

**DNA-MIGRATION
IN STRUKTURIERTEN
MIKROFLUIDIK-KANÄLEN**

Diplomarbeit

zur Erlangung des Grades eines

Diplom-Physikers

vorgelegt von

Thanh Tu Duong

Fakultät für Physik

Universität Bielefeld

Bielefeld, Juni 2002

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und dabei keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, den 28.Juni 2002

(Duong, Thanh Tu)

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Prof. Dr. Friederike Schmid

Datum des Einreichens der Arbeit: 28. Juni 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	2
2.1	DNA-Struktur	2
2.2	Das Statistische Knäuel	4
2.3	Geladene Teilchen in Lösung	8
2.3.1	Elektroosmose	9
2.3.2	Elektrophoretische Mobilität	10
2.3.3	DNA als Polyelektrolyt	11
2.4	DNA-Elektrophorese	12
2.4.1	Experimentelle Untersuchung der DNA-Elektrophorese	13
2.4.2	Migrationsmodelle	15
2.4.3	Molekulardynamische Simulationen	17
2.4.4	Mikrochip Elektrophorese	19
2.5	Digitale Bildbearbeitung	21
2.5.1	Fast-Fourier-Transformation	22
2.5.2	Korrelation und Faltung	25
2.6	Newtonsche Flüssigkeit auf rotierender Scheibe	26
3	Experimentelle Methoden	30
3.1	SU-8 Masterwafer Herstellung	31
3.2	Probenpräparation	35
3.2.1	PDMS Mikrokanalpräparation	35
3.2.2	Charakterisierung der Mikrokanäle	36
3.2.3	DNA-Fluoreszenzmarkierung	37
3.3	Aufbau der Messapparatur	37
3.4	Durchführung der Mobilitätsmessungen	39

3.5	Kurvenfit	40
4	Ergebnisse und Diskussion	42
4.1	SU-8 Eichkurven	42
4.2	Mikrokanal-Abmessungen	44
4.3	Mobilitätsbestimmung mittels Kreuzkorrelation	49
4.4	Migration und Mobilitäten in strukturierten Kanälen	54
4.4.1	Freie Mobilität in 20 μm Kanälen	55
4.4.2	1.5 μm Kanäle	55
4.4.3	3.0 μm Kanäle	63
4.4.4	5.0 μm Kanäle	63
5	Zusammenfassung & Ausblick	69
	Literaturverzeichnis	71
	Danksagung	79

1 Einleitung

Die DNA-Elektrophorese ist heute die Standardmethode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge. Das *Human-Genom-Projekt*, das sich mit der Entschlüsselung bzw. Sequenzierung des menschlichen Genoms befaßt, wurde auch mittels Elektrophorese-Techniken (EP-Techniken) durchgeführt. Die Verkündung der vollständigen Entzifferung vor einiger Zeit bedeutet nicht, daß kein Interesse mehr an der Sequenzierung bestünde¹. Das Gegenteil ist der Fall. Man erhofft sich durch die Kenntnis weiterer in der Natur vorkommender Genome anderer Spezies, Heilmittel für Krankheiten zu finden.

Auch für analytische Zwecke, z.B. die Früherkennung von Erbkrankheiten, und für die biometrische Verschlüsselung sowie Erkennung [1, 2] werden EP-Techniken benötigt. Die heute verwendeten Methoden sind jedoch zu langsam, als daß man sie zur schnellen Diagnose verwenden könnte. Zwar gibt es für die Elektrophorese ein sehr gutes theoretisches Verständnis über die physikalischen Mechanismen, die die Breiten und Formen der Peaks in den Elektropherogrammen beschreiben, doch sind diese qualitativer Natur und können kaum für die Entwicklung neuer effizienterer Techniken herangezogen werden [3, 4].

In dieser Arbeit wurde die Migration von drei DNA-Molekülsystemen unterschiedlicher Länge in strukturierten Mikrokanälen untersucht. Bei den DNA-Molekülsystemen handelt es sich um $\Phi X174$ -, λ - und T2-DNA, die 5,4 kbp, 48,5 kbp bzw. 164 kbp lang sind. Die strukturierten Kanäle bestanden aus periodischen Einheiten, die eine charakteristische Kanalbreite von 1,5 μm , 3,0 μm und 5,0 μm hatten. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Mobilitäten der DNA-Moleküle in den selbst hergestellten Kanälen mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops und einer empfindlichen CCD-Kamera zu bestimmen. Die Bestimmung der Mobilität erfolgte mittels einer automatisierten Kreuzkorrelationsanalyse.

¹Am 11.06.2002 ist in der *New York Times* ein Artikel erschienen, der auf über 100 schwerwiegende Fehler in den Gen-Karten hinweist.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 DNA-Struktur

Die DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*) ist das bekannteste in der Natur vorkommende Polymermolekül. Sie ist der Träger der Erbinformation. Die Fähigkeit der Informationsspeicherung ist dabei in ihrer Basensequenz begründet.

Zwei komplementäre Polymerstränge winden sich um eine gemeinsame Achse und bilden dabei eine Doppelhelix. Komplementär heißt, daß sich die vier verschiedenen Monomereinheiten, die Nukleotide (Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin), paarweise nur so anordnen, daß A mit T und G mit C paart. Bei der Zellteilung wird der Doppelstrang wieder aufgelöst, so daß den zwei Zellen je eine exakte Kopie des Einzelstrangs vorliegt. Durch Polymerasen wird jeder Einzelstrang in einer Zelle wieder zu einem Doppelstrang vervollständigt. Abb. 2.1 und Abb. 2.2 zeigen ein Kalotten- sowie Stabmodell der DNA und einen Ausschnitt aus der Strukturformel.

Die bereits angesprochenen Nukleotide A, T, G und C stehen dabei z.B. für A für 2'-*Desoxyadenosin-5'-monophosphat* [5]. Ein Nukleotid besteht also aus einem Zucker, der 2-*Desoxyribose*, der am 5'-C-Atom mit Phosphat verestert ist sowie einer am 1'-C-Atom angekoppelten Base. Die Basen sind die *Pyrimidinderivate Cytosin* und *Thymin* sowie die *Purinderivate Adenin* und *Guanin*. Der Einfachheit halber werden die Nukleotide nach ihren Basen benannt. Einzelsträngige ssDNA erhält man durch Veresterung der 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose des einen Nukleotids mit der sauren Hydroxylgruppe der Phosphatgruppe eines anderen Nukleotids [6]. Das eine Ende der Kette hat eine freie Hydroxylgruppe am 3'-Ende und das andere eine Phosphateinheit am 5'-Ende. Zwei antiparallel um eine gemeinsame Achse gewundene ssDNA-Stränge bilden die dsDNA. Diese Doppelhelix wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen stabilisiert. Dabei paart Adenin nur mit Thymin über zwei Wasserstoffbrückenbindungen und Guanin nur mit Cytosin über drei Wasserstoffbrückenbindungen.

Die „normale“ Konfiguration der DNA, die B-DNA oder Watson-Crick-Helix, ist in

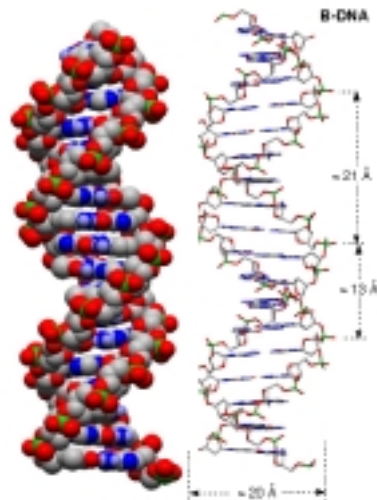


Abbildung 2.1: Kalotten- und Stabmodell der B-DNA

Die nach innen gerichteten Basen bilden mit dem nach außen gerichtetem Zucker-Phosphatrückgrad das Polymermolekül. (Quelle: www.oci.unizh.ch/edu/lectures/material/AC_BII)

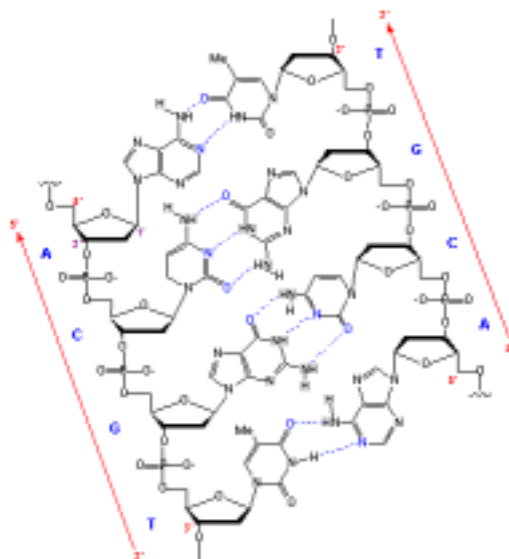


Abbildung 2.2: Ausschnitt aus der DNA-Strukturformel

Zwei antiparallele und komplementäre Polymerstränge bilden die dsDNA. Guanin (G) paart dabei nur mit Cytosin (C) über drei und Adenin (A) nur mit Thymin (T) über zwei Wasserstoffbrückenbindungen. (Quelle: www.oci.unizh.ch/edu/lectures/material/AC_BII)

lebenden Systemen durch folgende Parameter gekennzeichnet [7, 6]:

- Durchmesser der Helix $\simeq 2,37 \text{ nm}$
- Abstand benachbarter Basen $\simeq 0,34 \text{ nm}$
- rechtshändig um 36° gegeneinander verdreht, d.h. Periodizität von 10 bp bzw. $3,4 \text{ nm}$
- Persistenzlänge von $30 \text{ nm} \leq l_p \leq 60 \text{ nm}$

Für die linkshändige Z-DNA, sowie auf andere Konformationen sei auf die Literatur verwiesen [8].

2.2 Das Statistische Knäuel

Das Verhalten von unterschiedlichen Polymeren kann durch universell gültige Skalierungsgesetze beschrieben werden, obwohl sich der chemische Aufbau ihrer Untereinheiten stark unterscheiden kann. Grundlegende Arbeiten auf diesem Gebiet wurden von Flory zusammengefasst und später in den 70'er Jahren von de Gennes erweitert [9]. Im Folgenden sollen die wichtigsten Ergebnisse für das *freely-jointed-chain (FJC)*, *freely-rotating-chain (FRC)*, und *worm-like-chain-Modell (WLC)* kurz dargestellt werden.

FJC: Beim FJC wird angenommen, daß eine Kette aus N gleich langen starren Abschnitten l_0 besteht, deren Bindungswinkel zufällig sein können. d.h. die Kette vollführt einen sogenannten *random walk* [10].

Zunächst soll aber der allg. End-zu-End Abstand (s. Abb. 2.3)

$$\vec{R}_i = \sum_{i=1}^N \vec{l}_i$$

für eine Kette aus N Gliedern definiert werden, deren Glieder \vec{l}_i verschieden lang sein können. Die Einführung des gemittelten quadratischen End-zu-End Abstand $\langle R_e^2 \rangle$ ergibt allg. für verschieden lange Kettensegmente \vec{l}_i ,

$$\begin{aligned} \langle R_e^2 \rangle &= \langle \vec{R}_i \cdot \vec{R}_j \rangle \\ &= \left\langle \left(\sum_{i=1}^N \vec{l}_i \right) \cdot \left(\sum_{j=1}^N \vec{l}_j \right) \right\rangle \\ &= \sum_{i=1}^N l_i^2 + 2l^2 \sum_{1 < j < N} \langle \cos \vartheta_{ij} \rangle . \end{aligned} \quad (2.1)$$

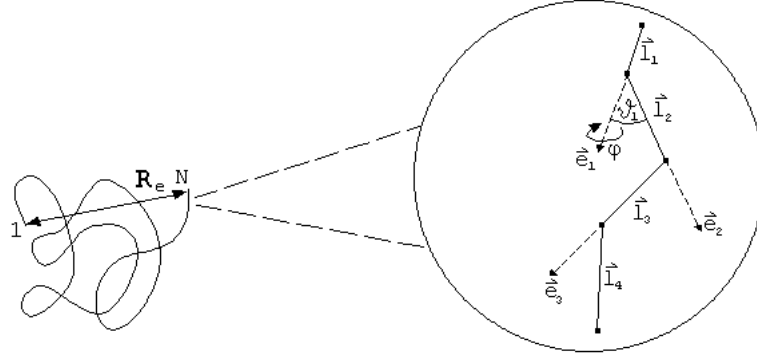


Abbildung 2.3: Statistisches Knäuel

Ein aus N -Segmenten bestehendes Knäuel mit End-zu-End-Abstand R_e .
Für eine FRC und WLC gilt $l_0 = |\vec{l}_i| = |\vec{l}_j|$.

Für den Fall der FJC vereinfacht sich der Ausdruck der Gl. (2.1) zu

$$\langle R_e^2 \rangle = N l_0^2, \quad (2.2)$$

da ja nach Annahme alle Abschnitte $l_0 = |\vec{l}_i| = |\vec{l}_j|$ gleich lang sein sollen. Der rechte Term der Summe über die gemittelten Winkel in Gl. (2.1) ist 0, da ja nach Annahme alle Winkel gleich wahrscheinlich sind. Der Gyrationradius, definiert durch

$$R_g = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{l_i^2}{N}}$$

läßt sich für eine zufällig geknäuelte Kette aus $N + 1$ Gliedern zu

$$\bar{R}_g^2 = \langle R_g^2 \rangle = \frac{N}{6} \cdot \frac{N+2}{N+1} l_0^2$$

berechnen. Der Gyrationradius \bar{R}_g ist dabei eine charakteristische Größe, die die DNA in Lösung bei fehlenden äußeren Kräften beschreibt, während sie fluktuierende Zufallskonformationen annimmt. Für große N wird der Gyrationradius zu

$$\bar{R}_g^2 = \frac{N l_0^2}{6} = \frac{\bar{R}_e^2}{6}. \quad (2.3)$$

Nähere Betrachtungen für den End-zu-End Abstand zeigen, daß dieser einer Gaußverteilung folgt [10].

Das FJC kann daher auch mit einer Gauß'schen Kette betrachtet werden, wobei angenommen wird, daß die Längen der Kettensegmente \vec{l}_j gaußverteilt um die Bindungslänge l sind. Die Gaußverteilten Kettensegmente werden durch die Verteilungsfunktion

$$P(L) = \left(\frac{3}{2\pi Nl^2}\right)^{3/2} \exp\left(-\frac{3L^2}{2Nl^2}\right) \quad (2.4)$$

beschrieben, wobei L die Konturlänge darstellt. Der End-zu-End Abstand ist über $\bar{R}_e = \int_0^L P(L)L^2 dL = Nl^2$ gegeben.

FRC: Das FRC-Modell ist gegenüber dem FJC-Modell ein verbessertes Modell. Bisher wurden alle Bindungswinkel und Verdrehungen der Segmente zugelassen. Beispielsweise betragen die vier beim Kohlenstoffatom durch *sp³-Hybridisierung* gebildeten Bindungswinkel $\vartheta \sim 70, 53^\circ$. Durch bevorzugte Winkel erhält das Molekül eine gewisse Steifigkeit, die durch die Persistenzlänge l_p ausgedrückt wird. Dadurch wird mit Gl. (2.1) in der Grenzwertbetrachtung für $N \rightarrow \infty$ zu

$$\bar{R}_e^2 \simeq Nl^2 \left(\frac{1 + \langle \cos \vartheta \rangle}{1 - \langle \cos \vartheta \rangle} \right)$$

Durch Einführen einer effektiven Segmentzahl N_e und Segmentlänge l_k , wobei die Konturlänge $L = N_e l_k$ ist, kann der End-zu-End Abstand auch als

$$\bar{R}_e^2 = N_e l_k^2 \quad (2.5)$$

geschrieben werden. l_k ist dabei die sogenannte Kuhnlänge, die wie später beim WLC gezeigt wird, mit der doppelten Persistenzlänge in Verbindung gebracht werden kann.

WLC: Beim WLC sind die betrachteten Bindungslängen l_0 konstant. Verdrillungen zweier Bindungen um φ sind ebenfalls erlaubt. Die Bindungswinkel sorgen wie beim FRC-Modell für eine Versteifung des Systems [10]. Die Krümmung der Polymerkette kann als Änderung des Tangentenvektors entlang der Kettenkontur betrachtet werden. Der Tangentenvektor am Punkt r_j sei, wie in Abb. 2.3 gezeigt, ein Einheitsvektor \vec{e}_j an der entsprechenden Bindungsstelle. Für den diskreten Fall, der hier besprochen werden soll, ist die Krümmung also durch die Differenz zweier aufeinander folgender Einheitsvektoren

$$|\vec{e}_j - \vec{e}_{j-1}| \quad (2.6)$$

gegeben.

Mit der einfachen Annahme, daß die Biegungsenergie einem harmonischen Potentialverlauf folgt, ist der Hamilton-Operator

$$H_b = \frac{\kappa}{2} \sum_{j=2}^N (\vec{e}_j - \vec{e}_{j-1})^2.$$

κ ist dabei die Biegesteifigkeit des Systems. Aufgrund einfacher geometrischer Überlegungen kann Gl. (2.6) als $2 \sin \vartheta_j^2$ ausgedrückt werden. Bei hohen Biegeenergien erhält man nur kleine Bindungswinkel ϑ_j , womit der Hamilton-Operator zu

$$H_b = \frac{\kappa}{2} \sum_{j=2}^N \vartheta_j^2$$

vereinfacht wird.

Mit Hilfe der statistischen Mechanik erhält man über die Zustandssumme die Verteilungsfunktion der Kettenkonfiguration direkt aus dem Hamilton-Operator [10]. Für die Konformation der WLC ergibt sich

$$P(\{\vartheta_j\}) = \left(\frac{E}{2\pi k_B T} \right)^{N-1/2} \exp \left(-\frac{E}{2k_B T} \sum_{j=2}^N \vartheta_j^2 \right).$$

Der Vergleich mit Gl. (2.4) zeigt, daß $P(\{\vartheta_j\})$ eine Gaußverteilung der Bindungswinkel ϑ_j beschreibt. Dadurch erhält man für den mittleren quadratischen End-zu-End Abstand

$$\bar{R}_e^2 = 2l_p^2 \left[\exp \left(-\frac{L}{l_p} \right) + \frac{L}{l_p} - 1 \right]. \quad (2.7)$$

Für sehr lange Ketten $L > l_p$ ergibt sich

$$\bar{R}_e^2 \simeq 2l_p L = l_k L = N l_k^2. \quad (2.8)$$

Zusammengefaßt kann gesagt werden, daß bei allen bisher betrachteten Modellen der mittlere Gyrationradius mit $\langle R_g \rangle \propto N^\nu$ skaliert. Dabei ist

$$\nu = \frac{1}{2} \quad (2.9)$$

der sogenannte Flory-Exponent.

Self-Avoiding-Chain: In den bisherigen Betrachtungen wurden langreichweitige Wechselwirkungen vernachlässigt. Aufgrund der Flexibilität des Polymers kann sich dieses nach einer Länge $l > l_p$ zurückfalten, sich aber nicht selbst durchdringen. Genaugenommen ist das eine lokale, kurzreichweitige Wechselwirkung, die jedoch langreichweitig über die Konturlänge wirkt. Wegen dieses Effektes, des sogenannten ausschließenden Volumens (engl. *self-excluded-volume*), wächst das Knäuel nicht mit $\nu = \frac{1}{2}$, sondern mit $\nu = \frac{3}{5}$ an. Genauere Berechnungen ergeben $\nu = 0,588 \pm 0,001$ [9, 11]. Mit der Flory-Theorie kann gezeigt werden, daß der Flory-Exponent von der Dimension d des betrachteten Systems abhängt. Allgemein gilt $\nu = \frac{3}{2+d}$.

2.3 Geladene Teilchen in Lösung

In diesem Abschnitt soll das Verhalten eines geladenen Moleküls in einer Elektrolytlösung betrachtet werden. Das geladene Molekül hat eine Störung der in der Lösung befindlichen Ionen zur Folge [7]. Im Gleichgewicht halten sich die elektrostatischen und Brown'schen Kräfte die Waage. Kondensation von Gegenionen an das Molekül ergibt die sogenannte *starre Schicht*, an die sich die *diffuse Schicht* anschließt. Beide Schichten zusammen werden als die *elektrische Doppelschicht* bezeichnet (s. Abb. 2.4). Die Dicke der starren Schicht ist durch die Bjerrum-Länge

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r k_B T}$$

gegeben, wobei e die Ladung, $k_B T$ die thermische Energie und $\epsilon = \epsilon_0\epsilon_r$ die Dielektrizitätskonstante ist. Für Wasser bei Raumtemperatur ist $l_B \simeq 0,7 \text{ nm}$ mit $\epsilon_r = 80$ [7, 12].

In der Zentralfeldnäherung ist das elektrische Potential V durch Lösen der Poisson-Boltzmann-Gleichung

$$\epsilon_0\epsilon_r \Delta V = - \sum_k z_k C_k \exp\left(-\frac{ez_k V}{k_B T}\right) \quad (2.10)$$

gegeben. ez_k und C_k sind die Ladung und Gesamtkonzentration einer Ionensorte k .

Die Lösung von Gl. (2.10) beschreibt einen exponentiellen Abfall des Potentials

$$V = V_0 \exp(-\kappa r) \quad (2.11)$$

in der diffusen Schicht, wobei

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{\epsilon_0\epsilon_r k_B T}{e^2 \sum_k z_k C_k} \right)^{1/2} \quad (2.12)$$

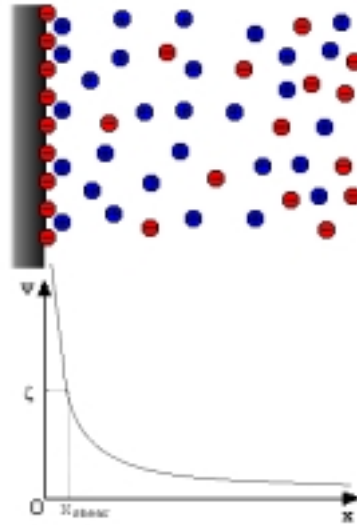


Abbildung 2.4: Elektrische Doppelschicht

Eine starre und diffuse Schicht bilden die elektrische Doppelschicht. Das ζ -Potential befindet sich an der Stelle, an der Scherkräfte auftreten.

die Debye-Länge bzw. Abschirmlänge ist.

2.3.1 Elektroosmose

Die Elektroosmose, die in der Plattengelektrophorese für Verbreiterungen der Auftrennungsbanden sorgt, wird in der Kapillargelektrophorese zum Teil dafür ausgenutzt, um alle Teilchen in eine gewünschte Richtung zu pumpen. Der elektroosmotische Fluß wird hierbei durch die Bewegung der Gegenionen ausgelöst und kann durch Lösen der Navier-Stokes-Gleichung beschrieben werden:

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta}{\eta}. \quad (2.13)$$

EOF steht für die Abkürzung des durch die Elektroosmose erzeugten *elektroosmotischen Flusses*. Das ζ -Potential (s. Abb. 2.4) ist an der Grenzfläche zwischen der starren und diffusen Schicht definiert, an der Scherkräfte auftreten. Gl. (2.13) läßt sich als Funktion der Oberflächenladung σ zu

$$\mu_{EOF} = \frac{\sigma}{4\pi\eta\kappa} \quad (2.14)$$

umschreiben. Je höher die Oberflächenladung ist, desto höher ist die elektroosmotische Mobilität. Andererseits gilt, je höher die Ionenkonzentration des Elektrolytpuffers ist, desto kleiner ist κ^{-1} und desto kleiner ist die elektroosmotische Mobilität, da $\kappa^{-1} \propto \frac{1}{\sqrt{C}}$. In Kanälen, deren Durchmesser größer als die Debye-Länge sind, kann gezeigt werden, daß das so erzeugte Geschwindigkeitsvektorfeld außerhalb der Debye-Schicht isotrop ist.

2.3.2 Elektrophoretische Mobilität

In diesem Abschnitt wird nach Einführung der Mobilität gezeigt, warum die DNA-Elektrophorese in freier Lösung nicht möglich ist.

Auf ein geladenes Teilchen mit der Ladung q , das sich zwischen unterschiedlichen Potentialen ϕ_1, ϕ_2 befindet, wirkt die Kraft

$$\vec{F}_e = -q \text{grad}\phi = q\vec{E}.$$

Das geladene Teilchen wird durch die Kraft solange beschleunigt, bis diese gleich der geschwindigkeitsabhängigen Reibungskraft

$$\vec{F}_R = -f \cdot \vec{v}$$

ist. Im Gleichgewicht, welches typischerweise nach $10^{-11}s$ erreicht ist [13], beträgt die Geschwindigkeit

$$v_{equi} = \frac{qE}{f}.$$

Die Normierung der Geschwindigkeit auf das elektrische Feld wird bezeichnet als die Mobilität

$$\mu = \frac{v_{equi}}{E} = \frac{q}{f}.$$

Unterschiede in der Ladung, Form, Größe und damit auch Masse wirken sich auf die Mobilität aus. Für ein globuläres, undurchdringbares Teilchen gilt für den Reibungskoeffizient f nach Stokes

$$f = 6\pi r\eta. \tag{2.15}$$

Aus der Dichte ρ des Teilchens und dem Volumen $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ ergibt sich für die Masse $m = \rho V$. Dadurch erhält man für ein massives, globuläres Teilchen eine Abhängigkeit des Reibungskoeffizienten $f \sim m^{1/3}$ von der Masse.

Für DNA gilt dieses jedoch nicht, da sie sich wie ein sogenanntes *free-draining-coil* [14, 13] verhält und somit $f \sim m$ wird. Anschaulich läßt sich das mit Hilfe des eingenommenen Volumens erklären. Das von der DNA selbst eingenommene Volumen

$V = \frac{(2nm)^2}{4} \cdot \pi \cdot L$ ist wesentlich kleiner als das durch den Gyrationradius beschriebene Volumen. Das durch den Gyrationradius beschriebene Volumen ist daher hauptsächlich hohl bzw. leer, so daß die Fläche, die der Reibung Angriffsfläche bietet, sehr klein ist. Zusammen mit der zweifach negativen Ladung pro DNA-Basenpaar ist die Mobilität des Moleküls dieselbe wie für jedes einzelne Segment, d.h.

$$\mu_{eff} = \frac{q}{f} \simeq \frac{2N}{N} = const. \quad (2.16)$$

Daher liefert die Elektrophorese in freier Lösung keine Auftrennung nach Länge. Die elektrophoretische Mobilität μ_{EP} muß bei nicht vernachlässigbarem EOF zu

$$\mu = \mu_{EP} + \mu_{EOF} \quad (2.17)$$

angepaßt werden. Wie bereits beschrieben muß die Elektrophorese in Gelnetzwerken bzw. in verschlachten, d.h. verdünnten Polymernetzwerken durchgeführt werden.

2.3.3 DNA als Polyelektrolyt

Unter einem Polyelektrolyten versteht man ein Makromolekül, das aus ionisierbaren Gruppen besteht [12]. Das Lösen in einem polaren Lösungsmittel wie Wasser bewirkt im Fall der DNA, daß die Phosphatgruppen teilweise deprotoniert werden. Unter physiologischen Bedingungen ist die DNA pro Basenpaar zweifach negativ geladen. Durch die nun auch vorhandene langreichweitige Coulomb-Wechselwirkung entlang der DNA-Kette werden ihre Eigenschaften derart verändert, daß sich die Skalierungsgesetze anders verhalten.

Mit der Zentralfeldnäherung für die freie Energie [12]

$$F = k_B T \frac{R^2}{Nl^2} + k_B T l_B \frac{N^2}{R} \quad (2.18)$$

läßt sich ein Skalierungsgesetz für R_g eines unendlich verdünnten Systems abschätzen. R ist hierbei eine für das System typische Längenskala. Der erste Term von Gl. (2.18) beschreibt den Fall der Gaußschen Kette mit dem End-zu-End Abstand $\langle R_e^2 \rangle = Nl^2$, der zweite Term die elektrostatische Energie der N Abschnitte. Minimierung der freien Energie im Gleichgewicht bzgl. R liefert

$$R \sim N(l_B l^2)^{1/3} \propto R_g,$$

d.h. ein linearer Anstieg mit der Kettenlänge gegenüber $R_g \sim l\sqrt{N}$ für eine Gaußsche Kette und $R_g \sim lN^{3/5}$ [12] für eine *self-avoiding-chain*. Die langreichweitige Coulomb-Wechselwirkung bewirkt daher eine Vergrößerung des Systems sowie der Persistenzlängen.

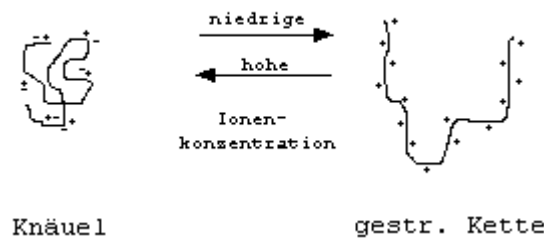


Abbildung 2.5: Konformation in Abhängigkeit der Ionenkonzentration

Bei hoher Ionenkonzentration nehmen Polyelektrolyte aufgrund einer kurzen Abschirmlänge eine Knäuelkonformation ein. Bei niedrigen Ionenkonzentrationen verursacht die langreichweitige Coulombwechselwirkung eine Versteifung des Systems.

Bei hohen Salzkonzentrationen ist die Abschirmlänge κ^{-1} so kurz ($\sim 1 - 3 \text{ nm}$) [7], daß die DNA als vollständig abgeschirmt betrachtet werden kann und daher kaum Coulomb-Wechselwirkungen zu erwarten sind. Da in dieser Arbeit Konzentrationen von bis zu 50 mM NaCl verwendet wurden, kann von diesem Fall ausgegangen werden. Typische Werte für die Persistenzlänge l_p bei sehr hohen sowie niedrigen Ionenkonzentrationen bei $pH 8$ sind [15]:

- $l_p = 53 \text{ nm}$ ($10 \text{ mM} - 100 \text{ mM Na}^+$)
- $l_p = 300 \text{ nm} - 350 \text{ nm}$ ($< 0,1 \text{ mM Na}^+$)

2.4 DNA-Elektrophorese

Die DNA-Elektrophorese wird hauptsächlich in Polyacrylamid- oder Agarose-Gelen bzw. verdünnten, sogenannten verschlauften Polymerlösungen durchgeführt, da Auftrennungen in freier Lösung für Basenpaarungen ≥ 20 , wie in Kapitel 2.3.2 gezeigt, nicht möglich sind [14, 16]. Aufgrund der in Plattengelen benötigten hohen Probenmengen sowie des großen Zeitaufwandes, werden heute für schnelle Analysen hauptsächlich Kapillargel-elektrophoresetechniken verwendet. Die Auftrennung in Gelen ist jedoch nur bis zu einer Länge von ca. 20 kbp durchführbar. Durch gepulste Wechselfelder läßt sich der Auftrennungsbereich in Plattengelen bis auf 2 Mbp erhöhen, doch geht dieses mit einem

Verlust in der Auflösung und erheblich größerem Zeitaufwand einher. Die Migration der DNA durch die Gelporen kann dabei grob in drei Bereiche aufgeteilt werden [7, 17-29], die in den nächsten Abschnitten näher erläutert werden. Anschließend werden neue Konzepte der DNA-Auftrennung am Beispiel der entropischen Falle und entsprechender molekulardynamischer Simulationen (MD-Simulationen) aufgezeigt. Im letzten Abschnitt wird die Mikrochip-Elektrophorese vorgestellt, die äußerst wenig Probensubstanz und Messzeit benötigt. Zunächst sollen aber zwei experimentelle Methoden zur Untersuchung der DNA-Elektrophorese vorgestellt werden.

2.4.1 Experimentelle Untersuchung der DNA-Elektrophorese

Aufgrund der geringen lateralen Abmessung der DNA von ca. 2 nm ist es nicht möglich, diese mit einem einfachen optischen Mikroskop abzubilden. Das Abbe'sche Kriterium sagt aus, daß die mit einem Mikroskop maximal erreichbare Auflösung etwa der halben Wellenlänge des zur Untersuchung verwendeten Lichts entspricht. Mit einem Trick kann die DNA trotzdem sichtbar gemacht werden:

Die DNA muß selbst Licht aussenden. Mittels neu entwickelter Fluoreszenzfarbstoffe ist es möglich, einzelne DNA-Doppelstränge mit der Fluoreszenz-Videomikroskopie aufzuzeichnen [30].

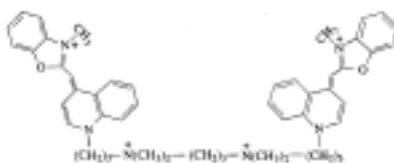


Abbildung 2.6: YOYO-1 Strukturformel [31]

Für diese Arbeit wurde als Fluoreszenzfarbstoff das YOYO-1 (*oxazole yellow-Homodimer*, Strukturformel s. Abb 2.6) aufgrund seiner hohen Quanteneffizienz von 0,52 [32-34] und der bis zu 1000-fach erhöhten Fluoreszenz im gebundenen Zustand gewählt [31, 35, 36]. Abb. 2.7 zeigt das Absorptions- und rotverschobene Emissionsspektrum des YOYO-1. Das YOYO-1 gehört zu der Klasse der sogenannten Interkalatoren. Die Interkalatoren zeichnen sich dadurch aus, daß sie, aufgrund ihrer planaren Struktur, zwischen den Basen doppelsträngiger DNA binden. Die Abb. 2.8 zeigt die Interkalation eines YOYO-1 verwandten Farbstoff, TOTO-1. YOYO-1 interkaliert aufgrund seiner Struktur dabei sogar zweimal in die dsDNA und ist daher ein Bisinterkalator. Die Interkalation induziert eine Strukturänderung der Doppelhelix. Von Ethidiumbromid (EtBr), einem

weiteren Interkalator ist z.B. bekannt, daß zirkuläre DNA-Moleküle wie das $\Phi X174$ ihre Form von negativ- bis positiv-superspiralisiert über die entspannte Form, je nach EtBr-Konzentration, ändern kann[37]. Durch die Interkalation von YOYO-1 in die DNA ändert sich auch die Persistenzlänge (66 nm) [79], wobei sich auch die Konturlänge für die λ -DNA von $16,5 \mu\text{m}$ auf ca. $20 \mu\text{m}$ ändert [38].

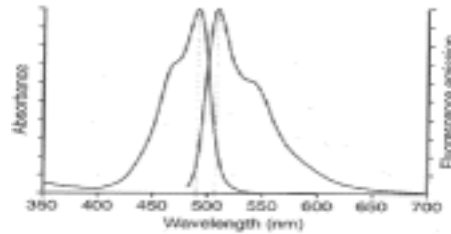


Abbildung 2.7: YOYO-1 Absorptions- und Emissionsspektrum ($491 \text{ nm}/509 \text{ nm}$)
(Quelle:www.probes.com)



Abbildung 2.8: Simulierte Interkalation des YOYO-1 verwandten TOTO-1 Moleküls in DNA

Linear-Dichroitische (LD) Spektroskopie wird benutzt, um die Orientierung der DNA-Helixachse während der Elektrophorese zu untersuchen [29, 27]. Als LD wird die Differenz des parallel polarisierten Licht zum dazu senkrecht polarisierten Lichts in Absorption bezeichnet. Aufgrund der Wechselwirkung des absorbierten polarisierten bzw. der elektrischen Vektorkomponente des Lichts mit dem Übergangsdipolmoment der DNA-Basen, können aus dem LD-Signal Rückschlüsse auf die DNA-Helixorientierung gezogen werden [29].

2.4.2 Migrationsmodelle

Wie bereits erwähnt, sind für die Weiterentwicklung neuer EP-Techniken tiefere Verständnisse über die DNA-Migration von besonderer Bedeutung. Daher wird auf die drei wichtigsten Migrationsmodelle eingegangen die in Abb. 2.9 schematisch dargestellt sind.

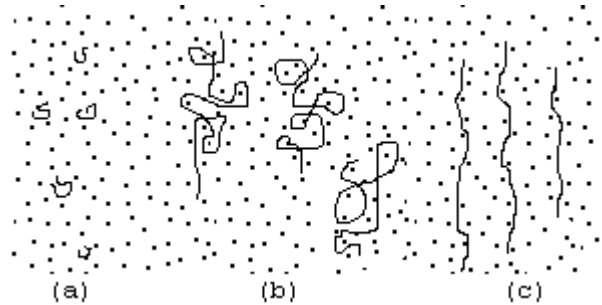


Abbildung 2.9: Migrationsregime

(a) Ogston-Sieb-Modell, (b) Reptation-Modell, (c) Biased-Reptation-Modell

Ogston-Modell: Die Gelelektrophorese kleiner DNA-Fragmente durch Gelporen in der Größenordnung des Gyrationradius der DNA wird durch das Ogston-Modell beschrieben. Erstmals wurde es von Ogston(1958) für sphärische Partikel, später von Giddings(1968), Chrambach(1970) und Rodbard(1971) für andere Partikelgeometrien zum *free-volume-Modell* erweitert [7].

Die um eine einstellbare Größe statistisch verteilten Gelporengrößen wirken dabei als Hindernisse für die globulären DNA Moleküle. In der Literatur wird es daher häufig auch das Ogston-Siebmodell genannt. Je größer die Moleküle gegenüber den Gelporen sind, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für Wechselwirkungen. Die vereinfachte grobe Annahme, das Verhältnis der Mobilitäten μ im Gel relativ zur freien Mobilität μ_0 sei $f = \mu/\mu_0$ und gleich dem Bruchteil des für die DNA im Gel einnehmbaren Volumen, beschreibt die Migration sehr gut. Für sphärische Moleküle mit Radius R ist

$$f = \frac{\mu}{\mu_0} \simeq \exp(-\pi vd(r + R)^2).$$

Dabei ist r der Radius einer Gelfaser, d der durchschnittliche Gelfaserabstand und v die durchschnittliche Anzahl der Gelfasern pro Volumen. vd ist hierbei proportional der Gelkonzentration C .

Doppeltlogarithmische Auftragung (sogenannter *Ferguson-Plot*) gegen die Gelkonzentration C führt zu der gut bekannten Beziehung

$$\log \mu = \log \mu_0 - \text{const} \cdot C \cdot (r + R)^2.$$

Die Steigung

$$K_r \propto (r + R)^2$$

entspricht dabei einem Abbremsungsfaktor K_r [7, 17].

Für nicht zu hohe elektrische Felder und lange DNA-Stücke beschreibt das Modell den Sachverhalt sehr gut. Doch für starke Felder wird das DNA-Knäuel deformiert und kann nicht mehr als sphärisch betrachtet werden. Auch für DNA-Moleküle, deren Gyrationradius R_g größer als die Gelporen sind, kann das Modell nicht mehr verwendet werden.

Reptation-Modell: Beim Reptation-Modell werden im wesentlichen zwei Annahmen gemacht [17]:

- Gelporen engen DNA-Moleküle so ein, daß die Fortbewegung schlangenartig entlang der eigenen Kontur abläuft, d.h. wie durch ein Röhrensegment seitlich begrenzt ist
- nicht zu hohe Felder ($< 10V/cm$)

Für den Fall schwacher Felder kann die Konfiguration der DNA-Kette noch als WLC bzw. Gaußsche Kette aufgefaßt werden, die von einem 3-dimensionalen Gelnetzwerk umgeben ist [16].

Durch Gleichsetzen der Einsteinrelation

$$D = \frac{k_B T}{f} = \frac{k_B T v}{F}$$

mit dem Reptation-Diffusionskoeffizienten

$$D_{rep} \simeq \frac{\langle R_e^2 \rangle}{N^3} \simeq N^{2\nu-3} \quad (2.19)$$

erhält man die elektrophoretische Mobilität μ . Mit Hilfe des quadratischen End-zu-End-Abstands, der mit $\langle \bar{R}_e^2 \rangle \propto N^{2\nu}$ skaliert [10] und der Annahme, daß die Kraft F proportional der Anzahl der Basenpaare N und des elektrischen Feldes E ist, erhält man für die elektrophoretische Mobilität zu

$$\mu = \frac{v}{E} = N^{2\nu-2} = \frac{1}{N}.$$

Dabei wurde für eine Gaußsche Kette nach Gl. (2.9) $\nu = \frac{1}{2}$ angenommen.

Insgesamt entspricht das einer 1-dimensionalen Diffusion bzw. dem *random walk* einer Röhre [7]. Das Modell kann allerdings die experimentell ermittelte längenunabhängige Mobilität von DNA bei höheren Feldern nicht erklären.

Biased-Reptation-Modell: Für hohe elektrische Felder kann das DNA-Molekül nicht mehr als WLC betrachtet werden. Durch das starke elektrische Feld wird die DNA entlang der Feldrichtung ausgerichtet. Schleifen bzw. Haarnadelkonfigurationen werden aufgrund der Streckung nicht mehr möglich. Mit der Streckung geht auch die längenabhängige Mobilität verloren.

Mit der einfachen Annahme, daß die gemittelte Orientierung der DNA dann gegeben ist, wenn die Brown'sche Molekularkraft gleich der elektrischen Kraft ist, dann ist die Mobilität gegeben durch

$$\mu = \frac{\mu_0}{3} \left(\frac{1}{N} + \frac{\varepsilon_{tp}^2}{3} \right).$$

ε_{tp} ist dabei das dimensionslose Verhältnis von thermischer Energie zu einer potentiellen elektrostatischen Energie die benötigt wird, um ein Fragment bestimmter Länge um dieselbe Strecke zu verschieben.

Für lange Ketten ist die Mobilität daher nur von der Feldstärke abhängig, was die experimentell ermittelte limitierende Mobilität erklärt. Da die Richtung der Migration beim Reptationmodell durch die Enden vorgegeben ist, muß das Modell für flexible, fluktuierende Enden angepaßt werden. Hierdurch verändert sich der Ausdruck für die Mobilität [7] zu

$$\mu = \mu_0 \sqrt{\frac{1}{3N^2} + \left(\frac{2}{5} \varepsilon_{tp} \right)^2}.$$

2.4.3 Molekulardynamische Simulationen

Da diese Arbeit von der theoretischen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Friederike Schmid begleitet wurde, sollen hier kurz die Grundlagen der Molekulardynamischen (MD) Simulationen aus der Diplomarbeit von Martin Streek [39] erläutert werden:

Die Monte-Carlo-Simulation ist eine Standardmethode zur Untersuchung von Gleichgewichtszuständen. Um das dynamische Verhalten eines Systems zu untersuchen, eignet sie sich daher nicht. MD-Methoden laufen darauf hinaus, die Newtonschen Bewegungsgleichungen

$$m_i \ddot{\vec{r}}_i = -\frac{\partial V}{\partial \vec{r}_i}$$

für das System zu lösen. m_i , \vec{r}_i und V sind dabei die Masse, der Ort des Teilchens i und das Potential, in dem sich die Teilchen befinden.

Im Experiment befindet sich die DNA in einem Lösungsmittel. Würde man alle Lösungsmittelmoleküle, die mit der DNA wechselwirken, bei der Berechnung in Betracht ziehen, so würde der Hauptteil der Simulationszeit für die nicht interessierenden Lösungsmittelmoleküle aufgewendet werden. Die Hauptidee der *Langevin-Dynamik* liegt darin, die Wechselwirkung der Lösungsmittelmoleküle mit der DNA durch eine statistische Kraft, die Brownsche Kraft, zu ersetzen. Einzelheiten dazu sind in der o. g. Arbeit zu finden. Die DNA selber wird als Kugel-Federmodell angenähert. Mehrere DNA-Basenpaare bilden jeweils ein „Monomer“, welche untereinander mit elastischen Federn verbunden sind. Der *excluded-volume-Effekt* sowie die Wechselwirkungen der Kette mit den Kanalwänden werden durch ein abstoßendes (12-6)-*Lennard-Jones-Potential* berücksichtigt.

Um die DNA-Migration mittels MD-Simulationen besser verstehen zu können, eignen sich Gelporen nicht, da diese zufällig verteilt und unterschiedlich groß sind. Künstliche Siebe [40] mit definierter Struktur vereinfachen die für die Simulationen nötigen Randbedingungen und verkürzen damit auch die benötigte Rechenzeit enorm. MD-Simulationen zur DNA-Elektrophorese in künstlichen Sieben sind bereits bekannt. Ein völlig neues Konzept stellen die entropischen Fallen dar [3, 41-44], die ebenfalls eine definierte Struktur besitzen und daher gut mit der MD-Simulation untersucht werden können. Die entropische Falle (s. Abb 2.10) besteht aus Regionen abwechselnd tiefer und schmaler Abschnitte. Die engen schmalen Bereiche sind dabei so gewählt, daß das DNA-Molekül ohne äußere Kräfte nicht in die Verengung diffundieren kann. Die Breite x der Verengung sollte daher in einem Bereich $l_p \ll x \leq R_g$ liegen. Die Tiefe der Box muß dagegen mindestens so groß sein, daß die DNA vollständig hineinpaßt, also mindestens eine Querschnittsfläche von $2R_g \cdot 2R_g$ besitzen.

Erst das Anlegen einer genügend starken Kraft zwingt die DNA durch Konformationsänderung durch die Konstriktion. Auf dem ersten Blick würde man für kurze DNA-Ketten eine höhere Mobilität als für lange Ketten erwarten, da der Verlust an freier entropischer Energie für kurze Ketten wesentlich geringer ist [39]. Überraschenderweise zeigen experimentelle Befunde, daß der umgekehrte Fall auftritt [41-43].

Anhand von Simulationen [39, 45, 46] wurde gezeigt, daß der entscheidende Moment darin besteht, daß sich eine erste DNA-Schleife in die verengte Zone begibt [39]. Durch diese wird der Rest der Kette wie durch ein Nadelöhr gezogen. Die Wahrscheinlichkeit der Schlaufenbildung ist dabei für längere Ketten höher. Ein weiterer Punkt ist in der Diffusion zu suchen, die wie in Abschnitt 2.4.2 gezeigt, mit $D \propto \frac{1}{N^2}$ abfällt. Kürzere Ketten können aufgrund der schnelleren Diffusion mit einer höheren Wahrscheinlichkeit

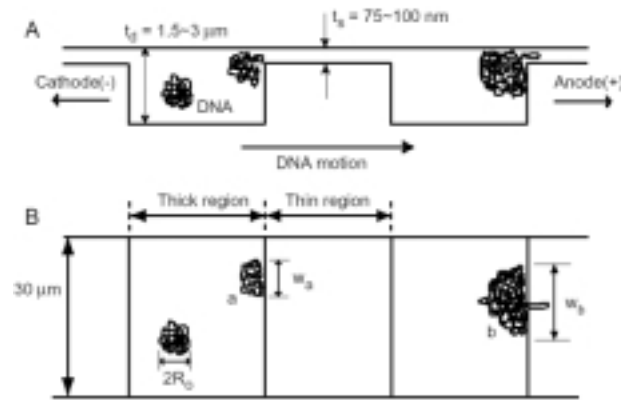


Abbildung 2.10: Entropische Falle [43]

Sie besteht aus abwechselnd tiefer und schmaler Bereiche. Die schmalen Bereiche sind größer als die Persistenzlänge, jedoch kleiner als der Durchmesser der DNA. Die tiefen Bereiche sind größer als der Gyrationradius.

noch aus der Konstriktion heraus diffundieren. Abb. 2.11 zeigt die Mobilität verschieden langer Ketten in Abhängigkeit der Feldstärke bei einer gegebenen Wandneigung, die von M. Streek mit der MD-Simulation gewonnen wurde.

Mit den MD-Simulationen kann auch gezeigt werden, daß die Mobilität für bestimmte Kettenlängen bei gegebenen Parametern einbricht. Dadurch ist es möglich, die Parameter im Voraus so festzulegen, daß man gewünschte Kettenlängen effizient auftrennen kann.

2.4.4 Mikrochip Elektrophorese

Wie bereits beschrieben werden für die Plattengelelektrophorese große Mengen an Probensubstanz benötigt. Auch der zeitliche Aufwand für einen Versuchsdurchlauf benötigt mehrere Stunden. Der explosionsartige Anstieg der Veröffentlichungen seit 1990, der heute bei bis zu 3000 Artikeln pro Jahr liegt [4], zeigt, daß an diesem Gebiet großes Interesse besteht. Mit der Einführung der Kapillarelektrophorese um 1990 konnte die benötigte Probenmenge auf ein tausendstel reduziert werden, wobei der zeitliche Aufwand auf ein zehntel gesenkt werden konnte. Die Verwendung von Kapillaren reduzierte die benötigten Probenmengen sowie das Oberflächen zu Volumenverhältnis, wodurch die Joulsche Wärme besser abgeführt werden konnte, die sonst die Trenneffizienz verringert hätte. Durch die bessere Abführung der Wärme konnten wiederum bis zu 100 mal höhere

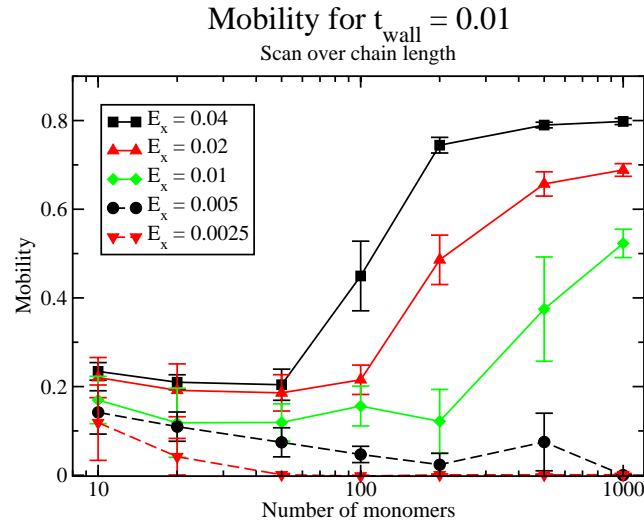


Abbildung 2.11: Mobilitätsdiagramm [39]

In Abhängigkeit der Anzahl der Kettenmonomere und der elektrischen Feldstärke ist die Mobilität in einer geeigneten Struktur gezeigt. Bei zu geringer Feldstärke bleiben die Ketten gefangen.

Feldstärken realisiert werden, wodurch der zeitliche Aufwand erheblich verringert werden konnte. Der Durchbruch der Kapillargelelektrophorese erfolgte 1999, als parallelisierte Kapillargelelektrophorese-Sequenzierer kommerziell erhältlich wurden. 95% des menschlichen Genoms wurden in den letzten zwei Jahren mit solchen Geräten entschlüsselt [4]. Die aufwendige Probenpräparation mußte aber immer noch von Hand durchgeführt werden. Manz et al. stellten Anfang der 90er das μTAS -Konzept (micro-total-analysis-system) [47] vor, auf dem auf einem einzigen Chip die gesamte Probenpräparation, Separation sowie Detektion untergebracht sein sollte. Aufgrund der Kompaktheit des Systems wird es heute auch *Lab-On-A-Chip* genannt [47]. Die Unterbringung der Probenpräparation ist dabei der schwierigste Teil, da diese nicht einfach auf die Vielfalt der chemischen Reaktionen angepasst werden kann. Mikroprobenmischer, die geringste Flüssigkeitsmengen schnell mischen, chemische Reaktionskammern sowie andere für die Probenpräparation notwendigen Einheiten konnten bereits realisiert werden [47]. Anregungs- und Detektionseinheit konnten ebenfalls bereits auf einem einzigen Chip mit Separationskanal untergebracht werden. Als Detektionseinheit diente eine μAPD (Avalanche-Photodiode) wenige μm vom Kanal entfernt [48].

Die DNA-Auftrennung in einem Mikrokanal von bis zu 100 μm Höhe und Breite wurde

bereits von mehreren Gruppen demonstriert [49-52]. Beispielsweise benötigten Zhou et al. (1300 bp-DNA) [50] und Liu et al. (500 bp-DNA) [49] für eine komplette Sequenzierung einer ssDNA in linearen Polyacrylamid weniger als zwei Stunden bzw. 20 Minuten, wobei beide Gruppen eine Genauigkeit oberhalb von 98,5% erzielten. Wolley et al. erreichten eine 97% Genauigkeit auf einer nur 3,5cm langen Auftrennungsstrecke. Dabei wurden 433 bp innerhalb 10 Minuten aufgetrennt [53]. Die erfolgreiche Parallelisierung auf Mikrochips (capillary array electrophoresis, CAE) wurde ebenfalls von Wolley et. al. und Simpson et. al. [54, 55] vorgeführt. Wolley et al. erzeugten auf einem einzigen Glas-Substrat insgesamt fünf Kanalkreuzungen. Mittels konfokaler Laserdetektion und einem beweglichen Spiegel konnten sie die Separationskanäle abrastern. In *Hydroxyethylcellulose* (HCL) trennten sie damit Fragmente der $\Phi X174$ -DNA (70 – 1000 bp) innerhalb von zwei Minuten auf, d.h. es wäre möglich, gleichzeitig fünf verschiedene Proben in zwei Minuten aufzutrennen. Simpson et. al. haben auf einem 4'-Wafer sogar 48 Separationskanäle mit 96 Probenreservoirs untergebracht. Dabei wurden 2x48 Proben, wie bei Wolley et. al. beschrieben, seriell innerhalb von acht Minuten detektiert. Würden 96 Proben hintereinander aufgetrennt werden, hieße das nur fünf Sekunden für jede Probe! Die schnelle Entwicklung auf dem Gebiet der Mikroprozessoren ist der Herstellung von $\mu T A S$ -Chips sehr entgegen gekommen. Diese basieren auf Mikrolithographietechniken, die in den 70er und 80er Jahren entwickelt wurden [8]. Bei der Laserablation bricht ein Hochleistungslaser die (chemischen) Bindungen eines Materials auf und hinterläßt so die gewünschten Strukturen [56, 57]. Eine ebenfalls weitverbreitete Methode ist die Abformung von Polymethylacrylat (PMMA) von einer mittels Mikrolithographie hergestellten Struktur. Durch *rapid prototyping*¹, das auch in dieser Arbeit verwendet wurde, wird in Kapitel 3.1 eingegangen.

2.5 Digitale Bildbearbeitung

Visuelle Beobachtungen von Vorgängen in der Natur spielen von Beginn an in den Naturwissenschaften eine wichtige Rolle. Objektive und quantitative Aussagen über solche Vorgänge wurden aber erst mit der Erfindung der Photographie möglich [63]. Der zeitliche Aufwand für manuelle Auswertungen der Bilder stieg, aufgrund der Möglichkeit der schnellen Bildaufnahme, ständig an, so daß die Auswertungen nicht mehr zu bewältigen waren. Als Beispiele seien hier Bilder aus der Astronomie oder Strömungsforschung so-

¹Genaugenommen entspricht das *rapid prototyping* den Schritten von der Maskenherstellung im „Fotokopiergeschäft“ [58, 59, 60, 61, 62] bis zur fertigen Kanalstruktur aus PDMS. Die Maske wurde in dieser Arbeit aber kommerziell erworben.

wie die Wasserstoffblasenkameraufnahmen der Hochenergiephysik genannt.

Die rasante Entwicklung in der Computerindustrie mit immer schnelleren Prozessoren und größeren Datenspeichern machte es möglich, die Auswertungsverfahren zu automatisieren. Die Erkennung von Objekten und die Analyse bewegter Objekte gestaltet sich immer noch als äußerst schwierig. Elementare Verfahren zur Bewegungsanalyse sind die differentielle, Tensor-, Korrelations-, und Phasenmethode [63].

Die differentielle- und Tensormethode basiert auf der Analyse der zeitlichen und räumlichen Grauwertänderung in den Bildsequenzen. Dabei wird aus jeweils zwei Graubildern das Differenzbild berechnet. Bewegte Objekte tauchen in dem so erhaltenen Differenzbild als helle Doppelkonturen auf, deren Abstände x durch die Geschwindigkeiten der Objekte und die zeitliche Verzögerung der Bilder gegeben sind. Diese Verfahren reagieren jedoch sehr empfindlich auf Variationen in der Beleuchtungsstärke.

Die Phasenmethode nutzt aus, daß die Phase des fouriertransformierten Bildes die Hauptinformation des Bildes trägt [63] und damit gegenüber Änderungen der Beleuchtungsstärke unabhängig ist.

Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur Bewegungsanalyse basiert auf der Korrelationsmethode. Durch die enge Verknüpfung von Korrelation, Faltung und Fourier-Transformation (FT) wird auf die 1-dimensionale Fast-Fourier-Transformation (FFT) eingegangen. Da für die Bewegungsanalyse in Kapitel 4.3 nur horizontale FFT durchgeführt wurden, braucht auf die N-dimensionale FT hier nicht eingegangen zu werden. Bei der horizontalen FFT werden die Zeilen als unabhängig voneinander angesehen, d.h. für M -Zeilen wird jeweils eine FT durchgeführt.

2.5.1 Fast-Fourier-Transformation

Die Fourierreihe spielt in der Physik eine wichtige Rolle, da es in der Natur viele Vorgänge gibt, die sich periodisch mit einer beliebigen Periode $2L$ wiederholen. Diese periodischen Vorgänge bzw. Funktionen lassen sich systematisch in ihre Teilfrequenzen

$$FR(f(x + 2nL)) = \frac{1}{2}a_0 + \sum_{n=1}^{\infty}(a_n \cos(nx) + b_n \sin(nx)) \quad (2.20)$$

zerlegen.

Das Auftrennen der Funktion in eine unendlich trigonometrische Reihe entspricht einer Projektion auf die Basisvektoren des Vektorraums L^2 der periodischen Funktionen [63]. Die Koeffizienten a_n und b_n lassen sich mit Hilfe der Orthogonalitätsrelationen der

trigonometrischen Funktionen zu

$$a_n = \frac{2}{L} \int_0^L f(x) \cos(nx) dx$$

$$b_n = \frac{2}{L} \int_0^L f(x) \sin(nx) dx$$

bestimmen.

a_n stellt dabei den geraden und b_n den ungeraden Anteil der Funktion dar. Mit Hilfe der komplexen Exponentialfunktion lassen sich die trigonometrischen Funktionen auch als

$$\sin(nx) = \frac{1}{2i}(e^{inx} - e^{-inx}) \quad (2.21)$$

$$\cos(nx) = \frac{1}{2i}(e^{inx} + e^{-inx}) \quad (2.22)$$

schreiben.

In Gl. (2.20) eingesetzt ergibt

$$\begin{aligned} FR(f) &= c_0 + c_1 e^{ix} + c_{-1} e^{-ix} + c_2 e^{2ix} + c_{-2} e^{-2ix} + \dots \\ &= \sum_{n=-\infty}^{\infty} c_n e^{inx} \end{aligned}$$

mit

$$\begin{aligned} c_0 &= \frac{1}{2} a_0 = \frac{1}{L} \int_0^L f(x) dx \\ c_n &= \frac{1}{2} (a_n - i b_n) = \frac{1}{L} \int_0^L f(x) (\cos(nx) - i \sin(nx)) dx \\ &= \frac{1}{L} \int_0^L f(x) e^{-inx} dx. \end{aligned}$$

Da man aus einem Experiment die Funktionswerte y_k an diskreten, äquidistanten Stützstellen x_k und nicht als kontinuierliche Funktion $f(x)$ erhält [63], muß c_n entsprechend angepasst werden.

Die Messpunkte (x_k, y_k) liegen $x_k = \frac{2\pi k}{n}$ voneinander entfernt. Mit $z = e^{-2\pi i/N}$ ergibt sich c_n nach Symmetrisierung zu

$$c_n = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=0}^{N-1} y_k z^{kn}.$$

Die Umkehrfunktion dazu lautet

$$y_j = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{n=0}^{N-1} c_n z^{-nj}.$$

Zur Berechnung aller Koeffizienten c_n , also der $\exp(\pm inx_k)$ sind daher für alle N -Koeffizienten N Beiträge zu berechnen. Damit wächst der Aufwand, die N -Koeffizienten zu finden mit N^2 an.

Durch geschicktes „Finden“ der Koeffizienten nach der *Divide-And-Conquer*-Strategie [63] läßt sich der Rechenaufwand erheblich verringern. Die FFT bedient sich solcher Strategien:

Bei den Stützstellen x_k handelt es sich um komplexe Einheitswurzeln ($\sqrt[n]{1} = e^{2\pi ik/n}$ mit $k = 0, 1, \dots, n-1$), d.h. es gibt maximal N verschiedene Werte für z , da

$$e^{2\pi i kn/N} = e^{2\pi i(kn \bmod N)/N} = z^{kn \bmod N}.$$

Es muß also ein Polynom der Form

$$c_n = P(x = z^n) = \sum_{k=0}^{N-1} y_k x^k$$

berechnet werden. Beispielsweise ließe sich dieses für den Fall, daß N eine Potenz von 2 ist, schreiben als

$$\begin{aligned} P(x) &= [y_0 + y_2 x^2 + \dots + y_{N-2} x^{N-2}] \\ &\quad + x[y_1 + y_3 x^2 + \dots + y_{N-1} x^{N-2}] \\ &= P_0(x^2) + xP_1(x^2). \end{aligned}$$

Die beiden Polynome bestehen jeweils aus $N/2$ Termen und beschreiben den geraden und ungeraden Anteil von $P(x)$. Da die beiden neuen Polynome von x^2 abhängen und x^2 ebenfalls eine Einheitswurzel ist, gibt es nur $N/2$ verschiedene Werte von x^2 . Rekursiv kann man den ganzen Prozess auf die Polynome P_0 und P_1 anwenden und erhält P_{00}, P_{01}, P_{10} und P_{11} , auf welche man die Prozedur wieder anwenden kann. Durch die Rekursionsform wird die Zahl der Rechenschritte auf einen Aufwand von $N \log_2 N$ reduziert. Für ein Bild mit beispielsweise M -Zeilen und $N = 1024$ Spalten würde sich der Aufwand einer horizontalen FFT um einen Faktor

$$\frac{M \cdot N^2}{M \cdot N \log_2 N} = \frac{N}{\log_2 N} \sim 100$$

reduzieren [63-65].

2.5.2 Korrelation und Faltung

Bei der Korrelationsmethode werden zwei aufeinanderfolgende Bilder g_1 und g_2 so verschoben, daß optimale Ähnlichkeit zwischen den beiden Bildern herrscht. Die Verschiebung kann dabei mit einem Verschiebungsvektor \vec{s} beschrieben werden. Beleuchtungsunterschiede in den zwei Bildern machen sich in einem konstantem Faktor im Ähnlichkeitsmaß $r(\vec{s})$ bemerkbar. Die gegeneinander verschobenen Bilder besitzen maximale Ähnlichkeit, wenn bei der *Cauchy-Schwarz-Ungleichung* Gleichheit auftritt [63]:

$$\left| \int_{-\infty}^{\infty} g_1(\vec{x}) \cdot g_2(\vec{x} \pm \vec{s}) d^2 x \right|^2 \leq \int_{-\infty}^{\infty} g_1^2(\vec{x}) d^2 x \cdot \int_{-\infty}^{\infty} g_2^2(\vec{x} \pm \vec{s}) d^2 x \quad (2.23)$$

Das Ähnlichkeitsmaß kann als

$$r(\vec{s}) = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} g_1(\vec{x}) \cdot g_2(\vec{x} \pm \vec{s}) d^2 x}{\sqrt{\int_{-\infty}^{\infty} g_1^2(\vec{x}) d^2 x \cdot \int_{-\infty}^{\infty} g_2^2(\vec{x} \pm \vec{s}) d^2 x}} \quad (2.24)$$

geschrieben werden.

Das Integral auf der linken Seite von Gl. (2.23) bzw. der Zähler von Gl. (2.24) ist die sogenannte Kreuzkorrelation bzw. Faltung. Die rechte Seite von Gl. (2.23) bzw. der Nenner von Gl. (2.24) kann als Normierungsfaktor aufgefasst werden.

Korrelation und Faltung unterscheiden sich dabei nur im Argument des zweiten Faktors. Mit Hilfe des Faltungstheorems [63] läßt sich die Faltung bzw. Korrelation zurückführen auf eine Multiplikation im Fourierraum. Tabelle 2.1 zeigt die Beziehung zwischen Korrelation und Faltung im Orts- und Wellenzahlraum. Das zurücktransformierte Fourierbild

	Ortsraum	Korrelation Wellenzahlraum (-)	Faltung Wellenzahlraum (+)
1-dim., diskret	$\frac{1}{N} \sum_{i=0}^{N-1} g_1(i) \cdot g_2(k \pm i)$	$\hat{g}_1(\vec{k}) \cdot \hat{g}_2(\vec{k})$	$\hat{g}_1(\vec{k}) \cdot \hat{g}_2^*(\vec{k})$
2-dim., diskret	$\frac{1}{NM} \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{M-1} g_1(i, j) \cdot g_2(k \pm i, l \pm j)$	$\hat{g}_1(\vec{k}, \vec{l}) \cdot \hat{g}_2(\vec{k}, \vec{l})$	$\hat{g}_1(\vec{k}, \vec{l}) \cdot \hat{g}_2^*(\vec{k}, \vec{l})$
N-dim., kont.	$\int_{-\infty}^{\infty} g_1(\vec{x}) \cdot g_2(\vec{x} \pm \vec{s}) d^N x$	$(2\pi)^N \hat{g}_1(\vec{k}) \cdot \hat{g}_2(\vec{k})$	$(2\pi)^N \hat{g}_1(\vec{k}) \cdot \hat{g}_2^*(\vec{k})$

Tabelle 2.1: Zusammenhang zwischen Korrelation und Faltung im Orts- und Wellenzahlraum

(*IFFT* Inverse-FFT) der beiden im Fourierraum miteinander multiplizierten Bilder ergibt dann die Faltung der Bilder. Um das kreuzkorrelierte Bild zu erhalten, muß das

zweite Bild bei der Multiplikation im Fourierraum zuvor noch komplex konjugiert werden:

$$Corr = IFFT(FFT(g_1) \cdot FFT(g_2)^*) \quad (2.25)$$

Entsprechend Gl. (2.24) liefert der Punkt mit der größten Amplitude, d.h. dem höchsten Ähnlichkeitsmaß, die wahrscheinlichste Verschiebung der Bilder gegeneinander.

Auf den Computer-Algorithmus zur Berechnung der Korrelation soll nicht weiter eingegangen. In Kapitel 4.3 sollen aber anhand von Beispielen zur Mobilitätsbestimmung die Eigenschaften der Kreuzkorrelationsanalyse gezeigt werden.

2.6 Newtonsche Flüssigkeit auf rotierender Scheibe

Dünne, homogen glatte Fotolackschichten sind für die Herstellung von Mikrostrukturen von besonderer Bedeutung. Eine schnelle und kostengünstige Methode dünne Fotolackschichten zu erhalten ist das sogenannte „*spin coaten*“. Hierbei wird ein Fotolack auf eine sich drehende Scheibe eines Substrats aufgebracht. Im Folgenden soll ein vereinfachtes Modell für die Entstehung eines gleichmäßig dicken Fotolacks auf einem Substrat behandelt werden. Dabei werden folgende vereinfachende Einschränkungen gemacht [66]:

- unendlich ausgedehnte Scheibe
- *Newtonsche Flüssigkeit*, d.h. Viskosität ist unabhängig von der Scherkraft
- vernachlässigbare Corioliskraft
- kein Verdunsten des im Fotolack befindlichen Lösungsmittels
- radial symmetrische und horizontale Scheibe
- dünne Flüssigkeits-/Fotolackschicht

Die letzten beiden Annahmen zur Vereinfachung des Modells dienen zur Vernachlässigung solcher Effekte, die durch gravitative Unterschiede verursacht werden. Ferner sei die Scherkraft nur zwischen horizontalen Ebenen (siehe Abb. 2.13) berücksichtigt. Für die Beschreibung des Problems eignen sich Zylinder-Koordinaten (r, θ, z) :

Zunächst einmal wirke auf einem Volumensegment der Fläche A und Höhe ∂z die Zentrifugalkraft

$$F_{Zentrifugal} = m\omega^2 r = A\partial z \rho \omega^2,$$

wobei, wie in Abb. 2.13 gezeigt, ρ die Dichte der Flüssigkeit und ω die Winkelgeschwindigkeit der Scheibe sind.

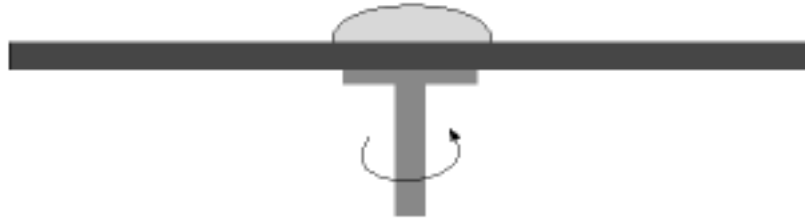


Abbildung 2.12: Rotierende Scheibe

Bevor der eigentliche Spin-Coat-Vorgang beginnt, muß der Photolack die Scheibe vollständig benetzen.

Die Scherung $\sigma_{shear} = -\eta \frac{\partial v}{\partial z}$ lässt sich durch den Geschwindigkeitsunterschied (s. Abb. 2.13) zwischen zwei Flüssigkeitsebenen angeben. Die Scherkraft ergibt sich mit der Fläche zwischen den Ebenen zu

$$F_{shear} = -A\eta \frac{\partial v}{\partial z}.$$

Im Gleichgewicht gilt

$$-\eta \frac{\partial^2 v}{\partial z^2} = \rho \omega^2 r.$$

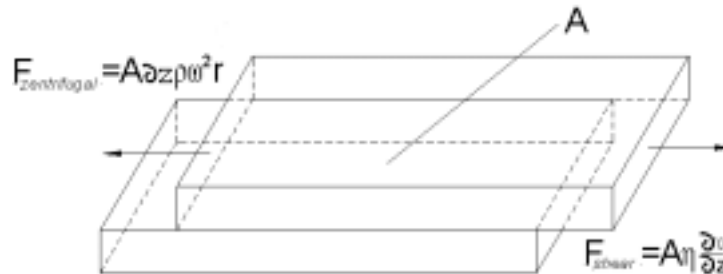


Abbildung 2.13: Scherung

Zwischen zwei Flüssigkeitsebenen wirken Scherkräfte, die durch Zentrifugalkräfte ausgeglichen werden.

Mit den Randbedingungen, daß die Geschwindigkeiten der Flüssigkeit an der Grenzfläche zum Substrat $v = 0$ und $\frac{\partial v}{\partial z} = 0$ für die Oberfläche sind, erhält man

$$v = \frac{1}{\eta} \cdot \left(-\frac{\rho \omega^2 r z^2}{2} + \rho \omega^2 r h z \right).$$

Der gesamte, durch den Einheitskreis gehende radiale Massenfluß q ist durch den Massenfluß über die gesamte Höhe des Flüssigkeitsfilms h (Abb. 2.14)

$$q = \int_0^h v dz = \frac{\rho \omega^2 r h^3}{3\eta} \quad (2.26)$$

gegeben. Mit Hilfe der Kontinuitätsgleichung

$$\frac{\partial h}{\partial t} = -\frac{1}{r} \cdot \frac{\partial(rq)}{\partial r}$$

und Gl. (2.26) erhält man eine Differentialgleichung für h in t

$$\frac{\partial h}{\partial t} = -\frac{\rho \omega^2}{3\eta} \cdot \frac{1}{r} \cdot \frac{\partial(r^2 h^3)}{\partial r}.$$

Für den speziellen Fall, daß

$$\frac{\partial h}{\partial r} = 0,$$

d.h. die Filmoberfläche von Beginn an eben war, vereinfacht sich die Differentialgleichung zu

$$\frac{\partial h}{\partial t} = -2 \cdot \frac{\rho \omega^2}{3\eta} \cdot h^3,$$

die eine einfache Lösung hat:

$$\begin{aligned} h &= \frac{h_0}{\sqrt{1 + 4 \cdot \frac{\rho \omega^2}{3\eta} h_0^2 t}} \\ &\approx \frac{\sqrt{3\eta}}{2\omega \sqrt{\rho t}} \\ &= k \cdot \frac{1}{\omega \sqrt{t}}, \quad \text{mit } k = \frac{1}{2} \cdot \sqrt{\frac{3\eta}{\rho}}. \end{aligned} \quad (2.27)$$

Gl. (2.27) beschreibt die Änderung der Filmdicke in Abhängigkeit von der Zeit und der Winkelgeschwindigkeit. Die Höhe einer dicken Fotolackschicht nimmt zu Beginn des *spin*-Vorgangs stärker ab als die einer dünnen Schicht. Unebenheiten der Filmoberfläche verschwinden also mit der Dauer der *spin coat*-Zeit. Dieses Verhalten gilt jedoch nur für *Newtonsche Flüssigkeiten*, und nicht bei Suspensionen oder hoch viskosen Flüssigkeiten, die in in der Lieteratur z.B. in [67] und [68] behandelt werden.

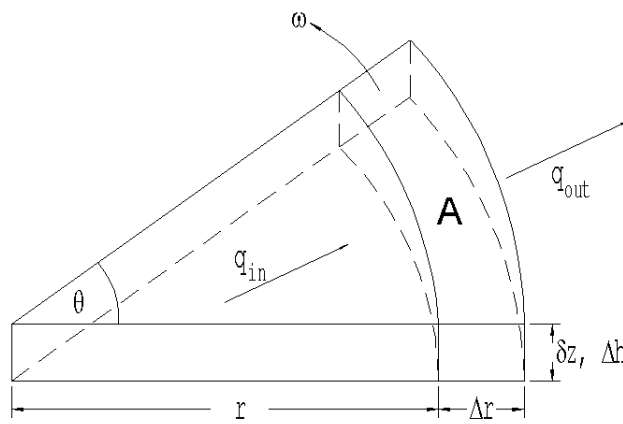


Abbildung 2.14: Massenfluß des Photolack durch ein Volumenelement $A \cdot \Delta h$ einer rotierenden Scheibe.

3 Experimentelle Methoden

Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit werden zunächst alle für die Präparation benutzten Verbrauchsmaterialien in der Tabelle 3.1 aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden:

Bezeichnung	Bezugsquelle	sonstige Informationen
Aceton	Riedel-de-Haen, D	p.A. 99,7%
β -Mercaptoethanol	Fluka, CH	
Deckgläser	Menzel Gläser, D	Größe 18 x 18 mm ²
EDTA	Sigma, D	Ethylenediaminetetraacetic acid
Ethanol p.A.	Roth, D	
HMDS	Merck, D	Haftvermittler, 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane
Isopropanol	Merck, D	p.A.
NaCl	Fluka, S	
Objektträger	Menzel Gläser, D	Größe 76 x 26 mm ²
PDMS	Sylgard 184, Dow Corning, D	Polydimethylsiloxan
Schwefelsäure	Merck, D	95%
Si-Wafer	CrysTec, D	P-Type (100), Dotierung Bor
SU-8 50	Microresist, D	
SU-8 Entwickler	s.o.	
SU-8 Verdünnner GBL	s.o.	
Wasser, reinst	MilliQ Anlage	
Wasserstoffperoxid	Merck, D	30%
YOYO-1	Molecular Probes, USA	1 mM in DMSO

Tabelle 3.1: Verbrauchsmaterialien

3.1 SU-8 Masterwafer Herstellung

Die Herstellungsparameter von SU-8 Photolackschichten sind vom Hersteller [69, 70] sowie in der Literatur [71-76] beschrieben. Die verschiedenen Prozeduren wurden dabei für diese spezielle Anwendung lediglich leicht angepasst. Für verschiedene Schichtdicken des Photolacks muß das SU-8 entsprechend mit dem Verdünner GBL verdünnt werden. Vom Hersteller des SU-8 werden verschiedene Verdünnungsstufen (SU-8 100, 50, 25, 10, 5, 2) angeboten. Diese SU-8 Numerierung gibt dabei an, welche Schichtdicke bei ca. 3000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zu erwarten sind. In Tab 3.2 sind der feste und GBL Anteil des SU-8 aufgeführt sowie die Menge an GBL, die 100ml SU-8 50 hinzugeführt werden muß, um die entsprechenden äquivalenten Herstellerprodukte zu erhalten.

Bezeichnung SU-8 X	fester- [%]	GBL-Anteil [%]	GBL Hinzugabe [ml] für 100ml SU-8
100	73	27	
50	69	31	
25	63	37	9,6
10	59	41	17,0
5	52	48	32,8
2	40	60	72,6

Tabelle 3.2: SU-8 Bezeichnungen

Herstellerbezeichnungen der verschiedenen SU-8 Produkte, die sich durch den Anteil des Verdünners GBL unterscheiden.

Für die Masterwafer-Herstellung dieser Arbeit wurde das SU-8 5 gewählt. Die Herstellung erfolgte durch Mischen der Komponenten nach o.g. Tabelle. Die nach gründlichem Rühren entstandenen Gasbläschen verschwanden dabei nach ca. 24 Stunden. Kleinere, mit dem Auge kaum sichtbare Luftbläschen konnten durch Erhitzen des SU-8 auf ca. 60°C für 2 Stunden entfernt werden. Die Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte dabei so langsam wie möglich durch Ruhen auf einer Heizplatte für ca. 2 Stunden. Die weiteren Schritte von der Substratreinigung bis zum *Hard Baking*¹ werden nun erläutert:

Substrat Reinigung: Als Substrat für den Photolack wurden Si-Wafer und zu Quadraten gebrochene Objektträger (26 x 26 mm²) verwendet. Die quadratischen Objektträger wurden für Eichmessungen der Schichtdicke verwendet (s. Kapitel 4.1). Diese wurden für jeweils 5 Minuten im Ultraschallbad mit Aceton, Ethanol und anschließendem reinst-Wasser aus dem Reinraum gereinigt.

¹In Anlehnung an die Literatur werden hier die engl. Ausdrücke und Prozeßschritte verwendet.

Die Si-Wafer wurden dagegen zunächst mit Aceton, Isopropanol und reinst-Wasser abgespült und in der Trockenschleuder (Delta10, Ble-Laboratory Equipment GmbH, Deutschland) bei 4000 rpm für 20 Sekunden getrocknet. Anschließend wurden sie für ca. 5 Minuten mit Caro'scher Säure (auch Piranha Säure, $H_2SO_4 : H_2O_2$ im Verhältnis 3:1) behandelt. Nach gründlichem Abspülen mit Wasser wurden sie jeweils für 10 Minuten in zwei frische Wasserbäder getaucht und wieder abgespült. Getrocknet wurden die Objektträger und Si-Wafer wieder in der Trockenschleuder. Auf einer Heizplatte (HT-303D, ATV-Technologie, Deutschland) bei 200°C wurde in 20 Minuten die eingeschlossene Restfeuchtigkeit entzogen.

Zu erwähnen sei hier noch, daß Mikrostrukturen aus SU-8 mit Caro'scher Säure wieder restlos vom Substrat entfernt werden können. Unversehrt gebliebene Substrate können problemlos wiederverwendet werden. Nicht vollständige Bedeckung des Si-Wafers mit SU-8 nach dem *Spin-Coaten* bzw. Bläschenbildung beim *Soft Baking* deuten auf Verschmutzungen bzw. Defekte hin.

Spin-Coating: Nach der Reinigung der Substrate wurden die Objektträger im *Spin-Coater* (Manueller Belacker 1001/ST147, Convac) mittig zentriert. Die Si-Wafer dagegen wurden in einer vorhandenen Halterung zentriert. Abb. 3.1 zeigt die Heizplatte sowie den *Spin-Coater*. Vorhandene Staubpartikel wurden, wenn vorhanden, vorher mit Stickstoff abgeblasen, bevor ein Tropfen SU-8 ($\sim 1\text{ ml}$ pro inch-Radius) mittig auf das Substrat gegossen wurde. Der Vorgang wurde dabei vorsichtig durchgeführt, damit sich möglichst keine Luftbläschen einschließen konnten. Bei 500 – 700 rpm wurde der Photolack über das Substrat verteilt. Bei allen nun folgenden Prozessen betrug die *Spin-Coat*-Zeit 35 Sekunden. Für die inverse Winkelbeschleunigung des *Spin-Coaters* gab es 15 Stufen zur Auswahl, wobei die höchste Stufe, d.h. kleinste Winkelbeschleunigung gewählt wurde. Für die Erstellung der Eichkurve wurden Objektträger bei 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000 rpm mit SU-8 25, 10 und 5 beschichtet. Bei Si-Wafer dagegen betrug die Umlauffrequenz für eine 3 μm dicke Schicht 5200 rpm. Es wurden zwei Masterwafer hergestellt, wobei auf einem der Masterwafer zuvor noch der Haftvermittler HMDS aufgebracht wurde. Am Rand der Substrate bildete sich, aufgrund eines Überschusses an Photolack, eine Wölbung, die durch anschließendes verbleiben für 10 Minuten auf der Heizplatte bei Raumtemperatur ausgeglichen werden konnte.

Soft Baking (SB): Die beschichteten Substrate der Masterstruktur aus SU-8 5 wurden nun für 3 Minuten bei 40°C, 3 Minuten bei 65°C und für 5 Minuten bei 95°C vorgebacken. Je nach GBL-Anteil und Schichtdicke des SU-8 mußten die Vorbackzeiten für

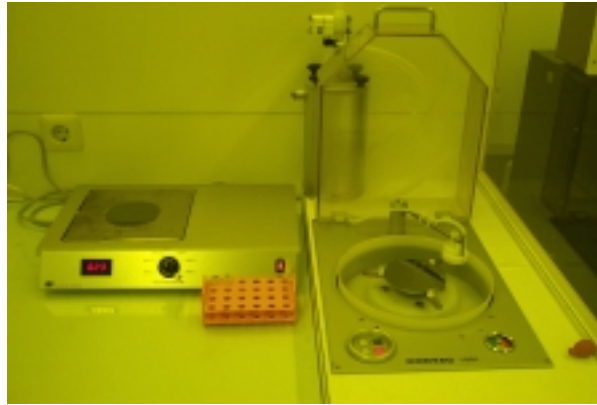


Abbildung 3.1: Heizplatte und Spin-Coater

Zu sehen sind links die Heizplatte sowie der Spin-Coater auf der rechten Seite mit der zentrierten Waferhalterung

die Eichstrukturen angepaßt werden. Da die Vorbackzeit „nur“ die Qualität der späteren Strukturen und unwesentlich die Strukturhöhe bestimmt, soll hier nur die längste Vorbackzeit einer Eichprobe (SU-8 50 bei 1000 rpm) angegeben werden. Die genannte Probe wurde für 45 Minuten bei 40°C, 45 Minuten bei 65°C und für 20 Minuten bei 95°C vorgebacken.

Exposure: Die Belichtungseinheit (Modell 8011, Oriel Corporation, USA, siehe Abb. 3.2) lieferte nach Herstellerangaben ca. 500 W/m^2 für einen Spektralbereich von 350–450 nm. Für eine ca. $3 \mu\text{m}$ dicke Photolackschicht betrug die benötigte Bestrahlung nach Herstellerangabe² $100 - 110 \text{ mJ/cm}^2$. Damit errechnet sich die Bestrahlungszeit zu:

$$t = \frac{100 \text{ mJcm}^2}{50 \text{ mWcm}^2} = 2 \text{ Sekunden}$$

Für die Si -Wafer ergab sich nach Optimierung der Bestrahlungszeit $t = 3,75$ Sekunden. Dabei wurde die strukturierte Chromseite der Chrom-Maske (DeltaMask, NL) direkt mit dem Photolack in Kontakt gebracht. Mit einer Gesamtkraft von ungefähr 20 Newton wurden die Ränder der Maske mit Hilfe eines Edelstahlrahmens (Eigenbau Mechanik-Werkstatt) während der Bestrahlungszeit auf den Si-Wafer gepresst.

Da sich die Bestrahlungszeit, wie beim SB, nicht auf die Höhe der Struktur auswirkt, wurden alle Objektträger ca. 20 Sekunden belichtet. Als Maske diente eine einfache

²i-Linie des Quecksilbers, 365 nm



Abbildung 3.2: Flutbelichter

Oben auf dem Flutbelichter befindet sich die Zeitschaltuhr für den Shutter. Unten ist der Stahlrahmen zu sehen, der auf die Ränder der Maske drückt. Bei Betrieb schützt eine Abdeckung die Umgebung vor UV-Strahlung.

Tantalmaske (Arbeitsgruppe Prof. Reiss, J. Schotter) mit 5 Linien ($3\text{-}20\ \mu\text{m}$ breit, 1cm lang).

Die erhöhte Bestrahlungszeit von $t = 3,75$ Sekunden für den Si-Wafer kam durch Reflexionen an der Grenzschicht von Luft zu Photolack, durch Absorption des Si-Substrats und durch das verwendete Quecksilberspektrum zustande.

Post Exposure Bake (PEB): Das Ausbacken des SU-8 auf der Heizplatte nach der Belichtung sorgte für die Vernetzung und Aushärtung des Photolacks. Alle beschichteten Substrate wurden dabei für 1 Minute bei 40°C , 3 Minuten bei 60°C und 20 Minuten bei 95°C ausgebacken.

Developing: Die Entwicklung des Photolacks erfolgte für alle Substrate in einem Entwicklerbad. Die $3\ \mu\text{m}$ Strukturen des Si-Wafers blieben 60 Sekunden, die Eich-Objektträger für ca. 1-5 Minuten darin. Anschließend wurden alle Strukturen zunächst mit technischem Aceton und anschließend reinem Isopropanol gereinigt. Auf einer schrägen Ebene wurden die Strukturen vorsichtig mit Stickstoff abgeblasen.

Hard Bake (HB): Dies ist letzte Schritt der Mikrostrukturierung. Bei ca. 200°C, knapp unterhalb der Glasübergangstemperatur, werden die Strukturen für 20 Minuten ausgehärtet. Dabei lagen die Strukturen schon zu Beginn der Aufheizphase auf der Heizplatte. Nach der Aushärtung wurden die Proben langsam auf der Heizplatte in zwei Stunden abgekühlt.

3.2 Probenpräparation

Die Probenpräparation ist in zwei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt wird auf die Mikrostrukturpräparation mittels PDMS-Abformung vom Masterwafer, anschließend auf die DNA-Fluoreszenzpräparation eingegangen.

3.2.1 PDMS Mikrokanalpräparation

Die Abb. 3.3 zeigt schematisch die Schritte bei der Mikrokanalpräparation:

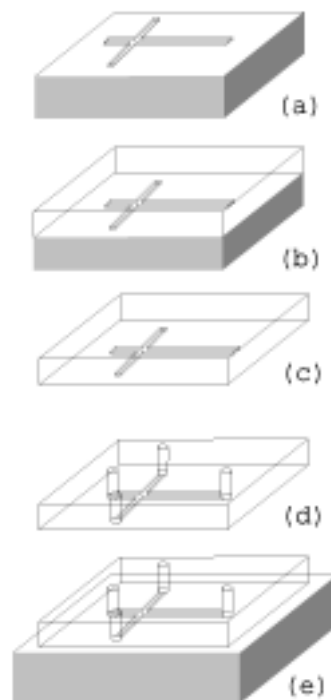


Abbildung 3.3: Herstellungsschritte der PDMS-Mikrokanäle

Die Herstellungsschritte sind hier exemplarisch anhand einer Kreuzungsstruktur dargestellt (siehe Text).

Das zu Beginn noch nicht vernetzte Vorpolymer (*base*) des PDMS wurde im Verhältnis 1 : 10 mit dem Katalysator (*curing agent*), das für die Vernetzung zuständig ist, gründlich verrührt. Nun wurde das Gemisch über den Masterwafer (Abb. 3.3a) gegossen und für ca. 15 Minuten stehen gelassen, damit die entstandenen Gasbläschen verschwinden konnten. Die restlichen größeren Gasbläschen konnten vorsichtig mit dem aus einer Düse herausströmenden Stickstoff zum Platzen gebracht werden. Die Polymerisation erfolgte dann für 3 Stunden in einem Ofen bei 75°C (Abb. 3.3b). Anschließend wurde das erhärtete PDMS vom Masterwafer abgelöst (Abb. 3.3c) und entsprechend zurecht geschnitten. Mit einem manuellem Stanzwerkzeug wurden Reservoirlöcher von der strukturierten Seite durch das PDMS gestanzt (Abb. 3.3d). Nach fünfminütiger Oxidation der PDMS-Struktur und eines Deckglases im UV-Reiniger (Modell 42-220, Jelight Co. Inc., Kanada) wurde die PDMS-Struktur sofort blasenfrei mit dem dünnen Deckglas verschlossen (Abb. 3.3e). Das Deckglas wurde zuvor wie die quadratischen Objektträger aus Kapitel 3.1 gereinigt. Nach dem Schließen der Strukturen wurden einige μL 0,1 M NaOH auf die Reservoirs pipettiert, was zum Füllen der Kanäle per Kapillarkraft führte. Nach einer Stunde wurde die Flüssigkeit in den Reservoirs mehrmals gegen Wasser ausgetauscht, um evtl. NaOH Rückstände zu entfernen. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde an einem Reservoir ein Vakuum erzeugt, um restliche NaOH aus den Kanälen zu beseitigen. Zuletzt wurde das Wasser in beiden Reservoirs³ durch eine YOYO-Pufferlösung (s. Kapitel 3.2.3) ausgetauscht.

3.2.2 Charakterisierung der Mikrokanäle

Die Höhe der strukturierten Mikrokanäle auf dem Masterwafer und der Stege auf den Eichproben wurden mit einem Profilometer (Dektak 3030ST - Surface Texture System) ausgemessen. Abgeformte PDMS-Mikrokanäle wurden, nachdem sie in einer Hochvakuum-Kleinbeschichtungsanlage (MCS 010, Bal-Tec, Liechtenstein) mit einer 50 nm dicken Platinschicht bedampft worden sind, mit einem Rasterelektronenmikroskop (JSM-880, Jeol, GB) ausgemessen. Die Auswertung erfolgte mit den Hilfswerkzeugen des zur Aufnahme verwendeten Programms (WinDISS, point electronic GmbH, Deutschland) des Rasterelektronenmikroskops.

³Für die Migrationsexperimente wurden nur lineare Mikrokanäle mit topographisch strukturierten Kanalwänden verwendet.

3.2.3 DNA-Fluoreszenzmarkierung

Für die Migrationsexperimente wurden λ -DNA, T2-DNA und Φ X174-DNA mit dem Interkalator YOYO-1 fluoreszenzmarkiert. Dafür wurden die jeweiligen DNA-Stammproben in 1000 μ l Tris-EDTA-NaCl-Puffer (10mM/1mM/50mM) bei pH 8,3 so verdünnt, daß die jeweiligen Endkonzentrationen bzgl. der DNA-Doppelstränge ca. $6 \cdot 10^{-12} M$ betragen. Für die Berechnungen der benötigten YOYO-1 Menge wurde von einer Länge für $\lambda = 45.5 \text{ kbp}$, $T2 = 164 \text{ kbp}$, Φ X174 = 5.4 kbp und einer molekularen Masse eines Basenpaars von grob 640 g/mol ausgegangen. YOYO-1 wurde in entsprechender Menge hinzugegeben, so daß das Verhältnis von YOYO-1 zu DNA-Basenpaar 1:7,5 betrug. Anschließend wurden noch 2% (v/v) BME hinzugefügt und gut verrührt. Bei den o.g. DNA-Konzentrationen sollten sich statistisch gesehen in einem 100 μ m langen Abschnitt eines 1,5 μ m breiten und 3,0 μ m tiefen Kanals etwa

$$N = 6 \cdot 10^{-12} \text{ mol/l} \cdot 100 \mu\text{m} \cdot 1 \mu\text{m} \cdot 3 \mu\text{m} \cdot 6,022 \cdot 10^{23} / \text{mol} \simeq 1 \quad (3.1)$$

DNA-Molekül aufhalten.

Der in Kapitel 3.2.1 genannte YOYO-Puffer entspricht dem gerade beschriebenen Puffer - jedoch ohne DNA.

3.3 Aufbau der Messapparatur

Die Messapparatur (Abb. 3.4) bestand aus einem Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss, Deutschland), einer empfindlichen CCD-Kamera (Imager3L, LaVision baugleich mit Sensicam, PCO beide Deutschland), der dazu passenden Videograbberkarte (SensiCam PCI Interface-Board, PCO, Deutschland), der Software für die Bildauswertung (DaVis V.5.44, LaVision, Deutschland) und einer Spannungsquelle (MCN 14-2000, FUG, Deutschland). Mit der CL-Makrosprache (*Command Language*) des DaVis-Programms sowie darin bereits enthaltenen Makros wurde ein neues Makroprogramm geschrieben, mit dem die Mobilitäten bestimmt werden konnten.

Epifluoreszenzmikroskop: Das Mikroskop mit der Kamera ist in Abb. 3.5 schematisch abgebildet. Als Lichtquelle diente eine Quecksilber-Kurzbogenlampe (HBO 50 W, Zeiss, Deutschland). Der Lichtstrahldurchmesser konnte mittels einer Lochblende eingegrenzt werden, bevor der Lichtstrahl durch einen Anregungsfilter (XF1087, Omega Optical Inc., USA) und den dichroitischen Spiegel (XF2077, Omega) durch das Objektiv umgeleitet wurde. Mit einem xy-Tisch (99S008, Ludl Electronic Products LEP, USA) konnte

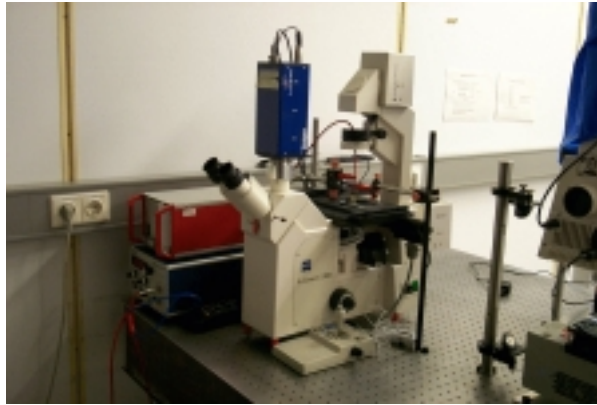


Abbildung 3.4: Versuchsaufbau

Zu sehen sind eine Spannungsquelle, die Steuerung für den xy-Tisch, ein Epifluoreszenzmikroskop und eine CCD-Kamera.

die Probe justiert werden. Das Fluoreszenzlicht wurde mit dem Objektiv eingefangen und durch den dichroitischen Spiegel geleitet. Noch vorhandenes Anregungslicht wurde durch einen Sperrfilter herausgefiltert (XF3105, Omega). Anschließend wurde das Fluoreszenzlicht über ein Linsensystem auf der Kamera bzw. dem Okular abgebildet.

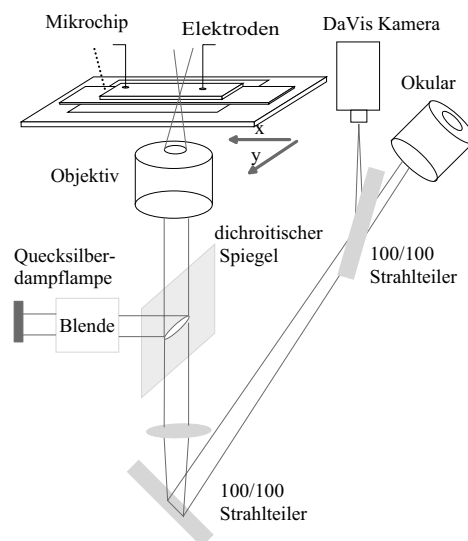


Abbildung 3.5: Schematischer Versuchsaufbau

CCD-Kamera: Da die Eigenschaften des CCD-Chips für die Qualität der Aufnahmen von besonderer Bedeutung waren, sollen hier die relevanten Spezifikationen angegeben werden. Bei einer Pixelanzahl von 1280(horiz.) x 1024(vert.) und einer Pixelgröße von $6,7 \times 6,7 \mu\text{m}^2$ betrug die aktive Pixelfläche ca. $8,6 \times 6,9 \text{mm}^2$. Die CCD wurde mittels eines Peltierelements auf -12°C herabgekühlt. Durch die Kühlung der CCD betrug der Dunkelstrom nur $0,1e^-/\text{pixel sec}$. Die Anzahl der durch die Belichtung erzeugten Elektronen in einem Pixel wurde linear einem 12 bit Bereich zugeordnet, wobei der Quantenwirkungsgrad bei 500nm 40% und die maximale Kapazität $25000e^-$ betrug. Das durch die maximale Abtastrate von $12,5 \text{MHz}$ erzeugte Ausleserauschen lag bei ca. $8e^-$. Die CCD wurde im sog. *exposure-readout-Modus* betrieben, d.h. nachdem das belichtete Bild in das Ausleseregister verschoben wurde, konnte das nächste Bild bereits aufgenommen werden.

3.4 Durchführung der Mobilitätsmessungen

Nach der Probenpräparation und nach dem Füllen der Kanäle und Reservoirs mit dem YOYO-Puffer, wurde der Kanal nochmals mit Hilfe eines elektrischen Feldes ($\sim 50 \text{V/mm}$, 5 Minuten) durchgespült. Nach Reinigung beider Reservoirs wurde ein Probenreservoir mit der DNA-Lösung und das andere Reservoir mit dem YOYO-Puffer gefüllt. Die Schritte vom Durchspülen des Kanals bis zum Auffüllen der Reservoirs mit der DNA-Lösung und des YOYO-Puffers erfolgten jeweils nach einer Messreihe. Eine Messreihe bestand dabei aus Mobilitätsmessungen bei verschiedenen Feldstärken, wobei immer mit der höchsten Feldstärke begonnen wurde. In einem Kanal erfolgten so insgesamt vier Messreihen, wobei abwechselnd zuerst λ , T2, λ und wieder T2 gemessen wurde. Eine umgekehrte Reihenfolge (T2 \rightarrow λ \rightarrow T2 \rightarrow λ) in einem $1,5 \mu\text{m}$ para-Kanal (Nomenklatur s. Kapitel 4.2) diente als zusätzliche Kontrollmessung.

Aufgrund der verschiedenen Längen der Kanäle, die durch die Stanzlöcher definiert worden sind, war es ohne erheblichen Aufwand nicht immer möglich, bei denselben Feldstärken zu messen. Die Einstellungen der Aufnahmeparameter bei den Mobilitätsmessungen konnten aber immer gleich gehalten werden. Die Belichtungszeit betrug bei den Mobilitätsmessungen immer 23ms ; zusammen mit der Auslesezeit von 17ms ergaben sich Bildaufnahmefrequenzen von 25 Bildern pro Sekunde (engl. *frames per second*, fps). Um solche fps-Raten zu erhalten, mußte ein zweifaches Hardware-Binning in vertikaler Richtung durchgeführt sowie der Bildausschnitt verkleinert werden. Bei der Migrationsuntersuchung der $\Phi X174$ wurden 40 fps durch kürzere Belichtungs- und Auslesezeiten (Verkleinerung des Bildausschnitts plus vierfach Binning in horizontaler und

vertikaler Richtung) erzielt.

Für die Mobilitätsbestimmung mittels Kreuzkorrelation wurden jeweils 200 Bilder aufgenommen. Da immer zwei aufeinanderfolgende Bilder für die Analyse verwendet wurden, wurden so maximal 199 Werte extrahiert. Um die Fehler zu minimieren, mußten die Bilder gewisse Kriterien erfüllen, die zum größten Teil direkt nach der Aufnahme sichergestellt werden mußten. Das wichtigste Kriterium betraf die Dichte der Teilchen (s. Kapitel 4.3 und Gl. (3.1)). Zusätzlich dazu wurde mit dem Makroprogramm zur Mobilitätsbestimmung die Intensität des hellsten Pixels im Bild kontrolliert, das einen gewissen Schwellwert übersteigen mußte, damit mit dem darauffolgendem Bild eine Korrelationsanalyse durchgeführt wurde. Die so erhaltenen Verschiebungen bzw. Geschwindigkeiten mußten für eine vernünftige Geschwindigkeitsbestimmung mindestens zehn Werte beinhalten.

Zusätzlich wurden für eine Messung in einem $1,5 \mu\text{m}$ plan-Kanal und zwei Messungen in einem $5,0 \mu\text{m}$ para-Kanal die Geschwindigkeiten manuell ausgewertet. Dafür wurde ein Molekül zufällig ausgewählt, dessen gemittelte Geschwindigkeit dann über die gesamte Bildbreite bestimmt wurde. Die mit der manuellen Auswertung gewonnenen Geschwindigkeiten sollen keiner Fehlerabschätzungen unterzogen werden, da nur gezeigt werden sollte, daß die automatisiert gewonnenen Werte gut mit den manuellen Werten übereinstimmen.

3.5 Kurvenfit

Da die aus der Korrelation gewonnenen Geschwindigkeiten normalverteilt sind, wurden die Daten mit Hilfe des frei verfügbaren Plot-Programms *gnuplot* an eine Gauß'sche Kurve

$$f(x) = \frac{y_0}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (3.2)$$

angefittet. σ ist hierbei die Standardabweichung, y_0 ein Skalierungsfaktor für die Gauß'sche Kurve und x_0 stellt die Verschiebung auf der x -Achse dar. In dem Bereich $\pm\sigma$ liegen 68,3% der Daten. *gnuplot* benutzt den sog. *Levenberg-Marquardt-Algorithmus*, um Daten an nichtlineare Funktionen bzw. Funktionsparameter anzupassen. Der *Levenberg-Marquardt-Algorithmus* ist eine Mischung aus der *Methode des linearen Abstiegs* (engl. *method of linear descent*) und der *Gauss-Newton-Methode* [77]. Gegenüber diesen Verfahren bietet der *Levenberg-Marquardt-Algorithmus* den Vorteil größerer numerischer Stabilität und schnellerer Konvergenz [77].

Die erhaltenen Geschwindigkeiten wurden anschließend in ein Mobilitätdiagramm (Ge-

schwindigkeit gegen elektrisches Feld) eingetragen und mit der Geradengleichung $g(x) = ax$ angefitet, die durch den Koordinatenursprung geht. Die Steigung a entspricht dabei der Mobilität.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 SU-8 Eichkurven

Quadratische Objektträger wurden zur Erstellung der Eichproben bei verschiedenen Umdrehungszahlen mit Photolack beschichtet. Nach der in Kapitel 3.1 beschriebenen Herstellungsmethode besitzt jede Eichprobe fünf Stege. Die bereits beschriebenen Wölbungen am Rand der Substrate (s. Kapitel 3.1) verursachen bei den kleinflächigen Objektträgern ($26 \times 26 \text{ mm}^2$) eine nicht gleichmäßige Schichtdicke an den Rändern. Abb. 4.1 zeigt das typische Höhenprofil dieser Stege und die deutlich zur Mitte hin abnehmende Höhe. Die Abb. 4.2 – 4.4 zeigen die so gewonnen Messpunkte und die an die Messpunkte angefittete Funktion $f(x) = \frac{k}{x}$ nach Gl. (2.27) für konstante Zeit t , wobei k den Fit-Parameter darstellt.

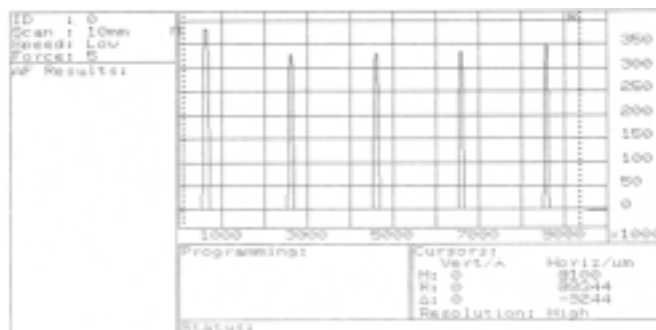


Abbildung 4.1: Profil von fünf auf dem Objektträger befindlichen Stegen. Gemessen wurde das Profil entlang der Mitte des Objektträrgläschens.

Für eine Schichthöhe von $3 \mu\text{m}$ wurde eine Umdrehungsfrequenz von ca. 5200 rpm für SU-8 5 extrapoliert. Da die Eichkurven nur als qualitative Anhaltspunkte für die Strukturhöhen dienten, werden hier keine Fehlerabschätzungen unternommen, da die Schichthöhe auch von der Oberflächenenergie des verwendeten Substrats abhängt [78].

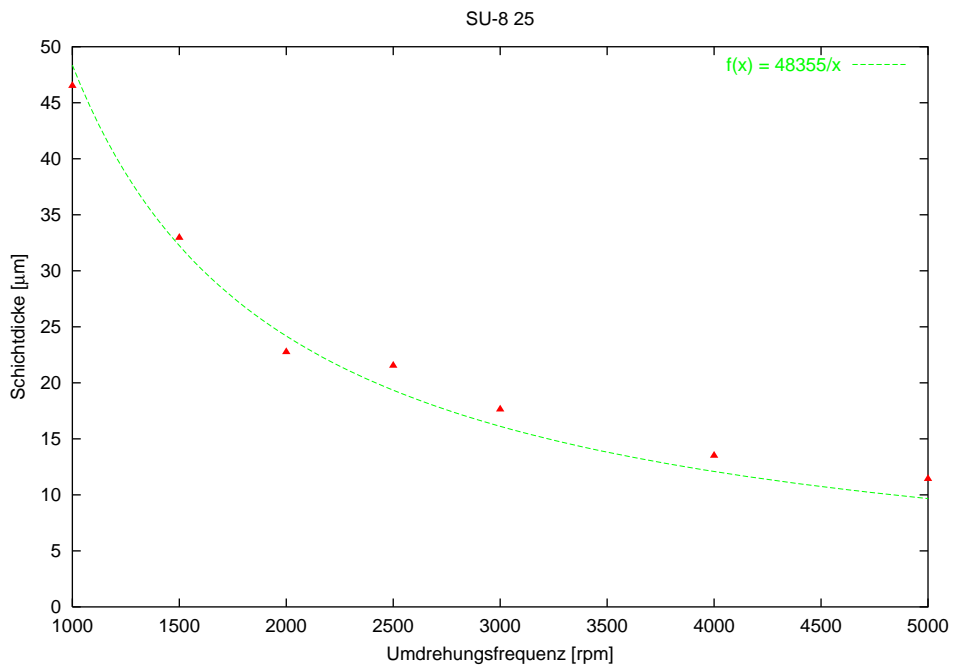


Abbildung 4.2: Schichtdicke in Abhängigkeit der Umdrehungsfrequenz für SU-8 25

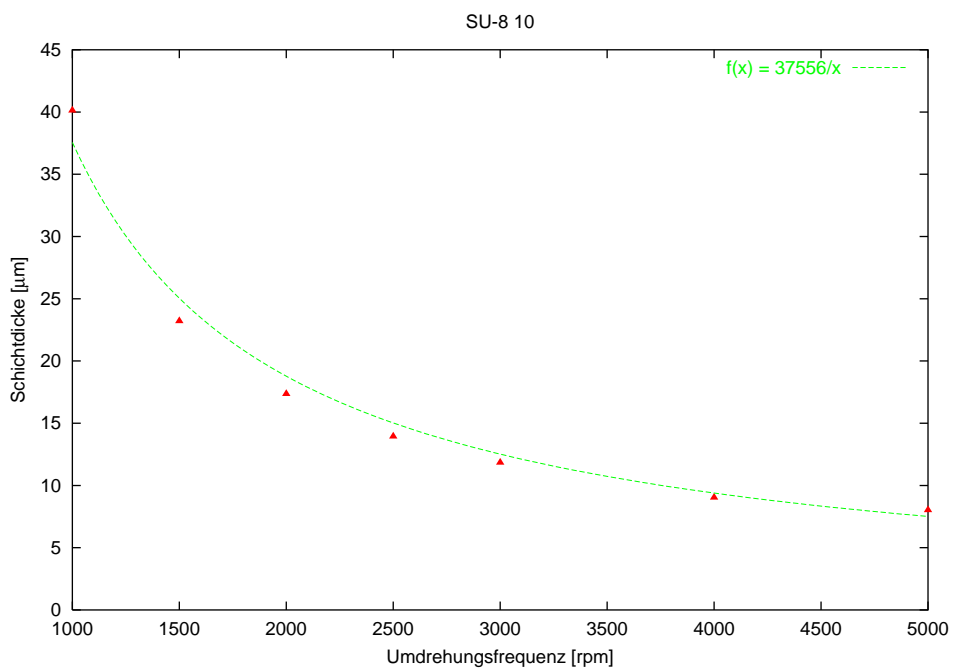


Abbildung 4.3: Schichtdicke in Abhängigkeit der Umdrehungsfrequenz für SU-8 10

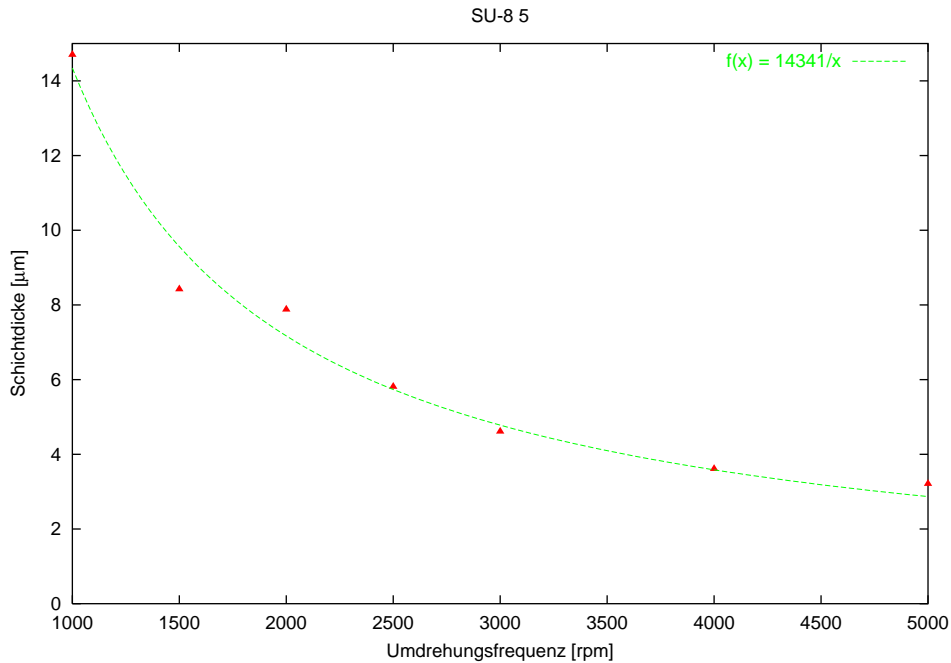


Abbildung 4.4: Schichtdicke in Abhängigkeit der Umdrehungsfrequenz für SU-8 5

4.2 Mikrokanal-Abmessungen

In Abb. 4.6 – 4.12 sind Rasterelektronenmikroskopaufnahmen der abgeformten, strukturierten Mikrokanäle gezeigt. Die Nomenklatur (tilt, plan und para) der abgebildeten Strukturen folgt dabei folgendem Schema:

- Beidseitig strukturierter Kanal wird „para“ genannt.
- Einseitig strukturierter Kanal wird „plan“ genannt oder, wenn
- einseitig strukturierter Kanal, der aus geneigten Strukturen (seitliche Kanalwand nicht senkrecht, sondern gekippt) besteht, wird mit „tilt“ bezeichnet.
- Die Definition der Box und der Mikrokanalbreite ist in Abb. 4.5 gezeigt.

Aufgrund des nicht ganz eindeutigen Beginns der Boxen- bzw. Kanalkante ist es schwierig, den Meßcursor des Auswerteprogramms an die „richtigen“ Stellen zu plazieren. Daher wurde der Meßfehler durchgehend auf $\pm 0,1 \mu\text{m}$ geschätzt. Auch für die Periodizitätsmessung, deren Wert sich in der Länge der Box und im Abstand zur nächsten Box widerspiegelt, wurde von diesem Meßfehler ausgegangen, obwohl sich der Meßfehler

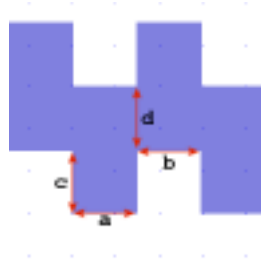


Abbildung 4.5: Para-Struktur

Schematische Zeichnung einer para-Struktur. Die Box wird aus den Wänden a und c gebildet. Der Abstand zur nächsten Nachbarbox ist b, d die Kanalbreite.

durch die Mittelung über mehrere Perioden verkleinern ließe. Die Mikrokanaldimensionen liegen weit über der Auflösungsgrenze des Rasterelektronenmikroskops, so daß dadurch bedingte Meßfehler vernachlässigt werden können.

	a [μm]	b [μm]	unteres c [μm]	oberes c [μm]	d [μm]
1,5 μm tilt	1,4	1,4	-	0,9	0,9
1,5 μm plan	1,4	1,4	-	0,9	0,8
1,5 μm para	2,87 ^(a)		1,0	1,1	0,8
3,0 μm tilt	3,0	2,8	-	2,7	2,6
5,0 μm plan	3,6	6,0	-	3,7	4,7
5,0 μm para	4,0	5,4	5,0	5,0	4,0

Tabelle 4.1: Abmessungen der strukturierten Mikrokanäle. Alle Zahlenangaben sind mit einem Meßfehler von 0,1 μm behaftet. Das Schrumpfen der Struktur senkrecht zur Kanallänge ist stärker ausgeprägt als entlang des Kanals.

(a) Es wurde die Länge einer Periode bestimmt, die sich aus a und b zusammensetzt.

Bedingt durch die Vorgabe der Maskenqualität kann man kaum einen Unterschied zwischen den 1,5 μm plan- und tilt-Strukturen (Abb. 4.6 und 4.7) erkennen. Der vergrößerte Ausschnitt der 1,5 μm plan-Struktur zeigt an der unteren Kanalwand und an den oberen Boxen leichte Ausfransungen, die durch ein nicht ganz planares Aufliegen der Maske auf dem Photolack während der Belichtung zurückzuführen sind. Für die 1,5 μm para-Struktur (Abb. 4.8) kann keine Angabe zur Boxgröße gemacht werden, da der Übergang vom Kanal hin zur Box fließend erscheint. Es wurde daher die Periode der Struktur

durch Mittelung über mehrere Bereiche bestimmt. Als Referenzpunkte dienten die Senken der Struktur. Bei der $3,0 \mu\text{m}$ tilt-Struktur (s. Abb. 4.9) wurde der Versuch gemacht, die Anfangs- sowie Endpunkte einer Periode an die Stellen zu setzen, an der die Kontur der Strukturierung von einer Links- in eine Rechtskurve übergeht.

Aus der Tabelle 4.1 geht hervor, daß der Schrumpfungsprozess des SU-8 entlang der Kanallänge wesentlich geringer ausfällt als senkrecht dazu. Das Schrumpfen der Strukturen läßt sich durch den Herstellungsprozess der Mikrostrukturen erklären. Vorhandenes Lösungsmittel wurde beim SB und PEB verdampft, so daß dem polymerisierendem SU-8 mehr Platz zur Verfügung stand als zuvor. Bedingt durch das Abkühlen konnten diese Zwischenräume vom auspolymerisierten SU-8 eingenommen werden. Das Zusammenziehen entlang des Kanals ist dabei schwieriger als senkrecht dazu, was die Werte in der Tabelle 4.1 und die welligen Abschnitte, besonders in den $5 \mu\text{m}$ strukturierten Kanälen (Abb. 4.10 – 4.12), erklärt.

Abb. 4.10 zeigt eine $5 \mu\text{m}$ plan-Struktur, bei der die obere Boxen-Wand nicht vollständig belichtet ist. Die nicht vollständige Belichtung läßt sich mit hoher Sicherheit auf ein nicht ganz planares Aufliegen der Maske auf dem Substrat zurückführen. Die Abb. 4.12 zeigt den selben Ausschnitt wie Abb. 4.11 der $5,0 \mu\text{m}$ para-Struktur mit dem Unterschied, daß die Probe im Rasterelektronenmikroskop um ca. 30° gekippt wurde. Dadurch erhält man einen räumlichen Eindruck über die Qualität der Kanalwände, die senkrecht zur Substratoberfläche sind.



Abbildung 4.6: Tilt-Struktur, $1,5 \mu\text{m}$

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines geneigten $1,5 \mu\text{m}$ Kanals mit Kreuzungsbereich

Für die Bestimmung der Strukturhöhen der beiden Masterwafer wurden jeweils vier zufällige Meßpunkte genommen. Zwei Meßpunkte befanden sich am äußeren Rand und zwei in Zentrumnähe des Wafers. In Tabelle 4.2 sind die gemessenen Werte eingetragen. Damit ergaben sich folgende Werte für die Strukturhöhe:

- Strukturhöhe des Masterwafer ohne Haftvermittler: $2,83 \mu\text{m} \pm 0,13 \mu\text{m}$
- Strukturhöhe des Masterwafer mit Haftvermittler: $2,70 \mu\text{m} \pm 0,11 \mu\text{m}$

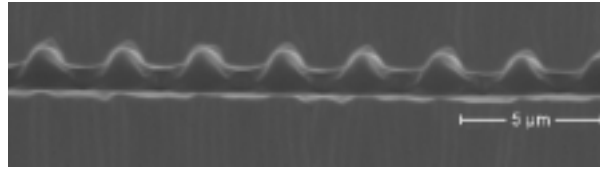


Abbildung 4.7: Plan-Struktur, 1,5 μm

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines einseitig strukturierten 1,5 μm Kanals

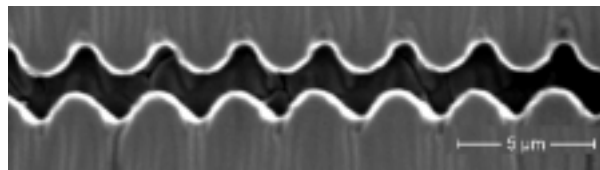


Abbildung 4.8: Para-Struktur, 1,5 μm

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines beidseitig strukturierten 1,5 μm Kanals

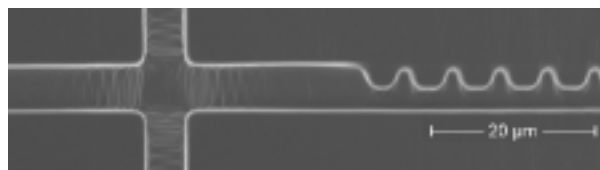


Abbildung 4.9: Tilt-Struktur, 3,0 μm

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines geneigten 3,0 μm Kanals mit Kreuzungsbereich



Abbildung 4.10: Plan-Struktur, 5,0 μm

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines einseitig strukturierten 5,0 μm Kanals mit Kreuzungsbereich

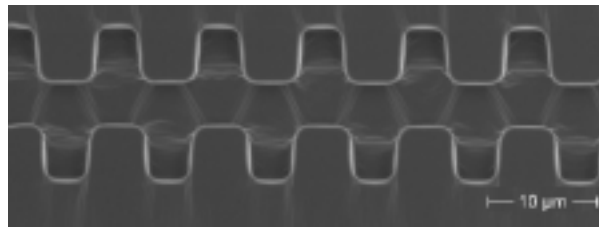


Abbildung 4.11: Para-Struktur, $5,0 \mu m$

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines beidseitig strukturierten $5,0 \mu m$ Kanals

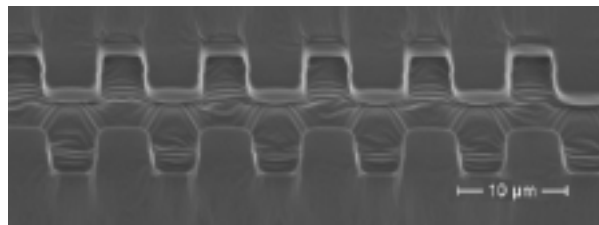


Abbildung 4.12: Para-Struktur

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines beidseitig strukturierten $5,0 \mu m$ Kanals um ca. 30° gekippt.

	Masterstrukturhöhe mit HMDS [μm]	Masterstrukturhöhe ohne HMDS [μm]
1. Messung	2,849	2,811
2. Messung	2,874	3,087
3. Messung	2,538	2,760
4. Messung	2,559	2,644
Mittelwert	2,705	2,825

Tabelle 4.2: Strukturhöhen auf den Masterwafern. Die ersten beiden Werte sind randnahe, die letzten beiden Werte sind zentrumnahe Werte.

4.3 Mobilitätsbestimmung mittels Kreuzkorrelation

In diesem Teil der Arbeit wurde die Mobilitätsbestimmung von DNA in Mikrokanälen mit Hilfe der Kreuzkorrelation durchgeführt. Anhand von vier Fall-Beispielen soll gezeigt werden, daß die mit dieser Methode erhaltenen Werte zuverlässig sind; aber es sollen auch die Nachteile der Methode angesprochen werden. Die Beispiele lauten:

- Ein Molekül im Kanal
- Ein Molekül im Kanal, ein zweites kommt ins Detektionsfeld
- Zwei Moleküle im Kanal
- Mehrere (sechs bzw. sieben) Moleküle im Kanal

Die Bilder (Abb. 4.13 – 4.17) sind jeweils in vier horizontale Bereiche aufgeteilt. Der obere Teil des Bildbereichs stellt eine Momentaufnahme eines Kanalausschnitts zur Zeit t dar, das Teilbild darunter eine zweite Aufnahme an der selben Position zu einem Zeitpunkt $t + \Delta t$. Δt ist für die gezeigten Fälle immer $40 \text{ ms} \pm 0,2 \text{ ms}$, das sich aus der Belichtungszeit und der Auslesezeit der CCD zusammensetzt. Der von oben aus gesehen dritte Teilbereich ist das Korrelationsbild nach Gl. (2.25). Der unterste Teil stellt das Korrelationsbild als Intensitäts-Spektrum dar, wobei alle Zeilen zuvor zusammengefasst wurden. Die x-Achse entspricht dabei der Pixelskala, wobei $1 \text{ Pixel} = 0,067 \mu\text{m}$ ist. Die Begriffe „Geschwindigkeit, Verschiebungsvektor, Verschiebung und Mobilität“ werden alle in dem Sinne gebraucht, daß der Betrag des Verschiebungsvektors einer Verschiebung, die Geschwindigkeit einer Verschiebung in 40 ms und die Mobilität einer Geschwindigkeit normiert auf die Feldstärke entspricht.

Ein Molekül im Kanal: Genaugenommen halten sich in diesem Beispiel (Abb. 4.13) zwei Moleküle im Kanal auf. Aufgrund der Intensitätsschwäche des auf der rechten Seite befindlichen Moleküls kann dieses in einer ersten Betrachtung als nicht vorhanden angesehen werden. Eine Fortbewegung des hellen Moleküls ist deutlich zu sehen. Diese spiegelt sich im Korrelationsbild sowie im Spektrum als Intensitätspeak wieder. Der Peak befindet sich bei ca. 50 Pixeln vom linken Bildrand entfernt, was der Verschiebung um 50 Pixel der Bilder gegeneinander entspricht und dem Ähnlichkeitsmaß nach Gl. (2.24) genügt. Die Miteinbeziehung des zweiten, jedoch dunkleren Moleküls ergibt einen zweiten, kaum erkennbaren Peak bei ~ 850 auf der Skala. Dieser Fall soll im übernächsten Abschnitt besprochen werden. Bei genauerem Hinsehen erkennt man, daß sich das Molekül nicht auf der selben Höhe wie das andere Molekül (aufgrund einer

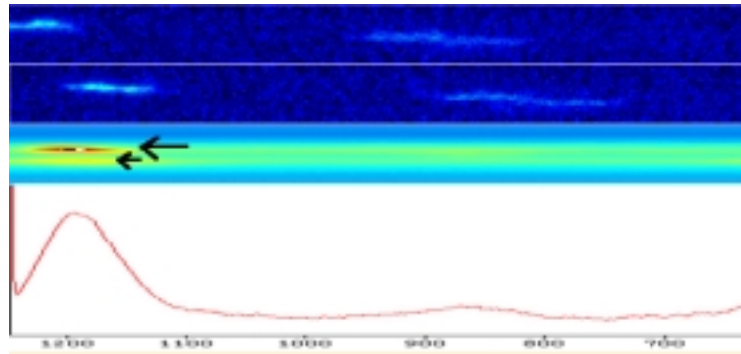


Abbildung 4.13: Kreuzkorrelationsanalyse eines hellen Moleküls

Zwei Bilder eines hellen Moleküls werden kreuzkorreliert. Der Intensitätspeak entspricht der Verschiebung der Bilder gegeneinander. Der obere Pfeil im Korrelationsbild stellt die Verschiebung des helleren Moleküls, der untere Pfeil die Verschiebung des dunkleren Moleküls dar.

Schieflage des Kanals) befindet. Da das Molekül sich aber ebenfalls um ca. 50 Pixel bewegt hat, kann man im Korrelationsbild ein zweites lokales Maximum unterhalb des zuvor besprochenem Maximums finden (s. Pfeile in Abb. 4.13). Das liegt an der, wie bereits in Kapitel 2.5 erwähnten horizontalen bzw. 1-dimensionalen FFT. Das bedeutet, daß jede Zeile für sich unabhängig von den anderen Zeilen einer FFT unterzogen wurde. Es werden mit der horizontalen FFT also nur horizontale Bewegungen erfaßt. Aufgrund der Linearität der FFT kann jede N-dimensionale FFT in N 1-dimensionale FFT's zerlegt werden. Damit ist es auch leicht möglich, 2-dimensionale Bewegungsanalysen durchzuführen, was hier aber zu anderen Schwierigkeiten führen würde. Diese Schwierigkeiten sind in der geringen vertikalen Abmessung des Bildes begründet. Die dadurch entstehenden Artefakte würden physikalisch nicht sinnvolle Ergebnisse hervorbringen. Aufgrund dessen, und der vernachlässigbaren Bewegung senkrecht zum Kanal¹, reicht eine einfache 1-dimensionale FFT aus.

Ein Molekül im Kanal, ein zweites kommt ins Detektionsfeld: In diesem Beispiel (Abb. 4.14) kommt ein zusätzliches Teilchen ins Detektionsfeld. Deutlich ist ein zweiter Peak bei ca. 850 zu sehen. Dieser Peak wird durch zwei Gründe verursacht. Der erste Grund ist dem vorherigen Beispiel identisch, wenn die etwas lichtschwächeren Moleküle

¹Bei der $5 \mu\text{m}$ Struktur stimmt das nicht ganz. Aufgrund der noch zu besprechenden Schwächen der Korrelationsmethode ist die Mobilitätsbestimmung für diese Kanalgeometrie mit dieser Methode nicht möglich.

rechts im Bild mit betrachtet werden. Dieses soll aber erst im nächsten Abschnitt besprochen werden. Der überwiegende Grund für die Höhe des Peaks ist in der Eigenschaft der FT und damit auch im Korrelationsbild zu finden, nämlich in der Periodizität. Werden die beiden Enden des Korrelationsbildes zusammengefügt, so entsteht der sog. *Fourier-ring*², der periodisch in sich abgeschlossen ist [63]. Leichter läßt sich die Periodizität des Korrelationsbildes anhand des Spektrums erkennen, wobei der zunächst starke Abfall auf der linken Seite ein sog. Artefakt darstellt. D.h., daß die Position des Peaks im Spektrum der Verschiebung nach rechts über die Periodizitätsgrenze (rechte Bildkante) hinaus bis zum Korrelationspartner entspricht, und nicht dem Betrag des direkten Verschiebungsvektors nach links.

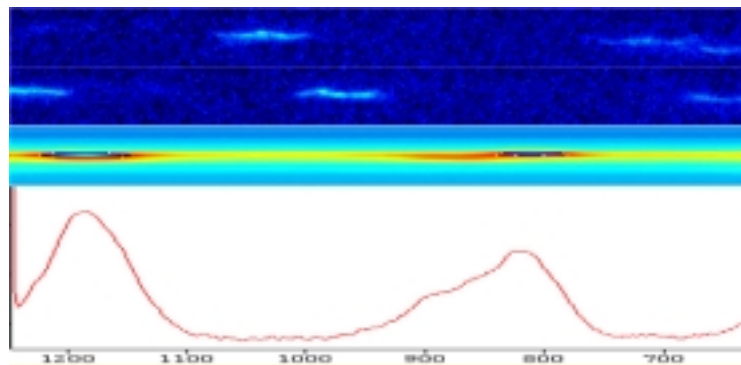


Abbildung 4.14: Kreuzkorrelationsanalyse eines hinzukommenden Moleküls

Das Hinzukommen eines Moleküls verändert das Kreuzkorrelationsspektrum. Ein zweiter Peak wird sichtbar, wobei der höchste Peak der wahrscheinlichsten Verschiebung der Bilder gegeneinander entspricht.

Zwei Moleküle im Kanal: Nun befinden sich zwei helle Moleküle im Kanal. Die zwei Nebenmaxima rechts vom Hauptmaximum (Abb. 4.15) entstanden nach der gerade besprochenen Begründung. Insgesamt gibt es bei N -Teilchen N^2 mögliche Korrelationen (siehe Abb. 4.16), hier also vier Stück. Da zwei Verschiebungsvektoren nahezu identisch sind, resultieren daraus insgesamt die drei Peaks im Spektrum. Der höchste Peak bei 1200 wird also durch die Superposition zweier Peaks erhalten.

²Für eine 2-dimensionale Korrelationsanalyse ergäbe sich, nach zusätzlichem verbinden der oberen und unteren Bildkante, der sog. Fouriertorus.

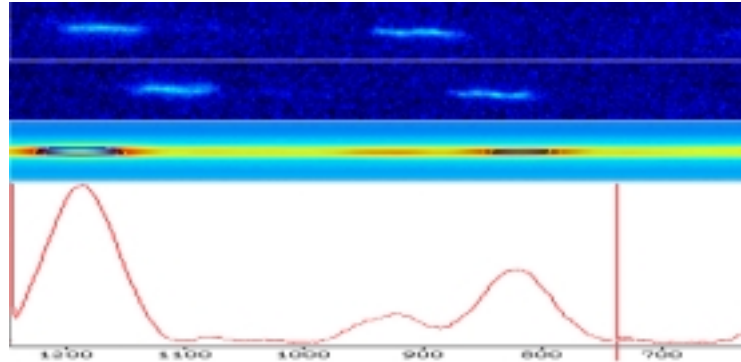


Abbildung 4.15: Kreuzkorrelationsanalyse zweier Moleküle

Zwei Moleküle, die drei Intensitätpeaks erzeugen. Wieder ist das globale Maximum die Wahrscheinlichste Verschiebung der Bilder gegeneinander.



Abbildung 4.16: Korrelationsmöglichkeiten

Die oberen drei Punkte entsprechen drei Molekülen, die unteren einer Verschiebung derselben nach einer Zeit Δt . Die Linien deuten die möglichen Korrelationsbeiträge an. Insgesamt sind $N^2 = 9$ Korrelationen möglich. Bei äquidistanten Abständen entstehen fünf Peaks, deren Verhältnisse 1:2:3:2:1 der Anzahl der Beiträge entsprechen. Bei unterschiedlichen Abständen stimmt dieses jedoch nicht mehr.

Mehrere Moleküle im Kanal: In diesem Beispiel (Abb. 4.17) sind sechs Moleküle deutlich zu erkennen. Ganz links im Bild sind wahrscheinlich zwei Moleküle so nahe beieinander, daß sie nicht mehr als getrennt dargestellt werden können. Das globale Maximum im Spektrum ergibt sich dabei durch Superposition der Einzelkorrelationen. Insgesamt gibt es also zwischen $6^2 = 36$ und $7^2 = 49$ mögliche Einzelbeiträge.

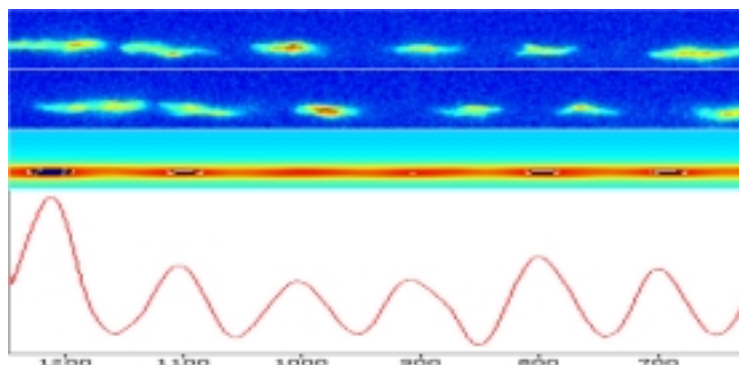


Abbildung 4.17: Kreuzkorrelationsanalyse mehrerer Moleküle

Die Moleküle erzeugen ein komplexes Spektrum, das nicht mehr einfach zu deuten ist. Das globale Maximum gibt die Wahrscheinlichste Verschiebung der Bilder gegeneinander an. Die kritische Dichte ist fast erreicht, d.h. der mittlere Teilchenabstand muß kleiner sein als die Verschiebung der Bilder gegeneinander.

Der Punkt mit der höchsten Intensität entspricht daher der wahrscheinlichsten Verschiebung der Bilder gegeneinander. Je mehr Teilchen in dem Prozeß beteiligt sind, desto mehr Nebenmaxima tauchen auf und desto stärker hebt sich das Hauptmaximum von den anderen hervor. Diese Superposition kann bei genauerer Betrachtung aber auch physikalische nicht sinnvolle Werte der Mobilitäten, also Artefakte liefern. Drei Beispiele für Fehlerquellen werden im Folgenden genannt:

- Wenn die Standardabweichung der Teilchengeschwindigkeiten groß ist, dann kann unter Umständen keine eindeutige Zuordnung mehr getroffen werden.
- Im Falle von vielen Teilchen, genauer gesagt, wenn die Teilchendichte so hoch ist, daß der mittlere Abstand zum nächsten Nachbarn kleiner ist als der Verschiebungsvektor, dann ist die Zuordnung ebenfalls nicht mehr eindeutig.

- Gestreckte Teilchen, die aufgrund einer Verschmierung³ nicht punktförmig erscheinen, erzeugen breitere Peaks. Dadurch ist die exakte Position des Teilchens nicht mehr auffindig zu machen. Hinzu kommt, daß bei gestreckten Teilchen der effektive Teilchenabstand abnimmt und damit der Messbereich für die maximale Geschwindigkeit bzw. Verschiebung der Bilder gegeneinander abnimmt.

Bei der Aufnahme, d.h. bei Messungen mußte also darauf geachtet werden, daß die Teilchendichten nicht zu hoch waren (s. Gl. (3.1)). Außerdem war durch die Verschmierung eine maximale Bildverschiebung und damit auch Feldstärke vorgegeben, die für die verwendeten Aufnahmeparameter bei ca. $12 V/mm - 15 V/mm$ lagen.

Mit dem oben Besprochenen kann nun zusammengefasst gesagt werden, daß mit der Korrelationsmethode eine automatisierte Methode gegeben ist, Mobilitäten von einzelnen Molekülen zu bestimmen.

4.4 Migration und Mobilitäten in strukturierten Kanälen

In diesem letzten Teil der Arbeit sollen die Migrationseigenschaften und Mobilitäten der verschiedenen DNA-Moleküle ($\Phi X174$, λ und T2) in unterschiedlichen Kanalgeometrien vorgestellt werden. Für die $\Phi X174$ -DNA werden jedoch lediglich qualitative Aussagen gemacht.

Da die absolute DNA-Mobilität in vorherigen Messungen nicht reproduziert werden konnte, wurden, wie in Kapitel 3.4 erwähnt, die λ - und T2-DNA abwechselnd je zweimal in einem Kanal gemessen. Aufgrund von Alterungseffekten wurde in einer Kontrollmessung in einem $1,5 \mu m$ -plan Kanal die Reihenfolge der Messung invertiert, so daß mit T2-DNA gestartet und mit λ -DNA weitergemessen wurde. Danach folgten wieder T2-DNA und λ -DNA. Für die Übersichtlichkeit werden daher immer die ersten beiden Messungen (erster Durchlauf) und letzten beiden Messungen (zweiter Durchlauf) in einem Kanal getrennt dargestellt. In Tabelle 4.3 sind vorab die gemessenen Mobilitäten aufgelistet. Wie später erläutert wird, macht sich der Alterungseffekt in den kleineren Kanälen stärker bemerkbar als in größeren Kanälen.

³Verschmieren des Bildes aufgrund der Bewegung des Teilchens während der Belichtungszeit

Kanalgeometrie	1. Messung, λ $\mu [10^{-4} \frac{cm^2}{Vs}]$	2. Messung, T2 $\mu [10^{-4} \frac{cm^2}{Vs}]$	3. Messung, λ $\mu [10^{-4} \frac{cm^2}{Vs}]$	4. Messung, T2 $\mu [10^{-4} \frac{cm^2}{Vs}]$
20 μm	$1,90 \pm 0,07^{(a)}$	$1,83 \pm 0,06^{(a)}$	$1,84 \pm 0,05^{(a)}$	$1,81 \pm 0,07^{(a)}$
1,5 μm para	1,83	1,46	1,59	1,40
1,5 μm plan	1,89	1,75	1,83	1,57
1,5 μm tilt	2,56	2,08	2,13	1,69
3,0 μm tilt	1,65	1,11	2,06	1,19
5,0 μm para	1,84	2,15	2,54	2,06
5,0 μm plan	1,46	1,51	0,97	1,52

Tabelle 4.3: DNA-Mobilitäten

Die Mobilitäten wurden mit der Kreuzkorrelationsanalyse bestimmt. Alterungseffekte der Strukturen erlauben keine Aussage zur absoluten Mobilität. Als Referenzwert dient die freie Mobilität, die in einem 20 μm Kanal gewonnen wurde und keine Anzeichen eines Alterungseffektes zeigte.

(a) Da der Alterungseffekt hier nicht auftrat, wurden nur für diese Messungen Fehler ermittelt.

4.4.1 Freie Mobilität in 20 μm Kanälen

Die freie Mobilität für DNA ist nach Gl. (2.16) konstant. Dieses wurde in einem 20 μm -Kanal für λ -DNA und T2-DNA gemessen. Die Abb. 4.18 und 4.19 zeigen die Mobilitätsdiagramme, in denen die Geschwindigkeit gegen die Feldstärke aufgetragen ist. Die Mobilitäten entsprechen den Steigungen der Geraden, die untereinander sehr ähnlich sind. Die Messwerte überdecken sich dabei ebenfalls immer sehr gut. Aufgrund der nicht stark abweichenden Werte der Mobilität in den zwei Durchläufen kann angenommen werden, daß sich der Alterungseffekt in dem 20 μm Kanal nicht bemerkbar macht. Daher sollen diese gemessenen Werte zusammengefaßt als die gemittelte Referenzmobilität $\bar{\mu} = (1,84 \pm 0,03) \cdot 10^{-4} cm^2/Vs$ betrachtet werden. Der Literaturwert liegt bei $\bar{\mu} = (2,15 \pm 0,03) \cdot 10^{-4} cm^2/Vs$ [14]. Die abweichenden Mobilitätswerte lassen sich auf die unterschiedlichen Meßsysteme zurückführen.

4.4.2 1,5 μm Kanäle

Die Migration einer λ -DNA durch einen plan-Kanal ist in einer Bildserie aus 6 Bildern in Abb. 4.20 dargestellt. Oben links befindet sich das erste, unten rechts das letzte Bild

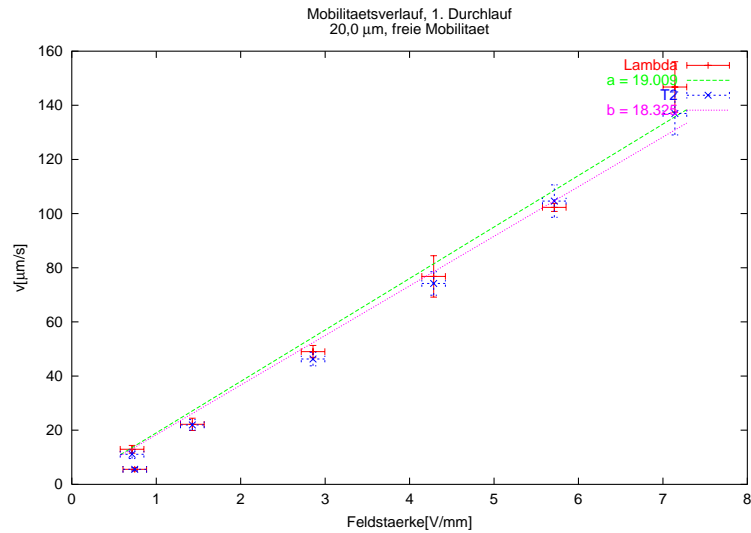


Abbildung 4.18: 1. Durchlauf: Freie Mobilität

Die Steigungen der Geraden geben die Mobilität wieder. Die Werte liegen hierbei alle sehr gut beieinander.

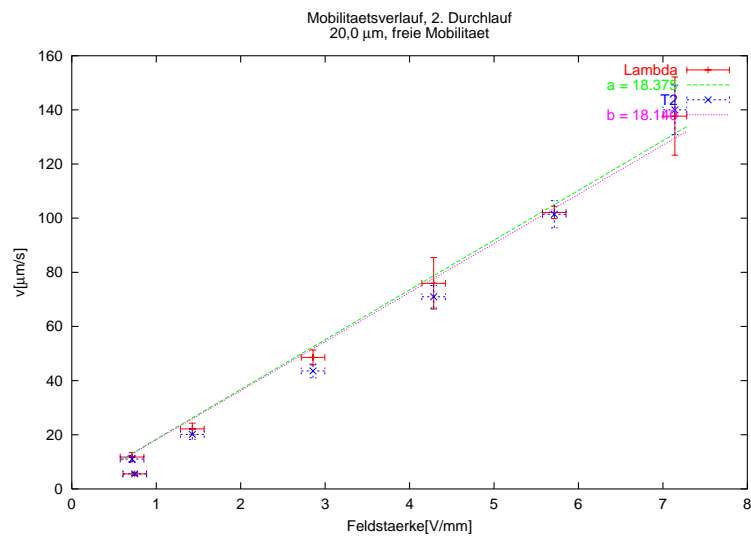


Abbildung 4.19: 2. Durchlauf: Freie Mobilität

Die Mobilitäten des 1. Durchlaufs konnten in diesem Durchlauf sehr gut reproduziert werden.

der Serie. Die λ -DNA⁴ passt mit ihrem Durchmesser von $d \simeq 1,4 \mu m$ nicht in den $1,5 \mu m$ strukturierten Kanal hinein⁵. Zu erkennen ist eine lineare Migration durch den Kanal, wobei der Kanal selbst nicht sichtbar ist. Die Geschwindigkeit v und das elektrische Feld E betragen $v = 100 \mu m/s$ und $5,8 V/mm$. Sehr schwache Beeinflussungen durch die Kanalkonstriktionen sind ebenfalls zu erkennen. In anderen Aufnahmen, die aufgrund des schlechteren Kontrastverhältnisses hier nicht gezeigt werden, sind die Beeinflussungen stärker ausgeprägt. Die λ -DNA scheint bei der Migration durch den Kanal eine leicht gestreckte Knäuelkonformation eingenommen zu haben. In der Bildserie ist eine Streckung der λ -DNA von ca. $5 \mu m$ zu sehen. Eine genaue Länge der Streckung kann aufgrund der Verschmierung nicht mit absoluter Gewissheit angegeben werden. Eine einfache grobe Abschätzung liefert für die Fortbewegung der DNA während der Belichtungszeit von $t \simeq 23 ms$ eine Distanz von $2,3 \mu m$. Die erzeugte Verschmierung hat daher eine maximale Ausdehnung von $2,3 \mu m$. Dieser Wert kann ungefähr auf die Hälfte korrigiert werden, da ein Pixel aufgrund der Lichtstärke der mit YOYO-1 interkalierten DNA mindestens $10 ms$ belichtet werden muß, um ein signifikantes Signal zu liefern. Damit ergibt sich für diesen Fall eine effektive Streckung der λ -DNA von $\approx 3,5 \mu m - 4 \mu m$. Eine T2-DNA zeigte bei dieser Feldstärke eine ähnliche Streckung, was auf die Ausweichmöglichkeit in die dritte Dimension des Kanals zurückzuführen ist, da die Mikrokanaltiefe ca. $2,7 \mu m$ betrug.

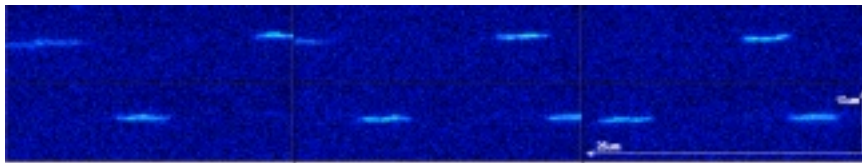


Abbildung 4.20: Bildserie einer λ -DNA in einem $1,5 \mu m$ plan-Kanal

Die Serie aus sechs Bildern beginnt oben links und endet unten rechts.
Die Moleküle bewegen sich jeweils von der rechten zur linken Bildseite.

⁴Aus der Gl. (2.8) ergibt sich für die λ -DNA ein Gyrationradius von $\bar{R}_g = \sqrt{1/3 \cdot l_p L} \simeq 0,7 \mu m$, mit der Persistenzlänge $l_p = 66 nm$ [79] und der Konturlänge $L = 20 \mu m$ [79, 80] für YOYO-1 angefärbte λ -DNA.

⁵Für die Übersichtlichkeit beziehen sich die Angaben immer auf die Originalgröße auf dem Masterwafer. Die geringeren Abmessungen, die durch ein Schrumpfen während des Herstellungsprozesses bedingt waren, sind aus Tabelle 4.2 zu entnehmen.

Para-Strukturen: Die Mobilitätsverläufe der Abb. 4.21 und Abb. 4.22 deuten auf einen Mobilitätsunterschied hin. Die Mobilitäten für die T2-DNA stimmen in den zwei Messungen gut überein, wohingegen ein Mobilitätsrückgang für die λ -DNA zu verzeichnen ist. Dieser Rückgang läßt sich auf einen Alterungseffekt der Kanalwände zurückführen. Während der Messung adsorbierten immer wieder kleine DNA-Fragmente an die Kanalwände, die vor der nächsten Messung mit den beschriebenen Reinigungsmethoden aus Kapitel 3.4 behandelt werden mußten. Eine Adsorption von negativ geladenen DNA-Fragmenten erhöhte die Oberflächenladung und damit auch den EOF. Die DNA bewegte sich bei diesen Experimenten immer in die elektrophoretische Richtung, also entgegengesetzt zum EOF, sodaß eine Verlangsamung aufgrund des erhöhten EOF zu erwarten war. Dieser Alterungseffekt war ausgeprägter, je länger die DNA in Kontakt mit den Mikrokanälen war und daher auch besonders in den kleinen Kanälen, wo das Oberflächen zu Volumen Verhältnis groß ist.

Plan-Strukturen: In Abb. 4.23 sind zusätzlich die Werte für die λ -DNA eingetragen, die mit der manuellen Geschwindigkeitsbestimmung gewonnen wurden (s. Kapitel 3.4). Die Übereinstimmung der beiden Methoden ist gut zu erkennen. In diesem Fall ist eine höhere Mobilität für die λ -DNA (Abb. 4.23 und Abb. 4.24) nicht bzw. kaum zu erkennen, da sich die Messdaten mit den Fehlerbalken zum größten Teil überdecken. Aufgrund dessen kann über den etwas steileren Anstieg der Geraden keine signifikante Aussage gemacht werden. Erwartet wurde aber eine geringere Mobilität für die T2-DNA, da sich die Strukturgrößen zur vorherigen nicht wesentlich unterschieden haben.

Für diese Struktur wurde eine zusätzliche Kontrollmessung mit der umgekehrten Reihenfolge ($T2 \rightarrow \lambda \rightarrow T2 \rightarrow \lambda$) vorgenommen. Abb. 4.25 und Abb. 4.26 zeigen für λ -DNA in den beiden Durchläufen eine höhere Mobilität als für T2-DNA. Auch hier macht sich der Alterungseffekt der Kanalwände wieder bemerkbar. Insgesamt nimmt die Mobilität je Meßreihe ab, allerdings wird für λ -DNA jeweils eine größere Mobilität gefunden als für T2-DNA. Die unterschiedlichen relativen Mobilitäten sind also keine Ursache des Alterungseffekts! Daher kann von einer längenabhängigen Mobilität ausgegangen werden.

Geneigte-Strukturen: Für kleine Feldstärken von bis zu 5 V/mm liegen die Meßpunkte nahe beieinander (Abb. 4.27 und Abb. 4.28). Für höhere Feldstärken macht sich eine deutliche geringere Mobilität für die T2-DNA bemerkbar. Deutlich ist auch der Rückgang der Mobilität von den ersten beiden Messungen zu den letzten beiden Messungen zu sehen, wobei jedoch die Mobilität der λ -DNA immer größer als die der T2-DNA

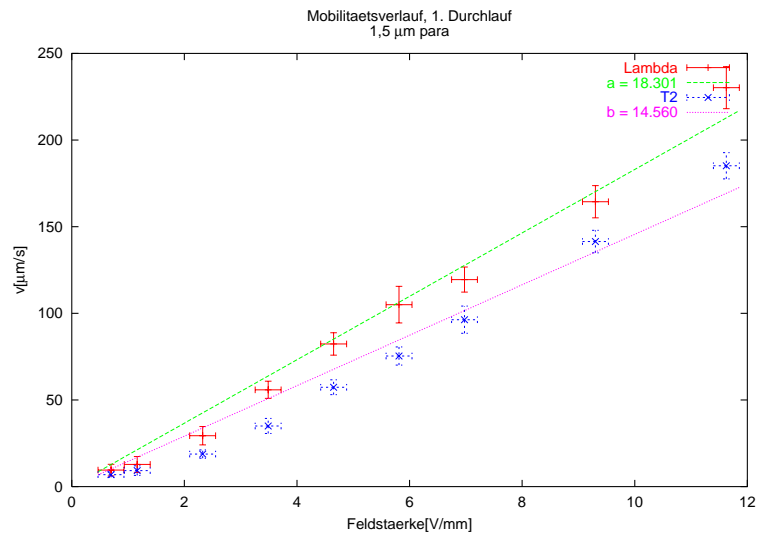


Abbildung 4.21: 1. Durchlauf: 1,5 μm para

Die Messpunkte sind für Feldstärken $> 2V/mm$ voneinander getrennt. Die Gerade geht wie erwartet durch den Ursprung.

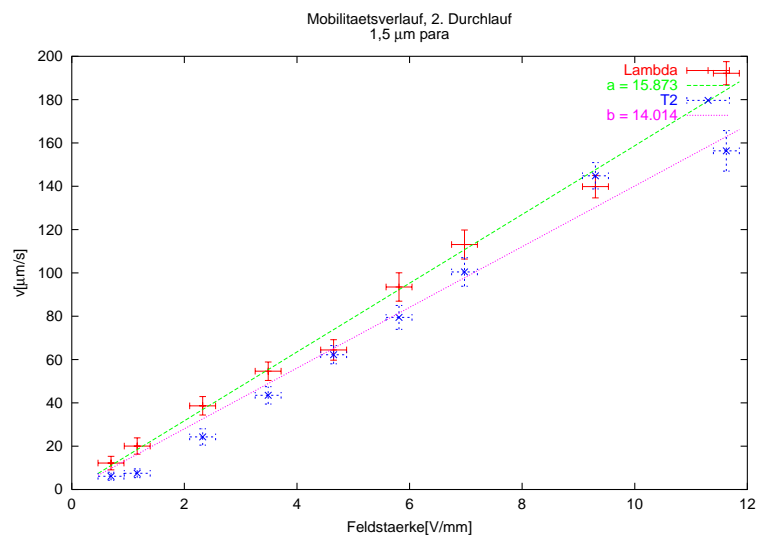


Abbildung 4.22: 2. Durchlauf: 1,5 μm para

Die letzten Messpunkte liegen deutlich auseinander, wodurch die unterschiedlichen Mobilitäten resultieren.

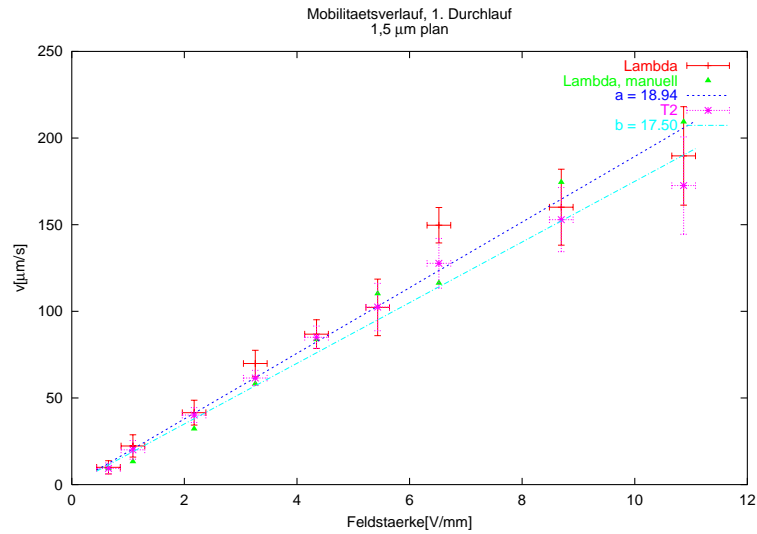


Abbildung 4.23: 1. Durchlauf: 1,5 μm plan

Die Fehlerbalken der Messwerte sind immer überlagert, sodaß keine unterschiedlichen Mobilitäten zu erkennen sind. Die Dreiecke stellen die Werte nach manueller Auswertung dar.

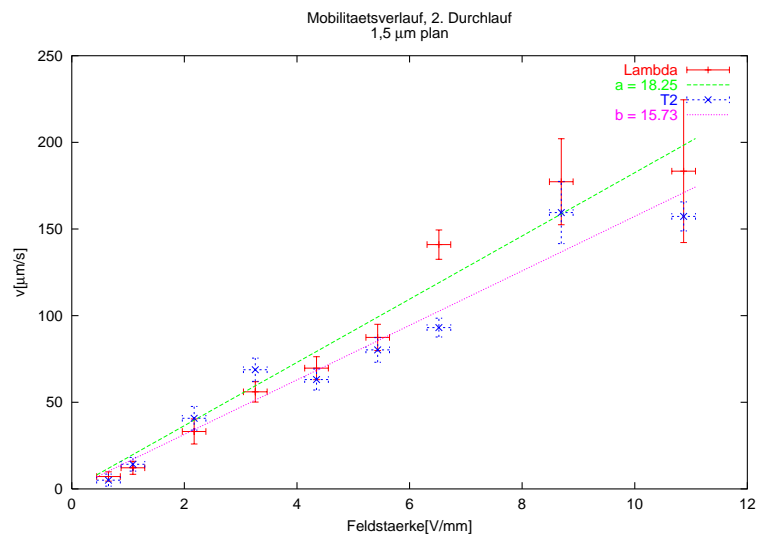


Abbildung 4.24: 2. Durchlauf: 1,5 μm plan

Die Meßwerte lassen keine unterschiedlichen Mobilitäten erkennen.

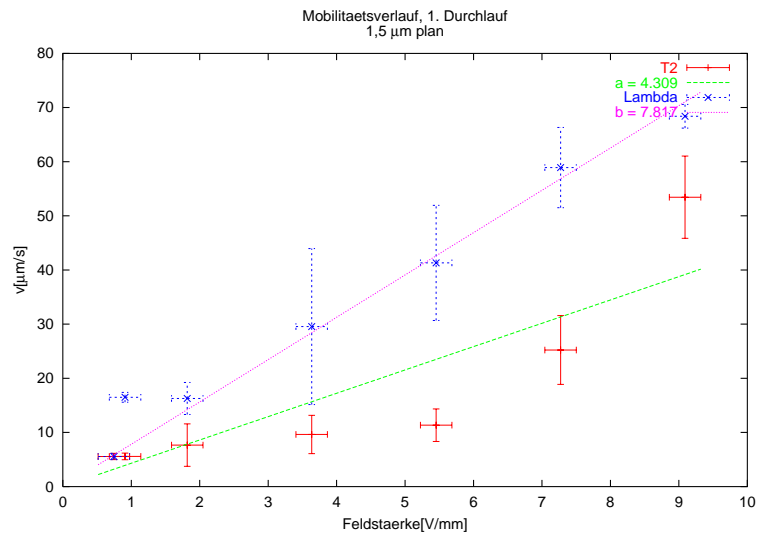


Abbildung 4.25: 1. Durchlauf mit umgekehrter Reihenfolge
Trotz großer Fehlerbalken sind unterschiedliche Mobilitäten gut zu erkennen.

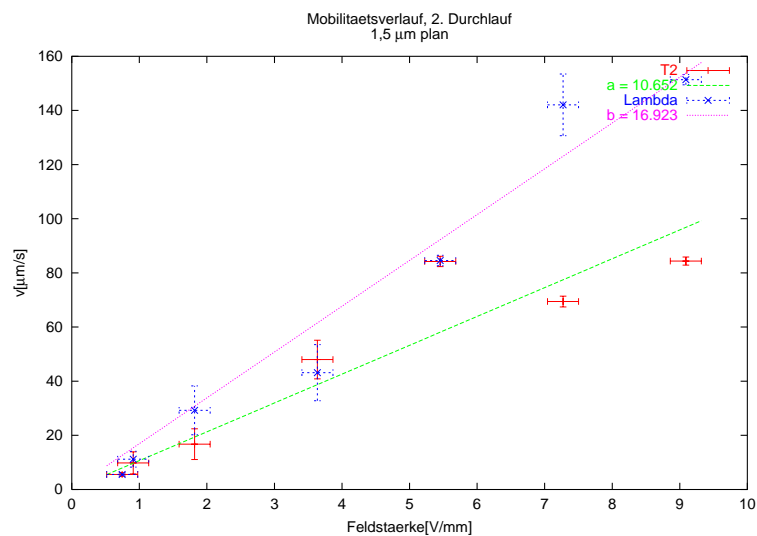


Abbildung 4.26: 2. Durchlauf mit umgekehrter Reihenfolge
Die Meßwerte streuen sehr stark um die angefitzte Kurve, doch ein Mobilitätsunterschied ist zu erkennen.

ist. Da die tilt-Struktur sich kaum von der plan-Struktur unterscheidet, wurden keine zusätzlichen Effekte erwartet. Tendenziell zeigen alle $1,5 \mu\text{m}$ Strukturen eine verringerte Mobilität für die T2-DNA.

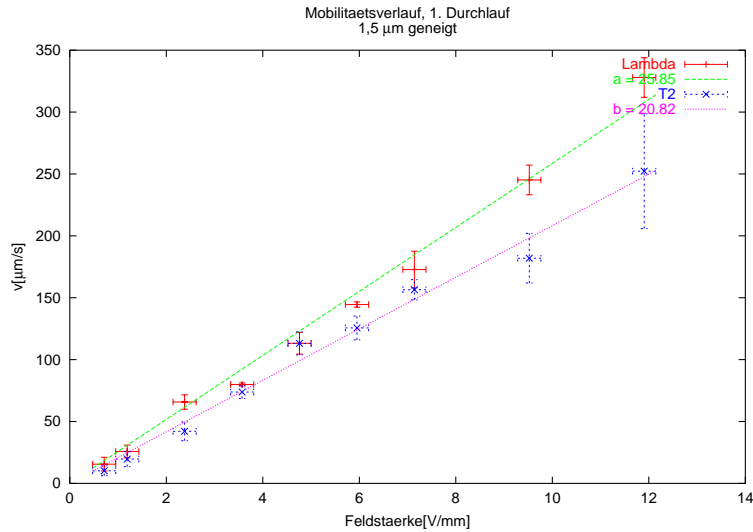


Abbildung 4.27: 1. Durchlauf: $1,5 \mu\text{m}$ tilt

Ein Mobilitätsunterschied scheint vorhanden zu sein, lässt sich aber aufgrund des letzten großen Fehlerbalkens der T2 nicht genau sagen.

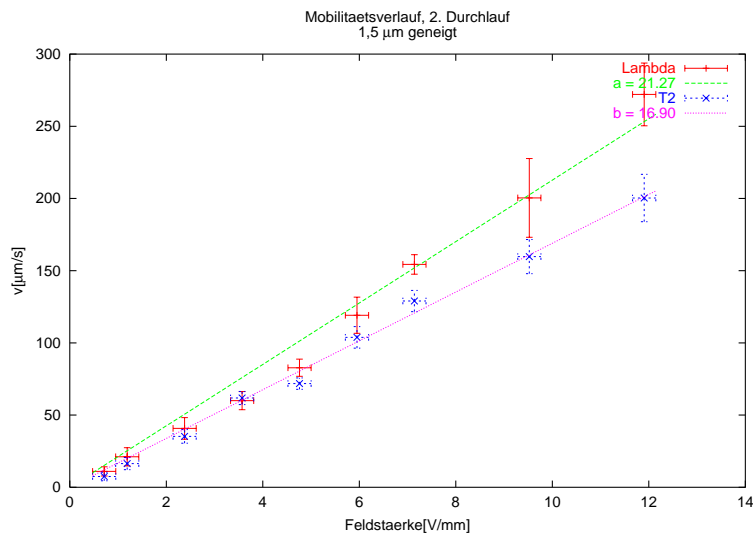


Abbildung 4.28: 2. Durchlauf: $1,5 \mu\text{m}$ tilt

Der Mobilitätsunterschied ist deutlich zu erkennen.

4.4.3 3.0 μm Kanäle

Wie in Kapitel 4.4.2 ist hier eine Bildserie für λ -DNA durch eine 3 μm tilt-Struktur in Abb. 4.29 gezeigt. Man erkennt deutlich die Beeinflussung durch die periodische Strukturierung, obwohl die λ -DNA mit ihrem Durchmesser von $d \approx 1,4 \mu\text{m}$ fast zweimal in den Kanal hineinpassen könnte. Die Beeinflussung könnte sich auf das inhomogene elektrische Feld zurückführen lassen. Simulationen deuten solche Effekte an. Sie wurden allerdings nur qualitativ anhand einer Modellstruktur durchgeführt und sind hier deshalb nicht gezeigt. Die Streckung der DNA von 4,5 μm wird durch die Verschmierung von $140 \mu\text{m}/\text{s} \cdot 23 \text{ms} \simeq 3,2 \mu\text{m}$ relativiert. Die geringere Streckung der DNA trotz höherer Feldstärke (6,5 V/mm) gegenüber der 1,5 μm Kanäle läßt sich damit begründen, daß die λ -DNA jetzt vollständig in den Kanal hineinpasste. Die T2-DNA paßte von ihren Ausmaßen nur knapp in den Kanal hinein. Die Ausmaße der T2-DNA⁶ sind jedoch zu groß, um ein vollständiges Knäueln in den Mikrostrukturen zu ermöglichen.

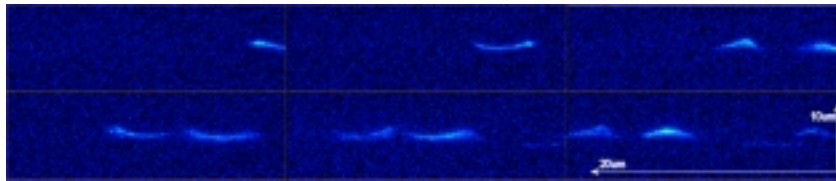


Abbildung 4.29: Bildserie einer λ -DNA in einem 3,0 μm tilt-Kanal

Die Bildserie beginnt oben links und endet unten rechts. Die Migration läuft jeweils vom rechten zum linken Bildrand

Die Abb. 4.30 und Abb. 4.31 zeigen, daß ab einer Feldstärke von ca. 4 V/mm die Meßpunkte deutlich voneinander getrennt sind. Die Mobilitäten für die T2-DNA unterscheiden sich kaum, wobei die λ -DNA im 1. Durchlauf kleiner ist als im zweiten. Mit hoher Sicherheit kann gesagt werden, daß eine Längenabhängigkeit erzielt wurde.

4.4.4 5.0 μm Kanäle

Abb. 4.32 und Abb. 4.33 zeigen T2-DNA-Moleküle in einem para-Kanal ohne Feld und bei anliegendem Feld. Die Strukturierungen sind hier aufgrund zusätzlichem Durchlicht während der Aufnahme sehr gut zu erkennen. Abb. 4.34 zeigt ebenfalls T2-DNA, dieses mal in einem plan-Kanal. Die Streckung von ca. 8 μm hebt sich gegenüber der

⁶Aus der Gl. (2.8) ergibt sich mit der Konturlänge $L = 72 \mu\text{m}$ [80] (Anfärbung mit YOYO-1) ein Gyrationradius von $\bar{R}_g \simeq 1,3 \mu\text{m}$ und folglich ein Durchmesser von $\simeq 2,6 \mu\text{m}$.

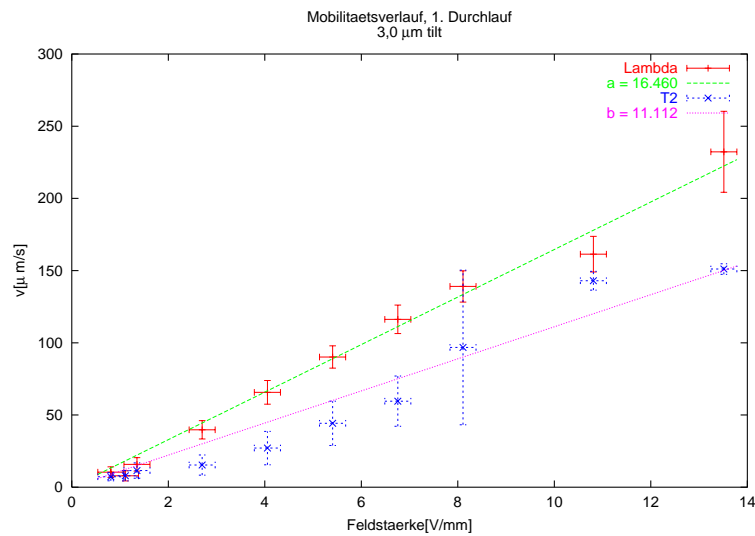


Abbildung 4.30: 1. Durchlauf: 3,0 μm tilt

Mobilitätsunterschiede sind gut zu erkennen. Bis auf wenige Meßpunkte sind deutlich voneinander getrennt.

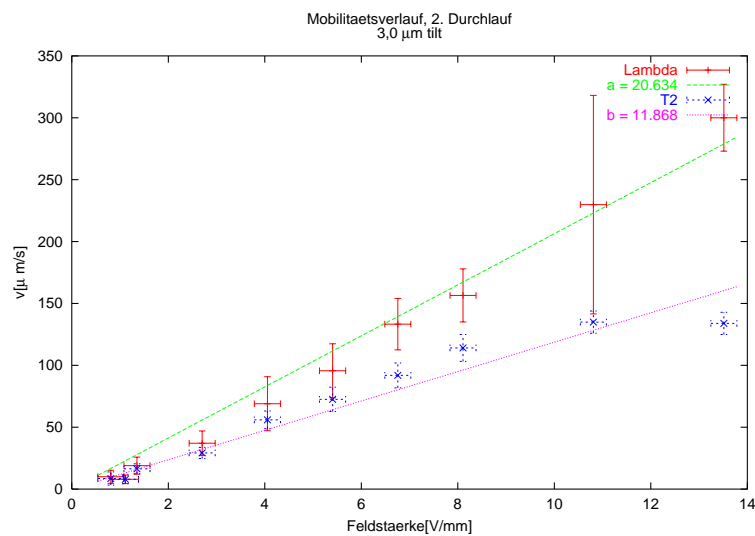


Abbildung 4.31: 2. Durchlauf: 3,0 μm tilt

Mobilitätsunterschied ist wieder gut zu erkennen. Der große Fehlerbalken bei ca. 11 V/mm deutet auf Reste der T2-DNA aus dem 1. Durchlauf hin.

Verschmierung von $50 \mu\text{m}/\text{s} \cdot 23 \text{ms} \simeq 1,2 \mu\text{m}$ deutlich hervor. Aufgrund der großen Kanalbreite werden nicht alle Moleküle von dem elektrischen Feld (hier: $4,5 \text{V}/\text{mm}$) in die Boxen gezwungen. Die Moleküle, die den Strukturierungen folgen, haben dabei eine effektiv kleinere Mobilität. Diese zwei unterschiedlichen Mobilitäten und die etwas längere Aufenthaltsdauer in den Boxen machen eine automatisierte Mobilitätsbestimmung fehleranfällig.

In Abb. 4.35 ist eine ΦX174 -DNA in einem $5 \mu\text{m}$ plan-Kanal gezeigt, das diffusiv gefangen ist, sich im letzten drittel der Bildsequenz befreit und mit einem von rechts kommendem Molekül von der Box entfernt. In Experimenten mit entropischen Fallen wurden für kurze DNA-Fragmente geringere Mobilitäten als für lange DNA-Fragmente gefunden [3, 41-44]. In Simulationen konnte dieses ebenfalls bestätigt werden (s. Kapitel 2.4.3). Die geringere Mobilität für kürzere Ketten ist, wie bereits beschrieben, auf zwei Phänomene zurückzuführen. Das Phänomen des diffusiven Fangens wurde weder für die λ -, noch für die T2-DNA beobachtet.

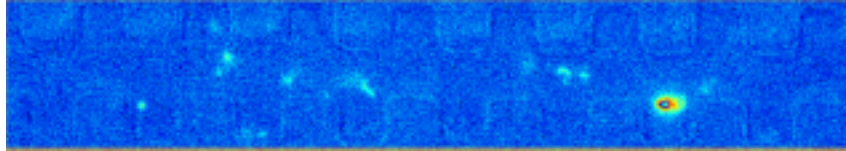


Abbildung 4.32: Gezeigt ist der Schnappschuß einer T2-DNA in Lösung und ohne Feld ($0 \text{V}/\text{mm}$) in einer $5,0 \mu\text{m}$ para-Struktur, die mit zusätzlichem Durchlicht sichtbar gemacht wurde. Mit ihrem Durchmesser paßt die T2-DNA knapp in den Kanal hinein.

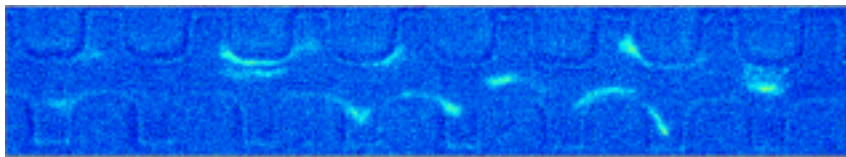


Abbildung 4.33: Schnappschuß einer T2-DNA in einer $5,0 \mu\text{m}$ plan-Struktur wie im letzten Beispiel - diesmal bei anliegendem Feld ($5,3 \text{V}/\text{mm}$). Die Streckung des Moleküls ist deutlich zu sehen. Die Trajektorie kann auch mit nur einem Bild erahnt werden.

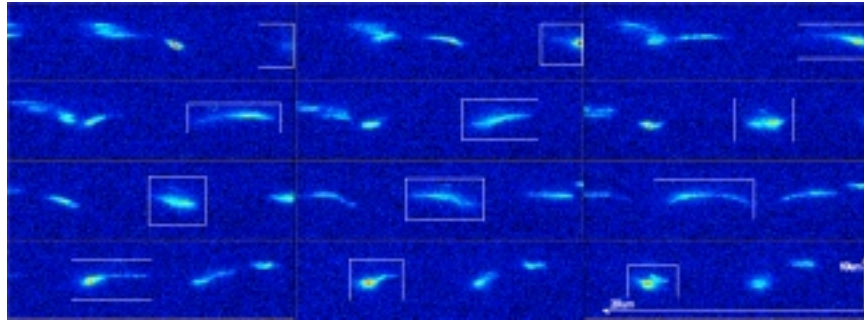


Abbildung 4.34: Bildserie einer T2-DNA in einer $5,0 \mu m$ plan-Struktur

Die Bildserie beginnt oben links und endet unten rechts. Eine T2-DNA bewegt sich von der rechten zur linken Bildseite. Die DNA hält sich dabei länger in den Boxen auf.

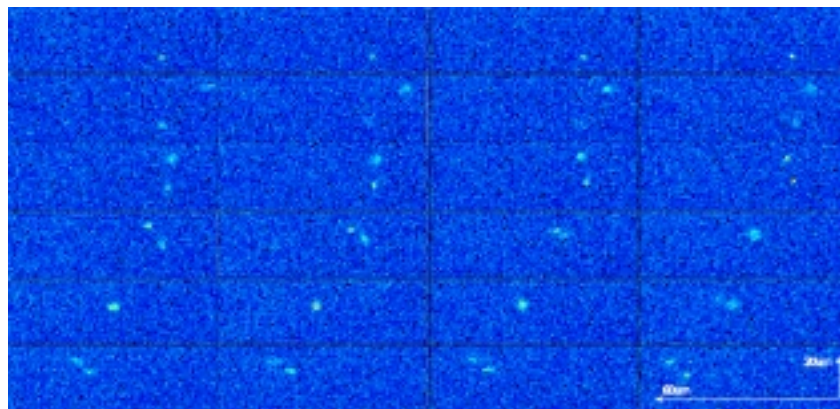


Abbildung 4.35: Diffusiv gefangene $\Phi X174$ -DNA

In der obersten Bildreihe ist ein kurzes DNA-Molekül zu sehen, daß diffusiv gefangen ist. Nach einiger Zeit kann es sich lösen und folgt einem hinzugekommenen Teilchen.

Para- und plan-Strukturen: Die Abb. 4.36 zeigt die Geschwindigkeitsverläufe für λ - und T2-DNA in einem $5,0 \mu m$ plan-Kanal, die mit der manuellen und automatisierten Methode gewonnen wurde. Ohne Fehlerabschätzungen der manuellen Methode kann aber gesagt werden, daß die Werte für beide Methoden bis zu einer Feldstärke von $< 7 V/mm$ gut übereinstimmen. Die Abweichungen für hohe Feldstärken lassen in diesem Fall durch die kleinen mittleren Teilchenabstände erklären. Die Abb. 4.37 zeigt die mit der automatisierten Methode gewonnenen Geschwindigkeiten für die λ - und T2-DNA in einem para-Kanal.

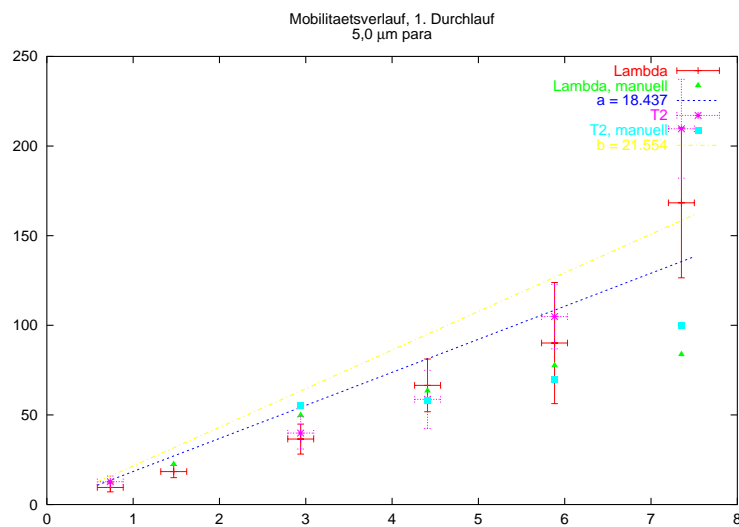


Abbildung 4.36: 1. Durchlauf: $5,0 \mu m$ para

Aufgrund der Überlappungen der Fehlerbalken lassen sich keine Aussagen über Mobilitätsunterschiede machen. Eingetragen sind auch die Werte, die mit der manuellen Auswertung erhalten wurden (Quadrate entsprechen T2, Dreiecke entsprechen λ). Die Abweichungen der letzten beiden Werte lassen sich mit den kleinen mittleren Teilchenabständen erklären.

Die großen Fehlerbalken sind dabei auf die unterschiedlichen Mobilitäten zurückzuführen, die eine breite Geschwindigkeitsverteilung bedeuten. Damit wird es kaum bzw. nicht möglich sein, verschiedene DNA-Längen aufzutrennen. Hinzu kommt, daß sich die ermittelten Mobilitäten für λ - und T2-DNA nicht merklich voneinander unterscheiden.

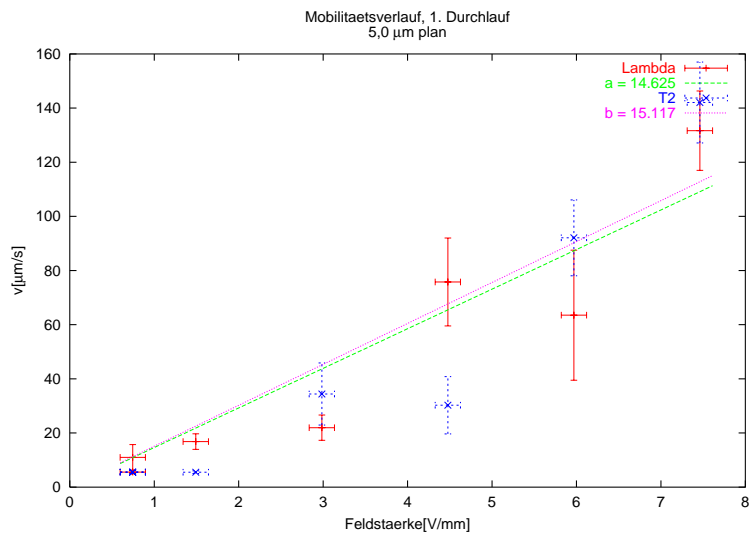


Abbildung 4.37: 1. Durchlauf: 5,0 μm plan

Aufgrund der großen Streuung der Meßwerte und des Überlapps der Fehlerbalken lassen sich keine Aussagen zu Mobilitätsunterschieden machen.

5 Zusammenfassung & Ausblick

In dieser Arbeit wurden die DNA-Migration und die Mobilitäten in selbst hergestellten strukturierten Mikrokanälen in einem Bereich von $1,5 \mu\text{m}$ bis $5 \mu\text{m}$ untersucht. Für die Untersuchung der Migration wurden λ -, T2- und ΦX174 -DNA-Moleküle verwendet, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff YOYO-1 angefärbt waren. Mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops und einer empfindlichen CCD-Kamera wurden die DNA-Moleküle detektiert und aufgezeichnet. Das diffusive Fangen eines kurzen DNA-Moleküls (ΦX174) in einer Kanalkonstriktion von $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ wurde, wie in der theoretischen Arbeit von M. Streek [39] vorhergesagt, aufgenommen.

Die Mobilitäten zweier verschieden langer DNA-Moleküle konnten mittels einer Kreuzkorrelationsanalyse ermittelt werden. Es stellte sich heraus, daß die kürzere λ -DNA in den strukturierten $1,5 \mu\text{m}$ und $3 \mu\text{m}$ Kanälen eine höhere Mobilität als die lange T2-DNA besaß. In den $5 \mu\text{m}$ Kanälen wurden jeweils zwei Mobilitäten festgestellt, die durch unterschiedliche Trajektorien i) entlang der Kanalstrukturierungen und ii) im mittleren, nicht strukturierten Teil der Kanäle verursacht werden. Die lineare Bewegung durch den Kanal sollte theoretisch der freien Mobilität entsprechen, was aufgrund von Schwierigkeiten in der Reproduzierbarkeit der Mobilitäten noch nicht mit Bestimmtheit gesagt werden kann. Die Mobilitätsunterschiede der verschiedenen DNA-Längen wurden im Wesentlichen auf zwei Effekte zurückgeführt, die beide längenabhängig sind:

- Die durch geometrische Konstriktionen verursachte Konformationsänderungen hat einen Verlust an freier/innerer Energie und damit eine Abbremsung zur Folge.
- Attraktive Wechselwirkungen der DNA mit der Kanaloberfläche führen zu einem Abbremsungseffekt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß die Kreuzkorrelationsanalyse eine zuverlässige Methode darstellt, um automatisiert und objektiv die Geschwindigkeiten von einzelnen bis wenigen Molekülen zu ermitteln.

Für sehr hohe elektrische Felder, wenn die DNA stark gestreckt ist, wird daher nicht

mehr eine längenabhängige, sondern eine feldabhängige Mobilität bzw. Mobilität wie in freier Lösung erwartet. Aufgrund der langen Belichtungszeit der Kamera und des daraus resultierenden Verschmierens der Bilder war es nicht möglich, die Mobilität bei höheren Feldstärken zu untersuchen. Mit einer schnellen, intensivierten Kamera, deren Belichtungszeit bis auf wenige hundert *ns* reduziert werden kann, ließe sich die Verschmierung des Bildes unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikrokops begrenzen. Dadurch wäre es möglich, eine nahezu „echte“ Konformation der DNA in „Echtzeit“ (25 Bilder pro Sekunde) aufzunehmen. Damit ließe sich der Bereich und die Genauigkeit der Mobilitätsbestimmung erhöhen.

Eine andere Art und Weise, die Mobilität zu bestimmen kann mit der sog. *Injektions-Pinch-Methode* erfolgen. Hierbei nimmt ein Detektor an einer bestimmten Stelle das Fluoreszenzsignal von DNA-Molekülen auf, die alle von einem gleichen Ort und zu einer gleichen Zeit, z.B. an einer Kreuzung, gestartet sind. Dieser Versuchsaufbau kann mit etwas Aufwand zu einem LD-Spektroskopie-Aufbau (Lineardichroismus) ummodifiziert werden. Dieser hat gegenüber einem Aufbau mit einer CCD-Kamera den Vorteil, daß er viel schnellere Konformationsänderungen auflösen kann, dafür aber den Nachteil, daß er nicht 2-dimensional ortsauflösend ist.

Das Problem hinsichtlich der fehlenden Reproduzierbarkeit bei den Mobilitätsmessungen ließe sich z.B. durch Beschichten der Kanalwände mit linearem Polyacrylamid (LPA), BSA oder anderen Beschichtungen beheben [81-84]. Die Beschichtungen sollen die unspezifische Adsorptionen von Molekülen an die Wände verhindern.

Entgegen den Ergebnissen dieser Arbeit wurden in experimentellen Untersuchungen der entropischen Fallen höhere Mobilitäten für lange DNA-Moleküle gefunden. Die $5,0 \mu m$ Kanalstruktur stellt mit ihrer großen Kanalbreite ein Zwischenkonstrukt aus $1,5 \mu m$ bzw. $3,0 \mu m$ und einer entropischen Falle dar. Durch Verringerung der Kanalbreite bei Beibehaltung der Strukturgrößen müßte sich für eine bestimmte DNA-Moleküllänge ein Übergangsbereich zur entropischen Falle bemerkbar machen. Daher wird die Untersuchung anderer Kanalgeometrien und der sogenannten Ratschen [45,85-89] weitere interessante Aufschlüsse über die DNA-Migration für die Entwicklung neuer effizienterer Auftrennungstechniken liefern.

Literaturverzeichnis

- [1] C. BORCHARD-TUCH: *Lebendes Chiffriergerät - Kryptographie mit Hilfe von DNA*. c't, Verlag Heinz Heise GmbH & Co KG, 3:94–97, 2002.
- [2] C. BUSCH, H. DAUM: *Frei von Zweifel? - Biometrische Erkennung: Grundlagen, Verfahren, Sicherheit*. c't, Verlag Heinz Heise GmbH & Co KG, 5:156–161, 2002.
- [3] G. W. SLATER, C. DESRUISSEAU, S. J. HUBERT J. F. MERCIER J. LABRIE J. BOILEAU F. TESSIER M. P. PEPIN: *Theory of DNA electrophoresis: a look at some current challenges*. *Electrophoresis*, 21(18):3873–3887, 2000.
- [4] S. HU, N. J. DOVICH: *Capillary electrophoresis for the analysis of biopolymers*. *Anal.Chem.*, 74(12):2833–2850, 2002.
- [5] R. WINTER, F. NOLL: *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Teubner Studienbücher - Chemie, 1998.
- [6] L. STRYER: *Biochemie*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg; Berlin, 1996.
- [7] J. L. VIOVY: *Electrophoresis of DNA, other polyelectrolytes: Physical mechanisms*. *Reviews of Modern Physics*, 72:813–872, 2000.
- [8] P. R. CHOUDHURY: *Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication: Microlithography 1*. SPIE - Intl Society for optical engineering, Bellingham, 1997.
- [9] A. BAUMGAERTNER: *Scaling Laws of Polymers - Soft Matter: Complex Materials on Mesoscopic Scales*. 33. IFF-Ferienkurs 2002 - Institut für Festkörperforschung, 33:B3.1–B3.13, 2002.
- [10] S. HOFFMANN: *Conformations of Polymer Chains - Soft Matter: Complex Materials on Mesoscopic Scales*. 33. IFF-Ferienkurs 2002 - Institut für Festkörperforschung, 33:B2.1–B2.20, 2002.

- [11] M. DOI, S. F. EDWARDS: *The theory of Polymer Dynamics*. Oxford University Press, New York, 1986.
- [12] R. G. WINKLER: *Polyelectrolytes - Soft Matter: Complex Materials on Mesoscopic Scales*. 33. IFF-Ferienkurs 2002 - Institut für Festkörperforschung, 33:B5.1–B2.31, 2002.
- [13] P. D. GROSSMAN, J. C. COLBURN: *Capillary Electrophoresis, Theory and Practice: Free Solution Capillary Electrophoresis*. Acad. Press, San Diego, 1992.
- [14] B. M. OLIVERA, P. BAINE, N. DAVIDSON: *Electrophoresis of Nucleic Acids*. *Biopolymers*, 2:245–257, 1958.
- [15] D. ANSELMETTI: *Vorlesungsmanuskript - Biophysik II*. Universität Bielefeld, SS2002.
- [16] L. S. LERMAN, H. L. FRISCH: *Communications to the editor - Why does the electrophoretic mobility of DNA in gels vary with the length of the molecule*. *Biopolymers*, 21:995–997, 1982.
- [17] T. DUKE, J.-L. VIOVY, A. N. SEMENOW: *Electrophoretic Mobility of DNA in Gels. I. New Biased Reptation Theory Including Fluctuations*. *Biopolymers*, 34:239–247, 1994.
- [18] M. LALANDE, J. NOOLANDI, C. TURMEL J. ROUSSEAU G. W. SLATER: *Pulsed-field electrophoresis: application of a computer model to the separation of large DNA molecules*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 84:8011–8015, 1987.
- [19] J. NOOLANDI, G. W. SLATER, H. A. LIM J. L. VIOVY: *Generalized tube model of biased reptation for gel electrophoresis of DNA*. *Science*, 243:1456–1458, 17-3-1989.
- [20] J. ROUSSEAU, G. DROUIN, G. W. SLATER: *Gel electrophoretic mobility of single-stranded DNA: the two reptation field-dependent factors*. *Electrophoresis*, 21(8):1464–1470, 2000.
- [21] G. W. SLATER, J. NOOLANDI: *New biased-reptation model for charged polymers*. *Physical Review Letters*, 55:1579–1582, 1985.
- [22] G. W. SLATER, J. ROUSSEAU, J. NOOLANDI C. TURMEL M. LALANDE: *Quantitative analysis of the three regimes of DNA electrophoresis in agarose gels*. *Biopolymers*, 27:509–524, 1988.

- [23] G. W. SLATER, J. NOOLANDI: *Effect of nonparallel alternating fields on the mobility of DNA in the biased reptation model of gel electrophoresis*. Electrophoresis, 10:413–428, 1989.
- [24] G. W. SLATER, J. NOOLANDI: *The biased reptation model of DNA gel electrophoresis: mobility vs molecular size, gel concentration*. Biopolymers, 28:1781–1791, 1989.
- [25] R. A. MOSHER, C. X. ZHANG, J. CASLAVSKA W. THORMANN: *Dynamic simulator for capillary electrophoresis with in situ calculation of electroosmosis*. Journal of Chromatography, 716:17–26, 1995.
- [26] G. W. SLATER, P. MAYER, S. J. HUBERT G. DROUIN: *The biased reptation model of DNA gel electrophoresis: a user guide for constant field mobilities*. Appl.Theor.Electrophor., 4:71–79, 1994.
- [27] S. MAGNUSDOTTIR, B. AKERMAN, M. JONSSON: *DNA electrophoresis in agarose gels: three regimes of DNA migration identified, characterized by the electrophoretic orientational behavior of DNA*. Journal of Physical Chemistry, 98:2624–2633, 1993.
- [28] J. M. DEUTSCH: *Theoretical studies of DNA during gel electrophoresis*. Science, 240:922–924, 1988.
- [29] A. LARSSON, B. AKERMAN: *Period times, helix alignment during the cyclic migration of DNA in electrophoresis gels studied with fluorescence microscopy*. Macromolecules, 28:4441–4454, 1995.
- [30] D. G. WEISS, W. MAILE, R. A. WICK W. STEFFEN: *[03] Title*. IRI Press, 2002.
- [31] C. CARLSSON, A. LARSSON, M. JONSSON B. ALBINSSON B. NORDEN: *Optical, photophysical properties of the oxazole yellow DNA probes YO, YOYO*. Journal of Physical Chemistry, 98:10313–10321, 1994.
- [32] S. GURRIERI, S. B. SMITH, K. S. WELLS I. D. JOHNSON C. BUSTAMANTE: *Real-time imaging of the reorientation mechanisms of YOYO-labelled DNA molecules during 90 degrees, 120 degrees pulsed field gel electrophoresis*. Nucleic Acids Res., 24:4759–4767, 1996.

- [33] D. MARIE, D. VAULOT, F. PARTENSKY: *Application of the novel nucleic acid dyes YOYO-1, YO-PRO-1, PicoGreen for Flow Cytometric Analysis of marine prokaryotes*. Applied, Environmental Microbiology, 62(5):1649–1655, 1996.
- [34] S. GURRIERI, K. S. WELLS, I. D. JOHNSON C. BUSTAMANTE: *Direct visualization of individual DNA molecules by fluorescence microscopy: characterization of the factors affecting signal/background, optimization of imaging conditions using YOYO*. Anal.Biochem., 249:44–53, 1997.
- [35] B. AKERMAN, E. TUIITE: *Single-, double-strand photocleavage of DNA by YO, YOYO, TOTO*. Nucleic Acids Res., 24:1080–1090, 1996.
- [36] L. D. SIMON, K. H. ABRAMO, J. K. SELL L. B. MCGOWN: *Oxazole yellow dye interactions with short DNA oligomers of homogeneous base composition, their hybrids*. Biospectroscopy., 4:17–25, 1998.
- [37] F. LOTTSPEICH, H. ZORBAS: *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin, 1998.
- [38] M. D. WANG, H. YIN, R. LANDICK J. GELLES S. M. BLOCK: *Stretching DNA with optical tweezers*. Biophys.J., 72:1335–1346, 1997.
- [39] M. STREEK: *Migration von DNA auf strukturierten Oberflächen in einem äußeren Feld*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2002.
- [40] W. D. VOLKMUTH, R. H. AUSTIN: *DNA electrophoresis in microlithographic arrays*. NATURE, 358:600–602, 1992.
- [41] J. HAN, H. G. CRAIGHEAD: *Entropic trapping, sieving of long DNA molecules in a nanofluidic channel*. J.Vac.Sci.Technol.A, 17(4):2142–2174, 1999.
- [42] J. HAN, S. W. TURNER, H. G. CRAIGHEAD: *Entropic trapping, escape of long DNA molecules at submicron size constriction*. Physical Review Letters, 83(8):1688–1691, 1999.
- [43] J. HAN, H. G. CRAIGHEAD: *Separation of long DNA molecules in a microfabricated entropic trap array*. Science, 288:1026–1029, 12-5-2000.
- [44] S. W. TURNER, M. CABODI, H. G. CRAIGHEAD: *Confinement-induced entropic recoil of single DNA molecules in a nanofluidic structure*. Phys.Rev.Lett., 88(12):128103–, 2002.

- [45] G. W. SLATER, H. L. GUO, G. I. NIXON: *Bidirectional Transport of Polyelectrolytes Using Self-Modulation Entropic Ratchets*. Phys. Rev. Lett., 78:1170–1173, 1997.
- [46] G. I. NIXON, G. W. SLATER: *Entropic trapping and electrophoretic drift of a polyelectrolyte down a channel with a periodically oscillating width*. Phys. Rev. E, 53:4969–4980, 1996.
- [47] P. A. AUROUX, D. IOSSIFIDIS, D. R. REYES A. MANZ: *Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations, Applications*. Anal.Chem., 74(12):2623–2636, 2002.
- [48] M. L. CHABINYC, D. T. CHIU, J. C. McDONALD A. D. STROOCK J. F. CHRISTIAN A. M. KARGER G. M. WHITESIDES: *An integrated fluorescence detection system in poly(dimethylsiloxane) for microfluidic applications*. Anal.Chem., 73(18):4491–4498, 2001.
- [49] S. LIU, Y. SHI, W. W. JA R. A. MATHIES: *Optimization of high-speed DNA sequencing on microfabricated capillary electrophoresis channels*. Anal.Chem., 71:566–573, 1999.
- [50] H. ZHOU, A. W. MILLER, Z. SOSIC B. BUCHHOLZ A. E. BARRON L. KOTLER B. L. KARGER: *DNA sequencing up to 1300 bases in two hours by capillary electrophoresis with mixed replaceable linear polyacrylamide solutions*. Anal.Chem., 72(5):1045–1052, 2000.
- [51] E. CARRILHO, M. C. RUIZ-MARTINEZ, J. BERKA I. SMIRNOV W. GOETZINGER A. W. MILLER D. BRADY B. L. KARGER: *Rapid DNA sequencing of more than 1000 bases per run by capillary electrophoresis using replaceable linear polyacrylamide solutions*. Anal.Chem., 68(19):3305–3313, 1996.
- [52] C. S. EFFENHAUSER, G. J. M. BRUIN, A. PAULUS M. EHRAT: *Integrated Capillary Electrophoresis on Flexible Silicone Microdevices: Analysis of DNA Restriction Fragments, Detection of Single DNA Molecules on Microchips*. Analytical Chemistry, 69:3451–3457, 1997.
- [53] A. T. WOOLLEY, R. A. MATHIES: *Ultra-high-speed DNA sequencing using capillary electrophoresis chips*. Anal.Chem., 67:3676–3680, 1995.

- [54] A. T. WOOLLEY, R. A. MATHIES: *Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 91(24):11348–11352, 1994.
- [55] P. C. SIMPSON, D. ROACH, A. T. WOOLLEY T. THORSEN R. JOHNSTON G. F. SENSABAUGH R. A. MATHIES: *High-throughput genetic analysis using microfabricated 96-sample capillary array electrophoresis microplates*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 95(5):2256–2261, 1998.
- [56] A. ROS: *New Protein Separation and Analysis Techniques*. Dissertation, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, 2000.
- [57] M. A. ROBERTS, J. S. ROSSIER, P. BERCIER H. GIRAULT: *UV laser machined polymer substrates for the development of mikrodiagnostic systems*. Anal.Chem., 69(11):2035–2042, 1997.
- [58] J. R. ANDERSON, D. T. CHIU, R. J. JACKMAN O. CHERNIAVSKAYA J. C. McDONALD H. WU S. H. WHITESIDES G. M. WHITESIDES: *Fabrication of topologically complex three-dimensional microfluidic systems in PDMS by rapid prototyping*. Anal.Chem., 72(14):3158–3164, 2000.
- [59] T. DENG, H. WU, S. T. BRITTAIN G. M. WHITESIDES: *Prototyping of masks, masters,, stamps/molds for soft lithography using an office printer, photographic reduction*. Anal.Chem., 72(14):3176–3180, 15-7-2000.
- [60] T. MCCREEDY: *Rapid prototyping of glass, PDMS microstructures for micro total analytical systems, micro chemical reactors by microfabrication in the general laboratory*. Analytica Chimica Acta, 427:39–43, 2000.
- [61] J. CHRISTOPHER LOVE, B. WOLFE, HEIKO O. JACOBS G. M. WHITESIDES: *Microscope Projection Photolithography for rapid prototyping of masters with micron-scale features for use in soft lithography*. Langmuir, 17:6005–6012, 2001.
- [62] D. C. DUFFY, J. COOPER McDONALD, O. J. A. SCHUELLER G. M. WHITESIDES: *Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)*. Analytical Chemistry, 1998.
- [63] B. JÄHNE: *Digitale Bildverarbeitung*. Springer, Heidelberg, 1997.
- [64] C. B. LANG, N. PUCKER: *Mathematische Methoden der Physik*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg; Berlin, 1998.

- [65] DATENBLATT: *The Command Language for DaVis, ProPackage Manual for DaVis, Software Manual for DaVis*. LaVision, Göttingen, 2000.
- [66] A. G. EMSLIE, F. T. BONNER, L. G. PECK: *Flow of a viscous liquid on a rotating disk*. Journal of Applied Physics, 29(5):858–862, 1958.
- [67] A. ACRIVOS, M. SHAH, E. PETERSEN: *On the flow of a Non-Newtonian Liquid on a Rotating Disk*. Journal of Applied Physics, 31:963–968, 1960.
- [68] D. MEYERHOFER: *Characteristics of resist film produced by spinning*. Journal of Applied Physics, 49:3993–3997, 1978.
- [69] DATENBLATT: *Nano SU-8 negative tone photoresists*. www.microchem.com, 2002.
- [70] DATENBLATT: *Micro resist technology*. www.microresist.de, 2002.
- [71] G. GRENOLET: *New photoplastic fabrication techniques, devices based on high aspect ratio photoresist*. Dissertation, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, 2001.
- [72] DATENBLATT: *Automated SU-8 resist processing*. www.evgroup.com, 2002.
- [73] M. SHAW, D. NAWROCKI, R. HURDITCH D. JOHNSON: *Improving the process capability of SU-8*. MicroChemCorp, 2002.
- [74] A. L. BOGDANOV, S. S. PEREDKOV: *Use of SU-8 photoresist for very high aspect ratio x-ray lithography*. MaxLab, University of Lund, 2002.
- [75] BOGDANOV, A. L.: *Use of SU-8 negative photoresist for optical mask manufacturing*. MaxLab, University of Lund, 2002.
- [76] DATENBLATT: *SU-8: A thick photo-resist for MEMS*. <http://aveclafaux.freeservers.com/su8.html>, 2002.
- [77] S. A. GLANTZ, B. K. SLINKER: *Primer of Applied Regression an Analysis of Variance*. McGraw, 1990.
- [78] P. LINDERHOLM, P. ASBERG: *3D / Multi-Layered PDMS Microfluidic Systems - Project Report*. Project Report, 2000.
- [79] S. R. QUAKE, H. BABCOCK, S. CHU: *The dynamics of partially extended single molecules of DNA*. Nature, 388:151–154, 1997.

- [80] C. CARLSSON, M. JONSSON: *Spectroscopic Study of Orientational Dynamics of DNA during Electrophoresis in Entangled and Dilute Polyacrylamide Solutions*. *Macromolecules*, 29:7802–7812, 1996.
- [81] A. CIFUENTES, J. C. DIEZ-MASA, J. FRITZ D. ANSELMETTI A. E. BRUNO: *Polyacrylamide-coated capillaries probed by atomic force microscopy: correlation between surface topography, electrophoretic performance*. *Anal.Chem.*, 70(16):3458–3462, 1998.
- [82] T. W. GRAUL, J. B. SCHLENOFF: *Capillaries Modified by Polyelectrolyte Multilayers for electrophoretic separations*. *Anal.Chem.*, 71:4007–4013, 1999.
- [83] S. L. BARKER, D. ROSS, M. J. TARLOV M. GAITAN L. E. LOCASCIO: *Control of flow direction in microfluidic devices with polyelectrolyte multilayers*. *Anal.Chem.*, 72(24):5925–5929, 2000.
- [84] Y. LIU, J. C. FANGUY, J. M. BLEDSOE C. S. HENRY: *Dynamic coating using polyelectrolyte multilayers for chemical control of electroosmotic flow in capillary electrophoresis microchips*. *Anal.Chem.*, 72(24):5939–5944, 2000.
- [85] R. D. ASTUMIAN: *Thermodynamics, kinetics of a Brownian motor*. *Science*, 276:917–922, 1997.
- [86] J. S. BADER, R. W. HAMMOND, S. A. HENCK M. W. DEEM G. A. MCDERMOTT J. M. BUSTILLO J. W. SIMPSON G. T. MULHERN J. M. ROTHBERG: *DNA transport by a micromachined Brownian ratchet device*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96:13165–13169, 1999.
- [87] C. DESRUISSEAU, G. W. SLATER, T. B. KIST: *Trapping electrophoresis, ratchets: a theoretical study for DNA-protein complexes*. *Biophys.J.*, 75:1228–1236, 1998.
- [88] R. W. HAMMOND, J. S. BADER, S. A. HENCK M. W. DEEM G. A. MCDERMOTT J. M. BUSTILLO J. M. ROTHBERG: *Differential transport of DNA by a rectified Brownian motion device*. *Electrophoresis*, 21(1):74–80, 2000.
- [89] OUDENAARDEN, S. G. BOXER A. VAN: *Brownian ratchets: molecular separations in lipid bilayers supported on patterned arrays*. *Science*, 285:1046–1048, 1999.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit direkt und indirekt unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti für die Möglichkeit der Durchführung der Diplomarbeit in dieser Arbeitsgruppe bedanken, aber auch für die Betreuung und das zur Verfügung stellen der nötigen Ressourcen.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Alexandra Ros für die Zweit-Betreuung und Unterstützung der Arbeit während des letzten Jahres, für wertvolle Diskussionen, praktische Tipps, neue Ideen und auch kritisches Hinterfragen der Ergebnisse. Ebenfalls möchte ich mich auch bei ihrem Ehemann, Herrn Dr. Robert Ros für ein stets offenes Ohr, wertvolle Diskussionen und die ungezählten Motivationsversuche nach mißglückten Experimenten bedanken.

I'd like to thank Prof. Dr. Jürgen Brugger and Gyu Man Kim (both from *Ecole Polytechnique Federale de Lausanne*) for a successful collaboration on micromachining and for a nice stay in Twente.

Bei Martin Streek möchte ich mich für interessante „theoretische Gespräche“ :-)) auf dem Gebiet der Polymerphysik bedanken. Die Begleitung der Arbeit durch seine Computer-Simulationen halfen beim Verständnis der dynamischen Vorgänge.

Herrn Dr. Ulf Kleineberg danke ich für die Möglichkeit, die Mikrostrukturen mittels Profilometrie ausmessen zu können.

Dank auch an die Mitarbeiter der Mechanik-Werkstatt, die trotz meiner niemals perfekten technischen Zeichnungen letztendlich alles so angefertigt haben, wie ich es mir vorgestellt habe - ja, manchmal sogar viel besser und einfacher!

Vielen Dank natürlich auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe *Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften*. Insbesondere danke ich meiner „Leidensgenossin“ Wibke Hellmich für die lockere Arbeitsatmosphäre im Büro und auch für aufschlussreiche Diskussionen auf dem Gebiet der Elektrophorese. Herzlichen Dank an Frau Dr. Katja Tönsing für viele schnelle Besorgungen aus der Fakultät für Chemie,

ihren Einsatz für die Arbeitssicherheit und auch für die Beantwortung chemischer Fragen. Des weiteren möchte ich mich bei Christoph Pelargus für das technische *know-how* und den damit verbundenen Support, bei unserem Chemiker Rainer Eckel für wilde Erklärungen (!?!) chemischer Vorgänge, bei Carola Haumann für humorvolle Diskussionen und die Gegenlese sowie positive Kritik der Vor-Beta-Version der Arbeit und bei Antonija Cvitkovic für das viele Eis bedanken. Bei Hermann Kleine bedanke ich mich für viele kleine Gerüche (Whiskey, Asiatin etc.) und den klasse Tipp „Chattanooga“. Der Familie Fischer sowie last but not least meiner Familie möchte ich ganz besonders herzlich danken, da deren Unterstützungen das Studium überhaupt ermöglicht hat.