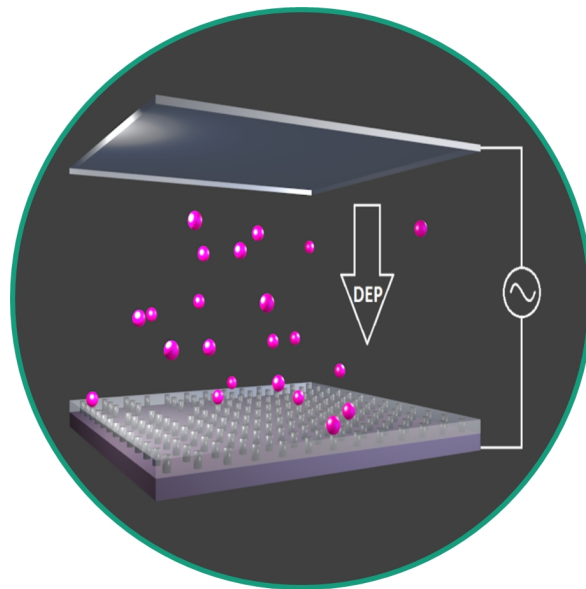


INSTITUT FÜR PHYSIK UND ASTRONOMIE

Einzelmolekül-Manipulation mittels Nano-Elektroden und Dielektrophorese



Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Biologische Physik“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

Xenia Knigge

Disputation: 20. Januar 2020

Soweit nicht anders gekennzeichnet ist dieses Werk unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung – Keine kommerzielle Nutzung 4.0 International. Dies gilt nicht für zitierte Inhalte anderer Autoren.
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.de>

Diese Arbeit wurde unter der Aufsicht von Prof. Dr. Carsten Beta in der Zeit von November 2011 bis August 2019 am Fraunhofer IZI-BB (Institut für Zelltherapie und Immunologie, Institutsteil Bioanalytik und Bioprozesse), betreut von PD Dr. Ralph Hölzel in dessen Arbeitsgruppe (Biomolekulare Nanostrukturen und Messtechnik), durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Carsten Beta
(a) Universität Potsdam
Institut für Physik und Astronomie
Institut für Biochemie und Biologie
Arbeitsgruppe: Biologische Physik

PD Dr. Ralph Hölzel
(b) Fraunhofer IZI-BB, Potsdam-Golm
Abteilung: Biosystemintegration und
Prozessautomation
Arbeitsgruppe: Biomolekulare Nanostrukturen
und Messtechnik
(c) Freie Universität Berlin
Institut für Biologie

Prof. Dr. Wolfgang Fritzsche
(d) Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Physikalische Chemie
(e) Leibniz-IPHT, Jena
Abteilung: Nanobiophotonik

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<https://doi.org/10.25932/publishup-44313>
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-443137>

*Meinen drei lieben Kindern
Leonie, Adrian und Oliver*

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht

Publikationen (peer-reviewed)

X. Knigge, Ch. Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel; *Dielectrophoretic immobilisation of nanoparticles as isolated singles in regular arrays*, Journal of Physics D: Applied Physics, 2018, 51, 065308

E.-M. Laux, **X. Knigge**, F. F. Bier, Ch. Wenger, R. Hölzel; *Aligned immobilization of proteins in AC electric fields*, Small, 2016, 12, 1514

E.-M. Laux, **X. Knigge**, F. F. Bier, Ch. Wenger, R. Hölzel; *Dielectrophoretic immobilization of proteins: Quantification by atomic force microscopy*, Electrophoresis, 2015, 36, 2094

Ch. Wenger, **X. Knigge**, M. Fraschke, D. Wolansky, P. Kulse, U. Kaletta, A. Wolff, W. Mehr, E.-M. Laux, F. F. Bier, R. Hölzel; *Label-free immobilization of nanoparticles on silicon based electrodes for single-biomolecule studies*, Proceedings of the International Conference on Biomedical Electronics and Devices, 2014, 176, (Short Paper Nr. 41)

Konferenzbeiträge

Im Folgenden sind Konferenzen aufgeführt, auf denen die eigenen Arbeiten in Vorträgen und Postern präsentiert wurden.

Vorträge

X. Knigge, Ch. Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel; *Immobilization of Single Biomolecules on Nano-Electrode Arrays by Dielectrophoresis*, Single-Molecule Sensors and nanoSystems 2019, München (D), 03.-05.04.2019

X. Knigge, Ch. Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel; *Dielectrophoretic Immobilization of single Biomolecules*, 2nd European Biosensor Symposium 2019, Florenz (I), 18.-21.02.2019

X. Knigge; *From idea to Lab: Dielectrophoresis for the immobilization of single biomolecules*, Potsdam Days on Bionalysis 2018, Potsdam (D), 01.-02.11.2018

Poster

X. Knigge, Ch. Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel; *Dielectrophoretic Immobilization of Nanoobjects as Singles*, DPG-Frühjahrstagung, Berlin (D), 11.-16.03.2018

X. Knigge, Ch. Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel; *Immobilization and Detection of single Nanoobjects on Nanoelectrodes*, 1st European and 10th German BioSensor Symposium, Potsdam (D), 20.-23.03.2017

X. Knigge, U. Kaletta, Ch. Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel; *Dielektrophoretische Immobilisierung von Nanoobjekten für Einzelmoleküluntersuchungen*, 9. Deutsches BioSensor Symposium in München (D), 11.-13.03.2015

X. Knigge, U. Kaletta, F. F. Bier, Ch. Wenger and R. Hölzel; *Dielectrophoretic immobilization of single nanoobjects*, Dielectrophoresis 2014, in London (UK), 14.-16.07.2014

X. Knigge, U. Kaletta, E.-M. Laux, F. F. Bier, Ch. Wenger, R. Hölzel; *Dielectrophoretic immobilization of nanoobjects on silicon based electrodes for single-biomolecule studies*, NanoBioEurope 2014, Münster (D), 02.-04.06.2014

X. Knigge und E.-M. Laux, K. Nicklas, U. Kaletta, F. F. Bier, Ch. Wenger, R. Hölzel; *Dielektrophoretische Immobilisierung von Nanopartikeln und Proteinen an Nanoelektroden*, Deutsches BioSensor Symposium 2013, Wildau (D), 10.-13.03.2013 (*Posterpreis*)

Mitarbeit an Beiträgen anderer

Aufgeführt sind Poster und Vorträge, in denen Teile dieser Arbeit von anderen vorgestellt wurden.

Vorträge

R. Hölzel, **X. Knigge**, E.-M. Laux, M. Noffke, S. Stanke, Ch. Wenger, F. F. Bier; *AC electrokinetic immobilisation of nanoparticles and proteins*, Single-Molecule Sensors and nanoSystems 2019, München (D), 03.-05.04.2019

X. Knigge, E.-M. Laux, S. Stanke, Ch. Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel; *Spatial manipulation of nanoparticles and molecules by AC electrokinetics*, Dielectrophoresis 2018, Guildford (UK), 23.-25.07.2018

E.-M. Laux, **X. Knigge**, Ch. Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel; *AC electrokinetic manipulation of nanoparticles and molecules*, DPG-Frühjahrstagung, Berlin (D), 11.-16.03.2018

R. Hölzel, **X. Knigge**, E.-M. Laux, S. Stanke, Ch. Wenger, F. F. Bier; *AC electrokinetic manipulation of nanoparticles and molecules*, Bioelectronics Workshop Berlin Cell Separation (Between Microfluidics) and Dielectrophoresis, Berlin (D), 30.11.2017

F. F. Bier, R. Hölzel, **X. Knigge**, E.-M. Laux; *Systems Integration in Bioanalysis: Oriented Immobilization of Biomolecules for Affinity Sensors*, 24th International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Lyon (F), 03.-07.07.2017

Ch. Wenger, **X. Knigge**, M. Fraschke, D. Wolansky, P. Kulse, U. Kaletta, A. Wolff, W. Mehr, E.-M. Laux, F. F. Bier and R. Hölzel; *Label-free immobilization of nanoparticles on silicon based electrodes for single-biomolecule studies*, 7. International Conference on Biomedical Electronics and Devices, Angers (F), 03.-06.03.2014

R. Hölzel, **X. Knigge**, E.-M. Laux, U. Kaletta, S. Otto, S. Stanke, Ch. Wenger, F. F. Bier; *Dielectrophoretic immobilisation of proteins and nanoparticles*, Dielectrophoresis 2014, London (UK), 14.-16.07.2014

R. Hölzel, Ch. Wenger, **X. Knigge**, E.-M. Laux, U. Kaletta, S. Otto, S. Stanke, F. F. Bier; *Dielectrophoretic immobilisation of antibodies and enzymes on nanoelectrodes*, 20th International symposium on electro- and liquid phase-separation techniques 2013, Puerto de la Cruz, Teneriffa (ES), 06.-09.10.2013

Poster

M. Noffke, Ch. Wenger, **X. Knigge**, F. F. Bier, R. Hölzel; *Production and characterization of enzyme nanoarrays assisted by alternating electric fields*, Single-Molecule Sensors and nanoSystems 2019, München (D), 03.-05.04.2019

M. Noffke, **X. Knigge**, Ch. Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel; *Production and Characterization of Enzyme Nanoarrays Assisted by Alternating Electric Fields*, 2nd European Biosensor Symposium 2019, Florenz (I), 18.-21.02.2019

R. Hölzel, **X. Knigge**, E.-M. Laux, M. Noffke, S. Stanke, Ch. Wenger, F. F. Bier; *AC electrokinetic immobilisation of nanoparticles and proteins*, 2nd European Biosensor Symposium 2019, Florenz (I), 18.-21.02.2019

X. Knigge, Ch. Wenger, M. Noffke, F. F. Bier, R. Hölzel; *Immobilisation of nanospheres as single objects on nanoelectrode arrays*, Dielectrophoresis 2018, Guildford (UK), 23.-25.07.2018

X. Knigge, Ch. Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel; *Immobilisation and detection of single nanoobjects on nanoelectrodes*, Bioelectronics Workshop: Cell Separation between Microfluidics and Dielectrophoresis, Berlin (D), 30.11.2017

R. Hölzel, **X. Knigge**, E.-M. Laux, S. Stanke, Ch. Wenger, F. F. Bier; *AC electrokinetic immobilisation of nanoparticles and proteins*, 12th International Symposium on Electrokinetic Phenomena, Dresden (D), 10.-12.09.2017

E.-M. Laux, **X. Knigge**, Ch. Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel; *AC electrokinetic manipulation of nanoparticles and molecules*, 19th IUPAB and 11th EBSA congress, Edinburgh (UK), 16.-20.07.2017

Eur. Biophys. J., 2017, 46, 189

X. Knigge, Ch. Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel; *AC electrokinetic immobilisation of nanoobjects as individual singles in regular arrays*, 19th IUPAB and 11th EBSA congress, Edinburgh (UK), 16.-20.07.2017

Eur. Biophys. J., 2017, 46, 187

E.-M. Laux, S. Otto, **X. Knigge**, Ch. Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel; *Dielectrophoretic immobilisation of proteins*, European Biophysics Congress 2015, Dresden (D), 18.-22.07.2015

E.-M. Laux, **X. Knigge**, S. Otto, Ch. Wenger, F. F. Bier, R. Hölzel; *Nano-manipulation of proteins by AC electric fields*, 10th European Biophysics Congress, Dresden, 18.-22.07.2015

Eur. Biophys. J., 2015, 44, 58

R. Hölzel, **X. Knigge**, E.-M. Laux, U. Kaletta, S. Otto, S. Stanke, Ch. Wenger, F. F. Bier; *Dielectrophoretic Immobilisation of Proteins and Nanoparticles*, Dielectrophoresis 2014, in London (UK), 14.-16.07.2014

R. Hölzel, Ch. Wenger, **X. Knigge**, E.-M. Laux, U. Kaletta, S. Otto, S. Stanke, F. F. Bier; *Dielectrophoretic manipulation of biomolecules and nanoparticles*, NanoBioEurope 2014, Münster (D), 02.-04.06.2014

E.-M. Laux, **X. Knigge**, U. Kaletta, F. F. Bier, Ch. Wenger, R. Hölzel; *Positioning nanoparticles and proteins on nanoelectrodes arrays by dielectrophoresis*, 20th International symposium on electro- and liquid phase-separation techniques 2013, Puerto de la Cruz, Teneriffa (ES), 06.-09.10.2013

X. Knigge und E.-M. Laux, K. Nicklas, U. Kaletta, F. F. Bier, Ch. Wenger, R. Hölzel; *Dielektrophoretische Immobilisierung von Nanopartikeln und Proteinen an Nanoelektroden*, Wissenschaftliches Symposium zur Eröffnung des Joint Lab Bioelectronics, 2013, Berlin (D), 20.09.2013

E.-M. Laux and **X. Knigge**, U. Kaletta, F. F. Bier, Ch. Wenger, R. Hölzel; *Dielectrophoretic immobilization of nanoparticles and proteins on nanoelectrodes*, NanoBioEurope 2013, Toulouse (F), 10.-12.06.2013

R. Hölzel, Ch. Wenger, **X. Knigge**, E.-M. Laux, U. Kaletta, K. Nicklas, S. Otto, S. Stanke, F. F. Bier; *Spatial manipulation of nanoparticles and biomolecules by AC electric fields*, NanoBioEurope 2013, Toulouse (F), 10.-12.06.2013

U. Kaletta, Ch. Wenger, **X. Knigge**, R. Hölzel; *Nanoelectrodes for Biomedical Applications*, 8. Deutsches BioSensor Symposium 2013, Wildau (D), 10.-13.03.2013

Kurzfassung

In dieser Arbeit wurden Nano-Elektroden-Arrays zur Einzel-Objekt-Immobilisierung mittels Dielektrophorese verwendet. Hierbei wurden fluoreszenzmarkierte Nano-Sphären als Modellsystem untersucht und die gewonnenen Ergebnisse auf biologische Proben übertragen. Die Untersuchungen in Kombination mit verschiedenen Elektrodenlayouts führten zu einer deterministischen Vereinzelung der Nano-Sphären ab einem festen Größenverhältnis zwischen Nano-Sphäre und Durchmesser der Elektrodenspitzen. An den Proteinen BSA und R-PE konnte eine dielektrophoretische Immobilisierung ebenfalls demonstriert und R-PE Moleküle zur Vereinzelung gebracht werden. Hierfür war neben einem optimierten Elektrodenlayout, das durch Feldsimulationen den Feldgradienten betreffend gesucht wurde, eine Optimierung der Feldparameter, insbesondere von Spannung und Frequenz, erforderlich.

Neben der Dielektrophorese erfolgten auch Beobachtungen anderer Effekte des elektrischen Feldes, wie z.B. Elektrolyse an Nano-Elektroden und Strömungen über dem Elektroden-Array, hervorgerufen durch Joulesche Wärme und AC-elektroosmotischen Fluss. Zudem konnte Dielektrophorese an Silberpartikeln beobachtet werden und mittels Fluoreszenz-, Atom-Kraft-, Raster-Elektronen-Mikroskopie und energiedispersiver Röntgenspektroskopie untersucht werden. Schließlich wurden die verwendeten Objektive und Kameras auf ihre Lichtempfindlichkeit hin analysiert, so dass die Vereinzelung von Biomolekülen an Nano-Elektroden nachweisbar war.

Festzuhalten bleibt also, dass die Vereinzelung von Nano-Objekten und Biomolekülen an Nano-Elektroden-Arrays gelungen ist. Durch den parallelen Ansatz erlaubt dies, Aussagen über das Verhalten von Einzelmolekülen mit guter Statistik zu treffen.

In this work, nanoelectrode arrays were used for single object immobilization by dielectrophoresis. Fluorescently labeled nanospheres were used as a model system and the results were transferred to biological samples. The experiments in combination with different electrode layouts led to a deterministic singling of the nanospheres for a fixed size ratio between nanosphere and tip diameter. Dielectrophoretic immobilization could also be demonstrated for the proteins BSA and R-PE, while R-PE molecules were even immobilized as single objects. For this purpose, in addition to an optimized electrode layout, which was searched by numerical field calculations, an optimization of the field parameters was required, in particular of voltage and frequency.

Besides dielectrophoresis, observations of other effects were made, e.g. electrolysis at nanoelectrodes and fluid flows caused by Joule heating and AC-electroosmotic flow. In addition, dielectrophoresis was observed on silver nanoparticles, which was examined by fluorescence-, atomic force-, scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy. Finally, the objectives and cameras were analyzed for their photosensitivity so that the singling of biomolecules on nanoelectrodes became detectable.

The successful singling of nanoobjects and biomolecules on nanoelectrodes has been shown in a parallel approach so that it is possible to make statements about the behavior of single molecules with good statistics.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. Die Idee: Einzelmolekül-Biosensoren	2
2. Einordnung in die aktuelle Forschung	4
2.1. Einzelmolekül-Methoden	4
2.2. Partikelfallen	6
2.3. Dielektrophorese an Biomolekülen und Einzelobjekten	7
3. Arbeitshypothese: Vereinzeln durch Dielektrophorese	8
II. Material und Methoden	9
4. Effekte im elektrischen Wechselfeld	10
4.1. Partikel im elektrischen Feld	10
4.1.1. Elektrisches Gleichfeld	11
4.1.2. Elektrisches Wechselfeld	12
4.2. Dielektrophorese-Kraft	13
4.2.1. Proportionalitäten	16
4.3. Störeffekte	16
4.3.1. Strömungen	17
4.3.2. Bläschenbildung durch Elektrolyse	19
4.3.3. Kettenbildung	20
4.3.4. Haften von Partikeln	20
5. Geräte	21
5.1. Nano-Elektroden	21
5.1.1. Zylinder-Elektroden	23
5.1.2. Kegel-Elektroden	24
5.1.3. Gegenelektrode	25
5.1.4. Aufbau	26
5.1.5. Reinigung der Elektroden-Chips	27
5.2. Mikroskopie	28
5.2.1. Fluoreszenz-Mikroskopie	28
5.2.2. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (C-LSM)	29
5.2.3. Objektive	29
5.2.4. Kameras	30

5.2.5.	Raster-Kraft-Mikroskopie (AFM)	30
5.2.6.	Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)	31
5.2.7.	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)	32
6.	Proben	33
6.1.	Modellsystem	33
6.1.1.	Mikro- und Nano-Sphären	33
6.2.	Biologische Proben und Farbstoffe	34
6.2.1.	R-PE aus <i>Pyropia tenera</i>	34
6.2.2.	Rinderserumalbumin (BSA)	36
6.2.3.	Rhodamin B	36
7.	Rechnergestützte Auswertung	37
7.1.	Numerische Simulationen mit Maze und Octave	37
7.2.	Histogramm-Methode	38
7.3.	Zeitliche Trajektorien	40
III.	Ergebnisse	41
8.	Numerische Simulationen	42
8.1.	Abstand der Elektrode zum ITO-Deckglas	42
8.2.	Einzelelektroden	43
8.2.1.	Zylinder-Elektrode	43
8.2.2.	Abschluss mit der Oberfläche	45
8.2.3.	Bead an der Spitze	45
8.2.4.	Kegel-Elektrode	47
8.2.5.	Kegel-Elektrode mit integrierter Gegenelektrode	47
8.2.6.	Spitzenumgebendes Siliziumdioxid	48
8.3.	Elektroden-Arrays	50
8.3.1.	Zylinder-Array	50
8.3.2.	Orientierungskreuz	52
8.3.3.	Kegel-Array	52
8.4.	Schlussfolgerungen	53
9.	Nano-Diektrophorese	54
9.1.	Diektrophorese an Nano-Sphären	54
9.1.1.	Diektrophorese an einem Silizium-Splitter	54
9.1.2.	Strömungen über dem Elektroden-Array	54
9.1.3.	Unterschiedliche Spitzenbeschichtungen	55
9.1.4.	Bestimmung der Beadanzahl und deren Vereinzelung	57
9.1.5.	Nachweis von Beads mittels EDX	68
9.1.6.	Beleuchtungsabhängige Diektrophorese	69
9.1.7.	Übergangsfrequenz und Grenzspannung	70

9.2. Störeffekte	73
9.2.1. Optimierung	73
9.2.2. Strömungen	73
9.2.3. Elektrolyse	74
9.2.4. Kettenbildung	78
9.2.5. Dielektrophorese von Silber-Nanopartikeln	78
9.3. Dielektrophorese an Biomolekülen	81
9.3.1. Temperaturmessungen mit Rhodamin B	81
9.3.2. Dielektrophorese von BSA	83
9.3.3. Dielektrophorese von R-PE	83
9.3.4. Einzelmoleküluntersuchungen an R-PE	85
IV. Diskussion	92
10. Parallele Einzelmolekül-Immobilisierung mittels Dielektrophorese	93
10.1. Numerische Simulationen	94
10.2. Nano-Dielektrophorese	95
10.2.1. Nachweis der immobilisierten Objekte	95
10.2.2. Störeffekte und Optimierung	98
10.2.3. Dielektrophorese oder AC-Elektrophorese?	101
V. Fazit	102
VI. Anhang	i
A. Material	ii
A.1. Geräte	ii
A.2. Proben	iii
B. Methoden	viii
B.1. Herleitungen zu DEP-Gleichungen	viii
B.2. Lichtstärke von Objektiven	xi
B.3. Charakterisierung von Kameras	xiii
C. Abkürzungen und Konstanten	xix
D. Literaturverzeichnis	xxi

Teil I.

Einleitung

1. Die Idee: Einzelmolekül-Biosensoren

Die Möglichkeit der Halbleitertechnik, immer kleinere Strukturen herzustellen, diese mit immer besseren Mikroskopiemethoden zu beobachten und so in Zusammenhang zu biologischen Proben zu bringen, hat dazu geführt, dass Konzepte wie *Lab on a Chip*, *Point of Care Diagnostic* und *eHealth* entwickelt wurden. Hier liegt die Bestrebung zugrunde, nicht mehr darauf angewiesen zu sein, medizinische Proben in großen Mengen zeitaufwendig in ein Labor schicken zu müssen, sondern direkt vor Ort schnell und effizient durch eine geringe Probe, deren Entnahme dem Patienten möglichst wenig Unbehagen bereitet, ein Ergebnis zu erhalten. Das Schlüsselement dieser Technologie stellt der **Biosensor** dar.

Prinzipiell bestehen Biosensoren aus einer großen Anzahl von Biorezeptor-Molekülen, die auf einer Transducer-Elektrode immobilisiert werden und im Fall einer Bindung an einen Analyten zu einem Signal führen. Das gesamte Signal erweist sich als statistische Mittelung über die Signale aller Biorezeptor-Moleküle, an die Analyten gebunden haben. Bei dieser Anordnung, in der die Biorezeptor-Moleküle zufällig orientiert auf der Transducer-Elektrode festgehalten werden, kommt es dazu, dass einige der Bindungsstellen nicht für die Analyten zugänglich sind. Eine erste Optimierung läge also in einer Ausrichtung der Biorezeptor-Moleküle auf der Transducer-Elektrode. Das verstärkte Signal, das auf diese Weise entsteht, ist allerdings weiterhin ein Ensemble-Signal. Möchte man Aussagen über individuelle Analyten treffen, wird eine andere Art Biosensor nötig: Ein **Einzelmolekül-Biosensor**.

Dieser müsste die Möglichkeit der Einzelmolekül-Analyse mit einem hohen Durchsatz vereinen, so dass die Unterschiede der Signale der einzelnen Analyten mit statistischen Methoden auswertbar wären. Dieses *maximale* Level der Miniaturisierung würde nicht nur zu einer Optimierung der Biosensoren führen, sondern auch ein neues Level der Biosensorik eröffnen, bei dem zusätzlich eine Option der Informationsgewinnung bezogen auf Einzelmoleküle besteht.

Die methodische Entwicklung einer parallelen Einzelmolekül-Immobilisierung war das Ziel dieser Arbeit.

Das Projekt, in dem diese Arbeit zunächst angesiedelt war, hieß *T(h)eraDiagnostic*. Es beschäftigte sich mit der Entwicklung und Miniaturisierung eines diagnostischen Mikrosystems als Biosensor. Das Nachfolgeprojekt hieß *BioBic*, führte die Arbeiten an Biosensoren fort und übertrug sie auf den Nachweis und die Klassifizierung von Influenza-Viren und von anderen Erregern. Beide Projekte wurden von der Europäischen Union gefördert.

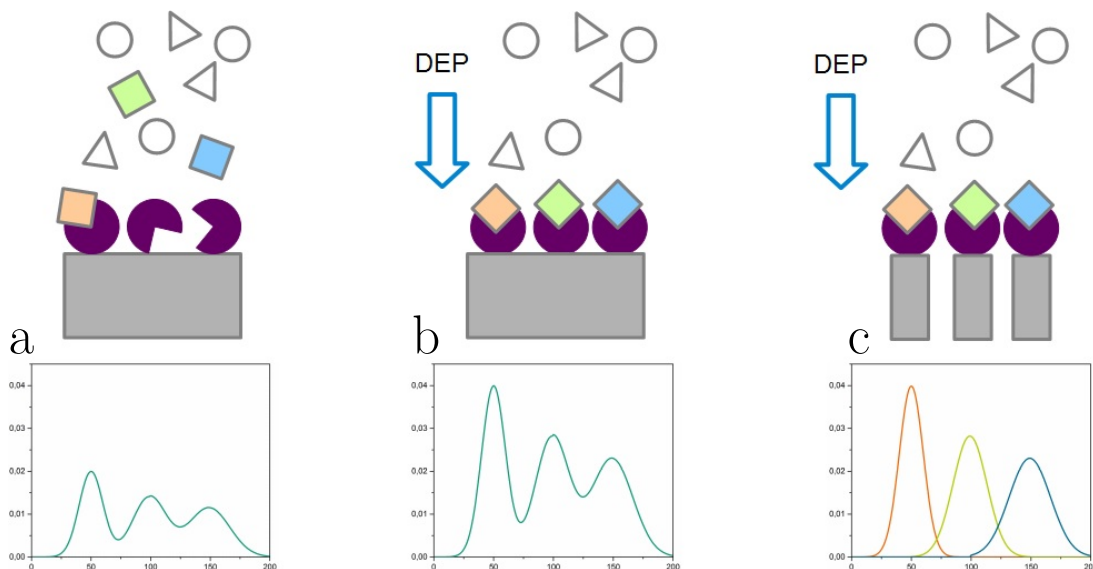


Abbildung 1.1.: Ein Biosensor besteht prinzipiell aus einer Transducer-Elektrode (grau), auf der Biorezeptor-Moleküle (violett) immobilisiert werden. An diese binden die Analyten (Quadrate) und es wird ein Signal erzeugt. Im Normalfall werden die Biorezeptoren zufällig ausgerichtet (a). Nutzt man die Dielektrophorese (DEP), so werden Objekte parallel zu den Feldlinien ausgerichtet [71] (b). Im Optimalfall könnte eine geschickte Wahl der Elektrodenform dazu führen, dass alle Bindungsstellen den Analyten zugänglich wären. Eine solche Optimierung würde zu einer Verstärkung des Signals führen. Gleichzeitig würden durch die Dielektrophorese-Kraft die Biorezeptoren schneller immobilisiert werden. Das erzeugte Signal jedoch gibt nur Aufschluss über das Verhalten aller Analyten als Ensemble. Möchte man Aussagen über das Verhalten jedes einzelnen treffen, so wird die Entwicklung eines Einzelmolekül-Biosensors notwendig. Damit an dieser Stelle nicht die statistische Information mehrerer Analyten verloren geht, kann mit einer Vielzahl paralleler Elektroden gearbeitet werden (c).

2. Einordnung in die aktuelle Forschung

2.1. Einzelmolekül-Methoden

Vorgänge auf Einzelobjektebene unterscheiden sich vom Verhalten, das durch Ensemble-Messungen erkannt wird, zum Teil erheblich, da in letzterem Informationen über Zustände einzelner Moleküle in der Mittelung verloren gehen.

An einem Beispiel lässt sich dies illustrieren: Angenommen, man möchte eine Substanz auf ihre Wirksamkeit hin untersuchen und führt dafür Messungen am Ensemble durch. Als Ergebnis erhalte man, dass die Substanz nach einer Zeit t nur noch eine Wirksamkeit von 50% zeigt. Für die Betrachtung des Ensembles ist es nun nicht möglich zu unterscheiden, ob jedes Molekül zu 50% wirksam ist oder ob die Hälfte aller Moleküle es vollständig ist und die andere gar nicht.

Die Schwierigkeit der Einzelmolekülmessungen liegt zum einen darin, Moleküle mit einer Größe im Nanometerbereich als Einzelobjekte **nachzuweisen** und zum anderen darin, ihre **Position im Raum** zu kontrollieren.

Nachweis einzelner Moleküle

Die Auflösung der Mikroskopie ist limitiert. Klassischerweise gilt für die optische Mikroskopie das Abbe-Limit. Es besagt, dass die Auflösung durch die Beugung des Lichtes begrenzt ist. Es gilt für den minimal auflösbaren Abstand

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2 \cdot n_m \sin(\alpha)} = \frac{\lambda}{2 \cdot NA},$$

mit λ , der Wellenlänge des verwendeten Lichtes, n_m , dem Brechungsindex des Mediums ($n_{Luft} \approx 1$, $n_{\text{Öl,Glas}} \approx 1,5$) und α , dem halben Öffnungswinkel des Objektivs. $NA = n_m \sin(\alpha)$ gibt als Kenngröße eines Objektivs die numerische Apertur. Bei einer Wellenlänge von grob 500 nm des verwendeten Lichtes kann man in Luft maximal Objekte mit einer Größe von etwa 250 nm und bei Öl-Immersion maximal Objekte mit einer Größe von grob 170 nm sichtbar machen.

Diese Auflösungsgrenze wurde erst durch Methoden hochauflösender Mikroskopie (C-LSM, SIM, STED, SMLM (PALM, STORM), REM, AFM) überwunden. Solche hochauflösenden Methoden haben unterschiedliche Auflösungsgrenzen [104] (x/y: C-LSM: 250 nm, SIM: 120 nm, STED: 50 nm, SMLM (PALM, STORM): 20 nm, REM: 1 nm, AFM: 1 nm) und Voraussetzungen (fluoreszierend, an-/aus-Zustände, leitende Oberfläche, Vakuum).

Der Nachweis kleinster Objekte durch superauflösende Fluoreszenzmikroskopie wurde 2014 mit dem Chemie-Nobelpreis für Eric Betzig, Stefan Hell und W.E. Moerner

gewürdigt [86]. Insbesondere die Arbeiten von W.E. Moerner bezüglich des Nachweises einzelner Moleküle durch deren Blinken [87] sind in dieser Arbeit von Interesse.

Das Blinken fluoreszierender Moleküle ist allgemein als Nachweis anerkannt, dass es sich hierbei um Einzelobjekte handelt [95, 106]. Betrachtet man ein Ensemble vieler Moleküle, so erhält man für eine Probe die Fluoreszenz als breiten Peak im Spektrum. Durch leichte Veränderungen in Rotations- oder Vibrationszuständen fluoreszieren die Moleküle bei geringfügig unterschiedlichen Wellenlängen, so dass es statistisch zu einer Gaußverteilung kommt. In der Ensemblemessung werden Änderungen der Zustände nicht sichtbar, da sie sich herausmitteln. Betrachtet man nun allerdings einzelne Moleküle, so lassen sich diskrete An- und Aus-Zustände der Fluoreszenz beobachten, das sogenannte Blinken.

Dessen Ursache liegt in langlebigen Triplett-Zuständen. Bei der Fluoreszenz kommt es allgemein zur spontanen Emission von Licht aus dem spinerlaubten Singulett-Zustand eines angeregten Fluorophors, wenn es wieder in den Grundzustand fällt. Etwa alle 1000 Anregungen wird durch Spinumkehr beim *intersystem crossing* vom Singulett- zum spinverbotenen Triplett-Zustand gewechselt, dessen Lebensdauer mindestens 1000-mal länger ist als die des Singulett-Zustands [44]. Für diese Zeit hört das Molekül auf zu emittieren, bis es nach erneuter Spinumkehr in den Grundzustand zurückkehrt. Dies führt zu einem An- und Aus-Zustand der Fluoreszenz des einzelnen Moleküls, was als Blinken zu beobachten ist.

Für selbstleuchtende Objekte gilt zudem das Rayleigh-Kriterium. Es besagt, dass diese gerade dann noch unterscheidbar sind, wenn ihr Abstand mindestens dem Abstand des ersten Beugungsminimums zum Zentrum entspricht. Andererseits bedeutet das aber auch, dass bei ausreichendem Abstand zweier selbstleuchtender Objekte und einem genügend empfindlichen Detektor (z.B. single photon detector) auch Objekte, die kleiner als 250 nm sind, unterschieden werden können. Hierbei ist es allerdings notwendig, dass ein ausreichender Kontrast zum Hintergrund gegeben ist. Dies ist einer der Vorteile der konfokalen Mikroskopie. In der Konfokalmikroskopie wird über ein Pinhole eine Schärfebene eingestellt, die der Ebene entspricht, in der das Präparat sich befindet. Dieses wird daraufhin abgerastert, wodurch die Hintergrundfluoreszenz unterdrückt wird.

Auch andere Methoden können zum Nachweis von Einzelmolekülen herangezogen werden. Über Fluoreszenzlebensdauer-Messungen kann die mittlere Lebensdauer eines einzelnen Moleküls im angeregten Zustand bestimmt werden, bevor es in den Grundzustand zurückkehrt und dabei ein Photon aussendet. Eine Einzelpartikelverfolgung über die FCS ist ebenfalls möglich. Hier beobachtet man ein Blinken, wenn sich das Molekül bewegt. Befindet es sich im Fokus des Mikroskops, ist ein An-Zustand zu beobachten, wenn es sich außerhalb des Fokus befindet, ein Aus-Zustand.

Ist es einmal gelungen, ein einzelnes Molekül zu fangen und nachzuweisen, so kann man an ihm weitere Untersuchungen durchführen. Mit dem AFM beispielsweise lassen sich durch Auseinanderziehen der Sekundärstruktur Aussagen über den Aufbau eines Moleküls zeigen [92].

2.2. Partikelfallen

Partikelfallen dienen in der Physik dazu, mikroskopische Teilchen im Raum festzuhalten.

Eine der bekanntesten Partikelfallen ist die von Wolfgang Paul 1953 entwickelte Paulfalle [96], in der geladene Teilchen zwischen hyperbolischen Elektroden gefangen werden können. Für deren Entwicklung wurde bereits 1989 der Physik-Nobelpreis verliehen. Diese Art der Partikelfalle benötigt allerdings geladene Objekte. Möchte man eine Anwendung auf biologische Systeme übertragen, wird eine Methode benötigt, die es ermöglicht, auch ungeladene Objekte zu fangen.

Das öffentliche Interesse der letzten Jahre an Anwendungen physikalischer Prinzipien auf biologische Systeme ist groß, wie sich auch in der Vergabe der letzten Nobelpreise zeigt. So ehrt der Nobelpreis für Physik des letzten Jahres (2018) unter anderem Arthur Ashkin für die Entwicklung der Methode der optischen Pinzette [7] und deren Anwendung auf biologische Systeme. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Partikelfalle, die auf ungeladene polarisierbare Objekte wirkt. Hierbei wird durch das elektromagnetische Feld eines eingestrahlten Laserstrahls ein elektrischer Dipol induziert. Es kommt zu einer Wechselwirkung zwischen Feld und induziertem Dipol. Diese Wechselwirkung erzeugt eine Kraft entlang des elektrischen Feldgradienten in Richtung des Ortes maximaler Lichtintensität, in diesem Fall zum Fokus des Laserstrahls. Auf diese Weise ist es realisierbar, Nanopartikel zu fangen und festzuhalten.

Die Kraft F_{OP} , die auf ein Teilchen wirkt, lässt sich als Gradientenkraft darstellen [45]. Es gilt

$$F_{OP} = 2\pi r^3 \varepsilon_0 n_m^2 \left(\frac{\frac{n_p^2}{n_m^2} - 1}{\frac{n_p^2}{n_m^2} + 2} \right) \nabla |E^2|,$$

mit $n_{m,p}$ dem Brechungsindex des Mediums bzw. des Partikels.

Eine zur optischen Pinzette komplementäre Methode ist die Dielektrophorese (DEP). Auch hier bildet sich eine Gradientenkraft F_{DEP} auf ein ungeladenes polarisierbares Partikel aus. Für diese Kraft, bei der durch ein elektrisches Feld ebenfalls ein Dipol in ein polarisierbares Objekt induziert wird, gilt analog [103]

$$F_{DEP} = 2\pi r^3 \varepsilon_0 \varepsilon_m \operatorname{Re} \left(\frac{\frac{\varepsilon_p^*}{\varepsilon_m^*} - 1}{\frac{\varepsilon_p^*}{\varepsilon_m^*} + 2} \right) \nabla |E^2|,$$

mit $\varepsilon_{m,p}^*$ der komplexen elektrischen Permittivität des Mediums bzw. des Partikels.

Entdeckt wurde die Dielektrophorese 1951 von Herbert A. Pohl [102]. Er verwendete noch vergleichsweise große Elektroden und Hochspannungen. Später wurde an Mikroelektroden experimentiert [105], wodurch die verwendeten Spannungen deutlich reduziert werden konnten. Heute werden auch Elektroden im Nanometerbereich genutzt [94]. An diesen lassen sich Experimente mit Spannungen im Bereich einiger Volt verwirklichen. Auch die Probenpartikel können so immer geringere Größen haben. Hierdurch werden Anwendungen als Biosensoren in der medizinischen Diagnostik [34, 6] sowie in der Mikrofluidik, zur Partikelsortierung [29, 57] und insbesondere auf Biopartikel [66, 90] möglich. Eine Kombination der Technik der optischen Pinzette und der Dielektrophorese

kann ebenfalls erfolgen und wurde 2015 beispielsweise bei Pesce et al. [97] genutzt, um Dielektrophorese-Kräfte auf ein optisch gefangenes Nanobead zu untersuchen.

In dieser Arbeit findet die Methode der Dielektrophorese zur Immobilisierung Anwendung. In Kapitel 4.2 befindet sich eine genauere Beschreibung der Dielektrophorese-Theorie.

2.3. Dielektrophorese an Biomolekülen und Einzelobjekten

Die Verwendung der Dielektrophorese als Immobilisierungsmethode für biologische Objekte hat in den letzten Jahren zugenommen. Man kann einen Trend in Richtung Bio- und Nanotechnologie erkennen [99]. Als Beispiel sei hier die Manipulation von Proteinen genannt.

Die erste Manipulation von Biomolekülen, in diesem Fall das Auseinanderziehen von λ DNA mit Dielektrophorese wurde von Masao Washizu 1990 [122] veröffentlicht. Zu diesem Zeitpunkt wurde davon ausgegangen, dass sich die Dielektrophorese zwar auf Zellen, aber wegen der Brownschen Bewegung nicht auf Nanometer-Objekte übertragen ließe. 1994 jedoch gelang es Washizu et al., Dielektrophorese an Avidin-Proteinen zu zeigen [123].

Die Manipulation von Proteinen wurde in den darauf folgenden Jahren vielfach untersucht [90]. Proteine wurden immobilisiert [58] und es konnte gezeigt werden, dass Antikörper-Bindungen nach der Dielektrophorese weiterhin aktiv sind [94]. Ebenso ist die Enzymaktivität nach der Dielektrophorese noch vorhanden [69]. Mithilfe von Nanopipetten wurden Proteine und einzelne DNA-Moleküle gefangen [23, 31].

Hierbei geht der Trend zu immer schärferen Elektroden. Entwicklungen mit Graphen gehen sogar soweit, einatomig scharfe Elektroden für die Untersuchung von DNA-Molekülen bereitzustellen [12]. Auch gibt es eine Entwicklung von spitzen Elektroden beispielsweise aus Gold [56] oder auf Basis von AFM-Spitzen [73, 74] für die Immobilisierung und Untersuchung von Einzelobjekten. Es wurden lange Objekte wie einzelne Nanowires [32, 35] oder Nanotubes immobilisiert [16], aber auch sphärische Objekte, die in allen Dimensionen in der Nanometergrößenordnung liegen, wie einzelne Beads [50, 60, 9] oder einzelne Proteine [47]. Dies allerdings konnte bisher nur an einigen wenigen Objekten gezeigt werden, nicht aber gleichzeitig an größeren Mengen.

Für eine größere Auswahl einzelner Objekte ist eine parallele Immobilisierung über Arrays möglich. Bei deren Entwicklung gibt es prinzipiell zwei Richtungen. Zum einen werden Locharrays genutzt [8, 11], um an deren Rändern Proteine wie BSA festzuhalten, oder es werden Nadelelektroden verwendet [128, 65].

Eine Herausforderung ist es nun, die Immobilisierung von Einzelobjekten und die Anwendung von großen Arrays zusammenzubringen.

3. Arbeitshypothese: Vereinzelnung durch Dielektrophorese

Gerade zu Beginn dieser Arbeit Ende 2011 war, nach dem Stand der Literatur zu urteilen, wenig über Dielektrophorese als Mittel für Einzelmolekülstudien bekannt. Experimente an größeren Objekten wie einzelnen Zellen waren und sind durchaus im öffentlichen Interesse [13, 55, 63, 59, 54]. Auch kommerzielle Anwendungen gibt es inzwischen. Zur Immobilisierung einzelner Moleküle mittels Dielektrophorese gab es 2011 aber lediglich die Arbeiten von Hölzel et al. [47] aus dem Jahr 2005.

2007 wurde von Yamamoto et al. [128] ein 9fach Array mit Nano-Elektroden mit 50 nm Durchmesser auf BSA-Moleküle angewendet. Es war aber noch nicht möglich, daran Einzelmoleküle zu immobilisieren.

Hier greifen die Arbeiten von Otto et al. [94] an, in denen 2014 die Immobilisierung vieler R-PE-Moleküle und Antikörper auf in Arrays angeordneten Nano-Elektroden gezeigt werden konnte. Auch Schäfer et al. [111] immobilisierten 2015 viele BSA-Moleküle auf in Arrays angeordneten Elektroden. Barbee et al. [8] gelang 2009 das Festhalten vieler einzelner Nanobeads bis hinunter zu 500 nm Durchmesser mittels Dielektrophorese auf einem Locharray. 2015 erreichten Leiterer et al. [73] die Immobilisierung einzelner Silber- und Gold-Nanoobjekte mit 15 nm-100 nm Durchmesser an einzelnen spitzen Elektroden (AFM-Spitzen).

Um das Ziel dieser Arbeit, die parallele Einzelmolekül-Immobilisierung für statistische Aussagen auf Einzelobjektebene zu erreichen, sollte eine Verbindung des Ansatzes, Elektroden in Arrays anzuordnen, und des Nachweises von Einzelmolekülen gefunden werden.

Dafür wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass, sofern die Immobilisierung von Einzelmolekülen durch Dielektrophorese an Nano-Elektroden grundsätzlich möglich ist, das erste immobilisierte Molekül das elektrische Feld derart abschwächt, dass kein weiteres Molekül festgehalten wird, sofern die Feldeinstellungen und das Elektrodendesign richtig gewählt werden.

Um die Hypothese zu überprüfen, galt es, diese Einstellungen und Parameter zu finden und zu optimieren.

Teil II.

Material und Methoden

4. Effekte im elektrischen Wechselfeld

4.1. Partikel im elektrischen Feld

Um Kraftwirkungen auf Objekte auszuüben, können elektrische Felder verwendet werden. Werden Partikel, die sich in einer Flüssigkeit befinden, einem elektrischen Feld ausgesetzt, so treten verschiedene Kräfte und daraus resultierende Effekte auf. Hierbei gilt es grundsätzlich zu unterscheiden, ob es sich um geladene oder ungeladene Teilchen, Wechsel- oder Gleichfelder sowie homogene oder inhomogene Felder handelt, wodurch acht verschiedene Fälle betrachtet werden können. Es treten neben erwünschten Effekten wie Elektrophorese und Dielektrophorese auch Störeffekte wie Strömungen aufgrund von *elektroosmotischem Fluss* (AC-EOF) und Joulscher Wärme auf.

Auf alle Partikel im elektrischen Feld wirken verschiedene Kräfte, die sich zum Teil gegenseitig verstärken und zum Teil miteinander konkurrieren.

Es gilt allgemein für die Kraft auf ein (geladenes) Partikel in einer Flüssigkeit im elektrischen Feld

$$F_Q = qE, \quad (4.1)$$

mit der Ladung q . Dieser Kraft wirkt die *Stokessche Reibung* im Medium entgegen, die sich mit

$$F_R = 6\pi r \eta_m v \quad (4.2)$$

beschreiben lässt, mit dem Teilchenradius r , der Viskosität des Mediums η_m und der Geschwindigkeit des Teilchens v . Außerdem wirken die Gravitationskraft $F_G = m \cdot g$ und die Auftriebskraft $F_A = g \rho_m V$, mit $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ dem Volumen des Körpers und $\rho_{m,p} = \frac{m}{V}$, den Dichten des Mediums bzw. des Partikels. Für sphärische Objekte gilt dann

$$F_G = \frac{4}{3}\pi r^3 \rho_p g \quad (4.3)$$

bzw.

$$F_A = \frac{4}{3}\pi r^3 \rho_m g. \quad (4.4)$$

Für kleine Objekte ist zudem die Brownsche Bewegung [130] zu berücksichtigen mit

$$F_{BB} = \sqrt{12\pi\eta_m r k_B T}, \quad (4.5)$$

mit T der Temperatur der Flüssigkeit und k_B der Boltzmannkonstante.

4.1.1. Elektrisches Gleichfeld

Elektrophorese: Geladenes Partikel im homogenen Gleichfeld Bringt man ein in Lösung befindliches geladenes Partikel in ein homogenes elektrisches Gleichfeld, so wird dieses Partikel auf Grund der Coulomb-Kraft zu der Elektrode mit entgegengesetzter Ladung gezogen. Hierbei muss die Stern-Doppelschicht berücksichtigt werden, das heißt, dass sich an Ladungen eine Schicht aus gegensätzlich geladenen Ionen bildet und dahinter eine diffuse Ionen-Wolke. Diese elektrochemischen Doppelschichten treten sowohl an den Elektroden als auch insbesondere um die geladenen Partikel auf, wodurch sich der scheinbare Radius des Partikels verändert. Die Bewegung der geladenen Partikel zu einer Elektrode findet bei der Methode der **Elektrophorese** Anwendung. Hier bewegen sich Teilchen aufgrund verschiedener Ladung abhängig vom Teilchenradius unterschiedlich schnell durch das Trägermaterial, wodurch es möglich ist, eine Auftrennung zu erreichen.

Ungeladenes polarisierbares Partikel im homogenen Gleichfeld In einem elektrischen Feld entsteht durch die Ladungsverschiebung im ungeladenen polarisierbaren Partikel ein Dipol (und eine Ladungswolke außerhalb des Partikels). Die Größe des Dipolmoments hängt hierbei von der Feldstärke des angelegten Feldes bzw. der Größe der angelegten Spannung ab. Das Dipolmoment des Partikels ist proportional zur Feldstärke $\vec{p} = \alpha \vec{E}$. Die Proportionalitätskonstante α heißt Polarisierbarkeit. Hat das Partikel eine höhere Polarisierbarkeit als das umgebende Medium, ist der induzierte Dipol dem Feld entgegen gerichtet.

An den Spitzen des Dipolvektors sammeln sich jeweils mit entgegengesetzter Ladung Ionen, die den scheinbaren Radius des Partikels verändern. Zudem verändert das Partikel selbst den Verlauf der Feldlinien [66, 88].

Befindet sich ein solcher Dipol in einem homogenen elektrischen Feld, so erfolgt die Ladungstrennung und Feldveränderung gleichmäßig, was dazu führt, dass die Dipolkraft zu jeder Elektrode gleich groß ist, wodurch das Partikel **keine Bewegung** erfährt.

Geladenes Partikel im inhomogenen Gleichfeld Betrachtet man Partikel, die sich in einem inhomogenen elektrischen Feld befinden, so ist die Kraftwirkung auf jeden Punkt des Partikels nicht mehr gleich. In einem inhomogenen Feld gibt es Regionen hoher Feldstärke, auch hier wird der Feldverlauf durch das Partikel selbst verändert. Das Partikel erfährt also nicht überall dieselbe Feldwirkung. Hierdurch entsteht eine Kraft auf den Dipol und die Partikel werden in Bewegung versetzt. Ein geladenes Teilchen wird weiterhin mit einer Gegenionenwolke umgeben in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode gezogen. Hierbei bewegt es sich allerdings dem Feldverlauf entsprechend.

DC-Dielektrophorese: Ungeladenes polarisierbares Partikel im inhomogenen Gleichfeld In einem ungeladenen polarisierbaren Teilchen, das sich im inhomogenen elektrischen Gleichfeld befindet, wird ein Dipol induziert. In diesem Fall aber kommt es durch die Inhomogenität des Feldes dazu, dass die Feldstärke in jedem Punkt des Teilchens

unterschiedlich ist, was dazu führt, dass die Kraft auf dieses Partikel nicht mehr in beide Richtungen gleich groß ist. Das Partikel selbst und seine Gegenionen beeinflussen ebenfalls das elektrische Feld. Die Inhomogenität des elektrischen Feldes schließlich führt dazu, dass das Partikel sich bewegt. Diese Bewegung ist je nach Vorzeichen der Polarisierbarkeit entweder zu Positionen besonders hoher oder besonders niedriger Feldstärke gerichtet und wird als **positive** oder **negative (DC-)Dielektrophorese** bezeichnet.

4.1.2. Elektrisches Wechselfeld

Im elektrischen Wechselfeld ist neben der elektrischen Feldstärke \vec{E} die Frequenz des Umpolens ω zu beachten.

Geladenes Partikel im homogenen Wechselfeld Für ein geladenes Partikel, das sich in einem elektrischen Wechselfeld befindet, gilt für jeden Zeitpunkt t_n das gleiche Verhalten wie in einem Gleichfeld. Da sich jedoch nach einer Zeit Δt die Polung der Elektroden umkehrt, wodurch sich die Kraft auf das Partikel in die entgegengesetzte Richtung ändert, erfährt das Partikel im zeitlichen Mittel **keine Bewegung**. Bei niedrigen Frequenzen, was langen Zeiten Δt entspricht, kann es jedoch zur **AC-Elektrophorese** kommen, bei der an beiden Elektroden ein Verhalten, wie es die Elektrophorese hervorrufen würde, auftritt [107].

Ungeladenes polarisierbares Partikel im homogenen Wechselfeld Ein ungeladenes polarisierbares Teilchen im elektrischen Wechselfeld erfährt **keine Bewegungskraft**, da ein Umpolen des Feldes die sich ausgleichenden Kräfte auf den Dipol nicht ändert. Eine Bewegung des Partikels kann allerdings dadurch zustande kommen, dass es eine zeitliche Verzögerung des Umpolens des induzierten Dipols in Bezug auf die Frequenz des angelegten Feldes gibt. Dies führt zu einer oszillatorischen Bewegung um eine feste Position.

Geladenes Partikel im inhomogenen Wechselfeld Es kommt im inhomogenen Wechselfeld wie auch im Gleichfeld zu einem Kräfteungleichgewicht, was zu einer Bewegung führt. Befindet sich ein geladenes Teilchen im Feld, so kommt es durch das ständige Umpolen des Feldes zu einer Bewegung. Nach jeder Zeit Δt wirkt eine Kraft mal zur einen, mal zur anderen Elektrode. Die Addition dieser Kraftvektoren gibt die Richtung an, in die sich das Partikel bewegt. Die resultierende Bewegung ist zunächst parallel zu den Elektroden gerichtet, bis mittig zwischen den Elektroden ein Kräftegleichgewicht herrscht und es zu keiner weiteren Bewegung kommt.

AC-Dielektrophorese: Ungeladenes polarisierbares Partikel im inhomogenen Wechselfeld Den Fall eines ungeladenen polarisierbaren Partikels im inhomogenen Wechselfeld beschreibt die **(AC-)Dielektrophorese**. Hier wird in dem Partikel ein Dipol induziert, der sich bei jedem Umpolen (mit einer gewissen Verzögerung) auch umpolt. Es kommt hierdurch zu jeder Zeit t_n zu einer Kraftwirkung in die gleiche Richtung, da sich das

Partikel im inhomogenen Feld befindet. Die Größe und Richtung der Kraft hängt von der angelegten Frequenz, Spannung, den elektrischen Eigenschaften des Partikels und dem es umgebenden Mediums sowie der Form der Elektroden ab. Außerdem ist diese Kraft proportional zum Volumen des Partikels, wächst also mit dessen Größe. Es können Teilchen zu Positionen hoher Feldstärke gezogen oder gerade von diesen Positionen abgestoßen werden. Diese Effekte nennt man analog zum DC-Fall **positive** bzw. **negative (AC-)Dielektrophorese**. Auf diese Weise bewegt sich das Partikel im Fall von positiver Dielektrophorese zu der Stelle der größten Feldstärke.

Für ungeladene Partikel gleicher Art erwartet man wegen der gleich ausgerichteten induzierten Dipole eine Kettenbildung im inhomogenen Feld. Diese Ketten spannen sich entlang der Feldlinien auf.

Betrachtet man die Dielektrophorese an kleinen Teilchen, so wird die DEP-Kraft so klein, dass verschiedene Störeffekte auftreten. Neben der Auftriebskraft wirkt auf kleine Teilchen auch die Kraft der Brownschen Bewegung. Zudem sind die Partikel Strömungen im Medium ausgesetzt, die zum Beispiel durch Erwärmungen oder AC-elektroosmotischen Fluss entstehen.

In dieser Arbeit findet insbesondere die AC-Dielektrophorese Anwendung.

4.2. Dielektrophorese-Kraft

Zur Betrachtung der Kraftwirkung der Dielektrophorese auf ein Partikel im elektrischen Wechselfeld kann man unter der Vereinfachung, dass das Partikel eine sphärische Gestalt hat, eine relativ einfache Gleichung für die DEP-Kraft aufstellen [103, 98]. Über die Zeit gemittelt lässt sie sich darstellen als

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_0\epsilon_m r^3 \operatorname{Re}\{K(\omega)\} \nabla |E_{rms}^2|, \quad (4.6)$$

mit $\epsilon_{m,p}$ der elektrischen Permittivität des Mediums bzw. des Partikels, r dem Radius des Partikels, $\omega = 2\pi\nu$ der Kreisfrequenz des angelegten Wechselfeldes, $\nabla |E_{rms}^2|$ dem Gradienten des Quadrats des elektrischen Feldes sowie

$$K(\omega) = \frac{(\epsilon_p^* - \epsilon_m^*)}{(\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*)}, \quad (4.7)$$

dem Clausius-Mossotti Faktor (CM-Faktor). Dieser beschreibt den Einfluss des Mediums auf die Dielektrophorese und insbesondere das zeitliche Hinterherhinken der Ausrichtung des Dipols beim Umpolen der Spannung. Hierbei ist $\epsilon_{m,p}^*$ die komplexe elektrische Permittivität des Mediums bzw. des Partikels. Für sie gilt

$$\epsilon_{m,p}^* = \epsilon_{m,p}\epsilon_0 - i \frac{\sigma_{m,p}}{\omega}$$

mit $\sigma_{m,p}$ der Leitfähigkeit des Mediums bzw. Partikels und $i = \sqrt{-1}$.

Es können drei Fälle auftreten, abhängig von der angelegten Frequenz.

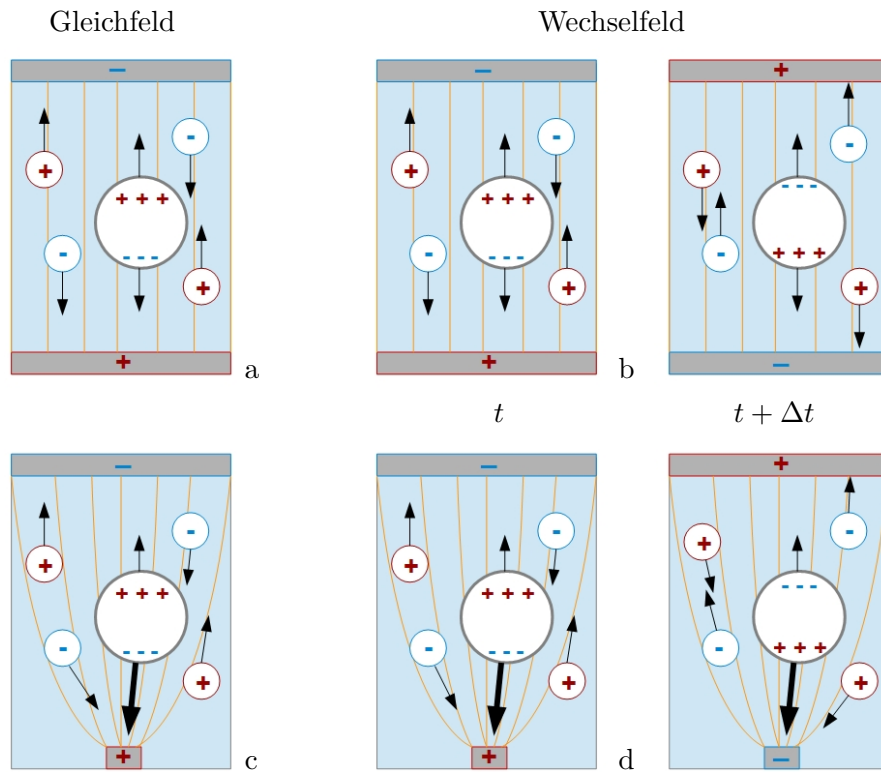


Abbildung 4.1.: Partikel im elektrischen Feld: Unterschieden werden vier bzw. acht Fälle. Im homogenen elektrischen Gleichfeld (a) kommt es zu einer Bewegung geladener Teilchen, während polarisierbare Teilchen an ihrer Position bleiben, da ein Kräftegleichgewicht herrscht. Im homogenen Wechselfeld (b) gleichen sich im zeitlichen Mittel auch die Kräfte auf geladene Teilchen aus, so dass es zu keiner Bewegung kommt. Im inhomogenen Feld tritt Dielektrophorese auf. Die Kräfte auf Partikel sind nicht mehr symmetrisch, da die Feldstärke ortsabhängig ist. Im inhomogenen Gleichfeld (c) werden sowohl geladene als auch ungeladene polarisierbare Objekte bewegt. Im inhomogenen Wechselfeld (d) hingegen gleichen sich die Kräfte auf geladene Teilchen im zeitlichen Mittel nahezu aus, so dass sich nur ungeladene polarisierbare Objekte bewegen.

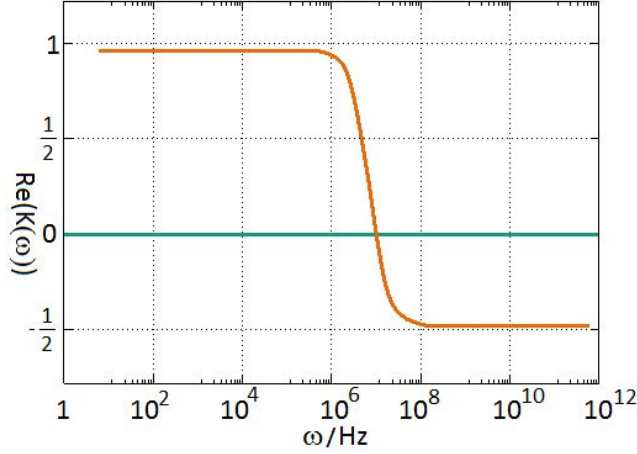


Abbildung 4.2.: Realteil des zur Dielektrophoresekraft proportionalen Clausius-Mossotti-Faktors für den Fall von Polystyrolbeads in Reinstwasser mit $\varepsilon_m = 80$, $\varepsilon_p = 2,5$, $\sigma_m = 10^{-4} \frac{S}{m}$ und $\sigma_p = 10^{-2} \frac{S}{m}$. Der Realteil des Clausius-Mossotti-Faktors nimmt Werte zwischen $+1$ und $-\frac{1}{2}$ an. Für niedrige Frequenzen ist der Wert von $Re\{K(\omega)\}$ im Fall von Polystyrolbeads in Wasser positiv, für hohe negativ. Im positiven Bereich kommt es zu einer Anziehung der Partikel an Positionen hoher Feldliniendichte (pDEP), im negativen Bereich zu einer Abstoßung von diesen Positionen (nDEP).

Gilt $Re\{K(\omega)\} > 0$, so tritt positive DEP (pDEP) auf. Die Partikel werden zu Regionen hoher Feldstärke bewegt.

Bei $Re\{K(\omega)\} < 0$, der negativen DEP (nDEP) hingegen, werden die Partikel von Regionen hoher Feldstärke abgestoßen und sammeln sich in den Regionen mit der geringsten Feldstärke.

Der Grenzfall für $Re\{K(\omega_{xo})\} = 0$ definiert die Übergangsfrequenz. Es tritt in diesem Fall keine Bewegung durch DEP auf. Aus ω_{xo} lässt sich nach einigen Umformungen (vgl. Anhang Kapitel B.1) die Leitfähigkeit des zu untersuchenden Partikels bestimmen.

Es gilt dann für die Übergangsfrequenz

$$\omega_{xo} = \sqrt{\frac{(\sigma_m - \sigma_p)(\sigma_p + 2\sigma_m)}{(\varepsilon_p - \varepsilon_m)(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)\varepsilon_0^2}} \quad (4.8)$$

bzw. für die Oberflächen-Leitfähigkeit des Partikels

$$\sigma_p = \frac{\sigma_m}{2} + \sqrt{\omega_{xo}^2 \varepsilon_0^2 (\varepsilon_m - \varepsilon_p)(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m) + \frac{9}{7} \sigma_m^2}. \quad (4.9)$$

4.2.1. Proportionalitäten

Aus der Gleichung für die Dielektrophorese-Kraft 4.6 folgen einige Proportionalitäten, die für die praktische Arbeit im Labor nützlich sind.

Die Abhängigkeiten der Dielektrophoresekraft von den Materialeigenschaften der Probe und des Mediums $F_{DEP}(\varepsilon_{p,m}, \sigma_{p,m})$ spielen für Messungen eine entscheidenden Rolle. Diese treten im Realteil des Clausius-Mossotti-Faktors (vgl. Glg. 4.7) auf. Es gilt $F_{DEP} \sim \text{Re}\{K(\omega)\}$. Eine Änderung des Mediums beispielsweise hätte Auswirkungen auf die Dielektrophoresekraft. Hier ist es möglich, mit geeigneten Medien eine Vergrößerung der Kraftwirkung zu erreichen.

Im Realteil des Clausius-Mossotti-Faktors tritt außerdem die Frequenz des angelegten Feldes auf. Hier ergeben Rechnungen mit Parametern für Wasser als Medium und Polystyrol als Probe, dass für niedrige Frequenzen $\text{Re}\{K(\omega)\}$ maximal, d.h. +1 wird (vgl. Abb. 4.2 und Anhang Kapitel B.1). Im realen Experiment tritt bei niedrigen Frequenzen allerdings eine Bläschenbildung als Störeffekt auf (vgl. Kapitel 4.3).

Es gilt weiterhin $F_{DEP} \sim \nabla|E^2|$, daher ist die räumliche Verteilung dieses Wertes interessant. Eine entscheidende Rolle spielt hier die Form der verwendeten Elektroden (vgl. Kapitel 8). Vereinfacht kann gesagt werden, dass der Gradient umso größer ist, je geringer der Krümmungsradius der Elektroden ist.

Es folgt aus $F_{DEP} \sim \nabla|E^2|$ weiter, mit $\nabla|E^2| \sim U^2$, mit der Spannung als Potentialdifferenz $U = \Delta(\varphi)$ und $E = -\nabla(\varphi)$, dass die Dielektrophoresekraft mit dem Quadrat der Spannung steigt $F_{DEP} \sim U^2$.

Im Experiment aber treten bei hohen Spannungen Störeffekte durch Erwärmung des Mediums, des Chips und der Elektroden sowie Strömungen auf (vgl. Kapitel 4.3.1).

Es gilt weiter, dass die Dielektrophoresekraft proportional zum Volumen des zu untersuchenden Objektes ist ($F_{DEP} \sim r^3$). Das heißt, da auf größere Objekte eine stärkere DEP-Kraft wirkt, kann man mit vergleichsweise niedrigeren Spannungen arbeiten, um eine Immobilisierung zu erhalten. Die Größenordnung der verwendeten Elektroden muss allerdings zur Größe der einzufangenden Objekte passen. Für Protein-Dielektrophorese sind daher Elektroden im Nanometermaßstab notwendig.

Zusammenfassend ergibt die Theorie, dass eine maximale Dielektrophoresekraft für möglichst scharfe Elektroden bei hohen Spannungen und niedrigen Frequenzen zu erreichen wäre, was allerdings durch Störeffekte begleitet wird, wodurch eine Optimierung der Parameter notwendig ist.

4.3. Störeffekte

Neben gewünschten Feldeffekten wie Elektrophorese und Dielektrophorese treten auch Störeffekte auf, die man sich zum Teil aber zunutze machen kann. Zu erwähnen sind hier insbesondere Strömungen durch AC-elektroosmotischen Fluss (AC-EOF) und Rayleigh-Benard-Strömungen, die durch Joulsche Wärme entstehen, sowie Bläschenbildung durch Elektrolyse.

4.3.1. Strömungen

Strömungen und Walzenbildung in DEP-Experimenten sind in der Literatur beschrieben [42, 116]. Hierbei tritt eine Abhängigkeit von der angelegten Frequenz und Spannung auf. Diese Strömungen lassen sich zum einen auf Feldeffekte, zum anderen auf thermische Effekte zurückführen.

Strömungen durch Einfluss eines elektrischen Feldes

Je nach angelegter Frequenz des elektrischen Wechselfeldes treten unterschiedliche Effekte auf.

Bei hohen Frequenzen kommt es zum elektrothermischen Fluss. Wegen lokal variierender Feldstärken heizt sich das Medium unterschiedlich durch Joulesche Wärme auf, weshalb Zirkulationen der Probenflüssigkeit entstehen.

Bei niedrigen Frequenzen hingegen tritt der AC-EOF auf, durch den sich der Drehsinn der Zirkulationen umkehrt [105]. Beim AC-EOF handelt es sich um einen Flüssigkeitsfluss zwischen Elektroden [42, 43]. Bei Anlegen einer Wechselspannung entsteht durch die tangentielle Komponente von \vec{E} eine Kraft, die parallel zur Elektrodenoberfläche gerichtet ist und so eine Strömung produziert. Der elektroosmotische Fluss steigt proportional zur angelegten Spannung U an.

Mit der Gleichung 4.10 lässt sich die sogenannte *charge relaxation frequency* $\nu_{CRF,m}$ einer Flüssigkeit bestimmen [9, 43]. Unterhalb dieser Frequenz kann AC-EOF auftreten, oberhalb elektrothermischer Fluss. Es gilt

$$\nu_{CRF,m} = \frac{\sigma_m}{2\pi\epsilon_m\epsilon_0}, \quad (4.10)$$

mit der elektrischen Leitfähigkeit des Mediums σ_m , seiner Permittivität ϵ_m und der Permittivität des Vakuums ϵ_0 .

Für das hier verwendete Reinstwasser erhält man mit $\sigma_{H_2O} = 3 \cdot 10^{-5} \frac{S}{m}$ und $\epsilon_{H_2O} = 80$ zunächst $\nu_{CRF,H_2O} = 6,7 \text{ kHz}$. Sobald man eine Verdünnung beispielsweise mit Beads untersucht, verändert sich die Leitfähigkeit der Flüssigkeit allerdings. Für eine Bead-Suspension wurden abhängig von der jeweiligen Verdünnung Werte von etwa $\sigma_{Bead-Suspension} = 1 \cdot 10^{-3} \frac{S}{m}$ bestimmt. Dies führt zu einer Frequenz von

$$\nu_{CRF,H_2O} = 225 \text{ kHz}.$$

Bezogen auf die in dieser Arbeit verwendeten Elektroden sollte das, bei der Betrachtung nur einer Elektrode, bei niedrigen Frequenzen dazu führen, dass die Probenpartikel in Richtung der Elektrodenmitte bewegt werden. Betrachtet man das gesamte Array quasi als eine große Elektrode, so ist eine Bewegung der Partikel in Richtung der Arraymitte zu erwarten - ein Effekt der tatsächlich häufig zu beobachten ist. Da allerdings hier das elektrische Feld hauptsächlich in vertikaler Richtung verläuft und dessen Tangentialkomponente, zu der der AC-EOF proportional ist, viel kleiner ist als bei den in fast allen Publikationen beschriebenen koplanaren Elektroden, ist davon auszugehen, dass weitere Effekte für diese Bewegung der Partikel zur Arraymitte eine Rolle spielen.

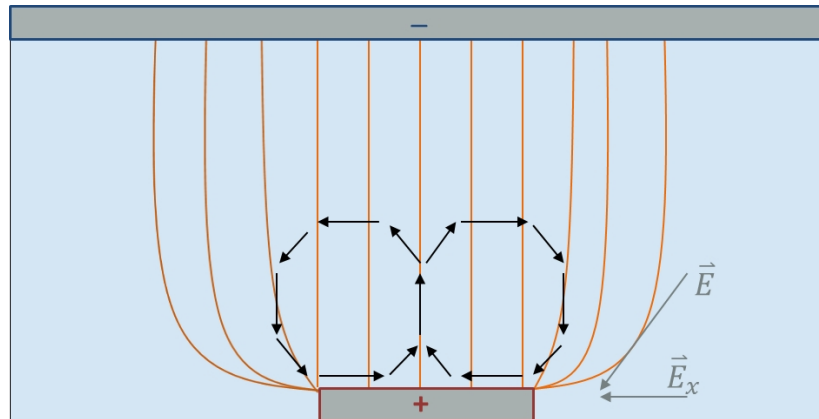


Abbildung 4.3.: Bei niedrigen Frequenzen wird durch die Tangentialkomponente des elektrischen Feldes über den Elektroden eine Strömung durch den AC-elektroosmotischen Fluss erzeugt. Es entsteht eine Strömung in Richtung Elektrodenmitte.

Strömungen durch Temperaturgradienten

Strömungen, die durch Joulsche Wärme entstehen, werden durch die Rayleigh- und Benard-Instabilitäten beschrieben [14]. Nach dem ersten Joulschen Gesetz gilt, dass die Erwärmung proportional zum Quadrat der Spannung U^2 ist.

Rayleigh-Instabilität Eine Rayleigh-Instabilität tritt auf, wenn sich eine Flüssigkeit zwischen zwei Platten unterschiedlicher Temperatur befindet [14]. Angenommen, die Platten haben den Abstand z . Die obere Platte werde konstant auf der Temperatur T_1 gehalten, während die untere auf $T_2 > T_1$ erhitzt wird.

Durch die unterschiedlichen Temperaturen der beiden Platten kommt es zur Ausbildung eines Temperaturgradienten, der der Schwerkraft entgegengesetzt ist. Bei hoher Viskosität oder einem geringen Temperaturgradient gelangt das System durch mikroskopische Prozesse der Reibung und Wärmeleitung ins Gleichgewicht. Diese Prozesse werden als stabilisierende dissipative Prozesse bezeichnet. Bei niedriger Viskosität bzw. hohen Temperaturgradienten führen lokale Inhomogenitäten zur Ausbildung von Konvektionszellen. Es kommt zur Thermokonvektion, d.h. die unteren Schichten der Flüssigkeit erwärmen sich und steigen zur oberen Platte auf, wo sie entlang der Grenzfläche strömen, sich abkühlen und wieder herunterfallen. Die Konvektionszellen bilden sich an vielen Orten gleichzeitig, so kommt es zur Ausbildung mehrerer Wirbel. Diese Kreisbewegungen organisieren sich selbst, so dass eine regelmäßige Zellenstruktur erzeugt wird. Hierbei steigt in der Mitte die Flüssigkeit nach oben, an den Platten strömt sie entlang und am Rand fällt sie herunter.

Die Bildung dieser Konvektionszellen und damit der Wirbel ist von der *Rayleigh-Zahl* Ra abhängig. Übersteigt diese den kritischen Wert Ra_c entstehen die Wirbel. Für die *Rayleigh-Zahl* gilt

$$Ra = g\alpha_T\rho_m \frac{\nabla(T)}{\lambda_T\eta_m} z^4, \quad (4.11)$$

mit der Erdbeschleunigung g , der Temperatur T , der Schichtdicke der Flüssigkeit z , der Dichte der Flüssigkeit ρ_m , der Viskosität η_m , dem thermischen Ausdehnungskoeffizienten α_T . Für die Temperaturleitfähigkeit λ_T gilt

$$\lambda_T = \frac{\lambda_q}{\rho_m C_p}, \quad (4.12)$$

mit der Wärmeleitfähigkeit λ_q und der spezifischen Wärmekapazität bei konstantem Druck C_p .

Zur Vermeidung von makroskopischen Wirbeln sollten der Temperaturgradient und die Schichtdicke also möglichst gering gehalten werden. Auch eine höhere Viskosität der Flüssigkeit wäre von Vorteil.

Wird Ra weiter erhöht, beginnen ab einem weiteren kritischen Wert die Konvektionszellen mit einer charakteristischen Frequenz ν_o zu oszillieren, wodurch es zu einer turbulenten und später chaotischen Konvektion kommt.

Benard-Instabilität Wenn statt zweier Platten nur eine vorhanden ist und die Flüssigkeit frei darauf aufgebracht wird, treten bei Erwärmung Benard-Instabilitäten auf. Wird diese Platte auf T erwärmt, so führt die Kombination des Temperaturgradienten mit der Oberflächenspannung der Flüssigkeit zu einer Ausbildung von Wirbeln. An der Oberfläche der Flüssigkeit kommt es durch Verdunstung zu lokalen Fluktuationen der Oberflächenspannung, dies ist der *Marangoni-Effekt*. Die erwärmte Flüssigkeit steigt auf, kühlt beim Fließen entlang der Oberfläche ab, wodurch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit ansteigt. Die Ausbildung der Wirbel oder *Benard-Zellen* findet statt, wenn die *Marangoni-Zahl* Ma einen kritischen Wert Ma_c übersteigt. Für die *Marangoni-Zahl* gilt

$$Ma = -\left(\frac{d\sigma}{dT}\right) \frac{\nabla(T)}{\lambda_T\eta_m} z^2, \quad (4.13)$$

mit der Oberflächenspannung σ .

Die Zellenbildung lässt sich durch Zugabe grenzflächenaktiver Stoffe vermeiden.

4.3.2. Bläschenbildung durch Elektrolyse

Während eines Dielektrophorese-Experiments kommt es bei niedrigen Frequenzen an spitzen Elektroden häufig zur Bildung von Bläschen durch die elektrolytische Aufspaltung von Wasser in Wasserstoff und Sauerstoff [53, 23, 21]. Diese Bläschen stören die Immobilisierung. Besonders deutlich treten die Bläschen bei hohen Feldstärken entweder durch besonders spitze Elektroden oder hohe Spannungen auf. Zudem führen metallische

Nanostrukturen zu einer katalytischen Verstärkung der Bläschenbildung durch Elektrolyse [27]. Eine genauere Untersuchung dieses Effekts bezogen auf die in dieser Arbeit verwendeten Elektroden befindet sich in Kapitel 9.2.3.

4.3.3. Kettenbildung

Ein weiterer störender Effekt bei der Vereinzelung ist die Bildung von Ketten während des Dielektrophorese-Experiments [72, 64]. Durch dielektrische Polarisierung kommt es zur Induzierung von Dipolen in jedem einzelnen Partikel. Diese Partikel ziehen sich gegenseitig an, da die Dipole im elektrischen Feld gleich ausgerichtet sind. Dadurch lagern die Partikel sich aneinander und es kommt zu einer Bildung von Partikel-Perlen-Ketten, die sich entlang der elektrischen Feldlinien ausrichten und so zwischen den Elektroden aufspannen [88]. Niedrige Frequenzen führen zu einer bevorzugten Kettenbildung [49].

4.3.4. Haften von Partikeln

Die meist gewünschte Folge der dielektrophoretischen Anziehung ist die dauerhafte Immobilisierung der Nanoobjekte. Dieser Effekt lässt sich durch die nanoraue Oberfläche der Elektroden erklären. Hier treten van-der-Waals-Wechselwirkungen auf, durch die die Partikel an der Oberfläche haften bleiben. Dies äußert sich jedoch auch als Nachteil, da es damit schwierig wird, einen einmal belegten Elektroden-Chip zu reinigen und wieder zu verwenden.

5. Geräte

5.1. Nano-Elektroden

Bei den verwendeten Elektroden handelt es sich um vertikale Elektroden, die in regelmäßigen Arrays zu vielen Tausenden angeordnet sind.

Die Elektroden werden in einer Standard-0,25 μm -CMOS-Prozess-Linie auf 8 inch Silizium-Wafern vom IHP (*Leibniz Institut für innovative Mikroelektronik*) in Frankfurt/Oder hergestellt [94, 70].

Der CMOS-Prozess beginnt mit der Abscheidung einer aus Metall- bzw. TiN-Schichten bestehenden Bodenelektrode (Ti-TiN-AlCu-TiN-Ti). Auf diese Metallschichten wird eine SiO_2 -Schicht aufgebracht, in die durch RIE (*reactive ion etching*) Löcher für die Wolfram-Zylinder geätzt werden. Diese Löcher, die einen direkten elektrischen Kontakt zur Bodenelektrode haben, werden daraufhin mit Wolfram gefüllt. Mittels CMP (*chemical mechanical polishing*) wird die Wafer-Oberfläche poliert, wobei es durch die unterschiedlichen Materialien zu einer geringfügig unterschiedlichen Abtragsrate kommt. Dies kann dazu führen, dass die Elektroden leicht versenkt oder erhaben sind. Schließlich erhält man einen Wafer mit Wolfram-Zylinder-Elektroden-Arrays.

Die Herstellung spitzerer Silizium-Kegel-Elektroden-Arrays ist etwas aufwendiger. Positionen, an denen die Elektroden entstehen sollen, werden hier während eines mehrstufigen RIE-Prozesses mit einer SiO_2 Schicht geschützt. Nach mehreren RIE-Schritten kommen so immer spitzere Kegel mit Durchmessern bis zu 1,5 nm zustande [85]. Um schließlich wieder größere, den Probenpartikeln angemessene Spitzendurchmesser zu erhalten, werden die kegelförmigen Elektroden durch CMP entsprechend geschliffen. Zur Kontaktierung dient hier eine Rückseitenmetallisierung aus Aluminium.

Das CMOS-Verfahren bietet zum einen den Vorteil, dass komplette Wafer-Platten prozessiert werden können, wodurch die Erstellung großer und vieler gleichartiger Arrays möglich wird. Zum anderen erlaubt es diese Technologie, Elektroden mit wenigen Nanometern Spitzendurchmesser herzustellen, so dass ihre Größe den zu immobilisierenden Proteinen entspricht.

Die verschiedenen genutzten Elektrodentypen (vgl. Abb. 5.1) unterscheiden sich in Bezug auf ihre Form, ihren Spitzendurchmesser, die Beschichtung der Spitzen, die Anordnung der Arrays und die Art der Kontaktierung der Gegenelektrode. Es wurden Experimente an zylinder-, kegel- und kegelstumpfförmigen Elektroden durchgeführt. Als Gegenelektrode wurde entweder ein mit Indium-Zinn-Oxid (ITO) beschichtetes Deckglas oder eine auf dem Chip integrierte Titan-Nitrit-Schicht (TiN) verwendet. Die Elektroden befinden sich zum Teil in einzeln ansteuerbaren Testfeldern auf einem Chip oder zusammen in einem Gesamtarray. Als Spitzenbeschichtungen wurden CoSi, AlSi, TiSi oder PtSi verwendet oder es war keine Beschichtung vorhanden.

Tabelle 5.1.: Elektrodentypen

Durchmesser	Material	Beschichtung	Besonderheit
500 nm	W	ohne	
30-50 nm	Si	ohne	TiN-Gegenelektrode
50 nm	Si	ohne, CoSi, PtSi	
10 nm	Si	ohne, CoSi, PtSi, AlSi, TiSi	
1 nm	Si	ohne	ohne SiO_2 -Matrix

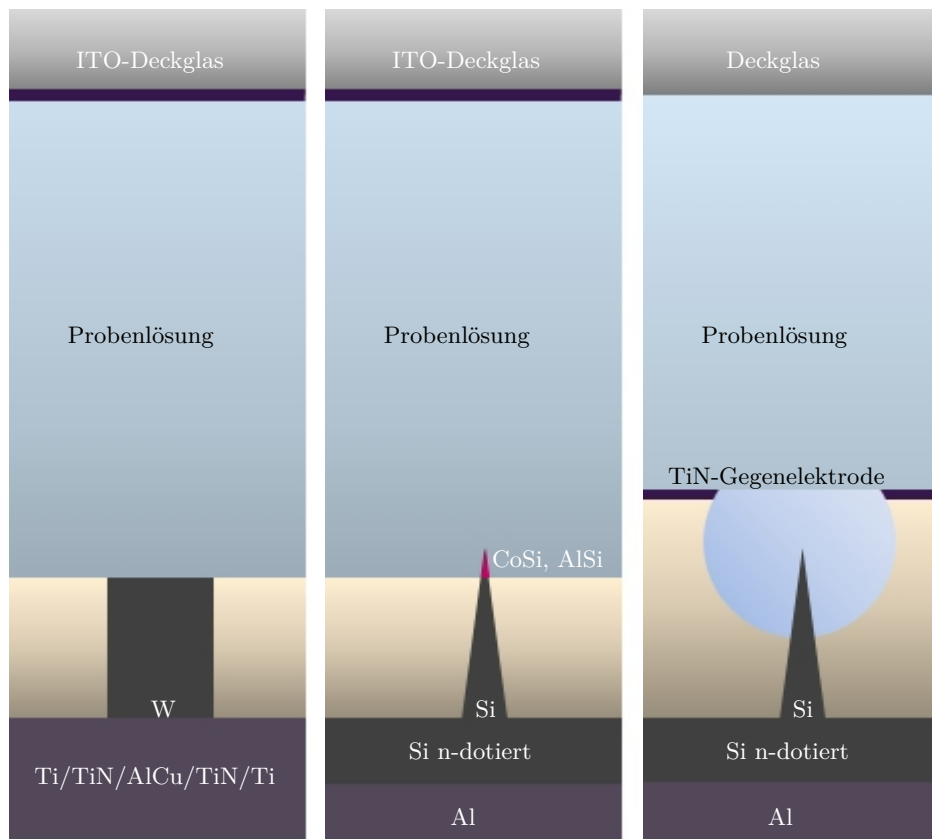


Abbildung 5.1.: Schematische Darstellung der einzelnen Elektroden als Schnitt: Es ist jeweils eine Elektrode in ihrer Umgebung gezeigt. Die Elektroden sind in eine isolierende SiO_2 -Schicht eingebettet, so dass nur die Elektrodenspitze der Probenlösung ausgesetzt ist. Bei Verwendung der Zylinder- (links) oder der Kegel-Elektroden (Mitte) wurde als Gegenelektrode ein ITO-Deckglas verwendet. Das dritte Bild (rechts) zeigt eine Kegel-Elektrode mit auf der SiO_2 -Schicht integrierter TiN-Gegenelektrode.

5.1.1. Zylinder-Elektroden

Die zylinderförmigen Elektroden sind in vier einzeln ansteuerbaren Arrays mit jeweils 80×80 Elektrodenpositionen angeordnet (s. Abb. 5.2). Zur Orientierung auf dem Array wurden jeweils 16 Elektrodenpositionen frei gelassen, so dass im mikroskopischen Bild Kreuze erkennbar sind. Jedes Array besteht somit aus 6256 Elektroden, die jeweils einen Spitzendurchmesser von 500 nm und einen Abstand von $2 \mu\text{m}$ zueinander haben. Die Zylinder-Elektroden sind in eine isolierende SiO_2 -Schicht eingebettet. Wegen der unterschiedlichen Abtragungsraten beim Schleifen liegt die Oberfläche der SiO_2 -Schicht etwa 20 nm höher als die der Wolfram-Zylinder, wie sich in AFM-Messungen zeigt.

Unterhalb der Zylinder befinden sich je Unterarray eine leitende quadratische Platte aus Ti/TiN/AlCu/TiN/Ti und Leiterbahnen aus demselben Material zur Kontaktierung. Diese enden in Kontaktpads auf der Chipoberfläche, so dass es bei diesem Elektrodentyp möglich ist, die Elektroden von der Chipoberseite aus zu kontaktieren.

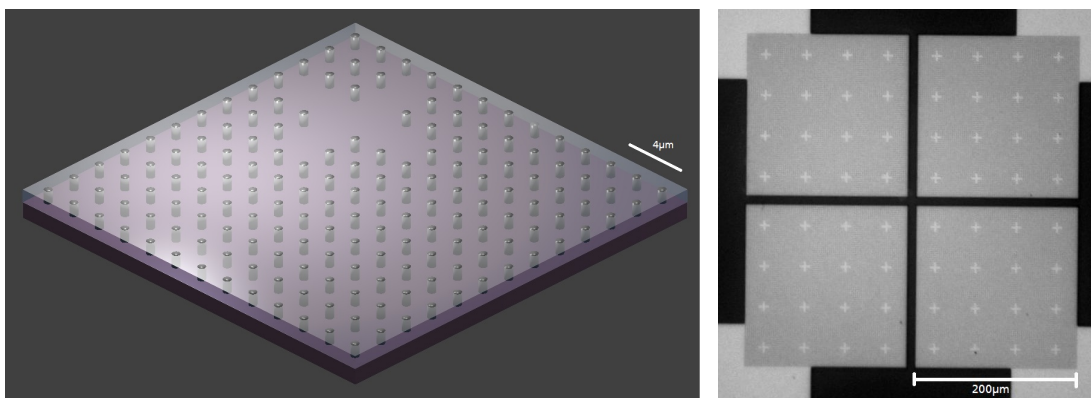


Abbildung 5.2.: Die einzelnen Elektroden sind in Arrays mit einigen tausend Elektroden angeordnet, so dass parallele Messungen machbar sind. Die Zylinder-Elektroden sind in vier unabhängig ansteuerbaren Arrays mit 80×80 Elektrodenpositionen arrangiert. Zur Orientierung wurden durch Aussparung einiger Elektrodenpositionen Orientierungskreuz erzeugt, so dass sich in einem Unterarray jeweils 6.256 Elektroden befinden. Die einzelnen Elektroden haben voneinander einen Abstand von $2 \mu\text{m}$. Links: Schematischer Ausschnitt einer Arrayecke mit Orientierungskreuz; Rechts: Lichtmikroskopische Aufnahme der vier Unterarrays.

5.1.2. Kegel-Elektroden

Die scharfen kegelförmigen Elektroden bestehen aus n-dotiertem Silizium.

Zu Beginn der Arbeit wurde noch mit unbeschichteten Kegel- und Kegelstumpf-Elektroden gearbeitet, die keine Dielektrophorese zeigten, an denen aber Strömungen beobachtet werden konnten. Der Fehler in der Elektroden-Herstellung lag darin, dass der Kegel bzw. Kegelstumpf aus p-dotiertem Silizium bestand, während der Untergrund des Chips aus n-dotiertem Silizium hergestellt wurde. Der so entstandene p-n-Übergang bzw. die dadurch resultierende Sperrschicht führte zu einer Gleichrichtung der Spannung. Hierdurch wurde die Nutzung der Elektroden für die Dielektrophorese verhindert.

Bei einem p-n-Übergang handelt es sich um einen Übergang zwischen einem Material mit ortsfesten positiven (p) und einem mit ortsfesten negativen (n) Dotieratomen. Durch Diffusion bewegen sich die Elektronen aus dem n-Bereich in den p-Bereich und Löcher aus dem p-Bereich in den n-Bereich. Dort kommt es zur Rekombination mit den ortsfesten Dotieratomen und zur Ausbildung einer Ladungsdifferenz. Dies geschieht bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat und eine Raumladungszone ohne freie Ladungsträger im Übergangsbereich der beiden Materialien entstanden ist. Wird eine Spannung in Sperrrichtung angelegt, so dass plus am n-Bereich liegt, vergrößert sich diese Sperrschicht und es erfolgt kein Stromfluss. Wird hingegen in Durchlassrichtung, also minus an den n-Bereich gelegt, so wird die Sperrschicht abgebaut und ein Stromfluss kann stattfinden. Stromfluss ist daher nur in eine Richtung möglich, die Spannung wird also gleichgerichtet.

Bezogen auf die Kegel-Elektroden bedeutet dies, dass in Sperrrichtung Partikel nur ein Feld zwischen ITO- und Boden-Elektrode erfahren, als sei das Elektroden-Array eine große Elektrode und dass an den Elektrodenspitzen keine Dielektrophorese beobachtet werden kann. In Durchlassrichtung müsste zunächst die Sperrschicht abgebaut werden, bevor es an den Elektrodenspitzen zu einem Effekt kommen könnte. Die für die Dielektrophorese notwendige Wechselspannung führt also dazu, dass die Sperrschicht sich frequenzabhängig vergrößert und verkleinert.

Die nächsten vom IHP hergestellten Elektroden hatten keinen p-n-Übergang mehr. Sowohl Kegel als auch der Chipboden bestehen nun aus n-dotiertem Silizium.

Es wurden Kegel-Elektroden mit Spitzendurchmessern zwischen $< 2\text{ nm}$ und 50 nm verwendet. Die Elektroden sind (meist) in einer als Isolator dienenden SiO_2 -Matrix eingebettet, die entsprechend dem Spitzendurchmesser durch CMP abgeschliffen wird. Die Elektrodenoberfläche selbst liegt rund 40 nm über der Chip-Oberfläche, wie durch Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) vom IHP festgestellt wurde [124]. Lediglich ein Elektroden-Typ mit einem Spitzendurchmesser $< 2\text{ nm}$ wurde nicht in SiO_2 eingebettet und ebenfalls nicht abgeschliffen. Nach dem Schleifen werden die Spitzen der Kegel-Elektroden gegebenenfalls mit CoSi, PtSi, AlSi oder TiSi beschichtet. Kegel-Elektroden, bei denen die Spitzen-Beschichtungen variiert wurden, haben Spitzendurchmesser von 10 nm oder 50 nm .

Auch diese Elektroden befinden sich auf rechteckigen leitenden Boden-Elektroden. Hier allerdings sind die meisten Elektroden-Typen zum Boden hin durchkontaktiert, und deren Chips haben einen Untergrund aus Aluminium. Die am häufigsten verwendeten

Elektroden sind in einem quadratischen Array zu 500.000 Elektroden angeordnet (vgl. Abb. 5.3). In einem solchen Array sind die Kegel-Elektroden in einem um 45° gedrehten Gitter angeordnet. Der Abstand der einzelnen Elektroden zueinander ist $\sqrt{2} \mu m$, womit die Packungsdichte der Elektroden doppelt so groß ist wie die der Zylinder-Elektroden.

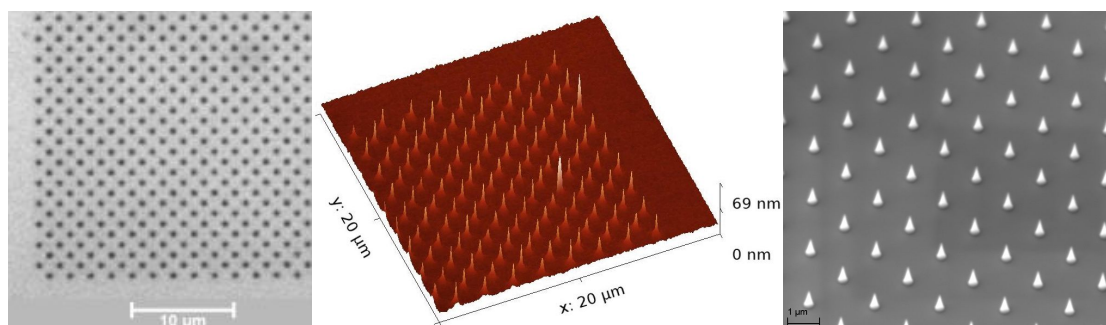


Abbildung 5.3.: Die kegelförmigen Elektroden befinden sich in einem Array zu 500.000 Elektroden. Die Elektroden haben zueinander einen Abstand von $\sqrt{2} \mu m$. Links: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Arrayecke von Elektroden mit 50 nm Spitzendurchmesser; Mitte: AFM Aufnahme einer Arrayecke mit Elektroden mit einem Spitzendurchmesser von 10 nm; Rechts: REM Aufnahme ungeschliffener Elektroden, die nicht in eine SiO_2 -Schicht eingebettet sind.

5.1.3. Gegenelektrode

Sowohl bei den zylinderförmigen als auch bei den kegelförmigen Elektroden wurde als Gegenelektrode ein mit leitendem Indium-Zinn-Oxid (ITO) beschichtetes Deckglas von SPI SUPPLIES verwendet. Hier standen zwei Typen zur Verfügung mit $30 - 60 \Omega$ oder $70 - 100 \Omega$. Auf diese Weise konnten die Experimente über optische Mikroskopie verfolgt werden. Der Abstand des ITO-Deckglases zur Chipoberfläche wurde durch eine als Spacer dienende $80 \mu m$ dicke Laminierfolie bestimmt.

Als Variation der Gegenelektrode wurden Kegel-Elektroden-Chips mit integrierter Gegenelektrode vom IHP hergestellt (vgl. Abb. 5.4). Auch die Kegel-Elektroden mit integrierter Gegenelektrode bestehen aus n-dotiertem Silizium. Sie sind allerdings nicht beschichtet. Eingebettet sind die Elektroden ebenfalls in eine SiO_2 -Matrix. Der gesamte Chip wurde mit einer als Gegenelektrode dienenden Titan-Nitrit-Schicht (TiN) versehen. Die Elektroden sind in kugelförmigen Löchern versenkt, deren Öffnung zum Probenvolumen einen Durchmesser von etwa $670 nm$ aufweist, wodurch der Abstand der Spitze zur Gegenelektrode $250 nm$ beträgt. In einzelnen Testfeldern sind fünf verschiedene Spitzendurchmesser zwischen $30 nm - 50 nm$ angeordnet.

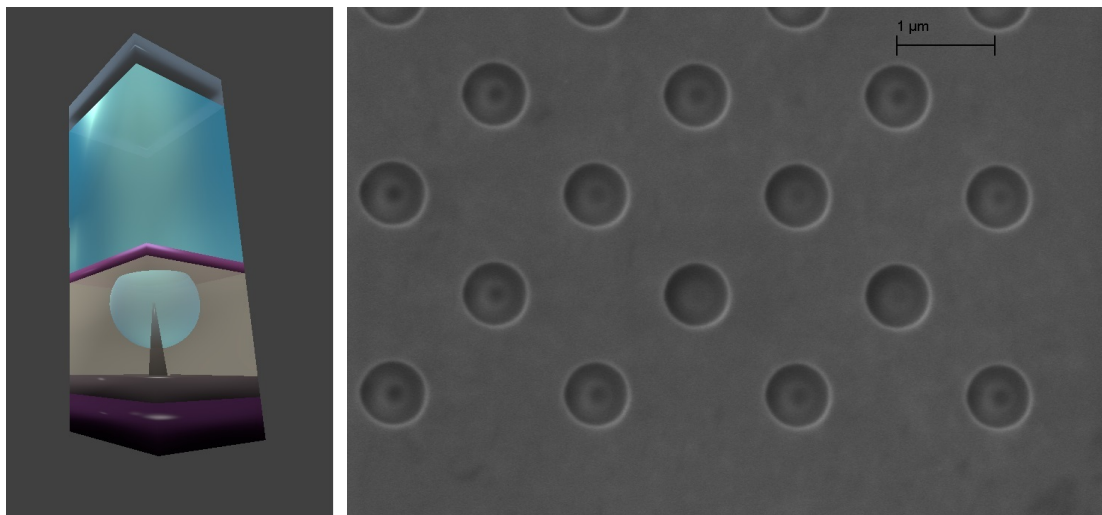


Abbildung 5.4.: Die kegelförmigen Elektroden mit integrierter Gegenelektrode befinden sich in Unterarrays zu jeweils $4 \cdot 10^5$ Elektroden. Die Elektroden haben zueinander einen Abstand von $\sqrt{2} \mu\text{m}$ und sind in Vertiefungen eingelassen. Links: Schematische Darstellung als Blick durch das SiO_2 ; Rechts: REM Aufnahme eines Arrayausschnitts.

5.1.4. Aufbau

Die $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ -Silizium-Chips, auf denen sich die Elektroden-Arrays befinden, wurden auf einem Objektträger arrangiert, so dass während des Experiments eine Beobachtung über das Fluoreszenz-Mikroskop möglich war. Es erfolgte über die Zeit eine Veränderung und Optimierung des Aufbaus auf dem Objektträger.

Im finalen Aufbau wurde auf die Chipoberfläche eine Laminierfolie mit $80 \mu\text{m}$ -Dicke geklebt, in die ein Loch mit 5 mm Durchmesser als Probenkammer gestanzt war. Auf diese Laminierfolie wurde nach Einfüllen der Probenflüssigkeit das ITO-Deckglas gelegt und mit Krokodilklemmen fixiert. Im Fall eines ITO-Deckglases wurde, um einen elektrischen Kontakt herzustellen, aus einem Stück des Wafers ein Podest gefertigt, auf dem eine selbstklebende Kupferfolie befestigt war. Diese Kupferfolie war über einen Draht mit einem Steckerelement verbunden. Im Fall einer Bodenkontaktierung wurde eine weitere Kupferfolie ebenfalls mit einem Draht mit dem Steckerelement verbunden. Der Elektroden-Chip wurde mit *Leit-C*-Leitkleber der Firma PLANO GMBH auf diese Kupferfolie geklebt. Falls Leitpads vorhanden waren, wie bei den Zylinder- und Kegelelektroden mit integrierter Gegenelektrode, erfolgte die Kontaktierung dieser Pads mit Kontaktgummi oder mit Leitkleber.

Für die Erzeugung eines elektrischen Feldes zwischen Gegenelektrode und Elektroden-Array wurde ein Funktionsgenerator (Typ: *Model 193*) der Firma WAVETEK verwendet. Das so erzeugte sinusförmige Signal wurde mit einem Breitbandverstärker (Typ: *TOE*

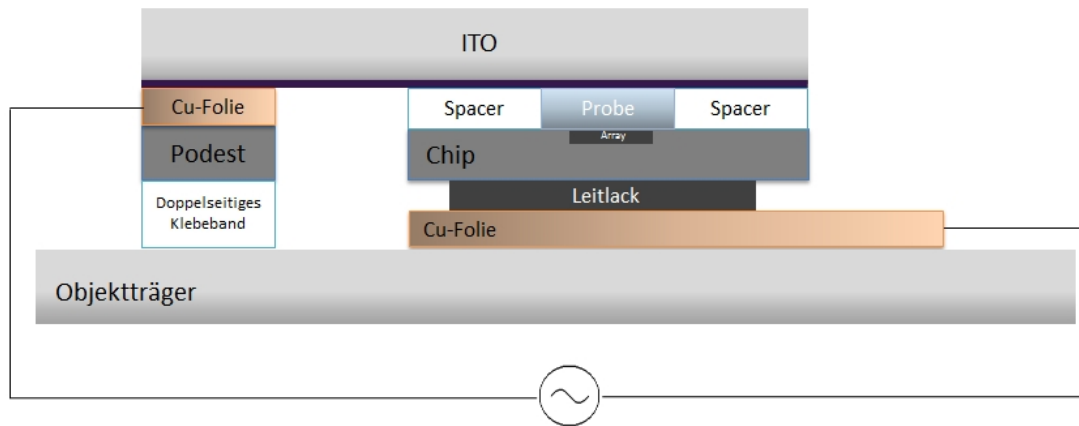


Abbildung 5.5.: Kontaktierung des Elektroden-Chips: Die Bodenkontaktierung des Chips erfolgt über einen Tropfen Leitlack (zuletzt *Leit-C*) und eine Kupferfolie. Die ITO-Gegenelektrode wird ebenfalls über eine Kupferfolie kontaktiert. Diese ist auf ein Podest aufgeklebt, so dass das ITO-Deckglas mit einer Krokodilklemme an seiner Position fixiert werden kann.

7606) der Firma TOELLNER angepasst. Die Spannung konnte mit einem DC-Voltmeter (Typ *M9803R*) der Firma MASTECH, das mit einer Demodulator-Sonde (Typ: *TT-DE 112*) der Firma TESTEC ausgestattet war, gemessen werden. Außerdem wurde das Signal durch ein AC-Voltmeter (Typ: *UT 803*) der Firma UNI-T überprüft und mit einem Oszilloskop (Typ: *HM 307*) der Firma HAMEG betrachtet. Die Frequenzen wurden mit einem Frequenzzähler (Typ: *7202*) der Firma VOLTCRAFT gemessen.

5.1.5. Reinigung der Elektroden-Chips

Bei Bead-Experimenten konnten Elektroden-Chips mehrfach verwendet werden. Zur Reinigung wurde zunächst ein Reinigungspolymer des Typs *First Contact* der Firma PHOTONIC CLEANING TECHNOLOGIES auf das Elektroden-Array aufgetragen und wieder abgezogen. Nach Spülen mit Reinstwasser wurde der Chip mit einem Plasma Cleaner des Typs *kINPen Ind* der Firma NEOPLAS CONTROL behandelt. Ein Stickstoffplasma wurde mit 1,7 bar bei $5,7 \frac{L}{min}$ in 1 cm Entfernung zur Chipoberfläche erzeugt und der Chip damit 10 Minuten behandelt. Erst danach erfolgte die Erneuerung der Spacer-Folie.

Durch den Plasma Cleaner werden organische Komponenten sowohl in Verschmutzungen als auch von der Oberfläche selbst aufgebrochen. Das Plasma reagiert mit diesen, so dass geladene Gruppen auf der Oberfläche entstehen, die sehr hydrophil sind. Neben der Reinigung hat dieses Vorgehen so den Effekt, dass die Probe sich gleichmäßig über die Oberfläche der Probenkammer verteilt.

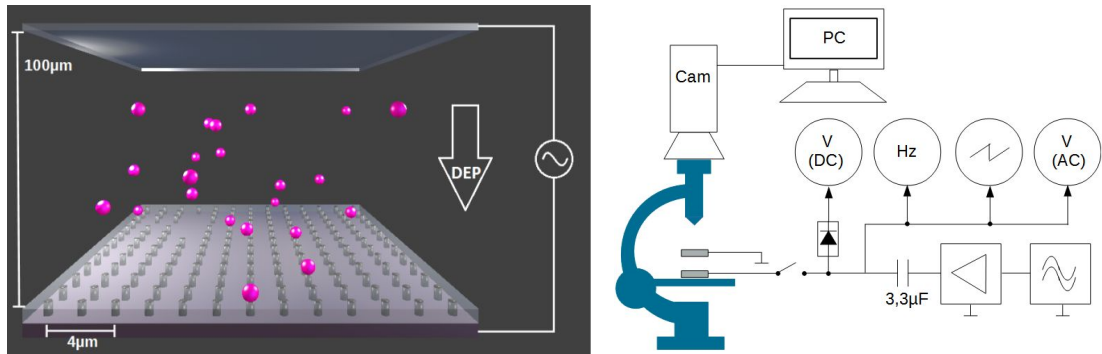


Abbildung 5.6.: Messaufbau: Im Funktionsgenerator wird eine Sinusspannung erzeugt und über einen Verstärker erhöht. Sie kann über ein Oszilloskop beobachtet werden. Über zwei Voltmeter, von denen eins über eine Demodulator-Sonde verbunden ist, werden die Effektiv- und die Spitzenspannungen gemessen. Mit einem Frequenzzähler kann die Frequenz des Wechselfeldes variiert werden. Über ein Mikroskop wird das Experiment mit einer Kamera beobachtet.

5.2. Mikroskopie

5.2.1. Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Beobachtung der fluoreszierenden Proben, mit denen die DEP-Experimente durchgeführt wurden, erfolgte mithilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie. Durch die durchsichtige ITO-Gegenelektrode konnte das Experiment beobachtet werden, während das Feld angelegt war. Das verwendete aufrechte Mikroskop war ein *BX51* der Firma OLYMPUS.

Zur Bildaufnahme kamen unterschiedlich empfindliche Kameras zum Einsatz (vgl. Anhang A.1). Hierbei wurden insbesondere zwei gekühlte Kameras genutzt: Eine CCD-Kamera des Typs *F-View II* der Firma SIS (SOFT IMAGING SYSTEM/OLYMPUS) und eine sCMOS-Kamera des Typs *Orca flash 4.0* der Firma HAMAMATSU. Letztere zeichnet sich dadurch aus, dass sie deutlich lichtempfindlicher ist als erstere (vgl. Kapitel 5.2.4 bzw. Anhang B.3). Hier erlaubt es ein Adapter am Mikroskop, ein Experiment durch zwei Kameras gleichzeitig zu beobachten.

Zur Bildaufnahme wurde jeweils die Software des Herstellers (vgl. Anhang Tabelle A.7) eingesetzt. Die *F-View*-Kamera konnte über die Software *Cell^M* (Version 3.1) gesteuert werden und die *Orca*-Kamera über die Software *HoKaWo* (Version 2.8). Ein am Mikroskop befindlicher Shutter konnte ebenfalls über die *Cell^M*-Software kontrolliert werden. Bilder wurden im tiff-Format gespeichert und weiter verarbeitet. Hierfür wurde die open source Software *ImageJ* (Version 1.50b) genutzt. Aus den Daten konnten Histogramme berechnet werden, die weiter mit *Origin* (Pro 2015G) verarbeitet wurden. Gaußanpassungen wurden hier mit einem Levenberg-Marquardt-Algorithmus durchgeführt.

Für die Aufnahmen wurden verschiedene Luft-Objektive und zu den Farbstoffen passende Filter verwendet (s. Anhang Abschnitt A.1).

Außerdem besitzt das *BX51*-Mikroskop zwei separate Lichtquellen. Zu Beginn wurde für Auflichtaufnahmen eine Halogen-Lampe genutzt, später wurde sie gegen eine LED Lichtquelle (Typ *pE-4000* der Firma COOL LED) ausgetauscht. Für Fluoreszenzaufnahmen fand entweder eine Quecksilberdampfampe (OSRAM, Typ *HBO 103W/2*) oder eine LED bei entsprechender Wellenlänge Anwendung. Hierbei wurden Belichtungszeiten bis zu 10 s eingestellt.

5.2.2. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (C-LSM)

Ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (C-LSM) des Typs *Axiocvert 100M* der Firma ZEISS wurde verwendet, um das Temperaturverhalten an den Elektrodenspitzen mithilfe von Rhodamin B zu untersuchen und die Elektrodenspitzen zu charakterisieren.

5.2.3. Objektive

Das Objektiv ist für ein Licht-Mikroskops von wesentlicher Bedeutung. Durch das Objektiv werden die Auflösung und die Vergrößerung festgelegt. Nicht zuletzt bestimmen die Lichtstärke und das Lichtsammelvermögen eines Mikroskops, wie viele Photonen der Probe die Kamera erreichen. Besonders bei der Untersuchung von fluoreszierenden Einzelmolekülen ist es daher von Interesse, die zur Messung verwendeten Objektive genau zu kennen.

Objektive werden durch verschiedene Eigenschaften beschrieben. $NA = n \cdot \sin(\alpha)$ definiert die numerische Apertur, wobei α der halbe Einfallswinkel des Lichtkegels in das Objektiv darstellt und n dem Brechungsindex des Immersionsmittels entspricht. Aus produktionstechnischen Gründen ist α maximal 72° und damit $NA_{Luft} \leq 0,95$ möglich [2]. Über die numerische Apertur sind das Auflösungsvermögen und die Lichtstärke eines Objektivs bestimmt. Das Auflösungsvermögen, also der kleinste noch unterscheidbare Punktabstand eines Mikroskops, lässt sich nach der Abbeschen Theorie berechnen mit

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2 \cdot NA}$$

Die Lichtstärke eines Objektivs beschreibt, wie viele Photonen ein Objektiv passieren lässt. Sie hängt von der numerischen Apertur und der Vergrößerung M des Objektivs ab und ist proportional zu [1]

$$\left(\frac{NA}{M}\right)^2$$

Bei Transmissionsbeleuchtung ist das Lichtsammelvermögen eines Objektivs proportional zu

$$\left(\frac{NA^2}{M}\right)^2$$

Die Lichtstärke eines Objektivs nimmt also rapide mit ansteigender Vergrößerung ab.

Die verwendeten Objektive wurden auf ihre Lichtstärke und das Lichtsammelvermögen hin überprüft (vgl. Anhang Kapitel B.2). Für die Experimente wurden insbesondere die drei folgenden Luft-Objektive genutzt:

Vergrößerung M	Nummerische Apertur NA	Auflösung bei 520 nm	Lichtstärke $\cdot 10^4$
40x	0,95	274 nm	5,6
60x	0,70	371 nm	1,4
100x	0,90	289 nm	0,8

5.2.4. Kameras

Für die Bildaufnahme wurden unterschiedliche Kameras genutzt. Da erreicht werden sollte, in einem gewöhnlichen Fluoreszenz-Aufbau Einzelmoleküle nachzuweisen, war es notwendig, besonders lichtempfindliche Kameras einzusetzen, die ein möglichst geringes Rauschen zeigten. Für die Charakterisierung der Kameras wurde eine Methode aus der Astronomie übernommen und ein Skript in *Octave* für dessen Anwendung geschrieben (vgl. hierzu Anhang Kapitel B.3). Über Weißbilder und Dunkelaufnahmen bei unterschiedlichen Belichtungszeiten lassen sich das Ausleserauschen (R_S) und der Dunkelstrom (D_S) der Kamera bestimmen. Über diese Angaben kann die Qualität der Kamera bzw. der aufgenommenen Bilder abgeschätzt werden.

Anhand der Ergebnisse zwölf verschiedener Kameras ergab sich, dass die *Orca flash 4.0*-Kamera der Firma HAMAMATSU für den Nachweis geringer Lichtintensitäten besonders geeignet war ($R_S = 1,406(5) e^-$, $D_S = 0,0418(7) \frac{e^-}{s}$). Diese Kamera wurde daher für empfindliche Messungen verwendet. Für Messungen mit weniger lichtschwachen Objekten erwies sich die *F-View II*-Kamera von OLYMPUS als ausreichend empfindlich ($R_S = 9,5(2) e^-$, $D_S = 0,66(3) \frac{e^-}{s}$) und wurde wegen ihrer komfortablen Handhabung häufig genutzt.

5.2.5. Raster-Kraft-Mikroskopie (AFM)

Statt mit der Fluoreszenz-Mikroskopie können DEP-Experimente auch mit dem AFM betrachtet werden. Hier allerdings kann das Experiment nicht in Echtzeit verfolgt werden. Im AFM werden Höhenverläufe bestimmt. Diese zeigen das gleiche Verhalten wie die Fluoreszenzintensität der dielektrophoretisch immobilisierten Proteine. Außerdem ist das Verhalten mit Werten aus numerischen Simulationen (s. Kapitel. 8) vergleichbar [70]. Ein Vorteil von AFM-Messungen gegenüber Fluoreszenzmessungen ist, dass hier labelfrei gearbeitet werden kann und man keine Beeinträchtigungen durch Ausbleichen der Probe zu erwarten hat.

Es wurden an einem AFM des Typs *NanoWizard 3* der Firma JPK INSTRUMENTS Aufnahmen getrockneter Chips im Kontakt-Modus in Luft gemacht und somit die Form und die Belegung der Elektroden untersucht. Hierfür wurden pyramidenförmige AFM-Spitzen des Typs *OMCL-TR400PSA* der Firma OLYMPUS mit einem Spitzendurchmesser und dementsprechender maximaler Auflösung von 15 nm und einer Federkonstante von $0,02 \frac{N}{m}$ verwendet.

AFM-Aufnahmen wurden mit der Hersteller Software *SPM Desktop* aufgenommen und mit *Gwyddion (Version 2.42)* weiterverarbeitet. Hier können 3D-Darstellungen aus den Daten erzeugt und Höhen bestimmt werden.

5.2.6. Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)

Für raster-elektronen-mikroskopische Aufnahmen wurde ein REM des Typs *Evo MA10* der Firma ZEISS mit einem Sekundärelektronen-Detektor genutzt.

Mit dem REM wurden die Oberflächen der Elektroden und deren Belegung untersucht, wofür Beschleunigungsspannungen zwischen 2 kV und 15 kV verwendet wurden, bei Probeströmen zwischen 5 pA und 425 pA , was dem maximal erreichbaren Wert der Apparatur entspricht. Insbesondere zur Darstellung der Belegung der Elektroden mit nicht leitfähigen Materialien, Beads und biologischen Proben war es notwendig, niedrige Probenströme und niedrige Beschleunigungsspannungen zu verwenden, so eine geringe Eindringtiefe der beschleunigten Elektronen auszunutzen und auf diese Weise Aufladungseffekte zu verringern.

Für die Darstellung der Elektroden oder (leitender) Silberstrukturen hingegen sind hohe Probenströme und hohe Beschleunigungsspannungen vorteilhaft.

Es wurden verschiedene Scan-Geschwindigkeiten eingestellt, wobei bezogen auf Aufladungseffekte schnellere Scangeschwindigkeiten bei einer hohen Line-Integration günstiger waren, d.h. jede Zeile wurde mehrfach schnell abgerastert und dann gemittelt dargestellt.

Auch der Abstand der Probe zur Elektronen-Kanone beeinflusst die Bildqualität in erheblichem Maße. Hier wurden möglichst geringe Abstände verwendet, was bei dem genutzten Aufbau minimal 4 mm entspricht. Bilder wurden mit der Hersteller-Software *SmartSEM* (Version 5.07) im tiff-Format aufgenommen.

Mit Hilfe dieses Mikroskops konnten Elektroden sowie immobilisierte Proben dargestellt werden, ohne die Proben weiter zu präparieren. Hierbei eignen sich für einen Überblick und um die Elektroden zu finden, Einstellungen von 3 kV und 150 pA bei einer Scan-Geschwindigkeit mit *ScanSpeed* 6. Will man nachfolgend eine immobilisierte nicht leitende Probe abbilden, so benötigt man ebenfalls geringe Beschleunigungsspannungen, aber deutlich geringere Probenströme. Hier wurden gute Ergebnisse bei $4,5\text{--}6,5\text{ mm}$, $1,7\text{--}2\text{ kV}$ und 3 pA erreicht. Bei dieser Energie ist die Anzahl der ankommenden Elektronen nahezu gleich der Anzahl der Sekundärelektronen, wodurch es lediglich zu einer minimalen Aufladung der nicht-leitenden Probe kommt. Verwendet man höhere Beschleunigungsspannungen oder Probenströme, so führt die Aufladung der Probe dazu, dass das Bild nach und nach nur noch als weiße Fläche sichtbar ist.

Um eine deutlichere Abbildung zu erhalten gibt es unterschiedliche Arten der Mittelung. Hier wurde meist die Funktion *Line Integration* genutzt, d.h. eine Linie wird mehrfach (meist 60 fach) abgerastert und daraus ein Mittelwert erstellt. Auf diese Weise fallen eventuelle Probleme durch eine Drift der Probe nicht ins Gewicht. Hier zeigt die Beobachtung, dass es sich eher lohnt, eine schnellere Scangeschwindigkeit mit vielen Wiederholungen zu verwenden als eine langsame Scangeschwindigkeit mit wenigen Wiederholungen.

5.2.7. Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Das verwendete REM ist mit einem Detektor des Typs *XFlash6* für energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) der Firma BRUKER erweitert, so dass eine räumlich aufgelöste Elementaranalyse möglich ist. Hier wird das *Quantax*-System des Herstellers verwendet. Bilder wurden mithilfe der Software *Esprit 1.9* aufgenommen.

Hierbei werden die Atome der Probe durch den Elektronenstrahl bei einer festen Energie angeregt. Bei dem hier verwendeten Detektor entspricht dies einer Beschleunigungsspannung (EHT) von 15 kV.

Bei der Anregung werden Elektronen in höhere Energieniveaus gehoben. Die entstandenen Lücken werden durch Elektronen aus höheren Schalen wieder gefüllt und die Energiedifferenz als Strahlung ausgesendet. Auf diese Weise entsteht ein für ein Element charakteristisches Spektrum.

Als günstig hat es sich erwiesen, die Aufnahmen bei hohen Probenströmen (I_{Probe}) von maximal 425 pA durchzuführen, wodurch höhere Zählraten erreicht werden und die Messungen kürzer dauern, so dass Störungen durch eine eventuelle Drift weniger stark zu Tage treten. Des Weiteren ist der Arbeitsabstand (WD) durch die Position des Detektors bestimmt. Bei 9,5 mm erhält man eine maximale Ausbeute.

6. Proben

Alle Proben wurden in Reinstwasser mit einer Leitfähigkeit von etwa $\sigma_m = 0,3 \frac{\mu S}{cm}$ aus der hausinternen Anlage verdünnt.

6.1. Modellsystem

6.1.1. Mikro- und Nano-Sphären

Für die Untersuchungen des Verhaltens von Einzelobjekten auf Nano-Elektroden wurden zunächst Mikro- und Nano-Sphären (Beads) aus Polystyrol als Modellsystem verwendet. Hierbei fanden insbesondere Beads der Firma THERMO FISHER SCIENTIFIC (ehemals LIFE TECHNOLOGIES) Verwendung.

Die Latex-Beads sind kugelförmige Partikel in der Größenordnung von Kolloiden. Sie werden aus ultrareinem Polystyrol ($(C_8H_8)_n$) hergestellt, mit verschiedenen Farbstoffen beladen und zeigen typischerweise kein oder nur sehr geringes Ausbleichen.

Anhand verschiedener Beads (vgl. Tabelle A.9 im Anhang) wurden systematische Experimente zum Verhalten kleiner Partikel unter dielektrophoretischer Wirkung durchgeführt, indem sie an unterschiedlichen Elektrodentypen vergleichend untersucht wurden. Die Beads unterscheiden sich in Farbe, Funktionalisierung und Radius.

Hierbei wurden carboxylierte, amino-modifizierte und nicht funktionalisierte Beads verwendet. Die carboxylierten Beads tragen eine feste negative Partialladung, während die amino-modifizierten eine positive tragen, was Auswirkungen auf das Verhalten während der DEP hat.

Die Lichtstärke der Beads ist größenabhängig, da sie mit einer unterschiedlichen Farbstoffmenge beladen werden. Ihre Helligkeiten im Vergleich lassen sich anhand der Herstellerangaben über Fluorescein-Äquivalente (vgl. Tabelle A.9 im Anhang) abschätzen.

Die Anzahl der Beads pro mL lässt sich nach Herstellerangaben wie folgt bestimmen:

$$\frac{Beads}{mL} = \frac{6 \cdot C \cdot 10^{12}}{\rho \cdot \pi \cdot \Phi^3},$$

mit C der Konzentration der suspendierten Beads in $\frac{g}{mL}$ (hier meist $0,02 \frac{g}{mL}$ für 2% Suspensionen), Φ dem Durchmesser in μm und ρ , der Dichte des Polymers in $\frac{g}{mL}$ (hier $1,05 \frac{g}{mL}$ für Polystyrol).

Für die Experimente wurde die Original-Bead-Lösung zunächst für 1 Minute einem Ultraschallbad ausgesetzt und dann mit ultrareinem Wasser verdünnt. Dabei wurde meist ein Verhältnis gewählt, dass etwa $10^5 \frac{Beads}{mL}$ in der Probe vorhanden waren. $5 \mu L$ dieser Probenlösung wurden in die Probenkammer gegeben und untersucht.

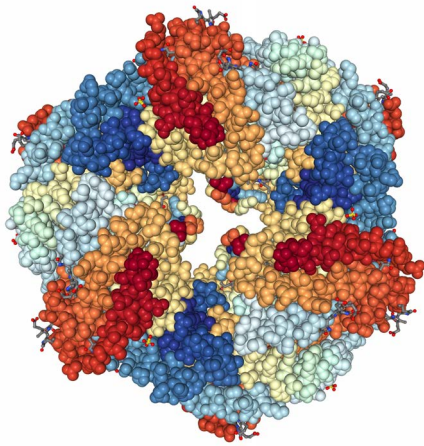


Abbildung 6.1.: Struktur von R-PE nach PDB 1eyx [18] und Abbildung des Gametophyten von *Pyropia tenera* aus dem Herbarium der Universität von Kalifornien (Berkeley) [AHFH 21546]

6.2. Biologische Proben und Farbstoffe

6.2.1. R-PE aus *Pyropia tenera*

Für Einzelmolekülmessungen wurde ein in Rotalgen (**R**hodophyta) vorkommendes autofluoreszierendes Protein, das R-**P**hycoerythrin (R-PE) des Herstellers MERCK genutzt.

Das hier verwendete R-PE entstammt einer Rotalge aus der Ordnung der Bangiales. Bis 2011 hieß der Organismus *Porphyra tenera* (Kjellman), später *Pyropia tenera* (Kjellman). Die Beschreibung der Art erfolgte 1897 vom schwedischen Botaniker Frans Reinhold Kjellman [61], während die Gattung der *Porphyra* Carl Adolph Agardh bereits 1824 beschrieben hatte [4]. 2011 wurde *Porphyra tenera* wegen molekulargenetischer Sequenzunterschiede aus der Gattung der *Porphyra* aus- und in die Gattung *Pyropia* eingegliedert [119]. Ihr wissenschaftlich korrekter Name ist damit heute *Pyropia tenera* Kjellman (N.Kikuchi, M.Miyata, M.S.Hwang, H.G.Choi).

Für die Photosynthese beinhalten Rotalgen verschiedene Pigmente, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen absorbieren können. Eines hiervon ist das R-PE. Hierbei handelt es sich um ein rotes Pigment, das der Alge ihre Farbe gibt, da das ebenfalls enthaltene Chlorophyll a maskiert wird. Je tiefer die Alge lebt, desto dunkler wird ihre Farbe, da mehr Pigmente zur Absorption von Licht benötigt werden.

R-PE ist ein autofluoreszierendes Protein, oder genauer ein Phycobiliprotein [37, 38], das Teil eines Phycobilisomes ist. Hierbei handelt es sich um stabförmige Proteine, die den Hauptteil eines Lichtsammel-Protein-Pigment-Komplexes bilden, der in Bakterien, Algen und Pflanzen vorkommt. Sein Zweck ist die Absorption von Licht und der Transfer

von Energie an die photoaktiven Reaktionszentren in der Thylakoidmembran. Phycobilisomen bestehen aus verschiedenen Phycobiliproteinen. An der Oberfläche des Stromas befindet sich zunächst Allophycocyanin (APC), in der Mitte Phycocyanin (PC) und an der Spitze Phycoerythrin (PE). Der Energietransfer findet also von PE über PC zu APC und schließlich zum Chlorophyll a statt. Die Effizienz dieses Vorgangs beträgt beim R-PE nahezu 100% [18]. Die sehr hohe Quantenausbeute macht es für Einzelmolekülmessungen besonders geeignet [40]. Bei dem Mechanismus des Energietransfers handelt es sich um eine Förstersche Dipol-Dipol-Resonanz. Die Energietransferrate κ_{ET} lässt sich hierbei bestimmen nach

$$\kappa_{ET} = \frac{k^2}{\tau_0} \left(\frac{R_0}{d} \right)^6$$

mit k dem Orientierungsfaktor, $R_0 = 5 \text{ nm}$ dem Försterradius, τ_0 der Fluoreszenzlebensdauer und d dem Abstand der Chromophore.

Bei den Chromophoren im R-PE handelt es sich um Tetrapyrrole, die über Thioetherbindungen an Cysteine des Proteinrückgrates gebunden sind. Es treten vier Klassen mit verschiedenen Absorptionsmaxima auf: PEB (Phycoerythrobilin, $\lambda_{max} = 560 \text{ nm}$), PUB (Phycourobilin, $\lambda_{max} = 495 \text{ nm}$), PCB (Phycocyanobilin, $\lambda_{max} = 620 - 650 \text{ nm}$) und PXB (Phycobiliviolin, $\lambda_{max} = 575 \text{ nm}$). Phycobiliproteine haben neben starken Absorptions- und Emissionsbanden auch einen großen Stokes-Shift, wodurch im Experiment Störungen durch Rayleigh- und Raman-Streuung minimiert werden.

R-PE besteht aus Untereinheiten $(\alpha_2\beta_2)_3\gamma$ [18]. Die $(\alpha\beta)_3$ -Trimere formen eine Scheibe (vgl. Abbildung 6.1 links) mit einem Durchmesser von 11 nm und einer Dicke von 6 nm. In der Mitte der Scheibe ist ein Kanal mit einem Durchmesser von 3,5 nm. In diesem Kanal befindet sich die γ -Untereinheit. R-PE hat ein molekulares Gewicht von etwa 240 kDa. Jede $(\alpha\beta)$ -Einheit besitzt vier PEB- und ein PUB-Chromophor. Die γ -Untereinheit besitzt ein PEB- und drei PUB-Chromophore. Insgesamt enthält jedes R-PE-Molekül also **34 Chromophore**. Die verschiedenen Moleküle verhalten sich allerdings wie ein Quantensystem und nicht wie eine Sammlung von 34 unabhängigen Chromophoren [127]. Bei Fluoreszenz blinken also einzelne R-PE Moleküle und nicht einzelne Chromophore.

Die Fluoreszenz von R-PE ist sowohl abhängig von der Temperatur [121] und dem pH-Wert (stabil bis 60°C [30] und zwischen pH 5,0 und 9,0 [93]) als auch von der Lichtstärke und der Dauer der Beleuchtung. Die Emission bei 570 nm ist für kleine Lichtstärken proportional zur Lichtstärke [33]. Durch die Aufbringung von R-PE auf plasmonische Nanostrukturen (z.B. Silber [106]) lässt sich seine Fluoreszenz vervielfachen [20]. Da R-PE photodestruktiv ist, kommt es allerdings bei andauernder Beleuchtung zur Denaturierung der Moleküle, was als Bleichen beobachtbar ist.

Die Anregung von R-PE ist optimal im primären Anregungspeak bei 565 nm. Zudem gibt es zwei sekundäre Peaks bei 496 nm und 545 nm. Die Emission hat ihr Maximum bei 575 nm.

6.2.2. Rinderserumalbumin (BSA)

Rinderserumalbumin (bovines Serumalbumin (BSA)) ist ein wasserlösliches globuläres Protein aus dem Blutserum von Hausrindern. Im Blut dient es dazu, dass andere Proteine durch Bindung an Serumalbumin ebenfalls wasserlöslich werden, wodurch der kolloidische Druck des Blut aufrechterhalten werden kann.

Ein BSA-Molekül besteht aus 583 Aminosäuren und hat ein molekulares Gewicht von 66 kDa . Ein einzelnes Protein hat die Größe $(4 \text{ nm})^3$. Bei Erwärmung auf 50°C oder mehr formt das Albumin hydrophobe Aggregate, die nicht durch Kühlen in das Monomer zurückkehren.

In Natriumbicarbonat-Puffer (100 mM, pH 8,5), bei einer Konzentration von $5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$, gelöstes BSA des Herstellers MERCK fand Verwendung. Dieses wurde von meiner Kollegin Dr. Eva-Maria Laux mit Oyster-647-TFP Farbstoff der Firma LUMINARTIS fluoreszenzmarkiert und mir freundlicherweise für Experimente überlassen. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen des Oyster-647-Farbstoffs liegen bei 651-653 nm und 671-673 nm.

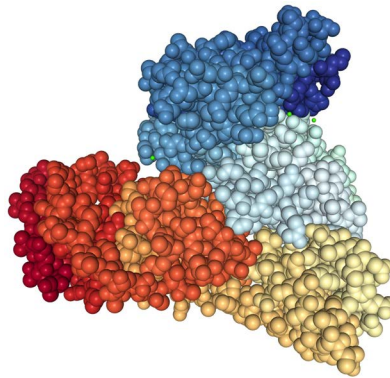


Abbildung 6.2.: Struktur von BSA nach PDB 3v03 [81]

6.2.3. Rhodamin B

Bei Rhodamin B handelt es sich um einen Xanthenfarbstoff, dessen Fluoreszenz von der Temperatur beeinflusst wird, aber nicht pH-abhängig ist. Über Messung der Fluoreszenzintensität kann auf die Temperatur einer Flüssigkeit geschlossen werden [113]. Für Temperaturbestimmungen wurde in Reinstwasser gelöstes Rhodamin B des Herstellers MERCK genutzt. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 553 nm und das Emissionsmaximum bei 627 nm.

7. Rechnergestützte Auswertung

7.1. Numerische Simulationen mit Maze und Octave

Zur Bestimmung des räumlichen Verlaufs des elektrischen Feldes und des Gradienten $\nabla|E^2|$, der proportional zur Dielektrophoresekraft ist, wurden numerische Simulationen durchgeführt. Die Feldsimulationssoftware *Maze* der Firma FIELD PRECISION fand hier Anwendung. Sie basiert auf FEM (finite element modelling). Ein Gitter entsprechend der Elektrodenform wurde erzeugt (vgl. Abb. 7.1). Durch Lösen der Laplace-Gleichung $\nabla(\varepsilon\nabla(\varphi)) = 0$ unter Neumann-Randbedingungen $\nabla(\varphi) = 0$ wurde die räumliche Verteilung von $\varphi(x, y, z)$ bestimmt und als Matrix ausgegeben. Deren Weiterverarbeitung fand in einem selbstgeschriebenen *Octave*-Skript statt, so dass $E(x, y, z)$ als

$$E = -\nabla(\varphi)$$

berechnet werden konnte, um daraus $\nabla|E^2|(x, y, z)$ zu bestimmen. Hieraus wiederum lässt sich, abhängig von den Parametern des Mediums und des Partikels, eine räumliche Verteilung sowie ein Maximalwert der Dielektrophoresekraft (vgl. Glg 4.6) berechnen.

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Werte für ideales Wasser ($\varepsilon_m = 80$; $\sigma_m = 5,5 \cdot 10^{-6} \frac{S}{m}$), Polystyrol ($\varepsilon_p = 2,55$; $\sigma_p = 0,01 \frac{S}{m}$) und Siliziumdioxid ($\varepsilon(SiO_2) = 4,3$) verwendet (nach [88]). Zur Bestimmung einer maximalen Dielektrophoresekraft (auf ein Partikel mit 10 nm Durchmesser) und für Berechnungen der Übergangsfrequenz oder der elektrischen Leitfähigkeit wurde mit einem Potential von 1 V zwischen den Elektroden gerechnet. Dieses lässt sich über $\nabla|E^2|_{max}(1 V) \cdot U^2 = \nabla|E^2|_{max}(U)$ auf andere Spannungen übertragen, um $|E|$ bzw. $\nabla|E^2|$ zu bestimmen.

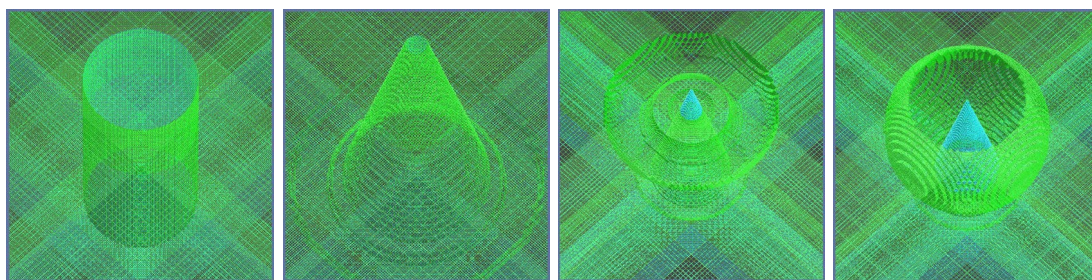


Abbildung 7.1.: Im kommerziellen Feldsimulationsprogramm *Maze* wurden Gitter der verwendeten Elektroden erstellt. Das Programm erlaubt eine Berechnung der räumlichen Verteilung von φ und $|E|$. Die hier gewonnenen Werte konnten mit einem *Octave*-Skript weiterverarbeitet werden.

7.2. Histogramm-Methode

Eine Histogramm-Methode wurde zur Bestimmung der Anzahl immobilisierter fluoreszierender Objekte angewendet.

Die Verteilungen der Fluoreszenzintensitäten wurden mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms *ImageJ* ermittelt. Hierfür wurde zum einen die *Find Maxima*-Methode angewandt, nach der in einer festgelegten *Region of Interest* (ROI), abhängig von einem Grenzwert, für Intensitätsunterschiede lokale Maxima einer Helligkeitsverteilung angezeigt werden. Als zweite Methode wurden manuell immer gleich große ROIs um jede Elektrode gelegt und der mittlere Grauwert der Flächen an diesen Stellen bestimmt. Die Korrektur des grauen Hintergrunds wurde über den Mittelwert verschiedener Flächen von Regionen ohne Fluoreszenz bestimmt. Letztere Methode hat den Vorteil, das gesamte Bead zu erfassen und Positionen, die nicht besetzt sind, zu berücksichtigen. Der große Zeitaufwand, der mit der Anzahl der zu untersuchenden Elektroden steigt, ist allerdings nachteilig. Die *Find Maxima*-Methode hingegen lässt sich sehr schnell automatisiert durchführen, erfasst aber nur die Maximalwerte, womit unbesetzte Elektroden nicht berücksichtigt werden. Es wurden auch andere Plugins (z.B. *Particle Tracker*, *Dot Blot Analyzer*, *Patch Detector Plus*) untersucht, die sich aber als weniger nützlich für die Auswertung herausgestellt haben.

Aus dem Histogramm wird eine Punktschar erstellt, an die mit *Origin* eine Kurve mit mehreren Gaußpeaks angepasst werden kann. Dabei stellt man fest, dass die Fluoreszenzintensitäts-Maxima der Kurve einen festen Abstand zueinander haben. Jedes Maximum spiegelt eine bestimmte Anzahl immobilisierter Beads je Elektrode wider. Das erste Maximum entspricht der Immobilisierung von keinem Bead je Elektrode, das zweite der von einem Bead je Elektrode und so fort.

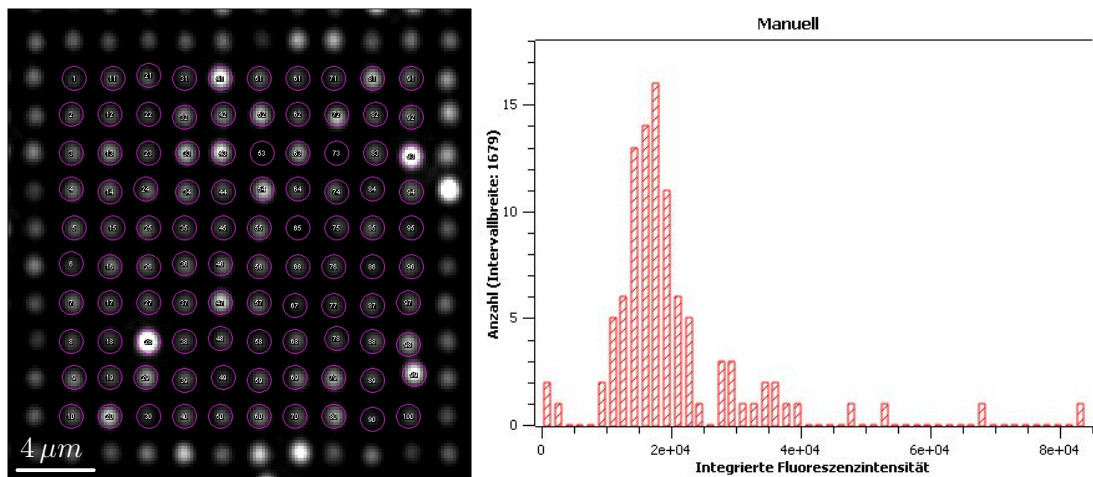


Abbildung 7.2.: Beispiel von 100 Elektrodenpositionen zur Erstellung eines Histogramms aus einer Fluoreszenzaufnahme: Um die Elektrodenpositionen wurden manuell gleichgroße ROIs gelegt. Aus den Mittelwerten der Fluoreszenzintensität in diesen Flächen wurden Histogramme erstellt.

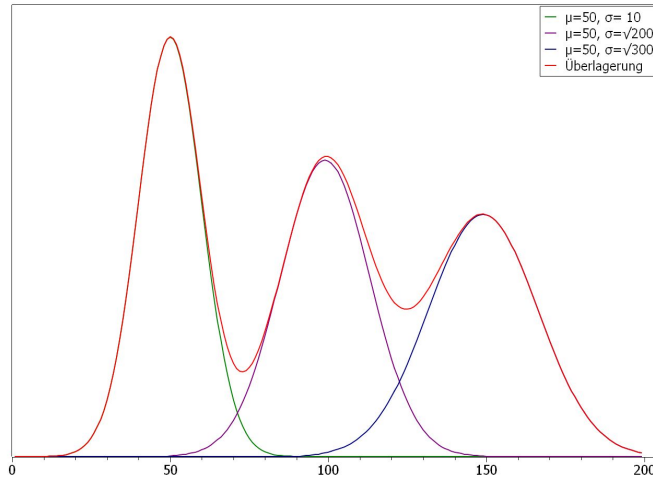


Abbildung 7.3.: Gaußverteilungen: Unter der Annahme, dass die gleiche Anzahl von Elektroden mit einem, zwei und drei Beads besetzt sind, deren Fluoreszenzintensität jeweils gaußverteilt ist, erhielte man eine Kurve dieser Form. In diesem Beispiel wurde ein Erwartungswert von $\mu_1 = 50$ für ein Bead angenommen, dementsprechend $\mu_2 = 100$ für zwei Beads und $\mu_3 = 150$ für drei Beads. Hier war für ein Bead $\sigma_1 = 10$. Daraus ergibt sich $\sigma_2 = \sqrt{200}$ für zwei Beads und $\sigma_3 = \sqrt{300}$ für drei Beads.

Faltungssatz bei Gaußverteilungen Zur Auswertung der Histogramme wurde mit einer Gaußanpassung in Origin gearbeitet, daher soll hier kurz der Faltungssatz bei Gaußverteilungen in Erinnerung gerufen werden.

Es wird angenommen, dass die Verteilung der Fluoreszenzintensität je Beadgröße einer Standard-Normalverteilung nach

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (7.1)$$

folgt, mit dem Erwartungswert μ und der Varianz σ .

Auf den Elektroden wird zum Teil mehr als ein Bead immobilisiert. Für eine Kombination von mehreren Gaußfunktionen gilt dann der Faltungssatz:

$$f(\mu_1, \sigma_1^2) \cdot f(\mu_2, \sigma_2^2) = f(\mu_1 + \mu_2, \sigma_1^2 + \sigma_2^2). \quad (7.2)$$

Geht man also davon aus, dass man die gleiche Anzahl einzelner, doppelter und dreifacher Beads miteinander vergleicht, so sind die entsprechenden Verteilungen $f(\mu, \sigma^2)$, $f(2\mu, 2\sigma^2)$ und $f(3\mu, 3\sigma^2)$. Die Erwartungswerte der Verteilungen für die verschiedenen Anzahlen von Beads sollten einen konstanten Abstand zueinander haben. Die Breite der Kurven sollte für mehrere Beads größer werden, während die Kurve selbst niedriger wird (vgl. Abb. 7.3).

7.3. Zeitliche Trajektorien

Wie nach [87] bekannt ist, gilt das Blinken von Molekülen als Nachweis, dass es sich um Einzelobjekte handelt. In einer Auftragung des zeitlichen Verlaufs einer fluoreszierenden Position äußert sich dies in Form von Stufen der Fluoreszenzintensität [47, 106].

Die Auswertung dieser Stufen erfolgte über die Software *Origin*. Hier wurde jeweils eine Gerade mit der Steigung 0 angepasst. Eine Mittelung der untersten dieser Stufen wurde als Hintergrundkorrektur von den Werten abgezogen. Die höher gelegenen Stufen verschiedener fluoreszierender Positionen wurden miteinander verglichen, um so auf die Anzahl der Moleküle zu schließen, die durch ihr Blinken zu dem Signal beitragen.

Teil III.
Ergebnisse

8. Numerische Simulationen

Numerische Simulationen wurden durchgeführt, die den räumlichen Verlauf des elektrischen Feldes $|E|$ und den Gradienten $\nabla|E^2|$ betreffen. Aus den gewonnenen Ergebnissen konnten Rückschlüsse für das Design neuer Elektroden und den Experimentaufbau gezogen werden.

Jeweils eine Bodenelektrode wurde mit einer zusätzlichen vertikalen Elektrode konstruiert. Diese ist gegebenenfalls in eine isolierende SiO_2 -Schicht eingebettet, so dass die Spitze mit dem Medium (Wasser) in Kontakt tritt. Als Gegenelektrode ist ein 7 – 99 μm entferntes ITO-Deckgläschen konstruiert.

8.1. Abstand der Elektrode zum ITO-Deckglas

Um im Programm *Maze* mit kleineren Gittergrößen arbeiten zu können, was einen erheblichen Einfluss auf die Rechenzeit der Simulationen hat, wurden einige Simulationen an Zylinder-Elektroden mit einem Abstand der Elektrode zum ITO von nur 7 μm durchgeführt. Der Realität des Experiments entspricht aber ein Abstand von etwa 100 μm , wobei die Spacerfolie einen Mindestabstand von 80 μm vorgibt. Die Abhängigkeit des Abstands d vom ITO zur Elektrode wurde in einer Simulationsreihe geklärt. Diese ergibt für unterschiedliche Abstände des ITO-Deckglases zu einer einzelnen Zylinder-Elektrode bei 1 V angelegter Spannung einen hyperbolischen Verlauf von $|E|$ und $\nabla|E^2|$ für große Abstände. Das entspricht im Wesentlichen dem Verhalten eines Plattenkondensators ($E = \frac{U}{d}$). Bei 1 V angelegter Spannung beginnt dies für Abstände ab etwa 30 μm . Darunter findet man ein Verhalten von $|E|$ nach $1/d^4$. Betrachtet man $\nabla|E^2|$, so geht es mit $1/d^{10}$. Den gesamten Verlauf kann man mit Hilfe von *Origin* mit einer hyperbolischen Funktion anpassen (s. Abb. 8.1) nach

$$\nabla|E^2|_{max} = \nabla|E^2|_0 + \frac{A}{(1 + \cdot Bd)^{\frac{1}{c}}}. \quad (8.1)$$

Die Abstände im Experiment sind durch die Dicke der Spacerfolie bestimmt. Bei einer Gegenelektrode in direkter Elektrodennähe, wie sie bei den Kegel-Elektroden mit integrierter Gegenelektrode vorhanden ist, sollte dementsprechend ein größerer $\nabla|E^2|$ erzeugt werden als bei der Verwendung der weiter entfernten ITO-Elektrode. Für eine ebene Zylinder-Elektrode erhält man die Werte:

Abstand d	$ E _{max}$ in $\frac{V}{m}$	$\nabla E^2 _{max}$ in $\frac{V^2}{m^3}$
7 μm	$13 \cdot 10^6$	$21 \cdot 10^{21}$
99 μm	$0,15 \cdot 10^6$	$0,0031 \cdot 10^{21}$

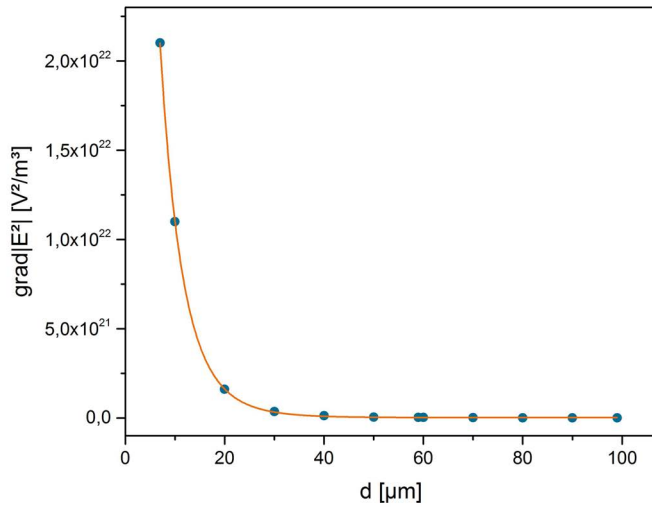


Abbildung 8.1.: Die Entfernung d der ITO-Elektrode zur Zylinder-Elektrode hat einen Einfluss auf die Größe von $\nabla|E^2|_{max}$, was bei kleinem d deutlich zu Tage tritt.

8.2. Einzelelektroden

Bezüglich des Feldverlaufs wurden einzelne vertikale Elektroden untersucht. Es wurden unterschiedliche Spitzendurchmesser und Elektrodenformen berücksichtigt, der Einfluss der isolierenden SiO_2 -Schicht auf den Feldverlauf untersucht sowie Simulationen mit einem Bead an der Elektrode durchgeführt.

8.2.1. Zylinder-Elektrode

Eine einzelne Zylinder-Elektrode mit einem Spitzendurchmesser von 500 nm wurde mit einer räumlichen Auflösung von $(10 \text{ nm})^3$ in der Nähe der Oberfläche berechnet. Hierbei handelt es sich um eine Mittelung aller Werte in einem Würfel mit 10 nm Kantenlänge. Weiter von der Spitzenoberfläche entfernt wurde eine geringere Auflösung gewählt.

Für die Simulationen wurde ein statischer Fall angenommen, mit 1 V an der Zylinder-Elektrode und 0 V an der ITO-Gegenelektrode. Dies führte bei einer Entfernung zwischen ITO- und Zylinder-Elektrode von $7 \mu\text{m}$ zu Werten im Bereich von $10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$ für $|E|$ und im Bereich von $10^{22} \frac{\text{V}^2}{\text{m}^3}$ für $\nabla|E^2|$ (vgl. Abbildungen 8.2 und 8.3).

Die maximalen Werte sowohl von $|E|$ als auch von $\nabla|E^2|$ befinden sich an den Rändern der Elektrodenspitze. Nach der Gleichung der Dielektrophoresekraft (Glg. 4.6) sollten Objekte demnach dielektrophoretisch zu den Zylinder-Elektroden-Rändern gezogen werden und eine Immobilisierung dort bevorzugt stattfinden.

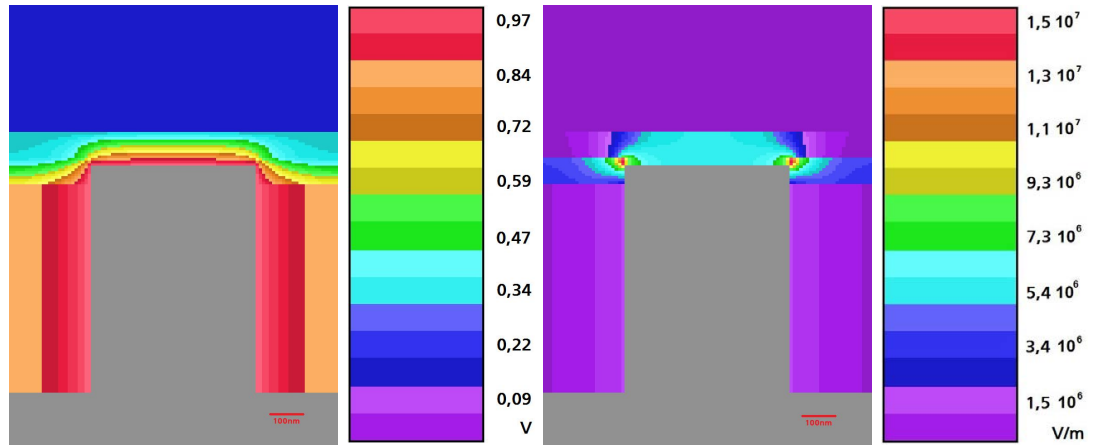


Abbildung 8.2.: Verteilung des Potentials φ (links) und der elektrischen Feldstärke $|E| = -\nabla(\varphi)$ (rechts) als Seitenansicht einer Zylinder-Elektrode für 0 V am ITO und 1 V an der Zylinder-Elektrode bei einer Auflösung von $(10\text{ nm})^3$ nahe der Zylinder-Elektrode und einem Abstand von $7\text{ }\mu\text{m}$ zum ITO. Im Sinne einer Modellreduzierung zur Beschleunigung der Rechenzeit wurde außerhalb des interessanten Bereichs mit einer größeren Auflösung gerechnet.

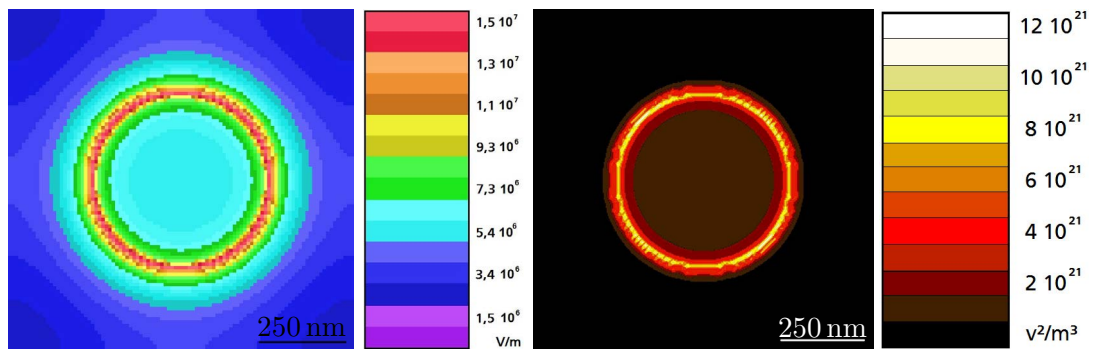


Abbildung 8.3.: Verteilung der elektrischen Feldstärke $|E|$ (links) und des Gradienten $\nabla|E|^2$ (rechts) als Schnitt über einer Zylinder-Elektrode. Für die Berechnung wurde 0 V an der ITO-Elektrode und 1 V an der Zylinder-Elektrode angenommen bei einem Abstand von $7\text{ }\mu\text{m}$.

8.2.2. Abschluss mit der Oberfläche

Es stellte sich die Frage, ob die Elektroden mit der Chipoberfläche abschließen. Die für die Messungen verwendeten zylinderförmigen W-Elektroden sind um etwa 20 nm versenkt im Vergleich zur Chipoberfläche. Im Folgenden wurde der Einfluss versenkter und erhabener Elektroden untersucht. In Abb. 8.4 finden sich Plots der Verteilung der elektrischen Feldstärke $|E|$ und des Gradienten $\nabla|E^2|$, zu dem die Dielektrophoresekraft nach 4.6 proportional ist. Hier wurde mit einer 900 nm Zylinder-Elektrode gerechnet, was dem Durchmesser eines früheren Elektrodentyps entspricht.

Diese Simulationen ergaben, dass der maximale Wert des Gradienten $\nabla|E_{max}^2|$ bei einem mit der Oberfläche abschließenden Zylinder im Vergleich am größten ist. Hier ist $\nabla|E_{max}^2| = 21 \cdot 10^{21} \frac{V^2}{m^3}$ für 1 V angelegte Spannung zwischen einem 7 μm entfernten ITO-Deckglas und der Zylinder-Elektrode. Der Wert für den versenkten Zylinder liegt darunter, ist aber höher als der für den erhabenen Zylinder. Allerdings gilt dies nicht nur an der Elektrode selbst, sondern auch an den Kanten des Lochs. Bei einer durch den Herstellungsprozess bedingten Unebenheit ist also eine versenkte Elektrode einer erhabenen vorzuziehen.

Insgesamt erhält man

Maximale Werte	$ E _{max}$ in $\frac{V}{m}$	$\nabla E^2 _{max}$ in $\frac{V^2}{m^3}$
abschließend	$13 \cdot 10^6$	$21 \cdot 10^{21}$
versenkt	$9 \cdot 10^6$	$10 \cdot 10^{21}$
erhaben	$6 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^{21}$

8.2.3. Bead an der Spitze

Simulationen zur Feldverteilung bei Vorhandensein unterschiedlich großer Beads (Durchmesser 1 μm ; 500 nm und 100 nm) auf einer zylinderförmigen Elektrode (Durchmesser 435 nm; Höhe 600 nm) wurden erstellt. Die Positionierung des Beads in der Zylindermittle bzw. am Zylinderrand wurde dabei berücksichtigt und jeweils die Verteilung der elektrischen Feldstärke $|E|$ in $\frac{V}{m}$ sowie die Verteilung des Gradienten $\nabla|E^2|$ in $\frac{V^2}{m^3}$ bestimmt. Beispielhaft sind in Abbildung 8.5 die Ergebnisse dargestellt für ein Bead, das sich am Zylinderrand befindet und mit 1 μm einen etwa doppelt so großen Durchmesser hat wie die Elektrode.

Für die hier durchgeführte Simulation wurde eine Auflösung von 50 nm gewählt. Zwischen dem 99 μm entfernten ITO-Deckglas und der Elektrode wurde eine Spannung von 1 V angenommen. Die Beads wurden über eine relative Permittivität von 2,55 für Polystyrol [88] definiert.

Aus den Simulationen mit verschiedenen Beads an unterschiedlichen Positionen ergibt sich, dass deren Anwesenheit verstärkend auf das elektrische Feld wirkt. Der maximale Wert des Gradienten für einen Zylinder ohne Bead beträgt $\nabla|E^2|_{max} = 2,0 \cdot 10^{17} \frac{V^2}{m^3}$ im Gegensatz zu $\nabla|E^2|_{max} = 3,9 \cdot 10^{17} \frac{V^2}{m^3}$ bei einem Bead mit 500 nm Durchmesser

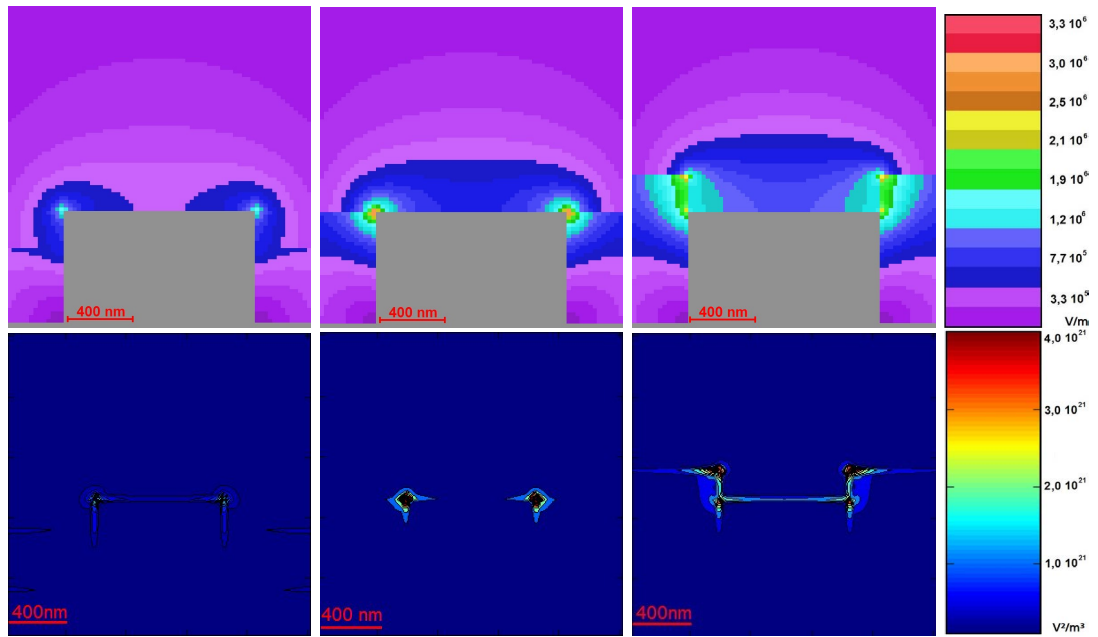


Abbildung 8.4.: Numerische Berechnung des elektrischen Feldes $|E|$ in $\frac{V}{m}$ (oben) und des Gradienten $\nabla|E^2|$ in $\frac{V^2}{m^3}$ (unten) einer Zylinder-Elektrode für den Fall, dass sie aus der isolierenden SiO_2 -Schicht heraus schaut (links), mit ihr abschließt (Mitte) oder versenkt ist (rechts). Die mit der Oberfläche abschließende Elektrode weist die größten maximalen Werte auf. (Potentialdifferenz: 1 V; Abstand zum ITO: $7 \mu m$)

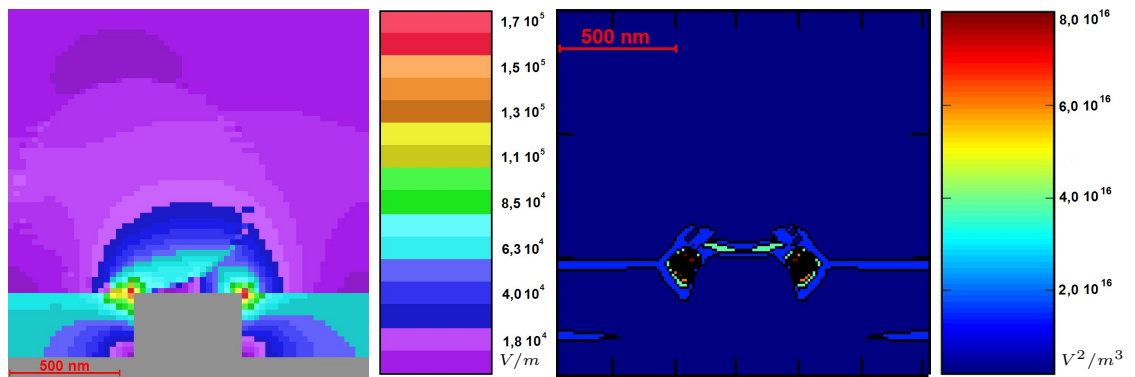


Abbildung 8.5.: Zylinder-Elektrode (435 nm), mit einem $1 \mu m$ -Bead an der linken Ecke. In der räumlichen Verteilung der Feldstärke $|E|$ (links) ist eine Änderung des Feldverlaufs klar erkennbar. Bezogen auf den Gradienten $\nabla|E^2|$ fällt sie aber kaum ins Gewicht. (Potentialdifferenz: 1 V; Abstand zum ITO: $99 \mu m$)

am Rand der Zylinder-Elektrode. Zudem wirkt sich ein Bead am Rand einer Elektrode geringfügig deutlicher in Bezug auf eine Feldveränderung aus als ein Bead, das sich auf der Mitte der Elektrodenspitze befindet. So ist der maximale Gradient für den Fall eines 500 nm Beads in der Zylinder-Elektrodenmitte $\nabla|E^2|_{max} = 3,1 \cdot 10^{17} \frac{V^2}{m^3}$. Bei Simulationen mit zylinderförmigen Elektroden sowohl ohne als auch mit Bead findet man die größte Dielektrophoresekraft am Rand der Elektrode. Ein Bead sollte dort also vorwiegend immobilisiert werden.

Demgegenüber ist das Feld oberhalb des Beads, das für weitere Partikel zugänglich wäre, abgeschwächt. Das einmal immobilisierte Bead schirmt das Feld also für weitere Beads teilweise ab.

8.2.4. Kegel-Elektrode

Es wurde zum einen ein idealer Kegel mit den Maßen aus einer transmissions-elektronenmikroskopischen (TEM) Aufnahme vom IHP [124] und zum anderen ein Kegelstumpf simuliert.

Hierbei wurde ein Kompromiss gewählt zwischen der idealen Kegelform und der realen Elektrodenform bei der tatsächlichen Höhe der Elektrode im Vergleich zur Bodenelektrode. Somit wurde statt dem eigentlichen Spitzendurchmesser von 50 nm die Simulation so gestaltet, dass mit der idealen Kegelform und der realen Elektrodenhöhe ein Kegelstumpf mit 75 nm Spitzendurchmesser simuliert werden konnte. Eine andere Kegel-Elektrode hatte tatsächlich einen Spitzendurchmesser von 10 nm. Hier konnte bei einer der Realität nahezu entsprechenden Elektrodenhöhe auch bei der idealen Kegelform ein Spitzendurchmesser von 10 nm gestaltet werden.

Die Rechnung wurde mit 99 μm Abstand zum ITO-Deckglas durchgeführt. Die Potentialdifferenz zwischen der Elektrode und der Gegenelektrode betrug 1 V (vgl. Abb. 8.6 und 8.7).

8.2.5. Kegel-Elektrode mit integrierter Gegenelektrode

Neben den Elektroden, bei denen ein ITO-beschichtetes Deckglas als Gegenelektrode verwendet werden muss, wurden auch Elektroden mit integrierter TiN-Gegenelektrode simuliert. Wie bei den anderen Simulationen wurde mit 1 V Potentialdifferenz gerechnet. Hier allerdings ist der Abstand zur Gegenelektrode mit 250 nm deutlich geringer, wodurch wesentlich höhere Gradienten auftreten.

Vergleicht man die Maximalwerte der Simulationen verschiedener Kegel-Elektroden (vgl. Abb. 8.7 und 8.8), so erhält man jeweils für einen Abstand von 99 μm zur ITO-Gegenelektrode und 1 V Potentialdifferenz:

Spitzendurchmesser	E_{max} in $\frac{V}{m}$	$\nabla E^2 $ in $\frac{V^2}{m^3}$	$F_{DEP,max}$ in N
10 nm (ITO)	$0,16 \cdot 10^6$	$0,003 \cdot 10^{21}$	$0,013 \cdot 10^{-12}$
75 nm (ITO)	$0,09 \cdot 10^6$	$0,001 \cdot 10^{21}$	$0,005 \cdot 10^{-12}$
10 nm (TiN)	$38 \cdot 10^6$	$150 \cdot 10^{21}$	$670 \cdot 10^{-12}$

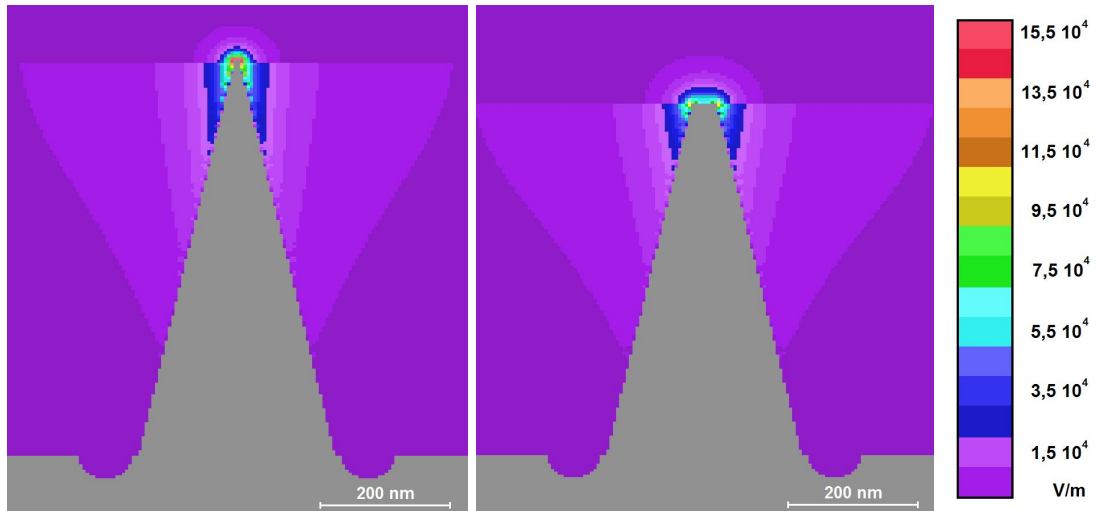


Abbildung 8.6.: Räumliche Verteilung der elektrischen Feldstärke $|E|$ zweier Kegel-Elektroden mit unterschiedlichen Durchmessern. Links ist eine Elektrode mit 10 nm Durchmesser und rechts eine mit 75 nm berechnet. Es wurde hier mit einer Spannung von 1 V und einem Abstand von $99\text{ }\mu\text{m}$ zum ITO gerechnet.

Vergleicht man Kegel-Elektroden mit unterschiedlichen Spitzendurchmessern, so erkennt man, dass die Elektroden mit den schärferen Spitzen zu größeren Werten des Gradienten führen. Vergleicht man die unterschiedlichen Gegenelektroden, so stellt man fest, dass aufgrund des geringeren Abstands der integrierten Gegenelektrode zur Kegel-Elektrode bei sonst gleichen Bedingungen der Gradient einen um mehrere Größenordnungen höheren Wert annimmt. Da die Dielektrophoresekraft nach Gleichung 4.6 proportional zu $\nabla|E^2|$ ist, ist auch dieser Wert deutlich höher.

8.2.6. Spitzenumgebendes Siliziumdioxid

Der Feldverlauf wurde bezüglich des Vorhandenseins einer SiO_2 -Schicht untersucht. Für einen Vergleich wurde bei 1 V und einem $7\text{ }\mu\text{m}$ entfernten ITO eine numerische Berechnung angestellt. In Abbildung 8.9 ist die Verteilung der elektrischen Feldstärke $|E|$ in $\frac{\text{V}}{\text{m}}$ um die Kegel-Elektrode dargestellt. Hierbei wurde links eine Elektrode mit SiO_2 -Schicht, aus der sie herausragt, angenommen und rechts eine blanke Elektrode ohne SiO_2 . Eine Verstärkung des Feldes um die Spitze, die in das SiO_2 eingelassen ist, im Gegensatz zu der Elektrode ohne SiO_2 , ist deutlich erkennbar. Die maximalen Werte für die elektrische Feldstärke $|E|$ und den Gradienten $\nabla|E^2|$ sind im Folgenden aufgeführt. Hieraus ergibt sich, dass eine von SiO_2 umgebene Elektrode zu bevorzugen ist. Zudem sind die eingebetteten Spitzen besser vor Beschädigungen oder Verschmutzungen geschützt.

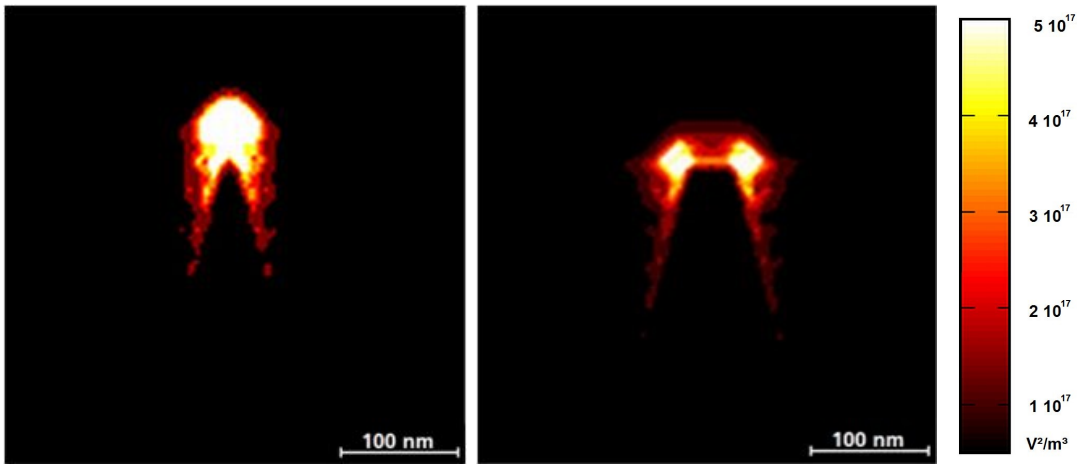


Abbildung 8.7.: Verteilung des Gradienten $\nabla|E^2|$ an den Spitzen zweier Kegel-Elektroden mit den Durchmessern 10 nm (links) und 75 nm (rechts). Die Rechnungen wurden mit 1 V und einem Abstand von $99\text{ }\mu\text{m}$ zum ITO-Deckglas durchgeführt. Die Auflösung des Gitters in der Umgebung der Spitze ist hier $(5\text{ nm})^3$.

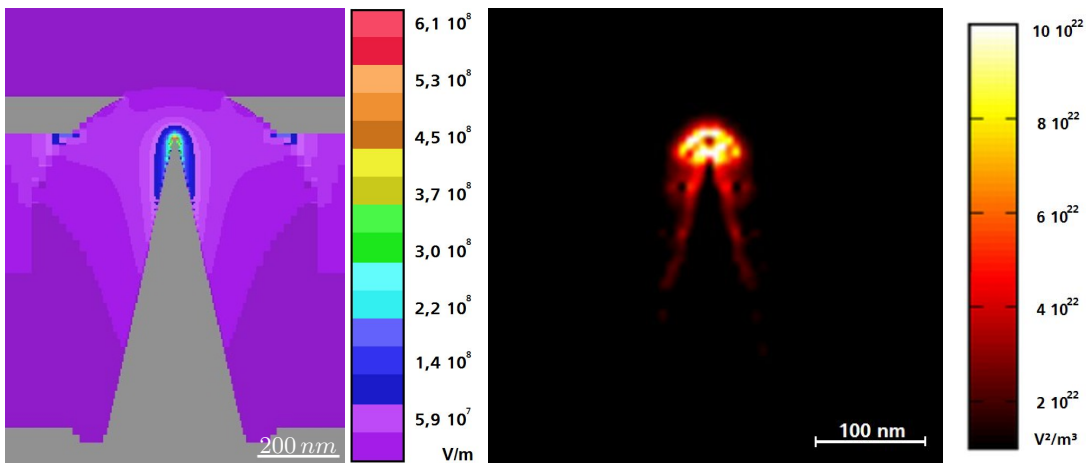


Abbildung 8.8.: Verteilung der Feldstärke $|E|$ (links) und des Gradienten $\nabla|E^2|$ (rechts) der Spitzen einer Kegel-Elektrode mit integrierter Gegenelektrode mit dem Durchmesser 10 nm . Durch die deutlich nähere Gegenelektrode ist der Wert für den Gradienten im Vergleich zur Simulation mit einer entfernten ITO-Elektrode deutlich größer. (Potentialdifferenz: 1 V ; Abstand zum ITO-Deckglas: $99\text{ }\mu\text{m}$)

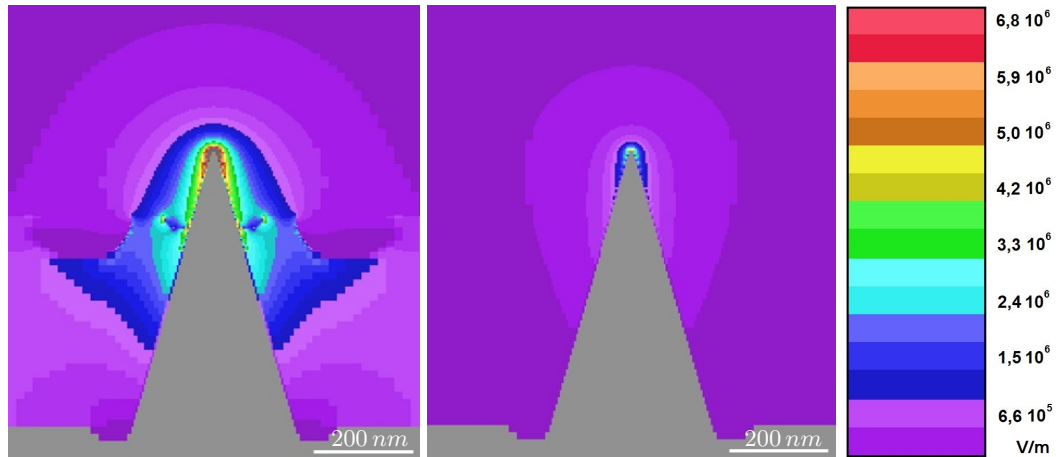


Abbildung 8.9.: Kegel-Elektrode mit isolierender SiO_2 -Schicht (links) und ohne (rechts): Dargestellt ist die elektrische Feldstärke $|E|$ in $\frac{V}{m}$. Mit dem SiO_2 tritt eine Verstärkung des Feldes um die Spitze auf. Gerechnet wurde mit einem Abstand zum ITO-Deckglas von $7 \mu m$ und mit 1 V Potentialdifferenz.

Maximale Werte	$ E _{max}$ in $\frac{V}{m}$	$\nabla E^2 _{max}$ in $\frac{V^2}{m^3}$
mit SiO_2	$15 \cdot 10^6$	$22 \cdot 10^{21}$
ohne SiO_2	$4 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^{21}$

8.3. Elektroden-Arrays

Neben der Berechnung des Feldverlaufs einer einzelnen Elektrode wurde auch die Anordnung von Elektroden in Arrays betrachtet. Dies erfolgte sowohl an den Ecken des Arrays als auch in der Nähe eines Orientierungskreuzes. Die räumliche Auflösung betrug $(100 \text{ nm})^3$. Es handelt sich also um eine Mittelung aller Werte in einer 100 nm Schicht.

8.3.1. Zylinder-Array

Simulationen von Ausschnitten der Elektroden-Arrays wurden durchgeführt. Die betrachteten Elektroden sind zylinderförmig, haben einen Durchmesser von 500 nm und sind in vier einzeln ansteuerbaren Arrays arrangiert. Abbildung 8.10 zeigt den Verlauf der elektrischen Feldstärke $|E|$ in $\frac{V}{m}$ und den des Gradienten $\nabla|E^2|$ in $\frac{V^2}{m^3}$. Der Bereich zwischen den einzelnen Subarrays ist zu sehen, wobei an das obere rechte (aktive) Array eine Spannung von 1 V angelegt ist, während die anderen auf dem Potential 0 V liegen. Gerechnet wurde bei einer Auflösung von $(100 \text{ nm})^3$, wofür etwa $1 \cdot 10^7$ Volumenelemente erstellt wurden. Als Ergebnis erhält man einen Feldverlauf, der den größten Wert an den Randlelektroden des Arrays zeigt und zur Arraymitte hin kleinere Werte aufweist.

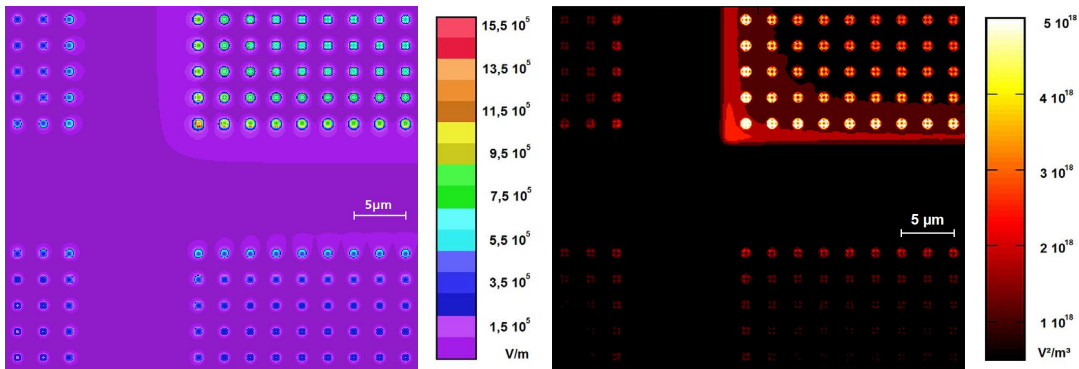


Abbildung 8.10.: Ausschnitt eines Arrays mit zylinderförmigen Elektroden. Gezeigt ist die Position zwischen den vier Subarrays. Das Array oben rechts wurde als aktives Array angenommen und mit 1 V an den Elektroden simuliert. Die anderen drei Arrays liegen auf dem Potential 0 V. Gerechnet wurde mit einem Abstand zum ITO von $99 \mu\text{m}$. Den größten Wert des Gradienten weisen die Rand-Elektroden des aktiven Arrays auf, während der Wert zur Mitte des Arrays hin geringer wird. Auch die Rand-Elektroden der inaktiven Arrays zeigen einen erhöhten Wert des Gradienten. Die linke Abbildung zeigt die Verteilung des elektrischen Feldes $|E|$ in $\frac{\text{V}}{\text{m}}$, die rechte die Verteilung des Gradienten $\nabla|E^2|$ in $\frac{\text{V}^2}{\text{m}^3}$. Die Auflösung beträgt für diese Simulation $(100 \text{ nm})^3$.

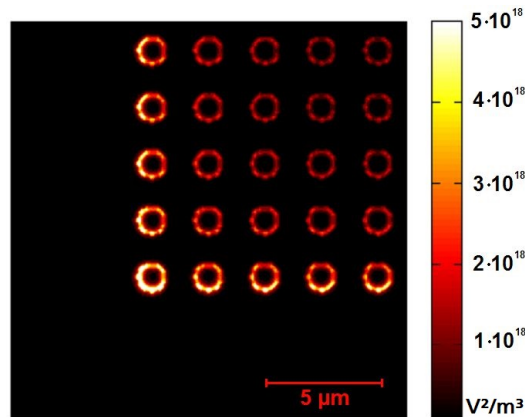


Abbildung 8.11.: Ausschnitt der Ecke eines Arrays mit zylinderförmigen Elektroden. Es wurde mit 1 V an den Elektroden simuliert und einem Abstand zum ITO von $99 \mu\text{m}$. Wie in [70] gezeigt, ist eine dielektrophoretische Belegung entsprechend der räumlichen Verteilung des Gradienten $\nabla|E^2|$ auch im Experiment nachweisbar.

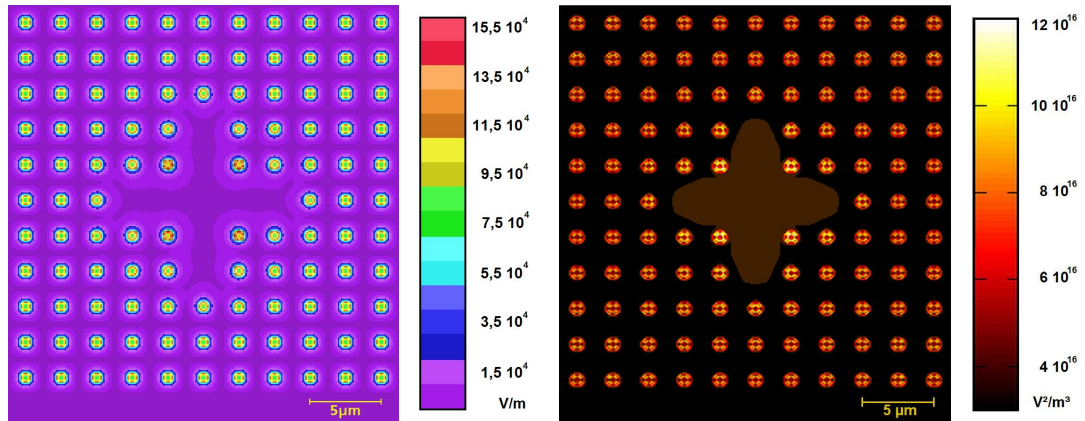


Abbildung 8.12.: Elektroden-Array mit Orientierungskreuz. Gezeigt ist die Verteilung des elektrischen Feldes $|E|$ in $\frac{V}{m}$ (links) und des Gradienten $\nabla|E^2|$ in $\frac{V^2}{m^3}$ (rechts). Simuliert wurde bei 1 V Potentialdifferenz und einem Abstand zum ITO-Deckglas von $99 \mu\text{m}$. Die Auflösung beträgt $(100 \text{ nm})^3$. Ein besonders großer Wert ist an den Ecken des Kreuzes zu beobachten.

8.3.2. Orientierungskreuz

Für die Messungen werden Zylinder-Elektroden-Arrays mit Orientierungskreuzen verwendet. Hierbei bleiben neun Elektrodenpositionen bei der Herstellung frei. Die räumliche Verteilung der auftretenden Feldstärken $|E|$ bzw. Gradienten $\nabla|E^2|$ um ein Orientierungskreuz wurde simuliert (vgl. Abbildung 8.12).

Die höchsten Werte findet man hier an den Ecken des Kreuzes, wo demnach die stärkste dielektrophoretische Immobilisierung zu erwarten ist. Im Zwischenraum des Kreuzes liegt der Wert zudem höher als außerhalb des Arrays.

8.3.3. Kegel-Array

Auch Simulationen von Kegel-Elektroden-Arrays wurden durchgeführt. Diese Elektroden haben einen Spitzen-Durchmesser von 50 nm . Die Elektroden sind im Vergleich zum Zylinder-Array um 45° gekippt angeordnet und haben einen geringeren Abstand zueinander. Da die Elektroden sich gegenseitig beeinflussen, sind die Werte also nicht vollständig vergleichbar. Betrachtet man die Maximalwerte des Gradienten je Elektrode, so stellt man fest, dass diese bei dem Kegel-Array etwa um einen Faktor 3 größer sind als bei einem Zylinder-Array. Auch hier nimmt der Gradient zur Mitte des Arrays hin ab. In Abbildung 8.13 ist der Verlauf der elektrischen Feldstärke $|E|$ in $\frac{V}{m}$ und der Verlauf des Gradienten $\nabla|E^2|$ in $\frac{V^2}{m^3}$ einer Array-Ecke zu sehen. Gerechnet wurde mit einer Spannung von 1 V und einem Abstand zum ITO von $99 \mu\text{m}$ bei einer Auflösung von $(100 \text{ nm})^3$.

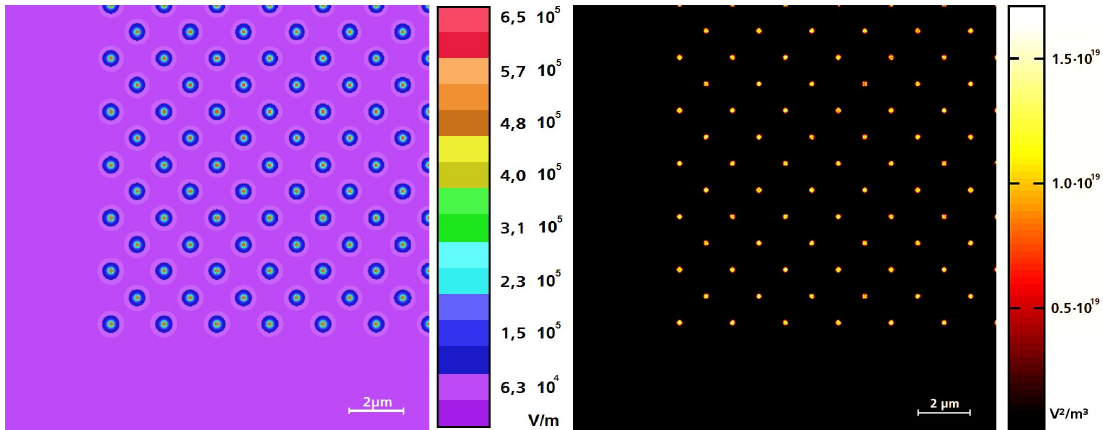


Abbildung 8.13.: Gezeigt ist die Ecke eines Kegel-Arrays. Links ist die elektrische Feldstärke $|E|$ in $\frac{V}{m}$ und rechts der Gradient $\nabla|E^2|$ in $\frac{V^2}{m^3}$ aufgetragen. 1 V Potentialdifferenz und ein Abstand zum ITO von $99 \mu m$ wurde angenommen. Wie bei Zylinder-Arrays auch, tritt eine Abnahme des Gradienten zur Mitte des Arrays hin auf. Die Unterschiede der Werte von Elektroden am Arrayrand und solchen, die weiter in der Arraymitte liegen, sind allerdings weniger deutlich.

8.4. Schlussfolgerungen

Für eine maximale Dielektrophoresekraft sollte $\nabla|E^2|$ nach Gleichung 4.6 einen großen Wert annehmen. Hierbei hat die Gestalt der einzelnen Elektroden und deren räumliche Anordnung eine Auswirkung. Der maximale Feldgradient und dessen räumlicher Verlauf ist stark von der Elektrodenform und deren Spitzendurchmesser abhängig. Die höchsten Maximalwerte erhält man an den spitzesten Elektroden, also solchen mit einem geringen Spitzendurchmesser. Der Ort des maximalen Feldgradienten liegt bei einem idealen Kegel an dessen Spitze, bei der zylinder- oder kegelstumpfförmigen Elektrode ergibt sich ein Ring gleicher Stärke an der Kante. Es wirkt also eine Kraft zur Elektrodenkante hin.

Eine in SiO_2 eingebettete Elektrode ergibt in den Simulationen große Werte für $\nabla|E^2|_{max}$. Eine solche Elektrode ist einer freistehenden daher vorzuziehen. Ebenso ist eine abschließende Elektrode zu bevorzugen. Betrachtet man eine regelmäßige Anordnung von vertikalen Elektroden in einem Array, so stellt man fest, dass die maximalen Werte des Feldgradienten an den Randelektroden auftreten und zur Arraymitte hin schwächer werden. Die Dielektrophoresekraft ist dort am stärksten, was zu einer bevorzugten Belegung führen sollte.

Befindet sich ein Bead in der Nähe einer Elektroden spitze, so wird deren Feld in der Weise verändert, dass es am Rand der Elektrode verstärkt wird. Diese Position ist in diesem Fall aber bereits belegt, wodurch das Feld effektiv für folgende Beads abgeschwächt wird. Ist eine Elektrode belegt, sollte zunächst eine andere unbesetzte Elektrode in der Nähe belegt werden.

9. Nano-Dielektrophorese

9.1. Dielektrophorese an Nano-Sphären

Mikro- und Nano-Sphären (Beads) wurden für Dielektrophorese-Experimente als Modellsystem verwendet. Ihre kugelige Gestalt entspricht den Annahmen der DEP-Theorie (vgl. Kapitel 4.2).

9.1.1. Dielektrophorese an einem Silizium-Splitter

Zu Beginn der Arbeit war bereits bekannt, dass Wolfram-Elektroden geeignet sind für Dielektrophorese-Experimente. Ob jedoch hochdotiertes Silizium, aus dem die Kegel-Elektroden bestehen, ebenfalls DEP-fähig ist, sollte erst festgestellt werden.

Zur Überprüfung wurde ein Splitter von einem Elektroden-Chip entnommen und mit Hilfe von Silberleitlack auf einem Objektträger fixiert. Ebenfalls aus Silberleitlack wurde eine Gegenelektrode auf den Objektträger gestrichen.

Zwischen dem Si-Splitter und der Silber-Gegenelektrode wurde ein Feld mit $4,5 V_{eff}$ und $10 kHz$ angelegt. Als Probe wurden fluoreszierende Beads mit einem Durchmesser von $50 nm$ (*Typ: T8864*) verwendet. Nach wenigen Minuten konnte eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenz an den Spitzen des Splitters festgestellt werden, was auf eine Ansammlung von Beads durch positive Dielektrophorese zurückzuführen ist. In Abbildung 9.1 ist die Fluoreszenzzunahme nach 5 Minuten dargestellt. Hiermit ließ sich nachweisen, dass das hochdotierte Silizium für Dielektrophorese geeignet ist.

9.1.2. Strömungen über dem Elektroden-Array

Die ersten Chargen der Kegel-Elektroden wiesen einen Fehler auf: Das Silizium der Kegelspitzen war wegen eines p-n-Übergangs durch eine Sperrschicht von dem Untergrund und der Bodenkontaktierung getrennt. Das Elektroden-Array verhält sich hier wie eine große Elektrode. Es ließ sich zwar keine Dielektrophorese an den Elektrodenspitzen, aber Strömungen und die Sammlung von Beads an den Arrayrändern beobachten (vgl. Abb. 9.2). Diese Sammlung ist bei niedrigeren Frequenzen stärker als bei höheren.

Weiterhin lassen sich Walzen über den Arrayrändern beobachten. Diese verhalten sich, wie nach Kapitel 4.3 zu erwarten ist. Über dem Array steigt die Flüssigkeit mit Beads auf, bewegt sich entlang des ITO-Deckglases, fällt am äußeren Rand wieder herunter und bewegt sich auf der Chipoberfläche wieder Richtung Array. Bei höheren angelegten Spannungen treten hierbei stärkere Strömungen auf, ebenso bei niedrigeren Frequenzen.

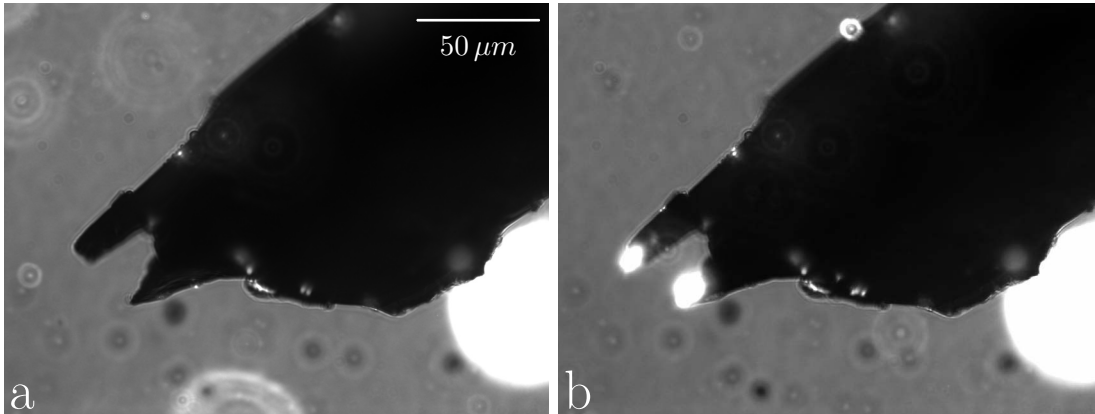


Abbildung 9.1.: Ein Silizium-Splitter wurde als Elektrode für ein Dielektrophoreseexperiment verwendet. Bild a zeigt den Silizium-Splitter vor Anlegen des Feldes. Als Probe wurden fluoreszierende Beads mit einem Durchmesser von 50 nm verwendet. Nach 5 Minuten erkennt man eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz an den Spitzen des Si-Splitters (b), aufgrund der Ansammlung der Beads durch pDEP. Zur Beobachtung wurde hier ein 40x-Luft-Objektiv verwendet. (Feld: $4,5 V_{eff}$; 10 kHz)

Nachdem das Problem des p-n-Übergangs einmal erkannt war, wurden vom IHP Elektroden mit verbesserten Designs hergestellt. Neben der Beseitigung des p-n-Übergangs wurden auch andere Aspekte optimiert. So wurden verschiedene Spitzenbeschichtungen und -durchmesser, Elektrodenanordnungen und Gegenelektroden für weitere Untersuchungen bereitgestellt.

9.1.3. Unterschiedliche Spitzenbeschichtungen

Es wurden 10 nm Kegel-Elektroden mit unterschiedlichen Spitzenbeschichtungen untersucht und verglichen (vgl. Abb. 9.3). Hierfür wurden 20 nm Beads (Typ: F8786) dielektrophoretisch bei einem Feld mit $4,5 V_{eff}$ und 5 kHz über 5 Minuten immobilisiert.

Bei diesen Feldeinstellungen zeigt sich, dass die CoSi-beschichteten Elektroden am gleichmäßigsten belegt werden. Die mit AlSi beschichteten Elektroden werden mit besonders vielen Objekten belegt. Diese beiden Elektrodentypen wurden daher für spätere Experimente vorwiegend verwendet.

Hierbei handelt es sich allerdings um eine rein qualitative Aussage, da nicht alle Details der Herstellungsprozesse bekannt sind. Es ist aber zu vermuten, dass die Unterschiede im dielektrophoretischen Verhalten weniger in der kristallinen Struktur der Silicide zu finden sind als viel mehr in Unterschieden bei der Anfertigung.

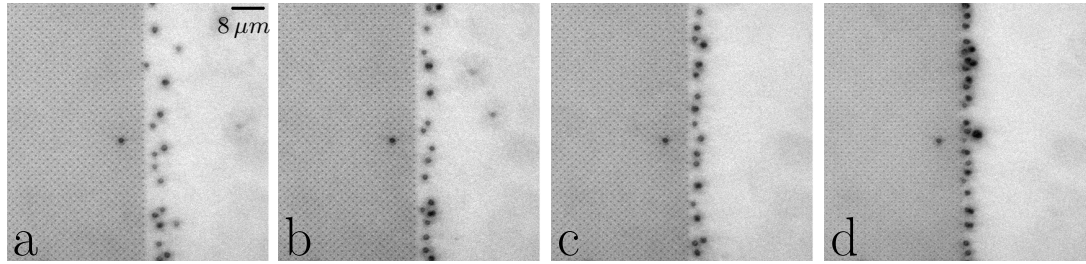


Abbildung 9.2.: Verhalten von $1\ \mu\text{m}$ Beads bei unterschiedlichen Frequenzen: An ein Kegel-Elektroden-Array mit p-n-Übergang wurden bei einer Spannung von $7V_{eff}$ verschiedene Frequenzen angelegt. Durch den p-n-Übergang zwischen Bodenelektrode und Kegelspitzen trat keine DEP an den Kegel-Elektroden auf. Es konnten aber Strömungen und das Verhalten von Beads bei hohen Frequenzen beobachtet werden. (a: 1 MHz; b: 750 kHz; c: 500 kHz; d: 250 kHz)

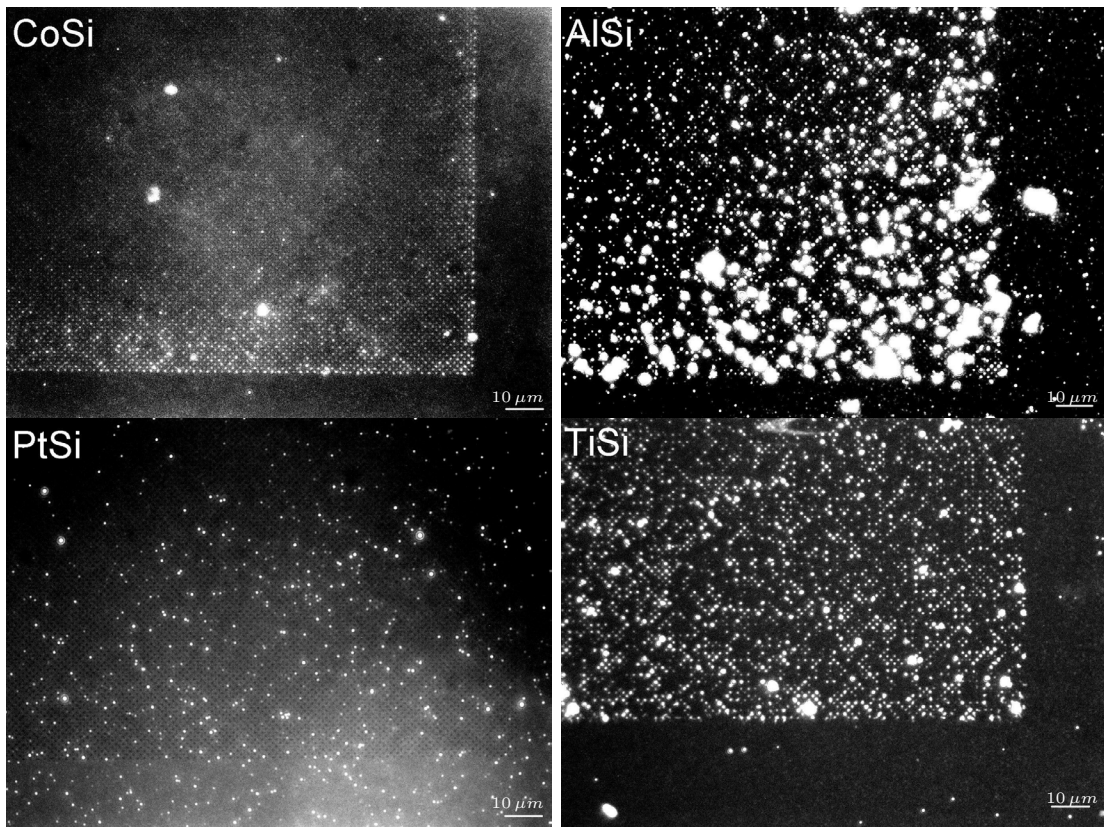


Abbildung 9.3.: Es wurden $20\ \text{nm}$ Beads auf unterschiedlich beschichteten Elektroden bei einem Feld mit $4,5V_{eff}$ und $5\ \text{kHz}$ über 5 Minuten immobilisiert. Die stärkste Belegung zeigen die Elektroden mit AlSi-Beschichtung, die gleichmäßigste die mit CoSi-Beschichtung.

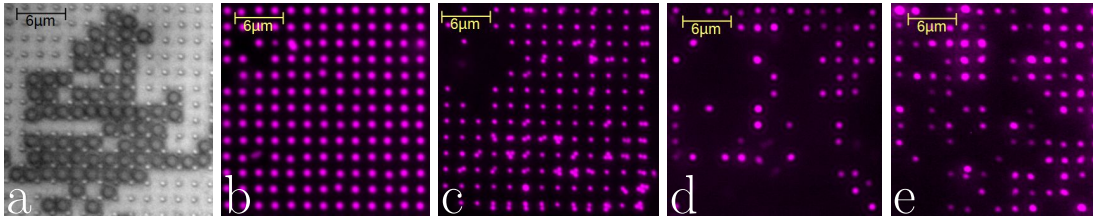


Abbildung 9.4.: Beads verschiedener Größe wurden bei 15 kHz auf 500 nm-W-Zylinder-Elektroden immobilisiert: a) $2\ \mu\text{m}$ - temporär ($2,5 V_{eff}$); b) $1\ \mu\text{m}$ - temporär ($3,3 V_{eff}$); c) $500\ \text{nm}$ - temporär ($3,3 V_{eff}$); d) $200\ \text{nm}$ - temporär ($1,7 V_{eff}$); e) $100\ \text{nm}$ - permanent ($4,6 V_{eff}$)

9.1.4. Bestimmung der Beadanzahl und deren Vereinzeln

Für die optimale Sammlung von Polystyrolbeads auf den Elektroden über pDEP sind bestimmte Voraussetzungen günstig.

Bezogen auf die Dielektrophoresekraft F_{DEP} wird diese maximal für große Partikel, hohe Feldgradienten und eine Frequenz, die dem Material von Medium und Partikel angepasst ist. Im Fall von Polystyrolbeads hat sich **15 kHz** als günstige Frequenz herausgestellt.

Hohe Feldgradienten werden durch die Höhe der angelegten Spannung und vor allem durch die Form der Elektroden hervorgerufen. Hier gilt, je schärfer die Elektrode, desto höher der Feldgradient. Die spitzen Zylinder- und Kegel-Elektroden lassen so also zu, die Dielektrophoresekraft (F_{DEP}) zu maximieren.

Die Durchmesser der Probenpartikel hingegen sind in den hier gezeigten Experimenten mit $50\ \text{nm}$ bis $2\ \mu\text{m}$ relativ klein. Es zeigt sich, dass bei fester Frequenz für die Immobilisierung von $2\ \mu\text{m}$ Beads niedrigere Spannungen nötig sind als für die kleineren Beads, was der Gleichung für F_{DEP} (Glg. 4.6) entspricht.

Hierbei tritt ein weiterer Unterschied auf: Die größeren Beads ($2\ \mu\text{m}$ - $500\ \text{nm}$) werden eher temporär festgehalten, solange das Feld eingeschaltet ist, und lösen sich von den Elektroden, wenn es abgeschaltet wird, während kleinere Beads (100 - $50\ \text{nm}$) eher permanent an den Elektroden haften bleiben. Zum Teil ist es möglich, temporär gefangene Beads durch sprungartiges Erhöhen der Spannung permanent zu immobilisieren (so zum Beispiel $200\ \text{nm}$ Beads). Hier überwiegen die van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der nanorauen Elektrodenoberfläche. Die Beads erfahren durch die plötzliche Spannungserhöhung eine plötzlich höhere Dielektrophoresekraft, so dass sie sehr nah an die Elektroden gezogen werden, bevor sie durch Strömungen weggerissen werden können.

Von temporär gefangenen Beads konnten fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen erstellt werden (vgl. Abb. 9.4). Nach der permanenten Immobilisierung von Beads war es sogar möglich, die Chips vorsichtig zu spülen, wodurch Fluoreszenzaufnahmen einen besseren Kontrast zeigten, da nicht haftende Beads entfernt wurden. Zudem konnten die Chips später mit dem REM untersucht und so die Anzahl der auf den Elektroden befindlichen Beads direkt gezählt werden (vgl. Abb. 9.5 und 9.9).

Nach Einschalten des Feldes geschieht die Belegung des Arrays mit Beads zunächst am Arrayrand, wo der Feldgradient bezogen auf das gesamte Array am größten ist (vgl. Kapitel 8.3.1). Dort werden bei größeren Beads ($2\ \mu\text{m}$, $1\ \mu\text{m}$ auf 500 nm-Zylinder-Elektroden; 200 nm, 100 nm auf 50 nm-Kegel-Elektroden) die Rand-Elektroden als erstes belegt, so dass die nachfolgenden Beads auf diesen keinen Platz mehr finden und Elektroden weiter in der Arraymitte belegen (vgl. Abb. 9.10). Bei kleineren Beads ist für mehr als ein Bead Platz auf einer Elektrode. Hier werden bereits weiter innen liegende Elektroden belegt, während die äußeren zum Teil noch nicht vollständig gefüllt sind (vgl. Abb. 9.7). Die Randelektroden sind hier mit mehr Beads belegt als weiter innen liegende Elektroden. Es kommt durch AC-EOF und Rayleigh-Instabilitäten zu Strömungen in Richtung Arraymitte [105, 43] und Walzenbildung über den Rändern [116]. Zudem richten sich Pärchen entlang der Feldlinien aus, was nach der Theorie der Kettenbildung zu erwarten war. Gleichzeitig werden die Elektroden mit den Beads belegt.

Bei $2\ \mu\text{m}$ -Beads auf W-Zylindern beobachtet man zudem, dass Beads zur Arraymitte geschoben werden. So bilden sich teilweise Ketten, die sich gemeinsam bewegen (vgl. Abb. 9.19). Bei kleineren temporär gefangenen Beads kommt es stattdessen teilweise zu einem Springen von einer Elektrode zur nächsten (vgl. Abb. 9.8), wenn die Strömungen stärker als die Dielektrophoresekraft sind. *Springen* meint hier, dass man die Bewegung der Beads von Elektrode zu Elektrode verfolgen kann, die Beads sich aber nicht auf besagten Elektroden immobilisieren lassen. Dies tritt bei höheren Spannungen auf, so dass ein Kompromiss zwischen stärkerer Dielektrophoresekraft und stärkerer Strömung bei hohen Spannungen gefunden werden muss, will man Beads auf den Elektroden festhalten.

Bei Verwendung der Zylinder-Elektroden zeigt sich, dass Beads, deren Durchmesser der Größe der Zwischenräume zwischen den Elektroden entspricht, nicht auf den Elektroden, sondern dazwischen gefangen werden (vgl. Abb. 9.4a). Kleinere Beads werden auf den Elektroden immobilisiert. Hier zeigt sich zunächst, dass $1\ \mu\text{m}$ und 500 nm Beads zentriert auf den Elektroden festgehalten werden (vgl. Abb. 9.4b,c), während bei kleineren 200 nm oder 100 nm Beads (vgl. Abb. 9.5) gegenseitige Dielektrophorese eine Rolle spielt. Statt einer Immobilisierung vorwiegend am Rand der Elektroden geschieht diese mehr zur Elektrodenmitte hin. Auch Nanorauigkeiten der Elektrodenoberfläche, durch die lokal ein erhöhter Gradient entsteht, könnten das Feld und die Verteilung hin zu einer statistischen Verteilung der Beads auf der Elektrodenoberfläche beeinflussen. Zudem entstehen durch Mikro-AC-EOF vermutlich Strömungen oberhalb der Elektroden, die eine Kraft auf die Beads in Richtung Elektrodenmitte ausüben.

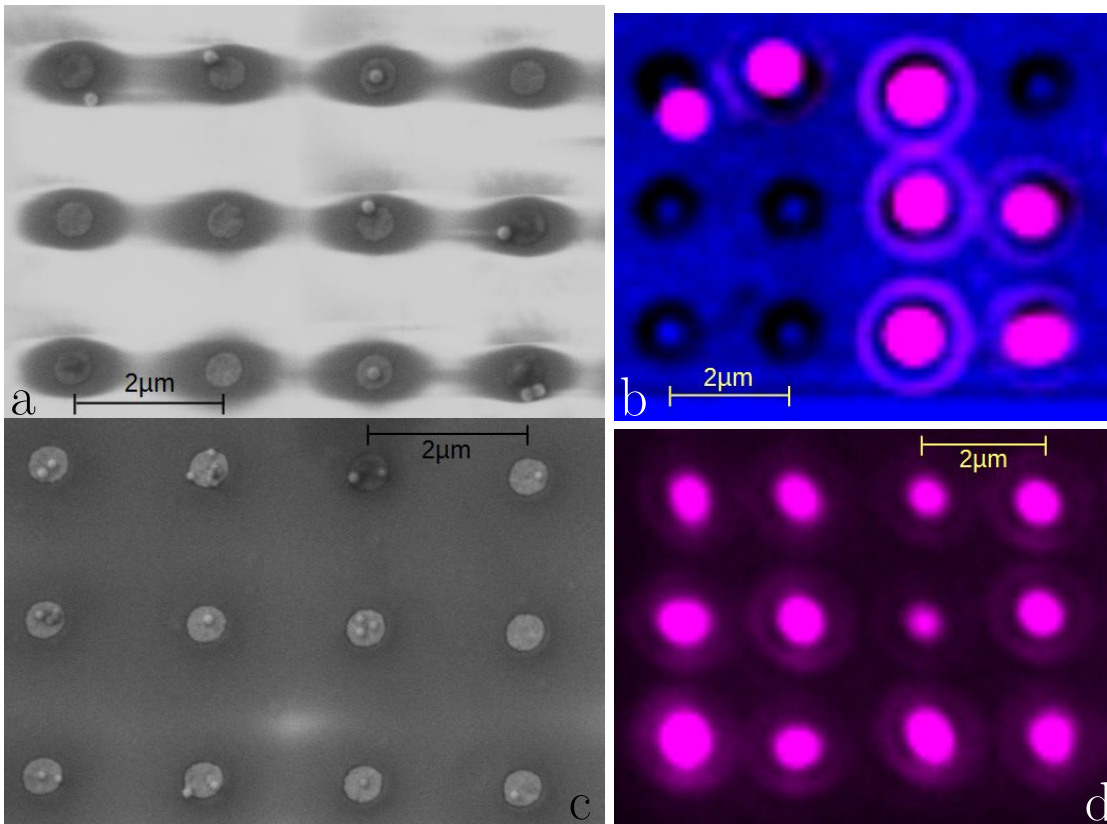
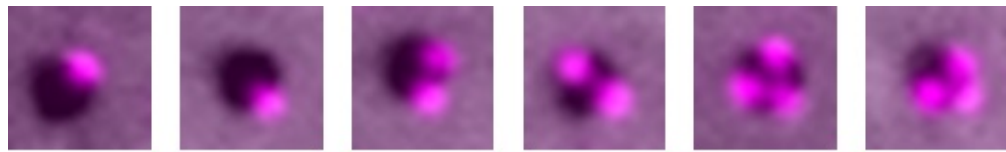


Abbildung 9.5.: Kolokalisation von Fluoreszenz und REM: 200 nm und 100 nm Beads konnten bei 15 kHz permanent auf W-Zylinder-Elektroden immobilisiert werden. Es war durch geringe Probenströme, kleine Beschleunigungsspannungen und sehr geringe Arbeitsabstände (WD) möglich, ohne die Elektroden-Chips zusätzlich zu bearbeiten, REM-Aufnahmen der haftenden Beads zu erstellen. Oben: 200 nm Beads; 1-4 Beads je Elektrode: Zunächst wurden bei $3,8 V_{eff}$ die Beads temporär gesammelt, dann durch sprungartige Spannungserhöhung auf $13,7 V_{eff}$ permanent immobilisiert. a) REM-Aufnahme (2 kV ; 3 pA ; $WD = 5,5\text{ mm}$); b) Fluoreszenzaufnahme derselben Region überlagert mit Auflicht; Unten: 100 nm Beads; 1-7 Beads je Elektrode: Eine Spannung von $4,6 V_{eff}$ wurde für 5 Minuten angelegt. c) REM-Aufnahme (2 kV ; 4 pA ; $WD = 5,5\text{ mm}$); d) Fluoreszenzaufnahme derselben Region



500 nm

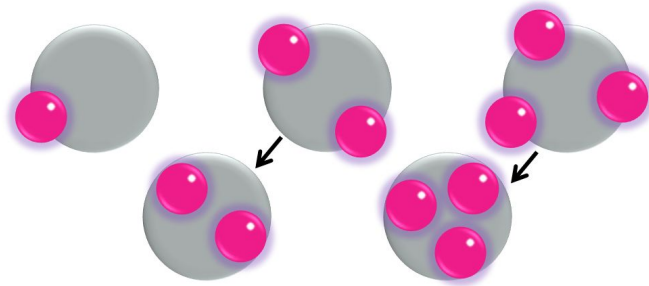


Abbildung 9.6.: Schematische Darstellung der Belegung der Elektroden mit Beads abhängig vom Verhältnis des Beaddurchmessers zum Spitzendurchmesser im Vergleich mit tatsächlich immobilisierten Beads: 200 nm Beads auf 500 nm Zylinder-Elektroden (2:5). Oben: Fluoreszenzaufnahme überlagert mit Aufsicht; unten: Belegungsschema. Die Beads werden eher am Elektrodenrand als in der Elektrodenmitte immobilisiert. Auffällig ist, dass der Schwerpunkt des Beads bei einem immobilisierten Bead direkt über dem Elektrodenrand liegt. Bei mehreren Beads verschiebt er sich Richtung Elektrodenmitte. Hier wirkt neben der Kraft durch den höchsten Gradienten am Rand der Elektrode auch die Anziehung der Partikel untereinander durch gegenseitige Dielektrophorese.

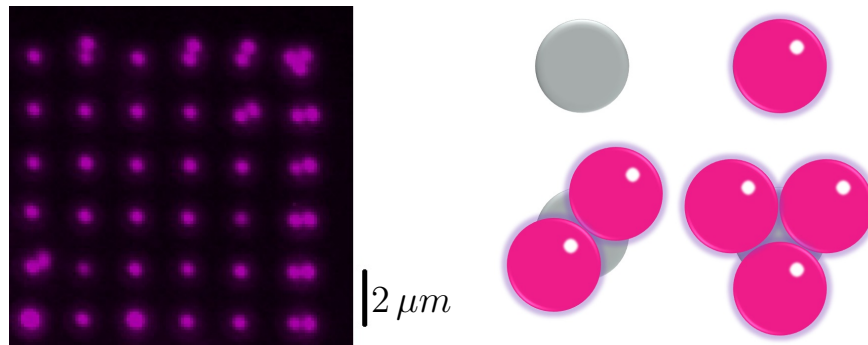


Abbildung 9.7.: Schematische Darstellung der Belegung bei 500 nm Beads auf 500 nm Zylinder-Elektroden (1:1). Die immobilisierten Beads berühren sich. Pärchen richten sich nach den Feldlinien aus. Elektroden, die mit drei Beads belegt sind, halten diese nicht fest in einer Position, sondern es kommt zu einer Rotation des Bead-Tripels auf der Elektrode.

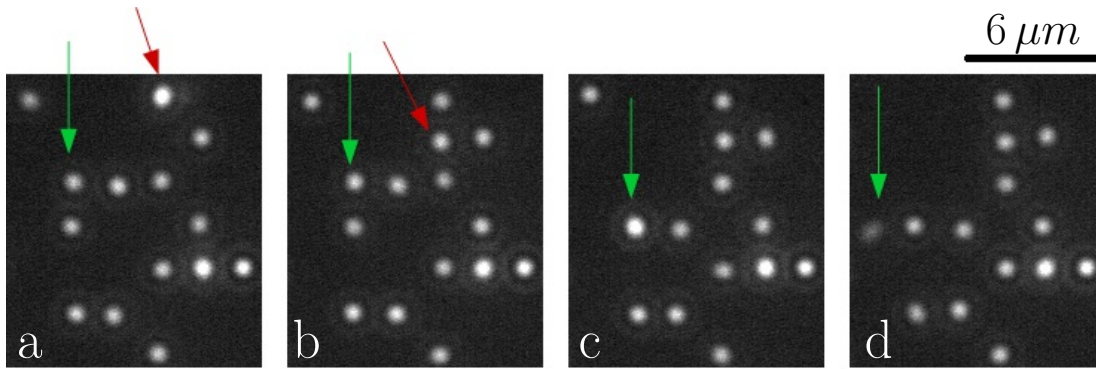


Abbildung 9.8.: 200 nm Beads wurden bei $1,7 V_{eff}$ und 15 kHz temporär auf 500 nm-W-Zylinder-Elektroden immobilisiert: Durch diese Einstellungen wurde eine Dielektrophoresekraft erzeugt, die ungefähr im Gleichgewicht mit den Strömungseffekten war. Einmal festgehaltene Beads verweilten kurz auf den Elektroden, um dann von Strömungen weggerissen und auf freien Elektroden in Strömungsrichtung wieder gefangen zu werden. Der rote Pfeil zeigt z.B. ein Bead, das zunächst auf derselben Elektrode immobilisiert war wie ein anderes, dann aber durch die Strömung zu einer freien benachbarten Elektrode gezogen und dort durch DEP immobilisiert wurde. Der grüne Pfeil zeigt den umgekehrten Fall, bei dem ein Bead zunächst einzeln auf einer Elektrode festgehalten und dann auf eine andere belegte Elektrode gezogen wurde. Schließlich löste es sich wieder von der Elektrode und wurde durch die Strömung weiter bewegt.

Je nach Beadgröße im Verhältnis zum Spitzendurchmesser der Elektroden werden diese mit einer unterschiedlichen Anzahl an Beads belegt.

Eine Vereinzelung von Beads wurde bei einer Verdünnung, die zu $10^5 \frac{\text{Beads}}{\mu\text{L}}$ führt, ab einem Größenverhältnis von 1:2 (Spitzendurchmesser: Beaddurchmesser) festgestellt. Der Nachweis der Anzahl der auf den Elektroden immobilisierten Beads geschah hier auf drei Wegen (direkte Beobachtung, Histogramm oder REM).

Bis herab zu einer Größe von 500 nm lassen sich die einzelnen Beads noch mühelos mit dem Fluoreszenz-Mikroskop unterscheiden (Abb. 9.4c und 9.7). Zudem lassen sich aus den Fluoreszenzaufnahmen der belegten Arrays Helligkeitsverteilungen der Fluoreszenzintensität mit guter Statistik ableiten. Diese geben Aufschluss über die Anzahl der jeweils auf den Elektroden immobilisierten Beads. Hierfür wurden Ausschnitte eines belegten Arrays gewählt. Um die Elektrodenpositionen wurden gleich große Flächen gelegt und dort nach einer Hintergrundkorrektur die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt. Aus den so gewonnenen Fluoreszenzintensitäten je Elektrodenposition konnten Histogramme mit kleiner Intervallbreite bestimmt werden (vgl. Abb. 9.11 und 9.12).

Es zeigt sich, dass in den so entstehenden Histogrammen einzeln abgegrenzte Peaks gleicher Anzahl von Beads je Elektrode sichtbar werden. Die einzeln gaußverteilten Helligkeiten der Beads addieren sich nach dem Faltungssatz, d.h. es entsteht wieder eine

Gaußverteilung mit addierter Peakposition und -breite. Dies sollte zu gleichmäßigen Abständen der einzelnen Peaks bei größer werdender Breite führen.

Die entstandenen Peaks konnten mit *Origin* einer Gaußanpassung unterzogen werden, wodurch die Position des Maximums (incl. Fit-Fehler), die Breite der Peaks und die Fläche unter den Peaks bestimmt werden konnten. Aus der Fläche der einzelnen Peaks lässt sich die prozentuale Besetzung eines Arrays mit einer bestimmten Anzahl an Beads je Elektrode berechnen. Die Breite der Peaks gibt Aufschluss darüber, ob bei mehreren Beads je Elektrode die Beads unabhängig voneinander nebeneinander angeordnet sind oder ob sie sich überdecken und abschatten.

Aus den hier gezeigten Histogrammen (Abb. 9.11 und 9.12) können so Aussagen über die Belegung der Elektroden mit einer bestimmten Beadanzahl getroffen werden. Hier führte die Immobilisierung von $1\ \mu\text{m}$ Beads dazu, dass 8% der Elektroden mit keinem Bead, und 92% der Elektroden mit genau einem Bead belegt waren (Abb. 9.11a). Die Verteilung der 500 nm Beads (0 Beads: 8%; 1 Bead: 62%; 2 Beads: 24%; 3 Beads: 1%) konnte zudem durch direktes Abzählen aus der Fluoreszenzaufnahme verifiziert werden (Abb. 9.4c und 9.11b).

Auch das Histogramm der Verteilung der 200 nm Beads zeigt deutlich einzelne Peaks (0 Beads: 45%; 1 Bead: 26%; 2 Beads: 19%; 3 Beads: 10%) (Abb. 9.11c). Hier wurde allerdings eine Messung ausgewertet, bei der mit $1,7 V_{eff}$ eine relativ geringe Spannung angelegt war. Bei so geringen Spannungen überwiegen zum Teil Strömungen durch AC-EOF oder Brownsche Bewegung, so dass es zu einem Springen von Beads von einer Elektrode auf die nächste kommt.

Die Anzahl der festgehaltenen 100 nm Beads hingegen lässt sich mit der Histogramm-Methode nicht mehr eindeutig bestimmen (vgl. Abb. 9.11 d), da sich einzelne Peaks überlappen. Hier können allerdings REM-Messungen Aufschluss geben (Abb. 9.5 unten). Diese REM-Messungen konnten ohne weitere Probenpräparation durchgeführt werden, mussten allerdings bei geringen Arbeitsabständen, Probenströmen und Beschleunigungsspannungen erstellt werden. Sie zeigen, dass die Elektroden mit bis zu 7 Beads belegt werden. Ein Nachweis über die Histogramm-Methode kann also nur bei einer geringen Anzahl immobilisierter Beads (bis 4) erfolgen, dort allerdings ist er durch relativ klar abgegrenzte Peaks eindeutig.

Auch an den 50 nm Kegel-Elektroden konnten Beads immobilisiert werden. Es konnte positive DEP auf dem Array in einem Spannungsbereich von $6,4 - 13,7 V_{eff}$ und einem Frequenzbereich von 15 - 50 kHz beobachtet werden. Hier ergibt sich für 200 nm Beads auf 50 nm Kegel-Elektroden eine temporäre Belegung mit 0 Beads zu 20% und 1 Bead zu 80% (Abb. 9.12 oben). Betrachtet man die Belegung über die Zeit (Abb. 9.10), so stellt man zunächst vom Rand ausgehend einen linearen Anstieg der Belegung des Arrays fest, der später in eine Sättigung bei 80% übergeht.

100 nm Beads konnten ebenfalls dielektrophoretisch festgehalten werden und ergaben eine Verteilung von 0 Beads zu 2%; 1 Bead zu 73% und 2 Beads zu 25% (Abb. 9.12 unten). Diese Beads wurden permanent immobilisiert, wodurch über REM-Aufnahmen die Belegung mit überwiegend einem oder zwei Beads bestätigt werden konnte (Abb. 9.9 oben).

Bei 17 kHz konnten zudem 50 nm Beads auf 50 nm und 10 nm Kegel-Elektroden gefan-

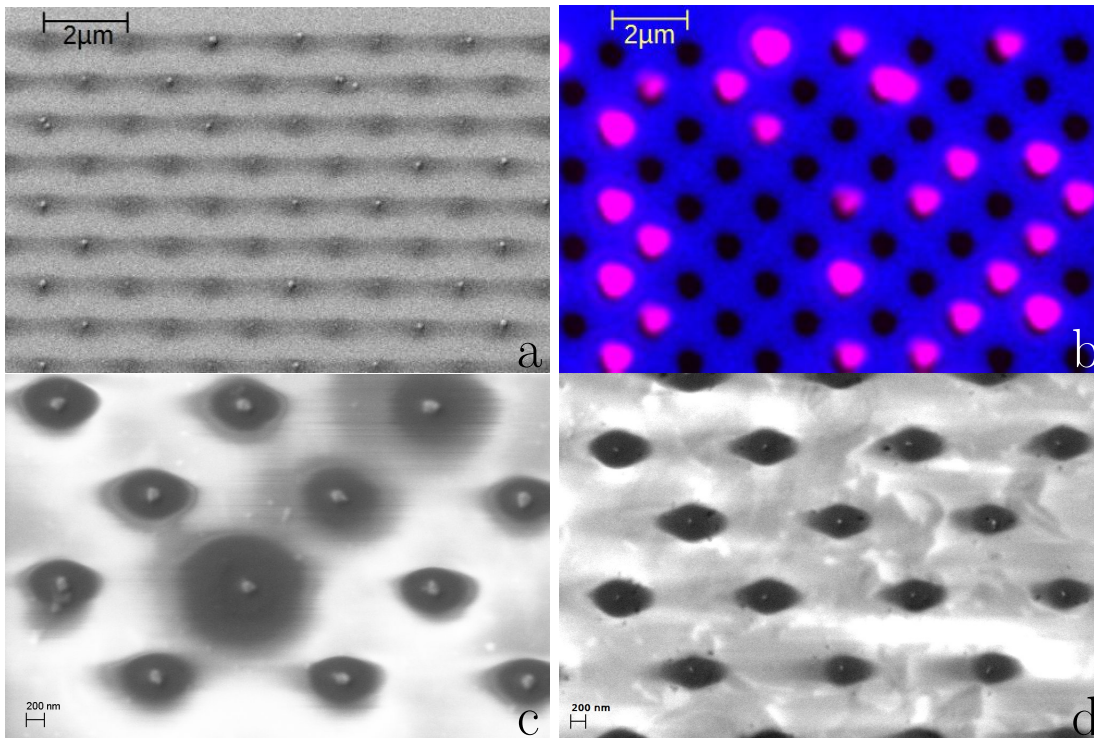


Abbildung 9.9.: Beads wurden auf Si-Kegel-Elektroden permanent immobilisiert und REM-Aufnahmen erstellt. Oben: 100 nm Beads auf 50 nm Elektroden ($6,5 V_{eff}$; 15 kHz; 2 Min): 1-2 Beads je Elektrode, a) REM-Aufnahme, b) Fluoreszenz- mit Auflichtaufnahme überlagert; Unten: 50 nm Beads: c) auf 50 nm Elektrode ($10,3 V_{eff}$; 17 kHz; 25 Min): etwa 1-4 Beads je Elektrode - hier wird die Auflösungsgrenze des REMs erreicht, so dass eine Unterscheidung nur noch schwer möglich ist; d) auf 10 nm Elektrode ($10,3 V_{eff}$; 17 kHz; 5 Min): 1 Bead je Elektrode

gen werden. Bei Beads dieser Größe stößt man an die Auflösungsgrenze des verwendeten REMs, so dass zwar die Belegung nachweisbar ist, aber die Anzahl der Objekte und deren Position auf der Elektrode nur grob bestimmt werden können. Aus den Aufnahmen kann man schließen, dass etwa 1-4 Beads je 50 nm Kegel-Elektrode und 1 Bead je 10 nm-Kegel-Elektrode immobilisiert wurden (Abb. 9.9 unten).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Immobilisierung und Vereinzelung von Beads sowohl bei Zylinder- als auch bei Kegel-Elektroden mit unterschiedlichen Spitzendurchmessern möglich war, sofern ein Größenverhältnis von mindestens 2:1 (Beaddurchmesser : Spitzendurchmesser) vorlag. Hierbei kam es je nach Elektrodentyp bei großen Beads zu temporärer und bei kleinen Beads zu permanenter Immobilisierung (vgl. Tabelle 9.1).

Tabelle 9.1.: Anzahl der Beads je Elektrode

Elektrode/ Beads	W-Zylinder (500 nm)	Si-Kegel (50 nm)	Si-Kegel (10 nm)
$2 \mu m$	1 temporär ($2,5 V_{eff}$) im Zwischenraum		
$1 \mu m$	1 temporär ($3,3 V_{eff}$) zentriert		
$500 nm$	1-4 temporär ($3,3 V_{eff}$) zentriert oder am Rand		
$200 nm$	1-4 temporär ($1,7 V_{eff}$) permanent ($3,8 - 13,7 V_{eff}$) zentriert oder am Rand	1 temporär ($6,5 V_{eff}$) zentriert	
$100 nm$	1-7 permanent ($4,6 V_{eff}$) statistisch	1-2 permanent ($6,5 V_{eff}$) zentriert	
$50 nm$		$\approx 1 - 4$ permanent ($10,3 V_{eff}$) zentriert	1 permanent ($10,3 V_{eff}$) zentriert

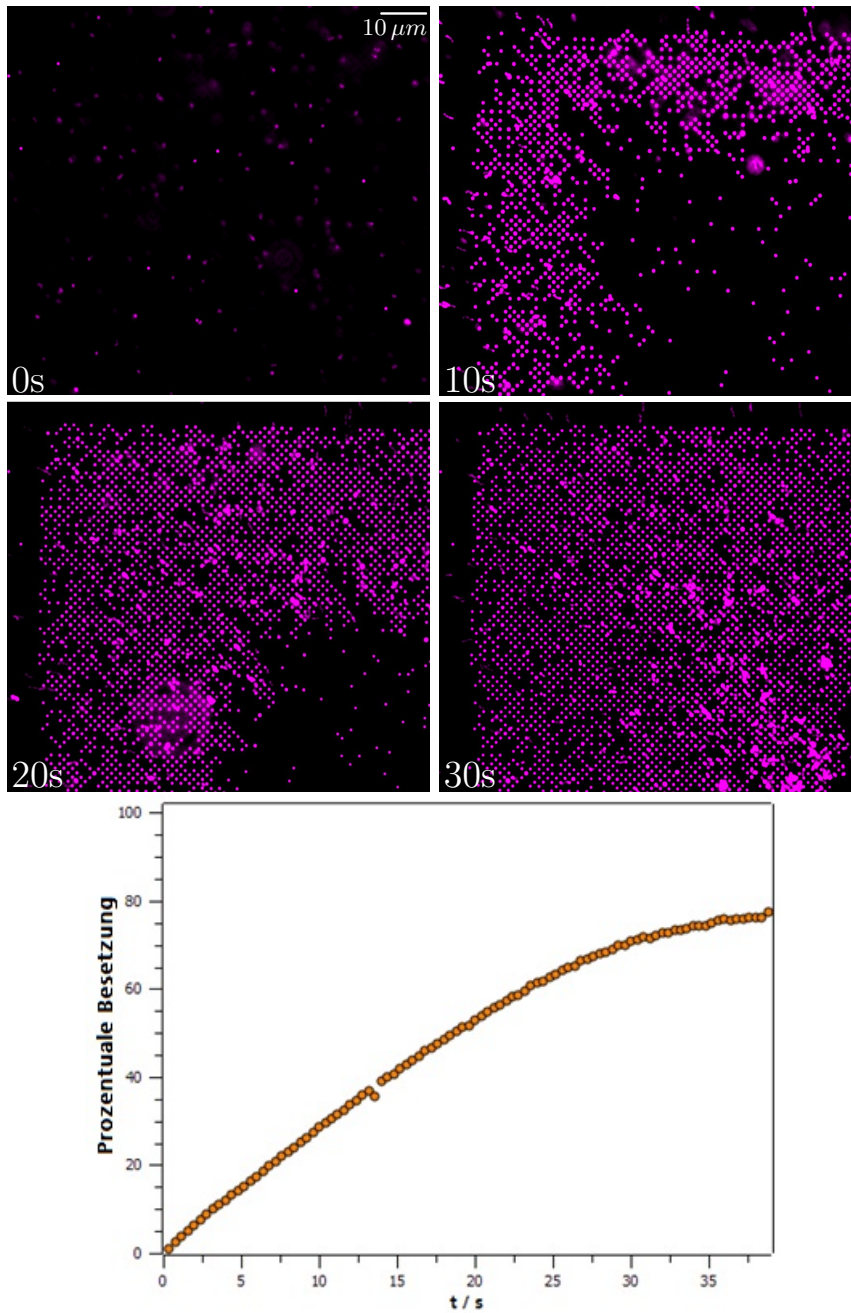


Abbildung 9.10.: Immobilisierung von 200 nm Beads auf 50 nm Kegel-Elektroden bei $9,5 V_{eff}$ und 17 kHz über die Zeit (nach 0 s, 10 s, 20 s, 30 s). Zunächst werden die Elektroden am Arrayrand belegt und erst später die Elektroden in der Mitte. Hierbei werden einmal belegte Elektroden nicht doppelt belegt. Das Feld wird durch das einmal immobilisierte Bead abgeschirmt. Schließlich wird eine Belegung von 80% erreicht.

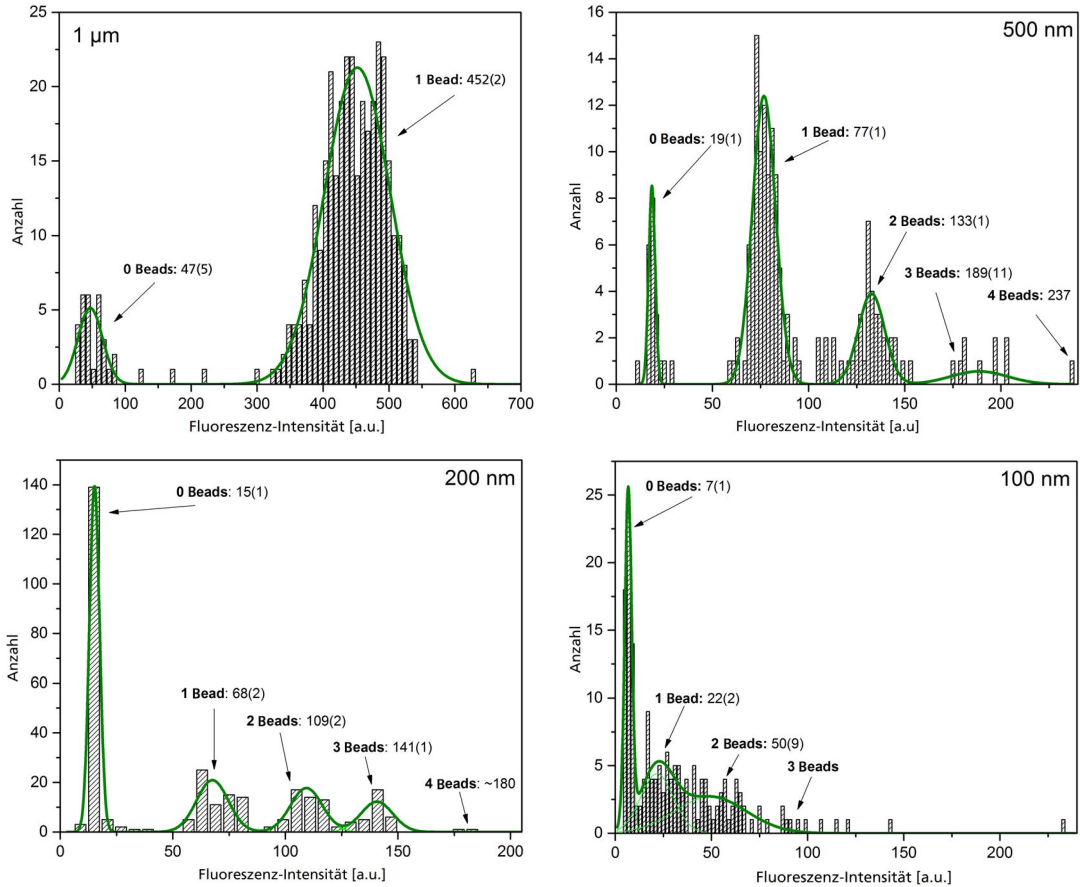


Abbildung 9.11.: Histogramme der Fluoreszenzintensitäten nach Immobilisierung von Beads auf W-Zylinder-Elektroden: Um die Elektrodenpositionen wurden in *ImageJ* ROIs (*Regions of interest*) gelegt. Aus den so ermittelten Intensitäten konnten Verteilungen als Histogramme erstellt werden. Eine Kurvenanpassung nach dem Faltungssatz für Gaußfunktionen erfolgte daran in *Origin*. Man erkennt bei 1 μm -Beads, 500 nm-Beads und 200 nm-Beads deutliche Peaks. Diese entsprechen der jeweiligen Anzahl von Beads je Elektrode. Bei 100 nm Beads ist eine Ermittlung der Beadanzahl mittels Histogrammen dagegen nicht mehr eindeutig.

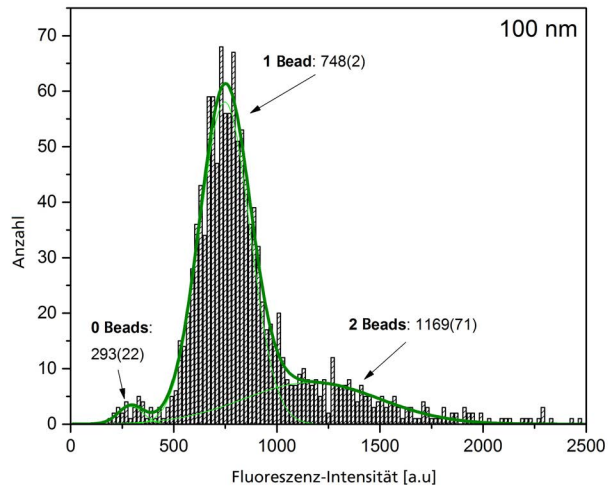
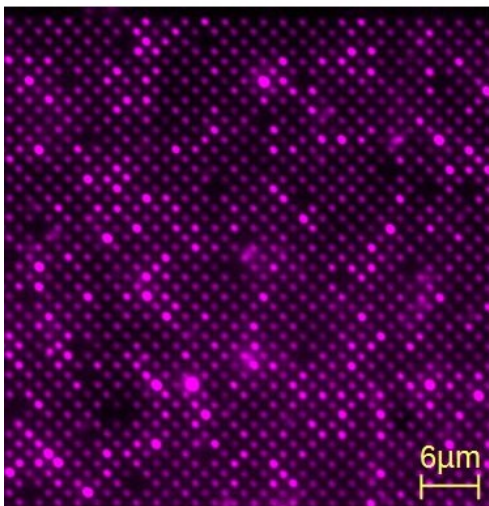
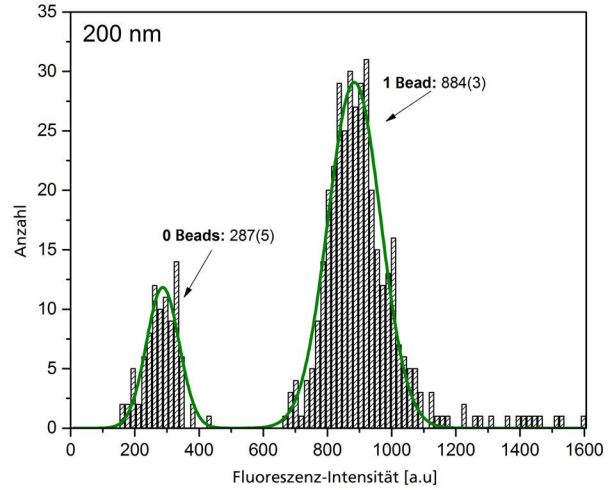
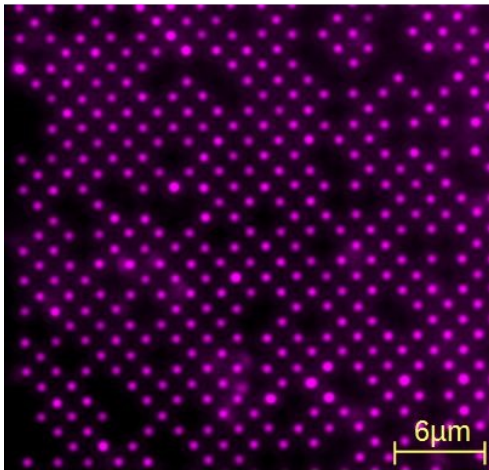


Abbildung 9.12.: Es wurden Beads bei $6,5 V_{eff}$ und 15 kHz auf 50 nm Si-Kegel-Elektroden gefangen. Histogramme der Fluoreszenzintensitäten nach der Immobilisierung wurden erstellt. Oben: 200 nm Beads: 1 Bead je Elektrode (temporär); Unten: 100 nm Beads: 1-2 Beads je Elektrode (permanent)

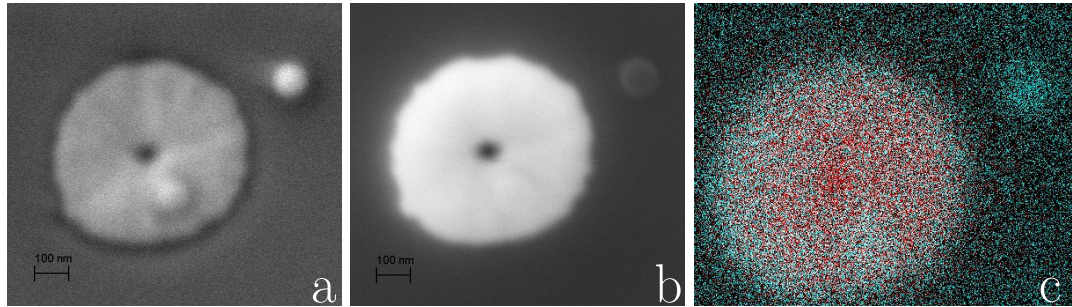


Abbildung 9.13.: Kohlenstoff-Nachweis in Beads über energiedispersive Röntgenspektroskopie: Auf einer Zylinder-Elektrode wurde ein 100 nm Polystyrolbead immobilisiert. Im REM ist das Bead bei den Einstellungen 2 kV, 4 pA und 5,5 mm zu erkennen (a), bei den Einstellungen der EDX (15 kV, 200 pA und 9,5 mm) (b), lässt sich die Beadposition nur noch erahnen. Mittels der EDX (c) wurde eine Elementanalyse durchgeführt, in der das Wolfram der Elektrode (rot) und Kohlenstoff (türkis) untersucht wurde. Neben einer Kohlenstoffschicht, die den gesamten Chip überzieht, konnte an den Positionen der Beads eine höhere Kohlenstoffdichte nachgewiesen werden.

9.1.5. Nachweis von Beads mittels EDX

Auf Zylinder Elektroden wurden 100 nm Beads aus Polystyrol (C_8H_8) permanent durch pDEP immobilisiert. Die so belegten Elektroden-Chips konnten mit dem REM und der dazugehörigen EDX-Spektralanalyse untersucht werden. Möchte man die Chips nicht weiter modifizieren, benötigt man, um die Beads im REM nachzuweisen, relativ geringe Beschleunigungsspannungen (EHT), ebenso wie relativ geringe Probenströme (I_{Probe}) und Arbeitsabstände (WD). Das linke Bild in Abb. 9.13 wurde bei $EHT = 2\text{ kV}$, $I_{Probe} = 4\text{ pA}$ und $WD = 5,5\text{ mm}$ aufgenommen. Man erkennt hier ein Bead, das auf der Elektrode immobilisiert wurde, sowie ein Bead, das neben der Elektrode auf der Chipoberfläche haftet. Diese Anordnung wurde mit Hilfe der EDX weiter untersucht. Hierfür allerdings ist eine feste Beschleunigungsspannung von 15 kV und wegen der Position des Detektors ein fester Arbeitsabstand von 9,5 mm notwendig. Außerdem erzielt man mit hohen Probenströmen bessere Ergebnisse, da so die Messungen von kürzerer Dauer sein können und dementsprechend Fehler, die durch eine Drift der Probe zustande kommen, nicht so stark ins Gewicht fallen. Hier wurden 200 pA verwendet (vgl. Abb. 9.13b). Der Nachteil bei diesen Einstellungen liegt darin, dass man die Position von nichtleitenden Objekten kaum noch erahnen kann. In der Spektralanalyse der EDX wird die Position der Beads allerdings durch eine höhere Konzentration an Kohlenstoff offensichtlich (vgl. Abb. 9.13c).

9.1.6. Beleuchtungsabhängige Dielektrophorese

Messungen an Kegel-Elektroden mit einem Spitzendurchmesser von 70 nm mit auf dem Chip integrierter TiN-Gegenelektrode wurden durchgeführt. Hierfür wurden Beads mit unterschiedlichen Durchmessern und Funktionalisierungen untersucht.

Bei Anlegen eines Feldes kommt es durch positive DEP zu einer reversiblen Belegung der Elektroden. Dies passiert allerdings nur, wenn neben dem angelegten Wechselfeld auch eine Beleuchtung des zu untersuchenden Testfeldes mit einer lichtintensiven Lampe (hier Quecksilberdampfampe) geschieht.

Die Frequenzen und die Spannungen wurden variiert. Auf diese Weise wurden Grenzspannungen und Grenzfrequenzen, bis zu denen eine Immobilisierung der Beads an den Elektroden stattfindet, bestimmt. Da die Immobilisierung reversibel war, konnte beobachtet werden, ab wann sich die Beads wieder von den Elektroden lösten.

Ein Vorteil der Elektroden dieses Typs gegenüber den Kegel-Elektroden mit ITO-Gegenelektrode ist, dass trotz der hohen Spannungen kaum Störungen durch Strömungen über den Elektroden-Arrays auftreten. Auf diese Weise wird die Messung von Grenzspannungen erst möglich. Ein Nachteil hingegen ist, dass die Beads zunächst die Elektroden in ihren Vertiefungen erreichen müssen, wodurch eine Messung länger dauert.

Ein besonderer Effekt, der bei Elektroden mit integrierter Gegenelektrode auftritt, ist die Abhängigkeit der Immobilisierung von der Beleuchtung des Elektroden-Arrays (vgl. Abbildung 9.15). Es kommt hier nur unter Dauerbeleuchtung zur Immobilisierung. Dafür wird eine lichtintensive Quecksilberdampfampe verwendet und ein Filter (entweder WIB3 (Anregung: $460\text{ nm} - 495\text{ nm}$) oder WIY2 (Anregung: $545\text{ nm} - 580\text{ nm}$)). Dieser Effekt tritt nicht auf, wenn ohne Filter und mit lediglich einem halbdurchlässigen Spiegel im Filterblock gearbeitet wird.

Für die Untersuchung von Biomolekülen ist dies zwar ungünstig, da es zum Ausbleichen, Erhitzen und möglicherweise zur Denaturierung der Probe kommen kann. Andererseits öffnet dieser Effekt Möglichkeiten im Hinblick auf die Kombination von Feld und Licht, als separat ansteuerbare Trigger für die Immobilisierung bzw. das Ablösen der Partikel bei Fehlen einer der beiden Komponenten. Durch punktweise Beleuchtung wäre es so eventuell möglich, Einzelelektroden zu adressieren, was bisher in einer integrierten Schaltung nur schwierig herstellbar ist.

Der Lichteffect wird vermutlich durch einen plasmonischen Effekt hervorgerufen. Wegen der Beleuchtung kommt es zur Anregung von Oberflächenplasmonen, wodurch eine weitere Gleichspannung zwischen TiN-Gegenelektrode und Kegel-Elektrode auftritt. Dies ist vermutlich abhängig von den Öffnungen in der TiN-Oberfläche des Chips. Der Durchmesser dieser Öffnungen beträgt hier 670 nm , ist also etwas größer als die Wellenlänge des verwendeten Lichtes. Diese Lochstruktur wirkt wie ein plasmonisches Nano-Loch-Array, wodurch es zur Verstärkung des lokalen elektrischen Feldes kommt [80].

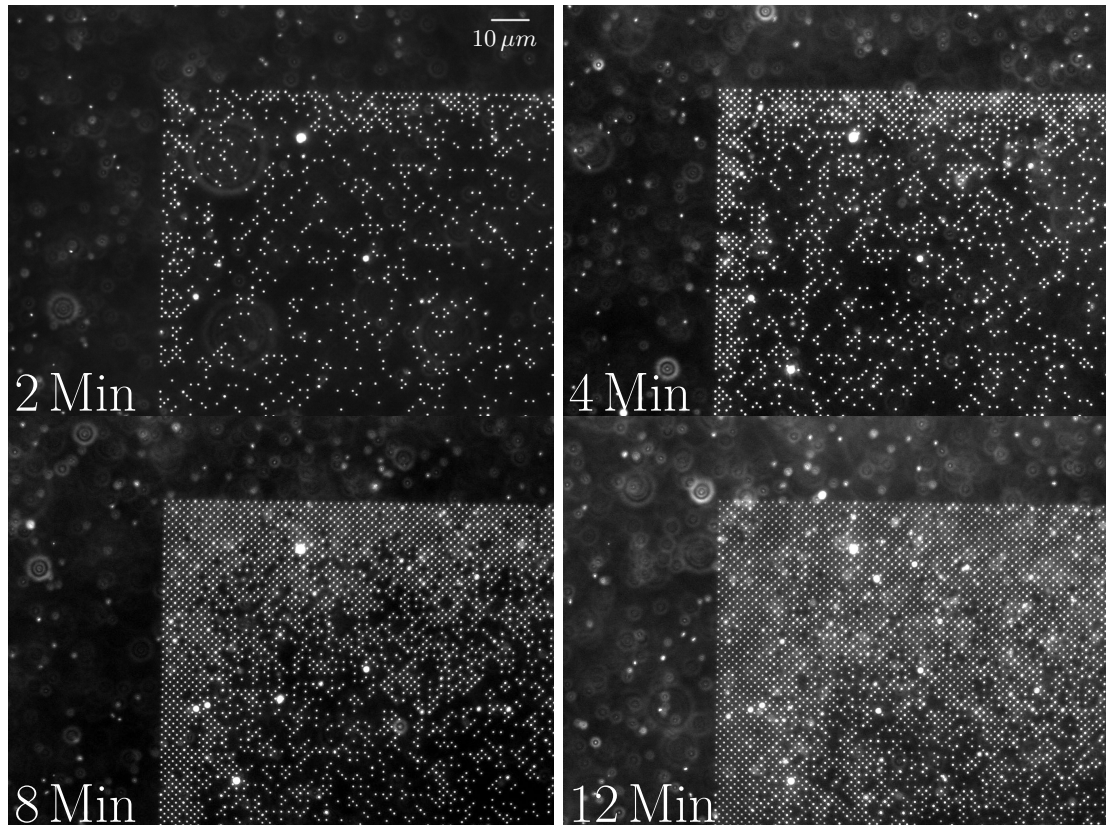


Abbildung 9.14.: Dielektrophoretische Belegung von Kegel-Elektroden mit integrierter Gegenelektrode mit amino-modifizierten 200 nm Beads über die Zeit: nach 2, 4, 8, 12 Minuten Feldeinwirkung und Beleuchtung. (Feld: $13,5 V_{eff}$; 59 kHz)

9.1.7. Übergangsfrequenz und Grenzspannung

Beads mit 20 nm - $1 \mu m$ Durchmesser wurden untersucht. Daraus konnten Kurven bezüglich der Abhängigkeit einer Grenzspannung U_{xo} , unterhalb derer keine DEP beobachtbar ist, erstellt werden (vgl. Abb. 9.16). Für die Grenzspannung gilt, dass die erzeugte Dielektrophoresekraft gerade alle anderen Kräfte ausgleicht. Eine solche Kurve folgt grob dem Verlauf von $U_{xo} \sim \sqrt{d^{-3}}$. Kleinere Beads lösen sich also bereits bei höheren Spannungen, während größere Beads geringere Spannungen benötigen, um noch festgehalten zu werden, da die Dielektrophorese bei größeren Beads stärker wirkt. Das geht konform mit der Theorie, die besagt, dass die Dielektrophoresekraft proportional zum Volumen des untersuchten Partikels ist (vgl. Glg. 4.6).

Betrachtet man die Immobilisierung von Beads im Detail, so findet man, dass Beads mit einem Durchmesser von $1 \mu m$ wegen ihrer Größe im Verhältnis zum Elektrodenabstand von $2 \mu m$ eher ungeeignet sind. Beads mit einem Durchmesser von 500 nm und 200 nm hingegen lassen sich als Einzelobjekte fangen. Bei Beads mit 100 nm oder klei-

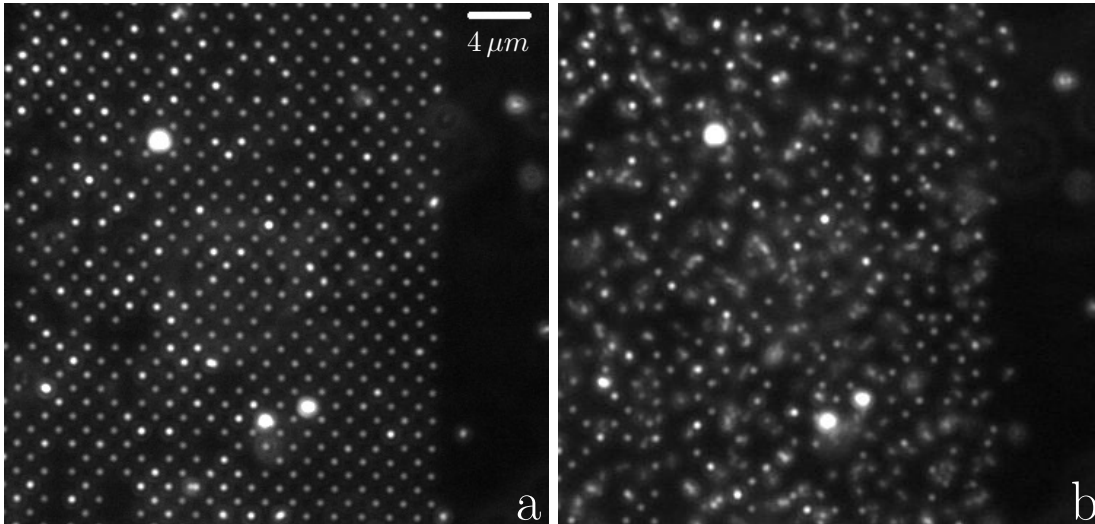


Abbildung 9.15.: Lichteffect der Elektroden mit integrierter Gegenelektrode: Es wurden Beads mit einem Durchmesser von 200 nm auf Kegel-Elektroden mit integrierter Gegenelektrode immobilisiert (Feld: $13,5 V_{eff}$; 59 kHz). Diese Gegenelektroden haben ein Loch mit einem Durchmesser von 670 nm um die Kegelspitzen herum. Bei kontinuierlicher Beleuchtung mit einer Quecksilberdampfampe und unter Verwendung eines Filters bei einer Anregungswellenlänge von 460-495 nm werden die Beads dielektrophoretisch immobilisiert (a). Unterbricht man die Beleuchtung (hier für 0,2 s), lösen sich die Beads von den Elektroden (b).

nerem Durchmesser konnten mehrere Beads je Elektrode immobilisiert werden.

Man erhält als Grenzspannung verschiedene Werte für gleich große, aber unterschiedlich modifizierte Beads. Hier wirkt vermutlich eine permanente Ladung als zusätzlicher Effekt mit. Positive aminomodifizierte Beads zeigen eine geringere Grenzspannung als negative carboxylierte. Nicht modifizierte Beads weisen die höchste Grenzspannung auf.

100 nm Beads	amino-modif.	carboxyliert	nicht modifiziert
$U_{xo}(130 kHz)$ in V_{eff}	8	8	10

Bestimmung der Übergangsfrequenz

Die niedrigste Frequenz, bei der Beads noch immobilisiert bleiben, ist eine materialabhängige Konstante. Mit den hier ermittelten Übergangsfrequenzen lässt sich nach Umstellen der Gleichung 4.8 die elektrische Oberflächen-Leitfähigkeit σ_p der modifizierten Polystyrolbeads bestimmen (vgl. Gleichung 4.9).

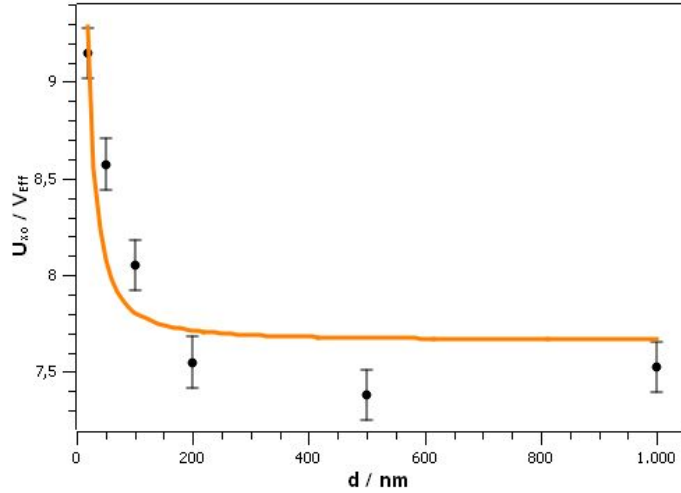


Abbildung 9.16.: Grenzspannung bei konstanter Frequenz (130 kHz) anhand von carboxylierten Beads unterschiedlicher Größe mittels Elektroden mit integrierter Gegenelektrode. Eine Kurvenanpassung ergibt grob einen Verlauf nach $U_{xo}(d) = 150(40) V \sqrt{nm^3} \sqrt{d^{-3}} + 7,6(2) V$.

100 nm Beads	amino-modif.	carboxyliert	nicht modifiziert
$\omega_{xo}(13,5 V_{eff})$ in MHz	2	2	0,4
σ_p in S/m	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-4}$

Man stellt einen Unterschied der Leitfähigkeiten von amino-modifizierten bzw. carboxylierten Beads zu nicht modifizierten Beads fest.

Nutzt man eine Leitfähigkeitssonde bei einer Messfrequenz von $1 kHz$ zur direkten Bestimmung der Leitfähigkeit einer Beadverdünnung in Reinstwasser mit $0,3 \cdot 10^{-4} \frac{S}{m}$, so erhält man verdünnungsabhängig Werte zwischen $2 \cdot 10^{-3}$ und $3 \cdot 10^{-4} \frac{S}{m}$. Diese haben die gleiche Größenordnung, wie die aus den Übergangsfrequenzen berechneten. Hier allerdings geht die Leitfähigkeit des Mediums mit in den Wert ein.

Vergleicht man diese Werte mit der Literatur, so erhält man ebenfalls eine grobe Übereinstimmung bezüglich der Größenordnung. Zum Beispiel wurde bei White et. al [125] ebenfalls über die Übergangsfrequenz die elektrische Oberflächen-Leitfähigkeit von unterschiedlich modifizierten Polystyrolbeads bestimmt. Für carboxylierte Beads mit einem Durchmesser von 460 nm erhalten White et al. $\sigma_p = 1,57 \cdot 10^{-2} S/m$, für nicht modifizierte Beads liegt der Wert etwas niedriger bei $\sigma_p = 1,24 \cdot 10^{-2} S/m$.

Offenbar eignen sich also die hier genutzten Elektroden-Chips mit integrierter Gegenelektrode zur Bestimmung der Übergangsfrequenz und daraus folgend der elektrischen Oberflächen-Leitfähigkeit von Probestoffen, sofern diese für die Fluoreszenz-Mikroskopie geeignet und lichtbeständig sind.

9.2. Störeffekte

9.2.1. Optimierung

Für eine erfolgreiche dielektrophoretische Immobilisierung ist, bezogen auf die angelegte Spannung und Frequenz, eine Optimierung notwendig.

Bei hohen Spannungen treten starke Strömungen auf, so dass gefangene Partikel von der Arrayoberfläche weggerissen werden. Bei niedrigeren Spannungen wird die Dielektrophoresekraft geringer, so dass auch hier die Strömung in Richtung Arraymitte durch AC-EOF überwiegt.

Bei höheren Frequenzen beobachtet man eine Haufenbildung der Beads, ohne dass eine Immobilisierung feststellbar wäre. Bei niedrigeren Frequenzen ist zwar die Dielektrophoresekraft größer, es nimmt aber auch die Strömung zu und reißt die Beads von den Elektroden los. Außerdem kommt es vermehrt zur Bildung von Elektrolyseblasen und Bead-Ketten.

Mit Hilfe der Zylinder-Elektroden, die in vier einzeln ansteuerbaren Arrays angeordnet sind, konnten die Einstellungen für positive DEP optimiert werden. Durch die Verwendung derselben Probenlösung für 4 unterschiedliche Einstellungspaare (von Spannung zu Frequenz) ist es möglich, sich an eine günstige Frequenz für ein bestimmtes Material heranzutasten und so das kleine Fenster zu finden, in der positive DEP beobachtet werden kann. Die Einstellungen für die Frequenz sind auch auf Experimente an anderen Elektrodenformen anwendbar, da hier insbesondere die Materialeigenschaften von Partikel und Medium über den Clausius-Mossotti-Faktor ausschlaggebend sind. Günstige Einstellungen der Spannung hingegen müssen für jeden Elektrodentyp neu ermittelt werden, da hier über den Gradienten die Elektrodenform mit eingeht nach $\nabla|E^2| \propto U^2$.

9.2.2. Strömungen

Beobachtet man das Verhalten von Beads in der Probenflüssigkeit bei nicht optimalen Bedingungen für die positive Dielektrophorese, so erkennt man Strömungsmuster.

Zunächst beobachtet man eine Bildung von Walzen über den Arrayrändern. Diese Walzen bewegen sich je nach angelegter Spannung mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und tragen so zu einer Durchmischung des Probenvolumens bei. Die Strömungen sind nahe den Elektroden zur Arraymitte gerichtet und nahe dem ITO von der Mitte weg. Dies entspricht im Wesentlichen dem Verhalten des AC-EOF und der Rayleigh-Strömungen.

Unter günstigeren Bedingungen für die DEP weiten sich diese Walzen soweit aus, dass die Partikel über das gesamte Array bewegt werden, wiederum in Elektrodennähe in die Richtung der Arraymitte. Hier ist auffällig, dass sich entlang der Diagonalen von Arrayecke zu Arrayecke besonders viele Partikel sammeln und in Richtung Arraymitte transportiert werden. Es entsteht von oben betrachtet auf dem Array ein Muster, das einem Kleeblatt ähnelt.

Wählt man Einstellungen, bei denen sich die Dielektrophoresekraft und die Strömungen ausgleichen, beobachtet man ein Springen der Partikel von Elektrode zu Elektrode in Richtung Arraymitte. Insbesondere an Stellen, die beleuchtet werden, lösen sich die

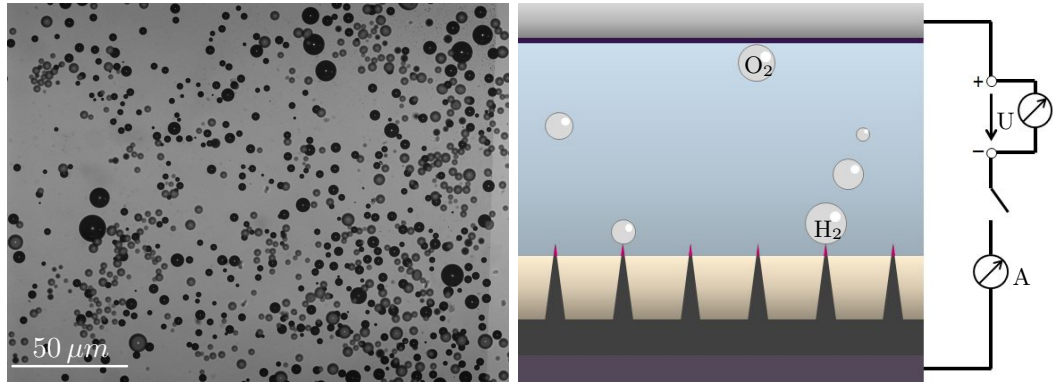


Abbildung 9.17.: links: Bläschenbildung auf einem Kegel-Elektroden-Array (50 nm Spitzendurchmesser) bei einer angelegten Gleichspannung von 9,31 V unter mikroskopischer Beobachtung bei vierfacher Vergrößerung. rechts: Messaufbau, der für die Elektrolyseexperimente verwendet wurde: Die Elektroden sind an eine Gleichspannungsquelle angeschlossen. An dem Elektroden-Array erwartet man die Bildung von H_2 und an der ITO-Gegenelektrode erwartet man die Bildung von O_2 .

Beads schnell wieder. Dies ist vermutlich eine Folge der Erwärmung des Arrays durch die intensive Beleuchtung der Quecksilberdampfampe.

9.2.3. Elektrolyse

Legt man an Nano-Elektroden ein elektrisches Wechselfeld an, so sollte bei niedrigen Frequenzen laut Theorie die Wirkung der Dielektrophorese besonders groß sein. Verwendet man diese Frequenzen aber, stellt man schon bei niedrigen Spannungen (unter $10 V_{eff}$) häufig eine Bildung von Bläschen an den Elektroden fest. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei diesen Bläschen um elektrolytisch aufgespaltenes Wasser handelt, also um Gasbläschen aus H_2 und O_2 .

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Bläschenbildung von der Zeit und dem angelegten Feld in Bezug auf Stromstärke und Spannung wurden verschiedene Kegel-Elektroden untersucht.

Der verwendete Aufbau ist in Abbildung 9.17 dargestellt. Die Gleichspannungsquelle (HAMEG *HM8143*) mit integriertem Voltmeter wurde so mit den Elektroden verbunden, dass an diese der Minuspol angelegt war. Als Gegenelektrode am Pluspol wurde ein transparentes mit Indium-Zinn-Oxid beschichtetes Deckgläschen (ITO) genutzt, durch das die Elektroden beobachtet werden konnten. Man erwartet daher am Elektroden-Array eine Bildung von H_2 , während an der ITO-Elektrode O_2 entstehen sollte. Für die Messungen der Abhängigkeit von Strom und Spannung wurde in den Aufbau ein Amperemeter (VOLTcraft *Plus VC960*) geschaltet. Beobachtet wurde die Bläschenbildung mithilfe des *BX51* in Aufsichtbeleuchtung mittels Halogenlampe.

Zeitmessung

Es wurden Messungen mit verschiedenen Wasserqualitäten durchgeführt. Zum einen wurde Reinstwasser aus der hauseigenen Anlage für die Experimente verwendet. Als zweites wurde mittels einer Brennstoffzelle (CONRAD Modell Nr. FCJJ-11; mit 0,11 A; 1,7 V) Wasser elektrolytisch aufgespalten und für die Experimente genutztes Wasser auf diese Weise für 24 Stunden begast.

An 10 nm CoSi-Kegel-Elektroden wurden Zeitmessungen durchgeführt. Es wurde beobachtet, ab wann bei einer angelegten Spannung Gasbläschen im Mikroskop zu sehen waren und die Spannung variiert. Diese Messung wurde mit Reinstwasser durchgeführt. Eine Bildung von Gasbläschen bei einer angelegten Spannung von 7 V fand instantan ($t < 1$ s) statt. Dies ließ sich später bei allen Elektrodentypen für eine angelegte Spannung von 7 V beobachten.

Beispielhaft ist in Abbildung 9.18 eine Zeitkurve dargestellt. Teilweise entstand nach dem Einschalten des Feldes sofort ein Bläschen, das dann wieder verschwand, während die Bildung mehrerer Bläschen erst später einsetzte. Dargestellt sind hier die Zeiten, nach denen mehrere Bläschen auf dem Array zu sehen waren.

Eine Kurvenanpassung der Messwerte mit einer hyperbolischen Funktion ergibt:

$$t(U) = \frac{a}{U} + t_0 = \frac{(3300 \pm 200) \text{ sV}}{U} - (360 \pm 30) \text{ s}.$$

Strommessung

Messungen der Stromstärke wurden in Abhängigkeit von der angelegten Spannung durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine Spannung von 7 V eingestellt und dann in 0,25 V-Schritten reduziert bis die Stromstärke auf $0 \mu\text{A}$ gefallen war. Für jede Messreihe wurde eine neue Probe verwendet, aber innerhalb einer Messreihe wurde an derselben Probe gemessen. In Abbildung 9.18 ist beispielhaft eine Kurve mit einer Kurvenanpassung dargestellt.

Die Kurvenanpassung erfolgte mit dem Programm *SciDAVis* nach einem exponentiellen Anstieg, also der Form

$$I(U) = I_0 + Ae^{\frac{U}{b}}.$$

Als Fitparameter wurden hier I_0 , A und b ausgegeben, wobei die Messfehler in I berücksichtigt wurden.

Schlussfolgerungen

Die Anzahl der entstandenen Bläschen war von Chip zu Chip sehr unterschiedlich. Insbesondere bei 50 nm CoSi-Kegel-Elektroden entstehen sehr schnell viele sprudelnde Bläschen. Die höchsten Werte für die Stromstärke sowie die niedrigste Grenzspannung, findet man bei 50 nm CoSi-Kegel-Elektroden.

Auch die Größe der entstehenden Bläschen ist wenig einheitlich. Besonders große Blasen entstanden bei den Messungen mit 10 nm AlSi-Kegel-Elektroden. Auffällig ist, dass bei gleichem Material Chips mit größerem Spitzendurchmesser einen niedrigeren Wert

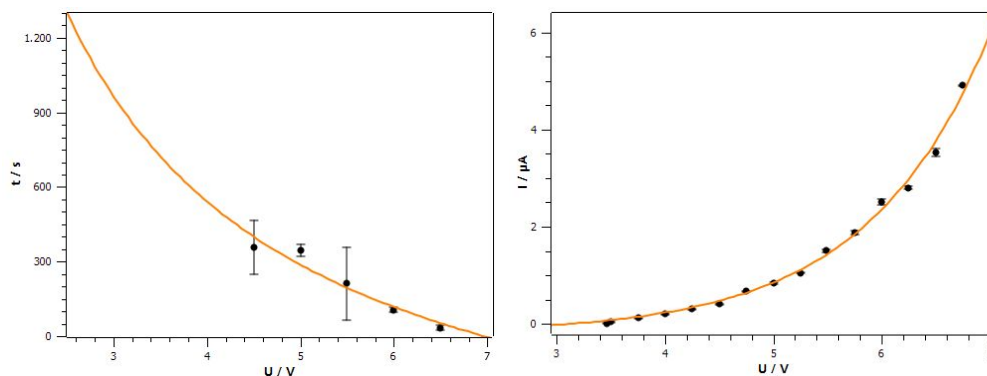


Abbildung 9.18.: links: Es wurden an 10 nm Kegel-Elektroden mit CoSi-Beschichtung Messungen der Zeit durchgeführt, bis eine Bläschenbildung bei einer angelegten Gleichspannung zu beobachten war. Als Probe wurde Reinstwasser aus der hausinternen Anlage verwendet. rechts: Darstellung der Abhängigkeit des Stromflusses von der angelegten Spannung ebenfalls am Beispiel einer 10 nm CoSi-Kegel-Elektrode. Es wurde eine Kurvenanpassung nach einem exponentiellen Anstieg durchgeführt. Die Kurve folgt dem Verlauf von $I = -0,20(2) \mu A + 0,0126(6) \mu A \cdot e^{\frac{U}{1,130(7) V}}$.

der Spannung zeigen, also schon eher zur Elektrolyse führen. Bei den meisten Chips entstehen die Bläschen zunächst am Arrayrand. Im Vergleich der verschiedenen Materialien zeigen die Chips mit AlSi Spitzenbeschichtung eine etwas geringere Grenzspannung als andere Chips des gleichen Spitzendurchmessers.

Es stellt sich nun die Frage, ob der Feldgradient Auswirkungen auf die Bläschenbildung hat. Einerseits scheint es offensichtlich zu sein, dass eine Korrelation vorhanden ist, da eine Bevorzugung der Randelektroden zu beobachten ist. Andererseits zeigen besonders spitze Elektroden keine stärkere Bläschenbildung.

Der Vergleich der beiden Wassertypen führt zu geringen Unterschieden. Die Grenzspannung ist bei der Verwendung von gesättigtem Reinstwasser niedriger. Die Stromstärke hingegen ist höher. Bei der Nutzung des gesättigten Reinstwassers kommt es also eher zur Elektrolyse, was andererseits bedeutet, dass erst eine lokale Sättigung des Wassers geschehen muss, bevor es zur Bläschenbildung kommt.

Beobachtungen während anderer (DEP-)Experimente legen den Schluss nahe, dass es außerdem zu einer bevorzugten Bildung von Elektrolysebläschen kommt, wenn sich bereits Silber-Dendriten an den Elektroden gebildet haben. Hierbei könnte es sich um einen katalytischen Effekt handeln.

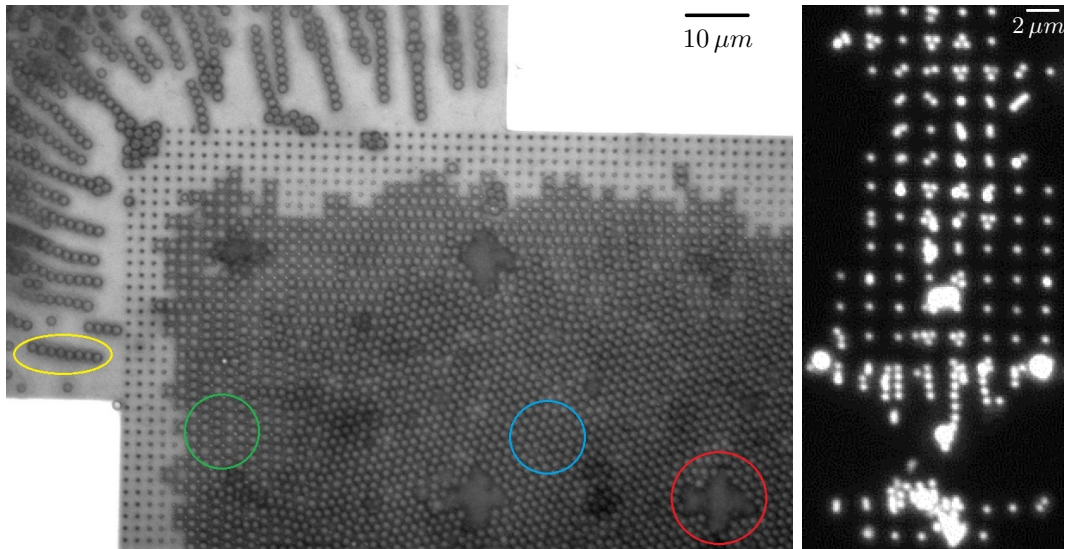


Abbildung 9.19.: Effekte vor der Optimierung der Parameter: Das linke Bild zeigt $2\ \mu\text{m}$ Beads bei einem Feld von $2,7 V_{eff}$ und $15\ \text{kHz}$. Über der Leiterbahn haben sich Beadketten durch gegenseitige Dielektrophorese gebildet, die entlang der Feldlinien ausgerichtet sind (gelb). Nahe dem Arrayrand werden die Beads in der Chipebene zwischen den Elektroden vereinzelt immobilisiert (grün). Weiter in der Arraymitte werden die Beads näher zusammengedrängt und in einer dichtesten Packung nebeneinander gelegt (blau). Die Orientierungskreuze als Bereiche ohne Elektroden werden mit Beads gefüllt und dort bilden sich Haufen. Die Beads sind hier nicht mehr in der Chipebene, da sie nicht durch die DEP-Kraft nach unten gezogen werden. Das rechte Bild zeigt $500\ \text{nm}$ Beads bei $7 V_{eff}$ und $7\ \text{kHz}$. Es bilden sich Beadketten zum nicht kontaktierten Nachbararray und Beadhaufen an den Rändern des Nachbararrays. An diesen Elektroden bildet sich ebenfalls ein hoher Gradient $\nabla|E^2|$, so dass auch zu ihnen eine DEP-Kraft gerichtet ist und Beads gefangen werden.

9.2.4. Kettenbildung

Neben dem Effekt der Bildung von Elektrolysebläschen bei niedrigen Frequenzen und der Bildung von Strömungen bei hohen Spannungen kann es bei ungeeigneter Wahl der Feldparameter (insbesondere bei niedrigeren Frequenzen) zu einer Kettenbildung der Probeobjekte kommen.

Diese Ketten bilden sich in erster Linie an den Arrayrändern oder von Teilarray zu Teilarray aus und richten sich nach den Feldlinien aus. Ebenfalls kommt es zu einer Ansammlung von Objekten in Haufen, die mit den Strömungen langsam über das Array getragen werden oder gemeinsam an den Elektroden immobilisiert werden.

Die Ketten- und Haufenbildung von Probepartikeln in der Dielektrophorese lässt sich mit gegenseitiger DEP erklären, das heißt, dass die induzierten Dipole der einzelnen Objekte gleich ausgerichtet sind und diese so eine Kraft aufeinander ausüben. Bei ungünstiger Wahl der Feldparameter überwiegt diese Kraft der induzierten Dipole zueinander der Kraft, die die Elektroden auf die Objekte ausüben.

Um eine Vereinzelnung von Probepartikeln zu erreichen, ist daher eine Frequenz- und Spannungsoptimierung notwendig.

9.2.5. Dielektrophorese von Silber-Nanopartikeln

Ein Problem, das bei DEP-Experimenten auftrat, war eine gleichzeitige Immobilisierung von Silber-Nanopartikeln aus zur Kontaktierung des ITO-Deckglases verwendetem Silber-Leitlack (der Firma FERRO GMBH). Durch diesen gingen Silber-Partikel von etwa 40 nm Größe in die Probenlösung über. Sie erfahren wegen höherer Leitfähigkeit σ_p nahezu immer pDEP, da die Crossover-Frequenz sehr weit zu hohen Frequenzen verschoben ist.

Die angezogenen Silber-Partikel vergrößern die Oberfläche der Elektroden und sind gleichzeitig leitfähig. Hier liegt ein Unterschied zu gefangenen nichtleitenden Polystyrolbeads: Das Feld wird nicht durch bereits immobilisierte Partikel abgeschirmt. Auf den nun vergrößerten Elektroden finden viele Proteine, Beads oder weitere Silberpartikel Platz. Zudem bildet jedes Silber-Partikel eine atomare Spitze, an der ein größerer $\nabla|E^2|$ herrscht. Die DEP wird (scheinbar) verstärkt.

Silber ist dielektrophoretisch sehr aktiv. Schon kleinste Mengen werden schnell an die Elektroden gezogen, dort permanent immobilisiert und bilden Kuben, Haufen, Ketten und insbesondere dendritische fraktale Strukturen, die entweder flach auf der Chipoberfläche oder in den Raum hineinwachsen (vgl. Abb. 9.20 und 9.21).

Diese Silber-Strukturen bilden sich auf dem gesamten Array an den Elektroden. Hierbei beobachtet man eine exponentielle Verteilung, wie nach der Theorie zur Dielektrophorese zu erwarten. Der Arrayrand ist stärker belegt und die Belegung wird gleichmäßig zur Arraymitte hin geringer. Besonders am Array-Rand bilden sich lange Dendriten aus. Diese Strukturen fluoreszieren in allen Filterkanälen und zeigen, sehr ähnlich wie Einzelmoleküle, ein blinkendes Verhalten.

Hierbei erklärt man sich das Blinken durch das Verhalten von Silber-Clustern aus zwei bis vier Silberatomen, deren starke Fluoreszenz in dünnen Gasen bekannt ist [101, 120].

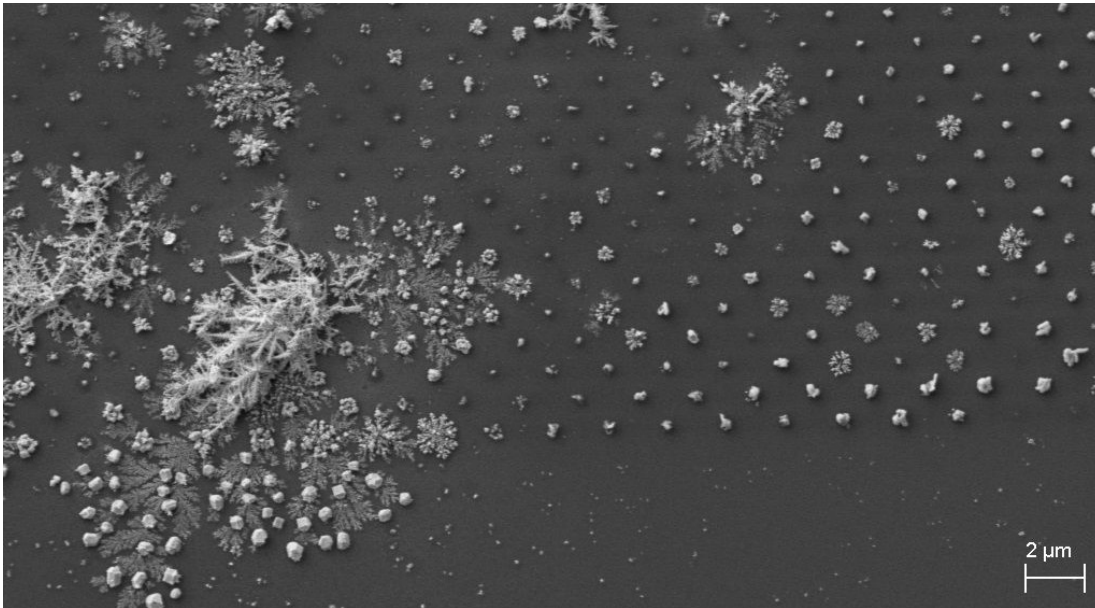


Abbildung 9.20.: Silber-Partikel wurden auf einem 50 nm-Kegel-Elektroden-Chip dielektrophoretisch immobilisiert. Dort haben sie dendritische und kubische Strukturen an den Elektroden und auf der Chipoberfläche gebildet. (REM-Aufnahme: EHT=4 kV; $I_{Probe} = 10 \text{ pA}$; WD=7 mm).

Durch Reaktionen mit dem Luftsauerstoff werden Silberoxide und durch photochemische Prozesse Silber-Cluster aus Ag_2O oder AgO an der Oberfläche gebildet. Diese sind nicht stabil und zerfallen nach einiger Zeit wieder. Es kommt zu einer ständigen Geometrie-, Größen- und Ladungsänderung und somit zu einem Blinken in der Fluoreszenz (vgl. Abb. 9.22).

Die Fluoreszenz von R-PE und Silber zeigt sich zufällig im selben Wellenlängenbereich, was eine Unterscheidung durch die Fluoreszenz-Mikroskopie erschwert. Bei einer gemeinsamen Immobilisierung von Silber und Proteinen ist also in der Fluoreszenz-Mikroskopie nicht oder kaum unterscheidbar, ob ein Blinken von Silber oder von Einzelmolekülen stammt. Einen Hinweis darauf, ob die Fluoreszenz tatsächlich von Molekülen stammt, bietet hier das Bleichen, da Silber nicht bleicht.

In der Elementaranalyse der EDX schließlich wird Silber eindeutig nachweisbar (vgl. Abb. 9.23). Hier konnten schon geringe Mengen, d.h. einzelne besetzte Elektroden untersucht werden. Eine Kontrolle der Experimente im Hinblick darauf, ob Silber angezogen wurde, ist also auf diese Weise möglich. Silber lässt sich als Indiz dafür, ob Elektroden DEP-fähig sind, verwenden.

Erst durch das vollständige Ersetzen von Silber-Leitlack durch silberfreien *Leit-C*-Leitlack (der Firma PLANO) konnten Silberverunreinigungen im Experiment verhindert werden.

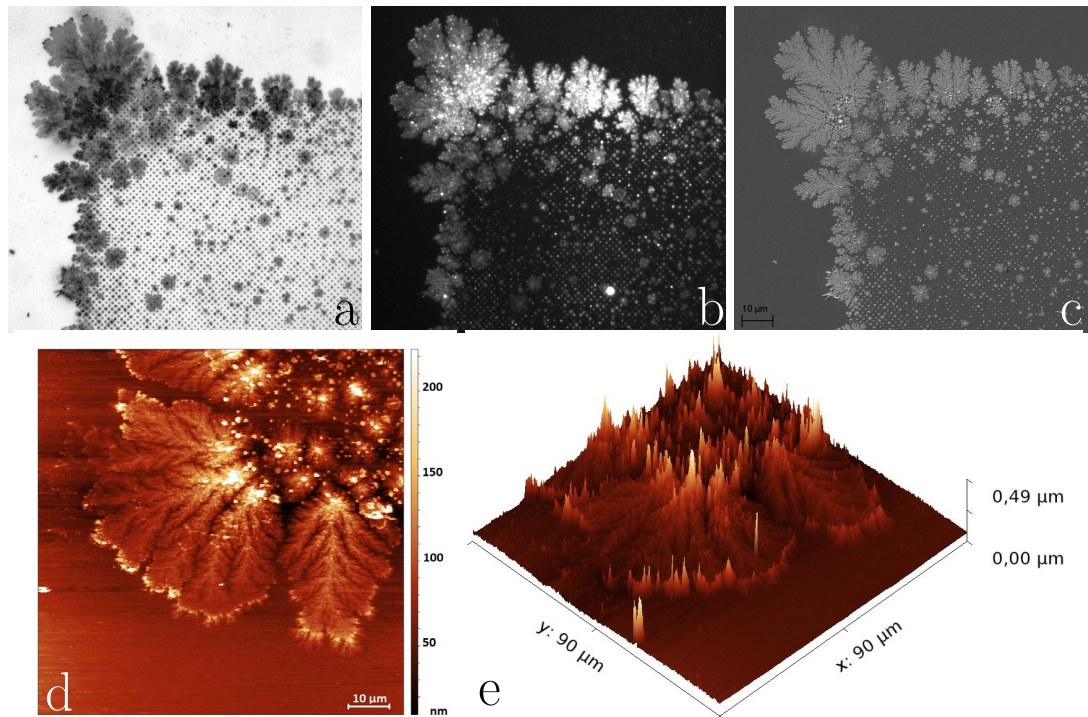


Abbildung 9.21.: Bei der Kontaktierung von Elektroden-Chips mit Silberleitlack kam es zu einer gleichzeitigen Immobilisierung der Probe und anderen fluoreszierenden Partikeln. Diese anderen Partikel bilden kristalline Strukturen aus, sowohl in Richtung der Chipoberfläche, als auch in den Raum hinein. Zudem entstehen kubische Strukturen. (Feld: $7 V_{eff}$; 15 kHz; 15 Min.) Oben: Aufsicht (a), Fluoreszenz (b) und REM (c) (EHT=5 kV; $I_{Probe} = 100 pA$; WD=10,5 mm). Unten: AFM (d, e).

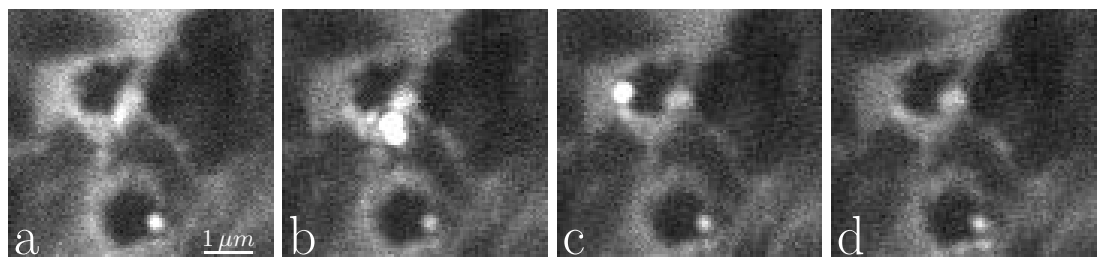


Abbildung 9.22.: Blinken einiger Silber-Partikel in der Fluoreszenz im CY3-Filter (Anregung: 520-570 nm; Emission: 535-675 nm).

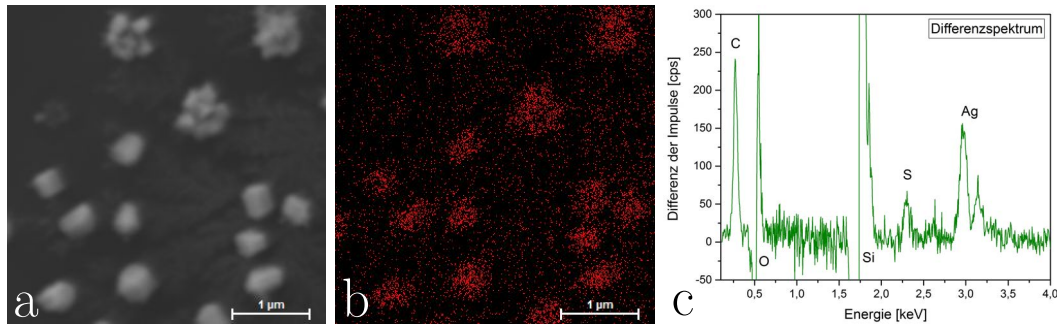


Abbildung 9.23.: Die dendritischen Strukturen können mittels EDX-Spektralanalyse als Silber identifiziert werden. Im Differenzspektrum einer belegten zu einer unbelegten Elektrode treten neben den Elementen der Elektroden (Si) und der R-PE Probe (S, C, O) auch der Silber-Doppel-Peak (Ag) auf. (EHT=15 kV; $I_{Probe} = 200 \text{ pA}$; WD=9,6 mm) a) SE-Kanal, b) Element-Mapping für Silber, c) Differenzspektrum

9.3. Dielektrophorese an Biomolekülen

9.3.1. Temperaturmessungen mit Rhodamin B

Um den Stress auf immobilisierte Moleküle zu untersuchen wurde nach der Methode von Seger-Sauli et. al [113] die Temperaturerhöhung an unterschiedlichen Typen von Nano-Elektroden über die Verringerung der Fluoreszenzintensität des temperaturabhängigen Farbstoffes Rhodamin B untersucht. Hierbei entspricht eine Intensitätsabnahme der Fluoreszenz von 1,2% einem Temperaturanstieg um 1°C . Im Experiment wurde eine wässrige Lösung von Rhodamin B auf die unterschiedlichen Elektroden-Typen gegeben und für 220 s ein elektrisches Wechselfeld mit unterschiedlichen Spannungen und Frequenzen angelegt, wie es im Dielektrophorese-Experiment auch passiert. Unter Verwendung des C-LSM wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt.

In der folgenden Tabelle sind Werte dargestellt, die aus der exponentiellen Anpassung nach

$$I = I_0 + Ae^{\frac{-t}{b}}$$

und der Umrechnung von I_0 in eine Temperaturerhöhung stammen. In Abb.9.24 sind beispielhaft drei Kurven gezeigt, die bei $3,2 V_{eff}$ und 1 MHz aufgenommen wurden.

Tabelle 9.2.: Temperaturerhöhung verschiedener Elektrodentypen

Spannung U	Frequenz ω	Zylinder (500 nm)	Kegel (50 nm)	Kegel (10 nm)
$8,8 V_{eff}$	500 kHz	75(1) K	17(1) K	
$8,8 V_{eff}$	1 MHz	77(1) K	23(1) K	15(1) K
$10,6 V_{eff}$	1 MHz		39(1) K	25(1) K

Sowohl eine höhere Spannung als auch eine höhere Frequenz bedeuten eine Temperaturzunahme. Im Fall hoher Spannungen führt dies zu Strömungen im Sinne von Rayleigh-Instabilitäten, während hohe Frequenzen zu Strömungen im Sinne des elektrothermischen Flusses führen.

Mit dieser Messmethode konnten keine signifikanten Intensitätsänderungen beobachtet werden, bei Spannungen unterhalb von $2,5 V_{eff}$ oder Frequenzen unterhalb von 100 kHz, wie sie später in den Dielektrophorese-Experimenten verwendet wurden. Im Vergleich der verschiedenen Elektrodenformen stellt man fest, dass die zylinderförmigen Elektroden die höchste Temperaturentwicklung zeigen. Dieses Ergebnis lässt sich mit der größeren Elektrodenoberfläche dieser Elektroden erklären, die dazu führt, dass ein größeres Volumen erwärmt wird. Die Wärmeentwicklung an den 50 nm Kegel-Elektroden ist dementsprechend ebenfalls größer als die an den 10 nm Kegel-Elektroden.

Als Schlussfolgerung kann festgehalten werden, dass es an spitzeren Elektroden zu einer geringeren Entwicklung von Wärme in einem Volumen kommt, wodurch Strömungen, die darauf zurückzuführen sind, ebenfalls geringer ausfallen. Außerdem ist der Stress auf die Probe in diesem Volumen durch die geringere Temperatur kleiner.

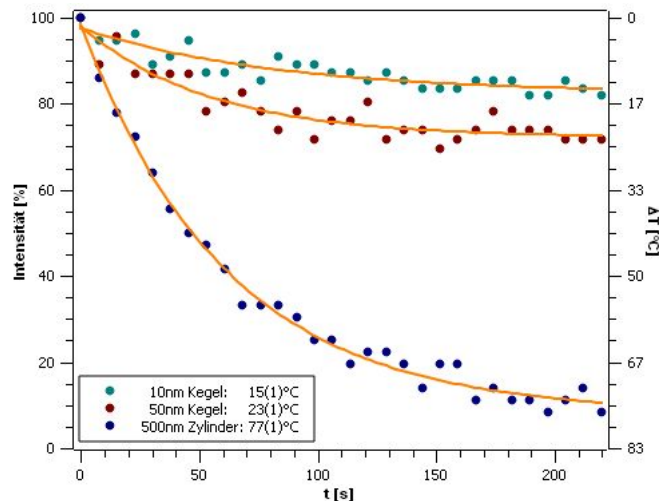


Abbildung 9.24.: Temperaturmessung mit Rhodamin B an Zylinder- und Kegel-Elektroden mit 500 nm, 50 nm bzw. 10 nm Spitzendurchmesser. Für 220 s wurde ein elektrisches Wechselfeld mit $3,2 V_{eff}$ und $1 MHz$ angelegt. Die Verringerung der Fluoreszenzintensität dient hier als Maß für eine Temperaturerhöhung, wobei $-1,2\%$ einer Temperaturerhöhung von $1^\circ C$ nach [113] entspricht. Aus einer exponentiellen Anpassung nach $I = I_0 + Ae^{-\frac{t}{b}}$ konnten die Temperaturerhöhungen von $77(1)^\circ C$, $23(1)^\circ C$ bzw. $15(1)^\circ C$ für die drei Elektrodenformen bestimmt werden.

9.3.2. Dielektrophorese von BSA

Fluoreszenzmarkierte BSA-Moleküle (Durchmesser 4 nm) wurden auf Kegel-Elektroden mit 50 nm Spitzendurchmesser immobilisiert (vgl. Abb. 9.25). Hierfür wurde ein Feld mit $7V_{eff}$ und 10 kHz für 10 Minuten angelegt. Dies resultierte in einer permanenten gleichmäßigen Belegung. Aufgrund der deutlich größeren Spitzen war hier keine Vereinzelnung zu erwarten, sondern eine Belegung mit vielen Molekülen je Elektrode. Es zeigt sich jedoch, dass es prinzipiell möglich ist, Proteine auf Kegel-Elektroden zu immobilisieren.

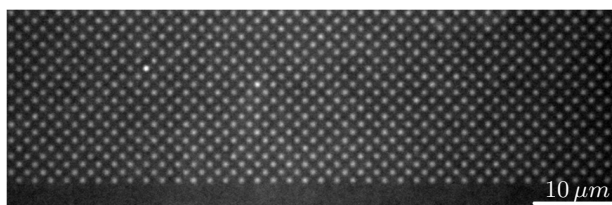


Abbildung 9.25.: Gleichmäßige dielektrophoretische Immobilisierung vieler BSA-Moleküle auf Kegel-Elektroden ($7V_{eff}$; 10 kHz ; 10 Min).

9.3.3. Dielektrophorese von R-PE

R-PE-Moleküle konnten dielektrophoretisch auf Zylinder-Elektroden immobilisiert werden (vgl. Abb. 9.26). Diese bieten wegen deren Größe (500 nm) Platz für viele Moleküle.

Zur Optimierung der Frequenz, Spannung und Experimentdauer wurden die vier Teilarrays verwendet. Hierbei zeigte sich eine günstige Frequenz für pDEP bei $7,5\text{ kHz}$. Bei niedrigeren Frequenzen kommen bereits DC-Effekte zum Tragen und die DEP überwiegt nicht mehr. Bei höheren Frequenzen ist die DEP-Kraft wegen des geringeren Clausius-Mossotti-Faktors kleiner.

Für Spannungen gilt prinzipiell, je höher die Spannung ist, desto höher ist die DEP-Kraft. Es gilt aber auch, dass durch höhere Spannungen Strömungen aufgrund von Joulescher Wärme, Rayleigh-Instabilitäten und AC-EOF groß werden, so dass Moleküle von den Elektroden weggerissen werden.

Weiterhin gilt, dass Elektrolyse mit steigender Spannung zunimmt. Ab $18V_{eff}$ treten Elektrolyseblasen auf. Es sollte also eine Spannung unterhalb dieses Wertes gewählt werden. Bereits bei $15V_{eff}$ kommt es zu einer gleichmäßigen Belegung der Elektroden.

Bezüglich der Zeit eines DEP-Experiments gilt, dass eine Messung so kurz wie möglich durchgeführt werden sollte, um das Austrocknen der Probe zu vermeiden. Gleichzeitig können bei einer längeren Wirkung der DEP-Kraft mehr Teilchen gefangen werden, die sich durch die Brownsche Bewegung und Strömungen in den Bereich begeben, in dem die DEP-Kraft ausreichend zur Immobilisierung ist. Eine Messung, die bis zu 10 Minuten dauert, stellt bei einer Probenkammer, die $5\ \mu\text{L}$ fasst, kein Problem dar. Bei längeren Zeiten benötigt man ein Mittel zur Abdichtung.

Es wurden also als optimale Einstellungen für positive DEP von $0,4\text{ nM}$ R-PE (d.h. 1 Molekül je $1,6\ (\mu\text{m})^3$) an Zylinder-Elektroden $15V_{eff}$, $7,5\text{ kHz}$ und 10 Minuten gefunden (vgl. Abb. 9.27).

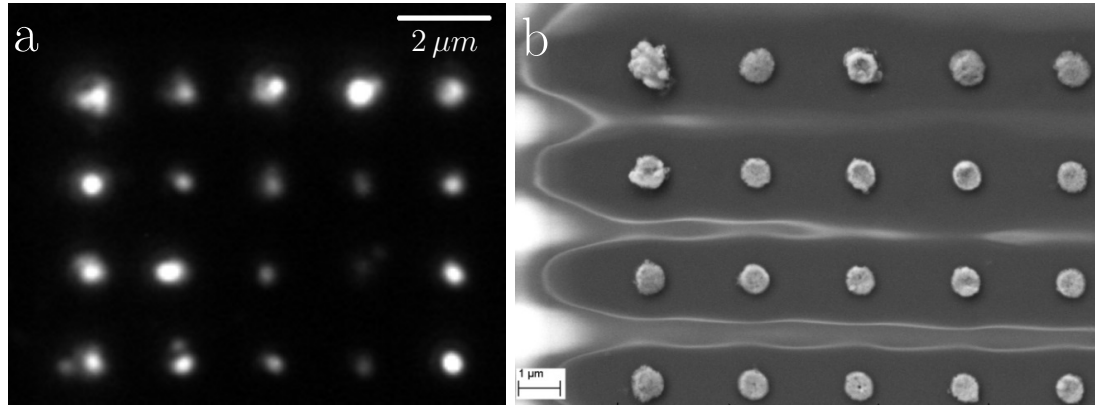


Abbildung 9.26.: Immobilisierung vieler R-PE-Moleküle auf Zylinder-Elektroden. Die Moleküle sind mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (a) sowie im REM (b) nachweisbar. In der REM-Aufnahme wird offensichtlich, dass die Eckelektrode am stärksten besetzt ist. Betrachtet man zudem die einzelnen Elektroden genauer, erkennt man z.T. eine Anhäufung der Moleküle an den Zylinderrändern. Dies entspricht der Verteilung nach den numerischen Berechnungen (vgl. Abb. 8.11) (Feld: $15 V_{eff}$; $7,5 kHz$; 10 Min.).

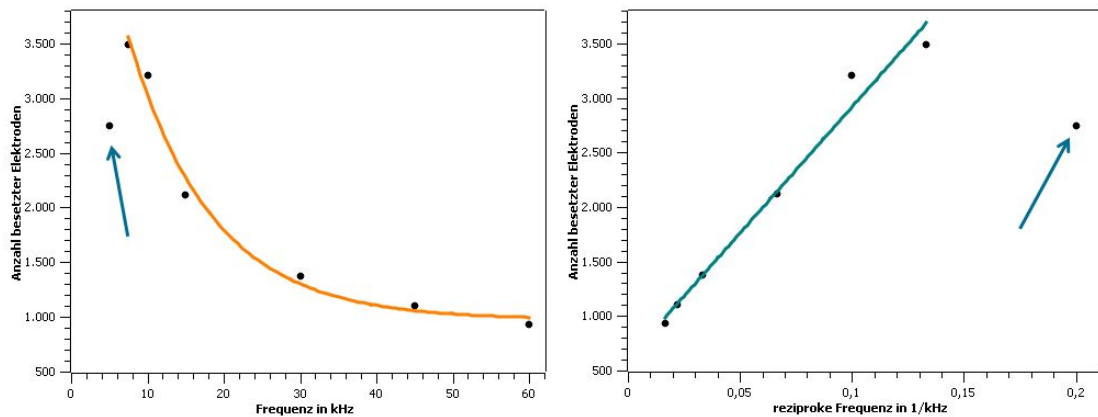


Abbildung 9.27.: Frequenzabhängige Belegung der Elektroden. Hier ist die Anzahl der belegten Elektroden im Bereich der pDEP gegen die Frequenz bzw. reziprok dazu aufgetragen. Eine Kurvenanpassung, bei der der Wert für $5 kHz$ nicht berücksichtigt ist, führt zu $N = 600(100) + 23(2) MHz \cdot \frac{1}{f}$. Das lineare Verhalten lässt vermuten, dass neben Dielektrophorese noch AC-Elektrophorese eine Rolle spielen könnte (vgl. Kapitel 10.2.3). Bei niedrigeren Frequenzen, was einer höheren DEP-Kraft entspricht, werden mehr Elektroden belegt. Wird die Frequenz allerdings zu niedrig (Pfeil), überwiegen andere Effekte, beispielsweise die rasante Bildung von Elektrolyseblasen. Für Experimente mit R-PE wurde daher eine Frequenz von $7,5 kHz$ als optimal angesehen.

9.3.4. Einzelmoleküluntersuchungen an R-PE

Experimentelle Durchführung

Für die Experimente wurden Kegel-Elektroden mit einem Spitzendurchmesser von 10 nm und einer AlSi-Spitzenbeschichtung verwendet.

Vor dem Experiment wurde der unbenutzte Chip gereinigt und von eventuellem fluoreszierenden Staub befreit. Diese Reinigung erfolgte zunächst für 10 Min mit einem N_2 -Plasma durch den Plasma Cleaner in 1 cm Entfernung mit einer Durchflussrate von $5,7 \frac{L}{min}$. Daraufhin wurde der Reinigungspolymer-Lack (*First Contact Lack*) angewendet, abschließend mit Reinstwasser gespült sowie mit N_2 getrocknet. Der Chip wurde so auf einem Objektträger befestigt, dass es möglich war, vollständig silberfrei zu arbeiten und die ITO-Gegenelektrode über ein Kupfer-Podest zu kontaktieren.

Aus einer R-PE Stammlösung wurde eine 1.000fache Verdünnung ($4 nM$) hergestellt. $5 \mu L$ der Lösung wurden in die Probenkammer gegeben und das ITO mit Krokodilklemmen befestigt, so dass die Probenlösung nicht austrocknen konnte. Es wurde ein Feld von $15,1 V_{eff}$ und $7,5 kHz$ für 10 Minuten angelegt. Hierbei kam es zum Teil zur Bildung von Elektrolyseblasen. Für die dielektrophoretische Immobilisierung von R-PE war nach den Ergebnissen der Bead-Experimente bei einem Größenverhältnis von grob 1:1 von Objekt ($11 nm \times (6 nm)^2$) zu Spitzendurchmesser (10 nm) eine Belegung der Elektroden mit bis zu 4 Molekülen zu erwarten.

Nach vorsichtigem Spülen des Chips mit Reinstwasser konnten Fluoreszenzaufnahmen erstellt werden. Hierbei fand die Quecksilberdampfampe Anwendung. Das 100x Luft-Objektiv wurde genutzt. Es hat eine numerische Apertur von 0,9, was nahe dem theoretischen Maximum für Luft-Objektive liegt.

Um eine möglichst hohe Lichtausbeute zu erhalten, wurde neben der *F-View*- auch die lichtempfindlichere *Orca*-Kamera genutzt. Zusätzlich wurde bei der *Orca*-Kamera ein 4×4 Binning eingestellt, bei dem immer die Intensität von 16 Pixeln zusammengefasst aufgenommen wird. Auf diese Weise wird nicht nur eine höhere Empfindlichkeit pro virtuellem Pixel erreicht, sondern insbesondere auch das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert, allerdings zum Preis einer geringeren Auflösung. Da die Elektroden jedoch in einem regelmäßigen Array angeordnet sind, können die Elektrodenpositionen weiterhin gefunden werden. Hier dienen die ohne Binning aufgenommenen Bilder der *F-View*-Kamera zum Vergleich.

Immobilisierung von R-PE

Wie man in Bild 9.28a an der Sammlung der Fluoreszenz auf den Elektroden erkennt, fand eine Immobilisierung von R-PE statt. Diese ist, wie erwartet, besonders stark im CY3-Filter zu erkennen. Gezeigt ist eine Ecke des Arrays. Die 6 äußeren Reihen sind dicht belegt, die nächsten etwa 40 Reihen sind locker belegt. Besonders hell sind die Elektroden in der Nähe der Eckelektrode. Hier herrscht nach den Berechnungen den Gradienten $\nabla|E^2|$ betreffend die stärkste Dielektrophoresekraft, was vermutlich dazu führt, dass Moleküle so stark angezogen werden, dass sie aufeinander immobilisiert werden, wodurch

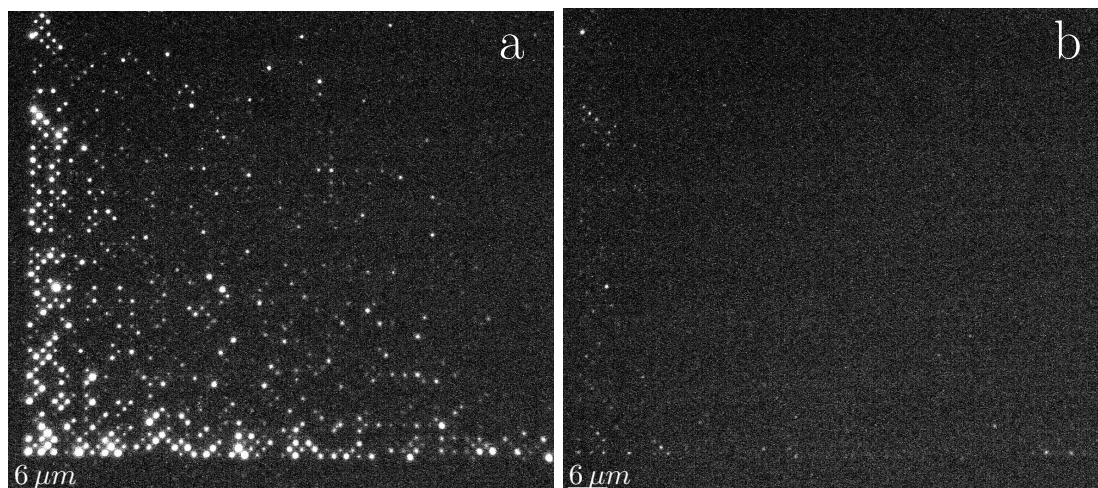


Abbildung 9.28.: Ecke eines Elektroden-Arrays mit 10 nm Kegel-Elektroden, auf dem R-PE-Moleküle immobilisiert wurden: Links ist die erste Aufnahme dieses Arrays, rechts eine Aufnahme nach 226 s Beleuchtung mit einer Quecksilberdampfampe zu sehen. Deutlich zu erkennen ist die Abnahme der Fluoreszenz, die einem Bleichen der gefangenen Moleküle entspricht. (100x Luft-Objektiv, 2 s Belichtungszeit, Quecksilberdampfampe)

sich mehr als 4 Moleküle auf einer Elektrode befinden. Hier stößt man an die Grenzen der Arbeitshypothese, dass ein einmal immobilisiertes Objekt das elektrische Feld abschirmt.

Je weiter sich die Elektroden in der Arraymitte befinden, desto schwächer ist deren Fluoreszenz. Hier könnten wenige oder sogar einzelne Moleküle gefangen worden sein.

Um dies zu überprüfen, wurden Fluoreszenzbilder mit der *Orca*-Kamera bei 4 x 4 Binning über die Zeit aufgenommen, so dass es möglich war, zeitliche Trajektorien zu erhalten. Beobachtet wurde mit dem 100x Luft-Objektiv bei einer Belichtungszeit jedes Bildes von 500 ms und einer ebenso langen Zeit, in der das Array nicht belichtet wurde, wodurch eine Intervallzeit von 1 s zustande kommt. Insgesamt wurde die Fluoreszenz über 5 Minuten verfolgt. Nach der Beleuchtung erkennt man deutliches Bleichen der belegten Elektroden (vgl. Bild 9.28b), was bedeutet, dass tatsächlich R-PE und nicht Silber immobilisiert wurde.

Verfolgt man die Fluoreszenz über die Zeit, so erkennt man an der stark besetzten Ecke-elektrode ein fast kontinuierliches Bleichen. Auf die Anzahl der Moleküle lässt sich durch Rückrechnung der Fluoreszenzintensität einzelner Moleküle schließen (vgl. Abb. 9.33). Die maximale Fluoreszenzintensität von 300 a.u. (vgl. Abb. 9.30a) an der Ecke-elektrode entspricht vermutlich einer Besetzung mit 10-15 R-PE Molekülen. Bei so vielen Objekten sind keine Stufen in der Fluoreszenz erkennbar.

Betrachtet man Elektroden nahe der Ecke-elektrode, die immer noch hell erscheinen, so erkennt man ebenfalls ein Bleichen. In diesem Fall sind die Elektroden aber mit wenigen R-PE-Molekülen belegt. Hier erkennt man die Abnahme der Fluoreszenz in Stufen. In Abb. 9.30b erlischt gleichzeitig die Fluoreszenz mehrerer Moleküle. Zunächst

erkennt man, nach Abziehen eines Backgrounds, die Fluoreszenz bei 98(1) a.u., was einer Belegung mit fünf Molekülen entspricht. Drei dieser Moleküle bleichen aus, was zu einer Fluoreszenz von 32(2) a.u. führt. Eine bessere zeitliche Auflösung sollte hier zu Zwischenstufen führen. In Abb. 9.30c nimmt die Fluoreszenzintensität in Stufen gleicher Höhe (hier 21(1) a.u.) nach und nach ab. Man erkennt das Bleichen von zwei Molekülen nacheinander.

Untersucht man das Fluoreszenzverhalten von Rand-Elektroden, die weiter von der Array-Ecke entfernt sind, so erkennt man auch hier die Belegung mit wenigen R-PE-Molekülen. In Abb. 9.32a ist eine Trajektorie einer Elektrode zu erkennen, die mit mehreren R-PE-Molekülen belegt ist. Hier erkennt man ein Blinken der Objekte, was wie das Bleichen in Stufen der Trajektorie zum Ausdruck kommt. In den ersten 50 s trägt lediglich die Fluoreszenz weniger (zwei) Moleküle zum Signal von 29(3) a.u. bei. Zwischen 50 s und 120 s fluoreszieren alle (fünf) Moleküle mit 87(3) a.u. und nach dieser Zeit fluoresziert kein Molekül mehr.

In Abb. 9.32b ist eine Trajektorie einer besetzten Elektrode gezeigt, bei der man ein Blinken mit 59(5) a.u. misst. Hier ist die Elektrode vermutlich mit drei Molekülen besetzt, die gleichzeitig zwischen einem An- und Aus-Zustand wechseln.

Betrachtet man die in Abb. 9.31 blau markierte Elektrode, so erkennt man, dass sie bei 34(2) a.u. fluoresziert, was nach 9.33 einer Belegung mit zwei R-PE-Molekülen entspricht. In Abb. 9.32 ist ihre zeitliche Trajektorie gezeigt, bei der das Bleichen auf einer Elektrode als Stufe zu erkennen ist.

Um die Anzahl der Objekte je Elektrode zu untersuchen, ist es notwendig, Statistik zu betreiben. Wertet man verschiedene fluoreszierende Elektroden analog aus, so erhält man jeweils Graphen mit unterschiedlichen Fluoreszenzstufen in den Trajektorien.

In Abb. 9.33 wurden die Werte sortiert als Punkte nebeneinander aufgetragen, die man erhält, wenn man eine Gerade mit der Steigung 0 den Stufen anpasst. Man erkennt hier, dass diese Punkte wiederum in Stufen angeordnet sind. An jede dieser Stufen lässt sich ebenfalls eine Gerade der Steigung 0 anpassen. Auf diese Weise erhält man einen gemittelten Wert der Fluoreszenzintensität einer Stufe.

Man erhält so für den Aus-Zustand 0(1), da ein Background von den Werten abgezogen wurde. Die weiteren Stufen haben die Werte 15(1); 34(1); 54(2) und 91(1). Davon ausgehend, dass jeweils die gleiche Anzahl an Molekülen die gleiche Fluoreszenzintensität aufweist, sollte der Abstand dieser Stufen zueinander konstant sein. Die Differenz der letzten beiden Werte ist etwa doppelt so groß wie die anderen Stufenabstände. Nimmt man an, dass hier eine Stufe übersprungen wurde, erhält man einen mittleren Abstand der Fluoreszenzintensität je Molekül von 17(1).

Dieser regelmäßige Abstand bestätigt, dass es sich hierbei um die Fluoreszenz der jeweils gleichen Anzahl von Molekülen handelt. Damit entsprechen die Stufen einem Blinken von einem, zwei, drei bzw. fünf Molekülen. Es war also möglich, einige der Elektroden mit wenigen bzw. einzelnen Molekülen zu belegen und so das Ziel dieser Arbeit zu erreichen.

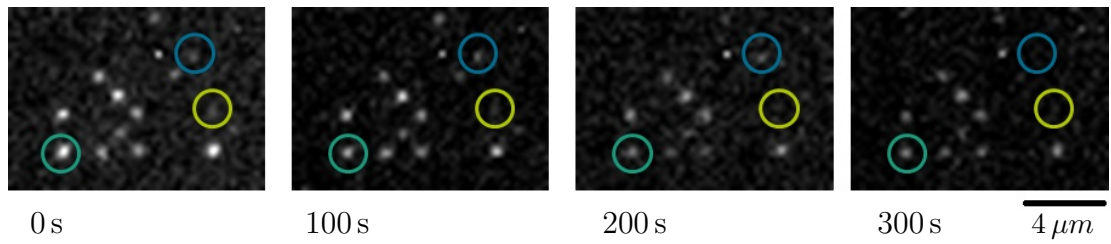


Abbildung 9.29.: Gezeigt sind Fluoreszenzaufnahmen derselben Position nach 0 s, 100 s, 200 s und 300 s. Die drei farblich markierten Elektroden entsprechen den Trajektorien derselben Farben in Abb. 9.30. Die Aufnahmen wurden mit der *Orca*-Kamera mit einem 4 x 4 Binning aufgenommen (100x Luft-Objektiv, 500 ms Belichtungszeit, Quecksilberdampflampe).

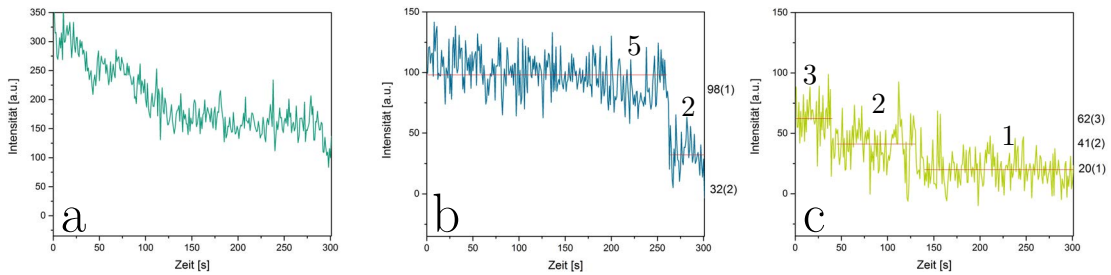


Abbildung 9.30.: Zu den drei markierten Elektroden in Abb. 9.29 gehörige Trajektorien. Die Eckelektrode (a) ist mit 10-15 R-PE Molekülen belegt. Diese bleichen über die Zeit. Da hier so viele Moleküle durch den besonders hohen $\nabla|E^2|$ immobilisiert wurden, sind keine Stufen in der Fluoreszenz zu erkennen. Die beiden anderen Graphen (b, c) zeigen das Fluoreszenzverhalten von Elektroden, die mit 5 bzw. 3 R-PE-Molekülen belegt sind. Zunächst tragen alle Moleküle zur Fluoreszenz bei, bis schließlich Moleküle bleichen, was als Stufen in der Fluoreszenzintensität zu erkennen ist. (Von den Kurven wurde ein Background abgezogen, so dass die Intensität ohne Fluoreszenz bei 0 liegt.)

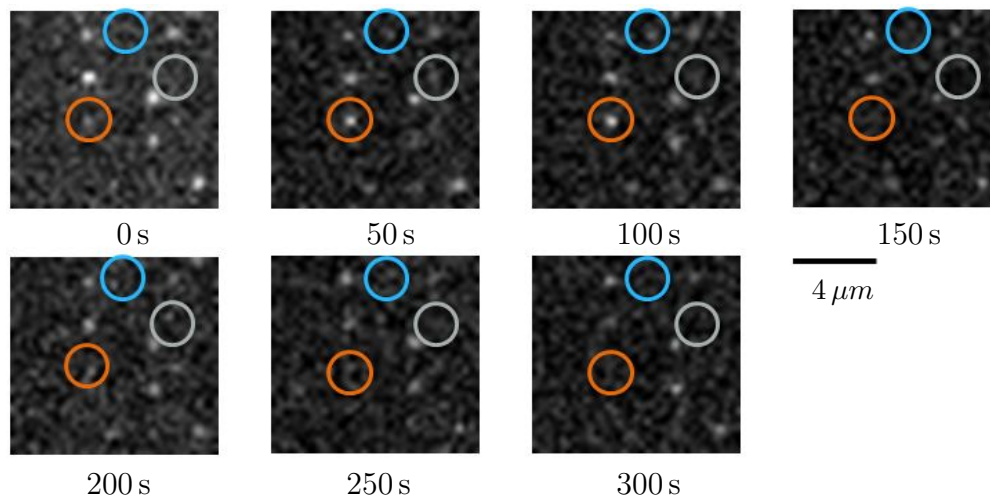


Abbildung 9.31.: Fluoreszenzaufnahmenfolge nach 0 s, 50 s, 100 s, 150 s, 200 s, 250 s und 300 s. Die drei eingekreisten Elektroden zeigen einen zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität, wie in Abb. 9.32, gekennzeichnet durch die gleiche Farbe, dargestellt. Bereits in der Fluoreszenzaufnahme erkennt man ein Blinken. (*Orca*-Kamera, 4x4 Binning, 100x Luft-Objektiv, 500 s Belichtungszeit, Quecksilberdampfampe).

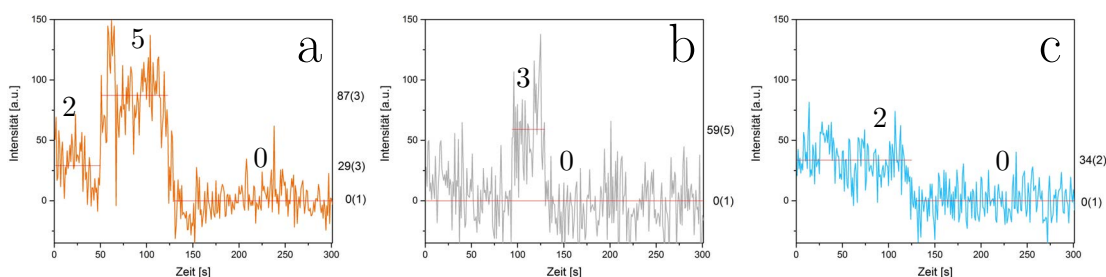


Abbildung 9.32.: Die drei Trajektorien entsprechen den Elektroden in Abb. 9.31. Zu sehen sind zwei Trajektorien von blinkenden Molekülen (a, b) und eine Trajektorie zweier Moleküle, die über die Zeit gebleicht sind (c). (Kurven nach Backgroundabzug)

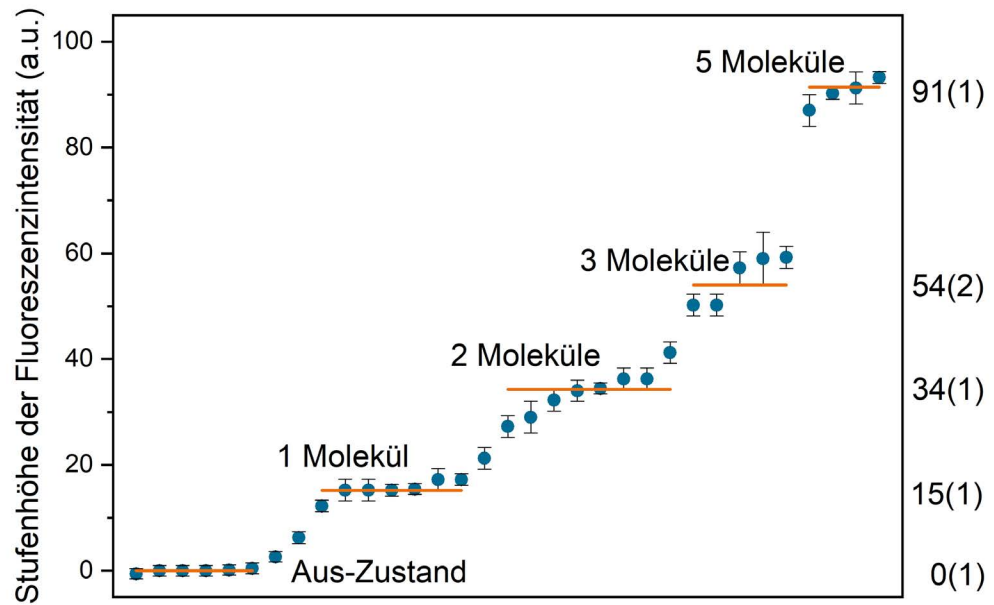


Abbildung 9.33.: Es wurden 33 blinkende Stufen von Molekülen unterschiedlicher Elektroden ausgewertet und die Fluoreszenzintensität der einzelnen Stufen gemittelt. Diese Werte wiederum wurden als Punkte sortiert aufgetragen. Hier erkennt man Stufen der Fluoreszenzintensität. Jede dieser Stufen entspricht einer diskreten Anzahl an fluoreszierenden Molekülen. Anhand dieser Stufen lässt sich die Fluoreszenzintensität eines einzelnen Moleküls bestimmen und so durch Rückrechnung darauf schließen, wie viele Moleküle zu dem Zeitpunkt einer Aufnahme auf einer Elektrode fluoreszieren.

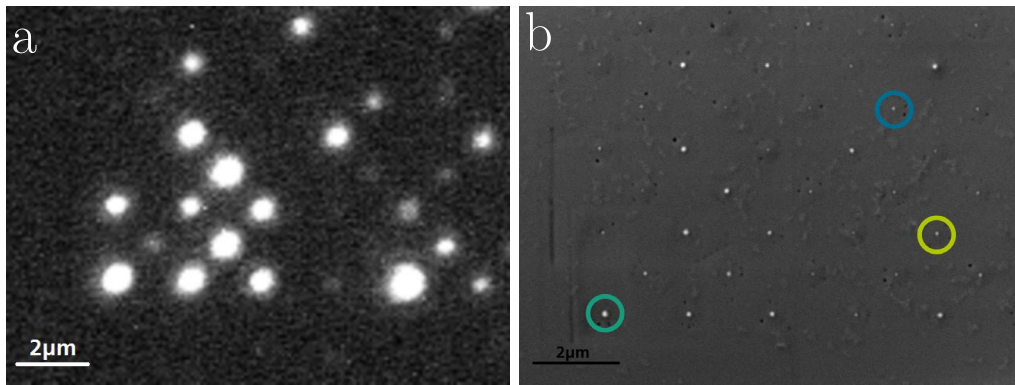


Abbildung 9.34.: Kolokalisierung von Fluoreszenz und REM: R-PE Moleküle wurden auf 10 nm Kegel-Elektroden immobilisiert. Die Arrayecke wurde hierbei wie zu erwarten am stärksten belegt. Am Arrayrand zeigt sich insgesamt die meiste Fluoreszenz (a), was darauf schließen lässt, dass dort mehrere R-PE-Moleküle gefangen wurden. Es war möglich, eine Kolokalisierung der belegten Elektroden mit dem REM (b) zu erhalten sowie EDX-Messungen an den belegten Elektroden durchzuführen. Die eingekreisten Elektroden entsprechen den Trajektorien der gleichen Farbe aus Abb. 9.32 mit etwa 18 (türkis), 5 (blau) bzw. 3 (grün) fluoreszierenden R-PE-Molekülen. Da 3 R-PE-Moleküle mit einem Diskus-Durchmesser von 11 nm mit dem REM noch darstellbar sind, lässt sich ableiten, dass dessen Auflösung für unbehandelte biologische Proben bei mindestens 33 nm liegt. a) Fluoreszenz: 100x Luft-Objektiv; 2 s Belichtungszeit, b) REM: EHT=3 kV; $I_{Probe} = 30 \text{ pA}$; WD=5,5 mm

Überprüfung mit REM und EDX

Zur Überprüfung, ob auf den Elektroden tatsächlich R-PE immobilisiert wurde und dort blinkt, und nicht, wie in früheren Experimenten, Silber-Nanopartikel, wurde eine EDX-Analyse durchgeführt.

Die Kegel-Elektroden lassen sich im Vergleich zu anderen Strukturen eher mühsam im REM finden. Es wurden daher zuerst Aufnahmen gemacht, die nicht den für die EDX optimalen entsprechen. Zum Finden der Kegel-Elektroden eignen sich die Einstellungen 3 kV; 150 pA und ScanSpeed 6. Im Vergleich zu Elektroden, die mit Silber belegt sind, waren die Objekte hier auf den Elektroden bei diesen Einstellungen eher dunkel. In der EDX schließlich war kein Silberpeak feststellbar. Das Fehlen des Silberpeaks lässt darauf schließen, dass hier nicht Silber fluoresziert, sondern die Fluoreszenz tatsächlich vom R-PE herrührt.

Die Elektroden sind also belegt, fluoreszieren und blinken, d.h. es wurde tatsächlich R-PE immobilisiert und die Positionen, die blinken, tragen wenige oder zum Teil einzelne R-PE Moleküle.

Teil IV.
Diskussion

10. Parallele Einzelmolekül-Immobilisierung mittels Dielektrophorese

Seit der Jahrtausendwende hat sich die Technik der Dielektrophorese zu einem wichtigen Werkzeug für die Manipulation von Mikro- und Nanoobjekten entwickelt [48]. Sie wird hauptsächlich zur Aufkonzentration [76], zur Trennung [82, 5, 25] oder zur Immobilisierung [51] genutzt. Ihre Verwendung zur Immobilisierung bietet den Vorteil, dass sie im Vergleich zur Diffusion relativ schnell ist [46] und ohne chemische Modifizierungen sowohl der Probe als auch der Oberfläche auskommt [70]. Objekte werden dabei permanent oder temporär festgehalten und zudem parallel zu den Feldlinien ausgerichtet [71].

Die Dielektrophorese wirkt auf alle polarisierbaren Partikel, ist also prinzipiell auf alle kleinen biologischen Objekte [131, 68] wie Proteine [89, 90], Enzyme [69], DNA [24], Antikörper [94], Viren [52], Bakterien [15], Zellen [36, 59], aber auch auf andere Nanopartikel [78] wie beispielsweise Kohlenstoffnanoröhren [75], Beads [19], Silber- [74] oder Gold-Nanopartikel [72, 17] zerstörungsfrei anwendbar.

Mit Hilfe der Dielektrophorese kann bis zum Level von Einzelmolekülen [31] gelangt werden. Vergleichsweise große DNA-Moleküle lassen sich einzeln fangen und nachweisen [67, 126]. Die Immobilisierung kleinerer Moleküle wird hingegen erst bei kleineren Dimensionen der Elektroden realisierbar. Hier können entweder Lochelektroden oder besonders spitze Elektroden verwendet werden [132]. Mit letzteren kann bei relativ geringen Spannungen gearbeitet werden, da ein hoher Wert für $\nabla|E^2|$ auftritt [56]. Hier konnten zunächst nur einzelne [47] oder einige wenige Objekte [74, 129] gleichzeitig festgehalten werden.

Hochparallele Einzelmolekül-Untersuchungen können durch die Verwendung von Arrays durchgeführt werden. In Locharrays [109, 84, 39, 108] wird die Vereinzelnung durch die verwendete Verdünnung der Probe in Zusammenhang mit der Größe der Container bestimmt. Eine Kombination der Locharray-Methode mit Dielektrophorese beschreiben Barik et al. [11], hier allerdings nicht auf Einzelmolekül-Level.

Werden spitze Elektroden in einem Array angeordnet, so ergibt sich ebenfalls die Möglichkeit eines parallelen Ansatzes, wodurch tausende Experimente gleichzeitig stattfinden können, was neben einem hohen Durchsatz auch bedeutet, dass statistische Aussagen getroffen werden können. In einem parallelen Ansatz konnte allerdings bisher nur eine große Anzahl von Objekten je Elektrode immobilisiert werden [111, 128, 65, 10].

Hier schließen die eigenen Ergebnisse eine Kenntnislücke bezüglich der zur dielektrophoretischen Vereinzelnung benötigten Größenverhältnisse [62] und der Einzelmolekül-Immobilisierung in Arrays zu einigen tausend Elektroden. Durch die hier genutzten spitzen Elektroden und die dadurch entstehenden größeren Gradienten werden so parallele Einzelmoleküluntersuchungen realisierbar.

10.1. Numerische Simulationen

Vor den Messungen wurden zunächst numerische Simulationen durchgeführt, um herauszufinden, welches Elektrodendesign für die Immobilisierung von Molekülen mittels Dielektrophorese optimal ist. Hierbei wurde der räumliche Verlauf des Gradienten $\nabla|E^2|$ untersucht, da dieser proportional zur Dielektrophoresekraft ist (vgl. Glg. 4.6) und daher einen entscheidenden Einfluss auf die Experimente hat. Aus den Rechnungen konnte der Einfluss des Elektrodendesigns bestimmt werden. Diese Berechnungen wurden für ein elektrostatisches Feld durchgeführt.

Spitze Elektroden bilden im Vergleich zu stumpfen Elektroden einen größeren maximalen Wert von $\nabla|E^2|$ aus. Dieser Wert ist zudem abhängig vom Abstand zur Gegenelektrode. Hier gilt, dass eine nähere Gegenelektrode einen deutlich höheren Wert zur Folge hat als eine entfernte Gegenelektrode. Auch eine die Elektroden umgebende isolierende Schicht wirkt sich vergrößernd auf den Gradienten aus. Betrachtet man die Elektroden relativ zur umgebenden isolierenden Oberfläche, so stellt man fest, dass Elektroden, die mit der Oberfläche abschließen oder versenkt sind, ebenfalls einen höheren Gradienten zeigen als die, die aus der Schicht heraus schauen. Bei versenkten Elektroden kommt es zudem zu Maxima des Gradienten an den Lochrändern. Dieser Effekt wird beispielsweise bei Locharrays [11] ausgenutzt.

Betrachtet man eine einzelne Elektrode, so ist der Wert am Rand der Elektrode am höchsten. Ebenfalls ist bei einem ganzen Elektroden-Array der Wert an den Randlelektroden am höchsten und der der Ekelektroden maximal. Die größte Dielektrophoresekraft wirkt also in Richtung der Ränder.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass im Experiment die äußeren Elektroden die größte Kraftwirkung ausüben und dementsprechend als Erstes besetzt werden bzw. mit den meisten Objekten belegt werden sollten. Allerdings müssen auch andere Feldeffekte berücksichtigt werden. Die Dielektrophoresekraft wirkt zwar zu den Rändern, betrachtet man aber den AC-EOF oder Rayleigh-Instabilitäten, so erzeugen diese eine Strömung in Richtung der Elektrodenmitte. Diese Effekte konkurrieren somit bzw. ergänzen sich. Bezogen auf ein gesamtes Array ist zu erwarten, dass nach der Belegung der Randlelektroden eine Strömung Richtung Arraymitte dazu führt, dass dort weitere Elektroden besetzt werden. Auf den Elektroden selbst ist eine Besetzung am Elektrodenrand oder in der Mitte zu erwarten.

Im Fall der Zylinder-Elektroden mit mehreren Arrays erkennt man schon in der Berechnung, dass auch an Elektroden eigentlich inaktiver Arrays lokale Maxima des Gradienten auftreten. Im Experiment ist hierdurch eine Belegung insbesondere von deren Randlelektroden zu erwarten.

Diese Erwartungen aus den numerischen Simulationen werden durch die Experimente bestätigt (vgl. Kapitel 9.1.4).

Aufgrund der großen Abstandsabhängigkeit zur Gegenelektrode sollten sich bereits geringe Änderungen einer Spacerfolie deutlich dahingehend auswirken, welche Spannungen für eine erfolgreiche Immobilisierung in Frage kommen. Im Fall der ITO-Gegenelektrode wurden immer die gleichen Laminierfolien mit $80\ \mu\text{m}$ Dicke verwendet, aber bereits eine abdichtende Vaselineschicht sollte einen deutlichen Einfluss zeigen. Auf diese Wei-

se ist eine exakte Reproduzierbarkeit eines Experiments schwierig. Interessant ist der Vergleich zu den Elektroden mit integrierter Gegenelektrode in einem, vom Hersteller angegebenen, immer gleichen Abstand zur Elektrodenspitze von 250 nm , die nach den Berechnungen bei einer deutlich geringeren Spannung höhere Werte des $\nabla|E^2|$ und somit pDEP zeigen sollten. Tatsächlich zeigt sich im Experiment, dass dies nicht der Fall ist, sondern erst bei höheren Spannungen und längerer Experimentdauer bessere Ergebnisse erreicht werden. Eine Erklärung liegt hier vermutlich im Elektrodendesign selbst. Zwar erzeugt dieses einen höheren Wert für die Dielektrophoresekraft, gleichzeitig sind die Elektrodenspitzen in Vertiefungen versenkt, so dass das elektrische Feld nur wenig aus der Chipoberfläche in das Probenvolumen hineinragt. Dies führt dazu, dass die Beads aus der Probenflüssigkeit diesen Raum erst durch Diffusion erreichen müssen, bevor sie dielektrophoretisch angezogen werden können.

Es wurde auch der Einfluss eines Beads an einer Elektrode untersucht. Dieser Einfluss auf die Form des Feldes ist relativ gering, aber das immobilisierte Bead belegt den Platz des höchsten Gradienten und verhindert dadurch rein geometrisch den Zugang weiterer Objekte, was der anfangs formulierten Arbeitshypothese entspricht.

Die numerischen Simulationen hatten Einfluss auf das Design neuer Elektroden. Es veränderte sich über die Zeit dieser Arbeit. So wurde beispielsweise der Radius der Zylinder-Elektroden von 900 nm auf 500 nm reduziert und die Elektroden statt in einem Array mit 100.000 Elektroden in vier einzeln ansteuerbaren Arrays mit je etwa 6000 Elektroden angeordnet. Auch die Idee zu Elektroden mit integrierter Gegenelektrode entwickelte sich erst im Laufe der Arbeit. Kegel-Elektroden wurden mit unterschiedlichen Spitzendurchmessern und -beschichtungen hergestellt. Diese Beschichtungen mit verschiedenen Siliciden zeigen im Experiment ein Verhalten, dass eine Bevorzugung der CoSi-beschichteten Elektroden rechtfertigt. Hier allerdings bewegt sich die Herstellung an der Grenze des technisch machbaren, weshalb diese Unterschiede vermutlich auf voneinander abweichende Herstellungsprozesse zurückzuführen sind.

10.2. Nano-Dielektrophorese

10.2.1. Nachweis der immobilisierten Objekte

Der Nachweis kleiner immobilisierter Objekte kann über verschiedene Mikroskopiemethoden erfolgen. In dieser Arbeit wurden hierfür Fluoreszenz-, Raster-Elektronen- und Raster-Kraft-Mikroskopie verwendet.

Die Fluoreszenz-Mikroskopie erweist sich als am einfachsten anwendbar. Durch sie können Experimente in Echtzeit beobachtet werden. Dabei können sowohl permanent als auch reversibel immobilisierte Objekte untersucht werden. Ein Nachteil ist allerdings, dass nur fluoreszierende oder fluoreszenz-markierte Objekte auf diese Weise sichtbar werden. Zudem liegt gerade bei geringen Mengen, die nachgewiesen werden sollen, ein Problem in der geringen Helligkeit der Probe bzw. der benötigten hohen Empfindlichkeit der verwendeten Kamera. Hier spielen insbesondere der Dunkelstrom und das Ausleserauschen eine Rolle (vgl. Anhang Kapitel B.3). Für Untersuchungen an Einzelmolekülen wurde daher in dieser Arbeit die relativ empfindliche *Orca flash*-Kamera von HAMA-

MATSU genutzt. Auch die Verwendung von Objektiven mit hoher numerischer Apertur wirkt sich positiv aus.

Aber das Signal-Rausch-Verhältnis wird auch durch das Experiment selbst beeinflusst. Bei der Beobachtung reversibel festgehaltener Objekte stört die Probenlösung mit fluoreszierenden Objekten. Um eine Beobachtung zu ermöglichen, musste die Konzentration der Probe optimiert werden. Bei der Betrachtung permanent immobilisierter Objekte kann dagegen der Chip vorsichtig mit Reinstwasser gespült werden, so dass nur die Objekte auf der Chipoberfläche zum Signal beitragen. Hier wirken sich eher Reflexionen an den Elektroden oder Streulicht nachteilig aus.

Für den Nachweis weniger permanent wie auch temporär immobilisierter Objekte wurde eine Histogramm-Methode genutzt. Hierbei erweist sich die Darstellung als abhängig von der gewählten Intervallbreite, was bei einer kleinen Anzahl auszuwertender Punkte stark ins Gewicht fällt, hier bei den zahlreichen besetzten Elektroden aber weniger. Eine stärkere Auswirkung hat die Art der Gewinnung der Daten aus den Fluoreszenzaufnahmen. Es wurde versucht, die Rasterstruktur der Elektroden-Arrays auszunutzen. Dazu wurden verschiedene automatische Methoden untersucht. Diese scheiterten aber daran, dass sie entweder nicht mit einer Abweichung vom Raster, wenn das Objekt nicht mittig auf der Elektrode immobilisiert wurde, oder mit einer Abweichung in der Größe der Objekte umgehen konnten. Als hilfreich hat sich hier die *Find-Maxima*-Funktion in *ImageJ* erwiesen. Da hier allerdings jeweils nur das lokale Maximum betrachtet wird, wurden die Histogramme in dieser Arbeit meist relativ zeitaufwendig über manuell gelegte ROIs (*Regions of interest*) ermittelt.

Einen weiteren Effekt, den es zu bedenken gilt, stellt das Bleichen der Probe mit der Zeit dar, insbesondere bei intensiver Beleuchtung. Zur Unterscheidung, ob ein Signal von einer biologischen Probe (die bleicht) oder einer metallischen (die nicht bleicht) kommt, hat sich dieser Effekt aber als hilfreich erwiesen. Zudem konnte er beim Nachweis der Belegung mit Einzelobjekten genutzt werden, da hier das Bleichen in eindeutigen Stufen geschieht. Diese Endzustands-Stufe wiederum wurde für die Korrektur des Hintergrunds verwendet, so dass Stufen in blinkenden Objekten einer konkreten Anzahl an Objekten zugeordnet werden konnten.

Bei dem Nachweis der Vereinzelung von R-PE mittels Blinken erkennt man, dass zu bestimmten Zeiten mehrere Proteine gleichzeitig fluoreszieren. Um wie viele Objekte es sich handelt, lässt sich erst in Kombination mit statistischen Aussagen feststellen. Diese können zum einen aus einer längeren Beobachtung erhalten werden, indem die einzelnen Stufen eines blinkenden Objekts miteinander verglichen werden. Zum anderen bietet die Methode der parallelen Immobilisierung auf den Elektroden des Arrays hier die Möglichkeit, verschiedene Zeit-Trajektorien zueinander in Beziehung zu setzen. Eine höhere zeitliche Auflösung als 500 ms würde hier helfen, damit das Blinken nicht als gleichzeitig aufgelöst wird. Dies würde allerdings zu einem höherem Rauschen führen, wodurch Konzepte wie z.B. das *Hidden Markov Model* [112, 83] genutzt werden müssten, um aus dem Rauschen die einzelnen Stufen zu ermitteln. Dies wird insbesondere in dem Moment interessant, wenn auf jeder Elektrode nur exakt ein Objekt vorhanden wäre. Eine optimale Immobilisierung von jeweils einem Objekt je Elektrode ist für R-PE bei Elektroden mit etwa 5 nm Durchmesser zu erwarten.

Hier allerdings stößt man an die Grenze der Arbeitshypothese, die besagt, dass das erste immobilisierte Objekt bei richtiger Wahl der Parameter ein Feld derart abschwächt, dass kein weiteres an derselben Elektrode immobilisiert wird. Für das Modellsystem *Bead* trifft die Arbeitshypothese zu, doch R-PE-Moleküle werden bei hohen Gradienten $\nabla|E^2|$ teilweise übereinander immobilisiert. Vermutlich führt eine weitere Optimierung bei spitzeren Elektroden hier ebenfalls zu einer Bestätigung der Arbeitshypothese.

Eine andere Methode zum Nachweis festgehaltener Objekte bietet das AFM. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Fluoreszenz-Mikroskopie ist die hohe räumliche Auflösung, durch die kleinste Objekte nachweisbar werden. Über die Höhe der auf den Elektroden befindlichen Objekte lässt sich im Vergleich mit der Objektgröße zudem grob die Anzahl mehrerer Objekte bestimmen. Nachteilig wirkt sich hier allerdings aus, dass eine Messung sehr zeitintensiv ist und dass nur permanent immobilisierte Objekte nachgewiesen werden können. Zudem kann die Probe je nach Betriebsmodus des AFM beschädigt werden.

Eine weitere Nachweismethode ergibt die Nutzung des REMs. Diese Methode hat ebenfalls eine höhere räumliche Auflösung als die Fluoreszenz-Mikroskopie, ist aber deutlich weniger zeitintensiv als eine AFM-Messung. Bei dem hier verwendeten REM können nichtleitende Objekte bis herab zu etwa 30-50 nm Größe nachgewiesen werden. Ein Weg, die Nachweisgrenze weiter zu senken, wäre eine Bedampfung mit Gold, wobei sich allerdings die Gold-Schichtdicke beim Nachweis von Einzelmolekülen nachteilig auswirkt. Zudem wäre eine spätere Verwendung der Probe nicht mehr so leicht möglich. Allerdings zeigen sich auch ohne Bedampfung nach einer REM-Messung Kohlenwasserstoffablagerungen auf den Oberflächen. Nichtleitende und insbesondere biologische Proben mit dem REM darzustellen erweist sich als schwierig. Hier muss mit niedrigen Beschleunigungsspannungen und niedrigen Probenströmen gearbeitet werden, um eine Aufladung der Probe zu vermeiden. Kleine Objekte lassen sich zudem deutlicher bei geringeren Arbeitsabständen darstellen.

Durch eine REM-Messung kann die Verteilung der Objekte auf der Elektrode bestimmt und deren Anzahl angegeben werden. Da allerdings auch hier permanent immobilisierte Objekte notwendig sind, kann nur an diesen mittels REM die Vereinzelnung nachgewiesen werden. Auf diese Weise können mit dem REM abhängig von dessen Auflösungsgrenze Einzel-Beads, aber keine Einzel-Proteine nachgewiesen werden. Die Messungen zeigen jedoch, dass drei übereinander liegende R-PE-Moleküle noch auflösbar sind.

Ein großer Vorteil in der Verwendung des REMs liegt zudem in der zugehörigen EDX-Einrichtung durch die überprüft werden kann, ob eine immobilisierte Probe tatsächlich die elementare Zusammensetzung hat, die dem Objekt entspricht. Erst durch EDX-Messungen ist das Problem der gleichzeitigen Immobilisierung von Silberpartikeln bemerkt worden, woraufhin jede Messung diesbezüglich überprüft wurde.

Es können unterschiedliche Mikroskopie-Methoden komplementär angewendet werden, um ein vollständigeres Bild zu erhalten. Bei solchen Kolokalisationsmessungen zwischen Fluoreszenz und REM konnte eine deutliche Korrelation festgestellt werden, wodurch sich die Ergebnisse gegenseitig bestätigt haben.

10.2.2. Störeffekte und Optimierung

Neben dem Elektrodendesign beeinflussen verschiedene andere Parameter die dielektrophoretische Immobilisierbarkeit.

Aus der Theorie erhält man die Gleichung für F_{DEP} (Glg. 4.6), nach der die Dielektrophoresekraft proportional zu $\nabla|E^2|$ ist und damit auch zu U^2 . Die Theorie berücksichtigt allerdings die elektrochemische Doppelschicht nur bedingt [98]. Zudem verändert sich der Clausius-Mossotti-Faktor, wenn das verwendete Partikel eine Ladung bzw. einen permanenten Dipol trägt. Hier wird zwar ebenfalls ein Dipol induziert bzw. verstärkt, aber dies entspricht nicht mehr den Voraussetzungen, unter denen der Standard-CM-Faktor hergeleitet wird. Pethig [100] argumentiert, dass beispielsweise bei Proteinen hierdurch eine Abhängigkeit von U statt U^2 auftritt. Weiterhin kommt durch den Clausius-Mossotti-Faktor die Frequenz in die Gleichung für F_{DEP} sowie die Leitfähigkeit und die Permittivität des verwendeten Mediums. Auch die Eigenschaften (Radius, Permittivität, Leitfähigkeit) des zu immobilisierenden Partikels und des Mediums haben Einfluss auf die Dielektrophoresekraft.

Betrachtet man die Dielektrophoresekraft losgelöst vom Experiment, so sollte diese demnach bei der Immobilisierung von Polystyrolbeads oder Proteinen in Reinstwasser (mit $0,3 \frac{\mu S}{cm}$) maximal werden für möglichst **niedrige Frequenzen, hohe Spannungen und spitze Elektroden**. Nach den Ergebnissen der numerischen Simulationen sollten diese Elektroden von einer isolierenden Schicht umgeben sein und mit der Oberfläche dieser Schicht abschließen.

Führt man nun aber ein solches Experiment durch, treten Störeffekte auf. Betrachtet man Partikel in der Größenordnung im Nanometerbereich, so spielen Kräfte der Brownschen Bewegung eine wesentliche Rolle. Zunächst muss die Dielektrophoresekraft größer sein als die der Brownschen Bewegung. Schon um die aufzuwendenden Spannungen in einer realisierbaren Größenordnung zu halten, wird es daher notwendig, die Dimensionen der verwendeten Elektroden herabzusetzen.

Bei niedrigen Frequenzen treten zudem aber gerade an Elektroden mit hohen Feldstärken $|E|$ bzw. Gradienten $\nabla|E^2|$ verstärkt Bläschen durch die Elektrolyse von Wasser in O_2 und H_2 auf. Auch ist auffällig, dass es bei einer gleichzeitigen Immobilisierung von Silber-Partikeln zu einer vermehrten Bläschenbildung kommt, was vermutlich katalytisch bedingt ist [27]. Eine Änderung des Mediums könnte diese Bläschenbildung vermeiden, was allerdings Auswirkungen auf den Clausius-Mossotti-Faktor hätte. Auch die Verwendung eines Durchfluss-Systems würde die Bläschenbildung reduzieren, da es nicht zur Sammlung einer ausreichenden Menge an Ionen an den Elektroden kommen würde. Eine andere Möglichkeit wird in [91] diskutiert. Neinrinck et al. verwenden hier asymmetrische elektrische Wechselfelder, d.h. Felder, bei denen in einer Periode die unterschiedlichen Polaritäten nicht gleich lange auftreten, um die Wasser-Elektrolyse zu verhindern. Aber bereits der Übergang zu höheren Frequenzen führt zu einer deutlich reduzierten Bläschenbildung.

Abhängig vom elektrischen Feld aber auch von der Beleuchtung [41] treten zudem elektrothermische [77] Kräfte durch Joulsche Wärme und elektroosmotische [22, 79] Kräfte auf, wodurch es zu Strömungen kommt. Da die Joulsche Wärme proportional zu U^2

und der AC-EOF proportional zu U ist, treten besonders bei hohen Spannungen starke Strömungen [116] auf, zum einen über dem gesamten Array, aber zum anderen vermutlich auch über jeder einzelnen Elektrode und um die Partikel [114] selbst. Hierbei kommt es durch den maximalen Gradienten am Array- bzw. Elektrodenrand und der Strömungsrichtung zur Array- bzw. Elektrodenmitte zu zwei konkurrierenden Effekten. Diese Strömungen bieten allerdings den Vorteil, dass hierdurch ein dauernder Nachschub von Probenpartikel erfolgt und diese in die Nähe der Elektroden gelangen. Dadurch muss weder auf die Diffusion gewartet werden, noch werden nur Objekte in der direkten Elektrodennähe immobilisiert.

Auch die Dauer der Feldapplikation hat Einfluss auf die Belegung des Arrays. Hier gilt es, ein Austrocknen der Probe zu verhindern, weshalb eine kürzere Messung vorteilhaft ist. Zudem ist die Verwendung einer Klemme hilfreich. Eine Abdichtung mit Vaseline hat sich dagegen als unpraktikabel erwiesen, da sie leicht mit dem Deckglas verschoben und so auf das Array gezogen werden kann.

Gegenseitige Dielektrophorese, wie sie in [3] für Tropfen berechnet wurde, tritt bei Beadexperimenten ebenfalls auf. Hierbei ziehen sich die Objekte durch die induzierten Dipole gegenseitig an [49]. Es kommt zu einer Bildung von Beadketten [64, 78]. Diese Beadketten richten sich an den Feldlinien des elektrischen Feldes aus. Bei Proteinen ist in diesem Fall die Bildung von Aggregaten zu beobachten. Wie die Simulationen von immobilisierten Beads auf Elektroden zeigen, ist allerdings der Gradient am Bead selbst deutlich niedriger als der an der Elektrodenspitze. Bei günstiger Wahl der Einstellungen ist es daher möglich, dass der Gradient zwar zur Immobilisierung eines Objekts ausreicht, aber nicht zur gegenseitigen Dielektrophorese durch den induzierten Dipol. Zudem tragen aminomodifizierte und carboxylierte Beads Partialladungen, die zu einer Abstoßung der einzelnen Beads voneinander führen. Überwiegt diese Abstoßung die Anziehung durch die induzierten Dipole, so findet keine Kettenbildung statt.

Um eine gleichmäßige Immobilisierung der Objekte auf einem Elektroden-Array zu erhalten, ist also eine Optimierung der Feldparameter notwendig. Aus den Angaben in der Literatur [94] wurde zunächst mit Frequenzen im 500 kHz-Bereich gearbeitet. Nach einigen Optimierungsexperimenten wurde aber festgestellt, dass niedrigere Frequenzen besser geeignet waren. Für Polystyrolbeads stellte sich hierbei eine Frequenz von 15 kHz und für R-PE eine Frequenz von $7,5\text{ kHz}$ als am besten geeignet heraus. Die Zylinder-Elektroden haben sich für Optimierungsmessungen als hilfreich erwiesen. So konnten nacheinander die vier Arrays verwendet werden, um unterschiedliche Parameter auf dieselbe Probenflüssigkeit anzuwenden. Auf diese Weise konnte eine grobe Optimierung der Feldparameter erfolgen, die allerdings an den eigentlich zur Messung verwendeten Elektroden noch angepasst werden musste.

Die Frequenzoptimierung bezogen auf die Übergangsfrequenz konnte erst mit der Verwendung der Elektroden mit integrierter Gegenelektrode klar erfolgen. Hierbei wurde eine Übergangsfrequenz für Polystyrolbeads im Bereich einiger MHz bestimmt. Elektroden, bei denen eine ITO-Gegenelektrode verwendet wird, zeigten unklarere Ergebnisse und bereits bei einigen 100 kHz das Ablösen temporär gefangener Beads. Aus der Bestimmung der Übergangsfrequenz konnte die Leitfähigkeit von Polystyrol bestimmt werden. Die gefundenen Werte stimmen mit Literaturangaben [125, 28] für Polystyrol überein.

Bei der Verwendung der Elektroden mit integrierter Gegenelektrode trat allerdings ein Lichteffect auf. Eine dielektrophoretische Immobilisierung auf den in Löchern versenkten Elektroden konnte nur erreicht werden, wenn gleichzeitig eine Beleuchtung mit der lichtstarken Quecksilberdampflampe bei 460-580 nm geschah. Hier wird vermutlich bedingt durch den Lochdurchmesser von 670 nm durch einen plasmonischen Effekt eine weitere Gleichspannung erzeugt. Diesen Lichteffect könnte man einerseits nutzen, da nur in Kombination von Feld und Beleuchtung eine Immobilisierung auftritt. Durch eine punktweise Beleuchtung einzelner Elektroden ließe sich so das Problem des Adressierens individuell zu funktionalisierender Elektroden elegant lösen. Andererseits erschwert der Effekt auch die Arbeit mit Proteinen, die bei einer dauerhaften Beleuchtung denaturieren, was zu einem Funktionsverlust führen könnte. Der Aufbau ist daher nur bedingt zur Bestimmung der Leitfähigkeit von Proteinen geeignet.

Bei der Arbeit mit biologischen Proben galt es, auch die Erwärmung der Elektrodenspitzen zu beachten. Ein auf einer zu stark erhitzten Elektrode befindliches Protein würde ebenfalls denaturieren. Eine Probe auf einem Zylinderarray erfährt eine geringe Erwärmung, wodurch es nicht zur Denaturierung kommt und beispielsweise Enzymaktivität [69] und Antikörperbindung [94] erhalten bleiben. Um zu überprüfen, wie stark die Erwärmung an Kegel-Elektroden ist, wurden Experimente mit Rhodamin B [113] vorgenommen. Diese ergaben, dass an diesen Elektroden die Erwärmung trotz des höheren Gradienten an der Elektrodenspitze geringer ist als an den Zylinder-Elektroden. Hier spielt allerdings auch die Messmethode eine Rolle, bei der ein immer gleich großes Volumen oberhalb der Spitze untersucht wurde. Durch das größere Oberflächen-Volumenverhältnis an der Zylinder-Elektroden-Spitze im Vergleich zur Kegel-Elektrodenspitze ist die Wärmeabgabe an die Umgebung größer, wodurch eine höhere Temperatur gemessen wird, selbst wenn die Spitzentemperatur der Kegelelektrode höher wäre. Die Erwärmung im Volumen oberhalb der Kegelelektrode ist allerdings in einer Größenordnung, dass davon ausgegangen werden kann, dass die Funktionalität der Proteine ebenfalls erhalten bleibt.

Ein überraschendes Problem trat mit der gleichzeitigen Immobilisierung von Silber-Nanopartikeln aus dem Silberleitlack auf. Hier stellte sich heraus, dass die Elektroden-Arrays ein empfindliches Nachweisinstrument für solche Partikel darstellen, da diese dielektrophoretisch sehr aktiv sind. Irritierend war hier die Literaturlage zu Beginn der Arbeit. So gab es in der Lakowicz-Arbeitsgruppe 2008 eine Publikation von Ray et al. [106], in der R-PE auf Silber-Nanostrukturen immobilisiert wurde und Zeit-Trajektorien des Blinkens gezeigt werden. Das Blinken der R-PE Moleküle und das Silber-Blinken sind zunächst schwer zu unterscheiden, da beides im gleichen Wellenlängenbereich geschieht. Betrachtet man aber die Fluoreszenz von R-PE, so ist diese deutlich schwächer als die von Silber. Zudem kommt es hier zum Bleichen der Probe, was bei Silber nicht auftritt. Durch die EDX kann eine besetzte Elektrode auf Silber hin untersucht werden.

Auffällig war die Art der Belegung der Elektroden. Beads bis herab zu 500 nm wurden grundsätzlich temporär festgehalten. 200 nm Beads und kleinere konnten hingegen bei Elektroden mit ITO-Gegenelektrode permanent immobilisiert werden. Bei Elektroden mit integrierter Gegenelektrode fand keine permanente Belegung statt. Dies liegt vermutlich an der freistehenden Elektrodenspitze letzterer.

Das permanente Haftenbleiben der Objekte lässt sich durch van-der-Waals-Kräfte erklären. Durch die nanoraue Oberfläche der Zylinder-Elektroden [70] werden hier stärkere Kräfte ausgebildet als durch die Spitzen der Kegel-Elektroden oder die glattere SiO_2 -Oberfläche. Eventuell spielt auch das Elektrodenmaterial eine Rolle. So wurden verschiedene Spitzenbeschichtungen bei Kegel-Elektroden untersucht. Gerade die CoSi-Beschichtung zeigte besonders gleichmäßige Ergebnisse in der Belegung mit Beads. Haften Beads oder Proteine einmal an der Oberfläche, ist es mühsam sie wieder zu reinigen. Hier bietet ein Plasma Cleaner Abhilfe, allerdings mit dem Effekt, dass die Oberfläche daraufhin hydrophil ist. Dies wirkt sich aber dahingehend positiv aus, dass unspezifischer Adsorption von Objekten auf der Chipoberfläche vorgebeugt wird. Zusätzlich erweist sich ein Reinigungspolymer (*First Contact-Lack*) als nützlich.

Bei einer ausreichenden Optimierung der Parameter ist es also möglich, mit dem hier vorgestellten Aufbau eine Immobilisierung von Einzelobjekten auf Nano-Elektroden zu erreichen, die nach und nach ein Array zu 80% füllen.

10.2.3. Dielektrophorese oder AC-Elektrophorese?

Betrachtet man die relativ kleinen Frequenzen, bei denen positive Dielektrophorese an Biomolekülen realisierbar ist, so stellt sich die Frage, ob der Begriff der **Dielektrophorese**, wie er von Pohl geprägt wurde, tatsächlich der treffende ist. Auch in der Literatur wird bei niedrigen Frequenzen von *Dielektrophorese* gesprochen, allerdings lässt sich das Verhalten der Partikel auch anders erklären, zumal Biomoleküle nicht als Objekte ohne Ladungen angenommen werden können. Eventuell kommt hier neben der durch die Inhomogenität des Feldes wirkenden Dielektrophorese auch **AC-Elektrophorese** zum Tragen. Einen Hinweis darauf bietet die $\frac{1}{f}$ -Abhängigkeit bei der Belegung der Elektroden (vgl. Abb. 9.27). Dieses Verhalten entspricht nur bedingt dem Verlauf des Clausius-Mossotti-Faktors. Eine mögliche andere Erklärung der Wirkung des Feldes auf die Partikel bei niedrigen Frequenzen wäre eine langreichweitige elektrostatische Wechselwirkung, deren Reichweite steigt, je kleiner die Frequenz ist. Hier kann AC-Elektrophorese eine Erklärung sein.

Eine Frequenz von 10 kHz beispielsweise entspricht einer Periodenlänge von $100\ \mu\text{s}$, also einem Umpolen nach $50\ \mu\text{s}$. Das heißt geladene Partikel bewegen sich $50\ \mu\text{s}$ in die eine Richtung und $50\ \mu\text{s}$ in die andere. Gelangen sie dabei in die Nähe der Elektroden, so kommt es zur Anziehung durch die kurzreichweitigen van-der-Waals-Kräfte, so dass die Partikel auf der Oberfläche haften bleiben.

Je niedriger die Frequenz ist, bzw. je größer die Zeit zwischen dem Umpolen ist, desto größer ist also das Volumen, in dem Partikel an die Elektroden gezogen werden, was der $\frac{1}{f}$ -Abhängigkeit entsprechen würde.

Insgesamt lässt sich das Verhalten der Teilchen vermutlich erklären als Kombination aus AC-Elektrophorese der geladenen Teilchen bei niedrigen Frequenzen und Dielektrophorese durch die Inhomogenität des Feldes.

Teil V.

Fazit

Dielektrophorese an Nano-Elektroden

Zusammenfassung Diese Arbeit begann 2011 mit dem Ziel, für die Entwicklung eines Biosensors viele Moleküle einzeln und parallel auf Nano-Elektroden zu immobilisieren. Zu diesem Zeitpunkt wurden in der Arbeitsgruppe bereits Experimente an Nano-Elektroden-Arrays gemacht. Der Aufbau der damaligen Elektroden-Chips hat sich im Laufe der Zeit allerdings stark verändert.

Zu Beginn der Arbeit war es noch nicht möglich, erfolgreiche DEP-Experimente mit Kegel-Elektroden durchzuführen. Ein pn-Übergang zwischen Bodenkontaktierung und Kegel erzeugte eine Sperrschicht, die verhinderte, dass sich ein ausreichend hoher $\nabla|E^2|$, der für die DEP-Kraft maßgeblich ist, bildete. Dieser pn-Übergang konnte in späteren Chargen vom Hersteller beseitigt werden, so dass auch die Kegelspitzen n-dotiert waren.

Die Experimente mit diesen ersten Elektroden führten daher zunächst lediglich zu Beobachtungen von Strömungen, wie sie eine einzelne „große“ (2 mm)²-Elektrode unter einer $1\ \mu\text{m}$ isolierenden SiO_2 -Schicht hervorrufen würde. Es konnten mit Hilfe von Nano-Beads Strömungsmuster, Ansammlungen und Kettenbildungen beobachtet werden.

An den späteren Elektroden ohne pn-Übergang wurden verschiedene Spitzenbeschichtungen getestet und insbesondere CoSi und AlSi als am besten für die DEP-Experimente geeignet herausgefunden. Zudem wurden Elektroden mit verschiedenen Spitzendurchmessern entsprechend der Größe der Probeobjekte verwendet.

Zu Beginn der Arbeit wurde als Spacer bereits eine $80\ \mu\text{m}$ Laminierfolie verwendet. Diese wurde aber noch mit Vaseline abgedichtet, so dass die Probe vor dem Austrocknen geschützt war. Spätere Experimente wurden ohne Vaseline durchgeführt, da es häufig vorkam, dass die Probenkammer verunreinigt wurde. Es wurde stattdessen dazu übergegangen, das Deckglas mit Klemmen zu fixieren. Auch so konnte die Austrocknung verzögert werden.

Die Kontaktierung des ITO-Deckglases hat sich maßgeblich geändert. Zunächst erfolgte sie noch mittels Silber-Leitlack. Dass sich Silber-Nanopartikel lösen und schon kleinste Niederschläge während des Experiments dazu führen, dass pDEP an Silber-Nanopartikeln geschieht, war zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar. Die Kontaktierung des ITO-Deckglases erfolgt nun über eine Kupfer-Folie auf einem Podest, das durch doppelseitiges Klebeband auf dem Objektträger befestigt wurde.

Auch die Boden-Kontaktierung des Chips hat sich geändert. Erfolgte sie zunächst noch über einen Silber-Leitlack-Streifen, wodurch der Chip auch auf den Objektträger geklebt wurde, so wird nun eine selbstklebende Kupferfolie auf dem Objektträger platziert und mit einem Tropfen *Leit-C* der Chip auf dieser Kupferfolie fixiert.

ITO-Deckgläser mit verschiedenen Widerständen wurden verwendet, wobei ein ITO-Deckglas mit $70\text{--}100\ \Omega$ besser geeignet war, als eines mit $30\text{--}60\ \Omega$. Für jedes Experiment wird inzwischen ein frisches ITO-Deckglas genutzt, während zu Beginn der Arbeit noch

versucht wurde, die Deckgläser zu reinigen und wieder zu verwenden.

Auch das Design der Elektroden-Arrays wurde über die Zeit angepasst. Genutzt werden inzwischen Wolfram-Zylinder-Elektroden-Chips mit vier einzeln ansteuerbaren Arrays, die mit Orientierungskreuzen versehen sind. Kegel-Elektroden liegen als Chips mit verschiedenen Teil-Arrays auf einem Chip oder als ein Array je Chip vor. Es wurde eine Reinigungsprozedur der Chips vor den Experimenten durchgeführt, wofür neben Reinstwasser und Ethanol auch *First Contact*-Lack sowie ein Plasmareiniger zum Einsatz kamen.

Es wurden bezüglich der verschiedenen Elektrodentypen numerische Simulationen zu den räumlichen Feldverläufen sowohl einzelner Elektroden als auch ganzer Arrays durchgeführt [124, 70, 71]. Hierbei wurde die räumliche Verteilung von $\nabla|E^2|$ bestimmt, die Dielektrophoresekraft berechnet, der Einfluss von versenkten, erhabenen, ebenen oder freiliegenden Elektroden untersucht sowie der Feldverlauf bei Anwesenheit eines Beads betrachtet. Es erfolgten Berechnungen zur Frequenzabhängigkeit des Clausius-Mossotti-Faktors und zur Leitfähigkeit von Polystyrol.

Außerdem wurden verschiedenen Kameras und Objektive auf ihre Lichtempfindlichkeit hin untersucht, so dass eine Auswahl getroffen werden konnte, um kleinste Lichtmengen nachzuweisen. Hierfür wurde ein Skript zur Bestimmung des Rauschens und des Dunkelstroms von Kameras erstellt.

Das Temperaturverhalten der Elektroden wurde mit Hilfe von Rhodamin B untersucht, um daraus abzuleiten, welchem Stress immobilisierte Proteine unterliegen [124].

Mit Hilfe von Beads verschiedener Größe, Funktionalisierung und Färbung als Modellsystem wurden Spannungen und Frequenzen optimiert und hier insbesondere deutlich niedrigere Frequenzen (Bereich von 10 kHz) als in den anfänglichen Experimenten (Bereich von 500 kHz) verwendet. Durch diese niedrigen Frequenzen kam es zu weiteren Effekten wie der Bildung von Elektrolyseblasen. Diese wurden eingehender untersucht. Auch Strömungen wurden beobachtet, und insbesondere eine Arraybelegung, die vom Rand ausging, ließ sich so erklären [62, 70].

An dem Verhalten der Beads auf Elektroden-Chips mit integrierter Gegenelektrode konnten Übergangsfrequenzen ν_{xo} untersucht und mit der Theorie verglichen werden. Aus Gleichung 4.9 konnte die Oberflächen-Leitfähigkeit von Polystyrolbeads bestimmt werden. An diesen Elektroden trat ein interessanter Lichteffect auf. Hier kam es lediglich zur Dielektrophorese, wenn die Elektroden gleichzeitig mit einer Quecksilberdampflampe in einem Wellenlängenbereich von $460\text{ nm} - 580\text{ nm}$ beleuchtet wurden.

Mit den Beads erfolgten des Weiteren Immobilisierungs-Experimente auf Zylinder- und Kegel-Elektroden. Hierbei wurden Belegungsanzahlen und -muster auf den Elektroden und Kettenbildungen untersucht. Anhand von Fluoreszenzintensitäten wurde eine Histogramm-Methode verwendet, so dass die Anzahl der immobilisierten fluoreszierenden Objekte nachgewiesen werden konnte. Ein Größenverhältnis von Spitzendurchmesser der Elektrode zum Durchmesser des Beads von maximal 1:2 konnte gefunden werden, bei dem es auf 80% der Elektroden des Arrays zur dielektrophoretischen Vereinzelnung kommt [62]. Hierfür wurde als Ergebnis einer Optimierung ein Verdünnungsverhältnis von $10^5 \frac{\text{Beads}}{\mu\text{L}}$ gewählt.

Auch die Proteine R-PE und BSA wurden auf den Elektroden immobilisiert. Die Bele-

gung der Elektroden konnte mit Fluoreszenz-Mikroskopie, durch das AFM und durch das REM nachgewiesen werden. Zudem ließ sich eine Elementanalyse mittels EDX durchführen und sowohl Kohlenstoff in Beads, als auch Schwefel in R-PE nachweisen.

Bei den Experimenten mit einzelnen R-PE-Molekülen kam es zunächst zu einem Problem durch eine Verunreinigung mit Silber, was zu der Erkenntnis führte, dass zum einen die Elektroden-Arrays als empfindliche Detektoren für Silber-Spuren verwendet werden können und zum anderen Silber nicht nur in Form von Nano-Partikeln blinkt. Hier stellt sich die Frage, ob zudem Fluoreszenzverstärkung von R-PE auf Silber gemessen werden konnte oder lediglich die Lumineszenz von Silber beobachtet wurde.

Nachdem Silber vollständig im Experiment ersetzt wurde, konnten R-PE Moleküle schließlich immobilisiert und an diesen das charakteristische Blinken von Einzelmolekülen gemessen werden. Hierfür wurden Elektroden mit einem Durchmesser von 10 nm verwendet, was nach den Ergebnissen zur Vereinzelung von Beads auf eine Belegung mit bis zu vier Objekten schließen ließ. Tatsächlich kam es, abhängig von der Elektrodenposition auf dem Array, auch zu einer Immobilisierung von mehr als vier Molekülen. Besonders stark wurden die äußeren Reihen des Elektroden-Arrays belegt. Zur Mitte des Arrays hin gab es Elektroden, die mit nur wenigen und sogar einzelnen Proteinen belegt waren. Ginge man zur Verwendung noch spitzerer Elektroden über, so sollte es, nach den Ergebnissen mit den Beads zu urteilen, bei der richtigen Wahl der Frequenz, Spannung und Experimentdauer ab einem Spitzendurchmesser von 5 nm möglich sein zu erzwingen, dass auf den meisten belegten Elektroden exakt ein Protein zu finden wäre. Hier allerdings stößt man an die Grenzen des Modellsystems *Bead*, wie sich an der Belegung der Ekelektroden mit 10-15 R-PE-Molekülen zeigt.

Ausblick Die erreichten Ergebnisse sollten sich auf andere Bio-Objekte übertragen lassen. Hierbei eignen sich beispielsweise die vorhandenen Zylinder-Elektroden mit 500 nm Spitzendurchmesser bezüglich ihrer Größe für die Vereinzelung von Mikrokokken [115] mit grob $1\ \mu\text{m}$ Durchmesser, die Kegel-Elektroden mit 50 nm Durchmesser für Influenza-Viren mit etwa 80-120 nm Durchmesser [118], die Kegel-Elektroden mit 10 nm Durchmesser für die Vereinzelung von Exosomen mit 60-80 nm Durchmesser [26], aber auch die Verwendung noch spitzerer Elektroden ist denkbar, so dass noch kleinere Objekte wie Antikörper oder Enzyme als Einzel-Objekte immobilisierbar wären. Die Analyse dieser medizinisch relevanten Objekte sollte zu einem Erkenntnisgewinn auf Einzelobjekt-Ebene führen.

Außerdem sollte es möglich sein, die erhaltenen Ergebnisse für die Optimierung von Biosensoren einzusetzen. Die bei Laux et al. [71] nachgewiesene Ausrichtung dielektrophoretisch gefangener Objekte mit ihrer Hauptachse parallel zu den Feldlinien wurde bisher noch nicht ausgenutzt. Sie könnte bei geschickter Wahl des Elektrodendesigns in Bezug auf die verwendeten Biorezeptoren dafür ausgenutzt werden, dass ihre Bindungsstellen überwiegend den Analyten zugänglich wären. So könnte eine Signalverstärkung stattfinden. In Kombination mit der Immobilisierung von Einzelmolekülen wäre somit eine maximale Miniaturisierung erreichbar, in dem je Transducer-Elektrode nur ein Biorezeptor immobilisiert würde. Durch den parallelen Ansatz des Nano-Elektroden-Arrays

wäre es außerdem möglich, viele tausend Ereignisse gleichzeitig zu erhalten und daran eine Statistik kleiner Zahlen zu betreiben. Diese Effizienz verbunden mit der Geschwindigkeit der Dielektrophorese könnte zu einem neuen Level der Biosensorik führen.

Der nächste Schritt wäre die Kombination derartiger Biosensoren mit einer Elektronik und Fluidik auf einem Chip, um auf diese Weise ein *Lab-on-a-Chip* zu erhalten, welches zeitsparend und kostengünstig direkt dort eingesetzt werden könnte, wo es gebraucht wird im Sinne einer *Point-of-Care*-Diagnostik. Für eine solche Kombination eignen sich insbesondere die Elektroden des Typs mit integrierter Gegenelektrode.

Auch Implantate auf Basis solcher Biosensoren wären denkbar. Verbunden mit der aktuellen Kommunikationstechnologie könnte man hier in Bereiche der *eHealth* vordringen, beispielsweise als Verknüpfung eines Sensors mit dem Smartphone. Nicht zuletzt kann man eine Verknüpfung mit dem Begriff des *Internet of Things* anstellen, wenn man Sensoren betrachtet als die Einbettung der digitalen Welt in die Wirklichkeit.

Teil VI.
Anhang

Anhang A.

Material

A.1. Geräte

Mikroskope Es wurden die Mikroskope aus Tabelle A.1 eingesetzt. Für Fluoreszenzaufnahmen wurde das *BX51*-Fluoreszenz-Mikroskop verwendet. Temperaturmessungen an den Elektroden-Spitzen wurden am C-LSM durchgeführt. Eine Bestimmung der Oberflächenstruktur konnte mit dem AFM erhalten werden. Am REM wurde die Belegung der Elektroden gezeigt und in der EDX eine Elementaranalyse durchgeführt.

Filter des *BX51*-Fluoreszenz-Mikroskops Für Beobachtungen mit dem *BX51* wurden die Filtersätze in Tabelle A.2 eingesetzt. Für R-PE und Silber-Nanopartikel war insbesondere der *CY3*-Filter von Interesse. Für rot fluoreszierende Beads wurde der *WIY2*-Filter eingesetzt und für gelb-grün fluoreszierende Beads der *WIBA*-Filter.

Objektive am *BX51*-Fluoreszenz-Mikroskop Für Beobachtungen mit dem *BX51* wurden die Luft-Objektive der Firma OLYMPUS in Tabelle A.3 verwendet. Aus den Angaben für die numerische Apertur und die Vergrößerung lassen sich nach Abbe der theoretisch minimal noch auflösbare Abstand ($d_{min} = \frac{\lambda}{2 \cdot NA}$) und die maximale Lichtstärke ($F_{trans} = (\frac{NA}{M})^2$) berechnen (vgl. Seite xi).

Kameras am *BX51*-Fluoreszenz-Mikroskop Neben den beiden in Tabelle A.4 aufgeführten Kameras wurden weitere bezüglich des Ausleserausens und des Dunkelstroms untersucht (vgl. Seite xiii). Die anderen Kameras haben sich allerdings für die Experimente als weniger geeignet erwiesen. Die *F-View II*-Kamera, die zwar im Vergleich mit der *Orca*-Kamera ein höheres Rauschen und einen größeren Dunkelstrom aufweist, wurde wegen der großen Bandbreite an Belichtungszeiten und wegen der komfortablen Bedienung für Standard-Messungen verwendet. Die lichtempfindlichere *Orca*-Kamera wurde insbesondere für Messungen verwendet, bei denen Objekte mit geringer Lichtintensität dargestellt werden sollten.

Aufbau und Präparation In Tabelle A.5 sind die elektronischen Komponenten des Dielektrophorese-Aufbaus zu finden. Für die Reinigung der Elektroden-Chips wurde der *kINPen Ind*-Plasmareiniger verwendet.

Nano-Elektroden Am IHP (*Institut für innovative Mikroelektronik*) in Frankfurt/ Oder wurden Elektroden A.6 in einem Standard-0,25 μm CMOS Verfahren hergestellt, so dass die Elektroden-Chips auf 8 *inch* Silizium Wafern bereits geschnitten geliefert wurden.

Software Zur Bildaufnahme und Bildbearbeitung wurde die Software aus Tabelle A.7 verwendet. *Cell^M*, *HoKaWo*, *LSM-FCS*, *SPM Desktop*, *SmartSEM* und *Esprit* wurde an dem jeweiligen Mikroskop zur Bildaufnahme genutzt. Bildauswertungen wurden mit *ImageJ* und *Gwyddion* durchgeführt, Tabellenkalkulationen in erster Linie mit *Origin* und *SciDAVis*. Numerische Simulationen und die Berechnung der räumlichen Verteilung von $\nabla|E^2|$ wurden mit *Maze* in Kombination mit *Matlab*- bzw. *Octave*-Skripten erstellt. Der *NGL viewer* [110] wurde zur Darstellung von Proteinen verwendet. In *Blender* wurden schematische Graphiken erstellt.

A.2. Proben

Reinigung Zur Reinigung der Chips wurde neben dem *kINPen Ind* Plasma-Cleaner auch ein Reinigungspolymer verwendet. Durch *First Contact* Lack der Firma PHOTONIC CLEANING TECHNOLOGIES konnten Staub und sogar permanent immobilisierte Beads nach zweimaliger Anwendung des Reinigungspolymers zu mehr als 90% beseitigt werden. Der Lack selbst fluoresziert schwach.

DEP Proben Die Proben wurden in Reinstwasser mit einer Leitfähigkeit von etwa $0,3 \frac{\mu\text{S}}{\text{cm}}$ aus der hausinternen Anlage verdünnt. Die Proben aus Tabelle A.8 wurden für Experimente genutzt. Zudem wurden die in Tabelle A.9 aufgeführten *FluoSpheres* der Firma THERMO FISHER SCIENTIFIC verwendet. Hierbei handelt es sich um Beads aus Polystyrol. Die Farbbezeichnungen in der Tabelle beziehen sich auf die Anregungs- und Emissionswellenlängen *red* (580 nm / 605 nm), *yellow-green* (505 nm / 515 nm), *red-orange* (488 nm / 560 nm) und 4 *Farben* (360 nm / 430 nm (blue), 505 nm / 515 nm (yellow-green), 560 nm / 580 nm (orange) and 660 nm / 680 nm (dark red)).

Leitlacke Verschiedene Leitmittel wurden dahingehend untersucht, ob sie für die Experimente geeignet sind. Hierbei wurden die subjektive Verarbeitbarkeit, die Trocknungszeit, der Flächenwiderstand (in $\frac{\Omega}{\text{cm}^2}$), die elementare Zusammensetzung, die Fluoreszenz sowie die Wasserlöslichkeit betrachtet. Schließlich wurden an Zylinder-Elektroden Experimente durchgeführt, um zu prüfen, ob DEP möglich ist.

Aus diesen Untersuchungen ergab sich, dass der zunächst verwendete Silber-Leitlack der Firma FERRO GMBH durch *Leit-C* der Firma PLANO GMBH ersetzt wurde, da die Silber-Nanopartikel z.T. in die Probenlösung übergegangen waren und die Messung gestört hatten. *Leit-C* erweist sich als leicht verarbeitbar und schnell trocknend. In der EDX zeigt sich eine elementare Zusammensetzung aus Kohlenstoff und Sauerstoff. Sein Flächenwiderstand beträgt etwa $200 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$. *Leit-C* ist nicht wasserlöslich und zeigt keine Fluoreszenz, geschweige denn ein Blinken. Für die DEP ist *Leit-C* als Leitmittel geeignet.

Tabelle A.1.: Mikroskope und Zusätze

	Modell	Firma
Fluoreszenz-Mikroskop	<i>BX51</i>	OLYMPUS
C-LSM: Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	<i>Axiocvert 100M</i>	ZEISS
AFM: Atom-Kraft-Mikroskop	<i>NanoWizard 3</i>	JPK INSTRUMENTS
AFM-Spitzen	<i>OMCL-TR400PSA-2</i>	OLYMPUS
REM: Raster-Elektronen-Mikroskop	<i>Evo MA10</i>	ZEISS
EDX: Energiedispersives Röntgenspektrometer	<i>Quantax XFlash6</i>	BRUKER

Tabelle A.2.: Filtersätze am *BX51*-Fluoreszenz-Mikroskop

Bezeichnung	Anregung [nm]	Dichroitischer Spiegel [nm]	Emission [nm]
CY3	520 - 570	565	535 - 675
CY5	560 - 680	660	625 - 775
WIBA	460 - 495	505	510 - 550
QDOT605	395 - 475	510	590 - 620
WIY2	545 - 580	600	610 - IF
WIB3	460 - 495	505	510 - IF

Tabelle A.3.: OLYMPUS-Objektive am *BX51*-Fluoreszenz-Mikroskop

Bezeichnung	Vergrößerung	Numerische Apertur	Auflösung bei 520 nm	Lichtstärke $\left(\frac{NA}{M}\right)^2$
UPlanFLN	10x	0,30	867 nm	$9,0 \cdot 10^4$
UPlanFLN	20x	0,50	520 nm	$6,3 \cdot 10^4$
UPlanFLN	40x	0,75	347 nm	$3,5 \cdot 10^4$
UPlanSApo	40x	0,95	274 nm	$5,6 \cdot 10^4$
LUCPlanFLN	60x	0,70	371 nm	$1,4 \cdot 10^4$
MPlanFLN	100x	0,90	289 nm	$0,8 \cdot 10^4$

Tabelle A.4.: Kamera-Eigenschaften

	<i>F-View II</i> OLYMPUS / SIS	<i>Orca flash 4.0</i> HAMAMATSU
Pixel	1376 x 1032	2048 x 2048
Pixelgröße [μm]	6,45	6,5
Belichtungszeit	100 μs - 160 s	3 ms - 10 s
Bias (B)	128(1)	99(2)
Gain (K) [$\frac{e^-}{ADU}$]	6,77(9)	0,44(3)
Rauschen (R_S) [e^-]	9,5(1)	1,406(5)
Dunkelstrom (D_S) [$\frac{e^-}{s}$]	0,66(2)	0,04118(7)

Tabelle A.5.: Aufbau und Präparation

Gerät	Modell	Firma
Funktions-Generator	<i>Model 193</i>	WAVETEK
Breitband Verstärker	<i>TOE 7606</i>	TOELLNER
Demodulator	<i>TT-DE 112</i>	TESTEC
DC Voltmeter	<i>M9803R</i>	MASTECH
AC Voltmeter	<i>UT 803</i>	UNI-T
Ampèremeter	<i>Voltcraft Plus VC960</i>	CONRAD
Frequenzzähler	<i>Voltcraft 7207</i>	CONRAD
Oszilloskop	<i>HM 307</i>	HAMEG
Brennstoffzelle	<i>FCJJ-11</i>	CONRAD
Gleichspannungsquelle	<i>8143</i>	HAMEG
Piezoelement	<i>PZ73E, E-66 2 LVPZT</i>	PI
ITO-Deckglas ((20mm) ² ; 30 – 60 Ω)	<i>6467-AB</i>	SPI SUPPLIES
ITO-Deckglas ((18mm) ² ; 70 – 100 Ω)	<i>6462-AB</i>	SPI SUPPLIES
Deckglas ((20mm) ²)	<i>H 873</i>	ROTH
Quecksilberdampfampe	<i>HBO 103W/2</i>	OSRAM
LED-Lichtquelle	<i>pE-4000</i>	COOL LED
Plasmareiniger	<i>kINPen Ind</i>	NEOPLAS

Tabelle A.6.: Nano-Elektroden vom IHP

Spitzendurchmesser	Spitzenbeschichtung	Gegenelektrode
Wolfram Zylinder im Abstand $2\ \mu\text{m}$:		
500 nm	keine	ITO
Silizium Kegel im Abstand $\sqrt{2}\ \mu\text{m}$:		
1 nm	keine (ohne SiO_2 -Matrix)	ITO
10nm	CoSi	ITO
50nm	CoSi	ITO
10nm	AlSi	ITO
10nm	PtSi	ITO
50nm	PtSi	ITO
10nm	TiSi	ITO
30nm	keine	TiN (integriert)
32nm	keine	TiN (integriert)
34nm	keine	TiN (integriert)
40nm	keine	TiN (integriert)
50nm	keine	TiN (integriert)

Tabelle A.7.: Software

Software	Version	Hersteller
<i>Cell^M</i>	3.1	OLYMPUS
<i>HoKaWo</i>	2.8	HAMAMATSU
<i>LSM510 ConfoCor</i>	2	ZEISS
<i>SPM Desktop</i>	v.4	JPK INSTRUMENTS
<i>SmartSEM</i>	5.07	ZEISS
<i>Esprit</i>	1.9	BRUKER
<i>ImageJ</i>	1.50b	WAYNE RASBAND (NIH)
<i>Gwyddion</i>	2.4.2	OPEN SOURCE
<i>SciDAVis</i>	1.D009	OPEN SOURCE
<i>Origin</i>	Pro 2015G	OriginLab Corporation
<i>Maze</i>	3	FIELD PRECISION
<i>Matlab</i>	R2015a	MATHWORKS
<i>Octave</i>	4.0.0	OPEN SOURCE
<i>Blender</i>	2.76	BLENDER FOUNDATION
<i>NGL viewer</i>		Rose et al. [110]

Tabelle A.8.: Proteine, Farbstoffe, Nanopartikel

Bezeichnung	Hersteller	Größe	Emission /Absorption
R-PE	MERCK (<i>P8912</i>)	$11 \text{ nm} \times (6 \text{ nm})^2$	$488 \text{ nm}/578 \text{ nm}$
BSA	MERCK (<i>A7030</i>)	$(4 \text{ nm})^3$	
Oyster-647-TRP	LUMINARTIS		$651 \text{ nm}/671 \text{ nm}$
Rhodamin B	MERCK (<i>83689</i>)		$553 \text{ nm}/627 \text{ nm}$
Silber Nanopartikel	PLASMA CHEM GMBH	$(10 \text{ nm})^3$	

Tabelle A.9.: Mikro- und Nano-Beads mit Fluorescein-Äquivalente je Bead je Durchmesser laut Hersteller THERMOFISHER SCIENTIFIC

Kennung	Größe	Farbe	Funktionalisierung	Fluorescein-Äquivalente
F8826	2 μm	red	carboxyliert	$3,1 \cdot 10^7$
F8827		yellow-green	carboxyliert	
F8821	1 μm	red	carboxyliert	$1,3 \cdot 10^7$
F8823		yellow-green	carboxyliert	
T7282		4 Farben	nicht funktionalisiert	
F8765		yellow-green	aminomodifiziert	
F8812	500 nm	red	carboxyliert	$2,0 \cdot 10^6$
F8813		yellow-green	carboxyliert	
T7281		4 Farben	nicht funktionalisiert	
F8810	200 nm	red	carboxyliert	$1,1 \cdot 10^5$
F8811		yellow-green	carboxyliert	
F8764		yellow-green	aminomodifiziert	
T7280		4 Farben	nicht funktionalisiert	
F8801	100 nm	red	carboxyliert	$7,4 \cdot 10^3$
F8803		yellow-green	carboxyliert	
T7279		4 Farben	nicht funktionalisiert	
F8793	50 nm	red	carboxyliert	$3,5 \cdot 10^2$
T8864		red-orange	carboxyliert	
F8786	20 nm	red	carboxyliert	$1,8 \cdot 10^2$
F8787		yellow-green	carboxyliert	

Anhang B.

Methoden

B.1. Herleitungen zu DEP-Gleichungen

Aus der Gleichung B.1 für die DEP-Kraft lassen sich durch Umformungen die Gleichungen für die Übergangsfrequenz und die Permittivität des Mediums erhalten (vgl. Glg.4.8,4.9). Die Herleitung soll hier gezeigt werden.

Für die zeitlich gemittelte DEP-Kraft auf ein kugelförmiges Partikel im elektrischen Wechselfeld gilt:

$$F_{DEP} = 2\pi\varepsilon_0\varepsilon_m r^3 \operatorname{Re}K(\omega) \nabla |E_{rms}^2|, \quad (\text{B.1})$$

mit

$$K(\omega) = \frac{(\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*)}{(\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*)},$$

dem CM-Faktor, mit $\varepsilon_{m,p}^*$ der komplexen elektrische Permittivität des Mediums bzw. des Partikels, mit

$$\varepsilon_{m,p}^* = \varepsilon_{m,p}\varepsilon_0 - i \frac{\sigma_{m,p}}{\omega}$$

(r: Radius des Partikels; $\nabla |E_{rms}^2|$: Gradient des Quadrats des elektrischen Feldes; $\sigma_{m,p}$: Leitfähigkeit des Mediums bzw. Partikels; ω : Frequenz des angelegten Wechselfeldes; $i = \sqrt{-1}$.)

Die Übergangsfrequenz tritt beim Grenzfall $\operatorname{Re}K(\omega_0) = 0$ auf, wenn keine Kraftwirkung und dementsprechend keine Bewegung stattfindet.

Der Clausius-Mossotti-Faktor lässt sich wie folgt umschreiben:

$$\begin{aligned}
K(\omega) &= \frac{(\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*)}{(\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*)} \\
&= \frac{(\varepsilon_p \varepsilon_0 - i \frac{\sigma_p}{\omega}) - (\varepsilon_m \varepsilon_0 - i \frac{\sigma_m}{\omega})}{(\varepsilon_p \varepsilon_0 - i \frac{\sigma_p}{\omega}) + 2(\varepsilon_m \varepsilon_0 - i \frac{\sigma_m}{\omega})} \\
&= \frac{\varepsilon_0(\varepsilon_p - \varepsilon_m) - \frac{i}{\omega}(\sigma_p - \sigma_m)}{\varepsilon_0(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m) - \frac{i}{\omega}(\sigma_p + 2\sigma_m)} \\
&= \frac{\left[\varepsilon_0(\varepsilon_p - \varepsilon_m) - \frac{i}{\omega}(\sigma_p - \sigma_m) \right] \left[\varepsilon_0(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m) - \frac{i}{\omega}(\sigma_p + 2\sigma_m) \right]}{\varepsilon_0^2(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)^2 + \frac{1}{\omega^2}(\sigma_p + 2\sigma_m)^2} \\
&= \frac{\varepsilon_0^2(\varepsilon_p - \varepsilon_m)(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m) + \frac{1}{\omega^2}(\sigma_p - \sigma_m)(\sigma_p + 2\sigma_m)}{\varepsilon_0^2(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)^2 + \frac{1}{\omega^2}(\sigma_p + 2\sigma_m)^2} \\
&\quad + i \frac{\frac{\varepsilon_0}{\omega} [(\sigma_p + 2\sigma_m)(\varepsilon_p - \varepsilon_m) - (\sigma_p - \sigma_m)(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)]}{\varepsilon_0^2(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)^2 + \frac{1}{\omega^2}(\sigma_p + 2\sigma_m)^2}
\end{aligned}$$

Realteil Der Realteil des CM-Faktors kann Werte in den Grenzen von

$$-\frac{1}{2} < \operatorname{Re}\{K(\omega)\} < +1$$

annehmen. Dies lässt sich wie folgt zeigen.

Der Realteil lässt sich schreiben als:

$$\operatorname{Re}\{K(\omega)\} = \frac{\omega^2 \varepsilon_0^2 (\varepsilon_p - \varepsilon_m)(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m) + (\sigma_p - \sigma_m)(\sigma_p + 2\sigma_m)}{\omega^2 \varepsilon_0^2 (\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)^2 + (\sigma_p + 2\sigma_m)^2}$$

Mit einer Polynomdivision nach dem Prinzip

$$\begin{aligned}
(x^2 a + b) : (x^2 c + d) &= \frac{a}{c} + \frac{b - \frac{ad}{c}}{x^2 c + d} \\
&= \left(\frac{a}{c} \cdot cx^2 + \frac{a}{c} \cdot d \right) \\
&\quad + b - \frac{ad}{c}
\end{aligned}$$

lässt sich nun schreiben

$$\operatorname{Re}\{K(\omega)\} = \frac{(\varepsilon_p - \varepsilon_m)}{(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)} + \frac{(\sigma_p - \sigma_m)(\sigma_p + 2\sigma_m) - \frac{(\varepsilon_p - \varepsilon_m)(\sigma_p + 2\sigma_m)^2}{\varepsilon_p + 2\varepsilon_m}}{\varepsilon_0^2 \omega^2 (\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)^2 + (\sigma_p + 2\sigma_m)^2}.$$

Grenzen Für den Fall $\omega = 0$ gilt:

$$\begin{aligned} \operatorname{Re}\{K(\omega = 0)\} &= \frac{(\varepsilon_p - \varepsilon_m)}{(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)} + \frac{(\sigma_p - \sigma_m)(\sigma_p + 2\sigma_m) - \frac{(\varepsilon_p - \varepsilon_m)(\sigma_p + 2\sigma_m)^2}{\varepsilon_p + 2\varepsilon_m}}{(\sigma_p + 2\sigma_m)^2} \\ &= \frac{(\varepsilon_p - \varepsilon_m)}{(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)} + \frac{(\sigma_p - \sigma_m)}{(\sigma_p + 2\sigma_m)} - \frac{(\varepsilon_p - \varepsilon_m)}{(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)} \\ &= \frac{(\sigma_p - \sigma_m)}{(\sigma_p + 2\sigma_m)}. \end{aligned}$$

Für den Fall $\omega \rightarrow \infty$ gilt:

$$\operatorname{Re}\{K(\omega \rightarrow \infty)\} = \frac{(\varepsilon_p - \varepsilon_m)}{(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)}.$$

Die Permittivität und die Leitfähigkeit sind positiv definiert, d.h. man erhält theoretisch die folgenden Grenzfälle:

$$\begin{aligned} \sigma_m = 0 &\Rightarrow \frac{(\sigma_p - \sigma_m)}{(\sigma_p + 2\sigma_m)} = 1 \\ \sigma_p = 0 &\Rightarrow \frac{(\sigma_p - \sigma_m)}{(\sigma_p + 2\sigma_m)} = -\frac{1}{2} \\ \varepsilon_m = 0 &\Rightarrow \frac{(\varepsilon_p - \varepsilon_m)}{(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)} = 1 \\ \varepsilon_p = 0 &\Rightarrow \frac{(\varepsilon_p - \varepsilon_m)}{(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)} = -\frac{1}{2} \end{aligned}$$

Insgesamt gilt für den Realteil des Clausius-Mossotti-Faktors also

$$-\frac{1}{2} < \operatorname{Re}\{K(\omega)\} < +1.$$

Tatsächlich ist die relative Permittivität als Verhältnis zur Permittivität des Vakuums definiert, wodurch sie minimal einen Wert von 1 annehmen kann.

Übergangsfrequenz Nach einigen Umformungen der Gleichungen (B.1) lässt sich aus der Dielektrophoresekraft eine Gleichung für die Übergangsfrequenz ω_0 finden. Bei dieser Frequenz ändert sich das Dielektrophoreseverhalten von positiver zu negativer DEP.

Für die Übergangsfrequenz gilt

$$\operatorname{Re}\{K(\omega_0)\} := 0.$$

Daraus folgt

$$\frac{(\varepsilon_p - \varepsilon_m)}{(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)} = -\frac{(\sigma_p - \sigma_m)(\sigma_p + 2\sigma_m) - \frac{(\varepsilon_p - \varepsilon_m)(\sigma_p + 2\sigma_m)^2}{\varepsilon_p + 2\varepsilon_m}}{\varepsilon_0^2 \omega_0^2 (\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)^2 + (\sigma_p + 2\sigma_m)^2}.$$

Also

$$\begin{aligned} \varepsilon_0^2 \omega_0^2 (\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)^2 + (\sigma_p + 2\sigma_m)^2 &= -(\sigma_p - \sigma_m)(\sigma_p + 2\sigma_m) \frac{\varepsilon_p + 2\varepsilon_m}{\varepsilon_p - \varepsilon_m} + (\sigma_p + 2\sigma_m)^2 \\ \omega_0^2 &= \frac{-(\sigma_p - \sigma_m)(\sigma_p + 2\sigma_m) \frac{\varepsilon_p + 2\varepsilon_m}{\varepsilon_p - \varepsilon_m}}{\varepsilon_0^2 (\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)^2} \end{aligned}$$

Es gilt also für die Übergangsfrequenz, wie man auch in der Literatur [125] findet:

$$\omega_0 = \frac{1}{\varepsilon_0} \sqrt{\frac{(\sigma_m - \sigma_p)(\sigma_p + 2\sigma_m)}{(\varepsilon_p - \varepsilon_m)(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)}}. \quad (\text{B.2})$$

Die angelegten Frequenzen bzw. Kreisfrequenzen sind nur im Positiven definiert. Eine Übergangsfrequenz lässt sich nur angeben, wenn entweder $\sigma_p > \sigma_m$ sowie $\varepsilon_m > \varepsilon_p$ oder $\sigma_m > \sigma_p$ sowie $\varepsilon_p > \varepsilon_m$ gilt. Andernfalls existiert kein Nulldurchgang, d.h. die Dielektrophorese ist nur positiv oder nur negativ für alle Frequenzen.

Umgestellt nach σ_p

$$\begin{aligned} \omega_0^2 \varepsilon_0^2 (\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)(\varepsilon_p - \varepsilon_m) &= -(\sigma_p - \sigma_m)(\sigma_p + 2\sigma_m) \\ &= -\sigma_p^2 - \sigma_p \sigma_m + 2\sigma_m^2 \\ \sigma_p^2 + \sigma_p \sigma_m + [\omega_0^2 \varepsilon_0^2 (\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)(\varepsilon_p - \varepsilon_m) - 2\sigma_m^2] &= 0 \end{aligned}$$

$$\sigma_p = -\frac{\sigma_m}{2} \pm \sqrt{\omega_0^2 \varepsilon_0^2 (\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)(\varepsilon_p - \varepsilon_m) + \frac{9}{4}\sigma_m^2}. \quad (\text{B.3})$$

Da Leitfähigkeiten positiv sind, ist physikalisch nur der „+“-Fall sinnvoll, wobei die Wurzel $\frac{\sigma_m}{2}$ übersteigen muss.

B.2. Lichtstärke von Objektiven

Messungen

Zur Überprüfung der Lichtstärke der verwendeten Objektive wurden Messungen am BX51-Mikroskop durchgeführt. Es wurde ein Spiegel mit einem punktförmigen Loch

von unten beleuchtet, so dass mit allen Objektiven die gleiche Punktlichtquelle vermessen werden konnte. Um den Spiegel wurde ein Spacer geklebt und der Zwischenraum mit $30 \mu\text{l}$ Wasser gefüllt. Die Abdichtung gegen Verdampfung erfolgte mit Vaseline. Verschluss wurde die Probe mit einem Deckglas der Firma ROTH ($20 \times 20 \text{ mm}^2$) mit einer Dicke von $0,13\text{--}0,16 \text{ mm}$.

Es erfolgte die Untersuchung verschiedener Objektive. Diese waren nicht direkt an dem Mikroskop befestigt. Zur besseren Fokussierung zwischen Mikroskop und Objektiv diente ein Piezoelement (*PZ73E, E-66 2 LVPZT Position Servo Controller*, PI).

Vor jeder Messung wurde zunächst die Köhlersche Beleuchtung eingestellt. Zur Vermeidung von Überstrahlung fanden zwei gekreuzte Polarisationsfilter Anwendung. Die Beleuchtung war maximal. Durch Veränderung der Belichtungszeit t wurde die gemessene Lichtmenge so variiert, dass sie bei maximal 74% lag (wobei 4095 ADU 100% entsprechen).

Die Schärfeneinstellung der Punktlichtquelle erfolgte manuell. Über das Piezoelement wurden zudem weitere 10 Bilder in jede Richtung jeweils in $0,2 \mu\text{m}$ -Schritten um das Maximum herum aufgenommen.

Auswertung

Zunächst erfolgte eine Hintergrundkorrektur mit *ImageJ*. Hierfür wurden Ellipsen mit einer von der Vergrößerung abhängigen Fläche um den Lichtpunkt gelegt. Es wurden der Mittelwert und der Maximalwert der gemessenen Flächen bestimmt. Die Messung einer Ellipse mit derselben Fläche erfolgte an einer unbeleuchteten Stelle. Die Werte wurden voneinander abgezogen.

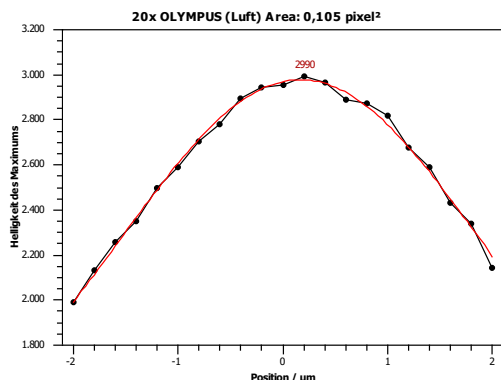
Das Maximum sollte im schärfsten Zustand die größte Helligkeit aufweisen. Aus dem Mittelwert der Beleuchtung, jeweils $1 \mu\text{m}$ um die Maximaposition, wurde erneut ein Mittelwert gebildet und dieser durch die Belichtungszeit geteilt.

Ergebnisse

Vergleicht man die Messwerte der Objektive mit dem theoretischen Wert der Lichtstärke nach

$$F_{trans} = \left(\frac{NA}{M} \right)^2,$$

so stellt man fest, dass Objektive, deren Lichtstärke hoch ist, auch in den Messungen einen großen Wert für die Lichtempfindlichkeit aufweisen. Eine Einschätzung der Lichtempfindlichkeit der Objektive lässt sich über die Berechnung von F_{trans} also ableiten. Es lässt sich hier jedoch kein konstantes Verhältnis zwischen Theorie und Messung finden, daher kann nur eine qualitative Aussage getroffen werden.



M	NA	$(\frac{NA}{M})^2 / 10^{-4}$	$\frac{Mean}{t} / \frac{ADU}{ms}$
10x	0,30	9,00	0,056
20x	0,50	6,25	0,040
40x	0,75	3,52	0,028
60x	0,70	1,36	0,034

Maximale Counts bezogen auf die Verschiebung mittels Piezo um die schärfste Stelle (OLYMPUS Luft-Objektiv; $M=20x$; $NA=0,50$)

B.3. Charakterisierung von Kameras

Zur Darstellung von Einzelmolekülen oder weniger hell fluoreszierenden Objekten spielt die Empfindlichkeit der verwendeten Kamera eine ausschlaggebende Rolle. Hierbei sind die entscheidenden Charakteristika Gain, Ausleserauschen, Dunkelstrom und Bias Level.

Beim **Gain** handelt es sich um einen Kameraverstärkungsfaktor, der angibt, wie viele Photoelektronen einem ADU (Analog-Digital-Unit; auch Count) entsprechen. Das **Ausleserauschen** ist ein durch die Elektronik beim Auslesen bedingtes Rauschen, das unabhängig von der Belichtungszeit und dem Signal ist. Der **Dunkelstrom** ist ein thermischer Effekt, bei dem Elektron-Loch-Paare gebildet werden und so einen Strom auslösen, der nicht durch die Photoelektronen bedingt ist. Der Dunkelstrom ist stark temperaturabhängig und proportional zur Belichtungszeit. Der **Bias Level** ist ein konstanter Wert, der auf alle aufgenommenen Counts addiert wird. Sein Zweck ist die Vermeidung von negativen Werten, die durch das Ausleserauschen verursacht werden könnten. Eine Aufnahme bei Belichtungszeit 0 s spiegelt den Bias Level wider.

Eine gängige Methode, die Kamera-Charakteristika zu bestimmen, ist bei [117] beschrieben. Bezüglich dieser Charakteristika wurden 12 verschiedene Kameras untersucht. Hier werden kurz die Herangehensweise und die Ergebnisse der beiden letztlich verwendeten Kameras (*F-View II* und *Orca flash 4.0*) dargestellt.

Berechnung

Veilleux beschreibt in einem Skript¹ die theoretischen Grundlagen zur Bestimmung des Gain und des Ausleserauschens. Hier soll die Theorie verkürzt dargestellt werden.

¹http://www.astro.umd.edu/~veilleux/ASTR310/fall105/ccd_theory.pdf

Bias Level Zunächst ist der Bias Level \bar{B} der Kamera zu bestimmen. Für jeden Pixel setzt sich der gemessene Wert zusammen als

$$B = \bar{B} + \Delta B, \quad (\text{B.4})$$

wobei ΔB die Fluktuationen um \bar{B} angibt.

Gain Nimmt man Weißbilder auf, so setzen sich die Signalcounts der Fläche für jeden Wert zusammen als

$$S = G \cdot n + \bar{B} + \Delta S, \quad (\text{B.5})$$

mit G dem Gain, n der tatsächlichen Anzahl der erzeugten Photoelektronen und der Standardabweichung des Ausleserausens $s := \sqrt{\Delta S}$. Es gilt zudem für eine Poissonverteilung $n = \bar{n} + \Delta n$, wobei Δn die Fluktuation von n um den Mittelwert über die Fläche angibt.

Bildet man für jeden Wert die Differenz von (B.5) und (B.4), so erhält man

$$S' = Gn + \Delta S - \Delta B. \quad (\text{B.6})$$

Mittelt man nun alle Werte einer Aufnahme, so erhält man

$$\bar{S}' = G \cdot \bar{n}, \quad (\text{B.7})$$

da Fluktuationen im Mittel verschwinden.

Nimmt man zwei Bilder auf, um Variationen der Pixel heraus zu mitteln, die durch nicht vollständig konstante Empfindlichkeit entstehen können, so gilt für beide Aufnahmen

$$S_1 = G \cdot n_1 + \bar{B} + \Delta S_1 \text{ mit } n_1 = \bar{n} + \Delta n_1 \text{ und } \bar{S}_1 = G \cdot \bar{n} \quad (\text{B.8})$$

$$S_2 = G \cdot n_2 + \bar{B} + \Delta S_2 \text{ mit } n_2 = \bar{n} + \Delta n_2 \text{ und } \bar{S}_2 = G \cdot \bar{n} \quad (\text{B.9})$$

Bildet man für jeden Wert die Differenz der Gleichungen (B.8) und (B.9), so erhält man

$$S_1 - S_2 = G(\Delta n_1 - \Delta n_2) + (\Delta S_1 - \Delta S_2). \quad (\text{B.10})$$

Es lässt sich die Varianz der Differenz bestimmen zu

$$\begin{aligned} V &= \overline{(S_1 - \bar{S}_1 - S_2 + \bar{S}_2)^2} = \overline{(S_1 - S_2)^2} \\ &= \overline{G^2(\Delta n_1 - \Delta n_2)^2} + 2G\overline{(\Delta n_1 - \Delta n_2)(\Delta S_1 - \Delta S_2)} \\ &+ \overline{(\Delta S_1 - \Delta S_2)^2} \end{aligned} \quad (\text{B.11})$$

Für nicht miteinander korrelierte Fluktuationen verschwindet der Mittelwert des Produktes, es gilt also $\overline{\Delta n \Delta S} = \overline{\Delta n \Delta B} = \overline{\Delta S \Delta B} = 0$. Zudem sind die Quadrate der Fluktuationen im Mittel gleich.

Unter Annahme einer Poissonverteilung gilt weiter $\overline{(\Delta n)^2} = \bar{n}$.
Man erhält also

$$V = 2G^2\bar{n} + 2s^2 = 2G\overline{S'} + 2s^2. \quad (\text{B.12})$$

Um einen besseren Mittelwert zu erhalten kann man $\overline{S'}$ auch berechnen nach

$$\overline{S'} = \frac{1}{2} \left[\overline{(S_1 - B)} + \overline{(S_2 - B)} \right]. \quad (\text{B.13})$$

Bei Veränderung der Intensität bleiben s^2 und G gleich, aber es ändern sich V und $\overline{S'}$, wodurch es möglich ist, durch eine graphische Auftragung von V über $\overline{S'}$ das Ausleserauschen und den Gain zu bestimmen. Die eigentliche Kenngröße der Kamera ist dann allerdings K .

$$K = \frac{1}{G} \text{ in } \frac{e^-}{ADU} \quad (\text{B.14})$$

Ausleserauschen Um das Ausleserauschen zu bestimmen, wird die Differenz zweier Biasaufnahmen gebildet. Die beiden Bias-Verteilungen lassen sich als

$$B_1 = \overline{B_1} + \Delta B_1 \text{ und } B_2 = \overline{B_2} + \Delta B_2$$

beschreiben. Da bei minimalen Belichtungszeiten der Dunkelstrom noch keine Rolle spielt, kann man annehmen, dass $\Delta B_1 = \Delta B_2 = R_S$ das Ausleserauschen um den Bias-Level ist.

Bildet man die Differenz beider Aufnahmen

$$B_1 - B_2 = \overline{B_{Diff}} + \Delta B_{Diff},$$

so bestimmt sich seine Standardabweichung nach der Gaußschen Fehlerfortpflanzung als

$$\Delta B_{Diff} = \sqrt{(\Delta B_1)^2 + (\Delta B_2)^2} = \sqrt{2}R_S.$$

Bestimmt man also die Standardabweichung eines Differenzbildes, so lässt sich daraus das Ausleserauschen errechnen. Damit der Wert vergleichbar wird, muss er allerdings noch gainkorrigiert werden.

Es gilt also

$$R_S = \frac{StdDev}{\sqrt{2} \cdot G} \text{ in } e^-$$

für das Ausleserauschen.

Vorgehen

Aufgenommen werden jeweils zwei identische Bilder bei einer minimalen Belichtungszeit ohne Beleuchtung (Biasaufnahmen: B_1 und B_2), sowie je ein Dunkelbild (D) bei verschiedenen Belichtungszeiten im Sekundenbereich und je zwei identische Weißlichtaufnahmen bei unterschiedlicher Intensität der Lichtquelle (S_1 und S_2). Für die Auswertung werden folgende Schritte durchgeführt:

- Gain
 - Erstelle ein Differenzbild $S_1 - S_2$ für alle Messungen
 - Bestimme die Standardabweichung ($StdDev$) der Counts aller Pixel
 - Berechne die Varianz $V = (StdDev)^2$
 - Erstelle ein Differenzbild $S - B_1$ für alle Messungen
 - Bestimme den Mittelwert der Counts
 - Berechne $S' = \frac{1}{2} \left[(\overline{S_1 - B_1}) + (\overline{S_2 - B_1}) \right]$ aus den jeweils zusammengehörenden Mittelwerten
 - Trage V über S' auf
 - Passe eine Gerade an nach $V = 2G \cdot S' + 2s^2$
 - Bestimme G , $K = \frac{1}{G}$ und s
- Ausleserauschen
 - Erstelle ein Differenzbild $B_1 - B_2$
 - Bestimme die Standardabweichung ($StdDev$) der Counts aller Pixel
 - Berechne $R_S = \frac{StdDev}{\sqrt{2} \cdot G}$
- Dunkelstrom
 - Bestimme den Mittelwert D aller Counts der aufgenommenen Dunkelbilder
 - Trage D über der Belichtungszeit auf
 - Berechne aus der gainkorrigierten Steigung den Dunkelstrom D_S

Beispiel: *F-View II*-Kamera

Herstellerangaben Im Folgenden sind einige Angaben des Herstellers SIS (SOFT IMAGING SYSTEM) der *F-View II* Kamera aufgeführt. Durch das verwendete Programm *Cell^M* ist die Belichtungszeit nach unten allerdings auf 1 ms beschränkt, statt wie angegeben auf 100 μ s.

Auflösung	1376 × 1032
Aktives Element	6,45 × 6,45 μm ²
Abtastrate	20 MHz
Dynamikbereich	12 Bit (d.h. maximal 4095 Counts)
Belichtungszeiten	100 μs – 160 s
Kühlung	Peltier: 10°C bei 25°C
Ausleserauschen	< 10e ⁻

Messungen

Die Messungen erfolgten am *BX51* Mikroskop. Es wurde eine Milchglasscheibe von unten beleuchtet und mit einem Objektiv mit 40facher Vergrößerung und numerischer Apertur 0,75 beobachtet. Verändert wurde die Belichtungszeit.

Bias Level und Dunkelstrom Der Bias Level ist auf zwei Arten bestimmbar. Zum einen lässt er sich aus der Mittelung aller Counts bei einer Belichtungszeit von 0 s ablesen, zum anderen kann wegen des linearen Zusammenhangs durch die Aufnahme von Dunkelbildern bei verschiedenen Belichtungszeiten ein Wert für die Belichtungszeit von 0 s extrapoliert werden. Aus der Steigung ist zudem der Dunkelstrom bestimmbar.

Aus der graphischen Auftragung der Counts der Dunkelbild-Aufnahmen gegen die verwendete Belichtungszeit T lässt sich der Dunkelstrom D_s bestimmen. Aus Abbildung B.1 links erhält man nach $D_s = \frac{D}{T} \frac{1}{G}$ den Dunkelstrom.

Gain und Ausleserauschen Weißbilder (= Flatfield-Aufnahmen) bei unterschiedlicher Lichtintensität werden aufgenommen. Hierbei handelt es sich um möglichst homogen ausgeleuchtete Aufnahmen. Dies lässt sich in der *Cell^M*-Software mit Hilfe von Intensitätsprofilen überprüfen. Aus der Varianz und dem biaskorrigierten Signalmittelwert ist der Gain und das Ausleserauschen der Kamera bestimmbar. Durch Änderung der Belichtungszeit kann die Lichtintensität je Aufnahme variiert werden. Die graphische Auftragung der Varianz V von $S_1 - S_2$ gegen das biaskorrigierte Signal $\overline{S'}$ ergibt eine Gerade (vgl. Abb. B.1 rechts), die sich mit $V = 2G \cdot \overline{S'} + 2s^2$ beschreiben lässt. Durch eine lineare Anpassung erhält man den Gain G bzw. $K = \frac{1}{G}$ und daraus das Ausleserauschen.

Ergebnisse der *F-View II*-Kamera

Die Messungen an der *F-View II* CCD-Kamera führten zu einem Bias Level von $\overline{B} = 128(1)$, einem Gain von $\overline{G} = 0,148(2) \frac{ADU}{e^-}$ bzw. $\overline{K} = 6,77(9) \frac{e^-}{ADU}$. Das für die Empfindlichkeit entscheidende Ausleserauschen stimmt mit der Angabe des Herstellers überein. Hier konnte es zu $\overline{R_S} = 9,5(2) e^-$ bestimmt werden. Der Dunkelstrom liegt bei $D_s = 0,66(3) \frac{e^-}{s}$. Damit ist diese Kamera durch das relativ hohe Ausleserauschen weniger für Messungen an besonders lichtschwachen Objekten geeignet. Lichtstärkere Objekte, wie fluoreszierende Nanosphären, können mit ihr aber dargestellt werden, wofür die leichte Handhabung vorteilhaft ist.

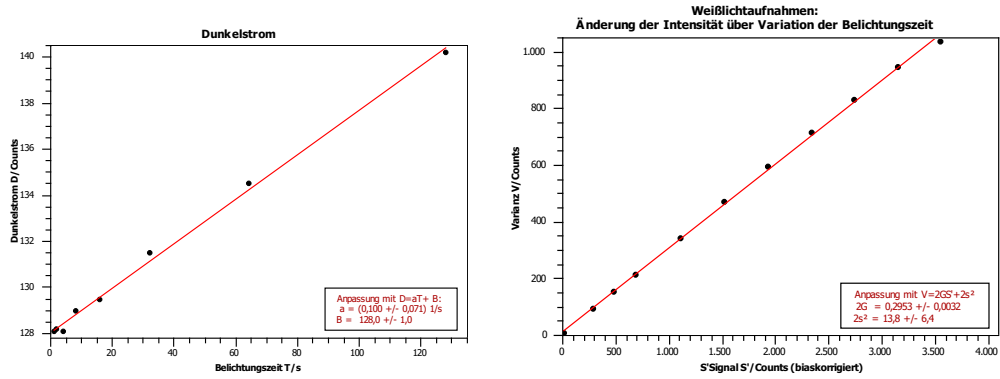


Abbildung B.1.: links: Dunkelstrommessung: Es wurden Dunkelbilder bei verschiedenen Belichtungszeiten aufgenommen. Der Achsenabschnitt gibt den Bias-Level an. Aus der Steigung lässt sich der Dunkelstrom bestimmen. rechts: Weißbilder unterschiedlicher Intensität: Durch Variation der Belichtungszeit wurde die gemessene Lichtmenge verändert. Trägt man Varianz gegen Signal auf, so lässt sich aus der Steigung Gain und Ausleserauschen bestimmen.

Ergebnisse der *Orca flash 4.0*-Kamera

Für die Messungen an den anderen Kameras, insbesondere der *Orca flash 4.0* Kamera von HAMAMATSU wurde analog zu den Messungen der *F-View II*-Kamera vorgegangen. Bei dieser Kamera handelt es sich um eine auf $-10^\circ C$ Peltier-gekühlte 16 bit CMOS-Kamera mit 2048×2048 Pixeln bei einer Pixelgröße von $(6,5 \mu m)^2$. Sie ließ sich mit einem Ausleserauschen von $1,406(5) e^-$ (Herstellerangabe: $1,4 e^-$) für den Normalbetrieb (bei 30 fps) und $1,77(3) e^-$ (Herstellerangaben $1,9 e^-$) für den schnellen Betrieb über USB 3.0 spezifizieren. Der Dunkelstrom ergab sich zu $0,0418(7) \frac{e^-}{s}$ (Herstellerangabe: $0,06 \frac{e^-}{s}$) bei einer Aufnahme mit 30 fps.

Die Messungen legen nahe, dass die *Orca 4.0*-Kamera durch ihre hohe Empfindlichkeit für Aufnahmen von Objekten geringer Helligkeit besonders geeignet ist.

Tabelle B.1.: Vergleich der Kamera-Eigenschaften

	<i>F-View II</i>	<i>Orca flash 4.0</i>
Bias Level \bar{B}	128(1)	99(2)
Dunkelstrom D_s in $\frac{e^-}{s}$	0,66(3)	0,0418(7)
Gain \bar{G} in $\frac{ADU}{e^-}$	0,148(2)	2,25(2)
reziproker Gain \bar{K} in $\frac{e^-}{ADU}$	6,77(9)	0,445(3)
Ausleserauschen \bar{R}_S in e^-	9,5(2)	1,406(5)

Anhang C.

Abkürzungen und Konstanten

Es wurden die folgenden Abkürzungen verwendet:

Abkürzung	Bedeutung
AC	Wechselstrom (alternating current)
AC-EOF	AC-elektroosmotischer Fluss
ADU	Analog-Digital-Unit
AFM	Atom-Kraft-Mikroskopie
APC	Allophycocyanin
a.u.	Willkürliche Einheiten (arbitrary units)
B	Bias Level
Bead	Polystyrol Mikro- oder Nano-Sphäre
BSA	Rinderserumalbumin (Bovines Serumalbumin)
C-LSM	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
CM	Clausius-Mossotti-Faktor
CMP	chemical mechanical polishing
CMOS	complementary metal-oxide-semiconductor
<i>D_S</i>	Dunkelstrom
DC	Gleichstrom (direct current)
DEP	Dielektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDX	Energiedispersive Röntenspektroskopie
EHT	Beschleunigungsspannung (extraheigh tension)
<i>F_{DEP}</i>	Dielektrophorese-Kraft
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FLIM	Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie
G	Gain
IHP	Leibniz Institute für innovative Mikroelektronik
<i>I_{Probe}</i>	Probenstrom
ITO	Indium-Zinn-Oxid (indium tin oxide)
M	Vergrößerung
NA	Numerische Apertur
nDEP	negative Dielektrophorese
OP	Optische Pinzette
PALM	Photoactivated Localization Microscopy

PC	Phycocyanin
pDEP	positive Dielektrophorese
PE	Phycoerythrin
R_S	Ausleserauschen
R-PE	R-Phycoerythrin
REM	Raster-Elektronen-Mikroskop
RIE	reactive ion etching
ROI	Region of interest
SIM	Structured Illumination Microscopy
SMLM	Single-molecule Localization Microscopy
STED	Stimulated Emission Depletion
STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
WD	Arbeitsabstand (working distance)

Folgende Konstanten wurden für Berechnungen benötigt:

- $\epsilon_0 = 8,85418781762 \cdot 10^{-12} \frac{As}{Vm}$: Permittivität des Vakuums
- $\epsilon_{m,H_2O} = 80$: relative Permittivität von Wasser
- $\sigma_{m,H_2O} = 3 \cdot 10^{-5} \frac{S}{m}$: gemessene elektrische Leitfähigkeit von Reinstwasser
- $\epsilon_{SiO_2} = 4,3$: relative Permittivität von SiO_2 [49]
- $\epsilon_{p,Bead} = 2,55$: relative Permittivität von Polystyrol [49]
- $\sigma_{p,Bead} = 2 \cdot 10^{-3} \frac{S}{m}$: elektrische Leitfähigkeit aus gemessener Übergangsfrequenz

Anhang D.

Literaturverzeichnis

- [1] M. Abramowitz. *Microscope: Basics and Beyond*, volume 1. Olympus America Inc., Melville, 2003.
- [2] M. Abramowitz, K. R. Spring, H. E. Keller, and M. W. Davidson. Basic Principles of Microscope Objectives. *Biotechniques*, 33(4):772–781, 2002.
- [3] K. Adamiak. Interaction of two dielectric or conducting droplets aligned in the uniform electric field. *J. Electrostat.*, 51-52(1-4):578–584, 2001.
- [4] C. A. Agardh. *Systema Algarum. Lundae Literis Berlingianis*, 1824.
- [5] A. Alazzam, I. Stiharu, R. Bhat, and A. N. Meguerditchian. Interdigitated comb-like electrodes for continuous separation of malignant cells from blood using dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 32(11):1327–1336, 2011.
- [6] R. Arya, H. Komal, S. A, and K. R. Applications of Dielectrophoresis in the Field of Medical Sciences. *Int. J. Sci. Res. Sci. Technol.*, 4(11):328–341, 2019.
- [7] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.*, 11(5):288–290, 1986.
- [8] K. D. Barbee, A. P. Hsiao, M. J. Heller, and X. Huang. Electric field directed assembly of high-density microbead arrays. *Lab Chip*, 9(22):3268–3274, 2009.
- [9] A. Barik, X. Chen, and S. H. Oh. Ultralow-Power Electronic Trapping of Nanoparticles with Sub-10 nm Gold Nanogap Electrodes. *Nano Lett.*, 16(10):6317–6324, 2016.
- [10] A. Barik, S. Cherukulappurath, N. J. Wittenberg, T. W. Johnson, and S. H. Oh. Dielectrophoresis-Assisted Raman Spectroscopy of Intravesicular Analytes on Metallic Pyramids. *Anal. Chem.*, 88(3):1704–1710, 2016.
- [11] A. Barik, L. M. Otto, D. Yoo, J. Jose, T. W. Johnson, and S.-H. H. Oh. Dielectrophoresis-enhanced plasmonic sensing with gold nanohole arrays. *Nano Lett.*, 14(4):2006–2012, 2014.

- [12] A. Barik, Y. Zhang, R. Grassi, B. P. Nadappuram, J. B. Edel, T. Low, S. J. Koester, and S. H. Oh. Graphene-edge dielectrophoretic tweezers for trapping of biomolecules. *Nat. Commun.*, 8(1):1867 (1–9), 2017.
- [13] J. D. Beck, L. Shang, M. S. Marcus, and R. J. Hamers. Manipulation and real-time electrical detection of individual bacterial cells at electrode junctions: A model for assembly of nanoscale biosystems. *Nano Lett.*, 5(4):777–781, 2005.
- [14] G. Brezesinski and H.-J. Mögel. *Grenzflächen und Kolloide: Physikalisch chemische Grundlagen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1993.
- [15] M. Castellarnau, A. Errachid, C. Madrid, A. Juárez, and J. Samitier. Dielectrophoresis as a tool to characterize and differentiate isogenic mutants of *Escherichia coli*. *Biophys. J.*, 91(10):3937–3945, 2006.
- [16] J. Castillo, S. Tanzi, M. Dimaki, and W. Svendsen. Manipulation of self-assembly amyloid peptide nanotubes by dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 29(24):5026–5032, 2008.
- [17] S. H. Cha, S. H. Kang, Y. J. Lee, J. H. Kim, E. Y. Ahn, Y. Park, and S. Cho. Fabrication of nanoribbons by dielectrophoresis assisted cold welding of gold nanoparticles on mica substrate. *Sci. Rep.*, 9(1):3629 (1–12), 2019.
- [18] W.-R. Chang, T. Jiang, Z.-L. Wan, J.-P. Zhang, Z.-X. Yang, and D.-C. Liang. Crystal structure of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 262(5):721–731, 1996.
- [19] Q. Chen and Y. J. Yuan. A review of polystyrene bead manipulation by dielectrophoresis. *RSC Adv.*, 9(9):4963–4981, 2019.
- [20] M. H. Chowdhury, K. Ray, K. Aslan, J. R. Lakowicz, and C. D. Geddes. Metal-enhanced fluorescence of phycobiliproteins from heterogeneous plasmonic nanostructures. *J. Phys. Chem. C*, 111(51):18856–18863, 2007.
- [21] C. H. Chuang and Y. W. Huang. Condensation of fluorescent nanoparticles using a DEP chip with a dot-electrode array. *Microelectron. Eng.*, 97:317–323, 2012.
- [22] C.-C. Chung, T. Glawdel, C. L. Ren, and H.-C. Chang. Combination of ac electroosmosis and dielectrophoresis for particle manipulation on electrically-induced microscale wave structures. *J. Micromechanics Microengineering*, 25(3):035003–035012, 2015.
- [23] R. W. Clarke, S. S. White, D. Zhou, L. Ying, and D. Klenerman. Trapping of proteins under physiological conditions in a nanopipette. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 44(24):3747–3750, 2005.
- [24] H. Dalir, Y. Yanagida, and T. Hatsuzawa. Probing DNA mechanical characteristics by dielectrophoresis. *Sensors Actuators, B Chem.*, 136(2):472–478, 2009.

- [25] S. Dash and S. Mohanty. Dielectrophoretic separation of micron and submicron particles: A review. *Electrophoresis*, 35(18):2656–2672, 2014.
- [26] K. Denzer, M. J. Kleijmeer, H. F. Heijnen, W. Stoorvogel, and H. J. Geuze. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J. Cell Sci.*, 113(4):3365–3374, 2000.
- [27] E. Fabbri, M. Nachtegaal, T. Binninger, X. Cheng, B. J. Kim, J. Durst, F. Bozza, T. Graule, R. Schäublin, L. Wiles, M. Pertoso, N. Danilovic, K. E. Ayers, and T. J. Schmidt. Dynamic surface self-reconstruction is the key of highly active perovskite nano-electrocatalysts for water splitting. *Nat. Mater.*, 16(9):925–931, 2017.
- [28] F. T. Farmer. Electrical Properties of Polystyrene. *Nature*, 150(3809):521, 1942.
- [29] S. Fiedler, S. G. Shirley, T. Schnelle, and G. Fuhr. Dielectrophoretic Sorting of Particles and Cells in a Microsystem. *Anal. Chem.*, 70(9):1909–1915, 1998.
- [30] J. Fleurence. R-Phycocerythrin from red macroalgae: Strategies for extraction and potential application in Biotechnology. *Appl. Biotechnol. Food Sci. Policy*, 1(1):63–68, 2003.
- [31] K. J. Freedman, L. M. Otto, A. P. Ivanov, A. Barik, S.-H. Oh, and J. B. Edel. Nanopore sensing at ultra-low concentrations using single-molecule dielectrophoretic trapping. *Nat. Commun.*, 7:10217 (1–9), 2016.
- [32] E. M. Freer, O. Grachev, X. Duan, S. Martin, and D. P. Stumbo. High-yield self-limiting single-nanowire assembly with dielectrophoresis. *Nat. Nanotechnol.*, 5(7):525–530, 2010.
- [33] A. Gaigalas, T. Gallagher, K. D. Cole, T. Singh, L. Wang, and Y.-Z. Zhang. A multistate model for the fluorescence response of R-phycoerythrin. *Photochem. Photobiol.*, 82(3):635–44, 2006.
- [34] R. Gambari, M. Borgatti, L. Altomare, N. Manaresi, G. Medoro, A. Romani, M. Tartagni, and R. Guerrieri. Applications to cancer research of "lab-on-a-chip" devices based on dielectrophoresis (DEP). *Technol. Cancer Res. Treat.*, 2(1):31–40, 2003.
- [35] B. D. Gates. Self-assembly: Nanowires find their place. *Nat. Nanotechnol.*, 5(7):484–485, 2010.
- [36] M. Gel, Y. Kimura, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, and M. Washizu. Dielectrophoretic cell trapping and parallel one-to-one fusion based on field constriction created by a micro-orifice array. *Biomicrofluidics*, 4(2):022808 (1–8), 2010.
- [37] A. N. Glazer. Phycobilisomes: Structure and Dynamics. *Annu. Rev. Microbiol.*, 36:173–198, 1982.

- [38] A. N. Glazer and L. Stryer. Emerging Techniques Phycofluor probes. *TIBS*, 5(1):423–427, 1984.
- [39] H. H. Gorris and D. R. Walt. Analytical chemistry on the femtoliter scale. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 49(23):3880–3895, 2010.
- [40] M. Goulian and S. M. Simon. Tracking single proteins within cells. *Biophys. J.*, 79(4):2188–2198, 2000.
- [41] N. G. Green, A. Ramos, A. González, A. Castellanos, and H. Morgan. Electric field induced fluid flow on microelectrodes: The effect of illumination. *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 33(2):L13–L17, 2000.
- [42] N. G. Green, A. Ramos, A. González, H. Morgan, and A. Castellanos. Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. I. Experimental measurements. *Phys. Rev. E Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 61(4):4011–4018, 2000.
- [43] N. G. Green, A. Ramos, A. González, H. Morgan, and A. Castellanos. Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. III. Observation of streamlines and numerical simulation. *Phys. Rev. E Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 66(2):026305 (1–11), 2002.
- [44] T. Ha and P. Tinnefeld. Photophysics of Fluorescent Probes for Single-Molecule Biophysics and Super-Resolution Imaging. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 63(1):595–617, 2012.
- [45] Y. Harada and T. Asakura. Radiation forces on a dielectric sphere. *Opt. Commun.*, 124(5-6):529–541, 1996.
- [46] D. Holmes, N. G. Green, and H. Morgan. Microdevices for Dielectrophoretic Flow-Through Cell Separation. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, 22(6):85–90, 2003.
- [47] R. Hölzel, N. Calander, Z. Chiragwandi, M. Willander, and F. F. Bier. Trapping single molecules by dielectrophoresis. *Phys. Rev. Lett.*, 95(12-16):128102 (1–4), 2005.
- [48] M. P. Hughes. AC electrokinetics: applications for nanotechnology. *Nanotechnology*, 11(2):124–132, 2000.
- [49] M. P. Hughes. *Nanoelectromechanics in Engineering and Biology*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 2003.
- [50] M. P. Hughes and H. Morgan. Dielectrophoretic trapping of single sub-micrometre scale bioparticles. *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 31(17):2205–2210, 1998.
- [51] M. P. Hughes and H. Morgan. Dielectrophoretic characterization and separation of antibody-coated submicrometer latex spheres. *Anal. Chem.*, 71(16):3441–3445, 1999.

- [52] M. P. Hughes, H. Morgan, and F. J. Rixon. Dielectrophoretic manipulation and characterization of herpes simplex virus-1 capsids. *Eur. Biophys. J.*, 30(4):268–272, 2001.
- [53] K. Hyoungh Kang, X. Xuan, Y. Kang, and D. Li. Effects of dc-dielectrophoretic force on particle trajectories in microchannels. *J. Appl. Phys.*, 99(6):064702 (1–8), 2006.
- [54] A. Jaffe and J. Voldman. Multi-frequency dielectrophoretic characterization of single cells. *Microsystems Nanoeng.*, 4(1):23 (1–9), 2018.
- [55] M. S. Jäger, K. Uhlig, T. Schnelle, and T. Müller. Contact-free single-cell cultivation by negative dielectrophoresis. *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 41(17):175502 (1–8), 2008.
- [56] J. Jose, S. Kress, A. Barik, L. M. Otto, J. Shaver, T. W. Johnson, Z. J. Lapin, P. Bharadwaj, L. Novotny, and S.-H. H. Oh. Individual Template-Stripped Conductive Gold Pyramids for Tip-Enhanced Dielectrophoresis. *ACS Photonics*, 1(5):464–470, 2014.
- [57] Y. Kang, D. Li, S. A. Kalams, and J. E. Eid. DC-Dielectrophoretic separation of biological cells by size. *Biomed. Microdevices*, 10(2):243–249, 2008.
- [58] T. Kawabata and M. Washizu. Dielectrophoretic detection of molecular bindings. *IEEE Trans. Ind. Appl.*, 37(6):1625–1633, 2001.
- [59] H. Kim, I. K. Lee, K. Taylor, K. Richters, D. H. Baek, J. H. Ryu, S. J. Cho, Y. H. Jung, D. W. Park, J. Novello, J. Bong, A. J. Suminski, A. M. Dingle, R. H. Blick, J. C. Williams, E. W. Dent, and Z. Ma. Single-neuronal cell culture and monitoring platform using a fully transparent microfluidic DEP device. *Sci. Rep.*, 8(1):1–9, 2018.
- [60] J. Kim, K. S. Hwang, S. Lee, J. H. Park, and H.-J. Shin. Selective nanomanipulation of fluorescent polystyrene nano-beads and single quantum dots at gold nanostructures based on the AC-dielectrophoretic force. *Nanoscale*, 7(47):20277–20283, 2015.
- [61] F. R. Kjellman. Japanska arter af slägtet Porphyra. *Bih. Till. K. Sven. Vet. Akad. Hadl.*, 23:1–34, 1897.
- [62] X. Knigge, C. Wenger, F. F. Bier, and R. Hölzel. Dielectrophoretic immobilisation of nanoparticles as isolated singles in regular arrays. *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 51(6):065308–065318, 2018.
- [63] T. Kodama, T. Osaki, R. Kawano, K. Kamiya, N. Miki, and S. Takeuchi. Round-tip dielectrophoresis-based tweezers for single micro-object manipulation. *Biosens. Bioelectron.*, 47:206–212, 2013.

- [64] R. W. F. Kretschmer. Pearl Chain Formation of Nanoparticles in Microelectrode Gaps by Dielectrophoresis. *Langmuir*, 20(12):11797–11801, 2004.
- [65] V. Krivitsky, L. C. Hsiung, A. Lichtenstein, B. Brudnik, R. Kantaev, R. Elnathan, A. Pevzner, A. Khatchourints, and F. Patolsky. Si nanowires forest-based on-chip biomolecular filtering, separation and preconcentration devices: Nanowires do it all. *Nano Lett.*, 12(9):4748–4756, 2012.
- [66] C. Kua, Y. Lam, and C. Yang. Review of bio-particle manipulation using dielectrophoresis. *Mosaic A J. Interdiscip. Study Lit.*, pages 144–150, 2004.
- [67] M. Kumemura, D. Collard, C. Yamahata, N. Sakaki, G. Hashiguchi, and H. Fujita. Single DNA molecule isolation and trapping in a microfluidic device. *ChemPhysChem*, 8(12):1875–1880, 2007.
- [68] A. Kuzyk. Dielectrophoresis at the nanoscale. *Electrophoresis*, 32(17):2307–2313, 2011.
- [69] E.-M. Laux, U. C. Kaletta, F. F. Bier, C. Wenger, and R. Hölzel. Functionality of dielectrophoretically immobilized enzyme molecules. *Electrophoresis*, 35(4):459–66, 2014.
- [70] E.-M. Laux, X. Knigge, F. F. Bier, C. Wenger, and R. Hölzel. Dielectrophoretic immobilization of proteins: Quantification by atomic force microscopy. *Electrophoresis*, 36(17):2094–2101, 2015.
- [71] E.-M. Laux, X. Knigge, F. F. Bier, C. Wenger, and R. Hölzel. Aligned Immobilization of Proteins Using AC Electric Fields. *Small*, 12(11):1514–1520, 2016.
- [72] C. Leiterer, S. Berg, A.-P. Eskelinen, A. Csáki, M. Urban, P. Torma, and W. Fritzsche. Assembling gold nanoparticle chains using an AC electrical field: Electrical detection of organic thiols. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 176:368–373, 2012.
- [73] C. Leiterer, T. Deckert-Gaudig, P. Singh, J. Wirth, V. Deckert, and W. Fritzsche. Dielectrophoretic positioning of single nanoparticles on atomic force microscope tips for tip-enhanced Raman spectroscopy. *Electrophoresis*, 36(9-10):1142–1148, 2015.
- [74] C. Leiterer, E. Wünsche, P. Singh, J. Albert, J. M. Köhler, V. Deckert, and W. Fritzsche. High precision attachment of silver nanoparticles on AFM tips by dielectrophoresis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 408(13):3625–3631, 2016.
- [75] J. Li, Q. Zhang, N. Peng, and Q. Zhu. Manipulation of carbon nanotubes using AC dielectrophoresis. *Appl. Phys. Lett.*, 86:153116 (1–3), 2005.
- [76] M. Li, S. Li, W. Cao, W. Li, W. Wen, and G. Alici. Improved concentration and separation of particles in a 3D dielectrophoretic chip integrating focusing, aligning and trapping. *Microfluid. Nanofluidics*, 14(3-4):527–539, 2013.

- [77] Y. Lin, J. Shiomi, S. Maruyama, and G. Amberg. Electrothermal flow in dielectrophoresis of single-walled carbon nanotubes. *Phys. Rev. B Condens. Matter Mater. Phys.*, 76:045419 (1–5), 2007.
- [78] L. Liu, K. Chen, N. Xiang, and Z. Ni. Dielectrophoretic manipulation of nanomaterials: A review. *Electrophoresis*, 40(6):873–889, 2019.
- [79] N. G. Loucaides, A. Ramos, and G. E. Georghiou. Trapping and manipulation of nanoparticles by using jointly Dielectrophoresis and AC electroosmosis. *J. Phys. Conf. Ser.*, 100(5):052015 (1–5), 2008.
- [80] A. Mahigir, T. W. Chang, A. Behnam, G. L. Liu, M. R. Gartia, and G. Veronis. Plasmonic nanohole array for enhancing the SERS signal of a single layer of graphene in water. *Sci. Rep.*, 7(1):1–9, 2017.
- [81] K. A. Majorek, P. J. Porebski, A. Dayal, M. D. Zimmerman, K. Jablonska, A. J. Stewart, M. Chruszcz, and W. Minor. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.*, 52(3-4):174–182, 2012.
- [82] B. Malnar, B. Malyan, W. Balachandran, and F. Cecelja. Separation of latex spheres using dielectrophoresis and fluid flow. *IEE Proc.*, 152(2):66–69, 2003.
- [83] S. A. McKinney, C. Joo, and T. Ha. Analysis of single-molecule FRET trajectories using hidden Markov modeling. *Biophys. J.*, 91(5):1941–1951, 2006.
- [84] B. McNally, A. Singer, Z. Yu, Y. Sun, Z. Weng, and A. Meller. Optical recognition of converted DNA nucleotides for single-molecule DNA sequencing using nanopore arrays. *Nano Lett.*, 10(6):2237–2244, 2010.
- [85] W. Mehr, A. Wolff, H. Frankenfeld, T. Skaloud, W. Höppner, E. Bugiel, J. Lärz, and B. Hunger. Ultra sharp crystalline silicon tip array used as field emitter. *Microelectron. Eng.*, 30(1-4):395–398, 1996.
- [86] L. Möckl, D. C. Lamb, and C. Bräuchle. Super-resolved Fluorescence Microscopy: Nobel Prize in Chemistry 2014 for Eric Betzig, Stefan Hell, and William E. Moerner. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 53(51):13972–13977, 2014.
- [87] W. E. Moerner. Those blinking single molecules. *Science*, 277(5329):1059–1060, 1997.
- [88] H. Morgan and N. G. Green. *AC Electrokinetics: colloids and nanoparticles*. Research Studies Press Ltd., Baldock, Hertfordshire, England, 1 edition, 2003.
- [89] A. Nakano, T. C. Chao, F. Camacho-Alanis, and A. Ros. Immunoglobulin G and bovine serum albumin streaming dielectrophoresis in a microfluidic device. *Electrophoresis*, 32(17):2314–2322, 2011.

- [90] A. Nakano and A. Ros. Protein dielectrophoresis: Advances, challenges, and applications. *Electrophoresis*, 34(1):1085–1096, 2013.
- [91] B. Neirinck, J. Fransaer, O. V. der Biest, and J. Vleugels. Aqueous electrophoretic deposition in asymmetric AC electric fields (AC-EPD). *Electrochem. commun.*, 11(1):57–60, 2008.
- [92] F. Oesterhelt, M. Rief, and H. E. Gaub. Single molecule force spectroscopy by AFM indicates helical structure of poly(ethylene-glycol) in water. *New J. Phys.*, 1:6.1–6.11, 1999.
- [93] A. Orta-Ramirez, J. Merrill, and D. Smith. pH Affects the Thermal Inactivation Parameters of R-Phycoerythrin from *Porphyra yezoensis*. *J. Food Sci.*, 6(65):1046–1050, sep 2000.
- [94] S. Otto, U. C. Kaletta, F. F. Bier, C. Wenger, and R. Hölzel. Dielectrophoretic immobilisation of antibodies on microelectrode arrays. *Lab Chip*, 14(5):998–1004, 2014.
- [95] Y. Pang and R. Gordon. Optical trapping of a single protein. *Nano Lett.*, 12(1):402–406, 2012.
- [96] W. Paul and H. Steinwedel. Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Zeitschrift für Naturforsch.*, 8a:448–450, 1953.
- [97] G. Pesce, G. Rusciano, G. Zito, and A. Sasso. Simultaneous measurements of electrophoretic and dielectrophoretic forces using optical tweezers. *Opt. Express*, 23(7):9363–9368, 2015.
- [98] R. Pethig. *Dielectrophoresis - Theory, Methodology and Biological applications*. John Wiley & Sons, Hoboken, Chichester, 1st edition, 2017.
- [99] R. Pethig. Review—Where Is Dielectrophoresis (DEP) Going? *J. Electrochem. Soc.*, 164(5):B3049–B3055, 2017.
- [100] R. Pethig. Limitations of the Clausius-Mossotti function used in dielectrophoresis and electrical impedance studies of biomacromolecules. *Electrophoresis*, Early View:1–9, 2019.
- [101] L. A. Peyser, A. E. Vinson, A. P. Bartko, and R. M. Dickson. Photoactivated Fluorescence from Individual Silver Nanoclusters. *Science*, 291(5501):103–106, 2001.
- [102] H. A. Pohl. The motion and precipitation of suspensoids in divergent electric fields. *J. Appl. Phys.*, 22(7):869–871, 1951.
- [103] H. A. Pohl. *Dielectrophoresis - The behavior of neutral matter in nonuniform electric fields*. Cambridge University Press, Cambridge, 1978.

- [104] S. Pujals, N. Feiner-Gracia, P. Delcanale, I. Voets, and L. Albertazzi. Super-resolution microscopy as a powerful tool to study complex synthetic materials. *Nat. Rev. Chem.*, 3(2):68–84, 2019.
- [105] A. Ramos, H. Morgan, N. G. Green, and A. Castellanos. Ac electrokinetics: a review of forces in microelectrode structures. *J. Phys. D. Appl. Phys.*, 31(18):2338–2353, 1999.
- [106] K. Ray, M. H. Chowdhury, and J. R. Lakowicz. Single-molecule spectroscopic study of enhanced intrinsic phycoerythrin fluorescence on silver nanostructured surfaces. *Anal. Chem.*, 80(18):6942–6948, 2008.
- [107] R. Riahifar, B. Raissi, E. Marzbanrad, and C. Zamani. AC Electrophoresis, a New Technique for Deposition of Ceramic Nanoparticles; Introduction, Application and Mechanism. *Key Eng. Mater.*, 507:41–45, 2012.
- [108] D. M. Rissin, C. W. Kan, T. G. Campbell, S. C. Howes, D. R. Fournier, L. Song, T. Piech, P. P. Patel, L. Chang, A. J. Rivnak, E. P. Ferrell, J. D. Randall, G. K. Provuncher, D. R. Walt, and D. C. Duffy. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat. Biotechnol.*, 28(6):595–599, 2010.
- [109] Y. Rondelez, G. Tresset, K. V. Tabata, H. Arata, H. Fujita, S. Takeuchi, and H. Noji. Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology. *Nat. Biotechnol.*, 23(3):361–365, 2005.
- [110] A. S. Rose, A. R. Bradley, Y. Valasatava, J. M. Duarte, A. Prlic, and P. W. Rose. NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics*, 34(21):3755–3758, 2018.
- [111] C. Schäfer, D. P. Kern, and M. Fleischer. Capturing molecules with plasmonic nanotips in microfluidic channels by dielectrophoresis. *Lab Chip*, 15(4):1066–1071, 2015.
- [112] Sean R Eddy. What is a hidden Markov model? *Nat. Biotechnol.*, 22(10):1315–1316, 2004.
- [113] U. Seger-Sauli, M. Panayiotou, S. Schnydrig, M. Jordan, and P. Renaud. Temperature measurements in microfluidic systems: Heat dissipation of negative dielectrophoresis barriers. *Electrophoresis*, 26(11):2239–2246, 2005.
- [114] Y. Solomentsev, M. Böhmer, and J. L. Anderson. Particle Clustering and Pattern Formation during Electrophoretic Deposition: A Hydrodynamic Model. *Langmuir*, 13(23):6058–6068, 1997.
- [115] E. Stackebrandt, C. Koch, O. Gvozdiak, and P. Schumann. Taxonomic Dissection of the Genus *Micrococcus* : *Kocuria* gen . nov ., *Nesterenkonia* gen . nov ., *Kytococcus* gen . nov ., *Dermacoccus* gen . nov ., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen . emend . *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45(4):682–692, 1995.

- [116] S. Stanke, F. F. Bier, and R. Hölzel. Fluid streaming above interdigitated electrodes in dielectrophoresis experiments. *Electrophoresis*, 32(18):2448–2455, 2011.
- [117] C. Stark. Review : Atik 16IC. *AstroPhotoInsight*, 3(7):4–8, 2007.
- [118] Y. Sugita, T. Noda, H. Sagara, and Y. Kawaoka. Ultracentrifugation deforms unfixed influenza A virions. *J. Gen. Virol.*, 92(11):2485–2493, 2011.
- [119] J. E. Sutherland, S. C. Lindstrom, W. A. Nelson, J. Brodie, M. D. Lynch, M. S. Hwang, H. G. Choi, M. Miyata, N. Kikuchi, M. C. Oliveira, T. Farr, C. Neefus, A. Mols-Mortensen, D. Milstein, and K. M. Müller. A new look at an ancient order: Generic revision of the bangiales (Rhodophyta). *J. Phycol.*, 47(5):1131–1151, 2011.
- [120] J. Toon. Turn on the "Nanolight": Nanometer-Scale Light Source Is First To Show Single-Molecule Electroluminescence. *Georg. Inst. Technol. Res. News*, 2002.
- [121] S. Vaidya, A. Orta-Ramirez, D. M. Smith, and R. Y. Ofoli. Effect of heat on phycoerythrin fluorescence: Influence of thermal exposure on the fluorescence emission of R-phycoerythrin. *Biotechnol. Bioeng.*, 83(4):465–473, 2003.
- [122] M. Washizu and O. Kurosawa. Electrostatic Manipulation of DNA in Microfabricated Structures. *IEEE Trans. Ind. Appl.*, 26(6):1165–1172, 1990.
- [123] M. Washizu, S. Suzuki, O. Kurosawa, T. Nishizaka, and T. Shinohara. Molecular dielectrophoresis of biopolymers. *IEEE Trans. Ind. Appl.*, 30(4):835–843, 1994.
- [124] C. Wenger, X. Knigge, M. Fraschke, D. Wolansky, P. Kulse, U. C. Kaletta, A. Wolff, W. Mehr, E.-M. Laux, F. F. Bier, and R. Hölzel. Label-free Immobilization of Nano-particles on Silicon based Electrodes for Single-biomolecule Studies. In *Proc. Int. Conf. Biomed. Electron. Devices*, pages 176–180, 2014.
- [125] C. M. White, L. A. Holland, and P. Famouri. Application of capillary electrophoresis to predict crossover frequency of polystyrene particles in dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 31(15):2664–2671, 2010.
- [126] A. Wolff, C. Leiterer, A. Csaki, and W. Fritzsche. Dielectrophoretic manipulation of DNA in microelectrode gaps for single-molecule constructs. *Front. Biosci.*, 13:6834–6840, 2008.
- [127] M. Wu, P. M. Goodwin, W. P. Ambrose, and R. A. Keller. Photochemistry and Fluorescence Emission Dynamics of Single Molecules in Solution: B-Phycoerythrin. *J. Phys. Chem.*, 100(96):17406–17409, 1996.
- [128] T. Yamamoto and T. Fujii. Active immobilization of biomolecules on a hybrid three-dimensional nanoelectrode by dielectrophoresis for single-biomolecule study. *Nanotechnology*, 18(49):495503 (1–7), 2007.

- [129] W.-H. Yeo, H.-B. Lee, J.-H. Kim, K.-H. Lee, and J.-H. Chung. Nanotip analysis for dielectrophoretic concentration of nanosized viral particles. *Nanotechnology*, 24(18):185502 (1–9), 2013.
- [130] L. Yuan, Z. Liu, and J. Yang. Measurement approach of Brownian motion force by an abrupt tapered fiber optic tweezers. *Appl. Phys. Lett.*, 91(2007):10–13, 2007.
- [131] L. Zheng, J. P. Brody, and P. J. Burke. Electronic manipulation of DNA, proteins, and nanoparticles for potential circuit assembly. *Biosens. Bioelectron.*, 20(3):606–619, 2004.
- [132] L. Zheng, S. Li, P. J. Burke, and J. P. Brody. Towards single molecule manipulation with dielectrophoresis using nanoelectrodes. *Proc. IEEE Conf. Nanotechnol.*, 1(3):437–440, 2003.

Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas danke ich Prof. Dr. Carsten Beta von der Universität Potsdam.

Die Arbeit wurde am Fraunhofer IZI-BB (bis 2014 Fraunhofer IBMT) in Potsdam-Golm in der Arbeitsgruppe von Dr. Ralph Hölzel durchgeführt. Ihm gilt mein herzlichster Dank, nicht nur für die großartige fachliche Betreuung und die fruchtbaren Diskussionen, sondern auch für die angenehme Atmosphäre in der Arbeitsgruppe und das zwischenmenschliche Verständnis. Ich hätte wohl nicht so leichtem Herzens den Wiedereinstieg nach jeder Elternzeit gewagt, wenn es nicht so gewesen wäre. Vielen Dank!

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Frank F. Bier. Ihm danke ich für das trotz aller Widrigkeiten ungebrochene Engagement für die Projekte und die Abteilung, sowie für das stetige Interesse an meinem Thema, die immer freundlichen Diskussionen und die Ermunterung, Vorträge zu halten.

Auch den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich danken. Insbesondere gilt mein Dank Dr. Eva-Maria Laux, deren Dissertationsthema ebenfalls der Dielektrophorese gewidmet war, so dass wir produktiv zusammenarbeiten konnten. Auch Dr. Elena Ermilova, Jessica Gibbons, Sandra Stanke, Marlen Kruse und Mareike Noffke möchte ich für die immer freundliche Arbeitsatmosphäre, gute Zusammenarbeit und all die mittäglichen Diskussionen danken.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Christian Wenger vom IHP für die Bereitstellung der Elektroden, die Diskussionen und die Anpassung des Chipdesigns an unsere Bedürfnisse. Diese Kooperation war wirklich eine *win-win-win*-Situation.

Ich möchte weiter meinen Freunden und Freundinnen danken und hier insbesondere Dr. Tom Resler und Dr. Melanie Hey erwähnen, die, auch wenn ihnen das vielleicht gar nicht so bewusst ist, konstant für ein Gleichgewicht zwischen Freundschaft, Familie und Beruf gesorgt haben und mir so das seelische Gleichgewicht gegeben haben, das ich gerade in anstrengenden Phasen gebraucht habe.

Des Weiteren möchte ich noch meiner Familie für die Unterstützung danken und hier besonders meinen Mann Jens Möckel erwähnen, der mir auch in fachlicher Sicht bei Programmierfragen immer zu Seite stand.

Zu guter Letzt gilt mein herzlicher Dank meinem Vater Dr. Ronald Knigge und meiner Schwiegermutter Ursula Möckel, die mir durch fleißiges Korrekturlesen geholfen haben, den Fehlerteufel zu vertreiben.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel von mir verfasst wurde. Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht.

Berlin, den 24. Januar 2020

(Xenia Knigge)

