

# BMBF-Verbundprojekt

## MultiplexLAB on NanoChip

Multiplexes elektrisches, mechanisches und optisches Auslesen von biologischen Membranprozessen an Silizium-Nanoporenchips

Förderkennzeichen 0312031

### Abschlussbericht

#### Projektpartner

<p>Prof. Dr. Robert Tampé (Kordinator)</p>	<p>Johann Wolfgang Goethe Universität Institut für Biochemie Max-von-Laue-Str. 9 60438 Frankfurt am Main</p>
<p>Prof. Dr. Gerhard Abstreiter</p>	<p>Technische Universität München Walter Schottky-Institut Am Coulombwall 3 85748 Garching</p>
<p>Prof. Dr. Marc Tornow</p>	<p>Technische Universität Braunschweig Institut für Halbleitertechnik Hans-Sommer-Straße 66 38106 Braunschweig</p>
<p>Prof. Dr. Michael Huth</p>	<p>Johann Wolfgang Goethe-Universität Insitut für Experimentelle Physik Max-von-Laue-Str. 1 60438 Frankfurt am Main</p>
<p>NanoScale Systems GmbH</p>	<p>Technologiezentrum Darmstadt (TIZ) Robert-Bosch-Str. 7 64293 Darmstadt</p>

# Inhalt

1	Aufgabenstellung und Planung .....	3
1.1	Aufgabenstellung .....	3
1.2	Planung und Ablauf .....	3
	A. Entwicklung einer generischen Siliziumchip-Architektur aus Nanoporen:.....	4
	B. Piezotunnel-resistiver Nanosensor für die Chipanwendung: .....	4
	C. Einzel-Molekül-Studien mit biochemischen Modellsystemen:.....	4
1.3	Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Vorhabens .....	5
1.4	Zusammenarbeit mit anderen Stellen .....	7
2	Forschungsarbeiten und Ergebnisse .....	8
2.1	Teilprojekt A1 (Prof. Dr. Gerhard Abstreiter / Dr. Ulrich Rant) .....	8
a)	Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Vergleich mit der ursprünglichen Planung .....	8
b)	Vergleich Stand des Vorhabens mit ursprünglicher Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung .....	16
2.2	Teilprojekt A2 (Prof. Dr. Marc Tornow).....	18
a)	Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Vergleich mit der ursprünglichen Planung .....	18
b)	Vergleich Stand des Vorhabens mit ursprünglicher Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung .....	24
c)	Relevante Forschungsergebnisse von dritter Seite während der Projektlaufzeit.....	26
2.3	Teilprojekt B1 (Prof. Dr. Michael Huth).....	27
a)	Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Vergleich mit der ursprünglichen Planung .....	27
b)	Relevante Forschungsergebnisse von dritter Seite während der Projektlaufzeit.....	36
2.4	Teilprojekt B2 (Nanoscale Systems GmbH).....	38
a)	Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Vergleich mit der ursprünglichen Planung .....	38
b)	Vergleich Stand des Vorhabens mit ursprünglicher Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung .....	49
c)	Relevante Forschungsergebnisse von dritter Seite während der Projektlaufzeit.....	50
3.1	Teilprojekt C (Prof. Dr. Robert Tampé) .....	51
a)	Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Vergleich mit der ursprünglichen Planung .....	51
b)	Vergleich Stand des Vorhabens mit ursprünglicher Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung .....	59
c)	Relevante Forschungsergebnisse von dritter Seite während der Projektlaufzeit.....	61
3.2	Verwertbarkeit der Ergebnisse, Verwertungsplan .....	62
3.3	Erfolge und geplante Veröffentlichungen .....	63
a)	Originalarbeiten (peer-reviewed).....	63
b)	Übersichtsartikel.....	65
c)	in Vorbereitung bzw. eingereicht .....	65

# 1 Aufgabenstellung und Planung

## 1.1 Aufgabenstellung

Sowohl aus akademischer als auch wirtschaftlicher Sicht ist die Untersuchung von Membranproteinen von größtem Interesse. Etwa ein Drittel aller menschlichen Proteine ist an der Membran organisiert; aufgrund ihrer zentralen Rolle in einer Vielzahl essentieller Prozesse wie Signaltransduktion, Zell-Zell-Kommunikation, Differenzierung und Energiewandlung stellen sie etwa 60% aller Zielmoleküle. Die Charakterisierung von Membranproteinen ist daher von eminenter Bedeutung für die Aufklärung von Krankheitsursachen sowie die Entwicklung neuer, effektiver Wirkstoffe für die Medizin. Um weitreichende *Screening*-Verfahren effizient realisieren zu können, sind automatisierbare Analyseverfahren im Nanomaßstab gefordert. Die Möglichkeit, Analysen auch kleinster Probenmengen – idealerweise an einzelnen Molekülen – in möglichst kurzer Zeit durchführen zu können, ist insbesondere für Membranproteine ein entscheidendes Kriterium, da diese meist nur in geringen Mengen verfügbar sind und bereits nach kurzer Zeit *in vitro* ihre native Funktionalität einbüßen.

Die ubiquitäre Rolle von Membranproteinen legt nahe, dass diese aufgrund unterschiedlicher Charakteristiken oftmals eine individuelle Wahl der geeignetsten Analyseverfahren erfordern. Es ist daher Ziel des Projekts, eine gemeinsame Analyseplattform für Membranproteine zu entwickeln, die mehrere hochempfindliche, komplementäre Auslesemethoden (optisch, mechanisch, elektrisch) in sich vereint. Diese Plattform wird auf einer ultraflachen nanostrukturierten Chipoberfläche realisiert, die geordnete Felder von unterätzten Nanoporen trägt. Durch die Aufbringung einer artifiziellen Lipidmembran bilden diese separate geschlossene Kompartimente, in denen parallelisiert Protein-vermittelter Transport bis hin zur Ebene der Einzelmolekülanalyse verfolgt werden kann. Insbesondere nicht-elektrogener Membrantransport soll so einer parallelen Analyse zugänglich gemacht werden.

Die direkte Integration eines mechanischen Nanosensors in die Geometrie der Chipoberfläche soll die Beobachtung biokinematischer Prozesse (Zelladhäsion, Motilität) unter Ausnutzung des piezotunnelresistiven (PTR) Effekts ermöglichen. Gleichzeitig würde der Sensor eine wirksame Auslese- bzw. Kontrollmöglichkeit für die Überspannung der Öffnungen durch die Lipidmembran und die Insertion von Membranproteinen darstellen.

## 1.2 Planung und Ablauf

Das Gesamtprojekt gliederte sich in die folgenden Abschnitte:

- A1 Fertigung und Optimierung der Nanoporenoberflächen
- A2 Elektrische Messtechnik, Entwicklung einer vollständig transparenten Chiparchitektur

- B1 & B2      Entwicklung der piezotunnelresistiven (PTR) Nanosensoren, EBID, elektrochemische Prozesse
- C              Biofunktionalisierung der Oberflächen und zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen von Protein-vermitteltem Membrantransport

**Zeitplan**

*Halbjahr*

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

**A. Entwicklung einer generischen Siliziumchip-Architektur aus Nanoporen:**

- A-1: Nanostrukturierungstechniken für Poren
- A-2: Elektrische Messtechnik, Kavitätenkonzept für direkten Elektrolytkontakt
- A-3: Strukturierung der Kavitätenoberseite zur elektromechanischen Auslesung
- A-4: Integration FET-Sensorik (EBID-Struktur)
- A-5: Integration in Mikrofluidiksysteme

■	■	■	■	■	■
■	■	■	□	□	□
□	■	■	■	■	■
□	■	■	■	■	■
□	□	□	□	■	■

**B. Piezotunnel-resistiver Nanosensor für die Chipanwendung:**

- B-1: Herstellung einzelner PTR-Sensoren mit elektrischer Kontaktierung
- B-2: Elektromechanische Charakterisierung der Membranspannung
- B-3: Sensorrauschen aufgrund Brownscher Molekularbewegung
- B-4: Entwicklung eines 5x5-Parallelfeldes von PTR-Sensoren

■	■	■	■	■	■
□	■	■	□	□	□
□	□	■	■	□	□
□	□	□	■	■	■

**C. Einzel-Molekül-Studien mit biochemischen Modellsystemen:**

- C-1: Membran-Deposition und Verifikation des Membranüberspannens
- C-2: Einsatz einfacher Membranproteinsysteme
- C-3: Etablierung der Einzelmolekülmikroskopie
- C-4: Kombination von optischen und elektr. Ausleseverfahren
- C-5: Einzelmolekülstudien an Membrantransportproteinen

■	■	□	□	□	□
■	■	■	□	□	□
□	□	■	■	■	■
□	□	□	■	■	■
□	□	□	□	■	■

## 1.3 Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Beginn des Vorhabens

### A. Präparation und Charakterisierung von Nanoporen-Kavitäten Arrays

Mittels einer Kombination von Elektronenstrahlolithographie, reaktivem Ionenätzen und selektivem, nasschemischen Ätzen konnten auf der Grundlage von *Silicon-on-Insulator* (SOI)-Substraten großflächige Arrays von Nanoporen-Kavitäten hergestellt werden. Die Strukturen wurden eingehend mittels Rasterelektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie (AFM) untersucht. In Kooperation mit Teilprojekt C gelang bereits frühzeitig die funktionelle Überspannung der Nanoaperturen mit Lipidmembranen mittels Vesikelfusion und deren Nachweis durch Fluoreszenz-Erholungsexperimente (FRAP) und AFM-Analytik.

### B. Piezotunnel-resistiver Nanosensor für die Chipanwendung

Die standardmäßigen Verfahren für die Detektion der Auslenkung von Cantilever- und Membranstrukturen basieren hauptsächlich auf zwei Funktionsprinzipien:

- (i) Der optischen Detektion mittels eines reflektierten Laserstrahls
- (ii) Dem piezoresistiven Effekt in dotierten Halbleitern

Beide Prinzipien beinhalten jedoch signifikante Nachteile für die in diesem Projekt verfolgten Ziele, insbesondere für den Nachweis der Kraftsignaturen molekularer Ereignisse in den Lipiddoppelschichten.

Die optische Detektion ermöglicht zwar Messungen mit sehr hoher Empfindlichkeit, allerdings sind Mindestgrößen für Cantilever- und Membranstrukturen von  $\sim 10 \mu\text{m}$  nötig, um eine hinreichend definierte Reflexion des Laserlichts zu gewährleisten. Für den Nachweis und die Detektion von Einzel-Molekülereignissen sind aber möglichst kleine und dünne Cantilever- und Membranstrukturen wünschenswert, bei denen die optische Detektion an Ihre Grenzen stößt. Die optische Detektion in Flüssigkeiten wird zusätzlich erschwert, da Grenzflächeneffekte berücksichtigt und kompensiert werden müssen. Gleichzeitig ist die Parallelisierbarkeit (Multi-Cantilever Arrays) nur mit hohem technischem Aufwand möglich.

Piezoresistive Sensoren bieten den Vorteil einer komplett elektrischen Messmethode und einer vollen Integrierbarkeit des Sensors auf dem Cantilever oder der Membran, wodurch Messungen in Flüssigkeiten erleichtert werden. Allerdings ist die Empfindlichkeit im Vergleich zu dem optischen Verfahren deutlich reduziert. Prinzipiell ließe sich die Empfindlichkeit durch Verkleinerung der Cantilever mit paralleler Vergrößerung des Dicken-zu-Längen-Verhältnisses erhöhen, wobei aber auch hier prozessbedingt enge Grenzen gesetzt sind. Die Herstellung der piezoresistiven Sensorschichten erfolgt in der Regel über Dotierung einer Siliziumschicht und anschließende thermische Prozesse, um eine homogene Verteilung der Dopanten im Sensorbereich zu gewährleisten. Für die Sensorfunktion ist es notwendig die Dotierung in die oberflächennahen Regionen zu beschränken, da anderenfalls der piezoresistive Effekt gegen Null geht.

Das Ziel dieses Vorhabens bestand nun darin ein neuartiges Messprinzip für die Detektion der Auslenkung von Cantilever- und Membranstrukturen zu verwenden, das auf Grundlage des *piezotunnelresistiven Effekts* (PTR-Effekt) basiert. Dieser Effekt tritt vorwiegend in nanogranularen Metallen auf. Das Messprinzip nutzt dabei die exponentielle Abstandsabhängigkeit des Ladungstransports zwischen den metallischen Nanopartikeln in einer normalerweise isolierenden Matrix. In ersten Vorarbeiten wurden Untersuchungen bezüglich des elektronischen Transports in diesen nanogranularen Metallen durchgeführt. Der Ladungstransport zwischen den Nanopartikeln erfolgt dabei über Tunnelprozesse. Dabei beobachtet man für die Leitfähigkeit in Abhängigkeit der Temperatur ein Coulomb-korreliertes *Variable-Range Hopping* Verhalten der Form  $\ln \sigma \sim T^{1/2}$ .

Die Herstellung des PTR-Sensorstrukturen erfolgt dabei mittels der elektronenstrahl-induzierten Deposition (*electron-beam induced deposition*: EBID), das im Vorhaben speziell für die Herstellung elektronisch funktionaler Strukturen angepasst wurde. Das EBID Verfahren basiert auf der durch den fokussierten Elektronenstrahl eines Rasterelektronenmikroskops induzierten Dissoziation von (metall-) organischen Präkursor-Molekülen auf einer Substratoberfläche. Durch die hohe Auflösung des Elektronenstrahls sind dabei Strukturen <20 nm einfach realisierbar, wodurch der Aufbau von sehr kompakten und empfindlichen Sensoren möglich wird (z.B. sehr kleine und dünne Cantilever). Durch geeignete Wahl des Präkursororgases und der Depositionsparameter (Elektronenenergie, Strahlstrom, Präkursor-Partialdruck, etc.) besteht zusätzlich die Möglichkeit, die Eigenschaften der Deponate zu beeinflussen. So lassen sich metallartige, halbleitende und isolierende Deponate erzeugen und damit die elektrischen Eigenschaften der Sensorstrukturen anwendungsbezogen festlegen. Ein weiterer Vorteil der PTR-Sensorstrukturen in Kombination mit dem EBID-Prozess ist die Möglichkeit auf nahezu jedem Substrat die Sensorstrukturen abscheiden zu können und auch komplizierte 3D-Strukturen erstellen zu können.

Die NanoScale Systems GmbH hat für die Kerntechnologie der PTR-Sensorstrukturen und EBID-Cantilever vor Beginn des Vorhabens (05/2006) eine Schutzrechtsanmeldung beim deutschen Patent- und Markenamt durchgeführt.

### **C. Biofunktionalisierung der Oberfläche durch artifizielle, biomimetische Membranen**

Durch das Spreiten und die Fusion von Lipidvesikeln auf der Chipoberfläche konnte diese mit einer unilamellaren Lipidschicht bedeckt werden. Es zeigte sich, dass eine glatte, hydrophile Oberfläche für die Ausbildung der Membran auf der Oberfläche unverzichtbar ist. Die Homogenität der Bedeckung wurde durch Fluoreszenzmikroskopie von markierten Lipiden nachgewiesen. Die für die funktionelle Insertion von Membranproteinen notwendige laterale Mobilität der Lipide innerhalb der Membran wurde durch Fluoreszenz-Erholungsexperimente (FRAP) gezeigt. Durch den Einbau von Chelatorlipiden in die

planare Lipidmembranen konnten lösliche Proteine mit Histidin-Markierung spezifisch auf der Chipoberfläche gebunden werden.

#### 1.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Heißdraht-CVD-Beschichtungen mit amorphem Silizium wurden vom Fraunhofer Institut für Schicht- und Oberflächentechnik, Braunschweig, AG Dr. Höfer, durchgeführt. Ein Teil der Nanostrukturierung von *Silicon-on-Insulator* (SOI)- bzw. *Silicon-on-Sapphire* (SOS)- Substraten mittels Elektronenstrahlolithographie wurde von der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB), AG Dr. Weimann, durchgeführt.

Messungen des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der PTR-Sensorstrukturen werden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Jens Müller (Goethe Universität, Frankfurt) durchgeführt.

Messungen bezüglich der Mikrostruktur und Kristallinität der PTR-Deponate werden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. A. Frangakis (Goethe Universität, Frankfurt) durchgeführt.

Die Synthetisierung des Silan-Oligomer Präkursors, der für die Passivierung der PTR-Sensorstrukturen, sowie die Erzeugung von binären PTR-Sensorstrukturen verwendet wurde, fand in der Arbeitsgruppe von Prof. Andreas Terfort und Prof. Norbert Auner (Goethe Universität, Frankfurt) statt.

Die Herstellung von speziellen Cantilever- und Membran-Strukturen werden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Friedemann Völklein (RheinMain University Wiesbaden) durchgeführt.

Messungen an dem mechanosensitiven Kanal MscL werden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Armagan Koçer (Groningen, NL) durchgeführt.

## 2 Forschungsarbeiten und Ergebnisse

### 2.1 Teilprojekt A1 (Prof. Dr. Gerhard Abstreiter / Dr. Ulrich Rant)

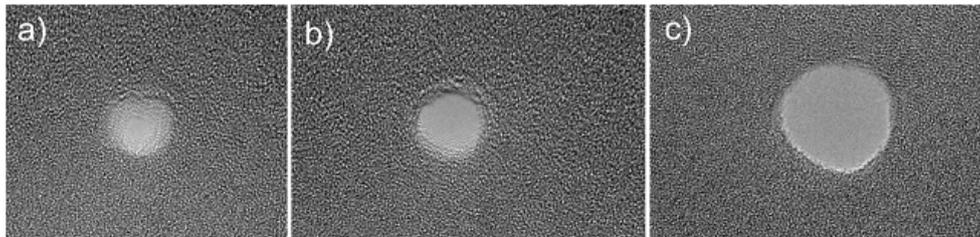
#### a) Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Vergleich mit der ursprünglichen Planung

##### Porenherstellung<sup>1,2</sup>

Ein zentrales Ziel des TP A1 war die Herstellung von Nanoporen und Kavitäten in Halbleitersubstraten. Die Arbeiten im TP A1 konzentrierten sich dabei auf das Materialsystem Silizium/Siliziumnitrid. Verschiedene Prozessierungsmethoden wurden untersucht:

- (1) Direktes „Bohren“ mit einem hochenergetischen Elektronenstrahl (300 keV TEM)
- (2) Direktes „Bohren“ mit einem fokussierten Ionenstrahl (FIB)
- (3) Strukturierung mit Elektronenstrahlolithographie (e-beam lithography)
- (4) Verjüngung von vordefinierten e-beam litho Poren durch Bestrahlung mit mittlere-energetischen Elektronen (100 keV TEM)

Die Methoden (1) und (3) erwiesen sich als besonders erfolgreich. Mittels direkten Bohrens mit einem 300 keV Elektronenstrahl ließen sich Nanoporen mit Durchmessern unter 2 nm reproduzierbar erzeugen.



**Abbildung 1: Nanoporen in 50 nm SiN Membran, hergestellt durch direktes Bohren mit 300 keV Elektronenstrahl in einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM). Durchmesser: a) 1.8 nm, b) 5 nm, c) 10 nm.**

Für die Herstellung von Poren mit Durchmessern >10 nm wurden systematische Untersuchungen mit Elektronenstrahlolithographie durchgeführt. Aufgrund der Parallelität des Verfahrens eignete es sich besonders gut zur Herstellung von Nanoporen-Feldern, weshalb es für die im TP C beschriebenen Experimente mit Lipid-Doppelschichten

---

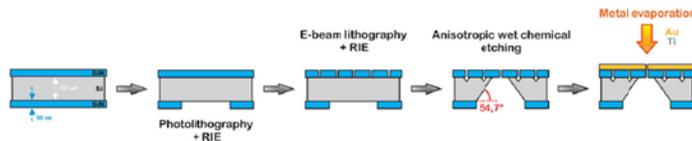
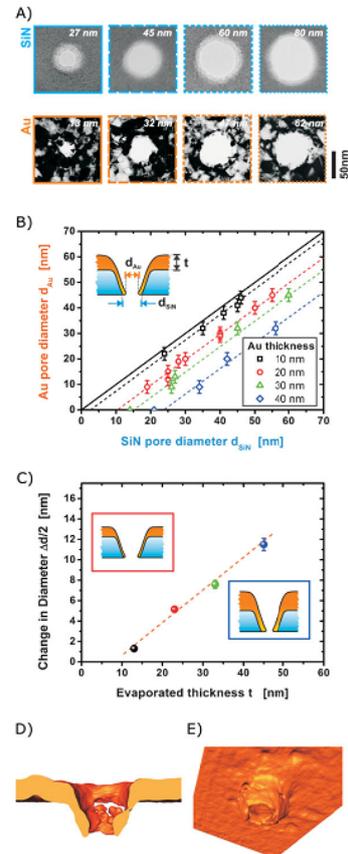
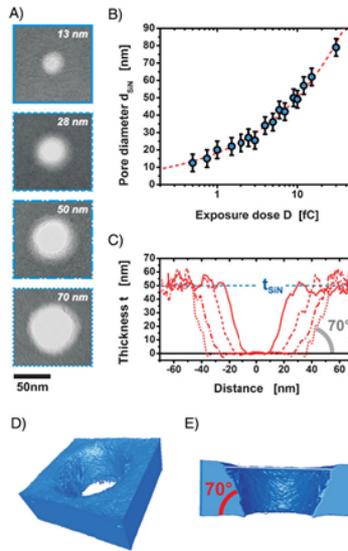
<sup>1</sup> Wei *et al.*, *Small* **2010**, 6, 1406 (Titelartikel)

<sup>2</sup> *Nano Letters* (2010) 10 (12), 5080–5087

überspannten Kavitäten eingesetzt wurde. Während der Projektdauer wurden routinemäßig etliche dutzend Proben für das TP C hergestellt.

### **Metallisierte Nanoporen1**

Es wurde ein neues Konzept zur Herstellung metallisierter Nanoporen in Siliziumnitrid Membranen für Einzelmolekülmessungen entwickelt. Poren unterschiedlicher Durchmesser ( $>10$  nm) wurden in freistehende SiN Membranen mittels Elektronenstrahlolithographie und reaktivem Ionenätzen prozessiert. Strukturuntersuchungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop inklusive Tomographie enthüllten eine konische Porenform mit einem Öffnungswinkel von  $40^\circ$ . Metallische Schichten aus Ti und Au wurden durch Verdampfen im Vakuum aufgebracht und die Porenform sowie die Verjüngung der Poren in Abhängigkeit der deponierten Filmdicke untersucht. TEM Tomographie Analysen bestätigten die Metallisierung der inneren Porenwände und den Erhalt der konischen Porenform. In elektrischen Messungen des trans-Poren Ionenstroms in wässrigen Elektrolytlösungen zeigten die Poren ein sehr niedriges Stromrauschen. Die Anwendbarkeit der metallisierten Poren für die Detektion von einzelnen Molekülen wurde für Lambda-DNA gezeigt. Es wurden besonders langanhaltende Stromblockaden mit einer Feinstruktur spezifischer Strom-Niveaus beobachtet, was eine attraktive Wechselwirkung zwischen der DNA und den PEGylierten metallisierten Porenwänden vermuten lässt.



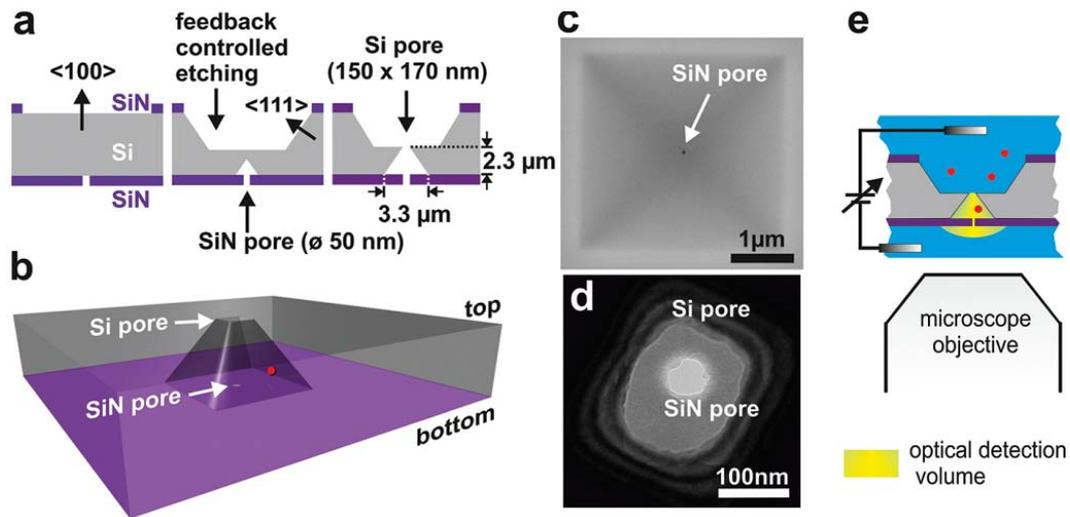
**Abbildung 2: Metallisierte Nanoporen.** Oben links: Cover Feature des Artikels in der Zeitschrift „Small“. Mitte oben: Herstellung von Nanoporen definierten Durchmessers mit Elektronenstrahlithographie und TEM Tomographie Bild. Mitte unten: Schematisches Herstellungsverfahren. Rechts: Metallisierung der SiN Nanoporen und Charakterisierung der Verjüngung in Abhängigkeit der Dicke der aufgedampften Metallschicht.

### Neuartiges Doppelporen-Bauelement: Pore-Cavity-Pore Device<sup>3,4</sup>

Im Rahmen des TP A1 wurde ein völlig neuartiges Konzept eines nano-fluidischen Nanoporen-Bauelements entwickelt und realisiert: das Pore-Cavity-Pore (PCP) Device.

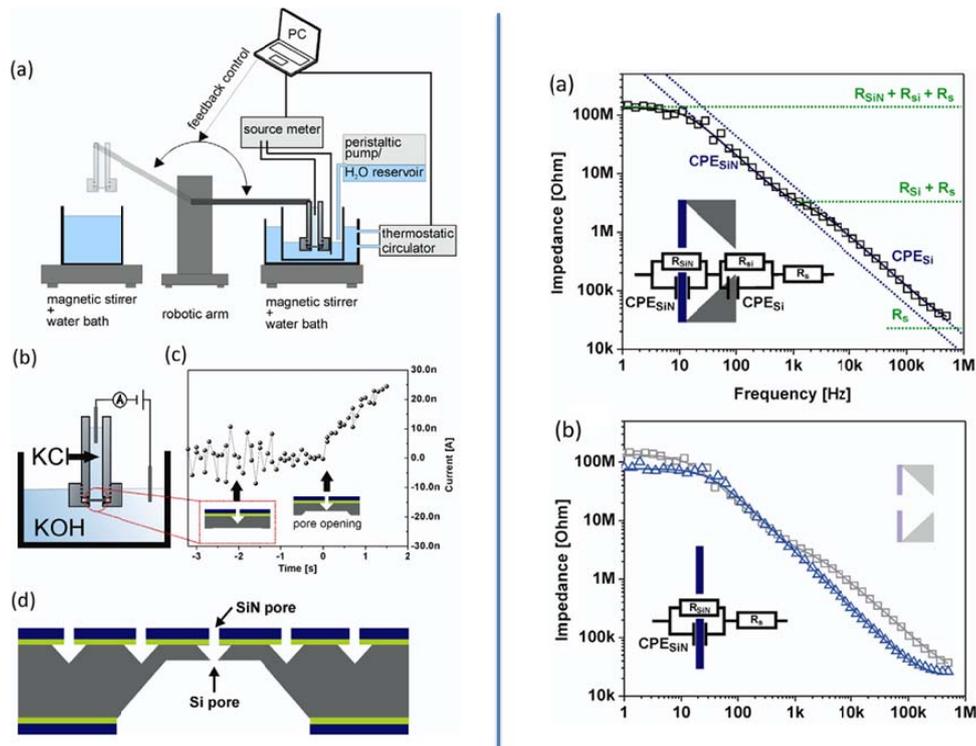
<sup>3</sup> Pedone *et al.*, *Nano Letters* **2011**, 111561

<sup>4</sup> Pedone *et al.*, *J. Phys. Condens. Matter* **2010**, 454115 (Sonderausgabe Nanoporen)



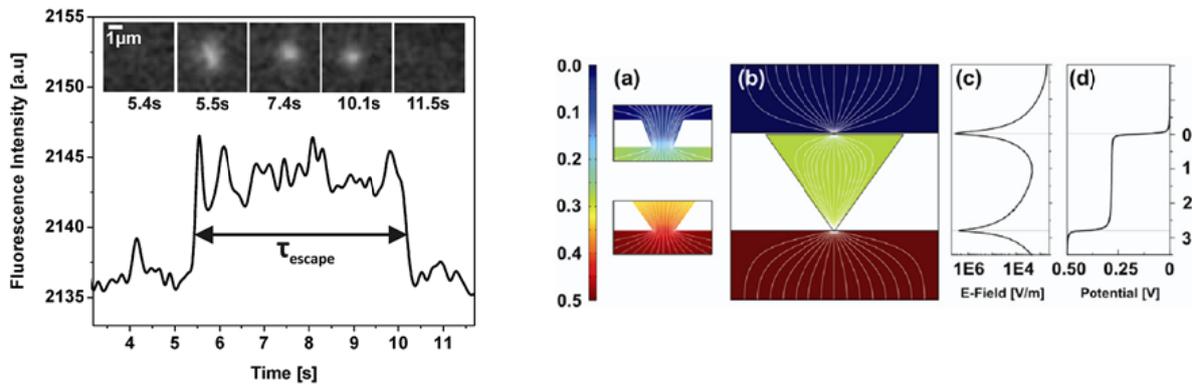
**Abbildung 3: Pore-Cavity-Pore Struktur.** a, b) schematische Darstellung, c) SEM Aufnahme, d) TEM Aufnahme, e) schematischer Messaufbau.

Die PCP-Struktur besteht aus zwei Nanoporen, die übereinander angeordnet sind und mit einer pyramidenförmigen Kavität von 10 femto-Liter Volumen verbunden sind. Die Herstellung der PCP-Struktur basiert auf der Prozessierung einer Nanopore in einer SiN-Membran mittels Elektronenstrahlolithographie, während die andere Nanopore in einem speziellen Feedback-gekoppelten Prozess nasschemisch in den Siliziumträger geätzt wird. Die Dimensionen der zwei Nanoporen sowie der Kavität können unabhängig voneinander eingestellt werden, was durch TEM Messungen bestätigt werden konnte. Das PCP-Bauelement wurde bezüglich seiner elektrischen Eigenschaften, inklusive Rauschverhalten und Impedanz, charakterisiert. Equivalent-Circuit Modelle konnten identifiziert und die Widerstände, Kapazitäten, und dielektrischen Verlustfaktoren quantitativ bestimmt werden. Weiters wurden die Verläufe des elektrischen Potentials und Feldes in der PCP-Struktur mit Finite Element Methoden simuliert. Die guten elektrischen Eigenschaften der PCP-Struktur (niedriges Stromrauschen, vergleichbar mit konventionellen Einzelporen) erlauben den Einsatz für die Detektion von einzelnen Molekülen.

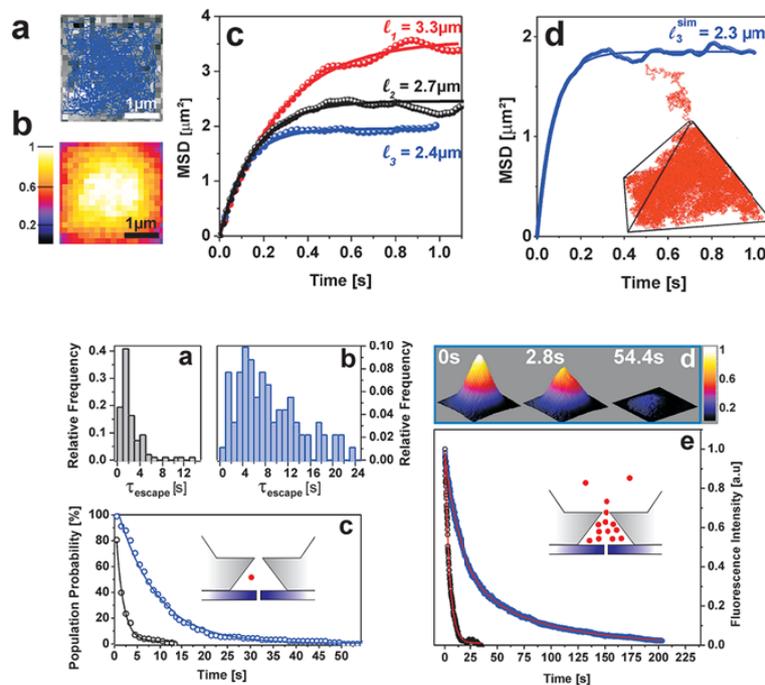


**Abbildung 4: PCP-Struktur Herstellung und elektrische Charakterisierung.** Links: Herstellung der Nanopore im Si-Träger durch Feedback-kontrolliertes Ätzen. Rechts: Elektrochemische Impedanzmessungen und Equivalent Circuits.

Die PCP-Struktur ist elektrisch adressierbar, sodass geladene Objekte aktiv in die Kavität gezogen, in der Kavität gespeichert, und aus der Kavität „entladen“ werden können. Wenn das Bauelement passiv betrieben wird (ohne angelegte Spannung), bestimmen die Brown'sche Molekularbewegung sowie die entropischen Barrieren der Nanoporen das Verhalten von Nanoobjekten innerhalb der Struktur. Es wurden Messungen mit einzelnen fluoreszierenden Nanopartikeln und Ensembles von Partikeln durchgeführt und deren Trajektorien und Verweildauern analysiert. Experimentelle Daten wurden mit „Random Walk“ Simulationen und analytischen Modellen für die räumlich eingeschränkte Diffusion und die Brown'sche Flucht über entropische Barrieren verglichen. Einzelpartikel-Daten unterstützen die analytischen Lösungen des „Narrow Escape Problem“, aber Messungen am Ensemble zeigen Verdrängungseffekte sogar bei geringen Teilchenkonzentrationen auf. Die Anwendung des PCP-Bauelementes auf Biomoleküle wurde anhand des Einfangens von einzelnen Lambda-DNA Molekülen gezeigt.



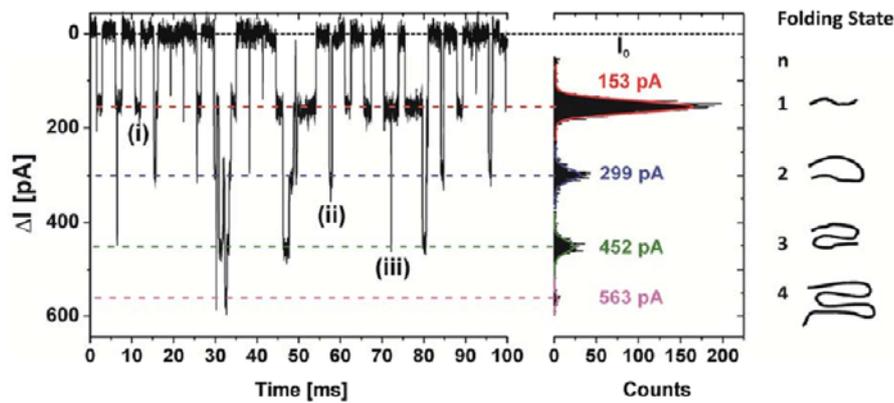
**Abbildung 5:** Optische Messungen der Verweildauer eines fluoreszierenden Nanopartikels in der Kavität (links) und Finite Element Simulation des elektrischen Feldverlaufs im PCP-Bauelement bei angelegter Spannung (rechts).



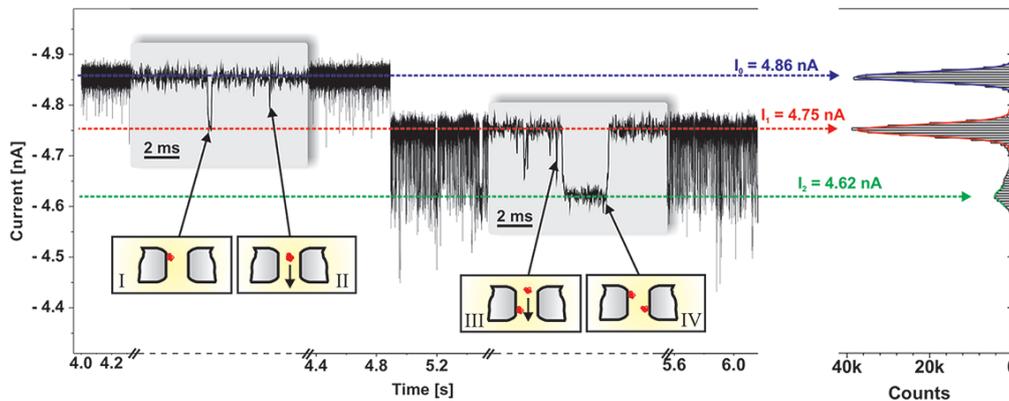
**Abbildung 6:** Brown'sche Diffusion von einzelnen Nanopartikeln in der Kavität (a, b, c, oben) und Random Walk Simulation (d oben). Narrow-Escape-Time Verteilungen von einzelnen Nanopartikeln (a, b, c, unten) und Nanopartikel-Ensembles (d, e, unten).

### Translokationen von einzelnen Bio-Molekülen durch Festkörper-Nanoporen

Gemäß den Vorhabenzielen wurden während der Förderperiode mehrere Aufbauten zur sensitiven Ionenstrommessung durch einzelne Festkörper-Nanoporen entwickelt und gebaut. Es gelang, Translokationen von einzelnen DNA Molekülen wie auch einzelnen Protein durch charakteristische Blockaden im Trans-Poren Ionenstrom nachzuweisen und systematische Messreihen durchzuführen.



**Abbildung 7: DNA Translokationen.** Links: Blockade-Ereignisse, die durch den Durchtritt einzelner Lambda-DNA Moleküle durch eine Festkörper-Nanopore entstehen (angelegte Spannung: 160 mV). Rechts: Strom-Histogramme, aus denen die verschiedenen Faltungszustände der DNA ersichtlich werden.



**Abbildung 8: Protein-Translokationen.** Stromblockaden, die durch Avidin-Proteine verursacht werden. Lang andauernde Ereignisse entstehen durch die unspezifische Adsorption von Proteinen in der Pore.

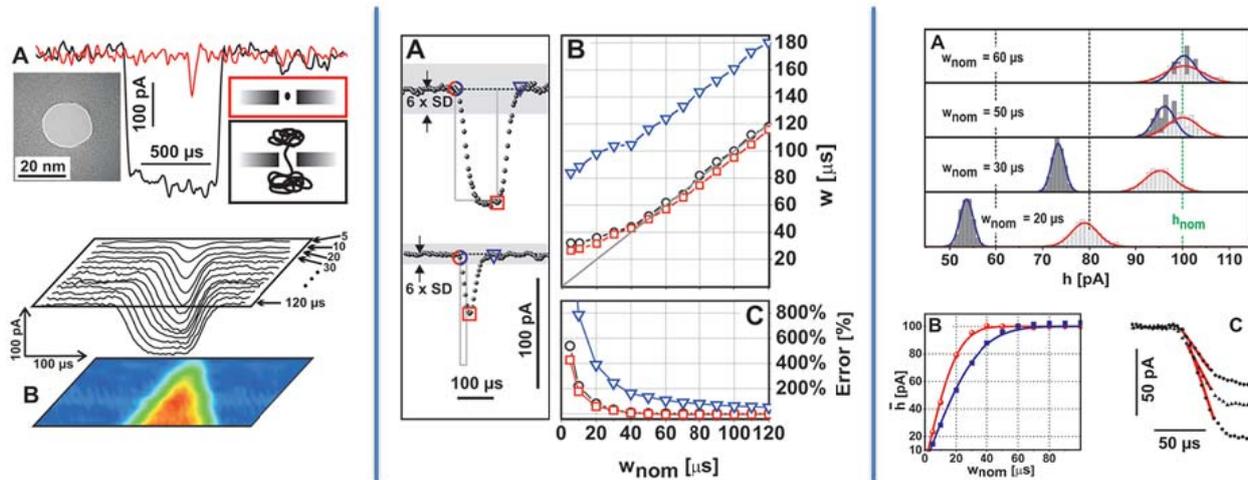
## Datenanalyse von Biomolekül Translokationen durch Nanoporen<sup>5</sup>

Nanoporen haben sich zu wichtigen Werkzeugen für Einzelmolekülexperimente entwickelt, wobei Informationen über die Eigenschaften von DNA/RNA Molekülen oder Proteinen aus Strompulsen (Blockaden) abgeleitet werden, die entstehen, wenn einzelne Moleküle die Nanopore passieren. Allerdings beschränken die elektronischen Filter, die notwendigerweise zur Rauschunterdrückung eingesetzt werden, die Auswertung von extrem kurzen Pulsen. Dies wiederum limitiert den Einsatz von Nanoporen für die Untersuchung von kleinen Molekülen, die die Pore sehr schnell passieren.

Aus diesem Grund wurde im TP A1 eine Methode entwickelt, die die Genauigkeit bei der Analyse von gefilterten Strompulsen deutlich verbessert. Es wurden verbesserte Kriterien zur Bestimmung der Pulse-Breite sowie eine Methode zur genaueren Bestimmung der Pulshöhe aus der fallenden Flanke des Pulses entwickelt. Die Methode erlaubt es auf eine

<sup>5</sup> Pedone *et al.*, *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 9689

Identifizierung des Puls-Plateaus in den Messdaten zu verzichten. Die neuen Methoden wurden mit konventionellen Routinen verglichen und validiert, indem Modell-Pulse und echte Protein-Translokationen analysiert wurden. Es wurde gezeigt, dass die neuen Methoden die üblichen Auswertemethoden übertreffen und es erlauben Bessel-gefilterte Pulse auszuwerten, die nur 30% der inversen Filter-Cutoff Frequenz „kurz“ sind.

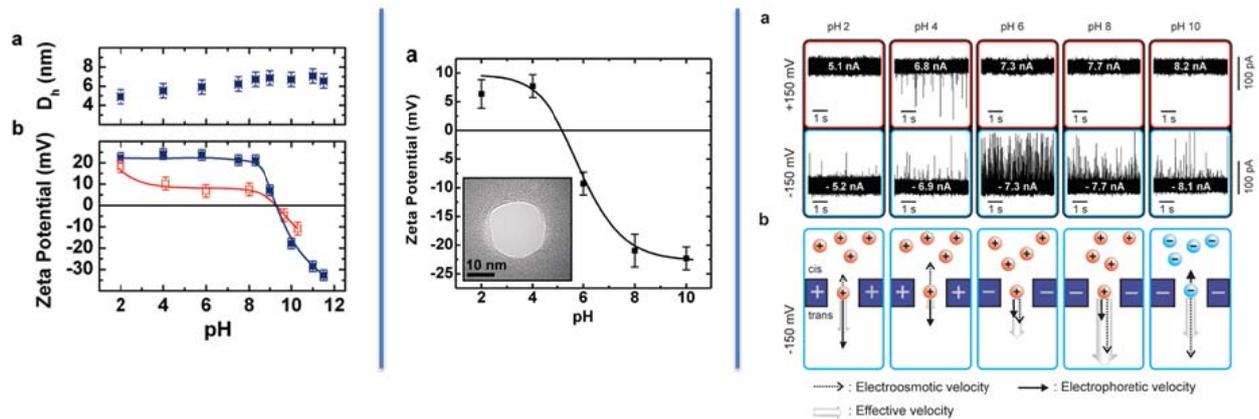


**Abbildung 9: Auswertemethoden für extrem kurze Translokations-Ereignisse.** Links: Exemplarische DNA- und Protein-Translokationen und die „Verzerrung“ von kurzen Pulsen durch Einsatz eines 10 kHz Filters. Mitte: Vergleich der verbesserten und üblichen Pulse Start-Stopp Kriterien zur Pulsbreitenbestimmung. Rechts: „Falling Edge“ Methode zur Pulshöhenbestimmung.

## Untersuchung der elektrischen Transportmechanismen, die Proteine durch Nanoporen bewegen<sup>6</sup>

Beim Durchtritt von Proteinen durch Festkörper-Nanoporen wurde ein unerwartetes Verhalten in Bezug auf die Richtung, Rate und Zeitdauer der Translokationen festgestellt. Deshalb wurde die Translokation eines Modellproteins (Avidin) durch eine SiN Nanopore im Hinblick auf die elektrokinetischen Effekte, die eine Translokation des Proteins verursachen, systematisch untersucht. Das Nanoporen-Zetapotential und das Protein-Zetapotential wurden unabhängig voneinander als Funktion des pH-Wertes der Lösung bestimmt. Unsere Ergebnisse zeigten, dass elektroosmotischer Transport den elektrophoretischen Transport verstärken, oder dominieren und umkehren kann. Die Messergebnisse konnten interpretiert werden, indem die Ladungszustände des Proteins und der Pore berücksichtigt wurden; die resultierende Translokationsrichtung kann aus der Differenz der Zetapotential des Proteins und der Pore abgeleitet werden. Wenn Elektrophorese und Elektroosmose sich gegenseitig aufheben, wird die Brown'sche Diffusion zu einem effektiven (und spannungs-unabhängigen) Transportmechanismus, der Proteine effizient durch eine Pore bewegen kann.

<sup>6</sup> Firnkes *et al.*, *Nano Letters* **2010**, *10*, 2162



**Abbildung 10: Elektrisch getriebene Translokationen von Proteinen durch SiN Nanoporen.** Gemeinsame und entgegengesetzte Wirkung von Diffusion, Elektrophorese, und Elektroosmose. Links: Zetapotential-Messung eines Modellproteins (Avidin) in Abhängigkeit des pH Wertes. Mitte: Zetapotential-Messung einer SiN Nanopore. Rechts: Translokationsereignisse bei verschiedenen pH Werten. Die Pfeile deuten die Richtung und relative Stärke der elektrophoretischen und elektroosmotischen Kräfte an.

## b) Vergleich Stand des Vorhabens mit ursprünglicher Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung

### A1-MS1 Erfolgreiche Präparation von Kavitäten / Präparation von Poren <10 nm

Herstellungsmethoden für Poren, Kavitäten, und Kavitäten-Felder mit nahezu beliebig einstellbaren Dimensionen wurden erfolgreich für das Silizium/Siliziumnitrid Materialsystem entwickelt.

### A1-MS2 Realisation des Messaufbaus für empfindliche Ionenstrommessungen

Elektrische und optische Messaufbauten zur Messung von Einzelmolekül-Ereignissen in Nanoporen wurden erfolgreich realisiert.

### MS3 siehe TP A2

### A1-MS4 Nachweis der Translokation von biologischen Makromolekülen durch Nanoporen

Translokationen von einzelnen DNA Molekülen und verschiedenen Proteinen konnten erfolgreich mit elektrischen und optischen Methoden nachgewiesen werden.

### A1-MS5 Implementierung einer Gate Elektrode

Metallisierte Nanoporen konnten erfolgreich entwickelt werden, die das Anlegen einer Gate-Spannung in der Pore erlauben.

## A1-MS6 Präparation eines Kavitäten-Arrays

Kavitäten-Arrays basierend auf dem Si/SiN Materialsystem wurden erfolgreich hergestellt, nach den Anforderungen des TP C optimiert und dem TP C zur Verfügung gestellt.

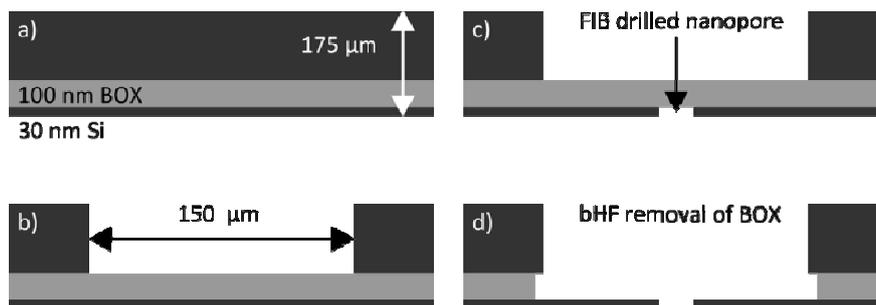
## 2.2 Teilprojekt A2 (Prof. Dr. Marc Tornow)

### a) Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Vergleich mit der ursprünglichen Planung

Ein HEKA Patchclamp-Amplifier-System *EPC 10 USB Double* für empfindliche elektrophysiologische Messungen wurde gemäß Geräteliste des Teilprojekts beschafft und unter Verwendung eines speziell abgeschirmten Faraday-Messplatzes für die Messungen des Ionenstroms zum Nachweis der elektrophoretischen Translokation von DNA eingerichtet.

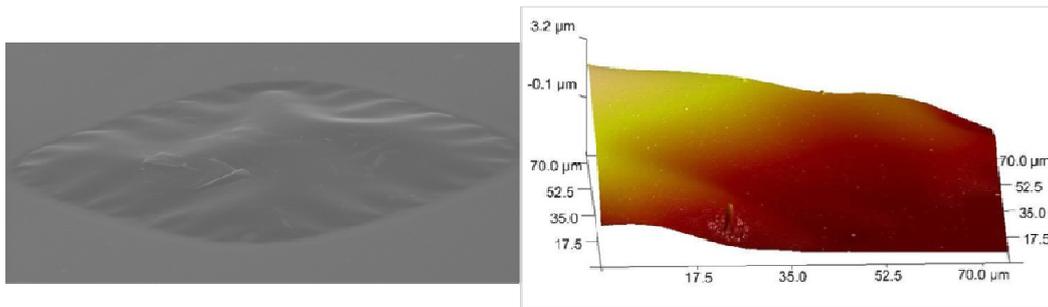
### Präparation von Silizium Nanoporen-Strukturen

Auf der Grundlage von Silicon-on-Insulator (SOI) -Materialien konnten erfolgreich Technologieprozesse zur Herstellung von freitragenden Siliziummembranen mit einzelnen Nanoporen entwickelt werden. Abbildung 1 zeigt den grundsätzlichen Präparationsablauf für Membranen mit Dicken 30-200 nm. Die in Prozessschritt (c) eingebrachten Nanoporen wurden in Kooperation mit Teilprojekt B1 durch fokussierten Ionenstrahl (Focused Ion Beam, FIB) mit Porendurchmessern im Bereich 25-45 nm erzeugt.



**Abbildung 1: Präparation freitragender Siliziummembranen mit Nanoporen.** Ausgehend von einem auf 175 µm gedünnten SOI-Substrat (a) wird mittels optischer Lithographie und trockenchemischem Ätzen (RIE-Kryo-Prozess) ein rückseitiges, quadratisches Zugangsloch der Kantenlänge 150 µm präpariert (b). Nach vorderseitiger Nanoporenstrukturierung mittels fokussiertem Ionenstrahl (FIB) (c) wird abschließend die dünne Si-Membran durch selektives Ätzen der vergrabenden Oxidschicht (buried oxide, „BOX“) mittels gepufferter Fluorwasserstoffsäure (buffered HF, bHF) freigegeben (d).

Die freitragend präparierten Siliziummembranen wurden eingehend mittels Rasterelektronenmikroskopie und AFM untersucht. Sie weisen eine außerordentlich geringe Rauigkeit (RMS-Wert = 0.2 nm) auf, die dem des unprozessierten Substrats entspricht. Wie aus Abb. 2 ersichtlich, weisen die dünnen Siliziumschichten gegenüber dem umgebenden SOI-Substrat ausgeprägte, makroskopische Aufwölbungen bzw. Verformungen von bis zum einigen µm über die gesamte Fläche auf. Diese sind auf mechanische Verspannungen in der Siliziummembran zurückzuführen, welche herstellungsbedingt im Ausgangs-SOI-Substrat (Hochtemperatur-Waferbonding-Prozesse) vorhanden sind und erst durch die Ablösung aus dem Substrat zu sichtbaren Verformungen führen.

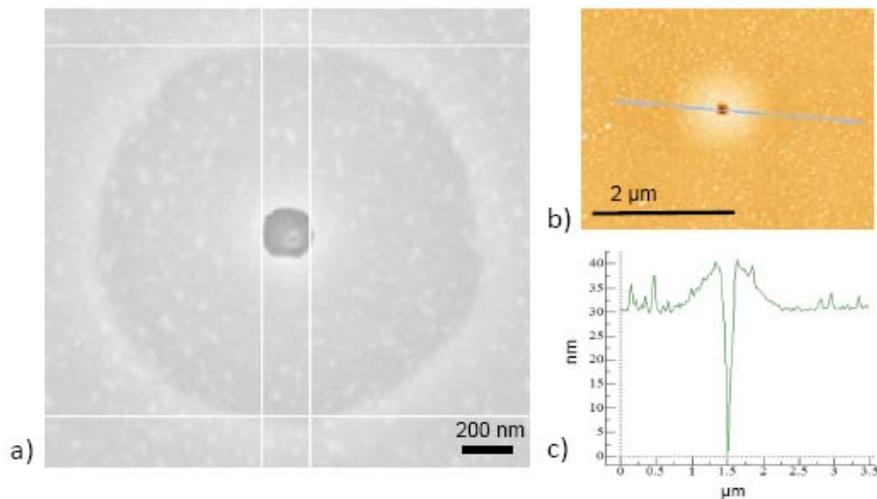


**Abbildung 2: Charakterisierung freitragender Siliziummembranen.** Links: Rasterelektronenmikroskopie (REM) Aufnahme ( $\sim 70^\circ$  verkippt) einer  $150\ \mu\text{m} \times 150\ \mu\text{m}$  weiten,  $30\ \text{nm}$  dicken Si-Membran. Rechts: AFM-Aufnahme eines Teils dieser Membran, welche eine bis zu  $4\ \mu\text{m}$  hohe Verformung gegenüber der umgebenden Substratoberfläche zeigt.

## Präparation von Nanoporen-Kavitätenstrukturen

### a) Kavitäten in SOI

Mittels Elektronenstrahlolithographie (ESL), reaktivem Ionenätzen (RIE) und selektivem, nasschemischem Ätzen mit Flusssäure (HF) konnten Arrays von Poren und darauf basierend Kavitäten in  $30\ \text{nm}$  dicken Siliziumschichten von *Silicon-on-Insulator* (SOI) Substraten erfolgreich präpariert werden. Typische Porendurchmesser dieser Teststrukturen waren von der Größenordnung  $200\ \text{nm}$ , nach Unterätzen wurden Kavitäten der Höhe  $100\ \text{nm}$  (= Oxid-Dicke) vom Durchmesser ca.  $2\ \mu\text{m}$  erhalten. Abbildung 3 zeigt die Rasterelektronenmikroskop (REM) -Aufnahme einer typischen Kavität. Wie auch aus Vorarbeiten an mehr als  $200\ \text{nm}$  dicken Si-Schichten und den oben beschriebenen großflächigen Membranen bekannt, trat eine charakteristische Aufwölbung der unterätzten Si-Schicht von rund  $10\ \text{nm}$  auf (Abbildung 3 a, b, c), welche auf Verspannungen im SOI-Substrat zurückzuführen ist.



**Abbildung 3: Nanoporen-Kavitäten in SOI.** **a)** REM-Aufnahme einer Kavität vom Durchmesser ca. 1.5 µm, die durch selektives Ätzen der 100 nm dicken Oxid-Schicht unter einer 30 nm dicken Si-Schicht entstanden ist. Der Porendurchmesser beträgt ca. 200 nm. **b)** AFM-Aufnahme einer Pore aus demselben Array wie a). **c)** Line-scan aus der AFM-Aufnahme b), die charakteristische Aufwölbung der freitragenden Si-Deckschicht ist deutlich erkennbar.

#### b) Kavitäten mit Rückseitenmetallisierung

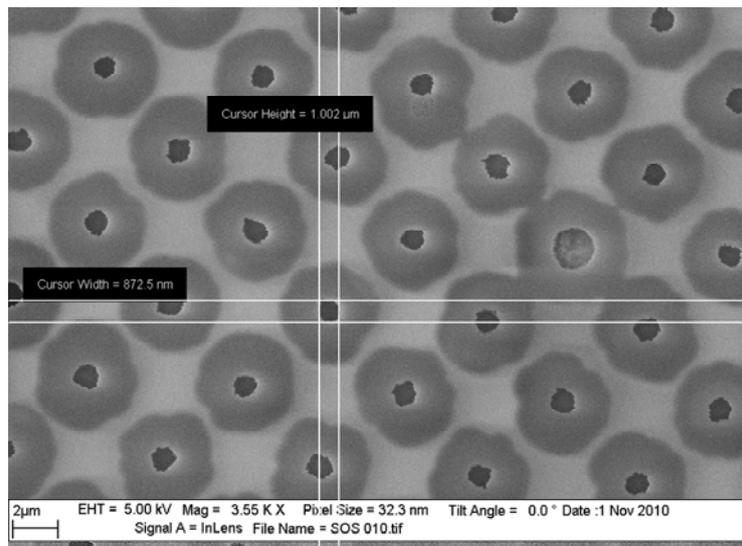
Unterschiedliche Metallisierungen wurden auf ihren Einsatz als mögliches Elektrodenmaterial für rückseitig metallisierte Kavitäten getestet, bei denen unterhalb der Pore der Boden der Kavität als integrierte Elektrode für Ionenstrommessungen dienen soll. Wesentlich eingesetzt wurde zur Charakterisierung die zyklische Voltammetrie sowie amperometrische Langzeit-Stabilitätsmessungen, um die Materialsysteme Au, Pt, Ag und Ag/AgCl hinsichtlich ihrer Eignung zu bewerten. Elektroden aus Au erwiesen sich als ideal polarisierend, solche aus Ag/AgCl als ideal nicht-polarisierend (Faraday'sche Elektrode). Letztere Elektroden konnten auch durch zunächst reine Beschichtung mit Ag und nachfolgende, *in-situ* Chlorinierung erfolgreich präpariert werden. Sie stellen somit ein potentiell einsetzbares System für die Boden-Metallisierung von Kavitäten dar. Erste erfolgreiche Rückseitenbedampfungen auf rückseitig bis zum vergrabenen Oxid durchgeätzte SOI-Substrate mit Ti/Ag-Schichten und nachfolgende elektrische Charakterisierungen wurden durchgeführt.

#### c) Transparente Kavitäten in SOS

Kavitätenstrukturen zur Überspannung mit Lipidmembranen und vollständigem, rückseitigem Mikroskopiezugang in Durchlichtanordnung (Kooperation mit TP C) wurden auf der Grundlage von *Silicon-on-Sapphire* (SOS) – Substraten gefertigt. Hierzu wurden 100 µm dicke, polierte Saphir-Substrate zunächst mit einer 0.5-2.0 µm dicken Schicht aus amorphem Silizium (a-Si) in einem Heißdraht-CVD-Prozess (*Chemical Vapour Deposition*) und nachfolgend mit 200-250 nm SiO<sub>2</sub> beschichtet (*Plasma-Enhanced Chemical Vapour Deposition*, PECVD). Nach Strukturierung mittels Elektronenstrahlithographie (ESL) und nachfolgendem, nasschemischen Ätzen von SiO<sub>2</sub> mit Flusssäure (HF) sowie der

vergrabenen a-Si-Schicht mit Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH) bildeten sich Kavitätenstrukturen aus, wie anhand Abbildung 4 ersichtlich.

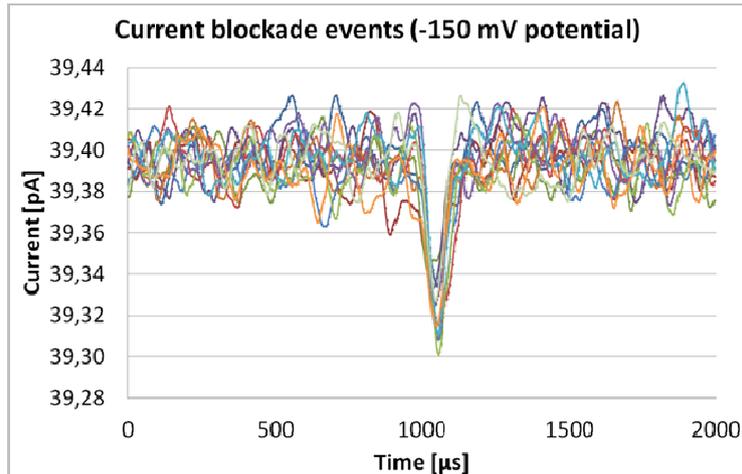
Eine möglichst geringe Rauheit ist im Hinblick auf die zu deponierenden Lipidmembranschichten (mit TP C1) entscheidend. AFM-Messungen ergaben für die obere SiO<sub>2</sub>-Schicht eines fertiggestellten SiO<sub>2</sub>-SOS-Substrats mit 1,5 µm Silizium eine *Root-Mean-Square* (RMS) - Rauigkeit von ca. 0,8 nm (Scanfläche 1 µm<sup>2</sup>). Die transparenten Kavitätenarrays erwiesen sich in ersten Untersuchungen im TP C als vielversprechend im Hinblick auf ihre Schichtarchitektur. In weiteren Optimierungsschritten sollen der Aperturedurchmesser verringert und eine bessere Abrundung der Porenränder erreicht werden.



**Abbildung 4: Arrays aus transparenten Kavitätenstrukturen.** REM-Aufnahme des Ausschnitts eines Arrays aus Kavitätenstrukturen in Saphir-Silizium-Siliziumoxid-Schichtsubstraten. Die Porendurchmesser betragen rund 1 µm, die Kavitätendurchmesser ca. 4 µm.

## Experimente zur Translokation von DNA

An freitragend präparierten Si-Membranen mit mittels FIB strukturierten, einzelnen Nanoporen wurden zunächst Messungen des Ionenstroms in Elektrolyten mit unterschiedlicher Salzkonzentration erfolgreich durchgeführt. Hierbei kam eine neu konstruierte Flusskammer mit zwei Teilkammern zum Einsatz, deren Elektrolytfüllungen mit eigens hergestellten Ag/AgCl-Elektroden kontaktiert wurden. Nachfolgend wurde als Modellsystem  $\lambda$ -DNA hinsichtlich des Translokationsverhaltens untersucht. Die beobachteten Stromblockaden (Abbildung 5) wiesen als Auffälligkeit sehr kurze Ereigniszeiten von nur ca. 200 µs bei zugleich sehr geringer, relativer Unterdrückung des Ionenstroms von nur rund 0.2% auf. Dieses Verhalten kann Translokationsereignissen zugeordnet werden, entspricht jedoch nicht der Erwartung für einen vollständigen Durchtritt der einzelnen Makromoleküle. Möglicherweise finden lediglich teilweise, transiente Blockaden der Porenöffnung statt.

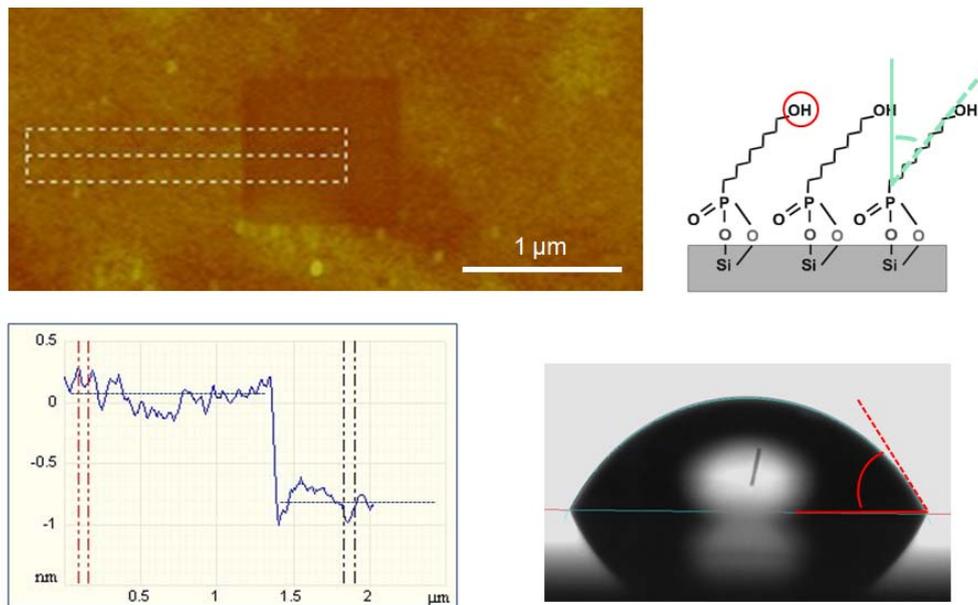


**Abbildung 5: Ionenstromblockaden für  $\lambda$ -DNA.** Ionenstrom durch eine Nanopore in einer FIB-strukturierten 30 nm Siliziummembran, als Funktion der Zeit, bei einer Biasspannung von 150 mV. Mehrere Blockadeereignisse wurden zur besseren Sichtbarkeit übereinander aufgetragen. Elektrolytpuffer: 1 M KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM EDTA. DNA: 4.75 nM  $\lambda$ -DNA.

### Molekulare Funktionalisierung von Si/SiO<sub>2</sub> Oberflächen

Um eine bio-molekulare Funktionalisierung der Porenöffnung zu ermöglichen wurden Verfahren der Ausbildung von selbst-assemblierten Monolagen (SAMs) auf der Grundlage von organischen Phosphonsäuren zunächst auf planaren Siliziumoxid-Oberflächen erprobt bzw. weiterentwickelt. Derartige Phosphonatmonolagen stellen einfach zu präparierende, robuste Systeme mit Dicken im Bereich weniger Nanometer dar. Sie können mit Rezeptoren für Biosensorik, wie DNA- oder PNA-Oligonukleotiden durch Einsatz heterobifunktionaler Linker, weiter funktionalisiert werden<sup>7</sup>. Abbildung 6 zeigt die Charakterisierung planarer Si/SiO<sub>2</sub>-Oberflächen, die erfolgreich mit Hydroxyundecylphosphonat-Monolagen als Modellsystem beschichtet wurden. Die Phosphonate binden direkt an das natürliche Oxid auf der Si-Oberfläche und bilden dort geordnete Monolagen aus. Sie wurden in Kooperation von der AG Prof. J. Schwartz (Princeton University, USA) zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit dem Vorliegen einer um ca. 50° verkippten Moleküllage der Dicke ~1 nm, welche die erwarteten hydrophilen Eigenschaften der nach oben orientierten OH-Endgruppen aufweist.

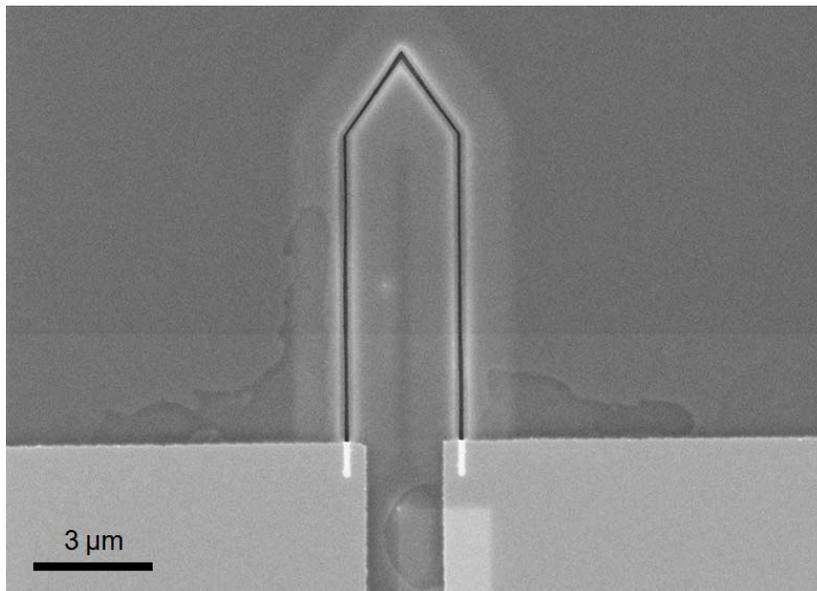
<sup>7</sup> Cattani-Scholz *et al.*, *ACS nano* **2008**, 2, 1653



**Abbildung 6: Funktionalisierung und Charakterisierung von Si/SiO<sub>2</sub> Oberflächen mit Organophosphonat-Monolagen.** Oben rechts: schematische Darstellung der Monolage. Oben links: AFM-Aufnahme, nach Freikratzen eines 1 µm x 1 µm Feldes, zur Messung des Höhenprofils (unten links). Unten rechts: Wasser-Kontaktwinkelmessung, der eingetragene Winkel beträgt 60°.

### Mikro-Cantilever-Strukturen

Zur funktionellen Ausrüstung mit EBID-Sensoren (TP B1) zwecks Messung von Lipidmembran-induzierten Verspannungen wurden Cantilever auf der Grundlage von SOI erfolgreich hergestellt. Hierzu wurden auf SOI-Substrate vom Schichtaufbau Si: 200 nm / SiO<sub>2</sub>: 2 µm zunächst die elektrischen Kontaktpads aufgebracht (ESL, Aufdampfen von Cr/Au). Anschließend wurde in einem weiteren ESL-Schritt die Struktur der Cantilever definiert, und dieser durch reaktives Ionenätzen (RIE) und nachfolgendes, selektives Unterätzen des SiO<sub>2</sub> frei aufgehängt fertiggestellt. Abbildung 7 zeigt eine 9 µm lange und 2,8 µm breite Teststruktur. Der Trenngraben um den Cantilever weist eine Breite von nur rund 100 nm auf, welches eine hervorragende Grundlage für eine nachfolgende Überspannung mit Lipidmembranen darstellt (TP C). Die gefertigten Cantileverstrukturen wurden mit EBID-Teststrukturen versehen und elektrisch vorcharakterisiert (TP B1).



**Abbildung 7: SOI-Mikrocantileverstruktur.** REM-Aufnahme einer einzelnen Si-Cantilever-Teststruktur der Dicke 200 nm. Die Grabenbreite beträgt rund 100 nm. Deutlich erkennbar sind die unterätzten Bereiche sowie die Cr/Au-Kontakte in der unteren Bildhälfte.

### **b) Vergleich Stand des Vorhabens mit ursprünglicher Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung**

Das Vorhaben entwickelte sich weitestgehend gemäß der ursprünglichen Planung, wobei geringfügige Verschiebungen bei den Teilaufgaben und Meilensteinen auf einen verzögerten Projektbeginn und damit verbundene Verzögerungen in der Stellenbesetzung zurückzuführen waren. Hinzu kamen Verzögerungen während der Anlaufphase des Teilprojekts, da die Arbeitsgruppe des Projektleiters Ende 2006 an die TU Braunschweig umgezogen war (Aufbau von Labors, Einstellung und Einarbeitung von Mitarbeitern).

Die Arbeitspakete und Meilensteine im Einzelnen:

#### A1: Nanostrukturierungstechniken für Poren

Unterschiedliche Technologien zur Fabrikation von Nanoporen-Strukturen wurden erfolgreich entwickelt und charakterisiert: Nanoporen-Kavitäten in SOI-Substraten, Nanoporen mit rückseitigem Elektrolytzugang, Kavitäten mit transparentem Rücksubstrat (mit TP C) auf der Grundlage von SOS; Erprobung unterschiedlicher Metallisierungen für rückseitig kontaktierte Kavitäten.

MS-1: Erfolgreiche Präparation von Kavitäten mit mind. 2 unterschiedlichen Architekturen für elektrokinetische und optische Experimente. Präparation von Poren im Bereich weniger 10 nm: *Meilenstein erreicht.*

## A2: Elektrische Messtechnik, elektrokinetische Experimente

Ein speziell abgeschirmter Faraday-Messplatzes für elektrophysiologische Experimente wurde aufgebaut, mehrere spezielle Flusskammerkonzepte für rauscharme Ionenstrommessungen wurden konzipiert und realisiert (mit TP A1). Ionenstrommessungen und Translokationsexperimente mit  $\lambda$ -DNA durch Nanoporen in 30, 50 und 200 nm Si-Membranen wurden durchgeführt.

MS-2: Realisation des Messaufbaus für empfindliche Ionenstrommessungen: *Meilenstein erreicht.*

MS-4: Nachweis der Translokation von Makromolekülen durch künstliche bzw. biologische Nanoporen anhand Ionenstrom: *Meilenstein erreicht.*

## A3: Strukturierung der Kavitätenoberseite zur elektromechanischen Auslesung

Eine Konzeption der Strukturierung der Kavitätenoberseite zur elektromechanischen Auslesung wurde erarbeitet. Mikrocantilever-Testarrays auf der Basis von SOI wurden erfolgreich gefertigt und charakterisiert (mit TP B1). Hierzu zählten insbesondere 200 nm dicke, freitragende Si-Balken mit einer Grabenbreite von rund 100 nm, welche elektrische Zuleitungen zur Kontaktierung von EBID-Sensor-Strukturen aufwiesen.

MS-3: Erfolgreiche Realisation einer Cantilever-Teststruktur für piezoelektrische Auslesung: *Meilenstein erreicht.*

## A4: Integration von lateralen Gate-Elektroden und FET-Sensorik

Die gezielte Dotierung der 30 bzw. 50 nm dünnen Si-Schichten von SOI-Substraten wurde via thermischer Diffusionsdotierung (Bor, ca.  $10^{19} \text{ cm}^{-3}$ ) erreicht und mittels „C-V-Profilings“ nachgewiesen. Diese Dotierung ist Voraussetzung für die Kontaktierung der Si-Membran als Gate-Elektrode zur Steuerung des Ionenstroms. Die Prozessentwicklung für niederohmige, metallische Rückkontakte an Si-Chips für elektrisch funktionsfähige Kavitätenstrukturen wurde optimiert. Als funktionelle organische Schichten für das „chemische Gating“ bei der Translokation durch Nanoporen wurden erfolgreich Organophosphonat-Monolagen auf planaren Oberflächen erfolgreich abgeschieden und charakterisiert.

MS-5: Implementierung einer Gate-Elektrode, Integration von FET-Teststrukturen. *Meilenstein weitestgehend erreicht.*

## A5: Array-Anordnungen

Die beschriebenen Nanoporen- und Cantileverstrukturen wurden stets als großflächige Arrays ausgeführt. Dies ermöglicht eine weitestgehend parallele Fabrikation und ist Grundlage für eine individuelle Auslesung (optisch/elektrisch). Die eingesetzten Fluidikkammeranordnungen für die elektrophysiologischen Messungen wurden im Laufe des Projekts stets weiterentwickelt und optimiert.

MS-6: Erfolgreiche Präparation eines Arrays von Kavitäten mit individueller Auslesung; Darstellung eines Mikrofluidikkonzepts. *Meilenstein erreicht, s. TP C.*

### **c) Relevante Forschungsergebnisse von dritter Seite während der Projektlaufzeit**

Die Präparation von ultradünnen Siliziummembranen mit Einzelporen für Translokationsexperimente wurde nur sehr vereinzelt in der Literatur berichtet. Die Gruppe Bashir nutzte bio-funktionalisierte Poren in oxidierten Si-Membranen zum Nachweis einer DNA-Selektivität in der Translokation<sup>8</sup>. Petrossian *et al.*<sup>9</sup> fertigten Nanoporenarrays ebenfalls in SOI-Substraten und führten an diesen Ionenstrommessungen durch, berichteten jedoch nicht über Translokationsuntersuchungen.

---

<sup>8</sup> Iqbal *et al.*, *Nature Nanotech.* **2007**, 2, 243

<sup>9</sup> Petrossian *et al.*, *JMEMS* **2007**, 16, 1419

## 2.3 Teilprojekt B1 (Prof. Dr. Michael Huth)

### a) Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Vergleich mit der ursprünglichen Planung

Aus Mitteln des BMBF-Projektes wurde in diesem Teilprojekt die Doktorarbeit von Frau Christina Grimm finanziert, die zur Zeit der Berichtsabfassung an der Endversion ihrer Dissertation arbeitet. Als besonders wertvoll erwies sich die enge Zusammenarbeit mit Dr. Christian Schwalb (Nanoss), der auch für den Bericht zu Teilprojekt B2 verantwortlich zeichnet.

Aus Mitteln der Grundausrüstung wurden im Zeitraum Juli 2009 bis Juni 2010 Beiträge von Herrn Dipl.-Phys. Dirk Klingenberger geleistet, der im Rahmen seiner Doktorarbeit u. a. einen kontinuierlichen regelbaren Gasinjektor für EBID-Prozesse (**E**lectron **B**eam **I**nduced **D**eposition) entwickelt<sup>10</sup>. Weitere signifikante Beiträge zur Aufklärung der für nanogranulare Materialien relevanten Transportmechanismen, sowie zur Etablierung neuer EBID-Prozesse wurden geleistet von Dr. Fabrizio Porrati, Roland Sachser, Marcel Winhold, MSc Martin Possel, MSc Markus Baranowski, Johannes Schwenk und Achim Rippert.

Das Projekt hat weiterhin hinsichtlich der Bereitstellung von Cantileverstrukturen von einer engen Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Friedemann Völklein (Hochschule RheinMain), sowie MSc Heiko Reith und MSc Matthias Schmitt profitiert.

Wertvolle zusätzliche Erkenntnisse zu den Transporteigenschaften von nanogranularen Materialien haben sich ergeben aus der Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Ralf Bandorf (Fraunhofer-Institut für Schicht- und Oberflächentechnik, Braunschweig) sowie in der Co-Betreuung der Masterarbeit von Frau Virginia Gwozdz, die sich mit dem PTR-Effekt in metallhaltigen, diamantartigen Kohlenstoffschichten (Me-DLC) befasst hat, die mittels reaktivem Sputtern als Dünnschicht präpariert wurden.

Als wesentliche Fragestellungen, die im Teilprojekt B zu bearbeiten waren hinsichtlich der Erreichung der definierten Meilensteine, sind zu nennen:

1. Welche Mechanismen liegen dem Ladungstransport in nanogranularen Metallen zum Einsatz in PTR-Sensoren zugrunde?
2. Inwieweit sind diese Transportmechanismen günstig für einen möglichst großen PTR-Effekt? Lässt sich dieser theoretisch angemessen beschreiben? Welche Vorgaben lassen sich bezüglich der Materialauswahl und der Prozessführung für den EBID-Prozess machen, um möglichst vorteilhafte Sensoreigenschaften zu erzielen?

---

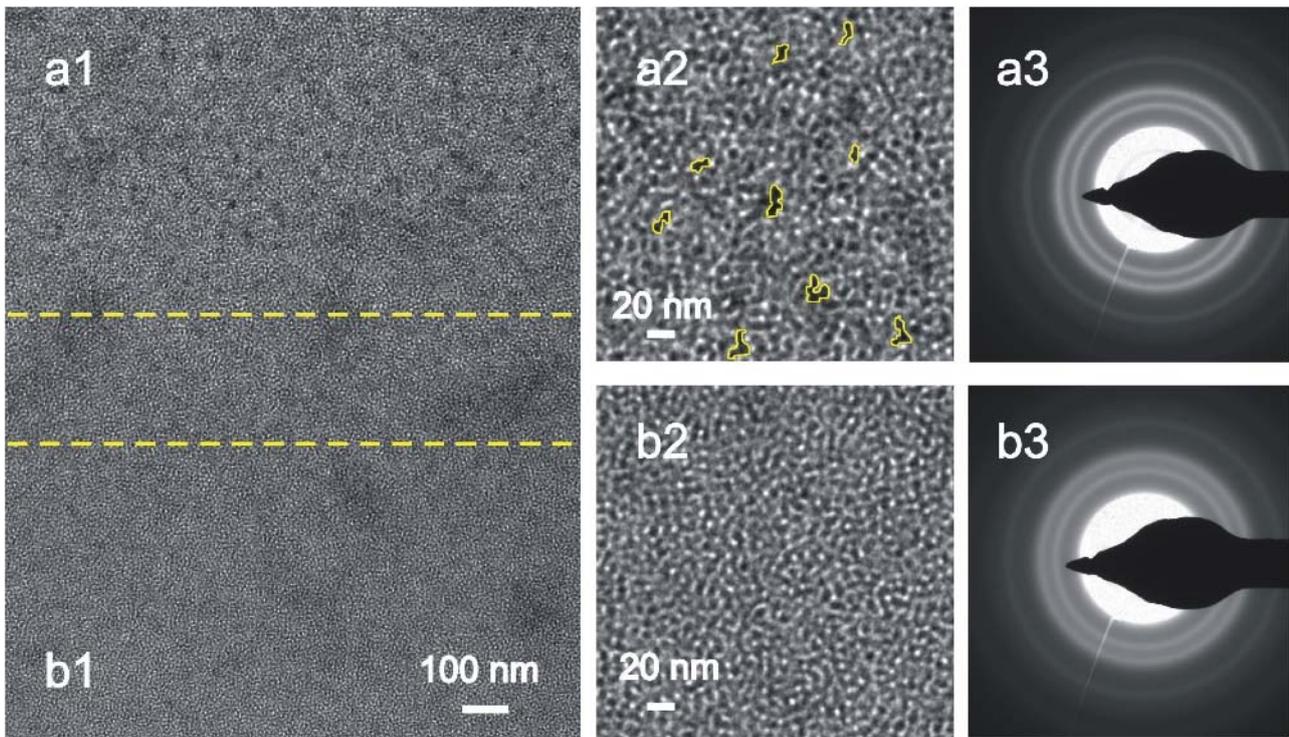
<sup>10</sup> Klingenberger *et al.*, *Journal of Vacuum Science & Technology A* **2009**, 27, 1204.

3. Wie ist das Langzeitverhalten nanogranularer Materialien unter ambienten Bedingungen und in flüssiger Umgebung? Lassen sich ggf. Passivierungsprozesse etablieren?
4. Welches Rauschverhalten zeigen nanogranulare Sensoren insbesondere im Bereich hoher PTR-Effekte? Welches Ausleseverfahren liefert ein hinreichend hohes S/R-Verhältnis?
5. Inwieweit sind EBID-PTR-Sensoren auf SOI-basierten oder auch  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -basierten Mikrocantilevern und Membranstrukturen einsetzbar? Lassen sich mit EBID-PTR-Sensoren hinreichend hohe Empfindlichkeiten erzielen, um oberflächenspannungsinduzierte Verbiegungen von Cantilevern oder Membranen elektrisch zu detektieren?

Im Folgenden wird auf diese Punkte eingegangen. Der Berichtsteil zu B1 ist dabei in einem engen Zusammenhang mit dem Berichtsteil zu B2 zu sehen.

## **1 Ladungstransportmechanismen in nanogranularen Metallen**

Granulare Metalle bilden eine Materialklasse mit steuerbaren elektronischen Eigenschaften. Sie bestehen aus dicht gepackten metallischen Partikeln (Kristallite), im Allgemeinen in Größe und Form variierend, mit einigen wenigen bis mehreren hundert Nanometern Größe. Die Partikel sind in eine isolierende, dielektrische Matrix eingebettet, die die inter-granulare elektronische Kopplung durch Tunneln ermöglicht. Die Anordnung der Partikel ist im Allgemeinen ungeordnet (siehe Abbildung 1), kann aber bei ausgewählten Präparationsmethoden auch gitterperiodisch sein, wie das insbesondere im EBID-Prozess möglich ist und weiter unten kurz erläutert wird.



**Abbildung 1:** (a) TEM-Aufnahme eines ungeordneten granularen Metalls präpariert mittels elektronenstrahl-induzierter Deposition mit dem Präkursor  $(\text{CH}_3)_3\text{PtCpCH}_3$ . Pt(fcc)-Nanokristallite mit einem typischen Durchmesser von 3,5 nm sind eingebettet in eine Matrix aus amorphem Kohlenstoff. a1) Bereich des Pt(C)-Deponats nach mehrstündiger Elektronenbestrahlung. b1) Unbestrahlter Bereich des Deponats. a2) und b2) zeigen jeweils herausvergrößerte Bereiche. In a2) sind einzelne Bereiche koaleszierter Pt-Partikel gelb umrahmt. a3) und b3) zeigen Beugungsbilder der bestrahlten bzw. unbestrahlten Bereiche des Deponats. Abbildung entnommen aus Porra *et al.*, 2011<sup>13</sup>.

Der Parameter, der die elektronischen Eigenschaften granularer Metalle wesentlich bestimmt, ist die inter-granulare Tunnelkopplungsstärke  $G$ , bzw. analog die auf den Quantenleitwert einer Spinrichtung normierte Kopplungsstärke  $g$ . Metallische Transporteigenschaften im Sinne einer endlichen elektrischen Leitfähigkeit für  $T \rightarrow 0$  treten auf oberhalb einer kritischen Kopplungsstärke  $g \geq g_c$  ( $g_c \approx 1$ ), die den Metall-Isolator-Übergang (MI-Übergang) kennzeichnet, während im Fall  $g < g_c$  für  $T \rightarrow 0$  isolierendes Verhalten beobachtet wird. Elektronische Korrelationen bei Tunnelprozessen ergeben sich als Folge der Coulomb-Ladeenergie  $E_C$ , die sich aus der Kapazität  $C$  des metallischen Partikels berechnet zu  $E_C = e^2/2C$  mit  $C = 4\pi\epsilon_0\epsilon_r D$  ( $D$ : Partikeldurchmesser,  $\epsilon_r$ : relative Permittivität des Materials).  $E_C$  unterdrückt den Ladungstransport und führt bei tiefen Temperaturen zum Auftreten einer harten Energielücke im elektronischen Anregungsspektrum. Eine weitere wichtige Kenngröße ergibt sich als Folge der Diskretisierung der Energieniveaus im Einzelpartikel. Der Niveauabstand  $\delta$  am chemischen Potential wird bestimmt durch den Teilchendurchmesser und die Zustandsdichte am chemischen Potential  $N_F$  zu  $\delta = 1/(4\pi/3 \cdot (D/2)^3 N_F) \approx 2/D^3 N_F$ . Die Granularität der elektronischen Struktur setzt dabei immer voraus, dass die im allgemeinen diffusive Leitfähigkeit im Einzelpartikel  $g_0 \gg 1$  die inter-granulare Leitfähigkeit  $g$  bei weitem übersteigt, also gilt  $g_0 \gg g$ . Im Falle  $g \approx g_0$  liegt ein homogen ungeordnetes System vor. Außer für Partikeldurchmesser unter ca. 1 nm gilt stets  $E_C \gg \delta$ . Für die in

Abbildung 1 gezeigten Pt-Kristallite mit einem mittleren Durchmesser  $D \approx 3,5$  nm ist  $E_C \approx 500$  K ( $\epsilon_r \approx 5$ ) und  $\delta \approx 8$  K.

Im Rahmen der Analyse der Transportregime der mittels EBID präparierten Sensorstrukturen wurden hauptsächlich drei Präkursoren näher untersucht. Die erzielten Ergebnisse werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

**Deponate aus W-C-O:** Bei Verwendung des Präkursors  $W(CO)_6$  konnte nachgewiesen werden, dass durch Erhöhung der Strahlstromstärke im EBID-Prozess (einige 10 pA bis 10 nA), sowie durch Reduktion der Strahlenergie (30 keV bis 5 keV) der W-Metallgehalt in den EBID-Deponaten von wenigen at% bis über 35 at% erhöht werden kann. Daraus ergibt sich ein Übergang in der elektrischen Leitfähigkeit bei tiefen Temperaturen von einem isolierenden, durch das sogenannte korrelierte „Variable Range Hopping“ (VRH) beschriebene Verhalten gemäß

$$\sigma(T) = \sigma_0 \exp\left(-\left(\frac{T_0}{T}\right)^{\frac{1}{2}}\right)$$

( $T_0$ : Aktivierungsenergie, i. w. abhängig von der Zustandsdichte an der Fermikante, sowie der elektronischen Abklinglänge der lokalisierten elektronischen Zustände)

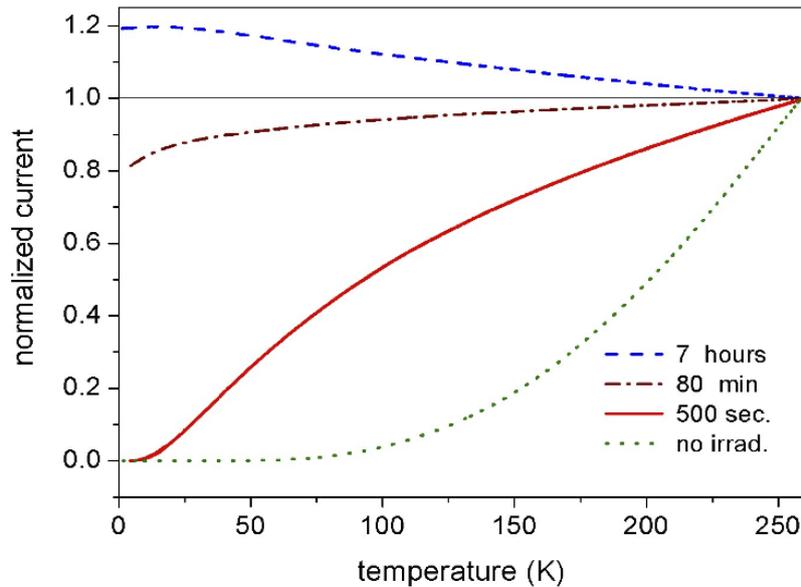
zu einem quasi-metallischen Verhalten mit einer endlichen Leitfähigkeit für  $T \rightarrow 0$ , die näherungsweise durch ein Gesetz der Form

$$\sigma(T) = \sigma'_0 + bT^{1/2}$$

beschrieben werden kann. Details zu diesen Untersuchungen sind in einer separaten Veröffentlichung dargestellt<sup>11</sup>. Für Anwendungen als PTR-Sensoren sind diese Deponate nur eingeschränkt nutzbar, weil ihre Mikrostruktur weitgehend amorph ist. Dies wurde anhand von begleitenden TEM-Messungen belegt. Die erzielbaren PTR-Effekte werden im B2-Teilprojektbericht zusammengefasst.

---

<sup>11</sup> Huth *et al.*, *New Journal of Physics* **2009**, *11*, 033032.



**Abbildung 2:** Verlauf der temperaturabhängigen Leitfähigkeit (Strom bei fester Bias-Spannung) von Pt-C-Deponaten nach verschieden langer Elektronenbestrahlung (5 keV, 1nA). Im gezeigten Beispiel befindet sich die Probe mit 80 min Bestrahlungsdauer bereits auf der metallischen Seite des MI-Übergangs (Kopplungsstärke  $g \approx 3$ ). Entnommen aus Porrati *et al.*, 2011<sup>13</sup>.

**Deponate aus Pt-C:** Besonders für die Sensorentwicklung relevante Ergebnisse wurden an Deponaten basierend auf dem Pt-Komplex  $(\text{CH}_3)_3\text{CpCH}_3$  (Cp: Cyclopentadienyl) als Präkursor erzielt. Pt-C-EBID-Deponate weisen eine nanogranulare Struktur auf (siehe Abb. 1) und sind insbesondere in ihrer Zusammensetzung und Mikrostruktur nur sehr schwach von den jeweils gewählten Strahlparametern im EBID-Prozess abhängig. Mit sehr hoher Reproduzierbarkeit wird eine Zusammensetzung von 22 – 24 at% Pt und 78 – 76 at% C gefunden. Die so präparierten Proben zeigen wiederum bei tiefen Temperaturen ein Verhalten nach dem korrelierten VRH-Gesetz. Besonders interessant aber ist, dass durch Elektronenbestrahlung nach der Deposition die Leitfähigkeit um bis zu 4 Größenordnungen erhöht werden kann und dabei auch ein MI-Übergang beobachtet wird; diesmal allerdings an einem nanogranularen Material<sup>12,13</sup>. Abbildung 2 zeigt dies anhand einer ausgewählten Anzahl von Proben, die verschieden lang bestrahlt wurden.

Mikroraman- und TEM-Untersuchungen an verschieden lang bestrahlten Proben geben Hinweise darauf, dass dieser Zuwachs der Leitfähigkeit auf i.w. zwei Mechanismen zurückzuführen ist. Es ergibt sich eine geringfügige Vergrößerung des mittleren Partikeldurchmessers um ca. 20 % bei den längsten Bestrahlungsdauern. Die strukturelle Nahordnung der C-Atome in der dielektrischen Matrix zeigt einen kontinuierlichen Zuwachs des Anteils von  $\text{sp}^2$ -hybridisiertem Kohlenstoff (graphitisch), was die intergranulare Kopplungsstärke erhöhen sollte<sup>4</sup>. Diese Einstellbarkeit der Kopplungsstärke

<sup>12</sup> Schwalb *et al.*, *Sensors* **2010**, *10*, 9847–9856.

<sup>13</sup> Porrati *et al.*, *Journal of Applied Physics* **2011**, *109*, 063715.

erweist sich als besonders günstig für die PTR-Sensorik, wie im Teilprojektbericht zu B2 ausgeführt wird.

**Deponate aus Co-C-O:** Durch Verwendung des Präkursors  $\text{Co}_2(\text{CO})_8$  lassen sich Deponate mit sehr hohen Metallanteilen abscheiden. Bis 85 at% Co wurden erzielt. Als schwierig hingegen erweist sich, den Metallgehalt durch geeignete Wahl der Abscheideparameter so weit zu reduzieren, dass ein für PTR-Sensorik interessanter Metallgehalt unter ca. 30 at% auftritt bei gleichzeitig nanogranularer Mikrostruktur der Deponate. Hier erscheint der Übergang zu binären Präkursor-Mischungen vielversprechend, den wir durch Etablierung eines EBID-Prozesses zur Abscheidung von Si-Strukturen (siehe Abschnitt 3) unter Verwendung eines Silan-Oligomers für das Pt-Si-System bereits eingeleitet haben<sup>14</sup>. Co-C-Si-basierte Abscheidungen sind aussichtsreiche Kandidaten für die PTR-Sensorik, weil durch die partielle Substitution von C durch Si die effektive Permittivität der Matrix abgesenkt und damit die Empfindlichkeit der Dehnungssensoren gesteigert werden kann. Dieser Zusammenhang wird im Abschnitt 2 (Theorie des PTR-Effektes) weiter ausgeführt.

**Künstliche granulare Metalle – 2D-Punktgitter:** Hinsichtlich der Einstellbarkeit der intergranularen Kopplungsstärke sind geordnete 2D-Nanopunktgitter besonders attraktiv. Wir konnten zeigen, dass durch Variation des Mitte-Mitte-Abstands von W-C-O-Nanopunkten mit einem Durchmesser von ca. 17 nm ein Übergang von einem aktivierten Widerstandsverhalten nach Arrhenius (großer Nanopunktabstand von 40 nm) zu einem quasi-metallischen Verhalten (Abstand 20 nm) auftritt<sup>15,16</sup>. Die hohe laterale Auflösung im EBID-Abscheideprozess erlaubt damit die präzise Einstellung der intergranularen Kopplungsstärke und somit die gezielte Selektion des Bereichs der höchsten Sensorempfindlichkeit (siehe insbesondere Abschnitt 2). Als wesentliche technische Herausforderung zur Erzielung hinreichend hoher Sensorempfindlichkeiten ist allerdings der Durchmesser der Nanopunkte noch um den Faktor 2 bis 3 zu reduzieren, was durchaus im Bereich des Auflösungsvermögens des von uns verwendeten Prozesses liegt.

## 2 Grundlagen des PTR-Effektes für Anwendungen in der Dehnungssensorik – Theorie und Experiment

**Theorie des PTR-Effektes:** Für ein tieferes Verständnis des Dehnungswiderstandseffektes in nanogranularen Metallen wurde im Rahmen dieses Projektes eine theoretische Beschreibung entwickelt, die auf neue Entwicklungen im Verständnis der Ladungstransportmechanismen in diesen Materialien aufbaut. Eine detaillierte Beschreibung der Modellrechnungen geht über den Rahmen dieses Berichtes hinaus<sup>17</sup>.

---

<sup>14</sup> Winhold *et al.*, in Vorbereitung

<sup>15</sup> Sachser *et al.*, *Physical Review B* **2009**, *80*, 195416.

<sup>16</sup> Porrati *et al.*, *Nanotechnology* **2010**, *21*, 375302.

<sup>17</sup> M. Huth, *Journal of Applied Physics* **2010**, *107*, 113709.

Einige wesentliche Merkmale und insbesondere die Implikationen für die Optimierung von PTR-Sensoren sollen allerdings hier zusammengestellt werden.

Für die Modellbildung ist zunächst das relevante Transportregime des betrachteten Sensors zu identifizieren. Hier kommt prinzipiell ein VRH-Mechanismus, Arrhenius-artiges Verhalten oder auch der Bereich der starken inter-granularen Kopplung mit i. w. logarithmischen Leitfähigkeitskorrekturen<sup>18</sup> in Frage. Im so identifizierten Leitfähigkeitsregime liefert die theoretische Beschreibung die temperaturabhängige Leitfähigkeit als Funktion der inter-granularen Kopplungsstärke  $g$ . Daraus lässt sich die differentielle Leitfähigkeitsänderung  $\Delta\sigma/dg$  formelmäßig ermitteln. Die Kopplungsstärke  $g$  wiederum ist exponentiell vom inter-granularen Abstand abhängig, so dass sich aus einem Modell der räumlichen Anordnung der Partikel die Kopplungsstärke als Funktion des mittleren Partikelabstands  $s$  darstellen lässt. Es wurde dazu eine dichteste Kugelpackung gleich großer Partikel angenommen<sup>17</sup>. Damit lässt sich die Sensor-Empfindlichkeit, ausgedrückt über den k-Wert

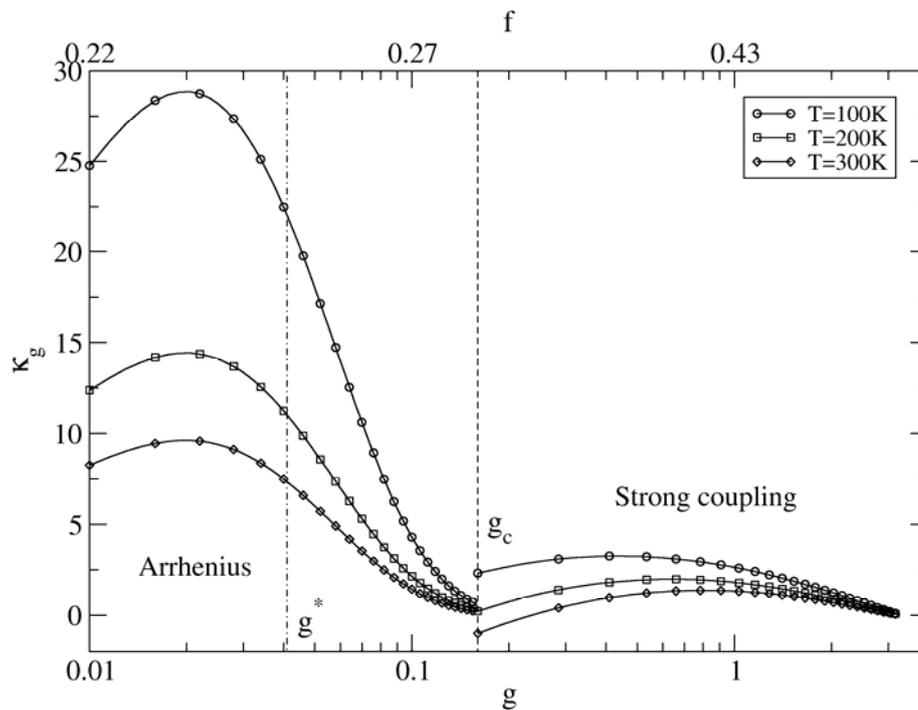
$$k = \frac{\Delta\rho/\rho}{\Delta s/s} = - \frac{\Delta\sigma/\sigma}{\Delta s/s}$$

formelmäßig ermitteln. Abschließend muss im Rahmen eines effektiven Medium-Modells die dielektrische Permittivität des Materials bei gegebener Zusammensetzung noch ermittelt und eingesetzt werden.

Abbildung 3 zeigt den Verlauf des k-Wertes als Funktion der Kopplungsstärke (bzw. des Metallanteils) im Arrhenius-Transportregime, sowie im Regime der starken inter-granularen Kopplung bei verschiedenen Temperaturen am Beispiel eines Modellmaterials bestehend aus Au-Nanokristalliten (siehe Bildunterschrift).

---

<sup>18</sup> Sachser *et al.*, eingereicht bei Phys Rev. Lett.



**Abbildung 3:** Berechneter  $k$ -Wert als Funktion der inter-granularen Kopplungsstärke  $g$  (untere Achse) bzw. des Metallvolumenanteils (obere Achse) bei ausgewählten Temperaturen im Arrhenius- (links) und Starkkopplungsregime (rechts). Angenommen wurde eine fcc-artige dichteste Kugelpackung von Au-Nanopartikeln von 5,5 nm Durchmesser mit Dodecanthiol-Liganden.  $g^*$  kennzeichnet die in einem nach Tran *et al.* durchgeführten Vergleichsexperiment realisierte Kopplungsstärke.  $g_c$  gibt die kritische Kopplungsstärke an, die den Übergang in den Bereich der starken Kopplung markiert. Abbildung entnommen aus Huth, 201017 (Details siehe dort).

Als wesentliche Ergebnisse dieser Modellbildung ist festzuhalten:

Besonders große PTR-Effekte treten im Arrhenius-Regime auf, während der Bereich der starken inter-granularen Kopplung wenig interessant erscheint. Dies unterstreicht die große Bedeutung der Korrelationseffekte im Ladungstransport für die Sensorfunktion, d.h. das Auftreten einer harten Energielücke im Anregungsspektrum an der Femikante.

Der PTR-Effekt zeigt mit sinkender Temperatur einen deutlichen Anstieg. Bei Raumtemperatur sind unter optimalen Bedingungen (siehe nächster Punkt)  $k$ -Werte bis über 50 möglich.

Optimal für hohe  $k$ -Werte im Arrhenius-Regime sind kleine Partikelgrößen (ideal  $< 2$  nm) und eine niedrige dielektrische Permittivität der Matrix.

Es existiert im Arrhenius-Regime eine wohldefinierte Kopplungsstärke, d.h. ein wohldefinierter mittlerer Partikel-Abstand, für den der PTR-Effekt maximal wird.

Daraus lassen sich für den EBID-Prozess sowohl hinsichtlich der Wahl des Präkursors als auch hinsichtlich der Abscheideparameter Handlungsregeln ableiten. Es sind solche Präkursoren zu bevorzugen, die eine sehr feine nanogranulare Struktur im Deponat erzeugen. Soweit möglich sollte das Matrixmaterial nur eine geringe Polarisierbarkeit aufweisen. Die inter-granulare Kopplungsstärke muss für jedes Sensormaterial auf das Maximum des PTR-Effektes eingestellt werden.

**Experimentelle Überprüfung des PTR-Effektes:** Die oben abgeleiteten Zusammenhänge konnten anhand des Pt-C-Systems einer umfassenden Überprüfung unterzogen werden. In der Tat zeigt sich im Pt-C-System unter Veränderung der Kopplungsstärke durch Bestrahlung die Ausbildung eines Maximums im PTR-Effekt<sup>12</sup>. Dies wird im Teilprojektbericht zu B2 detaillierter ausgeführt.

Im Rahmen der Weiterentwicklung von EBID-Prozessen auf Halbleiterstrukturen konnte ein Silan-Oligomer identifiziert werden, das es erlaubt, amorphes Si abzuscheiden. Dies ist im vorliegenden Zusammenhang sehr vielversprechend für binäre EBID-Prozesse, in denen bspw. der Si-Präkursor mit einem metallorganischen Präkursor gemischt eingesetzt wird, um damit eine veränderte Matrix- oder Nanokristallit-Zusammensetzung zu erhalten. Gesucht sind dann solche Si-Beimischungsgrade, die zu einer Abnahme der dielektrischen Permittivität führen und damit den PTR-Effekt steigern helfen. Erste Ergebnisse zum Pt-Si-EBID-Prozess werden zurzeit in einem Manuskript zusammengefasst<sup>14</sup>.

**Ergänzende Anmerkungen zu apparativen Voraussetzungen:** Aus Mitteln der Grundausrüstung ist es uns gelungen, unser hochauflösendes Elektronen-/Ionen-Mikroskop für den EBID-Prozess apparativ in mehrerer Hinsicht zu ergänzen. Zum einen wurde für leichter flüchtige Präkursoren ein Zweikanal-Gasinjektor integriert, der insbesondere für Präkursoren zur Abscheidung von amorphem Silizium, wie auch zur Abscheidung von SiO<sub>2</sub> eingesetzt wird. SiO<sub>2</sub> ist für die Passivierung von PTR-Sensoren von Interesse (siehe auch Abschnitt 3). Des Weiteren konnten wir einen vierachsigen, hochvakuum-kompatiblen Nanomanipulator integrieren, der es uns erlaubt, *in situ* Messungen des PTR-Effektes an Cantilevern durchzuführen. Ein Großteil der Charakterisierung zum Pt-C-System fand mit diesem Nanomanipulator statt. Die dazu nötige Software wurde im Teilprojekt B2 erstellt. Voraussetzung wiederum für diese Messungen ist die Möglichkeit einer *in situ* Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit von EBID-Strukturen, was durch Integration eines verdrahteten Chip-Trägers im Elektronenmikroskop gelungen ist. Dieser Aufbau erlaubt insbesondere auch die Aufzeichnung der transienten Leitfähigkeitsentwicklung beim EBID-Wachstumsprozess, nach dem Wachstum *in situ* oder bei Belüftung des Systems. Daraus ergibt sich unmittelbar die Möglichkeit der Bestimmung der Stabilität der elektrischen Kenngrößen unter Luftausschluss und unter ambienten Bedingungen, wie im folgenden Abschnitt diskutiert wird. Ein analoges Chip-Träger-Konzept wird auch in unseren Kryostateinsätzen verwendet, so dass unmittelbar im Anschluss an einen EBID-Prozess auch temperaturabhängige Transportmessungen durchgeführt werden können.

### 3 Stabilität der elektrischen Eigenschaften von EBID-Strukturen

**Stabilität von W-C-O-Deponaten:** Erste Untersuchungen zur elektrischen Langzeitstabilität der EBID-Deponate wurden an W-C-O-Deponaten mit verschiedenem Metallgehalt durchgeführt und bereits von uns publiziert<sup>19</sup>. Da das W-C-O-System für PTR-Sensoranwendungen aufgrund des eher geringen PTR-Effektes keine hohe Relevanz hat,

---

<sup>19</sup> Porra *et al.*, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 195301.

wird an dieser Stelle auf eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse verzichtet. Wesentlich ist festzuhalten, dass unter ambienten Bedingungen die Leitfähigkeit bei Proben mit niedrigem Metallgehalt schon nach wenigen Minuten um bis zu eine Größenordnung abfällt. Für Proben mit Metallgehalten oberhalb ca. 16 at% ist dieser Abfall deutlich geringer ausgeprägt und erreicht bei Proben mit mehr als 30 at% auch auf der Stundenskala nur wenige Prozent. Als mögliche Ursache des recht ausgeprägten Alterungsverhaltens sind prinzipiell oxidative Prozesse in der Matrix oder am W zu berücksichtigen. Ohne Passivierung wären derartige PTR-Sensoren nur bedingt einsetzbar.

Hoch interessant ist die Möglichkeit der Leitfähigkeitsmessung während des Deponatwachstums. Durch Analyse des zeitabhängigen Verlaufs der Leitfähigkeit lassen sich modellabhängige Aussagen über die zeitliche Entwicklung der Mikrostruktur der Deponate im Schreibprozess gewinnen<sup>19</sup>.

**Stabilität von Pt-C-Deponaten:** Das Pt-C-System ist für PTR-Sensoranwendungen besonders geeignet. Die äußerst geringe chemische Reaktivität von Pt in Verbindung mit der sauerstofffreien Matrix erweist sich im Hinblick auf die Langzeitstabilität und die Verwendbarkeit in Flüssigkeiten (*aqua dest.*) als nützlich. Details zum transienten Leitfähigkeitsverhalten der Pt-C-Deponate finden sich im Berichtsteil zu B2, der auch den Aspekt der Sensorpassivierung thematisiert.

#### **4 Rauschverhalten nanogranularer Materialien**

Die Möglichkeit zur Messung des Spannungsrauschens ergab sich im Laufe der Projektarbeit durch eine Kooperation mit Prof. Jens Müller (ebenfalls Physikalisches Institut der Goethe-Universität). Die wesentlichen Ergebnisse dazu sind im Berichtsteil zu B2 zusammengestellt.

#### **5 EBID-PTR-Sensoren auf Mikrocantilevern und Membranstrukturen**

Im Hinblick auf den Einsatz der PTR-Sensoren für die Detektion von Spannungszuständen von Doppellipidschichten ist deren Integrierbarkeit auf SOI-basierten Cantilevern (oder alternativen Cantileverstrukturen), sowie auf SOI-Kavitätsarrays nachzuweisen. Dieser Projektteil ist sehr anspruchsvoll, weil drei Prozesstechnologien zusammengeführt werden müssen: Mikrostrukturierung auf Si-Basis, Integration der PTR-Sensoren mittels EBID und Einsatz mit Doppellipidschichten. Im Bericht zu Teilprojekt B2 werden diese Aspekte näher beleuchtet und insbesondere nachgewiesen, dass EBID-PTR-Sensoren in stark miniaturisierten Cantileverstrukturen mit Vorteil eingesetzt werden können.

##### **b) Relevante Forschungsergebnisse von dritter Seite während der Projektlaufzeit**

Begleitend zu den Untersuchungen in diesem Projekt wurde der Projektleiter im Rahmen einer Co-Betreuung einer Masterarbeit am Fraunhofer-Institut für Schicht und Oberflächentechnik auf die dortigen Aktivitäten im Bereich der metallhaltigen,

diamantartigen Kohlenstoffschichten (Me-DLC) für die Dehnungssensorik aufmerksam. Im Hinblick auf die Transporteigenschaften von Me-DLC-Schichten ergeben sich viele Parallelen zur Physik nanogranularer EBID-Strukturen. Anwendungsbereiche der Me-DLC-Schichten liegen in der Wägetechnik, der Torsionsdetektion, sowie bei Dehnungssensoren für die Hochtemperaturanwendung. Eine Konkurrenzsituation zu EBID-basierten PTR-Sensoren besteht nicht, da diese vor allem in der Nanosensorik ihre Vorzüge ausspielen, der den Me-DLC-Sensoren nicht oder nur mit erheblichem Lithographieaufwand zugänglich ist.

Der Projektleiter hat weiterhin Kenntnis erlangt, dass das EBID-PTR-Sensorkonzept nun von anderen Arbeitsgruppen aufgenommen wird (bspw. am EMPA, Thun). Es ist also davon auszugehen, dass sich die Entwicklung von PTR-Sensoren auf EBID-Basis in den kommenden Jahren beschleunigt.

## 2.4 Teilprojekt B2 (Nanoscale Systems GmbH)

### **a) Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Vergleich mit der ursprünglichen Planung**

Aus Mitteln des BMBF-Projektes wurden im Rahmen dieses Teilprojekts Personalmittel für Dr. Alexander Kaya, Dr. Harald Drings und Dr. Christian Schwalb verwendet. Des Weiteren wurden die Mittel für Materialkosten, Reisemittel und für die Patentverlängerung sowie Neuansmeldungen (Titel: „Miniaturisiertes Federelement und Verfahren zu dessen Herstellung“) in Deutschland, Russland, Kanada, Indien, Australien und der USA verwendet.

Während des gesamten Projekts bestand eine enge Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Huth, die insbesondere durch die Doktorarbeit von Frau Christina Grimm vorangetrieben wurde.

Das Projekt hat weiterhin hinsichtlich der Bereitstellung von Cantileverstrukturen von einer engen Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Friedemann Völklein (Hochschule RheinMain), sowie MSc Heiko Reith und MSc Matthias Schmitt profitiert. Außerdem bestand eine Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Ralf Bandorf (Fraunhofer-Institut für Schicht- und Oberflächentechnik, Braunschweig) bezüglich Fragestellungen zu den Transporteigenschaften von nanogranularen Metallen.

Die wesentlichen Fragestellungen, die in Teilprojekt B zu bearbeiten waren, sind:

1. Welche Mechanismen liegen dem Ladungstransport in nanogranularen Metallen zum Einsatz in PTR-Sensoren zugrunde?
2. Inwieweit sind diese Transportmechanismen günstig für einen möglichst großen PTR-Effekt? Lässt sich dieser theoretisch angemessen beschreiben? Welche Vorgaben lassen sich hinsichtlich der Materialauswahl und der Prozessführung für den EBID-Prozess machen, um möglichst vorteilhafte Sensoreigenschaften zu erzielen?
3. Wie ist das Langzeitverhalten nanogranularer Materialien unter ambienten Bedingungen und in flüssiger Umgebung? Lassen sich ggf. angemessene Passivierungsprozesse etablieren?
4. Welches Rauschverhalten zeigen nanogranulare Sensoren insbesondere im Bereich hoher PTR-Effekte? Welches Ausleseverfahren liefert ein hinreichend hohes S/R-Verhältnis?
5. Inwieweit sind EBID-PTR-Sensoren auf SOI-basierten oder auch  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -basierten Mikrocantilevern und Membranstrukturen einsetzbar? Lassen sich mit EBID-PTR-

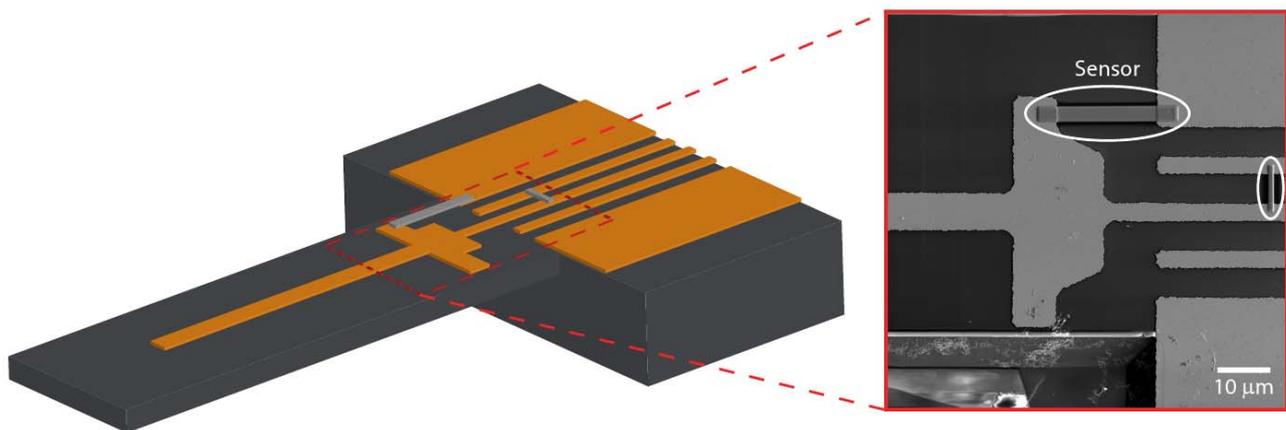
Sensoren hinreichend hohe Empfindlichkeiten erzielen, um oberflächenspannungsinduzierte Verbiegungen von Cantilevern oder Membranen elektrisch zu detektieren?

Im Folgenden wird auf diese Punkte eingegangen. Der Berichtsteil zu B2 ist dabei in einem engen Zusammenhang mit dem Berichtsteil zu B1 zu sehen.

## 1 Ladungstransportmechanismen in nanogranularen Metallen

Die Mechanismen, die dem elektronischen Ladungstransport in nanogranularen Metallen zu Grunde liegen, wurden intensiv für Deponate aus W-C-O, Pt-C, Co-C-O und künstliche 2D-Punktgitter untersucht. Die wesentlichen Aspekte dazu sind im Berichtsteil B1 zusammengestellt.

## 2 Grundlagen des PTR-Effektes für Anwendungen in der Dehnungssensorik – Theorie und Experiment

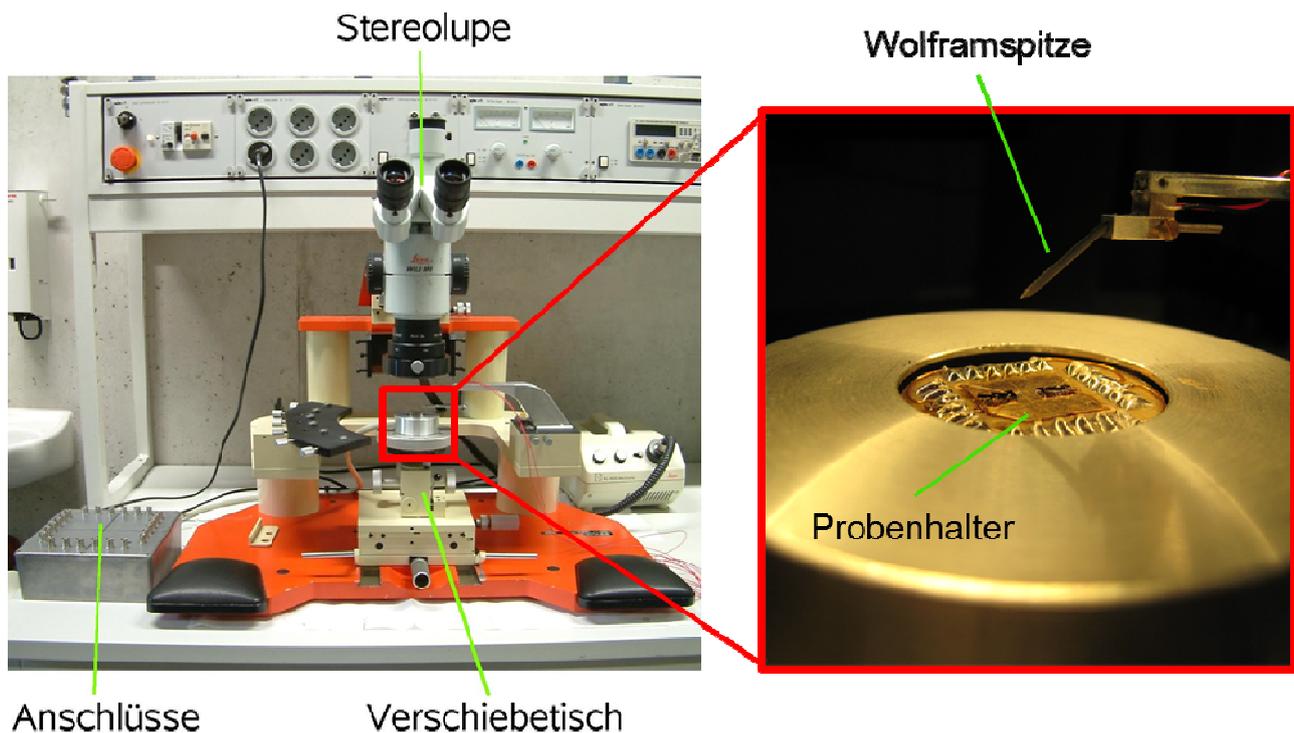


**Abbildung 4: REM-Aufnahme der Cantilever-Struktur für die Charakterisierung der PTR-Sensorstrukturen.** 3D Schema-Zeichnung der Cantilever-Struktur die für die Dehnungsmessungen an den PTR-Sensorstrukturen verwendet wurde. Die Cantilever Dimensionen betragen: Länge: 500 µm, Breite: 70 µm, Höhe: 10 µm. Die PTR-Sensoren werden an der Biegekante zwischen Cr/Au-Kontakte deponiert. Der Inset zeigt eine REM-Aufnahme des Cantilevers mit zwei PTR-Sensoren.

Zu Beginn des Vorhabens wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Friedemann Völklein (Hochschule RheinMain) eine Cantileverstruktur entwickelt, die eine Plattform für eine systematische Untersuchung der Dehnungscharakteristik von unterschiedlichen PTR-Sensorstrukturen ermöglichte. Für die Fertigung der Cantilever-Template verwendet man als Startmaterial einen SOI-Wafer, der beidseitig mit einer 300 nm dicken Niedrigspannung Siliziumnitridschicht ausgestattet ist. Die 10 µm dicke Siliziumschicht auf der Oberseite ist durch eine 600 nm thermische SiO-Schicht von dem restlichen Material getrennt. Der Cantilever wird durch eine Kombination aus reaktivem Ionenätzen und anisotropem

Siliziumätzen in KOH-Lösung hergestellt. Die 120 nm dicken Cr/Au-Kontakte werden über UV-Photolithographie erzeugt. Der Cantilever ist mit fünf Cr/Au-Kontakten ausgestattet, wobei vier an der Biegekante enden und die Mittelelektrode auf den Cantilever hinaus reicht. Die Anordnung der Kontakte erlaubt dadurch das Schreiben einer vollen Wheatstoneschen Brückenschaltung. In Abbildung 4 ist die verwendete Cantileverstruktur dargestellt.

Für die Charakterisierung der Empfindlichkeit der PTR-Sensorstrukturen auf Cantilevern wurde ein Spitzenmessplatz aufgebaut, der die Möglichkeit bietet *ex situ* den k-Wert der PTR-Sensorstrukturen zu bestimmen (siehe Abbildung 5). Der Spitzenmessplatz besteht aus einer Stereolupe und einem 3-achsigen Verschiebetisch, der die genaue Positionierung der PTR-Proben relativ zur Manipulatorspitze ermöglicht. Die Manipulatorspitze (Abbildung 5 rechts) ist eine aus Wolframdraht über elektrochemisches Ätzen hergestellte Spitze, die an einer Piezokeramik befestigt ist. Die Piezokeramik ermöglicht dabei eine Auslenkung der Spitze um maximal 2,2  $\mu\text{m}$ . Der Probenträger bietet die Möglichkeit 24 Kontakte zu vermessen. Die Dehnungsmessungen zur Bestimmung der relativen Widerstandsänderung der Sensorstrukturen werden standardmäßig mit Hilfe eines Lock-In-Verstärkers durchgeführt.

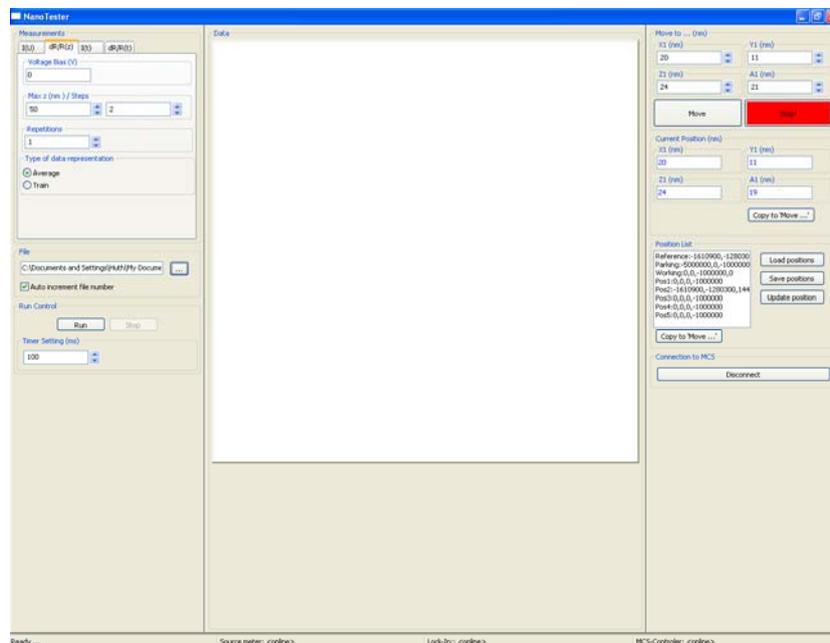


**Abbildung 5: Spitzenmessplatz für *ex-situ* Sensorcharakterisierung.** Links: Zur Untersuchung der Dehnungs-Charakteristik der PTR-Sensorstrukturen neu konzipierter Messplatz. Hauptbestandteile sind: Stereolupe und 3-achsiger Verschiebetisch für die genaue Positionierung der Proben und relativ zur Manipulatornadel, sowie elektrische Anschlüsse für die Messung der relativen Widerstandsänderung bei Dehnungsmessungen. Rechts: Wolframspitze befestigt an einer Piezo-Keramik, die für die Dehnung der PTR-Cantilever verwendet wird, sowie Probenträger mit zwei kontaktierten PTR-Cantilevern.

Zusätzlich zu der Möglichkeit *ex situ* die PTR-Dehnungscharakteristik bestimmen zu können, wurde ein 4-achsiger Nanomanipulator der Oldenburger Firma SmarAct im REM der Arbeitsgruppe Huth installiert und eine Software zur Ansteuerung des Manipulators für die Auslenkung von Cantilevern *in situ* erstellt. Die neu entwickelte Software integriert dabei mehrere Messmodi:

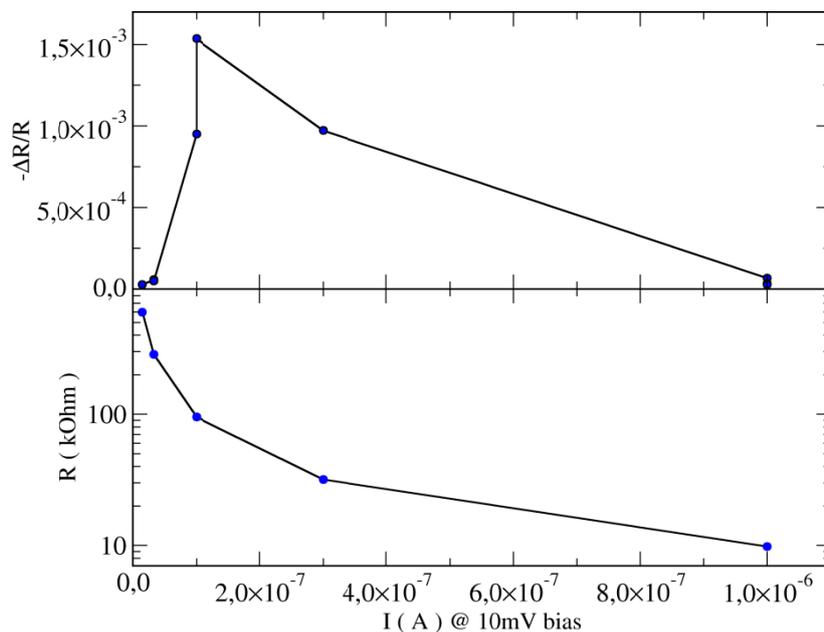
- Dehnungs-Widerstands-Messungen an Standard-Cantilevern und Mikro-Cantilevern
- I(V)-Charakteristik von PTR-Sensorstrukturen
- Leitfähigkeits-Zeit-Abhängigkeit der PTR-Sensorstrukturen (insbesondere auch beim Belüften des Mikroskops)
- Widerstands-Zeit-Abhängigkeit der PTR-Sensoren bei konstanter Dehnung

In Abbildung 6 ist die Nutzeroberfläche der entwickelten Software dargestellt, die für die *in situ* Charakterisierung der PTR-Sensorstrukturen entwickelt und verwendet wurde. Unter Verwendung des vierachsigen Nanomanipulators und der oben erwähnten Software können Experimente zur Dickenabhängigkeit von PTR-Sensorstrukturen durchgeführt werden. Dazu werden bei fester Bias-Spannung (typischerweise 10 mV) der Stromfluss durch den Sensor aufgezeichnet und die Deposition bei Erreichen eines vorgegebenen Schwellenwertes des Stromes unterbrochen. Anschließend wird mit Hilfe des Nanomanipulators eine Messung der Dehnungs-Widerstands-Charakteristik des Sensors durchgeführt. Im Anschluss wird die Sensordeposition weitergeführt bis zum Erreichen eines nächsten Stromschwellenwertes.



**Abbildung 6: NanoTester – Programm.** Programm für die *in-situ* Charakterisierung von PTR-Sensorstrukturen.

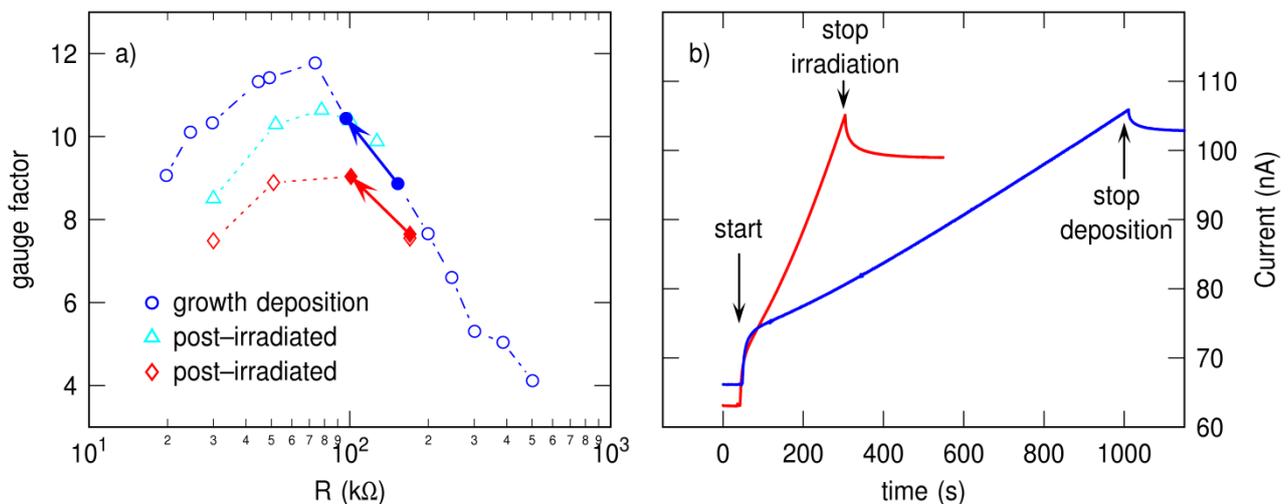
**Dehnungscharakteristik von W-C-O-Deponaten:** In Abbildung 7 ist die Abhängigkeit der Sensorempfindlichkeit vom Sensorstrom – und damit der Sensordicke – für PTR-Sensorstrukturen hergestellt mit EBID aus dem Präkursor  $W(CO)_6$  dargestellt. Für diese W-C-O-Deponate beobachtet man ein ausgeprägtes Maximum in der Sensorempfindlichkeit als Funktion der Sensordicke. Nichtsdestotrotz ist die maximale Empfindlichkeit für W-C-O-Deponate immer noch vergleichsweise gering und entspricht einem k-Wert von ca. 5. Zusätzlich zeigen die W-C-O-Deponate eine sehr starke Fluktuation in ihren elektrischen und sensorischen Eigenschaften, auch bei identischen Depositionsparametern. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit W-C-O-Deponaten war damit nur schwer realisierbar, so dass der überwiegende Teil der PTR-Sensorstrukturen aus den im Folgenden diskutierten Pt-C-Deponaten hergestellt wurde.



**Abbildung 7:** Dickenabhängigkeit des k-Werts (oben) und des Widerstands (unten) eines PTR-Sensors präpariert mit dem Präkursor  $W(CO)_6$ .

**Dehnungscharakteristik von Pt-C-Deponaten:** Im Anschluss an die Experimente mit W-C-O-Deponaten wurden Experimente zur Dickenabhängigkeit von  $MeCpPt(Me)_3$ -basierten Pt-C-Sensoren durchgeführt. Dabei wurde während des Depositionsprozesses bei einer festen Bias-Spannung von 10 mV der Stromfluss durch das Sensormaterial aufgezeichnet und die Deposition bei Erreichen eines vorgegebenen Schwellenwertes unterbrochen. In Abbildung 8b ist exemplarisch die Änderung der Leitfähigkeit während der Deposition dargestellt. Im Anschluss folgte eine Messung der Dehnungs-Widerstands-Charakteristik des Sensors *in situ*, um den jeweiligen k-Wert zu bestimmen. Danach wurde die Sensordeposition fortgeführt bis zum Erreichen des nächsten gewünschten Stromschwellenwertes. In Abbildung 8a ist die Empfindlichkeit des Sensormaterials als Funktion des Widerstands der Deponate – und damit der Sensordicke – aufgetragen (offene Kreise). Es zeigt sich ein ausgeprägtes Maximum der Sensorempfindlichkeit bei ca. 75 k $\Omega$ . Dieses Ergebnis ist in guter quantitativer Übereinstimmung mit dem in

Projektbereich B1 entwickeltem Modell zur Beschreibung der Sensorempfindlichkeit von granularen Metallen<sup>17</sup>, das ebenfalls ein Maximum in der Empfindlichkeit im Arrhenius Transportregime voraussagt. Die dort abgeleiteten Parameter, die die Empfindlichkeit des Sensormaterials am stärksten beeinflussen, sind die intergranulare Leitfähigkeit  $g$ , die Korngröße der metallischen Nanopartikel  $d$  und die dielektrische Konstante der isolierenden Matrix  $\epsilon_i$ . Der elektrische Widerstand der Deponate, respektive die Leitfähigkeit des Sensormaterials, ändert sich nicht nur mit zunehmender Dicke der Deponate, sondern kann auch durch Bestrahlungseffekte des Elektronenstrahls während der Deposition beeinflusst werden. Durch die Bestrahlung kann die Korngröße der metallischen Nanopartikel und/oder die dielektrische Konstante der isolierenden Matrix beeinflusst werden und damit die Empfindlichkeit der Sensoren stark variieren. Der Einfluss der reinen Elektronenbestrahlung wurde untersucht, indem zunächst Sensordeponate bis zu einem Widerstand von ca. 170 k $\Omega$  bzw. ca. 130 k $\Omega$  deponiert wurden und danach mit abgeschaltetem Präkursor-Gasfluss die Deponate bestrahlt wurden. Die Dehnungs-Widerstands-Charakteristiken der bestrahlten Deponate zeigen ebenfalls ein ausgeprägtes Maximum (Abbildung 8a, offene Dreiecke und Rauten). Im Vergleich zu den W-C-O-Sensoren ist die erzielte Empfindlichkeit der Pt-C-Sensoren deutlich größer. Noch wichtiger ist allerdings die hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, die für anwendungsbezogene Arbeiten von hoher Wichtigkeit ist.

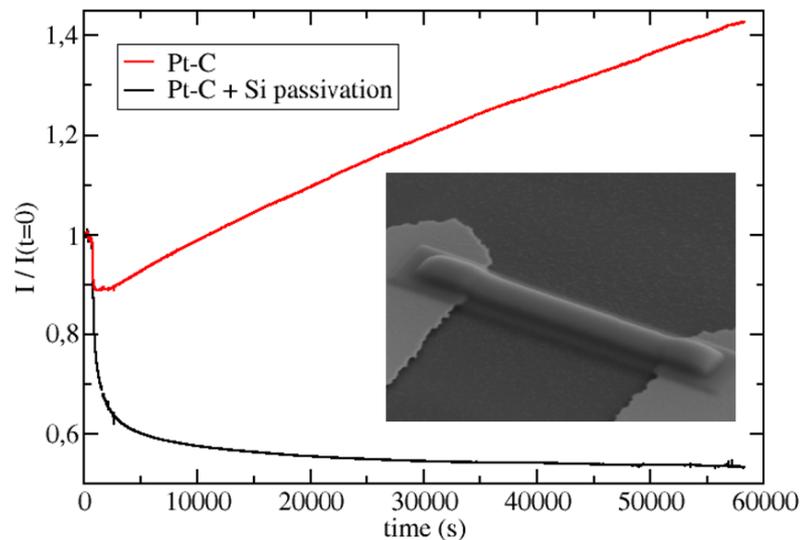


**Abbildung 8:** (a) Gemessene k-Werte für Pt-C-Deponate unterschiedlicher Dicken (offene Kreise) sowie nach Bestrahlung mit dem Elektronenstrahl (offene Dreiecke + Rauten). Die Pfeile markieren den Bereich der *in situ* Leitfähigkeitsmessungen als Funktion der Zeit während der Deposition (blau) und für nachbestrahlte Deponate (rot). (b) Leitfähigkeitsmessungen während der Deposition (blau) und während der Nachbestrahlung (rot) aufgenommen für eine Bias-Spannung von 10 mV. Abbildung entnommen aus Schwalb, 2010<sup>12</sup>.

### 3 Stabilität der elektrischen Eigenschaften von EBID-Strukturen

**Stabilität von W-C-O-Deponaten:** Wie in Abschnitt 2 dargestellt hat das W-C-O-System für PTR-Sensoranwendungen keine hohe Relevanz, da sowohl die Empfindlichkeit, als auch die Reproduzierbarkeit nur gering sind. Für ambiante Bedingungen wurde die Leitfähigkeit von W-C-O-Deponaten untersucht und publiziert<sup>19</sup>. Auf eine detaillierte Untersuchung der W-C-O-Deponate in Flüssigkeiten wurde verzichtet.

**Stabilität von Pt-C-Deponaten:** Das Pt-C-System ist für PTR-Sensoranwendungen besonders geeignet. Zum einen ist die Reproduzierbarkeit der Pt-C-Sensorstrukturen enorm wichtig, zum anderen ist die geringe chemische Reaktivität von Pt in Verbindung mit der sauerstofffreien Matrix von Vorteil. Für den Einsatz der PTR-Sensorstrukturen in Flüssigkeiten ist eine Passivierung der Sensoren dennoch von Vorteil, um Alterungseffekte und irreversible Änderungen (z.B. in stark ionischen Flüssigkeiten) der Sensoren zu vermeiden. Im Zuge dieses Projektes wurde dafür ein Selbstbau-Gasinjektionssystem entwickelt<sup>10</sup>, das die Möglichkeit bietet, unterschiedliche Materialien für die Abscheidung und Passivierung im REM zu verwenden. Die dabei hauptsächlich untersuchten Materialien für die Passivierung waren Tetramethylsilan (TMS) und ein in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Terfort (Physikalische Chemie, Goethe Universität Frankfurt) entwickelter Silan-Oligomer, der es erlaubt amorphes Silizium abzuscheiden. Die besten Ergebnisse lieferte die Passivierung mit dem Silan-Oligomer. Abbildung 9 zeigt das Alterungsverhalten der Leitfähigkeit von nicht-passivierten und passivierten Pt-C-Sensoren an Luft. Der nicht-passivierte Pt-C-Sensor zeigt dabei auch nach mehreren Stunden noch keine Sättigung im Alterungsverhalten. Im Gegensatz dazu zeigt der mit amorphem Silizium passivierte Pt-C-Sensor eine klare Sättigung in der Leitfähigkeit. Damit bietet die Passivierung mit amorphem Silizium einen vielversprechenden Ansatz für den Einsatz der PTR-Sensoren in Flüssigkeiten.

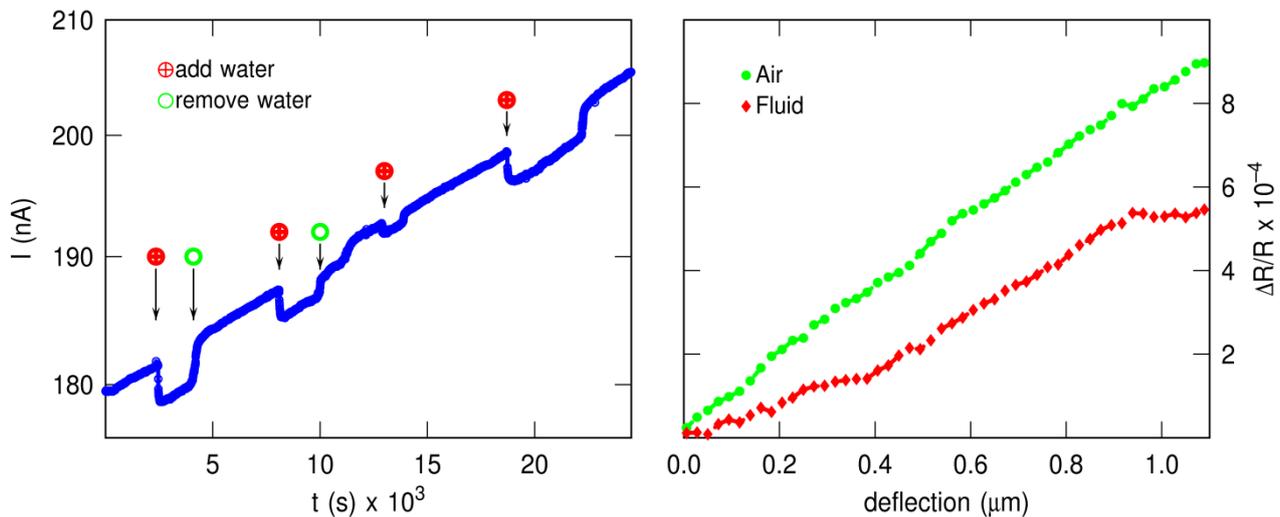


3

**Abbildung 9: Alterungsverhalten von Pt-C-Sensorstrukturen an Luft.** Alterungsverhalten von nicht passiviertem Pt-C-Sensor (rot) und mit einem Silan-Oligomer passivierten Pt-C-Sensor (schwarz). Der nicht passivierte Sensor zeigt auch nach mehreren Stunden noch keine Sättigung im Alterungsverhalten. Der passivierte Sensor dagegen zeigt ein Sättigungsverhalten. Inset: REM-Aufnahme der passivierten Pt-C-Sensorstruktur.

Ein weiterer interessanter Aspekt zeigt sich in der Beeinflussung der Sensoreigenschaften durch den Passivierungsprozess. Eine dünne Passivierungsschicht des Pt-C-Sensors mit amorphem Silizium führt zu einem Anstieg der Sensitivität von bis 25%. Der Hauptgrund für diesen beobachteten Anstieg könnte in einer Modifizierung der Matrix der PTR-Deponate liegen. Ein vielversprechender Ansatz für eine neue Generation von PTR-Sensoren könnte hier die Verwendung von binären EBID-Prozessen darstellen, in denen bspw. der Si-Präkursor mit einem metallorganischen Präkursor gemischt eingesetzt wird, um damit eine veränderte Matrix- oder Nanokristallit-Zusammensetzung zu erhalten. Erste Ergebnisse zu diesem Ansatz werden aktuell in einem Manuskript zusammengefasst<sup>14</sup>.

In Abbildung 10 links ist der Einfluss von Flüssigkeiten (aqua dest.) auf die Leitfähigkeit der Pt-C-Sensoren dargestellt. Zu erkennen ist die Alterung der Pt-C-Deponate an Luft als nahezu linearer Untergrund. Die Zugabe von aqua dest. führt zu einer leichten Abnahme der Leitfähigkeit. Der Prozess ist aber komplett reversibel. In Abbildung 10 rechts ist die Dehnungs-Widerstands-Charakteristik des Pt-C-Sensors in Luft und in destilliertem Wasser gezeigt. In der Flüssigkeit zeigt sich eine leichte Abnahme der Empfindlichkeit der PTR-Sensoren, wobei auch dieser Prozess reversibel ist.

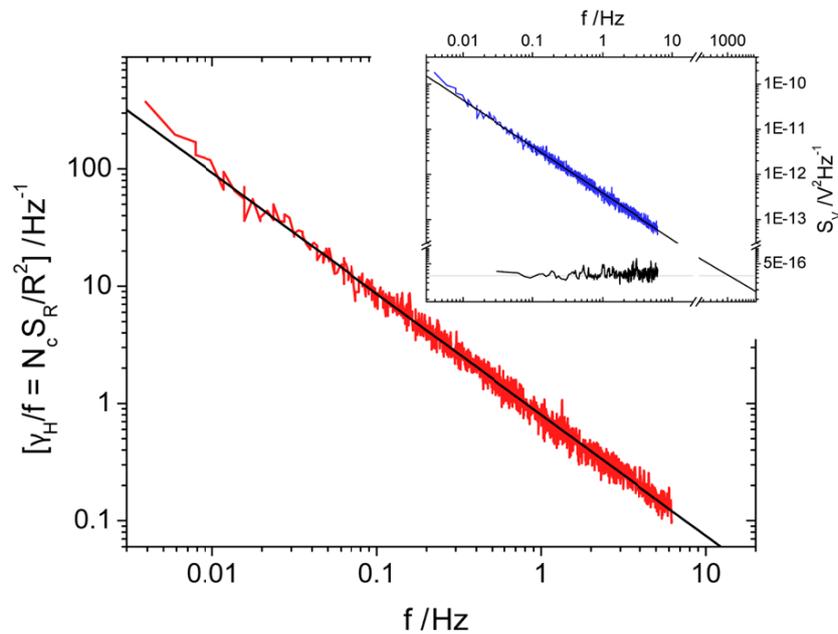


**Abbildung 10: Links)** Änderung der Leitfähigkeit eines Pt-C-Sensors bei wiederholter Zugabe und anschließendem Entfernen von destilliertem Wasser für eine Bias-Spannung von 10 mV. **Rechts)** Dehnungs-Widerstands-Charakteristik des Pt-C-Sensors an Luft und in destilliertem Wasser.

#### 4 Rauschverhalten nanogranularer Materialien

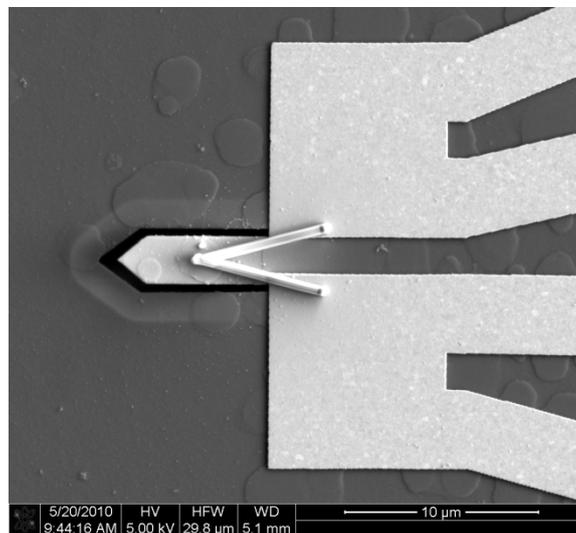
Das Rauschverhalten der nanogranularen PTR-Sensoren wurde im Laufe der Projektarbeit in einer Kooperation mit Prof. Jens Müller (Physikalisches Institut der Goethe-Universität Frankfurt) durchgeführt. Ziel war es, das durch das Rauschen bestimmte Auflösungsvermögen der PTR-Sensoren zu bestimmen. Abbildung 11 zeigt die normierte spektrale Leistungsdichte (*power spectral density*, PSD) des Widerstands-Rauschspektrums für einen Pt-C-Sensor, der im Bereich der optimalen Empfindlichkeit präpariert wurde. Das Rauschen zeigt ein typisches  $1/f$ -Verhalten. Im Inset in Abbildung 11 sind Spannungs-PSD aufgenommen für  $I=38.8\mu\text{A}$  (blau) und  $I=0$  (schwarz) dargestellt. Dabei entspricht die Messung für  $I=0$  dem Hintergrundrauschen (thermisches Rauschen). Wie aus dem Graphen ersichtlich ist, zeigen die Rauschmessungen der PTR-Sensoren für  $f_c \sim 1\text{kHz}$  einen Schnittpunkt mit dem thermischen Rauschen, so dass für eine Frequenz  $f > f_c$  Messungen mit PTR-Sensoren nur noch durch das Hintergrundrauschen in ihrer Auflösung limitiert sind.

Die Experimente zeigen, dass mit der statischen Deflektions-Messmethode bei Messungen über 1 kHz ein optimales Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht werden kann. Die Methode der dynamisch angeregten Cantilever wurde nicht weiterverfolgt, da in Flüssigkeiten eine sehr starke Dämpfung der angeregten Cantilever erfolgt, so dass dadurch kein messtechnischer Vorteil zu erwarten ist.



**Abbildung 11: Rauschmessungen an Pt-C-Sensorstrukturen.** Normierte spektrale Leistungsdichte (power spectral density, PSD) des Widerstands-Rauschspektrums für einen Pt-C-Sensor mit den Dimensionen  $15.1\mu\text{m} \times 1.3\mu\text{m} \times 0.3\mu\text{m}$ . Inset: Spannungs-PSD aufgenommen für  $I=38.8\mu\text{A}$  (blau) und  $I=0$  (schwarz). Die schwarze Messkurve entspricht thermischem Rauschen. Abbildung entnommen aus Porra *et al.*, 201016.

## 5 EBID-PTR-Sensoren auf Mikrocantilevern und Membranstrukturen

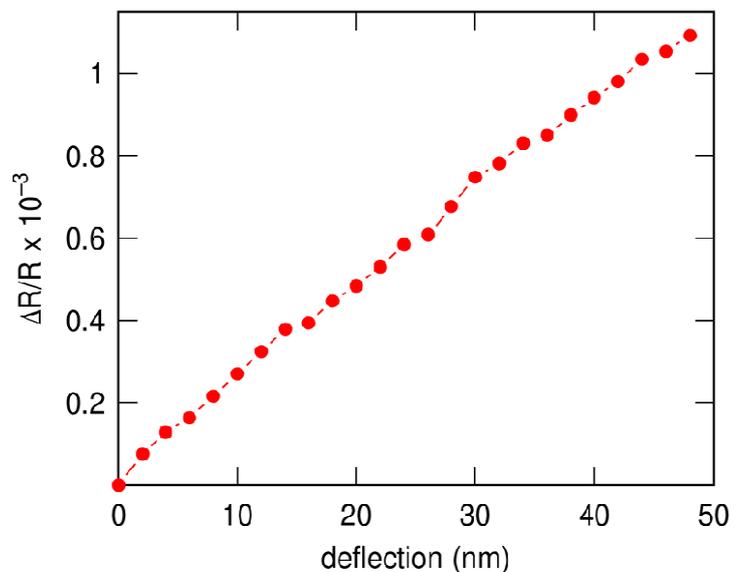
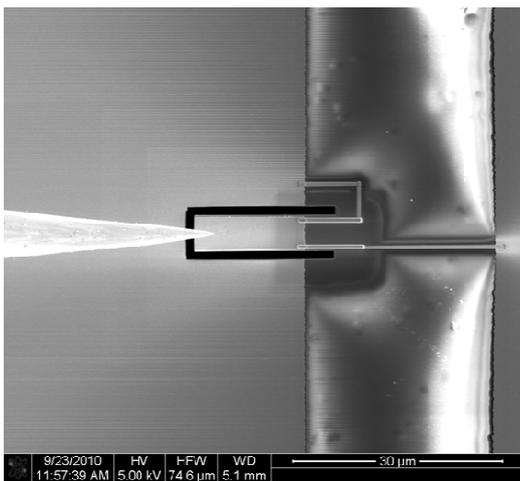


**Abbildung 12:** REM-Aufnahme eines Mikrocantilevers aus der Arbeitsgruppe von Prof. Tornow in Braunschweig, ausgestattet mit einem PTR-Sensor.

Im Hinblick auf den Einsatz der PTR-Sensoren für die Detektion von Spannungszuständen von Doppellipidschichten ist deren Integrierbarkeit auf SOI-basierten Cantilevern (oder alternativen Cantileverstrukturen), sowie auf SOI-Kavitätsarrays nachzuweisen. Dieser Projektteil ist sehr anspruchsvoll, weil drei Prozesstechnologien zusammengeführt werden müssen: Mikrostrukturierung auf Si-Basis, Integration der PTR-Sensoren mittels EBID und Einsatz mit Doppellipidschichten. Für die Detektion der Doppellipidschichtbildung benötigt

man idealerweise Mikrocantilever mit einem optimierten Dicken-zu-Längen-Verhältnis, um eine möglichst große Empfindlichkeit zu erreichen. Hier können PTR-Sensoren ihr volles Potential ausspielen, da eine Detektion der Cantilverbiegung hier mit optischen Methoden nicht mehr möglich ist und auch konventionelle piezoresistive Sensorstrukturen hier nicht mehr einsetzbar sind.

Für die Herstellung der Mikrocantilever wurden zwei parallele Ansätze verfolgt. Zum einen wurden Mikrocantileverstrukturen verwendet, die im Rahmen des Arbeitspakets A3 an der Technischen Universität Braunschweig in der AG Tornow hergestellt wurden (siehe Abbildung 12). Die Mikrocantilever besitzen eine Länge von 8  $\mu\text{m}$ , eine Breite von 3  $\mu\text{m}$  und eine Dicke von 0.1  $\mu\text{m}$ . In Abbildung 12 ist ein REM-Bild der Microcantileverstruktur mit deponiertem PTR-Sensor zwischen den Goldkontakten dargestellt. Die Deposition des Sensors war erfolgreich und eine Auslenkung des Mikrocantilevers mit dem dreiaxigen Nanomanipulator konnte *in-situ* durchgeführt werden. Eine Bestimmung der Sensitivität des Sensors konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden, da das verwendete Silizium-Substrat keine ausreichend dicke Oxid-Schicht hatte. Dadurch entstand ein Kontakt zwischen den aufgebracht Goldelektroden, der die elektrische Charakterisierung der hochohmigen Sensorstrukturen unmöglich machte. Die Lösungen dieser Probleme, z.B. durch den Einsatz isolierender Nitrid- oder Oxid-Schichten müssen in einem Folgeprojekt angegangen werden.



**Abbildung 13: Links)** REM-Aufnahme eines mittels FIB-Ätzen einer 300 nm  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran hergestellten Mikrocantilevers der Dimension  $20\mu\text{m} \times 4\mu\text{m} \times 0.3\mu\text{m}$  ausgestattet mit PTR-Sensorstrukturen. Links im Bild ist die Nanomanipulatorenanode sichtbar, die für die Messung der Dehnungs-Widerstands-Charakteristik verwendet wurde. **Rechts)** Dehnungs-Widerstands-Charakteristik des Mikrocantilevers. Die erreichbare Auflösung liegt bei mindestens 1 nm.

Der zweite Ansatz für die Herstellung von Mikrocantilevern ist in Abbildung 13 dargestellt. Hier wurde eine 300 nm dicke  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranstruktur verwendet, die teilweise mit einer dünnen Cr/Au-Schicht bedeckt war. Mit Hilfe von fokussiertem Ionenstrahlätzen (FIB) wurde aus der Membran eine Cantileverstruktur herausgeschnitten und zwar so, dass der Cantilever teilweise mit der Cr/Au-Schicht bedeckt war. Der so entstandene Mikrocantilver

konnte anschließend mit den PTR-Sensorstrukturen ausgestattet werden und die Dehnungs-Widerstands-Charakteristik mit Hilfe einer sehr feinen Nanomanipulatornadel untersucht werden. Die in Abbildung 13 rechts gezeigte Messkurve der relativen Widerstandsänderung als Funktion der Auslenkung macht deutlich, dass mit einem solchen Mikrocantilever Auflösungen von mindestens 1 nm erreicht werden können. Durch die Cr/Au-Schicht besteht zusätzlich die Möglichkeit einer geeigneten Funktionalisierung der Mikrocantilever-Oberfläche, so dass die Ausbildung einer Doppellipidschichtbildung anhand der Verbiegung des Cantilevers in Echtzeit verfolgt werden könnte.

## **b) Vergleich Stand des Vorhabens mit ursprünglicher Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung**

**B-MS0:** *Identifikation der primären Ladungstransportmechanismen, die beim PTR-Effekt wirksam werden*

Dieser Meilenstein wurde in vollem Umfang erreicht.

**B-MS1:** *Optimierung des EBID-Prozesses hinsichtlich eines möglichst großen PTR-Effektes*

Für das Pt-C-System konnte auch dieser Meilenstein in vollem Umfang erreicht werden. Die entwickelte Theorie zum PTR-Effekt in nanogranularen Materialien erlaubt es, sinnvolle Rahmenbedingungen für einen möglichst großen PTR-Effekt quantitativ zu formulieren.

**B-MS2:** *Anpassung des EBID-Prozesses für PTR-Sensorstrukturen auf SOI-Oberflächen; lineares Array*

Es konnte nachgewiesen werden, dass der EBID-Prozess mit Mikrocantileverstrukturen auf Si- und Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-Basis sehr gut kompatibel ist, ja im Vergleich mit gewöhnlichen halbleiterbasierten, piezoresistiven Sensoren absolute Alleinstellungsmerkmale besitzt. Die vollständige Integration auf SOI-Kavitätsarrays ist noch nicht durchgeführt worden, stellt aber kein prinzipielles Problem dar. Es sind vielmehr dazu noch weitere vorbereitende Schritte nötig. Insbesondere die Passivierbarkeit der PTR-Sensoren ist noch nachzuweisen.

**B-MS3:** *Anpassung des EBID-Prozesses für PTR-Sensorstrukturen auf zweidimensionalem Array von Kavitäten in SOI-Technik*

Wie unter B-MS2 ausgeführt gibt es hier keine prinzipiellen Probleme. Die tatsächliche Durchführung verbleibt als Aufgabe für ein Folgeprojekt.

**B-MS4:** *Identifikation geeigneter Präkursoren für chemisch und elektrisch stabile PTR-Sensorstrukturen in wässriger Umgebung*

Das Pt-C-System stellt hierfür die vielversprechendste Grundlage dar. Als verbleibende Aufgabe ist die Passivierungsproblematik zu lösen.

**B-MS5:** *Nachweis der Funktion des Sensors in wässriger Umgebung*

Dieser ist mit nicht passivierten PTR-Sensoren auf Pt-C-Basis in *aqua dest.* erfolgt. In einer physiologisch relevanten, flüssigen Umgebung ist das Passivierungsproblem noch zu lösen.

**B-MS6:** *Nachweis hinreichender Sensorempfindlichkeit für die Detektion von Membranspannungen*

Durch Verwendung der Kenngrößen von Cantilevern, die für die optische Detektion von Cantilever-Deflektionen bei der Doppellipidschichtbildung eingesetzt wurden<sup>20</sup>, lässt sich eine Abschätzung für PTR-Sensoren machen. Die bislang erreichte Empfindlichkeit und das erzielbare Rauschniveau (insbesondere für  $f > 1$  kHz) wird es erlauben, die Doppellipidschichtbildung bei chemisorbierten Schichten auf Cantilevern in Echtzeit mit guter Auflösung zu verfolgen. Bei physisorbierten Schichten wird die Doppellipidschichtbildung sichtbar aber schlecht aufgelöst sein. Durch Einsatz entsprechend verkleinerter Cantileverstrukturen (Mikrocantilever) ist die Empfindlichkeit allerdings erheblich zu steigern. Dort spielen EBID-PTR-Sensoren ihr volles Potential aus.

**B-MS7:** *Nachweis hinreichender Sensorempfindlichkeit für transiente Signale beim Transport von (Einzel-) Molekülen durch die Membran in die Kavitäten*

Es ist an dieser Stelle nur zu vermuten, dass die Sensorempfindlichkeit in der bislang erreichten Höhe dazu nicht ausreichen wird. Diese höchst anspruchsvollen Untersuchungen müssen in einem Folgeprojekt angegangen werden.

**c) Relevante Forschungsergebnisse von dritter Seite während der Projektlaufzeit**

Im Laufe der Projektlaufzeit wurden am Fraunhofer-Institut für Schicht und Oberflächentechnik in Braunschweig Experimente an metallhaltigen, diamantartigen Kohlenstoffschichten (me-DLC) durchgeführt, die auch für die Dehnungssensorik eingesetzt werden können. Eine Konkurrenzsituation zu EBID-basierten PTR-Sensoren besteht nicht, da diese vor allem in der Nanosensorik ihre Vorzüge ausspielen, der den Me-DLC-Sensoren nicht oder nur mit erheblichem Lithographieaufwand zugänglich ist.

---

<sup>20</sup> Liu & Biswal, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7527–7532

### 3.1 Teilprojekt C (Prof. Dr. Robert Tampé)

#### a) Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse im Vergleich mit der ursprünglichen Planung

Zur Charakterisierung des Membrantransports wurde ein Mikroskopieaufbau realisiert, der die hochempfindliche Detektion von Einzelmolekülen mit guter Zeitauflösung gestattet. Eine gekühlte CCD-Kamera ermöglicht die zeitliche Aufnahme von Fluoreszenz mit hervorragendem Signal/Rauschen-Verhältnis.

#### Funktionalisierung der Chipoberflächen mit planaren Lipidmembranen

Beim Aufbringen einer planaren Lipidmembran (*suspended lipid bilayer*, SLB) auf die Nanoporen sollten die folgenden Kriterien erfüllt werden:

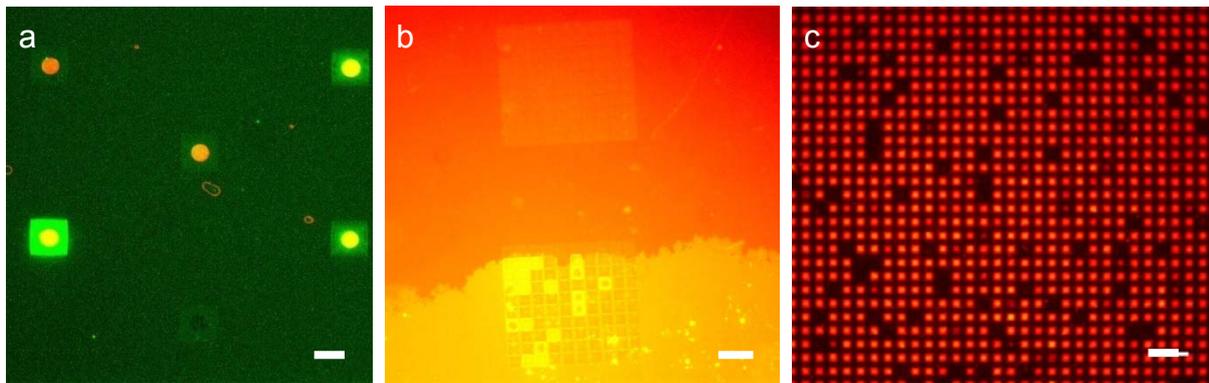
- homogene, möglichst vollständige Bedeckung aller Poren durch die freitragende Lipidmembran
- Abtrennung des Kompartiments vom Außenmedium
- Langzeitstabilität der Membran (mindestens für den Zeitraum einer Messung)
- Unilamellare Membran, d.h. nicht dicker als eine Lipiddoppelschicht
- Geeignet für die Rekonstitution von medizinisch relevanten Membrantransportern

Die folgenden Präparationsmethoden wurden auf ihre Eignung in Bezug auf diese Kriterien überprüft (Abbildung 1):

- (1) Mikro- bzw. Nano- *Black Lipid Membranes*<sup>21</sup>
- (2) Vesikelspreitung von GUVs
- (3) Vesikelspreitung von LUVs

---

<sup>21</sup> Weiskopf *et al.*, *Langmuir* **2007**, 23, 9134-9.



**Abbildung 1: Überspannen der Poren durch planare Lipidmembranen (SLBs).** Durch Einschluss eines Fluoreszenzfarbstoffs in den Kompartimenten wird überprüft, ob die Poren durch eine Membran abgedichtet sind. **a)** Mikro-BLMs. Hier gelingt oft eine gute Bedeckungseffizienz, aber es verbleiben oft dickere Lipidschichten auf der Oberfläche. Die Lipidschicht (rot) ist nur im Bereich der Öffnungen sichtbar, da ihre Fluoreszenz andernorts durch die Goldoberfläche gelöscht wird. Balken: 1  $\mu\text{m}$ . **b)** Spreitung von GUVs. Die Vesikel bilden großflächige Membranen aus, die jeweils eine Vielzahl von Poren überdecken. Jedoch ist nicht die gesamte Chipoberfläche mit der Lipidmembran bedeckt. Balken: 10  $\mu\text{m}$ . **c)** Spreitung von LUVs. Die Chipoberfläche ist homogen mit einer durchgängigen Lipidschicht bedeckt, so dass die Mehrzahl der Nanoporen abgedichtet ist. Balken: 10  $\mu\text{m}$ .

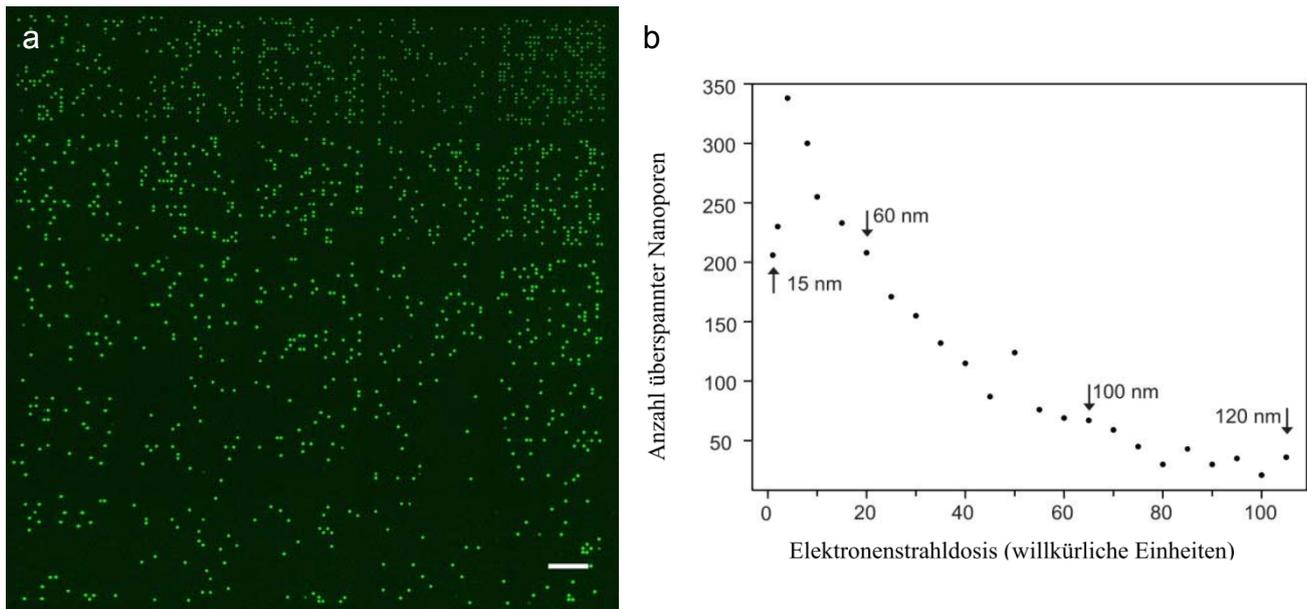
Die Membranüberspannung wurde durch Fluoreszenzmikroskopie (Farbstoffeinschluss in den Kompartimenten) und Rasterkraftmikroskopie nachgewiesen (siehe auch Zwischenbericht 2008). Die Fluidität der Membran konnte durch FRAP-Experimente gezeigt werden.

Am geeignetsten stellte sich Methode (3) heraus, da sie alle Kriterien weitestgehend erfüllen kann, sofern der Porendurchmesser klein genug ist. Methode (1) ist weniger geeignet, da die Anwesenheit von organischem Lösemittel wie in (1) Membranproteine denaturieren kann und es bei der Präparation häufiger zur Ausbildung dickerer Lipidschichten kommt. Außerdem muss hier die Oberfläche des Chips zunächst mit einer Goldschicht bedampft und anschließend vor jedem Experiment mit einer hydrophoben selbstorganisierten Monolage (SAM) funktionalisiert werden. Ein Vorteil ist jedoch, dass auch größere Poren (Mikrometerbereich) leicht überspannt werden können. Methode (2) liefert schlechtere Bedeckungseffizienzen, da die GUVs nach der Präparation sehr verdünnt vorliegen. Auch die funktionelle Rekonstitution von Membranproteinen ist hier problematisch und nur für wenige Beispiele belegt<sup>22</sup>. Die Bildung von Proteoliposomen aus LUVs ist dagegen für eine Vielzahl medizinisch relevanter Membranproteinen etabliert.

Zur Präparation der SLB durch Vesikelspreitung ist lediglich eine Oxidation der Siliziumnitrid-Chipoberfläche nötig. Im Gegensatz zu anderen Methoden muss die Oberfläche also nicht mit organischen Lösungsmitteln benetzt oder chemisch modifiziert werden. Wir konnten einen deutlichen Zusammenhang zwischen Bedeckungseffizienz und der Größe der Nanoporen feststellen (Abbildung 2). Die Verwendung von Nanoporen  $\leq 50$  nm ermöglicht allgemein gute Bedeckungseffizienz bei der Verwendung von LUVs bzw. Proteoliposomen. Da die Größenverteilung der Vesikel von Präparation zu

<sup>22</sup> Walde *et al.*, *ChemBioChem* **2007**, *11*, 848-865.

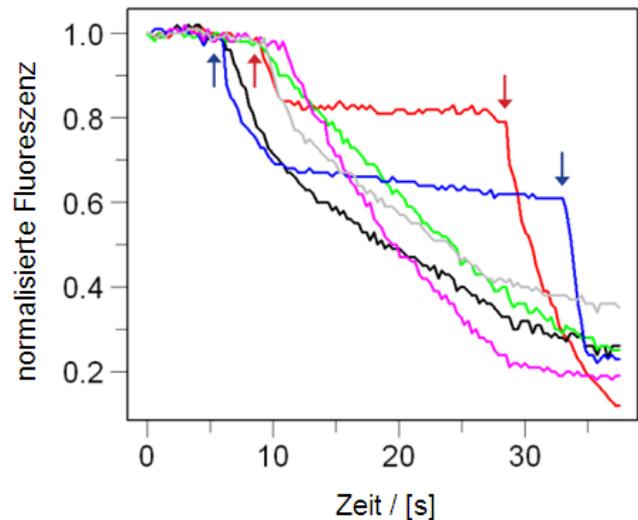
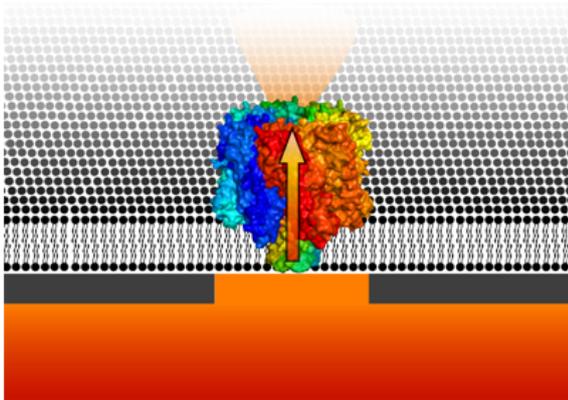
Präparation variiert, kann sich auch die absolute Bedeckungseffizienz zwischen den Experimenten unterschiedlich verhalten (siehe auch Zwischenbericht 2009).



**Abbildung 2: Die Bedeckungseffizienz der Nanoporen ist antikorreliert mit dem Nanoporendurchmesser.** Die Nanoporen wurden durch Vesikelfusion mit einer freitragenden Lipidmembran (SLB) bedeckt. **a)** Zusammengesetzte Mikroskopieaufnahme aller Nanoporen-Arrays. Die Poren mit dem geringsten Durchmesser (rechts oben) weisen eine wesentlich bessere Bedeckungseffizienz auf als die größten Poren (links unten). Balken: 100 µm. **b)** Bedeckungseffizienz in Abhängigkeit des Porendurchmessers. Da die Größe der Nanoporen (für einige Datenpunkte mit Pfeilen gekennzeichnet) bei der Vermessung im Elektronenmikroskop nur mit einem Fehler von +/- 5 nm bestimmt werden kann, ist in der X-Achse statt des Durchmessers die bei der Fabrikation der Nanoporen verwendete Elektronenstrahldosis angegeben.

Als Konzeptstudie wurde der Membrantransport am Beispiel des Kanalproteins  $\alpha$ -Hämolysin untersucht. Dabei wurde das Protein durch spontane Insertion in die durch vorab mittels Vesikelfusion ausgebildete Nanoporen-überspannende Lipidmembran eingebracht. Nun konnte der Transport eines zuvor in die Mikrokompartimente eingeschlossenen Fluoreszenzfarbstoffs durch die Proteinpore verfolgt werden (Abbildung 3). Dass es sich bei den Messungen um einzelne Proteinmoleküle handelt, kann aus Gründen der Kinetik (Übereinstimmung der Abklingkonstante mit Modellrechnungen) und dem geometrischen Kurvenverlauf (Abbildung 3b) als gesichert gelten: Aufgrund von zwischenzeitlichen Plateaus einiger der Effluxkurven kann man auf laterale Diffundieren einzelner Proteinmoleküle aus dem Bereich der Nanopore schließen.

Aufgrund der vergleichsweise großen Dimensionen der Nanokavitäten (ihre Grundfläche ist etwa 100x größer als die der Nanoporen) kann der Transport dank hoher Fluoreszenzintensität sehr empfindlich verfolgt werden. Die inneren Wände der Kavitäten reflektieren das Fluoreszenzlicht wie ein Spiegel und erhöhen dadurch zusätzlich die Signalstärke.

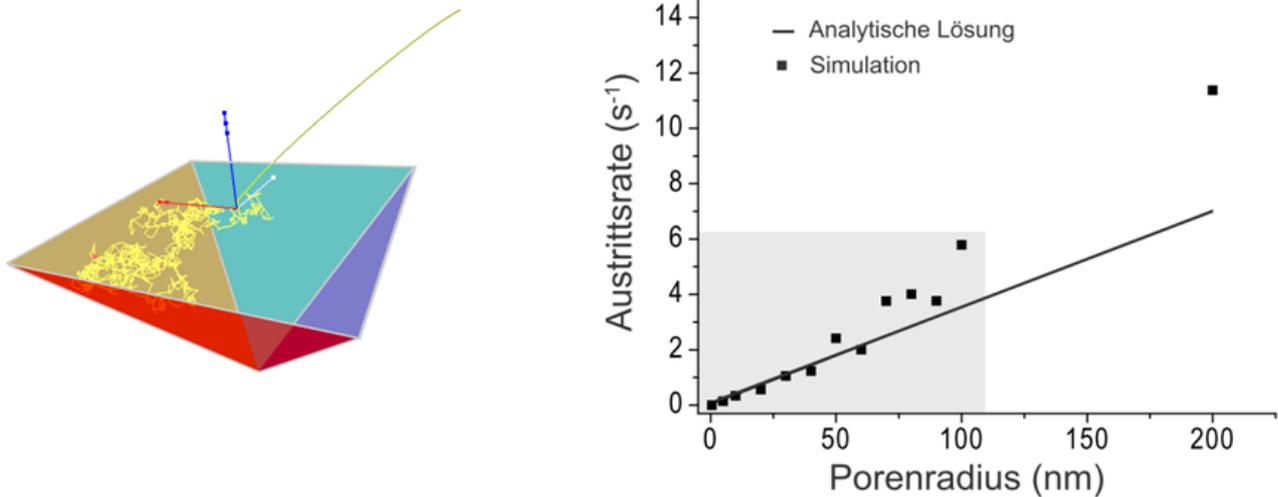


**Abbildung 3: Einzelmolekülmessung von Membrantransportern auf Nanoporen.** **a)** Einzelne Hämolyysinmoleküle inserieren asymmetrisch in die mit einer Lipidmembran bedeckten Nanopore. Im Folgenden kann der Transport eines Analyts (in diesem Fall ein Fluorophor) durch die Proteinpore via zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzintensität verfolgt werden. **b)** Repräsentative Beispiele der Einzelmolekül-Transportmessungen von  $\alpha$ -Hämolyysin. Alle hier gezeigten Kurven wurden simultan im gleichen Experiment aufgenommen. Bemerkenswert sind die durch Pfeile hervorgehobenen Unstetigkeiten in den Messkurven: der exponentielle Abfall ist in einigen Fällen durch ein Plateau unterbrochen. Dies deutet darauf hin, dass das Kanalprotein  $\alpha$ -Hämolyysin aufgrund seiner asymmetrischen Struktur und des unidirektionalen Einbaus in die Lipidmembran lateral aus dem Bereich der Nanopore heraus diffundieren kann.

Im Einklang mit theoretischen Arbeiten anderer Gruppen<sup>23,24</sup> zeigen unsere Modellberechnungen sowie 3D-Random-Walk Simulationen, dass sich der Ausstrom eines Analyten aus den Kompartimenten des Chips mithilfe eines monoexponentiellen Geschwindigkeitsverlaufs beschreiben lässt (Abbildung 4). Da die Effluxkinetik stark vom Volumen des Kompartiments abhängt, sind deren präzise Geometrie und die Kontrolle ihrer Dimensionen bei der Fertigung der Chips von entscheidender Bedeutung für eine aussagekräftige Auswertung der Messdaten.

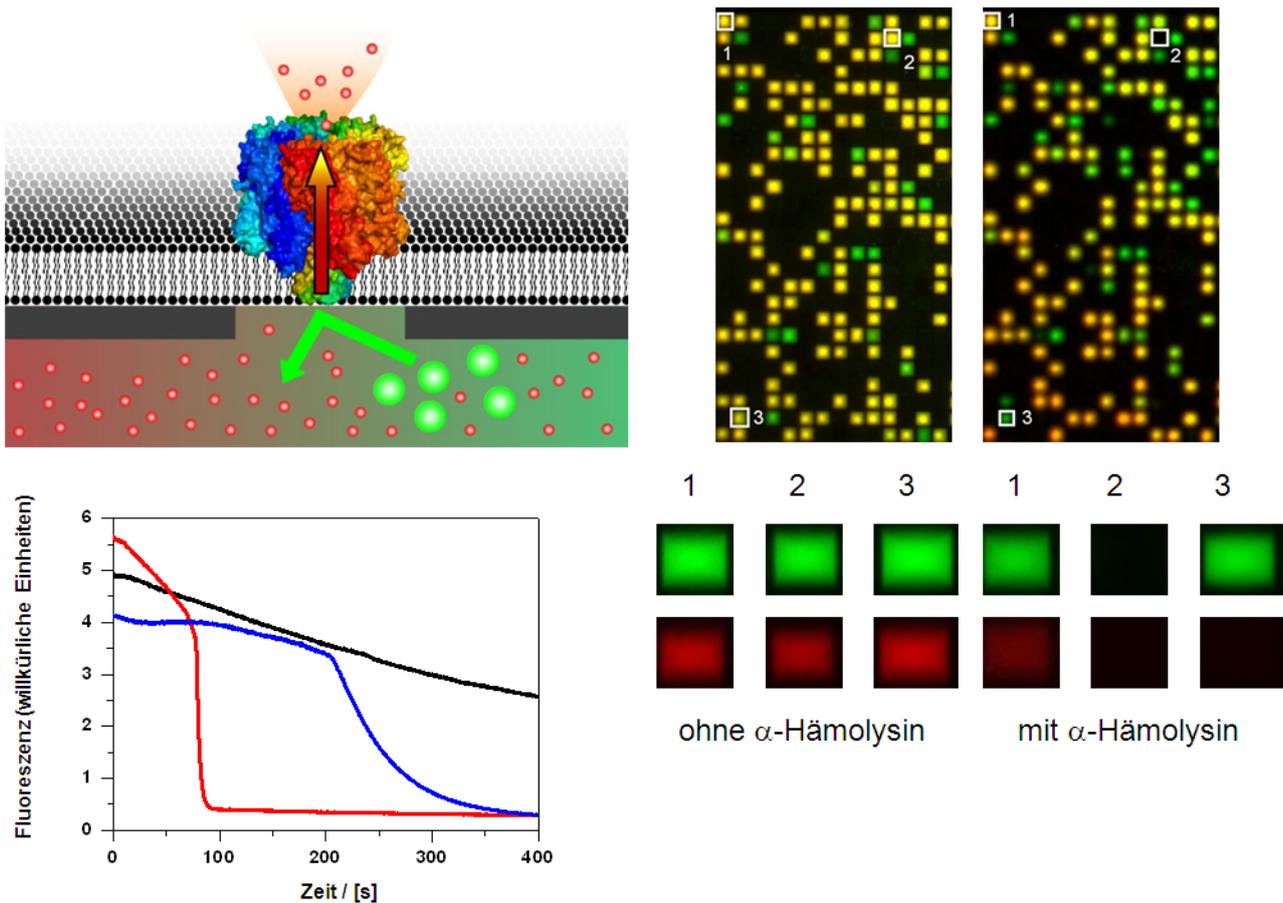
<sup>23</sup> Schuss *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2007**, *104*, 16098–103

<sup>24</sup> Grigoriev *et al.*, *J. Chem. Phys.* **2002**, *116*, 9574–77.



**Abbildung 4: Die Kinetik des freien Efflux durch die Nanopore kann durch ein monoexponentielles Modell beschrieben werden. a)** Simulation eines dreidimensionalen *Random-Walks* eines Teilchens bis zum Verlassen des pyramidenförmigen Kompartiments durch die Nanopore. Der Weg des Partikels ist als gelbe Linie dargestellt. Die Position des Teilchens zu Beginn der Simulation ist mit einem roten Punkt markiert. **b)** Abhängigkeit der Austrittsrate des Teilchens in Abhängigkeit des Porenradius. Insbesondere für den Bereich der auf unseren Chips vorkommenden Nanoporen-Durchmessern (15-120 nm, grau hinterlegter Bereich) stimmen die nach dem Modell von Schuss *et al.*<sup>23</sup> (vgl. S.54) berechneten Werte sowie die Ergebnisse der 3D-Random-Walk Simulation gut überein.

Das simultane Aufzeichnen von mehreren Fluoreszenzkanälen ermöglicht eine weitere Ebene der Parallelisierung. Wir nutzten dies, um die Transportkinetik mehrerer Analyte gleichzeitig verfolgen zu können. Dazu erweiterten wir unser in Abbildung 2 gezeigtes Modellexperiment um ein fluoreszierendes Polymer (Dextran), das aufgrund seiner Größe nicht von  $\alpha$ -Hämolysin transportiert werden kann. Lediglich im (vergleichsweise selten auftretenden) Fall einer reißen Lipidmembran kann das Dextran abrupt aus der Membran-überspannten Pore austreten. Auch im Fall des kleineren Analyten, welcher durch den Proteinkanal transportiert werden kann, lässt sich der Hämolysin-vermittelte Transport aufgrund seiner langsameren Kinetik deutlich vom Reißen der Lipidmembran unterscheiden (siehe auch Zwischenbericht 2010).



**Abbildung 5: Multispektrale Analyse des Membrantransports einzelner  $\alpha$ -Hämolysin-Moleküle.**

**a)** Größenselektivität: während ein Fluorophormolekül (rot) den Proteinkanal ungehindert permeieren kann, kann das grün-markierte Dextran nicht von  $\alpha$ -Hämolysin transportiert werden. Aufgrund spektraler Trennung können beide Analyte simultan verfolgt werden. **b)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Membran-überspannter Nanoporen-Arrays vor (links) und nach der Zugabe von  $\alpha$ -Hämolysin. Die markierten Ausschnitte sind jeweils vergrößert dargestellt (unten). Aufgrund der unterschiedlichen Transporteigenschaften der beiden Analyte lassen sich unterschiedliche Fälle voneinander unterscheiden:

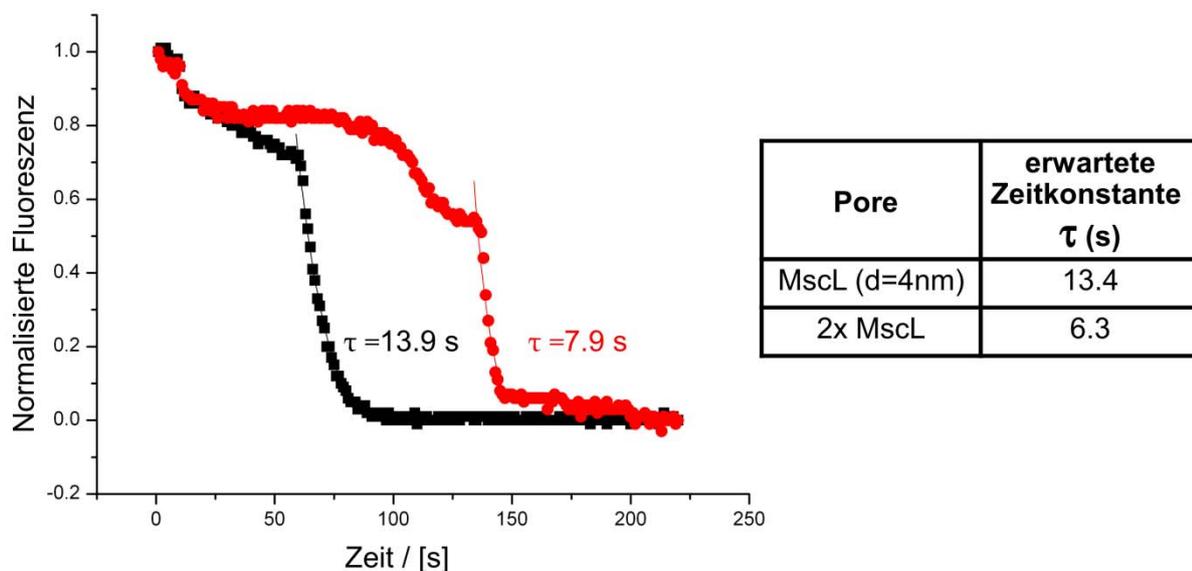
- (1) kein Protein in der Nanopore – keines der beiden Analyte wird transportiert
- (2) Reißen der Lipidmembran – beide Analyte werden freigesetzt
- (3) funktional eingebautes  $\alpha$ -Hämolysin – nur der kleinere Analyt (rot) wird transportiert

**c)** Die drei in b) beschriebenen Prozesse können auch auf kinetischer Ebene unterschieden werden. Der Graph zeigt den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität des transportierten Analyten (roter Kanal) für die in b) markierten Nanokompartimente. Beim Reißen der Membran (rote Kurve) wird der Analyt deutlich schneller freigesetzt als beim Protein-vermittelten Transport (blaue Kurve). In Kompartiment 3 (schwarze Kurve) ist lediglich das Photo-Bleichen des Fluorophors zu beobachten.

Während  $\alpha$ -Hämolysin spontan in eine bestehende Lipidmembran inseriert, müssen die meisten anderen Transmembranproteine mit Hilfe eines Detergens rekonstituiert werden<sup>25</sup>. Vor der Messung einer Transportkinetik muss dieses wieder entzogen werden, da die Membran in Gegenwart des Detergens destabilisiert ist. Ein Beispiel für ein solches Protein ist das Kanalprotein MscL (*mechanosensitive channel of large conductance*), welcher in der inneren Membran von gram-negativen Bakterien als „Notventil“ dient. Bei

<sup>25</sup> Rigaud *et al.*, *Biochemistry* **1988**, 27, 2677-88.

osmotischem Stress bewahrt er die Lipidmembran vor dem Reißen, indem er kurzzeitig einen Ausgleich des Konzentrationsgradienten über die Membran erlaubt. Die Arbeitsgruppe von Prof. Koçer (Universität Groningen, NL) stellte uns eine „schaltbare“ Variante von MscL (MscL-G22C) zur Verfügung, dessen Kanal sich durch chemische Modifikation reversibel öffnen lässt<sup>26</sup>. Das Protein lässt sich mit Hilfe eines etablierten Protokolls in hoher Dichte funktional in Liposomen rekonstituieren. Diese MscL-Proteoliposomen können nun direkt zur Biofunktionalisierung der Chipoberfläche verwendet werden, sodass sich die Membranproteine ohne zusätzlichen Rekonstitutionsschritt unmittelbar in den Nanoporen studieren lassen. Erste Experimente, die gemeinsam mit der Arbeitsgruppe von Prof. Koçer durchgeführt wurden, zeigen positive Resultate (Abbildung 6). Die gemessenen Kinetiken stimmen gut mit den erwarteten Werten überein, müssen jedoch durch weitere Messungen bestätigt werden. Die Möglichkeit, Proteoliposomen unmittelbar für die Messungen in unserem System einsetzen zu können, ist ein entscheidender Schritt zur Etablierung unseres Systems. Er demonstriert die potentielle Anwendbarkeit des Nanoporen-Chips für ein breites Spektrum medizinisch relevanter Membranproteine, die in der Regel nicht wie  $\alpha$ -Hämolyysin spontan in die Membran inserieren können.



**Abbildung 6: Einzelmolekülmessung des Kanalproteins MscL-G22C, das in Proteoliposomen auf die Chipoberfläche aufgebracht wurde.** Aufnahme der Transportkinetik von MscL-G22C nach Zugabe von (Trimethylammonium)ethyl-methanthiosulfonat (MTSET), welches den Kanal öffnet. Die der schwarzen Kurve repräsentiert einen Einzelkanal, während sich bei der roten Kurve die Kinetiken zweier Kanäle überlagern. Die Zeitkonstanten stimmen gut mit den nach Schuss *et al.* berechneten Werten (Tabelle) überein.

Um den Grad der Parallelisierung noch weiter zu steigern, arbeiten wir derzeit an der Integration des Chips in eine mikrofluidische Flusszelle, die mit den in den

<sup>26</sup> Yoshimura, *et al.*, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2198-2206

Lebenswissenschaften gebräuchlichen inversen Fluoreszenzmikroskopen eignet. Dies bietet u.a. die folgenden Vorteile:

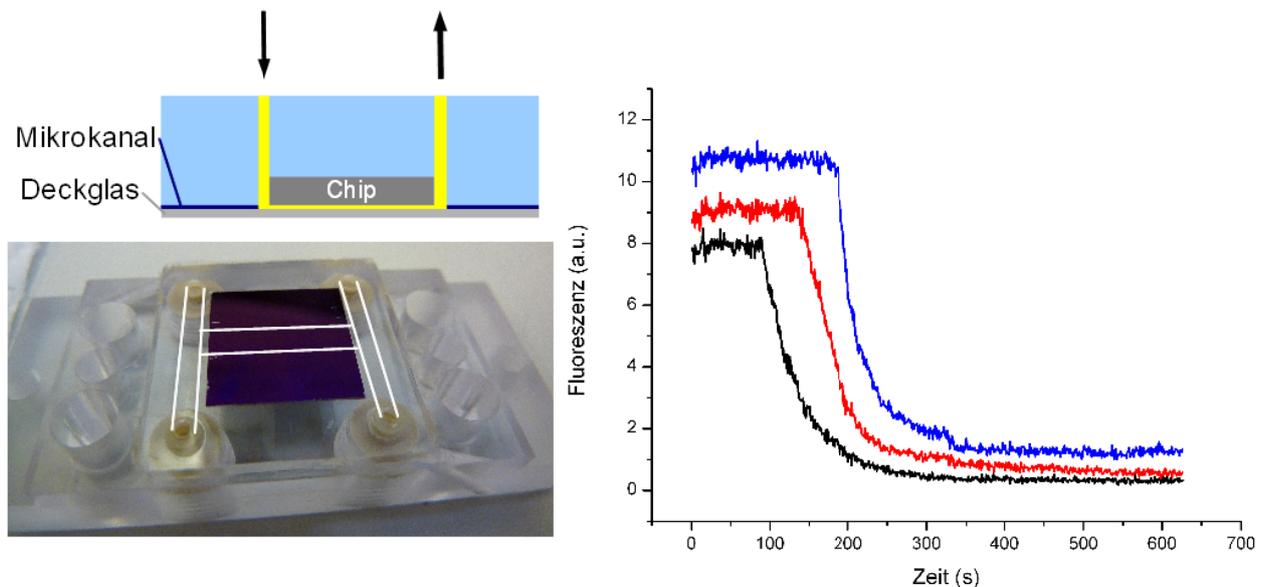
- geringer Probenverbrauch
- zeitlich präzise definiertes Zugeben und Austauschen von Reagenzien, z.B. Proteoliposomen und Liganden
- Zugabe von unterschiedlichen Reagenzien auf räumlich getrennte Bereiche des Chips

Insbesondere der letzte Punkt ist für die Durchführung von Hochdurchsatz-Screenings von großer Bedeutung. So könnten auf der gleichen Chipoberfläche gleichzeitig sowohl unterschiedliche Membranproteine als auch verschiedene Liganden (Wirkstoffe) untersucht werden. Dieses Ziel lässt sich technisch auf unterschiedliche Weise realisieren<sup>27</sup>. Die praktikabelste Möglichkeit besteht darin, mehrere Flusskanäle in die Flusszelle zu integrieren. Im Vortragsprotokoll des Projekts werden Beispiele beschrieben, wie Mikrokanäle unmittelbar in die Chiparchitektur integriert werden könnten. Auch innerhalb eines einzelnen Flusskanals können unterschiedliche Proben gleichzeitig nebeneinander aufgebracht werden, da sich unter laminaren Flussbedingungen die Reagenzien in parallelen Strömungen nicht mischen.

Die von uns verwendete Flusszelle, eine modifizierte „MicCell“ der Firma GeSiM (Abbildung 7), ist speziell auf diese Anforderungen abgestimmt. Ein Flusskanal von nur 50 µm Tiefe führt dabei über die Chipoberfläche und ermöglicht eine kontrollierte Probenzugabe (Spritzenpumpe, Injektionsventil) unter laminaren Flussbedingungen und geringem Totvolumen (< 10 µl). Dadurch kann der Probenverbrauch wertvoller Membranproteine sehr gering gehalten werden. Der Chip kann durch den transparenten Flusskanal optisch ausgelesen werden. Da Lipidmembranen äußerst empfindlich auf Luftblasen reagieren, sind jedoch hohe Anforderungen an den gesamten Fluidikaufbau zu erfüllen. Hierzu waren bzw. sind noch weitere Optimierungen zu leisten, bevor das System effizient für Routinemessungen genutzt werden kann. Insbesondere das Entgasen aller verwendeten Lösungen und das Verdrängen von Luftblasen aus den Chip-Kompartimenten spielen eine wichtige Rolle. Hämolyse-Transportmessungen wurden bereits erfolgreich in der Mikrofluidik-Flusszelle durchgeführt (Abbildung 7).

---

<sup>27</sup> Groves & Boxer, *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 149-157.



**Abbildung 7: Mikrofluidik-Flusszelle zur gleichzeitigen Messung unterschiedlicher Proben.**

**a)** Aufbau der Flusszelle. Oben: Querschnittszeichnung. Der 50 µm tiefe Flusskanal (gelb) führt quer über die Chipoberfläche. Er besteht aus Silikon (PDMS, blau), das mit Hilfe eines photolithographisch gefertigten Negativs (nicht gezeigt) auf einem Standard-Mikroskopie-Deckglas (grau) abgeformt wird. Unten: Deckelteil der Flusszelle mit eingebautem Chip. Der Verlauf des Flusskanals ist schematisch eingezeichnet. Über zwei parallele Zuläufe können zwei unterschiedliche Proben gleichzeitig aufgetragen werden, die räumlich getrennt durch einen gemeinsamen Kanal über die Chipoberfläche fließen. **b)** Transportkinetikmessungen von  $\alpha$ -Hämolyysin, die mit Hilfe der Mikrofluidik-Flusszelle durchgeführt wurden.

### **b) Vergleich Stand des Vorhabens mit ursprünglicher Arbeits-, Zeit- und Ausgabenplanung**

#### **C-1 MS1: Membrandeposition und Verifikation des Membranüberspannens**

Die Nanoporen können durch Vesikelfusion mit guter Effizienz von einer unilamellaren, planaren und lösemittelfreien Lipidmembran überspannt werden. Dies gilt sowohl für die Siliziumnitrid-Substrate von TP A1 (AG Abstreiter/Rant) als auch für die SOS-Substrate von TP A2 (AG Tornow).

#### **C-2 MS2: Einsatz einfacher Membranproteinsysteme**

$\alpha$ -Hämolyysin konnte erfolgreich funktional in Membran-überspannte Nanoporen (TP A1) inkorporiert und analysiert werden.

#### **C-2 MS3: Etablierung der Einzelmolekülmikroskopie**

Dank der optimierten Chiparchitektur konnten bereits mit einem nicht-spezialisierten Mikroskopieaufbau Einzelmolekülmessungen an  $\alpha$ -Hämolyysin durchgeführt werden. Mit

Hilfe einer speziell angefertigten Flusszelle konnten wir die Qualität der Messdaten weiter steigern.

#### **C-3 MS4: Kombination optischer und elektrischer Ausleseverfahren**

Im Verlauf des Projekts hat sich eine Verschiebung der Priorität zugunsten der Integration eines Mikrofluidik-Systems vollzogen, die aus unserer Sicht eine Schlüsselrolle für die Anwendung des Systems für Hochdurchsatz-Screeningverfahren darstellt. Die zuvor gezeigten Einzelmolekülexperimente an  $\alpha$ -Hämolysin konnten wir nun im Rahmen eines speziell angepassten Mikrofluidik-Aufbaus erfolgreich reproduzieren. Gleichzeitig ermöglichen wir die Kompatibilität der Plattform mit den in den Lebenswissenschaften üblichen inversen Fluoreszenzmikroskopen.

#### **C-3 MS5: Einzelmolekülstudien an Membrantransportproteinen**

Nachdem zunächst zuvor Einzelmolekülexperimente an  $\alpha$ -Hämolysin auf unseren Nanoporen gezeigt werden konnten, können wir erste erfolgreiche Ergebnisse mit dem mechanosensitiven Kanal MscL demonstrieren. Dabei werden nun erstmals in Proteoliposomen rekonstituierte Membranproteine direkt auf die Nanoporen-Arrays aufgebracht. Dies ist ein entscheidender Schritt auf dem Weg zur Untersuchung medizinisch relevanter Membranproteine.

### c) Relevante Forschungsergebnisse von dritter Seite während der Projektlaufzeit

Gleichzeitiges optisches und elektrisches Auslesen von Membrantransport wurden von Heron *et al.*<sup>28</sup> sowie Ide *et al.*<sup>29</sup> gezeigt, jedoch nicht in freitragenden Lipidmembranen. Die beiden Methoden sind daher nicht auf unser System übertragbar. Sie bieten weder klar definierte Kompartimentierung noch lösemittelfreie Membranen und sind daher aus unserer Sicht derzeit nicht tauglich für hochparallele Messungen von empfindlichen Membranproteinen auf Einzelmolekülebene, wie wir es für unsere Lösung anstreben.

Schmitt *et al.*<sup>30</sup> haben rein elektrische Messungen (Impedanz, Leitfähigkeit) auf Nanoporen in lösemittelfreien SLBs durchgeführt, jedoch nicht an Proteinen, sondern lediglich dem porenbildenden Peptid Gramicidin. Einen ähnlichen Ansatz demonstrierten Kresák *et al.*<sup>31</sup>, wobei zur Präparation der SLBs GUVs verwendet wurden, die durch Mikromanipulatoren gezielt über ein Feld aus 7 Nanoporen auf die Oberfläche gebracht wurden. Letztere Methode ist für unser System nicht geeignet, da der von uns angestrebte Grad an Parallelität nicht erreicht werden kann und die Rekonstitution von Membranproteinen in GUVs deutlich anspruchsvoller ist als bei den von uns verwendeten Vesikeln.

---

<sup>28</sup> Heron *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1652.

<sup>29</sup> Ide *et al.*, *Langmuir* **2010**, *26*, 8540.

<sup>30</sup> Schmitt *et al.*, *Soft Matter* **2009**, *5*, 3347.

<sup>31</sup> Kresak *et al.*, *Soft Matter* **2009**, *5*, 4021.

## Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Ansätze in unserem Forschungsverbund waren hoch transdisziplinär angesetzt. In besonderer Weise ist es hierbei gelungen, führende Gruppen im Bereich der Halbleiter- und Nanotechnologie, der Oberflächenphysik und biologischen Chemie zusammenzuführen und erfolgreich neue Methoden zum multiplexen elektrischen, mechanischen und optischen Auslesen von Nanostrukturen zu bringen. Die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeiten wird durch die vielen engen und erfolgreichen Kooperationen und den dadurch entstandenen hochkarätigen Publikationen in renommierten Journalen dokumentiert.

### 3.2 Verwertbarkeit der Ergebnisse, Verwertungsplan

Die Publikationen in hochrangigen Journalen zeigen, dass diese Ergebnisse richtungsweisend für die weitere technische Umsetzung und Applikationen sind. Hierfür wäre eine zweite Förderperiode das geeignete Förderinstrument. Dies schließt einen Verwertungsplan mit Industriepartnern ein.

### 3.3 Erfolge und geplante Veröffentlichungen

#### a) Originalarbeiten (peer-reviewed)

- 1) *Electrically facilitated translocations of proteins through silicon nitride nanopores: conjoint and competitive action of diffusion, electrophoresis, and electroosmosis.*  
M. Firnkes, D. Pedone, J. Knezevic, M. Döblinger, U. Rant  
*Nano Lett.* **10** (2010), 2162 (Impact Factor 10.0)
- 2) *Data Analysis of Translocation Events in Nanopore Experiments.*  
D. Pedone, M. Firnkes, U. Rant  
*Analytical Chemistry* **81** (2009), 9689, Highlighted article (Impact Factor 5.2)
- 3) *Fabrication of Metalized Nanopores in Silicon Nitride Membranes for Single Molecule Sensing.*  
R. Wei, D. Pedone, A. Zürner, M. Döblinger, U. Rant  
*Small* **6** (2010), 1406 (Impact Factor 6.2)
- 4) *A Pore-Cavity-Pore Device to Trap and Investigate Single Nanoparticles and DNA Molecules in a Femto-Liter Compartment: Confined Diffusion and Narrow Escape.*  
D. Pedone, M. Langecker, G. Abstreiter, U. Rant  
*Nano Letters* **11** (2011), 1561 (Impact Factor 10.0)
- 5) *Multiplexed Parallel Single Transport Recordings on Nanopore Arrays.*  
A. Kleefen, D. Pedone, Ch. Grunwald, R. Wei, M. Firnkes, G. Abstreiter, U. Rant, R. Tampé  
*Nano Letters* **10** (2010), 5080 (Impact Factor 10.0)
- 6) *Fabrication and Electrical Characterization of a Pore-Cavity-Pore Device.*  
D. Pedone, M. Langecker, A. Münzer, R. Nagel, U. Rant  
*J. Phys.: Condens. Matter* **22** (2010), 454115 Special Issue on Nanopores (Impact Factor 2.0)
- 7) *Silicon-on-Insulator based nanopore cavity arrays for lipid membrane investigation.*  
K. Buchholz, A. Tinazli, A. Kleefen, D. Dorfner, D. Pedone, U. Rant, R. Tampé, G. Abstreiter, M. Tornow  
*Nanotechnology* **19** (2008), 445305 (Impact Factor 3.1)
- 8) *Capabilities of ICP-RIE cryogenic dry etching of silicon: review of exemplary microstructures.*  
Ü. Sökmen, A. Stranz, S. Fündling, H-H. Wehmann, V. Bandalo, A. Bora, M. Tornow, A. Waag, E. Peiner  
*J. Micromech. Microeng.* **19** (2009), 105005 (Impact Factor 2.0)

- 9) *Conductance regimes of W-based granular metals prepared by electron beam induced deposition.*  
M. Huth, D. Klingenberger, Ch. Grimm, F. Porrati, R. Sachser  
New J. Phys. **11** (2009), 033032 (Impact Factor 3.3)
- 10) *Tunnel percolation and current path switching in a granular metal.*  
Ch. Grimm, D. Klingenberger, M. Huth  
J. Phys.: Conf. Ser. **150** (2009), 022019
- 11) *Modular ultra-high vacuum compatible gas injection system with an adjustable gas flow.*  
D. Klingenberger, M. Huth  
J. Vac. Sci. Technol. A **27** (2009), 1204 (Impact Factor 1.3)
- 12) *The transient electrical conductivity of W-based electron beam induced deposits during growth, irradiation and exposure to air.*  
F. Porrati, R. Sachser, M. Huth.  
Nanotechnology **20** (2009), 195301 (Impact Factor 3.1)
- 13) *Hard energy gap and current-path switching in ordered two-dimensional nano-dot arrays prepared by focused electron-beam-induced deposition.*  
R. Sachser, F. Porrati, M. Huth, Phys. Rev. B **80** (2009), 195416 (Impact Factor 3.5)
- 14) *Artificial granularity in two-dimensional arrays of nanodots fabricated by focused electron beam induced deposition.*  
F. Porrati , R. Sachser , M. Strauss , I. Andrusenko , T. Gorelik , U. Kolb , L. Bayarjargal , B. Winkler, M. Huth , Nanotechnology **21** (2010), 375302 (Impact Factor 3.1)
- 15) *Granular metals - from electronic correlations to strain-sensing applications.*  
M. Huth  
J. Appl. Phys. **107** (2010), 113709 (Impact Factor 2.1)
- 16) *A tunable strain sensor using nanogranular metals.*  
C. H. Schwalb, Ch. Grimm, M. Baranowski, R. Sachser, F. Porrati, H. Reith, P. Das, J. Müller, F. Völklein, A. Kaya, M. Huth  
Sensors **10** (2010), 9847 (Impact Factor 1.8)
- 17) *Tuning the electrical conductivity of Pt-containing granular metals by postgrowth electron irradiation.*  
F. Porrati, R. Sachser, C. H. Schwalb, A. Frangakis, M. Huth  
J. Appl. Phys. **109** (2011), 063715 (Impact Factor 2.1)

## **b) Übersichtsartikel**

- 1) *Wirkstoff-Screening im Hochdurchsatz: Nanoporen-Chip mit Mikrokompartimenten erlaubt Wirkstoffbeobachtung in Echtzeit.*  
A. Kleefen & R. Tampé  
Biospektrum **6** (2011)

## **c) in Vorbereitung bzw. eingereicht**

- 1) *Fabrication of Ultrathin Suspended Silicon Membranes for Macromolecule Translocation Studies.*  
V. Bandalo, Ü. Sökmen, Ch. Grimm, M. Huth, M. Tornow
- 2) *Evidence for a  $Pt_2Si_3$  phase in binary systems prepared by focused electron-beam-induced deposition.*  
M. Winhold, C. H. Schwalb, F. Porrati, R. Sachser, A. S. Frangakis, B. Kämpken, A. Terfort, N. Auner, M. Huth
- 3) *Evidence for universal conductance correction in a tunable strongly coupled nano-granular metal.*  
R. Sachser, F. Porrati, C. H. Schwalb, M. Huth  
eingereicht bei Phys. Rev. Lett. (2011)