

Kontrollierte biochemische Synthese auf Metall/Halbleiter-Nanostrukturen

*Thomas Altbäumer, Dieter Kern, Universität Tübingen,
Rudolf Ehlich, Heinrich Hörber, EMBL Heidelberg,
Markus Raschke, Erik Nibbering, Christoph Lienau, Max-Born-Institut, Berlin*

Manuskripteingang: 13. Oktober 2003; zur Veröffentlichung angenommen: 10. Dezember 2003

Die Antennenwirkung von metallischen oder halbleitenden Nanostrukturen in elektromagnetischen Feldern soll eingesetzt werden, um chemische Reaktionen an deren Oberflächen zu optimieren. Das Ziel ist die spezifische Synthese von Oligonukleinsäuresequenzen zum Aufbau von hochdichten „DNA-Arrays“ mit nanotechnologischen Methoden. Die Nanostrukturen werden für die Untersuchungen von einerseits Photonen-Transfer-Reaktionen und andererseits für Elektronen-Transfer-Reaktionen durch die Wahl geeigneter Geometrien und Materialien angepasst.

Schlagwörter: Nanostrukturen, Oberflächenplasmonen, Oligonukleinsäuren, Photonentransferreaktion, Elektronentransferreaktion

Controlled Biochemical Synthesis on Metal/Semiconductor Nanostructures

The antenna effect of metallic or semiconducting nanostructures in electromagnetic fields is to be exploited for optimization of chemical reactions at their surface, aiming at the synthesis of specific sequences of oligo-nucleic acids for the formation of highly dense arrays of DNA by nanotechnology. The nanostructures are tailored to the specific requirements of an investigation of photon transfer reactions on the one hand and electron transfer reactions on the other, by selecting appropriate geometries and materials.

Keywords: Nanostructures, surface plasmons, oligonucleotides, photon transfer reactions, electron transfer reactions

1 Einleitung

„DNA-Array“-Technologie bietet eine schnelle und kosteneffektive Möglichkeit, Genexpression und genetische

Variationen zu bestimmen [1]. Derzeit wird ausschließlich von Affymetrix ein Microarray vermarktet, das in der Lage ist, 5000 bis 10 000 verschiedene DNA-Sequenzen zu analysieren. Die Präparation dieser Arrays

erfolgt entweder durch mechanisch geführte Spritzdüsen, die die DNA wohl positioniert auf Nylon- oder Glasoberflächen aufbringen, oder es werden bekannte DNA-Sequenzen direkt auf der Oberfläche des Genchips mit lithographischen Methoden lokal synthetisiert. Die Detektion erfolgt durch die Hybridisierungsreaktion der bekannten einzelsträngigen DNA-Sequenzen mit den unbekanntem einzelsträngigen DNA-Sequenzen, die bedeutend länger als die synthetisierten Sequenzen sein können. Mit einer beispielsweise aus etwa 25 Nukleinsäuren bestehenden Sequenz können so eindeutig für Proteine kodierende Gene erkannt werden. Die Auswertung der Microarrays erfolgt durch eine verhältnismäßig aufwändige konfokale Mikroskopie-Technologie. Hierbei muss zur Erkennung der Array-Positionen, an denen eine Hybridisierungsreaktion stattgefunden hat, die zu analysierende DNA-Probe chemisch mit Fluoreszenzmarkern versehen werden. Mit dem Bekanntwerden weiterer krankheitsrelevanter Gensequenzen wird der Bedarf an spezifischen Arrays steigen, die eine Vielzahl verschiedener DNA-Sequenzen analysieren können. Wegen der Analyse zunehmend komplexer Genmuster geht der Trend deshalb zu immer dichteren Arrays, welche durch kostengünstigere und zuverlässigere Produktionsschritte herzustellen sind. Diese Entwicklung und einfachere Ausleseverfahren werden die effiziente Analyse von Gewebeproben und somit das Erstellen individueller Behandlungsmethoden für Erkrankungen mit genetischen Ursachen ermöglichen.

Ein wichtiger Ansatzpunkt für die Weiterentwicklung von „DNA-Arrays“ besteht in der Entwicklung besserer Oligo-Syntheseverfahren auf Chips. Affymetrix besitzt für diese Synthese ein Patent über ein lithographisches Verfahren, das in der Lage ist, DNA-Sequenzen lokal auf Flächen mit Abmessungen zwischen 10 und 100 Mikrometer zu synthetisieren. Die Anzahl der notwendigen lithographischen Masken sowie deren Ausrichtung und die Effizienz der verwendeten chemischen Reaktionen macht diese Technik jedoch teuer und ineffektiv.

Die in dieser Veröffentlichung beschriebene kontrollierte biochemische Synthese auf Metall/Halbleiter-Nanostrukturen kann sowohl ein wichtiger Beitrag zur Optimierung des chemischen Syntheseverfahrens werden als auch eine Möglichkeit zur Umgehung des aufwändigen Lithographieverfahrens, das Affymetrix verwendet. Das neue Verfahren, das spezifische Eigenschaften von Nanostrukturen wie ihre Plasmonenresonanz [2] ausnutzt, wird die erreichbare Dichte der Arrays sowie die Effizienz der chemischen Reaktionen um Größenordnungen erhöhen und damit die Ausbeute bei der Produktion deutlich steigern. Für eine Selektivität bei der Induzierung einer Reaktion wird die Abhängigkeit der Plasmonenresonanz

von spezifischen Eigenschaften der Nanostrukturen ausgenutzt. So kann die Resonanz von metallischen Strukturen über Größe, Form und Abstand der Strukturen variiert werden. Daher werden Form und Größe der Nanoteilchen so abgestimmt, dass die resultierende Plasmonresonanzenergie dem Energieniveau der molekularen Schutzgruppe entspricht. Die photochemische Anregung [3], die den Primärschritt der Synthesereaktion darstellt, erfolgt im optischen Nahfeld des Metallnanoteilchens [4]. Dieses Feld ist infolge der Plasmonresonanz lokal um bis zu mehrere Größenordnungen gegenüber dem Fernfeld verstärkt und erlaubt so eine effiziente und räumlich lokalisierte Anregung. Durch geeignete Wahl der molekularen Abstände von der Oberfläche soll der Verlust der Anregungsenergie durch Rücktransfer an das Metall erschwert werden.

Die Analyse dieser Chips kann dann ohne vorherige chemische Modifikation der Probe mit Fluoreszenzmarkern erfolgen, da die Molekülbeschichtung – und damit die Änderung der dielektrischen Umgebung – die Plasmonenresonanz der Nanostrukturen beeinflusst und die Hybridisierungsreaktion somit über das Plasmonenspektrum nachgewiesen werden kann.

2 Probenherstellung

Aufgrund der unterschiedlichen experimentellen Anforderungen wurden zwei Arten von Proben hergestellt. Für die optischen Experimente und die AFM-Charakterisierung wurden Gold-Dot-Arrays durch Ionenstrahlätzen von vorher direkt auf Glas-

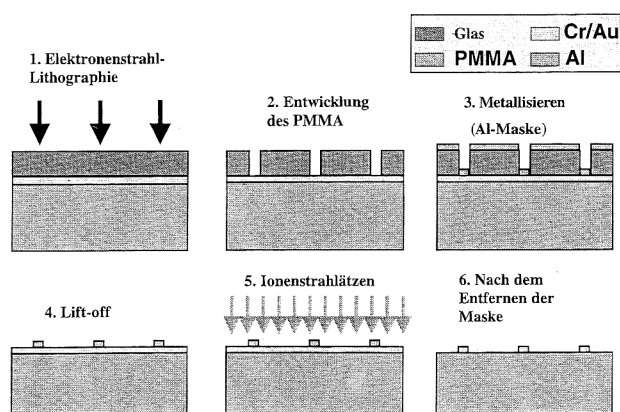


Bild 1: Herstellung der Metall-Dots direkt auf Glassubstrat mittels Elektronenstrahl-Lithographie und Ionenstrahlätzen.

Figure 1: Fabrication of metal dots directly on a glass substrate using electron beam lithography and ion beam etching.

substrat aufgedampften Cr/Au-Schichten hergestellt. Der Herstellungsprozess ist in Bild 1 schematisch dargestellt.

Um für die STM-Untersuchungen eine Ableitung des Tunnelstroms zu gewährleisten, wurde bei diesen Proben das Glassubstrat zuerst mit einer dünnen Titan-Schicht besputtert und diese dann nach leichter Oxidation mit der Cr/Au-Schicht bedampft. Als Ätzmaske diente mittels Elektronenstrahlolithographie und Lift-Off strukturiertes Aluminium. Die kleinste bisher erreichte Periode betrug 180 nm. Die Größe der Dots wurde von ca. 30 bis 120 nm variiert. Bild 2 zeigt einen

Array von runden Au-Dots, bei dem die Größe der Dots systematisch variiert wurde. Ionenstrahlgeätzte Strukturen besitzen eine glattere Oberfläche im Vergleich zu mittels Lift-Off hergestellten Strukturen, was für die Plasmonenanregung von Bedeutung sein könnte. Dieser Unterschied ist an den in Bild 3 gezeigten rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen von Al- (Lift-off) und Au-Dots zu erkennen. Die Herstellung von Silber-Dots ist zwar prinzipiell ebenfalls möglich, allerdings hat Silber die Eigenschaft, relativ stark zu oxidieren.

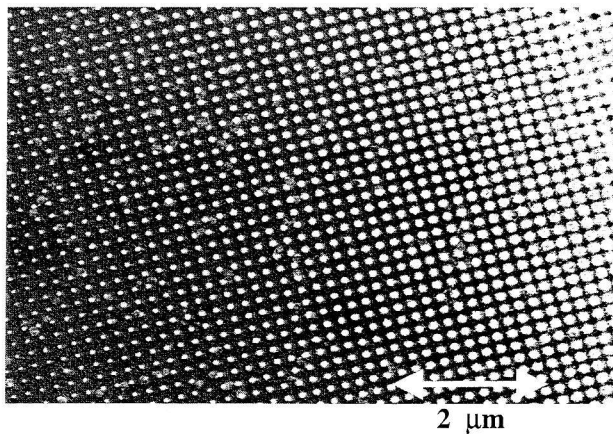


Bild 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Arrays von runden, 40 nm dicken Au-Dots mit systematisch variiert Größe.
Figure 2: Scanning electron micrograph of an array of round Au dots with systematically varied size and a thickness of 40 nm.

3 AFM- und STM-Charakterisierung

Die derart hergestellten Nanostrukturen und deren Beschichtung wurde mit dem AFM, und STM charakterisiert. Bei der Untersuchung verschiedener Schichtstrukturen zeigte sich, dass Proben aus Titan/Titanoxid mit darauf aufgebracht Gold-Nanostrukturen sich nicht nur mit dem AFM sondern auch mit dem STM charakterisieren lassen. Diese Materialkombination zeigte auch die größte Stabilität in wässriger Umgebung und wurde daher als Ausgangspunkt für die weiteren Untersuchungen gewählt. Im Weiteren wurden die Nanostrukturen mit kurzen, einfachen DNA-Sequenzen (50 Nukleinsäuren) beschichtet und deren erfolgreiche Anbindung über STM-Spektroskopie nachgewiesen. Die Anbindung fand über eine endständige Thiol-Gruppe statt, die spezifisch auf Gold wirksam ist. Die Leitfähigkeitsänderung wurde mittels STM an verschiedenen Positionen der

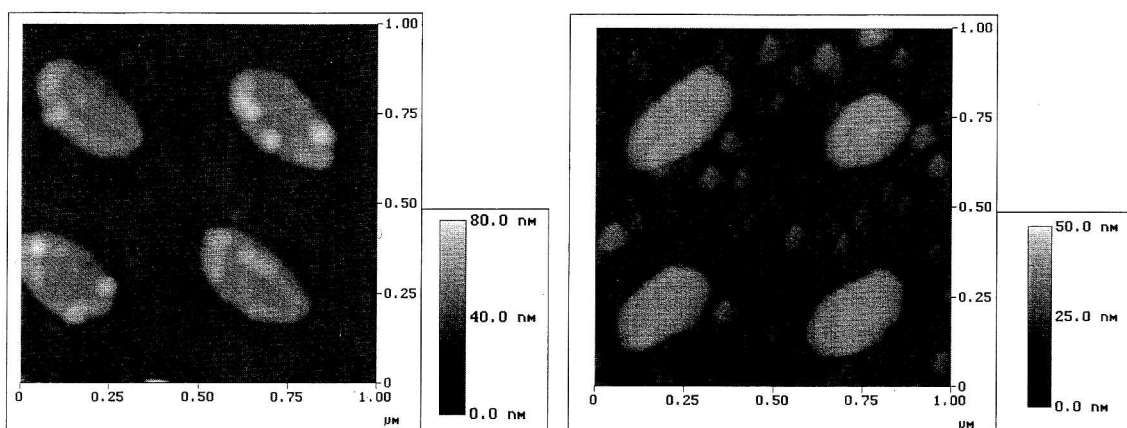


Bild 3: AFM-Aufnahmen von mittels Lift-off hergestellten Aluminium-Dots (links) und mittels Ionenstrahlätzen hergestellten Gold-Dots (rechts).
Figure 3: AFM images of aluminum dots fabricated using lift-off (left) and of gold dots fabricated by ion beam etching (right).

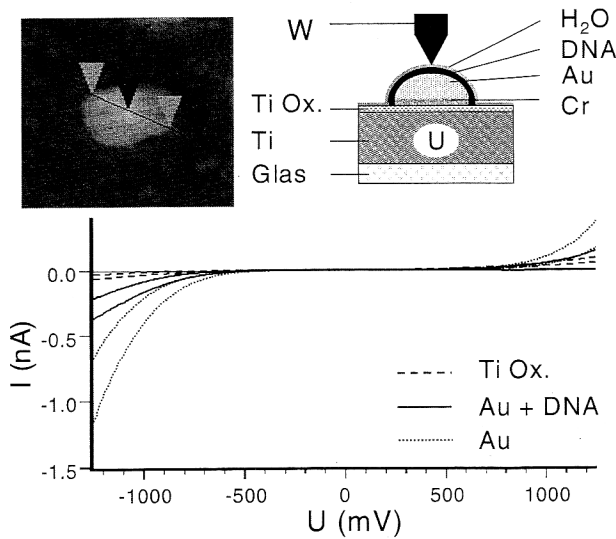


Bild 4: Oben links: Topographische Darstellung eines Gold-Dots. Im Linienschnitt ergab sich ein Durchmesser von 107 nm (helle Dreiecke) und eine Höhe von 19 nm (dunkle Dreiecke). Oben rechts: Schematische Schicht-Anordnung für die Tunnelmikroskopie am Gold-Dot. Das Potential U des Titan-Films wird bei der Messung des Tunnelstroms variiert. Unten: Tunnelstrom-Kennlinien gemessen über Titan-Oxid und dem Gold-Dot vor und nach der Beschichtung mit DNA. Dargestellt ist die Standardabweichung vom Mittelwert der Strom-Messungen.

Figure 4: Top left: STM image of a gold dot. Along the indicated line a diameter of 107 nm (light arrows) and a height of 19 nm (dark arrow) was measured. Top right: schematic arrangement of layers for the STM investigation of a gold dot. When measuring I/V -characteristics, the potential U applied to the titanium film is varied. Bottom: tunneling characteristics measured on titaniumoxide and on the gold dot before and after coating with DNA. The standard deviation from the average of the current measurements is shown.

Tunnelspitze über der Titanoxid-Oberfläche bzw. über ausgewählten Gold-Dots gemessen.

Für den Vergleich der Leitfähigkeit vor und nach der Beschichtung erfolgte die Mittelung über ca. 400 Messungen an verschiedenen Messpunkten an einem identifizierten Dot. Bild 4 zeigt die Standardabweichung dieser Messungen vom Mittelwert, die hauptsächlich auf die Strukturierung der Oberfläche zurückzuführen ist. Eine Absenkung der Leitfähigkeit durch die Beschichtung der Gold-Nanostrukturen konnte nachgewiesen werden. Für das Titanoxid wurde keine Veränderung beobachtet. Wir können daraus schließen, dass die An-

bindung ausschließlich auf den Gold-Nanostrukturen und nicht auf dem Titanoxid erfolgte. Für eine detaillierte Analyse der Messungen müssen die komplexe Schichtstruktur und die Wechselwirkung der Tunnel-elektronen mit dem Wasser-Film auf der Oberfläche berücksichtigt werden.

Es wurde ein STM entwickelt, das die Charakterisierung von optisch induzierten Elektron-Transfer-Reaktionen erlauben wird. Damit wurden die Voraussetzungen geschaffen, um die Induzierung von Elektron-Transfer-Reaktionen durch optische Anregung zu untersuchen und deren Einfluss auf chemische Reaktionen, im Speziellen auf die Synthese von Oligonukleinsäuren zu optimieren.

4 Optische Charakterisierung

Die optische Charakterisierung der erzeugten Nanostrukturen kann sowohl mit Methoden der Nahfeld- als auch der konventionellen Fernfeldspektroskopie erfolgen. Werden die Nanoteilchen auf der Oberfläche mit einem gegenseitigen Abstand von mehreren Mikrometern präpariert, können diese mittels Dunkel-feldmikroskopie einzeln untersucht werden. Dazu wird die Plasmonresonanz durch spektral breitbandige Illumination angeregt und das emittierte Streulicht durch die Mikroskopoptik auf den Eingangsspalt eines Spektrographen projiziert. Der Spalt dient als räumlicher Filter und erlaubt so die selektive Messung der plasmonischen Eigenschaften einzelner Nanoteilchen [5].

5 Zusammenfassung

Die Antennenwirkung von metallischen oder halbleitenden Nanostrukturen in elektromagnetischen Feldern soll eingesetzt werden, um chemische Reaktionen an deren Oberflächen zu optimieren mit dem Ziel der spezifischen Synthese von Oligonukleinsäuresequenzen. Mittels Elektronenstrahlolithographie und Ionenstrahlätzen wurden Au-Nanostrukturen mit verschiedenen Größen, Formen und an die Experimente angepassten Abständen hergestellt und mittels Raster-elektronenmikroskop, AFM und STM charakterisiert. Eine erfolgreiche DNA-Beschichtung konnte im STM in Strom-Spannungs-Kennlinien festgestellt werden.

Literatur

- [1] M. Schena et al.: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* (1995) S. 467–470.
- [2] U. Kreibitz, M. Vollmer: *Optical Properties of Metal Clusters*. Springer Ser. Mat. Sci. 25, Springer (1995).
- [3] T. Witte et al.: Controlling molecular ground-state dissociation by optimizing vibrational ladder climbing. *J. Chem. Phys.* (2003) 118 S. 2021–2024.
- [4] Lukas Novotny, Randy X. Bian, and X. Sunney Xie: Theory of Nanometric Optical Tweezers. *Phys. Rev. Lett.* 79, (1997) S. 645–648.
- [5] C. Sönnichsen, et al.: Spectroscopy of single metallic nanoparticles using total internal reflection microscopy. *Appl. Phys. Lett.* (2000) 77 S. 2949–2951.

Dr. Thomas Altbäumer, Prof. Dr. Dieter Kern

Adresse: Universität Tübingen, Institut für Angewandte Physik, Auf der Morgenstelle 10, D-72076 Tübingen, E-Mail: dieter.kern@uni-tuebingen.de

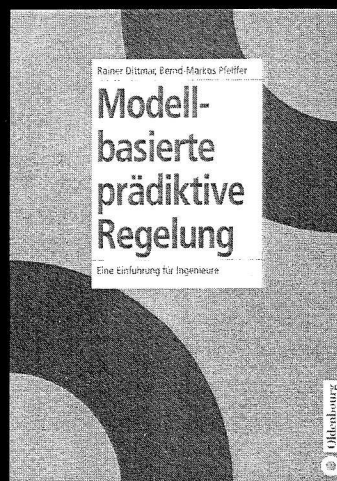
Dr. Rudolf Ehlich, Dr. Heinrich Hörber

Adresse: EMBL Heidelberg Main Laboratory, Meyerhofstraße 1, D-69117 Heidelberg

Dr. Markus Raschke, Dr. Erik Nibbering,
Dr. Christoph Lienau

Adresse: Max-Born-Institut, Max-Born-Straße 2a, D-12489 Berlin

Rainer Dittmar, Bernd-Markus Pfeiffer
**Modellbasierte prädiktive
Regelung**
Eine Einführung für Ingenieure
2004, Ca. 400 Seiten
Ca. € 49,80
ISBN 3-486-27523-2



Das Buch gibt erstmals in deutscher Sprache eine übersichtliche und leicht verständliche Einführung in das Gebiet der modellgestützten prädiktiven Regelung (Model Predictive Control, MPC). MPC-Technologien haben sich als besonders effektiv für die Regelung und Optimierung komplexer verfahrenstechnischer Prozesse erwiesen und werden vor allem in der Mineralölindustrie, zunehmend aber auch in anderen Industriebereichen, eingesetzt. Das Buch richtet sich vor allem an jetzige und zukünftige Anwender in der Industrie auf den Gebieten Anlagenplanung und -errichtung, Prozessleittechnik, Prozessführung und Informationstechnik, ist aber auch für Studierende höherer Semester der Fachrichtungen Automatisierungs- und Verfahrenstechnik geeignet.

Oldenbourg Wissenschaftsverlag
Rosenheimer Straße 145
D-81671 München
Telefon 089 / 450 51-0
Fax 089 / 450 51-204
Bestellungen: <http://www.oldenbourg-verlag.de>

Oldenbourg

