

UNIVERSITÄT BIELEFELD

FAKULTÄT FÜR PHYSIK

**Herstellung und Charakterisierung von
Glas-Nanopipetten für einzelmolekulare
Translationsexperimente**

BACHELORARBEIT

zur Erlangung des Grades eines
Bachelor of Science

vorgelegt von

Armin Grundmann

am

30.09.2015

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit in allen Teilen selbstständig und ohne die Verwendung unerlaubter Hilfsmittel angefertigt, sowie alle genutzten Hilfsmittel und Inhalte anderer Quellen explizit aufgeführt zu haben.

Bielefeld, den 30.09.2015

Armin Grundmann

Gutachter

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Dipl.-Phys. Roland Hillmann

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	5
2.1	Helium-Ionen-Mikroskopie	5
2.2	Leitwert von Nanopipetten	7
2.3	Coulter-Counter	9
3	Material und Methoden	13
3.1	Herstellen der Nanopipetten	13
3.2	Abbilden mit dem Helium-Ionen-Mikroskop	18
3.3	Messen des elektrischen Leitwertes	20
4	Ergebnisse und Auswertung	27
4.1	Verfeinerung der Methodik	27
4.2	Variation der Zugparameter	31
4.3	Reduktion der Porendurchmesser	36
4.4	Ionenflusseexperimente und Leitwerte	41
5	Zusammenfassung und Ausblick	47
	Literatur	51
	Danksagung	53

1 Einleitung

Der Nachweis und die Charakterisierung von Partikeln mit mikroskopischen oder nanoskopischen Durchmessern ist für viele Bereiche der modernen Wissenschaft von großem Interesse. Besonders bei der Untersuchung biologischer Proben ist oft schon die bloße Anzahl von Partikeln in einer bestimmten Umgebung eine wichtige Information. So kann das Zählen von Bakterien zur Bestimmung der Trinkwasserqualität dienen [1] und die Konzentration von Proteinmolekülen in Zellen tiefere Einblicke intrazelluläre Prozesse liefern [2]. Das Zählen von Proteinuntereinheiten in Biomembranen [3] oder die Bestimmung von DNA-Konzentrationen [4, 5] sind weitere Beispiele. Anwendungen dieser Art, insbesondere im Umgang mit DNA oder Viren, sind auch für die medizinische Forschung von großem Interesse [4–7].

Neben den verschiedenen Mikroskopieverfahren, die fast immer ein Markieren der zu zählenden Partikel voraussetzen, existieren auch markerfreie Methoden, wie der 1953 von W. H. Coulter vorgestellte Coulter-Counter [7–9]. Bei dieser Methode werden Partikel als Teil einer Salzlösung in zwei Reservoirs gefüllt, die über eine Öffnung miteinander verbunden sind. Die Öffnung soll dabei nur unwesentlich größer sein als die Partikel. Wird zwischen den Reservoirs eine elektrische Spannung angelegt, fließt zwischen ihnen ein Ionenstrom durch die Öffnung. Durchdringt ein Partikel die Öffnung, verändert sich der Ionenstrom kurzzeitig. Da jedes Partikel genau einen Ausschlag im Strom bewirkt, kann auf diese Weise ihre die Anzahl bestimmt werden. Die Methoden, die Partikel durch die Öffnung zu bewegen, können je nach Anwendung variieren, wobei zum Beispiel ein hydrodynamischer Druck oder ein elektrisches Potential zum Einsatz kommen [9, 10].

Um einzelne Nanopartikel wie Proteine oder DNA-Moleküle detektieren zu können, sind besonders kleine Öffnungen nötig, da das Verhältnis der Partikeldurchmesser zur Öffnung annähernd proportional zur Stärke der Stromänderung ist [9]. Anschaulich gilt, dass ein Partikel den Ionenfluss umso stärker beeinflusst, je mehr Fläche der Öffnung es beim Durchtritt in Anspruch nimmt. Eine gängige Variante einer solchen Öffnung sind Festkörpernanoporen. Sie können in Graphenschichten [11] oder vergleichbar dünn-schichtigen Materialien [12, 13] erzeugt und schon in vielen Anwendungen für Coulter-Counter verwendet werden [11, 13]. Eine weitere Möglich-

1 Einleitung

keit, derart kleine Poren zu realisieren, ist die Verwendung von biologischen Poren, wie Membranproteinen [7].

Nanopipetten stellen eine interessante Alternative zu den genannten Möglichkeiten dar. Sie können oft vergleichsweise kosteneffizient und ohne viel Aufwand aus Glas hergestellt werden, sind robust und vielseitig anwendbar [14]. Nanopipetten aus Glas sind in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt und es gibt bereits diverse Berichte über ihre erfolgreiche Verwendung in Coulter-Countern [10, 14–16]. Sie sind jedoch nicht auf den Einsatz in Coulter-Countern beschränkt und finden beispielsweise auch Anwendung in Untersuchungen von Ionentransporten an Übergängen flüssiger Medien [17] oder als Bestandteil von Mikrofluidik-Strukturen [18, 19].

In dieser Arbeit sollen, auf Basis der von Steinbock et al. [10] vorgeschlagenen Methoden und Parameter, Nanopipetten hergestellt und untersucht werden, die möglichst kleine Öffnungen haben, sodass sie sich für Coulter-Counter Experimente mit DNA-Molekülen eignen. Dazu sollen die Herstellungsmethoden im Rahmen der lokalen Laborbedingungen verfeinert und die hergestellten Pipetten charakterisiert werden. Zur Charakterisierung werden die Pipetten mit dem Helium-Ionen-Mikroskop abgebildet und aus den Aufnahmen der Durchmesser ihrer Pore bestimmt. Zudem sollen die Pipetten in ersten Ionenflussexperimenten auf ihren elektrolytischen Leitwert untersucht werden. Die erzielten Ergebnisse werden dann mit den Ergebnissen von Steinbock et al. [10] und einem einfachen theoretischen Modell verglichen.

Es wird sich zudem zeigen, dass es möglich ist, die Nanopipetten mithilfe des Helium-Ionen-Mikroskops zu bearbeiten, wodurch noch kleinere Porendurchmesser erzielt werden können. Dies eröffnet ähnliche Möglichkeiten wie die in einer neueren Veröffentlichung von Steinbock et al. [14] vorgestellte Methode zur Reduktion des Porendurchmessers mit einem Rasterelektronenmikroskop.

In den folgenden Kapiteln sollen die Inhalte dieser Arbeit vorgestellt werden. Kapitel 2: Grundlagen, gibt einen kurzen Überblick über die Helium-Ionen-Mikroskopie, das verwendete einfache Modell zur theoretischen Beschreibung des Pipettenleitwertes und Translationsexperimente mit dem Coulter-Counter. In Kapitel 3: Material und Methoden, wird im Detail auf die einzelnen Methoden eingegangen, die zum Herstellen, Abbilden, Manipulieren und elektrolytischen Vermessen der Nanopipetten zum Einsatz gekommen sind. Zudem wird eine Übersicht über die verwendeten Geräte, Materialien und Software gegeben. Im Anschluss werden in Kapitel 4: Ergebnisse und Auswertung, die experimentellen Ergebnisse präsentiert und diskutiert. Dabei wird im Einzelnen auf die Anpassung der Methoden an die experimentellen Umstände, die hergestellten und abgebildeten Nanopipetten, die Modifikation der Pipetten

mit dem Helium-Ionen-Mikroskop und die Ergebnisse der Leitwertmessungen eingegangen. Abschließend werden in Kapitel 5: Zusammenfassung und Ausblick, die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst und ein kurzer Ausblick gegeben.

2 Grundlagen

Bevor in den folgenden Kapiteln auf die Methoden und Ergebnisse dieser Arbeit eingegangen wird, soll zunächst ein kurzer Überblick über einige methodische und physikalische Hintergründe gegeben werden. Im Speziellen wird dabei das Arbeitsprinzip eines Helium-Ionen-Mikroskops erläutert, ein einfaches Modell zur Berechnung des elektrolytischen Leitwertes einer Nanopipette besprochen und der Coulter-Counter vorgestellt, der diese Arbeit motiviert.

2.1 Helium-Ionen-Mikroskopie

Die Helium-Ionen-Mikroskopie ist ein bildgebendes Verfahren zur hochauflösenden Abbildung von Oberflächen. Ähnlich wie bei der bekannteren Rasterelektronenmikroskopie wird die abzubildende Oberfläche mit einem geladenen Partikelstrahl abgerastert, wobei aus den Daten der einzelnen Positionen Bildpunkte errechnet und zu einer Abbildung der Oberfläche zusammengesetzt werden. Anstelle von Elektronen verwendet ein Helium-Ionen-Mikroskop (HIM) jedoch einfach positiv geladene Helium-Ionen. In diesem Abschnitt soll kurz die Funktionsweise eines HIM vorgestellt werden.

Um einen Partikelstrahl aus Helium-Ionen zu erzeugen, wird in einer Heliumatmosphäre ein elektrisches Feld zwischen einer trigonal zulaufenden Elektrode und der Probe gebildet, das an der im Idealfall dreiatomigen Elektrodenspitze Feldstärken von bis zu 4 V/\AA [20] erreichen kann. Durch das starke elektrische Feld werden die Heliumatome ladungspolarisiert und zur Elektrode gezogen. Unterhalb eines kritischen Abstandes können Elektronen in die Elektrode tunneln, wodurch die Heliumatome ionisiert und von der positiv geladenen Elektrode in Richtung der Probe beschleunigt werden.

Wie in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt, erzeugt dabei jedes Atom der Elektrodenspitze einen separaten Ionenstrom [20], von denen einer über eine elektrische Optik aufgefangen und die anderen abgelenkt werden. Besonders feine Elektrodenspitzen können demnach besonders starke Ionenströme erzeugen, da weniger Energie in ungenutzten Ionenströmen verloren geht. Die elektrische Optik, bestehend u.a.

2 Grundlagen

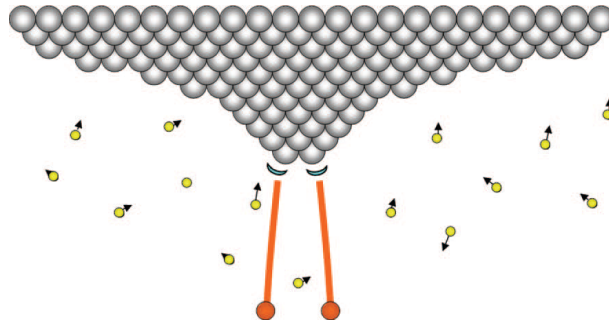


ABBILDUNG 2.1: Schematische Darstellung der Spitze der Beschleunigungskathode eines HIM. Die freien Heliumatome werden an der Spitze ionisiert und gerichtet abgestoßen. (Quelle: Ward et al. [20])

aus elektrostatischen Linsen, Quadrupolen und Oktopolen [21], fokussiert den ausgewählten Ionenstrahl dann auf die Probe. Dabei können einige Parameter dieser Optik konfiguriert werden, darunter auch eine Blende. Durch die Wahl einer großen Blende kann auf Kosten des Auflösungsvermögens die Ionenstromstärke gesteigert werden.

Die Kollisionen der Helium-Ionen mit der Probe führen zu einer Emission von Elektronen aus ihrer Oberfläche, den sogenannten Sekundärelektronen. Das HIM kann diese Emissionen detektieren und aus ihnen eine Abbildung der Oberfläche konstruieren. Für eine genauere Beschreibung dieses Vorganges und weitere mögliche Bildgebungsverfahren mit dem HIM sei an dieser Stelle auf die Literatur [20–22] verwiesen.

Durch das Auslösen der Sekundärelektronen aus der Oberfläche kann es vorkommen, dass diese sich elektrostatisch auflädt und ihre Fähigkeit, weitere Elektronen zu emittieren, stark eingeschränkt wird. Dies geschieht besonders bei nicht leitenden Proben und führt zu einer starken Einbuße im Kontrast und Auflösungsvermögen. In einem elektrisch leitenden Material bleibt dies aus, da die Elektronen dort über die Probenhalterung nachfließen können. Um diesem Effekt bei nicht leitenden Materialien entgegenzuwirken, kann über eine sogenannte Flood Gun nach jedem Rastervorgang die Oberfläche mit einem Elektronenstrahl abgerastert werden, um die Ladungsverluste auszugleichen.

Das Auflösungsvermögen eines Mikroskops ist bekanntermaßen direkt proportional zur Wellenlänge der verwendeten Strahlung oder Teilchen: Je kleiner die Wellenlänge desto feinere Strukturen können abgebildet werden. Da ein Helium-Ion wiederum als Materiewelle nach de Broglie eine Wellenlänge proportional zum Kehrwert seiner Energie hat, ist das Auflösungsvermögen eines HIM theoretisch unbegrenzt. In der Praxis bewirken jedoch Limitierungen der Optiken und der maximal möglichen

Beschleunigungsspannung einen Grenzwert, der sich je nach Aufbau unterscheiden kann und auf bis zu 0,25 nm vorhergesagt wird [20, 22].

2.2 Leitwert von Nanopipetten

Der elektrische Leitwert beschreibt als Kehrwert des Widerstandes die Fähigkeit eines Objektes, den elektrischen Strom zu leiten. Je höher der Leitwert G , desto geringer ist der Widerstand und desto stärker ist der zu einer bestimmten Spannung U fließende Strom I ; es gilt $G = \frac{I}{U}$. Der elektrische Widerstand eines Leiters steht in direktem Zusammenhang mit seinem Material und seiner Geometrie. Dadurch ist es unter anderem möglich, bei bekanntem Material durch die experimentelle Bestimmung des Leitwertes Rückschlüsse auf seine Maße zu erhalten, oder aus der Kenntnis seiner Geometrie Vorhersagen für den Leitwert zu treffen. Letzteres soll in dieser Arbeit als Kontrolle von elektrolytischen Messungen von Leitwerten genutzt werden.

Eine Betrachtung der elektrischen Eigenschaften der Nanopipetten selbst ist jedoch in der Regel nicht sinnvoll, da sie zumeist aus Glas hergestellt werden und entsprechend stark isolierend wirken. Stattdessen werden die elektrischen Eigenschaften des Füllmediums untersucht, wenn die Pipette mit einem leitenden Material, wie beispielsweise einer ionenhaltigen Flüssigkeit gefüllt ist. Im Folgenden ist mit dem Leitwert einer Nanopipette also eigentlich der Leitwert ihres Füllmediums gemeint.

Für einen homogenen Leiter berechnet sich der elektrische Widerstand R aus seiner elektrischen Leitfähigkeit σ , seiner Querschnittsfläche A und seiner Länge l über [23]

$$R = \frac{1}{\sigma} \int_0^l dz \frac{1}{A^2(z)}. \quad (2.1)$$

Durch entsprechendes Einsetzen eines geeigneten Verlaufes von $A(z)$ vereinfacht sich dies für einen Leiter mit konstantem Querschnitt zu $R = \frac{l}{\sigma A^2}$ und für einen kegelförmigen Leiter, mit einer linearen Zunahme seines Querschnitts zwischen der Grundfläche A_0 und der Deckfläche A_1 zu $R = \frac{l}{\sigma A_0 A_1}$.

Als erste Näherung für den elektrischen Widerstand einer Nanopipette kann diese als ein System von zwei in Reihe geschalteten Leitern betrachtet werden, von denen einer die Form eines Zylinders mit einem Widerstand R_z und der andere die Form eines Kegelstumpfes mit einem Widerstand R_k hat. Für eine Nanopipette mit der Länge

2 Grundlagen

l , dem Innendurchmesser d , dem Porendurchmesser d_p und einer Spitze der Länge l_s , ergibt sich der Widerstand somit als

$$R = R_z + R_k = \frac{4}{\pi\sigma d} \left(\frac{l-l_s}{d} + \frac{l_s}{d_p} \right), \quad (2.2)$$

wobei σ die elektrische Leitfähigkeit des Füllmediums beschreibt. Eine bessere Näherung erhält man, wenn genauere Informationen über den Verlauf der konischen Spitze bekannt sind und entsprechend ein genauerer Term für $A(z)$ aufgestellt werden kann. Die Näherung (2.2) soll im Rahmen dieser Arbeit jedoch genügen.

Für eine tatsächliche Messung des Leitwertes müssen noch die Widerstände des leitenden Mediums zwischen den Enden der Pipette und den Messelektroden berücksichtigt werden. Diese können als quaderförmige Leiter angesehen werden, deren Querschnittsfläche sich aus der Breite b des Flüssigkeitsreservoirs und dessen Füllhöhe h errechnet und dessen Länge der Abstand r der jeweiligen Elektrode zur Pipette ist. Daraus ergibt sich für den Widerstand $R = \frac{r}{\sigma bh}$. Unter der Annahme, dass sich beide Elektroden im gleichen Abstand r zur Pipette befinden, gilt für das gesamte System somit

$$R = \frac{4}{\pi\sigma d} \left(\frac{l-l_s}{d} + \frac{l_s}{d_p} \right) + \frac{2r}{\sigma bh}. \quad (2.3)$$

Bei Nanopipetten ist der Durchmesser d_p der Pore in der Regel um mehr als drei Größenordnungen kleiner¹ als der Durchmesser d der restlichen Pipette, wodurch im Modell (2.3) der Term $\frac{l-l_s}{d}$ gegenüber dem Term $\frac{l_s}{d_p}$ verschwindet, und somit vernachlässigt werden kann. Ähnliches gilt bei Reservoirs mit Abmessungen im Millimeterbereich, wie sie hier verwendet werden, auch für das Produkt bh und entsprechend den Term $\frac{2r}{\sigma bh}$. Dadurch vereinfacht sich das Modell für den elektrischen Leitwert einer Nanopipette zu (vgl. [10])

$$G = \frac{\pi\sigma d d_p}{4l_s}. \quad (2.4)$$

Untersuchungen an Festkörperporen [13] haben gezeigt, dass Eigenschaften wie die Geometrie und die Oberflächenladung einer Nanopore ihren Strom-Spannungs-Verlauf signifikant beeinflussen können. Effekte dieser Art werden von dem Modell (2.4) nicht berücksichtigt. Eine signifikante Konsequenz ist eine zum Teil deutliche

¹ In dieser Arbeit werden Pipetten mit einem Innendurchmesser von 0,3 mm verwendet, bei Porengrößen von 200 nm und kleiner.

Abweichung zwischen den Leitwerten einer Pore, die bei positiven und bei negativen Spannungen gemessen werden.

2.3 Coulter-Counter

Als Coulter-Counter wird ein Aufbau bezeichnet, mit dem es möglich ist einzelne, in einem flüssigen Medium gelöste Partikel, wie zum Beispiel Makromoleküle, beim Durchtritt durch eine Pore elektrisch zu detektieren. Dieses Messkonzept wurde erstmals von Wallace H. Coulter beschrieben [8] und hat seit dem vielfältig Anwendung gefunden. Eine zentrale Problemstellung bei diesem Verfahren ist die elektrische Detektion des Durchtritts [9].

Dies kann dadurch umgesetzt werden, dass ein Ionenstrom durch die Pore geleitet wird, der von einem während des gesamten Experimentes konstant bleibenden elektrischen Potential getrieben wird [7, 10, 14]. Beim Durchtritt eines Partikels durch die Pore wird dieser Strom dann für einen kurzen Moment verändert. Misst man den Ionenstrom über den Verlauf des Experimentes hinweg, kann man jeden Durchtritt eines Partikels durch die Pore anhand eines Ausschlags in den zeitaufgelösten Stromdaten erkennen.

Der elektrische Widerstand eines Leiters ist bekanntermaßen abhängig von dessen Querschnittsfläche. Befindet sich ein Partikel in der Pore, überdeckt dieses durch seine Ausdehnung teilweise deren Querschnittsfläche und führt somit zu einer Zunahme ihres Widerstandes. Solange sich das Partikel also in der Pore befindet, wird der Ionenfluss gestört und der gemessene Strom sinkt. Es lässt sich ein theoretisches Modell formulieren, das die Widerstandsänderung der Pore in Abhängigkeit ihres Durchmessers D und des Durchmessers des Partikels d beschreibt als [9]

$$\Delta R = \frac{4}{\pi\sigma} \frac{1}{D} \left[\frac{\arcsin(d/D)}{\sqrt{1-(d/D)^2}} - \frac{d}{D} \right] \quad (2.5)$$

wobei σ die Leitfähigkeit der Ionen ist, bzw. der Lösung, die diese enthält. Um die Abhängigkeiten von den einzelnen Parametern hervorgehoben, kann dieser Zusammenhang auch wie folgt als Reihenentwicklung dargestellt werden [9]:

$$\Delta R = \frac{8}{3\pi\sigma D} \left(\frac{d}{D} \right)^3 \left[1 + \frac{4}{5} \left(\frac{d}{D} \right)^2 + \frac{24}{35} \left(\frac{d}{D} \right)^4 + \frac{169}{280} \left(\frac{d}{D} \right)^6 + \dots \right]. \quad (2.6)$$

2 Grundlagen

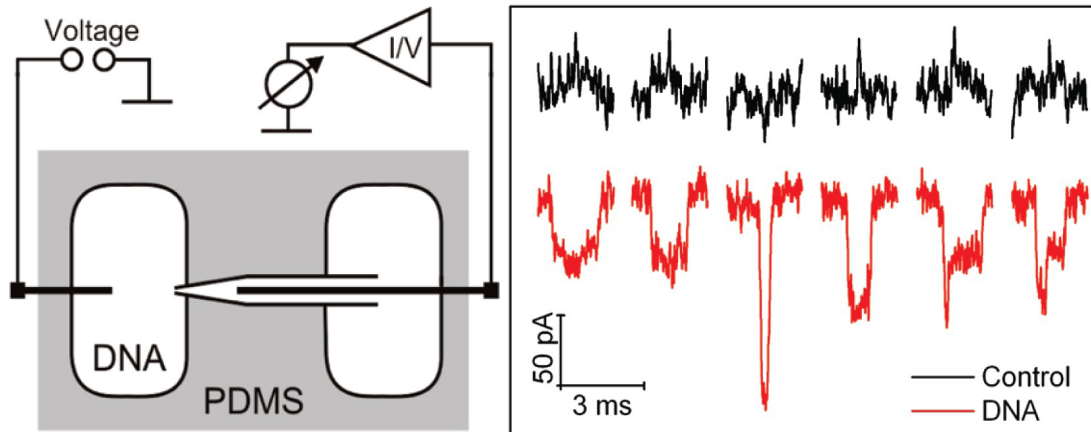


ABBILDUNG 2.2: (links) Skizze eines Coulter-Counter Setups für die Detektion von DNA-Molekülen mit Nanopipetten. Eine Nanopipette verbindet zwei mit KCl-haltiger Pufferlösung befüllte Reservoirs, von denen eines zusätzlich DNA enthält. Über zwei Elektroden wird eine Spannung angelegt und über ein Amperemeter der Strom gemessen. (rechts) Beispielhafte Graphen einer Strommessung ohne (schwarz) und mit DNA (rot). Die Messung mit DNA zeigt die charakteristischen Stromtäler, die in der Kontrollmessung (Control) nicht zu erkennen sind. (Quelle: Steinbock et al. [10])

Um die Detektion von Partikeln nach diesem Prinzip zu vereinfachen ist es von Vorteil, wenn sie beim Durchtritt eine große Veränderung in der Stromstärke erzeugen, was gleichermaßen bedeutet, dass sie eine große Änderung des Porenwiderstandes bewirken. Diese hängt dabei im Wesentlichen vom Verhältnis $\frac{d}{D}$ des Partikeldurchmessers zum Porendurchmesser ab. Je größer die Pore im Vergleich zu den Partikeln, desto geringer ist die Änderung im Widerstand. Im besten Fall wählt man also die Pore nur unwesentlich größer als die Partikel. Beachten sollte man dabei jedoch, dass kleine Poren bei hohen Partikelkonzentrationen auch leicht verstopfen können.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Nanopipetten herzustellen, die für die Verwendung in Coulter-Counter Experimenten für DNA-Moleküle genutzt werden können. Abbildung 2.2 gibt einen Überblick über einen entsprechenden Aufbau und mögliche Ergebnisse. DNA-Moleküle können stark vereinfacht als Zylinder aufgefasst werden, mit einem Querschnittsdurchmesser von etwa 2 nm [24, S. 343]. Um diese zu detektieren bedarf es also einer Pore mit ebenfalls einem Durchmesser im unteren Nanometerbereich. Es wurde bereits gezeigt [10], dass eine Detektion mit einer 45 nm Pore möglich ist und in 0,5 M Kaliumchlorid-Pufferlösung zu Stromeinbrüchen um die 50 pA führen. Aus dem mit (2.6) beschriebenen Zusammenhang wird deutlich, dass bereits eine Verdopplung dieses Durchmessers auf knapp 100 nm ein Absinken dieser Stromänderung auf grob 5 pA zur Folge hätte, was bei der in dieser Arbeit verwendete-

ten Ausrüstung (vgl. Tabelle 3.1) schon nicht mehr von statistischem Rauschen zu unterscheiden wäre.

Für geladene Partikel wie DNA ist die Änderung des Ionenstroms beim Durchtritt durch eine Pore abhängig von der Konzentration der Ionen im Medium und kann bei Konzentrationen von unter 0,4 M sogar zu einem Anstieg der Stromstärke führen [25]. Hierbei handelt es sich um einen annähernd linearen Zusammenhang, was ebenfalls bedeutet, dass eine Erhöhung der Ionenkonzentration auch ein stärkeres Absinken des Stroms zur Folge hat. Für einen Puffer mit 1 M Salzgehalt, wie in dieser Arbeit verwendet, wäre es demnach denkbar, dass auch mit einer 100 nm Pore DNA-Moleküle noch detektiert werden können.

Aus diesen Überlegungen ergibt sich die Zielsetzung, Pipetten mit Poren von unter 100 nm herstellen zu können.

3 Material und Methoden

In diesem Kapitel sollen die Methoden vorgestellt werden die verwendet wurden, um die Ziele dieser Arbeit umzusetzen. Zudem findet sich in den Tabellen 3.1, 3.2 und 3.3 eine Auflistung der verwendeten Geräte, Materialien und Software. Die Methoden gliedern sich in die Herstellung der Nanopipetten, das Abbilden und Modifizieren der Pipetten mit dem Helium-Ionen-Mikroskop, und das Ermitteln ihres elektrischen Leitwertes. Einige der beschriebenen Verfahren wurden erst im Laufe der Experimente zu ihrem endgültigen Stand verfeinert. Dieser Prozess wird in Abschnitt 4.1 ausführlicher diskutiert.

3.1 Herstellen der Nanopipetten

Die in dieser Arbeit hergestellten Nanopipetten werden aus Quarz-Glaskapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,3 mm und einem Außendurchmesser von 0,5 mm gezogen. Dabei werden sie an einer ausgewählten Stelle erhitzt und langsam auseinandergezogen, wobei sie sich unter dem anhaltenden Zug, bedingt durch die zunehmende Erweichung des Glases, verdünnen und sich schließlich vollständig trennen. Es entstehen zwei Pipetten mit theoretisch identischen Spitzen. Da bereits kleine Unregelmäßigkeiten beim Erwärmen oder Ziehen der Kapillare das Ergebnis empfindlich beeinflussen können, wird ein laserbasierter Mikropipettenzieher verwendet, der über definierte Parameter gesteuert werden kann und unter deren Einbehaltung theoretisch perfekt reproduzierbare Ergebnisse liefert [26].

In der Praxis unterliegen diese Ergebnisse jedoch statistischen sowie systematischen Schwankungen, die aber dennoch eine deutliche Verbesserung gegenüber dem manuellen Ziehen darstellen. Mikropipettenzieher zeigen zudem deutliche Abweichungen zwischen einzelnen Exemplaren, sodass Einstellungen, die bei einem Gerät zu guten Ergebnissen führen, bei einem theoretisch baugleichen Gerät deutlich schlechter funktionieren können [26]. Ein Teilgebiet dieser Arbeit ist es, Parameter für den vorhandenen Pipettenzieher zu finden, mit denen zuverlässig Pipetten mit möglichst kleinen Poren produziert werden können.

3 Material und Methoden

TABELLE 3.1: Auflistung der verwendeten Geräte

Mikropipettenzieher	Model P-2000, Sutter Instruments, USA
Helium-Ionen-Mikroskop	Orion [®] Plus, Zeiss, Deutschland / USA
Lichtmikroskope	Eclipse Ti-U, Nikon Corporation, Japan; BX51 TRF, Olympus Corporation, Japan
Patch-Clamp Amplifier	Axopatch 200B, Axon Instruments, Inc., USA
Datenschnittstellen	M3i.4831-Exp, Spectrum Systementwicklung Microelectronic GmbH, Deutschland; PCI-6052E, National Instruments Corp.
BNC-Adapter	BNC 2090, National Instruments Corp.
Sputteranlage	MED 020, Bal-Tec GmbH, Deutschland
Digitalkamera	EOS 600D, Canon Inc., Japan
Gasbrenner	MT-770s, MBFZ toolcraft GmbH, Deutschland

TABELLE 3.2: Auslistung der verwendeten Materialien und Hilfsmittel

Glaskapillaren	Quarzglas, Länge 75 mm, Außendurchmesser 0,5 mm, Wandstärke 0,1 mm, Hilgenberg GmbH, Deutschland
Aluminiumbauteile	maßgefertigt, Mechanische Werkstatt der Universität Bielefeld, Deutschland
Einmalspritzen	Inject [®] 10 ml, B. Braun Melsungen AG, Deutschland; Norm-Ject [®] 1 ml, Henke-Sass, Wolf GmbH, Deutschland
Spritzenaufsatz	MicroFil [™] , World Precision Instruments, Inc., USA
Spritzenfilter	0,2 µm Celluloseacetat Membranfilter, VWR International, LLC, USA
Petrischalen	5,5 cm, 9 cm und 14,5 cm Durchmesser, Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Objektträger	3 × 1 Zoll., IDL GmbH & Co KG, Deutschland
PDMS	Sylgard [®] 184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning Midland, USA
Reinstwasser	Milli-Q [®] , Millipore GmbH, Deutschland
Isopropanol	reinst, BDH Prolabo, VWR International S.A.S., Frankreich
Salzsäure	37 %, BDH Prolabo, VWR International S.A.S., Frankreich
Salpetersäure	65 %, Merck KGaA, Deutschland
Pufferlösung	1 M Kaliumchlorid, VWR International BVBA, Belgien; 10 mM Tris HCL, Fluka Chemie GmbH, Schweiz; Reinstwasser; pH 8; steril gefiltert
Elektroden	Ag/AgCl-Elektroden, Eigenbau

TABELLE 3.3: Auslistung der verwendeten Software

LabView	2009, 9.0.1 (32-bit), National Instruments Corp.
MatLab	7.11.0 R2010b 32-bit, MathWorks [®] , Inc.
ImageJ	1.48v, National Institutes of Health, USA

3.1 Herstellen der Nanopipetten

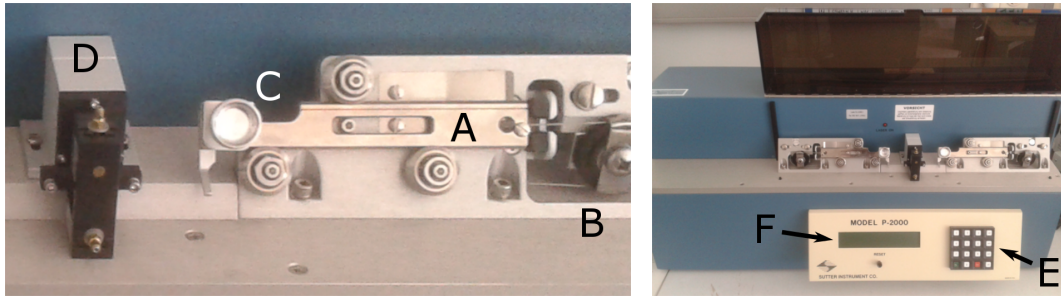


ABBILDUNG 3.1: Der P-2000 hat zwei Zugarme (A), die über Zugvorrichtungen (B) eine Kraft übertragen können. In die Halterungen der Zugarme (C) wird die Kapillare eingespannt, sodass sie den mittig zwischen den Zugarmen befindlichen Strahlengang des Lasers (D) passiert. Über das Bedienfeld (E) und das Display (F) können Einstellungen an den Zugparametern vorgenommen werden.

Der hier verwendete P-2000 Mikropipettenzieher (Abbildung 3.1) besitzt zwei Zugarme mit Haltevorrichtungen, in welche die Kapillare eingespannt wird. Ein Laser rastert dann über einen kleinen Bereich der Kapillare und erhitzt diesen gleichmäßig, wodurch das Glas der Kapillare an dieser Stelle erweicht. Durch einen konstanten Zug, der über die Zugarme auf sie ausgeübt wird, zieht sich die Kapillare auseinander, wobei sie sich in diesem Bereich verdünnt. Während dieses Vorganges wird die Geschwindigkeit gemessen mit der sich die Zugarme auseinanderbewegen und die sich durch eine stete Abnahme der Viskosität des erhitzten Glases kontinuierlich erhöht. Erreicht diese Geschwindigkeit einen bestimmten, einstellbaren Grenzwert, wird der Laser deaktiviert und es wird für eine Sekunde eine zusätzliche Kraft auf die Kapillare ausgeübt.

Der Anwender hat dabei mit den Parametern HEAT, FILAMENT, VELOCITY und PULL die Kontrolle über die Intensität des Lasers, die Größe des abgerasterten Bereichs, den Wert der Grenzgeschwindigkeit und die Stärke des abschließenden Zuges. Zudem kann über den Parameter DELAY eine Verzögerung zwischen dem Abschalten des Lasers und dem Beginn des Zuges eingestellt werden, die auch so gesetzt werden kann, dass bei Erreichen der Grenzgeschwindigkeit zunächst der Zug beginnt und der Laser erst eine bestimmte Zeit später abgeschaltet wird. Ist die Kapillare nach Beenden dieses Vorganges noch nicht getrennt, beginnt dieser von Neuem, wobei die Möglichkeit besteht, für aufeinanderfolgende Durchläufe verschiedene Parameter zu setzen. Eine vollständige Auflistung und Erläuterung der Parameter erfolgt in Tabelle 3.4.

Um Pipetten mit möglichst kleinen Poren zu produzieren, wurden in mehreren Durchläufen die Zugparameter variiert und die resultierenden Pipetten mit dem He-

TABELLE 3.4: Erläuterung der Zugparameter und des Zugprogrammes.

Ein Zugprogramm ist eine Abfolge von bis zu acht Cycles, von denen jeder einen vollständigen Durchlauf des Zugvorganges darstellt. Jeder Cycle setzt Werte für die fünf Parameter HEAT, FILAMENT, VELOCITY, DELAY und PULL[27].

HEAT	Der Heat Parameter steuert die Intensität des Lasers in ganzzahligen Schritten von 0 bis 999 in arbiträrer Einheit, wobei 0 die minimale und 999 die maximale Laserleistung bedeutet.
FILAMENT	Der Filament Parameter steuert die Scan-Länge des Lasers, d.h. die Länge des Kapillarabschnittes, der vom Laser abgerastert und so gleichmäßig erhitzt wird, in vordefinierten ganzzahligen Schritten von 0 bis 15 (siehe Tabelle 3.5).
VELOCITY	Der Velocity Parameter regelt die Geschwindigkeit der Zugarme, bei deren Erreichen mit dem Abschalten des Lasers bzw. dem Einleiten des Pulls begonnen wird, in ganzzahligen Schritten von 0 bis 255 in arbiträrer Einheit, wobei 0 die minimal und 255 die maximal einstellbare Geschwindigkeit bedeutet.
DELAY	Der Delay Parameter gibt die Zeit zwischen dem Abschalten des Lasers und dem Einleiten des Pulls an, in ganzzahligen Schritten von 0 bis 255. Dieser Wert abzüglich 128 gleicht der Wartezeit in ms, wobei negative Zeiten bedeuten, dass zunächst der Pull eingeleitet wird und erst entsprechend später der Laser abgeschaltet wird.
PULL	Der Pull Parameter steuert die Stärke des abschließenden Zuges in ganzzahligen Schritten von 0 bis 255 in arbiträrer Einheit, wobei 0 gar keine Zugkraft und 255 die maximale Zugkraft bedeutet.

TABELLE 3.5: Bedeutung der FILAMENT Werte [27]. Diese Werte sind werksseitig vorgegeben und für alle Geräte des gleichen Modells identisch. Die Einstellungen 6 bis 15 sind redundant belegt und entsprechen den Einstellungen 1 bis 5.

FILAMENT	Scan-Länge	Alternative Belegung
0	1,0 mm	-
1	1,5 mm	6, 11
2	1,9 mm	7, 12
3	4,5 mm	8, 13
4	6,5 mm	9, 14
5	8,0 mm	10, 15

TABELLE 3.6: Das Zugprogramm P01, ein Zugprogramm für Nanopipetten mit dem P-2000 von Steinbock et al. [10].

Cycle	HEAT	FIL	VEL	DEL	PULL
1	520	0	10	128	0
2	520	0	10	128	0
3	520	0	10	128	0
4	520	0	15	128	200

lium-Ionen-Mikroskop abgebildet und verglichen. Als Ausgangspunkt diente hier ein Zugprogramm (P01) (siehe Tabelle 3.6) von Steinbock et al. [10].

Mit dem Helium-Ionen-Mikroskop können nur Nanopipetten abgebildet werden, die nicht wesentlich länger als 2 cm sind (vgl. Abschnitt 3.2). Um Pipetten auf dieses Maß zu kürzen werden sie mit der Flamme eines Gasbrenners an der gewünschten Stelle erweicht und mit einer Pinzette getrennt. Dies soll verhindern, dass mechanische Resonanzen zum Verlust der feinen Spitze führen¹. Damit durch freihändige Handhabung der Pipette keine ungewollt großen Schwankungen in der erzielten Länge auftreten, wird sie in aus Aluminium gefertigte Einsätze für einen Schraubstock eingespannt. Dabei wird sie von zwei PDMS Polstern gehalten, um Beschädigungen des Glases durch den Druck des Schraubstocks vorzubeugen.

Eine alternative Methode Pipetten der gewünschten Länge zu erhalten ist die Kapillare so in den Zugarmen zu platzieren, dass eine der beiden Seiten nur wenige Millimeter in der Halterung sitzt, während die andere Seite entsprechend weit übersteht. Dieses Verfahren soll im Folgenden als asymmetrisches Ziehen bezeichnet werden. Die auf diese Weise gezogenen Pipetten haben eine Länge von etwa 2 cm und 5 cm. Die kleinere der beiden kann folglich mit dem Helium-Ionen-Mikroskop vermessen werden, während die lange Pipette erneut in den P-2000 eingespannt und zu einer zweiten 2 cm Pipette gezogen werden kann. Dabei muss diese so eingespannt werden, dass sie ihre ursprüngliche Spitze bei diesem Vorgang verliert. Es verbleibt ein Reststück mit zwei Spitzen, das nicht mehr für die weitere Produktion von Pipetten verwendet werden kann.

¹ Dieser Effekt wird umgangssprachlich auch als *Spaghetti-Effekt* bezeichnet. Dieser beschreibt, dass eine rohe Spaghettinudel immer stets an zwei Stellen gleichzeitig bricht.

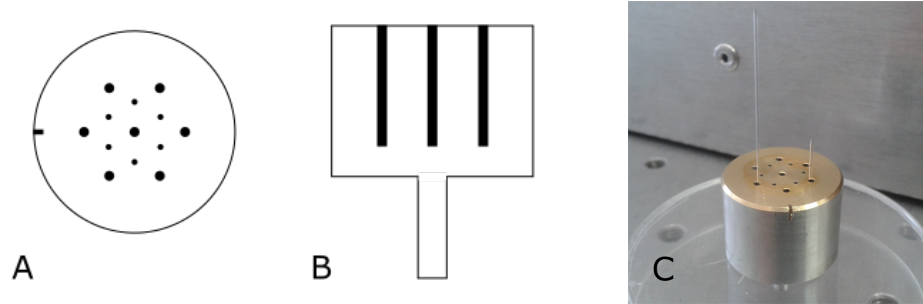


ABBILDUNG 3.2: (A) Schematische Aufsicht, (B) schematischer Querschnitt und (C) Foto des Probenhalters für die Nanopipetten im Helium-Ionen-Mikroskop. Er ist aus Aluminium gefertigt, hat einen Radius von 10 mm, eine Höhe von 15 mm und 7 Bohrungen mit je einem Durchmesser von 1 mm und einer Tiefe von 12 mm, sowie 6 Bohrungen mit jeweils einem Durchmesser von 0,6 mm und einer Tiefe von 14 mm. Die Bohrungen dienen als Halterungen für Nanopipetten. Ein Pin an der Unterseite mit einer Länge von 10 cm und einem Radius von 1,5 mm dient zur Verankerung in der Probenhalterung des HIM.

3.2 Abbilden mit dem Helium-Ionen-Mikroskop

Als bildgebendes Verfahren zur Charakterisierung der Nanopipetten dient die Helium-Ionen-Mikroskopie. Um die Pore einer Nanopipette abbilden zu können, muss diese senkrecht zur Abbildungsrichtung in der Probenkammer stehen. Durch die begrenzte Höhe der Probenkammer können nur Pipetten, deren Länge nicht deutlich über 2 cm liegt, abgebildet werden, damit sie aufrecht betrachtet werden können. Es wurde ein Probenhalter aus Aluminium konstruiert, der mit einem Pin in der Probenhalterung des Helium-Ionen-Mikroskops (HIM) verankert werden kann (Abbildung 3.2). Sieben senkrechte Bohrungen bieten dabei Halt für jeweils eine Pipette. Der vergleichsweise große Bohrdurchmesser von 1 mm wurde gewählt, um die Wahrscheinlichkeit des Abbrechens einer manuell gekürzten Pipette aufgrund abstehender Reste (vgl. Abschnitt 3.1) zu reduzieren. Dies führt jedoch auch zu einer erhöhten Mobilität von weniger sperrigen Pipetten und kann somit Schwierigkeiten beim Abbildevorgang verursachen. Um dem etwas entgegenzuwirken, wurden nach Einführung des asymmetrischen Zugvorganges sechs weitere Bohrungen mit 0,6 mm hinzugefügt. Durch den Probenhalter ist es möglich, mehrere Pipetten in einem Durchgang in die Probenkammer des HIM zu führen, sodass diese direkt hintereinander abgebildet werden können, ohne dass jede einzelne den zeitaufwändigen Prozess des Ein- und Ausführens von Proben beim HIM durchlaufen muss.

Zur Verbesserung des Bildkontrastes mit dem HIM können die Pipetten mit einer etwa 15 nm dicken Goldschicht bedampft werden. Dazu wird eine Sputteranlage

3.2 Abbilden mit dem Helium-Ionen-Mikroskop

verwendet, die über eine Goldelektrode um die Probe herum ein Gold-Ionen Plasma erzeugt, aus dem sich langsam eine dünne Goldschicht auf der Probe ablagert. Die Pipetten werden dabei mitsamt HIM-Probenhalter in die Sputteranlage gesetzt, sodass sie aufrecht gehalten werden und die Goldschicht direkt auf die Spitze aufwächst. Die gleichmäßig auf die Spitzen der Pipetten aufgetragene Goldschicht erhält die Form der Pipette, kann als Metall jedoch die durch den Ausstoß der Sekundärelektronen entstehende Oberflächenladung besser verteilen, wodurch ein deutlich höherer Kontrast erzielt wird (vgl. Kapitel 4.2).

Die Messergebnisse des HIM liegen zunächst als Bildaufzeichnungen im TIFF-Format vor, mit einer Auflösung von 512 oder 1024 Pixeln², inklusive einiger Parameter und Rahmenwerte. Diese umfassen die Rahmenmaße des abgebildeten Bereiches (*Field of View*), die angelegte Beschleunigungsspannung der Helium-Ionen (*Acceleration V*), die Belichtungszeit (*Dwell Time*), den Neigungswinkel der Probenhalterung (*Tilt Angle*), den Abstand der Probenhalterung vom letzten mechanischen Bauelement im Strahlengang (*Working Dist*), den Ionenstrom (*Blanker Current*), Art und Umfang etwaiger Bildmittelungen (*Frame/Line/- Averaging*) und den Maßstab. Mithilfe des Programmes ImageJ werden diese Bilder dann gemäß des enthaltenen Maßstabs skaliert und die Porendurchmesser manuell bestimmt, indem eine Maßlinie in das Bild gelegt wird. Dabei muss beachtet werden, den Abstand mit der geringsten perspektivischen Verzerrung zu wählen. Die ermittelten Durchmesser werden dann in tabellarischer Form digital verwaltet und statistisch ausgewertet.

Möchte man das HIM benutzen um den Porendurchmesser einer Pipette zu reduzieren, kann man diese für einige Minuten konstant dessen Ionenstrahl aussetzen. Die Spitze schrumpft dabei kontinuierlich zusammen und der Durchmesser der Pore wird zum Teil deutlich reduziert (vgl. Abschnitt 4.3). Voraussetzung ist jedoch, dass ein entsprechend hoher Ionenstrom erzeugt werden kann. Dazu kann es je nach Zustand der Quelle notwendig sein, die 20 µm anstelle der 10 µm Blende zu verwenden³, was jedoch ein verringertes Auflösungsvermögen zur Folge hat. In der Praxis hat sich ein Ionenstrom von etwa 1 pA bewährt.

² Die Wahl der Auflösung erfolgte für jede Aufnahme individuell unter Berücksichtigung der Umstände. Aufnahmen mit höherer Auflösung benötigen eine längere Belichtungszeit, was zu ungewollter Modifikation der Pipette führen kann und mehr Zeit in Anspruch nimmt.

³ Das Orion Plus HIM hat Blenden mit Öffnungen von 5 µm, 10 µm und 20 µm.

3.3 Messen des elektrischen Leitwertes

Um den elektrischen Leitwert der Pore einer Nanopipette zu bestimmen, wird der Strom gemessen, der über einen Ionenfluss durch sie hindurch geleitet werden kann. Dazu wird die Pipette in eine Flusszelle eingebaut, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde und so konstruiert ist, dass die Pipette die einzige Verbindung zwischen zwei ansonsten gegeneinander abgeschlossenen Flüssigkeitsreservoirien darstellt. Die Pipette und die beiden Reservoirie werden mit einer ionenhaltigen Pufferlösung befüllt und zwei Elektroden in die Reservoirie gehalten. Die angelegte Spannung und die resultierende Stromstärke werden dann protokolliert.

Zur Herstellung der Flusszellen muss zunächst PDMS angerührt werden. Dazu werden 10 ml des Rohpolymers mit einer Einmalspritze in eine Petrischale gefüllt und anschließend mit einer zweiten Einmalspritze 1 ml des Entwicklers beigegeben. Das PDMS wird dann für etwa 30 min im Exsikkator entgast und danach in die Aluminiumgussform für die Flusszelle gefüllt. Diese wird zur Förderung des Aushärtungsprozesses, der bei Raumtemperatur mehrere Tage dauern kann, in einem Ofen bei 85 °C für mindestens 90 min erhitzt⁴, bis das PDMS vollständig ausgehärtet ist. Im Anschluss wird das ausgehärtete PDMS aus der Gussform genommen, mit dem Skalpell von überstehenden Rändern befreit und dann auf einen sauberen Objektträger gedrückt, damit die Flusszelle während der Experimente unkompliziert unter einem Lichtmikroskop betrachtet werden kann. Zum Einbau einer Pipette wird diese in den Kanal der Flusszelle gelegt und mit PDMS umgossen, woraufhin das ganze erneut bei 85 °C für mindestens 30 min im Ofen ausgehärtet wird.

Abbildung 3.3 zeigt die Gussform, sowie eine schematische Darstellung der Flusszelle. Im Laufe der Arbeit ist das Design der Flusszelle mehrfach modifiziert worden, um den Herstellungsprozess zu vereinfachen und sie den Änderungen der Pipettenlänge anzupassen. Im ursprünglichen Design haben die Reservoirie eine Länge und Breite von jeweils 12 mm, eine Tiefe von 4 mm und sind durch einen 26 mm langen Kanal mit einander verbunden. Nach der Umstellung auf kürzere Nanopipetten wurde die Flusszelle verändert, indem der Kanal auf 10 mm verkürzt wurde, um die kürzeren Kapillaren verwenden zu können. Zudem wurde die Form der Reservoirie modifiziert, um zu verhindern, dass sie beim Herausnehmen aus der Gussform einreißen. Eine zusätzliche quadratische Vertiefung, die zwischen ihnen über dem Kanal eingefügt wurde, soll durch Verwendung eines ebenfalls aus PDMS gegossenen Deckels die Menge an PDMS reduzieren, die für das Abdichten des Kanals benötigt wird. Durch

⁴ In den meisten Fällen wurde das PDMS 3 h im Ofen gelassen. Wie sich herausstellte, sind 90 min jedoch ebenfalls ausreichend.

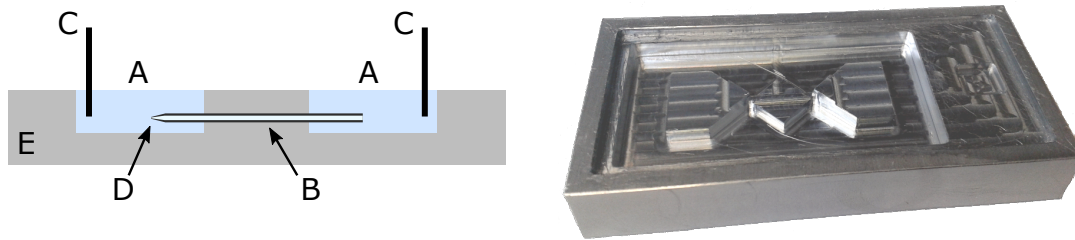


ABBILDUNG 3.3: (links) Schematische Darstellung einer Flusszelle. Sie besteht aus zwei Reservoiren (A), die über die Nanopipette (B) miteinander verbunden sind. Über Elektroden (C) in den Reservoiren wird ein Ionenfluss gemessen, der durch sterische Blockaden, wie große Moleküle, an der Pipettenspitze (D) unterbrochen werden kann. Der Rumpf (E) der Flusszelle besteht aus PDMS. (rechts) Fotografie einer Gussform aus Aluminium mit ausgehärteter PDMS-Füllung. Die Vertiefung am rechten Rand erzeugt einen Deckel, der beim Zusammenbau der Flusszelle das Abdichten des Kanals erleichtert.

die Änderungen an der Flusszelle hat sich die Grundfläche der Reservoir gegenüber dem ursprünglichen Design um ein Viertel von 144 cm^2 auf 108 cm^2 reduziert.

Soll eine Pipette, die zuvor für das HIM mit Gold beschichtet wurde, in eine Flusszelle eingesetzt werden, muss dieses zunächst wieder abgelöst werden. Dazu wird die Pipette für einige Sekunden in Königswasser⁵ getaucht, bis die typische Grünfärbung durch die Goldschicht nicht mehr zu erkennen ist, und abschließend gründlich mit Wasser gespült.

Die Reservoirs und die Pipette werden mit einem Kaliumchlorid-Puffer befüllt, der zuvor entgast und durch einen Celluloseacetat Membranfilter gefiltert wurde. Da bereits eine einzige Luftblase den Ionenstrom durch die Pipette stark beeinträchtigen oder sogar vollständig unterbrechen kann, ist es bei diesem Vorgang besonders wichtig, dass die befüllte Pipette frei von Lufteinschlüssen ist. Auch Verunreinigungen können eine Pipette verstopfen und müssen ebenfalls vermieden werden. Die zusammengebaute Flusszelle wird zunächst mit Isopropanol befüllt und für wenige Minuten im Exsikkator bei Unterdruck von bis zu $0,2 \text{ mbar}$ entlüftet, sodass die Luft aus der Pipette gezogen wird und diese sich mit Isopropanol füllt. Es verbleibt eine Luftblase in der Nähe der Spitze, die sich innerhalb weniger Minuten durch die Flüchtigkeit des Isopropanols auflöst, wodurch die Pipette dann homogen mit Isopropanol befüllt ist. Im Anschluss wird das Isopropanol wieder aus den Reservoiren entfernt und gegen die Pufferlösung ausgetauscht. Das verbleibende Isopropanol aus der Pipette ver-

⁵ Ein Gemisch aus einem Teil 65 %-iger Salpetersäure und drei Teilen 37 %-iger Salzsäure.

3 Material und Methoden

mischt sich mit der Pufferlösung und kann aufgrund seiner geringen Konzentration schließlich vernachlässigt werden.

Eine alternative Befüllmethode, die gegen Ende dieser Arbeit gefunden wurde, verzichtet auf das Isopropanol. Für dieses Vorgehen werden beide Reservoirs der Flusszelle direkt mit der Pufferlösung befüllt und dann im Exsikkator über 30 bis 40 min entlüftet. Dabei muss jedoch darauf geachtet werden, dass der Druck nicht zu weit gesenkt wird, damit das Wasser nicht verdampft. Ein gutes Anzeichen für den richtigen Druck ist, wenn das Wasser der Lösung beginnt, größere Blasen zu bilden, aber noch nicht siedet. Die nach dieser Prozedur in der Pipette verbleibenden Luftblasen lösen sich dann in der Regel innerhalb eines Tages auf und die Pipette verbleibt homogen befüllt. Lösen sich die verbleibenden Luftblasen nicht, kann der Vorgang des Entlüftens wiederholt werden.

Der Messaufbau besteht aus einer elektromagnetisch abgeschirmten Kammer auf einem schwingungsgedämpften Labortisch, dem Axopatch 200B Patch-Clamp Amplifier, einem BNC-Adapter und einem Laborcomputer (Abbildung 3.4). In der Messkammer befinden sich zwei Ag/AgCl-Elektroden, die jeweils in eines der beiden Reservoirs der Flusszelle getaucht werden und an den Axopatch angeschlossen sind. Bei positiver Spannungsrichtung ist die porensseitige Elektrode dabei die Anode und bei negativer Spannungsrichtung die Kathode. Die Signale werden vom Laborcomputer über spezielle Messkarten erfasst. Eine Messkarte des Modells M3i.4831-Exp ist direkt mit dem Axopatch verbunden und erfasst mit 65 Megasamples pro Sekunde die gemessene Stromstärke, und eine Messkarte des Modells PCI-6052E über den BNC-Adapter mit 333 Kilosamples pro Sekunde die angelegte Spannung.

Beide Datensätze werden vom Laborcomputer mithilfe einer von Dr. Lukas Bogunovic in LabView entwickelten Software ausgegeben und protokolliert. Aufgrund technischer Limitationen werden die Messdaten dabei komprimiert, indem über eine festgelegte Anzahl an Rohdaten gemittelt wird. Dies kann ebenfalls dazu genutzt werden, um den Umfang der Messdaten zu reduzieren und die Auswertung signifikant zu beschleunigen, besonders wenn eine zeitliche Auflösung im Bereich einiger Millisekunden für die Messung ausreichend ist. Der Umfang dieser Mittelungen wird als *Binning* bezeichnet und liegt hier in der Regel bei 100 000 Datenpunkten⁶. Die resultierende Datenrate beträgt 650 Datenpunkte/s. Die Auswertung dieser Daten erfolgt in MatLab über speziell für diesen Zweck geschriebene Skripte. Für frühe Messungen

⁶ Das Abspeichern von 65 Millionen Datenpunkten in der Sekunde kann vom verwendeten Computer nicht geleistet werden. Ein minimales *Binning* von 500 Datenpunkten ist nötig, um eine verlustfreie Aufzeichnung zu ermöglichen. Ein weiteres Anheben des *Binning* über diesen Wert hinaus dient der Reduktion der Datenlast.



ABBILDUNG 3.4: Fotografie des Messaufbaus für die Leitwertmessungen. Auf der linken Seite befindet sich eine schwingungs- und schallgedämpfte, lichtdicht verschließbare Messkammer. In ihrem Innenraum befindet sich eine weitere verschließbare Messkammer auf einem invertierten Lichtmikroskop, in der sich die Auflage für die Flusszellen und die Headstage des Axopatch mit den beiden Elektroden befindet. Das Lichtmikroskop und der ebenfalls abgebildete Laser sind für die hier durchgeführten Versuche nicht relevant. Auf der rechten Seite befinden sich die Messgeräte und Steuereinheiten, von denen hier der BNC-Adapter und der Axopatch (von unten nach oben, über dem Bildschirm), sowie der Laborcomputer zum Einsatz kommen.

3 Material und Methoden

wurden nur die Stromwerte aufgenommen, während die Spannungswerte manuell festgehalten und später der Auswertung beigefügt wurden.

Zur Durchführung einer Leitwertmessung wird zunächst die zusammengesetzte und befüllte Flusszelle in die Kammer des Messaufbaus gelegt und die Elektroden in den Reservoirs platziert. Zur Vermeidung von Bruch dürfen sie dabei nicht mit der Pipette in Kontakt treten. Nach Verschließen der Abschirmung und Aktivieren der Schwingungsdämpfung wird dann über den Axopatch zunächst ohne angelegte Spannung ein Offset eingestellt, sodass ein Strom von etwa 0 pA gemessen wird und anschließend die Stromstärke in Abhängigkeit der angelegten Gleichspannung gemessen.⁷

In der Datenauswertung wird zunächst sichergestellt, dass die zeitliche Skalierung der Spannungsdaten, soweit diese vorhanden sind, mit der Skalierung der Stromdaten übereinstimmt. Dazu werden die Zeitdaten der Spannungsaufnahme umskaliert, damit die letzten Einträge beider Datensätze den gleichen Zeitwert haben. Dies ist nötig, da die Zeitwerte der Datensätze jeweils aus den Datenraten der Messkarten abgeleitet werden und sich im Zuge einer Messung von mehreren Minuten eine ein- bis zweisekündige Abweichung ergeben kann. Weil beim Umschalten zwischen verschiedenen Spannungen Übergangswerte aufgenommen werden, die nicht in das Ergebnis der Messung mit einfließen sollen, müssen dann die Zeitintervalle und die zugehörigen Spannungen, die bei der Auswertung berücksichtigt werden sollen, aus den Messdaten herausgesucht und in ein Datenfeld notiert werden, damit das Skript alle Einträge aus den übrigen Daten überspringen kann.

Im Anschluss werden die beiden Datensätze anhand ihrer Zeitinformationen korreliert, sodass jedem gemessenen Stromwert ein Spannungswert zugeordnet werden kann. Durch die unterschiedlichen Datenraten der Messkarten kann es vorkommen, dass sich zu dem exakten Zeitwert eines Stromwertes kein gemessener Spannungswert findet. In diesem Fall wird dieser aus den beiden zeitlich benachbarten Spannungswerten gemittelt. Aus allen Datenpunkten mit Spannungswerten hinreichend nahe Null⁸ wird über einen linearen Fit die systematische Abweichung der Stromwerte ermittelt und aus den Stromdaten herausgerechnet. Die Verwendung eines linearen Fits anstelle der Annahme einer konstanten Abweichung folgt dabei aus der Beobachtung, dass alle Flusszellen ohne angelegte Spannung einen steigenden oder fallenden Stromverlauf gezeigt haben, der die Ergebnisse verfälschen würde.

⁷ Das Anlegen der Spannung erfolgt über den Regler *Holding Command*, $\times 1$, mit *Ext. Command* off, im *Mode V-Clamp* und *Config. Whole Cell $\beta = 1$* . Die erhaltenen Daten durchlaufen einen *Lowpass Bessel Filter 10 kHz* und *Leak Subtraction ∞* . Das Regeln des Offsets geschieht über den Regler *Pipette Offset*.

⁸ Die Toleranz ist einstellbar. Hier wurde ± 1 mV verwendet.

3.3 Messen des elektrischen Leitwertes

Abschließend wird aus diesen Daten durch einen linearen Fit der Leitwert ermittelt, wobei ein Leitwert für alle Datenpunkte mit positiven und ein Leitwert für alle Datenpunkte mit negativen Spannungswerten errechnet wird⁹. Beide Fits werden zudem so gelegt, dass sie durch den Koordinatenursprung verlaufen, da nach der Korrektur der Abweichungen gefordert wird, dass ohne eine angelegte Spannung auch kein Strom fließt.

⁹ Es zeigen sich leicht unterschiedliche Leitwerte für diese Bereiche (vgl. Abschnitt 4.4)

4 Ergebnisse und Auswertung

Das Ziel dieser Arbeit ist es Glas-Nanopipetten herzustellen, die durch hinreichend kleine Poren für DNA-Coulter-Counter Experimente verwendet werden können. Dazu wurde mit verschiedenen Einstellungen des Mikropipettenziehers experimentiert und die resultierenden Pipetten mit dem Helium-Ionen-Mikroskop untersucht. Zusätzlich wurde gefunden und umgesetzt, dass die Spitzen der Pipetten mit dem HIM verformt und verkleinert werden können. Ebenfalls Ziel der Arbeit ist es die Pipetten auf ihren elektrolytischen Leitwert zu untersuchen, und somit erste Ionenflussexperimente mit den Pipetten durchzuführen.

Die unter Verwendung der in Kapitel 3 beschriebenen Methoden erzielten Ergebnisse werden in diesem Kapitel präsentiert und diskutiert. Dazu wird getrennt auf die Anpassung und Verfeinerung der verwendeten Methoden, die Ergebnisse des Herstellens und Abbildens der Nanopipetten, die gezielte Modifikation mit dem HIM und die Resultate der Leitwertmessungen eingegangen.

4.1 Verfeinerung der Methodik

Die Methoden zum Herstellen, Abbilden und Vermessen der Nanopipetten haben sich im Laufe der Arbeit verändert. Die anfänglichen Vorgehensweisen wurden dabei neuen Erkenntnissen angepasst, die aus ihrer Anwendung gewonnen werden konnten. Dies betrifft die Überarbeitung des Ziehverfahrens, die Verwendung von Gold zur Kontraststeigerung, die Überarbeitung der Flusszelle, sowie mehrfache Variationen des Befüllverfahrens.

Zu Beginn der Arbeit wurden die Kapillaren zunächst, wie von der Referenzliteratur angegeben [26, 27], symmetrisch in den Mikropipettenzieher eingespannt und somit mittig getrennt. Auf diese Weise entstanden jeweils zwei 3,5 cm lange Pipetten, die dann auf eine Länge von etwa 2 cm gekürzt werden mussten, wenn sie mit dem HIM untersucht werden sollten. Obwohl das Kürzungsverfahren darauf ausgelegt wurde, ein Abbrechen der Spitze zu verhindern, geschah dies dennoch bei etwa 40 % der so produzierten Pipetten¹. Die Ursache liegt in der Ausbildung einer Spitze

¹ 12 von 29 symmetrisch gekürzten Pipetten haben unter dem HIM Bruch gezeigt.

4 Ergebnisse und Auswertung

an der gekürzten Seite der Pipette, die durch das manuelle Auseinanderziehen des erweichten Glases entsteht, sich in der Hitze des Brenners zur Seite biegt und in dieser Orientierung erkaltet. Beim Einsetzen der gekürzten Pipette in den Probenhalter kann diese untere Spitze dann brechen und so den Bruch der eigentlichen Spitze induzieren. Durch das Einführen des asymmetrischen Ziehens konnte der Bruch der Pipettenspitzen jedoch schließlich weitestgehend unterbunden werden. Abbildung 4.1 zeigt Beispiele für gebrochene Pipettenspitzen.

Beim Abbilden der Pipetten unter dem HIM hat sich schnell gezeigt, dass bei den gewünschten Maßstäben von unter $2\ \mu\text{m}$ Bildkantenlänge der Bildkontrast und die Bildschärfe stark zurückging und die Poren der Pipetten größtenteils nicht eindeutig, in extremen Fällen sogar gar nicht zu erkennen waren. Dies ließ sich dadurch beheben, dass die Pipetten vor dem Abbilden mit einer dünnen Goldschicht überzogen wurden. Abbildung 4.2 zeigt einen direkten Vergleich.

Durch die Änderungen am Zugverfahren für die Pipetten musste das Design der Flusszelle im Laufe dieser Arbeit angepasst werden. Die symmetrisch gezogenen Pipetten konnten aufgrund der beim Kürzen entstehenden zweiten Spitze nur entweder mit dem HIM abgebildet oder in eine Flusszelle eingebaut werden, weshalb die Flusszelle auf 35 mm lange Pipetten ausgelegt war. Durch den Umstieg auf asymmetrisches Ziehen musste sie dann an 20 mm lange Pipetten angepasst werden.

Das blasenfreie Befüllen der Pipetten mit Pufferlösung hat sich in der praktischen Umsetzung als Herausforderung erwiesen. Es wurde beobachtet, dass sich die wasserbasierte Pufferlösung den Kapillarkräften zum Trotz nicht durch die kleine Pore der Pipette zog, sodass die Spitze der Pipette fast immer luftbefüllt blieb. Wenn der Entlüftung mit einer kurzen Zeit im Exsikkator nachgeholfen wurde, zeigte sich die Spitze der Pipette zwar ein wenig befüllt aber es verblieb dennoch eine Luftblase nahe der Spitze, die nur in Einzelfällen nach einiger Zeit (bis zu drei Tage) aus der Pipette verschwunden ist.

Um den Problemen beim Befüllen der Spitze entgegenzuwirken wurde für einen Großteil der durchgeführten Experimente die Befüllmethode verwendet, bei der die Pipette zunächst mit Isopropanol befüllt wird, welches dann durch Puffer ausgetauscht wird. Mit diesem Verfahren gelang zuverlässig eine blasenfreie Befüllung der Pipetten. Eine weitere Diskussion dieses Verfahrens findet in Abschnitt 4.4 statt. Die Vorzüge des Isopropanols gegenüber dem wasserbasierten Puffer sind hierbei seine geringere Oberflächenspannung [28, S. 6/182f], aufgrund derer es einfacher durch die kleine Pore der Pipette dringen kann, und seine Flüchtigkeit, durch die sich verbleibende Luftblasen innerhalb weniger Minuten auflösen.

4.1 Verfeinerung der Methodik

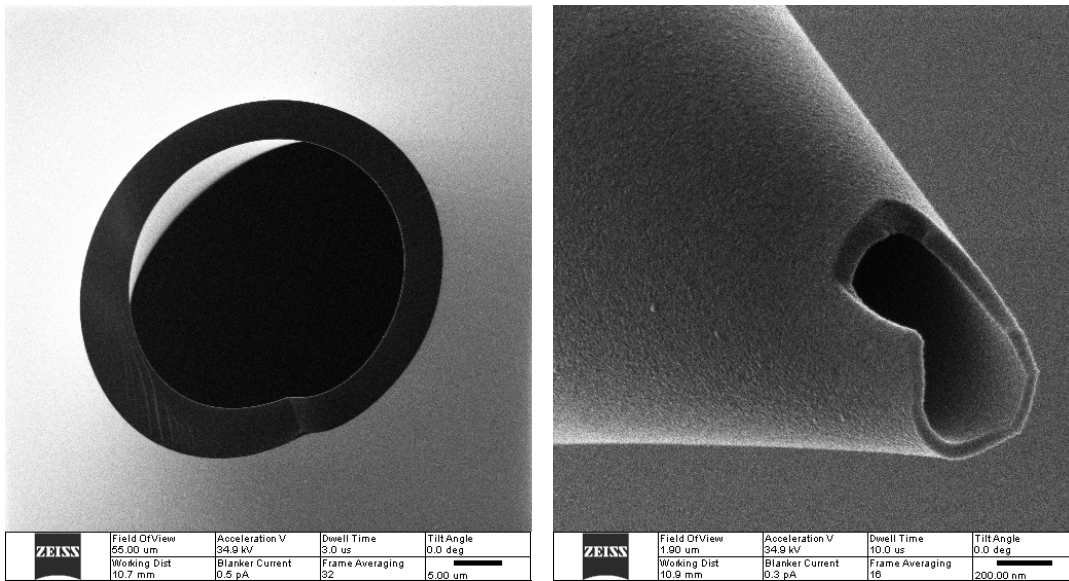


ABBILDUNG 4.1: Abbildung zweier beim Kürzen gebrochener Pipetten; (*links*) eine Pipette bei der viel von der Spitze abgebrochen ist, mit einer resultierenden Pore von grob 25 μm Durchmesser; (*rechts*) eine Pipette bei der nur wenig von der Spitze gebrochen ist, mit einer resultierenden Pore von bis zu grob 800 nm Durchmesser.

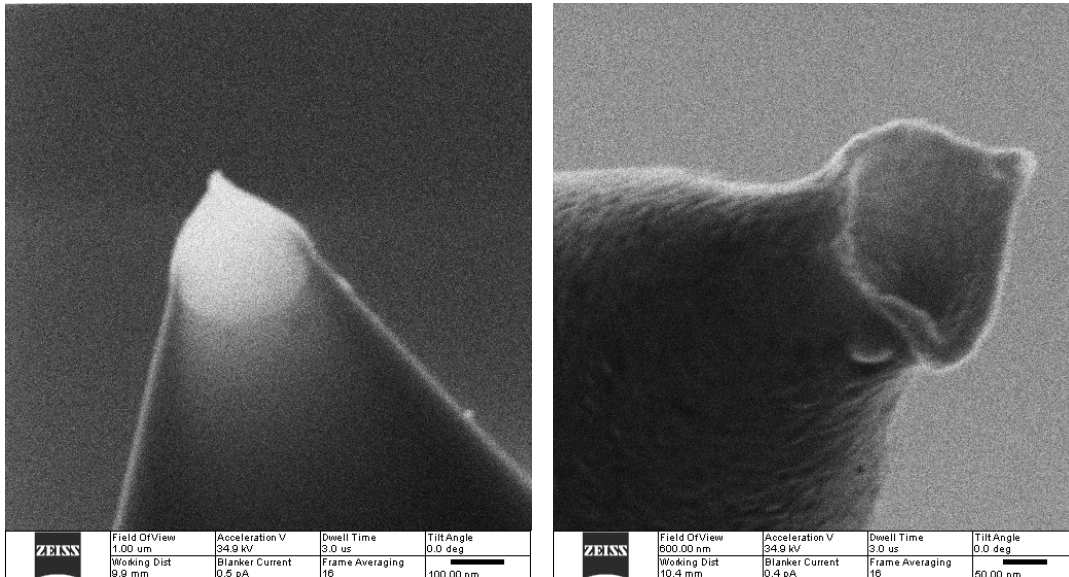


ABBILDUNG 4.2: Vergleich der Aufnahmen einer Pipette (*links*) ohne und (*rechts*) mit Goldbeschichtung.

4 Ergebnisse und Auswertung

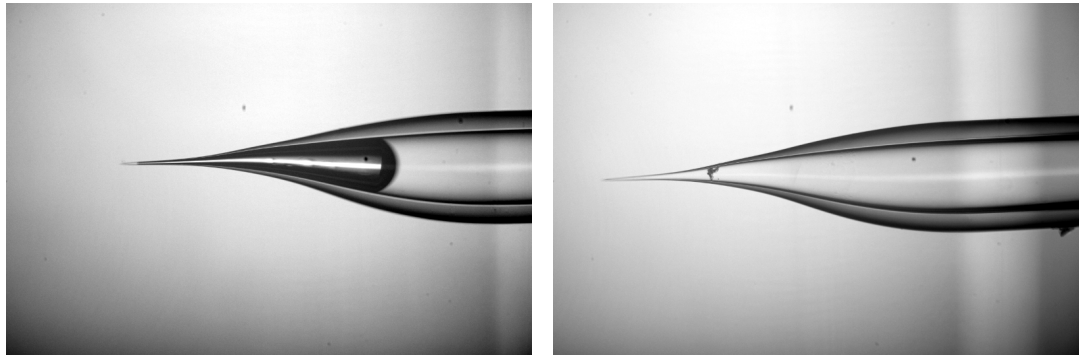


ABBILDUNG 4.3: Aufnahmen einer Nanopipette, die mit der isopropanolfreien Methode befüllt wurde, aufgenommen unter dem Lichtmikroskop mit einer Digitalkamera. Die Bilder zeigen die Spitze der Pipette (*links*) direkt nach einem halbstündigen Entlüften im Exsikkator und (*rechts*) fünf Stunden später. Man kann eine Ansammlung von Verunreinigungen erkennen, die bei dieser Pipette jedoch nicht zu einem Verstopfen geführt haben.

Gegen Ende dieser Arbeit wurde eine Möglichkeit gefunden auf das Isopropanol zu verzichten und eine homogene Befüllung zu gewährleisten, bei der durch Regulieren des Unterdrucks der Aufenthalt im Exsikkator verlängert wird. Dies hat den Vorteil, dass die Pipette direkt nach dem Befüllen verwendet werden kann, ohne dass darauf gewartet werden muss, dass das Isopropanol aus der Pipette diffundiert. Ebenfalls bietet es die Möglichkeit, die bisherige Methode zu kontrollieren und zu untersuchen, ob tatsächlich kein Isopropanol in der Pipette zurückbleibt und den Leitwert beeinflusst. Bei diesem Verfahren löst sich die anfänglich verbleibende Luftblase vollständig im gut entgasten Puffer, wie in Abbildung 4.3 verdeutlicht. Um sichere Aussagen über die Erfolgsrate dieses Verfahrens zu treffen, konnte im Rahmen dieser Arbeit keine ausreichende Zahl an Befüllungen durchgeführt werden. Bei den sechs Pipetten, bei denen dieses Verfahren zum Einsatz gekommen ist, haben sich die Luftblasen in der Spitze gelöst. Wie in Abbildung 4.4 gezeigt ist es jedoch vorgekommen, dass kleine Luftpinschlüsse im vorderen Teil der Spitze zurückblieben, und die Pipetten verstopften.

Zur Optimierung beider Verfahren wurde damit experimentiert, MicroFil Spritzenaufsätze zu verwenden, um Pufferlösung direkt in die Pipetten zu spritzen und so entweder die Verdrängung des Isopropanols oder der Luft zu beschleunigen. Es konnte jedoch in der Praxis kein direkter Vorteil durch die Verwendung der MicroFil Spitzen festgestellt werden. Dies liegt im Wesentlichen daran, dass die MicroFil Spitzen nicht bis in die dünne Spitze der Pipette vordringen und somit in diesem wichtigen Teil der Pipette weder Luft noch Isopropanol verdrängen können. Die MicroFil Spitzen haben

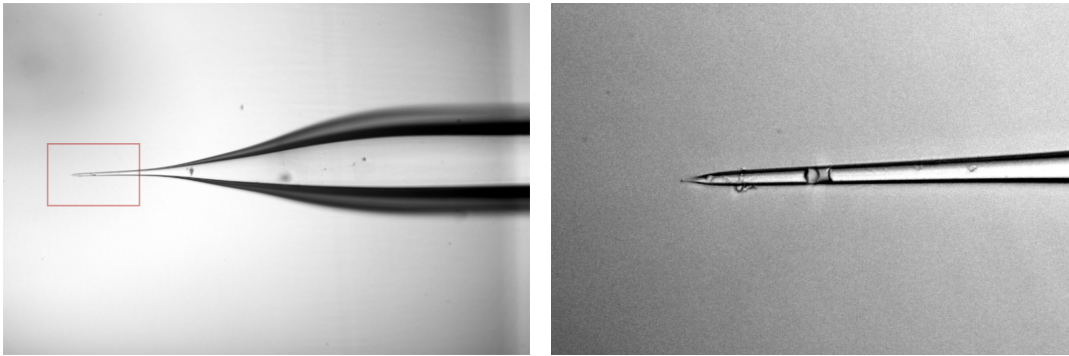


ABBILDUNG 4.4: (*links*) Bild einer Nanopipette, die mit der isopropanolfreien Methode befüllt wurde, aufgenommen unter dem Lichtmikroskop mit einer Digitalkamera. Es zeigt die Spitze der Pipette nach mehrmaligem Entlüften im Exsikkator und mehrstündigen Warteperioden. (*rechts*) Vergrößerung des vorderen Bereichs der Spitze, der im linken Bild mit dem roten Rahmen markiert ist. In diesem ist eine kleine Luftblase zu erkennen, die die Pipette verstopft.

sich jedoch als sehr hilfreich erwiesen, um vereinzelte Luftblasen aus einer Pipette zu entfernen, die sich nicht in unmittelbarer Nähe zu deren Spitze befinden.

Neben dem Verschluss durch Luftblasen kann auch das Anlagern von Verunreinigungen in der Pore eine Pipette unbrauchbar machen, da bisher keine Möglichkeit gefunden werden konnte, eine verstopfte Pore wieder zu befreien. Als problematisch haben sich in diesem Zusammenhang auch die MicroFil Spitzen erwiesen, die sich am Glas der Pipette abschaben und so in beachtlichen Mengen zur Verunreinigung beisteuern können, besonders wenn sie bis in die Nähe der Spitze geschoben werden. Bei der Verwendung der MicroFil Spitzen ist dementsprechend besondere Vorsicht geboten.

4.2 Variation der Zugparameter

Um ein Zugprogramm für den Mikropipettenzieher zu finden, mit dem es möglich ist, Pipetten mit Poren der angestrebten Größenordnung von unter 100 nm zu erzeugen, wurden insgesamt 14 verschiedene Programme getestet, die in Tabelle 4.1 aufgelistet sind. Als Grundlage diente das von Steinbock et al. [10] verwendete Programm, das in der Notation dieser Arbeit mit P01 bezeichnet wird. Von diesem Programm ausgehend wurde mit der Veränderung einzelner Parameter experimentiert. In 11 Variationen wurden die Parameter HEAT, FILAMENT, VELOCITY und DELAY variiert, um die Auswirkungen auf die resultierenden Poren zu untersuchen. Mit PULL wurde nicht experimentiert, da bereits bekannt war, dass hohe Werte von PULL den Durchmesser der

4 Ergebnisse und Auswertung

TABELLE 4.1: Getestete Zugprogramme mit Kennung, Parametern und Anzahl sowie durchschnittlichem Porendurchmesser der unter dem HIM betrachteten Pipetten. Fett gedruckte Parameterwerte sind Variationen gegenüber P01.

Kennung	Cycle	HEAT	FIL	VEL	DEL	PULL	Anzahl	Durchmesser
P01	1	520	0	10	128	0	6	239 ± 89 nm
	2	520	0	10	128	0		
	3	520	0	10	128	0		
	4	520	0	15	128	200		
P02	1	520	0	10	140	0	2	274 ± 68 nm
	2	520	0	10	140	0		
	3	520	0	10	140	0		
	4	520	0	15	128	200		
P03	1	520	0	20	128	0	0	-
	2	520	0	20	128	0		
	3	520	0	20	128	0		
	4	520	0	30	128	200		
P04	1	520	0	10	128	0	1	340 ± 6 nm
	2	520	0	10	128	0		
	3	520	0	10	128	0		
	4	520	0	15	126	200		
P05	1	520	2	10	128	0	2	160 ± 42 nm
	2	520	2	10	128	0		
	3	520	2	10	128	0		
	4	520	2	15	128	200		
P06	1	520	0	10	192	0	1	270 ± 5 nm
	2	520	0	10	192	0		
	3	520	0	10	192	0		
	4	520	0	15	128	200		
P07	1	520	3	10	128	0	6	124 ± 19 nm
	2	520	3	10	128	0		
	3	520	3	10	128	0		
	4	520	3	15	128	200		
P08	1	600	2	10	128	0	1	183 ± 6 nm
	2	600	2	10	128	0		
	3	600	2	10	128	0		
	4	600	2	15	128	200		
P09	1	680	3	10	128	0	2	234 ± 20 nm
	2	680	3	10	128	0		
	3	680	3	10	128	0		
	4	680	3	15	128	200		
P10	1	520	0	10	128	0	0	-
P11	1	480	0	10	128	0	6	248 ± 44 nm
	2	480	0	10	128	0		
	3	480	0	10	128	0		
	4	480	0	15	128	200		
P12	1	440	0	10	128	0	5	223 ± 47 nm
	2	440	0	10	128	0		
	3	440	0	10	128	0		
	4	440	0	15	128	200		
P13	1	400	0	10	128	0	3	226 ± 65 nm
	2	400	0	10	128	0		
	3	400	0	10	128	0		
	4	400	0	15	128	200		
P14	1	550	0	50	130	150	0	-

Spitze verringern [27] und das Ausgangsprogramm P01 ohnehin schon einen recht hohen Wert (200) in diesem Parameter hat. Außerdem sollte die Vergleichbarkeit zu P01 gewahrt bleiben. In Anlehnung an ein einzeliliges Programm, das Steinbock et al. [14] in einer späteren Veröffentlichung verwendeten (P14), wurde mit einem weiteren Programm versucht, aus P01 ein einzeliliges Programm zu erstellen (P10).

Die mit dem HIM erstellten Bilder der vermessenen Pipetten werden manuell über das Anlegen einer Maßlinie ausgewertet. Die Aufnahmen haben eine Auflösung von 512 oder 1024 Pixeln, wobei abhängig vom *Field of View*² der Aufnahme ein einzelner Pixel Ausmaße von bis zu wenigen Nanometern hat. Bei einer Aufnahme mit einem *Field of View* von 1,4 μm und einer Auflösung von 512 Pixeln, wie in Abbildung 4.5 unten rechts, entspricht ein Pixel beispielsweise etwa einer Distanz von 2,7 nm. Bedingt durch perspektivische Verzerrung und oft nicht optimalen Bildkontrast wird für die Maßlinie ein Messfehler von ± 2 Pixeln auf jeder Seite angenommen, der zugleich die Messunsicherheit für die Abbildung der Pore darstellt. Im vorangegangenen Beispiel sind dies knapp ± 11 nm.

Mit P01 wurden insgesamt 34 Pipetten gezogen, von denen sechs erfolgreich mit dem HIM abgebildet wurden. Wie in Abbildung 4.5 an vier dieser Pipetten exemplarisch gezeigt, unterliegen die erzielten Porenrößen zum Teil deutlichen Schwankungen. Im Mittel konnte ein Porendurchmesser von 239 ± 89 nm bestimmt werden. Steinbock et al. [10] haben mit diesem Programm Pipetten mit bis zu 45 nm Poren hergestellt. Das beste hier erzielte Ergebnis von 86 ± 4 nm erreicht diesen Wert zwar noch nicht ganz, liegt aber bereits, wie angestrebt, unterhalb von 100 nm.

Eine erfolgreiche und reproduzierbare Verringerung der Porendurchmesser konnte durch eine Änderung des FILAMENT Parameters erreicht werden, was in den Zugprogrammen P05 und P07 umgesetzt wurde. Mit P05 wurden insgesamt zwei Pipetten mit einem durchschnittlichen Porendurchmesser von 160 ± 42 nm gezogen, bevor auf P07 umgestiegen wurde. Mit diesem Programm wurden 14 Pipetten gezogen, von denen sechs erfolgreich mit dem HIM abgebildet wurden und eine durchschnittliche Porenröße von 124 ± 19 nm aufzeigten. Das beste Einzelergebnis war dabei 107 ± 7 nm (Abbildung 4.6). P07 erzielte von allen getesteten Programmen die besten Ergebnisse.

In einem Versuch, die Ergebnisse von P07 weiter zu verbessern, wurde mit P09 eine Variation mit höherem HEAT Wert erstellt. Die Annahme war, dass die breitere Verteilung des Lasers durch den erhöhten FILAMENT Parameter die Wärmedichte gesenkt wird [27] und ein Erhöhen des HEAT Wertes diese wieder dem Level von P01

² Das *Field of View* einer Aufnahme gibt die Kantenlänge des gesamten abgebildeten Bereiches an. Die meisten Aufnahmen von Spitzen ohne Bruch oder Poren von mehr als 400 nm Durchmesser wurden mit einem *Field of View* zwischen 1,0 μm und 1,4 μm aufgenommen.

4 Ergebnisse und Auswertung

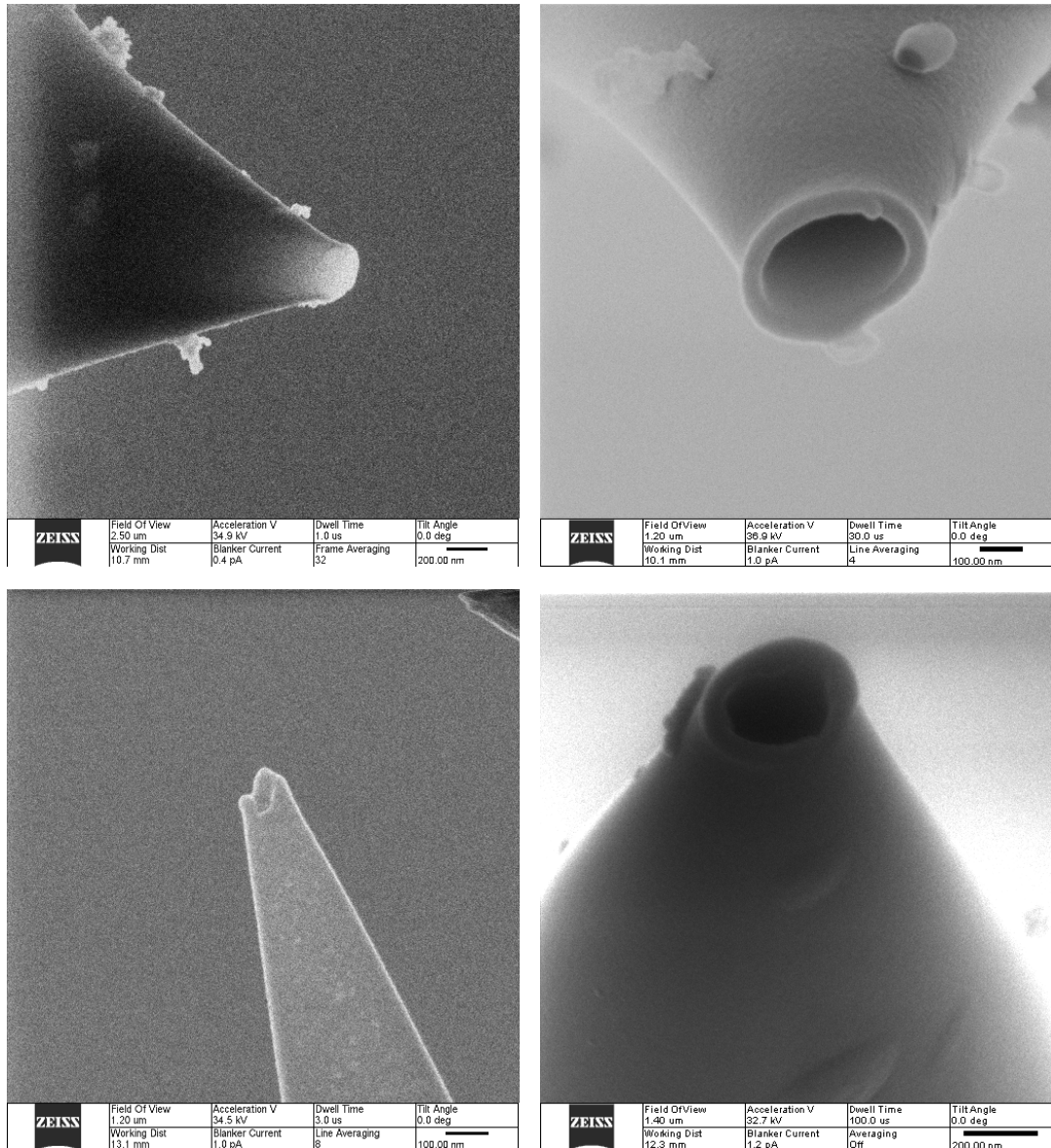


ABBILDUNG 4.5: Vier mit dem Programm von Steinbock et al. [10] (P01) gezo-
gene Pipetten, mit einem Porendurchmesser von (*oben links*) 219 ± 10 nm, (*oben*
rechts) 350 ± 9 nm, (*unten links*) 86 ± 4 nm und (*unten rechts*) 276 ± 11 nm.

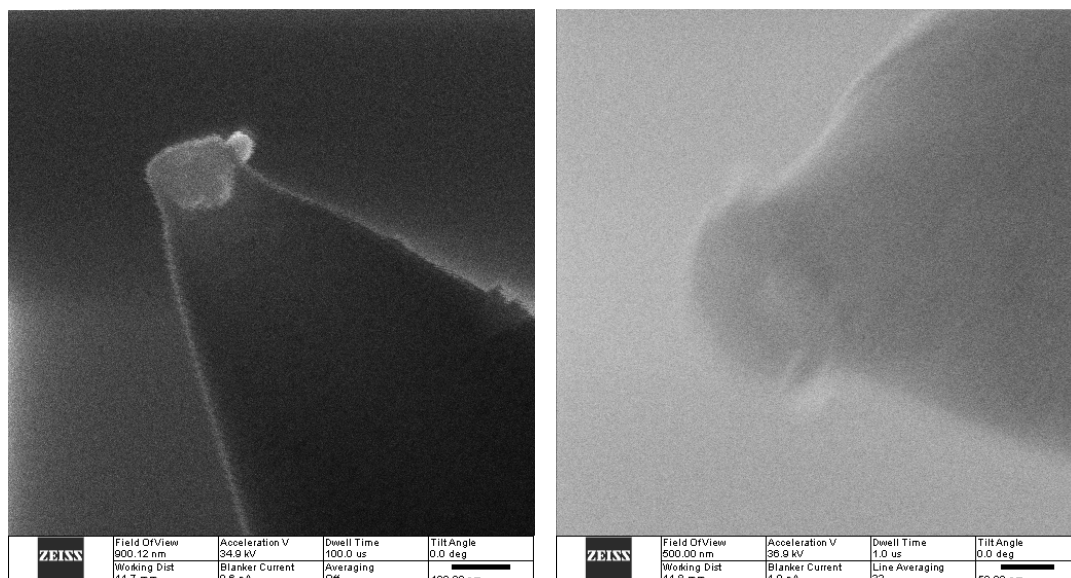


ABBILDUNG 4.6: Zwei mit dem Programm P07 gezogene Pipetten, mit einem Porendurchmesser von (*links*) 107 ± 7 nm und (*rechts*) 115 ± 8 nm. Unglücklicherweise waren fast alle P07 Aufnahmen sehr kontrastarm. Bei ihnen, wie hier *rechts*, wurde daher der angenommene Pixelfehler verdoppelt.

angleicht. Es zeigte sich jedoch in den beiden durchgeführten Messungen eine Vergrößerung der Poren auf 234 ± 20 nm. Im Umkehrschluss wurde dann gefolgert, dass eine Reduzierung der Wärmedichte in P01, und somit eine Senkung des HEAT Parameters, zu geringeren Porengrößen führen sollte. In drei Versuchen mit den Programmen P11, P12 und P13 konnte dies jedoch, in sechs, fünf und drei Messungen mit Ergebnissen von 248 ± 44 nm, 223 ± 47 nm und 226 ± 65 nm, gegenüber dem Porendurchmesser von 239 ± 89 nm von P01 weder bestätigt noch widerlegt werden, da die erzielten Porengrößen alle innerhalb desselben Schwankungsbereiches liegen.

Eine Variation des VELOCITY Parameters, umgesetzt in P03, hatte zur Folge, dass sich die Kapillare schon im dritten der vier Cycles getrennt hat und die Pipetten lange, fragile und leicht verformte Spitzen hatten und verworfen wurden. Veränderungen des DELAY Parameters haben sich ebenfalls als nicht zielführend erwiesen. Mit P02, P04 und P06 gezogene Pipetten zeigten ausgefranzte Spitzen und große Poren zwischen 226 nm und 340 nm (siehe Abbildung 4.7).

Die Auswahl und Entwicklung der Zugprogramme ist auf Grundlage von Stichproben mit zum Teil sehr geringem Umfang erfolgt. Aus zeitlichen Gründen war es notwendig, die Ansätze mit vielversprechenden Ergebnissen weiter zu verfolgen und andere Ansätze weitgehend unerforscht zu lassen.

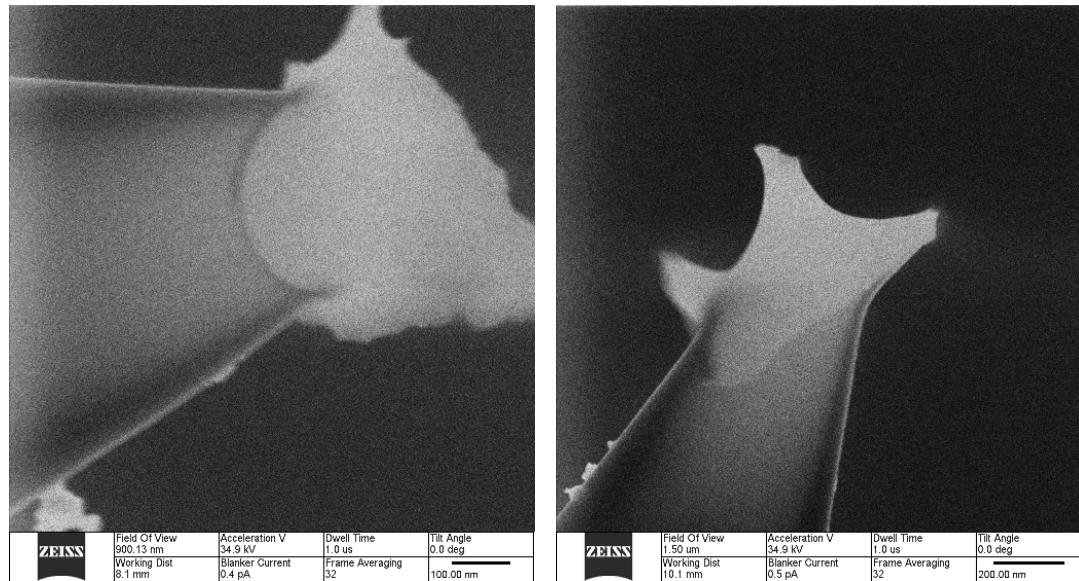


ABBILDUNG 4.7: Zwei Pipetten, gezogen mit DELAY-Variationen von P01, (*links*) mit dem Programm P02 (322 ± 4 nm Pore) und (*rechts*) mit dem Programm P04 (340 ± 6 nm Pore). Beide zeigen deutlich ausgefranste Spitzen.

4.3 Reduktion der Porendurchmesser

Im Zuge der Porenabbildung mit dem HIM wurde festgestellt, dass eine anhaltende Bestrahlung einer Pipettenspitze mit Helium-Ionen zu einer Verformung führt (vgl. Abschnitt 3.2). Dieses Phänomen wurde gezielt genutzt, um die Durchmesser der hergestellten Poren im Anschluss an ihre Herstellung weiter zu verringern.

Abbildung 4.8 zeigt den erfolgreichsten Versuch, eine Pore zu reduzieren. Es ist gelungen eine 276 ± 11 nm Pore auf einen Durchmesser von nur noch 40 ± 9 nm zu reduzieren. Dies erfolgte in mehreren kleinen Schritten, um den Vorgang gut dokumentieren zu können, und lief über einen Zeitraum von insgesamt etwa 16 min mit einem konstanten Ionenstrom³ von 1,1 pA. Die Abbildungen 4.9 und 4.10 zeigen weitere erfolgreiche Reduktionen auf Porendurchmesser von jeweils deutlich unter 100 nm.

Steinbock et al. [14] waren ebenfalls bereits in der Lage, Nanopipettenspitzen auf vergleichbare Weise zu modifizieren. Sie verwendeten dazu ein Rasterelektronenmikroskop (REM), mit dem Pipetten von ursprünglich bis zu 200 nm Poren mit 0,25 nm/s auf beliebig geringe Durchmesser verkleinert werden konnten, wobei sie dies für bis 11 nm gezeigt haben. Mit dem HIM war eine Bestimmung der Verkleinerungsrate nicht sinnvoll, da die Geschwindigkeiten, mit denen die Pipetten verkleinert werden

³ In der letzten Aufnahme ist der Strom auf 0,5 pA reduziert, um ohne weitere nennenswerte Modifikation der Pore die Aufnahmeparameter für optimalen Bildkontrast zu kalibrieren.

4.3 Reduktion der Porendurchmesser

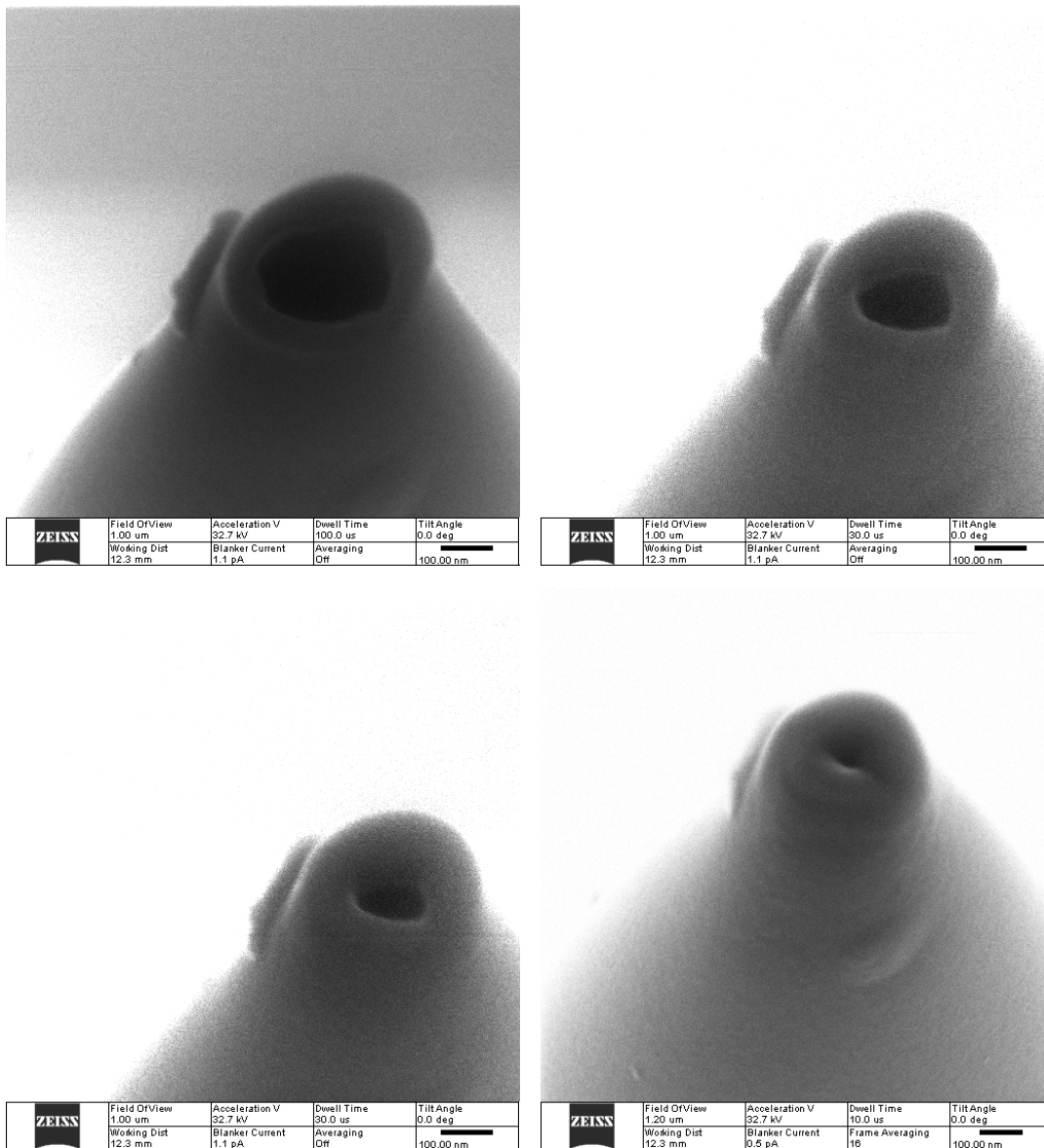


ABBILDUNG 4.8: Die Reduktion der Pore einer Pipette nach P01, mit einem Startdurchmesser (*oben links*) von 276 ± 11 nm und einem Enddurchmesser (*unten rechts*) von 40 ± 9 nm, über mehrere Belichtungsschritte (*oben rechts, dann unten links*). Zwischen dem Start und dem Ende des Vorganges liegen etwa 16 min.

4 Ergebnisse und Auswertung

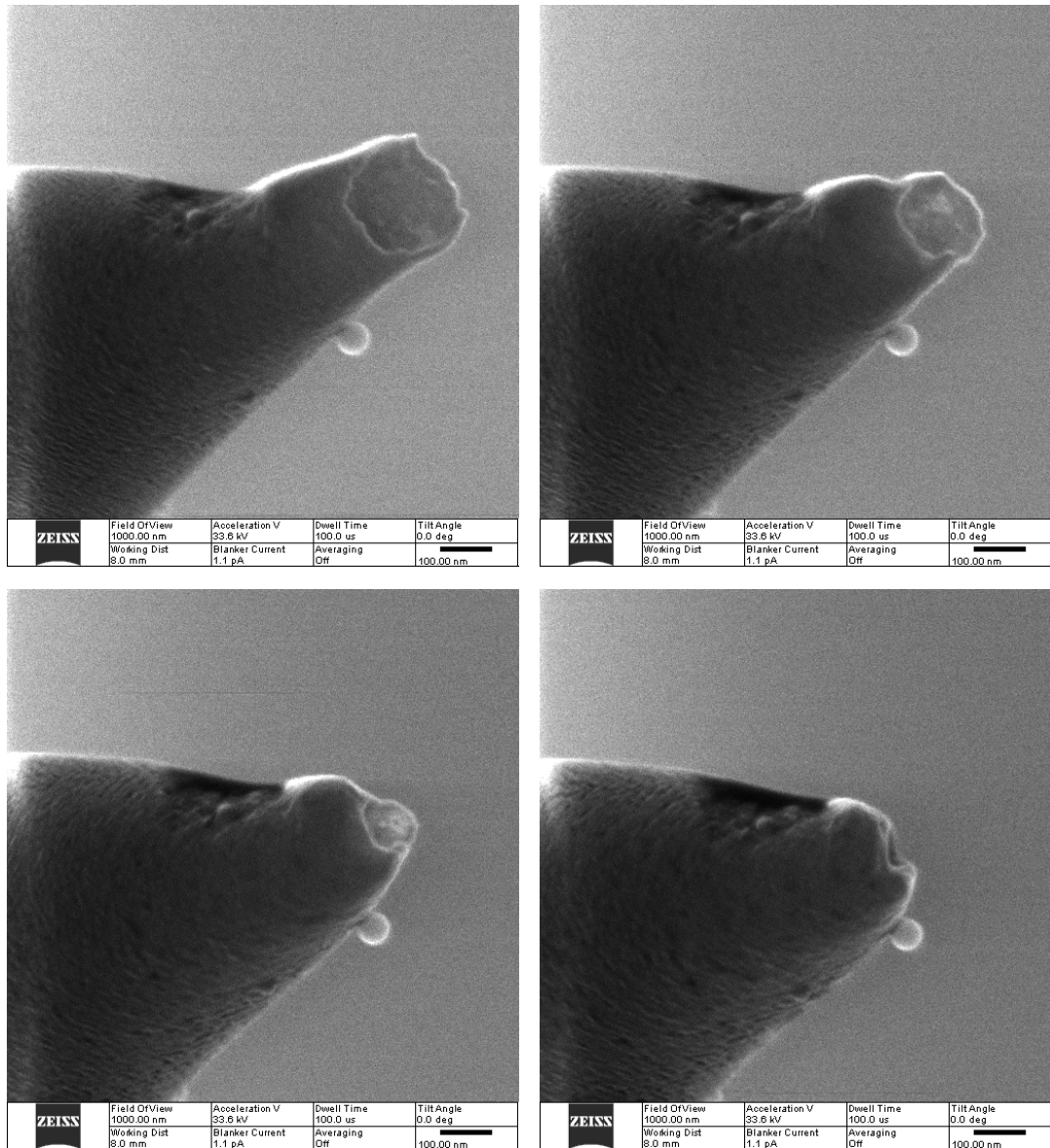


ABBILDUNG 4.9: Die Reduktion des Porendurchmessers einer Pipette nach P12 von (oben links) 218 ± 8 nm auf (unten rechts) 75 ± 8 nm, über mehrere Zwischenschritte (oben rechts, dann unten links). Zwischen dem Start und dem Ende des Vorganges liegen etwa 8 min.

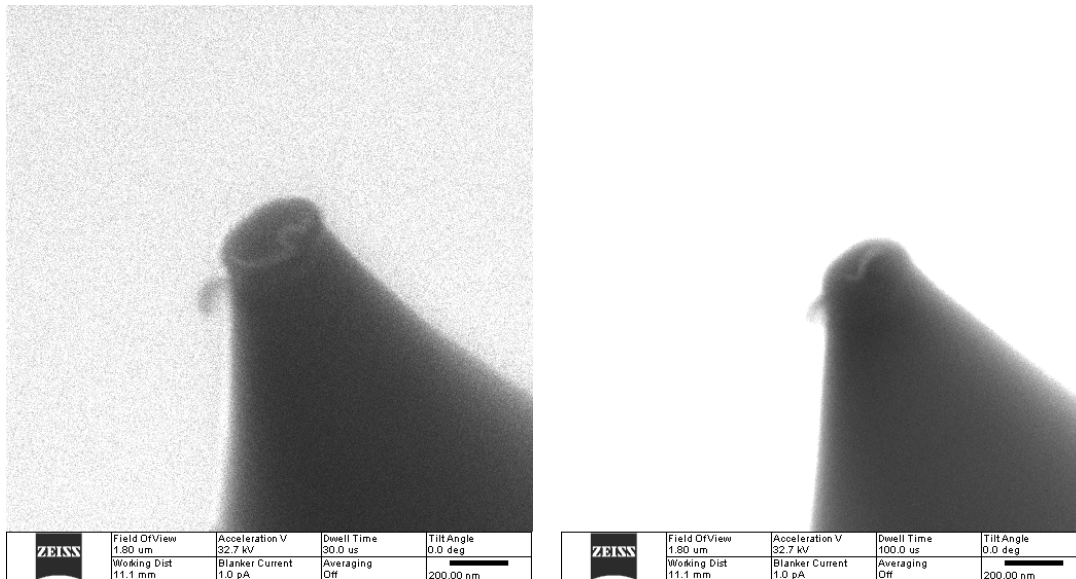


ABBILDUNG 4.10: Reduktion des Porendurchmessers einer mit P11 gezogenen Pipette von (links) 242 ± 14 nm auf (rechts) 71 ± 14 nm über 7 min.

konnten, von Versuch zu Versuch schwankten. Die experimentellen Erfahrungen haben gezeigt, dass der Ionenstrom des HIM großen Einfluss auf die Reduktionsrate zu haben scheint. Dieser wiederum hängt mit der aktuellen Geometrie der Ionenquelle zusammen (vgl. Abschnitt 2.1), die sich durch den Betrieb des HIM mit der Zeit verändern kann. Konnte beispielsweise ein Strom von 1 pA erzielt werden verformten sich die Pipetten deutlich schneller als bei einem Strom von nur 0,6 pA, und unterhalb von etwa 0,4 pA war kaum noch eine Verformung zu erkennen. Die erreichten Porendurchmesser sind jedoch mit den mittels REM erzielten Ergebnissen vergleichbar, da es sich ebenfalls als möglich erwiesen hat, die Pore einer Pipette mit dem HIM vollständig zu verschließen.

Der Erfolg dieser Prozedur ist von einigen Faktoren abhängig, die zum Teil außerhalb der experimentellen Kontrolle liegen. Besonders ins Gewicht fallen hier die Orientierung der Spitze relativ zur Strahlrichtung, sowie die Möglichkeit mit dem HIM ausreichend starke Ionenströme zu erzeugen. Wenn die Geometrie der Quelle wieder aufgefrischt werden muss, kann dies in extremen Fällen mehrere Stunden Vorbereitung erfordern. Abbildung 4.11 zeigt exemplarisch, dass eine Ausrichtung der Spitze annähernd senkrecht zur Strahlrichtung den gewünschten Effekt fast vollständig verhindert. Die Verformung durch den Ionenstrahl erfolgt wahrscheinlich orthogonal zur Ausrichtung der Spitze und ist entsprechend weder in den Abbildungen des HIM erkennbar, noch von Konsequenz für den Durchmesser der Pore. Die Orientierung der

4 Ergebnisse und Auswertung

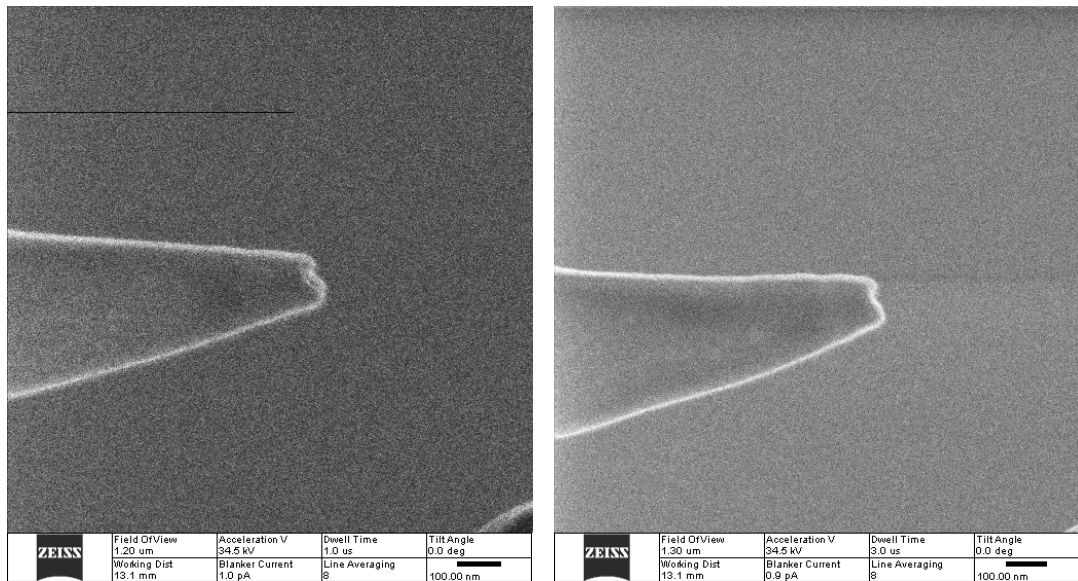


ABBILDUNG 4.11: Versuchte Reduktion des Durchmessers der Pipette mit dem niedrigsten gezogenen Porendurchmesser von 86 ± 4 nm (*links nach rechts*) über 6 min. Hier ist keine messbare Veränderung des Porendurchmessers erkennbar.

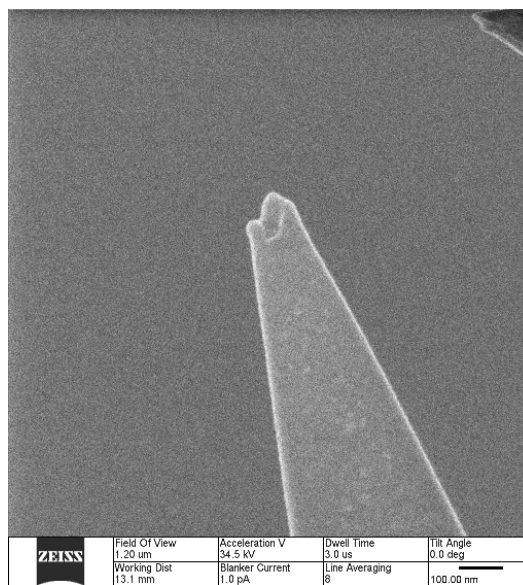


ABBILDUNG 4.12: Die Pipette aus Abbildung 4.11 im selben Messdurchlauf etwa 30 min zuvor die zeigt, dass sich die Pipette in dieser Zeit im Probenhalter gedreht hat.

Spitze beruht auf Biegungen im Endbereich der Pipette, die unterhalb der mit bloßem Auge erkennbaren Längen liegen und ein Resultat individueller Umstände beim Ziehen der jeweiligen Pipette sind. Abbildung 4.12 zeigt dieselbe Pipette am selben Messtag, jedoch etwa 30 min zeitversetzt und verdeutlicht, dass sich diese Orientierung im Laufe der Zeit vermutlich durch Drehung der Pipette im Probenhalter ändern kann. Diese Drehungen sind aber für die Reduktion der Pore weitestgehend ohne Bedeutung, da sie in der Regel die vertikale Orientierung (parallel zum Ionenstrahl) nicht beeinflussen.

Das Helium-Ionen-Mikroskop hat sich als effektives Werkzeug zur Produktion von Nanopipetten mit Porendurchmessern deutlich von unter 100 nm erwiesen. Die Möglichkeit mehrere Pipetten zugleich in die Probenkammer des HIM zu bringen erhöht die Effektivität des Verfahrens. Es sollte jedoch darauf geachtet werden zuvor die Ionenquelle zu kontrollieren und gegebenenfalls deren Spitze neu zu formen.

4.4 Ionenflusseexperimente und Leitwerte

Die Bestimmung des elektrolytischen Leitwertes der Nanopipetten sollte zum einen eine experimentelle Grundlage für deren Verwendung als Coulter-Counter dienen und zum anderen zeigen, dass die Pipetten die in dieser Arbeit gezogen und manipuliert wurden tatsächlich offen sind. Auf den Abbildungen des Helium-Ionen-Mikroskops war dies nicht immer eindeutig zu erkennen.

Zur Bestimmung der Leitwerte wurden verschiedene Pipetten in Flusszellen eingebaut, befüllt und elektrisch vermessen (vgl. Abschnitt 3.3). Die Daten einer Messung wurden mithilfe von MatLab-Skripten verarbeitet und eine Strom-Spannungskennlinie erstellt. Dazu wurde ein linearer Zusammenhang der beiden Größen vorausgesetzt (vgl. Abschnitt 2.2). Der für eine Messung ermittelte Leitwert ist dann die Steigung der Kennlinie. Wie erwartet wurde gefunden, dass Pipetten für positive und negative Spannungen einen leicht voneinander verschiedenen Leitwert aufzeigen, weshalb auch in der Auswertung stets eine Kennlinie für positive und eine für negative Spannungen erstellt wurde.

Ein Großteil aller elektrisch vermessenen Pipetten wurde mithilfe der Isopropanolmethode befüllt (vgl. Abschnitt 3.3). Durch diese konnte weitestgehend verhindert werden, dass isolierende Lufteinschlüsse in der Pipette zurückbleiben, obgleich durch Verunreinigungen nur etwa die Hälfte der präparierten Pipetten vermessbar waren. Es ist darüber hinaus nicht gelungen eine Pipette zu vermessen, die mit dieser Methode befüllt und zuvor mit dem HIM abgebildet worden ist. Zur Einschätzung der Porengröße wurde deshalb bei allen hier vermessenen Pipetten die durchschnittliche

4 Ergebnisse und Auswertung

Porengröße, die für das jeweilige Programm bestimmt wurde, angenommen. Alle hier vermessenen Pipetten wurden entweder mit den Programmen P01 oder P07 gezogen und haben deshalb einen Porendurchmesser von 239 ± 89 nm oder 120 ± 7 nm.

Im Laufe der Messreihen hat sich gezeigt, dass es über 24 h dauern kann, bis sich das Isopropanol ausreichend mit dem Puffer der Reservoirs vermischt hat, um einen überwiegend ungehinderten Ionenstrom zu ermöglichen. Innerhalb dieses Zeitraumes zeigten alle Pipetten gleichermaßen einen Leitwert von unter 0,5 nS. Nach diesem Zeitraum waren die Pipetten für durchschnittlich etwa 48 h vermessbar, d.h. es war möglich einen konstanten Nullstrom einzustellen⁴ und die gemessenen Stromwerte zeigten kein unerwartetes Verhalten. Die Messwerte aus dieser Phase wurden als verwertbare Ergebnisse weiter ausgewertet. Schließlich wurde es zunehmend schwieriger bis letztlich unmöglich einen konstanten Nullstrom einzustellen und ab einem Zeitraum von durchschnittlich 72 h nach dem Befüllen unterlag die Stromkurve der Pipetten spontanen spannungsunabhängigen Sprüngen, die mit einigen 1000 pA nicht mehr als statistische Schwankungen angesehen werden konnten. Dieses unerwartete Verhalten ist vermutlich auf chemische Veränderungen der Pufferlösung und Verunreinigungen, die unweigerlich ihren Weg in das System finden, zurückzuführen. Eine Pipette, die diesen Zustand erreicht hat, ist in der Regel nicht mehr verwendbar. Versuche, die Flusszellen dieser Pipetten zu entleeren und neu zu befüllen konnten dieses Problem nicht beheben. Außerdem ist bei der Befüllmethode mit Isopropanol zu beachten, dass nach einer Standzeit von 24 h ein merklicher Teil des Wassers aus den Reservoirs verdunstet ist. Um die Ionenkonzentration annähernd zu wahren und die Flusszelle vor dem Austrocknen zu schützen, müssen die Reservoirs deshalb regelmäßig mit Reinstwasser nachgefüllt werden.

Aus den Ergebnissen der weiterverwertbaren Messungen wurden für jedes der beiden Zugprogramme und die positiven und negativen Spannungsbereiche Mittelwerte erstellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 (a) aufgeführt.

Im späten Verlauf der Versuche wurde eine Methode gefunden, die Pipetten ohne den Einsatz von Isopropanol zu befüllen. Von den acht auf diese Weise hergestellten Flusszellen waren jedoch nur zwei vermessbar. Bei den anderen sechs Flusszellen sind im Zuge des Befüllens die Pipetten verstopft. Bei fünf dieser Flusszellen ist es möglich, dass dies mit dem Abrieb der MicroFil Spitzen zusammenhängt, die beim Befüllen bis nahe an die Spitze der Pipette geführt wurden. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Befüllmethode nicht so gut funktioniert wie angenommen und mikroskopische Luftblasen in der Feinspitze der Pipette zurückbleiben, die unter dem Licht-

⁴ Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, zeigen die meisten Nullströme eine konstante Steigung, die in der Auswertung aus den Daten herausgerechnet wird.

4.4 Ionenflusseperimente und Leitwerte

TABELLE 4.2: Übersicht über die ermittelten Leitwerte der vermessenen Pipetten. Angegeben sind jeweils die Kennung des Zugprogramms, das bei ihrer Herstellung verwendet worden ist, der Durchmesser d der Pore, der Leitwert G_+ für positive Spannungen, der Leitwert G_- für negative Spannungen und der theoretische Leitwert G_{theo} aus dem Modell (2.4). (a) Die Ergebnisse der mithilfe von Isopropanol befüllten Pipetten, wobei alle Ergebnisse von Pipetten, die mit dem selben Parametern hergestellt worden sind, gemittelt wurden. Der Durchmesser d ist hier der erwartete Wert des Zugprogramms. (b) Die Ergebnisse der zwei ohne Isopropanol hergestellten Pipetten. Der Durchmesser d wurde hier direkt mit dem HIM ermittelt.

	Programm	d (nm)	G_+ (nS)	G_- (nS)	G_{theo} (nS)
(a)	P01	239 ± 89	$19,6 \pm 9,8$	$26,0 \pm 10,8$	557 ± 348
	P07	120 ± 17	$13,0 \pm 7,2$	$13,9 \pm 8,7$	280 ± 145
(b)	P11	225 ± 9	$17,1 \pm 0,1$	$19,4 \pm 0,6$	525 ± 263
	P07	146 ± 19	$13,0 \pm 2,1$	$9,9 \pm 0,9$	341 ± 176

mikroskop⁵ nicht zu erkennen waren. Abbildung 4.13 zeigt exemplarisch eine der beiden erfolgreich auf diese Weise vermessenen Pipetten.

Tabelle 4.2 (b) gibt die gemessenen Leitwerte für diese beiden Pipetten an, die keine signifikanten Unterschiede zu denen der mit Isopropanol vorbefüllten Pipetten zeigen. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Befüllmethoden ist, dass die Pipetten ohne Isopropanol bereits direkt nach dem Befüllen vermessbar waren, während die anderen erst etwa 24 h stehen mussten. Ob diese Pipetten auch nach einigen Tagen elektrisch instabil werden, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Vorbefüllung mit Isopropanol nach einiger Zeit vernachlässigbar wird und keine Auswirkungen auf die Leitfähigkeit hat. Zudem hat sich die Isopropanolmethode hinsichtlich der erfolgreichen Befüllungen bisher als zuverlässiger erwiesen.

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde das vereinfachte Modell für konische Nanokapillaren (Gleichung 2.4) herangezogen. Die elektrolytische Leitfähigkeit der 1 M KCl-Pufferlösung beträgt dabei 9,9 S/m [28, S. 5/74], der Durchmesser der Pipette vor der Spitze ist 0,3 mm und die Länge der Spitze wird auf 1 mm geschätzt. Aus dem Durchmesser der Pore, der entweder direkt oder kategorisch mit dem HIM bestimmt wurde, lässt sich somit ein Erwartungswert für die Leitwerte der einzelnen Messungen errechnen. Die erwartete Fehlerbreite dieser Werte wird jeweils direkt aus der Annahme einer Gaußschen Fehlerfortpflanzung gefolgert. Für die Schätzung der

⁵ 10× Objektiv mit 10× Okularvergrößerung

4 Ergebnisse und Auswertung

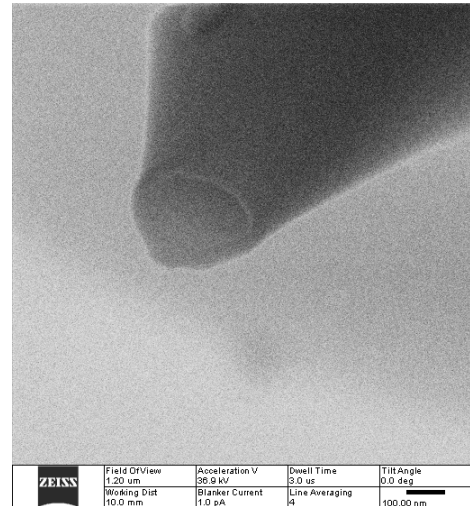
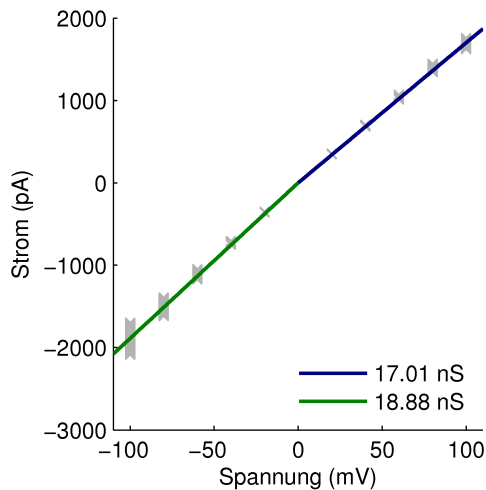


ABBILDUNG 4.13: (links) Eine Leitwertmessung einer Pipette nach dem Programm P11, der HEAT 480 Modifikation von P01, mit einem Durchmesser von 225 ± 9 nm. Die einzelnen Datenpunkte der Messung sind grau markiert, die beiden Leitwerte entsprechen den farbigen Linien. Die Leitwerte für die beiden Spannungsorientierungen liegen im Bereich zwischen 17 nS und 20 nS. (rechts) Eine Abbildung derselben Pipette mit dem HIM.

Länge der Spitze soll eine Ungenauigkeit von $\pm 0,5$ mm angenommen werden. Tabelle 4.2 zeigt eine Übersicht über die jeweils gemessenen und errechneten Leitwerte.

Trotz der großen Ungenauigkeiten von teilweise über 50 %, die zu großen Teilen aus der bewusst sehr groß gewählten Ungenauigkeit der Spitzenlänge folgen, weichen die modellierten Werte auffallend stark von den gemessenen Werten ab. Steinbock et al. [10] haben mit ihren Messungen das Modell (2.4) jedoch bestätigen können; sie lagen nur mit etwa einem Faktor von 3 neben den tatsächlich gemessenen Werten⁶. Dieser kann somit der Ungenauigkeit des Modells zugeschrieben werden.

Die verbleibende Abweichung um grob das Zehnfache deutet auf weitere, bislang nicht berücksichtigte Einflüsse hin. Durch eine großzügigere Abschätzung der Fehler-schranken für die aus den HIM-Aufnahmen gemessenen Porendurchmesser und mögliche Schwankungen der Pufferkonzentration können die Unsicherheiten der theoretischen Werte vergrößert und so den gemessenen Leitwerten ein wenig angenähert werden. Um die gesamte Abweichung zu erklären ist es jedoch wahrscheinlicher, dass dieser Fehler im komplexen Prozess der Datenaufnahme und der Datenverarbeitung

⁶ Sie haben mittels der Formel über einen gemessenen Leitwert von 30 nS einen theoretischen Porendurchmesser von 19 nm für eine Pore von tatsächlich etwa 45 nm errechnet. Dabei haben sie in ihren Experimenten einen 0,5 M KCL-Puffer verwendet, mit einem Leitwert von 6,3 S/m. Bei Errechnen eines Leitwertes für eine 45 nm hätte das Modell demnach einen Leitwert von etwa 79 nS ergeben; grob aufgerundet das Dreifache.

4.4 Ionenflusseperimente und Leitwerte

des Messaufbaus zu suchen ist. Ein derartiger systematischer Fehler konnte bei einer Inspektion des Messaufbaus und der Datenverarbeitung zwar nicht gefunden werden, ist aufgrund ihrer Komplexität aber dennoch nicht auszuschließen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Mit der Aussicht, Glas-Nanopipetten als Coulter-Counter für DNA-Moleküle zu verwenden, wurden in dieser Arbeit Nanopipetten aus Quarzglas-Kapillaren hergestellt und mit dem Helium-Ionen-Mikroskop abgebildet. Es wurde ein spezieller Probenhalter entworfen, mit dem die Pipetten aufrecht im HIM betrachtet werden können, was das Abbilden der Pore ermöglicht. Dazu musste ebenfalls der Herstellungsprozess an die Anforderungen des HIM angepasst werden, sodass die Pipetten auf eine Länge von etwa 20 mm gezogen werden.

Durch experimentelle Variation der Zugparameter konnten Pipetten mit einem Porendurchmesser von knapp 100 nm erzeugt werden; in einem Einzelfall entstand sogar einer Pore mit etwa 86 nm. Diese Ergebnisse wurden durch Variationen einzelner Parameter erzielt, wobei teilweise nur sehr kleine Stichproben untersucht wurden. Mit einer breiteren Variation der Parameter, mehr untersuchten Pipetten pro Versuch und den hier gesammelten Erfahrungen sollte es aber möglich sein, Pipetten mit noch geringerem Porendurchmesser zu erzeugen. Das nächste Ziel wäre dabei der von Steinbock et al. [10] gezeigte Wert von 45 nm.

Es ist zudem gelungen, Nanopipetten mit dem HIM weiter zu modifizieren, indem die Spitze der Pipette einem anhaltenden Ionenfluss ausgesetzt wurde und sich infolge dessen der Porendurchmesser zum Teil drastisch reduzierte. Die kleinste auf diese Weise erzeugte Pore, die nicht verschlossen war, hatte einen Durchmesser von etwa 40 nm, andere Ergebnisse lagen unter 80 nm. Es hat sich gezeigt, dass der Erfolg dieser Prozedur unter anderem von der Orientierung der Pipettenspitze abhängt und dass sich somit einige Pipetten für eine Porenreduktion als ungeeignet erweisen können. In weiterführenden Experimenten wäre das Ziel, Poren noch weiter zu reduzieren, ohne dass diese sich verschließen und ein besseres Verständnis des Schrumpfprozesses und dessen Abhängigkeit von der Stärke des Helium-Ionen-Stroms zu erlangen.

Elektrolytische Untersuchungen der Nanopipetten haben experimentell einen Zusammenhang zwischen der Porengröße und dem elektrischen Leitwert aufgezeigt und stimmen dahingehend mit theoretischen Betrachtungen überein. Um diese Messungen zu ermöglichen wurde eine Flusszelle entwickelt, in der die Pipette eine elektrolytische Verbindung zwischen zwei mit einer salzhaltigen Pufferlösung gefüllten

5 Zusammenfassung und Ausblick

Reservoirien bildet. Es hat sich herausgestellt, dass es sehr schwierig ist, die eingebaute Pipette mit der Pufferlösung zu befüllen, ohne dass sie von Luftblasen oder Verunreinigungen verstopft wird. Es wurden zwei Methoden entwickelt, um dies zu erreichen, die jedoch beide einige Probleme und eine hohe Ausschussrate aufweisen. Im Hinblick auf weitere Experimente ist es wichtig, die Befüllverfahren zu optimieren und somit die Ausschussrate zu minimieren. Zudem haben die Messungen der Leitwerte starke systematische Abweichungen von Werten aus der Literatur und der theoretischen Betrachtung aufgezeigt, die ebenfalls untersucht werden sollten.

Die Möglichkeit zuverlässig den Leitwert einer Nanopipette bestimmen zu können hat zwei wichtige Anwendungen. Zum einen kann dadurch bestimmt werden, ob eine Pipette eine offene Pore hat. Dies ist besonders interessant um zu schauen, ob eine mit dem HIM reduzierte Pore noch geöffnet ist, oder ob sie sich im Zuge der Verkleinerung verschlossen hat. Zum anderen ist ein stabiler Ionenfluss durch die Pore eine wichtige Voraussetzung um Coulter-Counter Experimente mit einer Nanopipette durchführen zu können. Sobald die bestehenden Schwierigkeiten überwunden und die Verfahren verfeinert wurden, kann es möglich sein, das Coulter-Counter Verfahren auf Nanopipetten anzuwenden und diese zum Einzelmolekülnachweis zu verwenden, wie es bereits von anderen Gruppen gezeigt wurde [10, 14–16].

Literatur

- [1] BARTRAM, J.; COTRUVO, J.; EXNER, M.; FRICKER, C. und GLASMACHER, A. *HPC and drinking-water safety: The significance of heterotrophic plate counts for water quality and human health*. WHO issues in water quality and health. London: IWA, 2003. ISBN: 1-84339-025-6.
- [2] WU, J.-Q. „Counting Cytokinesis Proteins Globally and Locally in Fission Yeast“. In: *Science* 310.5746 (2005), S. 310–314.
- [3] ULBRICH, M. H. und ISACOFF, E. Y. „Subunit counting in membrane-bound proteins“. In: *Nature Methods* 4.4 (2007), S. 319–321.
- [4] DHALLAN, R.; GUO, X.; EMCHE, S.; DAMEWOOD, M.; BAYLISS, P.; CRONIN, M.; BARRY, J.; BETZ, J.; FRANZ, K.; GOLD, K.; VALLECILLO, B. und VARNEY, J. „A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study“. In: *The Lancet* 369.9560 (2007), S. 474–481.
- [5] LEON, S. A.; SHAPIRO, B.; SKLAROFF, D. M. und YAROS, M. J. „Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy“. In: *Cancer Reserach* 37.3 (1977), S. 646–650.
- [6] BRUSSAARD, C. P. D. „Optimization of Procedures for Counting Viruses by Flow Cytometry“. In: *Applied and Environmental Microbiology* 70.3 (2004), S. 1506–1513.
- [7] HENRIQUEZ, R. R.; ITO, T.; SUN, L. und CROOKS, R. M. „The resurgence of Coulter counting for analyzing nanoscale objects“. In: *The Analyst* 129.6 (2004), S. 478.
- [8] COULTER, W. H. „Means for counting particles suspended in a fluid“. US2656508 A. 1953.
- [9] DEBLOIS, R. W. „Counting and Sizing of Submicron Particles by the Resistive Pulse Technique“. In: *Review of Scientific Instruments* 41.7 (1970), S. 909–915.
- [10] STEINBOCK, L. J.; OTTO, O.; CHIMEREL, C.; GORNALL, J. und KEYSER, U. F. „Detecting DNA Folding with Nanocapillaries“. In: *Nano Letters* 10.7 (2010), S. 2493–2497.

Literatur

- [11] ITO, T.; SUN, L. und CROOKS, R. M. „Simultaneous Determination of the Size and Surface Charge of Individual Nanoparticles Using a Carbon Nanotube-Based Coulter Counter“. In: *Analytical Chemistry* 75.10 (2003), S. 2399–2406.
- [12] SPIERING, A.; GETFERT, S.; SISCHKA, A.; REIMANN, P. und ANSELMETTI, D. „Nanopore Translocation Dynamics of a Single DNA-Bound Protein“. In: *Nano Letters* 11.7 (2011), S. 2978–2982.
- [13] SIWY, Z.; GU, Y.; SPOHR, H. A.; BAUR, D.; WOLF-REBER, A.; SPOHR, R.; APEL, P. und KORCHEV, Y. E. „Rectification and voltage gating of ion currents in a nanofabricated pore“. In: *Europhysics Letters* 60.3 (2002), S. 349–355.
- [14] STEINBOCK, L. J.; STEINBOCK, J. F. und RADENOVIC, A. „Controllable Shrinking and Shaping of Glass Nanocapillaries under Electron Irradiation“. In: *Nano Letters* 13 (2013), S. 1717–1723.
- [15] ZHANG, B.; WOOD, M. und LEE, H. „A Silica Nanochannel and Its Applications in Sensing and Molecular Transport“. In: *Analytical Chemistry* 81.13 (2009), S. 5541–5548.
- [16] SHA, J.; NI, Z.; LIU, L.; YI, H. und CHEN, Y. „A novel method of fabricating a nanopore based on a glass tube for single-molecule detection“. In: *Nanotechnology* 22.17 (2011), S. 175304.
- [17] CAI, C.; TONG, Y. und MIRKIN, M. V. „Probing Rapid Ion Transfer Across a Nanoscopic Liquid-Liquid Interface“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 108.46 (2004), S. 17872–17878.
- [18] GIBB, T. R.; IVANOV, A. P.; EDEL, J. B. und ALBRECHT, T. „Single Molecule Ionic Current Sensing in Segmented Flow Microfluidics“. In: *Analytical Chemistry* 86.3 (2014), S. 1864–1871.
- [19] GONG, X.; PATIL, A. V.; IVANOV, A. P.; KONG, Q.; GIBB, T.; DOGAN, F.; DEMELLO, A. J. und EDEL, J. B. „Label-Free In-Flow Detection of Single DNA Molecules using Glass Nanopipettes“. In: *Analytical Chemistry* 86.1 (2014), S. 835–841.
- [20] WARD, B. W.; NOTTE, J. A. und ECONOMOU, N. P. „Helium ion microscope: A new tool for nanoscale microscopy and metrology“. In: *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* 24.6 (2006), S. 2871.
- [21] HLAWACEK, G.; VELIGURA, V.; van GASTEL, R. und POELSEMA, B. „Helium ion microscopy“. In: *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* 32.2 (2014), S. 020801.

- [22] L. SCIPIONI; L.A. STERN; J. NOTTE; S. SIJBRANDIJ und B. GRIFFIN. „Helium Ion Microscope“. In: *Advanced Materials & Processes* 166.6 (2008), S. 27–30.
- [23] DESORBO, W. „Ultraviolet effects and aging effects on etching characteristics of fission tracks in polycarbonate film“. In: *Nuclear Tracks* 3.1-2 (1979), S. 13–32.
- [24] CAMPBELL, N. A.; KRATOCHWIL, A.; LAZAR, T. und REECE, J. B. *Biologie*. 6., aktualisierte Aufl. Pearson Studium - Biologie. München [u.a.]: Pearson Studium, 2006. ISBN: 978-3-8273-7180-5.
- [25] SMEETS, R. M. M.; KEYSER, U. F.; KRAPF, D.; WU, M.-Y.; DEKKER, N. H. und DEKKER, C. „Salt Dependence of Ion Transport and DNA Translocation through Solid-State Nanopores“. In: *Nano Letters* 6.1 (2006), S. 89–95.
- [26] SUTTER INSTRUMENTS. *Pipette Cookbook 2015: P-97 & P-1000 Micropipette Pullers*. 2015. URL: http://www.sutter.com/PDFs/pipette_cookbook.pdf (besucht am 20.07.2015).
- [27] SUTTER INSTRUMENTS. *P-2000 Laser Based Micropipette Puller System: Operation Manual*. 2012. URL: http://www.sutter.com/manuals/P-2000_OpMan.pdf (besucht am 20.07.2015).
- [28] HAYNES, W. M.; LIDE, D. R. und BRUNO, T. J. *CRC handbook of chemistry and physics: A ready-reference book of chemical and physical data : 2013-2014*. 94. Aufl. Boca Raton (Fla.), London und New York: CRC Press, op. 2013. ISBN: 978-1-4665-7114-3.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich abschließend allen Personen danken, die zum Gelingen meiner ersten wissenschaftlichen Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti danke ich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe *Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften* und die großzügige Bereitstellung der nötigen Materialien, Gerätschaften und Räumlichkeiten, sowie das Bewerten meiner Arbeit als erster Gutachter.

Bei Herrn Dr. Lukas Bogunovic bedanke ich mich für die hervorragende Betreuung während meiner Arbeit, stets freundliche Unterstützung und das LabView-Programm *NANOPOREN*, ohne das ein großer Teil meiner Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Dipl.-Ing. Christoph Pelargus danke ich für die zahlreichen Stunden am Helium-Ionen-Mikroskop, ohne die ich ebenfalls meine Arbeit nicht hätte umsetzen können.

Ich danke Herrn Dipl.-Phys. Roland Hillmann für sein motivierendes Interesse am Thema meiner Arbeit und seine Bereitschaft, diese als zweiter Gutachter zu bewerten.

Sebastian Knust danke ich für seinen fachlichen Rat, ein umfassendes Korrekturlesen meiner Arbeit, sowie viele interessante und unterhaltsame Gespräche abseits des Laboralltages.

Meinen Bürokollegen Sören und Jonathan danke ich für das nette und abwechslungsreiche Arbeitsklima in unserem Büro, sowie der gesamten Arbeitsgruppe für die zahlreichen kleinen Hilfestellungen, Anregungen und die freundliche Atmosphäre.

Ich danke meinen Eltern, dass sie mir das Studium der Physik ermöglicht und mich immer unterstützt haben.

Besonderer Dank gebührt meiner Freundin Jana für ihre unerschütterliche Bereitschaft, meine Arbeit korrekturlesen, für viele wertvolle Anregungen und dafür, dass sie mich jeden Tag zu einem glücklicheren Menschen macht.