

**Praktikumsprojekt im Rahmen des Fortgeschrittenenpraktikums in
Physikalischer Chemie, Wintersemester 2003/04**

Rasterkraftmikroskopische Analysen biologischer Strukturen

**Sven Siebler
Alexander Zulauf**

15.12.2003 – 30.01.2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung/Ziele.....	3
2. Theoretische Grundlagen.....	3
2.1. Kräfte	3
3. Aufbau und Funktion des AFM.....	5
3.1 Funktionsweise eines AFM.....	5
3.2 Scanmodi.....	6
3.2.1 Contact-Mode	6
3.2.2 Non-Contact-Mode	7
3.2.3 Tapping-Mode	7
3.2.4 Near-Contact-Mode	8
3.2.5 Messung in Lösung	8
4. Probenpräparationen	9
5. Kalibrierung.....	9
6. Messung.....	9
7. Ergebnisse	10
7.1 Diatomeen	10
7.2 Lachs- und Plasmid DNA	11
7.3 Scanartefakte	13
8. Anhang	15
8.1 Verwendete Chemikalien:.....	15
9. Literaturangaben.....	16

1. Einleitung/Ziele

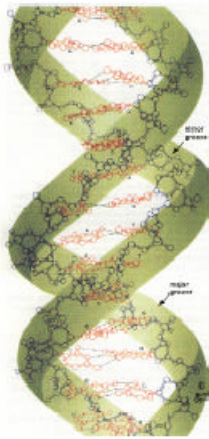


Abb.1 Schematische Darstellung eines DNA-Fadens mit kleiner und großer Einbuchtung

Im Rahmen des Projektes soll mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops (AFM) die Struktur biologischer Materialien hoch aufgelöst analysiert werden. Bei der Durchführung dieser Aufgabe kamen verschiedene Scantechniken (contact, non-contact, near-contact, tapping) zum Einsatz. Die Hauptaufgabe bestand darin, mit Hilfe des AFM insbesondere die Struktur von DNA hoch aufgelöst zu analysieren. Von großem Interesse war dabei die Analyse der großen und der kleinen Furche, die die DNA entlang des Doppelstranges aufweist (Abb.1).

Zur Ausführung dieser Aufgabe wurden Untersuchungen in Lösung und an Luft mit Hilfe der oben erwähnten Scanmodi durchgeführt. Neben der Analyse der Aufnahmen sollte als weiteres Ergebnis der Einfluss der äußeren Messparameter sowie der Aufnahmetechniken erhalten werden.

2. Theoretische Grundlagen

Rastersondenmikroskope (SXM) können im Gegensatz zu Lichtmikroskopen auch Strukturen auflösen, die kleiner als 200nm sind. Dabei setzt sich die Bezeichnung aus den Teilen „Scanning“, „Microscopy“ und einem Platzhalter X zusammen. Dieser Platzhalter steht für unterschiedliche Wechselwirkungen, die man sich zu nutze macht.

Um ein Abbild der Oberfläche mit dem AFM zu erzeugen, werden anziehende und abstoßende Kräfte ausgenutzt.

2.1. Kräfte

Ein AFM macht sich, wie der Namen schon vermuten lässt, zwischenmolekulare Kräfte zu nutze, um Oberflächen zu untersuchen. Diese Kräfte sind van-der-Waals und abstoßende Wechselwirkungen. Sie liegen typischer Weise in einer Größenordnung von 10^{-8} und 10^{-13} N. Besonders vorteilhaft ist das AFM, da man auch in Lösungen messen kann. Dies ist besonders für biologische Forschung interessant und wichtig.

Im Folgenden sollen nun die verschiedenen Kräfte beschrieben werden, die zwischen der untersuchten Oberfläche und der Spitze des Mikroskops wirken.

Als erstens gibt es die anziehenden Kräfte, die van-der-Waals Kräfte. Sie entstehen aufgrund der Wechselwirkung von z.B. zwei permanenten Dipolen. Diese ziehen sich bei unterschiedlicher Orientierung an:

$$U_0 \propto \mathbf{m}_1^2 \cdot \mathbf{m}_2^2 \cdot r^{-6} \quad (1)$$

μ = Dipolmoment der Moleküle; r = Abstand der Moleküle

Des Weiteren kann ein permanenter Dipol bei einem benachbarten Molekül einen Dipol induzieren, so dass auch in diesem Fall anziehende Kräfte wirken. Dies wird als Induktionseffekt bezeichnet. Die wirkende Kraft ist gegeben durch:

$$U_1 \propto -\mathbf{m}_1^2 \cdot \mathbf{a}_2 \cdot r^{-6} \quad (2)$$

μ = Dipolmoment des Moleküls; \mathbf{a} = Polarisierbarkeit des zweiten Moleküls; r = Abstand

Wenn nun dipolfreie Moleküle vorliegen, dann wirken nur kurzzeitige Anziehungskräfte. Dies sind die sog. Dispersionswechselwirkungen. Für sie gilt:

$$U_D \propto -\mathbf{a}_1 \cdot \mathbf{a}_2 \cdot r^{-6} \quad (3)$$

\mathbf{a} = Polarisierbarkeit der Moleküle; r = Abstand

Die damit gesamt wirkenden anziehenden Kräfte ergeben sich durch Summation der drei verschiedenen Einzelkräfte, welche damit proportional zu $1/r^6$ sind. Wenn man nun allerdings die makroskopisch wirkenden Kräfte zwischen der Oberfläche und der Mikroskopspitze betrachten will, beobachtet man ein etwas anderes Verhalten. Hier ist das Potential nur noch umgekehrt proportional zum Abstand der betrachteten Körper:

$$U_{\text{anziehend}} = \frac{\mathbf{p}^2 \mathbf{r}_1 \mathbf{r}_2 CR}{6} \cdot \frac{1}{r} = \frac{AR}{6} \cdot \frac{1}{r} \quad (4)$$

\mathbf{r} = Teilchendichte; R = Kugelradius; r = Abstand der betrachteten Körper; C = Londonsche Dispersionskonstante; A = Hamaker Konstante

Diesen Kräften stehen die abstoßenden Wechselwirkungen entgegen. Sie entstehen z.B. durch die Abstoßung der Elektronenhüllen der betrachteten Atome oder Moleküle. Dies wird z.B. durch das Harte Kugel Modell vereinfacht beschrieben:

$$U_{HK} = \left(\frac{\mathbf{s}}{r} \right)^n, \text{ mit } n = \infty \quad (5)$$

\mathbf{s} = Harte-Kugel-Radius; r = Teilchenabstand

Wenn der Teilchenabstand also geringer wird als der Harte-Kugel-Radius, dann schnellst das Potential ins Unendliche. Andersherum wird es null, wenn der Abstand größer wird.

Zum anderen gilt das Pauli-Verbot. So dürfen die Elektronenwolken zweier Moleküle nicht überlappen, da in diesem Fall die Elektronen in einem Orbitalen mit derselben Orientierung vorkommen würden. Dies ist im Normalfall nicht erlaubt (Ausnahme gilt nur für Bosonen). Dies wird häufig in einem Exponentialgesetz

$$U_{\text{abstoßend}} = c \cdot e^{-\frac{r}{\mathbf{s}_0}} \quad (6)$$

c und \mathbf{s}_0 sind angepasste Konstanten; r = Abstand

oder einem Potenzgesetz

$$U_{\text{abstoßend}} = \left(\frac{\mathbf{s}}{r} \right)^n, \text{ mit } 9 \leq n \leq 12 \quad (7)$$

veranschaulicht. Diese Beschreibungen sind genauer, da sie die Kompressibilität der Atome berücksichtigen.

Beide Modelle haben gemeinsam, dass diese Kräfte nur eine kurze Reichweite und eine große Abstandsabhängigkeit besitzen.

Wenn man sich nun diese Kräfte zunutze macht, ist eine getrennte Betrachtung natürlich nicht sinnvoll. Zur Beschreibung der Wechselwirkungen zwischen der AFM-Spitze und der Oberfläche kombiniert man die anziehenden und abstoßenden Kräfte. Man erhält mit den Gleichungen (4) und (7) folgendes Potential:

$$U = -\frac{AR}{6r} + \frac{B}{r^{12}} \quad (8)$$

wobei der Exponent der abstoßenden Wechselwirkungen gleich 12 gesetzt wird.

Zur Beschreibung der Wechselwirkungen zwischen zwei Atomen kann man jedoch die vereinfachte Version der Gleichung (4) verwenden, die sich durch einfache Summation der Einzelpotentiale (1) – (3) ergibt. Zusammen mit Gleichung (7) erhält man dann das Lennard-Jones-Potential:

$$U = 4e \left[\left(\frac{s_0}{r} \right)^{12} - \left(\frac{s_0}{r} \right)^6 \right] \quad (9)$$

s_0 ist hierbei der Abstand, bei dem das Potential Null wird. e beschreibt die Tiefe der Potentialmulde. Wenn man also nun die Gleichgewichtslage der Atome beschreiben will, muss das Potential minimal werden.

3. Aufbau und Funktion des AFM

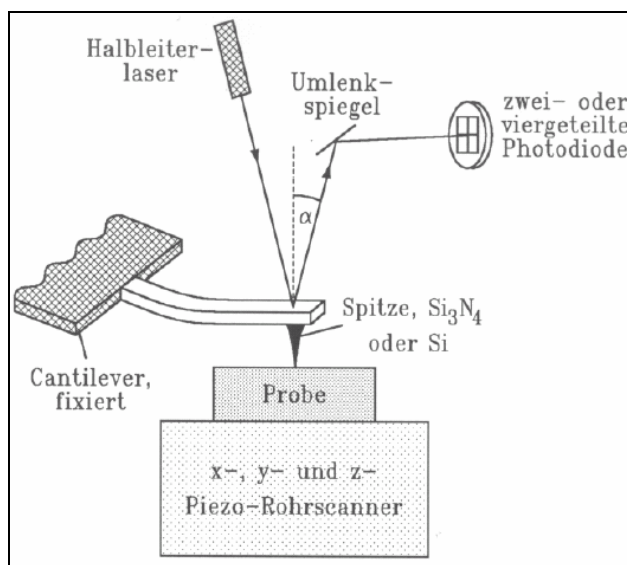


Abb. 4.1 Prinzipieller Aufbau eines AFM

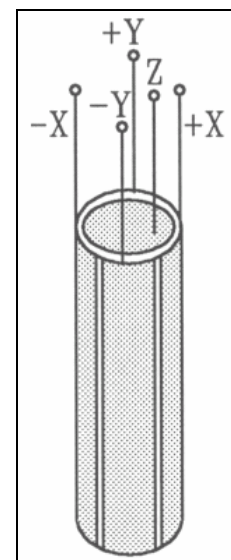


Abb. 4.2: Aufbau eines Rohrscanners

3.1 Funktionsweise eines AFM

Ein AFM besteht aus einer Probe, Probenhalterung und Probenpositionierung, Sonde, Sondenhalterung (-positionierung), einer Schwingungsdämpfung sowie einer Steuerungs- und Auswerteeinheit. Sonde und Probe werden relativ zueinander bewegt und die Oberflächeneigenschaften durch die Sonde gemessen.

Die Positionierung wird oft mit Hilfe eines optischen Mikroskops oder einer am AFM angebrachten Videokamera überwacht.

Die genaue Steuerung der Relativbewegung von Probe und Sonde wird i.a. durch zwei getrennte Systeme für Grob- und Feinsteuerung realisiert.

Die Grobsteuerung kann über rein mechanische Systeme wie z.B. Hebel, Mikrometerschrauben o.ä. erfolgen. Die Feinsteuerung erfolgt über einen Rohrscanner, der aus piezoelektrischen Stellelementen (Scanner) besteht.

Deren Funktion soll kurz erläutert werden.

Bei einem piezoelektrischen Stoff kann durch Einwirkung von mechanischem Druck ein elektrisches Feld erzeugt werden.

Der piezoelektrische Effekt wird durch die Verschiebung von Ionen in Kristallen mit nichtsymmetrischen Einheitszellen verursacht. Beim Zusammenpressen verschieben sich, die Ionen in jeder Einheitszelle und verursachen damit eine Verschiebung der

Ladungsschwerpunkte von negativer und positiver Ladung relativ zueinander. Dies führt zu einer elektrischen Polarisierung.

Diese Verschiebungen können auch durch Anlegen eines elektrischen Feldes erzwungen werden und führen somit zu einer Verformung des Kristalls. Dieser Effekt wird inverser piezoelektrischer Effekt genannt.

Bei unserem AFM wurde zur Feinsteuerung ein Dreibein- oder Rohrscanner verwendet. Der Rohrscanner besteht aus einer zirkular polarisierten Keramik, die auf der Innenseite eine Elektrode und auf der Außenseite 4 isolierte Elektroden trägt.

Durch Anlegen einer unsymmetrischen Spannung lässt sich also eine Verbiegung in x- y- oder z-Richtung bewirken, je nachdem welche Elektroden geschaltet werden.

Der Dreibeinscanner ist etwas anders aufgebaut. Er besteht aus drei unabhängig voneinander steuerbaren Stapeln aus piezoelektrischen Keramiken. Diese Bauart hat zur Folge, dass größere Flächen und Höhendifferenzen untersucht werden können, wodurch jedoch die Auflösung geringer wird.

Der Dreibeinscanner schafft daher keine atomare Auflösung (Scanbereich 150µm-1µm), hat aber den Vorteil, dass aufgrund seines Aufbaus Untersuchungen in Lösung durchgeführt werden können.

Durch die Feinsteuerung mit Hilfe der Scanner lässt sich die Spitze sehr genau auf der Oberfläche positionieren, ohne diese zu beschädigen.

Da ein AFM sehr empfindlich gegenüber externen Einflüssen ist, ist eine Messung ohne entsprechende Vorkehrungen undenkbar.

Störende Einflüsse sind zum Beispiel Trittschall, sonstiger Schall und Vibrationen (z.B. durch Kompressoren oder Fahrzeuge), die durch Wände, Fußböden und Luft auf das AFM übertragen werden können. Dabei liegen die anregenden Frequenzen im Bereich von etwa 1-20 Hz. Zusätzlich besitzen die Gebäude Eigenschwingungen in diesem Frequenzbereich, abhängig von Aufstellungsort. Diese störenden niederfrequenten Schwingungen müssen gedämpft werden. Hierzu wird ein luftgefederter Tisch verwendet. Zusätzlich kann noch eine Ummantelung des Mikroskops durch schall absorbierende Kunststoff- oder Metallhauben erfolgen.

3.2 Scanmodi

AFM können aufgrund ihres Aufbaus in verschiedenen Modi benutzt werden, in dem man sich die Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe zunutze macht. Dies wird im Folgenden genauer erläutert.

3.2.1 Contact-Mode

Im Auflagemodus wird die Spitze des AFM mit Hilfe eines Federbalkens auf die Oberfläche gedrückt. Dieser Federbalken ist auf der Rückseite mit Gold bedampft, so dass er einen Laserstrahl reflektiert. Der Laserstrahl trifft auf den Federbalken und wird unter einem bestimmten Winkel reflektiert. Ändert sich nun die Höhe der Spitze, ändert sich auch der Reflexionswinkel des Lasers. Dieser Winkel wird mit Hilfe einer Vierfeld-Photodiode gemessen. So kann eine Höhenänderung genauso wie ein Verkippen der Spitze durch eine Änderung des Photostromwertes registriert werden.

Der Auflagemodus kann wiederum auch in zwei unterschiedlichen Modi durchgeführt werden. Im Modus konstanter Kraft wird mit Hilfe eines Rückkopplungskreises der z-Piezo nachgeregelt, so dass das Signal der Photodiode konstant bleibt. So kann über die sich ändernde Steuerspannung des z-Piezo die Höheninformation gewonnen werden.

Die zweite Möglichkeit ist der Modus konstanter Höhe. Hierbei wird kein Rückkopplungskreis benötigt, was den Vorteil hat, dass die Messung schneller durchgeführt

werden kann. Die Feder wird nicht in der Höhe nachgeregelt, sondern biegt sich je nach Topographie der Oberfläche durch. Hieraus resultiert wieder eine Änderung des Reflexionswinkels und damit eine Änderung des Photostroms. Allerdings muss zur Gewinnung der Höheninformation unter Umständen die Federkonstante berücksichtigt werden. Auch ist dieses Verfahren nur bei sehr glatten Oberflächen zu verwenden, da ansonsten evtl. die Spitze beschädigt werden kann.

Da in diesem Mode die Spitze die Oberfläche direkt berührt, verwendet man Cantilever mit relativ weichem Federbalken aus Glas, deren Spitzen aus Siliziumnitrid hergestellt werden.

Nachfolgend seien beide Modi gegenübergestellt:

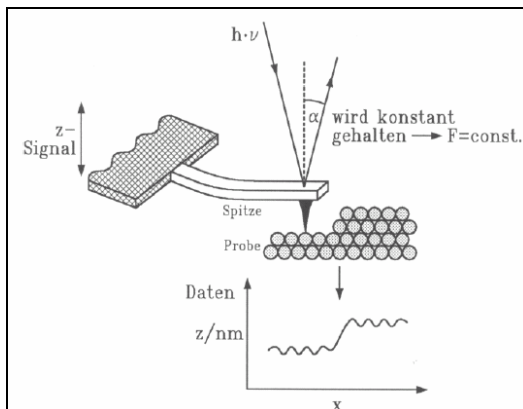


Abb.2.1 Mode konst. Kraft

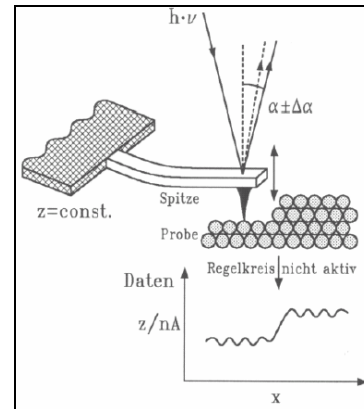


Abb. 2.2 Mode konst. Höhe

3.2.2 Non-Contact-Mode

Im Non-Contact-Modus befindet sich die Spitze einige nm oberhalb der Oberfläche. Die Spitze wird nun über ein Piezoelement nahe ihrer Resonanzfrequenz in Schwingung gebracht. Die Wechselwirkung zwischen Spitze und Oberfläche bewirkt nun eine Änderung der Federkonstanten k , welche wegen

$$n = \frac{1}{2p} \cdot \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (11)$$

eine unmittelbare Änderung der Resonanzfrequenz bewirkt. Dies führt zu einer Änderung der Amplitude bei der Anregungsschwingung n , welche nun wieder durch Nachregeln des Piezoelementes konstant gehalten wird. Die Änderung der Piezospannung liefert also in erster Näherung direkt die Höheninformation.

Ein wesentlicher Nachteil des Non-Contact-Mode ist eine geringere Bildauflösung, die darauf beruht, dass jede Probe von einer dünnen Wasserschicht (Kontaminationsschicht) bedeckt ist. Da die Spitze oberhalb dieser Schicht schwingt, wird die Höheninformation verfälscht, da diese Kontaminationsschicht und nicht die eigentliche Probe gemessen wird.

3.2.3 Tapping-Mode

Im Tapping-Mode schwingt die Spitze analog zum Non-Contact-Mode in der Nähe ihrer Resonanzfrequenz. Der Unterschied zum Non-contact-mode liegt darin, dass die Spitze am Umkehrpunkt der Schwingung die Oberfläche berührt. Wie auch im Non-Contact-Mode kommt es zu einer Änderung der Resonanzfrequenz während die Spitze die Oberfläche abtastet. Diese Änderung beruht auf attraktiven Wechselwirkungen zwischen Spitze und Oberfläche. Die Änderung der Resonanzfrequenz und somit auch die Änderung der Federkonstanten führt zu einer Phasenverschiebung. Die Phasenverschiebung ist die

Grundlage für Tapping-Mode. In diesem Modus aufgenommene Bilder liefern mehr Informationen (schärfere Bilder).

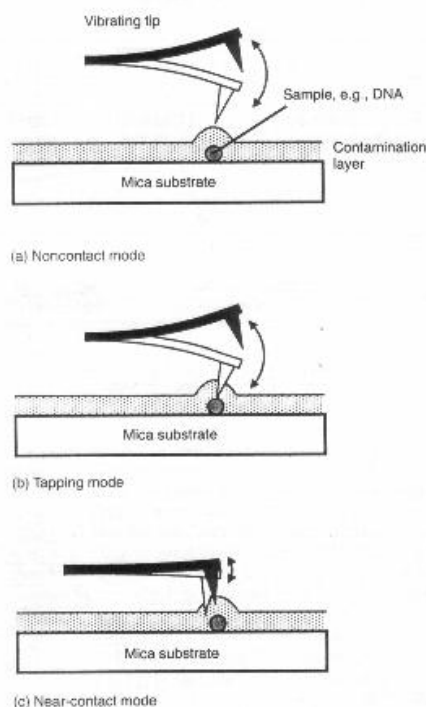
Ein weiterer Nachteil dieses Modus ist, dass es zu Beschädigungen der Spitze, der Oberfläche und der Probe kommen kann, weil Kontakt zwischen Probe und Spitze besteht. Im Gegensatz zum Contact-Mode treten jedoch keine lateralen Kräfte auf, welche zu Beschädigungen an der Probe führen können.

3.2.4 Near-Contact-Mode

Um die Höheninformationen zu verbessern muss die Spitze innerhalb der Kontaminationsschicht schwingen. Sie sollte die Oberfläche jedoch nicht berühren, um Beschädigungen zu vermeiden. Diese Bedingungen sind im Near-Contact-Mode erfüllt. Um dieses zu gewährleisten, muss die freie Schwingungsamplitude der Spitze sehr klein sein ($<2\text{nm}$).

Aufgrund der sehr kleinen Amplitude wird bei diesem Verfahren die empfindlichere Phasenverschiebung gemessen, die sehr kontrast- und informationsreiche Bilder liefert und sehr stabile Bedingungen für das Abtasten der Oberflächen bietet. Dieser Modus kann nur in Luft Verwendung finden und ist auf Oberflächen geringer Rauigkeit beschränkt.

Nachfolgend seien die drei zuletzt besprochenen Modi gegenübergestellt:



a) Hohe Amplitude, großer Abstand Spitze – Oberfläche

b) Hohe Amplitude und Kontakt zw. Spitze und Oberfläche am Umkehrpunkt jeder Schwingung, keine Lateralkräfte

c) sehr kleine Amplitude, kleiner Abstand Spitze – Oberfläche, i.d.R. kein Kontakt zw. Spitze und Probe, Spitze bleibt in der Kontaminationsschicht

Abb. 3: Vergleich der verschiedenen Non-Contact-Modi

3.2.5 Messung in Lösung

Als weitere Messmethode gibt es die Möglichkeit, „in Lösung“ zu messen. Hierbei wird der gesamte Messkopf mit Flüssigkeit gefüllt, so dass Probe und Spitze vollständig bedeckt sind. Hierdurch wird der, aufgrund der auftretenden Kapillarkräfte, wirkende negative Effekt der Kontaminationsschicht eliminiert. Dies ist vor allem im Non-Contact-Mode und Contact-Mode vorteilhaft. Der Near-Contact-Mode kann hingegen nicht mehr angewendet werden.

4. Probenpräparationen

- 1) Diatomeen: Die Präparation von Diatomeen ist vergleichsweise einfacher als bei DNA. Hierzu wurden mit Hilfe eines Mikroskops einzelne Diatomeen auf die frisch abgezogenen Glimmerträger aufgebracht. Hierbei musste darauf geachtet werden, ob die Diatomeen konkav oder konvex auf dem Probenträger lagen, da beide Seiten unterschiedliche Nanostrukturierungen aufweisen. Es gestaltete sich mitunter schwierig, diese umzudrehen. Da bei den Messung leider das Problem auftrat, dass die Proben durch die Spitze verschoben wurden, kam bei der weiteren Präparation Sekundenkleber zur Fixierung zum Einsatz.
- 2) DNA: In einem Kaliumglutamatpuffer wurden 1 mg Lachshoden-DNA gelöst und über Nacht rühren gelassen. Ein Teil davon wurde auf das vierfache verdünnt und davon 1-20 µl auf frisch abgezogenem Glimmer (wahlweise rein, Mg-behandelt, plasmabehandelt) aufgetropft. Nach einer 6-minütigen Inkubationszeit wurde die Probe mit Wasser abgespült und über Ar getrocknet.
- 3) DNA: Es wurde ein HEPES Puffer hergestellt. In 100 ml dieses Puffers wurde 1mg Lachshoden-DNA gelöst und über Nacht homogenisiert. Es wurden zwischen 1µl und 10µl dieser Lösung auf frisch abgezogene Glimmerträger aufgebracht und 2min einwirken lassen. Anschließend wurde über Ar getrocknet.

Da zwischen dem Glimmer und der zu untersuchenden DNA schwache abstoßende Wechselwirkungen existieren wurde durch Behandlung mit $MgCl_2$ bzw. Niederdruckplasma versucht, positive Oberflächenladungen auf dem Glimmer aufzubringen und so eine bessere Haftung der Probe zu gewährleisten.

5. Kalibrierung

Zu Beginn der Messungen wurde mit Hilfe von Kalibrierungsgittern der Fehler der Scanner überprüft. Hierbei wurde festgestellt, dass der Rohrscanner einen Fehler von 1% bei kleinen Scanbereichen (500nm) bis zu 55% bei größeren Scanbereichen (2,5µm) aufwies. Aus diesem Grunde wurde der Scanner rekaliert, so dass sich der Fehler für 2,5µm auf 0,5% - 5% reduzierte. Festzustellen blieb weiterhin, dass der Fehler in der x-Richtung bzw. in y-Richtung z.T. je nach Scangröße sehr unterschiedlich ausfiel.

Beim Dreibeinscanner (-150µm) fiel der Fehler insgesamt deutlich geringer aus. Er lag bei großen Messbereichen (150µm) lediglich bei ca. 1% und stieg bei sehr kleinen Scangrößen (5µm) bis auf 7%. Eine Nachkalibrierung war dementsprechend nicht nötig, die Fehler wurden bei den Auswertungen berücksichtigt.

6. Messung

Zu Beginn des Projektes bestand die Aufgabe darin, sich mit dem Gerät und den verschiedenen Scanmodi vertraut zu machen. Hierzu kamen als zu untersuchende Proben lediglich Diatomeen zum Einsatz. Diese Strukturen sind aufgrund ihres kristallinen Charakters leichter zu präparieren und zu untersuchen als andere organische oder biologische Proben. Somit war es auf einfache Weise möglich, sich in die einzelnen Modi einzuarbeiten. Man stellte schnell fest, dass es doch z.T. gravierende Unterschiede gab. So war es z.B. nicht möglich, vernünftige Ergebnisse im Contact-Mode zu erzielen, da die Probe nicht fest genug auf der Oberfläche befestigt werden konnte. Somit wurde während der Messung die Probe permanent mitbewegt. Zur Lösung dieses Problems wurde versucht, die Diatomeen mit Hilfe

eines Klebers auf der Oberfläche zu fixieren. Dies gestaltete sich schwieriger als erwartet, da die zu untersuchende Seite der Probe nicht mit Kleber in Berührung kommen durfte, da sonst keine Aufnahme der Nanostrukturierung möglich gewesen wäre.

Weiterhin machte man sich mit dem Non-Contact-Mode vertraut. Man stellte schnell fest, dass dieser deutliche Vorteile hatte. So fiel das Problem der Fixierung deutlich kleiner aus. Jedoch gab es auch bei diesem Mode ein Problem, dass in der großen Wölbung der Diatomeen bestand, womit eine große Höhendifferenz entstand.

Nach dieser Einarbeitungszeit wandte man sich der nächsten Aufgabenstellung zu, der Vermessung von DNA und dem Versuch der Auflösung der kleinen und großen Furche.

Wie schon bei den Probenpräparationen beschrieben, ist die Handhabung der DNA deutlich komplexer als bei den Diatomeen. Zudem hat man das Problem der richtigen Dosierung. Es wurde mit Mengen zwischen 1µl und 10µl DNA pro Probenträger experimentiert. Dabei war das Ziel, einzelne DNA Fäden zu präparieren. Leider gab es bei zu geringen Mengen das Problem, dass man die Fäden auf dem Träger nicht finden konnte, sowie bei zu großen Dosierungen, dass sich DNA Netzwerke bildeten, die für die Auswertung nicht geeignet waren.

Mit den präparierten Proben, die den Anforderungen gerecht wurden, wurden Messungen im Non-Contact- und Tapping-Mode sowie im Near-Contact-Mode durchgeführt. Des Weiteren wurde zur Verbesserung der Auflösung versucht in Lösung zu messen.

Eine Messung im Contact-Mode wurde nicht durchgeführt, da auch hier wieder das Problem der Fixierung der Probe bestand.

Die Messungen wurden parallel an zwei AFM durchgeführt, wobei die Diatomeen Messungen nur am TopoMetrix Explorer und die DNA Untersuchungen auch am Nanoscope AFM durchgeführt wurden. Das Nanoscope AFM ist hierbei das neuere und technisch ausgereifere Modell, es ermöglicht relativ exaktere Ergebnisse. Das TopoMetrix AFM ist aufgrund der zur Verfügung stehenden Scanner limitiert. So hat der Dreibeinscanner z.B. einen sehr großen Messbereich (150µm), so dass sehr kleine Strukturen, wie z.B. die DNA, gar nicht mehr exakt abgebildet werden können. Aus diesem Grund wurden mit diesem Gerät vorwiegend Messungen an Diatomeen, mit dem Rohrscanner (bessere Auflösung) auch an DNA im Non- und Near-Contact-Mode durchgeführt.

7. Ergebnisse

7.1 Diatomeen

Bei der Untersuchung von Diatomeen stellt man fest, dass es deutliche Unterschiede zwischen der Nanostrukturierung der Innen- und Außenseite der Kieselalgen gibt.

Die Außenseite ist geprägt von geometrisch regelmäßig angeordneten Poren, die jedoch in Form und Ausdehnung variieren. Diese werden erstaunlicherweise ganz regelmäßig von zusätzlichen Strukturierungen unterbrochen, bei denen jeweils eine Pore in drei Teile geteilt wird. Die biologische Bedeutung dessen konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden.

Die Innenseite ist aufgrund der Wölbung schwieriger zu vermessen. Jedoch stellt man fest, dass dort die Strukturierung nicht wie erwartet aussieht, sondern dass dort eher Kraterstrukturen vorliegen, die erstaunlicherweise sehr regelmäßig und kreisrund sind.

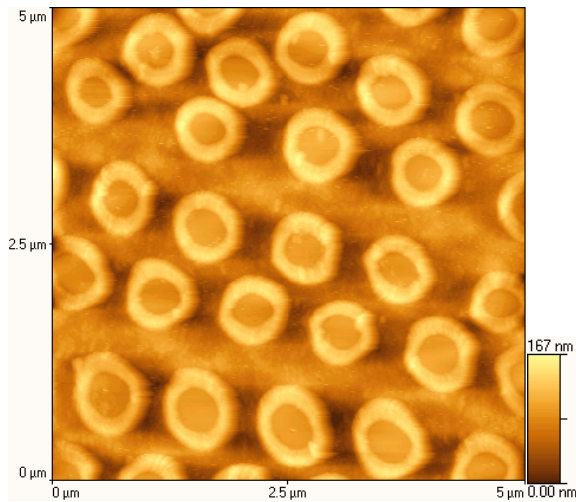


Abb. 5.1: Diatomeen Innenseite

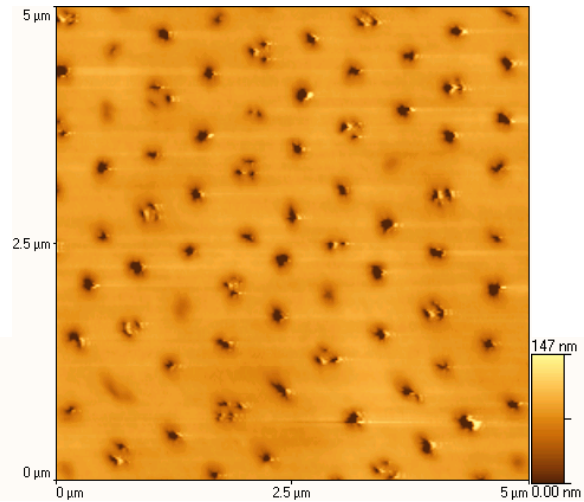


Abb. 5.2: Diatomeen Außenseite

7.2 Lachs- und Plasmid DNA

Bei den Messungen mit dem TopoMetrix Explorer AFM erhält man folgende Ergebnisse:

Datei	Scangröße [μm]	Auflösung	Modus	Höhe [nm]	Breite [nm]
l_dna9.tfr	1	500	Non-Contact	0,42	23,49
l_dna10.tfr	1,587	500	Non-Contact	0,4	25,67
l_dna101.tfr	1	500	Non-Contact	0,4	21,41
l_dna102.tfr	0,5	1000	Non-Contact	0,4	18,1
dna10c.tfr	1	500	Non-Contact	0,3	21,16
dna11.tfr	0,4	200	Non-Contact	0,33	15,5 *Ausreißer*
l_dna6.tfr	1	500	Near-Contact	1,03	23,69
l_dna7.tfr	0,2	400	Near-Contact	0,83	18,36
l_dna3.tfr	0,5	500	Near-Contact	0,8	28,08
l_dna4.tfr	0,5	1000	Near-Contact	0,72	32,6 *Ausreißer*

Wie man anhand der oberen Tabelle gut erkennen kann, erhält man im Non-Contact-Mode für die Höhe ca. $0,38\text{nm} \pm 0,05\text{nm}$ (12,7%) und für die Breite $21,97\text{nm} \pm 2,83\text{nm}$ (12,9%).

Für den Near-Contact-Mode erhält man hingegen eine Höhe von $0,85\text{nm} \pm 0,13\text{nm}$ (15,5%) und eine Breite von $23,38 \pm 4,87\text{nm}$ (20,8%).

Dieses Ergebnis war aufgrund der theoretischen Überlegungen zumindest für die Höhe auch zu erwarten, da aufgrund der Messmethoden die störende Kontaminationsschicht beim Near-Contact-Mode eliminiert wird. Somit kommt man deutlich näher an den Literaturwert^[3] von 1nm heran. Erreicht wird dieser aber bei beiden Methoden nicht. Dies kann auf die

vorhandenen Wechselwirkungen zwischen der DNA und dem Glimmer zurückgeführt werden, welche zu einer Stauchung der DNA Höhe führen.

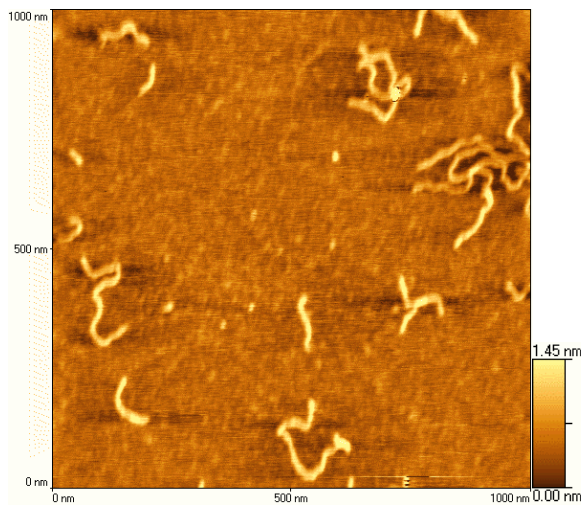


Abb. 6.1: Near-Contact Aufnahme von DNA

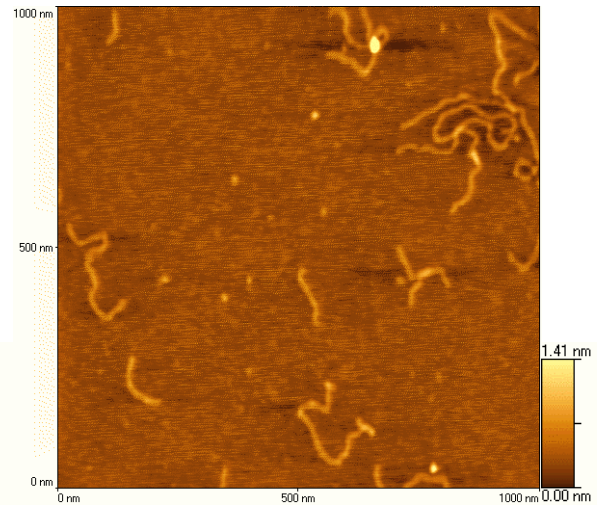


Abb. 6.2: Non-Contact Aufnahme von DNA

Bei der Breite hingegen weist der Non-Contact-Mode überraschenderweise einen besseren Wert auf als der Near-Contact-Mode. Dies liegt jedoch im Bereich der Ungenauigkeiten beim Vermessen der DNA. Leider wird in beiden Fällen der Literaturwert^[3] von 7nm bei weitem nicht erreicht. Dies kann auf die Spitzengeometrie zurückgeführt werden. Da diese einen bestimmten Krümmungsradius besitzt, der natürlich je geringer ausfällt desto spitzer diese ist, wird das Bild und somit das Ergebnis ein wenig verbreitert.

Genauer wird hierauf im Bereich Scanartefakte eingegangen.

Zusätzlich zu den Messungen mit dem Explorer AFM erhält man mit dem Nanoscope AFM folgende Ergebnisse:

Datei	Scangröße [nm]	Auflösung	Modus	Höhe [nm]	Breite [nm]
**dna.005_2	2000	512	Tapping	0,71	28 *Ausreißer*
dna.001_2	500	512	Tapping	0,77	24,54
dna.000_2	430	512	Tapping	0,73	22,75
dna.002_2	150	512	Tapping	0,66	22,36
dna.003_2	77	512	Tapping	0,4 *Ausreißer*	20,68
dna.007_1	540	512	Tapping	0,78	16,75
dna.009_1	175	512	Tapping	0,51	18,55
dna.5my.026_3	390	512	Tapping	0,36	11,27
dna.5my.027_3	200	512	Tapping	0,43	15,11
dna.5my.031_4	267	512	Tapping	0,41	14,61
dna-l-zentri.004_5	313	512	Tapping	0,47	14,34
dna-l-zentri.009_6	2000	512	Tapping	0,85	22

Obwohl verschiedene Messmethoden ausprobiert wurden, führte nur der Tapping Mode an Luft zu brauchbaren Ergebnissen. Die vorgenommenen Messungen in Flüssigkeit führten zu keinen brauchbaren Ergebnissen. Der Hauptgrund hierfür ist in der schlechten Fixierung der DNA auf dem Trägermaterial zu suchen. Bei Aufbringen der Lösung muss diese sich anscheinend gelöst haben. Methoden zur Befestigung (Niederdruckplasma-, $MgCl_2$ -Behandlung) führten nur zu mäßigem Erfolg. Aus diesem Grund stehen leider keine Daten zur Auswertung zur Verfügung. Von den theoretischen Überlegungen her sollte diese Methode jedoch am besten geeignet sein, organische Proben zu analysieren.

Die Auswertung der erhaltenen Tapping Daten ergibt eine durchschnittliche Höhe von $0,61\text{nm} \pm 0,18\text{nm}$ (29,5%), für die Breite erhalten wir $18,45\text{nm} \pm 4,31\text{nm}$ (23,4%).

Trotz der großen Streuung der Messergebnisse erkennt man, dass der Tapping-Mode genauere Ergebnisse liefert als der Non-Contact-Mode. Die besten Ergebnisse wurden aber mit dem Near-Contact-Mode erzielt. Dies war auch zu erwarten, da natürlich auch im Tapping-Mode das Problem der Kontaminationsschicht vorhanden ist.

Leider war es mit keinem der beiden Mikroskope möglich, die kleine bzw. große Furche der DNA aufzulösen. Dies liegt darin begründet, dass das Explorer AFM bei Auflösungen von unter $0,5\text{nm}$ nicht mehr auswertbare Aufnahmen lieferte. Der Ganghöhenunterschied beträgt jedoch laut Literatur^[6] nur $0,34\text{nm}$.

Mit dem Nanoscope AFM wird eine maximale Auflösung von $0,2\text{nm}$ erreicht.

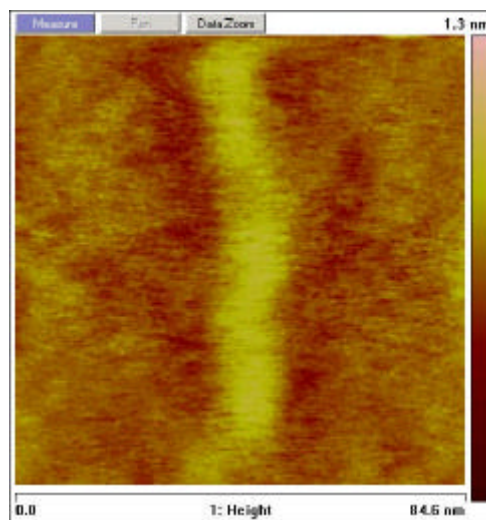


Abb. 6.3: DNA Aufnahme (Auflösung $>0,2\text{nm}$)

Es wäre also prinzipiell möglich gewesen, die Furchen aufzulösen. Jedoch war bei den in Frage kommenden Aufnahmen das Hintergrundrauschen so hoch, dass keine eindeutige Zuordnung möglich war.

Eine Minimierung der störenden Faktoren sowie eine Anpassung der Probenpräparation führten weiterhin nicht zu dem gewünschten Erfolg.

7.3 Scanartefakte

Da bei den Messungen häufig so genannte Scanartefakte auftreten, wird im folgenden Kapitel auf diese kurz eingegangen.

Scanartefakte entstehen am häufigsten durch Defekte an den verwendeten Spitzen. So ist es z.B. möglich, dass durch einen Kontakt mit der Oberfläche oder Probe die Spitze abbricht und hierdurch sog. Doppelspitzen entstehen. Diese Spitzen führen dann zu z.B. so einem Doppelbild:

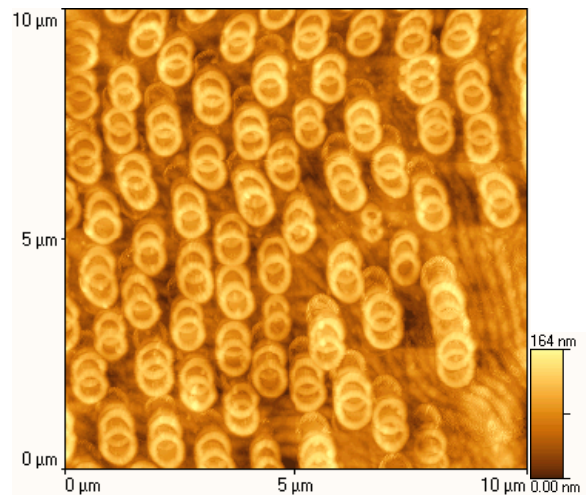


Abb. 7: Doppelspitzenartefakte bei Diatomeen

Hier erkennt man, die „beiden“ Bilder der verschiedenen Spitzen.

Doppelspitzen können jedoch auch schon bei der Herstellung unfreiwillig, oder auch gewollt entstehen.

Des Weiteren kann die Spitze natürlich durch das Abbrechen auch stumpf werden. Dies ist in den nachfolgenden Bildern sehr schön zu erkennen:

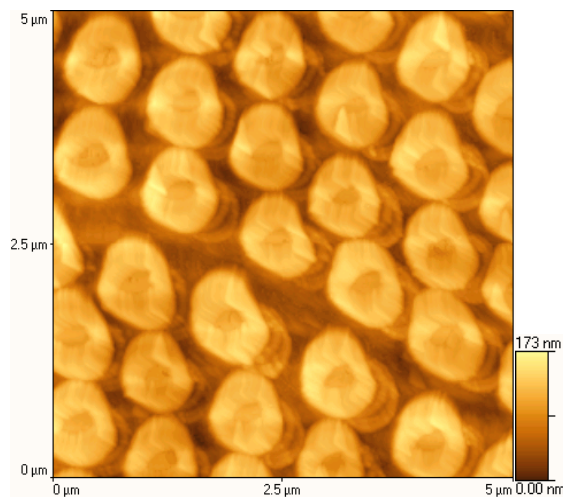


Abb. 8.1: stumpfe Spitze

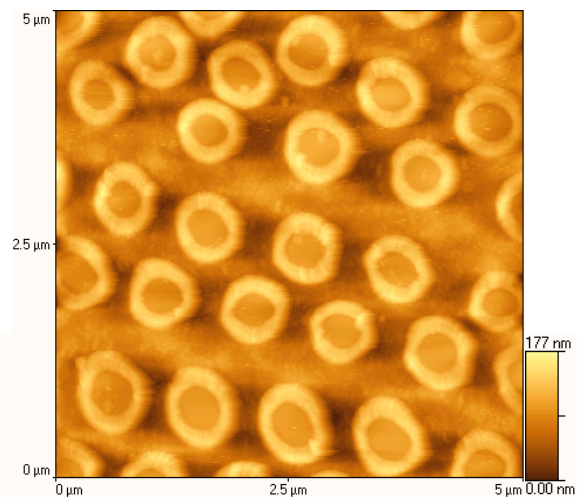


Abb. 8.2 scharfe Spitze

Weiterhin können Scanartefakte auch durch Verunreinigungen auf der Probe entstehen. Nachfolgend wurde einmal verdeutlicht, dass selbst schon bei reinem, frisch abgezogenem Glimmer, der mit bidestiliertem Wasser abgespült wurde, immense Artefakte auftreten können:

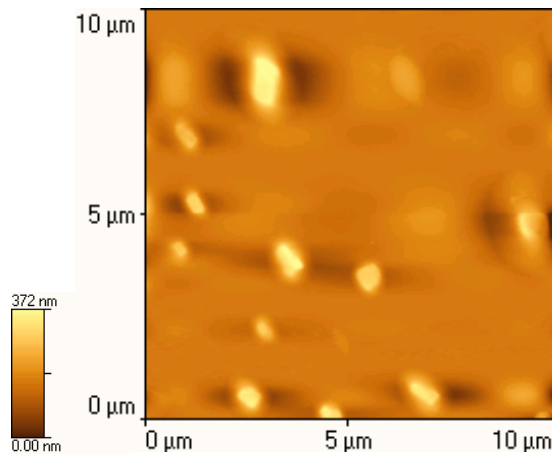


Abb. 9.1 Glimmer gespült mit
filtriertem bidest. Wasser (220nm)

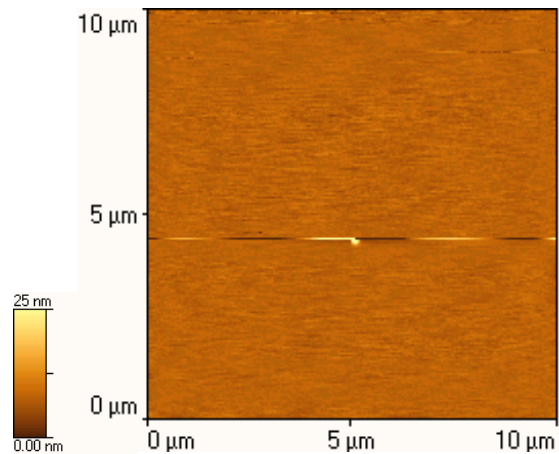


Abb. 9.2 Glimmer gespült mit
filtriertem bidest. Wasser (100nm)

Diesem Problem kann effektiv entgegengewirkt werden, indem die Probenlösung z.B. filtriert wird. Dies ist jedoch problematisch, da man in den meisten Fällen die zu vermessende Probensubstanz mit herausfiltern würde.

Eine weitere Möglichkeit zur Entstehung von Scanartefakten besteht in der Messgeschwindigkeit. Durch eine zu langsam gewählte Geschwindigkeit wird das Bild verzerrt, bzw. durch eine zu hohe Geschwindigkeit entsteht ungewünschtes Rauschen:

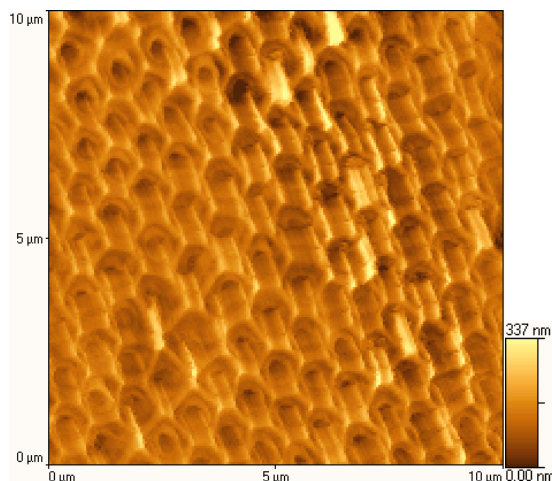


Abb. 10.1 Aufnahme mit zu geringer
Scangeschwindigkeit

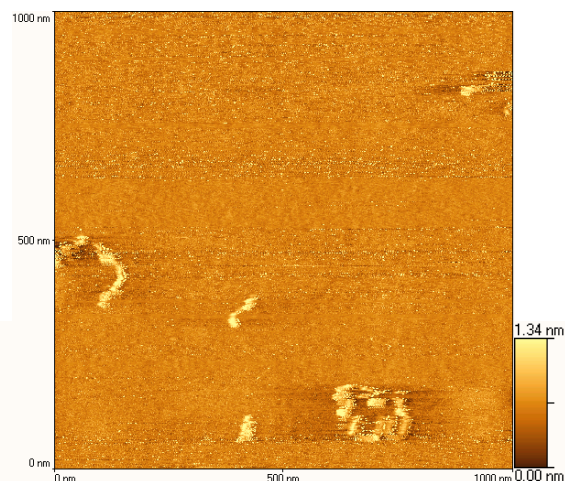


Abb. 10.2 Aufnahme mit zu hoher
Geschwindigkeit

8. Anhang

8.1 Verwendete Chemikalien:

1) Kaliumglutamatpuffer:

Unter Verwendung vom HPLC-reinem Wasser wurde aus 50mM Tris (pH 8), 20mM KGlu, 10mM MgCl₂ und 1mM DTT der Puffer hergestellt. Dieser wurde durch einen Filter mit einer Porengröße von 100 nm filtriert.

2) HEPES Puffer:

Zur Herstellung des Puffers wurden 40mmol HEPES, 40mmol KOH und 10mmol MgCl₂ gelöst und ein pH-Wert von 7,6 eingestellt.

3) Lachshoden-DNA: Fluka, Taufkirchen, Best. Nr. 31149, mit niedrigem Molekulargewicht.

- 4) DTT: Dithiothreit (Threo-1,4-dimercapto-2,3-butandiol)
- 5) Tris-Puffer: Trometamol (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol)
- 6) HEPES: N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
- 7) Niederdruckplasma: 1 mbar Druck, in Luft, ca. 30 sec. gezündet bei einem Stromfluß von 100 μ A.

9. Literaturangaben

Bei der Erstellung dieser Arbeit wurden folgende Literaturquellen herangezogen:

- 1) Noll, Frank; *Versuch im Fortgeschrittenen-Praktikum in Physikalischer Chemie "Rasterkraftmikroskopie"*; (2003)
- 2) Siebler, Sven; Zulauf, Alexander; *Protokoll zum Versuch im Fortgeschrittenen-Praktikum in Physikalischer Chemie "Rasterkraftmikroskopie"*; (2003)
- 3) Noll, Frank et al.; "Improvement of DNA- Visualization in dynamic Mode Atomic Force Microscopy in Air", *Scanning* Vol. 23, 175-181, (2001)
- 4) Noll, Frank et al.; *Nanostructure of Diatom Silica Surfaces and of Biomimetic Analogues*; *Nano Letters* Vol. 2 No. 2; 91-95; (2002)
- 5) Massimo, Antognozzi, et al.; *Comparison between Shear Force and Tapping Mode AFM – High Resolution Imaging of DNA*, *Single Mol.* 3, 2-3, 105-110, (2002)
- 6) Stryer, Lubert: *Biochemie*, Spektrum-Verlag (1990)