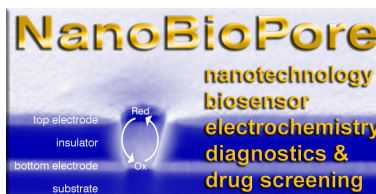


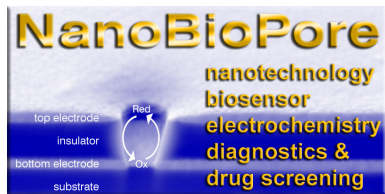
Schlußbericht

Zuwendungsempfänger:	Förderkennzeichen:
NMI Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut	13N8607
Vorhabensbezeichnung:	
NanoBioPore – Hochsensitive elektrochemische Sensoren basierend auf Nanopartikel-lithographie und Redoxcycling für Anwendungen in Diagnostik und Wirkstofffindung	
Teilvorhaben: NanoBioPore Technologien und Assays	
Laufzeit des Vorhabens:	
1.7.2004 – 31.10.2007	
Berichtszeitraum:	
1.7.2004 – 31.10.2007	



INHALT

A	Kurzdarstellung	3
1	Aufgabenstellung	3
2	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	3
3	Planung und Ablauf des Vorhabens	4
4	Wissenschaftlicher und technischer Stand	4
B	Eingehende Darstellung	6
1.	Ziele des Vorhabens und erreichte Ergebnisse	6
1.1	Entwicklung und Integration des NanoBioPore Sensorchips	6
1.2	Mikrostruktur- und Funktionsanalytik NanoBioPore Chip	15
1.3	Etablierung und Evaluierung biologischer Rezeptor-Ligand Assays	22
2	Kurzfassung des zahlenmäßigen Nachweises	26
3	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	27
4	Verwertbarkeit der Ergebnisse	27
5	Stand der Technik und Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens	27
6	Veröffentlichungen (mit Beteiligung von NMI-Autoren)	29
7	Literatur	29



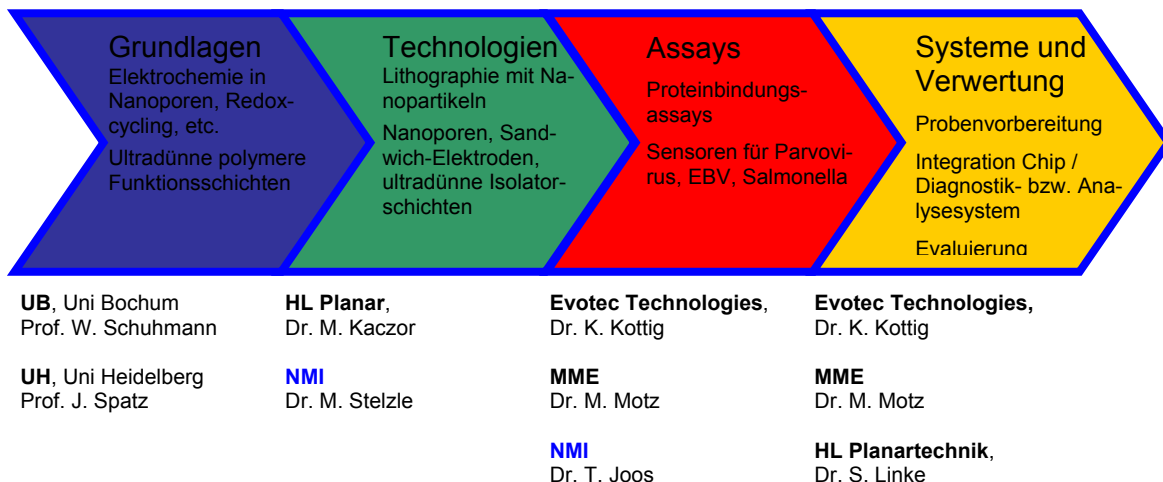
A Kurzdarstellung

1 Aufgabenstellung

Die Aufgabe des NMI im Nanobiopore Vorhaben war es, Strukturierungs- und Dünnschichttechnologien für die Herstellung von Nanobiopore Sensorchips zu erproben und später systematisch an HL Planartechnik zu übertragen. Methoden der Mikro- und Nanoanalytik sollten verwendet werden, um Dünnschichtprozesse zu validieren, poröse Sensorstrukturen morphologisch zu charakterisieren, Ausfallmechanismen zu analysieren und auf diese Weise die Herstellungsprozesse zu optimieren. Schließlich sollten biologische Modellassays auf Nanobiopore Sensoren etabliert und hinsichtlich Sensitivität (LOD und LOQ) charakterisiert werden.

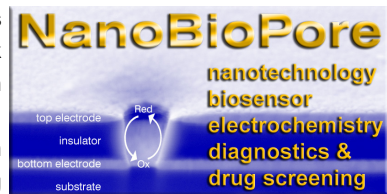
2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das NMI Vorhaben nahm im Verbund eine Schlüsselstelle zwischen Grundlagenforschung einerseits und Assay- und Systementwicklung andererseits ein (vgl. Projektstrukturplan aus Projektantrag).



Im Stand der Technik war Redoxcycling auf interdigitierende Elektrodenarrays (Sibanat-Projekt) bekannt. Verstärkungsfaktoren von etwa 10 werden damit typischerweise erreicht (1).

Im Nanobiopore Vorhaben war zunächst die Eignung des vorgeschlagenen Strukturierungsverfahrens – Nanopartikellithographie – für die Herstellung der Sensoren nachzuweisen. Weiterhin war zu klären, ob Redoxcycling in Mikro- bzw. Nanoporen überhaupt möglich ist



und welche Verstärkungsfaktoren damit erreichbar sind. Schließlich war zu zeigen, daß biologische Rezeptor-Ligand Bindungsassays auf Nanobiopore Sensoren mit hoher Sensitivität etabliert werden können.

3 **Planung und Ablauf des Vorhabens**

Das Teilvorhaben verlief zunächst planmäßig und die folgenden Meilensteine wurden erreicht:

PM 12: Prototyp NanoBioPore Chip, Isolator-pinhole-Dichte $< 10/\text{mm}^2$

PM 12: Prototyp Ausleseelektronik, 1-Kanal, verfügbar, $I_{\text{min}} < 50\text{pA}$

PM 18: a) Redoxcycling in NanoBioPore Struktur und Bestimmung d. Verstärkungsfaktors

b) Biotin/Streptavidin-Assay als Modellsystem oder alternatives biologisches Rezeptor-Ligand-System etabliert und LOD und LOQ auf NanoBioPore Struktur bestimmt

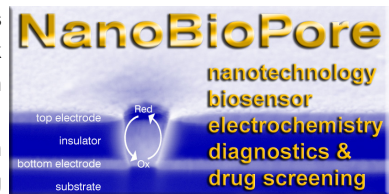
PM 24: Redesign und optimierter Prototyp von NanoBioPore Chip sowie Ausleseelektronik (8-Kanal)

In der zweiten Projekthälfte ging es schwerpunktmäßig um die Übertragung von Produktionsprozessen an den Partner HL Planartechnik mit dem Ziel, eine große Zahl von Sensoren für die Assayentwicklung bereit zu stellen. Dabei zeigte sich, daß der Ätzprozeß zum Einbringen der Poren in die Sensoren hinsichtlich der Prozeßführung recht sensitiv ist und die Ausbeute an funktionsfähigen Sensorchips war entsprechend gering, wodurch die Assayentwicklung behindert wurde. Dem entsprechend wurde ein Aufstockungsantrag gestellt und bewilligt, durch den zusätzliche Leistungen bei der Prozeßübertragung, der Chipfertigung und der elektrischen Charakterisierung von Sensorchips ermöglicht wurden.

4 **Wissenschaftlicher und technischer Stand**

Insgesamt wurden die wesentlichen Vorhabensziele einschließlich der Demonstration biologischer Rezeptor-Ligand Bindungsassays erreicht.

- Dünnschichtprozesse, Nanopartikellithographie, Schattenmaskentechnologie sowie Porenätzverfahren wurden erforscht und soweit etabliert, daß **Funktionsmuster von**



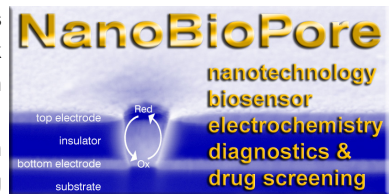
Nanobiopore Sensorchips für elektrische und elektrochemische Charakterisierung bereit gestellt werden konnten.

- **Prozeßtechnologie** wurde an HL Planartechnik übertragen.
- Insbesondere wurde Redoxcycling mit **Verstärkungsfaktoren von z.T. >100** in Nanobiopore Sensoren nachgewiesen und damit die zentrale Hypothese des Projektantrags positiv entschieden (2) (Ruhr Univ. Bochum, AG Schuhmann)!
- Die Biofunktionalisierung von Porenwänden mit Epoxysilan erhöht die elektrische und elektrochemische Stabilität von Sensoren und ermöglicht die **selektive Anbindung biologischer Rezeptoren in Nanoporen**. Diese behalten auch nach der Immobilisierung ihre biologische Funktion.
- Nanobiopore Sensoren wurden mit einem Detektionsantikörper funktionalisiert und u.a. bereits **erfolgreich in Patientenseren getestet** und zeigen auch dort eine Sensitivitätsverbesserung durch die Nutzung des Redoxcyclings in Nanoporen.

Diejenigen Fragestellungen des Forschungsantrags, denen ursprünglich ein hohes Forschungsrisiko zugemessen worden war, wurden also durchweg positiv entschieden! Allerdings konnte wegen der zu geringen Ausbeute bei der Chipfertigung nur ein Teil der vorgeschlagenen biologischen Assays realisiert werden.

Somit verbleiben zwei Aufgaben für ein Folgeprojekt:

- die Etablierung eines **durchgehenden robusten Herstellungsprozesses mit hoher Ausbeute** bei HL Planartechnik, die deutlich über den jetzigen Stand einer Fertigung von Funktionsmustern hinausgehen muß sowie
- die systematische **Realisierung und Validierung einer großen Zahl biologischer Rezeptor-Ligand Bindungsassays**.



B Eingehende Darstellung

1. Ziele des Vorhabens und erreichte Ergebnisse

1.1 Entwicklung und Integration des NanoBioPore Sensorchips

Ziel- und Aufgabendefinition:

„Nanostrukturierungsverfahren, Verfahren zur Herstellung extrem pinhole-armer Isolations-schichten und Chipdesign werden zusammengeführt, um Prototyp-Chips des NanoBioPore-Sensors bereitzustellen. Design und lithographische Definition des Chiplayouts der Prototypen erfolgt ebenfalls am NMI.“

1.1.1 Chipdesign

Im Verlauf des Vorhabens wurden in enger Zusammenarbeit zwischen NMI und HL Planartechnik insgesamt drei verschiedene Chipdesigns entworfen und realisiert.

Design 1:

Abb.1 zeigt das erste im Projekt realisierte Chiplayout und einen schematischen Querschnitt durch das Metall / Isolator / Metall – Schichtsystem. Die gezeigten Abmessungen der Elektroden, das Prinzip der sich im rechten Winkel überkreuzenden Strukturen und die Herstellung unter Verwendung von Schattenmasken wurden als potentiell kostengünstige Alternative zur Nutzung teurer Photolithographieprozesse evaluiert.

Am NMI wurde das Konzept erarbeitet und das CAD Design erstellt. Außerdem wurden Substrathalterungen und Schattenmasken für Glas- bzw. Siliziumwafer angefertigt und mehrere Probedurchläufe durchgeführt.

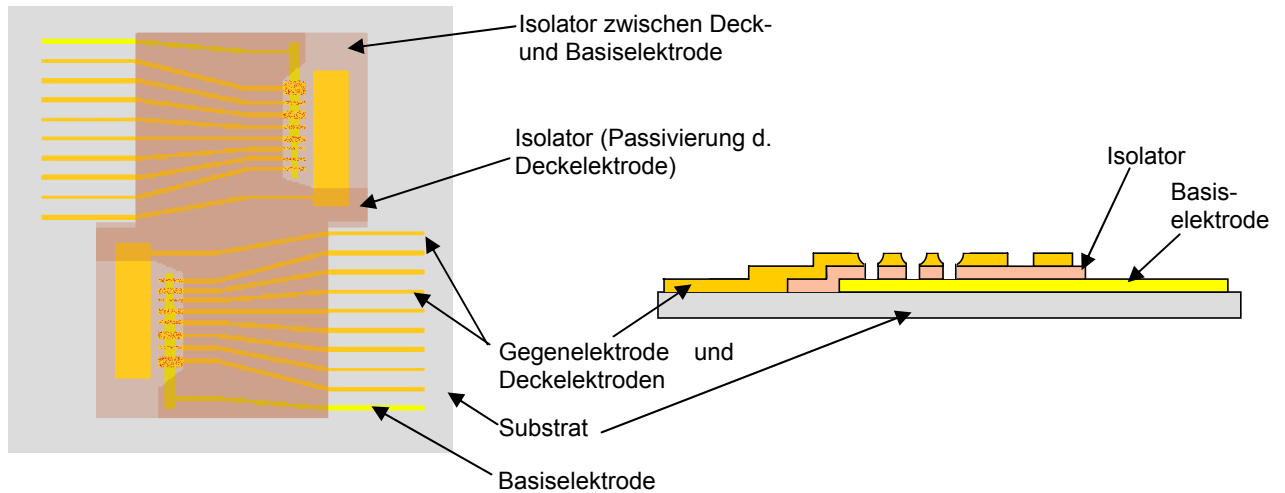


Abb.1: Chiplayout und Herstellung mittels Schattenmasken

Im weiteren Projektverlauf stellte sich jedoch heraus, daß an den Elektrodenkanten eine höhere Defektwahrscheinlichkeit zu bestehen scheint und eine unabhängige Kontaktierung jedes Sensors durch je zwei Anschlüsse vorteilhaft ist. Dies führte zu Design 2 (Tabelle 1). Auch dieses Design enthält Sensoren mit unterschiedlich großen Sensorflächen.

Design 2:

Tabelle 1 zeigt das Layout der Schattenmasken und die jeweils damit aufbrachte Schichtstruktur.

Tabelle 1: Herstellungsprozesse und Schichtlayout

Maske Nr.	Funktion / Prozeß	Layout
1	Basiselektrode / Aufdampfen oder Sputtern von Ti / Au / Ti	

2	Isolator / PECVD von Si_3N_4 oder SiC_xO_y - Schichten	
3	Haftvermittler für Partikel: Polyethyleneimine (0,1% in Wasser) bzw. BSA	vollflächig
4	Partikeldekoration	Tropfen der Partikelsuspension auf Sensorpads bzw. vollflächig und nachfolgende Gefriertrocknung
5	Deckelektrode / Aufdampfen oder Sputtern von Ti / Au / Ti	
6	Deckisolator / PECVD von Si_3N_4	
7	Porenätzmaske	

Design 3:

Die Evaluierung von Sensoren nach Design 1 und 2 ergab einen relativ hohen Aufwand für die positionsgenaue Montage von Substraten unter den Schattenmasken in den aufeinander folgenden Fertigungsschritten, welche die Ersparnis der Photolithographieprozesse im nicht-industriellen Fertigungsumfeld praktisch aufhob. Außerdem erschien es vorteilhaft, Entwicklungsaufgaben im Zusammenhang mit Dünnschichttechnik, Partikeldekoration und Porenätzen unabhängig voneinander zu untersuchen. Daher wurde im Design 3 (Abb.2) das Poren-

ätzfenster mittels Photolithographie erzeugt. Alle vier Sensoren wiesen außerdem nun die gleiche Fläche auf, um Mehrfachbestimmungen auf dem gleichen Chip unter exakt den gleichen Bedingungen durchführen zu können. Zusätzlich wurden Sensorarrays mit 24 Sensorfeldern realisiert.

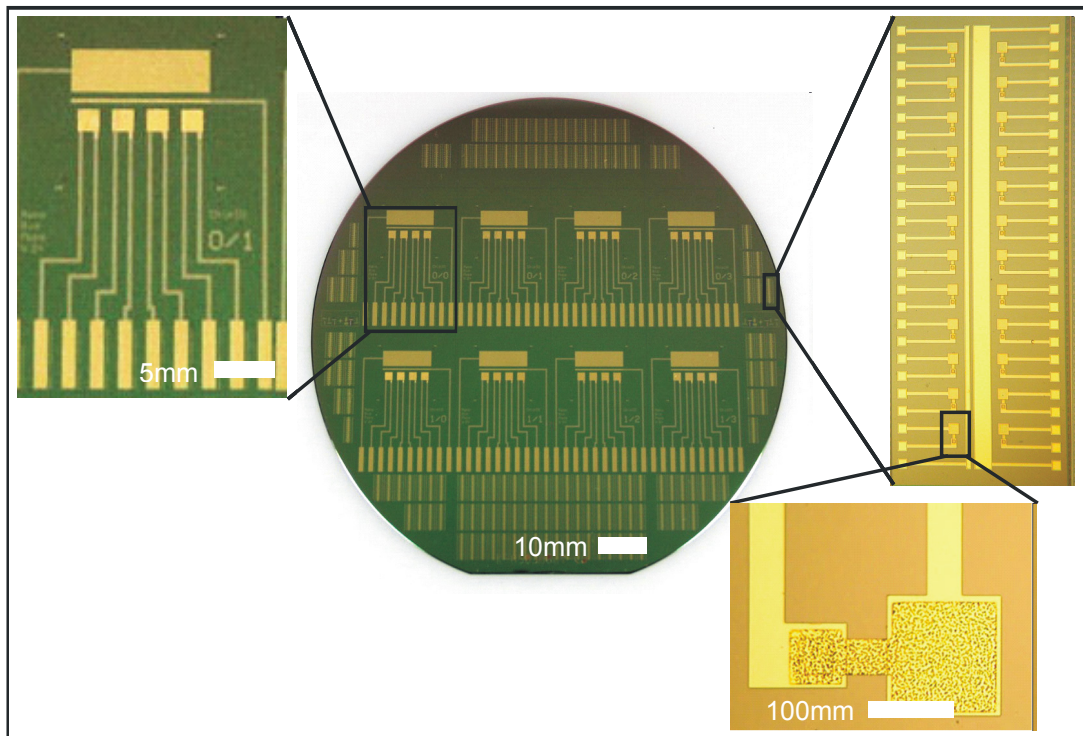


Abb. 2: Design 3 mit photolithographisch definierten Porenätzfenstern (Herstellung der Wafer bei HL Planartechnik)

1.1.2 Metall / Isolator / Metall – Systeme:

Herstellungsverfahren und elektrische Charakterisierung

Die Metallisierung für die Basis- bzw. Deckelektroden wurde durch Kathodenzerstäubung mit der Schichtfolge Titan / Gold / Titan (10nm / 100 – 300nm / 10nm) erzeugt, wobei die Titanschicht als Haftvermittler zwischen Substrat und Gold bzw. Gold und Isolatorschicht dient.

Die Isolatorschicht wurde in zwei Varianten realisiert:

- Silizium-Kohlenstoff-Schicht aus einem flüssigen Precursor (HMDSO), (NMI), Dicke ca. 100 - 200nm
- Siliziumnitrid-Isolator (HL Planartechnik GmbH), Dicke 100 - 200nm.

Die Qualität der Isolationsschicht wurde mittels Impedanzspektroskopie und Leckstromanalyse quantitativ evaluiert (vgl. 1.3). In diesem Zusammenhang wurde zunächst auf die Partikeldekoration und die Herstellung einer porösen Deckelektrode verzichtet. So entstehen auf jedem Chip acht (Design 1) bzw. vier (Design 2 und 3) Kondensatoren mit unterschiedlicher Fläche zwischen 0,1 und 1 mm² (Design 1, Abb. 3) bzw. 2,25mm² (Design 3). Unter der Annahme einer Dielektrizitätskonstante von etwa $\epsilon=4$ (Silizium-Kohlenstoffschicht) bzw. $\epsilon=7,5$ (Siliziumnitrid) ergibt sich bei einer Isolatorschichtdicke von 100nm ein theoretischer Wert für die Kapazität zwischen 40 und 400pF (Silizium-Kohlenstoffschicht) bzw. 75 und 750pF (Siliziumnitrid). Die tatsächlich gemessenen Werte liegen tendenziell etwas höher, u.a. vermutlich wegen der Flächenvergrößerung durch das Halbschattengebiet an den Elektrodenrändern und wegen Schichtrauigkeit und damit verbundener Vergrößerung der effektiven Elektrodenfläche bzw. Feldüberhöhung.

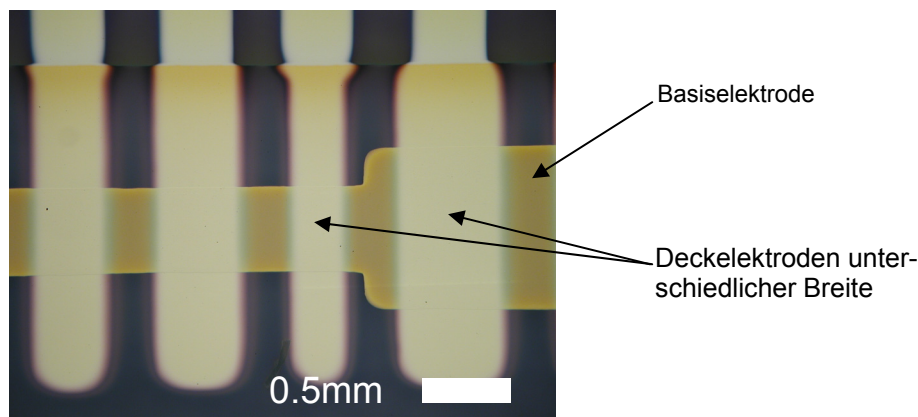


Abb. 3: Ausschnittsvergrößerung eines NanoBioPore Sensorchips (Design 1) mit einer Basiselektrode und Deckelektroden verschiedener Breiten. Die insbesondere bei den Deckelektroden erkennbare Kantenunschärfe rührt von nicht perfekt anliegenden Schattenmasken und der geringen Distanz zum Sputtertarget bei der Metallisierung her.

Die ebenfalls – aus dem Quotienten von Real- und Imaginärteil der Impedanz - bestimmte Kondensatorgüte gibt Aufschluß über die Isolationseigenschaften. Der bei einer Potentialdifferenz von 1V zwischen Deck- und Basiselektrode gemessene Leckstrom gibt einen Hinweis auf die erreichbare Sensitivität von Sensoren, da der faraday'sche Strom aufgrund eines Bindungsereignisses mindestens von ähnlicher Größenordnung sein muß, wie der Leckstrom durch den Isolator.

Tabelle 2 fasst die an den genannten Isolatorschichttypen mit Sensoren gemäß Design 1 erzielten Ergebnisse zusammen.

Tabelle 2: Charakterisierungsdaten zu den verschiedenen Isolatoren

Isolator	SiO ₂	Si ₃ N ₄	
		Einschichtprozeß	Zweischichtprozeß
C/A (gemessen)[pF/mm ²] (C/A (soll)) [pF/mm ²]	278 ± 66 (354)	1358 ± 410 (664)	1394 ± 469 (664)
Anzahl d. Sensoren mit D < 10 ⁻²	52 (n=91)	62 (n=64)	59 (n=64)
Anzahl d. ausheilbaren Sensoren	10 (n=39)	0 (n=2)	0 (n=5)
Ausbeute [%]	68	97	92
I(Verlust) [pA]	13 ± 9	<1	<1

C/A : Kapazität/Elektrodenfläche

D: Güte des Kondensators

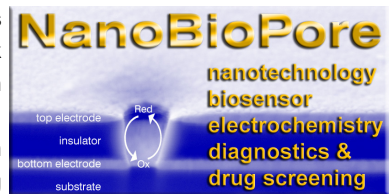
I(Verlust): mittlerer Verluststrom über die Isolatorschicht d. intakten Sensoren bei V=1V

n: Anzahl der untersuchten Sensoren

Besonders mit den Si₃N₄ Schichten erreicht man eine hohe Ausbeute von Metall / Isolator / Metall Systemen mit sehr guten Isolatoreigenschaften. Dabei muß betont werden, daß diese Werte die Situation ohne Partikellithographie und ohne Porenätzprozeß darstellen. Sie stellen die – sehr guten – Eigenschaften der Dünnschichtisolatormaterialien dar.

Für die Herstellung der Deckelektrode wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet: a) Kathodenzerstäubung (Sputtern), wobei der Abstand zwischen Target und Substrat etwa 15mm betrug sowie b) Aufdampfen mit einem Substrat / Quelle Abstand von etwa 30 cm. Die resultierenden morphologischen Eigenschaften werden in 1.2.1 im Detail diskutiert.

Von entscheidender Bedeutung ist die Verwendung einer Haftvermittlungsschicht zwischen Metall- bzw. Isolatorschichten, um Delamination zu vermeiden. Hier wurde Titan (ca. 10nm) eingesetzt. Im Verlauf des Vorhabens wurden keine negativen Auswirkungen auf das elekt-



rochemische Verhalten der Sensoren gefunden. Es wird vermutet, daß die dünne Ti-Schicht im Bereich der Poren passiviert und daher elektrochemisch inaktiv wird.

1.1.3 Partikellithographie

Um eine zuverlässige Haftung zwischen der Isolatoroberfläche und den negativ geladenen für die Nanopartikellithographie eingesetzten Latex-Partikeln zu erreichen, ist eine Haftvermittlerschicht erforderlich. Während der Partner Universität Heidelberg mit Beschichtungen aus BSA (bovine serum albumin) experimentierte, wurde am NMI Polyethyleneimine verwendet. Polyethyleneimine besitzt eine große Anzahl von Amingruppen, die zumindest z.T. protoniert und damit positiv geladen sind. Sie können einerseits mit den negativ geladenen Silanolgruppen an einer Siliziumoxid- oder -nitridoberfläche wechselwirken und andererseits mit den verbleibenden positiven Ladungen elektrostatisch Latexpartikel an die Oberfläche binden. Die Beschichtung erfolgt einfach durch Eintauchen der Substrate in eine 0,1%ige wässrige Lösung des Polyethyleneimines.

Aufgrund der elektrostatischen Abstoßung zwischen den Partikeln stellt sich eine Partikeldichte ein, die normalerweise deutlich geringer ist als es einer hexagonal dichtesten Packung entspräche. Durch Spülen mit destilliertem Wasser werden Partikel, die nicht im unmittelbaren Kontakt mit der Oberfläche stehen entfernt. Beim Eintrocknen der Schicht kommt es infolge von Kapillarkräften zur Ausbildung kleiner Aggregate und größerer Zwischenräume (Abb. 4). Dies kann jedoch durch eine Gefriertrocknung verhindert werden, wie Arbeiten des Projektpartners Univ. Heidelberg gezeigt haben (vgl. Bericht Univ. Heidelberg).

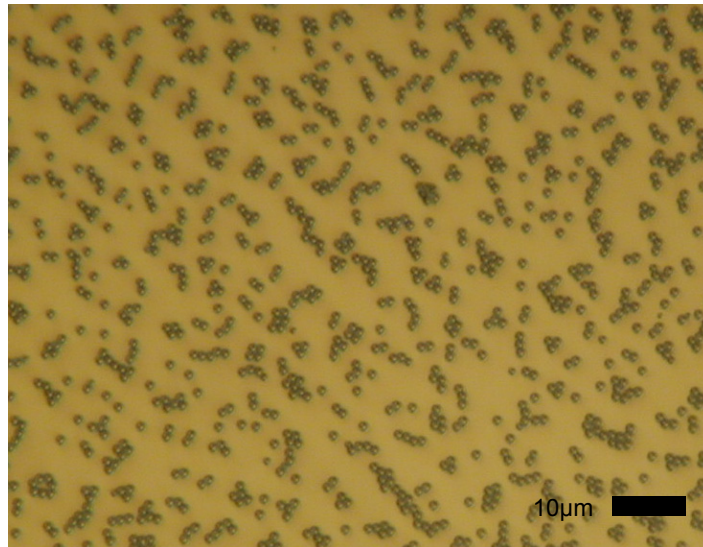
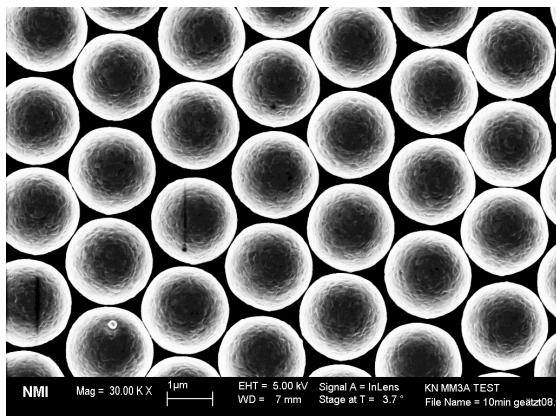
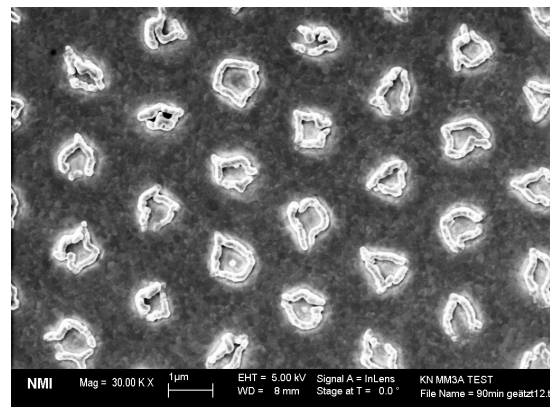


Abb. 4: Partikellithographie – 1µm Partikel auf Si_3N_4 Oberfläche. Nach dem Austrocknen bilden sich infolge von Kapillarkräften kleine Partikelaggregate.

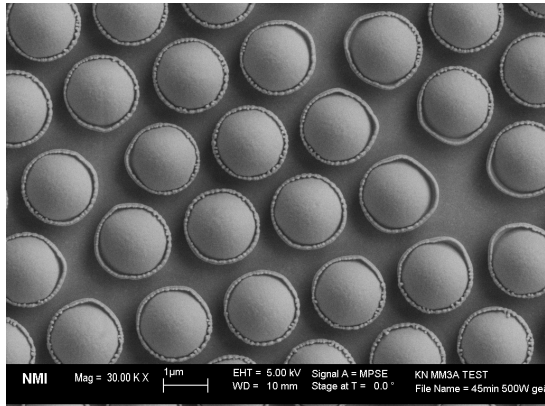
Alternativ zu diesen Verfahren ist es auch möglich, hexagonal dichteste Packungen von Partikeln auf den Isolatoroberflächen zu erzeugen. Um dennoch bei der Deposition der Metallisierung eine lateral zusammenhängende Schicht zu erzeugen, müssen die Partikel jedoch in einem gewissen lateralen Abstand zueinander angeordnet sein. Dies kann durch Ätzen der Partikel in einem Sauerstoffplasma erfolgen. Je nach Leistung und Einwirkungszeit des Plasmas erhält man einen einstellbaren Abstand (Abb. 5).



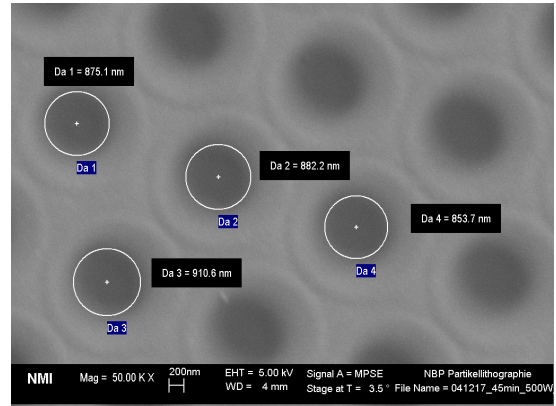
a)



b)



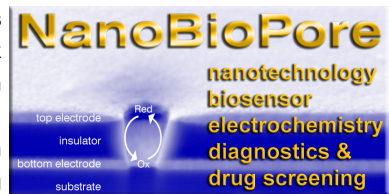
c)



d)

Abb.5: Partikellithographie und Optimierung des Plasmaätzverfahrens.

- hexagonal dichte Packung von Latexpartikeln nach 10min Ätzen in Sauerstoffplasma bei 1000 W. Der Partikeldurchmesser hat bereits abgenommen und die Partikel berühren einander nicht mehr.
- nach 90min bei 1000 W findet man unregelmäßig geätzte bzw. deformierte Partikel.
- nach 45min bei 500 W resultiert eine deutliche Abnahme der Partikel, so dass beim nachfolgenden Metallisierungsprozess eine lateral zusammenhängende poröse Schicht entsteht (d).
- Der Porendurchmesser ist kleiner als der Durchmesser der geätzten Partikel, da es aufgrund des geringen Abstands zwischen Sputtertarget und Probe zur Ausbildung eines Halbschattengebietes unter den Partikeln kommt.



1.2 Mikrostruktur- und Funktionsanalytik NanoBioPore Chip

Ziel- und Aufgabendefinition:

„Begleitend zu den Verfahrensentwicklungen werden Untersuchungen, und hierbei insbesondere Querschnittspräparationen, der Mikro- und Nanostrukturen und der Dünnschichtsysteme mit Hilfe von Focused Ion Beam-Technologie durchgeführt. Die elektrischen und elektrochemischen Eigenschaften der Dünnschichtsysteme und Isolationsschichten werden mit Hilfe von Platindekorationsmethoden evaluiert.“

Im Zusammenhang mit der Mikrostrukturanalytik wurden Rasterelektronenmikroskopie und Focused Ion Beam Etching Technik eingesetzt, um die Struktur von Dünnschichtsystemen und Mikro- und Nanoporen zu untersuchen und Defektmechanismen zu verstehen.

Lock-In Infrarot Mikroskopie machte Defekte über die bei der Applikation eines modulierten Spannungssignal erzeugten Temperaturänderungen sichtbar und ermöglichte dadurch die präzise Lokalisierung dieser Defekte für die nachfolgende Detailanalyse im Rasterelektronenmikroskop.

Für die elektrische und elektrochemische Analyse von Nanobiopore Sensoren wurde Impedanzspektroskopie und Leckstromanalyse eingesetzt. Entsprechende Funktionen wurden unter Mitwirkung des NMI in einen 4-fach Potentiostaten (Octopot, Fa. MCS) implementiert.

1.2.1 Porenmorphologie:

Bei kleinem Abstand zwischen Quelle und Substrat entstehen Halbschattengebiete unter den Partikeln und die in der Metallisierung resultierende Pore ist deutlich kleiner als der Partikeldurchmesser selbst („downsizing“ Effekt, Abb. 6a). Außerdem nimmt die Dicke der Goldschicht zum Porenrand hin ab, was möglicherweise den Elektronentransfer bei elektrochemischen Reaktionen behindert. Im Gegensatz dazu erhält man bei einem großen Abstand zwischen Quelle und Substrat Poren mit dem gleichen Durchmesser wie den der Partikel (Abb. 6 b). Die Flanken der Porenränder sind steil. Bei der Partikeldekoration ist in diesem Fall darauf zu achten, daß die Partikel räumlich von einander getrennt liegen, da sonst isolierte Metallinseln entstehen.

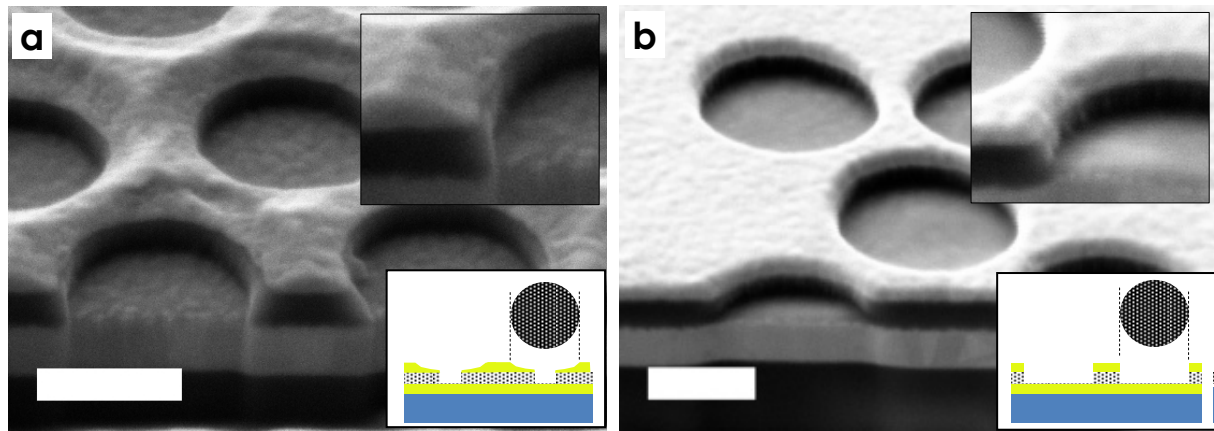


Abb.6: SEM Aufnahmen von Querschnittspräparationen (FIB) von Nanobiopore Sensoren, bei denen die Deckelektrode durch a) Sputterdeposition bei geringem Abstand zwischen Sputtertarget und Substrat bzw. b) Aufdampfen aus einer Quelle in großem Abstand zum Substrat hergestellt wurde. Die Balken entsprechen 500 nm.

1.2.2 Schichtanalyse

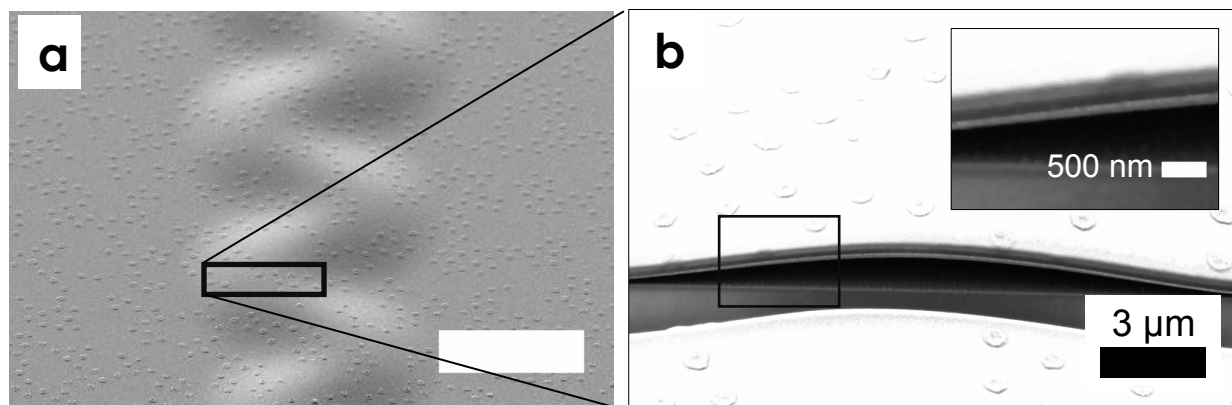
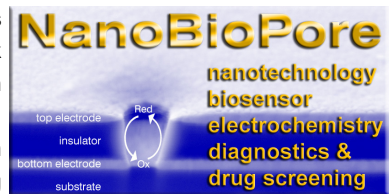


Abb.7: FIB / SEM Analyse ergab lokale Delamination des Metall/Isolator/Metall Schichtsystems wegen fehlender bzw. zu dünner Haftvermittlerschicht.

In den ersten Chargen traten vereinzelt Delaminationen des Schichtsystems auf, die mittels FIB / SEM im Detail analysiert werden konnten (Abb. 7). Einerseits ist eine möglichst geringe Schichtdicke des als Haftvermittler verwendeten Titan wünschenswert, um einen entsprechenden Beitrag zu den elektrochemischen Signalen auszuschließen. Ein vollständiger Verzicht auf den Haftvermittler ist jedoch offensichtlich nicht möglich. Im weiteren Projektverlauf



zeigten sich typische Schichtdicken des Haftvermittlers im Bereich weniger Nanometer als vollkommen ausreichend. Gleichzeitig wurden keine nachteiligen Effekte auf die Sensorsignale beobachtet.

1.2.3 Defektanalyse

Die einzelnen Herstellungsprozesse (vgl. Tabelle 1) wurden durch Untersuchung der elektrischen und morphologischen Eigenschaften analysiert. Nach dem Aufbringen der Deckelektrode (Prozeßschritt Nr. 5, Tabelle 1) wurden Kapazität und Leckstrom des Sensors gemessen. Mit dieser Messung konnte auf die Qualität des Isolators geschlossen und das Vorhandensein elektrisch leitfähiger Defekte detektiert werden, wie sie z.B. infolge von Pinholes im Isolator zu erwarten wären. Während jedoch die Isolareigenschaften und die Ausbeute bis zu diesem Prozeß sehr gut sind, erwies sich der Porenätzprozeß als recht kritisch und führte häufig zu elektrischen Kurzschlüssen an Sensoren, die vor dem Porenätzen noch sehr gute bis gute Isolationseigenschaften gezeigt hatten.

Mehrere mögliche Ausfallmechanismen wurden identifiziert und z.T. mittels Mikro- und Nanoanalytik an einzelnen Sensoren als Defektursache auch nachgewiesen.

a) Rückspütern von Bodenelektrode infolge Überätzens

Die Bodenelektrode stellt einen Ätzstopp für den Isolatorätzprozeß dar, da das verwendete CF_4 Plasma lediglich die Ti-Haftvermittlerschicht, nicht aber das darunter liegende Gold chemisch angreifen kann. Tatsächlich ist das Entfernen der Haftvermittlerschicht auch erwünscht, um einen ungehinderten Elektronentransfer zwischen Medium und Elektrode sicher zu stellen. Typischerweise wird ein Ätzprozeß mit etwas höherer Ätzdauer durchgeführt, als sich aus Ätzrate und Schichtdicke ergeben würde, um ein vollständiges Freilegen des Ätzstops sicher zu stellen. Im Fall eines sehr leicht durch ballistisch abzutragenden Materials wie Gold könnte dies jedoch zum Abtrag von Goldatomen und nachfolgender Redeposition auf den Porenwänden führen. Angesichts der sehr großen integralen Randlänge aller Poren (mehrere Zentimeter) bei gleichzeitig geringer Länge (100 – 200nm) könnte bereits eine sehr dünne, im SEM nicht nachweisbare Schicht bereits einen Kurzschluß verursachen. Im Fall der Abb. 8 wurde ein stark überätzter (kurzgeschlossener) Sensor (a) und ein mit geringerer Ätzdauer hergestellter, intakter Sensor (b) untersucht. Die Pfeile in Abb.8a) markieren Ablagerungen auf den Porenwänden, die in den Poren eines intakten Sensors nicht erkennbar sind.

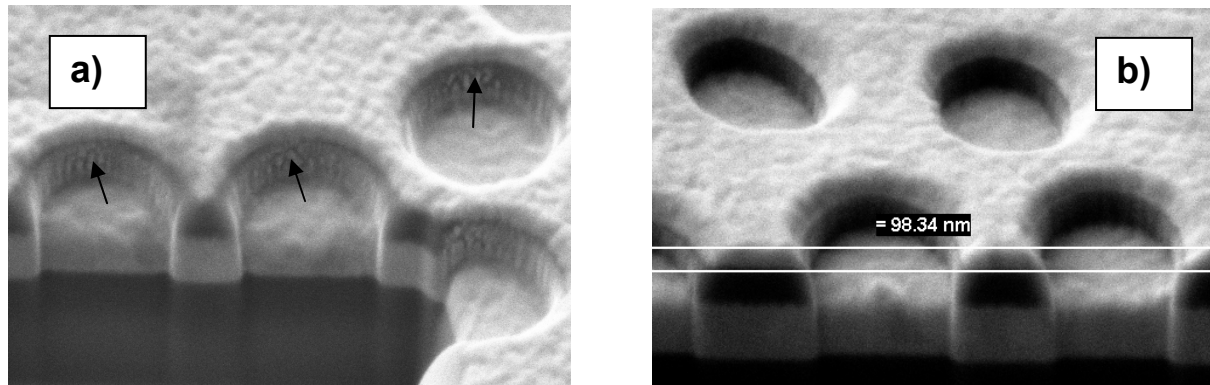


Abb.8: a) FIB-Querschnitt durch ein kurzgeschlossenes Elektrodenpaar (100 nm Isolator, 8 min geätzt). An den Porenwänden sind Strukturen erkennbar (Pfeile), die sich vermutlich beim Überätzen der Pore bilden (rückgesputtertes Gold)
b) FIB-Querschnitt durch ein intaktes Elektrodenpaar (100 nm Isolator, 4 min geätzt). An den Porenwänden sind keine Strukturen, die auf Rücksputtereffekte hinweisen.

b) Flitterbildung infolge der Überdeckung von Lithographie-Partikeln durch die Deckmetallisierung

Verschiedentlich wurde die Bildung von Flittern aus dem Deckelektrodenmaterial beobachtet (Abb.9). Ursache dafür ist der Sputterprozess, bei dem das Target nur etwa 2cm von der Probe entfernt lokalisiert ist. Dies führt zu einem signifikanten Halbschattengebiet unter der Projektion des Partikelrandes und damit einerseits zu dem (erwünschten) Down-Scaling des Porenradius gegenüber dem Partikelradius, andererseits zu einer relativ großen Kontaktfläche zwischen Partikel und Metallisierung. Dort kommt es zur Ausbildung von „Stegen“ zwischen Schicht auf Substrat bzw. Partikel. Wegen der Duktilität von Gold reißen diese während des Lift-off Prozesses u.U. nicht vollständig ab und bergen die Gefahr der Bildung von Kurzschlüssen im Bereich der Poren, indem sie eine Verbindung zwischen Deck- und Basis-elektrode herstellen.

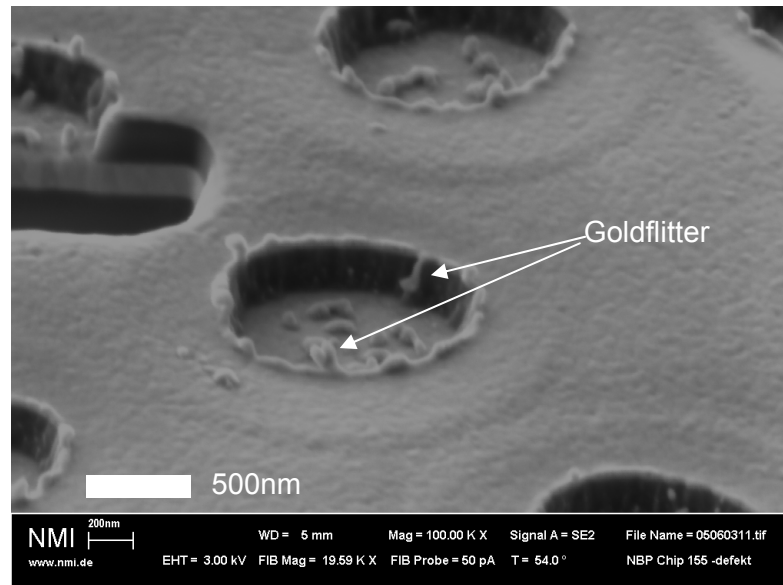


Abb.9: Poren nach Partikel-Lift-off und Ätzen des Isolators. Am Porenrand sind hochstehende Kanten der Metallisierung und z.T. Flitter erkennbar, die vom Abreißen der Metallisierungsschicht während des Lift-offs herrühren. Flitter könnten die Isolationsschicht überbrücken und zu Sensorausfall durch Kurzschluß führen.

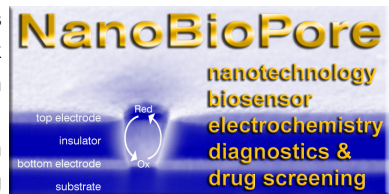
Die Ausbildung der Flitter lässt sich nach den im Projektverlauf gewonnenen Erkenntnissen durch einen Beschichtungsprozess vermeiden, bei dem die Quelle weit entfernt von den Substraten montiert ist, wie dies beim Aufdampfen möglich ist.

Ebenso bewirkt eine Verringerung der Goldschichtdicke und damit eine Minimierung der Kontaktfläche zwischen den Partikeln und der Beschichtung eine verminderte Tendenz zur Ausbildung der Flitter.

c) Elektrostatisch induzierte Defekte

Wie oben beschrieben, zeigen die Sensoren vor dem Porenätzprozeß extrem niedrige Leckströme von typischerweise wenigen pA bei 1V. Die Kapazität liegt im Bereich von einigen 100pF, so daß grundsätzlich auch elektrostatische Aufladung, die zu einem Durchschlagen des Isolators führen könnte, als Defektursache denkbar wäre.

In diesem Zusammenhang wurden mehrere Chargen von Sensoren mit z.T. durch Drahtbonding elektrisch verbundenen Deck- und Bodenelektroden zusammen mit nicht kurzgeschlossenen Sensoren im Porenätzprozeß behandelt. Die Auswertung der jeweiligen Aus-



beute ergab bisher jedoch keine statistisch signifikanten Verbesserungen infolge der kurzgeschlossenen Sensorelektroden.

Weiterhin wurden Ätzversuche in einer Ionenquelle anstelle einer RF-Plasmaätzenanlage durchgeführt, um einerseits die Ionenenergie und damit möglicherweise verbundene Rücksputtereffekte zu minimieren und andererseits die Einkopplung hochfrequenter Wechselspannungssignale in die frei floatenden Sensorelektroden auszuschließen. Auch diese Maßnahme erbrachte jedoch keine eindeutige Verbesserung der Ausbeute des Porenätzprozesses.

Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse werden elektrostatisch induzierte Defekte daher gegenwärtig als eher unwahrscheinliche Ursache angesehen.

Lock-In Infrarotmikroskopie und FIB / SEM

Bei der Aufklärung über den genauen Ausfallmechanismus ist ein Verfahren zur eindeutigen Lokalisierung der Defekte erforderlich. Im Falle eines durch Rücksputtern verursachten Ausfalls würde man nämlich einen gleichmäßig über die gesamte Sensorfläche verteilten Defekt erwarten während Flitter oder Pinholes eher lokalisierte Defekte verursachen sollten. Angesichts von etwa $10^6 - 10^7$ Poren / Sensor ist jedoch eine direkte SEM-Analyse der Poren nicht praktikabel.

Daher wurde ein kombiniertes Verfahren aus Lock-In-Infrarot Mikroskopie zur Lokalisierung von Kurzschlüssen mit einer lateralen Auflösung von etwa 10 – 20µm und nachfolgender Detailanalyse mittels FIB / SEM angewandt (Abb.10).

Dazu wurde zwischen Deck- und Bodenelektrode eines defekten und infolgedessen niederohmigen Sensors eine Wechselspannung mit einer Amplitude von 1V bei 1Hz angelegt und phasenstarr synchronisiert dazu Infrarotbilder aufgenommen und gemittelt. Dieses Lock-In Verfahren erlaubt die Messung sehr kleiner, mit dem angelegten Spannungssignal korrelierter Temperaturänderungen wie sie infolge von Kurzschlüssen zu erwarten sind. Diese Methode erlaubt somit eine Unterscheidung zwischen verteilten bzw. lokalisierten Defekten und die Feststellung der Defektposition für die nachfolgende Detailanalyse.

Im Falle der in Abb. 10 dargestellten Messung war beispielsweise die Unterätzung der Deckelektrode und Ausbildung eines die Bodenelektrode kontaktierenden Goldflitters die Defektursache.

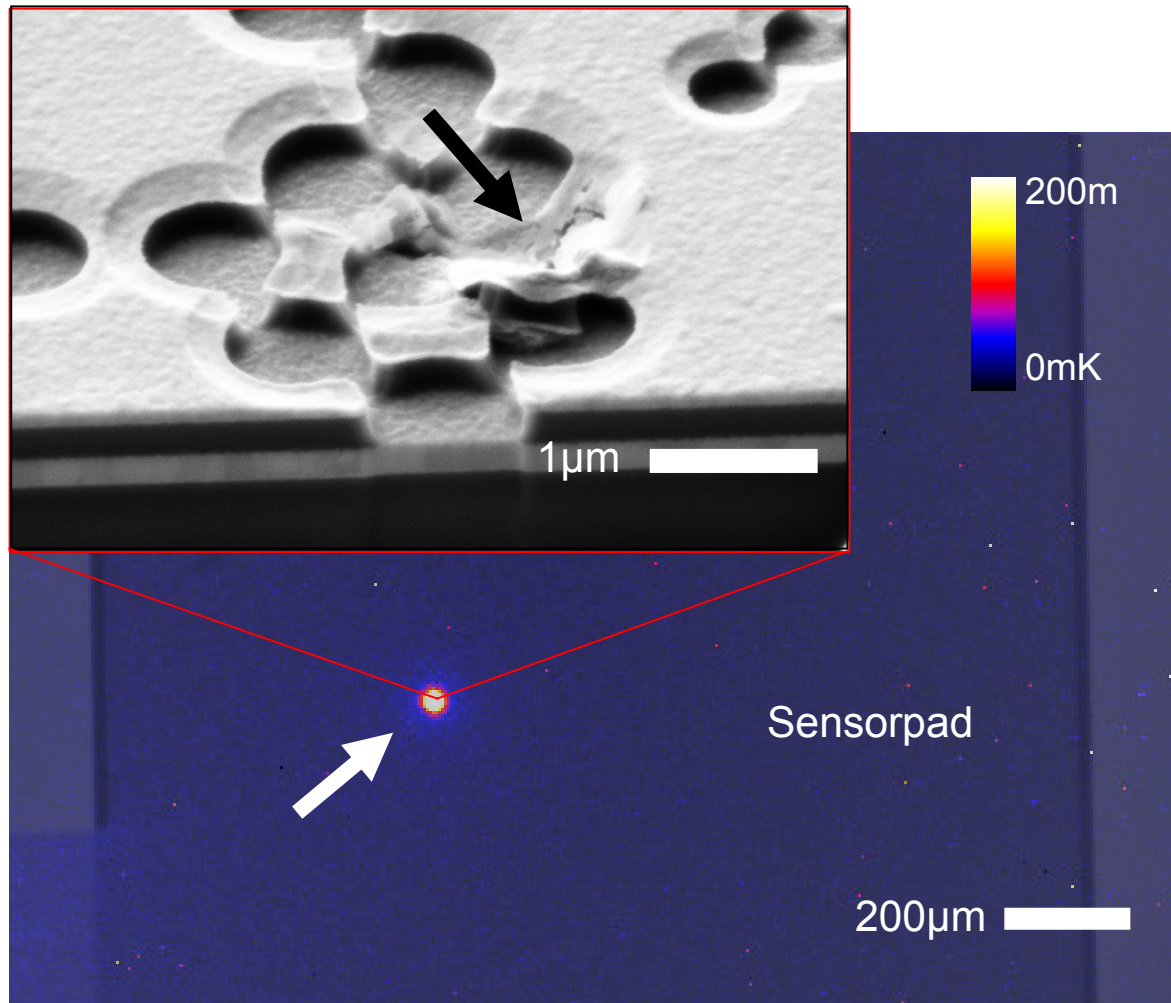
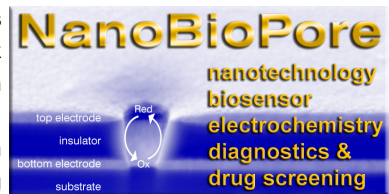


Abb.10: Lock-In Infrarotmikroskopie eines defekten Sensorfeldes bei Anlegen einer Wechselspannung von 1V / 1Hz offenbart einen lokalisierten Defekt als Ursache für den gemessenen Kurzschluß. Die Detailanalyse (SEM Aufnahme) zeigt einen offenbar durch Unterätzung der Deckelektrode entstandenen Goldfritter als mikroskopische Defektursache.

1.2.4 Elektrochemische Eigenschaften von Nanobiopore Sensoren

Die elektrochemischen Eigenschaften von Nanobiopore Sensoren wurden eingehend durch den Projektpartner Ruhr Universität Bochum untersucht (vgl. Bericht der Ruhr Universität Bochum, AG Prof. W. Schuhmann). Am NMI wurden routinemäßig Sensoren in Puffern mit redoxaktiven Molekülen wie p-Aminophenol oder $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6$ mittels zyklischer Voltammetrie bzw. Chronoamperometrie auf einwandfreie Funktion, d.h. ungehinderten Elektronentransfer aus dem Medium zu sowohl Deck- als auch Bodenelektrode, untersucht.



1.3 Etablierung und Evaluierung biologischer Rezeptor-Ligand Assays

Ziel- und Aufgabendefinition:

„Die Detektionseigenschaften von NanoBioPore werden zunächst mit wohldefinierten Rezeptor-Ligand-Systemen wie Streptavidin-Biotin und/oder Antigen-Antikörper untersucht. Hierbei gilt es ein möglichst hohes Signal-Hintergrundsverhältnis zu erreichen. Unspezifische Bindungen auf der NanoBioPore-Oberfläche gilt es zu minimieren, und erste optimale Pufferbedingungen werden definiert. Danach werden in enger Abstimmung mit den Verwertungspartnern und den Chipentwicklern anwendungsrelevante Assays etabliert und hinsichtlich Sensitivität und Selektivität evaluiert. Ziel ist die Bestimmung von LOD (limit of detection) und LOQ (limit of quantification) für (1) Streptavidin / Biotin, das optimale biologische Modellsystem, sowie (2) für diagnostisch relevante Assays wie TSH oder PSA Nachweis.“

Methoden:

- Elektrochemie, Octopot
- Silanderivatisierung
- Assayaufbau

Ergebnisse:

- Biotin – Streptavidin, Immobilisierung in Pore, Enzym aktiv
- Streptavidin – Biotin-AP: hohe Sensitivität
- Ak – Serum-Antigen: Nanobiopore Serumkompatibel

1.3.1 Biofunktionalisierung und Assayaufbau

Bei der am NMI verfolgten Immobilisierungsstrategie sollten Biomoleküle über eine spezielle Silanchemie selektiv an die – aus Siliziumoxid bestehenden - Porenwände gebunden werden, so daß der Elektronentransfer zu Deck- bzw. Bodenelektrode nicht durch eine Beschichtung beeinträchtigt würde.

Die Immobilisierung von Rezeptormolekülen auf den Porenwänden mittels Silanchemie (Abb.11) birgt den großen Vorteil einer ortsspezifischen Modifizierung des Sensors, die ohne weiteres auch auf Waferebene erfolgen kann (Produktionsmaßstab), da das Silan ausschließlich auf Siliziumoxid kovalent anbinden kann. So kann beispielsweise durch ein einfaches Tauchverfahren (Lösung von Aminopropylsilan in Toluol) ein ganzer Wafer selektiv im Bereich der Porenwände aktiviert werden, so dass nachfolgende Modifizierungsschritte ebenfalls nur in den Poren zur Anbindung funktioneller Moleküle führen.

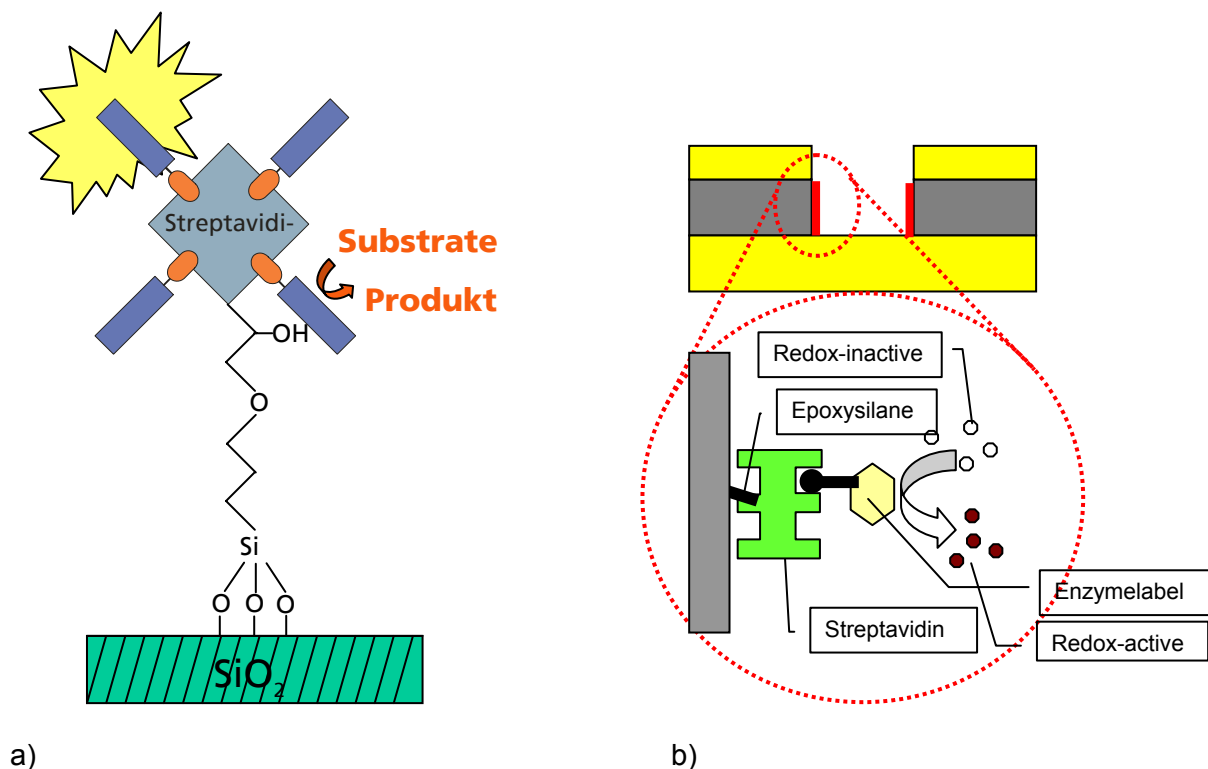


Abb. 11 a) schematische Darstellung des flexiblen Immobilisierungsschemas mittels Silanchemie und Streptavidin. Auf diese Weise entsteht selektiv an den Porenwänden eine Streptavidinmodifizierung, die eine flexible Ankopplung biotinylierter Erkennungsmoleküle ermöglicht (b).

Der Vergleich eines zyklischen Voltammogrammes eines Chips ohne Modifizierung mit einem Chip mit Modifizierung (Abb.12) zeigt, dass:

- a) es gelingt eine funktionelle Streptavidinbeschichtung in den Poren zu realisieren und
- b) das Enzym in der Pore aktiv ist.

Dies ist in sofern ein Schlüsselexperiment, als damit gezeigt ist, dass sowohl Bindungseigenschaften als auch Enzymaktivität durch die besonderen Feldverhältnisse in den Nanoporen nicht negativ beeinflusst werden!

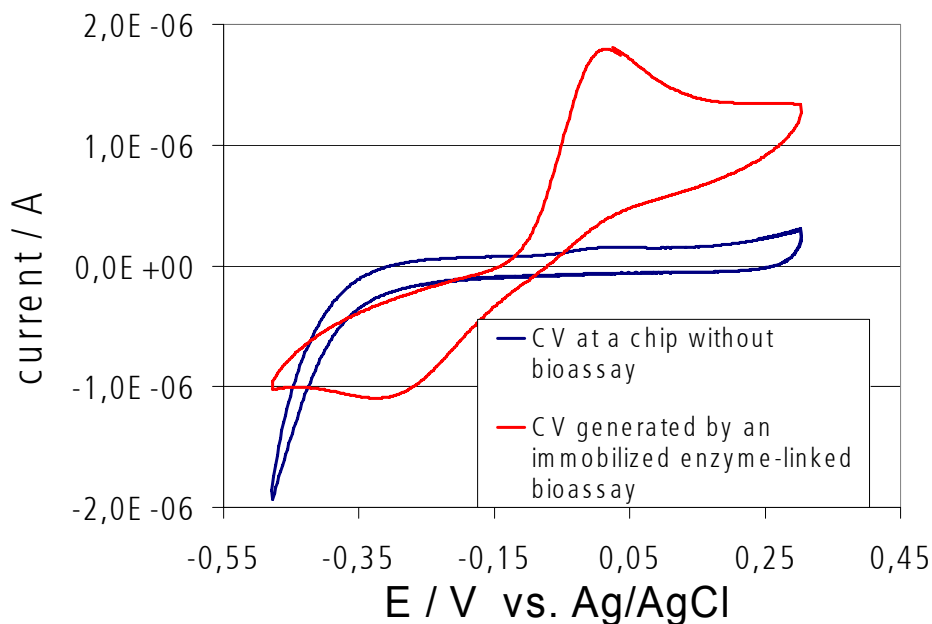


Abb. 12 Vergleich von Zyklovoltamogrammen eines Chips ohne bzw. mit Bioassay entsprechend Abb. 10. Das via Biotinlinker an die Streptavidin-modifizierte Porenwand gebundene Enzym (Alkalische Phosphatase) erzeugt dort aus p-Aminophenylphosphat das redoxaktive p-Aminophenol, das durch die elektrochemische Reaktion an der porösen Deckelektrode nachgewiesen wird.

1.3.2 Serumdiagnostikassay

Der Projektpartner Mikrogen lieferte Antigene und spezielle Antikörper an das NMI, mit denen ein Assayaufbau an den Porenwänden untersucht wurde. Abbildung 13 zeigt den schematischen Aufbau des ersten Assays, der an NBP-Chips getestet wurde. Der Assay basiert auf einem hu-IgG-Antikörper und einem zweiten, Enzym-markierten Anti-hu-IgG-Detektionsantikörper.

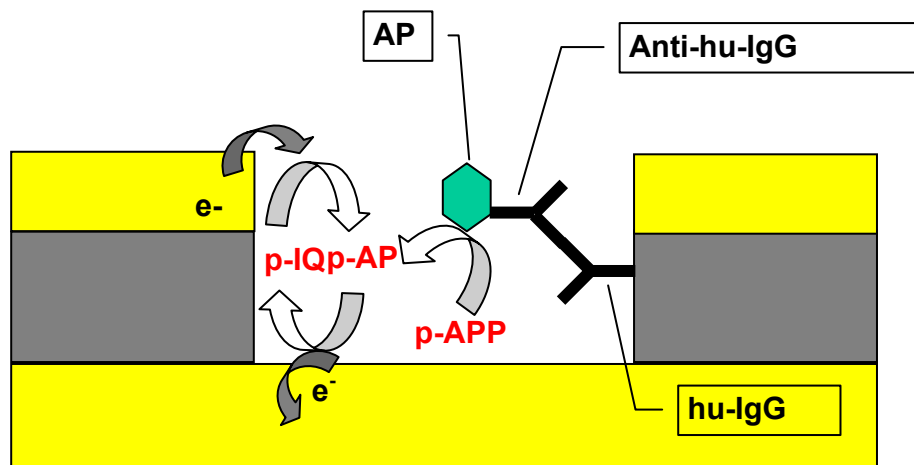


Abb. 13: Assayaufbau mit hu-IgG als Fängerantikörper und mit Anti-hu-IgG-AP als Detektionsantikörper. p-IQ: p-lminochinon, p-AP: p-Aminophenol, p-APP: p-Aminophenylphosphat, AP: alkalische Phosphatase

Nach der Silanisierung der NanoBioPore-Chips wurden die Elektroden mit dem hu-IgG ($c=0,1\text{mg/ml}$) eine Stunde inkubiert. In einem Waschschrift wurden nicht-angebundene Antikörper entfernt. Um unspezifische Bindungen des Detektionsantikörpers zu unterdrücken, erfolgte ein Blockierung der verbliebenen Anbindungsstellen mit einer 3%igen BSA-Lösung. Nach einem erneuten Waschschrift konnte nun der Enzym-markierte Detektionsantikörper angebunden werden. Die elektrochemische Detektion erfolgte nach einem weiteren Waschschrift. Dazu wurde eine $0,5\text{ mM}$ p-APP-Lösung (Glycin-Puffer, pH 9,5) auf den Chip appliziert. Das p-APP wird vom Enzymlabel des Assays zum elektrochemisch aktiven p-AP umgesetzt. Das elektrochemische Signal, das durch das Redoxcycling des p-AP hervorgerufen wird, ist in Abb. 14 dargestellt. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Chip präpariert, der in seiner ersten Inkubationsphase lediglich mit BSA anstelle mit des hu-IgG-Antikörpers inkubiert wurde. Der Signalunterschied zwischen dem Chip mit vollständigem Assay und dem Negativ-Kontrollchip zeigt die Spezifität der Anbindungschemie.

Die Signalintensität des Redoxcyclings an verschiedenen Elektrodenpaaren eines Chips korreliert gut mit der Größe der aktiven Sensorfläche des jeweiligen Elektrodenpaares.

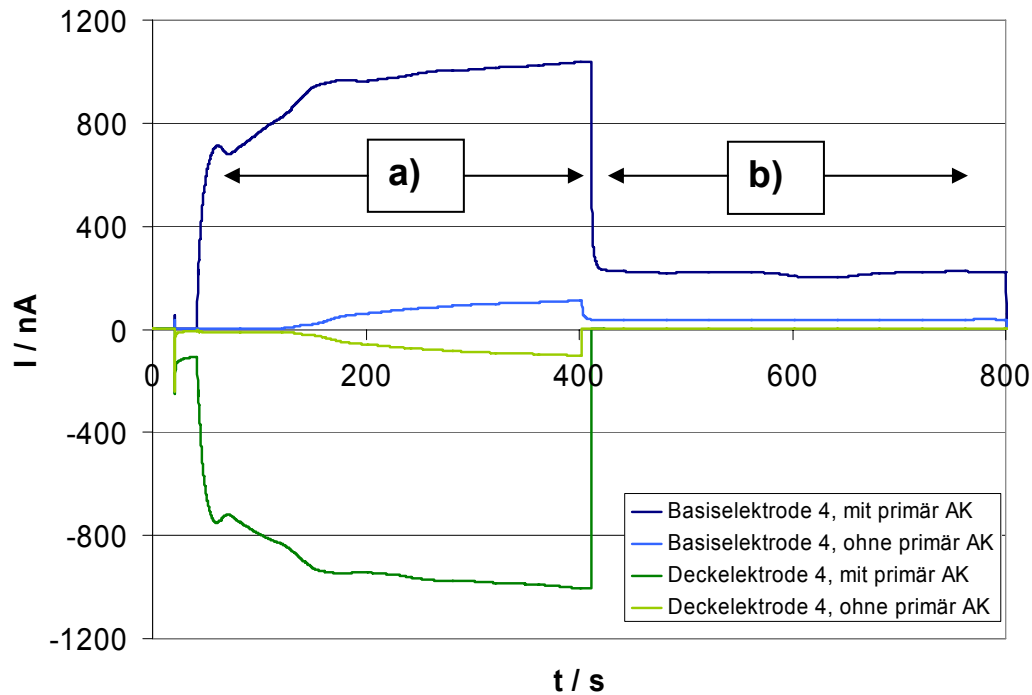


Abb.14: Chronoamperometrische Sensorsignale eines NanoBioPore-Chips mit Bioassay und eines Negativ-Kontrollchips (ohne hu-IgG) in Glycinpuffer pH 9,5. Zugabe von p-APP ($c=0,5 \text{ mM}$) bei $t=40\text{s}$

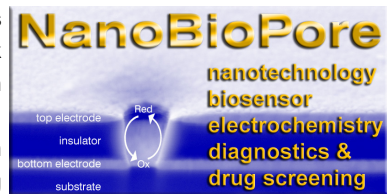
a) unter Redoxcycling-Bedingungen mit $E(\text{Basis}) = 200\text{mV}$, $E(\text{Deck}) = -200\text{mV}$

b) nach Abschalten der Deckelektrode

Insbesondere wurden in diesem Assaysystem bereits Messungen in serumhaltigen Realproben erfolgreich durchgeführt und mit etablierten Assays vergleichbare Detektionsempfindlichkeit registriert.

2 **Kurzfassung des zahlenmäßigen Nachweises**

Siehe Schlußabrechnung.



3 *Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit*

Das NMI arbeitete im Vorhaben an der Schnittstelle zwischen Grundlagenforschung und der Übertragung von Technologien an die industriellen Projektpartner. Dies betraf sowohl die Chipherstellung als auch die erste Erprobung biochemischer Assays. Die dort erzielten Ergebnisse (vgl. Abschnitt A 4) waren für den Erfolg des Gesamtvorhabens essentiell.

4 *Verwertbarkeit der Ergebnisse*

Das NMI strebt eine Lizenzierung des grundlegenden Schutzrechtes nach dessen Erteilung (3) an die Industrie-Partner des Nanobiopore–Verbundes an. Eine entsprechende Interessensbekundung liegt bereits vor.

Im Vorhaben wurde wichtiges Technologie-Knowhow am NMI etabliert, das in Folgeprojekten und Industriedirektaufträgen eingesetzt wird. Die betrifft insbesondere i) die Anwendung von Selbstorganisationsprozessen für Mikro- und Nanostrukturierung, ii) Dünnschicht- und Mikrotechnologie im Zusammenhang mit Strukturierung mittels Schattenmasken und iii) elektrochemische Meßtechnik und Redoxcycling für sensitive Diagnostikverfahren.

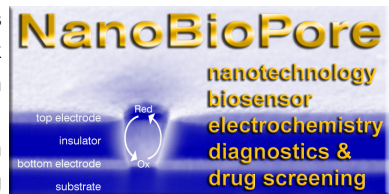
Aufbauend auf diesen Erkenntnissen sind bereits Folgeprojekte entstanden (z.B. Nano-hybrid, FZK 13N9122; Neuroslide) bzw. in Vorbereitung (z.B. Elektrochemischer Immunsuppressiva-Biochip). Insbesondere wird das NMI im aktuell beantragten Folgeprojekt im industriellen Unterauftrag ein Verfahren zur chemischen Aktivierung von Sensoren sowie einen Meßaufbau zur Sensorcharakterisierung auf Waferlevel entwickeln.

Im Zusammenhang mit dem Nanobiopore Vorhaben wurden mehrere Diplom- bzw. Masterarbeiten erfolgreich abgeschlossen.

5 *Stand der Technik und Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens*

i) Redox-cycling in interdigitierenden Elektrodenarrays und elektrochemische diagnostische Assays für Point-of-care Diagnostik

Eine Publikation von Zhu et.al. bei der MicroTAS 2004 (4) untersuchte den durch Redoxcycling an interdigitierenden Nanoelektrodenarrays (100nm Rastermaß) gegenüber Mikroelekt-



rodenarrays erzielbaren Verstärkungseffekt. Ahn et.al. berichten von einer Effizienzsteigerung um einen Faktor 10^2 (4, 5). Dieses Ergebnis bestätigt einerseits die im Nanobiopore Vorhaben erzielten Resultate. Allerdings erfordert die Herstellung der dort beschriebenen Sensorchips einen sehr hohen Aufwand und ist nicht massenfertigungstauglich.

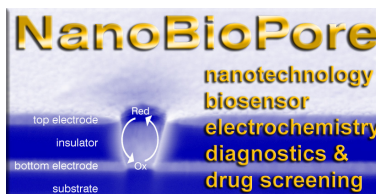
In einer weiteren, während der Projektlaufzeit erschienenen Publikation (1) des FhG ISIT wird ein Verstärkungsfaktor durch Redoxcycling von etwa 10 für Sensoren mit interdigitierenden Elektrodenarrays (Rastermaß $1,2\mu\text{m}$) genannt. Dieser Wert wird durch Nanobiopore weit übertroffen (2).

Das im Sibanat Vorhaben entwickelte Detektionssystem soll derzeit durch die Fa. Siemens unter dem Namen „Quicklab“ zur Serienreife für Anwendungen in DNA- und Proteindiagnostikassays entwickelt werden.

Ein dem Nanobiopore-Konzept vergleichbar sensitives und dabei massenfertigungstaugliches Elektroden-System ist während der Projektlaufzeit nicht bekannt geworden. Zudem verfügt das Konsortium über eine grundlegende Schutzrechtsanmeldung für diese Technologie.

ii) Nanostrukturierung mittels Selbstorganisationsverfahren

Mikro- und Nanostrukturierung durch Selbstorganisation von Partikeln oder Polymeren ist überall dort anwendbar, wo zwar eine bestimmte Strukturgröße jedoch keine genaue Positionierung der Strukturen erforderlich ist (6, 7). Eine prominente Anwendung stellen Membranfilter dar. Dort kommt es darauf an, Polymermembranen mit möglichst hoher Porosität und enger Verteilung von Porenradien herzustellen (8). Nanopartikellithographie und selbstorganisierende Copolymere werden derzeit in einem industriellen Verbundprojekt unter Beteiligung des NMI zur Herstellung großflächiger nanoporöser Membranfilter eingesetzt. Eine weitere Anwendung betrifft Mikrostimulationselektroden mit extrem hoher Ladungsübertragungskapazität. Mittels Nanopartikellithographie soll eine poröse 3D-Strukturierung und damit eine hohe effektive Oberfläche realisiert werden, wobei es wiederum nicht auf die genaue Position der Poren sondern lediglich auf die Strukturdimension ankommt. Die prinzipielle Machbarkeit wurde mit konventionellen lithographischen Verfahren bereits nachgewiesen (9). Solche Mikroelektroden stellen eine unverzichtbare Voraussetzung für innovative aktive Neuroimplantate wie Retinaprothese und Hirn-Computer-Schnittstellen dar, die ebenfalls derzeit entwickelt werden.



6 Veröffentlichungen (mit Beteiligung von NMI-Autoren)

Konferenzbeiträge

Schomann, P., Gonska, J., Martin, D., Nisch, W. & Stelzle, M. (2004) in *Micro Total Analysis Systems 2004*, eds. Laurell, T., Nilsson, J., Jensen, K., Harrison, D. J. & Kutter, J. P. (The Royal Chemical Society, Malmö), Vol. 1, pp. 425-426.

Müller, U., Kentsch, J., Nisch, W., Neugebauer, S., Schuhmann, W., Linke, S., Kaczor, M., Lohmüller, T., Spatz, J. P. & Stelzle, M. (2005) in *Micro Total Analysis Systems 2005*, eds. Jensen, K., Han, J., Harrison, D. J. & Voldman, J., Boston, Massachusetts, USA), Vol. 1, pp. 473-475.

Müller, U., Kentsch, J., Nisch, W., Neugebauer, S., Schuhmann, W., Linke, S., Kaczor, M., Lohmüller, T., Spatz, J. & Stelzle, M. (2005) in *MST Kongreß*, Freiburg).

Neugebauer, S., Müller, U., Stelzle, M. & Schuhmann, W. (2005) in *NanoBio Europe*, Münster).

Müller, U., Kentsch, J., Nisch, W., Neugebauer, S., Schuhmann, W., Linke, S., Kaczor, M., Lohmüller, T., Spatz, J. & Stelzle, M. (2006) in *Deutsch-Japanischer Biochip Workshop*, Tokyo, Kanasawa).

Stelzle, M. (2006) in *Physics of Sensors and Detection Systems International Workshop*, JRC, Ispra).

Müller, U., Nisch, W., Pawlack, M., Gierke, B., Breisch, S., Burkhardt, C., Rudorf, R., Neugebauer, S., Schuhmann, W., Linke, S., Kaczor, M., Lohmüller, T., Spatz, J., Motz, M., Sorsa, J., Hecke, S., Hartwich, G. & Stelzle, M. (2007) in *NSTI Nanotech*, Santa Clara).

Müller, U., Nisch, W., Pawlack, M., Gierke, B., Breisch, S., Burkhardt, C., Rudorf, R., Neugebauer, S., Schuhmann, W., Linke, S., Kaczor, M., Lohmüller, T., Spatz, J., Motz, M., Sorsa, J., Hecke, S., Hartwich, G. & Stelzle, M. (2007) in *WING Konferenz*, Berlin).

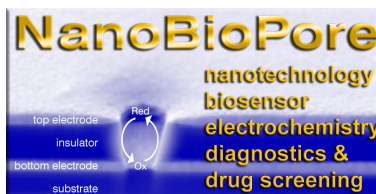
Zeitschriftenartikel

Neugebauer, S., Müller, U., Lohmüller, T., Spatz, Joachim P., Stelzle, M. & Schuhmann, W. (2006) *Electroanalysis* **18**, 1929-1936.

Lohmüller, T., Müller, U., Breisch, S., Nisch, W., Schuhmann, W., Neugebauer, S., Kaczor, M., Linke, S., Spatz, J. & Stelzle, M. (in preparation).

7 Literatur

1. Elsholz, B., Worl, R., Blohm, L., Albers, J., Feucht, H., Grunwald, T., Jurgen, B., Schweder, T. & Hintsche, R. (2006) *Anal Chem* **78**, 4794-802.



2. Neugebauer, S., Müller, U., Lohmüller, T., Spatz, Joachim P., Stelzle, M. & Schuhmann, W. (2006) *Electroanalysis* **18**, 1929-1936.
3. Stelzle, M. & Nisch, W. (2001) in *WO 02/084272 A2* (NMI, PCT).
4. Zhu, X. & Ahn, C. H. (2004) in *8th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, Malmö, Sweden), pp. 324-326.
5. Zhu, X. & Ahn, C. H. (2005) *IEEE Trans Nanobioscience* **4**, 164-9.
6. Guarini, K. W., Black, C. T., Milkove, K. R. & Sandstorm, R. L. (2001) *J. Vac. Sci. Technology* **19**, 2784-2788.
7. Guarini, K. W., Black, C. T., Zhang, Y., Kim, H., Sikorski, E. M. & Babich, I. V. (2002) *J. Vac. Sci. Technology* **20**, 2788-2792.
8. Yang, S. Y., Ryu, I., Kim, H. Y., Kim, J. K., Jang, S. K. & Russell, T. P. (2006) *Advanced Materials* **18**, 709-712.
9. Bauerdick, S., Burkhardt, C., Kern, D. P. & Nisch, W. (2003) *Biomedical Microdevices* **5**, 93-99.