

**Herstellung und Charakterisierung
dreidimensionaler photonischer Nano-Strukturen
als Trägersubstrat für Mikroarrays**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaft

2006

vorgelegt von
Marco Klühr

Tag der mündlichen Prüfung:

02. März 2006

Dekan:

Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Bauer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Bisswanger

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hermann Bauer in der Zeit von Juni 2003 bis Dezember 2005 am Institut für Angewandte Chemie, Georg-Simon-Ohm-Fachhochschule Nürnberg, angefertigt.

Für meine Eltern

Danksagung

Großer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Hermann Bauer. Er stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stephan Dertinger, Infineon Technologies München, für die Unterstützung während meiner Doktorarbeit. Er hat durch wertvolle Diskussionen und kritische Anregungen sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Hans Bisswanger gilt mein Dank für die Übernahme des Koreferats.

Ein großes Dankeschön geht an Michaela Fritz, Karin Fuchs, Barbara Hasler, Alexandra Heim, Kristin Rüffer, Martina Spangler, Kerstin Thein, Christian Elsner, Thomas Haneder, Christian Hanke, Jürgen Kern, Ludwig Laxhuber, Volker Lehmann, Alfred Martin und Alexander Sauermann für das angenehme und kooperative Arbeitsklima, das zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ganz besonderer Dank gilt Karolin Schmidt für ihre liebevolle Unterstützung.

Key Words

macroporous silicon
photonic structure
microarray
biosensor
DNA-analysis

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Herstellung dreidimensionaler photonischer Strukturen aus Silizium und Siliziumdioxid für die Bioanalytik beschrieben. Die optischen Eigenschaften werden charakterisiert und die Anwendung als Trägersubstrat für DNA-Mikroarrays aufgezeigt. Die Membran wird durch partielle thermische Oxidation einer makroporösen Silizium-Membran hergestellt, die regelmäßige, durchgängige und quadratische Poren aufweist, welche sich senkrecht durch die Membran erstrecken. Die partielle Oxidation erzeugt eine poröse Siliziumdioxid-Membran, die von unvollständig oxidierten dickeren Wänden, mit einem Kern aus Silizium, in regelmäßige rechteckige Kompartments unterteilt wird. Das Restsilizium in den dickeren Wänden mit einer Breite von 0,8-1,0 μm reicht aus, um das optische Übersprechen auf benachbarte Sensorbereiche zu unterbinden. Die Siliziumdioxid-Porenwände weisen wellenleitende Eigenschaften auf. Unter der Verwendung von Epifluoreszenz-Mikroskopie tragen Fluorophore, abhängig von ihrer Lage in der dreidimensionalen Membran, einen geringfügig unterschiedlichen Beitrag zur Gesamtfluoreszenz bei. Die große Oberfläche der dreidimensionalen Membran erhöht die Anzahl an Bindungsplätzen pro Spot und verbessert demzufolge die Nachweisgrenze. Es gelingt in einem DNA-Hybridisierungsexperiment Cy3-markierte komplementäre Oligonukleotide bis zu einer Stoffmenge von 100 amol nachzuweisen.

Abstract

In this thesis the fabrication of three dimensional photonic silicon and glass membranes for bio analytics is described. The optical properties are characterized and the application as a microarray is demonstrated. The membrane is fabricated by thermal oxidation of a macro porous silicon membrane with periodic pattern of quadratic pores running perpendicular through the membrane. Partial oxidation generates a glass membrane, but leaves a rectangular grid of thicker silicon walls dividing the membrane into compartments. The silicon in the compartment walls, with a thickness of 0.8-1.0 μm , prevents light from spreading laterally in the membrane. The glass walls act as an optical waveguide. Using epifluorescent microscopy, fluorophores contribute slightly different to the entire fluorescent signal, depending on the position in the three-dimensional membrane. The large surface area of the three dimensional membrane provides a large number of available binding sites and improves the detection limit. In a DNA hybridization experiment, the detection of 100 amol of Cy-3 labeled complementary oligonucleotides have been successfully detected.

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG	1
2	GRUNDLAGEN	5
2.1	Herstellung von partiell oxidierten makroporösen Silizium-Membranen	5
2.1.1	Isotropes und anisotropes Ätzen von Silizium	5
2.1.2	Herstellung von porösem Silizium durch elektrochemisches Ätzen	6
2.1.2.1	Strom-Spannungscharakteristika von n-Siliziumelektroden	7
2.1.3	Thermische Oxidation	9
2.1.3.1	Mechanischer Stress.....	10
2.2	Planare Wellenleiter	11
2.2.1	Reflexion, Brechung, Totalreflexion und evaneszentes Feld	11
2.3	Grundlagen der Mikroarraytechnologie	12
2.3.1	Schematischer Ablauf eines Mikroarray-Experiments.....	12
2.3.1.1	Oberflächenfunktionalisierung.....	13
2.3.1.2	Aufbringen der Biomoleküle.....	13
2.3.1.3	Probenvorbereitung.....	15
2.3.1.4	Blocking und Hybridisierung.....	16
3	EXPERIMENTELLER TEIL.....	19
3.1	Materialien.....	19
3.2	Methoden zur Herstellung von Partox-Membranen.....	22
3.2.1	Prozessschritte zur Herstellung von Partox-Membranen	25
3.2.1.1	Strukturierung des Ausgangsmaterials.....	26
3.2.1.2	Elektrochemisches Porenätzen.....	26
3.2.1.3	Öffnen der Poren	27
3.2.1.4	Aufweitung der Poren	28
3.2.1.5	Thermische Oxidation.....	29
3.2.1.6	Charakterisierung von Partox-Membranen	29
3.3	Partox-Membranen als DNA-Mikroarray	30
3.3.1	Adaption der Partox-Membranen an kommerzielle Dosiersysteme.....	30
3.3.2	Oberflächenfunktionalisierung	31
3.3.3	Aufbringung von Nukleinsäuren auf den Partox-Tip	31
3.3.4	Blocking, Hybridisierung und Waschen.....	32
3.3.5	Reverse Transkription.....	32
3.4	Optische Charakterisierung von Partox-Membranen	34
3.4.1	Transmissionsmessung	34
3.4.2	Fluoreszenzmessung.....	35
3.4.3	Selektive Adsorption von Proteinen	37

4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	38
4.1	Herstellung von Partox-Membranen.....	38
4.1.1	Elektrochemisches Ätzen.....	38
4.1.2	Rückseitiges Öffnen der Poren.....	39
4.1.3	Aufweitung der Poren.....	39
4.1.4	Partielle thermische Oxidation.....	44
4.1.4.1	Charakterisierung des Oxidationsgrades.....	44
4.1.4.2	Oxidationszeiten.....	46
4.1.4.3	Volumenausdehnung.....	47
4.1.4.4	Manifestation des mechanischen Stresses.....	53
4.2	Optische Charakterisierung der Partox-Membran.....	59
4.2.1	Einkopplung von Licht in Partox-Membranen.....	61
4.2.1.1	Reflexion an der Stirnfläche von Partox-Membranen.....	61
4.2.1.2	Bestimmung der numerischen Apertur der SiO ₂ -Porenwände.....	63
4.2.2	Ausbreitung des Lichts innerhalb der Partox-Membran.....	66
4.2.3	Auskopplung des Lichts aus den Partox-Membranen.....	68
4.2.3.1	Transmission.....	68
4.2.3.2	Intensitätsverteilung des transmittierten Lichts.....	70
4.2.4	Fluoreszenzversuche.....	73
4.2.4.1	Intensitätsverteilung des emittierten Lichts von Fluorophoren.....	73
4.2.4.2	Auslesearten für Fluoreszenzversuche.....	74
4.2.4.3	Ortsabhängiger Beitrag der Fluorophore am Fluoreszenzsignal.....	77
4.3	Charakterisierung als Mikroarray.....	85
4.3.1	Oberfläche.....	85
4.3.2	Bestimmung der Hybridisierungskinetik.....	88
4.3.3	Spezifität.....	93
4.3.4	Nachweisgrenze und dynamischer Bereich.....	96
4.3.5	Hintergrundsignal bei Fluoreszenzmessungen.....	100
4.3.5.1	Substratspezifisches Hintergrundsignal.....	100
4.3.5.2	Erhöhung des Hintergrundsignals durch Übersprechen des Emissionslichts.....	101
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	103
6	AUSBLICK.....	106
7	LITERATUR.....	107
8	ANHANG.....	114
8.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	114
8.2	Publikationen.....	115
8.3	Curriculum Vitae.....	116

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

A	Adenin
b	Basen
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CCD	Charge-Coupled-Device
cDNA	<i>copy</i> Deoxyribonukleinsäure
CVD	Chemical Vapour Deposition
Cy3; Cy5	Cyaninfarbstoffe
dNTP	Desoxynukleotid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
DM	Double Mismatch
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
FA	Formamid
FP	Festphasenoligonukleotide (Proben)
G	Guanin
HF	Fluorwasserstoffsäure
K	Kontrolloligonukleotide (Target)
MM	Mismatch
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NA	numerische Apertur
NB	None Binding
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
REM	Raster-Elektronen-Mikroskopie
RLZ	Raumladungszone
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
PDMS	Polydimethylsiloxan
Partox	partiell oxidiert
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
PM	Perfect Match
SCCM	Standard Kubikzentimeter pro Minute

SDS	Natriumdodecylsulfat
SLM	Standard-Liter pro Minute
SNP	Single-Nucleotide-Polymorphism
SSC	Natriumchlorid/ Natriumcitrat-Puffer
T	Thymin
μ CP	Microcontactprinting

Verzeichnis der verwendeten Symbole und Konstanten

A	Fläche [μm^2]
c	Konzentration [Gew.%] oder [Vol.%]
d	Dicke [μm]
d_p	Eindringtiefe des evaneszenten Feldes [μm]
E_A	Aktivierungsenergie [eV]
E	Intensität der elektrischen Feldstärke [V m^{-1}]
h^+	Minoritätsladungsträger
I	Lichtintensität [Grauwerte]
i_{ps}	kritische Stromdichte [A cm^{-2}]
K_n	Reaktionskonstante
l	Länge [μm]
n	Brechungsindex
N	Komplexität der Nukleinsäure
p	Porosität [%]
R	Reflexion [%]
t	Zeit [sec]
T	Transmission [%]
T	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]
T_m	Schmelztemperatur [$^{\circ}\text{C}$]
S	Fluoreszenzsignal [Grauwerte]
U	Spannung [V]
V	Volumen [μm^3]
x_o	Oxiddicke [μm]
α	Winkelspektrum [$^{\circ}$]
θ	Winkel [$^{\circ}$]
λ	Wellenlänge des Lichts [nm]
γ	Ausdehnungskoeffizient [K^{-1}]
τ	Dicke des natürlichen Oberflächenoxids [μm]

1 Einleitung

Die DNA-Sequenz des gesamten menschlichen Genoms ist seit 2001 bekannt, die Aufklärung der Funktionen der Gene und der dazugehörigen Transkripte (RNA und Proteine) sowie die Charakterisierung der Regelkreise der Gene untereinander stehen jedoch noch am Anfang der Erforschung. Für die Aufklärung des Zusammenspiels der Gene in einer Zelle beziehungsweise des resultierenden Aktivitätsmusters der Gene werden parallele, schnelle, kostengünstige und sensitive Analysen benötigt. Eine große Bedeutung kommt hierbei der Mikroarray-Technologie zu. In der Mikroarray-Technologie können mehrere tausend Gene in einem einzigen Experiment analysiert und charakterisiert werden (Goergen et al., 2001; Shomaker et al., 2001; Shi, 2002).

In der DNA-Analytik werden heutzutage vor allem unterschiedliche Methoden der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt (Saiki et al., 1985; Gilliland et al., 1990; Liang et al., 1992; Velculescu et al., 1995). In der PCR können einzelne Moleküle nachgewiesen werden, jedoch eignet sich die PCR nur für eine geringe Anzahl von Analysen. Mikroarrays hingegen eignen sich für eine Vielzahl von Analysen.

Das Funktionsprinzip der DNA-Mikroarrays beruht generell auf der Paarbildung komplementärer DNA-Stränge. DNA-Mikroarrays, auch Biochip oder DNA-Chip genannt, bestehen aus einem Trägersubstrat, auf dem bis zu 100 000 verschiedene Probenmoleküle (Sonden) auf definierten Regionen immobilisiert sind (Lipschutz et al., 1999). Für das Trägersubstrat werden Glas, Kunststoffe, Silizium, Aluminium oder Nylon verwendet. Die verschiedenen immobilisierten Probenmoleküle, einzelsträngige DNA mit bekannter Sequenz, hybridisieren mit ihren komplementären Targetmolekülen aus der zu analysierenden Lösung. Eine eindeutig quantitative Zuordnung der Targetmoleküle erfolgt aufgrund der Intensitäten der gemessenen Signale.

Die Bindungsereignisse der Probenmoleküle mit den Targetmolekülen werden vorwiegend optisch detektiert (Hall, 1995; Schena, 2003). Die optische Detektion lässt sich in zwei Bereiche einteilen. Methoden, bei der die nachzuweisenden Targetmoleküle eine zusätzliche Markierung benötigen und Methoden die keine weiteren Markierungsschritte bedürfen. Effekte wie Oberflächenplasmonresonanz (Kretschmann et al., 1968; Johnson et al., 1994), Totalreflexion von Licht in Wellenleitern (Tiefenthaler et al., 1989) oder Interferenz an dünnen Schichten (Kunz, 1991; Brecht et al., 1996) sind optische Messmethoden die ohne zusätzliche Markierung auskommen und die Änderung des Brechungsindex für Messung der Bindungsereignisse ausnutzen. Optische Sensoren, die

Fluoreszenz, Lumineszenz oder radioaktive Strahlung detektieren, benötigen einen zusätzlichen Derivatisierungsschritt. Die Sensitivität und Spezifität sind jedoch besser als bei markierungsfreien Verfahren.

DNA-Mikroarrays werden hauptsächlich für Genexpressionsanalysen zur Untersuchung der Aktivität von Genen in unterschiedlichen Zelltypen eingesetzt (Eickhoff et al., 1999; Lockhart et al., 2000; Klein-Hitpaß et al., 2001). Ein weiteres Anwendungsgebiet für Mikroarrays ist die Pharmakogenetik. Basierend auf der genetischen Variabilität der Patienten wird in diesem Forschungsgebiet die individuelle Wirkungsweise und Verträglichkeit von Medikamenten untersucht (Scherf et al., 2000; Schmidt, 2001). In diesem Zusammenhang wird die Analyse von Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNP's) durchgeführt, da diese die Grundlage für genetische Unterschiede zwischen einzelnen Menschen darstellen (Chakravarti, 2001). Darüber hinaus können die DNA-Mikroarrays in der Umwelttechnik, zur Untersuchung von Genveränderungen in der Flora und Fauna, in der Lebensmittelindustrie, zur Identifizierung genetisch veränderter Lebensmittel, und in der Forensik verwendet werden (Goergen et al., 2001). Ein neues Einsatzgebiet ist die diagnostische Anwendung (Certa et al., 2003; Mariadason et al., 2003; Affimetrix, 2005).

Historisch haben sich Mikroarrays aus dem Dot Blot-Verfahren entwickelt. Bei dieser Analysemethode werden DNA-Fragmente auf eine permeable Nitrozellulose Membran transferiert und für die Identifizierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden hybridisiert (Southern, 1975). Der Übergang zu planaren, nicht permeablen Substraten zu Beginn der 90er Jahre wurde von der Notwendigkeit getrieben, eine wesentlich dichtere Belegung der Probenmoleküle auf der Oberfläche zu erreichen. Die strukturell labilen Eigenschaften der permeablen Membranen beeinträchtigen jedoch die präzise Anordnung und das Auslesen der Sensorspots. Die quervernetzten Kapillaren in der Membran führen auch zu einer Verbreiterung des Sensorspots. Die Verwendung von starren Glas- oder Kunststoffträgern umgeht die Nachteile der permeablen Nitrozellulose Membran und ermöglicht die Herstellung von hochdichten Mikroarrays (Southern et al., 1999; Southern, 2001).

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von unterschiedlichen Sensorkonzepten entwickelt, um die Erhöhung der Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit zu steigern. Unter diesen Aspekten wurden die Probenvorbereitung, die Reaktionsbedingungen, die Sensoroberfläche, das Ausleseverfahren und die Eigenschaften der Mikroarray-Substrate optimiert (Duvencek, 1999; Shi, 2002).

Ein großer Schritt zur Sensitivitätssteigerung gelang durch die Optimierung der optischen Eigenschaften des Mikroarray-Substrats. Mit der Entwicklung planarer Wellenleiterstrukturen als Mikroarraysubstrat konnten Sensitivitätssteigerungen bis in den unteren attomolaren Bereich erreicht werden. In dem planaren Wellenleiter-System wird Licht über ein Gitter eingekoppelt und als Wellenleitermode durch die Sensoroberfläche geführt. Fluorophore, die sich in unmittelbarer Nähe der Sensoroberfläche befinden, werden sehr effizient über das evaneszente Feld der Lichtmoden angeregt (Duveneck et al., 1997; Budach et al., 1999).

Eine Erhöhung der vorhandenen Bindungsplätze pro Sensorspot ist ein weiterer Ansatz zur Steigerung der Sensitivität. Die Erhöhung der Anzahl von Bindungsplätzen pro Sensorspot, hervorgerufen durch eine Vergrößerung der Oberfläche, führt nach dem Massenwirkungsgesetz beziehungsweise der Langmuir-Isotherme zur Bindung von mehr Targetmolekülen an der Oberfläche des Sensors. Eine verstärkte Bindung von Targetmolekülen resultiert in einer Erhöhung des absoluten Signals und führt somit zur Verbesserung der Nachweisgrenze. Eine Vergrößerung der Oberfläche wurde durch den Übergang von zweidimensionalen Trägersubstraten in dreidimensionale Trägersubstrate realisiert. Häufig wird dies durch Polyethylenglycol- und Polyacrylamid-Gele, die auf Glas oder Kunststoff aufgebracht werden (Timofeev et al., 1996; Poudnikov et al., 1998) oder durch poröse Materialien wie makroporöses Silizium (Cheek et al., 2001) oder Mikrokanal-Glas (Benoit et al., 2001) erreicht. In den porösen Gelen wird jedoch ein Austausch von Analytlösungen durch die vorhandenen Sacklöcher und quervernetzte Poren erschwert. Ein großer Vorteil des makroporösen Siliziums und des Mikrokanal-Glases gegenüber den quervernetzten Poren in den Polyethylenglycol- und Polyacrylamid-Gele ist die Möglichkeit, kontinuierlich die Analytlösung durch geordnete, homogene Mikrokanäle zu pumpen. Ein Auseinanderlaufen der Sensorspots ist wegen des Fehlens von quervernetzenden Kanälen im makroporösen Silizium und in Mikrokanal-Glas nicht möglich.

Die optische Detektion der Hybridisierungsereignisse bei Lumineszenz-Mikroarrays im sichtbaren Spektrum des Lichts ist jedoch in der makroporösen Siliziumstruktur aufgrund der Absorption limitiert. Mikrokanal-Gläser und die porösen Gele wiederum zeigen hohe Transparenz im sichtbaren Spektrum des Lichts. Eine erhöhte Streuung und Reflexion innerhalb der Struktur führt jedoch zu einer Erhöhung des Hintergrundsignals.

Allgemein kann die analytische Leistungsfähigkeit eines Sensors durch Erhöhung des Signals oder durch Verringerung des Hintergrundsignals und Hintergrundrauschens verbessert werden. Ein idealer Affinitätssensor weist demzufolge zur Erhöhung des absoluten Signals eine große Sensoroberfläche auf und ermöglicht eine effektive Anregung der Fluorophore. Für eine effektive Anregung der Fluorophore wird zur Verringerung des Hintergrundsignals möglichst wenig Anregungslicht auf die Sensoroberfläche eingestrahlt und zur Erhöhung des absoluten Signals die Wechselwirkungslänge des Anregungslichts mit den Fluorophoren sowie die Intensität des Anregungslichts in der Nähe der Fluorophore erhöht. Das Emissionslicht der Fluorophore wird möglichst ohne Verluste aus dem Sensor geleitet und detektiert. Zur Verringerung des Hintergrundsignals weist der optimale Sensor optisch isolierte Sensorbereiche auf, um Übersprechen anderer Spotsignale zu verhindern.

Erste Arbeiten über dreidimensionale makroporöse Membranen aus Silizium und Siliziumdioxid zeigen das Potential als Trägermaterial für einen optimalen heterogenen Affinitätssensor auf. Die gleichzeitige Integration von Silizium und Siliziumdioxid in einer makroporösen Membran wurde erstmals 2003 beschrieben (Klühr, 2003). Die beschriebene poröse Membran weist eine große Oberfläche auf, die sowohl optisch als auch fluidisch leicht zugänglich ist. Die Anwendbarkeit als Träger für Bio-Assays ist jedoch wegen materialbedingter Verformungen noch stark eingeschränkt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Herstellung neuartiger makroporöser Membranen aus Silizium und Siliziumdioxid mit regelmäßiger dreidimensionaler Struktur. Diese Membranen sollen eine deutlich größere reaktive Oberfläche als herkömmliche zweidimensionale Glasträger besitzen.

Die angestrebten dreidimensionalen photonischen Strukturen sollen optisch charakterisiert werden. Hierfür soll das Einkoppelverhalten, die Ausbreitung innerhalb der Membran und das Auskoppelverhalten von Licht untersucht werden.

Für die angestrebten Nano-Strukturen sollen neue Techniken zur Lösung der fluidischen Probleme, der Immobilisierung der Probenmoleküle und der Detektion erarbeitet werden.

Ferner soll die Anwendbarkeit der Nano-Membranen als Trägersubstrat für DNA-Mikroarrays nachgewiesen werden. Hierfür sollen Hybridisierungsbedingungen ausgearbeitet, sowie die entsprechenden Hybridisierungskinetiken erstellt werden.

2 Grundlagen

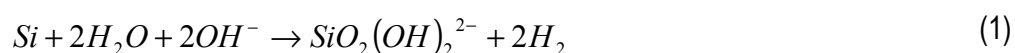
2.1 Herstellung von partiell oxidierten makroporösen Silizium-Membranen

2.1.1 Isotropes und anisotropes Ätzen von Silizium

Als Ätzen wird der Abtragungsprozess einzelner Atome oder Moleküle eines Ausgangsmaterials bezeichnet. Es findet neben vielen anderen formgebenden Prozessen vor allem in der Mikro- und Nanotechnologie Anwendung.

Grundsätzlich wird zwischen Trocken- und Nassätzverfahren unterschieden. Die Nassätzverfahren, bei denen das Material durch eine Ätzlösung abgetragen wird, werden weiter in außerstromlose und elektrochemische sowie in isotrope und anisotrope Verfahren unterteilt.

Isotropes und anisotropes Ätzen unterscheiden sich bezüglich ihrer Ätzrate in den Raumrichtungen (Köhler, 1998). Beim isotropen Ätzen erfolgt der Materialabtrag in allen Raumrichtungen mit der gleichen Geschwindigkeit; beim anisotropen Ätzen sind bestimmte Raumrichtungen bevorzugt. Die Ursache für die Bevorzugung einer Raumrichtung beim Ätzen liegt in den strukturellen Eigenschaften des zu ätzenden Mediums oder in dem richtungsabhängigen Angriff der reaktiven Spezies in der Ätzlösung. Beim kristallographischen Ätzen ist der Aufbau der Kristallflächen und die Anzahl und Anordnung der Elektronenorbitale in der Kristallfläche entscheidend für die Art und Geschwindigkeit der chemischen Prozesse, die sich beim Ätzen an der Oberfläche abspielen. Dabei weisen Ebenen mit einer hohen Dichte von Atomen ((111)-Ebene) eine niedrige Ätzrate und Ebenen mit niedrigen Dichten ((100)-Ebene) eine hohe Ätzrate auf (Kittel, 1980; Hilleringmann, 1999). Zum anisotropen Ätzen von Silizium eignen sich vor allem Ätzbäder mit Alkalilaugen wie KOH (Seidel et al., 1990; Sato et al., 1998; Xia et al., 2001), NaOH (Allongue et al., 1993), NH₄OH (Kern, 1984; Gould et al., 1989) oder auch Mischungen aus Ethylendiamin, Benzendiol, Hydrazin, Brenzkatechin, Pyrazin und Wasser (EDP-Lösungen) (Finne et al., 1967; Kendall, 1979; Mehregany et al., 1988; Xu et al., 1990). Alle Ätzmischungen haben gemeinsam, dass die Auflösung des Siliziums durch die Hydroxylionen in der Lösung nach folgender Reaktion abläuft (Hilleringmann, 1999):



2.1.2 Herstellung von porösem Silizium durch elektrochemisches Ätzen

Poröses Silizium kann grundsätzlich auf zwei Arten hergestellt werden: durch das rein chemische Stain Etch Verfahren (Steckl et al., 1994) und durch anodische Oxidation in fluoridhaltiger, wässriger Elektrolytlösung (Turner, 1958).

Die bei der anodischen Oxidation von Silizium entstehenden porösen Strukturen zeigen sehr unterschiedliche Morphologien und lassen sich in drei Grundtypen einteilen:

- Mikroporöses Silizium (Porendurchmesser von ca. 2 nm; innere Oberfläche von typisch $1000 \text{ m}^2 \text{ ml}^{-1}$);
- Mesoporöses Silizium (Porendurchmesser von 2 nm bis 50 nm; innere Oberfläche von typisch $100 \text{ m}^2 \text{ ml}^{-1}$);
- Makroporöses Silizium (Porendurchmesser ab 50 nm; innere Oberfläche von typisch $1 \text{ m}^2 \text{ ml}^{-1}$).

Makroporenbildung in n-Silizium unter rückseitiger Beleuchtung

Das elektrochemische Porenätzen in Silizium erfolgt beim Anlegen einer Spannung an einen n-Silizium Wafer, der mit der Vorderseite in eine wässrige HF-Lösung eintaucht und als Anode geschaltet wird (Lehmann et al., 1990; Lehmann, 2002). Durch rückseitige Beleuchtung werden Elektronen-Loch-Paare generiert, wobei die Löcher (Minoritätsladungsträger) durch Diffusion zur Oberseite wandern. Die Elektronen (Majoritätsladungsträger) werden durch die positive Vorspannung abgezogen. Es kommt zu einer Verarmung an Majoritätsladungsträger, was eine Krümmung der Raumladungszone (RLZ) um die Porenspitzen und eine lokale Erhöhung des elektrischen Feldes zur Folge hat (Abbildung 1). Die Minoritätsladungsträger (Löcher; h^+) werden durch die Erhöhung der Feldstärke auf die Porenspitze fokussiert. Dies vergrößert die Stromdichte an der Porenspitze, bis die kritische Stromdichte (i_{ps}) erreicht wird. Da der Stromfluss in erster Näherung ausschließlich über die Porenspitzen erfolgt und keine Ladungsträger in die Bereiche der Porenwände gelangen, findet die anodische Auflösung von Silizium bzw. Porenbildung fast vollständig an den Porenspitzen statt.

Die kritische Stromdichte (i_{ps}) ist der entscheidende Parameter beim elektrochemischen Ätzen von Makroporen und ist abhängig von der Konzentration und Temperatur der HF-Lösung. Folgende Gleichung wurde empirisch ermittelt (Lehmann, 1993):

$$i_{PS} = C_{PS} c_{HF}^{1,35} \exp(-E_A/kT) \quad (2)$$

E_A : die Aktivierungsenergie (0,415 eV);

C_{PS} : empirisch ermittelte Konstante ($68000 \text{ A cm}^{-2} (\%HF)^{-1,35}$);

c_{HF} : Konzentration der Flusssäurelösung [Gew. %];

T : Temperatur der Lösung [K];

i_{PS} : kritische Stromdichte [A cm^{-2}].

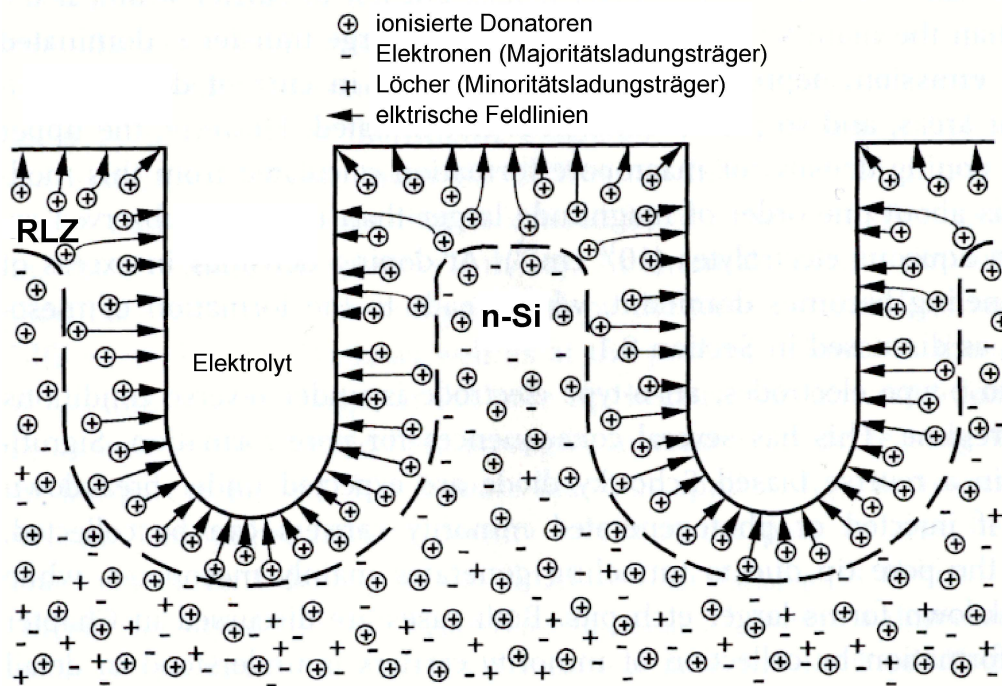


Abbildung 1: schematische Darstellung des Porenwachstums in n-Silizium (Lehmann, 2002).

2.1.2.1 Strom-Spannungscharakteristika von n-Siliziumelektroden

Abbildung 2 zeigt eine Stromdichte-Spannungskurve einer n-Silizium-Elektrode im beleuchteten und unbeleuchteten Zustand.

Reaktionsbereich 1:

Die n-Silizium-Elektrode ist in diesem Bereich in Durchlassrichtung geschaltet (kathodischer Bereich). Elektronen können im beleuchteten und unbeleuchteten Zustand an den Elektrolyten abgegeben werden. Dabei werden Protonen zu Wasserstoff reduziert. Die Wasserstoffentwicklung an der Elektrode ist sowohl im beleuchteten als auch im unbeleuchteten Zustand zu beobachten.

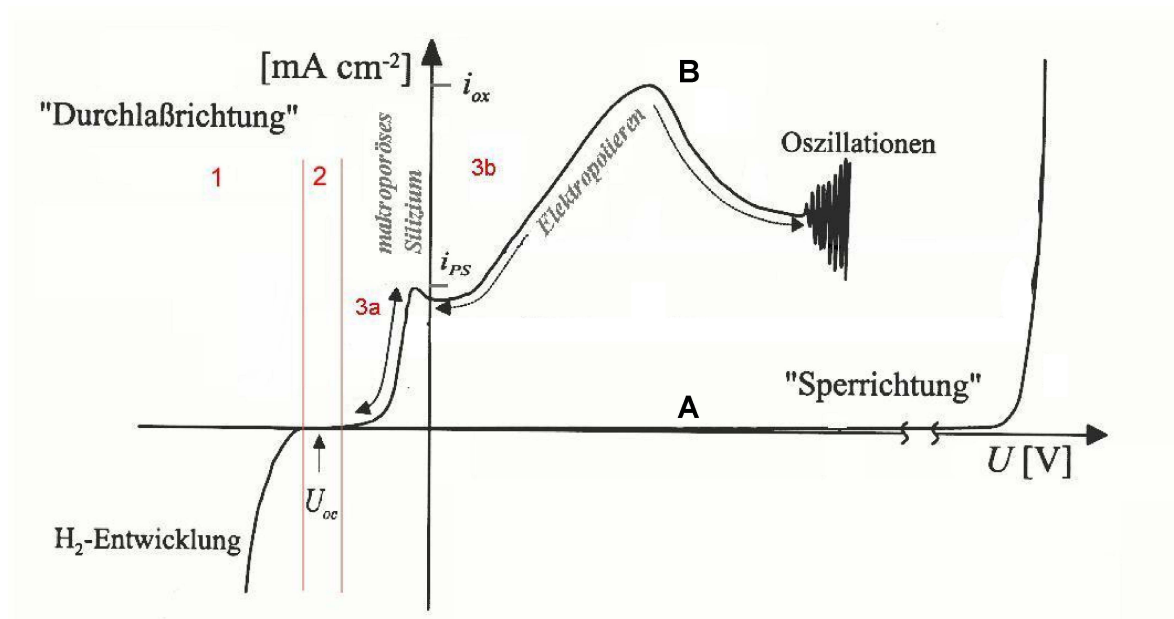


Abbildung 2: Darstellung der Stromdichte-Spannungs-Kurve einer n-Silizium-Elektrode. A: unbeleuchtet; B: beleuchtet; 1- 3: verschiedene elektrochemische Reaktionsbereiche.

Reaktionsbereich 2:

Für den Bereich der Leerlaufspannung (U_{oc}) findet mit dem Elektrolyten keine chemische Reaktion statt.

Reaktionsbereich 3:

Nach Überschreiten der Leerlaufspannung in anodischer Richtung ist die Elektrode in Sperrrichtung geschaltet und es muss zwischen beleuchtetem Zustand (Kennlinie B) und unbeleuchtetem Zustand (Kennlinie A) differenziert werden.

Solange keine Beleuchtung stattfindet, fließt ein geringer Leckstrom bis es bei hohen Überspannungen zum elektrischen Durchbruch kommt. Im beleuchteten Zustand wird abhängig von der Lichtintensität eine bestimmte Anzahl von Minoritätsladungsträgern generiert, die die maximale Stromdichte bestimmen. Im Bereich 3a erfolgt ein starker Anstieg der Kennlinie bis zum ersten Stromdichtemaximum, der kritischen Stromdichte (i_{ps}). Hier erfolgt unter divalenter Auflösung des Siliziums die Bildung von meso- oder makroporösem Silizium und Wasserstoff. Bei Stromdichten unterhalb der kritischen Stromdichte, liegen zu wenig Minoritätsladungsträger für ein konstantes Porenwachstum zur Bildung von makroporösem Silizium vor. Jeder Minoritätsladungsträger, welcher die Oberfläche erreicht, initiiert sofort die Herauslösung eines Siliziumatoms.

Für Stromdichten oberhalb der kritischen Stromdichte (Bereich 3b) findet eine tetravalente Auflösung der Siliziumelektrode unter Bildung von makroporösem Silizium statt. Der Auflösungsprozess erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird die Elektrode anodisch oxidiert und im anschließenden Schritt wird das gebildete Oxid in einer chemischen Reaktion in HF aufgelöst. Dieses Gebiet kennzeichnet die Elektropolitur. Stromdichten größer der kritischen Stromdichte führen zur Akkumulation der Minoritätsladungsträger an der Grenzfläche. Die Auflösungsreaktion wird durch die Diffusion der Ionen im Elektrolyten begrenzt. Es kommt zu einer Verarmung an HF_2^- -Ionen in Oberflächennähe der Porenspitze. In Folge des Überangebots an Löchern ist der Auflösungsprozess von Silizium nicht mehr nur auf die Porenspitzen beschränkt, sondern findet auch an den Porenwänden statt.

Die Stromdichte-Spannungs-Kurve durchläuft beim Elektropolieren ein zweites Stromdichtemaximum bis zur Strom-Spannungszosillation. Das stationäre Gleichgewicht von Oxidbildung und Oxidauflösung wird in Richtung Oxidbildung verschoben.

2.1.3 Thermische Oxidation

Die thermische Oxidation von Silizium ist neben verschiedenen Abscheidetechniken eine geeignete Methode um Siliziumdioxid mit hoher dielektrischer Qualität zu erhalten. Die thermische Oxidation lässt sich in feuchte und trockene Oxidation unterteilen. Die trockene Oxidation erfolgt in reiner Sauerstoffatmosphäre; die feuchte Oxidation in Wasserdampfatmosphäre. Um dicke Oxidschichten zu erhalten, ist die feuchte Oxidation der trockenen Oxidation vorzuziehen, da bei der feuchten Oxidation die Aufwachsrate (R) bei 1000 °C bis zu achtmal größer ist als bei der trockenen Oxidation (Ruge et al., 1984).

Die Oxidationskinetik wurde 1965 von B. E. Deal und A. S. Grove für die feuchte und die trockene Oxidation beschrieben (Deal et al., 1965). Das Modell berücksichtigt einen linearen und einen parabolischen Anteil des Schichtenwachstums während der Oxidation für planare Siliziumoberflächen.

$$x_0^2 + A x_0 = B (t + \tau) \quad (3)$$

x_0 : Oxiddicke;

A und B: temperaturabhängige Konstanten;

τ : natürliches Oberflächenoxid;

t: Oxidationszeit.

Für lange Oxidationszeiten kann die Oxidationskinetik auf ein parabolisches Gesetz reduziert werden, da das Oxidwachstum vor allem von der Diffusion der Reaktanten durch das Oxid abhängig ist:

$$x_o^2 = B (t + \tau) \quad (4)$$

2.1.3.1 Mechanischer Stress

Während der thermischen Oxidation kommt es beim Übergang von Silizium in Siliziumdioxid zu einer Zunahme des Volumens. Der Volumenzunahmefaktor hängt von der Dichte des gebildeten Siliziumdioxides, der Oxidationstemperatur und der Art des Oxidationsverfahrens (feucht oder trocken) ab und variiert zwischen 2 und 2,5 (Ruge et al., 1984; Kao et al., 1988; Revesz, 1999). Die Volumenzunahme induziert mechanischen Stress, da sich während der Oxidation in der wachsenden Grenzschicht zwischen Silizium/Siliziumdioxid eine Druckspannung aufbaut (Mikhailov et al., 1987; Revesz, 1999). Beim Übergang von kristallinem Silizium zu amorphem Siliziumdioxid wird durch die molekularen Umlagerungen eine stark unter Spannung stehende Zwischenschicht gebildet. Kontinuierlich getrieben von dem neu gebildeten Oxid wandert die Zwischenschicht nach außen. Mit zunehmendem Abstand von der Grenzfläche verringert sich der Einfluss der Gitterstruktur des Siliziums auf die Oxidschicht und eine Reorganisation der unter Spannung stehenden Oxidschicht setzt ein. Die Reorganisation und der damit verbundene Stressabbau benötigt Zeit und ist von der Viskosität des Siliziumdioxids abhängig (Mikhailov et al., 1987; Sokolov et al., 1987). Die Erniedrigung der Viskosität des Siliziumdioxids mit zunehmender Temperatur führt zu einem Abbau des Stresses (Doremus, 1987). Diesem Effekt gegenläufig ist der Aufbau von Stress aufgrund der unterschiedlichen Ausdehnungskoeffizienten von Silizium ($\gamma_{(Si)} = 4,5 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$) und Siliziumdioxid ($\gamma_{(SiO_2)} = 0,35 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$). Mit steigender Oxidationstemperatur steigt der Stress. Beide Effekte zeigen eine gegensätzliche Abhängigkeit von der Oxidationstemperatur; ein Minimum der Stressentstehung während der Oxidation wird bei einer Temperatur von 1050 °C beobachtet (Sokolov et al., 1987).

2.2 Planare Wellenleiter

Planare Wellenleiter bestehen aus einem Schichtsystem optisch transparenter Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes. Dabei ist eine Schicht mit dem Brechungsindex 1 (n_1) von einem Medium mit dem Brechungsindex 2 (n_2) umgeben, wobei n_1 kleiner n_2 ist.

2.2.1 Reflexion, Brechung, Totalreflexion und evaneszentes Feld

Trifft Licht aus einem transparenten Medium mit höherem Brechungsindex (n_2) auf ein transparentes Medium mit niedrigerem Brechungsindex (n_1), so ändert sich der Strahlengang des Lichtstrahls nach dem Snelliusschen Brechungsgesetz wie folgt:

$$\sin \theta_1 n_1 = \sin \theta_2 n_2 \quad (5)$$

Dabei wird ein Teil des Lichts wieder in das optisch dichtere Medium (n_2) unter dem Einfallswinkel (θ_2) reflektiert und der andere Teil in das optisch dünnere Medium (n_1) unter dem Winkel 1 (θ_1) gebrochen. Ab einem bestimmten Einfallswinkel θ_{Grenz} (Grenzwinkel der Totalreflexion) wird das Licht parallel zur Grenzfläche gebrochen. Bei Überschreiten des Grenzwinkels ($\theta_i > \theta_{\text{Grenz}}$) erfolgt Totalreflexion, und die elektromagnetische Welle wird in das optisch dichtere Medium zurück reflektiert (Abbildung 3).

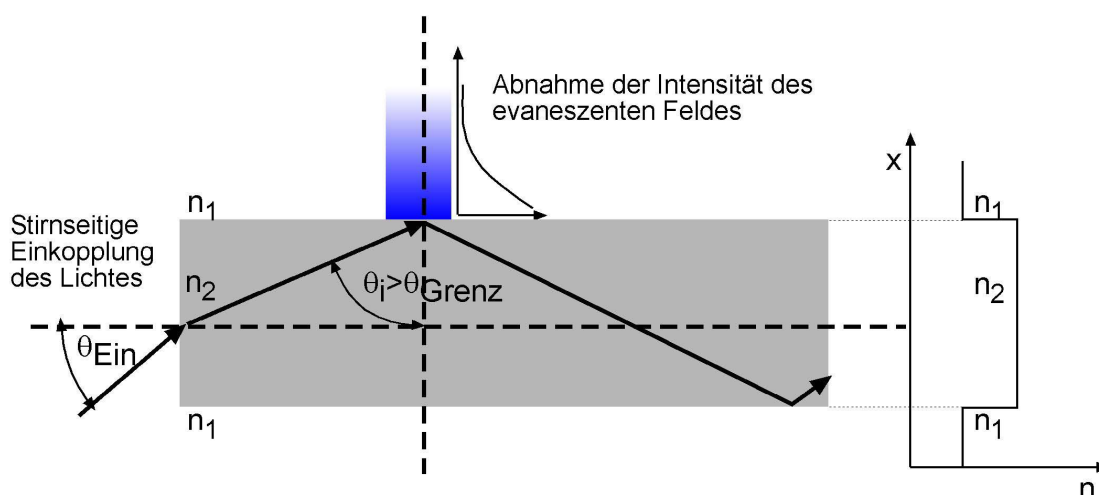


Abbildung 3: schematische Darstellung eines symmetrischen Wellenleiters mit stirnseitiger Einkopplung des Lichts.

θ_{Ein} : Einfallswinkel; θ_{Grenz} : Grenzwinkel der Totalreflexion; n_1 : Brechungsindex des optisch dünneren Mediums; n_2 : Brechungsindex des optisch dichteren Mediums.

Der Feldstärkeverlauf der elektromagnetischen Welle bei Totalreflexion nimmt im optisch dünneren Medium mit dem Abstand zur Grenzfläche exponentiell ab. Dieser abnehmende Feldanteil wird als evaneszentes Feld bezeichnet und wird durch folgende Gleichung beschrieben.

$$E_{(z)} = E_0 \exp(-z/d_p) \quad (6)$$

$E_{(z)}$: Intensität der elektrischen Feldstärke in Entfernung z von der Grenzfläche;

E_0 : Intensität der elektrischen Feldstärke an der Grenzfläche;

d_p : Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in das optisch dünnere Medium.

Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes lässt sich wie folgt berechnen:

$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{n_2^2 \sin^2 \theta_i - n_1^2}} \quad (7)$$

n_1 : Brechungsindex des optisch dünneren Mediums;

n_2 : Brechungsindex des optisch dichteren Mediums;

λ : Wellenlänge;

θ_i : Winkel der Totalreflexion (Reider, 1997).

In einigen Mikroarraysubstraten und anderen optischen Sensoren wird das evaneszente Feld zur Anregung von fluoreszierenden Molekülen genutzt. Dabei ist die Anregung auf Fluorophore beschränkt, die sich in unmittelbarer Nähe des Wellenleiters befinden. Die Fluoreszenzmoleküle in Lösung werden nicht angeregt und tragen deshalb nicht zum Fluoreszenzsignal bei (Kellner, 1998).

2.3 Grundlagen der Mikroarraytechnologie

2.3.1 Schematischer Ablauf eines Mikroarray-Experiments

In Abbildung 4 ist der grundsätzliche Ablauf einer Genexpressionsanalyse dargestellt. In der unteren Zeile der Abbildung ist die Vorbereitung des Mikroarrays mit den Schritten der Oberflächenfunktionalisierung, der Sondenauftragung (Spotting) und dem Blockieren dargestellt. Die Probenvorbereitung mit den Schritten der mRNA-Extraktion aus der Zelle und der Fluoreszenz-Markierung ist in der oberen Zeile der Abbildung gezeigt. DNA (cDNA), die aus der Probenvorbereitung gewonnen wird, bindet bei der

Hybridisierung an die gespotteten, komplementären Sondenmoleküle auf dem Trägermaterial. Im Anschluss an die Hybridisierung erfolgt die Detektion und Datenanalyse.

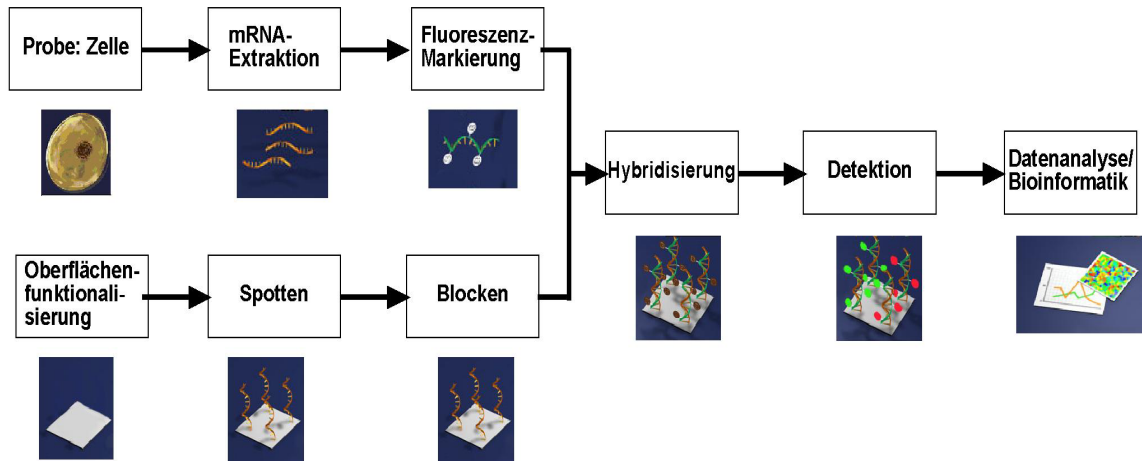


Abbildung 4: schematische Darstellung einer Genexpressionsanalyse.

2.3.1.1 Oberflächenfunktionalisierung

Für die Immobilisierung von Oligonukleotiden auf der Oberfläche müssen kopplungsfähige Gruppen (z.B. Aldehyd-, Amino- oder Epoxygruppen) zur Verfügung stehen. Für die Aktivierung von Metalloxydoberflächen, wie TiO_2 oder SiO_2 , werden meist Trimethoxysilane eingesetzt. Bei der Silanisierung reagieren die Hydroxylgruppen der Glasoberfläche mit den Silanolgruppen des Silans, wobei Methanol abgespalten wird. Aufgrund der drei Methoxygruppen am Silan ist außerdem eine geringe Quervernetzung zu anderen Silanmolekülen auf der Oberfläche möglich, was die Stabilität der Silanschicht auf dem Substrat erhöht (Unger et al., 1976; Buszewski et al., 1998).

2.3.1.2 Aufbringen der Biomoleküle

Für das Aufbringen der Biomoleküle (Probenmoleküle bzw. Sondenmoleküle) auf das Trägermaterial gibt es grundsätzlich zwei unterschiedliche Methoden (Ekins et al., 1999; Singh-Gasson et al., 1999; Southern et al., 1999; Goergen et al., 2001):

- In-situ Synthese; Oligonukleotide werden auf der Oberfläche des Biochips synthetisiert;
- Ex-situ Synthese; Oligonukleotide werden außerhalb des Mikroarrays hergestellt und anschließend auf dem Biochip immobilisiert.

Für die In-situ Synthese werden Verfahren der Photolithographie mit Lochmasken (Affimetrix, 2005), Micro Wet Printing (Ermantraut et al., 1998), Maskless Array Synthesis (Fodor et al., 1991) oder elektrochemische Fokussierung (Sosnowski et al., 1997) verwendet.

Das Aufbringen von vorsynthetisierten Probenmolekülen auf die Mikroarrays erfolgt hauptsächlich über Drucktechniken. Dabei wird zwischen dem kontaktfreien Drucken und dem Kontaktdrucken unterschieden (Bowtell et al., 2002). Bei dem kontaktfreien Drucken werden die Probenmoleküle, ohne direkten Kontakt zwischen Dispensern und Mikroarray, auf die Trägeroberfläche abgesetzt. Hierzu zählen die Verfahren des piezoelektrischen Printings (Blanchard, 1998), Bubblejet Printing (Okamoto et al., 2000) und Microsyring Pump Printing (Goergen et al., 2001). Beim Kontaktdrucken wird eine mit Probenmolekülen beladene Spitze oder Stempel auf die Chipoberfläche aufgesetzt. Hierzu zählt das Contact Tip Deposition Printing (Shena et al., 1995), Pin and Ring Array Printing (Lennon et al., 1991; Müller et al., 2004) und das Micro Contact Printing (Whitesides et al., 1998). Bei dem Ring and Pin System taucht ein Ring in die Lösung, welche die zu immobilisierenden Probenmoleküle enthält. Ein Film mit Lösung spannt sich über den Ring und dient als Reservoir für 5-10 µl Lösung. Beim Durchstoßen des Films nimmt eine dünne Nadel (Pin) eine definierte Menge an Lösung auf und setzt eine bestimmte Flüssigkeitsmenge bei Berührung mit der Substratoberfläche auf dieser wieder ab. Das hierbei abgesetzte Flüssigkeitsvolumen ist abhängig vom Durchmesser der verwendeten Nadel und von der Dauer des Kontakts.

Die In-situ und Ex-situ Synthese unterscheiden sich neben dem Herstellungsverfahren auch in der Länge der Oligonukleotide und der Arraydichte [Spots cm^{-2}]. Die In-situ Synthese ermöglicht eine hohe Arraydichte (bis zu 76 000 Oligonukleotide/16 mm^2 Array), aber lediglich die Herstellung von kurzen Oligonukleotiden (< 30 b). Die Ex-situ Synthese wird zur Immobilisierung von längeren DNA Molekülen, wie z.B. Oligonukleotiden (50-70 b), cDNAs oder PCR-Fragmenten verwendet. Sie erreicht jedoch nicht die hohe Arraydichte der In-situ Synthese.

Der Einsatz von Mikroarrays mit langen Probenmolekülen (> 30 b) ist vor allem dann sinnvoll, wenn eine hohe Sensitivität gefragt ist, da die Bindungskonstante mit steigender Probenlänge ansteigt. Steht die Spezifität im Vordergrund, so werden bevorzugt kurze Probenmoleküle (< 30 b) verwendet, da hier einzelne Veränderungen in der Basenabfolge einen stärkeren Einfluss auf die Bindungskonstante zeigen als bei langen Probenmolekülen (Ramdas et al., 2004).

2.3.1.3 Probenvorbereitung

Um Zielmoleküle (Targetmoleküle) detektieren zu können, ist vor der Hybridisierung ein Markierungsschritt notwendig. Eine Methode hierfür stellt die Fluoreszenz-Markierung von cDNA mittels reverser Transkription dar (Abbildung 5).

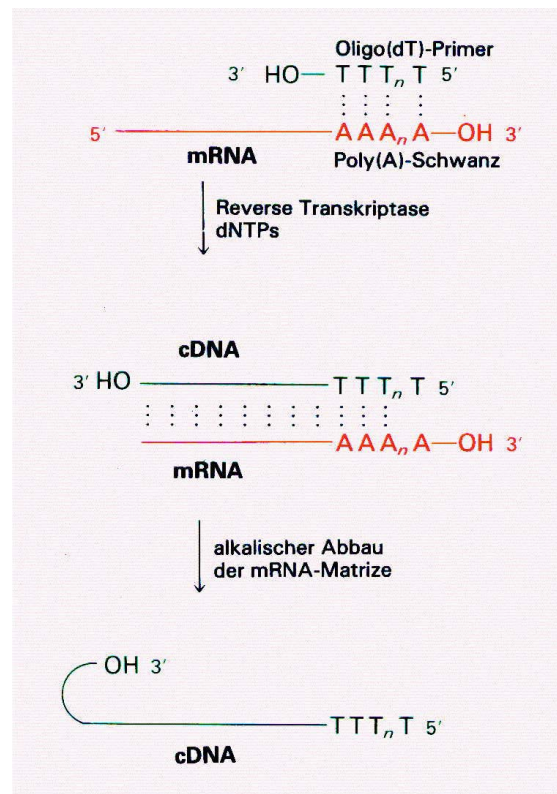


Abbildung 5: schematische Darstellung der reversen Transkription (Stryer, 1995).

Bei der reversen Transkription wird ein zur mRNA komplementärer cDNA-Strang unter Einbau fluoreszenzmarkierter Desoxynukleotide (fluoreszenzmarkierte-dCTP oder dUTP) synthetisiert. Im ersten Schritt bindet ein Oligo (dT)-Primer an den spezifischen Poly(A)⁺-Schwanz des mRNA-Matrizenstrangs (Primerannealing). Die Reverse Transkriptase synthetisiert beginnend am Primer in 3'-Richtung den zur Matrize komplementären cDNA-Strang. Hierbei baut das Enzym die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Desoxynukleotide ein. Im Anschluss daran wird der gebildete RNA-cDNA-Hybrid denaturiert und die RNA degeneriert. Nach dem Neutralisieren der Lösung wird die cDNA aufgereinigt.

In der Mikroarraytechnologie erfolgt die Fluoreszenz-Markierung häufig mit Cyaninfarbstoffen wie Cy3 (Absorption: 550 nm, Emission: 570 nm) und Cy5 (Absorption: 649 nm, Emission: 670 nm) (Schen, 2003).

2.3.1.4 Blocking und Hybridisierung

Vor der Hybridisierung erfolgt das Blocking, um unspezifische Bindungen der Targetmoleküle auf der Mikroarrayoberfläche zu unterbinden. Die Oberfläche des Mikroarrays wird durch Anhaften von Proteinen passiviert.

Die Hybridisierung beruht auf dem Prinzip der Renaturierung komplementärer DNA-Stränge unterhalb ihrer Schmelztemperatur (T_m) (Knippers, 2001). Die komplementären Basen der DNA Stränge Adenin und Thymin sind durch zwei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden, wohingegen Guanin an Cytosin jeweils durch drei Wasserstoffbrücken verbunden ist. Die Wasserstoffbrückenbindungen können durch Erhitzen wieder gelöst werden.

Hybridisierungsbedingungen

Die Stringenz der Hybridisierung, d.h. ihre Spezifität und die Reaktionsgeschwindigkeit, wird wesentlich von der Salzkonzentration, dem Vorhandensein von organischen Lösungsmitteln, dem pH-Wert der Hybridisierungslösung und der Hybridisierungstemperatur beeinflusst.

Salzkonzentration:

Monovalente Ionen beeinflussen die Hybridisierung, da die DNA durch die Phosphorsäurediester-Bindungen ein stark negativ geladenes Molekül ist. Zwischen den beiden komplementären Einzelsträngen herrscht eine elektrostatische Abstoßung, die durch die Anwesenheit von monovalenten Ionen abgeschirmt wird. Eine höhere Ionenstärke führt zu einer Erhöhung der Stabilität des Doppelstrangs. Niedrige Salzkonzentrationen wirken sich stark auf die Schmelztemperatur und die Renaturierungsrate aus. Bei Na^+ -Konzentrationen kleiner $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ist die Hybridisierungsgeschwindigkeit langsam. Eine Erhöhung der Na^+ -Konzentration auf $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ bewirkt eine 5- bis 10-fach höhere Reaktionsrate (Anderson et al., 1985).

Organische Lösungsmittel:

Formamid destabilisiert die Dublexbildung, da es die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen hemmt. Da eine Konzentrationserhöhung des Formamids um 1 % die Schmelztemperatur um $0,61 \text{ }^\circ\text{C}$ senkt, wird es häufig zur Variierung der Stringenz der Hybridisierung eingesetzt (McConaughy et al., 1969; Hutton, 1977). Dextransulfat, Polyacrylsäure oder Polyethylenglykol haben

wasserentziehenden Einfluss, was wiederum zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit führt.

Schmelztemperatur:

Die Schmelztemperatur (T_m) ist die Temperatur, bei der 50 % der DNA als Einzelstrang vorliegt. Die Schmelztemperatur für Oligonukleotide mit einer Länge von 14 bis 20 Basen wird über folgende Gleichung ermittelt (Meinkoth et al., 1984):

$$T_m = [4 (G+C) + (2(A+T))] \quad (8)$$

G, C, A und T: Anzahl der entsprechenden Purin- und Pyrimidinbasen.

Die Schmelztemperatur für einen DNA-Duplex mit mehr als 50 Basen berechnet sich über Gleichung (9) (Meinkoth et al., 1984):

$$T_m = 81,5 \text{ °C} + 16,6 \log(\text{Na}^+) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\%FA) - 500/N \quad (9)$$

Na^+ : Konzentration der monovalenter Na^+ -Ionen;

%GC: Gehalt von Cytosin und Guanin in der Nukleinsäuresequenz;

%FA: Anteil an Formamid;

N: Länge der Nukleinsäure.

Die empirisch ermittelte, optimale Hybridisierungstemperatur liegt 15-30 °C unter der Schmelztemperatur der Nukleinsäure. Im Fall von kurzen Oligonukleotiden und bei stringenten Bedingungen sollte die Hybridisierungstemperatur 5-15 °C unterhalb der Schmelztemperatur liegen (Lottspeich et al., 1998). Die maximale Hybridisierungsgeschwindigkeit wird 25 °C unterhalb T_m erreicht (Meinkoth et al., 1984).

Kinetik der Hybridisierung

Die Kinetik der Hybridisierung ist ein Zwei-Schritt-Prozess. Im ersten Schritt, der Nukleation, treffen die komplementären DNA Stränge zusammen, und es kommt zur Ausbildung der ersten passenden Basenpaarungen. Im zweiten Schritt erfolgen die übrigen Basenpaarungen. Die Nukleation ist der zeitbestimmende Schritt bei der Reassoziaton.

Die DNA Hybridisierung folgt in Lösung einer Kinetik zweiter Ordnung (Young et al., 1985). Bei einem Überschuss an Proben verläuft die Reaktion annähernd Kinetik erster Ordnung (Bryan et al., 1986).

Die Hybridisierungszeit, bei der 50 % der Proben mit den Target reagiert haben ($t_{1/2}$), wenn ein Überschuss an Probe in der Reaktionslösung vorliegt, wird nach folgender Gleichung berechnet (Wetmur et al., 1968; Meinkoth et al., 1984):

$$t_{1/2} = N \ln 2 / (K_n (L^{1/2}) c) \quad (10)$$

L: Probenlänge (Anzahl der Basenpaare);

c: Probenkonzentration [mol L^{-1}];

N: Komplexität der Probe;

K_n : Reaktionskonstante ($3,5 \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) bei einer Natriumkonzentration im Bereich von 0,4 bis 1 mol L^{-1} , pH 5-9 und einer Hybridisierungstemperatur von 25 °C unterhalb der Schmelztemperatur.

Die Hybridisierung zwischen DNA Molekülen in Lösung und festphasengebundenen DNA Molekülen verläuft anders als die Hybridisierung zwischen DNA Molekülen, die sich in Lösung befinden. Die Hybridisierungsrate reduziert sich um den Faktor 5 bis 10, wenn die DNA festphasengebunden ist. Die Auswirkungen der Probendichte oder der Oberflächenbeschaffenheit auf die Hybridisierungskinetik sind Gegenstand von Untersuchungen (Peterson et al., 2001; Peterson et al., 2002). Für eine niedrige Probendichte (z.B. $\sim 3 \times 10^{12}$ Moleküle cm^{-2}) wurde eine Langmuir-Kinetik und eine 100 %ige Hybridisierungseffizienz ermittelt. Bei hoher Probendichte (z.B. $\sim 1,2 \times 10^{13}$ Moleküle cm^{-2}) sinkt die Hybridisierungseffizienz auf 10 % und die Kinetik verläuft langsamer, da aufgrund sterischer Hinderung und Coulomb-Abstoßung ein Herandiffundieren der Targetmoleküle erschwert wird.

3 Experimenteller Teil

3.1 Materialien

Chemikalien und Oligonukleotide

Die verwendeten Chemikalien sind Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Firma
Aceton; VLSI Selectipur	Merck, Darmstadt
Ammoniak (NH ₃); VLSI Selectipur	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat, ACS Grade \geq 97 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Collagen Type IV-Lösung, Oregon Green gelabelt	Molecular Probes (Invitrogen), Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat, ACS Grade \geq 99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO), ACS Grade \geq 99,9 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol, absolut, 99,9 %	J. T. Baker, Freising
Fluorwasserstoffsäure (HF), 50 %, VLSI Selectipur	Merck, Darmstadt
Formamid, ACS Grade \geq 99,5 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
3-Glycidoxypropyl-trimethoxysilan, purum \geq 97 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Goat-Serum, für Molekular Biologie	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat, ACS Grade \geq 99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumhydroxid-Plätzchen (KOH), VLSI Selectipur	Merck, Darmstadt
Methanol, puriss \geq 99,8 %	Fluka, Taufkirchen
Natriumacetat, ACS Grade \geq 99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
20x Natriumchlorid/-citrat-Puffer (SSC), für Molekularbiologie	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS), ACS Grade \geq 99 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyethylenglykol (PEG); 200 und 300; zur Synthese	Merck, Darmstadt
2-Propanol, VLSI Selectipur	Merck, Darmstadt
Reinstwasser, steril	Biochrom AG, Berlin
Salzsäure, rauchend (HCl), VLSI Selectipur	Merck, Darmstadt
Sarkosyl (N-Lauroylsarcosin), purum \geq 97 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Schwefelsäure, 96 %, VLSI Selectipur	Merck, Darmstadt
Silikon-Elastomer-Kit, Sylgard 184	Dow Corning, Midland, USA
Sorbinsäureethylester, purum \geq 97 %	Fluka, Taufkirchen
Tetramethylammoniumhydroxid-Lösung	Merck, Darmstadt
TICKOPUR TR 13	Dr. H. Stamm, Berlin
Wasserstoffperoxid-Lösung, 30 %, (H ₂ O ₂), VLSI Selectipur	Merck, Darmstadt

Die verwendeten Oligonukleotide und RNA sind in Tabelle 2 - Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten Festphasenoligonukleotide (Proben).

Name	Sequenz	Firma
FP1	NH ₂ -5'-GCCCTCACGATCTCTTC-3'	VBC – Genomics, Wien
FP2	NH ₂ -5'-TGCCCTCACAATATATTC-3'	VBC – Genomics, Wien
FP3	NH ₂ -5'-TGCCCTCACACTCTCTTC -3'	VBC – Genomics, Wien
FP4	NH ₂ -5'-CGTCTACGTCAGATACGT -3'	VBC – Genomics, Wien
FP1-Cy3	NH ₂ -5'-GCCCTCACG AT TCT TC -3'- Cy3	VBC – Genomics, Wien
Amine β -Actin	Unbekannt	Stratagene, Heidelberg
Amine Oligo 1	Unbekannt, GC- Gehalt 51 %; T _m laut Hersteller 79 °C	Stratagene, Heidelberg

Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten Kontrolloligonukleotide und RNA (Target).

Name	Sequenz	Firma
K1	3'-TTTTTCGGGAGTGCTAGAGAAG TTTT-5'- Cy3	VBC – Genomics, Wien
K2	3'-TTTTTCGGGAGTGTTAGAGAAGTTTT -5'- Cy3	VBC – Genomics, Wien
mRNA Spike 1	Unbekannt	Stratagene, Heidelberg

Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Name	Firma
Küvetten, UVette®	Eppendorf, Hamburg
Microcon YM-100, Aufreinigungssäulen	Millipore, Bedford, USA
Mikrotiterplatten, Uniplate®, 96 well, 650 μ l,	Whatman, Kent, UK
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Silikonöl, Kalibrierflüssigkeit für Refraktometer, n=1,61 \pm 0,0001	TEC++ Analystechnik, Oberramstadt
(100) orientierter Float-Zone Siliziumwafer, n-Silizium (Phosphor Dotierung), Substratwiderstand von 20 Ω cm und 5 Ω cm, Durchmesser von 150 mm, Dicke 508 μ m, Rückseite sauergeätzt (hochreflektierend), Lebensdauer der Ladungsträger \geq 100 μ sec	Wacker-Siltronics, Burghausen
SuperScript™ Direct cDNA Labeling System	Invitrogen, Karlsruhe
Parafilm®	VWR, Ismaning

Lösungen und Puffer

Die verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Zusammenstellung der verwendeten Lösungen und Puffer.

Name	Zusammensetzung
Alkalisches Detergenz für die Reinigung	3 Vol.% Tickopur TR13
Blocking- Lösung	16 Vol.% Goat Serum in 1 x SSPE, über 0,2 µm Millipore Filter filtriert
Collagen Typ IV-Lösung	
Elektrolyt für elektrochemisches Porenätzen	3-6 Vol.% Flussäure
Standard-Hybridisierungslösung (Angaben als Endkonzentration, nach Zugabe der Oligonukleotide bzw. cDNA)	5 x SSC, 0,1 Vol.% Sarkosyl und 2 Vol.% DMSO
Hybridisierungslösung zur Bestimmung der Hybridisierungskinetik für cDNA (Angaben als Endkonzentration, nach Zugabe der cDNA)	5 x SSC, 0,1 Vol.% Sarkosyl, 2 Vol.% DMSO und 16 Vol.% Formamid
Lösung für die Brechungsindexanpassung der Poren an den Brechungsindex der SiO ₂ -Porenwände	50 Vol.% PEG 200 und 50 Vol.% PEG 300
Lösung zum Öffnen der Sacklöcher	10 Gew.% KOH zur Lösung wird jede Minute 1,3 ml H ₂ O ₂ zugegeben
Lösung für das Nachätzen der Poren	2 Gew.% KOH 10 Vol.% 2-Propanol Zugabe von 2 ml h ⁻¹ H ₂ O ₂ -Lösung (50 Vol.% H ₂ O ₂ und 50 Vol.% 2-Propanol)
Spottingpuffer: Natrium-Kalium-Phosphatpuffer (pH 8,1)	150 mmol L ⁻¹ Dinatriumhydrogenphosphat 7,7 mmol L ⁻¹ Kaliumdihydrogenphosphat auf pH 8,1 einstellen, autoklavieren
RCA-Reinigung	15 Vol.% HCL (37 Vol.%) 15 Vol.% H ₂ O ₂ (30 Vol.%)
Silanisierungs-Lösung	2,4 Vol.% 3-Glycidoxylpropyl-trimethoxysilan in Methanol

Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Zusammenstellung der verwendeten Geräte.

Gerät	Firma
UV-Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
CCD Kamera, Modell ORCA ER	Hamamatsu, Herrsching
Durchflusszelle für anisotropes Porenätzen	Infineon, München
Elektrisches Pipettiersystem, EDOS 5222,	Eppendorf, Hamburg
Elektrochemische Ätzzelle	Infineon, München
GMS 417 Arrayer	Genetic Microsystems / Affymetrix, High Wycombe, UK
Horizontalrohröfen TS 6304	Tempress Systems, VH Heerde, Niederlande
Kühlaggregat, Haake	Thermo, Karlsruhe
Lichtmikroskop, Leica DMX	Leica Microsystem Vertrieb, Bensheim
Magnetrührer mit Heizplatte, MR 3001	Heidolph, Schwabach
Membranpumpe	Almatec, Kamp-Lintfort
Pipetten, Research® (variabel),	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Spritzenpumpe, PHD 2000,	Harvard Aparatus, Eugendorf
Thermoblock, Thermomixer comfort,	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, Mini Spin Plus,	Eppendorf, Hamburg
Trockenofen	Heraeus, Hanau
Quarzplatten	Heraeus Quarzglas, München
Ultraschallbad, Sonorex	Bandelin electronic, Berlin
Vakuum-Druck-Pumpe	Infineon Technologies AG, München
Vortex-Mixer, Top mix	Fisher Bioblock Scientific, Illkirch
Waage, AdventurerTM	OHAUS, Giessen
Waage, AXIOS Delta Range®,	Mettler Toledo, Giessen
Wasserbad, HBR 4 digital	IKA-Werke, Staufen

3.2 Methoden zur Herstellung von Partox-Membranen

Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung einer **partiell oxidierten** makroporösen Siliziummembran (**Partox-Membran**). Als Partox-Membran wird eine makroporöse Siliziummembran bezeichnet, die durch thermische Oxidation bereichsweise in SiO₂ überführt wird.

Die Strategie zur Herstellung der Partox-Membran beruht auf unterschiedlichen Oxidationszeiten, um Silizium-Porenwände verschiedener Dicke durch thermische Oxidation vollständig in Siliziumdioxid zu überführen. Durch periodisches Auslassen von Porenreihen und Porenspalten bei der Herstellung des makroporösen Siliziums werden neben den dünnen Porenwänden mit einer Breite zwischen 0,8 und 1,6 μm dickere Wände mit einer Breite von 2,5-8 μm erzeugt. Bei der thermischen Oxidation der makroporösen Siliziummembran werden die dünneren Porenwände vollständig in Siliziumdioxid überführt, während in den dickeren Wänden (Kompartimentwände) noch immer ein Kern aus Silizium zurückbleibt. Die unvollständig oxidierten dickeren Wände unterteilen die Partox-Membran in regelmäßige Kompartments. Ein Kompartiment umfasst eine vorgegebene Anzahl an diskreten Poren, deren Wände aus Siliziumdioxid bestehen und senkrecht die Membran durchziehen. Der Abstand von Porenmittle zu Porenmittle der benachbarten Pore wird als Porenrafter bezeichnet.

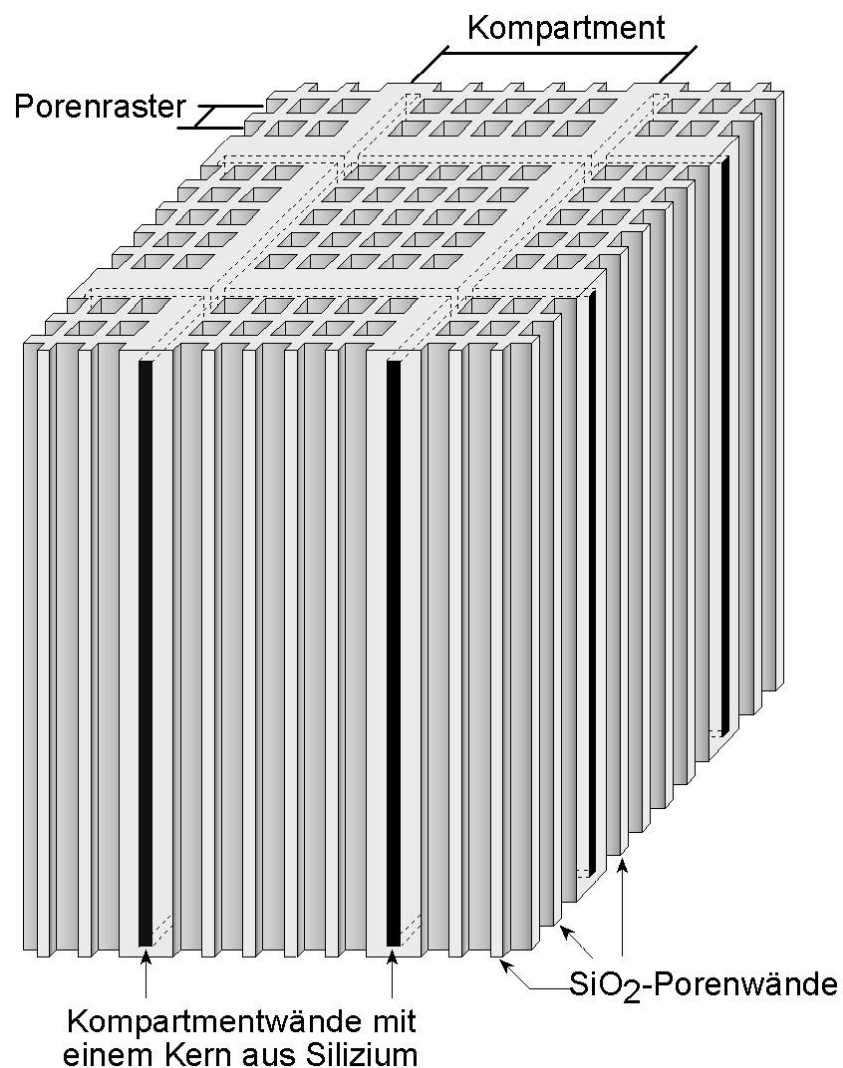


Abbildung 6: schematische Darstellung einer Partox-Membran.

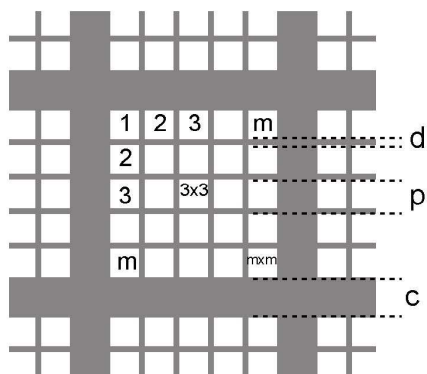
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Strukturen mit unterschiedlichen Porenanordnungen und Porenabmessungen hergestellt.

Die unterschiedlichen Partox-Membranen lassen sich in zwei Typen einteilen:

- zusammenhängende Kompartments; Kompartimentwände benachbarter Kompartments sind miteinander verbunden (Abbildung 7 A);
- isolierte Kompartments; Kompartimentwände benachbarter Kompartments sind durch einen Zwischenbereich voneinander abgetrennt (Abbildung 7 B).

Membranen mit zusammenhängenden Kompartments bestehen aus einem durchgängigen Gitter aus Kompartimentwänden. Membranen mit isolierten Kompartments zeichnen sich durch Zwischenbereiche aus, welche die Kompartments umschließen und somit die Kompartimentwände unterschiedlicher Kompartments voneinander abtrennen.

(A) Schema der Variablen im zusammenhängenden Kompartment



a = Breite des Zwischenbereiches
 c = Breite der Kompartimentwände
 d = Breite der Porenwände
 m = Anzahl der Poren im Kompartiment
 p = Porenraster

(B) Schema der Variablen im isolierten Kompartiment

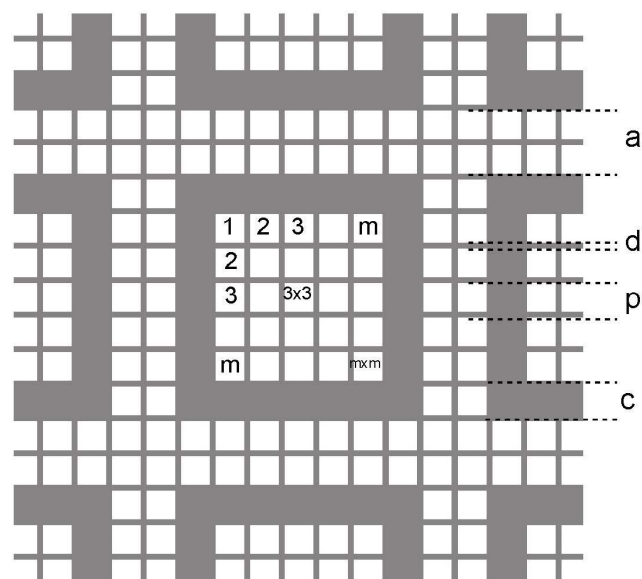


Abbildung 7: Schemata der Variablen in zusammenhängenden und isolierten Kompartments.

In beiden Membrantypen werden die Breite der Porenwände, die Breite der Kompartimentwände und der Porenraster sowie die Anzahl der Poren im Kompartiment verändert. Im isolierten Kompartiment wird zusätzlich die Breite des Zwischenbereiches geändert. Die Breite der Porenwände variiert zwischen 0,8 bis 1,6 μm , der Porenraster (Abstand von Porenmitte zu Porenmitte) zwischen 3 μm bis 11,3 μm und die Anzahl der Poren zwischen 5x5 bis 80x80 im Kompartiment. Die Breite der Kompartimentwände wird unter Bezug auf den Porenraster in einem Vielfachen dessen angegeben und variiert

zwischen 1,25- bis 2,0-fachen des Porenrasters. Dieses Maß bezieht sich auf den Porenabstand über eine Kompartimentwand hinweg. In einem Kompartiment mit 20x20 Poren und einem Porenraster von 5 μm wird eine Kompartimentwandbreite des 2-fachen Porenrasters dadurch erzeugt, dass bei allen 20 Reihen und Spalten der Abstand von Porenmitte zu Porenmitte auf 10 μm vergrößert wird.

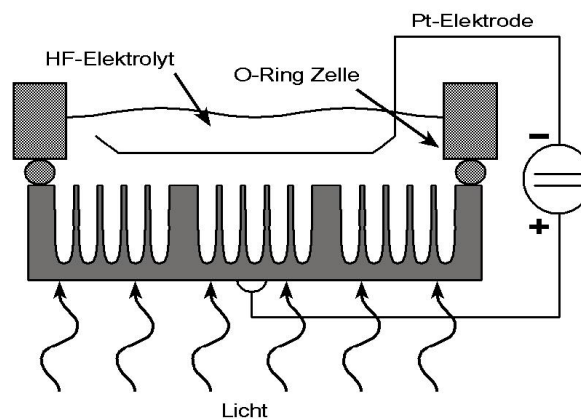
3.2.1 Prozessschritte zur Herstellung von Partox-Membranen

Die einzelnen Prozessschritte sind in Abbildung 8 dargestellt.

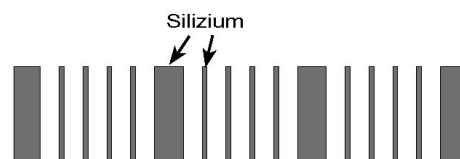
(A) Strukturierung des Wafers



(B) Elektrochemisches Porenätzen



(C) Öffnen und anisotropes Nachätzen der Poren



(D) Thermische Oxidation

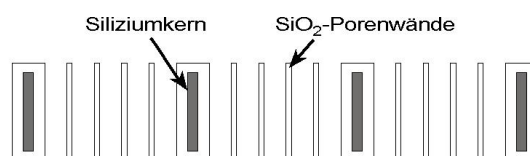


Abbildung 8: schematische Darstellung der Herstellungsprozesse von Partox-Membranen.

Im ersten Schritt wird die Oberseite des Siliziumwafers durch pyramidenförmige Ätzgruben strukturiert, um die Position der Poren für den anschließenden elektrochemischen Ätzprozess zu bestimmen (Abbildung 8 A). Das elektrochemische Ätzen erzeugt runde Poren, die senkrecht in den Siliziumwafer hineinreichen (Abbildung 8 B). Der Übergang von Sacklöchern zu durchgängigen Poren erfolgt durch einseitiges Rückätzen des unstrukturierten Siliziums. Im nächsten Schritt werden durch anisotropes Nachätzen die runden Poren in quadratische Poren überführt und die Porenwanddicke homogen über die gesamte Porenlänge eingestellt (Abbildung 8 C). Im letzten Schritt werden die Porenwände durch eine thermische Oxidation komplett in Siliziumdioxid überführt (Abbildung 8 D).

3.2.1.1 Strukturierung des Ausgangsmaterials

Als Ausgangsmaterial wird ein mit Phosphor dotierter (100) orientierter Float Zone-Siliziumwafer verwendet. Auf der Waferrückseite wird durch zusätzliche Phosphordiffusion ein hochdotiertes Gebiet erzeugt, welches 1,2 μm tief in den Wafer hineinreicht und einen Oberflächenwiderstand von 10 Ω pro Ausschnitt aufweist. Dies ist notwendig, um einen homogenen ohmschen Rückseitenkontakt für den elektrochemischen Ätzprozess zu gewährleisten.

Für die Strukturierung des Ausgangsmaterials wird eine 200 nm Siliziumdioxidschicht mittels CVD-Verfahren (Chemical Vapour Deposition) abgeschieden. Nach Aufschleudern und lithographischer Strukturierung einer Positiv-Photolackschicht mittels einer Maske werden die belichteten und entwickelten Stellen im Photolack mit 2,4 Vol.% Tetramethylammoniumhydroxid-Lösung entfernt. Durch ein Sauerstoffplasma werden die freigelegten Bereiche der Photolackschicht in die darunter liegende Siliziumdioxidschicht übertragen. Die Entfernung der restlichen unbelichteten Photolackschicht erfolgt durch Aceton. Durch 6-minütiges anisotropes KOH-Ätzen (10 Gew.%) bilden sich im Silizium, an den von Siliziumdioxid befreiten Stellen, pyramidenförmige Ätzgruben (2,5x2,5 μm), welche die Startposition des Porenwachstums für das elektrochemische Porenätzen definieren. Im Anschluss daran wird die restliche Siliziumdioxidschicht in wässriger HF-Lösung (10 Gew.%) entfernt.

3.2.1.2 Elektrochemisches Porenätzen

Für das elektrochemische Porenätzen ist vor allem der Porenraaster entscheidend. Je nach verwendetem Porenraaster werden Siliziumwafer mit entsprechender Dotierung

gewählt (Lehmann et al., 1997). Eine Abschätzung zur Bestimmung der Dotierung des entsprechenden Materials in Abhängigkeit des Porenrasters kann wie folgt berechnet werden:

$$\text{Dotierung} \approx [1/(\text{Porenrastrer})^2] 10^{16} \quad (11)$$

Die Größe des Porenrasters wird in μm angegeben, um die Dotierung mit der Einheit Anzahl der Dotieratome pro cm^3 zu erhalten. Die oben beschriebene Näherung gilt für das elektrochemische Ätzen von runden Löchern, die in einem quadratischen Gitter angeordnet sind.

Bei einem Porenrastrer von $3,0 \mu\text{m}$ wird ein Siliziumwafer mit $5 \Omega\text{cm}$ Substratwiderstand verwendet. Dies entspricht einer Dotierung von ca. $2,5 \cdot 10^{16}$ Dotieratome cm^{-3} . Bei einem Porenrastrer von $5,0$ und $11,3 \mu\text{m}$ werden die Poren auf einem Siliziumwafer mit $20 \Omega\text{cm}$ Substratwiderstand elektrochemisch geätzt. Dies entspricht einer Dotierung von ca. $1,5 \cdot 10^{16}$ Dotieratome cm^{-3} .

Nach Auswahl des entsprechenden Wafermaterials werden die Parameter Ätztiefe, Durchmesser, Spannung, Temperatur, HF-Konzentration und Ätzstrom so angepasst, dass $400 - 450 \mu\text{m}$ tiefe Poren mit homogener Wandstärke über die gesamte Porenlänge erzeugt werden.

3.2.1.3 Öffnen der Poren

Um durchgehende Poren zu erhalten, ist ein Öffnen der Sacklöcher im Anschluss an das elektrochemische Ätzen nötig. Das Öffnen der Sacklöcher wird durch das selektive Entfernen von $60-100 \mu\text{m}$ des Restsiliziums auf der Waferrückseite realisiert. Hierfür werden die Vorderseite des Wafers und die Innenseite der Poren durch eine Schutzschicht aus 60 nm Siliziumdioxid und 20 nm Siliziumnitrid vor der Ätzlösung geschützt. Zur Herstellung der thermisch aufgewachsenen Siliziumdioxid-Schicht wird der elektrochemisch geätzte Wafer bei $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ und unter Verwendung von 6 SLM (Standard-Liter pro Minute) Wasserstoff und 4 SLM Sauerstoff feucht oxidiert. Im Anschluss wird auf die Siliziumdioxid-Schicht eine 20 nm Siliziumnitrid-Schicht bei einem Druck von $0,46 \text{ bar}$, einer Temperatur von $650 \text{ }^\circ\text{C}$ und unter Verwendung von 210 SCCM (Standard Kubikzentimeter pro Minute) Ammoniakgas und 70 SCCM Dichlorsilan mittels CVD abgeschieden. Nach dem Entfernen der Schutzschicht von der Waferrückseite mit wässriger HF-Lösung kann das Restsilizium auf der Waferrückseite mit 10% iger KOH-Lösung bei $71 \text{ }^\circ\text{C}$ weggeätzt werden. Nach einer Zeit von ca. 120 Minuten sind alle Poren

geöffnet. Zuletzt werden die Schutzschichten auf der Vorderseite des Wafers und der Poreninnenseite in 10 %iger HF-Lösung innerhalb von 3 Stunden entfernt.

3.2.1.4 Aufweitung der Poren

Das anisotrope Nachätzen der Poren dient zur homogenen Einstellung der Porenwanddicke über die gesamte Porenlänge. Dies erfolgt in einer selbst entwickelten Durchflusszelle (Abbildung 9). Eine anisotrope Ätzlösung (2 Gew.% KOH-Lösung mit 10 Vol. % 2-Propanol) wird mit einer Geschwindigkeit von $1,0 \text{ l min}^{-1}$ umgewälzt, wobei ein Großteil der Ätzlösung durch die Poren gepumpt wird. Zusätzlich wird eine Lösung aus Wasserstoffperoxid und 2-Propanol im Verhältnis 1:1 mit einer Spritzenpumpe kontinuierlich zudosiert (2 ml h^{-1}). Die anisotrope Ätzlösung wird abwechselnd 5 Minuten von der Oberseite zur Unterseite des Wafers und 3 Minuten und 15 Sekunden entgegengesetzt durchströmt. Die Proben mit einem Porenraster von 3 und 5 μm werden bei $14 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ mit anisotroper Ätzlösung solange durchströmt, bis die entsprechende Porenwanddicke erreicht ist. Die Proben mit einem Porenraster von 11,3 μm werden bei einer Temperatur von $27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ nachgeätzt.

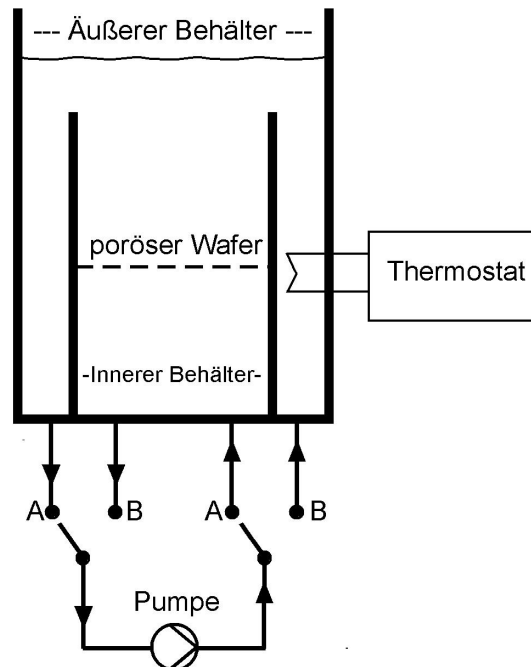


Abbildung 9: schematische Darstellung der Durchflusszelle für das anisotrope Nachätzen der elektrochemisch geätzten Poren.

Ventilstellung A: Ätzlösung wird mittels einer Membranpumpe durch den Wafer vom inneren Behälter in den äußeren Behälter gepumpt; Ventilstellung B: Ätzlösung wird mittels einer Membranpumpe durch den Wafer vom äußeren Behälter in den inneren Behälter gepumpt.

3.2.1.5 Thermische Oxidation

Das Ziel der thermischen Oxidation ist die komplette Umwandlung der dünneren Siliziumporenwände innerhalb eines Kompartments in Siliziumdioxid. Die feuchte thermische Oxidation der Partox-Membran findet in einem Horizontalofen bei 1050 °C statt. Hierfür werden 6 SLM (Standard-Liter pro Minute) Wasserstoff und 4 SLM Sauerstoff in einem Brenner am Rohreingang zu H₂O verbrannt. Abhängig von der Breite der Porenwände dauert die Oxidation zwischen 14 und 28 Stunden.

3.2.1.6 Charakterisierung von Partox-Membranen

Längenausdehnung:

Die Längenausdehnung (Δl [%]) wird durch das Verhältnis der Länge des Kompartments nach der Oxidation (l_{k-nach} [μm]) zur Länge des Kompartments vor der Oxidation (l_{k-vor} [μm]) nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\Delta l = (l_{k-nach}/l_{k-vor}) - 1) \cdot 100 \quad (12)$$

Porosität:

Die Porosität (p) der makroporösen Membran ist definiert als Verhältnis des Porenvolumens (V_{Poren}) zum Gesamtvolumen (V_{gesamt}) oder der Porenfläche (A_{Poren}) zur Gesamtfläche (A_{gesamt}):

$$p = V_{\text{Poren}}/V_{\text{gesamt}} = A_{\text{Poren}}/A_{\text{gesamt}} \quad (13)$$

Die Porosität vor der Oxidation wird wie folgt berechnet:

$$p_{\text{vorOx}} = (\text{Porenraster} - d_{\text{vorOx}})^2 / (\text{Porenraster})^2 \quad (14)$$

d_{vorOx} : Porenwanddicke vor der Oxidation.

Für die Berechnung der Porosität nach der Oxidation wird die Porenwanddicke nach der Oxidation (d_{nachOx}) verwendet. Der Porenraster wird mit der Längenausdehnung (Δl [%]) korrigiert:

$$p_{\text{nachOx}} = (\text{Porenraster}(1 + (\Delta l/100)) - d_{\text{nachOx}})^2 / (\text{Porenraster}(1 + (\Delta l/100)))^2 \quad (15)$$

3.3 Partox-Membranen als DNA-Mikroarray

3.3.1 Adaption der Partox-Membranen an kommerzielle Dosiersysteme

Mittels eines Diamantschneiders werden Proben der Partox-Membranen in der Größe von je 6,5 x 6,5 mm gebrochen und 1 Stunde bei 60 °C in einer alkalischen Tikopurlösung (3 Vol.%) gereinigt. In den ersten fünf Minuten der Reinigung werden die Partox-Membranen in der Reinigungslösung mit Ultraschall behandelt. Das alkalische Detergenz löst organische Substanzen und ätzt die SiO₂-Oberfläche der Partox-Membranen mit einer Ätzrate von 5 nm h⁻¹. Im Anschluss werden die Proben mit deionisiertem Wasser so lange gewaschen, bis alle Rückstände der Reinigungslösung entfernt sind.

Um kommerzielle Dosiersysteme für das Durchpumpen der unterschiedlichen Lösungen durch die makroporösen Membranen zu nutzen, werden die Partox-Membranen auf abgeschnittene Pipettenspitzen aufgeschmolzen. Die abgeschnittenen Pipettenspitzen werden vor dem Aufschmelzen der Partox-Membranen mit einer alkalischen Tickopurlösung (3 Vol.%) für 2 Stunden bei 60 °C im Wasserbad gereinigt und mit deionisiertem Wasser gewaschen und hinterher getrocknet. Anschließend werden die Partox-Membranen auf einer Heizplatte auf 220 °C erhitzt und die abgeschnittenen Pipettenspitzen auf die heißen Membranen gedrückt. Die entstandene Partox-Tips (Abbildung 10, abgeschnittene Spitze mit aufgeschmolzener Partox-Membran), werden anschließend silanisiert.



Abbildung 10: abgeschnittene Pipettenspitze mit aufgeschmolzener Partox-Membran (Partox-Tip).

3.3.2 Oberflächenfunktionalisierung

Die Oberfläche einer Partox-Membran wird mit einer 3-Glycidoxylpropyl-trimethoxysilan-Lösung (2,4 Vol.%) aktiviert. Die Epoxidgruppe des Linkermoleküls reagiert bei der Immobilisierung mit der 5'-Aminogruppe des modifizierten Festphasenoligonukleotids, wodurch die Probenmoleküle an die Oberfläche gebunden werden. Vor der Silanisierung wird der Partox-Tip 5 Minuten mit Methanol durchspült. Die Silanisierungslösung wird mit Hilfe eines elektrischen Pipettiersystems 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einer Frequenz von 0,10 Hz durch die Membran gepumpt. Danach wird 5 Minuten mit Methanol gespült. Der Partox-Tip wird anschließend für mindestens 12 Stunden bei 60 °C in einem Ofen aufbewahrt; die Wasserreste werden entfernt und die geringe Quervernetzung der Silanmoleküle auf der Oberfläche vervollständigt. Bis zum weiteren Gebrauch werden die silanisierten Partox-Tips in Stickstoff eingeschweißt bei 4 °C in der Dunkelheit gelagert.

3.3.3 Aufbringung von Nukleinsäuren auf den Partox-Tip

Das Aufbringen der Probenmoleküle auf die Partox-Membran erfolgt mit einem GMS Arrayer 417, Firma Affimetrix, welcher auf dem Ring & Pin-Verfahren basiert. Die Probenmoleküle werden in Spottingpuffer (Na/K-Phosphatpuffer, 150 mmol L⁻¹, pH= 8,1) gelöst ($c_{\text{Probe}} = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$) und bei Raumtemperatur und einer Luftfeuchtigkeit von 60-70 % gespottet.

Die hierbei eingesetzte Nadel mit einem Durchmesser von 300 μm muss 15-mal pro Spot auf die Partox-Membran abgesetzt werden, um ein komplette Füllung der Poren zu gewährleisten. Zur Vermeidung von Verschleppungen, werden Ring und Pin nach jedem Spottingvorgang jeweils 20 Sekunden in SDS-Lösung (0,2 Gew.%) und deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend in einem Luftstrom getrocknet.

Um die gespotteten Probenmoleküle an die silanisierte Oberfläche zu binden, wird der Partox-Tip über Nacht bei 50 °C inkubiert. Mit Hilfe eines elektrischen Pipettiersystems wird anschließend zehn Minuten deionisiertes Wasser mit einer Frequenz von 0,10 Hz durch die Membran gepumpt, um die ungebundenen Probenmoleküle und die Reste des Spottingpuffers zu entfernen.

3.3.4 Blocking, Hybridisierung und Waschen

Vor der Hybridisierungsreaktion erfolgt das Blocking, um unspezifische Bindungen der Targetmoleküle an der Oberfläche der Partox-Membran zu unterbinden. Hierfür wird die Partox-Membran 30 Minuten mit Blockinglösung bei 55 °C durchströmt und anschließend 10 Minuten mit destilliertem Wasser gespült (elektrisches Pipettiersystem, Frequenz von 0,10 Hz).

Für die Hybridisierung von Oligonukleotiden und cDNA-Molekülen wird eine Standard-Hybridisierungslösung verwendet (Tabelle 5); für die Bestimmung der Hybridisierungskinetik der cDNA-Moleküle wird die Hybridisierungslösung mit Formamid verwendet. Die Hybridisierungstemperatur wird durch die Zugabe des Formamids auf 43 °C reduziert, um die Verdunstung der Hybridisierungslösung zu senken. Nach Zugabe der Oligonukleotidlösung oder cDNA-Lösung zur entsprechenden Hybridisierungslösung wird der entstandene Hybridisierungsmix gemischt und zentrifugiert. Für die Hybridisierung von langen Oligonukleotiden (> 30 b) wird der Hybridisierungsmix fünf Minuten bei 95 °C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Die Hybridisierung der synthetischen Oligonukleotide erfolgt bei 42 °C für 30 Minuten mit Hilfe des elektrischen Pipettiersystems bei einer Frequenz von 0,1 Hz. Die Hybridisierung der cDNA-Moleküle erfolgt bei 50 °C für 1 Stunde mit Hilfe des elektrischen Pipettiersystems bei einer Frequenz von 0,1 Hz. Für die Bestimmung der Hybridisierungskinetik der cDNA-Moleküle erfolgt die Hybridisierung bei 43 °C. Um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes durch Lichteinstrahlung zu verhindern, wird der Hybridisierungsmix in dem 96-Well mit Aluminiumfolie abgedeckt.

Nach der Hybridisierung wird der Partox-Tip gewaschen, um nicht gebundene Targetmoleküle zu entfernen. Zunächst wird bei RT einmal 2 Minuten mit 2 x SSC und SDS (0,1 Gew.%), anschließend zweimal 1 Minute mit 0,2 x SSC und zum Schluss einmal 1 Minute mit 0,1 x SSC, mit Hilfe des elektrischen Pipettiersystems bei einer Frequenz von 0,10 Hz, gewaschen. Anschließend wird der Partox-Tip bei 40 °C getrocknet, bevor das Auslesen erfolgt.

3.3.5 Reverse Transkription

Für die Validierungsexperimente der Partox-Membranen werden als Targetmoleküle Antisense-Oligonukleotide mit 27 Basen (VBC) und exogene mRNA Spikes mit 500 Basen (Stratagene) verwendet.

Die Markierung der verwendeten exogenen mRNA-Moleküle erfolgt durch Einbau von mit Cyanin-Farbstoff markiertem Desoxycytosin (Cy3-dCTP) bei einer reversen Transkription. Hierfür wird das SuperScript™ Direct cDNA Labeling System (Invitrogen) verwendet. Um ein Primer-Annealing zu gewährleisten, werden 10 µl der umzuschreibenden RNA (0,4-2 µg mRNA) mit 2 µl Oligo(dT)-Primer versetzt und bei 70 °C im Thermoblock für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wird die Targetlösung für mindestens 1 Minute auf Eis gekühlt. Nach dem Mischen werden 18 µl des Reaktionsansatzes (Tabelle 7) zentrifugiert und zur Targetlösung gegeben, so dass jeweils ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 30 µl vorliegt. Die Lösungen werden erneut gemischt, zentrifugiert und für 3 Stunden bei 46 °C in einem Thermoblock inkubiert. Während der dreistündigen Inkubation erfolgt die Synthese des cDNA-Strangs.

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die Transkription.

Reagenz	Volumen [µl]	Endkonzentration
5 x First-Strand Puffer	6,0	1 x
0,1 mol L ⁻¹ DTT	3,0	0,01 mol L ⁻¹
dNTP Mix	2,0	
dCTP Cy3 (1 mmol L ⁻¹)	3,0	0,1 mmol L ⁻¹
RNase Out™ (40 Uµl ⁻¹)	1,0	40 U
SuperScript™ III RT (400 Uµl ⁻¹)	2,0	800 U
DEPC behandeltes Wasser	1,0	

Nach Abschluss der Reaktion wird die RNA des cDNA-RNA-Hybrids durch Zugabe von 15 µl Natronlauge (0,1 mol L⁻¹) bei 70 °C für 30 Minuten hydrolysiert. Die Lösung wird mit 15 µl Salzsäure (0,1 mol L⁻¹) neutralisiert.

Das Aufreinigungsverfahren der cDNA erfolgt mit Hilfe von Millipore-Säulen, Microcon YM-100. Nach dem Beladen der Säulen mit neutralisiertem Reaktionsmix erfolgt ein Zentrifugationsschritt von zwölf Minuten bei 500 x g, wobei das Eluat verworfen wird. Die Säule wird um 180 ° gedreht, auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt, und für weitere drei Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Das Eluat enthält die gereinigte und aufkonzentrierte cDNA.

3.4 Optische Charakterisierung von Partox-Membranen

3.4.1 Transmissionsmessung

Die Bestimmung der Transmission erfolgt mit Hilfe von Durchlichtaufnahmen. Für Durchlichtaufnahmen wird ein Lichtmikroskop (Leica DMX) mit CCD-Kamera (ORCA ER, Hamamatsu) mit geköhlerter Beleuchtung benutzt. Hierfür durchläuft ein Lichtstrahl einer Halogenlampe eine Kollektorlinse, eine Leuchtfeldblende, eine Aperturblende und eine Kondensorlinse (numerische Apertur = 0,9) und bestrahlt die Probe von der Unterseite. Das transmittierte Licht wird durch ein Objektiv aufgesammelt und mit der CCD-Kamera erfasst (Abbildung 11).

Für die Berechnung der Transmission wird der Quotient aus dem mittleren Grauwert des transmittiertem Lichts (I) zu dem mittleren Grauwert des Lichts ohne Probe im Strahlengang (I_0) gebildet. Sowohl von I als auch von I_0 wird das Dunkelrauschen der Kamera subtrahiert.

Zur Bestimmung des mittleren Grauwertbereichs werden der zu analysierende Bereich des Bildes und der entsprechende Bereich auf dem Bild ohne Probe markiert und mit der Kamerasoftware ausgewertet. Der detektierbare Grauwertbereich erstreckt sich von 0 bis 65526 Grauwerten, wobei das Dunkelrauschen der CCD-Kamera 3200 Grauwerte beträgt.

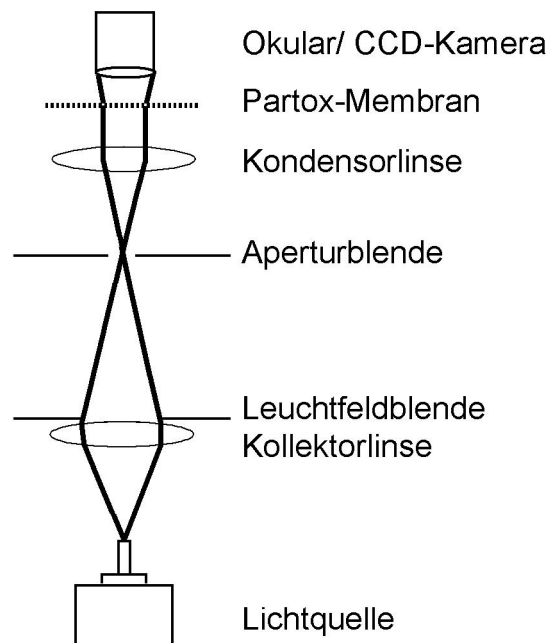


Abbildung 11: schematischer Aufbau des verwendeten Lichtmikroskops für Transmissionsmessungen mit Koehlerscher Beleuchtung.

3.4.2 Fluoreszenzmessung

Das Auslesen von Fluoreszenzsignalen erfolgt ebenfalls mit einem Lichtmikroskop (Leica, DMX) und einer CCD-Kamera (ORCA ER, Hamamatsu). Aus dem weißen Licht einer Quecksilber-Hochdruckdampfampe (100 W) wird durch einen Anregungsfilter (HQ 545/30, AF-Analysentechnik, Tübingen) die für die Anregung des Fluorochroms (Cy3) geeignete Wellenlänge herausgefiltert und mittels eines Strahlenteilers (Q570 LP, AF-Analysentechnik, Tübingen) und eines Objektivs auf das Präparat fokussiert (Abbildung 12). Das langwelligere Fluoreszenzlicht passiert den Strahlenteiler und den Sperrfilter (HQ 610/75, AF-Analysentechnik, Tübingen) und gelangt über das Okular zum Auge oder wird mit Hilfe der CCD-Kamera erfasst.

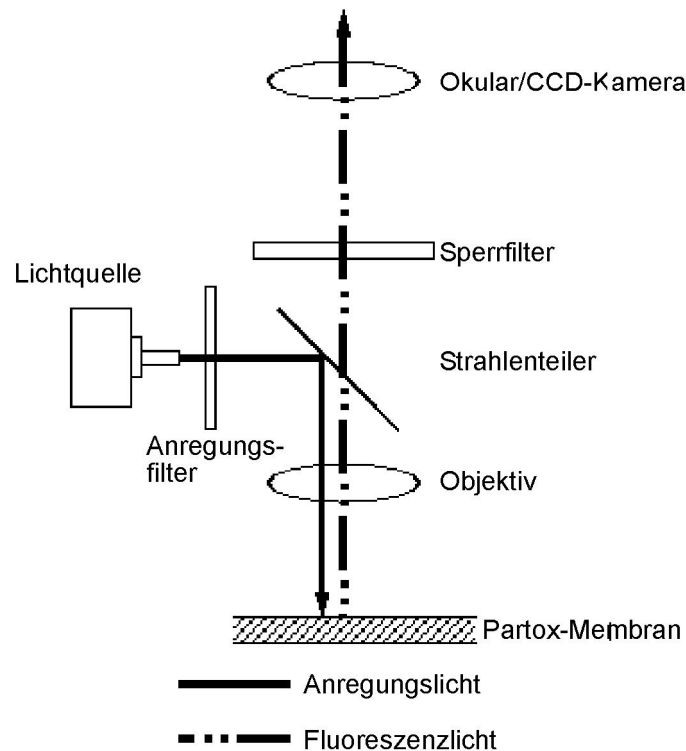


Abbildung 12: schematischer Aufbau des verwendeten Lichtmikroskops für Fluoreszenzmessungen.

Für die Auswertung des Fluoreszenzsignals wird um den gewünschten Spot im lichtmikroskopischen Fluoreszenzbild ein Kreis gezogen, welcher den auszuwertenden Bereich abgrenzt (Abbildung 13 links). Zur Ermittlung des Hintergrundsignals werden mehrere Kreise gleicher Größe um den Spot herumgelegt (Abbildung 13 rechts). Hierbei werden Verunreinigungen wie Partikel auf der Oberfläche, welche zu einer unerwünschten

Signalerhöhung führen, sowohl bei der Signal- als auch Hintergrundbestimmung nicht mit einbezogen. Die dunklen Kompartimentwände innerhalb der Kreise tragen bei der Auswertung zum Fluoreszenz- und Hintergrundsignal bei. Das Fluoreszenzsignal ergibt sich aus der Differenz des Grauwerts vom absoluten Signal und dem Mittelwert der Grauwerte der Hintergrundsignale.

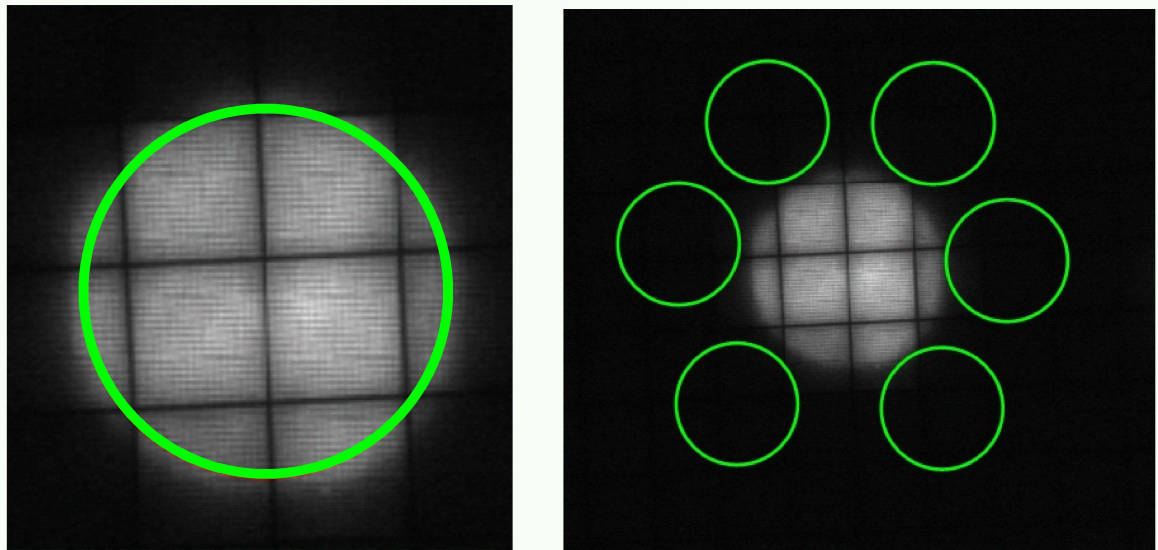


Abbildung 13: Auswertung eines Fluoreszenzsignals.

Links: Signalbestimmung; rechts: Hintergrundbestimmung.

Für die Auswertung einer Messreihe muss aufgrund des großen dynamischen Signalbereichs der Partox-Membranen gegenüber dem Messbereich der CCD-Kamera (ca. 3 Dekaden) die Bildaufnahme bei unterschiedlicher Belichtungszeit durchgeführt werden.

Hierfür werden die Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Belichtungszeiten unter Berücksichtigung des Dunkelrauschens der Kamera (3200 Grauwerte) auf eine normierte Belichtungszeit wie folgt umgerechnet:

$$S_2 = (S_1 - 3200)(t_2/t_1) + 3200 \quad (16)$$

t_1 : Belichtungszeit 1;

t_2 : normierte Belichtungszeit;

S_1 : Fluoreszenzsignal bei der Belichtungszeit 1;

S_2 : umgerechnetes Fluoreszenzsignal bei der normierten Belichtungszeit.

3.4.3 Selektive Adsorption von Proteinen

Um den ortsabhängigen Beitrag der Fluorophore an der Gesamtfluoreszenz zu bestimmen, werden fluoreszenzmarkierte Proteine zum einen auf die Stirnfläche der SiO₂-Porenwände und zum anderen an den SiO₂-Porenwänden im oberen Teil der Partox-Membran selektiv adsorbiert.

Selektive Adsorption von Proteinen an SiO₂-Porenwänden

Zur Adsorption von fluoreszenzmarkierten Proteinen an den SiO₂-Porenwänden im oberen Teil der Partox-Membran wird eine Seite der Membran mit einer Folie verschlossen. Hierfür wird die Partox-Membran auf ca. 40-50 °C erwärmt und auf eine Parafilm-Folie gedrückt. Die Collagen-TypIV-Lösung (Tabelle 5), welche Oregon-Grenn markierte Proteine enthält, wird mit Ethanol 1:2 vermischt. 1 µl der entstandenen Lösung wird auf die nicht verschlossene Stirnfläche der Partox-Membran pipettiert. Je nach gewünschter Eindringtiefe der Collagen-Lösung in die Poren der Partox-Membran wird die Collagen TypIV-Lösung nach 30 Sekunden - 1 Minute mit einem saugfähigen Tuch von der Partox-Membran entfernt. Nach dem Abziehen der Folie von der Unterseite der Partox-Membran wird das Fluoreszenzsignal auf der Ober- und Unterseite gemessen (Anregungsfilter HQ 480/40, Sperrfilter HQ 610/75, AF-Analysentechnik, Tübingen).

Adsorption von Proteinen auf der Stirnfläche von Partox-Membranen

Das Microcontactprinting (µCP) zählt zu den Verfahren der Soft-Lithographie (Whitesides et al., 1998) und ermöglicht die selektive Adsorption von fluoreszenzmarkierten Proteinen auf die Stirnfläche der Partox-Membran mit Hilfe eines elastischen Stempels. Für die Herstellung des elastischen Polydimethylsiloxan-Stempels (PDMS-Stempel) wird das Silikon-Elastomer Sylgard 184 verwendet. Das Silikon Elastomer wird 10:1 mit dem Härter vermischt und nach dem Ausgießen in die entsprechenden Formen bei 80 °C über Nacht ausgehärtet. Der entstandene PDMS-Stempel wird anschließend in Collagen-TypIV-Lösung getaucht. Der benetzte PDMS-Stempel wird anschließend mit N₂ getrocknet und auf die Stirnfläche der Partox-Membran gedrückt. An den Kontaktstellen zwischen Elastomer und Stirnfläche der Partox-Membran erfolgt ein Übertrag der fluoreszenzmarkierten Proteine. Nach Abziehen des Stempels wird das Fluoreszenzsignal auf der bedruckten Seite und auf der Rückseite der Partox-Membran gemessen (Anregungsfilter HQ 480/40, Sperrfilter HQ 610/75, AF-Analysentechnik, Tübingen).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Herstellung von Partox-Membranen

4.1.1 Elektrochemisches Ätzen

Die Parameter Ätztiefe, Durchmesser, Spannung, Temperatur, HF-Konzentration und Shape correction werden so angepasst, dass homogene 400 - 450 μm tiefe Poren mit gleich bleibender Wandstärke erzeugt werden. Der Parameter Shape correction gleicht den Ätzstrom durch die Beleuchtungsstärke der Lampen mit zunehmender Porentiefe den Modelabweichungen linear an.

Die angewandten Parameter für das elektrochemische Ätzen in Abhängigkeit des verwendeten Porenrasters sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Parameter des elektrochemischen Ätzens für unterschiedliche Poren raster.

Parameter	Poren raster [μm]		
	3,0	5,0	11,3
HF-Konzentration [%]	3	4	6
Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	10	9	10
Spannung [V]	2,8	3,4	2,2
Shape correction	0,25	0,32	0,23
Eingestellte Tiefe* [μm]	550	560	490
Eingestellter Porendurchmesser* [μm]	1,6	2,55	4,6
Ätzdauer [h]	39	28	13

*Modellparameter

Die experimentell ermittelten Porendurchmesser und Porentiefen in Abhängigkeit des Porenrasters sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Abmessung der Porendurchmesser und Porentiefe nach dem elektrochemischen Ätzen bei unterschiedlichen Porenrastern.

Parameter	Poren raster [μm]		
	3,0	5,0	11,3
Porendurchmesser [μm]	2,0	2,9	5,0
Tiefe [μm]	430	450	400

Die Abweichung des Porendurchmessers der unterschiedlichen Porenraaster beträgt über die gesamte Porentiefe $\pm 0,1 \mu\text{m}$. Die Abweichung der Porentiefe der unterschiedlichen Porenraaster beträgt über den gesamten Wafer $\pm 5 \mu\text{m}$.

4.1.2 Rückseitiges Öffnen der Poren

Im Anschluss an das elektrochemische Ätzen werden die entstandenen Sacklöcher durch ein einseitiges Rückätzen der Waferrückseite geöffnet, um durchgehende Poren zu erhalten. Eine Schutzschicht auf der Vorderseite des Wafers und der Innenseite der Poren schützt die Siliziumoberfläche vor der alkalischen Ätzlösung, welche für das rückseitige Öffnen der Poren verwendet wird. Abhängig von der verwendeten Schutzschicht steht ein begrenztes Zeitfenster zum Rückätzen zur Verfügung, bevor die Ätzlösung die Vorderseite des Wafers und die Innenseite der Poren angreift. Ist die Schutzschicht aufgelöst bevor alle Sacklöcher geöffnet sind, wird die Struktur von der Ätzlösung lokal angegriffen und zerstört.

Experimente, bei denen nur Siliziumdioxid oder Siliziumnitrid als Schutzschicht verwendet wurde, führten zu einer Verbiegung des Wafers. In einer Mischschutzschicht sollte dagegen die entstehende Druckspannung der thermisch aufgewachsenen Oxidschicht durch die Zugspannung der abgeschiedenen Siliziumnitridschicht kompensiert werden.

Als geeignet erwies sich eine Schutzschicht aus 60 nm Siliziumdioxid und 20 nm Siliziumnitrid, um die Vorderseite des Wafers und die Innenseite der Poren vor Eindringen der Ätzlösung zu schützen, bis alle Sacklöcher geöffnet sind. Eine Verbiegung des Wafers kann dadurch vermieden werden.

4.1.3 Aufweitung der Poren

Das Aufweiten der Poren überführt die runden Poren in quadratische Poren und ermöglicht, eine gewünschte Porenwanddicke homogen über die gesamte Porenlänge zu ätzen.

Während des Aufweitens der Poren muss die Ätzlösung durch die Poren gepumpt werden, um eine Verarmung an reaktiven Spezies in den Mikrokanälen zu verhindern. Hierfür wird eine Durchflusszelle entwickelt, die es ermöglicht, einen Wafer, dessen Poren rückseitig geöffnet wurden, sowohl von der Oberseite als auch von der Unterseite unterschiedlich lange mit der Ätzlösung zu durchströmen.

Nach dem rückseitigen Öffnen der Poren weisen die Porenöffnungen auf der Waferoberseite (photolithographisch strukturierte Seite) einen größeren Durchmesser auf als auf der Waferunterseite. Bei einem Umwälzfluss von $1,0 \text{ l min}^{-1}$ müssen die Poren von der Oberseite des Wafers zur Unterseite um den Faktor 1,5 länger durchströmt werden, um homogene Porenwandstärken von der Waferoberseite bis zur Waferunterseite zu erzeugen.

Eine mehrfache Änderung der Durchflussrichtung der Ätzlösung während des Ätzprozesses trägt zu einer Verbesserung der Gleichmäßigkeit der Porenwandstärke über die gesamte Porenlänge bei. Ein Durchströmen der Partox-Membran mit Ätzlösung von der Oberseite zur Unterseite von 5 Minuten, gefolgt von einer Änderung der Strömungsrichtung und anschließendem Durchströmen der Partox-Membran mit Ätzlösung von der Unterseite zur Oberseite von 3 Minuten und 15 Sekunden erwies sich als geeignet.

Ein Problem beim anisotropen Ätzen mit KOH-Lösung stellt die Bildung von Ätzpyramiden dar (Abbildung 14 A). Mit zunehmender Einwirkung der Ätzlösung werden die (100) orientierte Oberflächen immer rauer, da es vermehrt zur Bildung von Ätzpyramiden kommt (Hirokawa et al., 1974; Tan et al., 1996; Zhang, 2001). Nach der anschließenden thermischen Oxidation bleiben die Ätzpyramiden erhalten. Die Ätzpyramiden erhöhen die Rauhmigkeit der Oberfläche und wirken aufgrund ihrer Größe als Streuzentren.

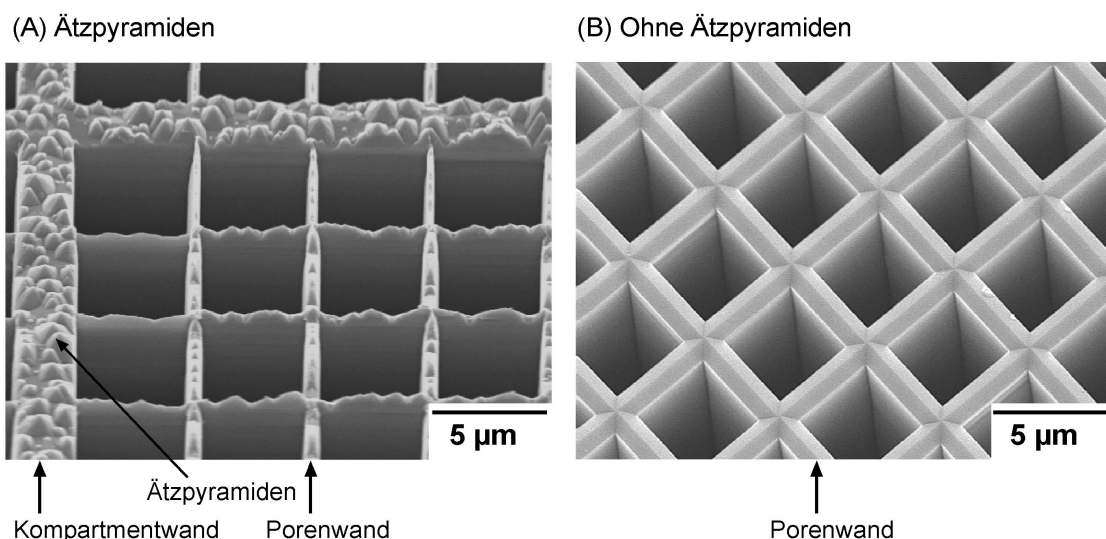


Abbildung 14: rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der makroporösen Siliziummembran mit Ätzpyramiden (A) und ohne Ätzpyramiden (B).

A: $27 \text{ }^\circ\text{C}$ ohne H_2O_2 -Lösung; B: $14 \text{ }^\circ\text{C}$ mit H_2O_2 -Lösung (2 ml h^{-1}).

Die Bildung der Ätzpyramiden soll durch die Zugabe von Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid zur Ätzlösung verhindert werden können (Zhang, 2001). Das Begasen der Ätzlösung mit Sauerstoff bei einer Temperatur der Ätzlösung von 29 °C zeigt keine Reduzierung der Ätzpyramiden.

In Abbildung 15 werden die Ergebnisse der Experimentreihen (18 Reihen) zum Einfluss der Prozessparameter (Ätztemperatur; Zugabe von Wasserstoffperoxid-Lösung) auf die Porengeometrie und Oberfläche der Partox-Membranen nach dreistündigem anisotropen Ätzen in einer Durchflusszelle graphisch dargestellt. Bei Zugabe von 2-10 ml H_2O_2 -Lösung pro Stunde in die Ätzlösung in einem Temperaturbereich der Ätzlösung von 12-21 °C zeigt die Oberfläche der makroporösen Membran keine Ätzpyramiden. Dieser in Abbildung 15 mit E gekennzeichnete Bereich eignet sich für die Herstellung von Partox-Membranen, da in diesem Bereich sich während des Ätzprozesses quadratische Poren, deren Oberfläche frei von Ätzpyramiden und sonstigen Defektstellen sind (Abbildung 14 B), bilden.

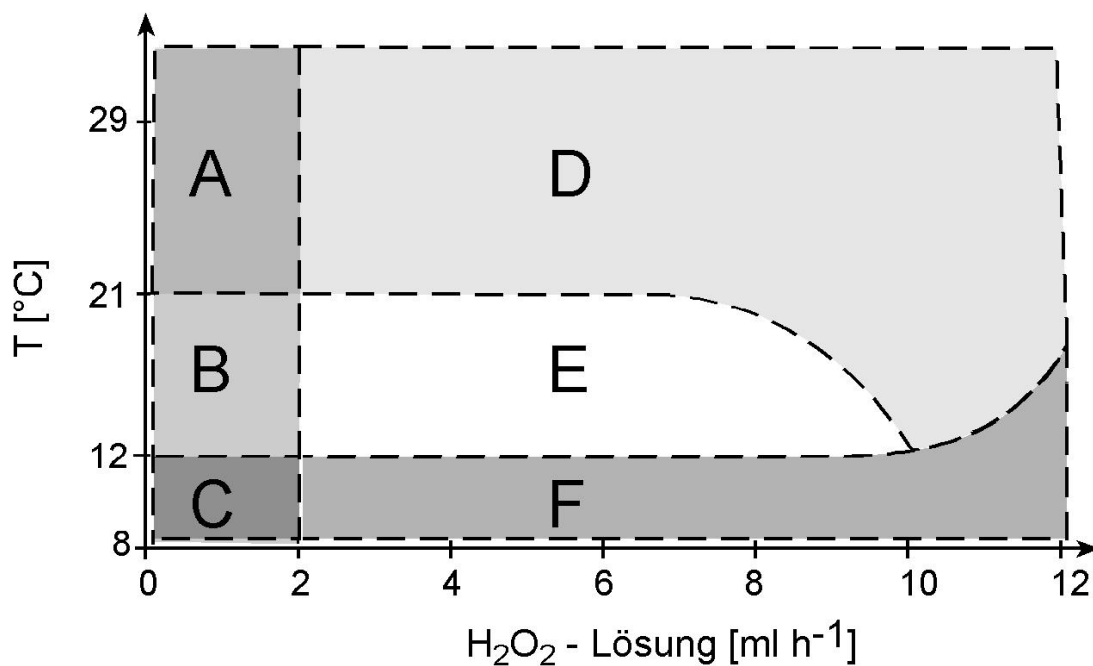


Abbildung 15: Abhängigkeit der Porengeometrie und der Membranoberfläche von der Ätztemperatur und der Zugabe von Wasserstoffperoxid-Lösung in die Ätzlösung.

Bereich A: quadratische Poren, Ätzpyramiden und Defektstellen; Bereich B: quadratische Poren, Ätzpyramiden, keine Defektstellen; Bereich C: achteckige Poren, Ätzpyramiden, keine Defektstellen; Bereich D: quadratische Poren, keine Ätzpyramiden, Defektstellen; Bereich E: quadratische Poren, keine Ätzpyramiden, keine Defektstellen; Bereich F: achteckige Poren, keine Ätzpyramiden, keine Defektstellen; Ätzdauer: 3h; Zahl der Experimente: 18.

Bei einer Zugabe von H_2O_2 -Lösung von weniger als 2 ml h^{-1} wird die Bildung von Ätzpyramiden beobachtet (Abbildung 15, Bereiche A-C).

Liegt die Zugabe von H_2O_2 -Lösung über 2 ml h^{-1} und die Ätztemperatur oberhalb von $21 \text{ }^\circ\text{C}$ (Abbildung 15, Bereich D) werden quadratische Poren und eine glatte Siliziumoberfläche erzeugt. Jedoch entstehen in diesem Bereich Defektstellen. Die Defektstellen weisen Ätzpyramiden oder Ablagerungen von Ätzprodukten auf und die Ätzrate der anisotropen Ätzlösung ist innerhalb der Defektstellen geringer. Mit steigender Temperatur der Ätzlösung und Zugabe von Wasserstoffperoxid wird die Ätzrate erhöht. Durch die erhöhte Ätzrate der anisotropen Ätzlösung steigt die Gasentwicklung während des Ätzprozesses. Die vermehrten Gasblasen bleiben für eine längere Zeit am Wafer haften und maskieren die Oberfläche. Folglich kann keine frische Ätzlösung an der maskierten Stelle auf die Oberfläche einwirken und die entstehenden Ätzprodukte reichern sich an.

Die Bildung der Defektstellen wird stark reduziert, wenn die Temperatur der Ätzlösung unterhalb von $21 \text{ }^\circ\text{C}$ liegt, da hier die Ätzrate und damit die Gasentwicklung vermindert wird.

Im Temperaturbereich zwischen $8 \text{ }^\circ\text{C}$ und $12 \text{ }^\circ\text{C}$ (Abbildung 15, Bereiche C und F) verändert sich die Porengeometrie von quadratisch zu achteckig. Der achteckige Porenquerschnitt wird von $\{100\}$ und $\{110\}$ Flächen begrenzt, wobei die $\{110\}$ Flächen dominieren (Abbildung 16). Wird mehr als 10 ml h^{-1} an H_2O_2 zur Lösung gegeben, entstehen zusätzlich zu den achteckigen Poren Defektstellen.

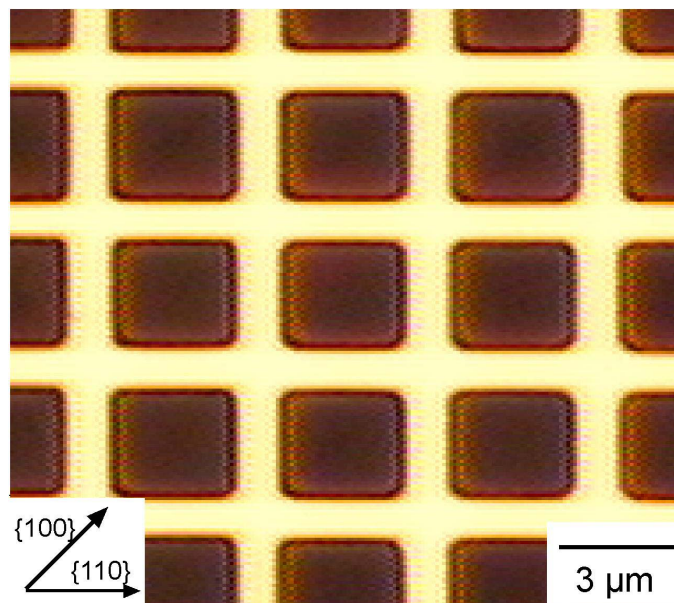


Abbildung 16: lichtmikroskopische Aufnahme von achteckigen Poren.

Die Poren sind an der $\{110\}$ Fläche und geringfügig an der $\{100\}$ Fläche facettiert.

Substrate mit einem Porenraster von 3,0 und 5,0 μm werden bei 14 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ mit Aufweitung unter Zugabe von 2 ml h^{-1} H_2O_2 -Lösung (50 Vol.% H_2O_2 und 50 Vol.% 2-Propanol) solange durchströmt, bis die entsprechende Porenwanddicke erreicht ist. Die anisotrope Ätzlösung zeigt bei 14 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ eine Ätzrate von ca. $0,13 \mu\text{m h}^{-1}$. Eine runde Pore mit einem Durchmesser von $2,9 \mu\text{m}$ muss zum Beispiel 3,5 Stunden in der Durchflusszelle durchströmt werden, um eine $1,2 \mu\text{m}$ breite Porenwand in einem $5 \mu\text{m}$ Porenraster zu ergeben.

Zur Erhöhung der Ätzrate findet die Porenaufweitung des Substrats mit einem Porenraster von $11,3 \mu\text{m}$ bei $27 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und unter Zugabe von 2 ml h^{-1} H_2O_2 -Lösung statt. Die anisotrope Ätzlösung zeigt bei $27 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ eine Ätzrate von ca. $0,29 \mu\text{m h}^{-1}$. Eine im Durchmesser $5 \mu\text{m}$ runde Pore muss zum Beispiel 11 Stunden durchströmt werden, um eine $1,2 \mu\text{m}$ breite Porenwand in einem $11,3 \mu\text{m}$ Porenraster zu ergeben. Bei Ätzzeiten größer 5 Stunden bilden sich bei Temperaturen der Ätzlösung von $27 \text{ }^{\circ}\text{C}$ nur geringfügige Defektstellen und Ätzpyramiden auf der Oberfläche der Partox-Membran. Eine Erhöhung der Ätzrate und somit eine Verkürzung des Ätzprozesses ist zu bevorzugen, wenn viel Silizium innerhalb der Porenwände abgetragen werden muss.

Die Untergrenze der Porenwanddicke nach dem Aufweiten der Poren beträgt ca. $0,4 \mu\text{m}$. Ein Unterschreiten dieser Untergrenze ist aufgrund der mechanischen Stabilität der Porenwände innerhalb eines Kompartments nicht möglich. Das Durchpumpen der anisotropen Ätzlösung durch die poröse Siliziummembran führt zu einem Herausbrechen der dünnen Porenwände aus dem Gitterverband.

Abbildung 17 zeigt REM-Aufnahmen der makroporösen Siliziummembran nach der Porenaufweitung. Die Oberfläche und die Seitenwände der makroporösen Membran zeigen nach der Porenaufweitung mit der anisotropen Ätzlösung auch unter 5 000-facher Vergrößerung keine Rauigkeiten. Abbildung 17 B zeigt die Seitenansicht einer Porenwand nach dem Aufweiten der Poren mit der anisotropen Ätzlösung. Die Spitze der Stirnfläche der Porenwand bildet einen Winkel (α) von ca. 32° zu der (100)-Ebene. Der Winkel entspricht keiner Kristallebene, die typischerweise bei anisotropen Ätzverfahren auftreten. Der Winkel ist etwas kleiner als der Winkel der (211)-Ebene zur der (100)-Ebene ($35,2^{\circ}$).

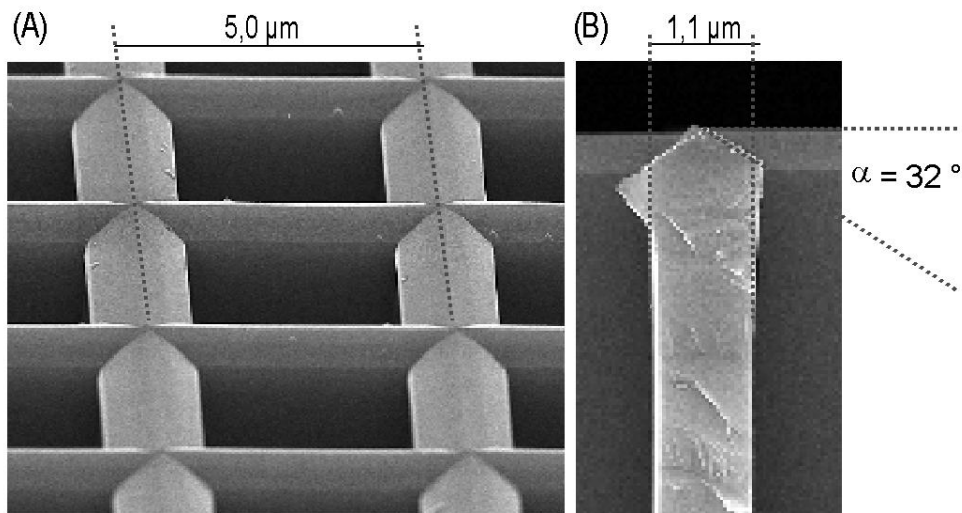


Abbildung 17: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der makroporösen Siliziummembran nach der Aufweitung der Poren mit anisotroper Ätzlösung.

A: 5000-fache Vergrößerung der Stirnflächen der Porenwände; B: 20 000-fache Vergrößerung der Seitenansicht einer Porenwand.

4.1.4 Partielle thermische Oxidation

Die Herstellung von Partox-Membranen wird mit der partiellen thermischen Oxidation der makroporösen Siliziummembran abgeschlossen. Während der feuchten Oxidation bei 1050 °C werden die Porenwände innerhalb eines Kompartments vollständig in SiO₂ umgewandelt. Die dickeren Kompartimentwände werden nur teilweise in SiO₂ umgewandelt, so dass noch ein durchgehender Kern aus Silizium zurück bleibt.

4.1.4.1 Charakterisierung des Oxidationsgrades

Porenwände innerhalb eines Kompartments mit einer Breite von 1,1 µm benötigen ca. 10 Stunden zur vollständigen Oxidation. Die Kreuzungen der Porenwände sowie die Kompartimentwände enthalten noch nach ca. 10 Stunden Oxidation Restsilizium. Das Restsilizium in den Kreuzungen der Porenwände benötigt noch weitere 8 Stunden für die vollständige Überführung in SiO₂. Die längere Oxidationszeit, die zur vollständigen Oxidation der Kreuzungsbereiche gegenüber den Porenwänden benötigt wird, hat zwei Gründe. Erstens, die Oxidationsrate ist in den Eckbereichen aufgrund der aufkommenden Druckspannung und der dadurch verminderten Diffusion der H₂O-Moleküle niedriger als an ebenen Flächen (Marcus et al., 1982; Sokolov et al., 1987). Zweitens, das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen ist in den Eckbereichen ungünstiger als im Vergleich zu den ebenen Flächen der Porenwände. Die Angriffsfläche der oxidierenden Spezies wird in den

Eckbereichen verringert. Sind die Kreuzungsbereiche der Porenwände vollständig oxidiert, wird die Membran als partiell oxidiert bezeichnet und die thermische Oxidation der Partox-Membran ist abgeschlossen. Eine weitere Oxidation der Membran führt zu einer Verringerung des Restsiliziums in den Kompartimentwänden bis die Membran vollständig in SiO_2 überführt ist.

Der Nachweis, dass die Porenwände und Kreuzungen innerhalb eines Kompartments vollständig oxidiert sind, erfolgt mit Hilfe einer lichtmikroskopischen Durchlichtaufnahme (Abbildung 18). Die Poren der Partox-Membran werden mit einer an dem Brechungsindex der SiO_2 -Porenwände ($n_{\text{SiO}_2}=1,46$) angepassten Lösung (Polyethylenglykol 200/300) gefüllt. In einer lichtmikroskopischen Durchlichtaufnahme ist aufgrund des gleichen Brechungsindex zwischen den gefüllten Poren und den SiO_2 -Porenwänden nahezu kein Kontrast mehr sichtbar. Weisen die Kreuzungsbereiche der SiO_2 -Porenwände noch Silizium auf, wird das Silizium aufgrund des unterschiedlichen Brechungsindex ($n_{\text{Si}}=3,99$) und der Absorption des Lichts als schwarzer Punkt erkennbar. Kleinste Abweichungen des Brechungsindex zwischen Polyethylenglykollösung (PEG) und der SiO_2 -Porenwände haben zur Folge, dass ein Restkontrast zwischen Poren und SiO_2 -Porenwände erhalten bleibt.

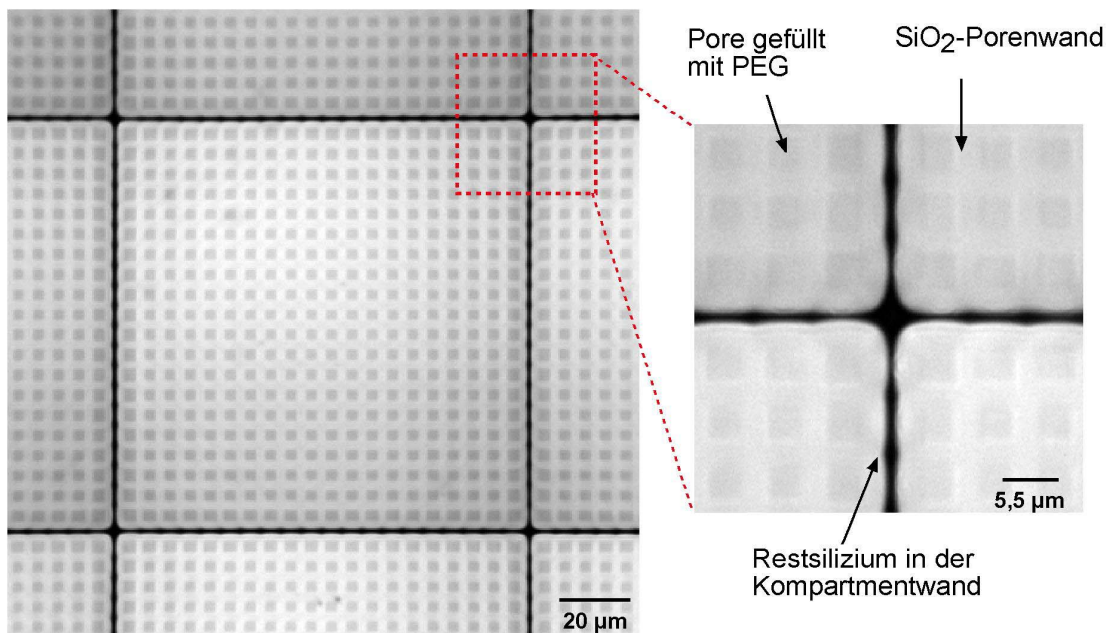


Abbildung 18: lichtmikroskopische Durchlichtaufnahme einer partiell oxidierten Probe deren Poren mit PEG-Lösung gefüllt sind.

Probe: Anzahl der Poren: 20×20 ; Porenraster: $5 \mu\text{m}$; Kompartimentwandbreite: 1,5-faches des Porenrasters; zusammenhängende Kompartments.

Restsilizium in der Kompartimentwand erscheint schwarz. Kreuzungsbereiche der SiO_2 -Porenwände innerhalb des Kompartments enthalten kein Silizium.

4.1.4.2 Oxidationszeiten

Um die Abhängigkeit der Oxidationszeit von den Porenwanddicken für partiell oxidierte Proben zu ermitteln, werden fünf Proben mit unterschiedlicher Porenwanddicke hergestellt und bei 1050 °C oxidiert (Tabelle 10).

Tabelle 10: Oxidationszeiten und Abmessung der Kompartimentwände, Porenwände und des Restsiliziums in den Kompartimentwänden von fünf unterschiedlich geätzten Proben.

Probe	Kompartimentwandbreite [μm]		Porenwanddicke [μm]		Restsilizium in der Kompartimentwand [μm]	Oxidationszeit (t_{partox}) [h]
	Vor der Oxidation	Nach der Oxidation	Vor der Oxidation	Nach der Oxidation		
1	3,5	6,3	1,6	3,4	0,5	26
2	3,3	5,8	1,3	2,6	0,4	22
3	3,1	5,5	1,2	2,4	0,8	18
4	3,0	5,3	1,0	2,1	0,9	15
5	2,9	5,0	0,9	2,00	1,0	14

Probe: Anzahl der Poren: 20x20; Porenraster: 5 μm; Kompartimentwandbreite: 1,5-faches des Porenrasters; zusammenhängende Kompartments.

Zur Herstellung von Porenwanddicken zwischen 1,6 und 0,9 μm (vor der Oxidation) müssen die elektrochemisch geätzten Proben 1,5 bis 4,5 Stunden in der Durchflusszelle anisotrop geätzt werden. Die Breite der Kompartimentwand ergibt sich durch das Maskendesign und die entsprechende Ätzzeit.

Abbildung 19 zeigt den linearen Zusammenhang zwischen der benötigten Oxidationszeit der partiell oxidierten Proben und der Porenwanddicke. Ein linearer Zusammenhang zwischen der benötigten Oxidationszeit für die Herstellung der Partox-Membran (t_{partox} [h]) und der Porenwanddicke vor der Oxidation (d [μm]) wurde empirisch gefunden und kann wie folgt beschrieben werden:

$$t_{\text{partox}} = 16,1 \cdot d \quad (17)$$

Makroporöse Siliziummembranen mit Porenwanddicken zwischen 0,8 und 1,6 μm können bei 1050 °C nach 14 bis 26 Stunden in einer feuchten thermischen Oxidation partiell oxidiert werden (Tabelle 10).

In der Oxidationskinetik von Deal und Grove ist die Oxiddicke proportional zur Quadratwurzel der Oxidationszeit (Deal et al., 1965). Bei kurzen Oxidationszeiten wird demzufolge ein parabolischer Kurvenverlauf beobachtet. Bei Oxidationszeiten von 14 Stunden und größer befindet sich die Oxidationskinetik jedoch in einem Bereich des Quadratwurzelgesetzes, der sich linear annähern lässt.

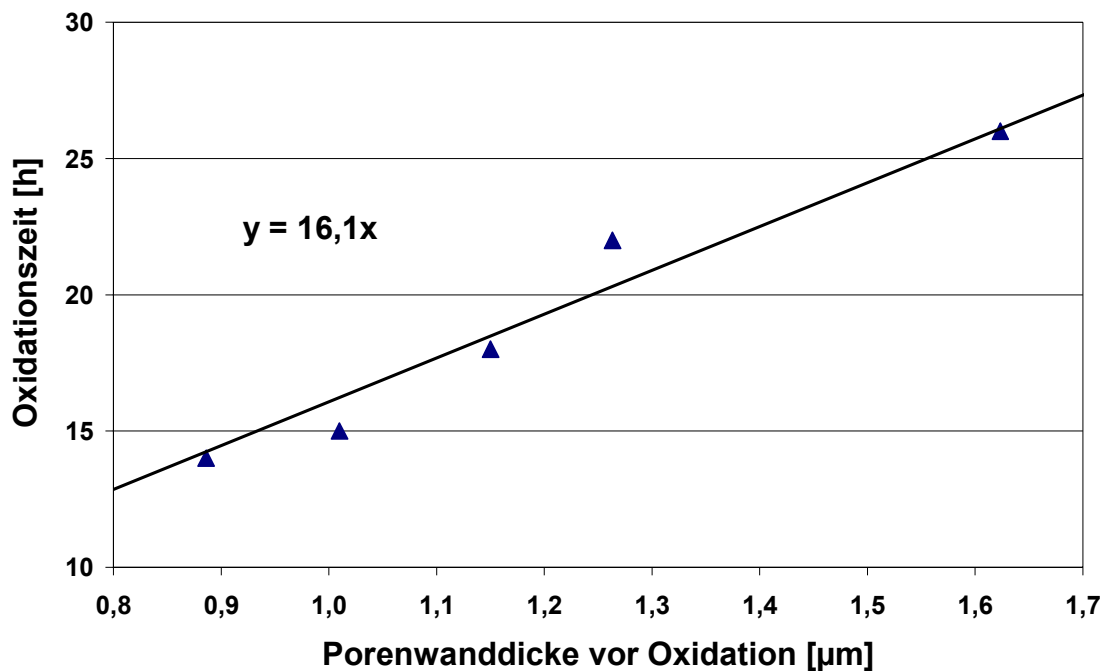


Abbildung 19: Abhängigkeit der benötigten Oxidationszeit von der Porenwanddicke vor der Oxidation für die Herstellung von Partox-Membranen.

Probe: Anzahl der Poren: 20x20; Porenraster: 5 µm; Kompartimentwandbreite: 1,5-faches des Porenrasters; zusammenhängende Kompartments.

Die Dicke des Restsiliziums in der Kompartimentwand wird durch die relative Breite der Kompartimentwand und durch die Oxidationszeit bei der thermischen Oxidation bestimmt. Die Dicke des Restsiliziums in den Kompartimentwänden sinkt mit zunehmender Oxidationszeit (Tabelle 10).

4.1.4.3 Volumenausdehnung

Während der thermischen Oxidation der makroporösen Siliziummembran kommt es unter Sauerstoffverbrauch und unter Abnahme der Siliziumschicht zum Aufwachsen einer SiO₂-Schicht. Die Umwandlung des Siliziums (Volumen eines Siliziumatoms = 20

Å³) zu Siliziumdioxid (Volumen eines Siliziumdioxidmoleküls = 45 Å³) ist mit einer Volumenzunahme um den Faktor 2-2,5 verbunden.

Die Volumenzunahme der aufwachsenden SiO₂-Schicht während der Oxidation äußert sich auf zwei verschiedene Arten in der makroporösen Membran. Erstens, die aufwachsende SiO₂-Schicht expandiert in die Pore und verringert somit die Porosität der Membran. Zweitens, die aufwachsende SiO₂-Schicht erzeugt einen Druck, welcher die gesamte Silizium/Siliziumdioxid-Membran dehnt. In Übereinstimmung mit beiden Möglichkeiten der Volumenzunahme werden eine Reduktion der Porosität und eine Längenausdehnung der Membran nach der thermischen Oxidation beobachtet (Abbildung 20).

Die Porenwände, welche vollständig in SiO₂ umgewandelt werden, verdoppeln ihre Dicke. Die Kompartimentwände mit einem Kern aus Silizium expandieren um einen Faktor von 1,8. Der Porendurchmesser schrumpft dabei, abhängig von den Dicken der Porenwände vor der Oxidation und der Längenausdehnung, zwischen 17 und 34 %.

Die Spitzen der Si-Porenwände runden sich während der thermischen Oxidation ab und bilden eine konisch zulaufende Spitze (Abbildung 20 B und D).

Typische Längenausdehnungen liegen im Bereich zwischen 4 und 15 % (Tabelle 11). Die Dicke der Membran verändert sich um maximal 2 %. Eine Längenausdehnung der Partox-Membran von 14 % bedeutet eine Flächenausdehnung von 30 %. Die Membran wächst somit während der Oxidation um fast ein Drittel ihrer Ausgangsfläche.

Ohne Berücksichtigung der Längenausdehnung würden theoretisch bei einer Verdoppelung der Porenwände während der thermischen Oxidation die Mikrokanäle der Proben mit einer Anfangsporosität von 25 % vollständig zuwachsen. Eine Anfangsporosität von 25 % ergibt sich bei 2,5 µm breiten Porenwänden vor der Oxidation in einem 5 µm Porenraster.

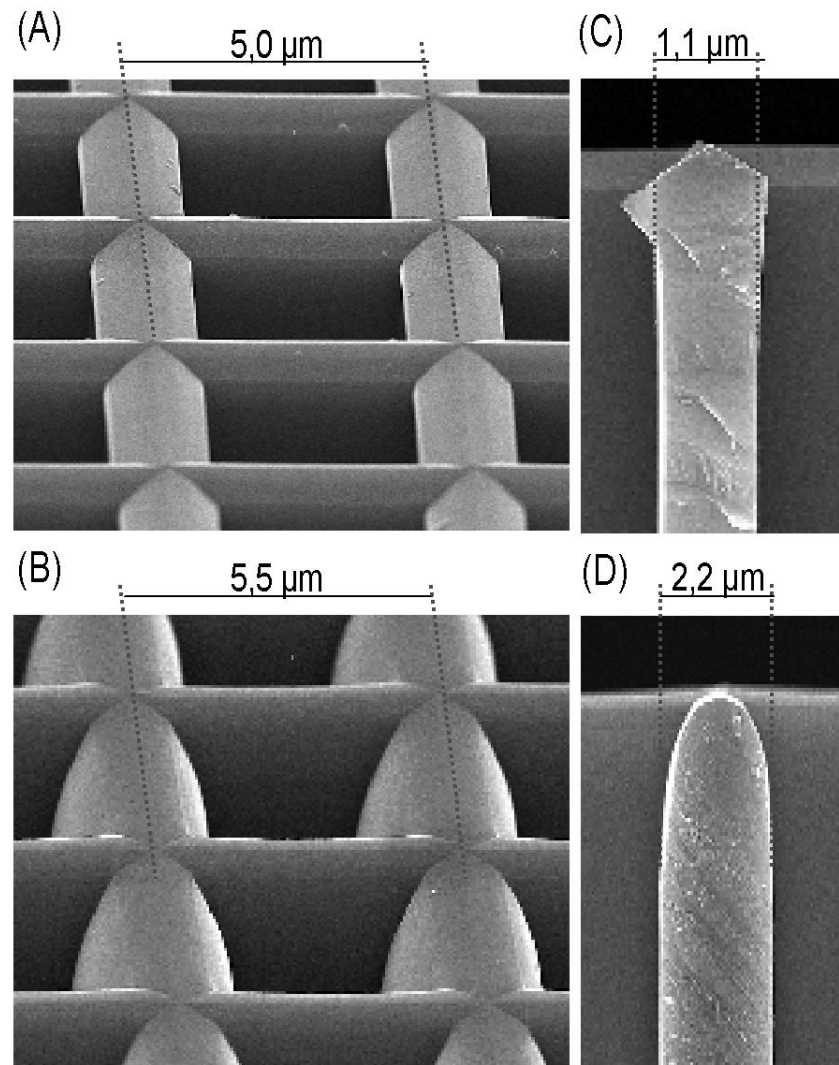


Abbildung 20: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der makroporösen Membran vor (A und C) und nach der thermischen Oxidation (B und D).

A und B: 5000-fache Vergrößerung der Stirnfläche der Porenwände vor und nach der Oxidation; C und D: 20 000-fache Vergrößerung der Seitenansicht einer Porenwand vor und nach der Oxidation; Porenwände verdoppeln ihre Dicke während der Oxidation; Porendurchmesser verkleinert sich; Spitzen der Si-Porenwände runden sich während der thermischen Oxidation ab.

Tabelle 11: Längenausdehnung unterschiedlicher Proben nach der thermischen Oxidation in Abhängigkeit der Porosität vor der Oxidation.

Anzahl der Poren im Kompartiment	Porenraster [μm]	Kompartimentwandbreite: x-faches des Porenrasters	Kompartiment-Typ	Porosität vor der Oxidation [%]	Längenausdehnung [%]
20x20	5	1,5	zusammenhängend	46	13,1
20x20	5	1,5	zusammenhängend	56	11,1
20x20	5	1,5	zusammenhängend	59	9,9
20x20	5	1,5	zusammenhängend	64	8,4
20x20	5	1,5	zusammenhängend	68	8,0
5x5	5	1,5	zusammenhängend	64	5,4
10x10	5	1,5	zusammenhängend	65	7,2
40x40	3	2,0	zusammenhängend	44	14,6
80x80	5	2,0	isoliert	58	11,2
24x24		1,8	isoliert	81	4,2

Der Fehler für die Bestimmung der Längenausdehnung wird durch die Fehlerfortpflanzung bei den Messungen mit $\pm 0,7$ % und für die Porosität mit $\pm 2,0$ % angenommen.

Drei strukturelle Merkmale der Partox-Membran bestimmen das Ausmaß der Längenausdehnung nach der Oxidation:

- Porosität der Siliziummembran vor der Oxidation;
- Kompartimentwandbreite;
- Anzahl der Poren in einem Kompartiment.

Abbildung 21 zeigt die Längenausdehnung unterschiedlicher Proben nach der thermischen Oxidation in Abhängigkeit der Porosität vor der Oxidation.

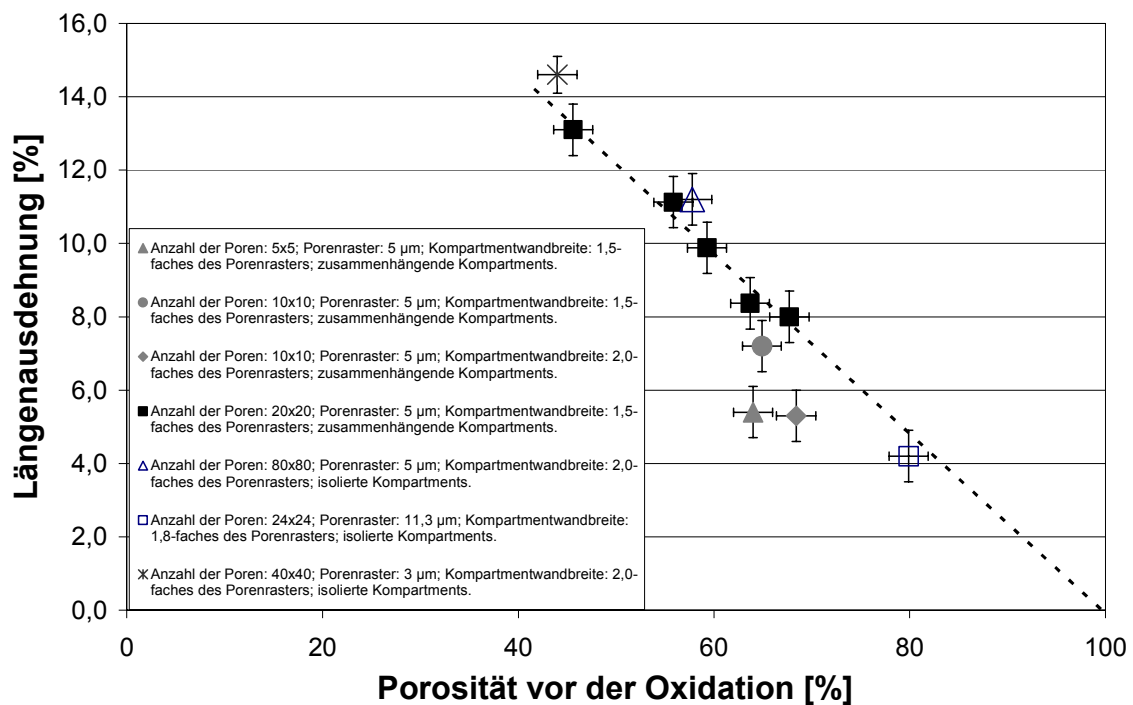


Abbildung 21: Längenausdehnung unterschiedlicher Proben nach der thermischen Oxidation in Abhängigkeit der Porosität vor der Oxidation.

Trendlinie (gestrichelte Linie) bezieht sich auf Proben mit 20x20 Poren, 5 µm Porenraster, einer Kompartimentwandbreite des 1,5-fachen des Porenrasters und zusammenhängenden Kompartments.

Es wird ein linearer Zusammenhang zwischen der Porosität vor der Oxidation und der Längenausdehnung bei sonst unveränderten Parametern (Kompartimentwandbreite, Porenraster, Anzahl der Poren und Art der Kompartments) in dem gemessenen Porositätsbereich beobachtet (schwarz-gefüllte Quadrate in Abbildung 21). Unter der Annahme, dass der lineare Zusammenhang zwischen der Porosität und der Längenausdehnung auch über die gemessenen Datenpunkte hinaus gültig ist, wird durch lineare Extrapolation eine laterale Ausdehnung von 0 % bei 100 % Porosität gefunden (Schnittpunkt der Trendlinie mit der x-Achse in Abbildung 21). Die Extrapolation liefert

ein physikalisch sinnvolles Ergebnis und bestätigt somit die Linearität zwischen der Porosität und der Längenausdehnung in der Partox-Membran für Porositäten über 40 % vor der Oxidation.

Die Breite der Kompartimentwände ist ein weiterer Faktor, welcher die Längenausdehnung der Partox-Membran beeinflusst. Eine Erhöhung der Kompartimentwandbreite von einer Kompartimentwandbreite des 1,5-fachen des Porenrasters (grauer Punkt in Abbildung 21; 10x10 Poren, 5 μm Porenraster und zusammenhängende Kompartments) auf einen Kompartimentwandbreite des 2,0-fachen des Porenrasters (graue Raute in Abbildung 21; 10x10 Poren, 5 μm Porenraster und zusammenhängende Kompartments) führt zu einer Erniedrigung der Längenausdehnung von 7,2 % auf 5,2 %. Die dünneren Kompartimentwände (1,5-faches des Porenrasters) können den Druck, hervorgerufen durch die aufwachsende SiO_2 -Schicht, weniger entgegenwirken als die dickeren Kompartimentwände (2,0-faches des Porenrasters) und werden deshalb stärker gedehnt.

Neben der Breite der Kompartimentwände hat auch die Anzahl der Poren innerhalb eines Kompartments Einfluss auf die Längenausdehnung. Die Längenausdehnung der Membran sinkt mit abnehmender Anzahl an Poren in einen Kompartiment, wenn sonst alle anderen Parameter konstant gehalten werden (Abbildung 21; graues Dreieck (5x5 Poren), grauer Punkt (10x10 Poren) und schwarzes Quadrat (20x20 Poren)). Mit steigender Anzahl an Poren in einem Kompartiment wird der durch die aufwachsende SiO_2 -Schicht generierte Druck erhöht und die Kompartments werden stärker gestreckt.

Der Datenpunkt des unausgefüllten Dreiecks in Abbildung 21 repräsentiert eine Probe mit 80x80 Poren, 5 μm Porenraster, Kompartimentwandbreite des 2-fachen des Porenrasters und isolierten Kompartments. Der sternförmige Datenpunkt in Abbildung 21 repräsentiert eine Probe mit 40x40 Poren, 3 μm Porenraster, Kompartimentwandbreite des 2,0-fachen des Porenrasters und zusammenhängenden Kompartments. Beide Proben weisen eine erhöhte Anzahl an Poren pro Kompartiment und eine dickere Kompartimentwand gegenüber vergleichbaren Proben auf der Trendlinie in Abbildung 21 auf (Anzahl der Poren: 20x20; Porenraster: 5 μm ; Kompartimentwandbreite: 1,5-faches des Porenrasters; zusammenhängende Kompartments). Beide Proben haben eine geringfügig höhere Längenausdehnung gegenüber vergleichbaren Proben auf der Trendlinie. Die erhöhte Anzahl an Poren innerhalb eines Kompartments führt zu einer erhöhten Längenausdehnung der Proben. Die dickere Kompartimentwand (2,0-faches des Porenrasters) reduziert die Längenausdehnung jedoch so weit, dass die resultierende

Längenausdehnung nur geringfügig höher ist als die Längenausdehnung der Proben mit 20x20 Poren und einer Kompartimentwandbreite des 1,5-fachen des Porenrasters.

Der Datenpunkt des unausgefüllten Vierecks in Abbildung 21 repräsentiert eine Probe mit 24x24 Poren, 11,3 μm Porenrastraster und einer Kompartimentwandbreite des 1,8-fachen des Porenrasters. Die Kompartimentwand mit einer absoluten Breite von 7,5 μm vor der Oxidation reduziert die Längenausdehnung gegenüber vergleichbaren Proben auf der Trendlinie in Abbildung 21.

4.1.4.4 Manifestation des mechanischen Stresses

Die thermische Oxidation ist ein kritischer Schritt in der Herstellung der Partox-Membranen. Die Volumenzunahme beim Übergang des kristallinen Siliziums in amorphes Siliziumdioxid und die unterschiedlichen thermischen Ausdehnungskoeffizienten von Silizium und Siliziumdioxid induzieren während der thermischen Oxidation und beim Abkühlen der Proben mechanischen Stress. Der induzierte mechanische Stress führt zu einer Verbiegung der Membran.

Verbiegungen der Membran treten auf, wenn es zu einer Abweichung in der Symmetrie kommt. Störungen der Symmetrie in der Membran entstehen durch unhomogene Porenwanddicken aufgrund keilförmiger Poren und an den Rändern der Membran (Abbildung 22). Bei Störungen der Symmetrie in der Membran kann der ungleichmäßig auftretende Expansionsdruck während der thermischen Oxidation nicht mehr ausgeglichen werden, und es kommt zu einer Verbiegung der Membran.

Der Grad der Verbiegung der Membran wird von der Längenausdehnung während der Oxidation und der Porenanordnung (zusammenhängende oder isolierte Kompartments) beeinflusst. Die Verbiegung der Partox-Membran kann durch Auflegen von Gewichten auf die Stirnflächen der Membran während der Oxidation verringert bzw. nahezu vollständig unterdrückt werden.

Um die Wellung der Partox-Membran nach der thermischen Oxidation zu charakterisieren, wird die Abweichung von der Planarität der Partox-Membran bestimmt. Hierfür werden die entsprechenden makroporösen Silizium-Membranen auf eine Größe von 5,8x5,8 mm gesägt. Nach dem Auflegen von Quarzplatten unterschiedlicher Gewichte auf die Stirnflächen der Membranen erfolgt die thermische Oxidation.

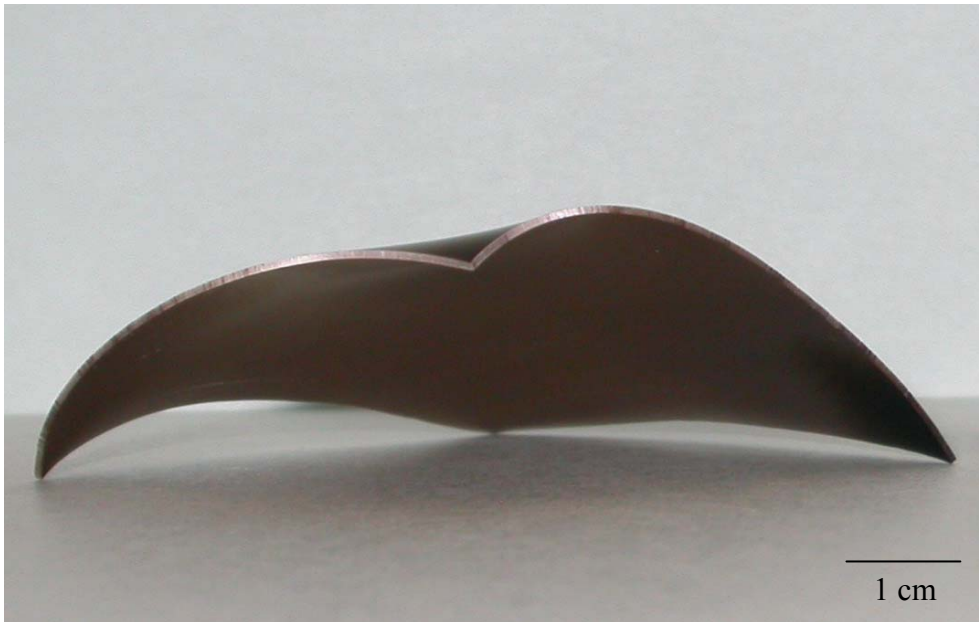


Abbildung 22: Einfluss von mechanischem Stress.

Probe weist keilförmige Poren auf und wurde ohne Auflegen von zusätzlichen Gewichten thermisch oxidiert.

Für die Auswertung der Planarität der unterschiedlichen Strukturen in Abhängigkeit des aufgelegten Gewichtes wird der Mittelpunkt der oxidierten Probe bei 10-facher Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop fokussiert. Davon ausgehend werden die Messpunkte entlang des Probenrandes (a-f) erneut fokussiert. Die Abweichung der Fokusebenen in μm bezogen auf den Bezugspunkt wird für jeden Messpunkt bestimmt (Abbildung 23). Für jede strukturell unterschiedliche Partox-Membran werden mindestens 6 Proben mit jeweils 6 Messpunkten vermessen und dann der Mittelwert gebildet.

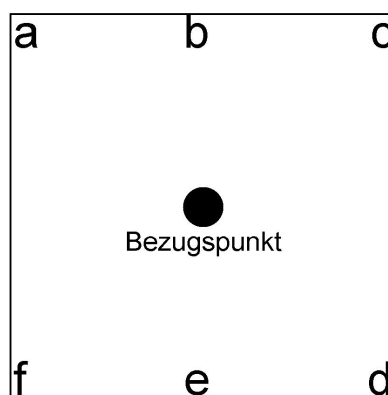


Abbildung 23: schematische Darstellung der Anordnung der sechs ausgewählten Messpunkte (a-f) auf den partiell oxidierten Proben.

Alle Partox-Membranen zeigen bei Erhöhung des Drucks eine geringere Wellung (Abbildung 24). Ein großer Sprung im Gewinn der Planarität ist bei einem Druck im Bereich von 0-1 kN m^{-2} zu beobachten. Bei weiterer Erhöhung des Drucks nimmt die Planarität nur noch geringfügig zu. Ein Druck von 1 kN m^{-2} entspricht einem aufgelegten Gewicht von 10 g pro Quadratzentimeter Partox-Membran.

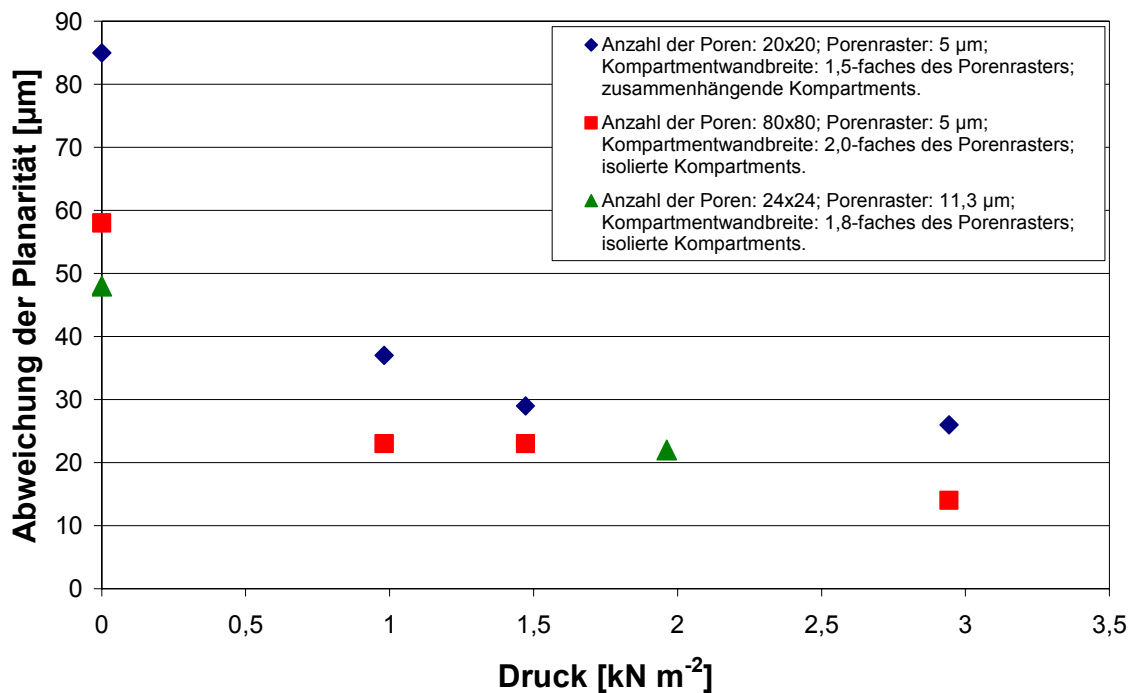


Abbildung 24: Abweichungen der Planarität unterschiedlicher Partox-Membranen nach der thermischen Oxidation bei 1050 °C in Abhängigkeit des Drucks.

Probengröße vor der Oxidation: 5,8x5,8 mm.

Tabelle 12 zeigt, dass sich Proben mit einer niedrigen Längenausdehnung (4,2 % Längenausdehnung, 24x24 Poren, 5 μm Porenraster, Kompartimentwandbreite: 1,8-fache des Porenrasters, isolierte Kompartments, 81 % Porosität) ohne Ausübung von Druck auf die Stirnfläche der Partox-Membran während der thermischen Oxidation mit einer geringeren Abweichung in der Planarität herstellen lassen als Proben mit einer höheren Längenausdehnung (14,6 % Längenausdehnung, 40x40 Poren, 3 μm Porenraster, Kompartimentwandbreite: 2,0-fache des Porenrasters, zusammenhängende Kompartments 44 % Porosität). Eine geringere Längenausdehnung während der thermischen Oxidation ist gleichzusetzen mit einem geringeren Expansionsdruck, welcher durch die aufwachsende SiO_2 -Schicht erzeugt wird (Kapitel 4.1.4.3). Mit steigendem Expansionsdruck während der thermischen Oxidation nimmt die Wellung der Membran zu.

Isolierte Kompartments zeigen eine geringere Wellung als zusammenhängende Kompartments bei nahezu gleicher Längenausdehnung der Proben (Tabelle 12). Bei den isolierten Kompartments kommt es jedoch während der thermischen Oxidation zu einem Verzug der Kompartimentwände (Abbildung 25). Die Kompartimentwände werden nach außen in die Zwischenbereiche gedrückt, was zu einem Verzug in den Eckbereichen führt. Einzelne SiO₂-Porenwände werden in den Eckbereichen gedehnt und verschoben. Die Verformung in den Eckbereichen führt jedoch nicht zu einer Wellung der Membran.

Tabelle 12: Abweichungen der Planarität unterschiedlicher Partox-Membrane nach der thermischen Oxidation bei 1050 °C in Abhängigkeit des Drucks.

<i>Angelegter Druck</i> [kN m ⁻²]	<i>0</i>	<i>1,0</i>	<i>1,5</i>	<i>2,0</i>	<i>2,9</i>	<i>5,4</i>
Probenbeschreibung:	Abweichung von der Planarität [µm]					
40x40 Poren, 3 µm Porenraster, Kompartimentwandbreite: 2,0-faches des Porenrasters, zusammenhängende Kompartments 44 % Porosität, 14,6 % Längenausdehnung	684	-	-	-	-	476
20x20 Poren, 5 µm Porenraster, Kompartimentwandbreite: 1,5-faches des Porenrasters, zusammenhängende Kompartments 55 % Porosität, 12,0 % Längenausdehnung	85	37	29	-	26	-
80x80 Poren, 5µm Porenraster, Kompartimentwandbreite: 2-faches des Porenrasters, isolierte Kompartments, 58 % Porosität, 11,2 % Längenausdehnung	58	23	23	-	14	-
24x24 Poren, 5 µm Porenraster, Kompartimentwandbreite: 1,8-faches des Porenrasters, isolierte Kompartments, 81 % Porosität, 4,2 % Längenausdehnung	48	-	-	22	-	-

Probengröße vor der Oxidation: 5,8x5,8 mm.

In den zusammenhängenden Kompartments wird kein Verzug der Kompartimentwände über die gesamte Länge der Probe (5,8x5,8 mm) beobachtet. Jedoch nimmt die Wellung in den Randbereichen der Membran gegenüber den isolierten Kompartments zu.

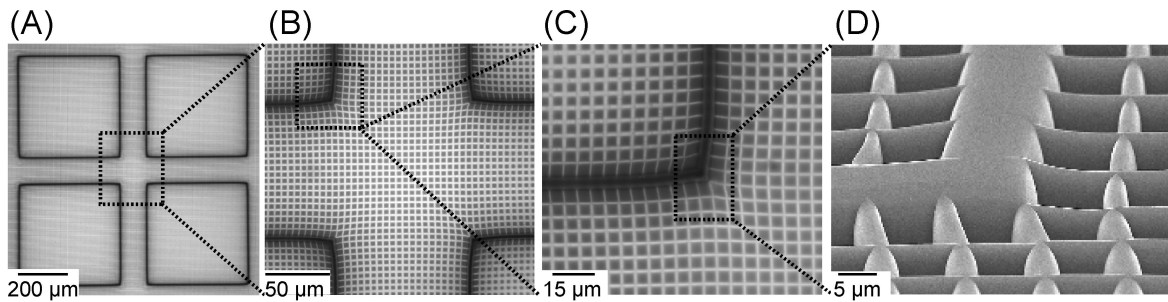


Abbildung 25: lichtmikroskopische und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Partox-Membranen.

A: 20-fache Vergrößerung (Poren: 80x80; Porenrastrer: 5 µm; Kompartimentwandbreite: 2-faches des Porenrastrers; isolierte Kompartments); B: 50-fache Vergrößerung; C: 100-fache Vergrößerung, Eckenbereich der isolierten Kompartimentwand; D: 5000-fache Vergrößerung.

Während der thermischen Oxidation kommt es zu einem Verzug in den Eckbereichen der isolierten Kompartments.

Die Wellung der Proben tritt nahezu nur in den Randbereichen auf, wobei der Grad der Wellung am Probenrand nahezu unabhängig von der Größe der Membran ist, wenn ein Druck von $1,0 \text{ kN m}^{-2}$ auf die Stirnfläche der Membran während der Oxidation ausgeübt wird. Ein Druck von 1 kN m^{-2} entspricht einem aufgelegten Gewicht von 10 g pro Quadratzentimeter Partox-Membran.

Bei der Oxidation von ca. 130 cm^2 großen Probenstücke können unterschiedliche makroporöse Membranen (20x20 Poren mit 5 µm Porenrastrer, 80x80 Poren mit 5 µm Porenrastrer und 24x24 Poren mit 11,3 µm Porenrastrer) unter Ausübung eines Druckes von $1,0 \text{ kN m}^{-2}$ auf die Stirnfläche der Membran während der thermischen Oxidation mit einer Abweichung von der Planarität unter 2 µm auf einer Fläche von 1 cm^2 hergestellt werden (Abbildung 26). In den Randbereichen ist die Abweichung von der Planarität bei den 130 cm^2 Probenstücken vergleichbar mit den entsprechenden 5,8x5,8 mm großen Proben.

Zur Erhöhung der Planarität ist es notwendig, große Probenstücke zu oxidieren und anschließend den gewellten Rand abzusägen.

In Abhängigkeit des Gewichts der aufgelegten Quarzplatten kann es während der Oxidation zu Abdrücken und Kratzern in der Stirnfläche der Partox-Membran kommen. Die Oberflächen der Proben, die unter Ausübung eines Druckes von $1,0 \text{ kN m}^{-2}$ auf die Stirnfläche der Membran während der thermischen Oxidation belastet werden, weisen kaum Defekte an der Oberfläche auf, die von den Quarzplatten herrühren. Mit steigendem Druck ($>1,5 \text{ kN m}^{-2}$) zeigt die Oberfläche der oxidierten Proben jedoch vermehrt Defekte.

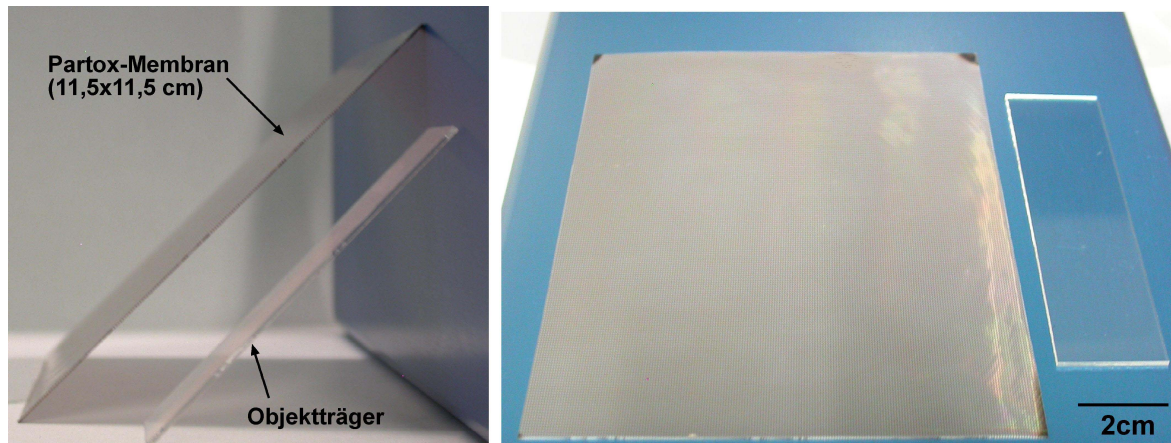


Abbildung 26: Partox-Membran mit einer Größe von 11,5x11,5 cm nach der thermischen Oxidation bei 1050 °C.

Probe: Anzahl der Poren: 80x80; Porenraster: 5 μm ; Kompartimentwandbreite: 2-faches des Porenrasters; isolierte Kompartments.

Zum Größenvergleich ist ein Objektträger mit abgebildet.

4.2 Optische Charakterisierung der Partox-Membran

Die Strukturen innerhalb der Partox-Membran liegen in der Größenordnung der Wellenlänge des sichtbaren Lichts (350-700 nm). Ist die Wellenlänge des Lichts im Bereich der Größe des Objekts, kann die geometrische Optik zur Beschreibung von Interferenz, Beugung oder Polarisation nur noch bedingt angewandt werden (Hecht, 1989). Qualitative Aussagen über die wichtigsten optischen Eigenschaften der Partox-Membranen können jedoch durch die geometrische Optik erfolgen.

Die Partox-Membran ist eine dreidimensionale photonische Struktur, die weder experimentell noch theoretisch in der Literatur beschrieben worden ist. Es gibt keine vergleichbaren Strukturen, die bereits numerisch simuliert wurden oder für die eine analytische Lösung der Lichtmoden innerhalb der Struktur gefunden wurde. Wellenoptische Simulationen der Struktur gehen aufgrund der Komplexität über den Rahmen dieser Arbeit hinaus.

Die Partox-Membran eignet sich aufgrund ihrer transparenten SiO₂-Bereiche als ideales Material für bioanalytische Assays, die auf der Messung von Fluoreszenz-Signalen im sichtbaren Bereich beruhen. Die makroporösen SiO₂-Bereiche ermöglichen eine optische Zugänglichkeit zur gesamten Sensoroberfläche für Anregungs- und Emissionslicht der Fluorophore.

Das Einkoppeln des Anregungslichts erfolgt über die Poren und die SiO₂-Porenwände (Abbildung 27). Bei der Einkopplung des Anregungslichts in die Poren kommt es zur Beugung des Anregungslichts (Lehmann et al., 2001). Bei der Einkopplung des Anregungslichts in die SiO₂-Porenwände kommt es an der Stirnfläche der SiO₂-Porenwände zu Reflexion und Brechung des Lichts. Bei der Reflexion an der abgerundeten Stirnfläche der SiO₂-Porenwände wird das eingestrahlte Licht entweder in die Membran reflektiert (Abbildung 27 A) oder zurückreflektiert (Abbildung 27 B).

Die Ausbreitung des Anregungslichts innerhalb der Membran erfolgt über Wellenleitermoden (Abbildung 27 C) und Kompartimentmoden (Abbildung 27 D). Lichtmoden, die sich in den SiO₂-Porenwänden ausbreiten, werden als Wellenleitermoden bezeichnet. Lichtmoden, die sich über Reflexion und Brechung an den SiO₂-Porenwänden innerhalb des Kompartiments ausbreiten, werden als Kompartimentmoden bezeichnet. Bei Reflexion an dem Restsilizium in den Kompartimentwänden kommt es zur Absorption des sich ausbreitenden Lichts (Abbildung 27 E).

Die Auskopplung des Lichts erfolgt wie das Einkoppeln des Lichts über die SiO₂-Porenwände und über die Poren.

Fluorophore an markierten nachzuweisenden Molekülen, die sich in unmittelbarer Nähe der SiO₂-Porenwand befinden, werden über Wellenleitermoden und Kompartimentmoden angeregt. Die Anregung der Fluorophore durch die Wellenleitermoden erfolgt über das evaneszente Feld der Lichtmoden in den SiO₂-Porenwänden. Die Anregung der Fluorophore durch die Kompartimentmoden erfolgt über Lichtmoden, die sich innerhalb eines Kompartiments ausbreiten.

Das Emissionslicht der Fluorophore kann seitlich in die wellenleitenden SiO₂-Porenwände einkoppeln oder innerhalb des Kompartiments sich durch Reflexion und Brechung an den SiO₂-Porenwänden ausbreiten (Abbildung 27 unterer Hälfte).

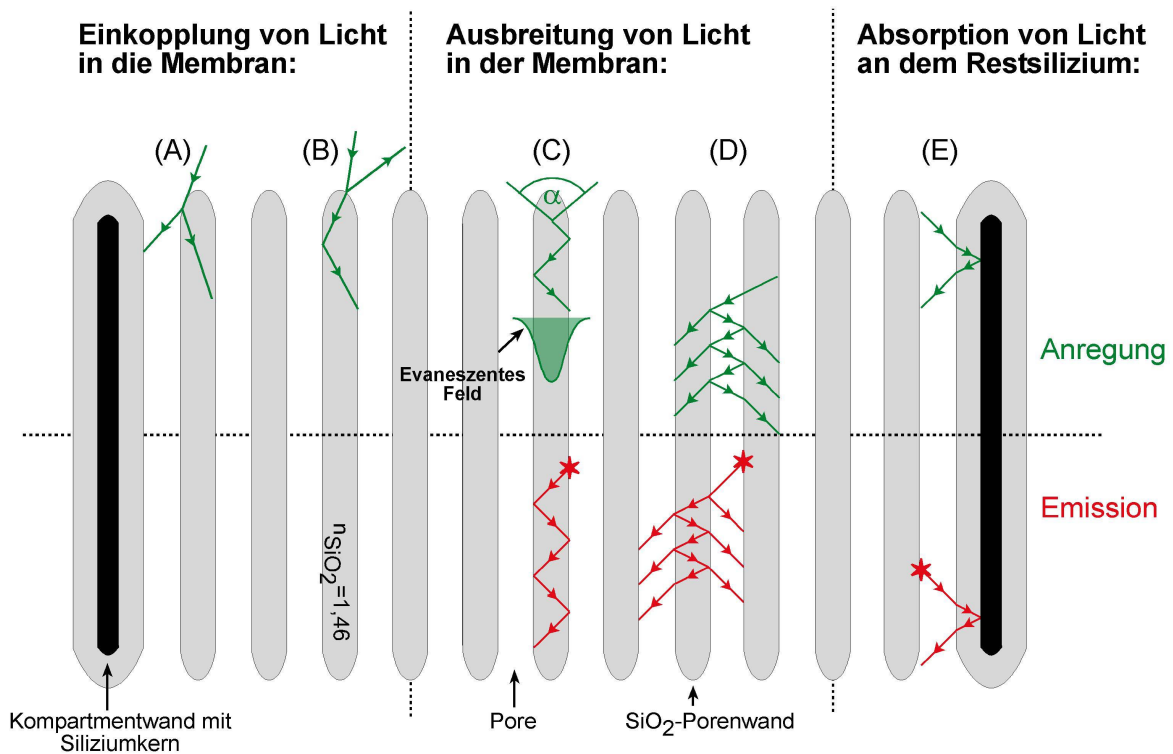


Abbildung 27: optische Eigenschaften von Partox-Membranen.

Obere Hälfte der Zeichnung: optischer Strahlengang des einfallenden Lichts für die Anregung von Fluorophoren; untere Hälfte: Strahlengang für Licht emittierende Moleküle (rote Sterne).

A: einfallendes Licht wird an den SiO₂-Porenwänden in die Membran reflektiert; B: teilweise zurückreflektiertes Licht; C: Wellenleitermoden; D: Kompartimentmoden; E: Reflexion und Absorption am Restsilizium.

4.2.1 Einkopplung von Licht in Partox-Membranen

4.2.1.1 Reflexion an der Stirnfläche von Partox-Membranen

Der Anteil des eingestrahnten Lichts, welcher auf die Stirnflächen der SiO₂-Porenwände trifft, wird entweder zurückreflektiert oder in die Membran reflektiert. Der andere Teil des eingestrahnten Lichts, welcher auf die Poren fällt, wird direkt in die Membran eingekoppelt. Das zurückreflektierte Licht an der Stirnfläche der Partox-Membran trägt nicht zur Anregung der Fluorophore bei und führt bei Fluoreszenzmessungen zu einem erhöhten Hintergrundsignal.

Um den Anteil des zurückreflektierten Lichts in Abhängigkeit des eingestrahnten Winkelspektrums zu ermitteln, wird eine Methode ausgearbeitet, die es erlaubt, die Einflüsse der abgerundeten Stirnflächen der SiO₂-Porenwände bei der Reflexion des eingestrahnten Lichts zu charakterisieren. Hierzu wird die Partox-Membran in eine Flüssigkeit (PEG-Lösung) eingebettet, die den gleichen Brechungsindex aufweist wie die SiO₂-Porenwände. Durch das Einbetten der Partox-Membran in die PEG-Lösung existieren innerhalb der Probe keine Grenzflächen mehr. Brechungsindexsprünge gibt es deshalb nur noch an den Grenzflächen zwischen der Partox-Membran und der Umgebung (Luft). Bei Einstrahlung von Licht kommt es an den ebenen PEG-Flüssigkeitsoberflächen zur Reflexion, wohingegen es bei ungefüllten Proben zu Reflexionen an den gekrümmten Stirnflächen der SiO₂-Porenwände kommt.

Für die Messung der winkelabhängigen Reflexionswerte wird im Auflichtmodus Licht durch eine Reihe verschiedener Objektive auf die Probe gestrahlt. Das zurückreflektierte Licht wird durch das Objektiv wieder erfasst und analysiert. Die Reflexion (R) berechnet sich aus dem Quotient von I zu I₀, wobei I₀ mit einer polierten Silizium-Scheibe bestimmt wird. Die Reflexion der polierten Siliziumscheibe wird mit 45 % angenommen (Singh et al., 2001). I₀ wird dementsprechend mit 1/0,45 korrigiert.

Tabelle 13 zeigt die winkelabhängigen Reflexionswerte der Partox-Membran bei Proben, deren Poren mit einer Flüssigkeit (PEG-Lösung) gefüllt sind, welche den gleichen Brechungsindex aufweist wie die SiO₂-Porenwände, und Proben mit ungefüllten Poren. Werden die Poren mit PEG-Lösung gefüllt, beträgt die Reflexion zwischen 6 und 7 %, unabhängig von dem eingestrahnten Winkelspektrum. Bei ungefüllten Poren erhöht sich die Reflexion mit steigender numerischer Apertur (NA) der Objektive. Bei einem eingestrahnten Winkelspektrum von 0 - 9 ° (NA = 0.15) wird eine Reflexion von 1 %

gemessen, die bis auf 18 %, gemessen unter einem eingestrahlt Winkelspektrum von 0 - 64 ° (NA = 0,9), ansteigt.

Tabelle 13: winkelabhängige Reflexionswerte der Partox-Membran bei unterschiedlich gefüllten Poren.

n_{Pore}	$\Delta n_{(n\text{SiO}_2\text{-Porenwände}-n\text{Poren})}$	$R_{(NA=0,15)}$ [%]	$R_{(NA=0,5)}$ [%]	$R_{(NA=0,9)}$ [%]
1,46 (PEG)	0	6	7	7
1,00 (Luft)	-0,46	1	6	18

Probe: Anzahl der Poren: 20x20; Porenraster: 5 μm ; Kompartimentwandbreite: 1,5-faches des Porenrasters; Porosität nach der Oxidation: 32 %; zusammenhängende Kompartments.

Der Anteil am reflektierten Licht bleibt bei Proben, deren Poren mit PEG-Lösung gefüllt sind, nahezu konstant. Licht wird unter einem Winkelspektrum, entsprechend der NA des Objektivs auf die glatte PEG-Flüssigkeitsoberfläche der eingebetteten Probe gestrahlt. Bei Reflexion an der horizontalen PEG-Schicht ist der Einfallswinkel gleich dem Ausfallswinkel. Folglich kann das gesamte Reflexionslicht vom Objektiv erfasst werden.

Bei senkrecht einfallendem Licht werden theoretisch 4 % des Lichts an einer Luft-PEG-Grenzfläche reflektiert. Da sich der Fresnelsche Reflexionskoeffizient bei Einfallswinkeln im Bereich zwischen 0-65 ° (entspricht einer NA von 0,9) nur geringfügig ändert, bleibt die Reflexion nahezu konstant (Hecht, 1989). Die gemessene Reflexion (7 %) an Ober- und Unterseite der PEG-Schicht liegen im Rahmen der Erwartung.

Bei ungefüllten Proben trifft das eingestrahlte Licht auf die gekrümmte Fläche der konisch geformten Stirnflächen der SiO_2 -Porenwände und wird zurück oder in die Membran reflektiert. Mit steigender NA des Objektivs wird immer mehr reflektiertes Licht erfasst und die Werte für die Reflexion steigen an. Aufgrund des Fehlens jeglicher Oberflächendefekte auf den SiO_2 -Porenwänden kann eine Streuung des Lichts an den Stirnflächen der SiO_2 -Porenwände ausgeschlossen werden (Abbildung 20).

Bei einer NA des verwendeten Objektivs von 0,9 wird in der Partox-Membran bei ungefüllten Poren ca. 3-fach soviel eingestrahlt Licht reflektiert wie bei Poren, die mit PEG-Lösung gefüllt sind. Die höhere Reflexion in der Partox-Membran bei ungefüllten Poren ergibt sich aufgrund der größeren Oberfläche der gekrümmten Porenspitzen gegenüber den in PEG-Lösung eingebetteten Porenspitzen. Trotz einer Porosität von 32 % nach der Oxidation weisen ungefüllte Proben aufgrund der gekrümmten Porenspitzen eine ca. 2-fach größere Oberfläche auf, welche das eingestrahlte Licht zurückreflektiert, als Proben, die mit einer PEG-Lösung gefüllt werden. Die konischen Porenspitzen ragen ca. 3

μm tief in die Partox-Membran. Die Krümmung der Porenspitzen vergrößert die effektive Oberfläche und erhöht somit den Anteil am zurückreflektierten Licht.

4.2.1.2 Bestimmung der numerischen Apertur der SiO_2 -Porenwände

Die Bestimmung der numerischen Apertur der SiO_2 -Porenwände erfolgt über den Kontrastvergleich zwischen der Lichtintensität in den Poren und der Lichtintensität in den SiO_2 -Porenwänden. Durch eine definierte Beleuchtung der Partox-Membran und Detektion des Lichts auf der gegenüberliegenden Seite der Membran können Rückschlüsse über das Einkoppelverhalten des Lichts in die Membran getroffen werden. In diesem Experiment wird Licht von der Rückseite durch eine Reihe verschiedener Objektive unter Dunkelfeldbeleuchtung auf die Probe gestrahlt (Dunkelfeld-Durchlichtmodus). Das auf der gegenüberliegenden Seite austretende Licht wird mit einem 50x-Objektiv gesammelt und auf eine CCD-Kamera geleitet (Abbildung 28). Durch die Dunkelfeldbeleuchtung wird mit steigender NA der Objektive der Anteil am eingestrahlt Licht, welcher in den wellenleitenden Porenwänden getragen wird, immer kleiner, bis es keinen Unterschied im Kontrast zwischen den Poren und den SiO_2 -Porenwände gibt. Wenn die SiO_2 -Porenwände keinen Helligkeitsunterschied gegenüber den Poren aufweisen, koppelt das schräg eingestrahlte Licht nicht in die SiO_2 -Porenwände ein. Das eingestrahlte Licht wird dann vorwiegend durch Reflexion und Brechung an den SiO_2 -Porenwänden durch die Membran geleitet.

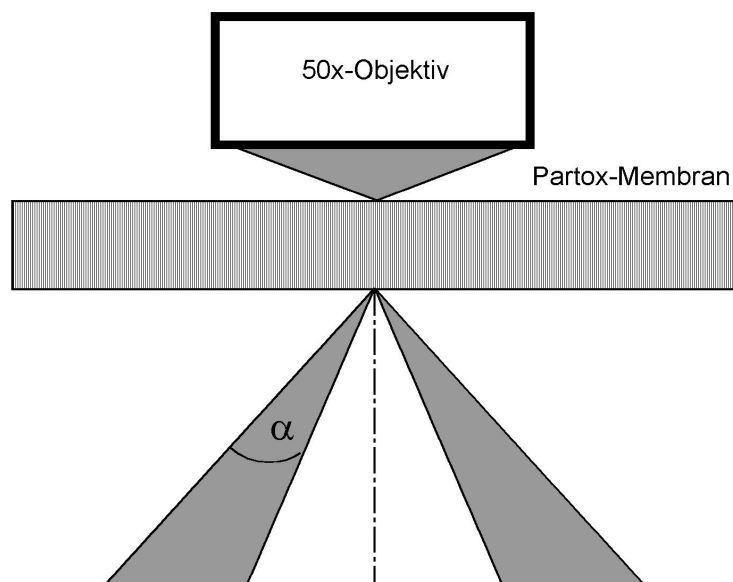


Abbildung 28: schematischer Aufbau der Dunkelfeld-Durchlichtbeleuchtung.

α : Winkelspektrum des eingestrahlt Lichts.

Tabelle 14 zeigt die NA der verwendeten Objektivs, den entsprechenden Winkel und das eingestrahlte Winkelspektrum im Dunkelfeldmodus.

Tabelle 14: numerische Apertur der verwendeten Objektivs und das Winkelspektrum des eingestrahnten Lichts im Dunkelfeldmodus.

Objektiv	NA / Winkel	Winkelspektrum (α) des eingestrahnten Lichts im Dunkelfeldmodus
5x	0,15/ 9 °	9 ° < α < 40 °
10x	0,30/ 18 °	18 ° < α < 50 °
20x	0,50/ 30 °	30 ° < α < 70 °
100x	0,90/ 64 °	64 ° < α < 80 °

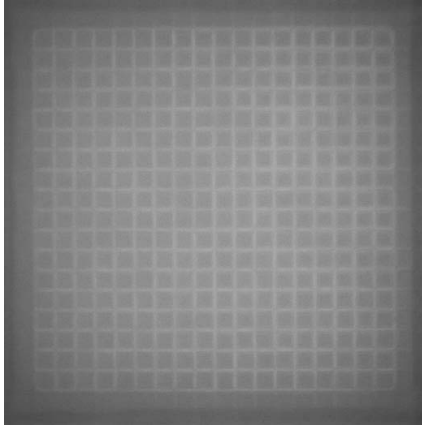
Die Bilderreihe (A)-(D) in Abbildung 29 zeigt lichtmikroskopische Dunkelfeld-Durchlicht-Aufnahmen bei unterschiedlichen Winkelspektren des eingestrahnten Lichts.

Bei einem eingestrahnten Winkelspektrum zwischen 9 ° < α < 40 ° und 18 ° < α < 50 ° sind die SiO₂-Porenwände (helles Gitter in Abbildung 29) noch von den Poren (graue Quadrate in Abbildung 29) zu unterscheiden. Der Kontrast zwischen Poren und SiO₂-Porenwänden ergibt sich aufgrund einer höheren Lichtintensität in den SiO₂-Porenwänden gegenüber den Poren. Die höhere Lichtintensität in den SiO₂-Porenwänden ist wiederum auf die wellenleitenden Eigenschaften der SiO₂-Porenwände zurück zu führen.

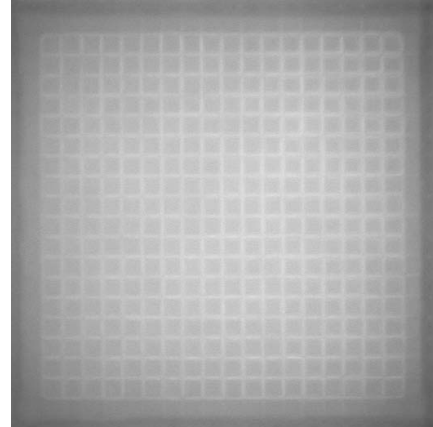
Wird die Probe unter einem Winkelspektrum des eingestrahnten Lichts von 30 ° < α < 70 ° beleuchtet, ist kein Unterschied in der Lichtintensität zwischen den SiO₂-Porenwänden und den Poren erkennbar. Licht, welches unter Winkeln größer 30 ° eingestrahlt wird, breitet sich nur geringfügig unter Totalreflexion in den SiO₂-Porenwänden aus. Das Licht wird bevorzugt durch Reflexion und Brechung an den Porenwänden durch die Membran geleitet.

In diesem Experiment konnte kein exaktes Winkelspektrum bestimmt werden, bei dem das eingestrahlte Licht nur noch durch Reflexion und Brechung an den Porenwänden durch die Membran geleitet wird. Folglich ist keine exakte NA der SiO₂-Porenwände bestimmbar. Anhand des Versuchs wird die NA der SiO₂-Porenwände zwischen 0,34 - 0,5 bestimmt, was einen maximalen Einkoppelwinkel zwischen 20 - 30 ° entspricht.

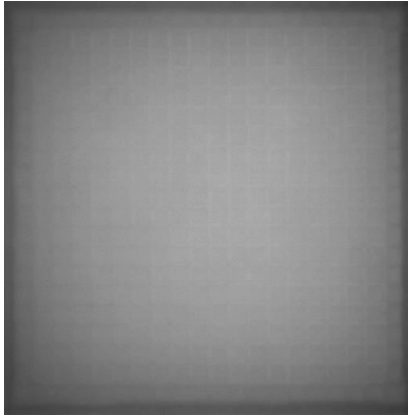
(A) Winkelspektrum des eingestrahlten Lichts : $9^\circ < \alpha < 40^\circ$ (5x-Objektiv)



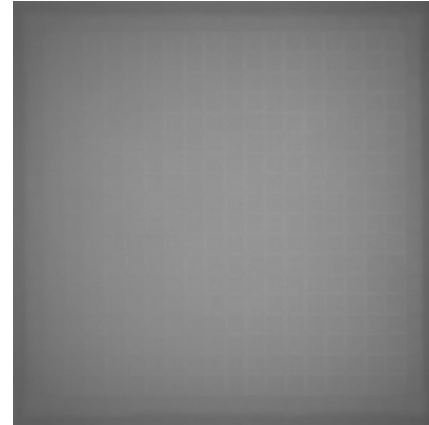
(B) Winkelspektrum des eingestrahlten Lichts : $18^\circ < \alpha < 50^\circ$ (10x-Objektiv)



(C) Winkelspektrum des eingestrahlten Lichts : $30^\circ < \alpha < 70^\circ$ (20x-Objektiv)



(D) Winkelspektrum des eingestrahlten Lichts : $64^\circ < \alpha < 80^\circ$ (100x-Objektiv)



(E) Winkelspektrum des eingestrahlten Lichts : $0^\circ < \alpha < 6^\circ$

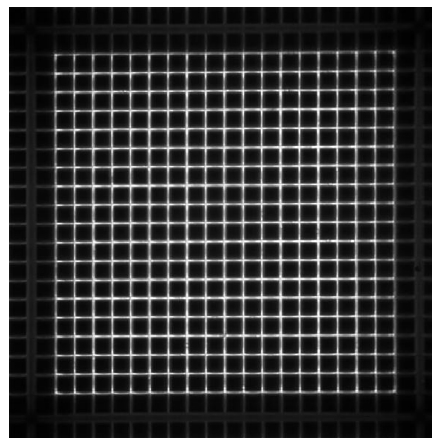


Abbildung 29: lichtmikroskopische Dunkelfeld-Durchlichtaufnahmen (A-D) und Durchlichtaufnahme (E) von Partox-Membranen bei unterschiedlichen Winkelspektren des eingestrahlten Lichts.

Proben: Anzahl der Poren: 20x20; Porenraster: 5 μm ; Kompartimentwandbreite: 1,5-faches des Porenrasters; Porenwanddicke: 1,2 μm ; zusammenhängende Kompartments.

Ab einem Winkelspektrum des eingestrahlten Lichts von $30^\circ < \alpha < 70^\circ$ ist kein Kontrast zwischen Poren und SiO_2 -Porenwänden zu erkennen.

Abbildung 29 E zeigt eine Durchlichtaufnahme bei Beleuchtung der Membran mit nahezu parallelem Licht (geköhlerte Beleuchtung mit vollständig geschlossener Aperturblende vor der Kondensorlinse). Die Apertur des eingestrahnten Lichtkegels ist kleiner 0,1. Das hell-leuchtende Gitter zeigt die SiO₂-Porenwände, welche als Wellenleiter fungieren. Die Poren und Kompartimentwände mit einem Siliziumkern erscheinen schwarz. Der Kontrast zwischen den SiO₂-Porenwänden und den Poren zeigt, dass bei einer Beleuchtung der Membran mit nahezu parallelem Licht, das eingestrahlte Licht bevorzugt in die SiO₂-Porenwänden einkoppelt und unter Totalreflexion in den SiO₂-Porenwänden durch die Membran getragen wird.

4.2.2 Ausbreitung des Lichts innerhalb der Partox-Membran

Lichtmoden, die sich innerhalb des Kompartments ausbreiten, werden bei Reflexionen am Restsilizium in den Kompartimentwänden abgeschwächt. Abhängig von der Wellenlänge des Lichts und der Dicke des Restsiliziums werden pro Reflexion am Restsilizium 20–60 % des sich ausbreitenden Lichts adsorbiert (Kovalev et al., 1996; Kovalev et al., 1999).

Die Anzahl der Reflexionen am Restsilizium in den Kompartimentwänden wird hauptsächlich durch die Kompartimentgröße bestimmt. Mit zunehmender Kompartimentgröße sinkt die Anzahl an Kompartimentwänden mit Restsilizium in der zu untersuchenden Fläche und somit auch die Anzahl der Reflexionen am Restsilizium in den Kompartimentwänden. Die Transmission nimmt folglich mit kleiner werdender Kompartimentgröße ab.

Um eine qualitative Aussage über die Absorption innerhalb der Partox-Membran zu treffen, werden drei Strukturen mit unterschiedlicher Kompartimentgröße nach der thermischen Oxidation auf ihre Lichtdurchlässigkeit untersucht. Für die Transmissionsmessungen werden die ungefüllten Proben unter geköhlter Beleuchtung mit nahezu parallelem Licht bestrahlt ($NA < 0,1$). Die Durchlichtaufnahmen werden mit einem 20x-Objektiv ($NA = 0,5$) aufgenommen und analysiert.

Struktur 1 besteht aus zusammenhängenden Kompartiments mit 20x20 Poren in einem 5 µm Porenraster, einer Porenwanddicke von 1,2 µm und einer Kompartimentwandbreite des 1,5-fachen des Porenrasters mit ca. 0,6 µm Restsilizium (Abbildung 30 A).

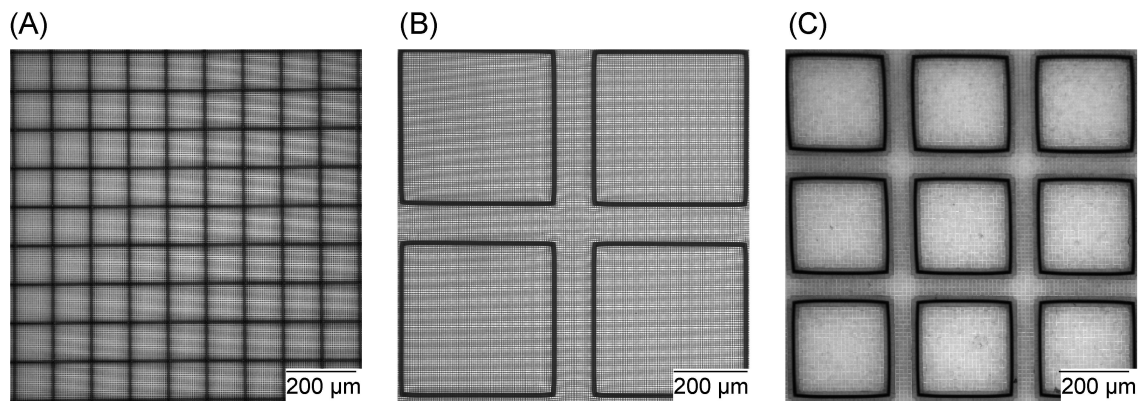


Abbildung 30: lichtmikroskopische Durchlichtaufnahmen von drei unterschiedlichen Partox-Membranen (10x-Objektiv).

A: Struktur 1 (zusammenhängende Kompartments, 20x20 Poren, 5 µm Porenrastraster); B: Struktur 2 (isolierte Kompartments, 80x80 Poren, 5 µm Porenrastraster, Zwischenbereich 100 µm); C: Struktur 3 (isolierte Kompartments, 24x24 Poren, 11,3 µm Porenrastraster, Zwischenbereich 72 µm).

Kompartimentwände mit einem Siliziumkern erscheinen schwarz; SiO₂-Porenwände grau-weiß.

Die Überstrukturen in den hellen Bereichen sind Moire'-Muster, die durch nicht parallele Ausrichtung der transparenten Proben mit dem Pixel-Gitter der CCD-Kamera entstehen

Struktur 2 besteht aus isolierten Kompartments mit 80x80 Poren in einem 5 µm Porenrastraster, einer Porenwanddicke von 1,2 µm, einer Kompartimentwandbreite des 2,0-fachen des Porenrastrasters mit ca. 1,2 µm Restsilizium und einem 100 µm breiten Zwischenbereich (Abbildung 30 B).

Struktur 3 besteht aus isolierten Kompartments mit 24x24 Poren in einem 11,3 µm Porenrastraster, einer Porenwanddicke von 1,2 µm, einer Kompartimentwandbreite des 1,8-fachen des Porenrastrasters mit ca. 2 µm Restsilizium und einem 72 µm breiten Zwischenbereich (Abbildung 30 C).

Tabelle 15 zeigt die Transmissionswerte (I/I_0) der drei Strukturen, gemessen mit einem 20x-Objektiv. Die Struktur 1 weist eine Kompartimentgröße von 102,5 µm vor der Oxidation auf. Struktur 3 hat eine Kompartimentgröße von 291,5 µm vor der Oxidation und einen Zwischenbereich von 72 µm, der frei von Kompartimentwänden mit Restsilizium ist. Struktur 2 hat eine Kompartimentgröße von 405 µm vor der Oxidation und einen Zwischenbereich von 100 µm, der keine Kompartimentwände mit Restsilizium beinhaltet. Struktur 1 zeigt somit die höchste Anzahl an Kompartimentwänden mit Restsilizium und Struktur 2 die geringste Anzahl an Kompartimentwänden mit Restsilizium in der zu untersuchenden Fläche (Abbildung 30).

Übereinstimmend mit der Anzahl an Kompartimentwänden mit Restsilizium in der zu untersuchenden Fläche hat die Struktur 2 mit der geringsten Anzahl an

Kompartimentwänden mit Restsilizium mit 39 % die höchste Transmission. Die Struktur 3 hat einen Transmissionswert von 31 % und die Struktur 1 mit der höchsten Anzahl an Kompartimentwänden mit Restsilizium in der zu untersuchenden Fläche zeigt die niedrigste Transmission von 27 %.

Tabelle 15: Transmissionswerte der drei untersuchten Strukturen.

Struktur	Kompartimentgröße vor der Oxidation [μm]	T [%]
1	102,5	27
2	405,0	39
3	291,5	31

20x-Objektiv (NA=0,5)

4.2.3 Auskopplung des Lichts aus den Partox-Membranen

4.2.3.1 Transmission

Die Poren von Partox-Membranen werden mit unterschiedlichen Flüssigkeiten gefüllt und unter geköhlter Beleuchtung mit nahezu parallelem Licht bestrahlt (NA<0,1). Das transmittierte Licht wird unter verschiedenen Winkelspektren (NA-Objektiv) erfasst und analysiert (Tabelle 16).

Tabelle 16: Transmission der Partox-Membran bei unterschiedlich gefüllten Poren in Abhängigkeit der numerischen Apertur der Objektive.

Poren gefüllt mit:	$\Delta n_{(n\text{SiO}_2\text{-Porenwand}-n\text{Poren})}$	$T_{(NA=0,15)}$ [%]	$T_{(NA=0,5)}$ [%]	$T_{(NA=0,9)}$ [%]
Luft (n=1,00)	-0,46	10	27	39
Wasser (n=1,33)	-0,13	24	56	65
PEG-Lösung (n=1,46)	0	78	83	84
Sorbinsäure (n=1,49)	-0,03	76	80	82
Siliconöl (n=1,61)	0,15	18	52	68

Probe: Anzahl der Poren: 20x20; Porenraster: 5 μm ; Kompartimentwandbreite: 1,5-faches des Porenrasters; Porenwanddicke: 1,2 μm ; zusammenhängende Kompartments.

Abbildung 31 zeigt die Transmission in Abhängigkeit der Brechungsindexunterschiede zwischen den SiO_2 -Porenwänden und dem Medium in den Poren bei unterschiedlichen Objektiven.

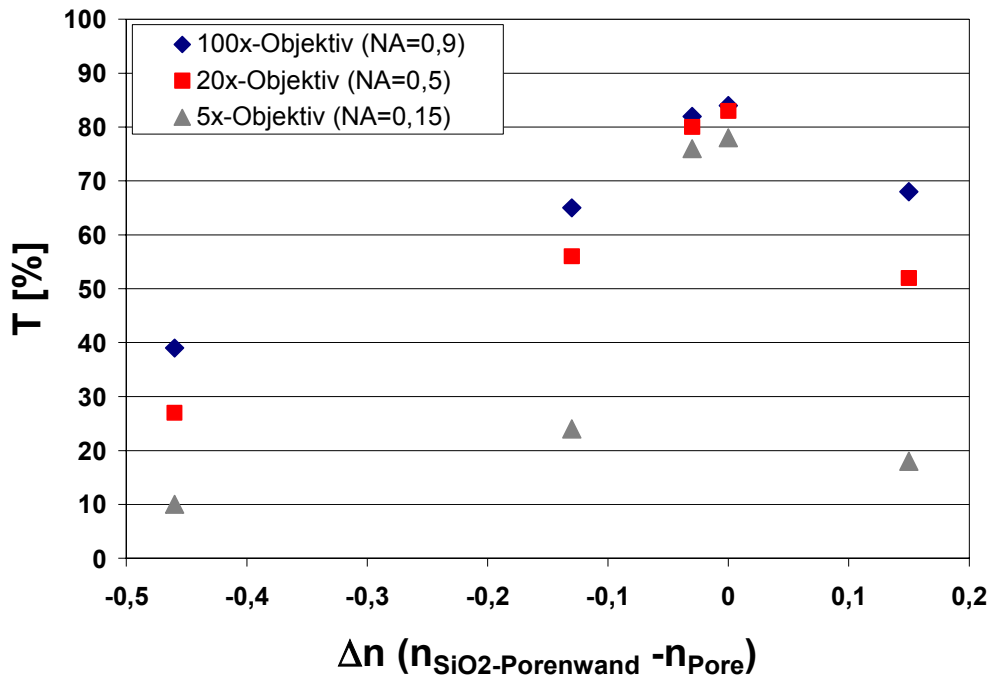


Abbildung 31: Transmission in Abhängigkeit der Brechungsindexunterschiede zwischen den SiO₂-Porenwänden und dem Medium in den Poren bei unterschiedlichen Objektiven.

Probe: Anzahl der Poren: 20x20; Porenraster: 5 μm; Kompartimentwandbreite: 1,5-faches des Porenrasters; Porenwanddicke: 1,2 μm; zusammenhängende Kompartments.

Die Transmission nimmt mit steigender numerischen Apertur der Objektive zu, wenn die Poren mit einem Medium gefüllt werden, dessen Brechungsindex von dem Brechungsindex der SiO₂-Porenwände abweicht ($\Delta n \neq 0$). Die Transmission ist nahezu unabhängig von der numerischen Apertur der Objektive, wenn die Poren der Partox-Membran mit einer Flüssigkeit (PEG-Lösung) gefüllt werden, welche den gleichen Brechungsindex aufweist wie die SiO₂-Porenwände.

Wenn der Brechungsindex des Mediums in den Poren von dem Brechungsindex der SiO₂-Porenwände abweicht ($\Delta n \neq 0$), kommt es an den gekrümmten Stirnflächen der SiO₂-Porenwände zu Reflexionen. Das eingestrahlte Licht wird in alle Raumrichtungen reflektiert (Kapitel 4.2.1.1). Mit steigender NA der Objektive wird ein größerer Anteil des Anregungslichts erfasst und die Transmission nimmt zu. Bei ungefüllten Poren steigt die Transmission in der Partox-Membran von 10 % gemessen mit dem 5x-Objektiv auf 39 % gemessen mit dem 100x-Objektiv an.

Die Transmission in der Partox-Membran steigt von ungefüllten Poren über wassergefüllte Poren bis zu Poren, welche mit PEG-Lösung gefüllt sind, an (Tabelle 16). Der Anteil des reflektierten Lichts hängt von dem Medium innerhalb der Poren ab. Je

größer der absolute Brechungsindexunterschied zwischen den SiO₂-Porenwänden und dem Medium innerhalb den Poren ist, desto höher ist der Anteil am reflektierten Licht (Kapitel 4.2.1.1) und desto geringer ist die Transmission.

Die Summe aus reflektiertem, transmittiertem und absorbiertem Licht beim Durchgang durch die Partox-Membran müsste 100 % ergeben. Wenn die Partox-Membran (20x20 Poren pro Kompartiment, 5 µm Porenraster, Kompartimentwandbreite: 1,5-faches des Porenrasters, Porenwanddicke 1,2 µm) mit einer Flüssigkeit (PEG-Lösung) gefüllt wird, welche den gleichen Brechungsindex aufweist wie die SiO₂-Porenwände, so wird bei Durchlichtmessungen unter Einstrahlung von nahezu parallelem Licht (NA<0,1) eine Transmission von 84 % mit dem 100x-Objektiv gemessen (Tabelle 16). Die Reflexion an den beiden PEG-Flüssigkeitsoberflächen beträgt 7 % (Kapitel 4.2.1.1). Der restliche Anteil des eingestrahnten Lichts (ca. 9 %) wird am Restsilizium in den Kompartimentwänden absorbiert. Bei einer ungefüllten Probe beträgt die Transmission 39 % (Tabelle 16; 100x-Objektiv). Durch Reflexion an den gekrümmten Porenspitzen der SiO₂-Porenwände werden mindestens 18 % des eingestrahnten Lichts reflektiert (Kapitel 4.2.1.1). Die restlichen 43 % des eingestrahnten Lichtes werden am Restsilizium in den Kompartimentwänden absorbiert oder beim Austritt aus der Partox-Membran nicht detektiert. Licht, welches aus der Partox-Membran unter einem flachen Winkel (<26 °) ausgekoppelt, wird nicht durch ein 100x-Objektiv (NA=0,9) bei Transmissionsmessungen erfasst.

4.2.3.2 Intensitätsverteilung des transmittierten Lichts

Für eine effektive Anregung von Fluorophoren ist es notwendig, eine hohe Feldstärke des Anregungslichts am Ort der Fluorophore zu erzeugen. Mit steigender Effektivität der Anregung der Fluorophore nimmt das absolute Fluoreszenzsignal zu. In der Partox-Membran sind die Fluorophore an markierte, nachzuweisende Moleküle gebunden, die sich in unmittelbarer Nähe der SiO₂-Porenwand befinden.

Es wird deshalb die Intensitätsverteilung des transmittierten Lichts in der Partox-Membran bei unterschiedlich gefüllten Poren untersucht, um Erkenntnisse für eine geeignete Anregungsart bei Fluoreszenzexperimenten zu gewinnen. Die wellenleitenden Eigenschaften der Partox-Membran können durch den Brechungsindex des Mediums innerhalb der Poren verändert werden. Sind die Poren mit einem Medium gefüllt, welches einen höheren Brechungsindex aufweist als die SiO₂-Porenwände, so werden die Poren zum Wellenleiter. Weist das Medium innerhalb der Poren einen kleineren Brechungsindex

als die SiO₂-Porenwände auf, so fungieren die SiO₂-Porenwände als Wellenleiter. Keine wellenleitenden Eigenschaften zeigt die Partox-Membran, wenn die Poren mit einem Medium gefüllt sind, welches denselben Brechungsindex aufweist wie die SiO₂-Porenwände.

SiO₂-Porenwände als Wellenleiter

Um die Stärke und die Verteilung des evaneszenten Feldes in den SiO₂-Porenwänden abzuschätzen, wird die Intensitätsverteilung des transmittierten Lichts bei ungefüllten Poren untersucht. Hierfür wird eine lichtmikroskopische Durchlichtaufnahme unter geköhlerter Beleuchtung mit einem 100x-Objektiv (NA=0,9) aufgenommen und analysiert. Um die Probe mit nahezu parallelem Licht zu bestrahlen, wird die Aperturblende vor der Kondensorlinse vollständig geschlossen. Die Apertur des eingestrahlten Lichtkegels wird als kleiner 0,1 bestimmt.

Abbildung 32 A zeigt eine Durchlichtaufnahme der Partox-Membran mit ungefüllten Poren. Das hell-leuchtende Gitter zeigt die SiO₂-Porenwände, welche als Wellenleiter fungieren. Die Poren und Kompartimentwände mit einem Siliziumkern erscheinen schwarz. Die Gesamttransmission beträgt 39 %, wovon die SiO₂-Porenwände 85 % des transmittierten Lichts tragen und die Poren 15 %. Die Probe (20x20 Poren pro Kompartiment, 5 µm Porenraaster, Kompartimentwandbreite: 1,5-faches des Porenraasters, Porenwanddicke 1,2 µm) zeigt nach der thermischen Oxidation eine Porosität von 30 %. Die Porenfläche beträgt dementsprechend 30 % von der Gesamtfläche und die Fläche der SiO₂-Porenwände 70 %. Somit tragen die SiO₂-Porenwände 85 % des transmittierten Lichts auf 70 % der Gesamtfläche und die Poren 15 % des transmittierten Lichts auf 30 % der Gesamtfläche. Das Verhältnis zwischen Lichtintensität in den SiO₂-Porenwänden und der Lichtintensität der Poren beträgt 2,8:1.

Der Unterschied zwischen dem dünnen Erscheinen der SiO₂-Porenwände in der lichtmikroskopischen Durchlichtaufnahme und der realen Abmessung der SiO₂-Porenwände (Abbildung 32 A, gestrichelte Linie in der lichtmikroskopischen Durchlichtaufnahme unter höherer Vergrößerung) entsteht durch die fokussierenden Eigenschaften der konisch geformten SiO₂-Porenwände (Konvexlinse). Werden die Ober- und Unterseite der SiO₂-Porenwände abgeschliffen, ist dieser Unterschied nicht mehr zu sehen.

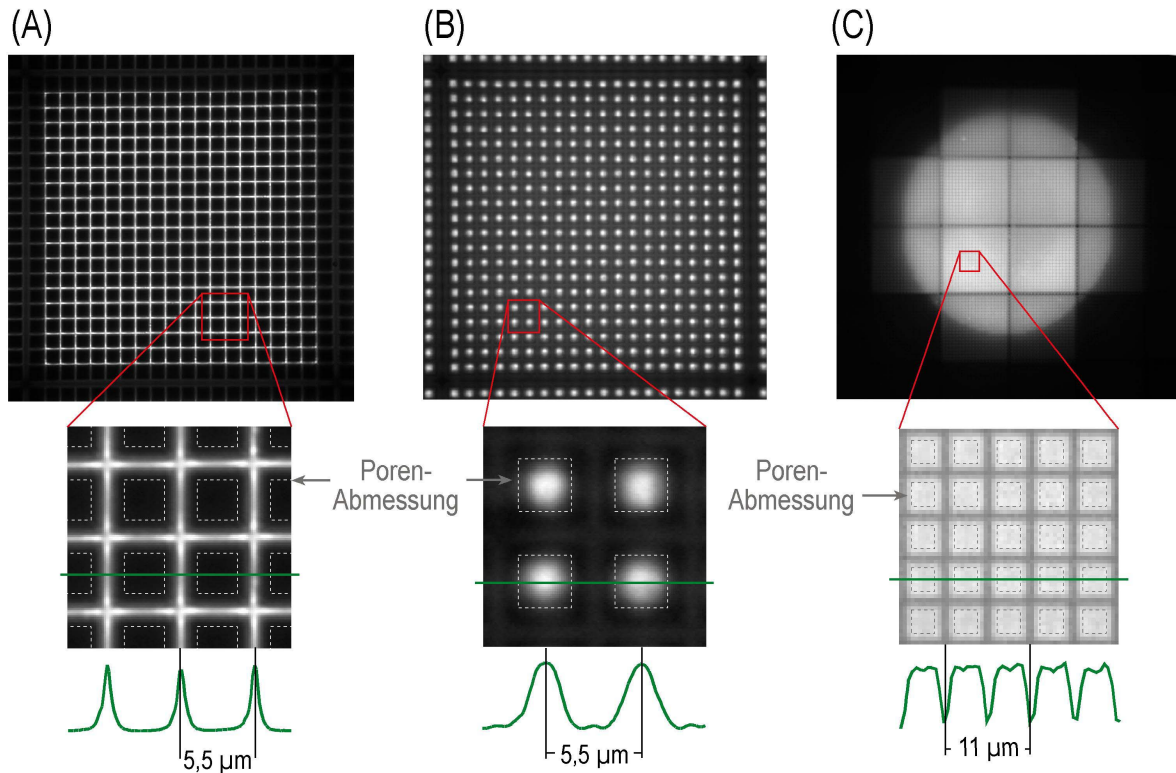


Abbildung 32: Intensitätsverteilung in lichtmikroskopischen Durchlichtaufnahmen (A und B) und Fluoreszenzaufnahmen (D) einer Partox-Membran.

A: Poren mit Luft gefüllt; B: Poren mit Siliconöl gefüllt; C: Fluoreszenzspot, Poren mit Luft gefüllt; Probe: Anzahl der Poren: 20x20; Porenraster: 5 µm; Kompartimentwandbreite: 1,5-faches des Porenrasters; Porenwanddicke: 1,2 µm; zusammenhängende Kompartments.

Die fein gestrichelten Linien zeigen die Position und Geometrie der Porenwände bzw. Poren. Das Profil der Intensitätsverteilung des transmittierten Lichts (A und B) und des emittierten Lichts der Fluorophore (C) ist jeweils unterhalb dargestellt.

Poren als Wellenleiter

Abbildung 32 B zeigt eine Partox-Membran, deren Poren mit Siliconöl gefüllt sind. Aufgrund des höheren Brechungsindexes des Siliconöls ($n=1,61$) gegenüber den SiO_2 -Porenwänden ($n=1,46$) werden die Poren zum Wellenleiter (liquid core waveguide) und erscheinen hell. Die SiO_2 -Porenwände erscheinen grau-schwarz und die Kompartimentwände mit einem Siliziumkern erscheinen schwarz. Die Gesamttransmission beträgt 69 %. Die SiO_2 -Porenwände tragen 53 % des transmittierten Lichts auf 70 % der Gesamtfläche, und die Poren tragen 47 % des transmittierten Lichts auf 30 % der Gesamtfläche. Das Verhältnis zwischen der Lichtintensität in den SiO_2 -Porenwänden und der Lichtintensität der Poren beträgt 1:2,3.

4.2.4 Fluoreszenzversuche

4.2.4.1 Intensitätsverteilung des emittierten Lichts von Fluorophoren

Fluorophore, welche sich in der unmittelbaren Nähe der SiO₂-Porenwand befinden, können ihr emittiertes Licht seitlich in die SiO₂-Porenwand einkoppeln und es innerhalb der Poren ausbreiten (Abbildung 27). Abbildung 32 C zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme eines Fluoreszenzspots. Die SiO₂-Porenwände tragen 55 % des Emissionslichts auf 70 % der Gesamtfläche und die Poren tragen 45 % des Emissionslichts auf 30 % der Gesamtfläche. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass Fluorophore an der SiO₂-Porenwand ihr Emissionslicht bevorzugt in den Raum abstrahlen und nicht in die wellenleitende SiO₂-Porenwand einkoppeln. Die Abstrahlung des Emissionslichts der Fluorophore sollte aufgrund des höheren Brechungsindex der SiO₂-Porenwand bevorzugt in den Wellenleiter stattfinden.

Vergleich mit planarem Wellenleitersystem

Allgemein sind die Dimension eines Wellenleiters und der Brechungsindexunterschied zwischen dem Wellenleiter und der Umgebung entscheidend für die Feldstärke und die Verteilung des evaneszenten Feldes. Die Breite der SiO₂-Porenwände beeinflusst die Moden, welche im Wellenleiter getragen werden und somit auch die Feldstärke und die Verteilung des evaneszenten Feldes. Mit steigender Breite des Wellenleiters sinkt die Feldstärke in unmittelbarer Umgebung des Wellenleiters. Mit steigendem Brechungsindexunterschied zwischen dem Wellenleiter und der Umgebung sinkt die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in das optisch dünnere Medium (Gleichung 7), jedoch wird die Intensität der elektrischen Feldstärke an der Grenzfläche erhöht. Mit abnehmender Stärke des evaneszenten Feldes kommt es zu einem geringeren Überlappen des evaneszenten Feldes mit den Fluorophoren. Folglich sinken die Effizienz bei der Anregung der Fluorophore und die Effizienz beim Einkoppeln des emittierten Fluoreszenzlichts in die SiO₂-Porenwände.

Ein Vergleich der Verteilung des Emissionslichts von Fluorophoren in einem planaren Wellenleitersystem aus Ta₂O₅ und der dreidimensionalen Wellenleiterstruktur zeigt, dass der Brechungsindexunterschied zwischen den SiO₂-Porenwänden und den ungefüllten Poren sowie die Dimension der SiO₂-Porenwände für die schlechte Einkoppeleffizienz des Emissionslichts in die wellenleitenden SiO₂-Porenwände verantwortlich sind. Das Verhältnis der Lichtintensität des Emissionslichts der Fluorophore zwischen Wellenleiter und Sensorvolumen ($I_{\text{Wellenleiter}}/I_{\text{Volumen}}$) wurde für das

planare Wellenleitersystem zu 3,2:1 bestimmt, d.h. ein Großteil des Lichts koppelt in das Wellenleitersystem ein (Duveneck et al., 1996). In der Partox-Membran beträgt das Verhältnis zwischen Lichtintensität des Emissionslichts der Fluorophore in den SiO₂-Porenwänden und der Lichtintensität der Poren 1:1,9, d.h. die Poren sind der bessere Lichtleiter des Emissionslichts.

Die Breite der SiO₂-Porenwände ist ungefähr 11-mal größer als im planaren Wellenleitersystem aus Ta₂O₅ (2,2 µm SiO₂-Porenwände zu 200 nm Ta₂O₅-Wellenleiter). Der Brechungsindex für Ta₂O₅ beträgt ca. 2,2 gegenüber SiO₂ mit 1,46. Die Stärke des evaneszenten Feldes in der Nähe der Fluorophore ist in den SiO₂-Porenwänden niedriger als in dem Ta₂O₅-Wellenleiter.

Die Effizienz für die stirnseitige Einkoppelung des Anregungslichts in die konisch geformten Enden der SiO₂-Porenwände ist im Vergleich zu einer Gittereinkopplung, welche für das planare Wellenleitersystem verwendet wird, moderat. In der Partox-Membran wird immer ein Teil des Lichts bei stirnseitiger Einkopplung nicht in die SiO₂-Porenwände einkoppelt, sondern breitet sich über Reflexion und Brechung in der Membran aus.

4.2.4.2 Auslesearten für Fluoreszenzversuche

In mehreren Versuchsreihen wird geprüft, welche Ausleseart bei Fluoreszenzversuchen in der Partox-Membran das beste Verhältnis von Fluoreszenzsignal zu Hintergrundsignal erzeugt.

Herkömmliche planare Mikroarrays werden durch Epifluoreszenz-Mikroskopie ausgelesen. Bei dieser Ausleseart wird das Anregungslicht durch ein Objektiv auf die Probe gestrahlt und das Emissionslicht der Fluorophore über dasselbe Objektiv detektiert. Wird die Partox-Membran durch Epifluoreszenz-Mikroskopie ausgelesen, so werden die Fluorophore, die sich in unmittelbarer Nähe der SiO₂-Porenwand befinden, über Wellenleitermoden und Kompartimentmoden angeregt. Die Anregung der Fluorophore durch die Wellenleitermoden erfolgt über das evaneszente Feld der Lichtmoden in den SiO₂-Porenwänden. Bei der Anregung der Fluorophore über die Wellenleitermoden wird die Intensität des Anregungslichts in den wellenleitenden SiO₂-Porenwänden erhöht. Die Anregung der Fluorophore durch die Kompartimentmoden erfolgt über Wechselwirkungen der Lichtmoden, die sich innerhalb eines Kompartiments durch Reflexion und Brechung an den SiO₂-Porenwänden ausbreiten, mit den Fluorophoren. Da die Fluorophore in der Partox-Membran in die dritte Dimension, entlang der SiO₂-Porenwände, aufgestapelt sind,

wird bei der Anregung der Fluorophore über Wellenleitermoden und Kompartimentmoden die Wechselwirkungslänge des Anregungslichts mit den Fluorophoren im Vergleich zu planaren Substraten verlängert.

Der Anteil an Wellenleitermoden und Kompartimentmoden kann durch den Brechungsindex des Mediums innerhalb der Poren verändert werden. Durch Füllen der Poren mit einer Flüssigkeit (PEG-Lösung), die den gleichen Brechungsindex aufweist wie die SiO₂-Porenwände, wird der wellenleitende Effekt der SiO₂-Porenwände unterbunden. Die Anregung der Fluorophore erfolgt ausschließlich über die Kompartimentmoden. Ein Vergleich zwischen der Anregung der Fluorophore bei ungefüllten Poren und mit PEG-Lösung gefüllten Poren ermöglicht es, eine Aussage über den Einfluss der Wellenleitermoden auf die Anregung der Fluorophore zu treffen.

Zum Vergleich der Fluoreszenzsignale und Hintergrundsignale von Proben, deren Poren mit PEG-Lösung gefüllt sind, und Proben mit ungefüllten Poren werden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide mit einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (FP1-Cy3) auf die Oberfläche der Partox-Membran gespottet und immobilisiert. Das Auslesen einer Probe erfolgt durch Epifluoreszenz-Mikroskopie mit einem 5x-Objektiv, wobei sie erst mit ungefüllten Poren und dann nach Füllen der Poren mit PEG-Lösung ausgelesen wird. Die Partox-Membran wird für diese Versuchsreihe nicht auf eine Kunststoffspitze aufgeschmolzen, da die Reflexion des Anregungslichts am gebildeten Flüssigkeits-Meniskus der PEG-Lösung innerhalb der Kunststoffspitze zu einer Erhöhung des Hintergrundsignals führt.

In Tabelle 17 sind die Fluoreszenzsignale und Hintergrundsignale von Proben, deren Poren mit PEG-Lösung gefüllt sind, und Proben mit ungefüllten Poren, zusammengefasst.

Tabelle 17: Fluoreszenzsignale und Hintergrundsignale von Proben, deren Poren mit PEG-Lösung gefüllt sind, und Proben mit ungefüllten Poren.

Modifikation:	Spot [Grauwerte]	Hintergrund (HG) [Grauwert]	Signal (Spot-HG) [Grauwert]
Poren ungefüllt	11100	6900	4200
Poren mit PEG-Lösung gefüllt	14800	7100	7700

5x-Objektiv (NA=0,15)

Das Auslesen der Partox-Membran bei ungefüllten Poren ergibt ein Fluoreszenzsignal von 4200 Grauwerten, bei einem Hintergrundsignal von 6900 Grauwerten. Durch das Füllen der Poren mit PEG-Lösung wird bei gleicher

Belichtungszeit ein Signal von 7700 Grauwerten bei einem Hintergrundsignal von 7100 Grauwerten gemessen. Das Fluoreszenzsignal steigt bei nahezu gleichem Hintergrundsignal um den Faktor 2 an.

Bei ungefüllten Poren der Partox-Membran erfolgt die Anregung der Fluorophore neben den Kompartimentmoden auch über die Wellenleitermoden. Bei der Anregung der Fluorophore über die Wellenleitermoden wird die Intensität des Anregungslichts in den wellenleitenden SiO₂-Porenwänden erhöht. Eine Erhöhung der Intensität des Anregungslichtes in den SiO₂-Porenwänden bewirkt jedoch keine Signalerhöhung, da die Feldstärke und die Verteilung des evaneszenten Feldes in den wellenleitenden SiO₂-Porenwänden zu einem geringeren Überlappen des evaneszenten Feldes mit den Fluorophoren führt (Kapitel 4.2.4.1). Werden die Poren der Partox-Membran mit PEG-Lösung gefüllt, so erfolgt die Anregung der Fluorophore über die Kompartimentmoden. Bei der Anregung der Fluorophore über die Kompartimentmoden wird die Intensität des Anregungslichtes innerhalb der Membran nicht lokal erhöht. Der Anteil des Anregungslichtes, der in die Membran einkoppelt, wird jedoch gegenüber ungefüllten Poren erhöht, da die Reflexion des Anregungslichts verringert wird (Kapitel 4.2.1.1). Der erhöhte Anteil am Anregungslicht, welcher in die mit PEG-Lösung eingebettete Membran einkoppelt, sowie die mäßige Anregung der Fluorophore über die Wellenleitermoden bei ungefüllten Poren führen zu einem erhöhten Signal bei einer in PEG-Lösung eingebetteten Membran.

Die Güte der Wellenleitermoden, d.h. die Feldstärke und die Verteilung des evaneszenten Feldes in den wellenleitenden SiO₂-Porenwänden, könnte theoretisch durch eine zusätzliche 150-200 nm abgeschiedene hochbrechende dielektrische Schicht (z.B. Tantalpentoxid) verbessert werden. Die Erhöhung des Brechungsindex an der Außenseite der SiO₂-Porenwände könnte die Eindringtiefe und die Stärke des evaneszenten Feldes steigern und somit die Intensität des Anregungslichts lokal in der Nähe der Fluorophore erhöhen.

Die Dunkelfelddurchlicht-Fluoreszenz-Mikroskopie ist eine weitere Ausleseart der Partox-Membran, die eine Verbesserung zwischen dem Verhältnis von Fluoreszenzsignal zu Hintergrundsignal bewirken könnte. Bei der Dunkelfelddurchlicht-Fluoreszenzbeleuchtung wird das Anregungslicht der Fluorophore unter einem bestimmten Winkelspektrum von unten schräg auf die Partox-Membran gestrahlt. Das Emissionslicht wird auf der Oberseite der Membran detektiert. Diese Beleuchtungsart ermöglicht eine Trennung von Anregungslicht und Emissionslicht, da das Winkelspektrum des

Anregungslichts nicht mit der NA des Objektivs, zur Detektion des Emissionslichts, überlappt.

Erste Versuche mit einer Dunkelfelddurchlicht-Fluoreszenz-Beleuchtung zeigen in einer mit PEG-Lösung eingebetteten Partox-Membran die gleichen Signalintensitäten wie bei einer mit PEG-Lösung eingebetteten Partox-Membran, die durch Epifluoreszenz-Mikroskopie ausgelesen wird. Unter Verwendung einer Ringblende wird das Anregungslicht unter einem Winkelspektrum zwischen $5^\circ < \alpha < 30^\circ$ von unten auf die in PEG-Lösung eingebettete Partox-Membran gestrahlt. Das Emissionslicht der Fluorophore wird von einem 5x-Objektiv über der Membran detektiert. Gegenüber einer direkten Beleuchtung ist der Anteil am eingestrahlt Licht bei der Dunkelfeldbeleuchtung mit Ringblende sehr gering, da nur ein geringer Anteil des Anregungslichts aus der Beleuchtungsquelle die Ringblende passiert. Bei gleichem Anteil am eingestrahlt Anregungslicht könnte die Dunkelfeld-Durchlichtbeleuchtung bessere Signalintensitäten erzeugen als die Auflicht-Fluoreszenzbeleuchtung mit nahezu parallel eingestrahlt Anregungslicht. Dies müsste jedoch durch eine geeignete Beleuchtungsvorrichtung realisiert werden.

4.2.4.3 Ortsabhängiger Beitrag der Fluorophore am Fluoreszenzsignal

Es werden Versuchsreihen durchgeführt, um Fluorophore selektiv an die Oberfläche zu binden. Dabei soll deren ortsabhängiger Beitrag an der Gesamtfluoreszenz untersucht werden. Beim Auslesen der Partox-Membran wird das Emissionslicht der Fluorophore, welches innerhalb der dreidimensionalen Struktur erzeugt wird, flächig detektiert. Abhängig von der Lage in der Partox-Membran trägt jeder Fluorophor mit einem unterschiedlichen Beitrag zur Gesamtfluoreszenz bei, da hierbei die Anregung der Fluorophore, das Abstrahlverhalten der Fluorophore und die Ausbreitung des Emissionslichts innerhalb der Struktur durch die Lage der Fluorophore in der Partox-Membran beeinflusst werden.

Um den ortsabhängigen Beitrag der Fluorophore zu bestimmen, werden zwei verschiedene Verteilungsmöglichkeiten von Fluorophoren in der Struktur untersucht. Zum einen werden fluoreszenzmarkierte Proteine auf die Stirnfläche der SiO₂-Porenwände und zum anderen im oberen Teil an den SiO₂-Porenwänden gebunden. In beiden Versuchen wird nach Anregung der Fluorophore das Emissionslicht auf der Ober- und Unterseite unter Verwendung verschiedener Objektive gemessen, und es werden die Unterschiede der Fluoreszenzsignale verglichen.

Fluorophore an den SiO₂-Porenwänden

Der ortsabhängige Beitrag von fluoreszenzmarkierten Proteinen, die im oberen Teil der Partox-Membran an den SiO₂-Porenwänden anhaften, an der Gesamtfluoreszenz wird untersucht. Für die Herstellung wird die Unterseite der Membran mit einer Folie verschlossen und die Oberseite mit fluoreszenzmarkierter Proteinlösung bespottet. Die Proteinlösung wird nicht vollständig durch die Kapillarkräfte in die Partox-Membran gezogen, wenn eine Seite der Membran mit einer Folie verschlossen wird, da die Luft in den einseitig geschlossenen Poren nicht entweichen kann. Folglich wird die Luft in den Sacklöchern der einseitig verschlossenen Membran komprimiert und die Proteinlösung kann die Poren nur im oberen Teil der Membran füllen. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels kommt es zu einer Adsorption der Proteine an den SiO₂-Porenwänden.

Abbildung 33 zeigt einen Ausschnitt aus einem Bruch der Partox-Membran (20x20 Poren pro Kompartiment, 5 µm Porenraster, Kompartimentwandbreite: 1,5-faches des Porenrasters, Porenwanddicke 1,2 µm) nach der Adsorption von Proteinen.

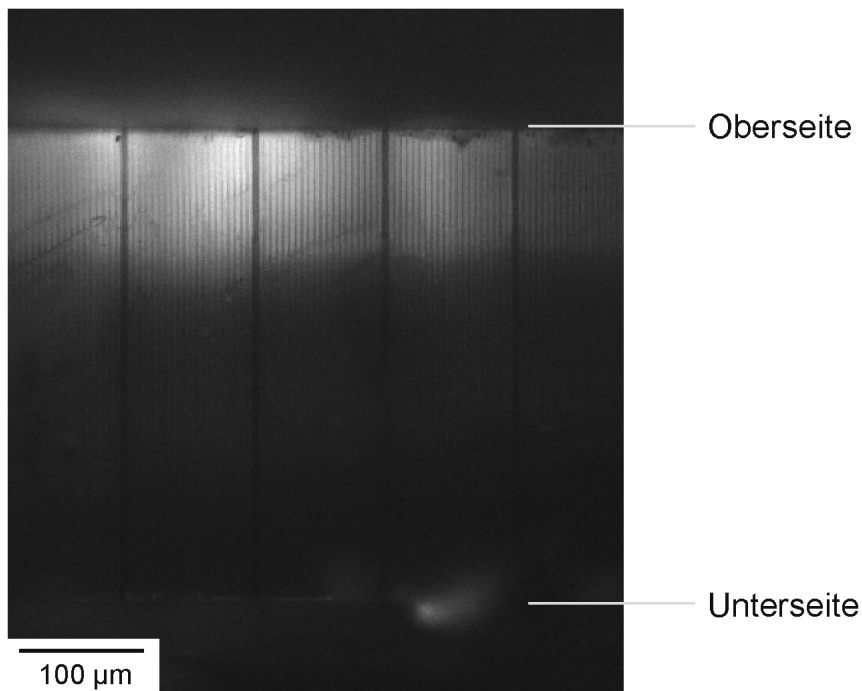


Abbildung 33: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Bruches durch eine Partox-Membran nach der Adsorption von Proteinen an den SiO₂-Porenwänden im oberen Drittel der Partox-Membran.

Die Unterseite der Partox-Membran wurde mit einer Folie verschlossen.

Eine verstärkte Adsorption der fluoreszenzmarkierten Proteine findet im oberen Drittel der Partox-Membran (120-150 μm) an den SiO_2 -Porenwänden statt, wenn die Unterseite der Partox-Membran mit einer Folie verschlossen wird. Die Luft in den Poren wird nur teilweise verdrängt beziehungsweise in der Protein-Lösung gelöst, so dass die Flüssigkeit vorwiegend in den oberen Teil in die Partox-Membran eindringt. Im unteren Teil der Membran haften an den SiO_2 -Porenwänden nur geringe Mengen von Proteinen. Werden die Fluorophore bei 480 nm angeregt, können unterschiedliche Fluoreszenzsignale auf Oberseite und Unterseite (mit Folie verschlossene Seite) in Abhängigkeit der NA des Objektivs gemessen werden.

Fluoreszenzmarkierte Proteine, welche im oberen Drittel der Partox-Membran an den SiO_2 -Porenwänden anhaften, zeigen beim Auslesen der Partox-Membran von der Oberseite ein 1,4-1,6-fach höheres Fluoreszenzsignal als beim Auslesen der Partox-Membran von der Unterseite (Tabelle 18). Das Verhältnis der Fluoreszenzsignale, welche an der Oberseite bestimmt werden, zu den Fluoreszenzsignalen, welche auf der Unterseite bestimmt werden, ist unabhängig von der NA der verwendeten Objektivs.

Tabelle 18: Fluoreszenzsignale von fluoreszenzmarkierten Proteinen, die im oberen Drittel an den SiO_2 -Porenwänden der Partox-Membran anhaften, in Abhängigkeit der verwendeten Objektivs beim Auslesen der Partox-Membran von der Ober- und Unterseite.

Objektiv / NA	Fluoreszenzsignal-Unterseite [Grauwerte]	Fluoreszenzsignal-Oberseite [Grauwerte]	Fluoreszenz-Oberseite / Fluoreszenz-Unterseite
5/0,15	5600	8000	1,4
10/0,3	10500	16300	1,6
20/0,5	8800	14400	1,6
50/0,8	11500	17700	1,5
100/0,9	8800	14200	1,6

Beim Auslesen der Partox-Membran von der Unterseite ist die Anregung der Fluorophore, welche sich im oberen Teil der Membran befinden, nicht so effektiv wie beim Auslesen der Partox-Membran von der Oberseite, da das Anregungslicht beim Durchgang durch die Partox-Membran durch Absorption am Restsilizium in den Kompartimentwänden abgeschwächt wird (Kapitel 4.2.2). Bei der Ausbreitung des Emissionslichts der Fluorophore innerhalb der Partox-Membran kommt es auch zur Abschwächung des Emissionslichts an dem Restsilizium der Kompartimentwände. Aufgrund der Abschwächung des Anregungslichts und Emissionslichts beim Auslesen der

Partox-Membran von der Unterseite verringert sich das Fluoreszenzsignal gegenüber dem Auslesen von der Oberseite.

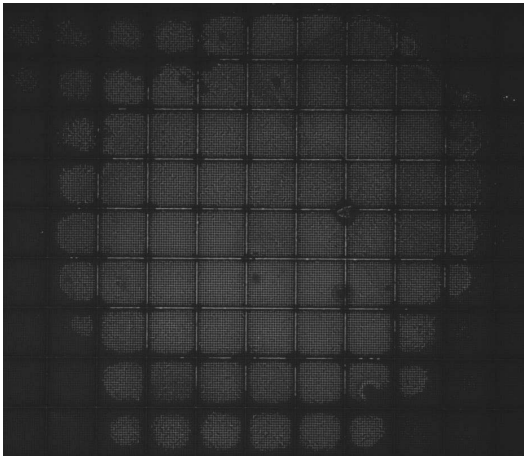
Fluoreszenzmarkierte Proteine, die in der oberen Hälfte (200-250 μm) in der Partox-Membran an den SiO_2 -Porenwänden gebunden sind, zeigen beim Auslesen der Partox-Membran von der Oberseite nur noch ein 1,2-1,3 fach höheres Fluoreszenzsignal als beim Auslesen der Partox-Membran von der Unterseite. Die Unterschiede zwischen dem Auslesen von der Oberseite und der Unterseite gleichen sich an, je tiefer die Poren mit Protein-Lösung gefüllt werden.

Zusammenfassend zeigen die Messungen, dass jeder Fluorophor auf der Oberfläche zur Gesamtintensität des Fluoreszenzlichts beiträgt. Je näher die Fluorophore an der auszulesenden Seite an den SiO_2 -Porenwänden anhaften, desto größer ist der Beitrag an der Gesamtintensität des Fluoreszenzlichts.

Fluorophore auf der Stirnseite der SiO_2 -Porenwände

Um den ortsabhängigen Beitrag der Fluorophore auf der Stirnseite der SiO_2 -Porenwände zu bestimmen, wird die Partox-Membran mit einem unstrukturierten PDMS-Stempel bedruckt (Abbildung 34).

(A) Bedruckte Seite



(B) Rückseite

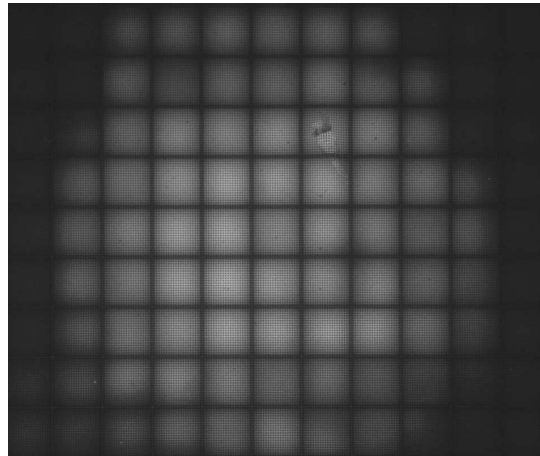


Abbildung 34: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der bedruckten Seite und der Rückseite einer Partox-Membran (10x-Objektiv).

Probe: Anzahl der Poren: 20x20; Porenraster: 5 μm ; Kompartimentwandbreite: 1,5-faches des Porenrasters; Porenwanddicke: 1,2 μm ; zusammenhängende Kompartments.

Das softlithographische Bedrucken mit einem PDMS-Stempel (Microcontactprinting) ermöglicht einen mechanischen Übertrag von fluoreszenzmarkierten Proteinen auf die Stirnfläche der Partox-Membran.

Fluoreszenzmarkierte Proteine, die auf der Stirnfläche der bedruckten Seite anhaften, zeigen unter rückseitiger Anregung und Messung des Emissionslichts und unter Verwendung eines Objektivs mit einer NA von 0,15 ein 1,7-faches höheres Fluoreszenzsignal als bei Anregung und Messung des Emissionslichtes von der bedruckten Seite (Tabelle 19). Mit steigender NA der Objektive verringert sich der Unterschied zwischen bedruckter Seite und Rückseite. Ab einer Objektivvergrößerung von 50x (NA= 0,8) zeigt die bedruckte Seite ein geringfügig größeres Fluoreszenzsignal als die Rückseite.

Tabelle 19: Fluoreszenzsignale von fluoreszenzmarkierten Proteinen, die auf der Stirnfläche der bedruckten Seite anhaften, in Abhängigkeit der verwendeten Objektive beim Auslesen einer Partox-Membran von der bedruckten Seite und der Rückseite.

Objektiv / NA	Fluoreszenzsignal bedruckte Seite [Grauwerte]	Fluoreszenzsignal Rückseite [Grauwerte]	Fluoreszenz-Oberseite / Fluoreszenz-Rückseite
5/0,15	20900	35500	1,70
10/0,3	28700	47500	1,66
20/0,5	18500	23400	1,26
50/0,8	13700	13200	0,96
100/0,9	13800	12500	0,91

Die unterschiedliche Abstrahlcharakteristik der fluoreszenzmarkierten Proteine auf der Stirnfläche der SiO₂-Porenwände und die unterschiedliche Anregung der Fluorophore erzeugen ein winkelabhängiges und ortsabhängiges Fluoreszenzsignal beim Auslesen der Partox-Membran von der bedruckten und von der Rückseite.

Aufgrund der unterschiedlichen Abstrahlcharakteristik der fluoreszenzmarkierten Proteine auf der Stirnfläche der SiO₂-Porenwände ist das Auslesen der Partox-Membran abhängig von der numerischen Apertur der verwendeten Objektive. Das Fluoreszenzsignal ist bei niedriger NA der verwendeten Objektive auf der Rückseite höher als auf der bedruckten Seite. Befindet sich ein Fluoreszenzmolekül in der Nähe eines optisch dichteren Mediums, so wird der größere Anteil des Emissionslichts in das optisch dichtere Medium abgestrahlt (Axelrod et al., 1989). Der größte Anteil des Emissionslichts wird somit in die SiO₂-Porenwände und der kleinere Anteil des Emissionslichts in die Umgebung (Luft) abgestrahlt. Unter der Annahme, dass das Emissionslicht der

Fluorophore, gemittelt über die Orientierung der Fluorophore, in das optisch dünnere Medium (Luft) in allen Richtungen mit gleicher Intensität abgestrahlt wird, steigt die Gesamtintensität des gemessenen Lichts auf der bedruckten Seite mit steigender numerischer Apertur des Objektivs. Innerhalb der Partox-Membran erfolgt die Ausbreitung des Emissionslichts hauptsächlich über Lichtmoden in den SiO₂-Porenwänden, wenn die fluoreszenzmarkierten Proteine auf der Stirnfläche der SiO₂-Porenwände gebunden sind. Die SiO₂-Porenwände strahlen das Emissionslicht auf der Rückseite unter dem gleichen Winkelspektrum ab, wie es in den SiO₂-Porenwänden eingekoppelt wird. Das abgestrahlte Winkelspektrum des Emissionslichts aus der Partox-Membran beträgt ca. 20-30 ° (Kapitel 4.2.1.2). Objektive mit kleiner NA erfassen demzufolge den größten Anteil des eingekoppelten Emissionslichts in den SiO₂-Porenwänden beim rückseitigen Auslesen der Membran.

Die Intensität des Anregungslichts wird beim rückseitigen Auslesen der Partox-Membran durch Reflexion an den gekrümmten Flächen der SiO₂-Porenspitzen und durch Adsorption am Restsilizium in den Kompartimentwänden abgeschwächt. Folglich ist die Anregung der Fluorophore von der Rückseite nicht so effektiv wie beim Anregen der Fluorophore von der bedruckten Seite.

Die schlechtere Anregung der Fluorophore beim rückseitigen Auslesen der Partox-Membran sowie die brechungsindexabhängige Abstrahlcharakteristik der Fluorophore führen auch zu den unterschiedlichen Fluoreszenzsignalen auf der bedruckten und der Rückseite.

Defektstellen in den wellenleitenden SiO₂-Porenwänden

Die selektive Adsorption von fluoreszenzmarkierten Proteinen auf die Stirnfläche der Partox-Membran ermöglicht neben der Bestimmung des ortsabhängigen Beitrags der Fluorophore an der Gesamtfluoreszenz auch die Bestimmung von möglichen Defektstellen in den wellenleitenden SiO₂-Porenwänden. Eine Experimentreihe soll über das Auskoppelverhalten des Lichts aus der Partox-Membran Aussagen über mögliche Defekte in den SiO₂-Porenwänden erlauben. Licht, welches unter Totalreflexion in einem Wellenleiter geführt wird, kann über Defektstellen innerhalb des Wellenleiters oder über Defektstellen an der Außenwand des Wellenleiters aus den wellenleitenden SiO₂-Porenwänden auskoppeln. Mit steigender Anzahl an Defektstellen koppelt immer mehr Licht aus dem Wellenleiter aus. Zur besseren Interpretation der Auskoppelrate werden fluoreszenzmarkierte Proteine auf die Stirnfläche der Partox-Membran mit einem

strukturierten PDMS-Stempel gedruckt. Ist das abgedruckte Muster noch auf der gegenüberliegenden Seite deutlich erkennbar, kann davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der Defektstellen in den wellenleitenden SiO_2 -Porenwänden geringfügig ist.

Abbildung 35 zeigt eine Fluoreszenzaufnahme der bedruckten Seite und der Rückseite der Partox-Membran nach dem μCP mit einem strukturierten PDMS-Stempel. Die Kompartimentwände mit Restsilizium (helle horizontale und vertikale Linien) und die restlichen bedruckten Stellen leuchten durch die fluoreszenzmarkierte Proteine auf der bedruckten Seite hell auf. Die nicht bedruckten Stellen, sind auf der bedruckten Seite (Abbildung 35 A) als schwarze Rechtecke (teilweise hell-gestrichelt markiert) und schwarze Linien (leicht verdrehte schwarze Gitterstruktur) sichtbar.

(A) Bedruckte Seite

(B) Rückseite

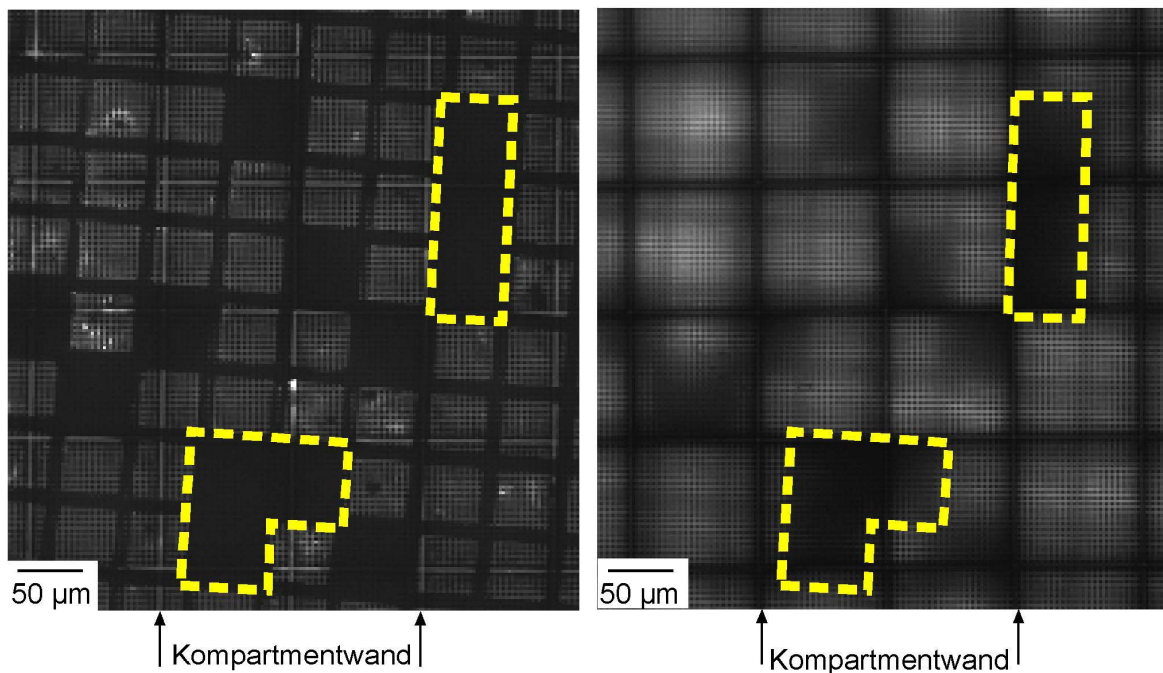


Abbildung 35: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der bedruckten Seite und der Rückseite der Partox-Membran nach dem μCP mit fluoreszenzmarkierten Proteinen (10x-Objektiv).

Auf der Rückseite des Substrates erscheinen die Kompartimentwände mit einem Kern aus Restsilizium dunkel (schwarze horizontale und vertikale Linien). Die nicht bedruckten Stellen, schwarze Quadrate (teilweise hell-gestrichelt markiert), sind auf der Rückseite ebenfalls sichtbar. Sogar die dünnen nicht bedruckten Linien (ca. $10\ \mu\text{m}$ breit) sind noch auf der Rückseite erkennbar.

Fluoreszenzmarkierte Proteine, die auf der Stirnfläche der SiO_2 -Porenwände anhaften, koppeln bevorzugt das Emissionslicht in die SiO_2 -Porenwände ein. Die

Ausbreitung des Emissionslichts erfolgt hauptsächlich über Lichtmoden in den SiO₂-Porenwänden. Die getragenen Lichtmoden koppeln nur geringfügig aus den SiO₂-Porenwänden aus, da ein deutlicher Kontrast der abgedruckten Struktur des PDMS-Stempels bei rückseitiger Betrachtung sichtbar ist. Da kaum Streulicht entsteht, wird davon ausgegangen, dass nahezu keine Defekte an der Oberfläche der SiO₂-Porenwände sowie Einschlüsse oder Mikrorisse innerhalb der SiO₂-Porenwände vorhanden sind.

4.3 Charakterisierung als Mikroarray

4.3.1 Oberfläche

Die Größe der Sensoroberfläche spielt eine entscheidende Rolle, für die Detektionsgrenze einer Mikroarrayplattform. Mit steigender Anzahl an Bindungsplätzen pro Spot steigt nach dem Massenwirkungsgesetz bzw. der Langmuir-Isotherme die absolute Intensität des Fluoreszenzsignals linear an.

Eine große Oberfläche führt zu einem hohen absoluten Fluoreszenzsignal und erlaubt die Verringerung der Belichtungszeit einer CCD- Kamera, welche benötigt wird, um genügend Fluoreszenzlicht zu erfassen. Die Verringerung der Belichtungszeit hat drei positive Effekte auf das Verhältnis von Fluoreszenzsignal zu Hintergrundsignal. Kürzere Belichtungszeiten verringern:

- den Anteil am zurückreflektierten Anregungslicht, welches das Hintergrundsignal mit steigender Belichtungszeit stetig erhöht;
- das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe, welche das Fluoreszenzsignal erniedrigt;
- das Rauschen der CCD-Kamera, welches von der Sensorelektronik herrührt.

In planaren Mikroarray-Systemen besteht die Möglichkeit die absolute Anzahl an Bindungsplätzen durch Vergrößerung des Spotdurchmessers zu erhöhen. Der Übergang von einem planaren Mikroarraysubstrat zu einer dreidimensionalen porösen Struktur geht mit einer Erhöhung der Bindungsplätze einher, ohne den Spotdurchmesser zu vergrößern. Die Partox-Membran hat eine 180-fach größere Oberfläche im Vergleich zu einem planaren Substrat. Die größere Oberfläche der Partox-Membran lässt erwarten, dass nur 1/180 der Belichtungszeit benötigt wird, um das gleiche Fluoreszenzsignal auszulesen. Unter der Annahme, dass die Partox-Membran die gleiche Probedichte an Fängermolekülen (festphasengebundene Oligonukleotide; Proben) aufweist wie ein planares Glassubstrat, und dass die gesamte Oberfläche in der Partox-Membran zu gleichen Teilen zum Signal beiträgt, kann die Partox-Membran ein 180-fach höheres Fluoreszenzsignal gegenüber dem planaren Glassubstrat erzeugen. Das Hintergrundsignal der unspezifischen Bindungen erhöht sich jedoch um denselben Betrag. Folglich ist das Verhältnis von Fluoreszenzsignal zu Hintergrundsignal aus unspezifischen Bindungen bei der Partox-Membran und bei einem planaren Glassubstrat gleich.

Es muss jedoch beachtet werden, dass ein Hybridisierungsereignis von Oligonukleotiden nur dann noch detektiert werden kann, wenn das absolute Fluoreszenzsignal höher ist als das Gesamthintergrundsignal. Abhängig von der Empfindlichkeit der Detektionseinheit bzw. der Intensität des Gesamthintergrundsignals muss eine bestimmte Anzahl an Target-Molekülen (fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide) aus der Hybridisierungslösung an der Oberfläche gebunden werden. Folglich muss eine bestimmte Anzahl an Bindungsplätzen, immobilisierte Moleküle an der Sensoroberfläche, vorhanden sein.

Abbildung 36 zeigt, dass eine höhere Anzahl an verfügbaren Bindungsplätzen auf der Sensoroberfläche einen höheren Anteil an fluoreszenzmarkierten Targetmolekülen aus der Lösung an die Oberfläche bindet und ein erhöhtes Fluoreszenzsignal erzeugt.

Der Nachweis der Wirksamkeit der Oberfläche lässt sich durch folgendes Experiment erbringen: Um eine unterschiedliche Anzahl an verfügbaren Bindungsplätzen pro Spot und somit unterschiedlich große Oberflächen zu simulieren, werden unterschiedliche Konzentrationen an Festphasenoligonukleotiden 1 (c_{Probe} : $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ und $50 \mu\text{mol L}^{-1}$) auf der Partox-Membran gespottet und über Nacht immobilisiert. Die immobilisierte Partox-Membran wird mit unterschiedlichen Stoffmengen an Targetmolekülen hybridisiert (n_{Target} : $0,5 \text{ fmol}$, 5 fmol und 50 fmol).

Abbildung 36 zeigt die Fluoreszenzsignale in Abhängigkeit von der Stoffmenge an Targetmolekülen in der Hybridisierungslösung bei unterschiedlichen gespotteten Probenkonzentrationen.

Der Einfluss der Bindungsplätze pro Spot auf die Detektionsgrenze wird deutlich, wenn die Fluoreszenzsignale für eine Targetstoffmenge von $0,5 \text{ fmol}$ (Abbildung 36; horizontale Daten bei $\log(\text{Target})$ von $-15,3$) in Abhängigkeit der gespotteten Probenkonzentration verglichen werden. Geringe Stoffmengen an Targetmolekülen ($0,5 \text{ fmol}$) können nur detektiert werden, wenn die gespottete Probenkonzentration $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ und höher ist. Liegen zu wenig Bindungsplätze auf der Sensoroberfläche vor ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ gespottete Probenkonzentration), so ist bei einer geringen Targetstoffmenge ($0,5 \text{ fmol}$) die Anzahl der Moleküle, welche an den Probenmolekülen an der Oberfläche des Sensors binden, so gering, dass diese nicht mehr detektiert werden können. Erst bei einer Targetstoffmenge von 5 fmol (Abbildung 36; horizontale Daten bei $\log(\text{Target})$ von $-14,3$) binden bei einer geringen Anzahl an verfügbaren Bindungsplätzen auf der Sensoroberfläche ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ gespottete Probenkonzentration) genügend

fluoreszenzmarkierte Targetmoleküle, so dass ein detektierbares Fluoreszenzsignal erzeugt wird.

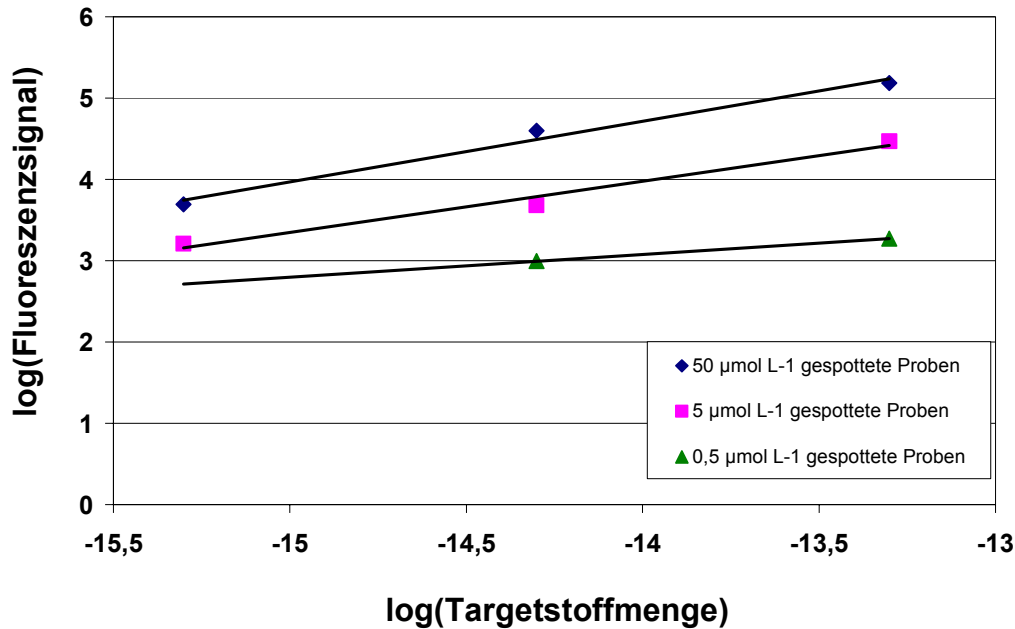


Abbildung 36: doppelt-logarithmische Auftragung der Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Targetstoffmengen bei drei unterschiedlichen gespotteten Probenkonzentrationen.

Hybridisierungsbedingung: Target: 27-mer DNA; Na⁺-Konzentration: 1 mol L⁻¹;
Hybridisierungstemperatur: 42 °C.

Verfügt eine Mikroarrayplattform folglich über eine große zugängliche Oberfläche zur Immobilisierung von Targetmolekülen, können mit dieser großen Oberfläche geringere Mengen an Targetmolekülen nachgewiesen werden, als bei einer Plattform mit kleinerer Oberfläche. Aufgrund der größeren Oberfläche der Partox-Membran im Vergleich zu planaren Plattformen, sollte bei gleicher Probenkonzentration an Fängermolekülen eine niedrigere Nachweisgrenze vorliegen.

Mit zunehmender Targetstoffmenge bei gleichbleibender gespotteter Probenkonzentration ist ein linearer Anstieg des Fluoreszenzsignals in Abbildung 36 festzustellen. Mit zunehmender Targetstoffmenge liegen mehr Moleküle in der Hybridisierungslösung vor und binden sich vermehrt an die Probenmoleküle an der Oberfläche. Die unterschiedlichen Steigungen der drei Geraden in Abbildung 36 entsprechen unterschiedlichen Tangenten an der Langmuir-Isotherme. Der charakteristische Kurvenverlauf der Langmuir-Isotherme steigt bei niedrigen Targetkonzentrationen stark an (niedrige Belegungsichte) und flacht bei hohen

Targetkonzentrationen (höherer Belegungsdichte) ab (Peterson et al., 2001; Peterson et al., 2002). Bei niedrigen Konzentrationen an gespotteten Probenmolekülen ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) sind weniger Bindungsplätze vorhanden als bei hohen Konzentrationen an gespotteten Probenmolekülen ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eine Hybridisierung bei niedrig gespotteter Probenkonzentration findet somit bei einer höheren Belegungsdichte statt als bei höher gespotteter Probenkonzentration, da eine geringere Anzahl an Probenmolekülen für die Hybridisierung der Targetmoleküle zur Verfügung stehen. Die Steigungen der Geraden in Abbildung 36 sind dementsprechend bei geringen Probenkonzentrationen flach, da die Hybridisierung bei einer hohen Belegungsdichte stattfindet und steigen mit zunehmender gespotteter Probenkonzentration an.

Die Steigerung der Anzahl an Fängermolekülen ist durch eine Erhöhung der Probedichte nur bis zu einem gewissen Grad möglich, da die Effektivität der Hybridisierung und die Kinetik der Hybridisierung entscheidend von der Probedichte abhängen (Peterson et al., 2001). Mit steigender Probedichte nimmt der Abstand zwischen den Probenmolekülen ab. Ist die Probedichte zu hoch, wird aufgrund sterischer Hinderungen und Coulomb-Wechselwirkungen das Binden der Targetmoleküle erschwert. Optimale Probedichten für silanisierte Glasoberflächen liegen zwischen 10^{12} und 10^{13} Probenmoleküle cm^{-2} (Bamdad, 1998; Southern et al., 1999). Wird die Partox-Membran mit einer Probenkonzentration von $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ immobilisiert, liegen bei einer silanisierten Oberfläche der Partox-Membran in der Größenordnung von $6 * 10^{12}$ Probenmoleküle cm^{-2} vor (Steel et al., 2000).

4.3.2 Bestimmung der Hybridisierungskinetik

Ein effektives Mischen der Analytlösung und eine Rezirkulation der Analytlösung durch die Partox-Membran sind für die Hybridisierung notwendig, damit die Targetmoleküle systematisch an der Oberfläche der fluidisch voneinander isolierten Porenkanäle vorbeiströmen, um an den entsprechenden komplementären Probenmoleküle auf der Oberfläche der Partox-Membran zu binden. Eine 1 cm^2 große Partox-Membran weist mehrere Millionen Porenkanäle auf. Ein Spot auf der Partox-Membran, welcher komplementäre Probenmoleküle an der Oberfläche der Porenkanäle trägt und einen Durchmesser von $300 \mu\text{m}$ aufweist, weist hingegen ca. 2000 Porenkanäle auf. Wenn sich ein Targetmolekül innerhalb eines Porenkanals befindet, kann es nicht seitlich in einen anderen Porenkanal gelangen. Nur durch effektives Mischen der Analytlösung und eine Rezirkulation der Analytlösung durch die Membran besteht die Möglichkeit der effektiven

Bindung von Targetmolekülen mit den entsprechenden Probenmolekülen auf der Sensoroberfläche.

Für die Ermittlung der Hybridisierungskinetik wird die Proben-Lösung (FP1) mit einer Konzentration von $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ gespottet. Die Hybridisierung erfolgt mit einer Target Konzentration (K1) von 10 nmol L^{-1} in $100 \mu\text{l}$ Hybridisierungsvolumen und bei einer Hybridisierungstemperatur von $42 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Hybridisierungslösung wird mit Hilfe des automatischen Pipettiersystems bei unterschiedlichen Frequenzen durch die Membran auf- und abgepumpt.

Für die Messung der Hybridisierungskinetik wird aller 3-10 Minuten ein Bild unter 5-facher Vergrößerung mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Die aus den sechs Spots resultierenden Fluoreszenzsignale werden gemittelt. Die gemittelten Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Hybridisierungszeiten werden auf das maximal gemittelte Fluoreszenzsignal normiert und über die Hybridisierungszeit aufgetragen. Das maximale Fluoreszenzsignal innerhalb der gemessenen Zeit wird als 100 % Hybridisierung angenommen, obwohl der Gleichgewichtszustand wahrscheinlich noch nicht vollständig erreicht ist. Die Zeit bis sich der Gleichgewichtszustand einstellt, kann bei planaren Mikroarrays mehr als 22 Stunden betragen (Toegl et al., 2003).

Die Hybridisierungskinetik ist in Abbildung 37 dargestellt.

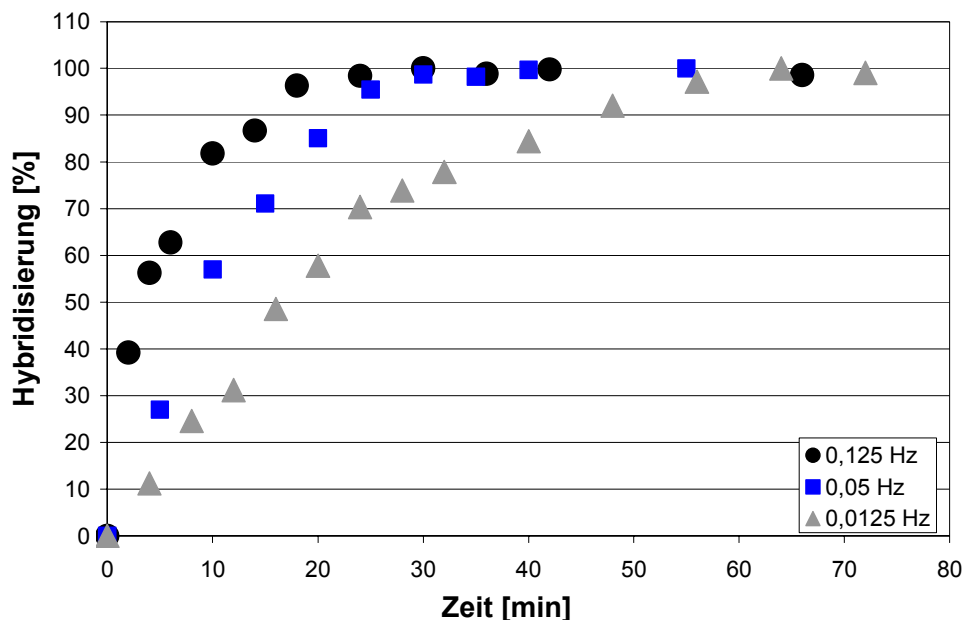


Abbildung 37: Verlauf der Hybridisierungskinetiken für 27-mer Oligonukleotid bei unterschiedlichen Pumpfrequenzen.

Hybridisierungsbedingung: Targetkonzentration: 10 nmol L^{-1} ; gespottete Probenkonzentration: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; Na^+ -Konzentration: 1 mol L^{-1} ; Hybridisierungstemperatur: $42 \text{ }^\circ\text{C}$.

Die drei abgebildeten Kurvenverläufe unterscheiden sich in den Frequenzen, mit der die Hybridisierungslösung durch die Membran auf- und abgepumpt wird. Bei einer Pumpfrequenz von 0,125 und von 0,05 Hz wird der stationäre Zustand nach 25-30 Minuten erreicht. Bei einer niedrigeren Pumpfrequenz (0,0125 Hz) wird der stationäre Zustand erst nach 60 Minuten erreicht.

Ein Pumpzyklus setzt sich aus einer Ansaugphase der Hybridisierungslösung, einer Ruhephase, einer Ausströmphase und einer weiteren Ruhephase zusammen (Abbildung 38). In beiden Ruhephasen sind die Mikrokanäle der Partox-Membran mit Flüssigkeit gefüllt. Für die in Abbildung 37 gezeigten Hybridisierungskinetiken betragen die Ansaug- und Ausströmphase jeweils 2 Sekunden, wohingegen die Ruhephasen variieren.

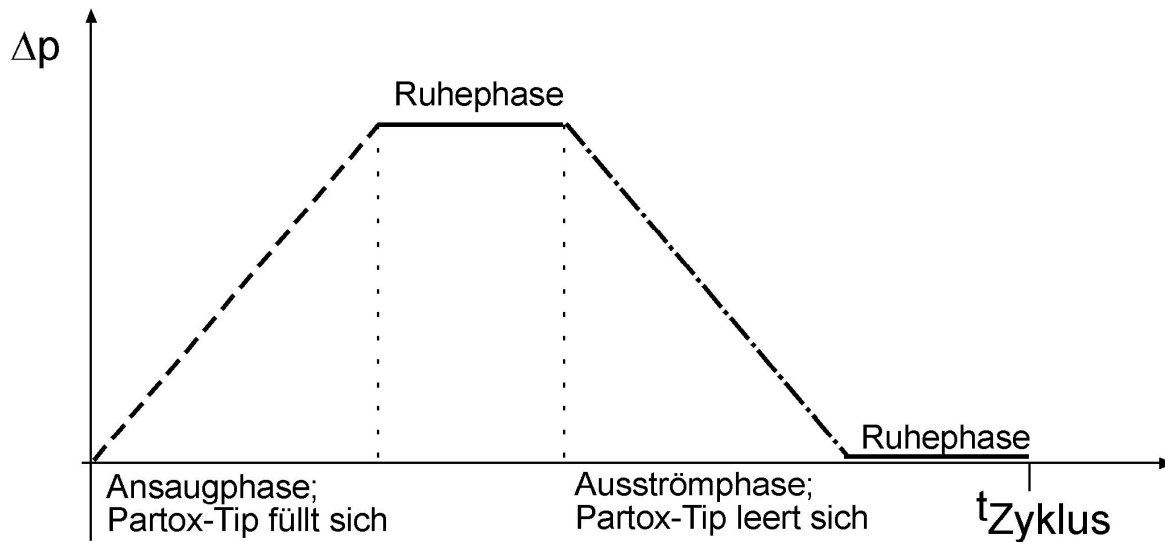


Abbildung 38: schematische Darstellung eines Pumpzyklus.

Variable: Ansaugphase, Ruhephase und Ausströmphase.

Die Pumpfrequenz kann allgemein durch Änderung der Ruhephasen oder durch Variation der Ansaug- und Ausströmphase verändert werden. Weitere Versuche zur Hybridisierungskinetik zeigen, dass durch systematisches Erniedrigen und Erhöhen der Ruhephasen (0-38 Sekunden) bzw. Ansaug- und Ausströmphase (1-10 Sekunden) mindestens 70-90 Pumpzyklen innerhalb von 25-30 Minuten nötig sind, bis sich ein stationärer Zustand einstellt. Dies entspricht einer Pumpfrequenz von 0,06 Hz. Bei einer Pumpfrequenz kleiner 0,06 Hz stellt sich der stationäre Zustand nach 70-90 Pumpzyklen ein. Wird die Hybridisierungslösung mit einer Pumpfrequenz von größer 0,06 Hz durch die Membran gepumpt, d.h. mehr als 70-90 Pumpzyklen innerhalb von 25-30 Minuten, stellt sich der stationäre Zustand trotzdem erst nach 25-30 Minuten ein. Bei ständiger

Rezirkulation der Analytlösung, d.h. keine Ruhephasen innerhalb eines Zyklus, wird der stationäre Zustand auch erst nach 25-30 Minuten erreicht. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die Hybridisierungsreaktion bei intensiver Durchmischung der Hybridisierungslösung (Pumpfrequenz von $> 0,06$ Hz) reaktionskontrolliert sein dürfte.

Abschätzung der nötigen Pumpzyklen bis zum Erreichen des stationären Zustands

Eine statistische Betrachtung des Zusammenhangs zwischen der Anzahl der nötigen Pumpzyklen und dem Erreichen des stationären Zustandes könnte die experimentellen Ergebnisse erklären. Für diese Betrachtung werden folgende Annahmen getroffen:

- ein Targetmolekül wird nie an derselben Stelle auf- und abgepumpt;
- die Analytlösung wird über und unterhalb der Membran so gut durchmischt, dass ein Targetmolekül die gleiche Pore nicht mehrmals durchläuft;
- die Target-DNA bindet an die Proben-DNA sobald sie durch die passende Pore transportiert wird und auf die komplementäre Proben-DNA trifft;
- die Diffusion innerhalb der Poren wird vernachlässigt.

Die Berechnung der Wahrscheinlichkeit, dass ein Targetmolekül auf das komplementäre Probenmolekül trifft, erfolgt auf der Basis des Verhältnisses der Spotfläche zu der Substratfläche. Im vorliegenden Versuch befinden sich sechs Spots auf einer Partox-Membran. Die Spots weisen einen Radius von $150 \mu\text{m}$ auf. Die resultierende Fläche der sechs Spots ($A_{6\text{Spot}}$) beträgt ca. $4,2 \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$. Die aktive Substratfläche (A_{Substrat}) nach dem Aufkleben des Substrates auf einer abgeschnittenen Pipettenspitze beträgt ca. $6,4 \cdot 10^7 \mu\text{m}^2$, da der Innenradius der abgeschnittenen Spitze $4,5 \text{ mm}$ aufweist. Aus der Substratfläche und der Fläche von sechs Spots wird das Verhältnis ($A_{\text{Substrat}}/A_{6\text{Spots}}$) von 152 berechnet. Die Hybridisierungslösung muss folglich 152-mal durch die Partox-Membran gepumpt werden, damit jede Target-DNA, unter der Annahme der perfekten Mischung, auf ihre komplementäre Proben-DNA in den Mikrokanälen treffen kann. Dies entspricht 76 Pumpzyklen, da innerhalb eines Pumpzyklus (Ansaugphase und Ausströmphase) die Hybridisierungslösung zweimal durch die Partox-Membran gepumpt wird. Die theoretisch berechnete Anzahl der Pumpzyklen stimmt mit der Anzahl der Pumpzyklen, welche bei der Bestimmung der Hybridisierungskinetik experimentell ermittelt wurde, überein.

Da die Hybridisierungszeit von der Länge der Oligonukleotide abhängig ist, wird in einem weiteren Versuch die Hybridisierungskinetik für längere DNA Moleküle (cDNA mit ca. 500 b) untersucht. Hierfür wird die Proben-Lösung (Amin-Oligo 1, Stratagene) mit einer Konzentration von $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ auf die Partox-Membran gespottet. Humane RNA wird über eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Da die Proben-DNA (Amin-Oligo 1, Stratagene) einen T_m von $79 \text{ }^\circ\text{C}$ aufweist, beträgt die Standardhybridisierungstemperatur $54 \text{ }^\circ\text{C}$. Um die Verdunstung der Hybridisierungslösung zu senken, wird die Hybridisierungstemperatur durch Zugabe von 36 Vol. % Formamid auf $43 \text{ }^\circ\text{C}$ reduziert. Die Hybridisierung erfolgt bei einer cDNA-Konzentration von ca. 65 pmol L^{-1} in $300 \mu\text{l}$ Hybridisierungsvolumen und bei einer Hybridisierungstemperatur von $43 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Hybridisierungslösung wird mit Hilfe des automatischen Pipettiersystems bei einer Pumpfrequenz von $0,1 \text{ Hz}$ durch die Membran auf- und abgepumpt.

Die Hybridisierungskinetik für lange Oligonukleotide ist in Abbildung 39 dargestellt.

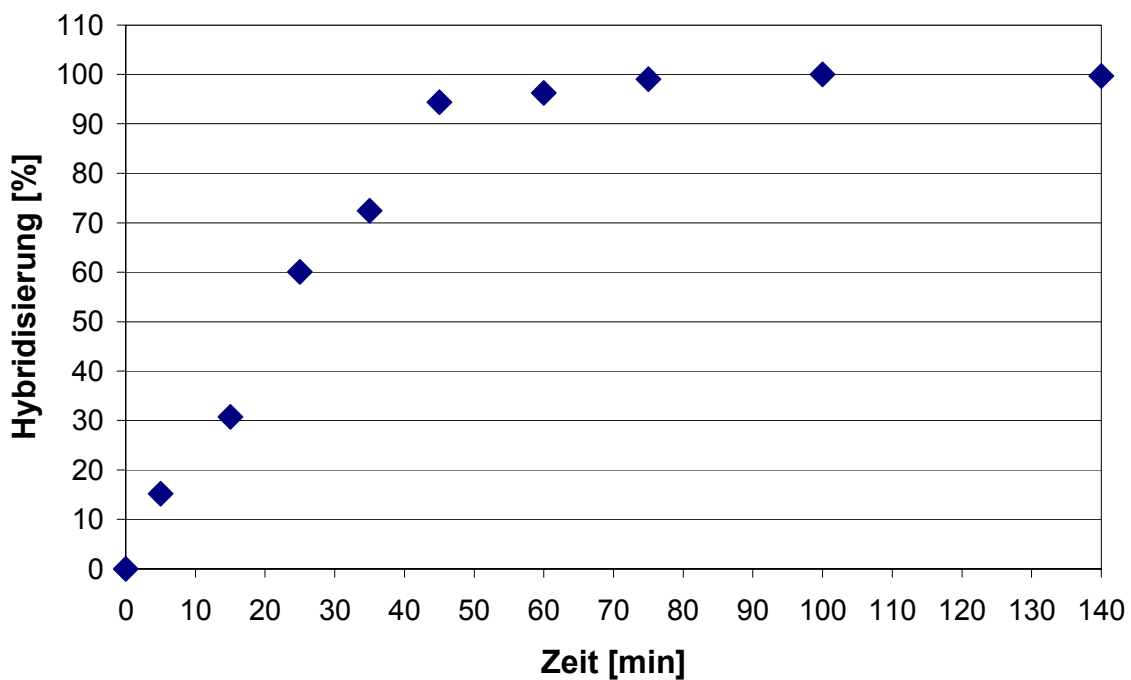


Abbildung 39: Verlauf der Hybridisierungskinetik für cDNA (ca. 500 b) bei einer Pumpfrequenz von $0,1 \text{ Hz}$.

Hybridisierungsbedingung: Targetkonzentration: 65 pmol L^{-1} ; gespottete Probenkonzentration: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; Na^+ -Konzentration: 1 mol L^{-1} ; Formamid: 6 Vol. %; Hybridisierungstemperatur: $43 \text{ }^\circ\text{C}$.

Bei einer Pumpfrequenz von $0,1 \text{ Hz}$ wird der stationäre Zustand nach 60-70 Minuten erreicht. Die Zeit bis zum Erreichen des stationären Zustandes erhöht sich bei den

langen Oligonukleotiden (500 b) gegenüber den kurzen Oligonukleotiden (27 b) um den Faktor 3. Der Einfluss der Pumpfrequenz auf die Hybridisierungskinetik der langen Oligonukleotide sollte sich ähnlich verhalten wie bei den kurzen Oligonukleotiden und wurde deshalb nicht untersucht.

Ein direkter Vergleich der Hybridisierungszeit zwischen planaren Mikroarrays und den porösen Partox-Membranen ist wenig sinnvoll, da die Zahl der Targetmoleküle, die ihre komplementären Probenmoleküle innerhalb einer bestimmten Zeit erreichen, ausschlaggebend ist.

4.3.3 Spezifität

Unter Spezifität in einem Mikroarray-Experiment wird die Diskriminierung ähnlicher DNA-Sequenzen verstanden. Die Diskriminierung eines Perfect Match, d.h. zwei vollständig komplementäre Oligonukleotide, von einem Single Mismatch, d.h. zwei Oligonukleotide, die in einer Base nicht komplementär sind, ist wichtig für die Detektion von Nukleotid-Polymorphismen (SNP's).

Im vorliegenden Versuch wird untersucht, inwieweit ein Perfect Match von einem Single Mismatch, einem Double Mismatch und einem nichtbindenden Oligonukleotid unterschieden werden kann. Hierfür werden die Festphasenoligonukleotide FP1, FP2, FP3 und FP4 (Tabelle 20) in einer Konzentration von $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ auf die Partox-Membran gespottet.

Tabelle 20: unterschiedliche Oligonukleotid-Sequenzen, deren Länge und deren Schmelztemperatur.

Nomenklatur	Oligonukleotid- Sequenz	Länge	T _m [°C]
FP1 , Perfect Match (PM)	NH ₂ -5'-GCCCTCACGATTCTTC -3'	17-mer	54
FP2, Mismatch (MM)	NH ₂ -5'-TGCCCTCACAAATCTCTTC-3'	18-mer	54
FP3, Double Mismatch (DM)	NH ₂ -5'-TGCCCTCACACTCTCTTC -3'	18-mer	56
FP4, None Binding (NB)	NH ₂ -5'-CGTCTACGTCAGATACGT -3'	18-mer	54
K1	3'-TTTTTCGGGAGTGCTAGAGAAGT TTTT-5'-Cy3	27-mer	74

Die Sequenz der Festphasenoligonukleotide unterscheidet sich in den grau hinterlegten Bereichen.

Das Target K1 (1 pmol in 100 μl) bildet mit FP1 einen Perfect Match, mit FP2 einen Single Mismatch, mit FP3 einen Double Mismatch, und an FP4 sollte es nicht binden.

Nach der Hybridisierung bei 42 °C erfolgt das Waschen bei RT unter stringenten Bedingungen. Durch die schrittweise Verminderung der Salzkonzentration wird die Stringenz sukzessive erhöht. Weniger stabile Doppelstränge werden abgewaschen und die Diskriminierung von Perfekt Match, Single Mismatch, Double Mismatch und nichtbindenden Oligonukleotiden erhöht.

Die Fluoreszenzaufnahme des DNA-Hybridisierungsexperiments von Perfekt Match (PM), Single Mismatch (MM), Double Mismatch (DM) und nichtbindenden Oligonukleotiden (NB) ist in Abbildung 40 A dargestellt. Abbildung 40 B zeigt eine schematische Zeichnung des Spottingmusters für das Diskriminierungs-Experiment.

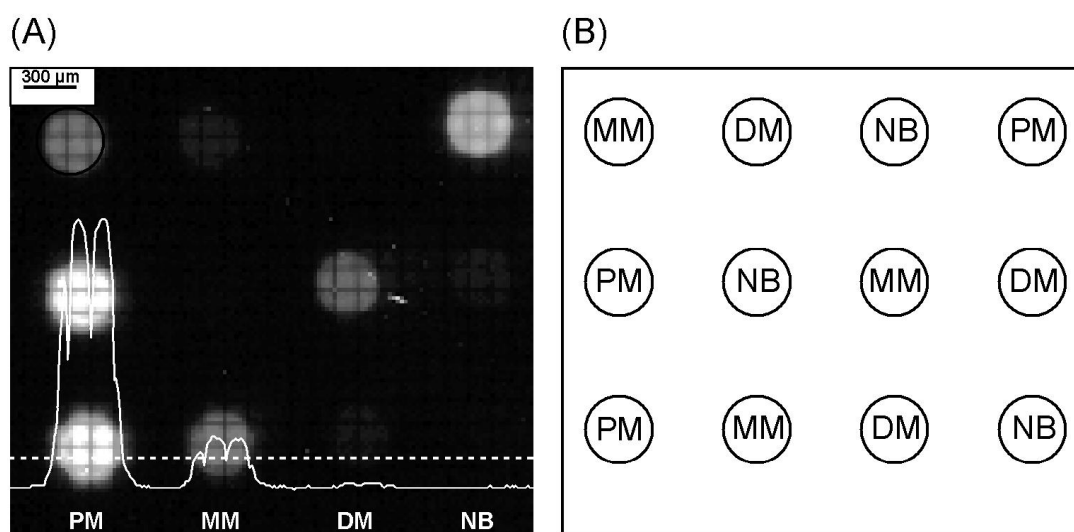


Abbildung 40: Fluoreszenzaufnahme des DNA-Hybridisierungsexperiments (A) und Zuordnung der Spots (B).

PM: Perfekt Match; Single Mismatch: MM; Double Mismatch: DM; nichtbindenden Oligonukleotide: NB. Die gestrichelte Linie gibt die Position an, bei der die Intensitätsverteilung (weiße Linie) der 4 Spots bestimmt wird.

Hybridisierungsbedingung: Target: 27-mer DNA; Targetkonzentration: 1 pmol; gespottete Probenkonzentration: 50 µmol L⁻¹; Na⁺-Konzentration: 1 mol L⁻¹; Hybridisierungstemperatur: 42 °C.

Die unterste Reihe der Fluoreszenzaufnahme zeigt vier Spots. Der helle Spot kennzeichnet den Perfekt Match (PM), der graue Spot den Single Mismatch (MM), der Double Mismatch (DM) ist gerade noch sichtbar und die nichtbindenden Oligonukleotide (NB) sind nicht sichtbar. Die gestrichelte Linie gibt die Position an, bei der die Intensitätsverteilung (weiße Linie) der 4 Spots bestimmt wird. Nach dem stringenten Waschen zeigt der Perfekt Match ein 4-mal höheres Signal als der Single Mismatch und ein 11-mal höheres Signal als das Double Mismatch. Die nichtbindenden Oligonukleotide können nicht detektiert werden.

Der Single Mismatch verursacht aufgrund seines Basenaustausches eine verminderte Stabilität des DNA Doppelstrangs, so dass im Gegensatz zum Perfect Match eine geringere Anzahl an Targetmolekülen an die Probenmoleküle bindet. Die Hybridisierung mit einem Single Mismatch führt entsprechend zu einer niedrigeren Intensität des Fluoreszenzsignals als die Hybridisierung mit einem Perfekt Match. Die Ursache für das noch geringere Signal im Fall des Double Mismatch gegenüber dem Single Mismatch liegt in einer noch stärkeren Destabilisierung der DNA Doppelhelix, die durch einen zweiten Basenaustausch hervorgerufen wird. Dies führt zu einer noch geringeren Anzahl an gebunden Oligonukleotiden. Im Falle der nichtbindenden Oligonukleotide können die Targetmoleküle aufgrund der geringen Sequenzhomologie nicht binden und somit ist auch kein Signal sichtbar.

In einem weiteren Versuch wird der Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf die Single-Nucleotide-Polymorphismen-Analyse untersucht. Hierfür wird der gleiche Versuchsaufbau wie oben beschrieben verwendet. Die Proben werden jedoch bei unterschiedlichen Temperaturen hybridisiert. Abbildung 41 zeigt die Fluoreszenzsignale des DNA-Hybridisierungsexperiments von Perfekt Match, Single Mismatch, Double Mismatch bei unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen. Die nichtbindenden Oligonukleotide können bei den unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen nicht detektiert werden.

Die Signalintensität der einzelnen Oligonukleotide steigt mit abnehmender Hybridisierungstemperatur, was mit einer höheren Renaturierungsrate bei niedrigeren Hybridisierungstemperaturen gleichzusetzen ist. Die Differenzierung zwischen PM/MM sowie zwischen PM/DM sind jedoch bei 42 °C, 12 ° unterhalb des T_m am größten und bei 60 °C, 6 ° oberhalb T_m , am kleinsten (Tabelle 21). Der relativ geringe Unterschied in der Schmelztemperatur zwischen PM, MM und DM führt bei Hybridisierungstemperaturen oberhalb der Schmelztemperatur zu einer niedrigen Renaturierungsrate und somit zu einer schlechten Differenzierung (Hutton, 1977; Wetmur, 1991).

Tabelle 21: relative Fluoreszenzsignale bei unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen.

Hybridisierungstemperatur [°C]	Fluoreszenzsignal-PM/ Fluoreszenzsignal-MM	Fluoreszenzsignal-PM/ Fluoreszenzsignal-DM
32	2,0	3,8
42	4,4	11,3
60	1,6	3,2

Die Selektivität und die Sensitivität ist nicht nur abhängig von den Hybridisierungsbedingungen und den Waschbedingungen, sondern auch von der Länge der Oligonukleotide, der Oberflächendichte der Proben-Moleküle und der Lage der Mismatches (Nelson et al., 2001; Peterson et al., 2002; Halperin et al., 2004). Der Einfluss dieser Größen wird hier nicht untersucht.

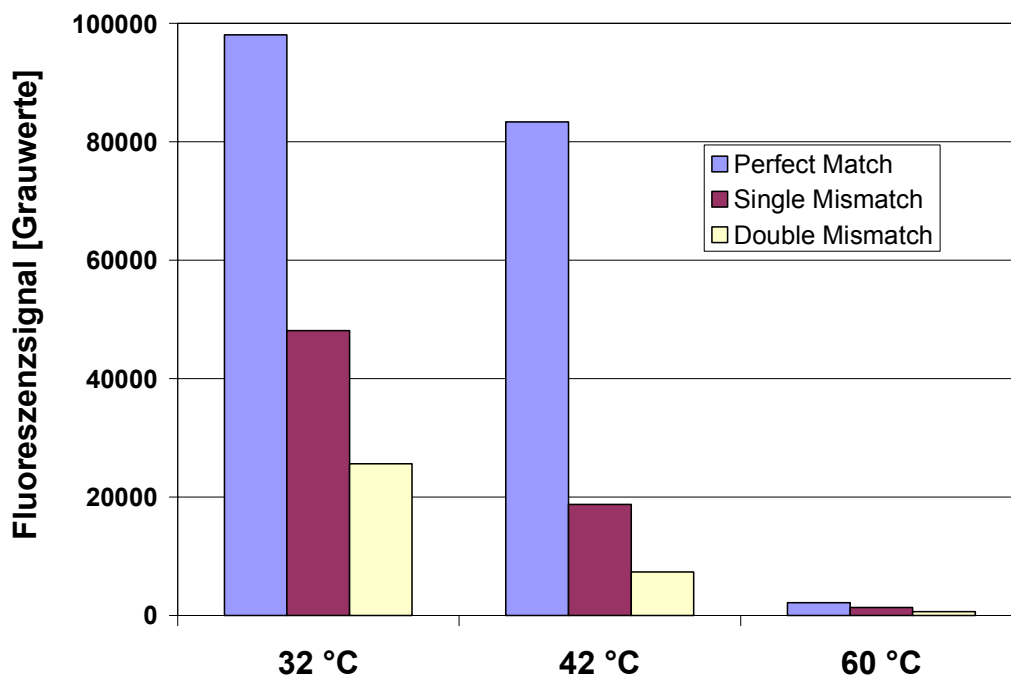


Abbildung 41: Fluoreszenzsignale des DNA-Hybridisierungsexperiments von Perfekt Match, Single Mismatch, Double Mismatch bei unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen.

Nichtbindende Oligonukleotide zeigen kein auswertbares Signal.

Hybridisierungsbedingung: Target: 27-mer DNA; Targetkonzentration: 1 pmol; gespottete Probenkonzentration: 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; Na^+ -Konzentration: 1 mol L^{-1} .

4.3.4 Nachweisgrenze und dynamischer Bereich

Für die Genexpression sind sowohl die Nachweisgrenze als auch der dynamische Bereich eines Mikroarrays sehr wichtig, um hoch- und niedrigexprimierte Gene gleichzeitig und sensitiv zu detektieren.

Um die Nachweisgrenze und den dynamischen Bereich der Partox-Membran zu bestimmen, wird ein Festphasenoligonukleotid (FP1) in einer Konzentration von 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ auf die Partox-Membran gespottet und immobilisiert. Die gespotteten Partox-Membranen werden mit einem 27-mer Target (K1) in 100 μl Hybridisierungslösung

hybridisiert. Die Targetkonzentration variiert dabei zwischen 1 pmol L^{-1} bis $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Dies entspricht einer Stoffmenge von 100 amol - 100 pmol . Das Auslesen der Membran erfolgt durch Epifluoreszenz-Mikroskopie unter Verwendung eines 5x-Objektivs.

Die Ergebnisse des Validierungsexperiments sind in Abbildung 42 dargestellt.

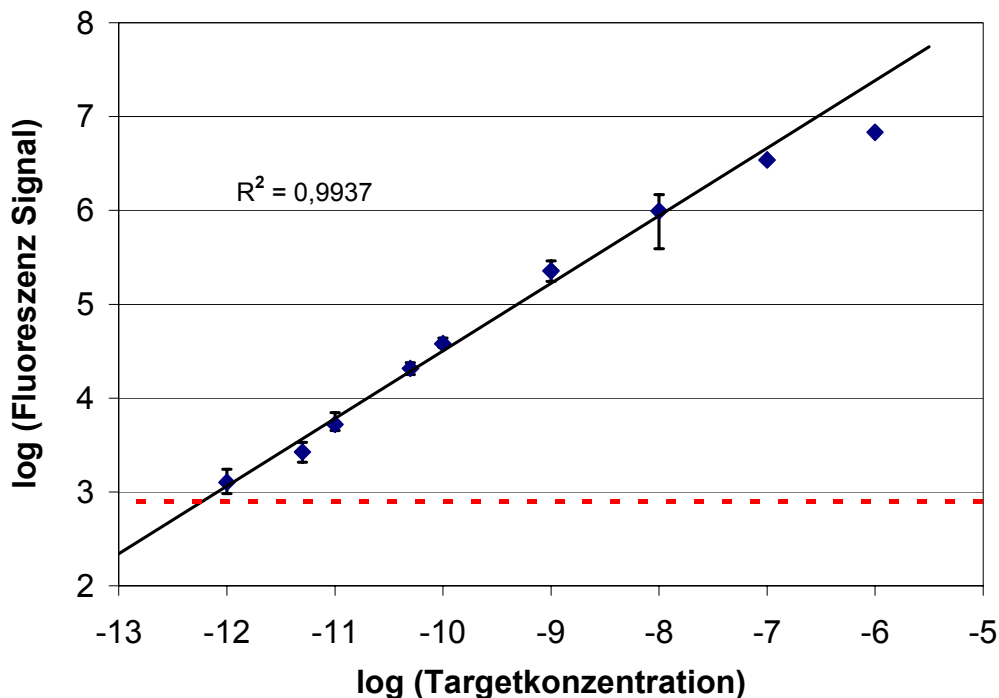


Abbildung 42: doppelt-logarithmische Auftragung der Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Targetkonzentrationen.

Die gestrichelte Linie kennzeichnet das 3-fache der Standardabweichung des Hintergrundsignals.

Hybridisierungsbedingung: Target: 27-mer DNA; gespottete Probenkonzentration: $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$; Na^+ -Konzentration: 1 mol L^{-1} ; Hybridisierungstemperatur: $42 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Die doppelt-logarithmische Auftragung zeigt die Fluoreszenzsignale in Abhängigkeit von der Targetkonzentration (27-mer Oligonukleotid). Die Detektion von 100 amol in 1 pmol L^{-1} Targetkonzentration wird mit einem Signal zu Hintergrundrauschen $> 3:1$ nachgewiesen. Der lineare Bereich (dynamischer Bereich) der Geraden in Abbildung 42 erstreckt sich über 5 Größenordnungen.

Für das zweite Validierungsexperiment wird mRNA in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und über Millipore-Säulen YM-100 aufgereinigt. Die Partox-Membranen werden mit jeweils drei Spots $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ Amine β -Actin, $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ Amine Oligonukleotid 1 und 150 mmol L^{-1} Na/K-Phosphatpuffer (Spottingpuffer) bespottet und immobilisiert. Die Spots der Amine β -Actin-Proben und des Spottingpuffers

dienen als Negativkontrollen. Die Spots der Amine Oligonukleotid 1-Proben dienen als DNA-Sonden. Die durch eine reverse Transkription umgeschriebene cDNA wird in 300 μl Hybridisierungslösung ohne Formamid hybridisiert. Die Hybridisierung der Targetmoleküle erfolgt mit einem Hybridisierungspuffer ohne Formamid, da in diesem Experiment, im Gegensatz zu der Hybridisierungskinetik, die Verdunstung durch Abdecken der Lösung besser kontrolliert werden kann. Die Targetkonzentration, angegeben in eingesetzter mRNA-Konzentration, variiert zwischen 1,67 nmol L^{-1} bis 0,33 $\mu\text{mol L}^{-1}$ was einer Stoffmenge von 500 amol - 100 fmol entspricht. Das Auslesen der Partox-Membranen erfolgt durch Epifluoreszenz-Mikroskopie unter Verwendung eines 5x-Objektivs.

Die Ergebnisse für die Validierung der Partox-Membran mit mRNA sind in Abbildung 43 dargestellt.

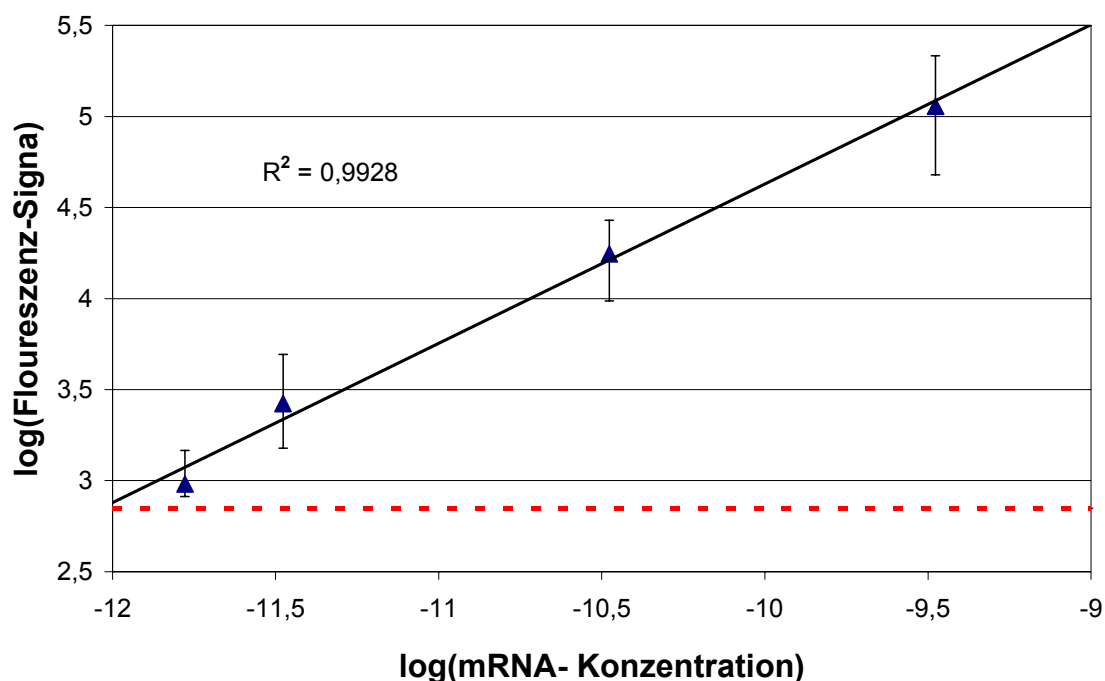


Abbildung 43: doppelt-logarithmische Auftragung der Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Targetkonzentrationen (eingesetzte mRNA-Konzentration).

Die gestrichelte Linie kennzeichnet das 3-fache der Standardabweichung des Hintergrundsignals.

Hybridisierungsbedingung: Target: cDNA (ca. 500b); gespottete Probenkonzentration: 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; Na^+ -Konzentration: 1 mol L^{-1} ; Hybridisierungstemperatur: 43 $^{\circ}\text{C}$.

Die doppelt-logarithmische Auftragung zeigt das Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Targetkonzentration, angegeben in eingesetzter mRNA-

Konzentration. Im gesamten Messbereich von 500 amol bis 100 fmol mRNA steigt das Signal linear an. Die Detektion von 500 amol in $1,67 \text{ pmol L}^{-1}$ Targetkonzentration wird mit einem Signal zu Hintergrundrauschen $> 3:1$ nachgewiesen. Die Negativkontrollen zeigen kein Signal oberhalb der 3-fachen Standardabweichung des Hintergrundsignals.

Die Nachweisgrenze der umgeschriebenen mRNA ist um den Faktor 5 schlechter als die Nachweisgrenze der synthetischen Oligonukleotide. Obwohl der durch reverse Transkription erzeugte cDNA-Einzelstrang mehrfach mit Fluorophoren (Cy3-dCTP) markiert ist (ca. alle 60-100 b), konnte keine Erniedrigung der Nachweisgrenze aufgezeigt werden. Während der Aufreinigung der cDNA konnte ein Teil der Probe nicht wiedergewonnen werden.

Das Auslesen der Fluoreszenzsignale für die Validierungsexperimente erfolgt nicht mit einer in PEG-Lösung eingebetteten Partox-Membran, da die Reflexion des Anregungslichts am gebildeten Flüssigkeits-Meniskus der PEG-Lösung innerhalb der Kunststoffspitze zu einer Erhöhung des Hintergrundsignals führt.

Die Detektionsgrenze der Partox-Membran unter Verwendung synthetischer Oligonukleotide ist um einen Faktor 10 schlechter als die Detektionsgrenze eines planaren Wellenleitersystems, welcher heutzutage zu den sensitivsten Mikroarrays zählt (Duveneck et al., 1997; Budach et al., 1999). Eine Verbesserung der Nachweisgrenze erscheint durch weitere Optimierung der optischen Auslesemethode und der Reaktionsbedingungen möglich. Die verwendeten transparenten PE-Spitzen eignen sich nicht für Fluoreszenzversuche, da der Kunststoff eine geringe Eigenfluoreszenz aufweist und das Anregungslicht in der Pipettenspitze gestreut wird. Aufgrund der hohen Transparenz der Partox-Membranen wird dadurch das Hintergrundsignal erhöht. Erste Versuche mit Kohlenstoff geschwärzten Pipettenspitzen zeigen eine Reduzierung des Hintergrundsignals gegenüber den transparenten PE-Spitzen. Die Hybridisierung und das Waschen der Membran wurde unter stringenten Bedingungen durchgeführt (Kapitel 4.3.3). Durch Änderung der Hybridisierungsbedingungen könnte die Nachweisgrenze auf Kosten der Selektivität noch weiter verbessert werden. Ein weiterer Parameter zur Verbesserung der Nachweisgrenze stellt die Oberflächenchemie dar. Erste Versuche, die Partox-Membran mit alternativen Protokollen (wasserfreies Toluol) zu silanisieren, zeigten eine Verbesserung der Oberflächenfunktionalisierung im Vergleich zur Silanisierung in Methanol. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff Cy3 weist eine geringe Quantenausbeute auf. Fluorophore, wie zum Beispiel B-Phycoerythrin, die eine höhere Quantenausbeute, einen höheren molaren Extinktionskoeffizient und ein geringes Ausbleichen aufweisen,

könnten den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff Cy3 ersetzen und somit zur Steigerung der Nachweisgrenze beitragen. Weiterhin können die verwendeten Filter, Objektive und die CCD-Kamera noch verbessert werden, um das Verhältnis von Fluoreszenzsignal zu Hintergrundsignal zu steigern.

4.3.5 Hintergrundsignal bei Fluoreszenzmessungen

Die analytische Leistungsfähigkeit eines Sensors kann durch Erhöhung des Signals oder durch Verringerung des Hintergrundsignals/Hintergrundrauschens verbessert werden.

4.3.5.1 Substratspezifisches Hintergrundsignal

Das Gesamthintergrundsignal setzt sich aus dem gerätespezifischen Hintergrundsignal (Offset der Kamera, Qualität der Filter) und einem substratspezifischen Hintergrundsignal zusammen. Das substratspezifische Hintergrundsignal ergibt sich sowohl durch die Autofluoreszenz des verwendeten Trägermaterials, als auch durch Reflexion und Streuung des Anregungslichts am Trägermaterial. Das substratspezifische Hintergrundsignal kann nach Abzug des gerätespezifischen Hintergrundsignals vom Gesamthintergrundsignal ermittelt werden.

In einem Experiment wird das substratspezifische Hintergrundsignal in einer Partox-Membran und in einem planaren Glasslid (Eppendorf) ermittelt. Hierfür werden die Trägersubstrate, silanisierte Partox-Membran und silanisiertes Glasslid, mit Anregungslicht, unter Verwendung des Fluorochroms Cy3 und geeigneten Filtersätzen, bestrahlt und das Emissionslicht mit einer CCD-Kamera detektiert. Das gerätespezifische Hintergrundsignal wird bei der gleichen Belichtungszeit ohne Trägersubstrat im Strahlengang ermittelt.

Ein 5-fach niedrigeres substratspezifisches Hintergrundsignal konnte in der Partox-Membran im Vergleich zu einem planaren Glasslid (Eppendorf) bestimmt werden. Ein Grund für den niedrigen substratspezifischen Hintergrund der Partox-Membranen ist die Abwesenheit einer Autofluoreszenz und der geringe Anteil an reflektiertem Licht, welcher vom Objektiv erfasst wird. Die Fabrikation der Partox-Membranen beginnt mit einem Siliziumeinkristall, welcher in $\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2$ Atmosphäre in SiO_2 überführt wird. Aufgrund der Reinheit des verwendeten Materials wird in dem Fluoreszenzexperiment keine Autofluoreszenz der Partox-Membran beobachtet. Der geringe Anteil am reflektierten Licht, welcher vom Objektiv erfasst wird, ergibt sich durch die runden Stirnflächen der SiO_2 -Porenwände und dem porösen Charakter der Membran. An den runden Stirnflächen

der SiO₂-Porenwände wird ein Teil des Anregungslichts unter einem flachen Winkel zurückreflektiert. Mit steigender NA des verwendeten Objektivs wird immer mehr Reflexionslicht detektiert, wobei mit einem 5x-Objektiv nur 1 % Reflexion gemessen wird (Kapitel 4.2.1.1). Aufgrund der Porosität der Partox-Membranen wird ein Teil des Anregungslichtes gleich in die Löcher der Membranen eingekoppelt und somit nicht reflektiert. Mit steigender Porosität sinkt folglich der Anteil am reflektierten Licht. Da nur ein geringer Anteil des zurückreflektierten Anregungslichts vom Objektiv erfasst wird, sinkt der Anteil am substratspezifischen Hintergrund, der durch Rückreflexion des Anregungslichts verursacht wird. Aufgrund des Fehlens jeglicher Oberflächendefekte an den Stirnflächen der SiO₂-Porenwände und innerhalb der SiO₂-Porenwände kann eine Streuung des Lichts praktisch ausgeschlossen werden.

4.3.5.2 Erhöhung des Hintergrundsignals durch Übersprechen des Emissionslichts

Die Kombination von lichtundurchlässigem und reflektivem Silizium und transparentem SiO₂ in den Partox-Membranen ermöglicht eine laterale Aufteilung der makroporösen Membranen in optisch isolierte Sensorvolumina. Die optische Isolierung einzelner Sensorspots wird mit zunehmender Miniaturisierung für lumineszenzbasierende Mikroarrays immer wichtiger, wenn die Distanz zwischen benachbarten Sensorspots immer kleiner wird. Eine Isolierung einzelner Sensorspots unterbindet das optische Übersprechen der Spotsignale und reduziert das Gesamthintergrundsignal.

Fluoreszenzexperimente ergaben, dass Restsilizium mit einer Dicke von 0,8-1,0 µm in den Kompartimentwänden ausreicht, um das optische Übersprechen auf benachbarte Kompartiments zu unterbinden. Mit abnehmender Dicke des Restsiliziums wird eine erhöhte Ausbreitung des Emissionslichts in benachbarte Kompartiments beobachtet.

Zur Bestimmung des Übersprechens von Emissionslicht eines Spots auf benachbarte Kompartiments, werden Proben mit unterschiedlicher Dicke an Restsilizium mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden, die eine Konzentration von 0,1 pmol L⁻¹ (FP1-Cy3) aufweisen, bespottet. Das Auslesen der Proben erfolgt durch Epifluoreszenz-Mikroskopie mit einem 5x-Objektiv. Für die Auswertung des aufgenommenen Bildes wird die Verteilung der Lichtintensität in der Umgebung des Spots ermittelt. Bleibt die Lichtintensität direkt angrenzender Kompartiments, die nicht mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden gefüllt sind, über die nächsten zehn Kompartiments konstant, so kann davon ausgegangen werden, dass das Restsilizium in den Kompartimentwänden das Emissionslicht der Fluorophore abschirmt. Fällt die Lichtintensität direkt angrenzender

Kompartments, die nicht mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden gefüllt sind, mit steigender Entfernung vom Spot langsam ab, so wird davon ausgegangen, dass das Restsilizium in den Kompartimentwänden das Emissionslicht der Fluorophore nicht ausreichend abschirmt.

Abbildung 44 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme eines Fluoreszenzspots. Die linke Seite der Abbildung zeigt die Originalaufnahme des Fluoreszenzspots. Die Erhöhung des Kontrasts (rechter Teil der Abbildung 44) demonstriert die lichtabschirmende Eigenschaft der Siliziumwände in den Kompartimentwänden. Das Emissionslicht breitet sich nur innerhalb der Kompartments aus, die mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden gefüllt sind, und wird nicht lateral durch die Membran gestreut.

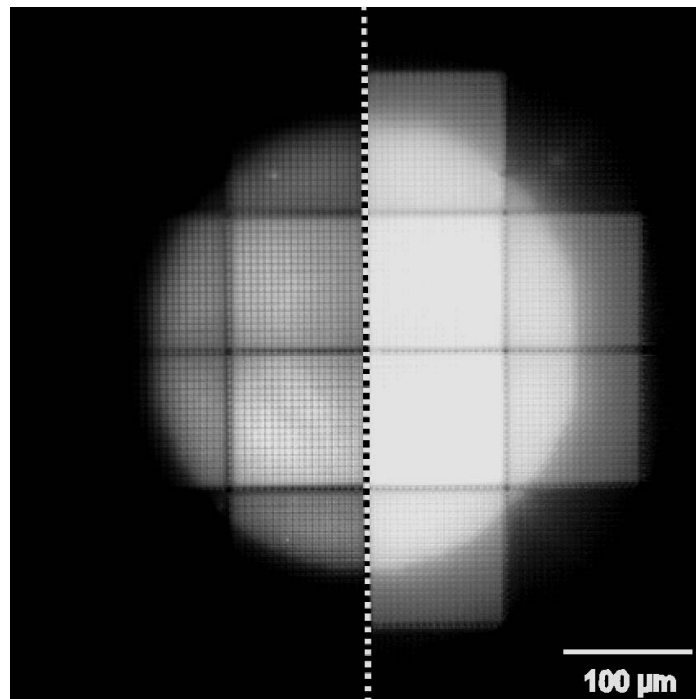


Abbildung 44: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Partox-Membran.

Linke Seite: Originalaufnahme; rechte Seite: Erhöhung des Kontrasts.

Probe: Anzahl der Poren: 20x20; Porenraster: 5 µm; Kompartimentwandbreite: 1,5-faches des Porenrasters; Porenwanddicke: 1,2 µm; Restsilizium in den Kompartimentwänden: 0,8 µm; zusammenhängende Kompartments.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Herstellung dreidimensionaler Nano-Strukturen aus Silizium und Siliziumdioxid beschrieben. Ihre optischen Eigenschaften werden charakterisiert und ihre Anwendung als potentiell Trägersubstrat für DNA-Mikroarrays aufgezeigt.

Die Herstellung dreidimensionaler Nano-Strukturen beginnt mit der Herstellung von makroporösem Silizium, welches durch elektrochemisches Ätzen in Fluorwasserstoffsäure erzeugt wird. Elektrochemisch geätzte runde Sackporen werden rückseitig geöffnet und durch anisotropes Ätzen in quadratische Poren überführt. Die Anordnung der Poren wird lithographisch so vorgegeben, dass nach dem anisotropen Ätzen dünne Porenwände mit einer Breite zwischen 0,8-1,6 μm und dicke Wände mit einer Breite von 2,5-8,0 μm entstehen. Im abschließenden Prozessschritt, der thermischen Oxidation der Siliziummembran, werden die dünnen Porenwände vollständig in Siliziumdioxid überführt, während in den dickeren Wänden (Kompartimentwände) noch ein Kern aus Silizium erhalten bleibt. Die unvollständig oxidierten dickeren Wände unterteilen die partiell oxidierten makroporösen Membranen in regelmäßige Kompartments. Im Rahmen dieser Arbeit werden neuartige Strukturen hergestellt, die sich in Anordnung der Kompartimentwände, der Breite der Kompartimentwände, im Porenraster und der Anzahl Poren pro Kompartiment unterscheiden.

Der Übergang von Silizium zu Siliziumdioxid während der thermischen Oxidation geht mit einer Verdoppelung des molaren Volumens einher. Die aufwachsende Siliziumdioxid-Schicht expandiert in die Pore, verringert damit die Porosität der Membran, und erzeugt gleichzeitig einen Druck, welcher zu einer Ausdehnung der Membran führt. Längenausdehnungen bis zu 15 % werden bei den hergestellten partiell oxidierten Membranen beobachtet. Die vertikale Ausdehnung der Membran beträgt ca. 2 %. Die Porenwände innerhalb der Kompartments, welche vollständig oxidiert werden, verdoppeln ihre Breite. Das Ausmaß der Längenausdehnung der partiell oxidierten Membranen nimmt mit steigender Porosität, dicker werdenden Kompartimentwänden und abnehmenden Anzahl an Poren pro Kompartiment ab.

Die Volumenzunahme während der thermischen Oxidation erzeugt mechanischen Stress, welcher zu einer Verbiegung der Membran führt. Unter Anlegen von kompensierenden Kräften (Arbeitsdrücke im Bereich von 1 kN m^{-2}) während der thermischen Oxidation gelingt es erstmalig, die Wellung der Membran bei

unterschiedlichen Strukturen auf eine Abweichung von der Planarität auf unter $2 \mu\text{m cm}^{-2}$ zu reduzieren. Die Oxidation von Probestücken bis zu einer Größe von 130 cm^2 gelingt reproduzierbar.

Restsilizium mit einer Dicke von $0,8\text{-}1,0 \mu\text{m}$ in den Kompartimentwänden reicht aus, um das optische Übersprechen auf benachbarte Sensorvolumina zu unterbinden. Das laterale Ausbreiten des Emissionslichts wird durch die Kompartimentierung verhindert und das Hintergrundsignal reduziert.

Die wellenleitenden Eigenschaften der SiO_2 -Porenwände werden durch lichtmikroskopische Experimente nachgewiesen. Die Anregung der Fluorophore über das evaneszente Feld der sich innerhalb der wellenleitenden SiO_2 -Porenwände ausbreitenden Lichtmoden trägt nicht zu einer Erhöhung des absoluten Fluoreszenzsignals bei. Durch Einbetten der Membran in eine Flüssigkeit, die den gleichen Brechungsindex aufweist wie die SiO_2 -Porenwände (PEG-Lösung), können die wellenleitenden Eigenschaften der SiO_2 -Porenwände vollständig unterbunden und das absolute Fluoreszenzsignal erhöht werden.

Da bei den neuartigen Strukturen jegliche Oberflächendefekte an den Stirn- und Seitenflächen der SiO_2 -Porenwände sowie Einschlüsse oder Mikrorisse innerhalb der SiO_2 -Porenwände fehlen, kann die Streuung des Lichts beim Ein- und Auskoppeln des Lichtes und während des Ausbreitens innerhalb der Membran vollständig unterdrückt werden.

Ein ortsabhängiger Vergleich der Fluoreszenzsignale ergab, dass der Beitrag der Fluorophore für das resultierende Signal weitgehend unabhängig von der Lage der Fluorophore in der dreidimensionalen Membran ist.

Zur Validierung der partiell oxidierten Membran als Trägersubstrat für DNA-Mikroarrays wurden zwei Hybridisierungsassays für synthetische Oligonukleotide und mRNA entwickelt. Die Nachweisgrenze für Cy3-markierte synthetische Oligonukleotide beträgt 100 amol . Die Nachweisgrenze einer mRNA, die durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wird, beträgt 500 amol .

In Diskriminierungsexperimenten wird gezeigt, dass die neuartige dreidimensionale makroporöse Membran bei den ausgearbeiteten Hybridisierungs- und Waschbedingungen für die Unterscheidung von Polymorphismen geeignet ist.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Bindungsplätze pro Spot und der Nachweisgrenze wird aufgezeigt.

Kinetische Untersuchungen zeigen, dass durch effektives Mischen und Rezirkulation der Analytlösung durch die Membran die Hybridisierungsreaktion

reaktionskontrolliert ist. Die Zeit bis zum Erreichen des stationären Zustands verkürzt sich im Vergleich zu klassischen Arrays drastisch.

6 Ausblick

Die entwickelten partiell oxidierten Membranen eignen sich für heterogene Assays. Hierbei können die Membranen als Trägersubstrat für DNA- und Protein-Mikroarrays oder ELISA-Tests eingesetzt werden. Für alle heterogenen Reaktionen sollte sich die poröse Membran aufgrund ihrer großen fluidisch zugänglichen Oberfläche, um eine erhöhte Anzahl an Analytmolekülen aus der zu untersuchenden Lösung zu binden, eignen. Vor allem bei paarbildenden Reaktionen, die eine niedrige Bindungskonstante aufweisen, ist eine große Oberfläche zur Sensitivitätssteigerung notwendig.

Die photonische Struktur könnte auch als Substrat für homogene Assays eingesetzt werden. Enzymatische Reaktionen, wie zum Beispiel PCR oder Primer-Extension (Been et al., 1988) könnten in den definierten Poren miniaturisiert und parallelisiert stattfinden. Das Füllen einzelner Poren oder Kompartments mit Reaktionslösung wird durch die Kapillarkräfte der Mikrokanäle und durch die gute Benetzbarkeit der Oberfläche zu einem selbst justierenden Prozess. Aufgrund der niedrigen thermischen Masse und dem großen Verhältnis von Oberfläche zu Volumen findet eine schnelle thermische Equilibrierung innerhalb der porösen Membran statt.

Mitunter könnte die poröse Membran auch Verwendung als Zell-Array finden. Ähnlich dem ELISPOT-Verfahren (Czerkinsky et al., 1983) könnten einzelne Zellen in den Mikrokanälen kultiviert und auf ihre Zellsegregation bzw. Exocytose untersucht werden.

Die makroporöse Hybridmembran sollte neben der Fluoreszenzdetektion auch noch für andere optischen Auslesetechniken, wie Chemilumineszenz, oder Präzipitations- und kolometrische Färbemethoden geeignet sein.

7 Literatur

Affimetrix, **2005**, www.affimetrix.com.

Allongue, P., Costa-Kieling, V., Gerischer, H., **1993**, Etching of Silicon in NaOH Solutions, *J. Electrochem. Soc.*, 1009-1026.

Anderson, M. L. M., Young, B. D., **1985**, Quantitative filter hybridization, in Nucleic acid hybridization: a practical approach, IRL Press, Oxford.

Axelrod, D., Hellen, E. H., **1989**, Emission of Fluorescence at an Interface, *Methods in Cell Biology*, 30, 399-416.

Bamdad, C., **1998**, The use of variable density self-assembled monolayers to probe the structure of target molecules, *Biophys. J.*, 75, 1989-1996.

Been, M., Cech, T. R., **1988**, RNA as an RNA polymerase: net elongation of an RNA primer catalyzed by Tetrahymena ribozyme, *Science*, 239, 1412-1416.

Benoit, V., Steel, A., Torres, M., Yu, Y. Y., Yang, H., Cooper, J., **2001**, Evaluation of Three-Dimensional Microchannel Glass Biochips for Multiplexed Nucleic Acid Fluorescence Hybridization Assays, *Anal. Chem.*, 73, 2412.

Blanchard, A. P., **1998**, Synthetic DNA Arrays, Genetic Engineering, J. K. Setlow, Plenum Press, New York.

Bowtell, D., Sambrook, J., **2002**, DNA Microarrays, A Molecular Cloning Manual, Cold Spring Harbor, New York.

Brecht, A., Gaultitz, G., Piehler, J., **1996**, Affinity detection of low molecular weight analytes, *Anal. Chem.*, 68, 139-143.

Bryan, R. N., Ruth, J. L., Smith, R. D., Le Bon, J. M., **1986**, Diagnosis with clinical samples with synthetic oligonucleotide hybridisation probes, Microbiology, Levine L, Ed., American Society for Microbiology, Washington D.C.

Budach, W., Abel, A. P., Bruno, A. E., Neuschäfer, D., **1999**, Planar Waveguides as High-Performance Sensing Platforms for Fluorescence-Based Multiplexed Oligonucleotide Hybridisation Assays, *Anal. Chem.*, 71, 3347-3355.

Buszewski, B., Jezierska, M., Welnika, M., Berek, D., **1998**, Survey and Trends in the Preparation of Chemically Bonded Silica Phases for Liquid Chromatographic Analysis, *J. of High Resolution Chromatography*, 21, 267-281.

Certa, U., Hochstrasser, R., Langen, H., Buess, M., Moroni, C., **2003**, Biosensors in Biomedical Research: Development and Applications of Gene Chips, *Chimia* 53, 57-61.

- Chakravarti, A., **2001**, ...to a future of genetic medicine, *Nature*, 409, 822-823.
- Cheek, B. J., Steel, A., Torres, M. P., **2001**, Chemiluminescence Detection for Hybridization Assays on the Flow-Thru Chip, a Three-Dimensional Microchannel Biochip, *Anal. Chem.*, 73, 5777-5783.
- Czerkinsky, C. C., Nilsson, L. A., Nygren, H., Ouchterlony, O., Tarkowski, A., **1983**, A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells, *J. Immunol. Methods*, 65.
- Deal, B. E., Grove, A. S., **1965**, General Relationship for the Thermal Oxidation of Silicon, *J. Appl. Phys.*, 36, 3770-3778.
- Doremus, R. H., **1987**, Oxidation of Silicon Stress Relaxation in Silica, *J. Electrochem. Soc.*, 134, 2001-2003.
- Duveneck, G. L., **1999**, Review on Fluorescence-Based Planar Waveguide Biosensors, *SPIE*, 3858, 59-71.
- Duveneck, G. L., Pawlak, M., Neuschäfer, D., Bär, E., Budach, W., Piele, U., Ehrath, M., **1997**, Novel bioaffinity sensors for trace analysis based on luminescence excitation by planar waveguides, *Sensors and Actuators B*, 38-39, 88-95.
- Duveneck, G. L., Pawlak, M., Neuschäfer, D., Budach, W., Ehrath, M., **1996**, A novel Generation of Luminescence-based Biosensors: Single-Mode Planar Waveguide Sensors, *SPIE Proceedings*, 2928, 98-109.
- Eickhoff, H., Nietfeld, W., Wolski, W. E., Tandon, N., Lehrach, H., **1999**, RNA-Expressionsanalysen auf cDNA-Arrays, *medgen*, 11, 23.
- Ekins, R., Chun, F. W., **1999**, Microarrays: Their origins and applications, *Trends in Biotechnology*, 17, 217-218.
- Ermantraut, E., Schulz, T., Tuchscheerer, J., Wöfel, S., Saluz, H. P., Thallner, E., Köhler, J. M., **1998**, Building highly diverse arrayed substance libraries by microoffset printing, Proceedings of Micro Total Analysis Systems '98, Kluwer Scientific Publishing, Dordrecht.
- Finne, R. M., Klein, D. L., **1967**, A water-amine-complexing agent system for etching silicon, *J. Electrochem. Soc.*, 1009 - 1026.
- Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T., Solas, D., **1991**, Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis, *Science*, 251, 767-773.
- Gilliland, D. G., Perrin, S., Blanchard, K. L., Bunn, H. F., **1990**, Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2725-2729.
- Goergen, B., Hartwig, K., **2001**, Technologie-Trends Biochips, DZ Bank, Frankfurt am Main.

- Gould, G., Irene, E. A., **1989**, An In-situ Ellipsometric Study of Aqueous NH_4OH Treatment of Silicon, *J. Electrochem. Soc.*, 136, 1108-1112.
- Hall, E. A. H., **1995**, Biosensoren, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Halperin, A., Buhot, A., Zhulina, E. B., **2004**, Sensitivity, Specificity, and the Hybridization Isotherms of DNA Chips, *Biophysical Journal*, 86, 718-730.
- Hecht, E., **1989**, Optik, Addison Wesley, München.
- Hilleringmann, U., **1999**, Silizium-Halbleitertechnologie, B. G. Teubner, Stuttgart.
- Hirokawa, T. K., Honda, K., Shibuya, T., **1974**, Formation of etch hillocks in white tin, *J. Cryst. Growth*, 24/25, 484-487.
- Hutton, J. R., **1977**, Renaturation kinetics and thermal stability of DNA in aqueous solutions of formamide and urea, *Nucleic Acids Research*, 4, 3537-3555.
- Johnson, B., Lofas, S., Lindqvist, G., **1994**, Immobilization of Proteins to a Carboxymethyl-Dextran Modified Gold Surface for Biospecific Interaction Analysis in Surface Plasmon Resonance Sensor, *Anal. Biochem.*, 198, 268-277.
- Kao, D. B., McVittie, J. P., Nix, W. D., Saraswat, K. C., **1988**, Two-Dimensional Thermal Oxidation of Silicon - II: Modeling Stress Effects in Wet Oxides, *IEEE Transactions on Electron Devices*, 35, 25-37.
- Kellner, R. A., **1998**, Analytical Chemistry, WILEY-VCH, Weinheim.
- Kendall, D. L., **1979**, Vertical Etching of Silicon at Very High Aspect Ratios, *Ann. Rev. Materials Science*, 9, 373-403.
- Kern, W., **1984**, Purifying Si and SiO_2 surfaces with hydrogen peroxide, *Semicond. Int.*, 7, 94-99.
- Kittel, C., **1980**, Einführung in die Festkörperphysik, Oldenbourg Verlag, München.
- Klein-Hitpaß, L., Möröy, T., **2001**, DNA-Mikroarrays: Eine neue Technologie zur Erstellung von RNA-Expressionsprofilen auf Genomebene, *Biospektrum*, 2, 150-156.
- Klühr, M., **2003**, 3D-Wellenleiterstruktur aus makroporösem Silizium, Georg-Simon-Ohm-Fachhochschule, Angewandte Chemie, Nürnberg.
- Knippers, R., **2001**, Molekulare Genetik, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Köhler, M., **1998**, Ätzverfahren für die Mikrotechnik, Wiley-VCH, Weinheim.
- Kovalev, D., Heckler, H., Poliski, G., Koch, F., **1999**, Optical Properties of Si Nanocrystals, *Physica status solidi(B)*, 215, 871-932.

- Kovalev, D., Polisski, G., Ben-Chorin, M., Diener, J., Koch, F., **1996**, The temperature dependence of the absorption coefficient of porous silicon., *J. Appl. Phys.*, 80, 5978-5983.
- Kretschmann, E., Raether, H., **1968**, Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light, *Z. Naturforsch.*, 23 A, 2135.
- Kunz, R. E., **1991**, Totally Integrated Optical Measuring Sensor, *Proc. SPIE*, 1587, 98-113.
- Lehmann, V., **1993**, The Physics of Macropore Formation in Low Doped n-Type Silicon, *J. Electrochem. Soc.*, 140, 2836-2843.
- Lehmann, V., **2002**, Electrochemistry of Silicon, WILEY-VCH, Weinheim.
- Lehmann, V., Föll, H., **1990**, Formation Mechanism and Properties of Electrochemically Etched Trenches in n-Type Silicon, *J. Electrochem. Soc.*, 137, 653-659.
- Lehmann, V., Grüning, U., **1997**, The limits of macropore array fabrication, *Thin Solid films*, 297, 13-17.
- Lehmann, V., Stengl, R., Reisinger, H., Detemple, R., Theiss, W., **2001**, Optical shortpass filters based on macroporous silicon, *Applied Physics Letters*, 78, 589-591.
- Lennon, G. G., Lehrach, H., **1991**, Hybridisation analysis of arrayed cDNA libraries, *Trends Genet.*, 7, 314-317.
- Liang, P., Pardee, A. B., **1992**, Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction, *Science*, 257, 967-971.
- Lipschutz, R. J., Fodor, S. P. A., Gingeras, T. R., Lockhart, D. J., **1999**, High density synthetic oligonucleotide arrays, *Anal. Chem.*, 62, 2587-2593.
- Lockhart, D. J., Winzeler, E. A., **2000**, Genomics, gene expression and DNA arrays, *Nature*, 405, 827-836.
- Lottspeich, F., Zobras, H., **1998**, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Marcus, R. B., Sheng, T. T., **1982**, The Oxidation of Shaped Silicon Surfaces, *Journal of Electrochem. Soc.*, 129, 1278-1282.
- Mariadason, J. M., Augenlicht, L. H., Arango, D., **2003**, Microarray analysis in the clinical management of cancer, *Heated Oncol Clin N Am*, 17, 377-387.
- McConaughy, B. L., Laird, C. D., McCarthy, B. J., **1969**, Nucleic acid reassociation in formamide, *Biochemistry*, 8, 3289.
- Mehregany, M., Senturia, S. D., **1988**, Anisotropic Etching of Silicon in Hydrazine, *Sens. Actuators*, 13, 375-390.
- Meinkoth, J., Wahl, G., **1984**, Hybridization of Nucleic Acids Immobilized on Solid Supports, *Analytical Biochemistry*, 138, 267-284.

- Mikhailov, I. F., Salek, Y. M., Fedorov, A. G., **1987**, Thermal and Structural Deformation in the Silicon-Oxide System, *Plenum Publishing Corporation*, 86, 189-193.
- Müller, H. J., Röder, T., **2004**, Der Experimentator Microarrays, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Nelson, B., Grimsrud, T. E., Liles, M. R., Goodman, R. M., Corn, R. M., **2001**, Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays, *Anal. Chem.*, 73, 1-7.
- Okamoto, T., Suzuki, T., Yamamoto, N., **2000**, Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using Bubble Jet technology, *Nature Biotechnology*, 18, 438-441.
- Peterson, A. W., Heaton, R. J., Georgiadis, R. M., **2001**, The effect of surface probe density on DNA hybridisation, *Nucleic Acids Research*, 29, 5163-5168.
- Peterson, A. W., Wolf, L. K., Georgiadis, R. M., **2002**, Hybridization of Mismatched or Partially Matched DNA at Surfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 14601-14607.
- Poudnikov, D., Timofeev, E., Mirzabekov, A., **1998**, Immobilization of DNA in polyacrylamide gel for the manufacture of DNA and DNA-oligonucleotide microchips, *Anal. Biochem.*, 259, 34-41.
- Ramdas, L., Cogdell, D. E., Jia, J. Y., Taylor, E. E., Dunmire, V. R., Hu, L., Hamilton, S. R., Zhang, W., **2004**, Improving signal intensities for genes with low-expression on oligonucleotide microarrays, BMC Genomics, London,.
- Reider, G. A., **1997**, Photonik: Eine Einführung in die Grundlagen, Springer-Verlag, Wien, New York.
- Revesz, A. G., **1999**, Structural Rearrangement of SiO₂ Films during their Growth and Annealing, *J. Electrochem. Soc.*, 164, 2225-2228.
- Ruge, I., Mader, H., **1984**, Halbleiter-Technologie, Reihe Halbleiter-Elektronik, Springer-Verlag, Berlin.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N., **1985**, Enzymatic Amplification of b-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia, *Science*, 230, 1350-1354.
- Sato, S., Shikida, M., Matsushima, Y., Yamashiro, T., Asaumi, K., Iriye, Y., Yamao, M., **1998**, Characterization of Orientation Dependent Etching Properties of Single Crystal Silicon: Effects of KOH Concentration, *Sens. Actuators*, 64, 87-93.
- Schena, M., **2003**, Microarray Analysis, WILEY-LISS, New Jersey.
- Scherf, U., Ross, D. T., Waltham, M., Smith, L. H., Lee, J. K., **2000**, A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer, *Nat. Genet.*, 24, 236-244.

- Schmidt, C., **2001**, Von den Genen Lernen, *DZKV*, 11/12, 51-58.
- Seidel, H., Csepregi, L., Heuberger, A., Baumgärtel, H., **1990**, Anisotropic Etching of Crystalline Silicon in Alkaline Solution, *J. Electrochem. Soc.*, 137, 3612-3632.
- Shena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O., **1995**, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science*, 270, 467-470.
- Shi, L., **2002**, DNA Microarray (Genome Chip), www.gene-chips.com.
- Shomaker, D. D., Schadt, E. E., Armour, C. D., al., e., **2001**, Experimental annotation of the human genome using Microarray technology, *Nature*, 409, 922-927.
- Singh, P. K., Kumar, R., Lal, M., Singh, S. N., Das, B. K., **2001**, Effectiveness of anisotropic etching of silicon in aqueous alkaline solutions, *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 70, 103-113.
- Singh-Gasson, S., Green, R. D., Yue, Y., Nelson, C., Blattner, F., Sussmann, M. R., Cerrina, F., **1999**, Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array, *Nature Biotechnol.*, 17, 974-978.
- Sokolov, V. I., Fedorovich, N. A., **1987**, Mechanical Stress on the Si-SiO₂ Interface, *Phys. Stat. Sol.*, 99, 151-158.
- Sosnowski, R. G., Tu, E., Butler, W. F., O'Connell, J. P., Heller, M. J., **1997**, Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 1119-1123.
- Southern, E. M., **1975**, Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517.
- Southern, E. M., **2001**, DNA Microarray-History and Overview, *Methods Mol. Biol.*, 170, 1-15.
- Southern, E. M., Kalim, M., Shchepinov, M., **1999**, Molecular interactions on Microarrays, *Nature Genetics*, 21, 5-9.
- Steckl, A. J., Xu, J., Mogul, H. C., **1994**, Crystallinity and Photoluminescence in Stain-Etched Porous Silicon Layers, *J. Electrochem. Soc.*, 141, 674.
- Steel, A., Torres, M., Hartwell, J., Yu, Y. Y., Ting, N., Hoke, G., Yang, H., **2000**, The Flow-Thru Chip: A Three-Dimensional Biochip Platform, *Microarray Analysis*, M. Schena, WILEY-LISS, New Jersey.
- Stryer, L., **1995**, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Tan, S. S., Reed, M. L., Han, H., Boudreau, R., **1996**, Mechanisms of etch hillock formation, *Journal of Microelectronic Systems*, 66-72.
- Tiefenthaler, K., Lukosz, W., **1989**, Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensors, *J. Opt. Soc. Am. B.*, 6, 209-220.

- Timofeev, E., Kochetkova, S. V., Mirzabekov, A. D., Florentiev, V. L., **1996**, Regioselective immobilization of short oligonucleotides to acrylic copolymer gels, *Nucleic Acid Res.*, 24, 3142-3148.
- Toegl, A., Kirchner, R., Gauer, C., Wixforth, A., **2003**, Enhancing Results of Microarray Hybridizations Through Microagitation, *Journal of Biomolecular Techniques*, 14, 197-204.
- Turner, D. R., **1958**, Electropolishing Silicon in Hydrofluoric Acid Solution, *J. Electrochem. Soc.*, 105, 402.
- Unger, K. K., Becker, N., Roumeliotis, P., **1976**, Recent Developments in the Evaluation of Chemically Bonded Silica Packings for Liquid Chromatography, *J. Chromatography*, 125, 115-117.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., **1995**, Serial analysis of gene expression, *Science*, 270, 484-487.
- Wetmur, J. G., **1991**, DNA Probes: Applications of the Principles of Nucleic Acid Hybridisation, *Crit. Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26, 227-259.
- Wetmur, J. G., Davidson, N., **1968**, Kinetics of renaturation of DNA, *J. Mol. Biol.*, 31, 349.
- Whitesides, G. M., Xia, Y., **1998**, Soft Lithography, *Angewandte Chemie*, 37, 550-575.
- Xia, X. H., Kelly, J. J., **2001**, Electrochemistry of Hypochlorite at Silicon in Alkaline Etchants, *J. Electrochem. Soc.*, 148, 348-352.
- Xu, Y. P., Huang, R. S., **1990**, Anodic Dissolution and Passivation of Silicon in Hydrazine, *J. Electrochem. Soc.*, 137, 948-953.
- Young, B. D., Anderson, M. L., **1985**, Quantitative analysis of solution hybridisation, *Nucleic acid Hybridisation-A practical Approach*, IRL Press, Oxford.
- Zhang, X. G., **2001**, *Electrochemistry of Silicon and its Oxide*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Frau Prof. Dr. Abbasi

Herr Prof. Dr. Aust

Herr Prof. Dr. Bartsch

Herr Prof. Dr. Bauer

Herr Prof. Dr. Bisswanger

Herr Prof. Dr. Braun

Herr Prof. Dr. Dorn

Herr Prof. Dr. Hamprecht

Herr Prof. Dr. Herold

Herr Prof. Höhne

Herr Prof. Dr. Jakob

Herr Prof. Dr. Kiemer

Herr Prof. Dr. Kinkel

Herr Prof. Dr. Probst

Herr Prof. Dr. Stark

Herr Prof. Dr. Stephan

Herr Prof. Dr. Stieß

Herr Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Voelter

Herr Prof. Dr. Volgnandt

Herr Prof. Dr. Wehnert

Herr Prof. Dr. Zägelein

Frau Prof. Dr. Zhu

8.2 Publikationen

Dertinger, S. K., Klühr, M., Sauermann, A., Thein, K., **2004**, A three-dimensional waveguide structure as a support for genomic and proteomic microarrays, *SPIE*, 5591, 88-95.

Dertinger, S. K., Klühr, M., Sauermann, A., Thein, K., **2005**, A three-dimensional waveguide structure for DNA microarrays based on macroporous silicon, *Physica Status Solidi A*, 202, 1443-1445.

8.3 Curriculum Vitae

Name: Marco Klühr
Geburtstag: 23. Juni 1975
Geburtsort: Würzburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Dissertation:

2003-2006 Doktorarbeit: Herstellung und Charakterisierung dreidimensionaler photonischer Nano-Strukturen als Trägersubstrat für Mikroarrays, Georg-Simon-Ohm-Fachhochschule Nürnberg, Fachbereich Angewandte Chemie.

Studium:

2003-2004 Eignungsfeststellungsverfahren Biochemie, Physiologisch-chemisches Institut, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

1998 – 2003 Studium der Technischen Chemie, Georg-Simon-Ohm Fachhochschule, Nürnberg, Diplomarbeit: 3D-Wellenleiterstruktur aus makroporösem Silizium.

Berufliche Tätigkeit und Berufsausbildung:

1994-1995 Chemielaborant bei Südzucker AG Mannheim /Ochsenfurt
1991-1994 Ausbildung zum Chemielaborant bei Südzucker AG Mannheim

Schulausbildung:

1996 - 1998 Berufsoberschule, Würzburg, Abschluss mit Fachabitur
1987 – 1991 Realschule, Kitzingen
1985 – 1987 Hauptschule, Kleinlangheim
1981 – 1985 Grundschule, Großlangheim