entwicklung der vorgestellten Lithographie-Methode zeigte sich außerdem die Möglichkeit der SCMOL-Bildung mit Monothiolen auf Kupferschichten. Mercaptohexanol ist das erste beschriebene Molekül mit nur einer Thiolgruppe, mit dem sich SCMOL-Schichten bilden lassen. Bisher wurden nur zwei- oder mehrfach thiolterminierte Moleküle als SCMOL-Bildner identifiziert. Mercaptohexanol zeigte eine temperaturabhängige Wachstumsgeschwindigkeit und eine maximale Schichtdickenverstärkung vom Faktor 20, die damit etwa doppelt so groß ist wie die vom ebenfalls wasserlöslichen SCMOL-bildenden Molekül Dithioerythritol (DTE).

8 Zusammenfassung

Da die Analyse von Oberflächeneigenschaften auf der Längenskala von einigen 100 μm bislang entweder niedrig aufgelösten oder nicht-quantitativen Messtechniken vorbehalten war, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein AFM mit ultragroßem Scanbereich von 800 μm x 800 μm entwickelt und zur Untersuchung biofunktioneller Oberflächen mit Anwendungspotential in der Biosensorik herangezogen. Mit Hilfe der durchgeführten Analysen konnten quantitative Aussagen über den bei der Dip-Pen-Nanolithographie ablaufenden Schreibvorgang getroffen und eine Lithographie-Methode zur einseitigen Anbindung und vertikalen Aufrichtung zylindrischer Tabakmosaikviren entsprechend einer nanoskaligen Vorstrukturierung von Metallsubstraten und unter Ausnutzung von DNA-Hybridisierung entwickelt werden. Zudem ist mit diesem AFM die Grundlage für die Detektion zusätzlicher Probeneigenschaften auf dieser Längenskala geschaffen, die mit gängigen Messmethoden nicht erfasst werden können, wie insbesondere die Untersuchung tribologischer, elastischer, chemischer, magnetischer oder elektrischer Eigenschaften.

Das aufgebaute Large-Scale-AFM-System basiert auf einem bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Messkopf und einer neuartigen Messbasis, die einen aus Stapelpiezoaktoren aufgebauten x-y-Scantisch und z-Scanner enthält. Mit dem entwickelten AFM-System konnte anhand von Aufnahmen mit Scanfeldgrößen von 800 μm bis hinab zu 5 μm dessen Funktionalität vom angestrebten Submillimeter- bis hin zum AFM-typischen Nanometer-Bereich demonstriert werden. Dabei zeigte sich neben der ausgezeichneten Driftstabilität nicht nur eine sehr gute laterale Auflösung, sondern auch eine hervorragende vertikale Auflösung. Diese kann auf einen Wert von unter 1 nm abgeschätzt werden, da beispielsweise nicht nur ein etwa 1 nm hoher SAM, sondern auch noch im darunter liegenden Siliziumoxidsubstrat befindliche Polierkratzer abgebildet werden konnten. Mit der Implementierung und Anwendung des Force-Mapping-Modes im ultragroßen Messbereich, bei dem durch das zusätzliche Abfahren von Kraft-Abstands-Kurven an jedem Messpunkt neben der Topographie auch die jeweilige Adhäsionskraft ermittelt wird, konnte zudem die Vielfältigkeit der Messmethoden des AFM auch im ultragroßen Messbereich angedeutet werden.

Das Large-Scale-AFM wurde im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich zur Untersuchung biofunktioneller Oberflächen herangezogen, deren Herstellung in der Nanotechnologie eine wachsende Bedeutung zukommt. In enger Kooperation mit biologischen Arbeitsgruppen befasst sich unsere Arbeitsgruppe mit dem Design funktioneller Oberflächen für die biologische Anwendung. Dies reicht von Untersuchungen zur Methodik und Anwendung der Dip-Pen-Nanolithographie (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Fuchs und Dr. Hirtz am Institut für Nanotechnologie am Karlsruher Institut für Technologie) über die Untersuchung von funktionellen, nanostrukturierten Pflanzenoberflächen (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Barthlott an der Universität Bonn) bis zu einem ganz neuen Konzept der Aufrichtung von am Ende funk-

tionalisierten Tabakmosaikviren (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Jeske und Prof. Wege an der Universität Stuttgart).

Da bei der Dip-Pen-Nanolithographie als ein Verfahren zur Herstellung solcher biofunktioneller Oberflächen bislang kaum quantitative Aussagen zum dort auftretenden Tintenübertrag existierten, wurde eine Large-Scale-AFM-Analyse an mittels dieser Lithographie-Methode geschriebenen, punktförmigen Lipid-Strukturen hinsichtlich ihrer Benetzungszeit-Abhängigkeit durchgeführt. Bei der AFM-Untersuchung wurde der volle Scanbereich von 800 μm ausgenutzt und alle 4125 wegen ihres flüssigkristallinen Aufbaus schwierig abzubildenden Lipid-Punkte vermessen, weshalb einerseits sowohl eine aussagekräftige Statistik als andererseits auch eine hohe Messgenauigkeit durch nahezu konstante Umgebungsbedingungen und Spitzenbeschaffenheiten erzielt werden konnten. Es wurde festgestellt, dass sich nach einer beim Schreibvorgang auftretenden Wartezeit erst nach einer stets ähnlichen Anzahl von Punkten ein konstantes Tintenvolumen und zuvor ein erhöhtes und gleichsam abfallendes Volumen ergibt. Bei der weiteren Auswertung wurden daher nur die Punkte des konstanten Niveaus berücksichtigt. Der Einfluss der Benetzungszeit auf das Tintenvolumen war klar erkennbar und folgte einem linearen Zusammenhang. Durchschnittlich wurden bei der beim Schreibprozess vorherrschenden Luftfeuchtigkeit von 35 % Tintenvolumen des Phospholipids DOPC in der Größenordnung von etwa 16 fl/s übertragen. Eine Benetzungszeit-Abhängigkeit der Regelmäßigkeit der geschriebenen Volumina wurde nicht festgestellt. Die prozentualen Abweichungen der Punktvolumina lagen innerhalb einzelner am Schreibvorgang beteiligter Spitzen bei 12 % und die der Spitzen untereinander bei 45 %. Die größten Schwankungen kommen demnach durch das unterschiedliche Benetzungsverhalten der einzelnen Spitzen beim zuvor erfolgenden Dipping-Prozess zu Stande, was an deren Geometrie oder deren Oberflächenbeschaffenheit liegen könnte. Abhilfe könnte bei dieser Problematik eine chemische Vorbehandlung der Spitzen schaffen.

Mit der Entwicklung einer Lithographie-Methode zur nanoskalig ortsselektiven Immobilisierung von Gold-Nanopartikeln unter Ausnutzung von DNA-Hybridisierung wurde an die vorhergehenden AFM-gestützten, biologisch motivierten Untersuchungen angeknüpft. Es wurden hierbei zunächst Oberflächen mittels Polymer-Phasenseparation vorstrukturiert, wodurch nach Metallbedampfung und Polymer-Lift-off-Prozessen eine Gold-Lochmaske entstand. Diese wurde anschließend mit DNA-Linkern und mit 10 nm großen Goldkolloiden präpariert, an die zuvor komplementäre DNA-Linker angebunden wurden. Die große Besonderheit dieses Immobilisierungsprozesses liegt in der hohen Ortsselektivität. Das Verhältnis der auf der DNA-behafteten Goldschicht und der auf dem unbehandelten Substrat befindlichen DNA-Goldkolloide ist eindeutig. Etwas mehr als 97 % der DNA-behafteten Goldkolloide wurde im Kontakt mit der komplementär DNA-behafteten Goldmaske nachgewiesen.

Da die den Goldkolloiden anhaftenden DNA-Linker dem Anfangsabschnitt der Tabakmosaikviren-RNA entsprechen, wurde auf der Basis dieses Verfahrens eine Lithographie-Methode entwickelt, anhand deren 135 nm lange, hohlzylindrische Tabakmosaikviren-Derivate nicht nur ortsselektiv immobilisiert, sondern sogar auf dem Substrat annähernd senkrecht aufgerichtet werden können. Mit dieser als „Functionality-on-a-Stick“ bezeichneten, konstruktiven Lithographie-Methode wird der Einsatz definierter Chemie an definierter Stelle ermöglicht, wobei die verwendeten molekularen Systeme sowohl ideale sterische Zugänglichkeit besitzen, als auch die Freiheit Konformationen auszubil-

den und zu ändern. Mit polymerbasierter Nanolithographie wurden dabei maßgeschneiderte Silber-Lochmasken mit den gewünscht kleinen Durchmessern von bis hinab zu 50 nm hergestellt und die Tiefe anschließend mittels Wachstum einer substratkonsumierenden metallorganischen Schicht (SCMOL) von ursprünglich 12 nm auf die benötigten 50 nm bis 100 nm erhöht. Die DNA-basierte Kopplung wurde mittels präparierter Oligonukleotide und abschließend auf der Oberfläche assemblierter Viren realisiert. Mit ihrer genetisch modifizierbaren Protein-Hülle und ihrer starren, tubulären Gestalt wohldefinierter Länge wären die mit dieser Methode immobilisierten und aufgerichteten Virus-Derivate durch Kombination mit Funktionsträgern wie bioaktiven Detektor-Molekülen mit konformativer Freiheit und damit vollständig erhaltener Funktionalität als ortsselektiv adressierbare und gleichzeitig sterisch optimal zugängliche Nano-Sonden-Systeme mit hoher Nachweisempfindlichkeit ideal geeignet.

Bei der Entwicklung der vorgestellten Lithographie-Methode zeigte sich außerdem die Möglichkeit der SCMOL-Bildung mit Monothiolen auf Kupferschichten. Während bisher nur zwei- oder mehrfach thiolterminierte Moleküle als SCMOL-Bildner identifiziert wurden, ist Mercaptohexanol (MCH) das erste beschriebene Molekül mit nur einer Thiolgruppe, mit dem sich SCMOL-Schichten bilden lassen. Bei der AFM-Analyse von mit MCH erzeugten SCMOL zeigten diese eine temperaturabhängige Wachstumsgeschwindigkeit und eine maximale Schichtdickenverstärkung vom Faktor 20, was dem doppelten Wert entspricht, der mit dem ebenfalls wasserlöslichen SCMOL-bildenden Molekül Dithioerythritol (DTE) maximal erreicht werden kann.

Nachdem in dieser Arbeit nicht nur ein Large-Scale-AFM-System entwickelt, sondern auch dessen Anwendungspotential anhand von Analysen verschiedener biofunktioneller Systeme von der Submillimeter- bis hinab zur Nanometer-Skala gezeigt wurde, könnte der nächste Entwicklungsschritt darin bestehen, die Vielzahl verschiedener Untersuchungsmöglichkeiten eines AFM ebenfalls auf den ultragroßen Messbereich zu übertragen. Während die Untersuchung tribologischer Eigenschaften oder chemischer Kontrastierungen mit dem aufgebauten System bereits demonstriert wurde, wären für die Analyse magnetischer oder ferroelektrischer Proben aufgrund der offenen Konzeption des AFM vergleichsweise geringe Modifizierungen des Systems nötig. Somit würde das Large-Scale-AFM diesen Messbereich, der zuvor niedrig aufgelösten oder nicht-quantitativen Messtechniken vorbehalten war, mit hochaufgelösten Aufnahmen, sowie quantitativen Messdaten zu verschiedensten Messgrößen noch weiter bereichern.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung der Polymerkonfiguration und -konformation	6
2.2	Strukturformeln von PMMA und PS	7
2.3	Schaubild von Freier Enthalpieänderung und Volumenverhältnis bei der Polymer-Phasenseparation	9
2.4	Phasendiagramme von Polymerblends und Polymer-Lösungen	10
2.5	Schaubilder der räumlichen Konzentrationswellen von deuteriertem Polystyrol	11
2.6	Schematische Phasenseparation eines Polymerblends unter Oberflächeneinfluss	12
2.7	Schematischer Aufbau und Schaubild des Wechselwirkungspotentials von SAM-Molekülen	14
2.8	Schematischer Wachstumsprozess eines SAM	15
2.9	Schematische Struktur einer mittels Dithiolen gebildeten SCMOL-Schicht	16
2.10	Strukturformeln von DTE und MCH	17
2.11	Schematischer Mechanismus des SCMOL-Schichtwachstums	18
2.12	Strukturformeln der Nukleotid-Bestandteile	20
2.13	Strukturformeln von exemplarischen Nukleotiden und Oligonukleotiden	21
2.14	Schematischer Aufbau der verwendeten DNA-Linker	22
2.15	Schematischer Aufbau des Tabakmosaikvirus	23
3.1	Schematische Darstellung des apparativen Aufbaus und des Funktionsprinzips des Snowjets	26
3.2	Schematisches Funktionsprinzip des Spincoaters	28
3.3	Schematischer apparativer Aufbau des Spincoaters	29
3.4	Schematisches Funktionsprinzip der Aufdampfanlage	31
3.5	Schematischer apparativer Aufbau der Aufdampfanlage	32
3.6	Schematische Darstellung des apparativen Aufbaus und des Funktionsprinzips des Plasmacleaners	34
4.1	Schematisches Funktionsprinzips des REM	37
4.2	Schematischer apparativer Aufbau des REM	38
4.3	Schematisches Funktionsprinzip des AFM	40
4.4	Schematischer apparativer Aufbau des AFM	41
4.5	Schaubild des Lennard-Jones-Potentials	42
4.6	Schematischer Aufbau der beim AFM eingesetzten Piezoaktortypen	46
5.1	AFM-Höhenbild und 3D-Visualisierung eines EPROM-Speicherchips mit einer Scanfeldgröße von 500 µm	51

5.2	AFM-Höhenbild einer lokal periodisch per Laserstrahl strukturierten Messingoberfläche mit einer Scanfeldgröße von 400 μm	53
5.3	Vergleich der durch digitales und sequentielles Zoomen entstandenen AFM-Höhenbilder einer lokal periodisch per Laserstrahl strukturierten Messingoberfläche	54
5.4	AFM-Höhenbild und 3D-Visualisierung eines Mikrolinsen-Arrays mit einer Scanfeldgröße von 200 μm und 5 μm	55
5.5	AFM-Höhenbild der Blattunterseite der Farnpflanze <i>Marsilea hirsuta</i> mit einer Scanfeldgröße von 500 μm	56
5.6	AFM-Höhenbilder einer CD-Unterseite im Force-Mapping-Mode bei unterschiedlichen Messrastern	57
5.7	AFM-Höhenbild und AFM-Adhäsionsbild im Force-Mapping-Mode mit einer Scanfeldgröße von 800 μm zur gleichzeitigen Ermittlung von Topographie und Zusammensetzung eines PS-PDMS-Polymerblends	60
6.1	Schematisches Funktionsprinzip der DPN	64
6.2	Strukturformel von DOPC	65
6.3	Schematische Schreibreihenfolge der Lipid-Punkt-Probe mit variabler Benetzungszeit	66
6.4	AFM-Höhenbilder der Lipid-Punkt-Probe mit variabler Benetzungszeit t_B mit Scanfeldgrößen von 800 μm	69
6.5	3D-Visualisierung des AFM-Höhenbilds der Lipid-Punkt-Probe mit variabler Benetzungszeit	70
6.6	Schaubild des gesamten Verlaufs der geschriebenen Lipid-Volumina für eine exemplarische Spitze über alle Probenanteile hinweg	71
6.7	Schaubild des Verlaufs der geschriebenen Lipid-Volumina für eine exemplarische Spitze an den Übergängen zwischen einzelnen Probenanteilen	72
6.8	Schaubild des Verlaufs der geschriebenen Lipid-Volumina in exemplarischen Probenanteilen	74
6.9	Schaubild des detaillierten Verlaufs der geschriebenen Lipid-Volumina in einem exemplarischen Probenanteil	75
6.10	Schaubild der Mittelwerte der geschriebenen Lipid-Volumina aller Spitzen und Probenanteile	76
6.11	Schaubild der Mittelwerte und Standardabweichungen der geschriebenen Lipid-Volumina des ersten Probenanteils für alle Spitzen	78
6.12	Schaubild der Mittelwerte und Standardabweichungen der geschriebenen Lipid-Volumina des zweiten Probenanteils für alle Spitzen	79
6.13	Schaubild der Mittelwerte und Standardabweichungen der geschriebenen Lipid-Volumina des dritten Probenanteils für alle Spitzen	80
7.1	Idee zur Herstellung ortsselektiv adressierbarer und zugleich sterisch ideal zugänglicher Nano-Sonden-Systeme mit hoher Nachweisempfindlichkeit	84
7.2	Schematischer Prozessverlauf der Polymerblend-Lithographie	87
7.3	Schematischer Prozessverlauf der SCMOL-Schichtdickenverstärkung	88
7.4	Schematischer Prozessverlauf der DNA-Linker-Präparation	90
7.5	Schematische Darstellung der DNA-Goldkolloid-Präparation	91

7.6	Schematischer Prozessverlauf der Viren-Assemblierung	92
7.7	AFM-Höhenbild eines löchrigen Perfluordekyltrichlorsilan-SAM mit einer Scanfeldgröße von 10 μm	93
7.8	Lichtmikroskop-Aufnahme und schematische Darstellung eines Prozessverlaufs bei der Polymerblend-Lithographie vor beziehungsweise nach dem Waschprozess auf einem zu hydrophilen Substrat	96
7.9	AFM-Höhenbilder von Kupfermasken nach Waschprozessen ohne mechanische Belastungen und mit veränderter Pinzettentechnik.	97
7.10	AFM-Höhenbild und schematische Darstellung eines Prozessverlaufs der Polymerblend-Lithographie beim Aufdampfprozess mit zu hoher Temperatureinwirkung	99
7.11	AFM-Höhenbild einer Kupfermaske nach einem Aufdampfprozess mit erhöhter Aufdampftrate	100
7.12	Photographien und Lichtmikroskop-Aufnahmen von halbseitig in bei der DNA-Linker-Präparation verwendeten Lösungen gelagerten Kupferschichten	102
7.13	AFM-Höhenbild einer in Mercaptohexanol-Lösung gelagerten Kupferschicht	103
7.14	Lichtmikroskop-Aufnahme einer halbseitig in TRIS-HCl-Lösung gelagerten DTE-SCMOL- und Kupferschicht	104
7.15	Absorptionsspektrum der synthetisierten DNA-Goldkolloid-Lösung	106
7.16	Schematischer Prozessverlauf der ortsselektiven Immobilisierung von DNA-Goldkolloiden	107
7.17	AFM-Höhenbild der mittels DNA-Hybridisierung auf einer Goldmaske präparierten Goldkolloide	108
7.18	AFM-Phasenbild der mittels DNA-Hybridisierung auf einer Goldmaske präparierten Goldkolloide	109
7.19	Querschnitte von AFM-Phasenbild und zugehörigem Höhenbild eines immobilisierten Goldkolloids.	110
7.20	Schematischer Prozessverlauf der ortsselektiven Immobilisierung und Aufrichtung von TMV-Derivaten	112
7.21	AFM-Höhenbild von mittels DNA-Hybridisierung ortsselektiv immobilisierten und mittels PBL und SCMOL-Wachstum aufgerichteten Tabakmosaikviren	113
7.22	AFM-Höhenbilder von bei Raumtemperatur in Mercaptohexanol-Lösung gelagerten Kupferschichten	116
7.23	AFM-Höhenbilder von bei 60 °C in Mercaptohexanol-Lösung gelagerten Kupferschichten	117
7.24	AFM-Höhenbilder von bei 60 °C in Mercaptohexanol-Lösung gelagerten Kupferschichten	118
7.25	Schaubild der mit dem AFM bestimmten Schichtdicken von MCH-SCMOLs auf Kupfer für unterschiedliche Temperaturen und Wachstumsdauern	119

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

6.1	Durchschnittliches Volumen V der mittels DPN übertragenen Lipid-Punkte für unterschiedliche Benetzungszeiten t_B	77
6.2	Minimale, maximale und durchschnittliche Abweichungen vom jeweiligen Durchschnittsvolumen $(\Delta V/V)_{8.Spitze}$, $(\Delta V/V)_{2.Spitze}$ und $(\Delta V/V)_{med}$ der mittels DPN übertragenen Lipid-Punkte für unterschiedliche Benetzungszeiten t_B bei Betrachtung einzelner Spitzen.	80
6.3	Durchschnittliche Volumenabweichungen $(\Delta V/V)_{med,ges}$ der mittels DPN übertragenen Lipid-Punkte für unterschiedliche Benetzungszeiten t_B bei Betrachtung aller Spitzen.	80

Literaturverzeichnis

- [1] G. Binnig, C. F. Quate, and Ch. Gerber. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56(9):930–933, 1986.
- [2] Y. Martin and H.K. Wickramasinghe. Magnetic imaging by force microscopy with 1000 Å resolution. *Appl. Phys. Lett.*, 50(20):1455–1457, 1987.
- [3] Y. Martin, D.W. Abraham, and H.K. Wickramasinghe. High-resolution capacitance measurement and potentiometry by force microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 52(13):1103–1105, 1988.
- [4] Th. Schimmel, K. Friemelt, J. Küppers, and M. Lux-Steiner. Atomic resolution imaging of ReS₂ by AFM/LFM. *NATO ASI Series*, E 287:525–530, 1995.
- [5] W.C. Yu and W.L. Mattice. A novel chromatographic method for determining the polydispersity index for polymers with a specified number of functional-groups. *Journal Of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 29(6):715–721, 1991.
- [6] R.C. Jordan. Size exclusion chromatography with low-angle laser-light scattering detection. *Journal Of Liquid Chromatography*, 3(3):439–463, 1980.
- [7] P.W. Atkins. *Physikalische Chemie*. VCH, Weinheim, 1996.
- [8] P.J. Flory. *Statistical Mechanics of Chain Molecules*. Hanser Publishers, New York, 1989.
- [9] P.J. Flory. Statistical thermodynamics of liquid mixtures. *Journal of the American Chemical Society*, 87(9):1833–1838, 1965.
- [10] R. Hölzle. *Physik der Polymere*. Forschungszentrum Jülich, Jülich, 1991.
- [11] S. Walheim. Micrometer and Sub-Micrometer Structure Formation of Phase Separating Polymer Films. Dissertation, Universität Konstanz, 2000.
- [12] G. Krausch, J. Mlynek, W. Straub, R. Brenn, and J.F. Marco. Order-induced period-doubling during surface-directed spinodal decomposition. *Europhysics Letters*, 28(5):323–328, 1994.
- [13] R.A.L. Jones, L.J. Norton, E.J. Kramer, F.S. Bates, and P. Wiltzius. Surface-directed spinodal decomposition. *Phys. Rev. Lett.*, 66:1326–1329, 1991.
- [14] U. Steiner, J. Klein, E. Eiser, A. Budkovski, and L.J. Fetters. Complete wetting from polymer mixtures. *Science*, 258:1126–1129, 1992.

- [15] U. Steiner, J. Klein, and L.J. Fetters. Surface phase inversion in finite-sized binary-mixtures. *Phys. Rev. Lett.*, 72:1498–1501, 1994.
- [16] G. Krausch, C.A. Dai, E.J. Kramer, F.S. Bates, and J.F. Marco. Influence of spinodal waves in thin polymer films. *Macromolecules*, 26:5566–5571, 1993.
- [17] F. Schreiber. Structure and growth of self-assembling monolayers. *Progress in Surface Science*, 65:151–256, 2000.
- [18] F. Cecchet, A. Duwez, C. Jérôme, S. Gabriel, R. Jérôme, K. Glinel, S. Demoustier-Champagne, A. M. Jonas, and B. Nysten. Atomic force microscopy investigation of the morphology and the biological activity of protein-modified surfaces for bio- and immunosensors. *Analytical Chemistry*, 79:6488–6495, 2007.
- [19] A. Kumar and G.M. Whitesides. Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol ink followed by chemical etching. *Applied Physics Letters*, 63(14):2002–2004, 1993.
- [20] M. Geissler, H. Schmid, A. Bietsch, B. Michel, and E. Delamarche. Defecttolerant and directional wet-etch systems for using monolayers as resists. *Langmuir*, 18:2374–2377, 2002.
- [21] Y. Xia, X.-M. Zhao, and G.M. Whitesides. Pattern transfer: Self-assembled monolayers as ultrathin resists. *Microelectronic Engineering*, 32:255–268, 1996.
- [22] E. Barena, C. Ocal, and M. Salmeron. Evolution of the structure and mechanical stability of self-assembled alkanethiol islands on au.111. due to diffusion and ripening. *Journal of Chemical Physics*, 111:9797–9802, 1999.
- [23] S. Walheim, Th. Schimmel, M. Barczewski, M. Mayor, and A. Blaszczyk. Verfahren zur Herstellung einer metallorganischen Schicht, mit diesem Verfahren hergestellte metallorganische Schichten und deren Verwendung. Patent DE 10 2005 025 693 A1, 2006.
- [24] M. Barczewski. Konstruktive Lithographie mit selbstorganisierenden metallorganischen Systemen. Dissertation, Forschungszentrum Karlsruhe, 2005.
- [25] B. Riedel. Substrat-konsumierende Metall-organische Schichten - Wachstumsverhalten und Nanolithographie. Dissertation, Forschungszentrum Karlsruhe, 2009.
- [26] P. Vincze. Substratkonsumierende metallorganische Schichten: Optische Charakterisierung und Nanolithographie. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2010.
- [27] W.W. Cleland. Dithiothreitol, a new protective reagent for sh groups. *Biochemistry*, 3:1964, 480-482.
- [28] M. Gorecki and A. Patchornik. Polymer-bound dihydrolipoic acid: A new insoluble reducing agent for disulfides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 303:36–43, 1973.

- [29] H.J. Choi, K. Lee S.W. Han, and S.J. Kim. Temperature-dependent ft-ir spectroscopy study of silver 1,9-nonanedithiolate. *Applied Spectroscopy*, 55(8):1085–1091, 2001.
- [30] I.G. Dance, K.J. Fisher, R.M.H. Banda, and M.L. Scudder. Layered structure of crystalline compounds agsr. *Inorganic Chemistry*, 30(2):183–187, 1991.
- [31] A.N. Parikh, S.D. Gillmor, J.D. Beers, K.M. Beardmore, R.W. Cutts, and B.I. Swanson. Characterization of chain molecular assemblies in long-chain, layered silver thiolates: A joint infrared spectroscopy and x-ray diffraction study. *Journal of Physical Chemistry B*, 103:2850–2861, 1999.
- [32] J.F. Bardeau, A.N. Parikh, J.D. Beers, and B.I. Swanson. Phase behaviour of a structurally constrained organic-inorganic crystal: Temperature-dependent infrared spectroscopy of silver n-dodecanethiolate. *Journal of Physical Chemistry B*, 104(3):627–635, 2000.
- [33] M.J. Baena, P. Espinet, M.C. Lequerica, and A.M. Levelut. Behaviour of silver thiolates with layered structure in the solid state: Covalent soaps. *Journal of the American Chemical Society*, 114(11):4182–4185, 1992.
- [34] H.G. Fijolek, J.R. Grohal, J.L. Sample, and M.J. Natan. A facile trans to gauche conversion in layered silver butanethiolate. *Inorganic Chemistry*, 36(4):622–628, 1997.
- [35] B. Alberts. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. WILEY-VCH, Weinheim, 2005.
- [36] J.J. Pasternak and B.R. Glick. *Molekulare Biotechnologie*. Spektrum, Heidelberg, 1995.
- [37] F. Eber. RNA-gesteuerte Nanostrukturbildung: Selbstassemblierung neuartiger Nukleoproteingerüste aus pflanzenviralen Bausteinen. Dissertation, Universität Stuttgart, 2012.
- [38] M. Grundner and H. Jacob. Investigations on hydrophilic and hydrophobic silicon (100) wafer surfaces by x-ray photoelectron and high-resolution electron loss spectroscopy. *Applied Physics A*, 39:73–82, 1986.
- [39] I.M. Tidswell, B.M. Ocko, P.S. Pershan, S.R. Wasserman, G.M. Whitesides, and J.D. Axe. X-ray specular reflection studies of silicon coated by organic monolayers (alkylsiloxanes). *Physical Review B*, 41:1111–1128, 1990.
- [40] B. Dollmann. Modellmembranen auf Siliziumoxid-Oberflächen - Eine kombinierte Untersuchung mit Ellipsometrie und elektrochemischen Methoden. Diplomarbeit, Universität Mainz, 2006.
- [41] R. Sherman, D. Hirt, and R. Vane. Surface cleaning with the carbon dioxide snow jet. *Journal of Vacuum Science and Technology*, A 12(4):1876–1881, 1994.
- [42] R. Sherman. Carbon dioxide snow cleaning. *Particulate Science and Technology*, 25:37–57, 2007.

- [43] M.J. Kelly and C. Weisbuch. *The Physics and Fabrication of Microstructures and Microdevices*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 1986.
- [44] C.W. Extrand. Spin coating of very thin polymer films. *Polymer Engineering and Science*, 34(5):390–394, 1994.
- [45] G. Kienel and K. Röhl. *Vakuumbeschichtung 2, Verfahren und Anlagen*. VDI Verlag, Düsseldorf, 1995.
- [46] M. Wutz, H. Adam, and W. Walcher. *Theorie und Praxis der Vakuumtechnik*. Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig/Wiesbaden, 1986.
- [47] J.I. Goldstein, A.D. Romig, D.E. Newbury, C.E. Lyman, P. Echlin, C. Fiori, D.C. Joy, and E. Lifshin. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis: a text for biologists, materials scientists, and geologists*. Plenum Press, New York, 1992.
- [48] P.F. Schmidt, L.J. Balk, R. Blaschke, W. Bröcker, E. Demm, L. Engel, R. Göcke, H. Hantsche, R. Hauert, R.E. Krefting, Th. Müller, H. Raith, M. Roth, and J. Woodtli. *Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse*. Expert Verlag, Renningen-Malmsheim, 1994.
- [49] P.J. Goodhew, J. Humphreys, and R. Beanland. *Electron Microscopy and Analysis*. Taylor & Francis, London and New York, 2001.
- [50] H. Jaksch. Field emission sem for true surface imaging and analysis. *Materials World*, 4(10):583–584, 1996.
- [51] G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber, and E. Weibel. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 49(1):57–61, 1982.
- [52] W. Häberle, J. K. Hörber, and G. Binnig. Force microscopy on living cells. *Vac. Sci. Technol. B*, 9(2):1210–1213, 1991.
- [53] E. Meyer, H. Heinzelmann, R. Wiesendanger, and H.-J. Güntherodt. *Scanning Tunneling Microscopy II. Further Applications and Related Scanning Techniques*. Springer-Verlag, Berlin, 1995.
- [54] J. Freund, J. Halbritter, and J.K. Horber. How dry are dried samples? Water adsorption measured by stm. *Microscopy Research and Technique*, 44(5):327–338, 1999.
- [55] J. Israelachvili. *Intermolecular & Surface Forces*. Academic Press Limited, London, 1992.
- [56] E. Meyer, R.M. Overney, J. Frommer, and B. Bushan. *Handbook of Micro/Nanotribology - Lubrication Studied by Friction Force Microscopy*. CRC Press, Boca Raton, 1995.
- [57] H. Ho and P. West. Optimizing ac-mode atomic-force microscope imaging. *Scanning*, 18:339–343, 1996.

- [58] Q. Zhong, D. Inness, K. Kjoller, and V. Ellings. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping atomic force microscope. *Surface Science Letters*, 290(1-2):688–692, 1993.
- [59] J. Tamayo and R. García. Deformation, contact time, and phase contrast in tapping mode scanning force microscopy. *Langmuir*, 12:4430–4435, 1996.
- [60] J. P. Cleveland, B. Anczykowski, A. E. Schmid, and V. B. Elings. Energy dissipation in tapping-mode atomic force microscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 72(20):2613–2615, 1998.
- [61] B. Cappella and G. Dietler. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surface Science Reports*, 34:15–30, 1999.
- [62] C.J. Chen. Electromechanical deflections of piezoelectric tubes with quartered electrodes. *Appl. Phys. Lett.*, 60(1):132–134, 1992.
- [63] M. Locatelli, G. Lamboley, J.P. Michenaud, and V. Bayot. Easy method to characterize a piezoelectric ceramic tube as a displacer. *Rev. Sci. Instrum.*, 59(4):661–663, 1988.
- [64] M. Rothenberger. 800-nm-Rasterkraftmikroskopie - Topographie und Lithographie. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2011.
- [65] T. Meier. Kombinierte Rasterkraftmikroskopie und Nanolithographie. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2010.
- [66] H. Schulz. Aufbau eines Rastersondenmikroskopie-Messsystems zur Untersuchung funktionell nanostrukturierter Oberflächen. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2011.
- [67] M. Rommel. Bildgebende Verfahren an AFMs mit Kraft-Abstands-Kurven. Bachelorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2013.
- [68] M. Pfirrmann. Rasterkraftmikroskopie im ultrgroßen Scanbereich - Einfluss der Dwell Time auf den Schreibprozess der Dip-Pen-Nanolithographie. Bachelorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2011.
- [69] J. Sachs. Rasterkraftmikroskopie im ultrgroßen Scanbereich - Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf den Schreibprozess der Dip-Pen-Nanolithographie. Bachelorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2011.
- [70] MikroMasch, Datenblatt der NonContact-Cantilever NSC11.
- [71] MikroMasch, Datenblatt der NonContact-Cantilever NSC15.
- [72] S. Zhang. Rasterkraftmikroskopie mit ultrgroßen Scanbereich. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2012.
- [73] L.G. Rosa and J. Liang. Atomic force microscope nanolithography: dip-pen, nanohaving, nanografting, tapping mode, electrochemical and thermal nanolithography. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 21(48):1–18, 2009.

- [74] R.D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. Hong, and C.A. Mirkin. Dip-pen nanolithography. *Science*, 283(5402):661–663, 1999.
- [75] NanoInk Inc.: Micropatterning of UV Curable Polymer. 2010.
- [76] K.-B. Lee, E.-Y. Kim, C.A. Mirkin, and S.M. Wolinsky. The use of nanoarrays for highly sensitive and selective detection of human immunodeficiency virus type 1 in plasma. *Nano Letters*, 4(10):1869–1872, 2004.
- [77] S. Lenhart, P. Sun, Y. Wang, H. Fuchs, and C.A. Mirkin. Massively parallel dip-pen nanolithography of heterogeneous supported phospholipid multilayer patterns. *Small*, 3(1):71–75, 2007.
- [78] S. Sekula, J. Fuchs, S. Weg-Remers, P. Nagel, S. Schuppler, J. Fragala, N. Theilacker, M. Franueb, C. Wingren, P. Ellmark, C.A.K. Borrebaeck, C.A. Mirkin, H. Fuchs, and S. Lenhart. Multiplexed lipid dip-pen nanolithography on subcellular scales for the templating of functional proteins and cell culture. *Small*, 4(10):1785–1793, 2008.
- [79] F. Brinkmann. Dip-Pen Nanolithography of Optical Diffraction Gratings with Biosensor Applications. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2009.
- [80] J. Cramer. Rasterkraftmikroskopie an mittels SCMO-L-Polymerblend-Lithographie strukturierten Oberflächen. Bachelorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2012.
- [81] C. Huang, M. Moosmann, J. Jin, T. Heiler, S. Walheim, and Th. Schimmel. Polymer blend lithography: A versatile method to fabricate nanopatterned self-assembled monolayers. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 3:620–628, 2012.
- [82] M. Haghghi. Nanolithographie auf Basis von Polymerphasenseparation und substratkonsumierenden metallorganischen Schichten. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2011.
- [83] J. Jin. Lateral Nanostructure Formation in Phase Separating Polymer Films. Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2011.
- [84] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, S. Gao, L. Chi, S. Peschel, and U. Simon. Site-selective immobilization of gold nanoparticles functionalized with DNA oligomers. *Colloid and Polymer Science*, 279(1):68–72, 2001.
- [85] W. Zhao, M.A. Brook, and Y. Li. Periodic assembly of nanospecies on repetitive DNA sequences generated on gold nanoparticles by rolling circle amplification. *Methods in molecular biology*, 474:79–90, 2008.
- [86] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, M. Noyong, and U. Simon. Bifunctional DNA-gold nanoparticle conjugates as building blocks for the self-assembly of cross-linked particle layers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311:995–999, 2003.

- [87] O. Seitz, M. M. Chehimi, E. Cabet-Deliry, S. Truong, N. Felidj, C. Perruchot, S. Greaves, and J. Watts. Preparation and characterisation of gold nanoparticle assemblies on silanised glass plates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 218:225–239, 2003.
- [88] M.-P. Ngoc Bui, T. J. Baek, and G. H. Seong. Gold nanoparticle aggregation-based highly sensitive DNA detection using atomic force microscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388:1185–1190, 2007.
- [89] P. Eaton, G. Doria, E. Pereira, P. V. Baptista, and R. Franco. Imaging gold nanoparticles for DNA sequence recognition in biomedical applications. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 6:282–288, 2007.