

Herstellung von Biochips basierend auf selbstaggregierender Monolagen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Fakultät für Physik

der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Dipl. Phys.

Mark Schnietz

aus Paderborn

Bielefeld, Juni 2011

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	1
2	Einleitung.....	4
3	Grundlagen.....	7
3.1	Selbstaggregierende Monolagen (SAMs)	7
3.2	Chemische Lithographie	8
3.3	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)	11
3.3.1	Quantitative Analyse	14
3.4	Extreme UV Interferenz Lithographie (EUV-IL)	15
3.5	Atomare Rasterkraftmikroskopie (AFM)	21
3.6	Elektronen Mikroskopie	24
3.6.1	Raster Elektron Mikroskopie	25
3.6.2	Transmission Elektronen Mikroskopie.....	27
3.7	Konfokale Laserscanning Mikroskopie	28
3.8	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie	29
4	Materialien und Methoden.....	31
4.1	SAM Präparation.....	31
4.1.1	Thiol SAMs.....	31

4.2	Strukturierung von SAMs.....	31
4.2.1	Elektronenstrahlolithographie	31
4.2.2	EUV – Interferenz Lithographie.....	32
4.3	Biochip Präparation	32
4.3.1	Funktionalisierung mit Hilfe von NTA- Chelatkomplexen	32
4.3.2	Austausch von EG ₃ mit bisNTA.....	34
4.4	XPS Spektroskopie	34
4.5	Transfer (Nanosiebe)	34
4.6	Gold Metall Abscheidung	35
4.7	Mikroskopische Methoden.....	35
4.7.1	AFM	35
4.7.2	TEM.....	36
4.7.3	REM	36
4.7.4	Optische Charakterisierung.....	37
5	Resultate und Diskussion	38
5.1	Fabrikation von strukturierten Oberflächen mit EUV-Interferenz Lithographie.....	38
5.2	Biochips.....	43
5.2.1	Herstellung und Vorarbeiten.....	43

5.2.2	Ankopplung mittels Carboxy NTA	46
5.2.3	Effizientere NTA Ankopplung auf Amino terminierten SAM Oberflächen mittels „Maleyl NHS und multivalenten-NTA Thiol“	50
5.2.4	Ankopplung von Polyethylenglykol-Thiol SAM	57
5.2.5	Oligoethylenglykol (OEG) SAM	60
5.3	Nanosiebe	71
5.3.1	Herstellung	71
5.3.2	Charakterisierung	74
6	Zusammenfassung	84
7	Literaturverzeichnis	87
8	Veröffentlichungen	97
9	Abkürzungen	98
10	Abbildungsverzeichnis	101
11	Anhang	113
12	Danksagung	119

2 Einleitung

Mit der Entschlüsselung des Humangenoms [1-3] wurden neue Erkenntnisse in der Genomik gewonnen, allerdings zeigte sich, dass die hier gewonnene, genetische Information für das Verständnis vieler biologischer Prozesse nicht hinreichend ist. Daher wurde analog zu dem „Human Genom Projekt“ in den 90er Jahren eine Forschung zur Entschlüsselung des menschlichen Proteoms initiiert. In diesem aktuellen Forschungsbereich der Proteomik wird die eingehende Charakterisierung von Struktur, Funktion und Interaktion von geschätzt mehr als 100.000 humanen Proteinspezies im Rahmen der „Human Proteome Organisation“ untersucht [4].

Die Untersuchung von Proteinen ist eine nicht zu unterschätzende Herausforderung an die Entwicklung von sogenannten Biochips. Hierfür sind besonders funktionalisierte Mikro- und Nanometer Strukturoberflächen mit sehr hoher Auflösung erforderlich. Mit dem Ziel Biomoleküle genau an diesen wohl definierten funktionellen Positionen zu immobilisieren, um eine weitere detaillierte Analyse zu ermöglichen.

Die Verwendung von Selbstaggregierenden Monolagen (SAMs) stellt für die oben genannten Ziele eine ideale Plattform dar. Durch diese Monolagen lassen sich chemische und physikalische Eigenschaften der Oberflächen sehr genau kontrollieren. Sie dienen quasi als Bindeglied zwischen organischen und anorganischen Umgebungen. Durch verschiedene lithographische Techniken können auf diesen Oberflächen lateral definierte chemische modifizierte Strukturen erzeugt werden. Zu diesem Zweck wurden bereits verschiedene Ansätze bzw. Methoden, wie Microcontact Printing [5, 6], Photo- [7] und Elektronen Bestrahlung [8, 9] und Rastersonden-Lithographie [10] im Detail untersucht.

Für die Biotechnologische Anwendung werden insbesondere großflächige Template mit stabilen, hochauflösenden und chemisch modifizierten Strukturen benötigt. Um dieses Ziel zu erreichen gilt die EUV (extreme UV mit einer Wellenlänge von 13.5nm) basierende Lithographie als „Next Generation Lithography“ Kandidat als sehr erfolgsversprechend und wird in dieser Arbeit besonders intensiv untersucht. Die hier verwendete Technik ist die EUV Interferenz Lithographie (EUV-IL) [11, 12], wobei räumlich kohärente EUV Synchrotronstrahlung, mittels Undulatoren an einem modernen Teilchenbeschleuniger erzeugt, als Quelle verwendet wird. Diese Strahlung wird durch Beugung an Transmissionsgitter zur Interferenz gebracht und resultiert in sinusoidalen Streifenmuster auf der Probenoberfläche. Die maximal gezeigte Auflösung dieser Lithographie liegt momentan bei 11nm [13]. Das Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung von Proteinchip Templaten durch die Kombination von EUV-IL zur Strukturierung bzw. Funktionalisierung von SAMs und die Anwendung des His-tag/Me²⁺ NTA Chelator Konzepts [14], um letztendlich einen funktionierenden Biochips zu demonstrieren.

Proteine verlieren insbesondere ihre Funktionalität bei der Immobilisation auf Substratoberflächen, da sie sehr schnell in vitro denaturieren. Des Weiteren ist die Menge an Proteinen stark limitiert oder aber in der biotechnologischen Produktion sehr aufwendig herzustellen. Daher ist die Entwicklung von Biochips in nanoskaliger Größenordnung hilfreich, um sie wirtschaftlich interessant zu machen. Die spezifische Adressierung und Immobilisierung von Proteinen unter Beibehaltung der Funktionalität ist für die Realisierung eines effizienten Biochips hierbei besonders wichtig. Die einfache Physisorption ist in der Regel unspezifisch und hat eine Entfaltung des Proteins bzw. Inaktivierung zur Folge.

Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit sogenannte multivalente Superchelatoren [15] verwendet. Hierbei wird insbesondere das His-tag/Me²⁺ NTA-Chelator-

Konzept [14] verwendet. Dabei gilt die Bindung durch Metallionen zwischen Proteinen und NTA als chemisch schonend und die Proteinfunktionalität wird beibehalten. Somit fungieren die NTA-Chelatoren quasi als „Molekularpinzetten“. Dieses Bindungspaar ermöglicht außerdem auch eine orientierte Ausrichtung der immobilisierten Proteine und eine hohe Packungsdichte. Ein weiterer Vorteil dieses Konzept besteht in der chemischen Reversibilität, d.h. die Ankopplung der Proteine an die Chelatoren kann von außen gesteuert wieder rückgängig gemacht werden. Dabei bleibt die Funktionalität der Chelatoren aber erhalten und eine weitere Proteinanbindung kann im Weiteren untersucht werden. Somit steht mit diesem Modellsystem ein vollständig reversibler Biochip zur Verfügung.

Ein weiterer Aspekt der in dieser Arbeit realisiert wurde, ist die Verwendung der EUV-Interferenz Lithographie zur Produktion von sogenannten Nanosieben. Unter Nanosieben versteht man perforierte Membrane deren Schichtdicke gerade einige Nanometer beträgt. Diese Nanosiebe können z.B. als Unterlage für mikroskopische Anwendungen [16] oder als feiner Filter für Separation von Biomolekülen [17] eingesetzt werden. Die Moleküle in einer Selbstaggregierenden Monolage werden durch Photonen quervernetzt und bilden damit ein zweidimensionales Netzwerk. Dieses Netzwerk ist mechanisch so stabil, das es sich von der Substratoberfläche ablösen und auf ein neues Substrat z.B. TEM Gitter übertragen lässt. Somit entsteht ein freitragendes Nanosieb, dessen Ober- bzw. Unterseite sogar unterschiedliche chemisch Funktionalitäten besitzt und als Janusmembran verwendet werden kann [18].

3 Grundlagen

3.1 Selbstaggregierende Monolagen (SAMs)

Selbstaggregierende Monolagen (SAMs) sind zweidimensionale Systeme aus organischen Molekülen, die spontan beim Eintauchen des Substrates in eine Lösung einen homogen geordneten Molekularfilm ausbilden. In Abbildung 1 ist schematisch dargestellt, dass diese organischen Moleküle sich im Wesentlichen wie in drei charakteristische Gruppen einteilen lassen: Kopfgruppe, Spacergruppe und Endgruppe. Dabei gehen die Kopfgruppen eine Bindung zum Substrat ein. Durch die Wahl der entsprechenden Gruppen lassen sich SAMs mit unterschiedlichen Eigenschaften auf verschiedenen Oberflächen herstellen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Moleküle mit Thiol Kopfgruppen lassen sich auf vielen Münzmetallen wie z.B. Kupfer, Silber oder Gold ausbilden. Die in der Forschung am intensivsten und am besten charakterisiertesten SAMs sind die Alkane-Thiole und deren Adsorption auf Gold [19-23]. Gold ist eine inerte Oberfläche und eignet sich somit hervorragend für die Präparation von Bioproteinchip.

Die weiteren Gruppen wie der Spacer beeinflussen die intermolekulare Wechselwirkung der Moleküle. So dass im Fall von unpolaren Gruppen wie aliphatische Alkankette oder aromatische Phenylringe die van der Waals Wechselwirkung zwischen den Ketten benachbarter Moleküle für einen geordneten und dicht gepackten Film sorgt. Wobei die Ordnung bzw. Dichte der Filme mit zunehmender Länge der Spacergruppe zunimmt [23, 24].

Der oberste Teil eines SAM Moleküls ist die Endgruppe. Durch Sie lassen sich die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Monolage beeinflussen. Durch die Wahl einer hydrophilen ($-CH_3$) oder hydrophoben ($-OH$) Endgruppe wird die Benetzbarkeit der Filmschicht eingestellt.

Wie später in dieser Arbeit demonstriert, dient die Auswahl einer Endgruppe auch zur spezifischen Anbindung von weiteren Molekülen bzw. Immobilisierung von Adsorbaten.

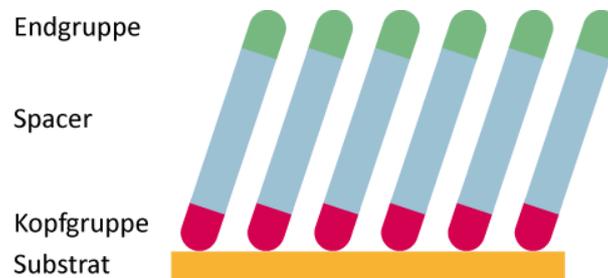


Abbildung 1: schematische Abbildung einer Selbst-aggregierenden Monolage (SAM). Die Bestandteile dieser Moleküle lassen sich in drei wesentliche Gruppen gliedern: Kopfgruppe, Spacer und Endgruppe. Während die Kopfgruppe für die Bindung zum Substrat verantwortlich ist, bestimmen Spacer und Endgruppe die intermolekularen Wechselwirkungen.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf NBPT SAMs so dass der Leser für eine detaillierte Beschreibung der Eigenschaften von SAMs auf die Übersichtsartikel von Ulman [25], Vericat [26, 27], Schreiber [28] und Love [23] verwiesen wird.

3.2 Chemische Lithographie

Das Hauptinteresse an der Strukturierung von selbstaggregierenden Monolagen ist die Untersuchung von fundamentalen Wechselwirkungen und Anordnung der unterschiedlichen gemischten SAMs auf Oberflächen. Des Weiteren bieten sie die Möglichkeit funktionelle Nanostrukturen zu realisieren, um allgemein Nanopartikel, Zellen, Proteine oder sonstige Biomoleküle weiter zu untersuchen. Eine Vielzahl von unterschiedlichen Techniken wurde entwickelt um lateral strukturierte SAMs herzustellen. Einige dieser Techniken sind in Abbildung 2 schematisch zu sehen, darunter UV-Lithographie [29], Ionen Lithographie [30, 31], Mikrokontakt-Drucken [32] und Rasterproben Lithographie [33, 34].

Für die Nanostrukturierung von SAMs ist hierbei die Elektronen-Strahl Lithographie eine oft verwendete Technik [35-38]. Die erreichbare Auflösung wird nicht primär durch die Fokussierung des Elektronenstrahls begrenzt, sondern durch Sekundärelektronenprozesse

wie Streuung und Proximity Effekte. Im Verlauf dieser Arbeit wird der Begriff „chemische Lithographie“ verwendet. Dieser Begriff steht für die Veränderung der chemischen Eigenschaften der Oberfläche durch Elektronenbestrahlung. Die aliphatische oder aromatische Beschaffenheit der selbst-aggregierenden Moleküle hat ebenfalls einen Einfluss auf die Reaktion der SAMs auf die Elektronen [35]. Für aliphatische SAMs werden durch die Elektronen die Kohlenwasserstoff Bindungen aufgebrochen, was zur Desorption von Material bzw. Beschädigung der homogenen Monolage führt. Die zurückbleibenden Fragmente bilden teilweise Kohlenstoff Doppelbindungen aus. Die SAMs fungieren somit als positiver Resist [35, 39-41].

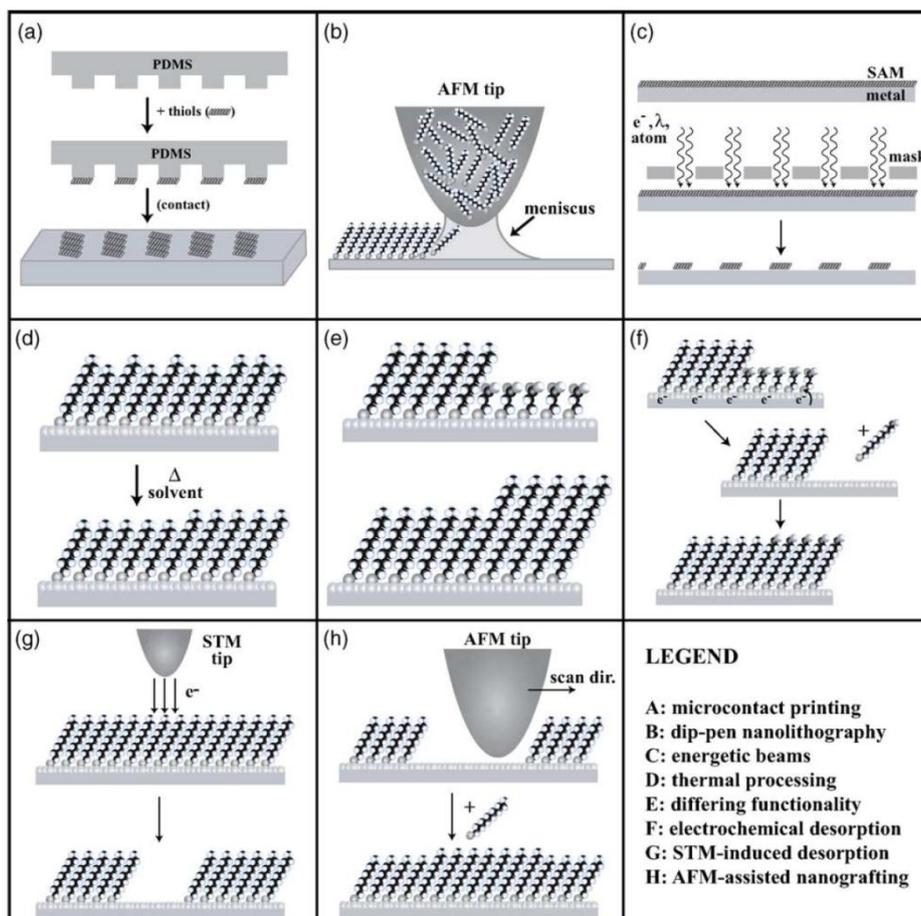


Abbildung 2: schematische Darstellung von verschiedenen Methoden zur Strukturierung von SAMs. (entnommen aus [42])

Die in dieser Arbeit hergestellten aromatischen Nitro-Biphenylthiol SAM Oberflächen und die Elektroneninduzierten Eigenschaften wurden bereits im Detail in Publikationen [8, 43, 44] gezeigt. Hierbei werden die Kohlenwasserstoff Bindungen der Biphenyl Moleküle durch Beschuss von Elektronen aufgebrochen und die benachbarten aromatischen Bereiche werden quervernetzt. Biphenyl SAMs können als negativer Resist verwendet werden [35, 45]. Insbesondere bei Nitrobyphenylthiol SAMs wird durch den aus der Vernetzung freiwerdende Wasserstoff für die Umwandlung der Nitro- zu einer Aminogruppe verantwortlich gemacht [44]. Diese Aminogruppe zeichnet sich besonders durch die Möglichkeit zur Ankopplung weiterer Moleküle aus. Hierdurch lassen sich z.B. Polymer Bürsten [46-49] auf den NBPT SAMs ausbilden oder wie später in dieser Arbeit gezeigt, Proteinchips realisieren. Wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt, lassen sich mittels EUV und Elektronenstrahl Lithographie sehr gut unterschiedlich funktionalisierte Oberflächen mittels SAMs realisieren [9].

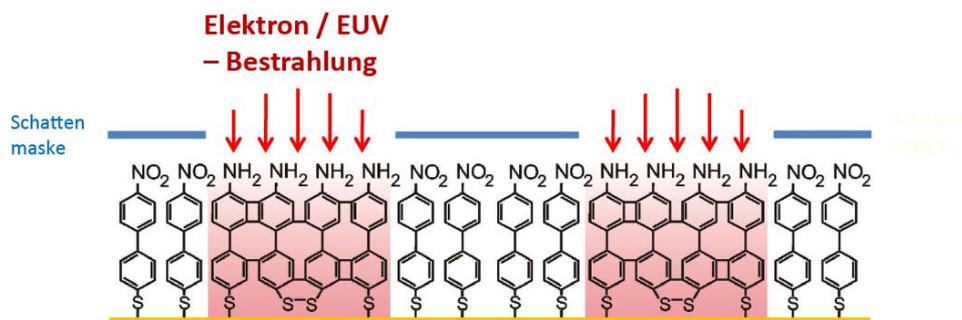


Abbildung 3: schematische Darstellung zur EUV- und Elektronenstrukturierung von Nitrobiphenylthiol-SAMs

Weitere Merkmale von vernetzten Biphenyl SAMs sind eine extrem hohe thermische Stabilität [50] und eine große Ätzresistivität [51]. Des Weiteren zeigen sie eine geringe Defektdichte auf und lassen sich für die Elektrochemische Abscheidung von Metallen verwenden [52, 53].

3.3 Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)

Die Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS) ist eine oberflächensensitive Methode bei der durch Anregung mit Röntgenphotonen Valenzelektronen eines Materials angeregt bzw. emittiert werden und ein Energiespektrum liefern.

Die Basis dieser Technik beruht auf dem sogenannten Photoeffekt, der Anfang des 19. Jahrhunderts entdeckt wurde und das Phänomen der Anregung und Emission von Elektronen durch Photonenanregung beschreibt. In den sechziger Jahren wurde diese Spektroskopie in der Arbeitsgruppe um Kai Siegbahn entwickelt und ihm wurde 1981 hierfür der Nobelpreis in Physik verliehen. Allgemein liefert diese Technik Informationen über die chemische Struktur und die Bindungsverhältnisse an Grenz- und Oberflächen.

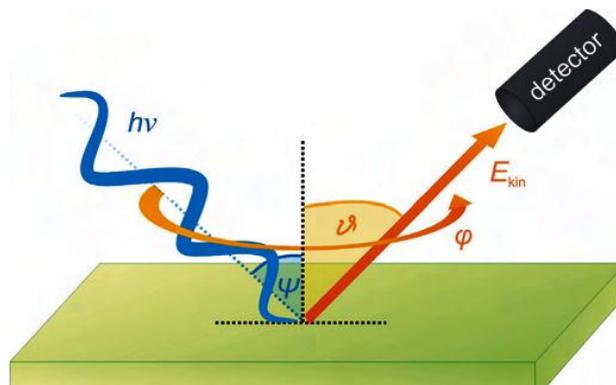


Abbildung 4: vereinfachte Darstellung des Funktionsprinzips einer Photoelektronen-Spektroskopie (Bild entnommen aus [54])

Die Anregungsenergie der am häufigsten verwendeten Labor-Röntgenquellen liegt bei 1486.6 eV (Al K_{α}) oder 1253.6 eV (Mg K_{α}). Die messbare Informationstiefe einer XPS-Anlage wird allerdings nicht nur durch die Anregungsenergie, sondern auch durch die Abschwächungslänge der emittierten Photoelektronen in der Probe bestimmt. Durch die Auftragung der mittleren freien Weglänge der Elektronen als Funktion ihrer Energie erhält man für die Vielzahl von Materialien geltende charakteristische Fundamentalkurve, die in Abbildung 5 wiedergegeben ist. Hier zeigt sich, dass die höchste Oberflächensensitivität bei

einer Elektronenenergie von 40 bis 100eV liegt, da die Reichweite in diesem Bereich mit 0.5nm minimal ist.

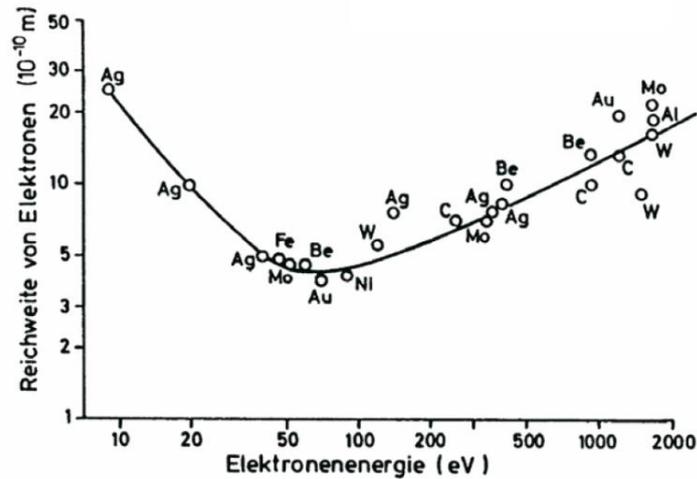


Abbildung 5: Hier ist die sogenannte Fundamentalkurve gezeigt, hierbei ist die mittlere freie Weglänge von Elektronen in verschiedenen Festkörpern als Funktion der Energie aufgetragen. [55]

Die kinetische Energie eines Photoelektrons entspricht der der Energie des eingestrahlenen Photons abzüglich der Bindungsenergie des Elektrons zum Vakuum E_B^* für den Fall $h\nu > E_B^*$:

$$E_{Kin} = h\nu - E_B^* \quad (3.1)$$

Durch die Messung der kinetischen Energie eines Elektrons kann seine Bindungsenergie im Atom bestimmt werden. Jedoch ist die Lage des Vakuumniveaus oft nicht bekannt und daher werden die Bindungsenergien oft auf die Lage des Fermi-niveaus bezogen.

Die Probe und das Spektrometer sind im elektrischen Kontakt, somit sind ihre Fermienergien im Gleichgewicht bzw. auf dem gleichen Energieniveau. Die Austrittsarbeiten der Probe Φ_s und des Spektrometers Φ_{Sp} sind jedoch verschieden.

Ein Photoelektron muss bei Eintritt in den Energieanalysator die Kontakt Potentialdifferenz $\Phi_{SP} - \Phi_S$ überwinden. In Abbildung 6 ist das Energie Bandschema dieses Prozesses schematisch dargestellt.

Die kinetische Energie eines Photoelektrons außerhalb der Probe lässt sich beschreiben durch:

$$E'_{kin} = h\nu - E_B - \Phi_S \quad (3.2)$$

Durch das das Kontaktpotential zwischen Probe und Spektrometer ändert sich die Energie der Photoelektronen auf dem Weg zu dem Energieanalysator zu:

$$E'_{kin} = h\nu - E_B - \Phi_S - (\Phi_{SP} - \Phi_S) \quad (3.3)$$

Die kinetische Energie der Photoelektronen im Spektrometer lassen sich wie folgt beschreiben:

$$E_{Kin} = h\nu - E_B - \Phi_{SP} \quad (3.4)$$

Daraus folgt das die Austrittsarbeit der Probe bei der Bestimmung der Bindungsenergien, bezogen auf das Fermi-niveau, keine Rolle spielt. Sondern nur die Austrittsarbeit des Spektrometers weitgehend konstant und bekannt sein muss.

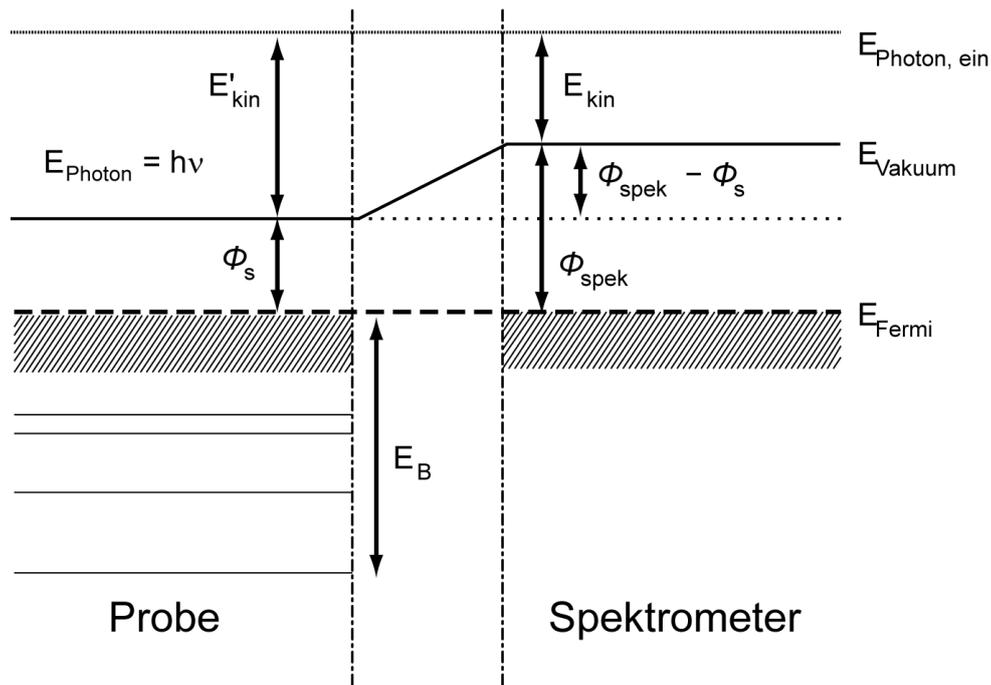


Abbildung 6: Energie Bandschema für die Probe und das Spektrometer: Die Fermi-Energie liegt durch die elektrische Verbindung zwischen Probe und des Spektrometers auf dem gleichen Niveau.

3.3.1 Quantitative Analyse

Die XP-Spektroskopie erlaubt nicht nur eine qualitative Analyse durch die Lage der Peakintensitäten, sondern auch eine quantitative Auswertung der Messdaten. Unter der Annahme, dass die Ionisierungswahrscheinlichkeit (Wirkungsquerschnitt) eines Rumpfelektrons unabhängig vom Valenzzustand eines Elementes ist (Koopman'sches Theorem), verhält sich die Peakintensität proportional zu der Anzahl der Atome in der Probe.

$$I_A = \sigma_A N_A \lambda_A(E_A) T(E_A) \cos \theta \left[1 - \exp\left(\frac{-d_A}{\lambda_A \cos \theta}\right) \right] \quad (3.5)$$

σ_A - Wirkungsquerschnitt (Ionisierungswahrscheinlichkeit) der Atome

N_A - Teilchendichte

λ_A - Abschwächungslänge der Photoelektronen

$T(E_A)$ Transmission des Energieanalysators

θ - Winkel zwischen der Oberflächennormalen und der Analysatorachse

d_A - Dicke der vermessenen Schicht

Für Proben mit einer homogenen Monolage auf der Oberfläche kann die Schichtdicke durch den Intensitätsvergleich mit einer sauberen Substrat Referenzprobe bestimmt werden. Hierbei wird die Photoelektronenabschwächung in der Röntgen-Photoelektronen Spektroskopie analog durch das Lambert-Beer'sche Gesetz in folgender Weise beschrieben:

$$I_A = I_A^0 \cdot e^{\frac{-d_A}{\lambda_A \cos \theta}} \quad (3.6)$$

I_A - Intensität nach der Transmission

I_A^0 - Intensität vor der Transmission

λ_A - Abschwächungslänge der Photoelektronen

θ - Winkel zwischen der Oberflächennormalen und der Analysatorachse

d_A - Dicke der vermessenen Schicht

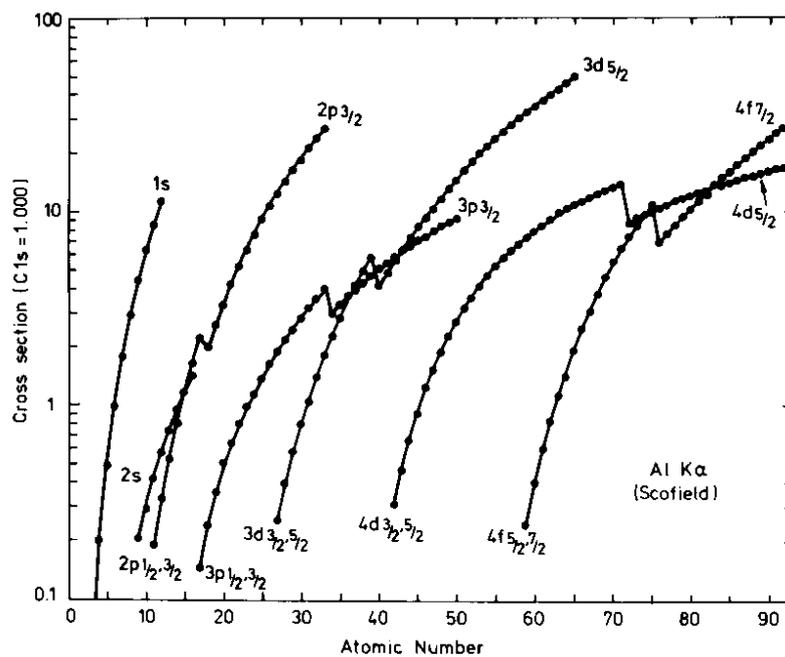


Abbildung 7: Berechnete Wirkungsquerschnitt-Werte σ_A nach Scofield für eine Aluminium (K_α) Quelle und die Werte sind auf C1s Wirkungsquerschnitt normiert. [56]

3.4 Extreme UV Interferenz Lithographie (EUV-IL)

Extreme UV Interferenz Lithographie (EUV-IL) [11, 12, 57, 58] gewinnt immer mehr Bedeutung in der Nano Lithographie, da sie die Vorteile einer parallelen Fabrikation bei

hoher Auflösung vereint. [13, 57] Diese Methode eröffnet somit Nutzern für die Nanostrukturierung, welche heute vorwiegend mit Photolithographie, Elektronenstrahlolithographie und Rastersonden Lithographie durchgeführt wird Vorteile in Bezug auf Probendurchsatz und Auflösungsvermögen. Diese EUV Technik gilt daher als Kandidat der nächsten Generation der Lithographie.

Die Halbleiter Industrie gilt als eine der wichtigsten Interessenten, dieser Technik, da dort vor allem eine Reduktion in der Fertigungsgröße bzw. Strukturgröße erforscht wird. Da diese mit dem Probenausstoß und den damit verbundenen Kosten einhergehen. Dabei war die Photolithographie lange Zeit die Methode der Wahl, zum einen konnte hiermit einer großen Ausbeute erzielt werden und durch Verbesserungen auf den Gebieten z.B. Belichtungsmethode und Photoresist weiter optimiert werden. Die maximale Auflösung die durch diese optischen Verfahren erreicht werden, können durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$d = k \frac{\lambda}{NA} \quad (3.7)$$

Hierbei sind k eine Konstante, λ die Wellenlänge und NA die numerische Apertur des Systems. Um die Auflösung zu erhöhen wurde über die Jahre wurde die Produktion mit immer kleinerer Wellenlänge durchgeführt, also vom sichtbaren Bereich in den tiefen UV Bereich. Derzeit werden Laser mit einer Wellenlänge im Bereich ~ 193 nm verwendet. Die Technik bei dieser Wellenlänge führt zu Strukturen in den Auflösungsbereich von 32-45 nm, wobei hier zusätzlich Immersionsobjektive zum Einsatz kommen [59]. Um die maximale Auflösung weiter zu erhöhen wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl weiterer Alternativen untersucht wie z.B. „Proximity X-Ray“, „projection e-beam and ion beam“ und „nanoimprint lithography“ (NIL) [60, 61].

Als EUV Quellen gibt es verschiedene Ansätze die entweder auf Synchrotronstrahlung [57, 62], Laser [63] oder Plasma [64] basieren. Die Quelle die in dieser Arbeit verwendet basiert auf Synchrotron Technik und die verwendete Wellenlänge beträgt 13.5 nm bzw. die Energie der Photonen liegt bei 92.5 eV. Die EUV Strahlung am Synchrotron wird mit Hilfe von Undulatoren erzeugt. Diese Bauteile bestehen aus periodisch linearen Array von Dipolmagneten, welche ein Magnetfeld erzeugen mit alternierenden Richtungen entlang des Array. Elektronen die dieses Bauteil durchlaufen werden somit durch das periodische Magnetfeld zu Richtungswechseln gezwungen. Diese beschleunigte Bewegung der Ladungen bei relativistischer Geschwindigkeit resultiert in der Erzeugung von Photonen mit der gleichen Ausbreitungsrichtung wie die Elektronen. Das Spektrum der emittierten Strahlung weist aufgrund von Interferenz Effekten, die durch die periodische Veränderung des Magnetfelds induziert werden, mehrere Peaks auf. Bis auf einen Peak werden alle Weiteren mittels optischen Bauelementen herausgefiltert.

Da die industrielle Lithographie zum Großteil auf der optischen Projektionslithographie basiert, wuchs das Interesse an der Holographie- oder Interferenz Lithographie. Das wesentliche Prinzip hierbei ist das Schreiben von Interferenzmustern die durch die Überlagerung von kohärenten Strahlen geformt werden. Der einfachste Fall ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Hier wird durch die Überlagerung von zwei planaren Wellenfronten ein stehende Welle erzeugt, die dadurch periodische Strukturen erzeugt und deren Breite lässt sich durch die Periode p wie folgt beschreiben:

$$p = \frac{\lambda}{2 \sin \frac{\theta}{2}} \quad (3.8)$$

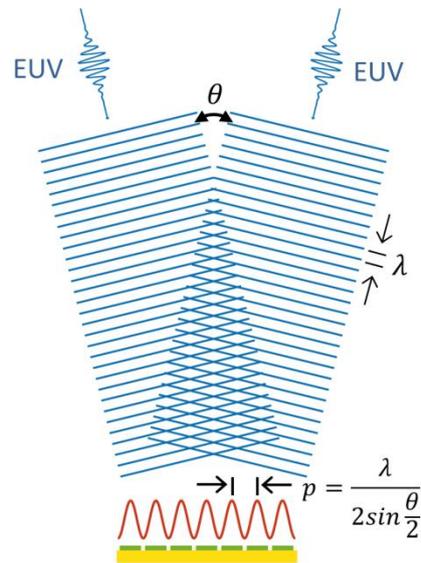


Abbildung 8: schematische Darstellung einer Zweistrahlinterdferenz

Zur Erzeugung der Wellenfronten nutzt man in der Interferenz Lithographie Transmissionsgitter. Da bei EUV Wellenlänge sämtliche Materialien eine hohe Absorption aufweisen, werden hier sehr dünne semitransparente Siliziumnitrid Membranen verwendet, welche mittels Elektronenstrahl Lithographie und Nasschemischen Ätzverfahren [65] strukturiert werden. Die Auswahl des Materials berücksichtigt dabei die Transmission Eigenschaften also auch die Handbarkeit bei der Produktion der Masken. Die hier verwendeten Masken basieren auf 100nm dicken Si_3N_4 und absorbieren bereits 60% der EUV Strahlung [13]. Des Weiteren wird wie in Abbildung 9 schematisch skizziert eine Chromschicht auf die Siliziumnitrid Membran aufgedampft, um die Effizienz zu steigern. Die Chromschicht dient als Stoppschicht, sodass die Interferenz auch nur durch das gewünschte Gitter erzeugt wird.



Abbildung 9: schematischer Aufbau einer Interferenzbeugungsmaske, durch Elektronenstrahl Lithographie und Ätzverfahren werden in Si_3N_4 Beugungsgitter erzeugt und zur Steigerung der Effizienz mit Chrom bedampft

Die bisher gezeigte Methode lässt nur die Erzeugung von Linienstrukturen zu, so dass für Punkt und Lochmuster entweder durch Drehung der Probe oder Maske um 90° in einer zweiten Belichtung erzeugt werden. Allerdings lässt sich dies einfacher durch eine Vielstrahlinterferenz realisieren. In Abbildung 10 ist (a) eine Zweistrahl und in (b) eine Vierstrahl Interferenz skizziert. D.h. die Maske besitzt vorherhin vier Beugungsgitter die senkrecht zu einander ausgerichtet sind und quasi ein Kreuz ausbilden. Dies wird in der Fotoaufnahme in Abbildung 11 am Beispiel der Maske M314 ebenfalls ersichtlich.

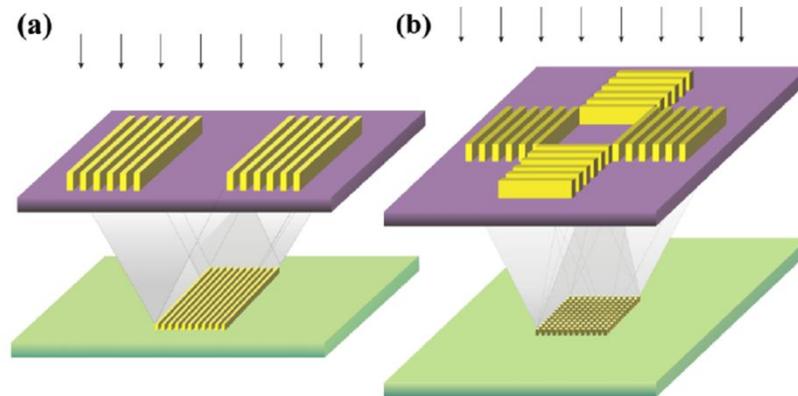


Abbildung 10: schematische Darstellung von (a) Zwei- und (b) Vierstrahl Interferenzbeugungsmaske zur Herstellung von (a) Linien und (b) Loch bzw. Punktmustern (Bild entnommen aus [13])

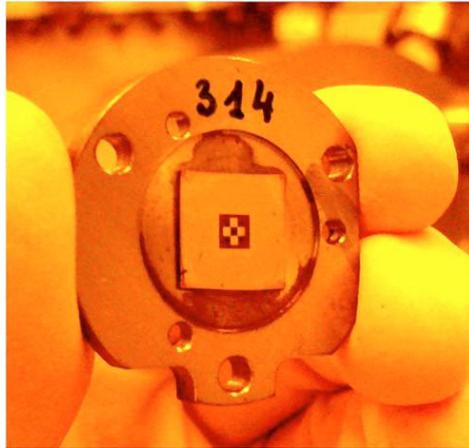


Abbildung 11: Fotoaufnahme der in dieser Arbeit verwendeten Vierstrahlinterferenz Maske M314 mit einer Periode von $100\text{nm} \times 90\text{nm}$. Die Chipfläche beträgt $3 \times 3\text{mm}^2$ und die Maske ist in der Mitte des Chips zu sehen (Bild entnommen aus [13])

Darüber hinaus lassen sich auch mehrere Beugungsgitter auf einer Maske kombinieren, so dass in einem Belichtungsschritt auch unterschiedliche Strukturen erzeugen lassen. Als Beispiel hierfür dient ein in dieser Arbeit verwendete Maske M74 deren schematischer Aufbau in Abbildung 12 zu sehen ist.

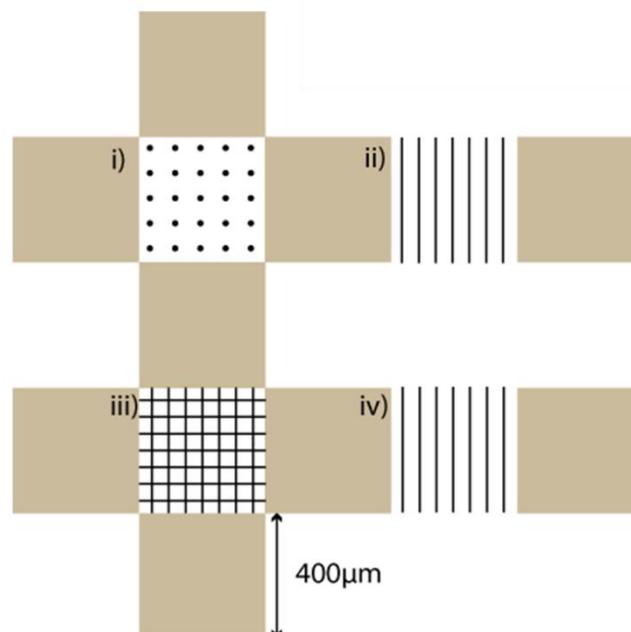


Abbildung 12: schematischer Aufbau der Maske M74 mit der parallel unterschiedliche Interferenzfelder geschrieben werden können: (i) Punktmuster (Periode 350nm), (ii) Linienmuster (Periode 250nm), (iii) Gitterstruktur (Periode 250nm) und (iv) Linienmuster (Periode 250nm)

In Abbildung 13 ist der experimentelle Aufbau an der XIL Beamline an der SLS schematisch gezeigt. Die Proben werden unter UHV Bedingungen in einer Kammer bestrahlt. In dieser Kammer befindet sich zusätzlich zu dem Proben bzw. Maskentisch noch eine Photodiode mit deren Hilfe die Intensität des Strahls gemessen werden kann. Dazu wird sie in den Strahlengang gefahren und vor dem eigentlichen Belichtungsprozess wieder entfernt.

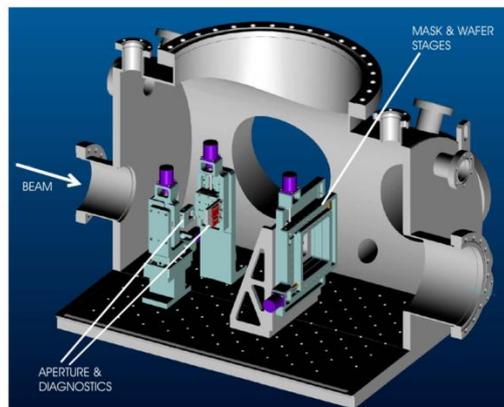


Abbildung 13: experimenteller Aufbau der XIL Beamline an der „Swiss Light Source“ am Paul Scherrer Institut [66]

3.5 Atomare Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Mit dem Atomaren Rasterkraftmikroskop kurz AFM (Atomic Force Microscope) ist ein Rastersondenmikroskop mit einem sehr hohen Auflösungsvermögen. Das AFM wurde durch Binnig, Quate und Gerber 1986 [67] eingeführt und zählt heute zu den wichtigsten Abbildung-, Mess- und Manipulator- Werkzeugen auf der Nanoebene. Es lassen sich damit Aussagen über Oberflächen einer Probe treffen. Dabei können Höheninformationen bzw. Rauigkeiten bis auf wenige Nanometer genau bestimmt werden.

Das AFM besteht im Wesentlichen aus einem Arm, dem sogenannten Cantilever, an dessen Ende eine Keramik oder Halbleiterspitze befestigt ist. Diese wird so nah an die Probenoberfläche gebracht, so dass nur atomare Kräfte von Bedeutung sind. Mit der Spitze

wird die Probe abgerastert, dabei wird der Abstand zur Probe durch ein Piezoelement konstant gehalten. Die Aufnahme des Höhenprofils erfolgt durch eine optische Messung. Ein Laserstrahl, der auf die Spitze gerichtet ist, wird reflektiert und trifft auf einen Vier-Quadranten Photodetektor. Wenn die Spitze beim Abrastern ausgelenkt wird, dann ändert sich auch die Position des reflektierten Strahls auf den Detektor. Diese Auslenkung ist ein Maß für die Topographie.

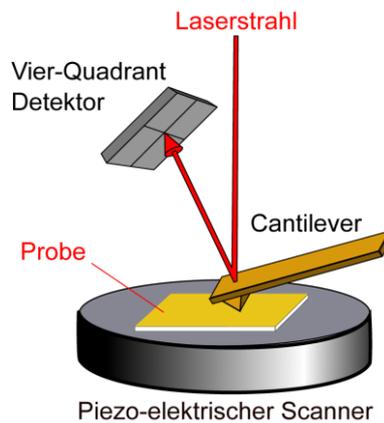


Abbildung 14: schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops (AFM)

Das AFM lässt sich in verschiedenen Messmoden betreiben, welche über die Wechselwirkung zwischen Spitze und Oberfläche beschrieben werden.

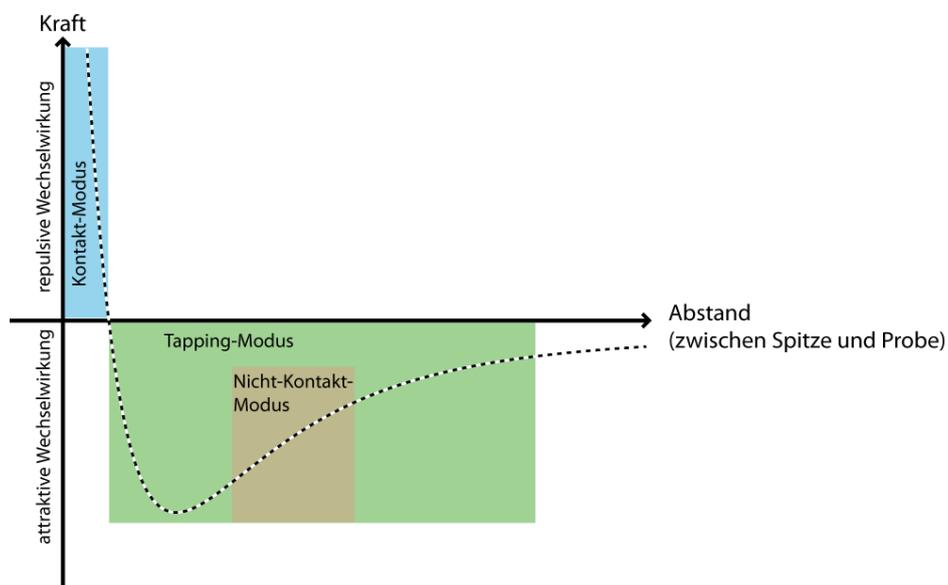


Abbildung 15: Kraftabstandskurve für die verschiedenen Arbeitsmodi eines atomaren Rasterkraftmikroskops

Im sogenannten „contact mode“ befindet sich die Spitze im mechanischen Kontakt mit der Oberfläche. Dabei lässt sich mit einer festen Höhe des Piezoscanners die veränderte Position des Cantilevers mit Hilfe der Photodiode messen. Diesen Modus bezeichnet man als „Constant Height Mode“. Der Vorteil hierbei liegt in einer schnellen Scangeschwindigkeit, jedoch gilt dies nur für kleine Scanbereiche ohne große Höhenunterschiede, da die Kräfte auf die Spitze und den Cantilever sonst zu groß werden. Der gebräuchlichste Modus ist der „Constant Force Mode“. Hier wird der Abstand der AFM Spitze zu der Oberfläche mit Hilfe einer elektronischen Rückkopplung kontrolliert, so dass die Auslenkung des Cantilevers bzw. das reflektierte Lasersignal wieder den ursprünglichen Ausgangswert annehmen. Dies wird durch die Bewegung des z-Piezo des Piezoscanner erreicht, d.h. in diesem Modus wird idealerweise immer mit einem konstanten Anpressdruck der Spitze auf die Probe gearbeitet.

Neben den Auslenkungen des Cantilevers nach oben oder unten kann mit Hilfe des Photodetektors auch die seitliche Verdrillung des Cantilevers gemessen werden. Diese seitlich wirkenden Kräfte hängen von der Oberflächeneigenschaft wie der Rauigkeit oder der Benetzungseigenschaft der Probe ab. Die meisten AFM Untersuchungen werden unter Luftatmosphäre durchgeführt, daher kann sich in Abhängigkeit der Polarität der Oberfläche ein Wasserfilm zwischen Probe und Spitze bilden. Dieser verringert die Reibung an den entsprechenden Bereichen und ermöglicht dadurch einen Kontrast. Diese Art der Aufnahme bezeichnet man als Lateralkraftmodus oder „Lateral Force Mode“ (LFM). Hiermit lassen sich topographisch glatte Oberflächen abbilden und Domänen mit unterschiedlichen chemischen Funktionalitäten aufweisen.

Eine weiterer AFM Betriebsmodus ist der sogenannte „Non-Contact Mode“(NC-AFM). Dabei wird der Cantilever über ein piezoelektrisches Element im Spitzenhalter zu Schwingungen im Bereich seiner Resonanzfrequenz angeregt. Befindet sich der Cantilever bzw. die Spitze in

der Nähe der Probenoberfläche, so treten langreichweitige van-der-Waals Kräfte auf, die eine Verschiebung in der Resonanzfrequenz und somit in einer Veränderung in der Schwingungsamplitude resultieren.

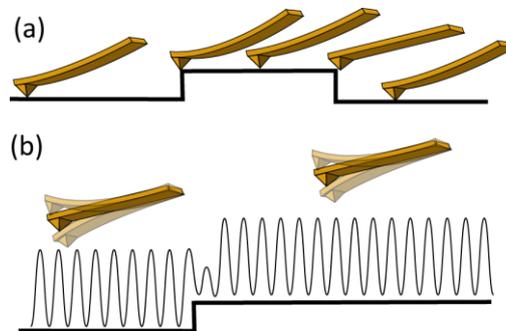


Abbildung 16: schematische Darstellung von den Rasterkraftmikroskop Betriebsarten im (a) Kontakt- und (b) Semikontakt- Modus

Im "Semi-Contact" bzw. „Tapping mode“ wird der Cantilever wie im Fall Non Contact Modus im Bereich der Resonanzfrequenz in Schwingung versetzt. Allerdings wird hierbei eine höhere Schwingungsamplitude verwendet und die Spitze näher an die Probe gebracht. So dass auch repulsive Kräfte detektiert werden können. Diese Methode ist somit sehr gut für empfindliche Oberflächen geeignet.

3.6 Elektronen Mikroskopie

Das Auflösungsvermögen des menschlichen Auges ist auf Strukturgrößen im Bereich von $\approx 75\mu\text{m}$ Strukturen begrenzt, so dass zur Untersuchung von Objekten im Bereich von einigen Nanometern Mikroskope notwendig werden. Die Auflösungsgrenze d eines Mikroskops hängt von der verwendeten Wellenlänge λ und der numerischen Apertur N_A :

$$d = \frac{\lambda}{2N_A} \quad (3.9)$$

Daraus folgt für optische Systeme, die mit sichtbaren Licht arbeiten eine Auflösungslimit von $\sim 200\text{nm}$. Um dieses Problem zu lösen, wurde von Ernst Ruska in die 1930er das erste

Elektronenmikroskop entwickelt.[68] Für diese Arbeit wurde 1986 auch den Nobelpreis der Physik verliehen. Nach der Gleichung von de-Broglie gilt für die Wellenlänge λ eines Teilchens mit der Masse m :

$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad (3.10)$$

mit der Planck Konstanten h und der Geschwindigkeit v . Daraus folgt für Elektronen mit einer kinetischen Energie von z.B. 50keV beträgt die Wellenlänge $\lambda \approx 0.005$ nm, somit wäre es theoretisch möglich atomare Auflösungen zu erreichen. [69] Jedoch zeigt sich in der Praxis das die Auflösung durch Beugung und Aberrationen limitiert werden.

Elektronenmikroskope lassen sich in zwei grundsätzliche Gerätekategorien einteilen: Rasterelektronen Mikroskop (REM) und Transmission Elektron Mikroskop (TEM).

3.6.1 Raster Elektron Mikroskopie

Bei einem Raster Elektron Mikroskop wird ein Elektronenstrahl auf eine kleinen Spot fokussiert und anschließend über das zu untersuchende Objekt ab gerastert. [68] Durch den primären Elektronenstrahl mit einer Energie im Bereich von 3-30keV findet eine Wechselwirkung mit der Probe statt. Hierbei entsteht eine Vielzahl von Sekundärstrahlung, welche aus zurückgestreuten Elektronen, Sekundärelektronen, Auger Elektronen und Röntgenstrahlung zusammensetzt. Die Abbildung wird mit Hilfe eines Computers aus Detektor Intensitäten in jedem Messpunkt erstellt. Dabei dienen insbesondere die Sekundärelektronen als meistgenutzte Informationsquelle und werden typischerweise mit einem Everhart-Thornley Detektor, oft als SE2 benannt, aufgenommen. Aufgrund der Position des Detektors im Verhältnis zu der Probe, erscheinen Objekte die zum Detektor ausgerichtet sind heller als die abgewandten Objekte. Dies führt zu Schattenausbildung auf den resultierenden Bildern.

Ein weiterer wichtiger Detektor ist der sogenannte Inlens Detektor, der sich in den Elektronenlinse befindet. Hier werden hauptsächlich die niederenergetischen Sekundärelektronen, die von der Oberfläche zurückgestreut bzw. reflektiert werden, detektiert. Aufgrund der geringen Energie jener Sekundärelektronen, ist dieser Detektor besonders empfindlich gegenüber unterschiedlichen Materialoberflächen. Da diese Elektronen von schweren Atomen stärker reflektiert werden als von leichten, wird anhand der Helligkeitsunterschiede ein chemischer Kontrast der Oberfläche sichtbar.

3.6.2 Transmission Elektronen Mikroskopie

Das TEM basiert auf dem Original Design von E. Ruska [70] und ist einem optischen Lichtmikroskop im Transmissionsmode in Abbildung 17 sehr ähnlich. Die verwendete Elektronenenergie liegt hierbei typischerweise im Bereich von 100-300 keV. Die Elektronen durchdringen das zu untersuchende Objekt und werden auf einem Fluoreszenzschirm projiziert. Für kleine Vergrößerungen sind im Wesentlichen die Objektstärke und die Proben Beschaffenheit für die Bilderzeugung relevant. Der Kontrast wird hierbei durch Absorption von Elektronen in der Probe erzeugt. Für hohe Auflösungen werden diese Wechselwirkungen komplexer, so dass für die Bildinterpretation sogar Computersimulationen notwendig werden. Die neuesten TEM Generationen erreichen eine Auflösung von $\sim 0.08\text{nm}$. [71, 72] Dieses Auflösungsvermögen reicht aus um einzelne Atome in kristallinen Materialien abzubilden.

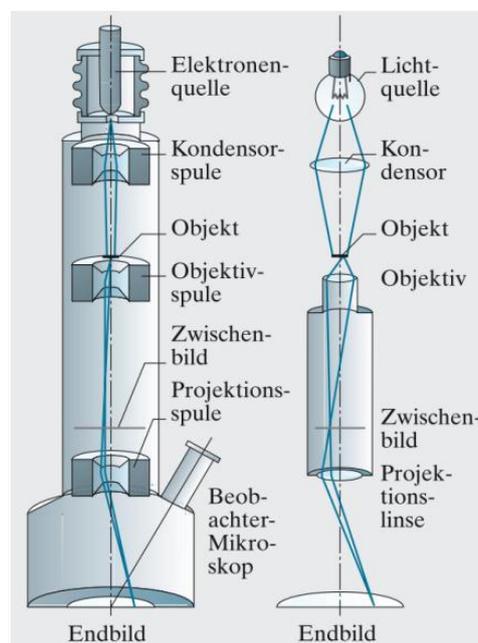


Abbildung 17: (v.l.) Schema eines Transmissionselektronen Mikroskops und eines Lichtmikroskops [73]

3.7 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Das konfokale Laserscanning-Mikroskop (CLSM) ist im Gegensatz zu einem konventionalen Mikroskop Bilder mit einer hohen und dreidimensionalen Auflösung abzubilden. Ein wesentlicher Vorteil der konfokalen Mikroskopie ist hierbei die Möglichkeit bietet unscharfe Objektteile, die außerhalb der Brennebene liegen, auszublenden. So dass durch Punkt zu Punkt Aufnahme von verschiedenen Brennebenen und Rekonstruktion des Bildes am Computer auch dickere Proben mit hoher Tiefenschärfe charakterisiert werden können. Im Vergleich zu einem konventionellen Mikroskop wird für eine hohe Tiefenschärfe hier nicht die Apertur verändert, welche zu einer Reduktion des Auflösungsvermögens resultiert. Die Grundzüge dieser Mikroskopie wurden von Marvin Minsky entwickelt und in einem amerikanischen Patent aus dem Jahr 1957 beschrieben [74]. Jedoch dauerte es weitere 30 Jahre und durch die Entwicklung von Lasern als nahezu ideale Lichtpunktquelle wurde die konfokale Mikroskopie Ende 1980 als weitere Standardtechnik zu Anwendung kam [75].

In einem konventionellen optischen Lichtmikroskop erfolgt die Transformation Objekt zu Bild für alle Objektpunkte parallel. Während in einem konfokalen LSM die Probenoberfläche punktweise mittels eines Laserstrahls ab gerastert und durch Wechselwirkung der bestrahlten Objektstelle kann z.B. Fluoreszenz punktweise vermessen werden. Die Information über die gesamte Probe wird durch die Bewegung des Laserstrahls über die Probe oder der Probe relativ zum Laser gewonnen. Daher werden konfokale Systeme als Punktscanner bezeichnet.

Die entscheidende Besonderheit eines konfokalen LSM gegenüber einem konventionellen Mikroskop ist die konfokale Blende, die in einer zur Zwischenbildebene und auch zur Objektebene des LSM konjugierten Ebene angeordnet ist. Somit kann durch den Detektor (Photomultiplier (PMT)) nur Licht detektiert werden, das die Blende passiert hat. Da der

beugungsbegrenzt fokussierte Laserstrahl einer punktförmigen Beleuchtung der Probe entspricht und Beleuchtungs- bzw. Beobachtungspunkt ineinander abgebildet werden (konjugierte Ebene), spricht man von einem konfokalen Strahlengang.

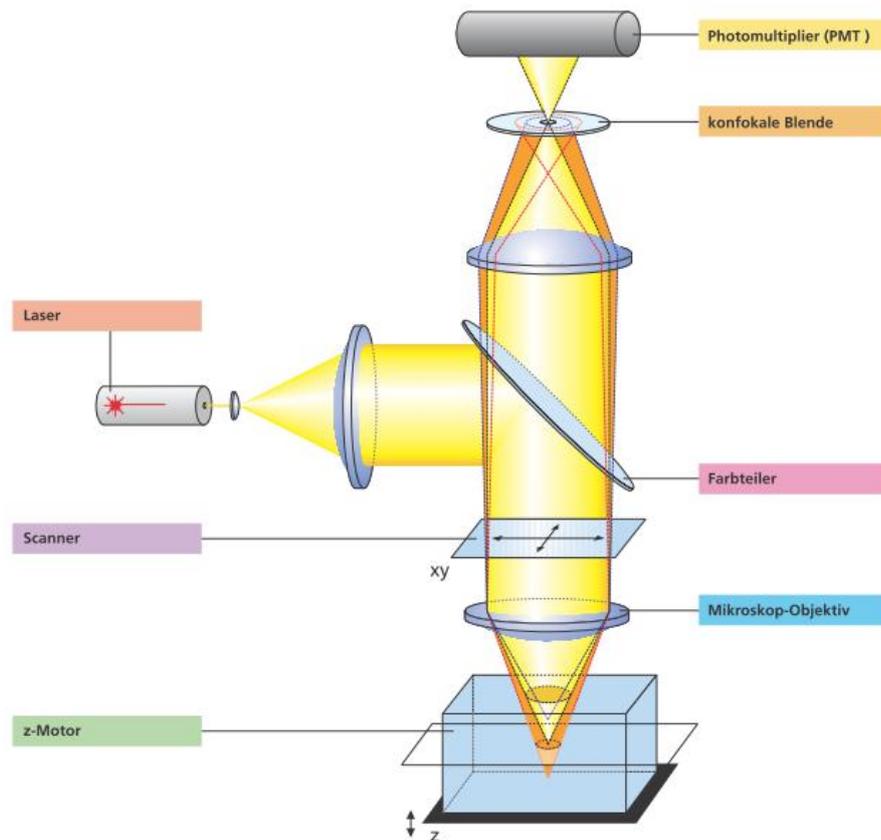


Abbildung 18: schematischer Aufbau eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops. [Eigentum der Carl Zeiss AG]

3.8 Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Die Technik der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR) beruht auf der Analyse von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen bei Bindung an eine Oberfläche. Die auf dem gleichnamigen physikalischen Phänomen beruhende Oberflächenplasmonresonanz erlaubt die Detektion von Molekülen bei Bindung an eine Oberfläche. Es wird bei dieser Spektroskopie polarisiertes und monochromatisches Licht auf eine dünne Goldschicht

gestrahlt, an der es zur Totalreflexion kommt. Die Goldschicht befindet sich auf einem transparenten Glasprisma. Im Falle der Totalreflektion von eingestrahlttem Licht wird ein sogenanntes evaneszentes Feld erzeugt, das eine Eindringtiefe von ~ 200 nm besitzt. Das evaneszente Feld ist in der Lage mit den Oberflächenplasmonen eines dünnen Metallfilms zu interagieren, falls die Resonanzbedingungen erfüllt sind. Dabei sind die Resonanzbedingungen abhängig von folgenden Parametern: (a) Einfallswinkel, (b) Brechungsindizes und (c) Wellenlänge. Die Wellenlänge wird während der Messung konstant gehalten, somit ergeben sich Veränderungen des Brechungsindex in der Nähe der Metalloberfläche. Diese Änderung ist proportional zu der Veränderung des Resonanzwinkels.

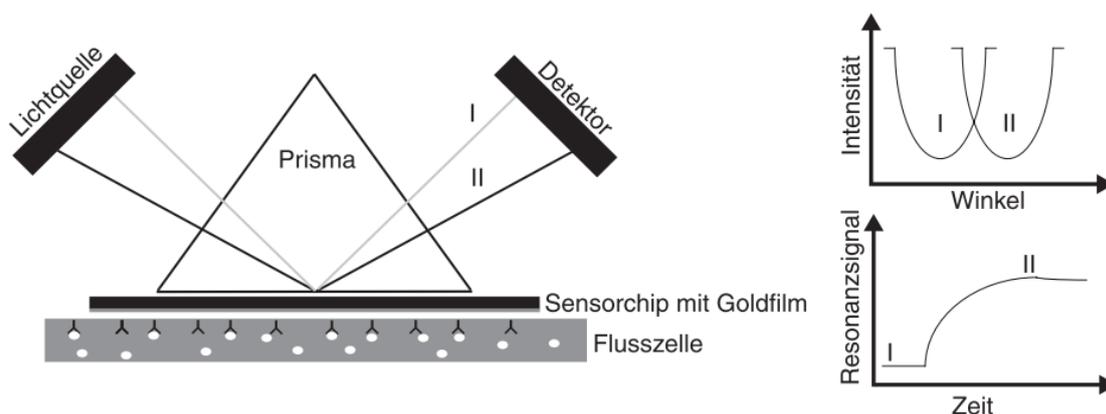


Abbildung 19: Prinzip eines Oberflächenplasmonresonanz Aufbaus (entnommen aus [76])

Das resultierende Sensorgramm ist eine Darstellung des SPR-Signals in Resonanzeinheiten (RU) in Abhängigkeit der Zeit (t). Hierbei entspricht eine Resonanzeinheit der Bindung von 1 pg an die Oberfläche einer Flusszelle mit der Fläche von 1 mm^2 . Somit ist die Einheit RU definiert als pg/mm^2 .

4 Materialien und Methoden

4.1 SAM Präparation

4.1.1 Thiol SAMs

Für die Präparation von 4'-Nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol (NBPT) SAMs wurden 30nm Au auf Silizium Wafer oder 300nm Au auf Glimmer Substrate (für den Transferprozeß notwendig) verwendet (Georg Albert PVD-Beschichtungen). Die Proben wurden jeweils mit einem UV / Ozon Reiniger (UVOH 150 LAB von FHR, Germany) für 3-5 Minuten bei einem Sauerstofffluß von 1 l/min gereinigt, mit Millipor Wasser und Ethanol anschließend gespült und unter Stickstofffluß getrocknet. Die Proben werden in einer 200µM Lösung aus NBPT und getrocknetem Dimethylformamid (DMF) für 72 Stunden in einem Kolben unter Stickstoffatmosphäre eingelegt. Danach werden die Proben mit DMF und Ethanol abgespült und bis zur weiteren Verwendung unter Argon Schutzatmosphäre gelagert.

Die Präparation von 16-mercaptohexadecanoic acid (triethylene glycol) ester SAMs (HS-C₁₆-EG₃-OH) erfolgte auf den gleichen Substraten wie die NBPT Präparation. Die Proben wurden in ~1mM Lösung aus (HS-C₁₆-EG₃-OH)-Molekülen in Ethanol für 24 Stunden eingelegt. Anschließend mit Ethanol abgespült und mit Stickstoff getrocknet. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Proben unter Argon Schutzatmosphäre gelagert.

4.2 Strukturierung von SAMs

4.2.1 Elektronenstrahlithographie

Die Vernetzung bzw. Elektronenbestrahlung erfolgte unter Hochvakuum ($< 5 \cdot 10^{-7}$ mbar) mit einer E-Floodgun der Firma Specs und die kinetische Energie der Elektronen beträgt 100eV. Für die Vernetzung von Biphenyl SAMs wurde typischerweise eine Dosis von 50 mC cm⁻² verwendet. Die Strukturierung der SAMS wurde hierbei mittels „proximity

printing“ durch Auflage einer Schattenmaske (Quantifoil TEM Gitter, Jena) auf die Probe während der Bestrahlung durchgeführt.

4.2.2 EUV – Interferenz Lithographie

Die EUV Interferenz Lithographie wurde an der XIL beamline der „Swiss Light Source“ (SLS) am Paul Scherrer Institut durchgeführt. Die EUV Wellenlänge beträgt 13.5nm (92.5eV) mit einer spektralen Breite von 2-3% [77]. Der Photonenfluß wurde mittels einer Photodiode gemessen und betrug 5-20mW cm⁻² abhängig von der verwendeten Maske. Die Strukturen sind mittels Zwei- oder Vierstrahlinterferenzmasken erzeugt worden.

4.3 Biochip Präparation

4.3.1 Funktionalisierung mit Hilfe von NTA- Chelatkomplexen

Die Synthese der in dieser Arbeit verwendeten Moleküle wie carboxyl tris-NTA Derivate, tris-NTA-EG₃-Thiole und Matrixthiole (EG₃-OH) stammen von unseren Kooperationspartnern der Gruppe Tampe (Universität Frankfurt) und sind in der Dissertation von Ali Tinazli ausführlich beschrieben [15].

4.3.1.1 Protokoll für die Ankopplung von Carboxy-trisNTA

Die Ankopplung der tris-NTA Moleküle an die Amino terminierten Oberflächen der vernetzten NBPT SAMs wurde wie folgt durchgeführt. Eine Lösung bestehend aus 1.0 ml Chloroform, 0.03 ml tert-butyl geschützten *tris*-NTA (10 mM) und 1.0 ml DIC wurde innerhalb von 5-8 min auf 75°C hochgeheizt. Die strukturierten NBPT SAM Proben wurden für 30 min in die vorgeheizte Lösung gegeben. Danach wurden die Proben entnommen und

mit Chloroform abgespült. Die Entschützung der tris-NTA erfolgte nun in TFA für 3-4 Stunden bei Raumtemperatur.

Die Chips wurden mit Millipore-Wasser abgespült. Die nicht vernetzten NBPT Bereiche wurden in einer Lösung aus 1mM EG₃-OH Molekülen und Ethanol für 5 Tage bei Raumtemperatur ausgetauscht. Abschließend wurden die Proben im Ultraschallbad mit Ethanol gereinigt und mit Stickstoff getrocknet. Die Lagerung der Proben erfolgt bis zu ihrer Anwendung unter Argon Schutzatmosphäre.

4.3.1.2 Protokoll für die Ankopplung von multi-NTA-SH / OEG-SH

Die Ankopplung von tris-NTA Thiolen an die Amino Gruppen von bestrahlten NBPT SAMs erfolgt nach dem folgenden Protokoll. Dabei wird „Maleoyl-NHS“ in trockenen DMF gelöst. Fünf Mikroliter dieser Lösung werden auf die vernetzte NBPT SAM Oberfläche gegeben und mit einer zweiten Probe oder einem Glassubstrat abgedeckt („Sandwich“), so dass sich die Lösung gleichmäßig verteilt. Nach einer Einwirkzeit von ca. 30min im Dunkeln und bei Raumtemperatur wird die Probe mit DMF gespült und mit Stickstoff getrocknet.

Da die trisNTA Moleküle nicht als einzelne Moleküle vorlagen wurden sie wie folgt reduziert. Hierbei wurde 2µl einer 50mM Tris(2-carboxyethyl)-phosphin Pufferlösung (TCEP 15.5mg in 1mL H₂O) zu 10µl einer 10mM trisNTA-S-S-trisNTA HBS-Pufferlösung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min sind die NTA Moleküle reduziert. Nach Hinzugabe von 5µl der reduzierten trisNTA-SH / Hepes Pufferlösung wurde die Probe wiederum mit einem weiteren Substrat abgedeckt und für zwei Stunden bei Dunkelheit und Raumtemperatur gelagert. Nach der Ankopplung der NTA Moleküle an die „Maleoyl-NHS“ Gruppen wurden die Proben mit Wasser abgespült und mit Stickstoff getrocknet. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei T=-20°C.

4.3.2 Austausch von EG₃ mit bisNTA

Die bestrahlten PEG SAM Substrate wurden in einer 20 μ M Thiollösung (25 mol% bisNTA thiol and 75 mol% matrix thiol in acetonitrile) für 25 min eingelegt. Anschließend wurden die Proben in Acetonitril, Ethanol und Millipor Wasser jeweils für 5min im Ultraschallbad gereinigt.

4.4 XPS Spektroskopie

Die Röntgenphotoelektronen-Spektroskopie (XPS) wurde unter UHV Bedingungen ($\sim 10^{-10}$ mbar) an einem Spektrometer der Firma Omicron durchgeführt. Die Messungen wurden mit Hilfe einer monochromatischen Röntgenquelle (Al K_{α}) realisiert. Die Bindungsenergien wurden mit Hilfe von Au $4f_{7/2}$ Peak bei 84.0 eV korrigiert. [78] Um die die Energieauflösung und die Signalintensitäten besser vergleichen zu können wurde die Auflösung mit 0.9 eV und der Emissionswinkel von 8° bestimmt. Die Schichtdickenbestimmung basiert auf der exponentiellen Abschwächung des Au mit $\lambda = 36\text{\AA}$ [77] bzw. Si $2p_{3/2}$ mit $\lambda = 35\text{\AA}$ [79]. Die Dekonvolution der XPS Spektren wurde durch Abzug eines Shirley Hintergrundes und Anwendung der symmetrischen Voigt Funktion durchgeführt. [80]

4.5 Transfer (Nanosiebe)

Der Transfer Prozess für die Nanosiebe basiert auf dem Transfer der Nanosheet von einem Substrat und ist im Detail in der Dissertation von Dr. Christoph Nottbohm zu entnehmen. [81] Daher folgen hier für diese Arbeit nur die notwendigen Transferparameter.

Zur Stabilisierung für den Transfer wurde eine ~ 300 nm dicke Polymethylmethacrylate Schicht (PMMA, Allresist AR-P 671.04) mittels „Spincoater“ (30s bei 4000 rpm) aufgebracht und für 5min bei 90°C auf einer Heizplatte ausgehärtet.

Durch einlegen der Probe (PMMA / Nanosieb / Au / Glimmer) in 48% HF-Säure für 15-30min kann der PMMA / Nanosieb / Goldfilm von dem Glimmersubstrat gelöst werden. Anschließend wird der PMMA / Nanosieb / Goldfilm für 15min in einer KI/I₂ Ätzlösung (0.6 mol/l KI, 0.09 mol/l I₂) eingelegt. Hierbei wird nur die Goldschicht entfernt und PMMA / Nanosieb Schicht kann auf ein neues Substrat (SiO₂ oder TEM Grid (Quantifoil R1/4)) transferiert werden. Um mechanischen Stress beim Entfernen des PMMA in Aceton Lösungsmittel zu minimieren wurde ein kritischer Punkttrockner der Firma Tousimis (Autosamdri-815) benutzt. Hierbei wird die Probe für ~60 Minuten in der Aceton gefüllten Kammer gelagert und mit flüssigen CO₂ heruntergekühlt und ausgetauscht.

4.6 Gold Metall Abscheidung

Das Aufdampfen des Goldfilms auf das Nanosieb erfolgte durch Argon Ionen Beschuss eines Goldtargets unter HV Bedingungen ($\sim 10^{-7}$ mbar) bei einem Goldfluss von 31.4 nm min⁻¹. Die Probe mit dem Nanosieb transferiert auf ein TEM Gitter wurde für einige Sekunden in den Molekularstrahl gedreht, so dass eine Gold Schichtdicke von 2-5nm resultiert.

4.7 Mikroskopische Methoden

4.7.1 AFM

Die Rasterkraftmikroskop Aufnahmen an der Universität Bielefeld wurden an einem Ntegra System der Firma NT-MDT unter Umgebungsklima durchgeführt. Für die Messungen von SAMs auf Goldsubstraten wurden im Kontaktmodus Kantilever mit einem Spitzendurchmesser von 10nm und einer typischen Kraftkonstanten von 0.11 Nm⁻¹ (NT-MDT CSG 10) und im Semikontakt Modus mit Durchmesser von 10nm und 11.8 Nm⁻¹ (NT-MDT NSG 10) benutzt. Für die transferierten Proben auf SiO₂ Oberflächen wurden HighQ Platin

beschichtete Spitzen mit einem Kurvenradius von 30-50nm und einer Kraftkonstante von 0.01-0.08 Nm^{-1} (der Firma Phoenix) verwendet.

Die AFM Untersuchungen zur Protein Anbindung wurden an einem Digital Instruments NanoScope IIIa SPM MultiMode atomic force microscope (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA) in einer kommerziellen Quarz Flüssigzelle durchgeführt. Für die Experimente wurden Siliziumnitrid Cantilever mit einer typischen Kraftkonstanten von 0.06 Nm^{-1} (Veeco Instruments, St. Barbara) verwendet. Die AFM Aufnahmen erfolgten in einer HBS Pufferlösung im „Tapping Mode“ bei einer Resonanzfrequenz von 20-30kHz. Alle Lösungen wurden in HBS Puffer, welche 0.01 % Triton X-100 enthält, vorbereitet oder verdünnt. Die Chelator-Oberflächen wurden für 15 min in 10mM NiSO_4 Lösung aktiviert, mit HBS Puffer abgespült und die aktivierten Oberflächen wurden bei Raumtemperatur für 15 min in 50nM Protein-Lösung mit 20S-His₆-tagged Proteasome eingelegt.

4.7.2 TEM

Die Transmission Elektron Mikroskopie wurde an einem Philips TEM CM 200 FEG (PTB Braunschweig) bei einer Beschleunigerspannung von 200 kV realisiert. Die Aufnahmen erfolgten im Dunkelfeld Modus mit „displaced aperture“ und wurden mittels 1k CCD Kamera (GATAN Inc.) digitalisiert.

4.7.3 REM

Die Rasterelektronen Mikroskop Aufnahmen wurden an einem LEO 1530 (Universität Bielefeld, AG Reiss) ausgestattet mit einer Zeiss Gemini Säule unter HV Bedingungen ($\sim 10^{-7}$ mbar) bei 3kV erstellt. Der Arbeitsabstand (working distance) betrug $\sim 10\text{mm}$ und es wurde der Inlens Detector verwendet.

4.7.4 Optische Charakterisierung

Die optischen Aufnahmen wurden mit Hilfe eines Olympus BX51 Mikroskops ausgestattet mit einer Olympus C5060 Kamera erstellt.

5 Resultate und Diskussion

5.1 Fabrikation von strukturierten Oberflächen mit EUV-Interferenz Lithographie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die chemische Lithographie an Nitrobiphenylthiolen und ähnlichen Molekülen mit Hilfe der EUV Interferenz Lithographie (EUV-IL) untersucht. Interferenzlithographie mit EUV-Strahlung bei 13.5 Nanometern ist ein einfaches paralleles Verfahren um periodische Muster mit sehr kleinen Strukturgrößen und höchster Qualität herzustellen. Die EUV-Belichtung geschieht in Kooperation an der „XIL Beamline“ an der Swiss Light Source (SLS) in Villigen, Schweiz.

Die Vernetzung bzw. chemische Lithographie von NBPT SAMs wurde mittels Vakuum UV (VUV, 21.2 eV) und EUV (92.5 eV) im Detail untersucht. Hierzu wurden Proben vor und nach der Bestrahlung mit Hilfe von Röntgenphotoelektronen Spektroskopie (XPS) charakterisiert. In Abbildung 20 sind die entsprechenden Spektren für VUV dargestellt und mit den Referenzspektren einer Elektronenvernetzten Probe verglichen.

In dem N1s Spektrum ist eindeutig eine chemische Verschiebung von 405.5 eV nach 399.2 eV zu erkennen, die auf die Umwandlung von Nitro nach Amino Gruppen zurückzuführen ist [78]. Des Weiteren sind charakteristische Veränderungen im S2p Signal zu erkennen. Wie bereits in der Literatur [77] für die elektroneninduzierte Vernetzung gezeigt, bildet sich auch bei der UV bestrahlten Probe ein weiteres Dublett bei 163.3eV aus. Dies kann durch die Bildung von Sulfid / Dissulfiden an der SAM / Gold Grenzfläche erklärt werden.

Letztendlich zeigt der Vergleich der XPS Spektren für die Elektronen und die Photonenbestrahlung die gleichen Änderungen in den jeweiligen Signalen. So dass hieraus eindeutig auf ein zweidimensionale Vernetzung von NBPT geschlossen werden kann.

Die Vernetzung mittels VUV Quelle kann mit Hilfe von zwei wesentlichen Mechanismen erklärt werden. Zum einen durch direkte Wechselwirkung der Photonen mit dem SAM und durch Photonen induzierte niederenergetische Sekundärelektronen aus dem Substrat. Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl Primär als auch Sekundärelektronen zu einer Dehydrierung (Wasserstoff) durch DEA (Dissociative Electron Attachment) der Biphenyl Moleküle führen. [82] Die kinetische Energie der Photo- bzw. Sekundärelektronen ist limitiert durch die Energie der Photonen der VUV Quelle (He I 21.2eV). Dies ist somit ein sehr gutes Indiz das die Vernetzung von Biphenyl Molekülen durch die Photo- bzw. die Sekundärelektronen herbeigeführt wird.

Um diesen Mechanismus der VUV Bestrahlung genauer zu betrachten, sind für die XPS Spektren in Abbildung 20 die jeweilige Dosis bestimmt worden. Unter Berücksichtigung der bestrahlten Probenfläche und Sekundär-Elektronenausbeute konnte die Dosis mit 20mC cm^{-2} bestimmt werden. [77] Dies entspricht der gleichen Dosis die für direkte Bestrahlung mit 50eV Elektronen notwendig ist. Daraus lässt sich nun schlussfolgern, dass die Wechselwirkung mit niederenergetischen Elektronen herbeigeführt durch Photoemission für die Vernetzung von NBPT eine wichtige Rolle spielt. Somit ist jede UV Quelle die eine hohe Sekundärelektronen Ausbeute besitzt für die chemische Lithographie von Biphenyl SAMs geeignet. Insbesondere die sogenannte weiche Röntgenstrahlung bzw. EUV Strahlung (92.5 eV) sollte diese Bedingungen erfüllen.

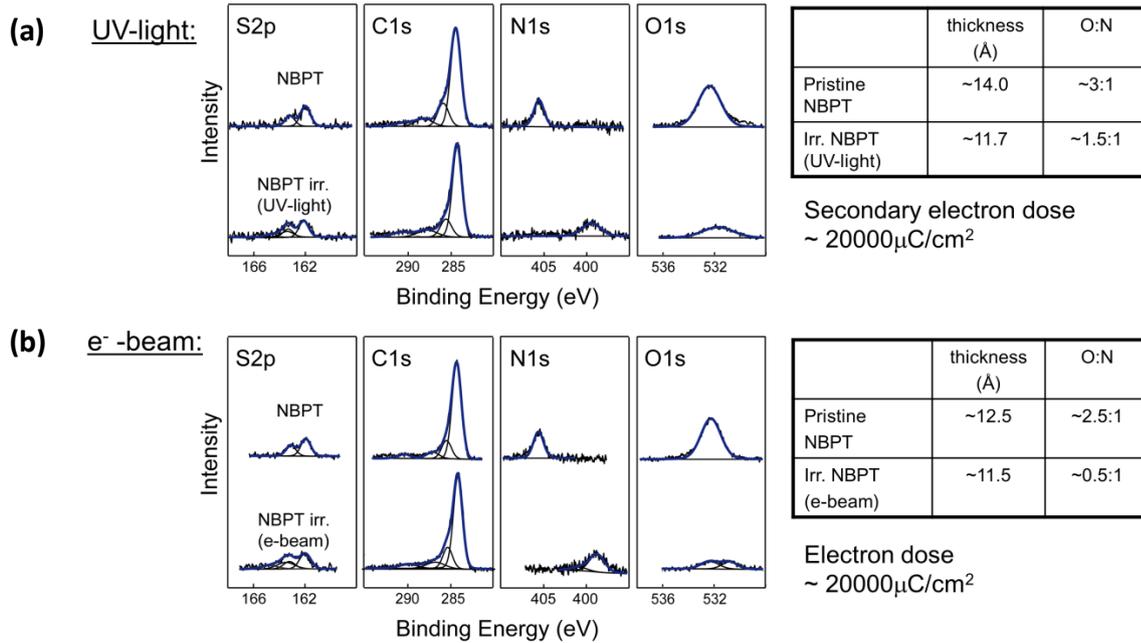


Abbildung 20: XPS Spektren für den Fall (a) vor und nach Vakuum UV (He I, 21.2eV) Bestrahlung einer NBPT SAM (entnommen aus [77]) und (b) vor und nach Vernetzung der NBPT SAM mittels Elektronen (entnommen aus [9])

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Proben mittels VUV und EUV bestrahlt und mit XPS im Detail charakterisiert. Besonders die Umwandlung von Nitro zu Amino wurde hierbei untersucht. Sodass hieraus eine Dosiskalibrierung für die zukünftigen EUV Bestrahlungen gewonnen wurde. In Abbildung 21 sind die N1s Daten als Verhältnis von Nitro zu Amino Gruppen gegen die Dosis sowohl für VUV (Quadrate) und EUV (Punkte) aufgetragen. Des Weiteren ist ein Inset hinzugefügt, der zusätzlich verdeutlicht, dass ab einer Dosis von 10mC cm⁻² die Umwandlung von einer Nitro zu Amino Gruppe fast vollständig ist. Dies ist insofern von besonderer Bedeutung, da es ein Maß für die Güte bzw. Vernetzungsgrad einer NBPT SAM ist. Zum Vergleich ist die notwendige Dosis zu einem Standard EUV Resist wie z.B. PMMA (Polymethylmethacrylate) um den Faktor 200-mal größer.

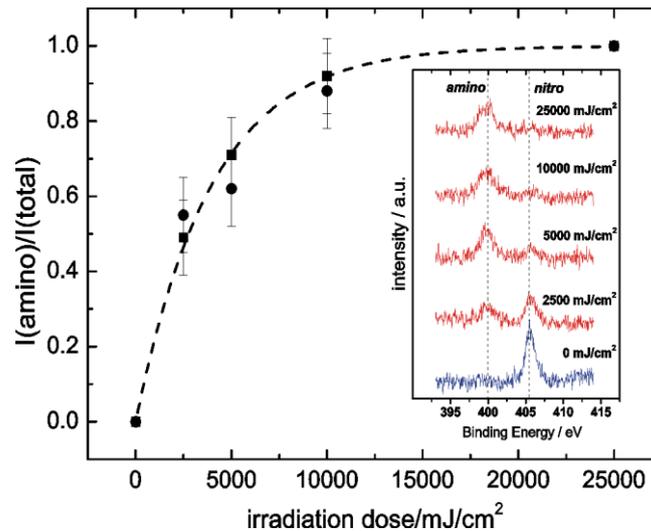


Abbildung 21: Verhältnis der Nitro zu Amino Gruppen aufgetragen als Funktion der EUV Strahlendosis. Das Inset zeigt die entsprechenden N1s XPS Spektren [9]

Mit Hilfe dieser Kalibrierung sind verschiedene Masken mit unterschiedlichen Strukturgrößen hergestellt worden. Anschließend erfolgte eine Charakterisierung im Detail mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops. In Abbildung 22 ist eine Auswahl von AFM Aufnahmen (Kontakt Modus) mit Linien und Punktmuster mit unterschiedlichen Perioden zusammengestellt. Die Bilder zeigen jeweils eine topographische und eine Lateralkraft Aufnahme (v.l.) für Masken mit unterschiedlichen Perioden von (a) 200nm, (b) 400nm, (c) 500nm, (d) 1000nm, (e) 1000nm bis (f) 2000nm. Die Linienstrukturen sind hierbei durch Zweistrahl Interferenz (a), (c), (e) und die Punktmuster durch Vierstrahl Interferenz (b), (d), (f) erzeugt worden. Die Aufnahmen zeigen jeweils ein Amino / Nitro Kontrast einer NBPT SAM auf Goldsubstrat, der sowohl in der Topographie als auch im chemischen Kontrast eindeutig sichtbar wird. Die Auswahl in dieser Galerie zeigt sehr deutlich homogene periodische Strukturen, die auf der jeweiligen Probe an beliebiger Stelle reproduzierbar sind.

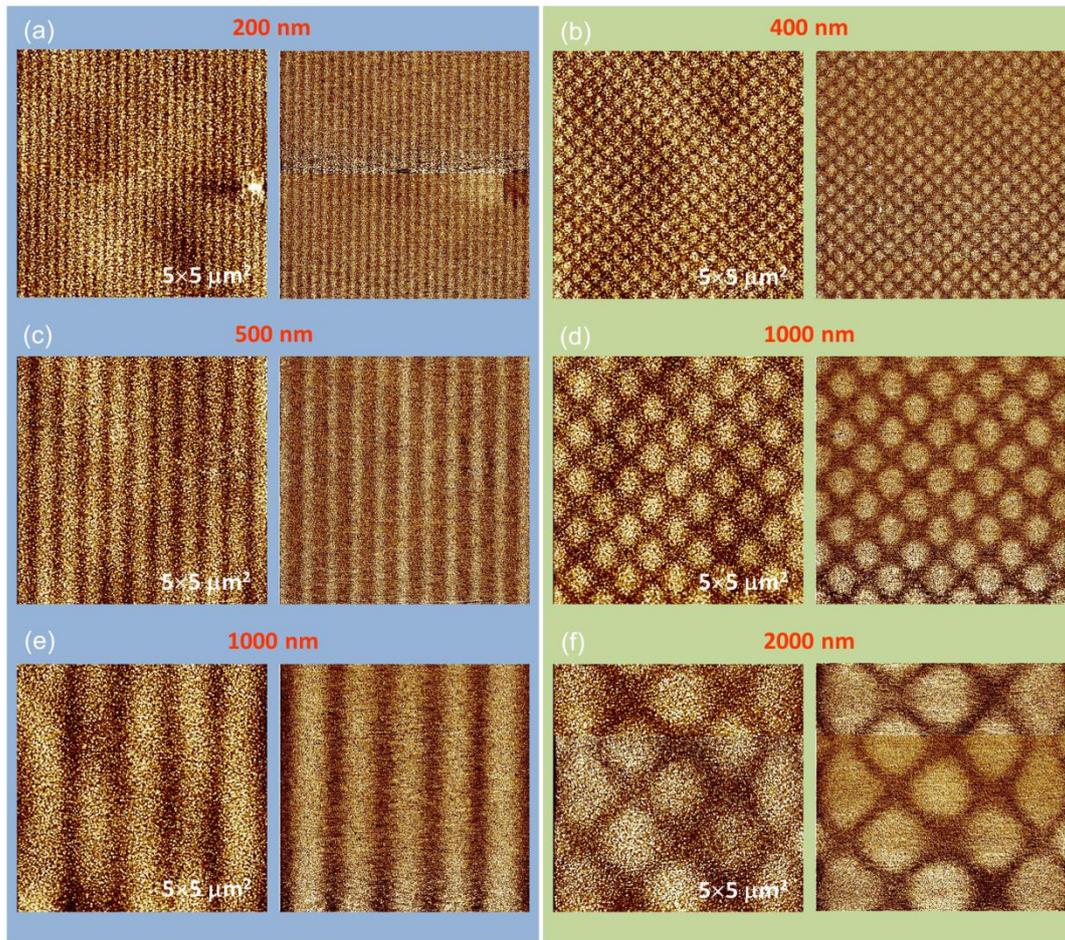


Abbildung 22: Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop einer NBPT Goldoberfläche mit sichtbaren Nitro / Amino Kontrast.

In der Abbildung 23 ist in (a) eine AFM Aufnahme einer NBPT Probe auf $\text{Au}_{0.8}\text{Pd}_{0.2}$ / Si Substrat dargestellt mit einem Linienmuster der Periode 60nm. D.h. die Linienbreite beträgt 30nm. Jedoch sind die Linien aufgrund der Rauigkeit des Substrates nicht wirklich gut aufgelöst und erst in der entsprechenden (b) Fast Fourier Transformation ist die Periodizität anhand der zwei Punktreflexe ersichtlich. Wohingegen die Struktur in Abbildung 23 (c) auf einer anderen Probe, welche mit einer Maske der Periode 100nm hergestellt wurde, die periodische Linienmuster mit der Breite 50nm noch eindeutig sichtbar sind. D.h. für die weiteren Experimente liegt die Auflösungsgrenze unserer Proben bzw. verwendeten Substrate aktuell bei 30nm, was aber für die Herstellung bzw. Erprobung der Proteinchip Fabrikation im Folgenden nicht einschränkt. Denn die wesentliche Voraussetzung eines

großflächigen Templates mit hoher Auflösung und einer stabilen, homogenen und spezifisch funktionalen Oberfläche ist dennoch erfüllt.

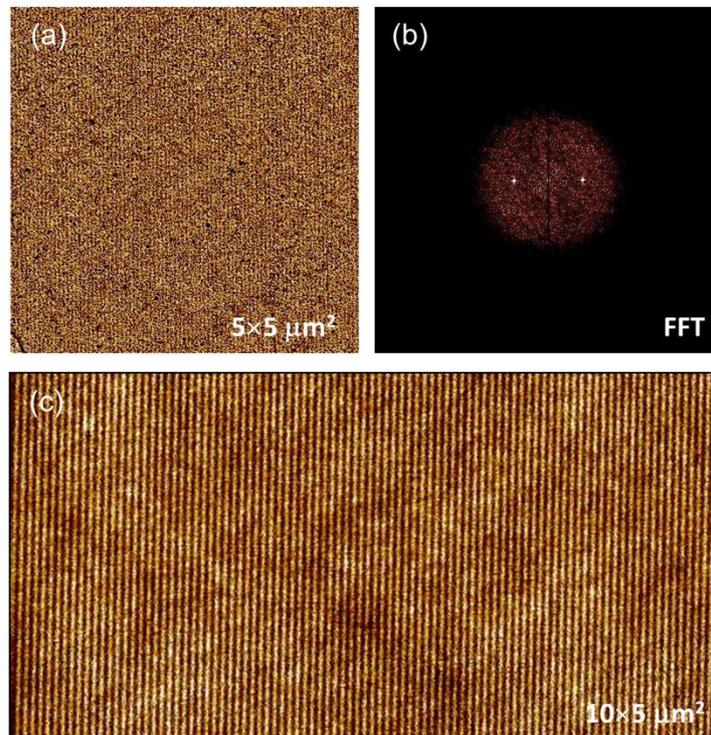


Abbildung 23: Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop einer NBPT Goldoberfläche mit sichtbaren Nitro / Amino Kontrast. (a) AFM Aufnahme einer NBPT Probe mit einem Linienmuster mit einer Breite von 30nm dargestellt und (b) der entsprechenden Fast Fourier Transformation, aus der die Periodizität von 60nm eindeutig ersichtlich wird. In (c) ist ein Ausschnitt dargestellt für ein Linienmuster der Periode 100nm, was einer Linienbreite von 50nm entspricht.

5.2 Biochips

5.2.1 Herstellung und Vorarbeiten

Wie bereits in der Einleitung erwähnt stellt die Untersuchung von Proteinen eine besondere Herausforderung an die Entwicklung von Biochips dar. Da Proteine insbesondere in vitro auf Substratoberflächen ihre Funktionalität verlieren können. Durch Anwendung des folgenden His-tag/Me²⁺ NTA-Chelator-Konzept soll ein Lösungsansatz aufgezeigt werden. Die Bindung durch Metallionen zwischen Proteinen und NTA gilt als chemisch schonend und die Proteinfunktionalität bleibt erhalten. Des Weiteren ermöglicht dieses Bindungspaar die

orientierte Ausrichtung der immobilisierten Proteine und eine dichte Packung. Durch die chemische Reversibilität können die Chelatoren wieder verwendet werden und liefern dadurch ein Modellsystem für einen vollständig reversiblen Biochip.

In Abbildung 5 ist die schematische Darstellung des Konzeptes der Immobilisierung über Metallionen Komplexe gezeigt. Durch Hinzufügen eines Metallionen werden Metall-Chelatkomplexe gebildet. An diese Komplexe werden His-tagged Proteine über den Metall Komplex angebunden und können entweder durch Hinzugabe von EDTA oder Imidazol wieder entfernt werden. [14]

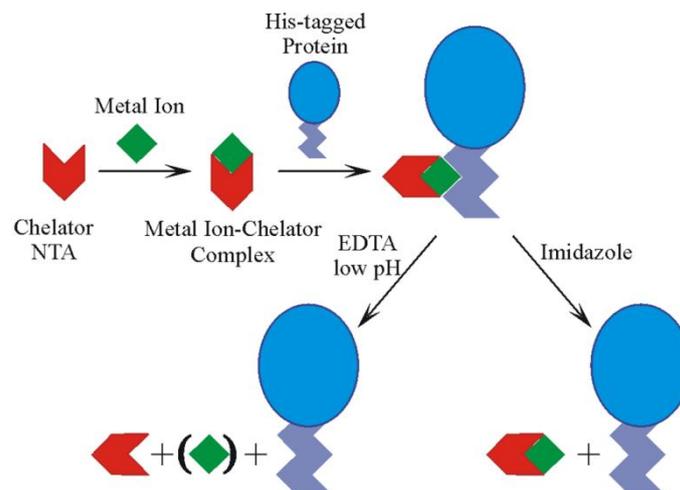


Abbildung 24: schematische Darstellung des Konzeptes der Immobilisierung über Metallionen Komplexe. Durch Hinzufügen eines Metallionen werden Metall-Chelatkomplexe gebildet. An diese Komplexe werden His-tagged Proteine über den Metall Komplex angebunden und können entweder durch Hinzugabe von EDTA oder Imidazol wieder entfernt werden. [14]

In Abbildung 25 ist ein Schema zur Herstellung von Biochips gezeigt. Nach Ausbildung einer NBPT SAM auf dem Goldsubstrat (i) wird mittels Elektron oder EUV Lithographie die Nitro Gruppe in Amino umgewandelt und die Moleküle werden gleichzeitig in den bestrahlten Bereichen vernetzt (ii). Danach werden die multivalenten NTA Moleküle mit Carboxy Funktionalität an den Amino Bereichen angekoppelt (iii). Da die NTA Gruppen noch durch tert-butyl Gruppen geschützt sind, wird in Schritt (iv) diese Gruppe durch Trifluoro acetic

acid (TFA) entfernt. In (v) werden dann die nicht vernetzten Bereiche durch eine proteinabweisende HS-C₁₆-EG₃-OH SAM [83] ausgetauscht, um eine unspezifische Ankopplung der Proteine in diesen Bereichen zu vermeiden. So dass nach Aufladen der angekoppelten NTA Chelatoren mittels Metallionen (Ni) hochaffine, spezifische, orientierte und reversible Immobilisierung von Proteinen mit Histidine-Markierung (Abbildung 26 (c)).

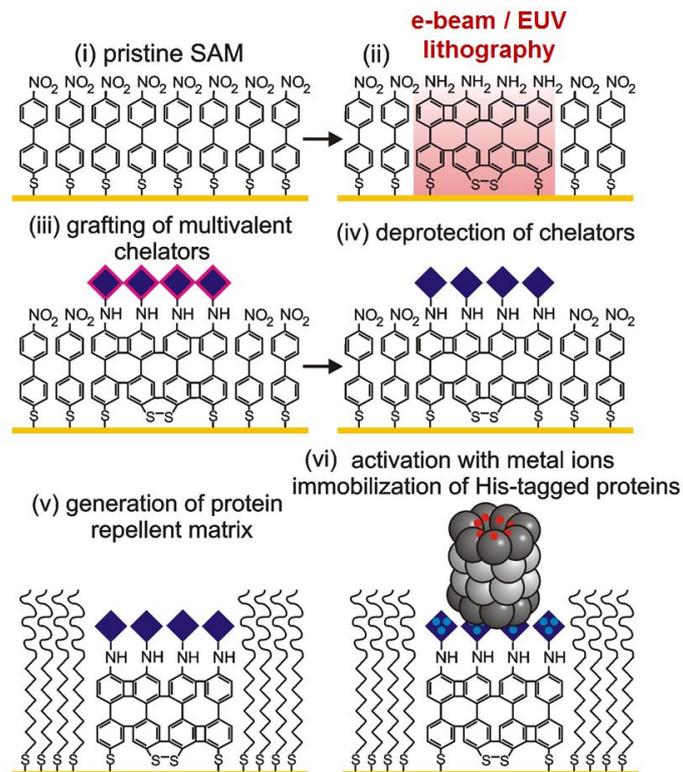
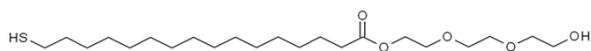


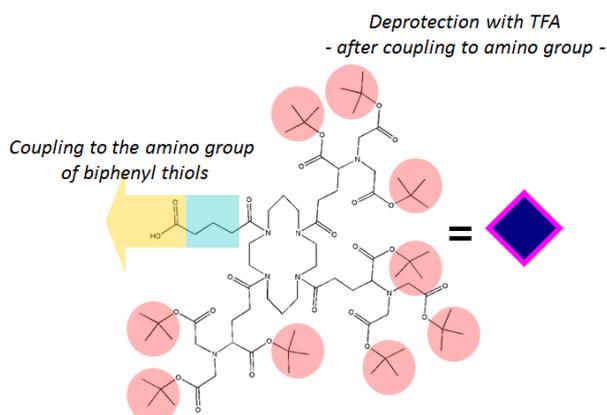
Abbildung 25: Schematische Darstellung zur Herstellung von Proteinchips aus der Lösung [9]

(a)

HS-C16-EG₃-OH

(b)

Multivalent chelators
tris-NTA carboxy derivative for coupling to amino functions



(c)

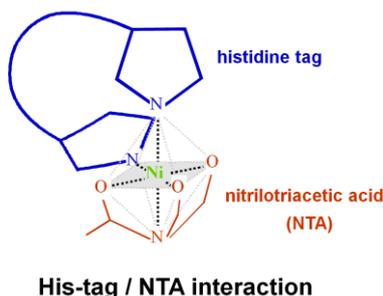


Abbildung 26: schematische Darstellung eines (a) tri-ethylen glycol Moleküls und (b) eines Multivalenten Chelatkomplexes mit drei NTA Funtionalitäten. Diese NTA Gruppen sind mit tert-butyl Schutzgruppen versehen. [9] (c) schematische Darstellung der His-Tag / NTA Wechselwirkung

5.2.2 Ankopplung mittels Carboxy NTA

Die Fabrikation mit Hilfe der Elektronen Lithographie eines Biochips mit μm Strukturen wurde im Detail untersucht und erfolgreich in der Veröffentlichung bzw. Dissertation von Ali Tinazli und Mohamed El-Desawy demonstriert. [15, 84]

Neu in dieser Arbeit ist die Verwendung von EUV Interferenz Lithographie, um großflächige Chipvorlagen in Nanometer Skala herzustellen. Hierzu wurden NBPT Proben auf $\text{Au}_{0,8}\text{Pd}_{0,2}/\text{Si}$

Substrat hergestellt. Die bis dato verwendeten Goldsubstrate weisen eine zu große Rauigkeit auf, um Strukturgrößen kleiner als 100nm im AFM aufzulösen.

In Abbildung 27 ist eine AFM Aufnahme einer NBPT / Au_{0,8}Pd_{0,2} / Si Probe dargestellt. Wie in (a) schematisch zusehen, ist in der Topographie und Lateralkraft Aufnahme jeweils der Nitro / Amino Kontrast abgebildet. Des Weiteren liefert das Höhenprofil zu der Topographie Aufnahme einen Höhenunterschied von 1 ± 0.1 nm. Dieser Höhenunterschied kann dadurch erklärt werden, dass die Messungen unter Umgebungsluft stattgefunden haben und somit bedingt durch die Luftfeuchtigkeit ein Wasserfilm an den Amino-Terminierten Bereichen gebildet hat. Des Weiteren ist wie bei den Elektronenbestrahlten SAM Proben ein Einfluss der unterschiedlichen elastischen Eigenschaften von vernetzten und nicht vernetzten Bereichen zu erwarten. [85]

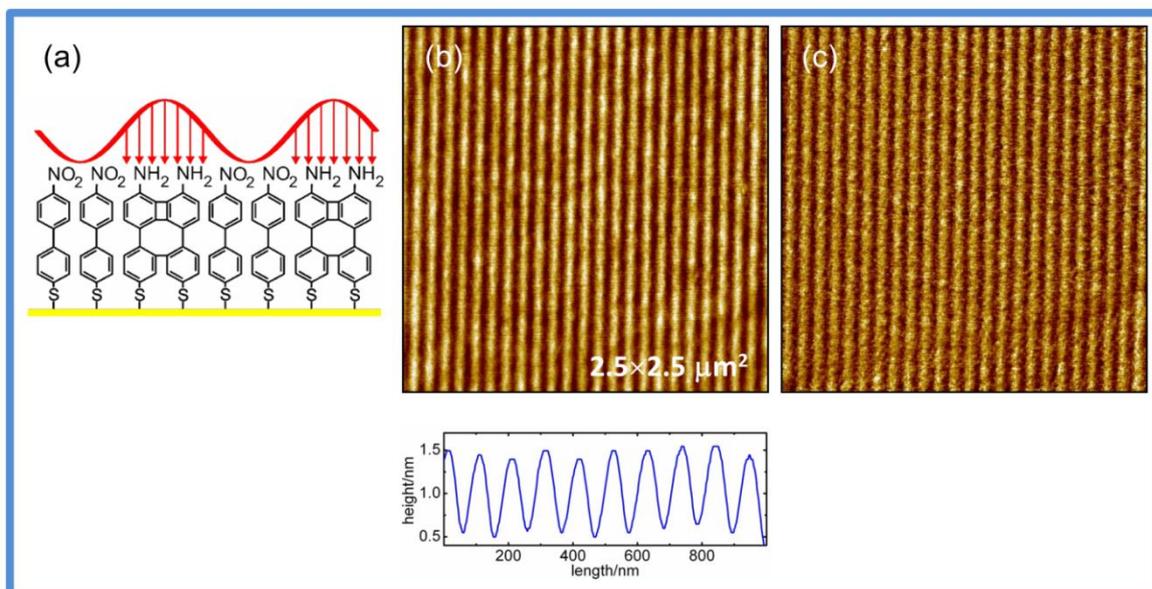


Abbildung 27. Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop einer NBPT Goldoberfläche mit sichtbaren Nitro / Amino Kontrast. (a) schematische Darstellung (b) Topographie Aufnahme mit 50nm breite Linien Struktur (Amino / Nitro Kontrast) und im darunter befindlichen Höhenprofil wird eine Höhendifferenz von ~1nm angezeigt (c) Analoge Aufnahme im lateralen Kraft Modus.

Nach Austausch der unvernetzten NBPT Bereiche mit PEG Molekülen zeigt sich im Kontrast der AFM Aufnahme in Abbildung 28 eine deutliche Änderung. So beträgt der

Höhenunterschied nun 1.5 ± 0.1 nm. Dieser Wert entspricht genau dem erwarteten Höhenunterschied zwischen dem vernetzten NBPT und PEG SAM. Des Weiteren ist auch eine Verbreiterung (FWHM = 69.8 ± 2.6 nm) der EG₃-OH Linien zu erkennen, welche vermutlich auf die Sinusoidale Verteilung der EUV Bestrahlung zurückzuführen sind und an den Linien-Randbereichen in einer abnehmenden Vernetzungsgrad resultieren.

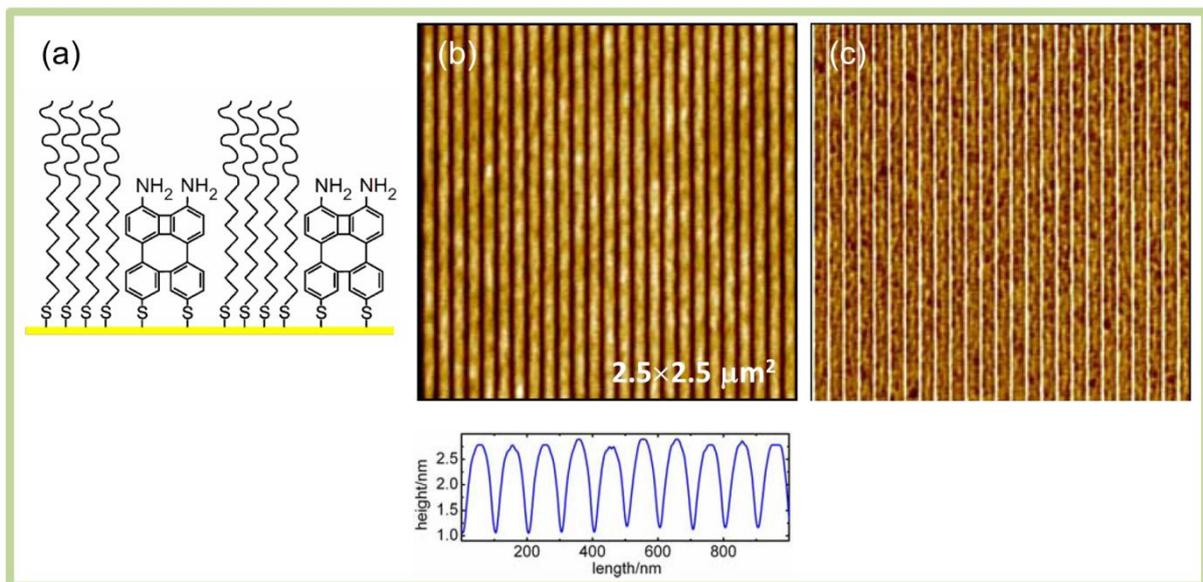


Abbildung 28: Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop einer NBPT / C16-EG3 Chipoberfläche. (a) schematische Darstellung **(b)** In der Topographie Aufnahme ist eine 50nm breite Linien Struktur (Amino / C16-EG3 Kontrast) sichtbar und eine erwartete Zunahme im Höhenprofil mit ~ 1.5 nm **(c)** entsprechende Phasen Kontrast Aufnahme

In Abbildung 29 ist ein $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ AFM Aufnahme der oben gezeigten Oberfläche nach Ankopplung von multivalenten Chelator-Komplexen und His-tagged Proteasom Proteinen gezeigt. Der hier verwendete AFM Spitzen-Kurvenradius lag im Bereich von 30nm und erschwerte die AFM Aufnahme. Dies zeigt sich insbesondere in (b) da nur ein Höhenunterschied von 2nm zu messen ist, obwohl der theoretische Wert für die Proteasom Proteine 15nm beträgt. Nachdem mittels der AFM Spitze eine höhere Kraft auf die Oberfläche ausgeübt worden ist, konnte ein Bereich freigekratzt werden und lieferte beim Herauszoomen die Abbildung (c). Ein entsprechendes Linienprofil zeigt nun einen

Höhenunterschied von 20nm, welcher qualitativ sehr gut mit der erwartenden Höhe des Proteins übereinstimmt.

Zum Vergleich ist in Abbildung 30 ein Biochip mit auf einem 500nm großer Punktstruktur dargestellt. Hierbei sind auch im Linienprofil ohne „Nanoshaving“ die zu erwartenden Höhenunterschiede von 15nm sichtbar.

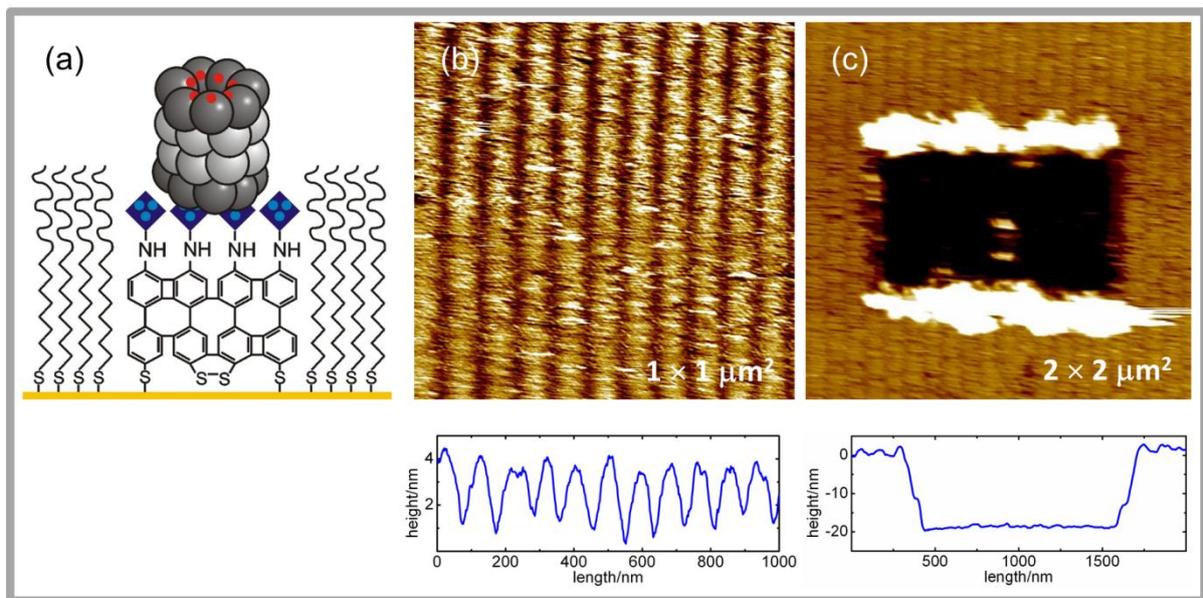


Abbildung 29: Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop einer Proteinchipoberfläche mit funktionalen Nanoarrays von His6-Proteasome Komplexen. (a) schematische Darstellung (b) 50nm breite Linien Struktur sichtbar, Höhenprofil entspricht nicht dem erwarteten Wert (c) Gleiche Probe nach Freikratzen mit AFM Spitze zeigt nun die erwartete Höhe von 15nm für das Proteasom Protein.

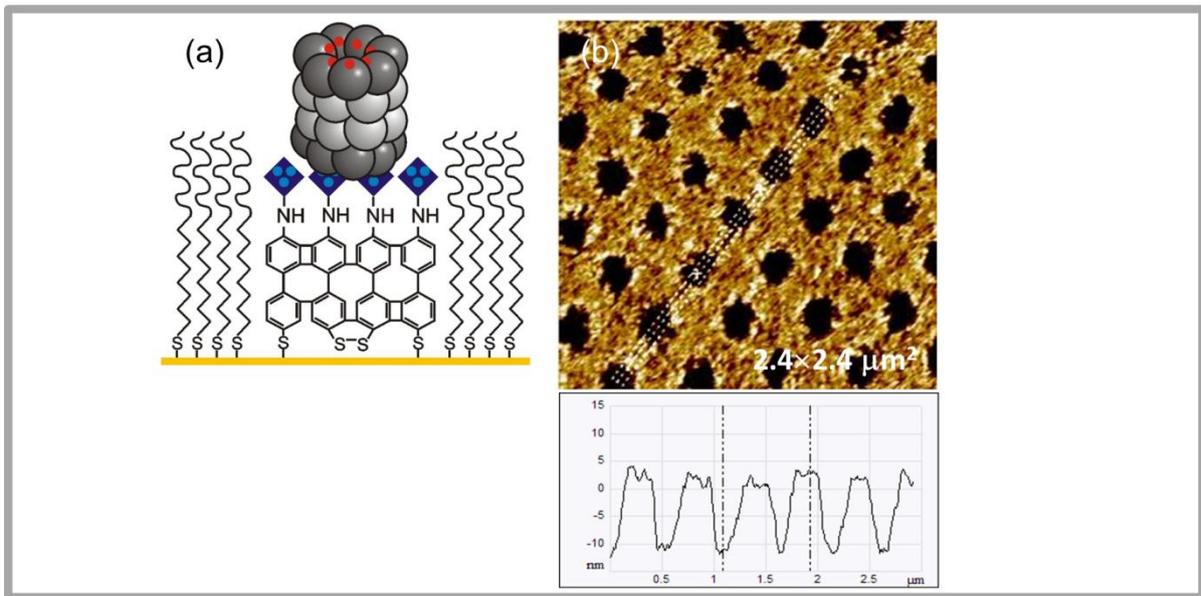


Abbildung 30: Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop einer Proteinchipoberfläche mit funktionalen Nanoarrays von His6-Proteasome Komplexen. (a) schematische Darstellung (b) 500nm große Punktstruktur sichtbar, Höhenprofil entspricht der Größe des Proteasom Proteins mit 15nm

5.2.3 Effizientere NTA Ankopplung auf Amino terminierten SAM Oberflächen mittels „Maleyl NHS und multivalenten-NTA Thiol“

Bei den oben gezeigten Untersuchungen zeigte sich jedoch dass nicht jede Ankopplung über Carboxy-tris-NTA auf unseren amino-terminierten Oberflächen zufriedenstellende Ergebnisse lieferte. Insbesondere bei Untersuchungen mittels Oberflächenresonanz Spektroskopie (Abbildung 34) zeigt sich eine deutliche geringere Proteinbindungskapazität (DIC / trisNTA-COOH) verglichen mit einem reinen multivalenten NTA SAM (5mol% bisNTA SAM) als Referenzprobe. Dies lässt sich vermutlich durch eine geringere Packungsdichte der NTA Moleküle auf der Oberfläche erklären. Daher wurden in Kooperation mit Helge Großmann systematisch weitere Ankopplungsmethoden für die NTA-Chelatoren auf amino-terminierten Oberflächen der elektronenvernetzten Nitrobiphenyl-SAMs untersucht. Mit dem Ziel, die Oberflächenanbindung der NTA-Moleküle weiter zu verbessern.

Die bis zu diesem Zeitpunkt verwendete Ankopplung der trisNTA an die Amino terminierten Oberflächen geschieht über freie Carboxylgruppen. Daher sind die Carboxylgruppen der NTA

Gruppen mit einer Schutzgruppe versehen, damit sie nicht an der Kopplungsreaktion teilnehmen können. Nach der Ankopplung wurden diese Schutzgruppen schließlich unter stark sauren Bedingungen abgespalten. Was unter Umständen auch zu Schäden an unseren NBPT SAM führen kann.

Eine andere Methode die hier vorgestellt wird basiert auf der Reaktion von Maleimiden mit NTA-Thiol Molekülen. Die Idee hierbei ist nun die Aminogruppen der strukturierten Oberfläche mit Maleimid Derivaten zu funktionalisieren, um an diese Derivate anschließend trisNTA Moleküle mit einer Thiol Kopfgruppe anzubinden. Der große Vorteil dieser Methode ist vor allem, dass auf den Entschützungsprozess verzichtet werden kann, da die Carboxylgruppen der NTAs somit an der Kopplungsreaktion nicht teilnehmen können. Denn es sollten keine freien Aminogruppen wegen der Sättigung mit Maleimid bzw. „Maleoyl-NHS“ mehr vorhanden sein.

Mit Hilfe der XPS Spektroskopie ist es leider nicht möglich wie bei SPR die Immobilisierung der Proteine selber nachzuweisen. Jedoch geben die XPS Daten Hinweise, dass die neue Methode NTA über das „Maleoyl-NHS“ Molekül, wie in Abbildung 31 schematisch repräsentiert, erfolgreich anzukoppeln. So sind in Abbildung 32 die XPS-Spektren vor und nach der Ankopplung mittels Maleoyl-NHS gezeigt. Dabei zeigen sich deutliche Veränderungen in den N1s, C1s und O1s Signalen, die sich nur durch die erfolgreiche Ankopplung des trisNTA-SH erklären lassen. Aus der Abschwächung des Au 4f_{7/2} Signals bei einer Bindungsenergie von 84 eV wurde jeweils die Schichtdicke bestimmt. Dabei beträgt die Schichtdicke der bestrahlten NBPT SAM $11 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ und nach der Ankopplung der NTA Derivate $16 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$. Eine mögliche Erklärung für die sehr kleine Schichtdickenänderung ist die sterische Hinderung der verzweigten trisNTA-Thiole, wodurch keine vollständige Monolage zu erwarten ist. Um die erfolgreiche Ankopplung von NTA-Derivaten dennoch mit

Hilfe von XPS weiter zu überprüfen, wurden die NTAs mit Nickel Metallionen aufgeladen. In dem entsprechenden XPS Spektrum in Abbildung 33 ist bei einer Bindungsenergie von 856eV auch ein Signal für Ni 2p zu erkennen. Was also ebenfalls die erfolgreiche Ankopplung unterstützt.

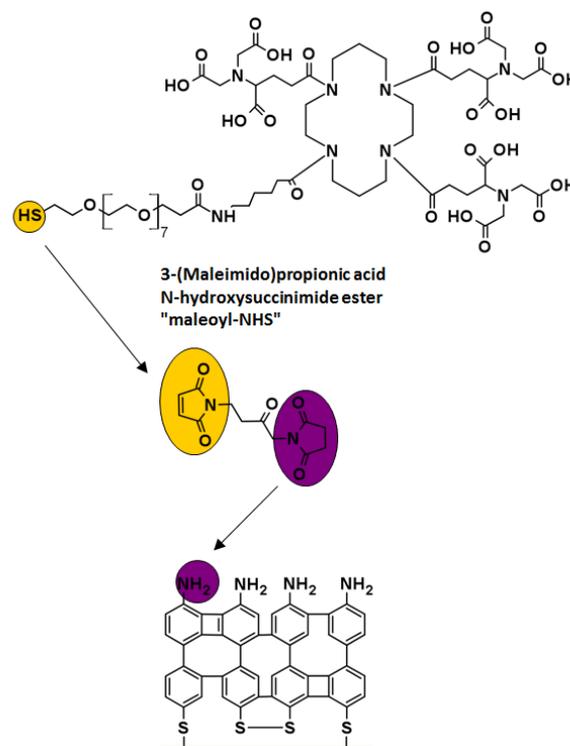


Abbildung 31: schematische Darstellung der Ankopplung von trisNTA mittels „Maleoyl-NHS“

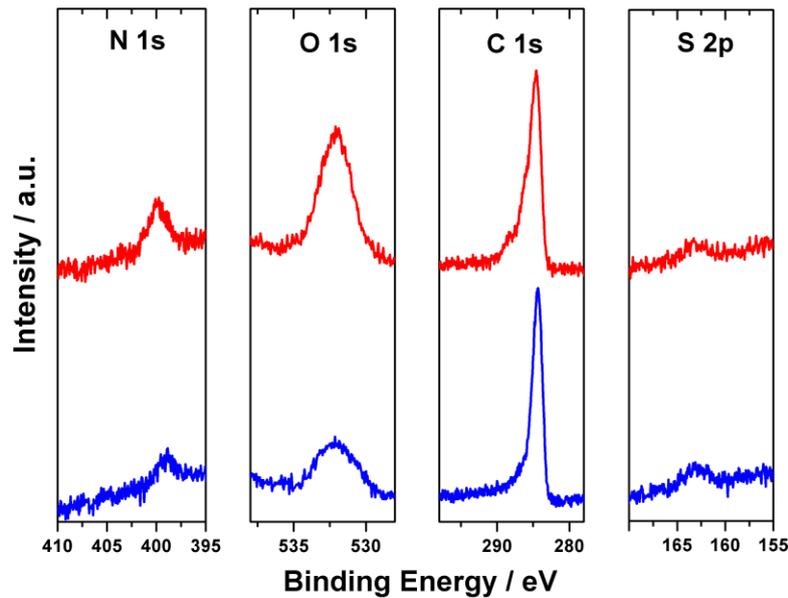


Abbildung 32: Röntgenphotoelektronenspektroskopische Untersuchung einer Probe vor (blaue Linie) und nach der Ankopplung (rote Linie) von tris-NTA mittels Maleyol-NHS. Ein Vergleich der beiden Spektren zeigt die erfolgreiche Ankopplung, es sind deutliche Veränderungen in den N1s, O1s und C1s Signalen sichtbar.

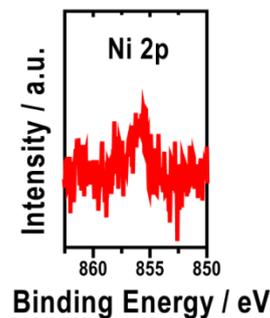


Abbildung 33: Röntgenphotoelektronenspektroskopische Untersuchung einer Probe nach der Ankopplung von tris-NTA-SH mittels Maleyol-NHS und zusätzlicher Aufladung der NTA-Derivate mit Nickel Metall-Ionen.

In Abbildung 34 ist die Oberflächen Plasmon Resonanz-Analyse (SPR) von unterschiedlich funktionalisierten multivalenten NTA Oberflächen in einem Sensogramm dargestellt. Nach Ankopplung der NTAs die Proben wurden und eine mittels SPR Spektrometer analysiert. Die Probenoberfläche wurde nach Hinzugabe einer Lösung mit 300nM his-tagged „Maltose Binding Protein“ (MBP_{H10}) untersucht, der schraffierte Bereich entspricht dem Zeitraum der Proteinzugabe. Hierbei ist vor allem der Intensitätsunterschied vor und nach der Hinzugabe der Proteine ein Maß für die Proteinbindekapazität. Somit würde z.B. eine

Proteinabweisende Schicht nach Unterbrechung der Proteinzufuhr wieder auf den Ursprungswert absinken. In dem Sensogramm fällt besonders bei dem Vergleich der bisNTA-SAM Oberfläche als Referenzprobe (grüne Linie) und der bisherigen trisNTA-COOH (Carboxy) Ankopplungsmethode (rote Linie) auf, dass die Proteinbindekapazität sich deutlich unterscheidet und im Falle trisNTA-COOH schlechter ist. Beim Vergleich der Probe mit der neuen Ankopplungschemie über „Maleoyl-NHS“-Ester und der bisNTA Referenzprobe zeigt sich hingegen kein Unterschied mehr und verfügt somit über eine gleich große Proteinbindekapazität.

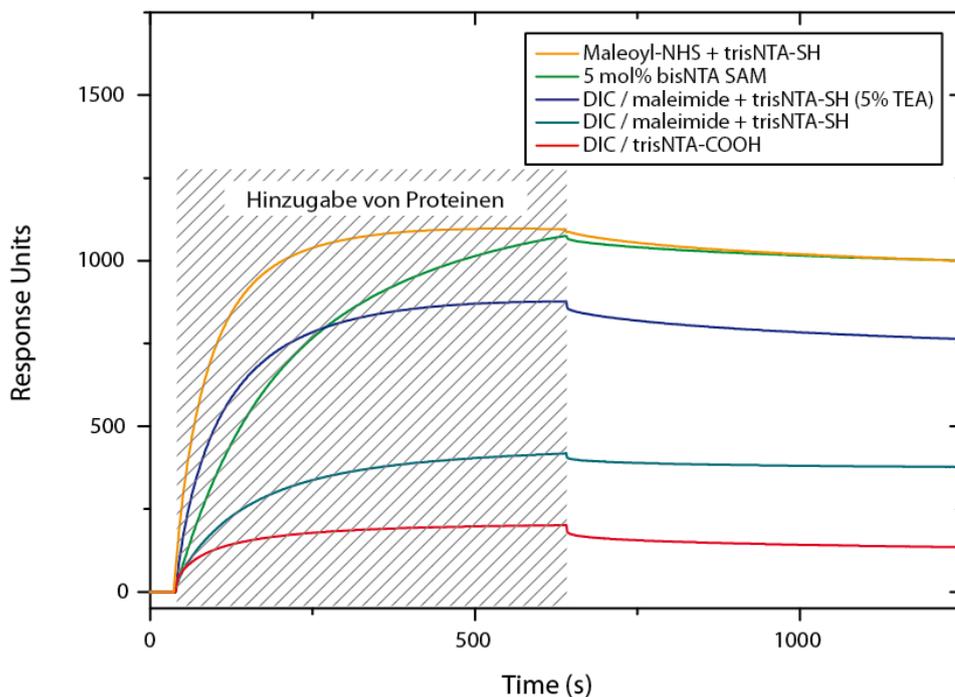


Abbildung 34: Oberflächen Plasmon Resonanz-Analyse (SPR) von multivalenten NTA funktionalisierten Oberflächen. Nach Ankopplung der NTAs die Proben wurden und eine bisNTA-SAM Oberfläche als Referenzprobe mittels SPR Spektrometer analysiert. Die Probenoberfläche wurde nach Hinzugabe einer Lösung mit 300nM his-tagged „Maltose Binding Protein“ (MBP_{H10}) untersucht, der schraffierte Bereich entspricht dem Zeitraum der Proteinzugabe. Die Zunahme in der Intensität ist hierbei ein Maß für die Proteinbindekapazität. Die Signale für die Kopplungsmethode mit Carboxy (COOH) sind im Vergleich zu der Referenzprobe deutlich kleiner. Während die Probe mit der neuen Ankopplungs-Chemie über „Maleoyl-NHS“-Ester eine vergleichbare Proteinbindekapazität wie die Referenzprobe aufweist.

Um die die Ankopplung bzw. die Funktionalisierung mittels strukturierter Proben in der Praxis zu demonstrieren wurden die Proben mittels Fluoreszenz Mikroskopie untersucht. In Abbildung 35 (b) ist eine entsprechende Fluoreszenzspektroskopie-Aufnahme während der Hinzugabe von 100nM MBPHis₁₀-OG488 Proteinen auf einer mit 1µm Punktmuster Elektronen strukturierte Probe dargestellt. Hierbei entspricht die Fluoreszenz bzw. der Kontrast von hellen und dunklen Bereichen den strukturierten funktionalisierten bzw. Proteinabweisenden Oberflächen und demonstriert die erfolgreiche Ankopplung.

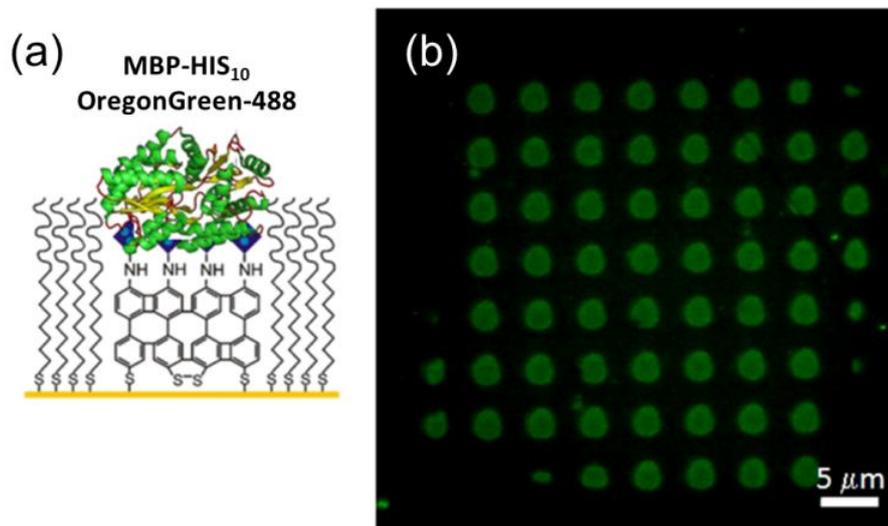


Abbildung 35: (a) schematische Darstellung (b) Fluoreszenzspektroskopie-Aufnahme während der Hinzugabe von 100nM MBPHis₁₀-OG488 Proteinen auf einer mit 1µm Punktmuster Elektronen strukturierte Probe

Wobei wir des Weiteren festgestellt haben, dass auch die Reihenfolge der Ankopplung eine entscheidende Rolle spielt. Die Aufnahmen in der Abbildung 36 zeigen den Einfluss sehr deutlich durch eine starke Veränderung der Kontrastverhältnisse. So wurde in (a) die umgekehrte Reihenfolge zu der Standardpräparation in (b) durchgeführt. D.h. in (a) wurde zuerst der Austausch der OEG Moleküle und dann die Ankopplung durchgeführt. So dass vermutlich bei der späteren Ankopplung der NTA Thiol Derivate ebenfalls ein Austausch mit den Proteinresistenten OEG Bereichen stattgefunden hat. Als Resultat zeigt sich eine Invertierung im Kontrast der Fluoreszenzaufnahme.

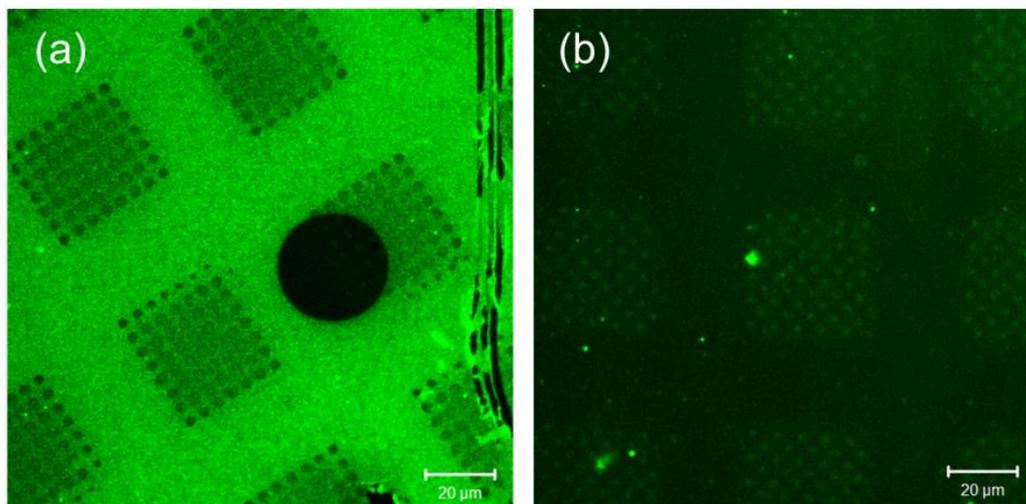


Abbildung 36: (a) umgekehrte Präparation Reihenfolge führt zu invertierten Kontrast im Vergleich zu Standardankopplung in (b)

Ebenso haben wir auch die Auswirkung von den zur Ankopplung notwendigen „Maleyl-NHS“ Molekül untersucht und mit einer drei Monate alten Charge (a) und einer neuen Charge (b) CLSM-Aufnahmen in Abbildung 37 erstellt. Das Resultat hier ist ein deutliche Abnahme im Kontrast, dennoch zeigen auch die Probe mit der alten Charge das die Eigenschaften der funktionalisierten Oberflächen im Prinzip erhalten bleiben.

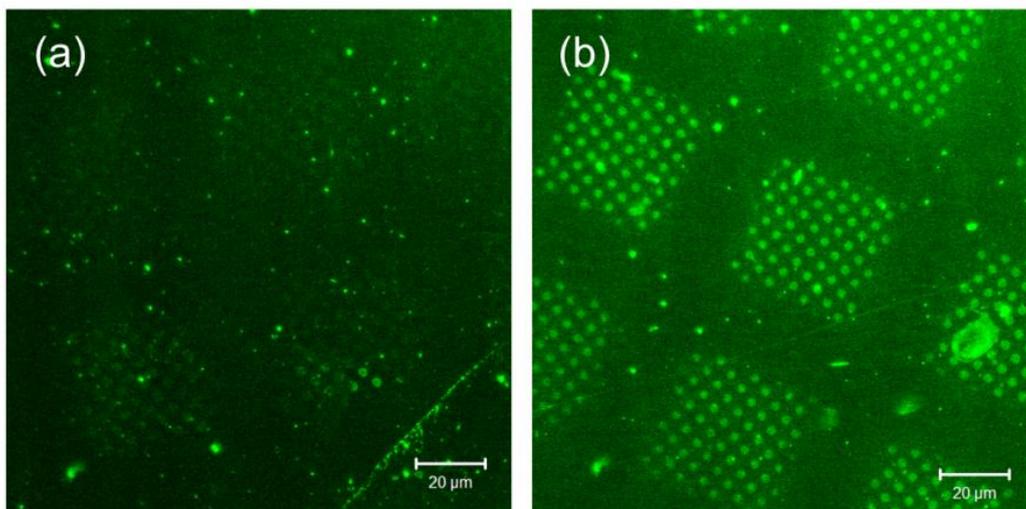


Abbildung 37: Auch das Alter der verwendeten „Maleyl-NHS“ Moleküle ist entscheidend (a) mit drei Monat alter Molekül-Charge und zum Vergleich Ankopplung mit (b) neuer Molekül-Charge

5.2.4 Ankopplung von Polyethylenglykol-Thiol SAM

Eine weitere Idee die durch die vorangegangenen Experimente getestet wurde ist die Ankopplung von Polyethylenglykol-Thiol (PEG-SH) bzw. Oligoethylenglykol-Thiol (OEG) Molekülen. Durch die Verwendung der Nitrobiphenyl Moleküle als Unterlage für eine PEGylierten (proteinabweisende) Oberfläche könnte eine Möglichkeit bieten stabilere PEG SAMs zu präparieren. Bis dato ist bekannt, dass PEG Oberflächen auf Gold nach einiger Zeit (~ zwei Wochen) unter normalen Raumbedingungen degradieren. Dies wird in der Literatur auf die Möglichkeit der Oxidation der Thiol-Gold Bindung zurückgeführt [86]. Somit ist die Verwendung von OEG in Proteinchips zeitlich limitiert und erschwert praktische Anwendungen von OEG-SAMs z.B. als Prävention in der Marine gegen biologische Fouling

(biofouling) bzw. Algenansiedlung [87]. Somit könnte der Ansatz eine NBPT Monolage als Bindeglied zwischen anorganischen und organischen Oberfläche zu verwenden, dies eventuell mindern. Denn der Vorteil einer NBPT SAM liegt darin, dass der SAM mechanisch [88] und thermisch [50] sehr stabil ist.

Hierzu wurden analog zu den vorangegangenen Experimenten die SAM-Monolagen an der Universität Bielefeld vorbereitet und die Ankopplung erfolgte wiederum an der Universität Frankfurt. In Abbildung 38 a) ist eine schematische Darstellung einer so hergestellten PEGylierten Oberfläche zu sehen und in der Abbildung 38 b) das hier verwendete PEG5000-SH Molekül. Aus der Abbildung 40 wird anhand der XP-Spektren die deutliche Veränderung in dem C1s und O1s Signal sichtbar. Diese Änderung und die Veränderung der Schichtdicke weist eindeutig auf eine erfolgreiche Ankopplung hin. Jedoch lassen sich aus den XPS Daten keine Rückschlüsse auf die proteinabweisenden Eigenschaften gewinnen. Daher wurden die so hergestellten Proben auch mittels Oberflächenresonanz Spektroskopie (SPR) untersucht. Ein solches SPR-Sensogramm in Abbildung 39 zeigt die Daten von vier gleich präparierten Proben. Bei Hinzugabe von BSA-Proteinen ist in dem Sensogramm ein sprunghafter Anstieg zu sehen, der jedoch wieder auf den ursprünglichen Wert zurückgeht, sobald die Proteinzufuhr unterbrochen wird. Dieses Verhalten entspricht einer proteinabweisenden Oberfläche und demonstriert ebenfalls erfolgreich die neue Ankopplungschemie.

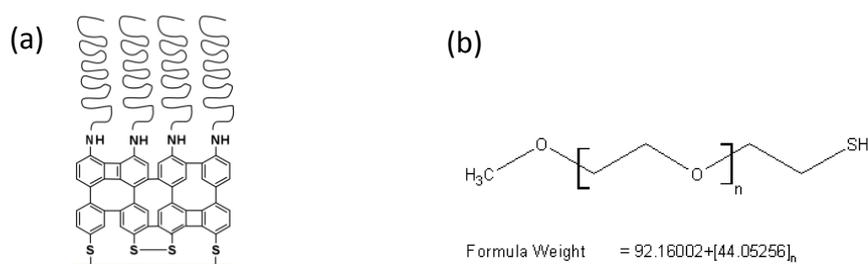


Abbildung 38: Schematische Darstellung von (a) PEG-5000 Ankopplung an NBPT / Maleoyl-NHS Oberfläche (b) PEG 5000-SH Molekül

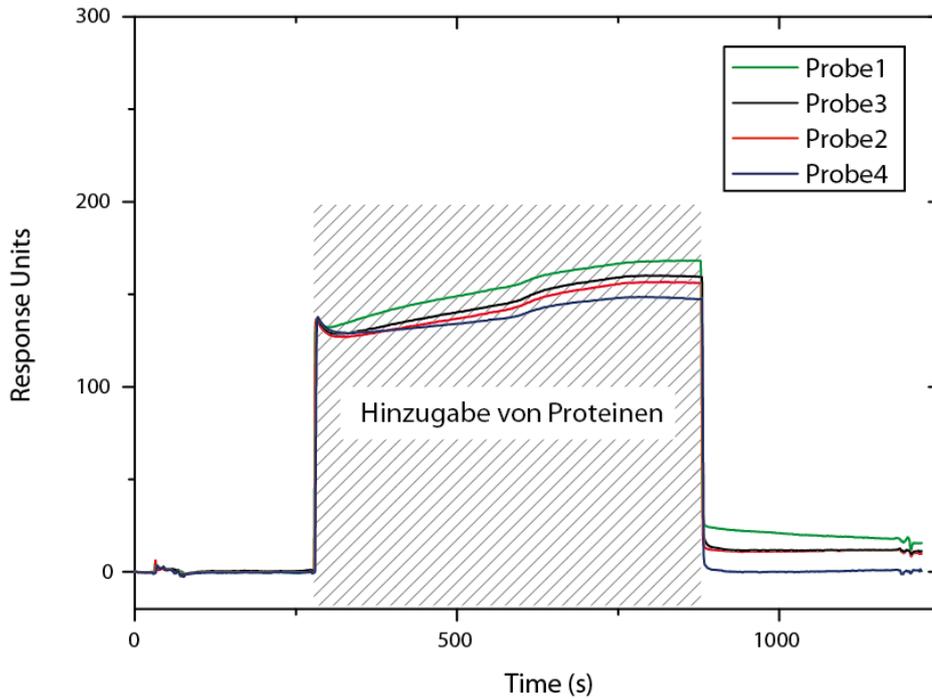


Abbildung 39: Oberflächenresonanz (SPR) Sensogramm unterschiedlicher PEG5000-NBPT Proben. Nach Zufuhr von BSA Proteinen zeigt das Spektrum einen sprunghaften Anstieg im Signal. Dies bleibt anschließend konstant bis die Proteinzufuhr unterbrochen wird und auf den Ausgangswert wieder abfällt. Die so hergestellten Proben zeigen somit proteinabweisende Eigenschaften.

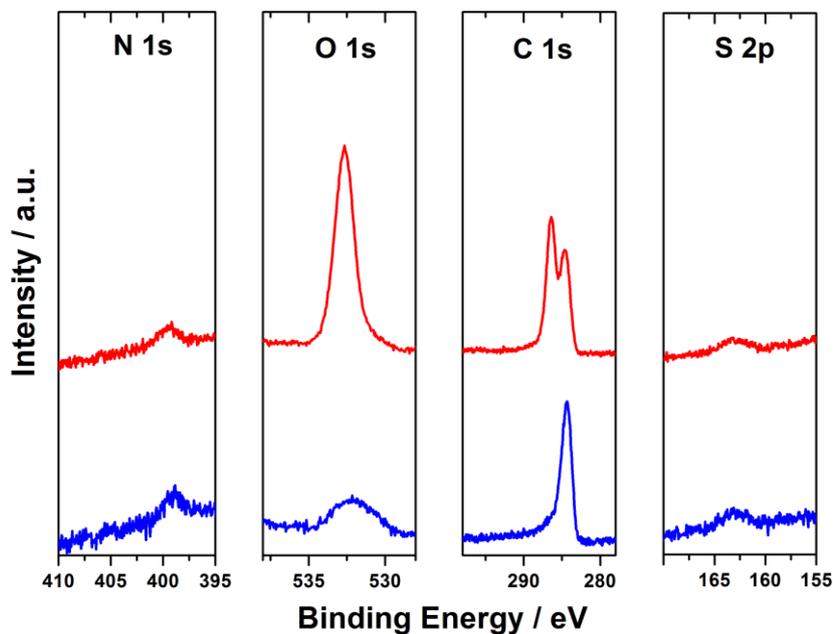


Abbildung 40: Röntgenphotoelektronenspektroskopische Untersuchung einer Probe vor (blaue Linie) und nach der Ankopplung (rote Linie) von PEG 5000 mittels Maleoyl-NHS. Ein Vergleich der beiden Spektren zeigt die erfolgreiche Ankopplung, aufgrund der deutlichen Veränderungen im O1s und C1s Signal.

5.2.5 Oligoethylenglykol (OEG) SAM

Bei der Untersuchung an reinen $C_{16}EG_3SH$ SAM Oberflächen zeigte sich bei XPS Untersuchungen, das in Abhängigkeit der Strahlendosis vor allem bei den Polyethylen und die Carboxylanteilen der hier verwendeten Oligoethylenglykol (OEG) SAMs Strahlenschäden nachweisen lassen. Da sich bei wiederholten XPS Messungen vor allem Änderungen im Kohlenstoffsignal bei den entsprechenden Bindungsenergien in Form einer Reduktion der Signalintensität zeigen und nur durch eine Schädigung der Moleküle erklärt werden kann. Um dies weiter systematisch zu untersuchen wurden die weiteren Experimente mit einer Elektronenquelle der Firma Kimball Physics ELG-2, deren Elektronenenergie und Dosis genau eingestellt bzw. variiert werden kann, durchgeführt.

Die Energieskala wurde dabei mit Hilfe des $Au\ 4f_{7/2}$ -Peaks bei 84.0eV kalibriert. Die Proben wurden mit der oben genannten Elektronenquelle bei einer Elektronenenergie von 5, 6, 7, 8, 10, 20 und 50 eV mit Dosen von 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 3 und 10 $mC\ cm^{-2}$ bestrahlt und anschließend mit den gleichen Messparametern spektroskopiert.

In Abbildung 41 (a) sind XPS Spektren für eine Elektronenenergie von 50 eV und in (c) eine schematische Darstellung des $C_{16}EG_3SH$ Moleküls gezeigt, wobei die spezifischen drei Kohlenstoffspezies C(I) Alkyl C(II) Carboxyl und C(III) Ethylenteil markiert wurden.

Beim Vergleich der O1s Signale sieht man mit zunehmender Dosis eine starke Abschwächung. Während die Signale im C1s Spektrum nur für den C(II) und C(III) Anteil deutlich abnehmen. Die Intensität für C(I) nimmt sogar zu, dies lässt darauf zurückschließen, dass besonders die PEG Moleküle mit der Carboxylgruppe bei der Bestrahlung kaputt gehen, während der C_{16} -Anteil erst bei sehr viel höheren Dosen ($>0.1mC\ cm^{-2}$) beschädigt wird. Dies zeigt sich besonders im C1s Signal des OEG SAM durch die Abnahme der Intensität jeweils

der Peaks von dem Polyethylen bei 286.9eV bzw. Carboxylanteil bei 289.2eV und den Erhaltung des Peaks des Alkylteils bei 285.0eV. Somit ergibt sich folgendes Schema in Abbildung 41 (b) für Elektroneninduzierte Stahlschäden der OEG SAMs. Ein ähnliches Bild zeigt sich analog auch bei anderen kinetischen Energien und Dosen wie in den XPS Spektren in Abbildung 42 für (a) 5eV, (b) 6eV, (c) 7eV und (d) 8eV sowie in Abbildung 43 für (a) 10eV und (b) 20eV zu sehen ist. D.h. es werden insbesondere zuerst die schwächeren Carboxylbindungen beschädigt, wodurch auch der Ethylenanteil abgespalten wird. Die effektive Schichtdicke eines intakten OEG SAM wurde über die Abschwächung des Au $4f_{7/2}$ -Signals bestimmt mit $26 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ und entspricht dem erwarteten Wert von 28.5 \AA für einen idealen OEG SAM mit Helix Konformation [9]. Nach Elektronenbeschuß mit einer Dosis von 0.2 mC cm^{-2} bei 50eV nahm die effektive Schichtdicke mit $16.6 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ laut XPS ab. Dieser Höhenunterschied ist somit ebenfalls ein starkes Indiz für die hauptsächliche Abspaltung des Polyethylen Anteils.

In Abbildung 44 sind XPS Daten nur für das Verhältnis von C (II) und C(I) der bestrahlten OEG Proben in Abhängigkeit der Dosis für verschiedene Energien aufgetragen. Hierbei wurde als „guide for the eye“ eine Linie durch die Messpunkte gelegt. Dabei fällt auf das die Beschädigung für den Ethylenglykol im Bereich von 5-7 eV kleinere Raten aufweist. Während für Energien größer als 7eV die Rate besonders stark ansteigt und bei 10-20 eV eine Sättigung ergibt.

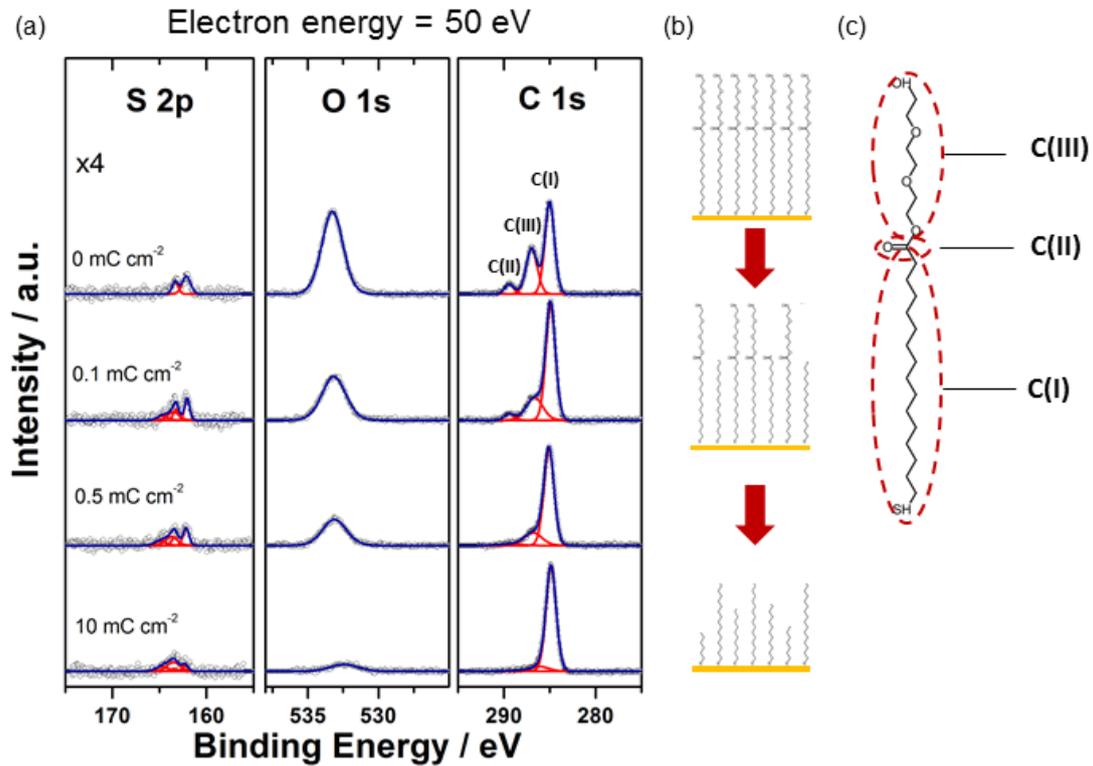


Abbildung 41: Schema und XPS Spektren zur Untersuchung von Strahlenschäden an OEG SAMs. a) XPS Spektrum für die Referenz und drei ausgewählte Proben mit unterschiedlicher Dosis bei 50eV b) schematische Darstellung von Elektronen / Photonen induzierter Strahlenschäden in Abhängigkeit der Dosis an OEG-SAM Oberflächen. c) schematische Darstellung des tri-ethylene glycol (HS-C₁₆-EG₃-OH) Moleküls mit der Kennzeichnung der spezifischen drei Kohlenstoffspezies C(I) Alkyl C(II) Carboxyl und C(III) Ethylenteil

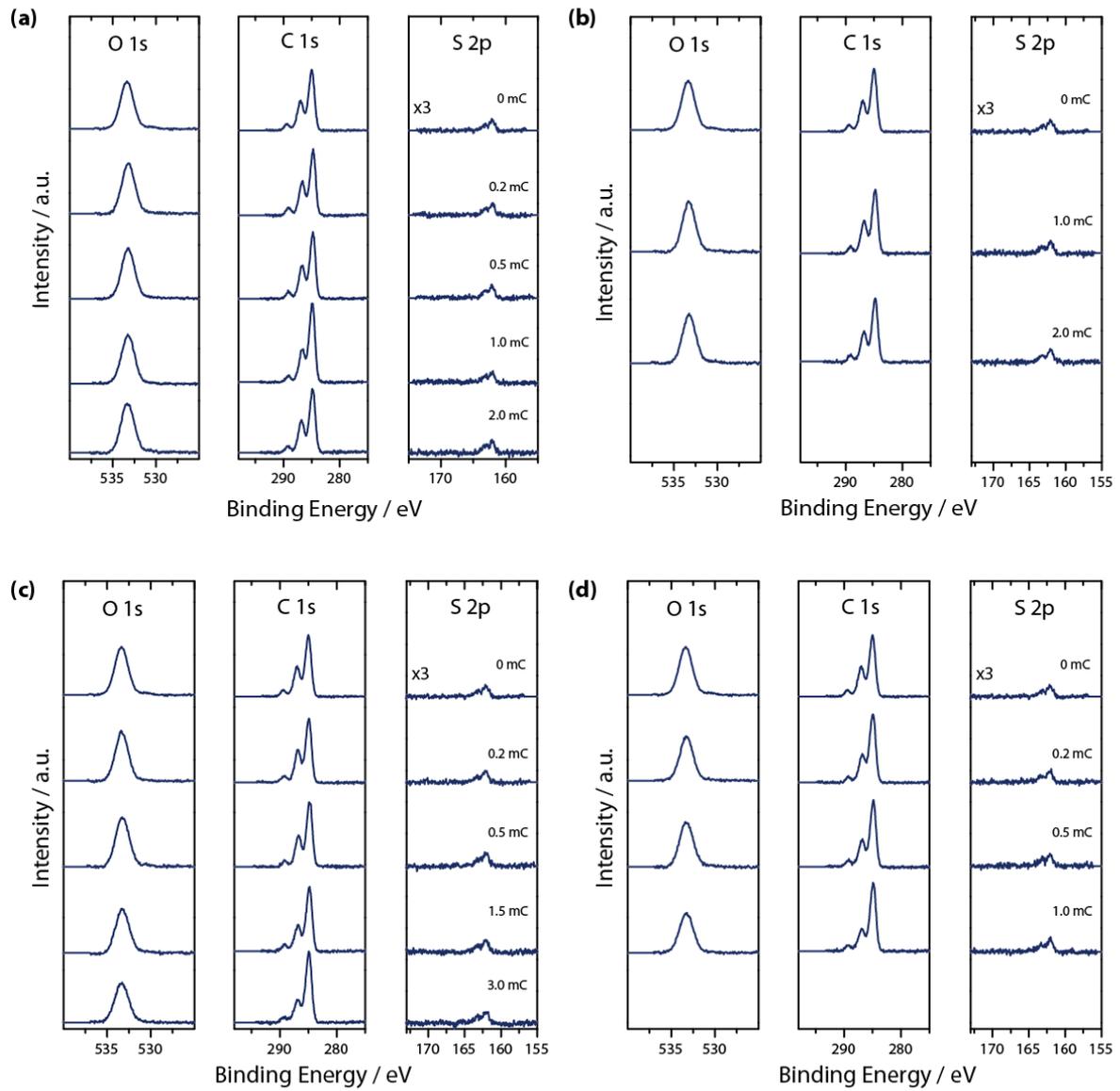


Abbildung 42: Schema und XPS Spektren zur Untersuchung von Strahlenschäden an OEG SAMs mit unterschiedlichen Dosen für die kinetischen Energien (a) 5 eV, (b) 6 eV, (c) 7 eV und (d) 8 eV

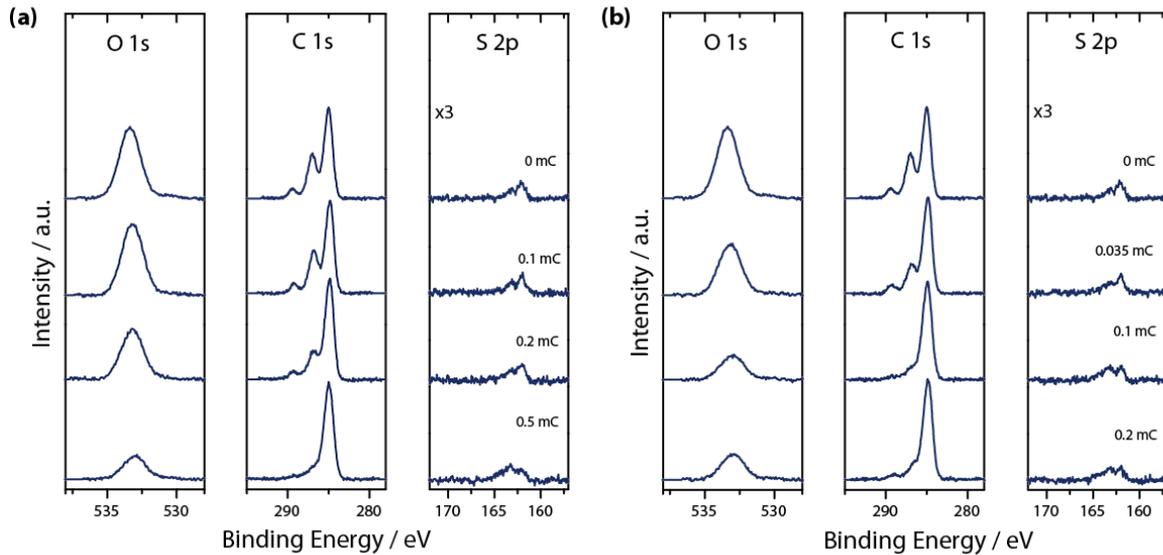


Abbildung 43: Schema und XPS Spektren zur Untersuchung von Strahlenschäden an OEG SAMs mit unterschiedlichen Dosen für die kinetischen Energien (a) 10 eV und (b) 20 eV

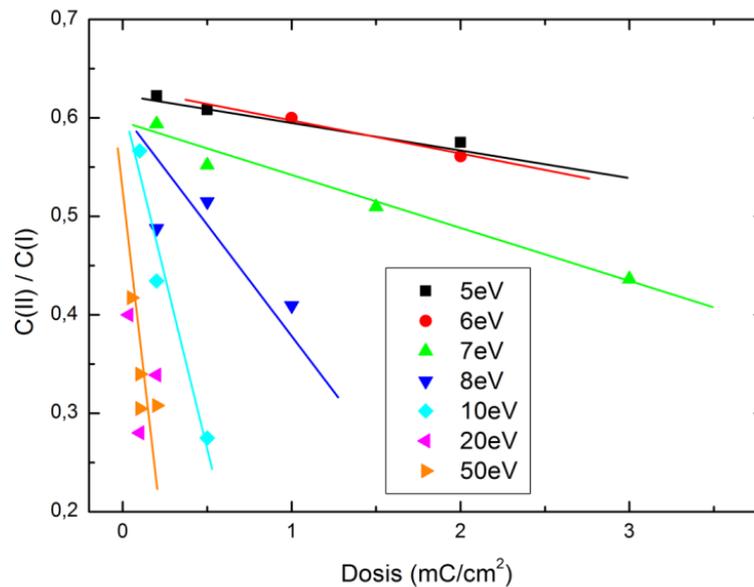


Abbildung 44: Die Verhältnisse aus den C(II) und C(I) der bestrahlten OEG SAMs wurde hier als der Dosis für verschiedene Energien aufgetragen. Als „guide for the eye“ wurde eine Linie durch die Messpunkte gelegt. Dabei fällt auf das die Beschädigung für den Ethylenglykolanteil im Bereich von 5-7 eV kleinere Raten aufweist. Während für Energien größer als 7eV die Rate besonders stark ansteigt und bei 10-20 eV eine Sättigung ergibt.

Um diese Methode zur Strukturierung zu testen wurden OEG-SAM Proben mittels Elektronen und Photonenbeschuß (EUV-IL) strukturiert. In Abbildung 45 (a) und (b) sind AFM

Lateralkraft Aufnahmen zu sehen, die jeweils eine Probe zeigen, die durch EUV-IL und der gleichen Maske erzeugt wurden. Jedoch wurde die Dosis variiert, um die Strukturgrößenänderung bedingt durch Dosisvariation zu demonstrieren. Durch Variation der Dosis (a) 100mJ cm^{-2} und (b) 800mJ cm^{-2} zeigt sich entsprechend eine Änderung in der Strukturgröße von (a) $163\text{nm} \pm 17\text{nm}$ zu (b) $214\text{nm} \pm 24\text{nm}$. In (c) ist hingegen ein Topographie Aufnahme zu sehen, bei der eine Maske mit resultierenden 100nm Strukturen verwendet wurde und durch Überbestrahlung entstanden hier Punktmuster mit 50nm Durchmesser. Ein entsprechendes Linienprofil ist in (d) abgebildet und zeigt sehr deutlich einen Höhenunterschied von 1.6nm . Dies entspricht sehr gut der Moleküllängendifferenz von einem $\text{HS-C}_{16}\text{-OH}$ (dunkler Bereich) und einem $\text{HS-C}_{16}\text{-EG}_3\text{-OH}$ (heller Bereich) OEG Molekül. Wobei hierbei insbesondere die Länge des Carboxyl und Ethylenanteils gemeint ist. Somit werden auch durch die AFM Aufnahmen die XPS Ergebnisse in Abbildung 41 unterstützt.

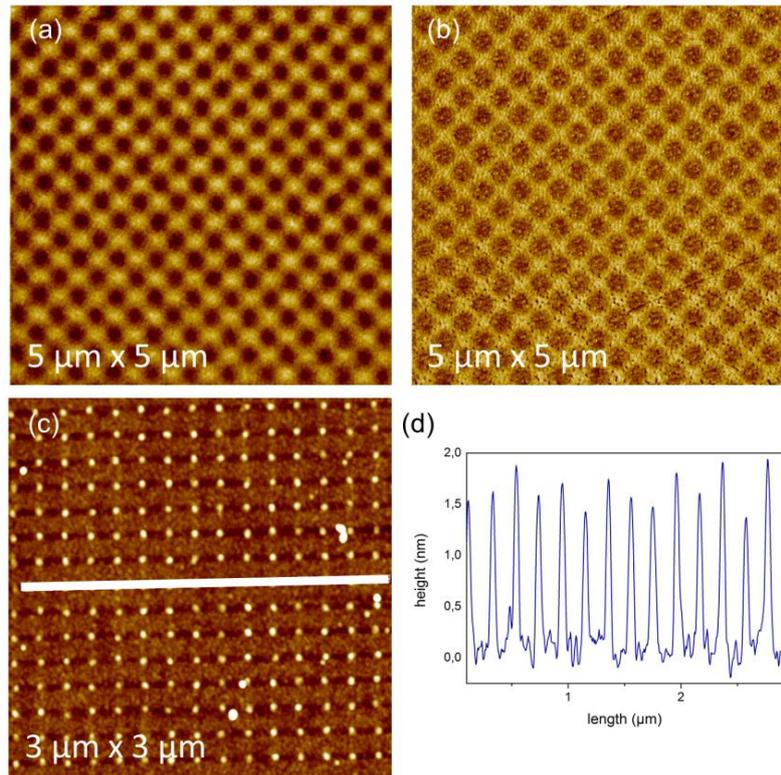


Abbildung 45: In (a) und (b) sind AFM Lateralkraft Aufnahmen zu sehen, die jeweils eine Probe zeigen, die durch EUV-IL und der gleichen Maske erzeugt wurden. Durch Variation der Dosis (a) 100mJ cm^{-2} und (b) 800mJ cm^{-2} zeigt sich entsprechend eine Änderung in der Strukturgröße von (a) $163\text{nm} \pm 17\text{nm}$ zu (b) $214\text{nm} \pm 24\text{nm}$. In (c) ist eine Topographie Aufnahme zu sehen, bei der eine Maske mit 100nm Strukturen verwendet wird und durch Überbestrahlung entstanden hier Punktmuster mit 50nm Durchmesser. Ein entsprechendes Linienprofil ist in (d) abgebildet und zeigt sehr deutlich einen Höhenunterschied von 1.6nm . Dies entspricht sehr gut der Moleküllängendifferenz von einem $\text{HS-C}_{16}\text{-OH}$ (dunkler Bereich) und $\text{HS-C}_{16}\text{-EG}_3\text{-OH}$ (heller Bereich) OEG Moleküls.

Des Weiteren eröffnet diese Methode eine weitere Möglichkeit einer Biochip Produktion. In der Literatur gibt es bereits einige Beispiele bei denen mittels EBL [89] und UV [90-92] strukturierte OEG terminierte SAM Oberflächen und unspezifischer Proteinadsorption Muster geschrieben wurden. Der Ansatz der in dieser Arbeit verfolgt wird, ist die Fabrikation eines Proteinchips mit hochaffiner, spezifischer, umkehrbarer und langfristiger Immobilisierung von Proteinen. Hierbei wird in (a) Ein 16-mercaptohexadecanoic acid (triethylene glycol) ester ($\text{HS-C}_{16}\text{-EG}_3\text{-OH}$) SAM auf Goldsubstrat ausgebildet. Indem ein bestimmter Bereich der SAM (b) gezielt mit Elektron oder EUV bestrahlt bzw. strukturiert wird, werden die OEG SAM Oberflächen teilweise beschädigt. Aufgrund der verringerten Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit Nachbarmolekülen, können Sie sehr leicht durch von

außen hinzugefügte NTA-Thiole verdrängt werden. Welche die beschädigten Bereiche somit wieder auffüllen (d). (e) Durch Komplexbindung mittels Metallionen können dann Histidine markierte Proteine an diese NTA Derivate spezifisch angebunden werden.

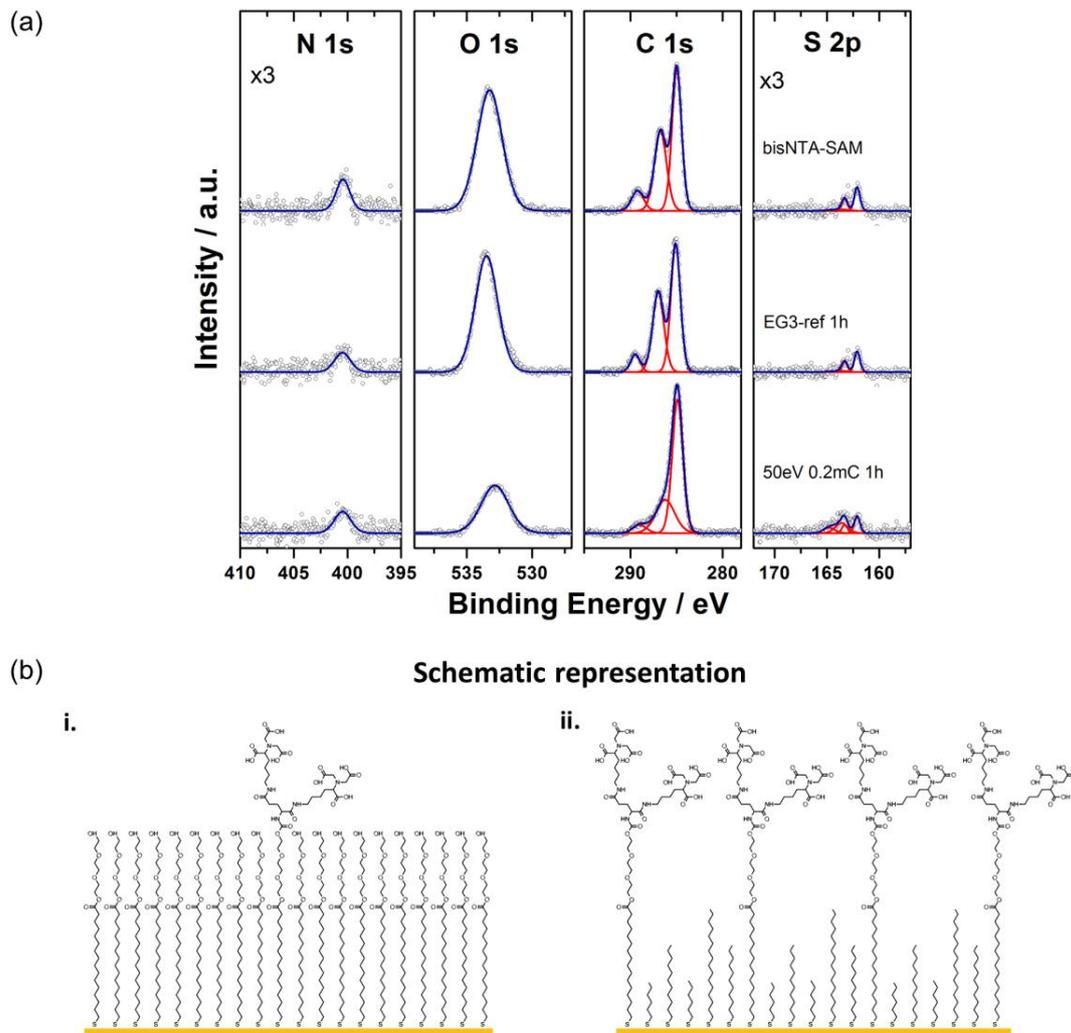


Abbildung 46: (a) X-Ray Photoelektron Spektroskopie (XPS) Charakterisierung von einer bisNTA-SAM als Referenzprobe, einer unbestrahlten OEG-SAM und einer Elektronenbestrahlten modifizierten OEG-SAM Probe. Die OEG Proben wurden jeweils für eine Stunde in einer 20 μM Thiol Lösung (25 mol% bisNTA Thiol and 75 mol% Matrix Thiol in Acetonitrile) eingelegt. In (b) ist eine schematische Darstellung des Austauschprozesses eines OEG SAMs (i) vor der Bestrahlung und (ii) nach der Bestrahlung mit Elektronen zu sehen.

Der Austausch bzw. Auffüllprozeß mit NTA Derivaten wurde mittels X-Ray Photoelektron Spektroskopie (XPS) in Abbildung 46 (a) bei einer Elektronenmodifizierten (50eV, Dosis 0.2mC cm^{-2}) OEG-SAM Probe mit den Spektren einer bisNTA-SAM Referenzprobe und einer unbestrahlten OEG-SAM (EG3-ref) verglichen. Die OEG Proben wurden jeweils für eine

Stunde in einer 20 μM Thiol Lösung (25 mol% bisNTA Thiol and 75 mol% Matrix Thiol in Acetonitril) eingelegt. Anhand der N1s Signale ist eindeutig zu erkennen, dass ein Austausch sowohl bei der bestrahlten und unbestrahlten OEG Probe stattfindet. Jedoch ist die Austauschrate im Fall der unbestrahlten Probe aufgrund der geringeren N1s Signalintensität ein wenig geringer. So dass sich für den Austauschprozesses einer OEG SAM (i) vor der Bestrahlung und (ii) nach der Bestrahlung mit Elektronen folgende schematische Darstellung in Abbildung 46 (b) ergibt. Eine Charakterisierung mit XPS liefert eine Schichtdicke von $16.6 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ für den Elektronenbestrahlten OEG SAM (0.2mC cm^{-2}) und $18.8 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ nach dem Austausch in bisNTA-Lösung (1h). Aufgrund der sterischen Hinderung der verzweigten bisNTA-Thiole ist allerdings wie in Abbildung 46 (b) zu sehen, auch keine vollständige Monolage zu erwarten.

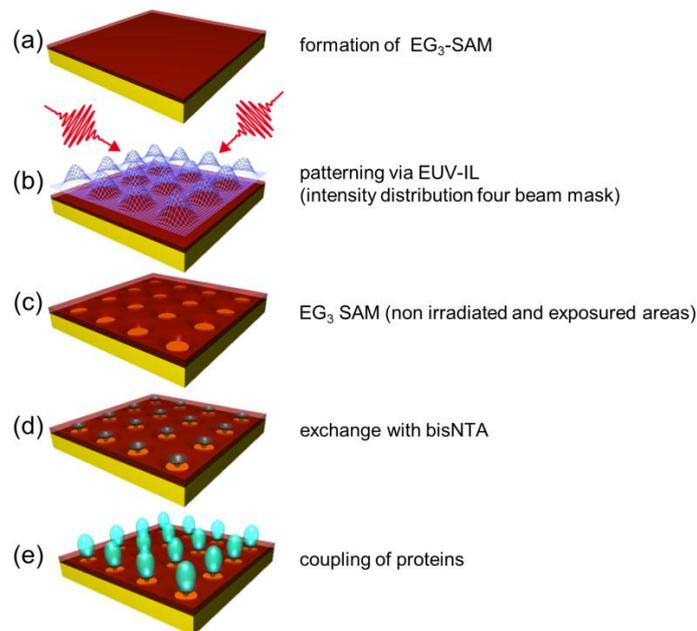


Abbildung 47: schematische Darstellung: (a) Ein 16-mercaptohexadecanoic acid (triethylene glycol) ester (HS-C16-EG₃-OH) SAM wird auf einem Goldsubstrat ausgebildet. (b) Die Strukturierung des SAM erfolgt mit Hilfe der EUV-IL durch eine Vierstrahlinterferenz. (c) In dem bestrahlten SAM Bereichen erleiden die EG₃-Moleküle Strahlenschäden, wodurch Löcher in dem SAM entstehen. (d) Diese werden in durch Thiol Moleküle mit *N*-nitriilotriacetic acid (NTA) Derivaten wieder aufgefüllt. (e) Durch Komplexbindung mittels Metallionen können Histidine markierte Proteine an diese NTA Derivate spezifisch angebunden werden.

Anhand der XPS Daten lassen sich aber keine Aussage über die Proteinanbindung und den Austauschverhalten in nanostrukturierten Proben treffen. Um die Proteinankopplung genauer experimentell zu untersuchen wurden die Proben mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM) an der Universität Frankfurt untersucht. Die Fluoreszenzaufnahmen in der Abbildung 48 zeigen Mikro bzw. Nanostrukturierte Proben, mit (a) $1\mu\text{m}$ Punkte durch Elektronenstrahlolithographie erzeugt und mittels EUV-IL (b) 250nm Gitterlinien, (c) 350nm Punkte und (d) 250nm Linien. Die strukturierten Proben wurden in einem Zeitraum von 25 min gegen bisNTA- und OEG-Thiole in Acetonitril ausgetauscht. Aufgrund der sterischen Hinderung der verzweigten bisNTA-Thiole muss die Austauschlösung OEG-Thiole enthalten, in diesem Fall ca. 75 mol%, welche die Bereiche zwischen den bisNTAs ausfüllen können. Andernfalls kann sich keine gleichmäßige SAM ausbilden. Danach wurden die bisNTAs mit 10 mM NiSO_4 beladen und 100 nM MBPH₁₀-OG₄₈₈ hinzugefügt. Die LSM Aufnahmen zeigen nach Auffüllen der beschädigten Bereiche mit bisNTA-Thiolen eine erfolgreiche spezifische Immobilisierung von MBP His₁₀-OG₄₈₈ Proteinen an den NTA Bereichen. Somit kann eindeutig gezeigt werden, dass die zerstörten Bereiche mit NTA-Derivaten wiederaufgefüllt werden. Die Proteinankopplung konnte ebenfalls erfolgreich auf ihre Reversibilität untersucht werden.

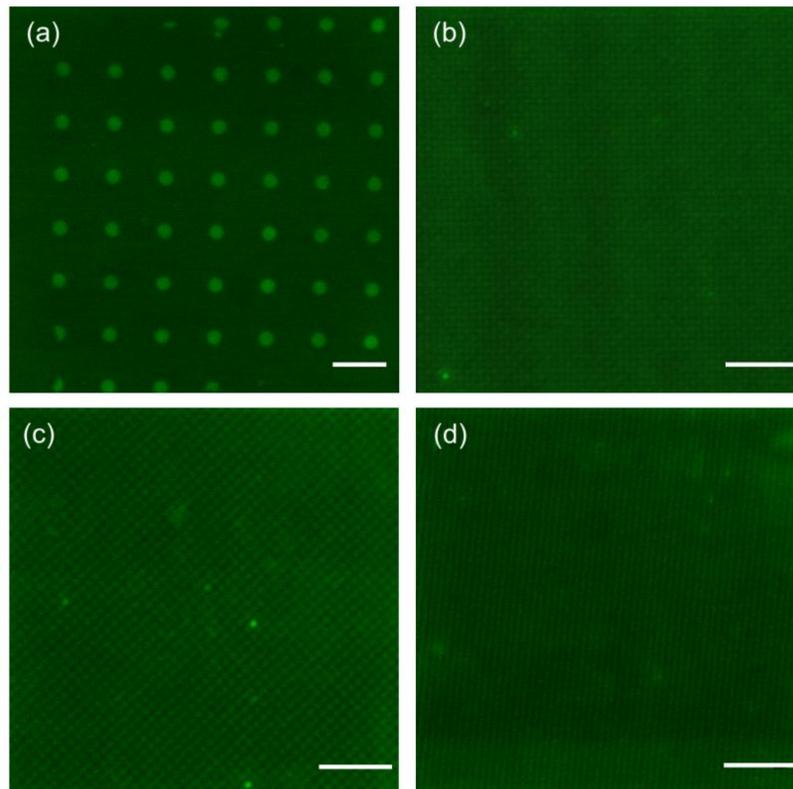


Abbildung 48: LSM Aufnahmen von Elektronen und EUV Interferenz Lithographie strukturierten Proben nach Auffüllen der beschädigten Bereiche mit trisNTA-Thiol Molekülen und Ankopplung von Fluoreszenz markierten MBP Proteinen. Die beschädigten Moleküle in den bestrahlten Bereichen wurden in einem Zeitraum von 25 min gegen *bis*NTA- und EG₃-Thiole in Acetonitril ausgetauscht (aufgrund der sterischen Hinderung der verzweigten *bis*NTA-Thiole muss die Austauschlösung EG₃-Thiole enthalten, in diesem Fall ca. 75 mol%, welche die Bereiche zwischen den *bis*NTAs ausfüllen können; andernfalls kann sich keine gleichmäßige SAM ausbilden). Danach wurden die *bis*NTAs mit 10 mM NiSO₄ beladen und 100 nM MBP_{H10}-OG400 hinzugefügt. **a)** schematische Darstellung nach Auffüllen der beschädigten EG₃ Bereiche **b)** LSM Aufnahmen von Strukturen durch Elektronenstrahl Lithographie (1µm Punkte) und EUV-IL (350nm Punkte und 250nm Linien) hergestellten EG₃ Oberflächen.

5.3 Nanosiebe

Ein Nanosieb ist eine perforierte Membran mit einer Schichtdicken von gerade einem Nanometer. Diese Nanosiebe können z.B. als Unterlage für mikroskopische Anwendungen [16] oder als feiner Filter für Separation von Biomolekülen [17] eingesetzt werden. Viele bioanalytische Probleme in der Proteomik oder medizinischen Diagnostik sind mit der konventionellen Technik zur Separation nicht zu lösen, so dass neue Nanosiebe hier von besonderem Interesse sind [93, 94]. Dabei erhofft man sich in der Mikrofluidtechnik durch verbesserte Nanosiebe große Auswirkungen bzw. Fortschritte in der Bioseparation [95-98]. Verschiedene Ansätze zur Herstellung von ultradünnen Nanosiebe mit Schichtdicken von 10-20nm wurden bereits untersucht [94, 99-101]. Jedoch ist ein Ziel die Schichtdicke der Membran in der Größenordnung der Biomoleküle herzustellen noch nicht zufriedenstellend gelöst. Basierend auf unserer NBPT SAM und der EUV-IL wird daher in dieser Arbeit die Herstellung eines ein Nanometer dünnen Nanosiebes untersucht.

5.3.1 Herstellung

Die Herstellung solcher Nanosiebe ist schematisch in Abbildung 49 skizziert. Nach Ausbildung einer SAM (a) auf Gold / Glimmer Substrat wird die Probe mittels EUV-IL (b) strukturiert. Durch das Auftragen (spin-coating) einer Polymerschicht auf die strukturierte Probe wird (c-d) die SAM mit der Goldschicht vom Glimmer Substrat mit Hilfe einer HF Ätzlösung abgelöst. Anschließend wird die Goldunterlage mit einer KI_2 Lösung entfernt und die Folie auf ein neues Substrat mit Lochöffnungen gelegt (holey substrate). Die Polymerschicht die während dieses Prozesses als Stabilisierung bzw. Schutz diente wird im (e) letzten Schritt in Lösungsmittel aufgelöst. So dass letztendlich ein Nanometer-Nanosieb auf der Unterlage zurückbleibt.

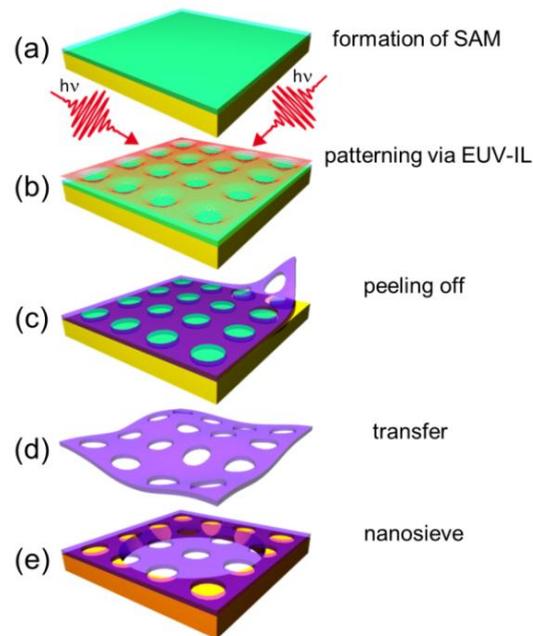


Abbildung 49: schematische Darstellung: Nach Ausbildung einer SAM (a) auf Gold / Glimmer Substrat wird die Probe mittels EUV-IL (b) strukturiert. Durch das Auftragen (spin-coating) einer Polymerschicht auf die strukturierte Probe wird (c-d) die SAM mit der Goldschicht vom Glimmer Substrat mit Hilfe einer HF Ätzlösung abgelöst. Anschließend wird die Goldunterlage mit einer KI2 Lösung entfernt und die Folie auf ein neues Substrat mit Lochöffnungen gelegt (holey substrate). Die Polymerschicht die während dieses Prozesses als Stabilisierung bzw. Schutz diente wird im (e) letzten Schritt in Acetone aufgelöst.

Um eine Veränderung der chemischen Eigenschaften bedingt durch den Transfer Prozess der perforierten „Nanosheets“ auszuschließen, wurden mittels XPS NBPT SAM Proben vor und nach dem Transfer auf SiO_2 untersucht. Hierfür wurden Proben mit ausreichender Fläche für die notwendige Untersuchung im XPS ($\sim 30 \text{ mm}^2$) vorbereitet. Die Vernetzung erfolgte mit 100eV Elektronen und einer Dosis von 50 mC cm^{-2} , da die Bestrahlung mit Elektronen die gleichen Effekte im SAM erzielt wie EUV. [77]

In Abbildung 50 sind die entsprechenden XPS Spektren dargestellt. In (a) ist für den Fall vor dem Transfer im $\text{C}1\text{s}$ Spektrum bei 284.2 eV ein Signal, welches sich dem aromatischen Teil zuordnen lässt, erkennen. Des Weiteren ist eine Schulter bei 285.3 eV bedingt durch C-S und C-N Bindungen zu sehen, so wie shake-up Satelliten Peaks bei $\sim 287 \text{ eV}$ und 290 eV . Im $\text{S}2\text{p}$ Spektrum sind zwei Dupletts für $\text{S}2\text{p}_{3/2}$ mit einer Bindungsenergie von 162 eV und 163.5 eV zu beobachten, welche charakteristisch für vernetzte NBPT SAMs sind. [9] Das Duplett bei

niedrigen Energien ist charakteristisch für Thiolate und bei höheren Energien für Sulfide bzw. Disulfide. [50]

In dem Spektrum für N1s ist eindeutig bei 399eV ein Peak zu erkennen, der den Amino Funktionalität zuordnen lässt. [44, 77, 78]

In Abbildung 50 b) ist das XPS Spektrum nach dem Transfer dargestellt. Hier sind insbesondere in dem C1s und N1s Signal keine Unterschiede zu der Probe vor dem Transfer festzustellen. Daraus folgt zum einen das die Aminofunktionalität als auch die Schichtdicke von $\sim 1\text{nm}$ erhalten bleibt. Wobei die letzte Eigenschaft auch über die Schichtdickenbestimmung basierend auf der Abschwächung des Si2p Signal (hier nicht gezeigt) und der Messung mittels AFM Linienhöhenprofilen von transferierten Nanosheets auf SiO₂ Substrat bestätigt werden. [88] Allerdings zeigt sich im Gegensatz zu dem C1s und N1s im S2p eine auffällige Änderung. So verschwinden das charakteristische Thiolat Duplett und nur noch ein Duplett bei 163.2eV ist zu erkennen. Dies kann durch die Formation von ungebundenen Thiol / Disulfiden nach dem Transfer erklärt werden. Deren Bindungsenergien überlappen sich mit den Signalen die generell bei einer bestrahlten Probe entstehen. Des Weiteren ist noch ein Peak bei 167.5 eV zu erkennen, der durch die Formation von oxidiertem Schwefel erklärt wird. Zusätzlich ist in Abbildung 50 noch für den transferierten Nanosheet ein I3d Signal zu sehen, dass kann auf die KI₂ Ätzlösung zurückgeführt werden. Deshalb wurde die Probe unter UHV Bedingungen für mehrere Stunden auf $\sim 500\text{K}$ geheizt und dabei verschwand dieses Signal vollständig. Die anderen XPS Spektren in c) zeigten durch den Heizschritt keinerlei Änderungen gegenüber b) auf.

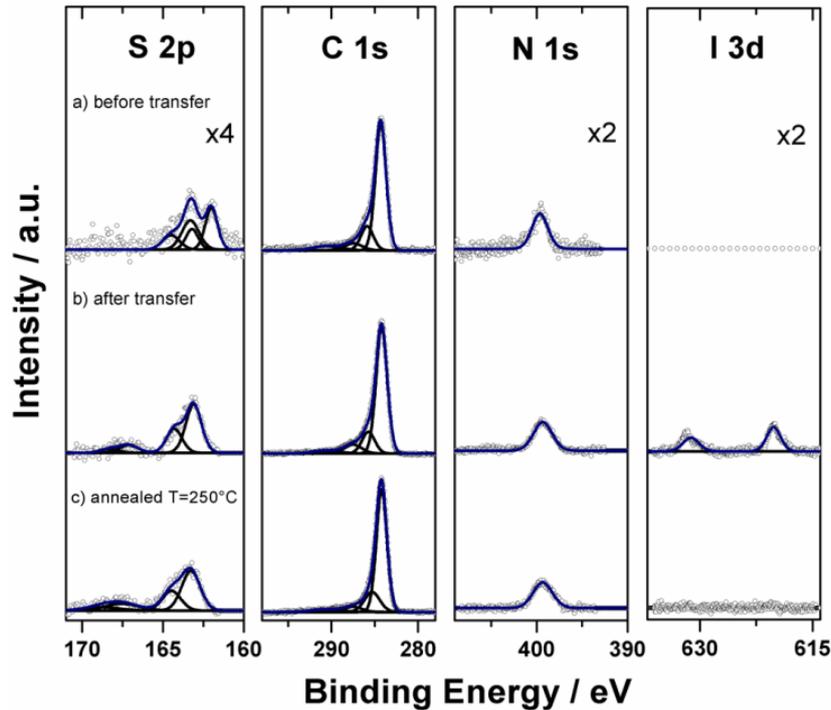


Abbildung 50: XPS Spektrum von einem Nanosheet (a) nach Ausbildung und Elektron Bestrahlung (50mC cm^{-2}) auf Gold Substrat. (b) XPS Spektrum nach dem Transferprozeß des gleiche Films auf eine SiO_2 Oberfläche und (c) nach einem zusätzlichen Annealingsprozeß bei 523K für mehrere Stunden unter UHV Bedingungen.

5.3.2 Charakterisierung

Es wurde bereits in anderen Arbeiten gezeigt, dass der Transfer von vernetzten NBPT Membranen auf eine 300nm dicke Silizium Oxidschicht durch Interferenz Kontrast im Lichtmikroskop sichtbar ist [81]. In Abbildung 51 ist ein EUV-IL strukturierte Probe auf ein SiO_2 Wafer transferiert worden und mittels Lichtmikroskop abgebildet. Oben links befindet sich als Inset ein Schema der verwendeten Maske. Welche über zwei Beugungsgitter rechtwinkelig zueinander angeordnet ist, so dass vier Strahlen in dem überlagerten Bereich interferieren und ein Gittermuster formen, dieser Bereich ist hier mit einem gestrichelten Rahmen gekennzeichnet. Des Weiteren sind auch noch die nullte und erste Ordnung als dunkler Kontrast in der Aufnahme zusehen, wodurch visuell eine homogene Kreuzstruktur („schweizer Kreuz“) als Abbild der Maske resultiert. Das Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops reicht nicht aus um die Strukturen aufzulösen, daher wurden AFM

Aufnahmen in dem gestrichelten Rahmenbereich zur Charakterisierung durchgeführt. In Abbildung 52 ist in (a) eine topographische AFM Aufnahme vor dem Transfer auf Gold / Glimmersubstrat und in (b) eine Lateralkraft Aufnahme nach Transfer auf das SiO₂ Substrat abgebildet. Zusätzlich sind jeweils die Fourier Transformation Bilder als Inset eingefügt. Hieraus wird besonders ersichtlich dass sowohl vor als auch nach dem Transfer die Periodizität erhalten bleibt. Die Rauigkeit des Goldsubstrates hat somit ebenfalls keinen Einfluss auf die Qualität der beobachteten Strukturen, was vermutlich auf die Tiefenschärfe der hier verwendeten EUV-IL zurückzuführen ist. Die Lochgröße beträgt 75 ± 15 nm und die Linienbreite 140 ± 15 nm.

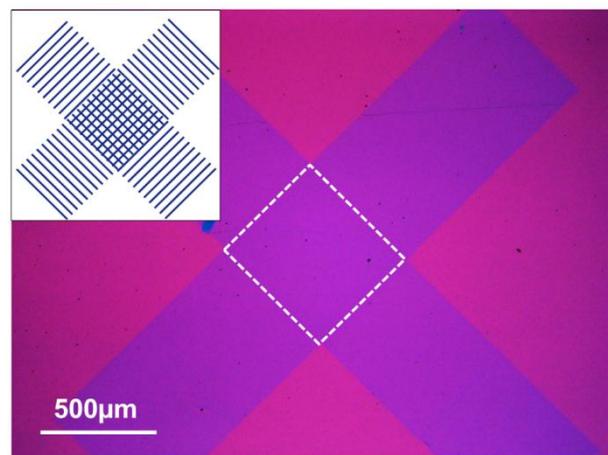


Abbildung 51: Lichtmikroskopische Aufnahme nach dem Transfer auf ein SiO₂ Oberfläche. Im Inset ist die hier verwendete EUV Maske schematisch dargestellt. Der strukturierte Bereich mit der konstruktiven Interferenz ist durch ein weißschraffiertes Rechteck gekennzeichnet. Die Form eines Kreuzes ergibt sich aufgrund der Tatsache, dass die Photonen in den Randbereichen in nullter Ordnung und erster Ordnung ebenfalls die NBPT SAM vernetzen.

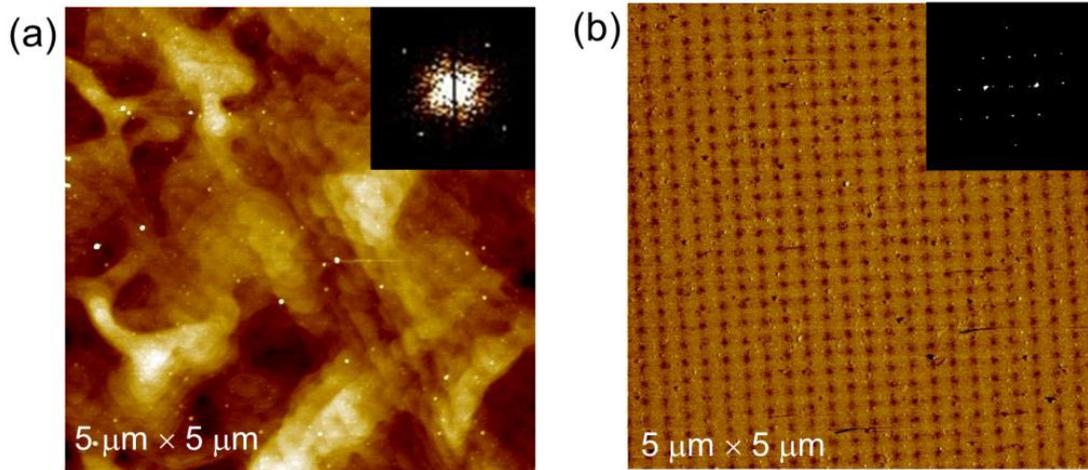


Abbildung 52: (a) Topographische AFM Aufnahme einer EUV strukturierten Probe (200 x 225 nm Maske) auf Gold / Glimmer Substrat. (b) Laterale Kraft AFM Aufnahme nach Transfer auf eine SiO₂ Oberfläche. Zu besseren Veranschaulichung der Periodizität wurde jeweils eine Fast Fourier Abbildung als Inset hinzugefügt.

Um freistehende Nanosiebe zu untersuchen, wurden diese auf ein TEM Gitter der Firma Quantifoil mit Lochdurchmesser von 1 µm transferiert. In Abbildung 53 ist ein Übersichtsbild mittels Rasterelektronenmikroskop bei 3keV abgebildet. Wie in der Lichtmikroskopischen Aufnahme (Abbildung 51) ist auch hier eine Kreuzstruktur von der Maske zu sehen.

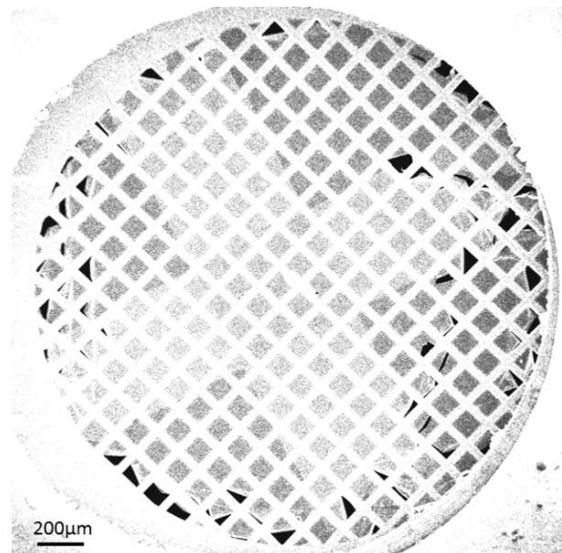


Abbildung 53: Rasterelektronen Mikroskop Aufnahme (REM) einer transferierten Nanosieb Probe auf einem TEM Gitter der Firma Quantifoil mit einem Lochdurchmesser von 1 µm. Hierbei ist das vollständige TEM Gitter zu sehen und wie im Lichtmikroskop ist ein Kreuz zu sehen, welches aus dem Interferenz Gitter und den überbestrahlten nicht strukturierten Bereichen besteht.

Allerdings zeigt sich in der Vergrößerung in Abbildung 54 eine Gitterstruktur in der Mitte des Kreuzes bzw. in dem Bereich der konstruktiven Interferenz. Die Strukturgröße der verwendeten EUV Maske beträgt 100 x 90 nm. Jedoch wird bei Betrachtung der gleichen Probenstelle mittels REM auch deutlich sichtbar dass sich die Größe der Poren mit jeder Aufnahme ebenfalls vergrößert (Abbildung 54 (a-j)). Besonders deutlich wird jenes Verhalten in Abbildung 54 k) nach Herauszoomen, wo die zuvor untersuchte Stelle ganz klar eine andere Porengröße zu den anderen Bereichen aufweist. Dies ist vermutlich auf Aufladungseffekte und den dadurch induzierten mechanischen Stress zurückzuführen, da die Nanosheets bei Raumtemperatur hergestellt, isolierend sind [88]. Somit ist die Charakterisierung von Nanosieben mit Hilfe eines REM mit hoher Auflösung eher ungeeignet. Jedoch bietet es auf der anderen Seite die Möglichkeit, nachträglich und lokal die Dimension der Poren zu variieren.

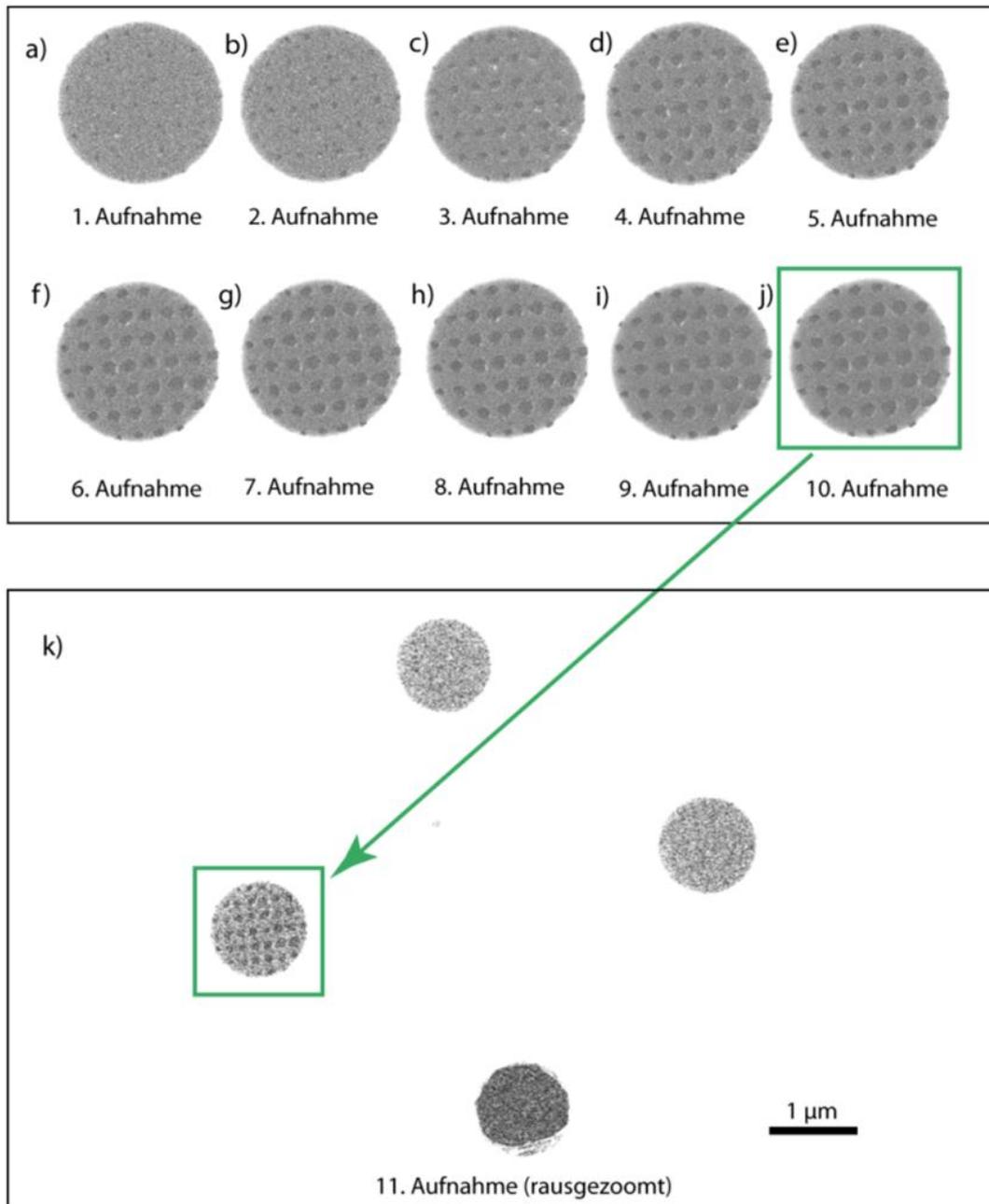


Abbildung 54: Rasterelektronen Mikroskop Aufnahmen (REM) einer transferierten Nanosieb Probe auf einem TEM Gitter der Firma Quantifoil mit einem Lochdurchmesser von $1\mu\text{m}$. Die Strukturgröße der verwendeten EUV Maske beträgt $100 \times 90 \text{ nm}$. Alle Aufnahmen sind an der gleichen Probenstelle durchgeführt worden und mit Zunahme der Anzahl der Aufnahmen sind eindeutig Vergrößerungen in den Nanosieböffnungen zu erkennen. Dies ist vermutlich auf Aufladungseffekte und dadurch induzierten Stress zurückzuführen, da die Nanosheets bei Raumtemperatur hergestellt, isolierend sind. [88]

In Vorarbeiten wurde bereits gezeigt, dass unsere Nanosheets im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) trotz der höheren kinetischen Energie der Elektronen [16, 81] standhalten. Dies ist vermutlich auf den dadurch bedingten kleineren Wirkungsquerschnitt der Elektronen zurückzuführen. Weshalb die weitere Charakterisierung

der Nanosiebe an einem Philips TEM CM 200 FEG bei 200kV an der PTB Braunschweig erfolgte.

In Abbildung 56 (a) und (b) ist eine entsprechende TEM Aufnahme der gleichen Probestelle zu sehen. Die Aufnahme in (a) erfolgte im Hellfeld Modus und in (b) im Dunkelfeld Modus des TEM, wie schematisch in Abbildung 55 dargestellt ist. Was letztendlich zu einer Kontrastverbesserung der TEM Aufnahme führt und die Strukturen wesentlich besser charakterisieren lässt. In dem hier gezeigten Bild wurde im Übrigen eine EUV-Maske mit der Periode $200 \times 225\text{nm}$ verwendet, weshalb die Poren größer ausfallen als in Abbildung 54. Die Löcher sind nahezu kreisrund und haben einen Durchmesser von $138 \pm 17\text{ nm}$. Sie sind somit größer als die Strukturen auf der AFM Probe, welche mit der gleichen Maske hergestellt wurde. Dies lässt sich vermutlich durch den mechanischen Stress des freistehenden Nanosiebes erklären.

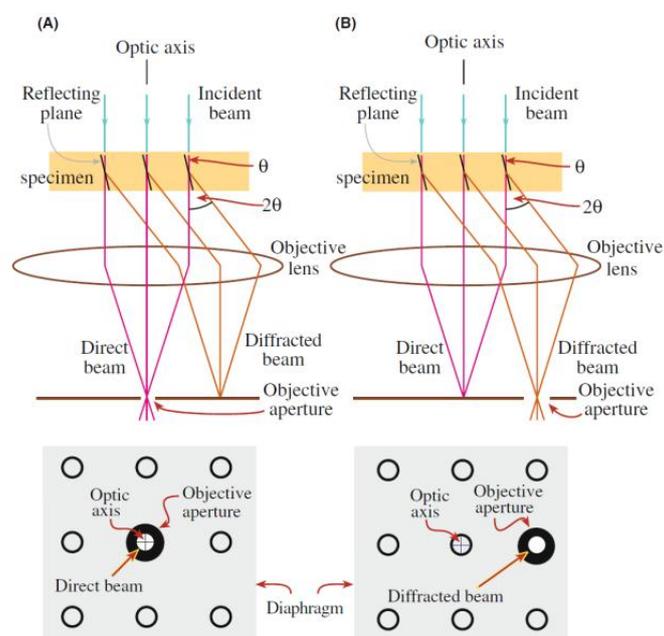


Abbildung 55: Die Strahlendiagramme zeigen die unterschiedlichen Kombinationen aus möglichen Einstellungen für die Objektaperturblende und der Linse, um (A) eine Hellfeld Aufnahme durch direkten Elektronenstrahl, (B) Dunkelfeld Aufnahme mit verschobener Aperturblende zu erzeugen. (Grafik entnommen aus [102])

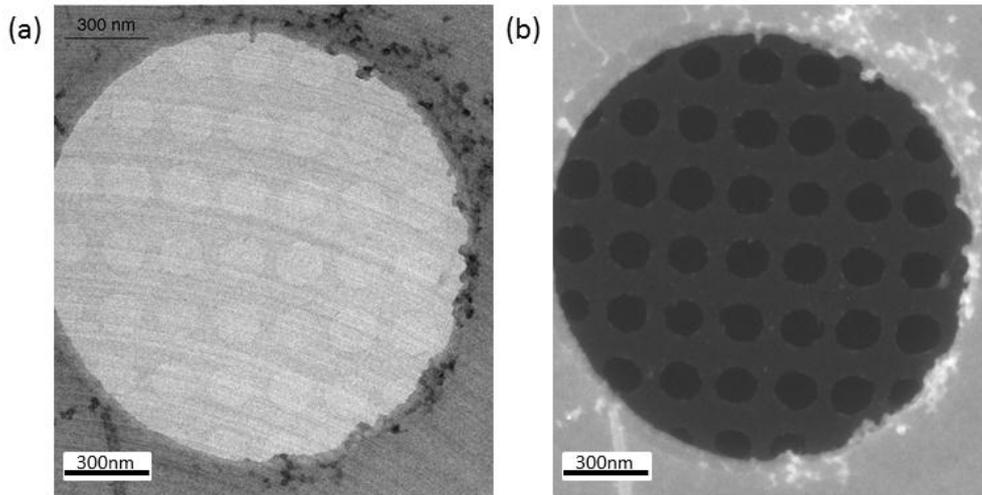


Abbildung 56: TEM Aufnahmen von einem freistehenden Nanosieb auf einem TEM Gitter der Firma Quantifoil, welches einen Lochdurchmesser von $1\mu\text{m}$ besitzt. In (a) ist eine TEM Hellfeld Aufnahme einer Probe, welche mit einer EUV Maske der Periodizität von $200 \times 225 \text{ nm}$ bei 70 J cm^{-2} hergestellt wurde, zu sehen. In (b) die gleiche Stelle, jedoch erfolgte hier eine TEM Dunkelfeld Aufnahme mit verschobener Aperturblende.

In Abbildung 57 (a) ist für den folgenden Vergleich noch einmal die gleiche Aufnahme wie in Abbildung 56 (b) zu sehen. So wurde in Abbildung 57 (b) eine Probe unter den gleichen Bedingungen wie in (a) hergestellt, jedoch mit einer anderen Strahlendosis. Dabei zeigt sich, dass durch Erhöhung der Strahlendosis in (b) auf 120 J cm^{-2} die Lochdurchmesser verglichen mit der Probe (a) bei einer Dosis von 70 J cm^{-2} deutlich kleiner werden und nur noch $100 \pm 15 \text{ nm}$ betragen. Es verdeutlicht, dass die Strukturgröße nicht nur durch die Maske, sondern auch durch die Optimierung der Strahldosis beeinflusst wird. Letztendlich ist dieses Ergebnis nicht unerwartet, aber es bietet einen weiteren Ansatz aufgrund limitierter Maskenauswahl die Porengröße weiter zu verkleinern.

In Abbildung 57 (c) ist eine TEM Aufnahme einer Probe mit einer Maske der Periodizität von $100 \times 90 \text{ nm}$ bei 50 J cm^{-2} gezeigt. Die Probe zeigt aktuell unseren feinsten Nanosieb mit einem Poren Durchmesser von $31 \pm 6 \text{ nm}$.

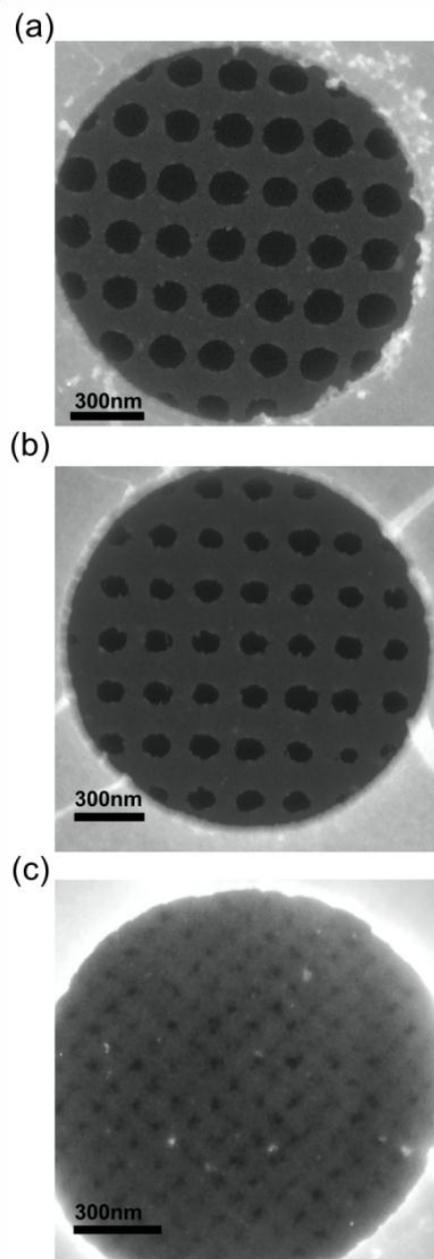


Abbildung 57: TEM Aufnahmen von drei unterschiedlichen freistehenden Nanosieben auf einem TEM Gitter der Firma Quantifoil, welches einen Lochdurchmesser von $1\mu\text{m}$ besitzt. In (a) ist eine TEM Aufnahme einer Probe, welche mit einer EUV Maske der Periodizität von $200 \times 225 \text{ nm}$ bei 70 J cm^{-2} hergestellt wurde, zu sehen. Die Löcher sind nahezu kreisrund und haben einen Durchmesser von $138 \pm 17 \text{ nm}$. (b) Des Weiteren zeigte sich durch Erhöhung der Strahlendosis auf 120 J cm^{-2} , dass die Lochdurchmesser verglichen mit der Probe bei einer Dosis von 70 J cm^{-2} deutlich kleiner werden und nur noch $100 \pm 15 \text{ nm}$ betragen. In (c) ist eine TEM Aufnahme einer Probe mit einer Maske der Periodizität von $100 \times 90 \text{ nm}$ bei 50 J cm^{-2} gezeigt, woraus ein Durchmesser von $31 \pm 6 \text{ nm}$ resultiert.

Ein Weg diese Nanosiebe dennoch mit Hilfe eines REM abzubilden und die mechanischen Eigenschaften zu demonstrieren ist in der Abbildung 58 zu sehen. Hier wurde auf ein freistehendes Nanosieb, welches mit einer Maske der Periodizität $100 \times 90 \text{ nm}$ und Dosis von

70 J cm⁻² hergestellt wurde, mit einem Goldfilm mit einer Schichtdicke von 2-5 nm bedampft. In Abbildung 58 sind verschiedene Interessante Bereiche auf einer Probe gezeigt. So wird in (a) ersichtlich, dass der zusätzliche Prozess einige Bereiche beschädigt hat und sich einige größere Öffnungen gebildet haben. Jedoch ist auch ersichtlich, dass in den nachkolorierten Abbildungen in (b) und (c) die periodische Struktur erhalten bleiben und der ein Nanometer dünne Film insgesamt so stabil ist, dass er den zusätzlichen Bedampfungsprozess standhält. Es entsteht also ein Kompositwerkstoff, der die Nanosiebe für weitere Anwendungen interessant machen kann. So lassen sich sicherlich auch andere Metalle als Gold oder Oxide aufdampfen, so dass sich durch das Komposit-Material die Eigenschaften der Nanosiebe an die gewünschten Applikationen anpassen lassen.

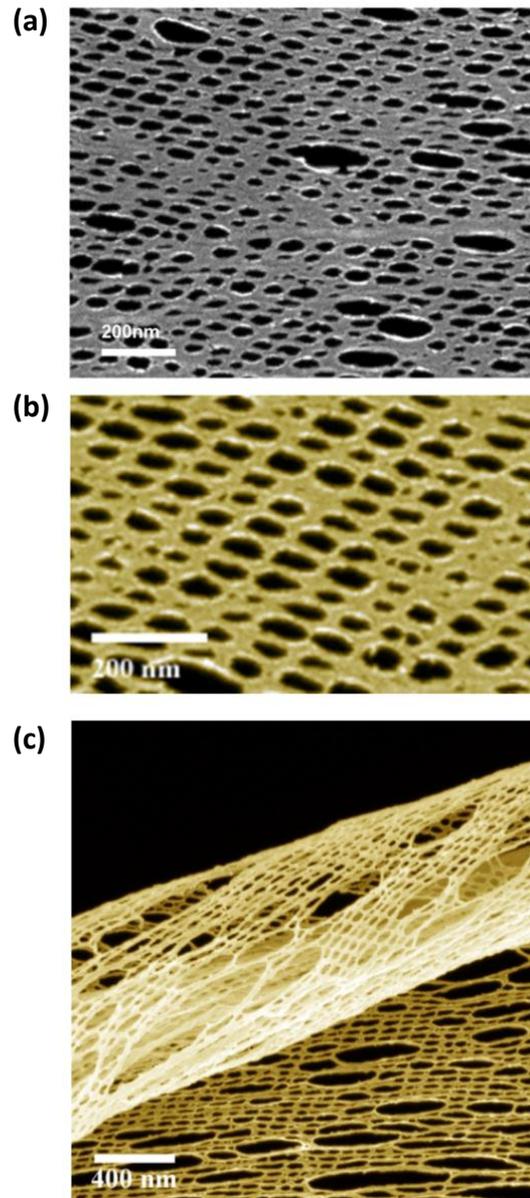


Abbildung 58: (a) REM Aufnahme eines freistehenden Nanosiebes, welches mit einer Maske der Periodizität 100 x 90 nm und Dosis von 70 J cm⁻² hergestellt wurde und mit einem Gold Film der Schichtdicke von 2-5 nm bedampft wurde. (b) Gleiche Probe noch einmal vergrößert und nachcoloriert, (c) Abbildung einer anderen Stelle auf der gleichen Probe und ebenfalls nachcoloriert

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die laterale Strukturierung selbstaggregierender Monolagen (SAMs) mittels EUV Interferenz Lithographie (EUV-IL) untersucht. Dabei zeigt sich, dass die Vernetzung von Nitrobiphenyl-Thiol SAMs die gleichen chemischen und physikalischen Eigenschaften aufweisen wie Elektronenvernetzte Proben. Dies wird in den Röntgenphotoelektronen Spektroskopie (XPS) Vergleichsaufnahmen von Photonen- und Elektronenvernetzten Proben sehr deutlich. Beide Methoden benötigen scheinbar die gleiche Sekundärelektronenausbeute, um eine vollständige Vernetzung zu erzeugen. Daraus lässt sich folgern, dass vermutlich primär die niederenergetischen Sekundärelektronen zur Vernetzung beitragen.

Durch Variation von verschiedenen Belichtungsparametern wie Masken und Dosis konnten verschiedene großflächige Mikro- und Nanostrukturierte SAM Oberflächen demonstriert werden. Die kleinsten so hergestellten Strukturen betragen 30nm. Das Auflösungslimit wurde hierbei lediglich durch die Rauigkeit bzw. Körnigkeit der verwendeten Goldpalladium ($\text{Au}_{0.8}\text{Pd}_{0.2}$) Substrate limitiert. Die Template zeigen in den Rasterkraftmikroskopie Aufnahmen eine hohe Ordnung bzw. Periodizität der Nitro- und Amino terminierten Oberfläche. Die Methode der EUV-IL eignet sich somit besonders gut für die Fabrikation von großflächigen Templaten z.B. für Biochips.

Bei der Ankopplung von NTA-Chelatoren konnte sehr deutlich das technische Potential der Kombination aus SAM und EUV Lithographie basierter Technik aufgezeigt werden. Wie bereits in den Vorarbeiten auf Elektronenvernetzten Proben demonstriert, konnte auch bei der Anwendung von EUV-Licht ein Biochip basierend auf dem NTA / His-tag Konzept demonstriert werden. Durch Veränderung der Ankopplungschemie konnte mittels

Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) und konfokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM) ebenfalls eine signifikante Verbesserung der Proteinanbindung erzielt werden. Diese neue Ankopplungsmethode ermöglicht ebenso einen neuen alternativen Weg zur Anbindung von Proteinabweisenden Polyethylenglykol (PEG) Molekülen an unsere Aminoterminierten vernetzten Nitrobiphenyl-Thiol SAM Bereiche. Aufgrund der Kenntnisse der hohen mechanischen und thermischen Stabilität von vernetzten Biphenyl SAMs ermöglicht dieser neue Lösungsansatz vielleicht das Problem der Degradation von reinen PEG SAM Oberflächen zu minimieren.

XPS Untersuchungen an vollständig Polyethylenglykol terminierten Oberflächen lieferten Hinweise auf strahleninduzierte Beschädigungen der OEG-SAM durch Elektronen und Photonen. Durch eine detaillierte Untersuchung dieser Strahlenschäden mittels Variation der Elektronenenergie konnte ein vollständig neuer Ansatz zur Biochip Herstellung verfolgt werden. Hierbei werden die selbstaggregierenden Monolagen durch Elektronen bzw. Photonenbeschuss strukturiert. Diese Bereiche lassen sich offensichtlich leichter gegen NTA-PEG-Thiol Moleküle austauschen bzw. wiederauffüllen. Die ersten CLSM Aufnahmen zeigen bei Hinzugabe von fluoreszenzmarkierten Proteinen eindeutig eine spezifisch homogene und reversible Immobilisierung an den aufgefüllten NTA-Derivat Bereichen. Diese alternative Methode der EUV basierten Strukturierung liefert ebenfalls einen sehr vielversprechenden Weg zur Biochip Fabrikation. Darüber hinaus erfordert dieser Ansatz weniger Prozessschritte als in den vorangegangenen Experimente über die Ankopplung der NTA Derivate und macht ihn wirtschaftlich interessant.

Das vielfältige technologische Potential aus der Kombination SAM und der EUV Nanostrukturierungs-Technik wird auch bei der Herstellung der Nanosieb noch einmal deutlich. Mit einer Membranstärke von nur einem Nanometer ist die Realisierung von

Porengrößen im Bereich von wenigen Nanometern sehr vielversprechend. Die kleinsten hier gezeigten Porenöffnungen betragen $\sim 30\text{nm}$ und lassen sich somit auch für praktische Anwendungen wie z.B. Filter sehr gut vorstellen. Durch weitere Optimierung der EUV Belichtungsparameter sind auch weitere Miniaturisierungen der Lochöffnungen leicht realisierbar, da die Membrandicke hier nicht der limitierende Faktor ist.

Selbst die mechanischen Eigenschaften von nur einem Nanometer dicken Nanosieb sind beeindruckend, da Sie sogar Gold PVD Prozesse standhalten. Somit also einen Kompositwerkstoff bilden. Darüber hinaus wurde in der Literatur auch gezeigt, dass selbst durch die vielen Prozessschritte inklusive dem Transfer, sogar die unterschiedliche chemische Funktionalität der Ober- und Unterseite der Membran erhalten bleibt. D.h. Sie eignen sich gleichzeitig auch als Janusmembran.

Abschließend zeigen somit alle hier aufgeführten Experimente das enorme technologische Potential, welches aus der Kombination von selbstaggregierenden Monolagen auf Thiol Basis und der neuen EUV Lithographie geschöpft werden kann. Die Herstellung und Anwendung einer Vielzahl von physikalischen, chemischen und biologischen Strukturen wird hierdurch ermöglicht. Konkret konnten verschiedene Herstellungsmethoden zu Realisierung eines Biochips demonstriert werden. Die multivalenten Chelatorchips erlauben eine spezifische, hochaffine, umkehrbare und langfristige Immobilisierung His-markierter Proteine. Deren Verwendung in der Untersuchung bzw. Analyse von unterschiedlichen Proteineigenschaften auf Oberflächen sehr hilfreich sein werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Mckusick, V.A., *The Human-Genome-Organization - History, Purposes, and Membership*. Genomics, 1989. **5**(2): p. 385-387.
2. Human Genome Sequencing Consortium, I., *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature, 2004. **431**(7011): p. 931-945.
3. *Human Genome Project*. Available from: http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml.
4. *Human Proteome Organization*. Available from: <http://www.hupo.org>.
5. Gates, B.D., et al., *Unconventional nanofabrication*. Annual Review of Materials Research, 2004. **34**: p. 339-372.
6. Wolfe, D.B., et al., *Fabrication of planar optical waveguides by electrical microcontact printing*. Applied Physics Letters, 2004. **84**(10): p. 1623-1625.
7. Tarlov, M.J., D.R.F. Burgess, and G. Gillen, *UV Photopatterning of Alkanethiolate Monolayers Self-Assembled on Gold and Silver*. Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(12): p. 5305-5306.
8. Götzhäuser, A., et al., *Chemical nanolithography with electron beams*. Advanced Materials, 2001. **13**(11): p. 806-+.
9. Turchanin, A., et al., *Molecular self-assembly, chemical lithography, and biochemical tweezers: A path for the fabrication of functional nanometer-scale protein arrays*. Advanced Materials, 2008. **20**(3): p. 471-+.
10. Kramer, S., R.R. Fuierer, and C.B. Gorman, *Scanning probe lithography using self-assembled monolayers*. Chemical Reviews, 2003. **103**(11): p. 4367-4418.
11. Solak, H.H., et al., *Multiple-beam interference lithography with electron beam written gratings*. Journal of Vacuum Science & Technology B, 2002. **20**(6): p. 2844-2848.

12. Solak, H.H., et al., *Four-wave EUV interference lithography*. *Microelectronic Engineering*, 2002. **61-2**: p. 77-82.
13. Auzelyte, V., et al., *Extreme ultraviolet interference lithography at the Paul Scherrer Institut*. *Journal of Micro-Nanolithography MemS and Moems*, 2009. **8(2)**: p. -.
14. Arnold, F.H., *Metal-affinity protein separations*, San Diego: Academic Press.
15. Tinazli, A., *Nanobiotechnology: Tools for Proteomics – Molecular Organization and Manipulation of Proteins and Proteincomplexes in Nanodimensions* 2007.
16. Nottbohm, C.T., et al., *Novel carbon nanosheets as support for ultrahigh-resolution structural analysis of nanoparticles*. *Ultramicroscopy*, 2008. **108(9)**: p. 885-892.
17. Bayley, H., *NANOTECHNOLOGY Holes with an edge*. *Nature*, 2010. **467(7312)**: p. 164-165.
18. Zheng, Z., et al., *Janus Nanomembranes: A Generic Platform for Chemistry in Two Dimensions*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2010. **49(45)**: p. 8493-8497.
19. Nuzzo, R.G. and D.L. Allara, *Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces*. *Journal of the American Chemical Society*, 1983. **105(13)**: p. 4481-4483.
20. Atre, S.V., B. Liedberg, and D.L. Allara, *Chain-Length Dependence of the Structure and Wetting Properties in Binary Composition Monolayers of Oh-Terminated and Ch3-Terminated Alkanethiolates on Gold*. *Langmuir*, 1995. **11(10)**: p. 3882-3893.
21. Fenter, P., A. Eberhardt, and P. Eisenberger, *Self-Assembly of N-Alkyl Thiols as Disulfides on Au(111)*. *Science*, 1994. **266(5188)**: p. 1216-1218.
22. Delamarche, E., et al., *Thermal-Stability of Self-Assembled Monolayers*. *Langmuir*, 1994. **10(11)**: p. 4103-4108.
23. Love, J.C., et al., *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology*. *Chemical Reviews*, 2005. **105(4)**: p. 1103-1169.

24. Cyganik, P., et al., *Self-Assembled Monolayers of ω -Biphenylalkanethiols on Au(111): Influence of Spacer Chain on Molecular Packing*. The Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(16): p. 4989-4996.
25. Ulman, A., *Formation and structure of self-assembled monolayers*. Chemical Reviews, 1996. **96**(4): p. 1533-1554.
26. Vericat, C., et al., *Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system*. Chemical Society Reviews, 2010. **39**(5): p. 1805-1834.
27. Vericat, C., et al., *Surface characterization of sulfur and alkanethiol self-assembled monolayers on Au(111)*. Journal of Physics-Condensed Matter, 2006. **18**(48): p. R867-R900.
28. Schreiber, F., *Structure and growth of self-assembling monolayers*. Progress in Surface Science, 2000. **65**(5-8): p. 151-256.
29. Dulcey, C.S., et al., *Deep Uv Photochemistry of Chemisorbed Monolayers - Patterned Coplanar Molecular Assemblies*. Science, 1991. **252**(5005): p. 551-554.
30. Ada, E.T., et al., *Ion beam modification and patterning of organosilane self-assembled monolayers*. Journal of Vacuum Science & Technology B, 1995. **13**(6): p. 2189-2196.
31. Ada, E.T., O. Kornienko, and L. Hanley, *Chemical modification of polystyrene surfaces by low-energy polyatomic ion beams*. Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(20): p. 3959-3966.
32. Xia, Y.N. and G.M. Whitesides, *Soft lithography*. Angewandte Chemie-International Edition, 1998. **37**(5): p. 551-575.
33. Perkins, F.K., et al., *Fabrication of 15 nm wide trenches in Si by vacuum scanning tunneling microscope lithography of an organosilane self-assembled film and reactive ion etching*. Applied Physics Letters, 1996. **68**(4): p. 550-552.

34. Liu, G.Y. and S. Xu, *Nanografting: A new fabrication method using simultaneous nanoshaving and molecular self-assembly*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1997. **214**: p. 29-IEC.
35. Götzhäuser, A., et al., *Nanoscale patterning of self-assembled monolayers with electrons*. Journal of Vacuum Science & Technology B, 2000. **18**(6): p. 3414-3418.
36. Lercel, M.J., et al., *Plasma etching with self-assembled monolayer masks for nanostructure fabrication*. Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films, 1996. **14**(3): p. 1844-1849.
37. Lercel, M.J., et al., *Sub-10 nm lithography with self-assembled monolayers*. Applied Physics Letters, 1996. **68**(11): p. 1504-1506.
38. Harnett, C.K., K.M. Satyalakshmi, and H.G. Craighead, *Low-energy electron-beam patterning of amine-functionalized self-assembled monolayers*. Applied Physics Letters, 2000. **76**(17): p. 2466-2468.
39. Lercel, M.J., et al., *Scanning-Tunneling-Microscopy Based Lithography of Octadecanethiol on Au and Gaas*. Applied Physics Letters, 1994. **65**(8): p. 974-976.
40. Lercel, M.J., et al., *Self-Assembled Monolayer Electron-Beam Resists on Gaas and Sio₂*. Journal of Vacuum Science & Technology B, 1993. **11**(6): p. 2823-2828.
41. David, C., et al., *Low energy electron proximity printing using a self-assembled monolayer resist*. Microelectronic Engineering, 1996. **30**(1-4): p. 57-60.
42. Smith, R.K., P.A. Lewis, and P.S. Weiss, *Patterning self-assembled monolayers*. Progress in Surface Science, 2004. **75**(1-2): p. 1-68.
43. Eck, W., et al., *Self-assembled monolayers as lithographic resists for physical and chemical nanostructures*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2000. **219**: p. U513-U513.
44. Eck, W., et al., *Generation of surface amino groups on aromatic self-assembled monolayers by low energy electron beams - A first step towards chemical lithography*. Advanced Materials, 2000. **12**(11): p. 805-808.

45. Geyer, W., et al., *Electron-induced crosslinking of aromatic self-assembled monolayers: Negative resists for nanolithography*. Applied Physics Letters, 1999. **75**(16): p. 2401-2403.
46. Schmelmer, U., et al., *Surface-initiated polymerization on self-assembled monolayers: Amplification of patterns on the micrometer and nanometer scale*. Angewandte Chemie-International Edition, 2003. **42**(5): p. 559-+.
47. Schmelmer, U., et al., *Synthesis of patterned polymer brushes via surface-initiated polymerization on self-assembled monolayers*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2003. **225**: p. U623-U623.
48. Schmelmer, U., et al., *Nanostructured polymer brushes*. Small, 2007. **3**(3): p. 459-465.
49. Amin, I., et al., *Patterned Polymer Carpets*. Small, 2011. **7**(5): p. 683-687.
50. Turchanin, A., M. El-Desawy, and A. Götzhäuser, *High thermal stability of cross-linked aromatic self-assembled monolayers: Nanopatterning via selective thermal desorption*. Applied Physics Letters, 2007. **90**(5): p. -.
51. Küller, A., et al., *Nanostructuring of silicon by electron-beam lithography of self-assembled hydroxybiphenyl monolayers*. Applied Physics Letters, 2003. **82**(21): p. 3776-3778.
52. Völkel, B., et al., *Electrodeposition of copper and cobalt nanostructures using self-assembled monolayer templates*. Surface Science, 2005. **597**(1-3): p. 32-41.
53. Nottbohm, C.T., A. Turchanin, and A. Götzhäuser, *Metallization of organic monolayers: electroless deposition of Cu onto cross-linked aromatic self-assembled monolayers*. Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-International Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics, 2008. **222**(5-6): p. 917-926.
54. Mutoro, E., et al., *Photoelectron Microscopy*, in *Bunsenmagazin*2007. p. 18-33.
55. Briggs, D. and M.P. Seah, *Practical Surface Analysis by Auger and X-ray photoelectron spectroscopy*1987, Chichester [u.a.]: Wiley. XIV, 533 S.

56. Ertl, G. and J. Küppers, *Low energy electrons and surface chemistry*. 2., completely rev. ed 1985, Weinheim [u.a.]: VCH. XII, 374 S.
57. Solak, H.H., *Nanolithography with coherent extreme ultraviolet light*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2006. **39**(10): p. R171-R188.
58. Solak, H.H. and C. David, *Patterning of circular structure arrays with interference lithography*. Journal of Vacuum Science & Technology B, 2003. **21**(6): p. 2883-2887.
59. Rothschild, M., et al., *Liquid immersion lithography: Why, how, and when?* Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures, 2004. **22**(6): p. 2877.
60. Chou, S.Y., P.R. Krauss, and P.J. Renstrom, *Imprint Lithography with 25-Nanometer Resolution*. Science, 1996. **272**(5258): p. 85-87.
61. Wiley, B.J., D. Qin, and Y.N. Xia, *Nanofabrication at High Throughput and Low Cost*. Acs Nano, 2010. **4**(7): p. 3554-3559.
62. Goldstein, M., et al. *FEL Applications in EUV lithography*. in *Proc. 2005 FEL Conf.* 2005.
63. Ritucci, A., et al., *Interference lithography by a soft x-ray laser beam: Nanopatterning on photoresists*. Journal of Applied Physics, 2007. **102**(3): p. 034313.
64. Stamm, U., H. Schwoerer, and R. Lebert, *Strahlungsquellen für die EUV-Lithographie*. Physik Journal, 2002. **12**: p. 33-39.
65. Köhler, M., *Ätzverfahren für die Mikrotechnik* 1998, Weinheim [u.a.]: Wiley-VCH. XVI, 398 S.
66. Paul Scherrer Institut (XIL Beamline). Available from: <http://www.psi.ch/sls/xil/endstations>.
67. Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber, *Atomic Force Microscope*. Physical Review Letters, 1986. **56**(9): p. 930-933.
68. Knoll, M. and E. Ruska, *Das Elektronenmikroskop*. Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei, 1932. **78**(5): p. 318-339.

69. Egerton, R.F., *Physical principles of electron microscopy : an introduction to TEM, SEM, and AEM* 2005, New York, NY: Springer. XII, 202 S.
70. Ruska, E., *The Development of the Electron-Microscope and of Electron-Microscopy (Nobel Lecture)*. Angewandte Chemie-International Edition in English, 1987. **26**(7): p. 595-605.
71. O'Keefe, M.A., et al., *Sub-Angstrom high-resolution transmission electron microscopy at 300 keV*. Ultramicroscopy, 2001. **89**(4): p. 215-241.
72. O'Keefe, M.A., et al., *Sub-angstrom resolution of atomistic structures below 0.8 angstrom*. Philosophical Magazine B-Physics of Condensed Matter Statistical Mechanics Electronic Optical and Magnetic Properties, 2001. **81**(11): p. 1861-1878.
73. Gerthsen, C. and D. Meschede, *Physik : mit 94 Tabellen, 105 durchgerechneten Beispielen und 1074 Aufgaben mit vollständigen Lösungen und Visualisierungen der Relativitätstheorie auf CD-ROM ; [die ganze Physik zum 21. Jahrhundert]*. 23., überarb. Aufl. ed. Springer-Lehrbuch 2006, Berlin [u.a.]: Springer. XIX, 1162 S.
74. Minsky, M., *Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope*. Scanning, 1988. **10**(4): p. 128-138.
75. Engelhardt, J. and W. Knebel, *Konfokale Laserscanning-Mikroskopie*. Physik in unserer Zeit, 1993. **24**(2): p. 70-78.
76. Biacore, *BIA technology Handbook*, 1998.
77. Turchanin, A., et al., *Fabrication of molecular nanotemplates in self-assembled monolayers by extreme-ultraviolet-induced chemical lithography*. Small, 2007. **3**(12): p. 2114-2119.
78. NIST, *X-ray Photoelectron Spectroscopy Database 20, (Version 3.4, Web Version, 2003)*.
79. Schnietz, M., et al., *Chemically Functionalized Carbon Nanosieves with 1-nm Thickness*. Small, 2009. **5**(23): p. 2651-2655.

80. Briggs, D. and J.T. Grant, *Surface Analysis by Auger and X-Ray Photoelectron Spectroscopy*. Surface Analysis by Auger and X-Ray Photoelectron Spectroscopy, ed. D. Briggs and J.T. Grant 2003, Chichester: Surface Spectra Limited.
81. Christoph Nottbohm, *Carbon nanosheets and their applications*, 2009.
82. Turchanin, A., et al., *Molecular Mechanisms of Electron-Induced Cross-Linking in Aromatic SAMs*. Langmuir, 2009. **25**(13): p. 7342-7352.
83. Harder, P., et al., *Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption*. The Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(2): p. 426-436.
84. El-Desawy, M., *Characterization and Application of Aromatic Self-Assembled Monolayers*, 2007.
85. Liu, H., et al., *Investigation of the adhesion, friction, and wear properties of biphenyl thiol self-assembled monolayers by atomic force microscopy*. Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films, 2001. **19**(4): p. 1234.
86. Cerruti, M., et al., *Poly(ethylene glycol) Monolayer Formation and Stability on Gold and Silicon Nitride Substrates*. Langmuir, 2008. **24**(19): p. 10646-10653.
87. Rosenhahn, A., et al., *The role of "inert" surface chemistry in marine biofouling prevention*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. **12**(17): p. 4275-4286.
88. Turchanin, A., et al., *One Nanometer Thin Carbon Nanosheets with Tunable Conductivity and Stiffness*. Advanced Materials, 2009. **21**(12): p. 1233-+.
89. Ballav, N., et al., *Making Protein Patterns by Writing in a Protein-Repelling Matrix*. Angewandte Chemie-International Edition, 2009. **48**(32): p. 5833-5836.
90. Ducker, R.E., et al., *One-step photochemical introduction of nanopatterned protein-binding functionalities to oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(48): p. 14842-+.

91. Montague, M., et al., *Fabrication of biomolecular nanostructures by scanning near-field photolithography of oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers*. Langmuir, 2007. **23**(13): p. 7328-7337.
92. Sun, S.Q. and G.J. Leggett, *Generation of nanostructures by scanning near-field photolithography of self-assembled monolayers and wet chemical etching*. Nano Letters, 2002. **2**(11): p. 1223-1227.
93. Fu, J.P., P. Mao, and J. Han, *Artificial molecular sieves and filters: a new paradigm for biomolecule separation*. Trends in Biotechnology, 2008. **26**(6): p. 311-320.
94. Zimnitsky, D., V.V. Shevchenko, and V.V. Tsukruk, *Perforated, freely suspended layer-by-layer nanoscale membranes*. Langmuir, 2008. **24**(12): p. 5996-6006.
95. Eijkel, J.C.T. and A. van den Berg, *Active transport: a new chemical separation method? Lab on a Chip*, 2006. **6**(5): p. 597-600.
96. Eijkel, J.C.T. and A. van den Berg, *Nanotechnology for membranes, filters and sieves*. Lab on a Chip, 2006. **6**(1): p. 19-23.
97. Eijkel, J.C.T. and A. van den Berg, *Nanofluidics: what is it and what can we expect from it? Microfluidics and Nanofluidics*, 2005. **1**(3): p. 249-267.
98. Han, J.Y., J.P. Fu, and R.B. Schoch, *Molecular sieving using nanofilters: Past, present and future*. Lab on a Chip, 2008. **8**(1): p. 23-33.
99. Tong, H.D., et al., *Silicon nitride nanosieve membrane*. Nano Letters, 2004. **4**(2): p. 283-287.
100. Snyder, J.L., et al., *Lossless fractionation of complex protein mixtures with ultrathin silicon membranes*. Biophysical Journal, 2007: p. 162a-162a.
101. Striemer, C.C., et al., *Charge- and size-based separation of macromolecules using ultrathin silicon membranes*. Nature, 2007. **445**(7129): p. 749-753.
102. Williams, D.B. and C.B. Carter, *Transmission Electron Microscopy : A Textbook for Materials Science*. 2. ed2009, Berlin: Springer. LXII, 760, 15 S.

8 Veröffentlichungen

- [1] A. Turchanin, A. Tinazli, M. El-Desawy, H. Großmann, M. Schnietz, H. H. Solak, R. Tampé, A. Götzhäuser, *“Molecular self-assembly, chemical lithography and biochemical tweezers: a path for the fabrication of functional nanoscale protein arrays”*, Adv. Mater. 20 (2008) 471-477.
- [2] Turchanin, M. Schnietz, M. El-Desawy, H. H. Solak, C. David, A. Götzhäuser, *“Fabrication of molecular nanotemplates in self-assembled monolayers by extreme ultraviolet induced chemical lithography”*, SMALL, (2007), 3, 2114-2119
- [3] M. Schnietz, A. Turchanin, Ch. T. Nottbohm, A. Beyer, H. H. Solak, P. Hinze, Th. Weimann, A. Götzhäuser, *“Chemically functionalized carbon nanosieves with 1 nm thickness”*, SMALL, (2009), 5, 2651 – 2655
- [4] M.Schnietz, H. Großmann, R. Tampé, A. Turchanin, A. Götzhäuser, *“Surface immobilization of proteins by extreme UV interference lithography of protein resistant (OEG)-terminated SAMs”*, (in preparation)
- [5] A. Beyer, A. Turchanin, C. T. Nottbohm, N. Mellech, M. Schnietz A. Götzhäuser, *“Fabrication of Metal Patterns on Freestanding Graphenoid Nanomembranes”* Journal of Vacuum Science and Technology B (2010) 28, C6D5

9 Abkürzungen

AFM	Rasterkraftmikroskop (atomic force microscopy)
BPT	1,1'-biphenyl-4-thiol
BSA	Bovines Serumalbumin
CLSM	Konfokale Laserscanning Mikroskopie
CPD	kritischer Punkttrockner (critical point drying)
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimide
DMF	Dimethylformamide
DPN	Dip Pen Nanolithography
EBID	Electron beam induced deposition
EBL	Electron beam lithography
EUV	Extreme Ultraviolet
EUV-IL	Extreme UV Interferenz Lithographie
FWHM	full width half maximum
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HF	hydrofluoric acid
HIS	Histidine

HR TEM	high resolution TEM
HV	Hochvakuum (high vacuum)
Maleyol-NHS	3-(Maleimido)propionic acid N-hydroxysuccinimide ester
MBP	Maltose-Binding Protein
NA	Numerische Apertur (numerical aperture)
NBPT	4'-Nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol
NTA	N-nitrilotriacetic acid
OEG	Oligoethyleneglykol
PEG	Polyethyleneglykol
PMMA	polymethylmethacrylate
PR	Photolack (photoresist)
REM	Rasterelektronenmikroskop (scanning electron microscopy)
SAM	Selbst-aggregierende Monolage (self-assembled monolayer)
SEM	Rasterelektronenmikroskop (scanning electron microscopy)
SPR	Oberflächenplasmon Resonanz Spektroskopie
TEA	triethylamine
TEM	Transmissionselektronenmikroskop (transmission electron microscopy)
TFA	Trifluoro acetic acid

UHV Ultra Hochvakuum (ultra high vacuum)

UV Ultraviolett (ultraviolet)

XPS X-ray Photoelectron Spectroscopy

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: schematische Abbildung einer Selbst-aggregierenden Monolage (SAM). Die Bestandteile dieser Moleküle lassen sich in drei wesentliche Gruppen gliedern: Kopfgruppe, Spacer und Endgruppe. Während die Kopfgruppe für die Bindung zum Substrat verantwortlich ist, bestimmen Spacer und Endgruppe die intermolekularen Wechselwirkungen.....	8
Abbildung 2: schematische Darstellung von verschiedenen Methoden zur Strukturierung von SAMs. (entnommen aus [42])	9
Abbildung 3: schematische Darstellung zur EUV- und Elektronenstrukturierung von Nitrobiphenylthiol-SAMs.....	10
Abbildung 4: vereinfachte Darstellung des Funktionsprinzips einer Photoelektronen-Spektroskopie (Bild entnommen aus [54])	11
Abbildung 5: Hier ist die sogenannte Fundamentalkurve gezeigt, hierbei ist die mittlere freie Weglänge von Elektronen in verschiedenen Festkörpern als Funktion der Energie aufgetragen. [55].....	12
Abbildung 6: Energie Bandschema für die Probe und das Spektrometer: Die Fermi-Energie liegt durch die elektrische Verbindung zwischen Probe und dem Spektrometer auf dem gleichen Niveau.	14
Abbildung 7: Berechnete Wirkungsquerschnitt-Werte σ_A nach Scofield für eine Aluminium (K_α) Quelle und die Werte sind auf C1s Wirkungsquerschnitt normiert. [56]	15
Abbildung 8: schematische Darstellung einer Zweistrahlinterferenz.....	18

Abbildung 9: schematischer Aufbau einer Interferenzbeugungsmaske, durch Elektronenstrahl Lithographie und Ätzverfahren werden in Si_3N_4 Beugungsgitter erzeugt und zur Steigerung der Effizienz mit Chrom bedampft	19
Abbildung 10: schematische Darstellung von (a) Zwei- und (b) Vierstrahl Interferenzbeugungsmaske zur Herstellung von (a) Linien und (b) Loch bzw. Punktmustern (Bild entnommen aus [13])	19
Abbildung 11: Fotoaufnahme der in dieser Arbeit verwendeten Vierstrahlinterferenz Maske M314 mit einer Periode von $100\text{nm} \times 90\text{nm}$. Die Chipfläche beträgt $3 \times 3\text{mm}^2$ und die Maske ist in der Mitte des Chips zu sehen (Bild entnommen aus [13])	20
Abbildung 12: schematischer Aufbau der Maske M74 mit der parallel unterschiedliche Interferenzfelder geschrieben werden können: (i) Punktmuster (Periode 350nm), (ii) Linienmuster (Periode 250nm), (iii) Gitterstruktur (Periode 250nm) und (iv) Linienmuster (Periode 250nm).....	20
Abbildung 13: experimenteller Aufbau der XIL Beamline an der „Swiss Light Source“ am Paul Scherrer Institut [66]	21
Abbildung 14: schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops (AFM)	22
Abbildung 15: Kraftabstandskurve für die verschiedenen Arbeitsmodi eines atomaren Rasterkraftmikroskops	22
Abbildung 16: schematische Darstellung von den Rasterkraftmikroskop Betriebsarten im (a) Kontakt- und (b) Semikontakt- Modus.....	24
Abbildung 17: (v.l) Schema eines Transmissionselektronen Mikroskops und eines Lichtmikroskops [73]	27

Abbildung 18: schematischer Aufbau eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops. [Eigentum der Carl Zeiss AG].....	29
Abbildung 19: Prinzip eines Oberflächenplasmonresonanz Aufbaus (entnommen aus [76]).	30
Abbildung 20: XPS Spektren für den Fall (a) vor und nach Vakuum UV (He I, 21.2eV) Bestrahlung einer NBPT SAM (entnommen aus [77]) und (b) vor und nach Vernetzung der NBPT SAM mittels Elektronen (entnommen aus [9]).....	40
Abbildung 21: Verhältnis der Nitro zu Amino Gruppen aufgetragen als Funktion der EUV Strahlendosis. Das Inset zeigt die entsprechenden N1s XPS Spektren [9]	41
Abbildung 22: Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop einer NBPT Goldoberfläche mit sichtbaren Nitro / Amino Kontrast.....	42
Abbildung 23: Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop einer NBPT Goldoberfläche mit sichtbaren Nitro / Amino Kontrast. (a) AFM Aufnahme einer NBPT Probe mit einem Linienmuster mit einer Breite von 30nm dargestellt und (b) der entsprechenden Fast Fourier Transformation, aus der die Periodizität von 60nm eindeutig ersichtlich wird. In (c) ist ein Ausschnitt dargestellt für ein Linienmuster der Periode 100nm, was einer Linienbreite von 50nm entspricht.	43
Abbildung 24: schematische Darstellung des Konzeptes der Immobilisierung über Metallionen Komplexe. Durch Hinzufügen eines Metallionen werden Metall-Chelatkomplexe gebildet. An diese Komplexe werden His-tagged Proteine über den Metall Komplex angebunden und können entweder durch Hinzugabe von EDTA oder Imidazol wieder entfernt werden. [14].....	44

Abbildung 25: Schematische Darstellung zur Herstellung von Proteinchips aus der Lösung [9]	45
Abbildung 26: schematische Darstellung eines (a) tri-ethylen glycol Moleküls und (b) eines Multivalenten Chelatkomplexes mit drei NTA Funtionalitäten. Diese NTA Gruppen sind mit tert-butyl Schutzgruppen versehen. [9] (c) schematische Darstellung der His-Tag / NTA Wechselwirkung	46
Abbildung 27. Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop einer NBPT Goldoberfläche mit sichtbaren Nitro / Amino Kontrast. (a) schematische Darstellung (b) Topographie Aufnahme mit 50nm breite Linien Struktur (Amino / Nitro Kontrast) und im darunter befindlichen Höhenprofil wird eine Höhendifferenz von $\sim 1\text{nm}$ angezeigt (c) Analoge Aufnahme im lateralen Kraft Modus.	47
Abbildung 28: Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop einer NBPT / C16-EG3 Chipoberfläche. (a) schematische Darstellung (b) In der Topgraphie Aufnahme ist eine 50nm breite Linien Struktur (Amino / C16-EG3 Kontrast) sichtbar und eine erwartete Zunahme im Höhenprofil mit $\sim 1.5\text{nm}$ (c) entsprechende Phasen Kontrast Aufnahme	48
Abbildung 29: Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop einer Proteinchipoberfläche mit funktionalen Nanoarrays von His6-Proteasome Komplexen. (a) schematische Darstellung (b) 50nm breite Linien Struktur sichtbar, Höhenprofil entspricht nicht dem erwarteten Wert (c) Gleiche Probe nach Freikratzen mit AFM Spitze zeigt nun die erwartete Höhe von 15nm für das Proteasom Protein.	49
Abbildung 30: Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop einer Proteinchipoberfläche mit funktionalen Nanoarrays von His6-Proteasome Komplexen. (a) schematische Darstellung (b)	

500nm große Punktstruktur sichtbar, Höhenprofil entspricht der Größe des Proteasom Proteins mit 15nm.....	50
Abbildung 31: schematische Darstellung der Ankopplung von trisNTA mittels „Maleoyl-NHS“	52
Abbildung 32: Röntgenphotoelektronenspektroskopische Untersuchung einer Probe vor (blaue Linie) und nach der Ankopplung (rote Linie) von tris-NTA mittels Maleoyl-NHS. Ein Vergleich der beiden Spektren zeigt die erfolgreiche Ankopplung, es sind deutliche Veränderungen in den N1s, O1s und C1s Signalen sichtbar.	53
Abbildung 33: Röntgenphotoelektronenspektroskopische Untersuchung einer Probe nach der Ankopplung von tris-NTA-SH mittels Maleoyl-NHS und zusätzlicher Aufladung der NTA-Derivate mit Nickel Metall-Ionen.....	53
Abbildung 34: Oberflächen Plasmon Resonanz-Analyse (SPR) von multivalenten NTA funktionalisierten Oberflächen. Nach Ankopplung der NTAs die Proben wurden und eine bisNTA-SAM Oberfläche als Referenzprobe mittels SPR Spektrometer analysiert. Die Probenoberfläche wurde nach Hinzugabe einer Lösung mit 300nM his-tagged „Maltose Binding Protein“ (MBP _{H10}) untersucht, der schraffierte Bereich entspricht dem Zeitraum der Proteinzugabe. Die Zunahme in der Intensität ist hierbei ein Maß für die Proteinbindekapazität. Die Signale für die Kopplungsmethode mit Carboxy (COOH) sind im Vergleich zu der Referenzprobe deutlich kleiner. Während die Probe mit der neuen Ankopplungs-Chemie über „Maleoyl-NHS“-Ester eine vergleichbare Proteinbindekapazität wie die Referenzprobe aufweist.	54

- Abbildung 35: (a) schematische Darstellung (b) Fluoreszenzspektroskopie-Aufnahme während der Hinzugabe von 100nM MBPHis₁₀-OG488 Proteinen auf einer mit 1µm Punktmuster Elektronen strukturierte Probe 55
- Abbildung 36: (a) umgekehrte Präparation Reihenfolge führt zu invertierten Kontrast im Vergleich zu Standardankopplung in (b) 56
- Abbildung 37: Auch das Alter der verwendeten „Maleoyl-NHS“ Moleküle ist entscheidend (a) mit drei Monat alter Molekül-Charge und zum Vergleich Ankopplung mit (b) neuer Molekül-Charge..... 57
- Abbildung 38: Schematische Darstellung von (a) PEG-5000 Ankopplung an NBPT / Maleoyl-NHS Oberfläche (b) PEG 5000- SH Molekül..... 58
- Abbildung 39: Oberflächenresonanz (SPR) Sensogramm unterschiedlicher PEG5000-NBPT Proben. Nach Zufuhr von BSA Proteinen zeigt das Spektrum einen sprunghaften Anstieg im Signal. Dies bleibt anschließend konstant bis die Proteinzufuhr unterbrochen wird und auf den Ausgangswert wieder abfällt. Die so hergestellten Proben zeigen somit proteinabweisende Eigenschaften..... 59
- Abbildung 40: Röntgenphotoelektronenspektroskopische Untersuchung einer Probe vor (blaue Linie) und nach der Ankopplung (rote Linie) von PEG 5000 mittels Maleoyl-NHS. Ein Vergleich der beiden Spektren zeigt die erfolgreiche Ankopplung, aufgrund der deutlichen Veränderungen im O1s und C1s Signal. 59
- Abbildung 41: Schema und XPS Spektren zur Untersuchung von Strahlenschäden an OEG SAMs. a) XPS Spektrum für die Referenz und drei ausgewählte Proben mit unterschiedlicher Dosis bei 50eV b) schematische Darstellung von Elektronen / Photonen induzierter

Strahlenschäden in Abhängigkeit der Dosis an OEG-SAM Oberflächen. c) schematische Darstellung des tri-ethylene glycol (HS-C₁₆-EG₃-OH) Moleküls mit der Kennzeichnung der spezifischen drei Kohlenstoffspezies C(I) Alkyl C(II) Carboxyl und C(III) Ethylenteil..... 62

Abbildung 42: Schema und XPS Spektren zur Untersuchung von Strahlenschäden an OEG SAMs mit unterschiedlichen Dosen für die kinetischen Energien (a) 5 eV, (b) 6 eV, (c) 7 eV und (d) 8 eV 63

Abbildung 43: Schema und XPS Spektren zur Untersuchung von Strahlenschäden an OEG SAMs mit unterschiedlichen Dosen für die kinetischen Energien (a) 10 eV und (b) 20 eV 64

Abbildung 44: Die Verhältnisse aus den C(II) und C(I) der bestrahlten OEG SAMs wurde hier als der Dosis für verschiedene Energien aufgetragen. Als „guide for the eye“ wurde eine Linie durch die Messpunkte gelegt. Dabei fällt auf das die Beschädigung für den Ethylenglykolanteil im Bereich von 5-7 eV kleinere Raten aufweist. Während für Energien größer als 7eV die Rate besonders stark ansteigt und bei 10-20 eV eine Sättigung ergibt. ... 64

Abbildung 45: In (a) und (b) sind AFM Lateralkraft Aufnahmen zu sehen, die jeweils eine Probe zeigen, die durch EUV-IL und der gleichen Maske erzeugt wurden. Durch Variation der Dosis (a) 100mJ cm⁻² und (b) 800mJ cm⁻² zeigt sich entsprechend eine Änderung in der Strukturgröße von (a) 163nm ± 17nm zu (b) 214nm ± 24nm. In (c) ist eine Topographie Aufnahme zu sehen, bei der eine Maske mit 100nm Strukturen verwendet wird und durch Überbestrahlung entstanden hier Punktmuster mit 50nm Durchmesser. Ein entsprechendes Linienprofil ist in (d) abgebildet und zeigt sehr deutlich einen Höhenunterschied von 1.6nm. Dies entspricht sehr gut der Moleküllängendifferenz von einem HS-C₁₆-OH (dunkler Bereich) und HS-C₁₆-EG₃-OH (heller Bereich) OEG Moleküls. 66

Abbildung 46: (a) X-Ray Photoelektron Spektroskopie (XPS) Charakterisierung von einer bisNTA-SAM als Referenzprobe, einer unbestrahlten OEG-SAM und einer Elektronenbestrahlten modifizierten OEG-SAM Probe. Die OEG Proben wurden jeweils für eine Stunde in einer 20 μ M Thiol Lösung (25 mol% bisNTA Thiol and 75 mol% Matrix Thiol in Acetonitrile) eingelegt. In (b) ist eine schematische Darstellung des Austauschprozesses eines OEG SAMs (i) vor der Bestrahlung und (ii) nach der Bestrahlung mit Elektronen zu sehen. .. 67

Abbildung 47: schematische Darstellung: (a) Ein 16-mercaptohexadecanoic acid (triethylene glycol) ester (HS-C16-EG₃-OH) SAM wird auf einem Goldsubstrat ausgebildet. (b) Die Strukturierung des SAM erfolgt mit Hilfe der EUV-IL durch eine Vierstrahlinterferenz. (c) In dem bestrahlten SAM Bereichen erleiden die EG₃-Moleküle Strahlenschäden, wodurch Löcher in dem SAM entstehen. (d) Diese werden in durch Thiol Moleküle mit *N*-nitriilotriacetic acid (NTA) Derivaten wieder aufgefüllt. (e) Durch Komplexbindung mittels Metallionen können Histidine markierte Proteine an diese NTA Derivate spezifisch angebunden werden. 68

Abbildung 48: LSM Aufnahmen von Elektronen und EUV Interferenz Lithographie strukturierten Proben nach Auffüllen der beschädigten Bereiche mit trisNTA-Thiol Molekülen und Ankopplung von Fluoreszenz markierten MBP Proteinen. Die beschädigten Moleküle in den bestrahlten Bereichen wurden in einem Zeitraum von 25 min gegen bisNTA- und EG₃-Thiole in Acetonitril ausgetauscht (aufgrund der sterischen Hinderung der verzweigten bisNTA-Thiole muss die Austauschlösung EG₃-Thiole enthalten, in diesem Fall ca. 75 mol%, welche die Bereiche zwischen den bisNTAs ausfüllen können; andernfalls kann sich keine gleichmäßige SAM ausbilden). Danach wurden die bisNTAs mit 10 mM NiSO₄ beladen und 100 nM MBP_{H10}-OG400 hinzugefügt. a) schematische Darstellung nach Auffüllen der beschädigten EG₃ Bereiche b) LSM Aufnahmen von Strukturen durch Elektronenstrahl

Lithographie (1 μ m Punkte) und EUV-IL (350nm Punkte und 250nm Linien) hergestellten EG3 Oberflächen..... 70

Abbildung 49: schematische Darstellung: Nach Ausbildung einer SAM (a) auf Gold / Glimmer Substrat wird die Probe mittels EUV-IL (b) strukturiert. Durch das Auftragen (spin-coating) einer Polymerschicht auf die strukturierte Probe wird (c-d) die SAM mit der Goldschicht vom Glimmer Substrat mit Hilfe einer HF Ätzlösung abgelöst. Anschließend wird die Goldunterlage mit einer KI2 Lösung entfernt und die Folie auf ein neues Substrat mit Lochöffnungen gelegt (holey substrate). Die Polymerschicht die während dieses Prozesses als Stabilisierung bzw. Schutz diente wird im (e) letzten Schritt in Acetone aufgelöst..... 72

Abbildung 50: XPS Spektrum von einem Nanosheet (a) nach Ausbildung und Elektron Bestrahlung (50mC cm⁻²) auf Gold Substrat. (b) XPS Spektrum nach dem Transferprozeß des gleiche Films auf eine SiO₂ Oberfläche und (c) nach einem zusätzlichen Annealingsprozeß bei 523K für mehrere Stunden unter UHV Bedingungen. 74

Abbildung 51: Lichtmikroskopische Aufnahme nach dem Transfer auf ein SiO₂ Oberfläche. Im Inset ist die hier verwendete EUV Maske schematisch dargestellt. Der strukturierte Bereich mit der konstruktiven Interferenz ist durch ein weißschraffiertes Rechteck gekennzeichnet. Die Form eines Kreuzes ergibt sich aufgrund der Tatsache, dass die Photonen in den Randbereichen in nullter Ordnung und erster Ordnung ebenfalls die NBPT SAM vernetzen. 75

Abbildung 52: (a) Topographische AFM Aufnahme einer EUV strukturierten Probe (200 x 225 nm Maske) auf Gold / Glimmer Substrat. (b) Laterale Kraft AFM Aufnahme nach Transfer auf eine SiO₂ Oberfläche. Zu besseren Veranschaulichung der Periodizität wurde jeweils eine Fast Fourier Abbildung als Inset hinzugefügt..... 76

- Abbildung 53: Rasterelektronen Mikroskop Aufnahme (REM) einer transferierten Nanosieb Probe auf einem TEM Gitter der Firma Quantifoil mit einem Lochdurchmesser von $1\mu\text{m}$. Hierbei ist das vollständige TEM Gitter zu sehen und wie im Lichtmikroskop ist ein Kreuz zu sehen, welches aus dem Interferenz Gitter und den überbestrahlten nicht strukturierten Bereichen besteht. 76
- Abbildung 54: Rasterelektronen Mikroskop Aufnahmen (REM) einer transferierten Nanosieb Probe auf einem TEM Gitter der Firma Quantifoil mit einem Lochdurchmesser von $1\mu\text{m}$. Die Strukturgröße der verwendeten EUV Maske beträgt $100 \times 90 \text{ nm}$. Alle Aufnahmen sind an der gleichen Probenstelle durchgeführt worden und mit Zunahme der Anzahl der Aufnahmen sind eindeutig Vergrößerungen in den Nanosieböffnungen zu erkennen. Dies ist vermutlich auf Aufladungseffekte und dadurch induzierten Stress zurückzuführen, da die Nanosheets bei Raumtemperatur hergestellt, isolierend sind. [88] 78
- Abbildung 55: Die Strahlendiagramme zeigen die unterschiedlichen Kombinationen aus möglichen Einstellungen für die Objektaperturblende und der Linse, um (A) eine Hellfeld Aufnahme durch direkten Elektronenstrahlengang, (B) Dunkelfeld Aufnahme mit verschobener Aperturblende zu erzeugen. (Grafik entnommen aus [102]) 79
- Abbildung 56: TEM Aufnahmen von einem freistehenden Nanosieb auf einem TEM Gitter der Firma Quantifoil, welches einen Lochdurchmesser von $1\mu\text{m}$ besitzt. In (a) ist eine TEM Hellfeld Aufnahme einer Probe, welche mit einer EUV Maske der Periodizität von $200 \times 225 \text{ nm}$ bei 70 J cm^{-2} hergestellt wurde, zu sehen. In (b) die gleiche Stelle, jedoch erfolgte hier eine TEM Dunkelfeld Aufnahme mit verschobener Aperturblende. 80
- Abbildung 57: TEM Aufnahmen von drei unterschiedlichen freistehenden Nanosieben auf einem TEM Gitter der Firma Quantifoil, welches einen Lochdurchmesser von $1\mu\text{m}$ besitzt. In

(a) ist eine TEM Aufnahme einer Probe, welche mit einer EUV Maske der Periodizität von 200 x 225 nm bei 70 J cm^{-2} hergestellt wurde, zu sehen. Die Löcher sind nahezu kreisrund und haben einen Durchmesser von $138 \pm 17 \text{ nm}$. (b) Des Weiteren zeigte sich durch Erhöhung der Strahlendosis auf 120 J cm^{-2} , dass die Lochdurchmesser verglichen mit der Probe bei einer Dosis von 70 J cm^{-2} deutlich kleiner werden und nur noch $100 \pm 15 \text{ nm}$ betragen. In (c) ist eine TEM Aufnahme einer Probe mit einer Maske der Periodizität von 100 x 90 nm bei 50 J cm^{-2} gezeigt, woraus ein Durchmesser von $31 \pm 6 \text{ nm}$ resultiert. 81

Abbildung 58: (a) REM Aufnahme eines freistehenden Nanosiebes, welches mit einer Maske der Periodizität 100 x 90 nm und Dosis von 70 J cm^{-2} hergestellt wurde und mit einem Gold Film der Schichtdicke von 2-5 nm bedampft wurde. (b) Gleiche Probe noch einmal vergrößert und nachcoloriert, (c) Abbildung einer anderen Stelle auf der gleichen Probe und ebenfalls nachcoloriert 83

Abbildung 59: XPS Spektren von Strahlenschäden an OEG SAMs. XPS Spektrum mit unterschiedlicher Dosis bei 5eV 113

Abbildung 60: XPS Spektren von Strahlenschäden an OEG SAMs. XPS Spektrum mit unterschiedlicher Dosis bei 6eV 114

Abbildung 61: XPS Spektren von Strahlenschäden an OEG SAMs. XPS Spektrum mit unterschiedlicher Dosis bei 7eV 115

Abbildung 62: XPS Spektren von Strahlenschäden an OEG SAMs. XPS Spektrum mit unterschiedlicher Dosis bei 8eV 116

Abbildung 63: XPS Spektren von Strahlenschäden an OEG SAMs. XPS Spektrum mit unterschiedlicher Dosis bei 10eV 117

Abbildung 64: XPS Spektren von Strahlenschäden an OEG SAMs. XPS Spektrum mit unterschiedlicher Dosis bei 20eV 118

11 Anhang

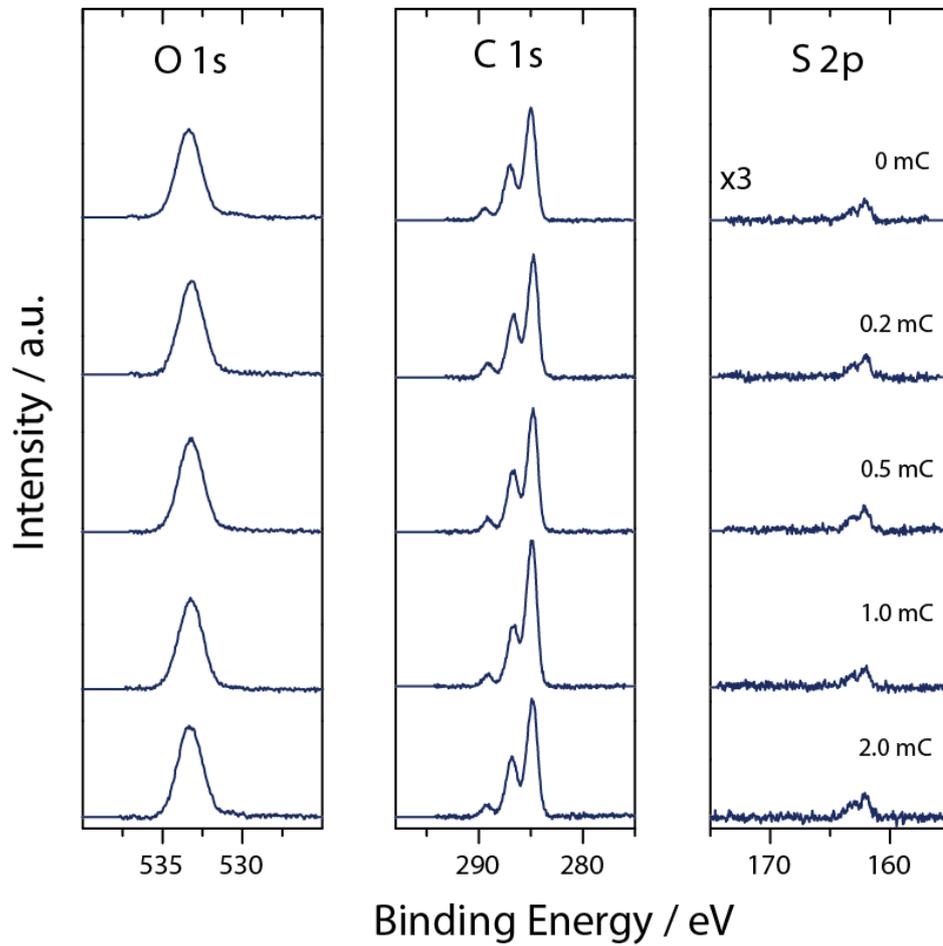


Abbildung 59: XPS Spektren von Strahlenschäden an OEG SAMs. XPS Spektrum mit unterschiedlicher Dosis bei 5eV

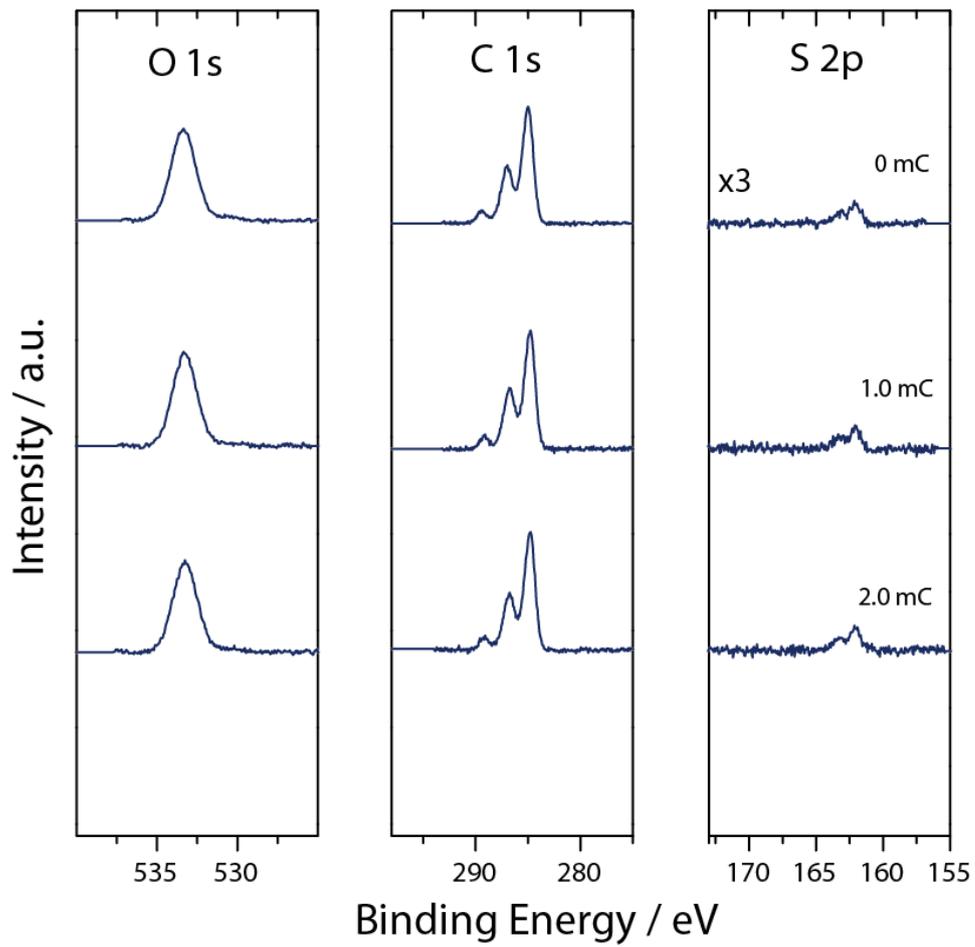


Abbildung 60: XPS Spektren von Strahlenschäden an OEG SAMs. XPS Spektrum mit unterschiedlicher Dosis bei 6eV

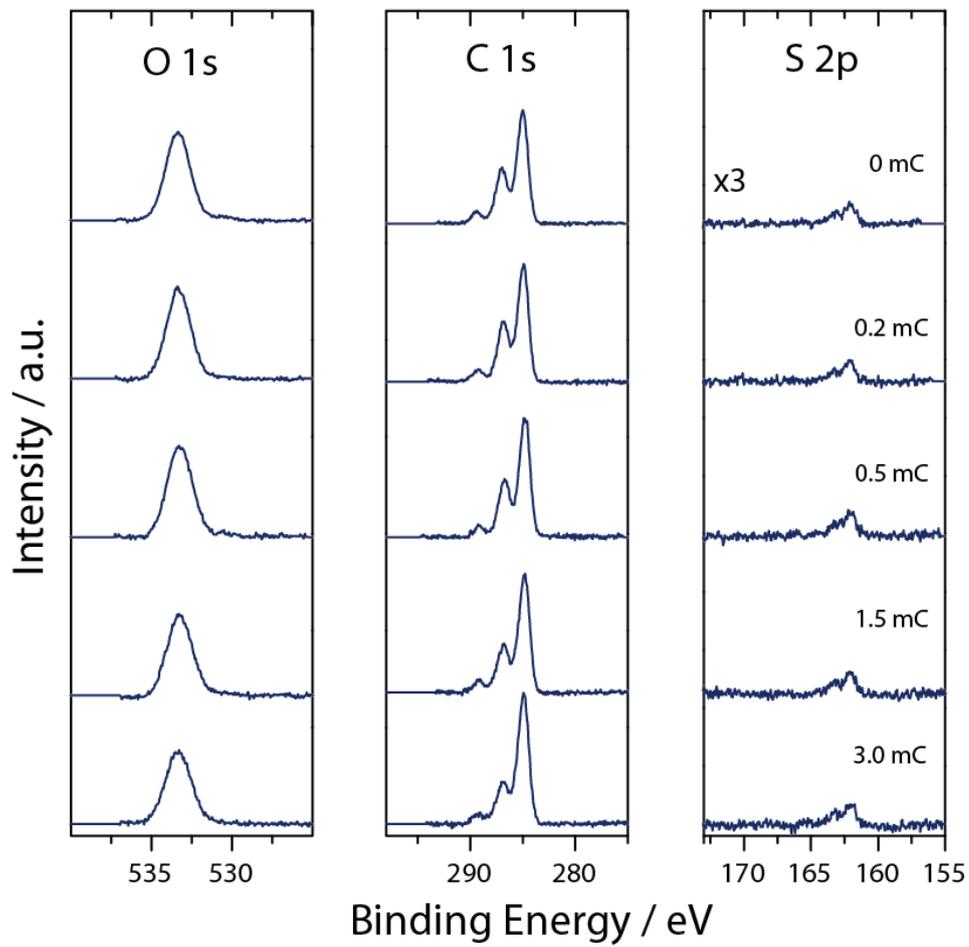


Abbildung 61: XPS Spektren von Strahlenschäden an OEG SAMs. XPS Spektrum mit unterschiedlicher Dosis bei 7eV

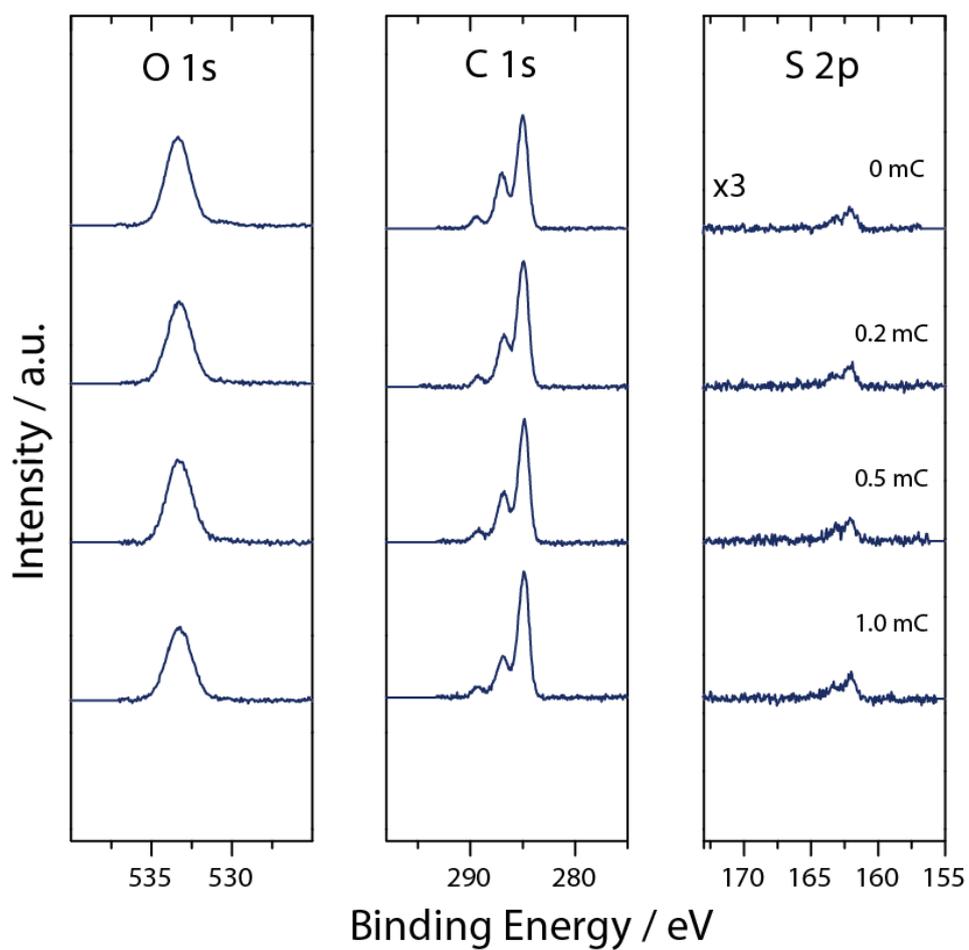


Abbildung 62: XPS Spektren von Strahlenschäden an OEG SAMs. XPS Spektrum mit unterschiedlicher Dosis bei 8eV

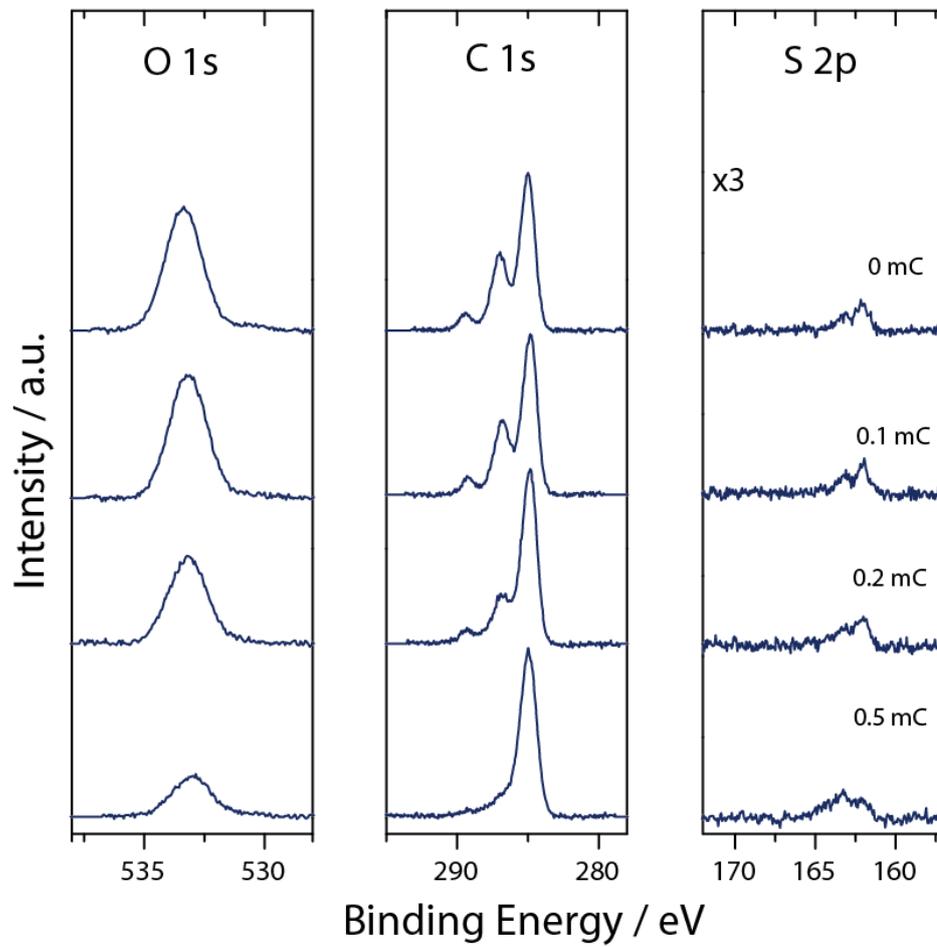


Abbildung 63: XPS Spektren von Strahlenschäden an OEG SAMs. XPS Spektrum mit unterschiedlicher Dosis bei 10eV

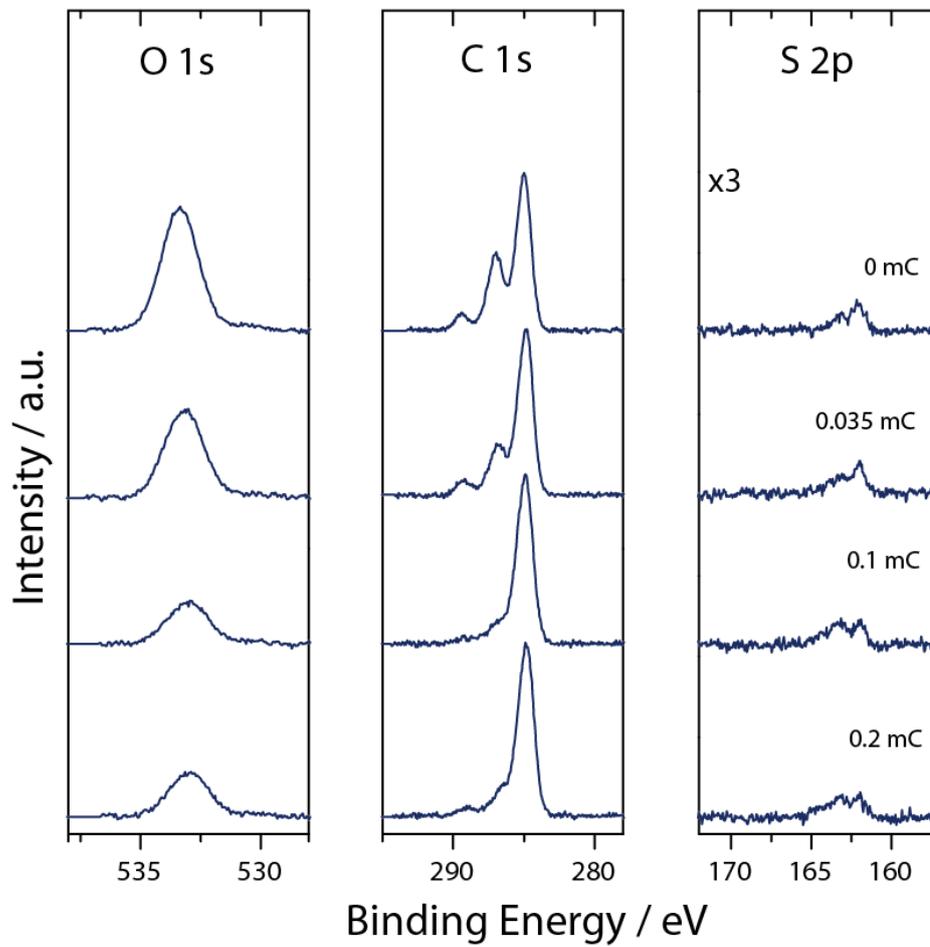


Abbildung 64: XPS Spektren von Strahlenschäden an OEG SAMs. XPS Spektrum mit unterschiedlicher Dosis bei 20eV

12 Danksagung

Vielen Dank an alle, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren:

Zu allererst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Armin Gölhäuser für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Möglichkeit diese interdisziplinäre Arbeit durchzuführen, sowie die offene und stets konstruktive Kritik.

Ebenso danke ich Dr. Andrey Turchanin und Dr. André Beyer für die ausführlichen Diskussionen und Unterstützung bei den vielen Projekten.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei meinen lieben Bürokollegen Dr. Christoph Nottbohm, Dr. Dirk Weber, Heiko Muzik, Matthias Büenfeld, Nils Mellech und Henning Vieker für die tolle Zeit und teilweise intensiven Diskussionen bei der Kaffeepause bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gebührt Frau Lorentzen, die bei allen organisatorischen Abläufen von der Einstellung bis zum Einreichen der Arbeit mit ihrer warmherzigen Art eine große Hilfe gewesen ist.

Bei Dr. Berthold Völkel für die tolle technische Unterstützung und kreativen Ideen bei den experimentellen Aufbauten bzw. Anlagen, vor allem für die Beschaffung und Bereitstellung der vielen Wafer und sonstigen Substrate.

Darüber hinaus danke ich Dr. Udo Werner für das langfristige Vertrauen als Praktikumsbetreuer. Als Tutor durfte ich hierbei noch so einiges über die Tücken der Fehlerrechnung und deren Anwendung in den vielen Studentenprotokollen lernen.

Ein besonderer Dank gebührt dem Studenten Daniel Emmrich, der mich später bei einigen Experimenten besonders bei AFM Messungen unterstützt hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei den vielen Kooperationspartnern, die diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben:

Für die Unterstützung und die tolle Zeit in der Schweiz an der EUV Beamline danke ich besonders Dr. Harun Solak, der auch jederzeit bei Fragen zu dieser Technik sein Hilfe gewährt hat.

Dann möchte ich mich bei Helge Großmann und Prof. Dr. Tampé bedanken, für die Möglichkeit einen Proteinchip zu realisieren. Denn ohne ihre Know How und Material (NTAs und Proteine) wäre die Arbeit in der Form nicht möglich gewesen. Darüber hinaus danke ich Helge für die vielen hilfreichen Diskussionen ohne die Ich als Physiker in der Biochemie verloren gewesen wäre.

In diesem Zusammenhang danke ich den SFB Projektpartnern Christian Schmidt und Prof. Dr. Godt aus der Chemie.

Für die Anfertigung zahlreicher TEM Aufnahmen danke ich Peter Hintze an der PTB Braunschweig.

Abschließend möchte ich noch einmal bei meinen Eltern bedanken, die mich in allen Bereichen und Entscheidungen immer voll unterstützt haben.

Vielen Dank!

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel durchgeführt habe.

Bielefeld,