



Fakultät für Physik

**Einflüsse der Ionenkonzentration
und von Fluorophoren
auf die Polarisierbarkeit von linearer DNA
in Mikrofluidiksystemen**

vorgelegt von Lukas Bogunovic

Von der Fakultät für Physik genehmigte

Bachelor-Arbeit

zur Erlangung des Grades eines Bachelor of Science.

Gutachter:

PD Dr. rer. nat. Alexandra Ros

Dr. rer. nat. Ralf Eichhorn

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Hydrodynamische Effekte in Mikrofluidiksystemen	3
2.2	Elektrokinetische Effekte in Mikrofluidiksystemen	6
2.2.1	Elektrophorese	9
2.2.2	Polarisierbarkeit und elektrodenlose Dielektrophorese	10
2.3	Statistische Mechanik	12
2.3.1	Brown'sche Bewegung und thermische Energie	12
2.3.2	Kramers Rate	14
2.4	Das DNA-Molekül	15
2.4.1	Längenunabhängige elektrophoretische Mobilität	20
2.4.2	Interkalationsprozesse	20
3	Materialien und Methoden	22
3.1	Experimentelle Realisierung	22
3.1.1	Verwendete Chemikalien und Materialien	22
3.1.2	Chip-Design	23
3.1.3	Herstellung des Masterwafers	24
3.1.4	Produktion der PDMS-Chips	25
3.1.5	Oberflächen- und Probenpräparation	27
3.1.6	Experimenteller Aufbau	27
3.1.7	Mikrochip-Operationen	29
3.2	Automatisierte Polarisationsbestimmung mittels ratentheoretischer Methoden	31
3.2.1	Bestimmung der Polarisierbarkeit	31
3.2.2	Motivation für die automatisierte Auswertung	34
3.2.3	Grundlegende Idee und automatisierte Auswertung	35
3.2.4	Technische Umsetzung	37
4	Ergebnisse und Diskussion	42
4.1	Fabrikation von Mikrofluidik-Chips	42
4.2	Verbessertes automatisches Auswertungsverfahren	44
4.3	Abhängigkeit der Polarisierbarkeit von der Ionenstärke des Puffers	45
4.4	Abhängigkeit der Polarisierbarkeit von der YOYO-Konzentration	48
5	Zusammenfassung und Ausblick	53
	Literaturverzeichnis	55
	Danksagung	61
A	Quellcodes der Auswertungsanwendungen	63
A.1	Hauptscript: „dna.pl“	63
A.2	Bootstrapper zur Ermittlung von Standardabweichungen: „bootstrap.c“	66
A.3	Klasse zum Einlesen von Dateien: „readin.h“	68

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe. Dabei wurden keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet.

Bielefeld, 17. Oktober 2007

Lukas Bogunovic

1 Einleitung

Die Sequenzierung von Erbgut ist heute eine Routine-Aufgabe in gentechnischen und gerichtsmedizinischen Laboren [1]. Dazu kommen bislang u.A. Gel-Analyseverfahren zum Einsatz [2, 3]. Enzyme schneiden das betrachtete Erbgut an bestimmten Codefolgen, und man analysiert anschließend die Länge der Fragmente, indem man ihre längenabhängige elektrophoretische Mobilität in bestimmten Gelen ausnutzt. Somit kann der Abstand dieser Sequenzen voneinander bestimmt werden.

Die Trennung besonders langer Fragmente in der Größenordnung von Megabasenpaaren ist mit diesem Verfahren nicht nur extrem aufwändig, sondern auch sehr langsam [1, 3, 4, 5] und kann Stunden bis Tage erfordern. Zudem ist die Qualität der Ergebnisse erst nach dieser Zeitspanne ersichtlich.

Die zunehmende Miniaturisierung von Analysesystemen hin zu Nanometerskalen eröffnet vollkommen neue Möglichkeiten, eine solche Analyse mit hoher Geschwindigkeit und wesentlich besserer Auflösung durchzuführen [1]. In der aktuellen Literatur zeichnen sich hauptsächlich zwei Ansätze ab.

Einerseits werden DNA-Moleküle mit Hilfe bestimmter geometrischer Strukturen innerhalb eines Mikrofluidik-Systems separiert. Beispielsweise präsentierten Chou et al. 1999 ein System, in dem die Moleküle durch geeignete Anordnung von länglichen Hindernissen in einem Kanal aufgrund der Brown'schen Bewegung eine Trajektorie verfolgten, welche von ihrem Diffusionskoeffizienten und damit von der Länge des DNA-Stranges abhängig ist [6]. Ein weiteres System dieser Arbeitsgruppe, welches zwei Jahre später zur Publikation kam, nutzte hexagonale Pfosten in einem Mikrokanal und gepulste Felder zur Trennung von DNA [5]. Auch die von Han und Craighead berichtete Separation von DNA mit Hilfe von entropischen Fallen basierte auf der Wechselwirkung der DNA mit der Geometrie der Strukturen [3]. Ein alternatives Verfahren von Minc et al. nutzt die Selbstorganisation von superparamagnetischen Nanopartikeln im Magnetfeld, um die netzartige Struktur der klassischen Analysegele zu imitieren [7].

Andererseits steht eine weitere Systemklasse von Mikrofluidik-Chips zur Verfügung, welche zur Trennung DNA-längenabhängige dielektrophoretische Effekte ausnutzen [8]. Wichtige

theoretische Vorarbeiten wurden beispielsweise hierzu von Ajdari und Prost [4] bzw. von Park und Sung [9] geleistet. Eine erste Demonstration der Funktion von so genannten dielektrophoretischen Fallen, welche auch in dieser Arbeit eingesetzt werden, gelang Chou et al. [10]. Schließlich konnten Regtmeier et al. erstmals ein auf diesen Prinzipien basierendes Trennverfahren für DNA-Stränge realisieren [8, 11]. Ähnliche Ansätze wurden später auch von Petersen et al. publiziert, jedoch mit deutlich längeren Trennzeiten [12]. Diese Systeme nutzen aus, dass die Polarisierbarkeit und damit die elektrophoretisch getriebene Migrationsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente durch eine serielle Anordnung von dielektrophoretischen Potentialmulden längenabhängig ist [8].

Für die weitere Entwicklung dieser Verfahren ist ein besseres Verständnis des komplexen Polarisationsprozesses von linearen DNA-Strängen nötig. Einige theoretische Vorarbeiten, beispielsweise von Washizu und Kokushi [13, 14] haben gezeigt, dass insbesondere die Gegenionenkonzentration im Puffer, indem die DNA vorliegt, eine wichtige Rolle spielt.

Die vorliegende Arbeit untersucht mit Hilfe des von Regtmeier et al. entwickelten Mikrofluidik-Systems die Abhängigkeit der Polarisierbarkeit von der Konzentration von Ionen in der Pufferlösung am Beispiel von linearer 12kbp- und λ -DNA. Einerseits kann dadurch der Polarisationsprozess dieser Moleküle möglicherweise besser verstanden werden, andererseits könnte durch bessere Kenntnis der Abhängigkeit von chemischen Parametern die Auflösung und die Trennzeit dieser Experimente verbessert werden. In einer zweiten Versuchsreihe wird die Abhängigkeit der Polarisierbarkeit von der Konzentration des Fluorophors YOYO-1 am Beispiel von 12kbp-DNA untersucht, da alle diskutierten Trennungsmethoden Fluoreszenzmarkierungen zum DNA-Nachweis benötigen.

Außerdem soll das experimentelle Verfahren von Regtmeier et al. zur Ermittlung der Polarisierbarkeiten verbessert und mit Hilfe eines selbst entwickelten Computerprogramms automatisiert werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Hydrodynamische Effekte in Mikrofluidiksystemen

Die erfolgreiche Handhabung und Manipulation kleinster Flüssigkeitsmengen auf Mikro- bis Nanometerskalen ist das zentrale Problem der Mikrofluidik. Die Miniaturisierung von Kanalstrukturen führt zu vollkommen neuen Möglichkeiten des Transportes und der Manipulation von darin befindlichen Flüssigkeiten, bedarf aber auch gleichzeitig neuer Konzepte zur Beschreibung [15, 16]. Große Oberflächen- zu Volumenverhältnisse und sehr kleine Reynoldszahlen prägen die hydrodynamischen Effekte in solchen Umgebungen. Zudem spielen Eigenschaften auf molekularer Ebene, wie z.B. die Brown'sche Molekularbewegung oder elektrische Wechselwirkungen zwischen den Teilchen, eine große Rolle und dürfen oft nicht mehr vernachlässigt werden. In diesem Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit für den Betrieb von Mikrofluidiksystemen nötigen theoretischen Grundlagen diskutiert.

Reynoldszahl

Die Reynoldszahl ist eine klassische Kenngröße für Strömungen aller Art und charakterisiert ihre Flusseigenschaften bezüglich Laminarität und Turbulenz. Sie ist definiert durch [17]:

$$\text{Re} = \frac{L\rho v}{\eta} \quad (1)$$

Dabei steht L für die charakteristische Längenskala im System, ρ für die Dichte der Flüssigkeit, v für die Strömungsgeschwindigkeit und η bezeichnet ihre dynamische Viskosität. Unter den folgenden Annahmen [17]

$$\eta \approx \eta_{\text{H}_2\text{O}} = 1,002 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$$

$$\rho \approx \rho_{\text{H}_2\text{O}} = 1003 \text{ kg/m}^3$$

$$L = 2 \mu\text{m}$$

$$v = 10^{-5} \text{ m/s}$$

ergibt sich

$$\text{Re}_{\text{geo}} = 2 \cdot 10^{-5}.$$

Das bedeutet, dass die Strömungen laminar sind und dass das System weit ab von turbulentem Verhalten operiert [17].

Viskosität

Der Begriff der Viskosität bezeichnet die Fähigkeit eines Fluids, Scherkräfte weiter zu geben.

In Abbildung 1 ist eine Flüssigkeit zwischen zwei Platten eingebracht worden. Die obere Platte

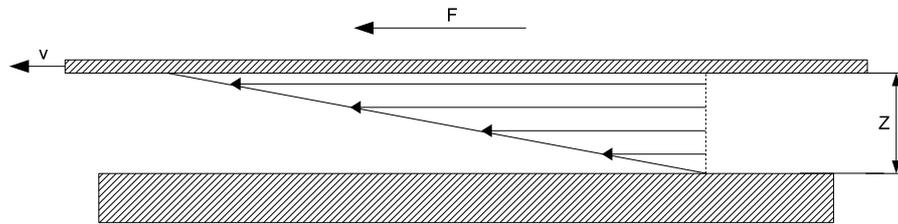


Abbildung 1: Experiment zur Bestimmung der Viskosität eines Fluids. Zwischen zwei Platten befindet sich eine Flüssigkeit. Die obere Platte wird gegen die untere durch Einwirkung der Kraft F mit der Geschwindigkeit v horizontal verschoben. Dabei entsteht ein Geschwindigkeitsgradient, welcher durch die Viskosität der Flüssigkeit erzeugt und charakterisiert wird.

wird unter Anwendung der Kraft F horizontal mit der Geschwindigkeit v gegen die untere verschoben. Nimmt man an, dass die Flüssigkeit aufgrund von Reibung mit den Oberflächen der Platten jeweils am Rand die Geschwindigkeit der Platte annimmt, so muss sich ein Geschwindigkeitsgradient innerhalb der Flüssigkeit einstellen. Formal ist die Viskosität folgendermaßen definiert:

$$\sigma_{\eta} = \eta \frac{dv}{dz} \quad (2)$$

Die viskose Schubspannung σ_{η} ist durch den Geschwindigkeitsgradienten $\frac{dv}{dz}$, multipliziert mit einer Proportionalitätskonstanten η , der dynamischen Viskosität, definiert. Die Viskosität und das Verhalten von viskosen Flüssigkeiten an Grenzflächen ist wesentlich, um druckgetriebene Strömungen in Mikrokanälen beschreiben zu können.

Druckgetriebene Strömungen

Betrachtet man zwei identische Flüssigkeitsreservoirs, welche durch einen Mikrokanal verbunden, aber unterschiedlich hoch gefüllt sind, so resultiert daraus ein Druckunterschied Δp , wofür gilt

$$\Delta p = \rho z g . \quad (3)$$

Dabei steht z für den Höhenunterschied der Füllstände und g für die Erdbeschleunigung. Aus diesem Druckgradienten folgt ein hydrodynamischer Fluss durch den Mikrokanal. Für seine Geschwindigkeit gilt approximativ [18]

$$v \approx \frac{h^2}{2\eta} \left(-\frac{\Delta p}{l} \right) . \quad (4)$$

Dabei steht h für die Höhe des Kanals und l für seine Länge. Nicht zu vernachlässigen ist hierbei ebenfalls die Krümmung der Flüssigkeitsoberfläche innerhalb des Reservoirs mit dem entsprechenden Innendruck

$$\Delta p = \frac{2\kappa}{r} . \quad (5)$$

Hier steht κ für die Größe der Oberflächenspannung des betrachteten Fluids und r für den Radius der gewölbten Flüssigkeitsoberfläche.

Die Drücke aufgrund der Oberflächenspannung wirken sich in Mikrofluidik-Systemen in der Regel extremer auf den Fluss aus als unterschiedliche Füllhöhen. Ein Wassertropfen von 2 mm Durchmesser auf einem Reservoir erzeugt einen Druck von 73 Pa. Daraus resultiert eine Flussgeschwindigkeit von $180 \mu\text{m/s}$. Bei einem vorliegenden Kanal von $9 \mu\text{m}$ Höhe und 11 mm Länge, müsste man einen Füllhöhenunterschied von 8 mm in den Reservoirs am Ende des Kanals erzeugen, um diesen Druckunterschied auszugleichen. [19].

Aufgrund der zuvor diskutierten Viskositätseigenschaften, und der Annahme, dass das Fluid grenzflächennah die Geschwindigkeit der Grenzfläche annimmt (No-Slip Randbedingungen), führt ein Druckgradient im Kanal dazu, dass sich ein parabelförmiges Flussprofil einstellt [15] (siehe Abbildung 3.b). Diese Eigenschaft ist für Experimente mit orts aufgelöster Analytik nicht sinnvoll, da die so erzeugte Bandenbreite die Auflösung verschlechtert. Daher werden in der

Mikrofluidik oft elektrokinetische Flussmechanismen ausgenutzt.

2.2 Elektrokinetische Effekte in Mikrofluidiksystemen

Neben der Bewegung von Fluiden in einem Mikrokanal durch Druckdifferenzen kann man auch elektrokinetische Flussmechanismen ausnutzen. Der elektroosmotische Fluss (EOF) ist ein solcher Mechanismus. Man versteht darunter die Bewegung einer Flüssigkeit relativ zu den geladenen Wänden des Kanals durch Anlegen einer elektrischen Spannung. In einem Glas- oder Polydimethylsiloxan-Chip findet eine Deprotonierung der Wandoberfläche statt, wenn die Flüssigkeit einen pH-Wert > 2 zeigt. Dabei geben die dort befindlichen Silanolgruppen Wasserstoffionen in die Flüssigkeit ab. Die zurückgebliebene Wandfläche ist nach Abgabe der Protonen negativ geladen.

Aufgrund von Coulomb-Wechselwirkung legen sich positive Ionen aus der Flüssigkeit starr an die Oberfläche an und erzeugen dadurch die so genannte Stern-Schicht, welche durch das linear abfallende Stern-Potential charakterisiert wird (siehe Abbildung 2). Oberhalb dieser Schicht bildet sich die diffuse so genannte Gouy-Chapman-Schicht aus. In ihr fällt das Potential exponentiell ab. Ist das Potential auf das $\frac{1}{e}$ -fache des ursprünglichen Wertes abgefallen, ist die so genannte Debye-Länge λ_D erreicht. Nach Probstein [20] wird λ_d für die hier verwendeten Bedingungen einer wässrigen Lösung bei Raumtemperatur folgendermaßen in guter Näherung berechnet:

$$\lambda_D = \frac{9,61 \cdot 10^{-9} \text{m}}{\sqrt{I}} \quad (6)$$

Dabei beschreibt I die Ionenstärke der Flüssigkeit und ist definiert durch

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i. \quad (7)$$

Hier steht z_i für die Valenz der entsprechenden Ionen und c_i für deren Konzentration. Legt man an ein solches System eine elektrische Spannung an, so werden die Ionen in der schwach gebundenen Gouy-Chapman-Schicht durch das elektrische Feld bewegt. Die Viskosität des Fluides bewirkt, dass der Rest der Flüssigkeit mitbewegt wird. Dadurch ergibt sich ein stem-

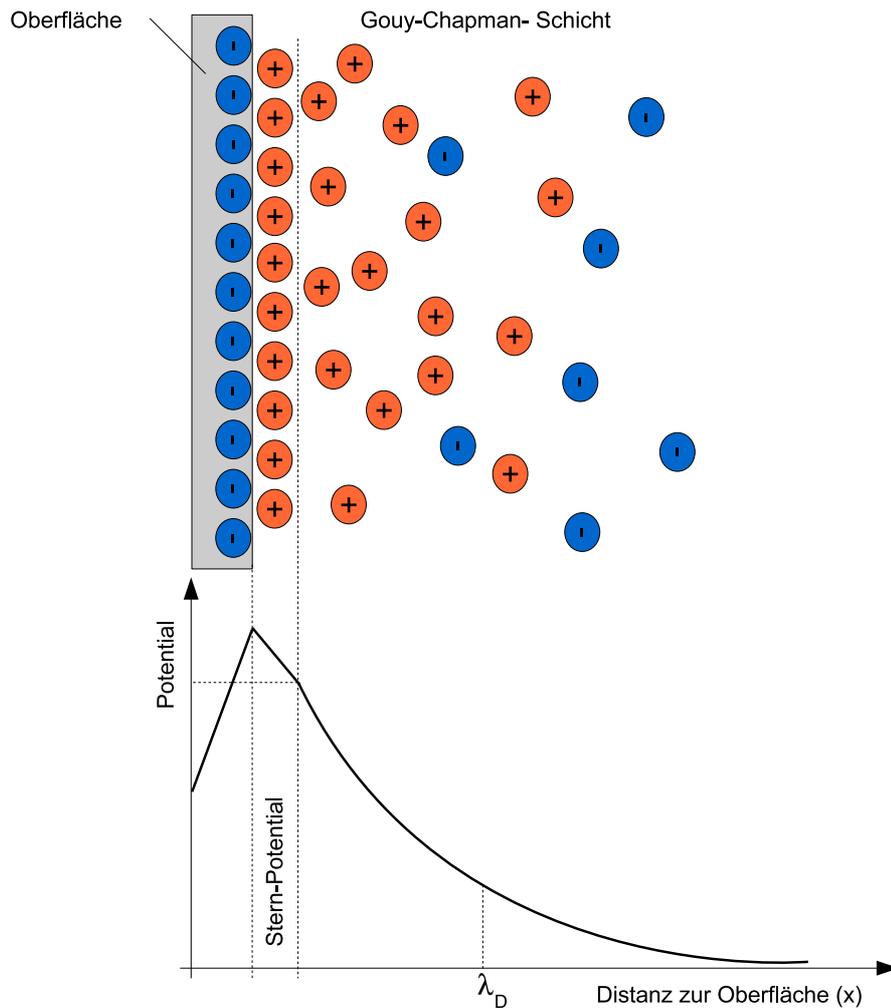


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Kanaloberfläche, die mit einem Elektrolyten mit $\text{pH} > 2$ in Berührung gekommen ist. An der negativ geladenen Oberfläche bildet sich aufgrund der Coulomb-Wechselwirkung eine starre Schicht aus Gegenionen (Stern-Schicht), in der das Potential linear abfällt. Darüber liegt die diffuse Gouy-Chapman-Schicht. Der Potentialwert an der Grenzfläche wird als ζ -Potential bezeichnet. In der Gouy-Chapman-Schicht fällt das Potential exponentiell ab. Ist es auf das $\frac{1}{e}$ -fache des Ausgangswertes gefallen, so ist die Debye-Länge λ_D erreicht.

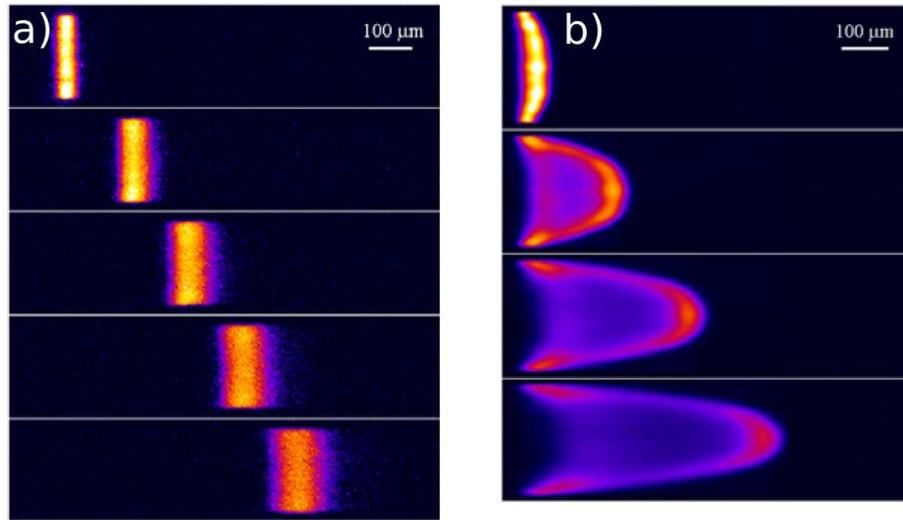


Abbildung 3: Vergleich der Flussprofile des elektroosmotischen Flusses (EOF) (links) und einer druckgetriebenen Strömung (rechts) [15]. Es ist deutlich zu erkennen, dass der EOF ein stempelartiges Profil zeigt, wohingegen im rechten Fall ein parabelförmiges Flussverhalten vorliegt. Für Messungen mit hoher örtlicher bzw. zeitlicher Auflösung (z.B. für Chromatografie) innerhalb des Kanals ist somit der EOF zu bevorzugen.

parabelförmiges Flussprofil (siehe Abbildung 3.a). Die folgenden Rechnungen werden eindimensional durchgeführt, können aber ohne Weiteres auf den dreidimensionalen Fall erweitert werden. Für die Flussgeschwindigkeit $v(x)$ in Abhängigkeit vom Abstand zur Kanalwand x gilt [20]

$$v(x) = -\frac{E\epsilon\Psi_0}{\eta} \left[1 - \exp\left(-\frac{x}{\lambda_D}\right) \right]. \quad (8)$$

Dabei steht x für den Abstand zur Kanalwand, E für die Stärke des elektrischen Feldes und Ψ_0 für das Potential an der Kanaloberfläche. Nun ist jedoch nicht die eigentliche Kanalwand in Hinsicht auf die No-Slip Randbedingung relevant sondern die Grenzschicht zwischen Stern-Schicht und Gouy-Chapman-Schicht. Der dortige Potentialwert wird als ζ -Potential bezeichnet. Man ersetzt deshalb Ψ gut genähert durch ζ . Des Weiteren misst λ_D einen Bereich von einigen Nanometern. Darum ist die Exponentialfunktion schon bei geringen Abständen vernachlässigbar. Somit folgt

$$v_{\text{eo}} = -\frac{E\epsilon\zeta}{\eta}. \quad (9)$$

Die elektroosmotische Geschwindigkeit v_{eo} ist nun unabhängig von x und ermöglicht die elek-

osmotische Mobilität μ_{eo} zu quantifizieren.

$$\mu_{eo} := \frac{v_{eo}}{E} = -\frac{\zeta\epsilon}{\eta} \quad (10)$$

Anhand von Gleichung (9) kann man erkennen, durch welche Parameter der elektroosmotische Fluss kontrollierbar ist. Die elektroosmotische Geschwindigkeit sinkt, wenn die dynamische Viskosität des Fluides ansteigt. Eine zweite Möglichkeit ist die Manipulation des ζ -Potentials durch Änderung der Ionenkonzentration in der Flüssigkeit oder durch Veränderung des pH-Wertes.

2.2.1 Elektrophorese

Die Elektrophorese ist ein weiterer elektrokinetischer Transportmechanismus. Zur vereinfachten Darstellung sei folgendes Beispiel betrachtet. Es befindet sich ein n -fach positiv geladenes sphärisches Teilchen mit Radius r in destilliertem Wasser in einem elektrischen Feld. Dadurch erfährt es aufgrund seiner Ladung eine Kraft F_E parallel zu den Feldlinien in Richtung der negativen Elektrode.

$$F_E = neE \quad (11)$$

Sobald es sich durch die Flüssigkeit bewegt, erfährt es die Stokes'sche Reibungskraft F_R .

$$F_R = 6\pi\eta rv \quad (12)$$

Gemäß Newtons Gesetz ergibt sich direkt die folgende Differentialgleichung:

$$neE - 6\pi\eta rv = m \cdot \frac{dv}{dt} \quad (13)$$

Angesichts der geringen Masse der später im Experiment betrachteten Moleküle und der Viskosität des Fluides in dem sie sich befinden, kann das System als stark überdämpft angesehen werden. Unter der Annahme, dass das Teilchen beim Einschalten des elektrischen Feldes in Ruhe war, erhält man folgendes Ergebnis für das Verhalten seiner Geschwindigkeit als Lösung

dieser Differentialgleichung.

$$v(t) = \frac{neE}{6\pi\eta r} \left[1 - \exp\left(-\frac{6\pi\eta r}{m}t\right) \right] \quad (14)$$

Für kleine Massen m und große Laufzeiten t verschwindet die Exponentialfunktion schnell. Daher wird das Teilchen nach einer sehr kurzen Beschleunigungsphase schnell die konstante Geschwindigkeit

$$v = \frac{neE}{6\pi\eta r} \quad (15)$$

erreichen.

Dieser Effekt ermöglicht nicht nur die Trennung von Teilchen mit unterschiedlichem Ladungsvorzeichen, sondern kann ebenfalls verwendet werden, um geladene Teilchen selektiv durch einen Mikrokanal zu transportieren.

2.2.2 Polarisierbarkeit und elektrodenlose Dielektrophorese

Der Begriff der Polarisierbarkeit chemischer Moleküle beschreibt ihre Eigenschaft durch Ladungsverschiebung auf ein äußeres elektrisches Feld zu reagieren. Dadurch wird ein temporäres elektrisches Dipolmoment im System induziert. Je größer die Polarisierbarkeit eines Moleküls ist, desto stärker ist diese Ladungsverschiebung bei gleichen elektrischen Feldstärken und desto größer ist das resultierende Dipolmoment. Im Fall von langkettigen negativ geladenen Polymeren, welche im Folgenden betrachtet werden (siehe Kapitel 2.4), bildet sich gemäß der Debye-Hückel-Theorie eine Ladungswolke aus positiven Gegenionen um das Molekül (siehe Abbildung 4.a. Bringt man dieses polarisierbare System in ein inhomogenes elektrisches Feld, so wirkt folglich die so genannte *dielektrophoretische Kraft*, welche durch das dielektrophoretische Potential

$$V(\vec{r}) = -\alpha \left| \vec{E} \right|^2 \quad (16)$$

beschrieben werden kann [8]. Je nach Vorzeichen der Polarisierbarkeit α erzeugt man somit an der Position der stärksten Feldstärke des inhomogenen Feldes ein Potentialminimum (positive Dielektrophorese) oder ein Potentialmaximum (negative Dielektrophorese). Aus der Literatur

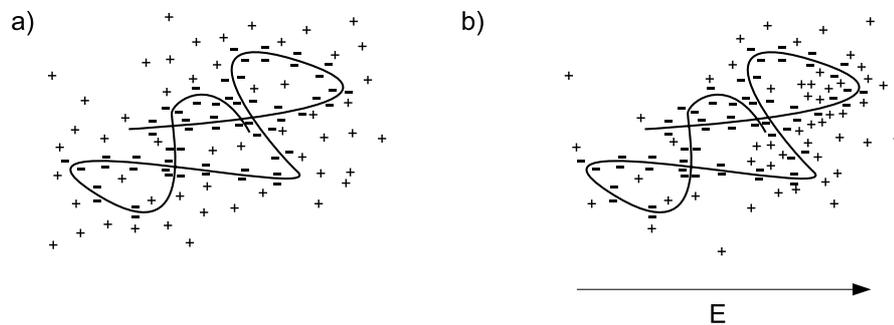


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines negativ geladenen großen Polymers in einer ionenhaltigen Lösung. Aufgrund der Coulomb-Wechselwirkung wird sich eine Wolke aus positiven Gegenionen anlagern (siehe Bild a). Wird hieran ein elektrisches Feld angelegt, so verschiebt sich die Ladungswolke entsprechend, wie in Bild b) gezeigt. Aus Gründen der Vereinfachung ist hier angenommen, dass sich die Lage des Polymers nicht verändert.

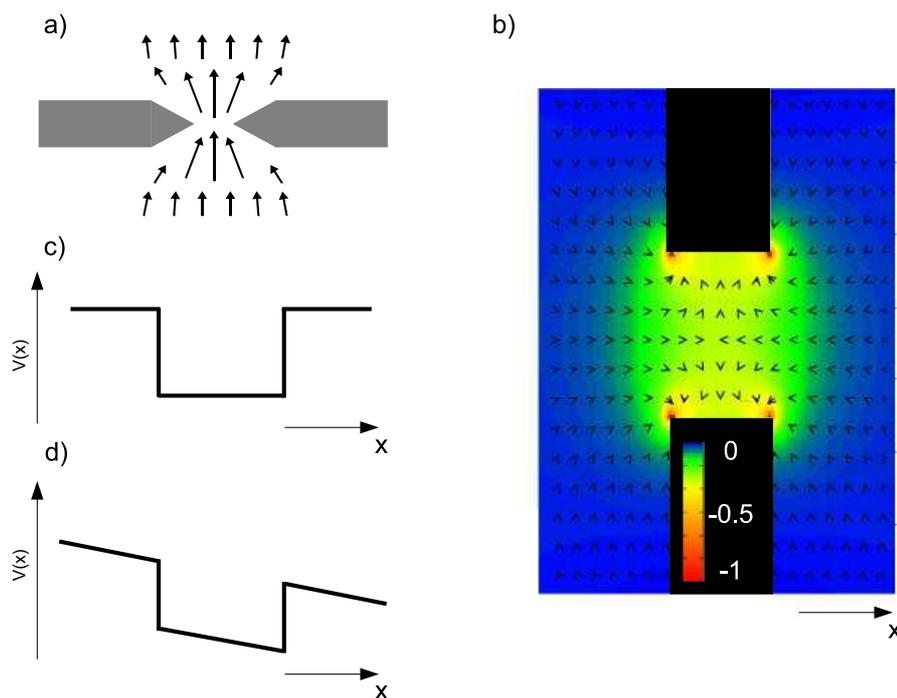


Abbildung 5: Abbildung a) zeigt schematisch den Verlauf der elektrischen Feldlinien für die Region eines lokalen Feldgradienten, welcher durch zwei nichtleitende Hindernisse erzeugt wird. b) zeigt die numerische Lösung der Poisson-Gleichung an der selben Stelle. Die eingezeichneten Vektoren zeigen in die Richtung der resultierenden dielektrophoretischen Kraft, wobei c) den daraus resultierenden Potentialverlauf für positive Dielektrophorese schematisch darstellt. Wird die Wechselspannung U_{AC} , die maßgeblich zur Erzeugung der Inhomogenitäten beitragen soll durch eine schwache Gleichspannung U_{DC} superpositioniert, so wird das Potential aus Abbildung c) wie in d) dargestellt gekippt.

[4, 10, 8] und aus eigenen Experimenten ist bekannt, dass DNA für die relevanten Parameter und Bedingungen positive Dielektrophorese zeigt.

Die gewünschten inhomogenen Felder können erzeugt werden, indem man nichtleitende Barrieren in ein homogenes elektrisches Feld einbringt, sodass sich zwischen diesen die Feldstärke erhöht (siehe Abbildungen 5.a und 5.b). Dies funktioniert sowohl mit Gleichspannungs- als auch mit Wechselfeldern, da sich im letzteren Fall auch die Richtung des induzierten Dipolmomentes mit dem Feldwechsel umkehrt. Damit lässt sich der in 5.b gezeigte Feldgradient erzeugen. Das eingezeichnete Vektorfeld zeigt in die Richtung der dielektrophoretischen Kraft. Die bereits erläuterte Potentialmulde, welche zwischen solchen Barrieren entsteht, ist schematisch in Abbildung 5.c dargestellt. In den Experimenten zu dieser Arbeit wird für die Erzeugung der dielektrophoretischen Potentialmulden (dielektrophoretische Fallen) lediglich sinusförmige Wechselfeldspannung U_{AC} verwendet, weil diese netto keine Elektrophorese bewirkt. Wird diese Wechselfeldspannung durch eine Gleichspannung U_{DC} überlagert, so wird das Potential, wie in Abbildung 5.d dargestellt, gekippt. Der Boden des Potentialtopfes wird von der Kippung mit beeinflusst, führt gleichzeitig aber auch zu einer Absenkung des Potentialwalls.

Die Erzeugung solcher dielektrophoretischer Potentialminima bzw. -maxima mittels nicht leitender Barrieren bezeichnet man als *elektrodenlose Dielektrophorese* [10], weil die Inhomogenitäten nicht direkt durch einzelne Elektroden an den entsprechenden Stellen erzeugt werden, wie etwa durch strukturierte Mikroelektroden [12, 21]. Die Herstellung der Mikrofluidik-Chips, in denen die Experimente ausgeführt werden sollen, ist jedoch einfacher, wenn nur ein einziges Material zum Einsatz kommt, und es werden so elektrochemische Reaktionen an der Metalloberfläche unterbunden. Außerdem können durch das elektrodenlose Verfahren die Feldgradienten mit identischem Verlauf in der ganzen Kanaltiefe gleichermaßen erzeugt werden.

2.3 Statistische Mechanik

2.3.1 Brown'sche Bewegung und thermische Energie

Die zufällige thermische Bewegung kleiner Partikel in einer Lösung wird als Brown'sche Bewegung bezeichnet. Ihr Entdecker war Robert Brown (1773-1858), ein schottischer Botaniker, der

Ende der zwanziger Jahre des neunzehnten Jahrhunderts in Wasser gelösten Pollenstaub unter seinem Mikroskop betrachtete und dabei die Bewegung das erste Mal feststellte. Heute wissen wir, dass die beobachteten Pollen, welche eine Größe von mehreren Mikrometern aufweisen, eine kinetische Energie besitzen, die sich, hervorgerufen durch Stoßprozesse mit Wassermolekülen und anderen Pollen, durch zufällig wirkende Bewegungen bemerkbar macht. Diese kinetische Energie hängt mit der Temperatur des Systems zusammen. Unter der Annahme, dass monoatomare Teilchen betrachtet werden, welche untereinander nicht wechselwirken, erhält man aus einem Ansatz im kanonischen Ensemble die Maxwell'sche Geschwindigkeitsverteilung:

$$P(v) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \left(\frac{m}{k_B T} \right)^{\frac{3}{2}} \cdot v^2 \cdot \exp \left[-\frac{mv^2}{2k_B T} \right], \quad (17)$$

Diese gibt die Wahrscheinlichkeit P an, ein Teilchen mit der Geschwindigkeit v anzutreffen. Man kann dies verwenden, um die zu erwartende mittlere quadratische Geschwindigkeit $\langle v^2 \rangle$ der Teilchen zu berechnen:

$$\begin{aligned} \langle v^2 \rangle &= \int_0^\infty v^2 \cdot P(v) dv \\ &= \sqrt{\frac{2}{\pi}} \left(\frac{m}{k_B T} \right)^{\frac{3}{2}} \int_0^\infty v^4 \cdot \exp \left[-\frac{mv^2}{2k_B T} \right] dv \end{aligned}$$

Dieses Integral kann mit Hilfe von [22] gelöst werden und es folgt

$$\langle v^2 \rangle = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \cdot \left(\frac{m}{k_B T} \right)^{\frac{3}{2}} \cdot \frac{3}{8 \left(\frac{m}{2k_B T} \right)^2} \cdot \sqrt{\frac{2\pi k_B T}{m}} = \frac{3}{m} k_B T. \quad (18)$$

Klassisch gilt nun für den Erwartungswert der kinetischen Energie T

$$\langle T(v) \rangle = \frac{1}{2} m \langle v^2 \rangle. \quad (19)$$

Fügt man Gleichung (18) hier ein, erhält man

$$\langle T(v) \rangle = \frac{1}{2} m \frac{3}{m} k_B T = \frac{3}{2} k_B T. \quad (20)$$

Dabei bezeichnet k_B die Boltzmannkonstante und T die absolute Temperatur. Damit ist gezeigt, dass die thermische Energie nur von der Temperatur abhängig ist.

In vielen Systemen wird die Brown'sche Bewegung als störend empfunden und es gibt viele Ansätze diese durch Kühlmechanismen, beispielsweise in der CCD-Technik, zu reduzieren. Viele Arbeiten, so z.B. die von Reimann et al. [23, 24] oder von Regtmeier [19] haben allerdings gezeigt, dass Brown'sche Bewegung nicht nur als Störung anzusehen ist, sondern ebenso gewinnbringende Effekte haben kann. So spielt die kinetische Energie der Teilchen, die der Brown'schen Bewegung unterliegen, in dieser Arbeit eine zentrale Rolle, wie das folgende Kapitel zeigen wird.

2.3.2 Kramers Rate

Im April 1940 veröffentlichte H. A. Kramers eine Theorie, um das Verhalten eines Punktteilchens in einem metastabilen Potential (Abbildung 6), unter dem Einfluss der Brown'schen Bewegung zu beschreiben [25]. Seine Hauptintention war, ein Modell zu finden, um chemische Reaktionen, welche eine Aktivierungsenergie benötigen, zu quantifizieren.

Das Teilchen verbleibt so lange im Bereich A, bis es, getrieben durch die thermische Energie, über den Potentialwall in den Bereich B gehoben werden kann und die Reaktion abläuft. Dabei ist die Höhe dieses Walls ΔV im Vergleich zur thermischen Energie groß. Kramers ermittelte das folgende Ratengesetz [25, 26]:

$$k_{A \rightarrow B} \propto \exp\left(-\frac{\Delta V}{k_B T}\right) \quad (21)$$

Daraus kann man direkt eine Regel für die erwartete Aufenthaltszeit τ des Teilchens im Bereich A ableiten, indem man das Inverse von Gleichung (21) bildet [27]:

$$\tau_{A \rightarrow B} \propto \exp\left(\frac{\Delta V}{k_B T}\right) \quad (22)$$

Dieses Modell muss jedoch nicht unbedingt auf chemische Potentiale angewendet werden, sondern kann auch zur Beschreibung physikalischer Probleme benutzt werden. So sind diese

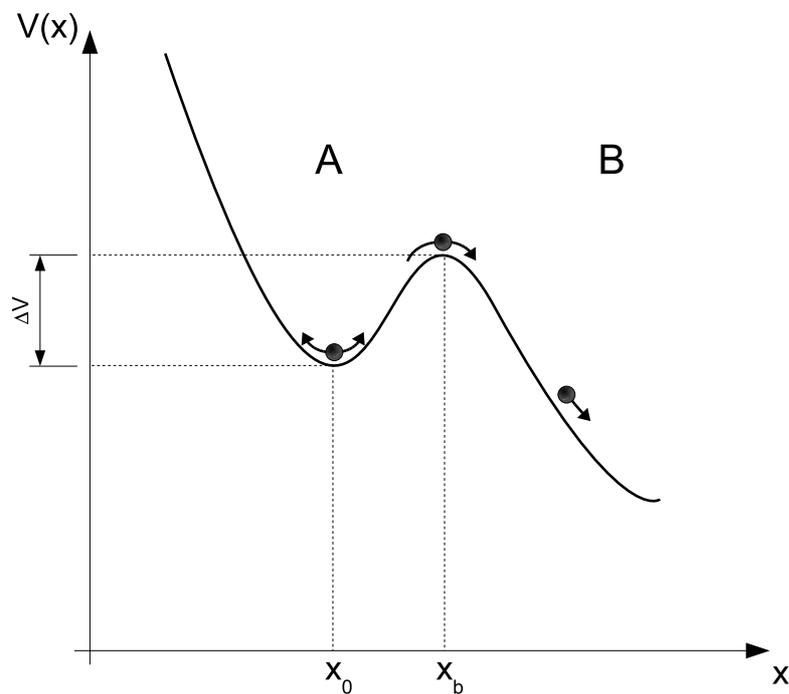


Abbildung 6: Metastabiles Potential, welches von H.A. Kramers für seine Ratenbeschreibung angenommen wurde. Dabei ist die Potentialwallhöhe im Vergleich zur thermischen Energie groß. Dennoch kann es passieren, dass das Teilchen durch seine Brown'sche Bewegung so viel Energie erhält, dass es den Wall überwinden kann. Dieses Potential ist mit dem dielektrophoretisch erzeugten Potential in dieser Arbeit gut vergleichbar und man kann mit Hilfe dieser Theorie eine Übergangsrate von Bereich A in den Bereich B angeben. Die Ähnlichkeit dieses Potentialverlaufs mit dem aus Abbildung 5.d ist leicht zu erkennen.

theoretisch beschriebenen metastabilen Potentiale gut mit den dielektrophoretisch erzeugten Potentialminima aus Kapitel 2.2.2 vergleichbar und man kann die Entweichprozesse der DNA aus den Potentialmulden sehr gut damit beschreiben, um somit ihre Polarisierbarkeit zu quantifizieren (siehe Kapitel 3.2).

2.4 Das DNA-Molekül

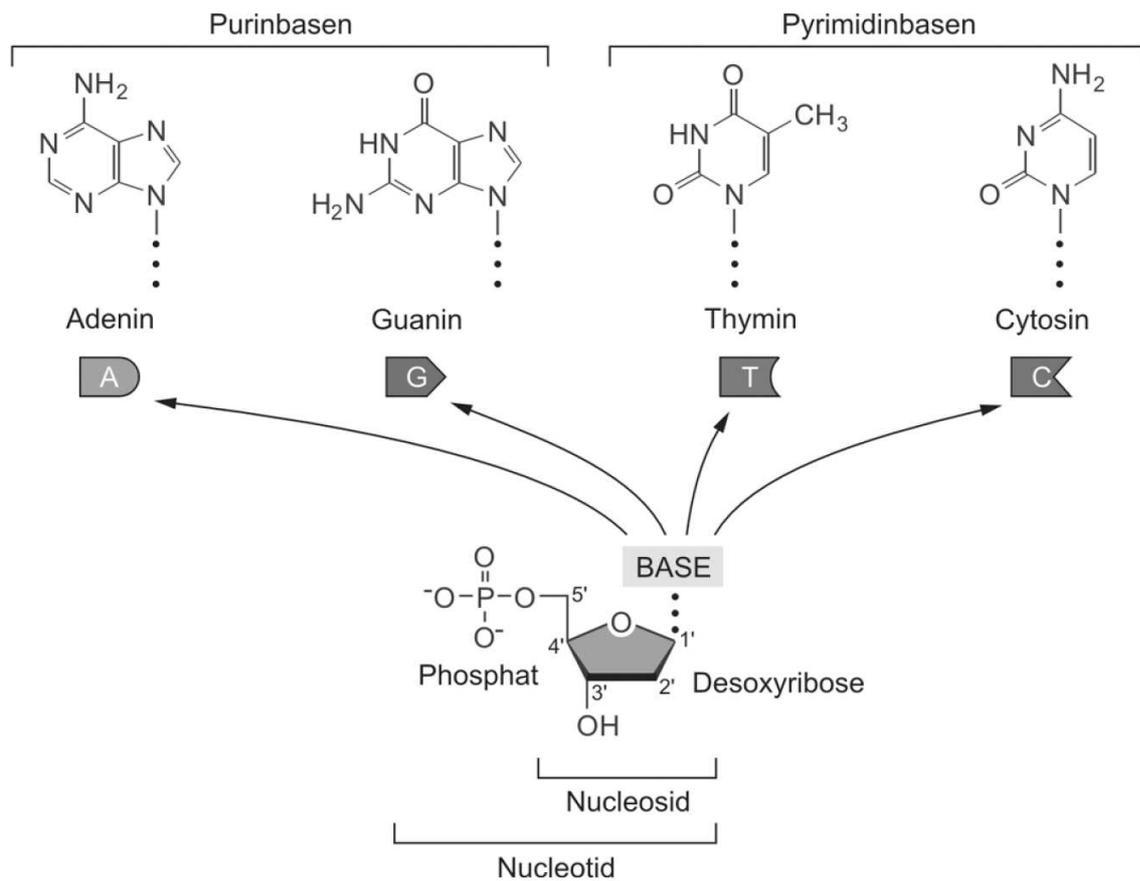
Als Träger der genetischen Erbinformation eines Lebewesens ist das Desoxyribonukleinsäure-Molekül, kurz DNA-Molekül, in der Forschung besonders in Hinsicht auf medizinische Entwicklung und die Biotechnologie von besonderer Bedeutung [28]. Es handelt sich hierbei um ein fadenförmiges Polymer mit einem Durchmesser von etwa zwei Nanometern. Als Monomere dienen vier Desoxyribonucleotide (kurz: Nucleotide), deren Kombinationsfolge die genetischen Merkmale eines Individuums kodiert.

Jedes Nucleotid besteht aus drei Komponenten: einer stickstoffhaltigen Base, einem Zucker und einer Phosphatgruppe (Abbildung 7). Die Phosphatgruppe und der Zucker in Form von Desoxyribose sind allen vier Nucleotiden gemeinsam und bilden das so genannte Rückgrat der DNA. Daher unterscheiden sich Nucleotide nur durch die verwendete Base. Diese Basen sind Derivate des Purins bzw. des Pyrimidins. Als Purinbasen treten Adenin (A) und Guanin (G) auf. Aus Pyrimidin lassen sich Thymin (T) und Cytosin (C) ableiten. Durch Anbindung an ein Desoxyribosemolekül erhält man ein Nucleosid, die Vorstufe eines Nucleotids. Hierbei bindet jeweils das 1'-Kohlenstoffatom des Zuckers an das 1'-Stickstoffatom des Purins bzw. an das 9'-Stickstoffatom beim Pyrimidin. Das Nucleotid ist nun ein Phosphatester des entsprechenden Nucleosids.

Zur Bildung des DNA-Moleküls, welches auch oft als DNA-Strang bezeichnet wird, werden zunächst die Desoxyribosemoleküle über die Phosphatgruppen seriell miteinander verbunden (siehe Abbildung 8). Dabei bindet die Phosphatgruppe auf der einen Seite an der 3'-Hydroxygruppe des einen Zuckers und auf der anderen Seite an der 5'-Hydroxylgruppe des anderen Zuckers. Hierdurch ergibt sich eine einfach negative Ladung an der Phosphatgruppe.

Ein DNA-Molekül besteht aus zwei gegenläufigen Nucleotidketten, welche in Form einer Doppelhelix umeinander geschlungen sind [30], damit Kopien des Moleküls bei der Zellteilung erstellt werden können und wegen der Hydrophobizität der Basen. Die Nucleotide sind dabei so ausgerichtet, dass ihre Basen ins Zentrum der Helix weisen. Die hydrophilen Phosphatgruppen weisen stets nach außen. Dabei besteht jedes Basenpaar aus einer Purin- und einer Pyrimidinbase. Aus geometrischen Gründen können hierbei nur die Kombinationen Adenin-Thymin und Guanin-Cytosin auftreten. Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren geben dem DNA-Strang seine Stabilität. Dabei bilden Adenin und Thymin zwei und Guanin und Cytosin je drei Wasserstoffbrücken aus.

Oft umfasst ein DNA-Strang (siehe Abbildung 9) einige Millionen Basenpaare (Bp). So hat das humane Erbgut beispielsweise einen Umfang von 2,9 Mrd. Basenpaaren und damit eine Länge im Bereich einiger Meter [2]. Diese Abmessung resultiert aus einer Ganghöhe von etwa 3,4 Nanometern, wobei jede Windung der Helix zehn Basenpaare benötigt [2, 31]. In der kleinen Grafik in Abbildung 9 ist zudem zu erkennen, dass die Doppelhelix nicht voll-



Aus Müller-Esterl, *Biochemie*, © 2004 Elsevier GmbH

Abbildung 7: Aufbau eines Nucleotids. Bei den eingebundenen Basen handelt es sich jeweils um Derivate des Purins bzw. des Pyrimidins. Aus Purin gehen die Basen Adenin (A) und Guanin (G) hervor. Als Pyrimidinbasen treten Thymin (T) und Cytosin (C) auf. Jede Base ist mit ihrem 1'- bei Purin-basierten bzw dem 9'-Stickstoffatom am 1'-Kohlenstoffatom der Desoxyribose gebunden. Dieser Komplex bildet das so genannte Nucleosid. Durch Anbindung eines Phosphatesters ergibt sich das Nucleotid. Die angebundene Phosphatgruppe beschert dem DNA-Molekül später seine negative Ladung. Aus [29].

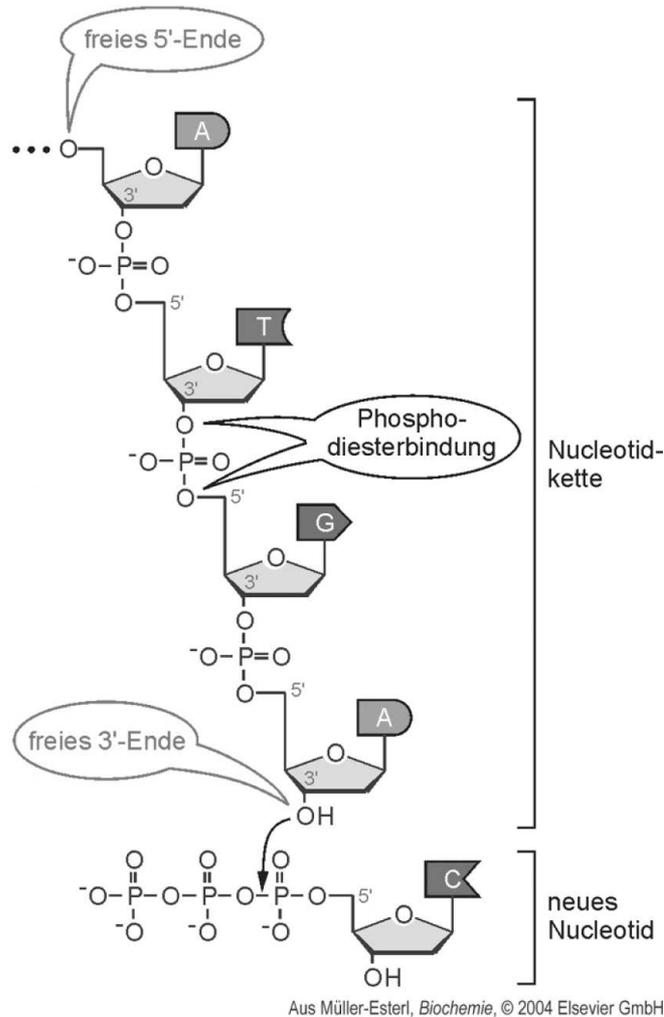


Abbildung 8: Struktur einer Nucleotidkette. Zwei Nucleoside werden jeweils durch eine Phosphodiesterbrücke miteinander verbunden. Diese setzt auf der einen Seite an der 3'-Hydroxygruppe des einen Zuckers und auf der anderen Seite an der 5'-Hydroxylgruppe des anderen Zuckers an. Das Rückgrat des DNA-Moleküls ist somit eine negativ geladene Folge aus Desoxyribosen, welche über Phosphatbrücken miteinander gebunden sind. Zwei Zucker haben hierbei stets einen Abstand von ungefähr 0,6 Nanometern. Zwischen den Basen, welche in sich flach sind und senkrecht zur Kettenachse ausgerichtet sind, zeigt sich stets ein Abstand von etwa 0,27 Nanometern. Die eigentliche Kodierung der Erbinformation findet nun durch die entsprechende Folge von Purin-, bzw. Pyrimidinbasen statt, welche am 1'-Kohlenstoffatom des zugehörigen Zuckers gebunden sind. Aus [29]

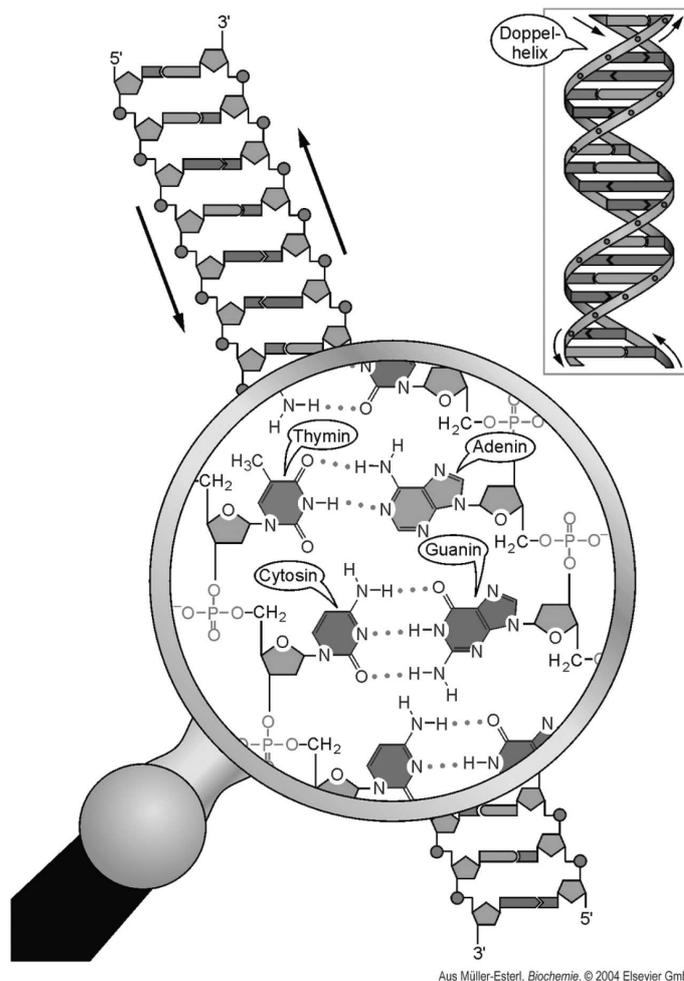


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines DNA-Stranges. Zwei Nucleotidketten sind in gegenläufiger Richtung (siehe schwarze Pfeile) umeinander geschlungen und bilden eine Doppelhelix. Aus geometrischen Gründen dürfen sich stets nur Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin gegenüber stehen. Die beiden Stränge sind also negative Kopien voneinander in umgekehrter Reihenfolge. Wasserstoffbrücken zwischen den Basen geben der Struktur den nötigen Halt, können aber zu Reproduktionszwecken während der Zellteilung getrennt werden. In der kleinen Grafik oben rechts ist die schematische Darstellung der Doppelhelix mit großer und kleiner Furche zu erkennen. Aus [29]

kommen symmetrisch umeinander geschlungen ist. Vielmehr bilden sich geometrisch bedingt abwechselnd große und kleine Einkerbungen aus, welche als große und kleine Furche (major-, minor-grooves) bezeichnet werden. Diese sind Bindungsstelle für bestimmte Arten von Fluoreszenzfarbstoffen [32]. Die große Furche hat eine Breite von 2,2 Nanometern und die kleine Furche misst 1,2 Nanometer [33].

2.4.1 Längenunabhängige elektrophoretische Mobilität

Es ist empirisch beobachtet worden, dass DNA in freier Lösung eine längenunabhängige Mobilität zeigt [34, 35]. Die Eigenschaft der DNA als free-draining-coil in flüssiger Umgebung vorzuliegen, führt auf das Ergebnis, dass die Reibung, die das Molekül erfährt linear mit der Masse und damit mit der Anzahl Basenpaare skaliert. Seine elektrophoretische Mobilität μ_{ep} ist somit längenunabhängig und man kann die folgenden Proportionalitäten zeigen:

$$\mu_{ep} := \frac{v_{ep}}{E} \propto \frac{q}{n} \propto \frac{2n}{n} = \text{const.} \quad (23)$$

Dabei ist n die Anzahl der Basenpaare und q ihre gesamte Ladung.

2.4.2 Interkalationsprozesse

Die Interkalation von Molekülen in einen DNA-Strang ist ein Prozess, durch den die physikalischen und physiologischen Eigenschaften der DNA massiv verändert werden können [32, 36]. Insbesondere ist das in Abbildung 10 gezeigte Molekül YOYO-1¹ sehr gut geeignet, um DNA fluoreszent zu markieren. Dies gelingt nur, wenn das Farbstoffmolekül durch Interkalation in den Strang seine Geometrie leicht verändert hat [37, 38, 39]. Freies YOYO in der Lösung ist somit nicht sichtbar. Wie in Kapitel 2.4 dargestellt, sind die Basenpaare der DNA jeweils planar und rechtwinklig zum Strang angeordnet. Dies erlaubt es Molekülen, welche aus flachen aromatischen Ringen bestehen, sich aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen zwei Basenpaare zu schieben und dort mit der DNA in Wechselwirkung zu treten (Abbildung 11). Merkmale solcher Interkalatoren sind folglich Planarität und eine gewisse Anzahl positiver

¹1,1' - (4,4,7,7 - tetramethyl - 4,7 diazaundecamethylen) - bis - 4 - [3 - methyl - 2,3 - dihydro - (benzo - 1,3 - oxazol) - 2 - methylen] - quinolinium tetraiodid

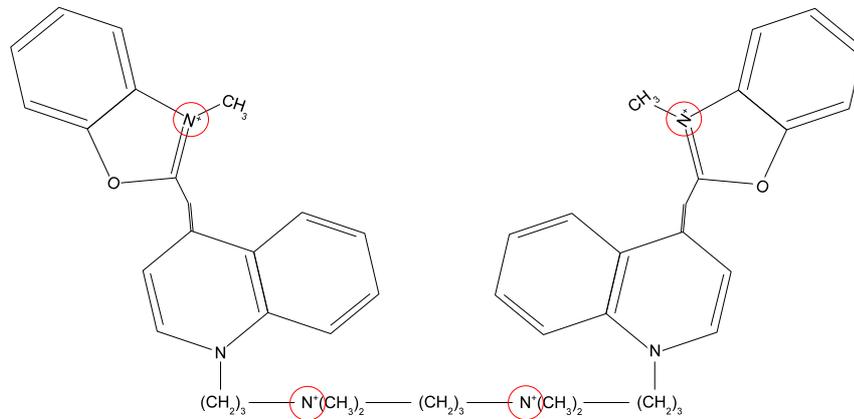


Abbildung 10: Struktur des Oxazol Gelb Homodimers (Handelsname: YOYO-1). Die vier positiven Ladungen sind rot markiert.

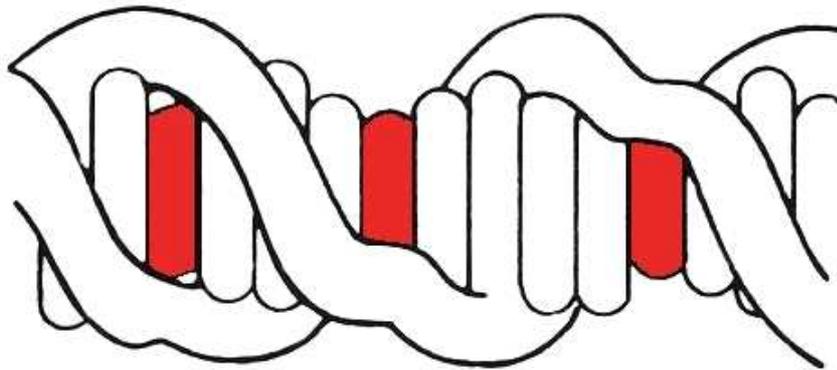


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines dreifach interkalierten DNA Stranges. Die Interkalatormoleküle (rot) haben sich jeweils zwischen zwei Basenpaaren eingelagert.

Ladungen. Der hier benutzte Interkalator YOYO-1 wird durch eine recht große Bindungskonstante von $K = 6,0 \cdot 10^8 \text{ Mol}^{-1}$ (Umgebung: Phosphatpuffer mit $\text{pH}=7$ und $[\text{NaCl}]=100 \text{ mM}$) und vier positive Ladungen [39] charakterisiert.

Eine erfolgreiche Interkalation hat ebenso Auswirkungen auf die geometrische Struktur des DNA-Moleküls und auf sein Verhalten im elektrischen Feld. So ist es nötig, dass sich der Strang pro interkaliertem Molekül im Schnitt um etwa 0,34 Nanometer verlängert, weil die Doppelhelix durch das Eindringen des Interkalators ein wenig auseinander geschoben wird. Dies hat eine Streckung der Abstände zwischen den negativen Ladungen der Phosphatbrücken zur Folge und verringert somit die Ladungsdichte an der Oberfläche des DNA-Moleküls.

3 Materialien und Methoden

3.1 Experimentelle Realisierung

3.1.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

Die untersuchte 12.000-Basenpaar-DNA wurde vom Biotechnologischen Labor Dr. Bartling (Deutschland) bezogen. Die λ -DNA stammt von Promega (USA). Dinatriumhydrogenphosphat, Natriumchlorid, β -Mercaptoethanol sowie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wurden bei Fluka (Deutschland) gekauft. Das Performance Optimized Polymer (POP-6) in sechszehntiger Konzentration stammt von Applied Biosystems (USA). Der Fluoreszenzfarbstoff YOYO-1 (1mM-Lösung) ist ein Produkt der Firma Molecular Probes (USA). Das benötigte deionisierte Wasser mit einer Leitfähigkeit von $\chi = 0,3 \text{ mS/cm}$, wurde mit Hilfe einer Milli-Q Biocel Anlage von Millipore (USA) gewonnen. Tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl-trichlorosilan (TDTS) wurde von ABCR (Deutschland) bezogen. Zur Oberflächenbehandlung der Chips wurde Polyethylenglycol (PEG3400) von Nektar (USA) verwendet. Technischer Sauer- und Stickstoff, sowie reinster Stickstoff sind von Linde (Deutschland) geliefert worden. Die Fotolithografie ist mit dem negativen Photolack SU-8(50) ausgeführt worden, welcher samt passendem Entwickler und Verdünner von Microresist (Deutschland) bezogen wurde. Wasserstoffperoxid p.a. (H_2O_2), konzentrierte Schwefelsäure p.a. (H_2SO_4) und Isopropanol p.a. sind ein Produkt von Merck (Deutschland). Zur Reinigung wurde Ethanol p.a. von Roth (Deutschland) und Aceton p.a. von Riedel de Haen (Deutschland) verwendet.

Die Fotolithografie wurde auf 5"-Siliziumwafern von CrysTec (Deutschland) ausgeführt. Das Polydimethylsiloxan (PDMS) Sylgard 184 ist zusammen mit dem passenden Vernetzer bei Sascoholz (Deutschland) erworben worden. Menzel-Gläser (Deutschland) lieferte die benötigten Objektträger mit einer Größe von $24 \times 60 \text{ mm}$. Zur Kontaktierung wurden Mikroklemmen von Conrad Elektronik (Deutschland) sowie Platindraht mit einer Dicke von 0,4 mm von VWR (Deutschland) verwendet.

3.1.2 Chip-Design

Die für diese Arbeit entwickelte Struktur des Mikrofluidik-Chips ist in Abbildung 12 skizziert. Zwischen den Reservoiren 2 und 4 befindet sich der Injektorkanal. Er hat eine Breite von 100

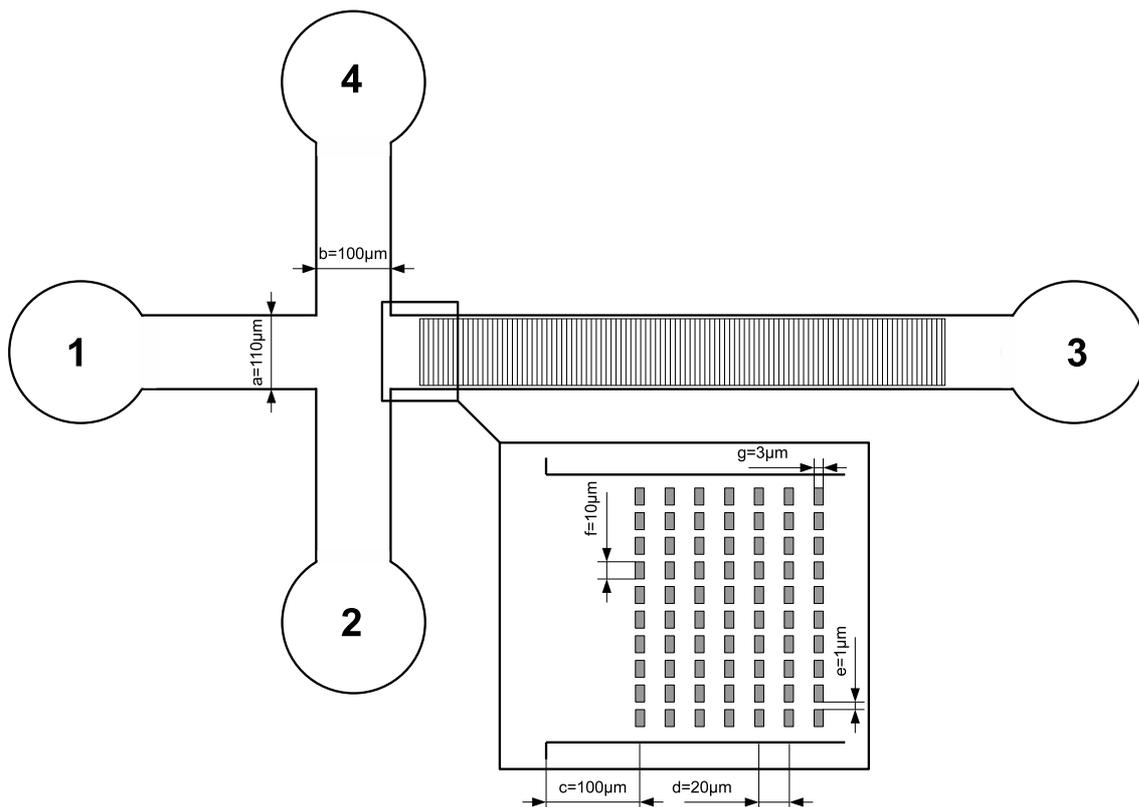


Abbildung 12: Schematische Darstellung des verwendeten Chip-Layouts. Dabei wird ein gängiger kreuzförmiger Injektor verwendet, um die DNA in den strukturierten Kanal einleiten zu können. Dieser Kanal hat eine Breite von $110 \mu\text{m}$. Der senkrecht dazu verlaufende Injektorkanal misst $100 \mu\text{m}$. Sämtliche Kanäle haben eine Höhe von $6 \mu\text{m}$. An die Enden der Kanäle werden unter dem Mikroskop Reservoirs mit $d = 2 \text{mm}$ gestanzt. Die Vergrößerung zeigt den Beginn der Strukturierung. Diese beginnt nach $100 \mu\text{m}$. Zwischen einer Fallreihe liegen $20 \mu\text{m}$. Jeder Pfosten hat eine Breite von $10 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$. Dazwischen befindet sich ein Durchlass mit $1 \mu\text{m}$ Breite.

μm und eine Länge von 2mm , gemessen von einem Reservoir zur Kreuzung. Senkrecht dazu, zwischen den Reservoiren 1 und 3 verläuft der Analysekanal mit einer Breite von $110 \mu\text{m}$ und einer Länge von 5mm rechtsseitig der Kreuzung und ebenfalls 2mm zwischen der Kreuzung und Reservoir 3. $100 \mu\text{m}$ nach der Kreuzung beginnt die Strukturierung des Kanals mit $10 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ großen Pfosten, welche über die gesamte Höhe des Kanals verlaufen. Eine Spalte besteht dabei stets aus 10 Pfosten. Insgesamt befinden sich 180 Spalten in dem Kanal, die

jeweils einen Abstand von 20 μm voneinander haben. Zwischen den Pfosten befindet sich ein Durchlass mit 1 μm Breite. Sämtliche Kanäle haben eine Höhe von 6 μm . Die eingezeichneten Reservoirs haben einen Durchmesser von 2 mm und eine Höhe von ca. 1,5 mm.

3.1.3 Herstellung des Masterwafers

Als Grundlage der Chipherstellung dient ein 5-Zoll-Siliziumwafer mit polierter Oberfläche. Darauf werden negative Reliefs der gewünschten Chip-Struktur per Fotolithografie aufgebaut. Dazu wird der Wafer zunächst für ca. 20 Minuten in Caro'scher Säure, einer 1:3-Mischung aus Wasserstoffperoxid und Schwefelsäure, zur Reinigung eingelegt und anschließend gründlich mit entmineralisiertem Wasser abgespült. Zur Trocknung wird er zunächst in einer Schleuder mit Vakuumhalterung (Delta 10 von BLE-Laboratory Equipment, Deutschland) bei 4.000 Umdrehungen pro Minute trocken geschleudert. Die Restfeuchtigkeit wird anschließend noch auf einer Heizplatte bei 200 °C zwanzig Minuten lang entzogen.

Zum Auftragen des Photolacks auf den Wafer kommt eine Spincoating-Anlage (ST147 von Convac, Deutschland) zum Einsatz. Der Lack wird dabei mittig auf den Wafer gegeben und zunächst bei 500 Umdrehungen pro Minute gleichmäßig verteilt. Die genaue Schichtdickeneinstellung erfolgt anschließend bei 1.500 Umdrehungen pro Minute für 30 Sekunden.

Vor der UV-Belichtung wird der Lack vorgehärtet (Soft-Baking). Dazu wird er auf der Heizplatte für drei Minuten auf 65 °C und anschließend für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend mit einer Glas-Chrom-Blende maskiert (siehe Abbildung 13.a). Die Bestrahlung im UV-Parallelbelichter (Modell 8011, Oriol, USA) dauert 16,5 Sekunden. Anschließend wird der belichtete Bereich thermisch ausgehärtet, indem er für drei Minuten auf 65 °C und für zwanzig Minuten auf 95 °C erhitzt wird.

Die nicht belichteten Teile des Lackes werden entfernt, indem der Wafer für ca. zwei Minuten in den zugehörigen Entwickler eingelegt wird. Der Entwickler wird anschließend mit Aceton p.a. und Isopropanol p.a. abgespült. Mit reinem Stickstoff wird der Wafer trocken geblasen. Es folgt eine letzte Erhitzungsphase (Hard-Baking). Dabei wird er abermals für zwanzig Minuten auf 200 °C erhitzt.

Bie TDTS-Beschichtung der Waferoberfläche erfolgt nach einer optischen Qualitätskontrolle

und einer Überprüfung mit dem Profilometer DEKTAK 3030 ST von Sloan (USA). Dazu wird der Wafer zusammen mit einem Tropfen der Flüssigkeit, welche sich separat davon in einem Urglas befindet, in einem Exsikkator abgelegt und dieser mit einer Ölschieberpumpe evakuiert. Dies bewirkt, dass das TDTS verdampft und sich eine wenige Nanometer dünne Schicht davon auf dem Wafer ablagert. Der Unterdruck wird dabei etwa eine Stunde aufrecht erhalten. Das TDTS wirkt im folgenden Produktionsprozess als Antihafbeschichtung.

3.1.4 Produktion der PDMS-Chips

Das Negativabbild der gewünschten Strukturierung auf dem Wafer aus Kapitel 3.1.3 muss nun in Polydimethylsiloxan (PDMS) abgeformt werden. Hierzu werden 20 Gramm des Basispolymers mit 2 Gramm des mitgelieferten Vernetzers gemischt und über mehrere Minuten verrührt. Die Mischung wird anschließend über den Wafer gegossen (siehe Abbildung 13.b). Die Luftbläschen werden durch eine halbstündige Behandlung in einem Exsikkator entfernt. Eine anschließende vierstündige Erhitzung des Wafers auf 85 °C bewirkt das Aushärten des PDMS.

Das ausgehärtete und abgekühlte PDMS kann nun mit einer Pinzette vom Wafer abgezogen und die gewünschten Bereiche mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Das anschließende Stanzen der Reservoirs mit $d = 2\text{mm}$ an den Kanalenden wird unter einem Mikroskop ausgeführt. Hierzu wurde die Objektivtrommel um ein spezielles „Stanz-Objektiv“ erweitert. Dadurch ist eine Positionierung mit einer Genauigkeit von $100\mu\text{m}$ möglich. Die Chips werden anschließend in Aceton, Ethanol und schließlich Wasser im Ultraschallbad gereinigt, nachdem das Restmaterial aus den Reservoirs entfernt wurde. Die Trocknung erfolgt durch Abblasen mit Stickstoff.

Die Qualitätskontrolle der Chips erfolgt mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops JSM 880 von Jeol (Japan). Zur Oberflächenbehandlung wird die Probe zuvor in der Sputteranlage MCS 010 von BAL-TEC (Liechtenstein) mit 20nm Platin beschichtet.

Den Boden der Chips bildet ein mit einer dünnen PDMS-Schicht versehener Objektträger aus Glas. Die Deckgläschen werden dazu zuvor in Aceton, Ethanol und destilliertem Wasser im

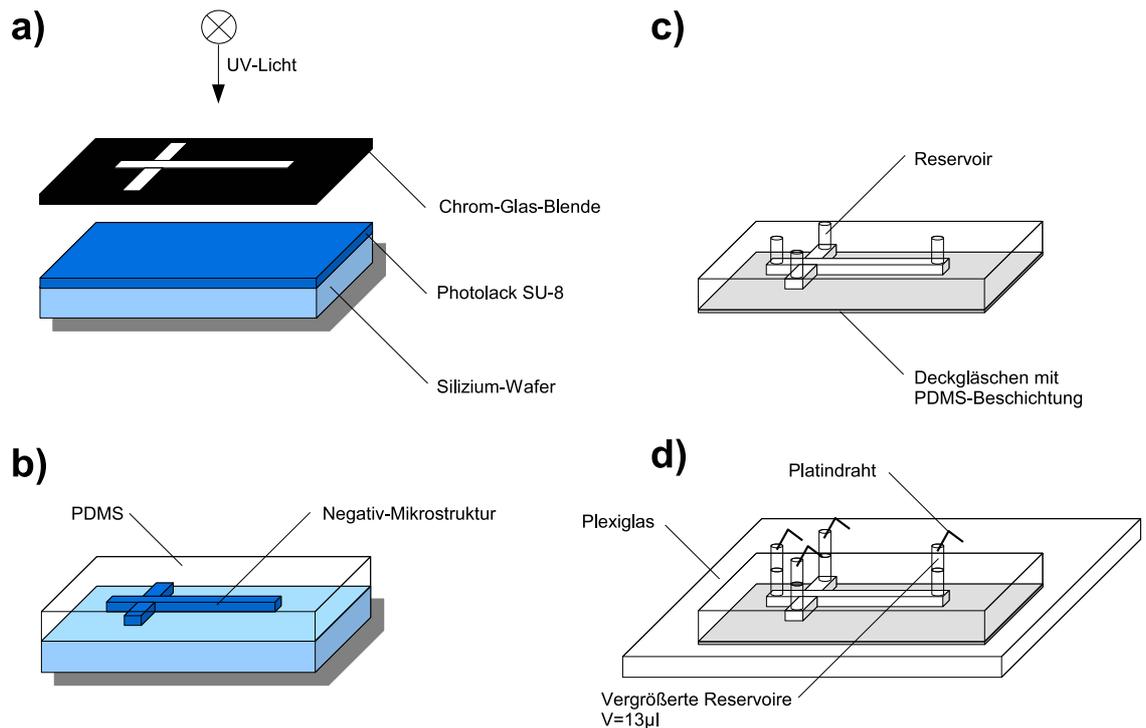


Abbildung 13: Herstellungsprozesse für den PDMS-Chip. a): Zunächst wird mit einer Chrom-Quarzglas-Blende die gewünschte Struktur im SU-8 Photolack belichtet. Nach der Aushärtung und der Entwicklung des Lackes bleibt ein Negativabdruck des gewünschten Chipdesigns auf der Waferoberfläche zurück b). Nach einer einmaligen Bedampfung mit TDTs kann der Wafer viele Male wiederverwendet werden. Zur Produktion des Chips wird diese Oberfläche mit einer 10:1-Mischung aus Polydimethylsiloxan (PDMS) und dem passenden Härter übergossen und für vier Stunden auf 85°C erhitzt. In c) wird das PDMS vom Wafer entfernt und die gewünschten Bereiche ausgeschnitten. An den Kanalenden werden Reservoirs mit einem Durchmesser von 2mm gestanzt. Der PDMS-Chip und ein mit PDMS beschichtetes Deckglas werden plasmabehandelt und aufeinander gelegt. Damit der Chip besser handhabbar ist und die angelegten elektrischen Felder genauer zu reproduziert werden können, wird der Chip über Adhäsion an eine 5mm dicke Plexiglasscheibe geklebt. Diese verfügt über passend gebohrte Reservoirs, welche mit Platinanschlüssen ausgestattet sind d).

Ultraschallbad gereinigt und die PDMS-Schichtdicke über Spin-Coating mit 3500 rpm für 15 Sekunden eingestellt. Die Aushärtung erfolgt bei 85 °C für 30 Minuten auf einer Heizplatte.

Sowohl die strukturierte Seite der Chips als auch die PDMS-Schicht der Objektträger werden nun mit einer selbstgebauten Plasma-Oxidationsanlage, welche [40] nachempfunden ist, behandelt. Dabei wird das Plasma bei einem Sauerstoffdruck von 0,1 mbar und mit einer Spannung von 50 kV bei einer Frequenz von 500 kHz erzeugt. Der PDMS-Chip wird anschließend auf dem Deckgläschen abgelegt (siehe Abbildung 13.c).

Vor der Inbetriebnahme des Chips wird dieser über Adhäsionskräfte mit einer 5mm dicken Plexiglasscheibe verklebt. Diese weist Bohrungen ebenfalls mit $d = 2$ mm auf, welche kongruent zu den Reservoirien des Chips angeordnet sind (siehe Abbildung 13.d). Darin sind bereits Anschlüssendrähte aus Platin vergossen, die in den Reservoirien enden.

3.1.5 Oberflächen- und Probenpräparation

Nach dem Zusammenbau wird nach mindestens einer halben Stunde Wartezeit eine etwa 3 μ M PEG3400-Lösung in ein Reservoir gegeben. Diese wird durch hydrodynamische Druckdifferenzen zwischen den Reservoirien in die Kanäle gespült. Sind alle Kanäle gefüllt, werden die restlichen Reservoirien mit der selben Menge der Lösung befüllt. Nach 15 bis 20 Minuten ist die Lösung durch 10mM Phosphatpuffer mit $\text{pH} = 8,3$ zu ersetzen. Wieder werden hydrodynamische Effekte genutzt, um den Rest der PEG-Lösung aus den Kanälen zu spülen.

Die Basispufferlösung für die Experimente besteht aus 10 mM Phosphatpuffer, 1mM EDTA und 0,1 % POP-6. Die DNA-Lösung enthält zusätzlich dazu 50 pM der entsprechenden DNA, 2 μ l pro ml β -Mercaptoethanol, sowie ein YOYO-Molekül pro 10 Basenpaare DNA. Für die Messungen bezüglich der Ionenstärke wird diese durch Zugabe von Natriumchlorid in alle Pufferlösungen eingestellt. Für die Messungen bezüglich der YOYO-Konzentration wird statt des Natriumchloridgehalts die Menge an YOYO variiert.

3.1.6 Experimenteller Aufbau

Das zentrale Element des Versuchsaufbaus ist das invertierte Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 von Carl Zeiss Microimaging (Deutschland), welches mit der Quecksilber-Kurzbogenlampe

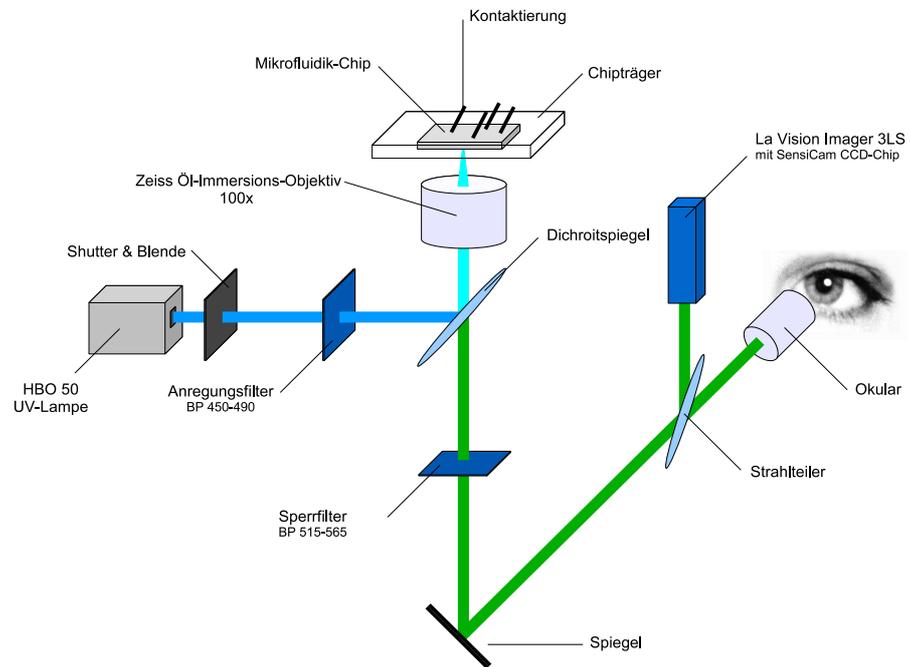


Abbildung 14: Schematische Darstellung des optischen Aufbaus.

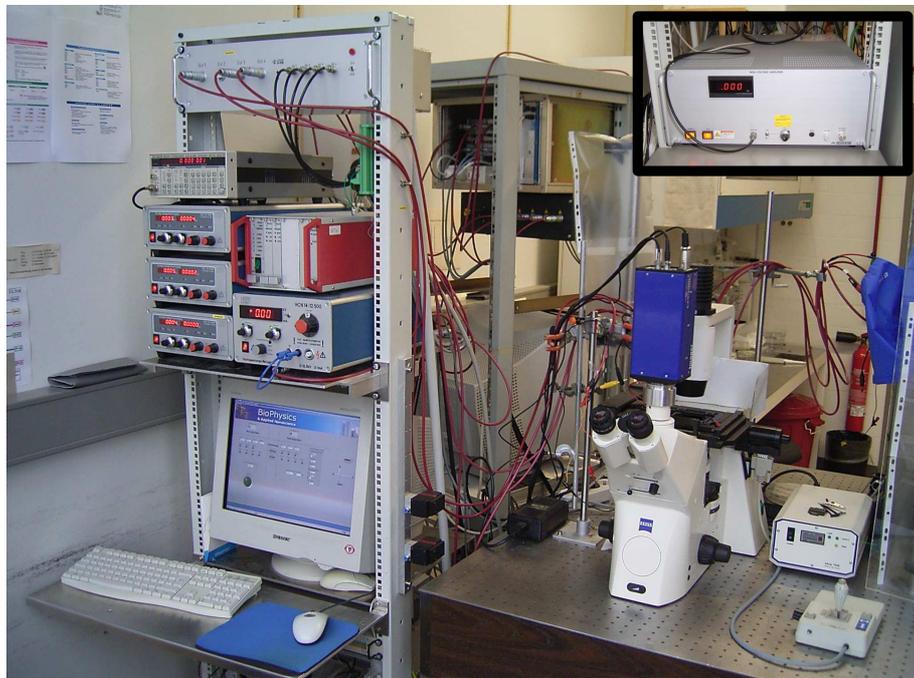


Abbildung 15: Fotografie des Versuchsaufbaus. Links im Turm befindet sich der Computer für die Steuerung der Spannungsversorgung. Darüber sind die Hochspannungsnetzgeräte sowie der Frequenzgenerator angeordnet. Der Hochspannungsverstärker ist in der Einblendung abgebildet.

HBO50 mit 50 Watt Leistung am Backport erweitert wurde. In dem Mikroskop befindet sich ein Fluoreszenzoptiksatz, bestehend aus dem Anregungsfilter BP 450-490, dem Sperrfilter BP 515-565 und dem Dichroitspiegel FT-510, alle ebenfalls von Zeiss. Der Dichroit leitet das UV-Licht über das 100-fach Ölimmersionsobjektiv Plan Neofluar (NA=1,3) von Zeiss auf die darüber angebrachte Probe. Diese wird auf der automatisch steuerbaren x-y-Stage von Ludl Electronics (USA) installiert, welche über einen Joystick bewegt werden kann.

Am Kameraport des Mikroskops ist die CCD-Kamera Imager 3LS von LaVision (Deutschland) angeschlossen. Ein Computer mit installiertem Sensi-Cam PCI Interface-Board zeichnet die Videodaten mit Hilfe der LaVision-Software Davis 6.2 auf. Eine schematische Darstellung der optischen Instrumente ist in Abbildung 14 zu sehen.

Die elektrischen Felder an den Chip-Kontakten 3 und 4 werden mit Hilfe von zwei HCL 14-12500 Hochspannungsnetzgeräten von FUG (Deutschland) erzeugt. Ihre Steuerung übernimmt ein gemeinsam entwickeltes LabView-Programm [8]. An Kontakt 1 wird die Wechselspannung U_{AC} angelegt, welche beliebig um dem Offset U_{DC} verschoben werden kann. Der Spannungsverlauf wird dabei vom Funktionsgenerator DS345 von Stanford Research Systems (USA) erzeugt und über den Hochspannungsverstärker AMS-1B30 von Matsusada Precision (Japan) mit einer Maximalspannung von 1.000 V hundertfach verstärkt. Die Steuerung des DS345 übernimmt ebenfalls das LabView-Programm über ein GPIB-Interface. Kontakt 2 wird stets an die Masse angeschlossen. Die Nummerierung der Kontakte ist in Abbildung 12 zu ersehen. Eine Fotografie des gesamten Aufbaus befindet sich in Abbildung 15.

3.1.7 Mikrochip-Operationen

Die Messprozedur ist in zwei Schritte unterteilt. Zu Beginn des Experimentes wird die DNA-Lösung in das Reservoir 4 gefüllt. In allen anderen Reservoiren befindet sich der Basispuffer mit der entsprechenden Ionenstärke (siehe Kapitel 3.1.5). Bevor das System mit den entsprechenden Spannungen in Betrieb genommen wird, muss der Füllstand aller Reservoirs ausgeglichen werden, sodass kein hydrodynamischer Fluss entsteht. Nun kann der Chip in das Mikroskop eingesetzt und mit dem ersten Prozessschritt begonnen werden.

Im ersten Schritt sind die Spannungen an den Reservoiren 1,3 und 4 so eingestellt, dass

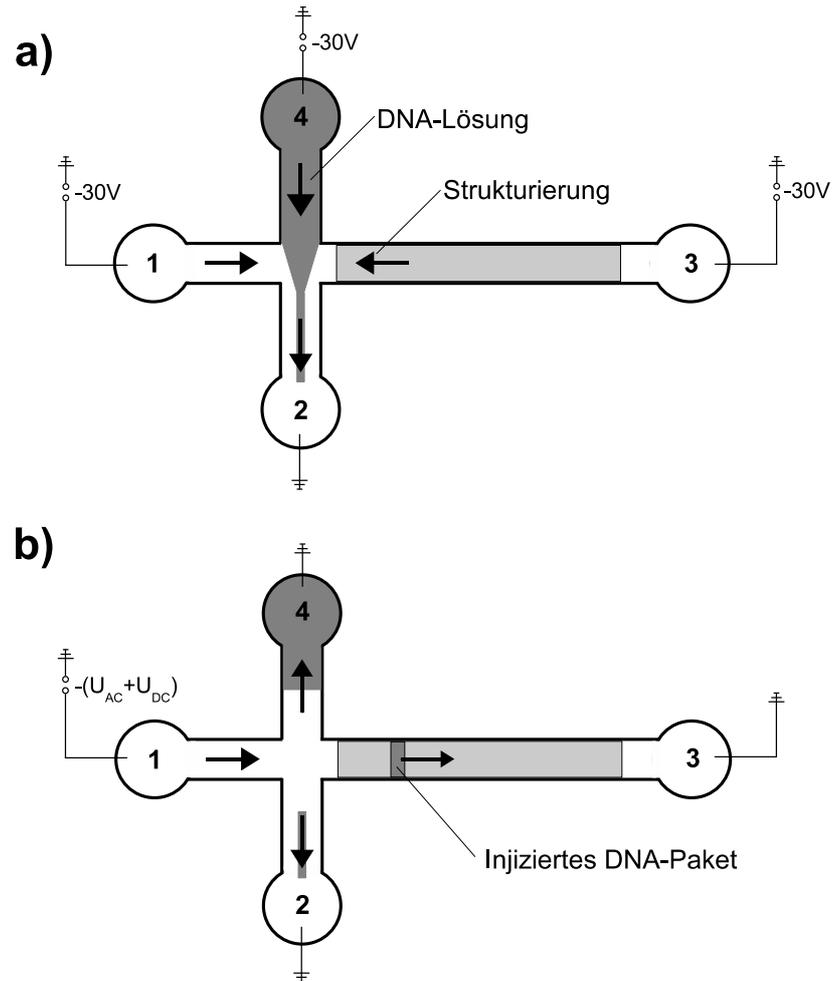


Abbildung 16: Injektionsprotokoll für die Chipoperation. Im ersten Prozessschritt (a) wird eine Gleichspannung von -30V an die Reservoirs 1,3 und 4 angelegt. Beim Umschalten auf den zweiten Prozessschritt (b) werden die Reservoirs 2,3 und 4 auf Masse gelegt und an Reservoir 1 die mit U_{DC} superponierte Wechselspannung U_{AC} ($U_{AC}, U_{DC} > 0$) angeschlossen. Die Steuerung der Spannungen übernimmt ein LabView-Programm.

in den Kanälen ein gleichmäßiger Fluss auf die Kreuzung zu entsteht (siehe Abbildung 16.a). Normalerweise wird ein Wert von ca. -30 V benutzt. Zudem werden DNA-Moleküle, die sich aus voran gegangenen Durchgängen noch im Analysekanal befinden, aus ihm herausgespült. Dieser Operationszustand wird für 45 Sekunden aufrecht erhalten.

Nun schaltet das LabView-Programm in den zweiten Betriebszustand (Abbildung 16.b). Dabei werden die Anschlüsse 2,3 und 4 auf Masse umgeschaltet. An Anschluss 1 wird die Spannung $U_{DC} = 12V$ und U_{AC} in verschiedenen aber festen Amplitudenwerten zwischen 100V und 350V angelegt. Zudem wird mit Beginn der Injektionssequenz die Videoaufzeichnung begonnen, wobei stets die selbe Stelle im Kanal von der Kamera erfasst wird. Die neuen Spannungsverhältnisse bewirken, dass ein Teil der DNA, die sich gerade in der Kreuzung befindet, in den Kanal 3 injiziert und die restliche DNA in die Kanäle 2 und 4 gedrückt wird. Dieses Verfahren ist allgemein als *Pinched Injection-Methode* bekannt [41]. Wenn alle Moleküle durch den betrachteten Bildausschnitt geflossen sind, beginnt der Prozess mit der ersten Sequenz von vorne und das Video wird abgespeichert. Nun wird diese Prozedur für weitere Werte von U_{AC} wiederholt.

3.2 Automatisierte Polarisationsbestimmung mittels ratentheoretischer Methoden

3.2.1 Bestimmung der Polarisierbarkeit

In Kapitel 2.2.2 ist dargestellt, dass man mit Hilfe von inhomogenen elektrischen Feldern eine durch

$$V(\vec{r}) = -\frac{1}{2}\alpha |\vec{E}|^2 \quad (24)$$

beschreibbare Potentiallandschaft erzeugen kann. Der Vorfaktor rührt von der zeitlichen Mittelung der Wechselspannung U_{AC} her, welche maßgeblich an der Erzeugung des elektrischen Feldes beteiligt ist. In Kapitel 2.3.2 wurde dieser Gedanke weiter geführt und mit dem modifizierten Kramers'schen Ratengesetz

$$\tau_{A \rightarrow B} \propto \exp\left(\frac{\Delta V}{k_B T}\right)$$

in Verbindung gebracht. Dieser Ansatz wird nun weiter entwickelt. Der in Kapitel 3.1.2 vor-

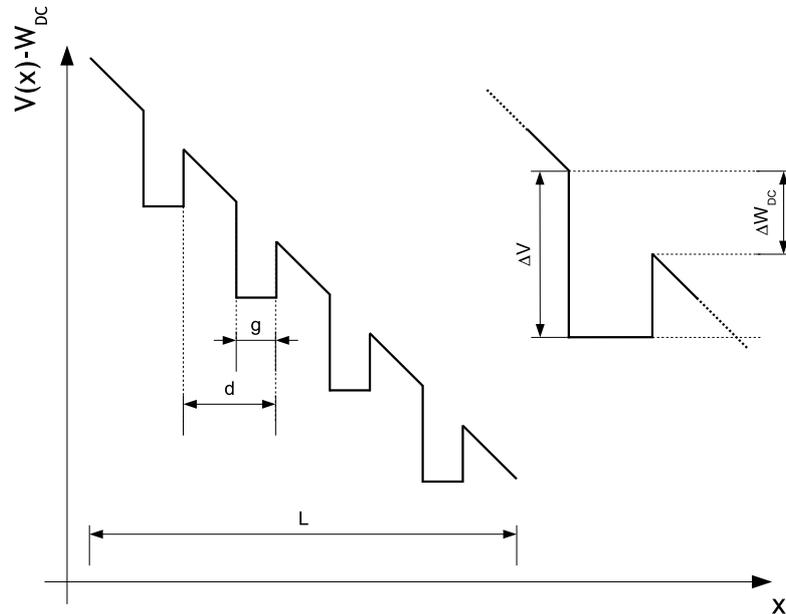


Abbildung 17: Dielektrophoretisch erzeugte Potentiallandschaft nach Ajdari und Prost [4]. Diese Potentialmulden sind mit den metastabilen Potentialen von Kramers vergleichbar und man kann die Ratenbeschreibung benutzen, um die durchschnittliche Aufenthaltszeit eines Teilchens in einer Falle (lokales Minimum) zu ermitteln. Daraus kann anschließend auf seine Polarisierbarkeit zurückgeschlossen werden.

gestellte Mikrofluidik-Chip enthält mehrere dielektrophoretische Fallen nebeneinander, welche zwischen den Pfosten im Kanal entstehen. Ausgehend von Abbildung 5.d wird daher beim Anlegen einer Wechselspannung U_{AC} , überlagert mit der Gleichspannung U_{DC} , eine hier auf eine Dimension vereinfachte Potentiallandschaft wie in Abbildung 17 erzeugt. Da U_{DC} zu einer Kippung und somit zur einer Reduktion der Potentialmulde führt, muss Gleichung (22) zu folgender Form angepasst werden.

$$\tau \propto \exp\left(\frac{\Delta V - \Delta W_{DC}}{k_B T}\right) \quad (25)$$

Die benutzten Variablen sind in Abbildung 17 eingeführt worden.

Ermittlung der Feldstärke in einer Falle durch ein Ersatzschaltbild

Um den Zähler im Exponenten von Gleichung (25) quantifizieren zu können, muss aus der

angelegten Spannung U_{AC} die Feldstärke in einer Falle ermittelt werden. Dies ist bereits in der Publikation von Regtmeier et al. durchgeführt worden [8]. Hierzu wird der Chip durch

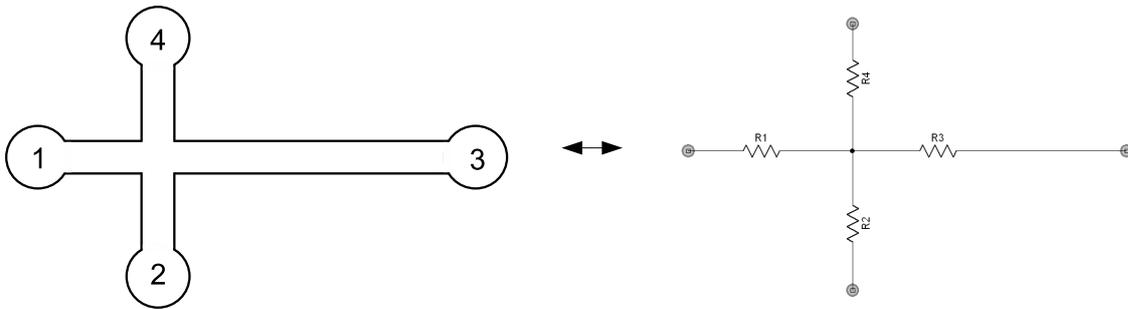


Abbildung 18: Zur Berechnung der Proportionalitätskonstanten ξ zwischen elektrischem Feld E in einer Falle und der angelegten Wechselspannung U_{AC} wird der Chip durch ein Widerstandsnetzwerk approximiert [8].

ein Widerstandsnetzwerk (siehe Abbildung 18) approximiert und das Problem mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes und der Kirchhoff'schen Regeln gelöst. Es gilt:

$$E^2 = 2\xi U_{AC}^2 \quad (26)$$

Es ergibt sich in der Arbeit von Regtmeier et al. in guter Näherung [8]

$$\xi \approx 22900 \text{m}^{-2}. \quad (27)$$

Diese Größe geht in den Proportionalitätsfaktor zwischen angelegter Spannung U_{AC} und dem daraus resultierenden Feld E in einer Falle ein und ist somit geometrieabhängig.

Bestimmung der Polarisierbarkeit

Das Einsetzen von Gleichung (24) in Gleichung (25) führt zu folgendem Ausdruck, wobei der Term für W_{DC} nicht weiter berücksichtigt werden muss.

$$\tau \propto \exp\left(\frac{\alpha E^2}{2k_B T}\right) \quad (28)$$

ξ ist aus Gleichung (27) bekannt und mit Gleichung (26) folgt direkt

$$\tau \propto \exp\left(\frac{\alpha \xi U_{AC}^2}{k_B T}\right). \quad (29)$$

Logarithmierung des Ausdruckes liefert

$$\ln \tau \propto \frac{\alpha \xi U_{AC}^2}{k_B T}. \quad (30)$$

Um α zu bestimmen, wird τ für verschiedene Werte von U_{AC} gemessen. Aus der Auftragung $\ln \tau$ gegen U_{AC}^2 kann man die Steigung m und somit α ermitteln, mit

$$\alpha = m \cdot \frac{k_B T}{\xi} \quad (31)$$

Bei vollständiger Betrachtung der Kramersrate treten nicht exponentielle, allerdings von α abhängige Vorfaktoren auf, die bei der Bestimmung von α folglich zu logarithmischen Korrekturen führen. Diese werden bei der Auswertung der Experimente berücksichtigt, indem der Graph mit der Funktion

$$f(x) = m \cdot x - \ln(x) + n \quad (32)$$

über die Parameter m und n angefitet wird.

3.2.2 Motivation für die automatisierte Auswertung

Für die bislang von Hand ausgeführte Auswertung des gewonnenen Bildmaterials aus [8] wird zur Ermittlung der Aufenthaltszeit aus einzelnen Bildern eine Videodatei mit bekannter Bildrate vom Fluss der DNA in der strukturierten Region des Chips erstellt. Die Fallenaufenthaltszeit τ wird daraus manuell ermittelt. Aus dreißig gezählten Molekülen, welche randomisiert gewählt werden müssen, werden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt und weiter verarbeitet.

Dieses Verfahren ist sehr mühsam, zeitaufwändig und bietet Möglichkeiten für den Auswertenden, das Ergebnis unterbewusst durch Wahl der Moleküle signifikant zu beeinflussen. Erfahrungen haben gezeigt, dass besonders jene Moleküle bevorzugt werden, welche sich in

leicht auszuwertenden Bereichen und damit nicht im Zentrum der Hauptmasse des injizierten Volumens aufhalten. Um diese beiden Probleme bei der Auswertung zu umgehen, wird mit dieser Arbeit ein neues automatisiertes Verfahren implementiert.

3.2.3 Grundlegende Idee und automatisierte Auswertung

Die grundlegende Idee ist, die manuelle Einzelauswertung der Fallenaufenthaltszeiten auf eine einfache Helligkeitsmessung zurückzuführen. Schwarz-Weiß-Bilder enthalten lokalisierte Informationen über die Helligkeit und können daher zur Auswertung herangezogen werden. Hat man das Videomaterial der durch die Strukturierung migrierenden DNA aufgezeichnet, wird in jedem Bild, d.h. für diskrete Zeitpunkte, in der Mitte des Bildes die *Region of Interest* (ROI) gewählt, welche in Abbildung 19 als Rechteck zu sehen ist. Anschließend wird dort für jedes Bild die mittlere Helligkeit bestimmt. Diese korreliert mit der Anzahl Moleküle, die sich gerade dort befinden, d.h. man bestimmt experimentell eine zeitliche Helligkeitsverteilung der DNA in einer definierten Region. Mit Hilfe dieser Daten kann die durchschnittliche Fallenaufenthaltszeit ermittelt werden. Dazu sind einige theoretische Vorüberlegungen nötig. Zunächst werden folgende statistische Verteilungen definiert:

$\Psi_{\text{esc}}(t)$: Verteilung der Aufenthaltszeiten

$\Psi_0(t)$: Verteilung der Laufzeiten zwischen zwei Fallen

$\Psi_+(t)$: Verteilung für Vorlaufzeiten bis zum Fallenbereich

Kombiniert man diese Verteilungen, kann man eine Helligkeitsverteilungsfunktion $H_N(t)$ angeben, welche sich nach N durchgetretenen Fallen einstellt:

$$H_N(t) = \int d\tilde{t} \Psi_+(\tilde{t}) \int \prod_{i=1}^N dt_i dt'_i \Psi_{\text{esc}}(t_i) \Psi_0(t'_i) \cdot \delta \left[t - \left(\tilde{t} + \sum_{k=1}^N (t_k + t'_k) \right) \right] \quad (33)$$

Unter der Annahme, dass die Ratenbeschreibung gültig ist, also $k_B T \ll \Delta W$ kann man Ψ_{esc} direkt angeben:

$$\Psi_{\text{esc}}(t) = \frac{1}{\langle \tau \rangle} \exp \left(-\frac{t}{\langle \tau \rangle} \right)$$

Es sei weiterhin angenommen, dass die Injektion der DNA als δ -Peak erfolgt und dass nur die dielektrophoretischen Fallen, nicht aber die freie Migration im unstrukturierten Bereich eine Verbreiterung dieses Peaks bewirken, also gilt

$$\begin{aligned}\Psi_0(t) &= \delta(t - t_0) \\ \Psi_+(t) &= \delta(t - t_+).\end{aligned}$$

Dabei ist t_0 die Zeit, die ein Molekül von Fallenreihe zu Fallenreihe benötigt, wenn das dielektrophoretische Potential abgeschaltet ist. t_+ ist die Zeit, die ein Molekül in Anspruch nimmt, bis der strukturierte Bereich erreicht ist. Damit vereinfacht sich Gleichung (33) folgendermaßen:

$$\begin{aligned}H_N(t) &= \int \prod_{i=1}^N dt_i \Psi_{\text{esc}}(t_i) \cdot \delta\left(t - t_+ + Nt_0 - \sum_{k=1}^N t_k\right) \\ &= \int \prod_{i=1}^N dt_i \Psi_{\text{esc}}(t_i) \cdot \delta\left(t - t_{\text{free}} - \sum_{k=1}^N t_k\right)\end{aligned}$$

wobei

$$t_{\text{free}} = Nt_0 + t_+.$$

Dabei bezeichnet N die Anzahl der Fallen, die das Molekül bis zur ROI bereits passiert hat. Das Problem kann durch Laplace-Transformation und anschließende Rücktransformation gelöst werden und man erhält [42]:

$$H_N(t) = \frac{1}{\tau(N-1)!} \cdot \left(\frac{t - t_{\text{free}}}{\tau}\right)^{N-1} \cdot \exp\left(-\frac{t - t_{\text{free}}}{\tau}\right) \cdot \Theta(t - t_{\text{free}}) \quad (34)$$

Hierbei ist $\Theta(t - t_{\text{free}})$ die Heaviside-Funktion, welche negative Werte der theoretischen Heligkeitsfunktion vor dem Eintreffen der injizierten DNA unterdrückt.

Die durchschnittliche Flusszeit bis zur ROI kann dementsprechend berechnet werden.

$$\langle t \rangle = \int dt t H_n(t) \quad (35)$$

und man erhält durch Einsetzen von Gleichung (34) [42]:

$$\begin{aligned}\langle t \rangle &= \tau N + t_+ + N t_0 \\ &= \tau N + t_{\text{free}}\end{aligned}$$

Dies wird anschließend noch nach τ aufgelöst:

$$\tau = \frac{\langle t \rangle - t_{\text{free}}}{N} \quad (36)$$

Das bedeutet, dass man bei bekannter freier Migrationszeit bis zur ROI und bei bekannter Anzahl der zurückgelegten Fallen aus dem Verteilungsschwerpunkt die mittlere Fallenaufenthaltszeit berechnen kann. Wie bereits zu Beginn des Kapitels erläutert, kann die Helligkeitsverteilung durch Helligkeitsmessung eines jeden Bildes in der ROI bestimmt werden. Daraus kann der zeitlich diskrete Verteilungsschwerpunkt berechnet werden

$$\langle t \rangle = \frac{\sum_i H(t_i) \cdot t_i}{\sum_i H(t_i)}. \quad (37)$$

Hier wird jeder Zeitpunkt t_i mit der dann auftretenden Helligkeit $H(t_i)$ gewichtet. Zudem kann man t_{free} bestimmen, indem man eine Messreihe für $U_{AC} = 0$ aufnimmt.

$$t_{\text{free}} = \langle t(U_{AC} = 0) \rangle \quad (38)$$

Ist zudem N bekannt, kann mit Hilfe von Gleichung (36) die gesuchte mittlere Fallenaufenthaltszeit berechnet werden.

3.2.4 Technische Umsetzung

ImageJ

Die vorgestellte Software benutzt als Kernelement das Programm ImageJ [43], welches in der Lage ist, eine Bildsequenz einzulesen und in einer vorher definierten ROI beim Durchblättern der Bilder die dort jeweils ermittelte Helligkeit in eine Datei zu schreiben. Sämtliche dazu

nötigen Anweisungen werden ImageJ beim Start mit einem Macro mitgeteilt, welches allgemein folgende Struktur hat:

```
01 | run("Clear Results");
02 | dir = "/home/lukas/2.0"
03 | list = getFileList(dir);
04 | run("Image Sequence...", "open=/home/lukas/2.0/img_0001.TIF number=300
    | starting=1 increment=1 scale=100 file=");
05 | makeRectangle(141, 2, 19, 250);
06 | run("Set Measurements...", " mean slice redirect=None decimal=6");
07 | for (i=0; i<list.length; i++)
08 | {
09 |   run("Measure");
10 |   run("Next Slice [>]");
11 | }
12 | run("Input/Output...", "jpeg=75 file=.dat");
13 | saveAs("Measurements", "/home/lukas/2.0results.dat");
```

Dieses Macro löscht in Zeile 01 zunächst alle vorhandenen Ergebnisse einer eventuell voran gegangenen Auswertung. In Zeile 02 wird die Variable 'dir' mit dem Verzeichnis belegt, indem die Bilddateien liegen, worauf hin gleich die Variable 'list' mit den Namen der gefundenen Bilddateien gefüllt wird. In Zeile 04 wird nun die Bildsequenz in das Programm geladen. Anschließend wird die ROI mit einem Rechteck markiert, die optimalerweise so platziert ist, dass sie zwischen zwei Fallen liegt. Die nötige Breite des Bereichs wird experimentell ermittelt, aber möglichst schmal gewählt, da die Geometrie des Rechtecks über eine Faltungsoperation mit der wahren Helligkeitsverteilung in die zeitliche Entwicklung der Helligkeitswerte einfließt. Das nun folgende Kommando in Zeile 06 weist ImageJ an, eine Messung der mittleren Helligkeit innerhalb des Rechtecks auszuführen. Nun wird die Bildsequenz durchgeblättert und je Bild einmal die mittlere Helligkeit gemessen (Zeile 07 bis 11). Anschließend wird festgelegt, in welchem Format die Ausgabe der Daten erfolgen soll und schließlich in der letzten Zeile die Ausgabe erstellt.

Perl-Script

Die zentrale Steuerung aller Operationen übernimmt das Perl-Script 'dna.pl' (siehe Abbildung 20). Sein Quellcode ist im Anhang A.1 zu finden. In den ersten zehn Zeilen wird der Pfad zum Unix Perl-Interpreter sowie die Variable 'ijpath', welche den Pfad zur ausführbaren Datei

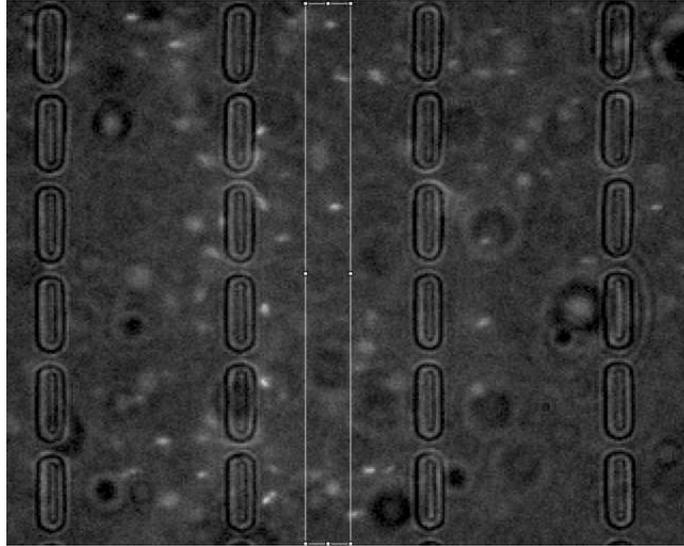


Abbildung 19: Markierung der Region of Interest (ROI) durch das ImageJ-Macro. Im Vergleich zur Breite des injizierten DNA-Paketes ist sie so klein, dass ihre Geomerie das Ergebnis des Helligkeitsverlaufs nicht beeinflusst aber ausreichend groß um die Messung sinnvoll durchzuführen.

von ImageJ enthält, angegeben. Die Zeilen 013-016 bewirken eine Tastaturabfrage, wo die auszuwertenden Bilddateien liegen. Die Antwort wird in der Variablen 'mutterpfad' abgelegt. Anschließend wechselt das System in dieses Verzeichnis und legt in der Liste '@verzeichnis' die Namen der darin enthaltenen Unterordner ab. Dabei wird davon ausgegangen, dass sämtliche Bilddateien zu je einem Wert von U_{AC} in einem separaten Unterordner im Mutterpfad liegen. Um zu ermitteln, wie viele Werte von U_{AC} gemessen wurden, wird in Zeile 020 sofort die Länge der Liste '@verzeichnis' bestimmt und zur Kontrolle dem User angezeigt.

Die nun folgende for-Schleife von Zeile 025 bis 058 enthält den zentralen Prozess der Auswertung. Sie wird so oft ausgeführt, wie verschiedene Werte von U_{AC} vorhanden sind. In Zeile 027 bis 030 wird der erste Unterordner ermittelt und darauf hin in ihn hinein gewechselt. Dort wird eine Datei mit der Bezeichnung 'ep-makro' angelegt, in welche das bereits vorgestellte ImageJ-Macro zur Messung des Helligkeitsverlaufes geschrieben wird. Dabei wird es für den aktuellen Wert von U_{AC} so angepasst, dass der Quellpfad der Bilddaten und der Zielpfad der Ergebnisdatei korrekt an ImageJ übermittelt werden. Dieses Makro wird in den Zeilen 033 - 049 erstellt und anschließend in Zeile 050 geschrieben. In Zeile 053 wird nun ImageJ gestartet. Dabei wird der Name des soeben erstellten Macros als Argument übergeben.

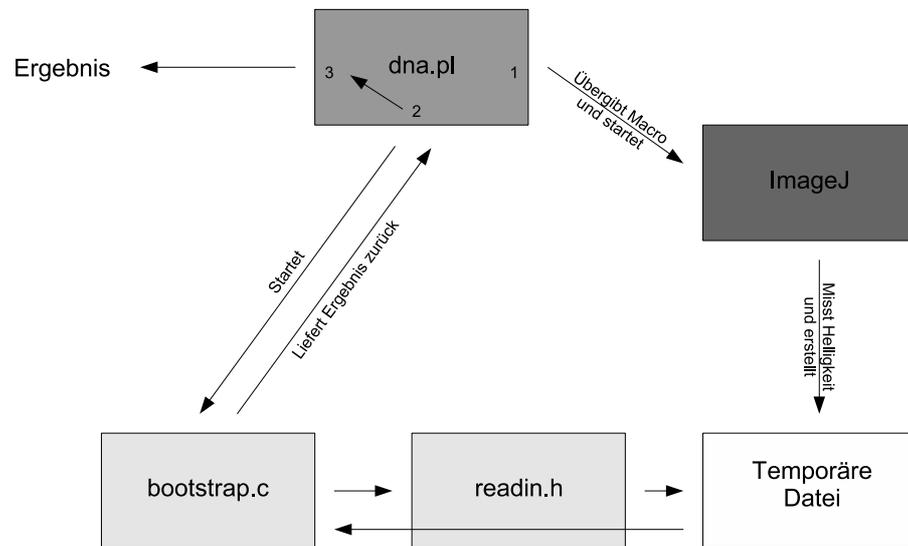


Abbildung 20: Funktionale Zusammenhänge zwischen den benutzten Scriptbestandteilen

Während seiner Laufzeit legt ImageJ eine temporäre Datei an, welche die Helligkeitsmessung sowie eine laufende Videoframe-Nummer enthält. Diese Datei wird von 'dna.pl' nun in Zeile 054 eingelesen und sofort wieder in eine weitere Datei ausgegeben, nachdem die ersten beiden Zeilen, welche die Spaltenbeschriftungen enthalten, entfernt wurden.

Bootstrapper

Abschließend führt 'dna.pl' die gemessenen Daten dem Programm 'bootstrap.c' zu, welches seinerseits auf die Klasse 'readin.h' zurückgreift, um die Datei einzulesen. Die Quellcodes von 'bootstrap.c' sowie 'readin.h' sind im Anhang A.2 bzw. A.3 aufgeführt. Dieses in C geschriebene Programm hat mehrere Funktionen. Es berechnet zunächst in den Zeilen 025 bis 034 den Helligkeitsmittelwert der ersten 60 Bilder und subtrahiert diesen Wert von allen ermittelten Helligkeitswerten. Damit ist eine Korrektur der Nulllinie durchgeführt. Anschließend wird in den Zeilen 036 bis 042 der gewichtete Mittelwert gemäß Gleichung (37) ermittelt. In den folgenden Zeilen fungiert das Programm als Bootstrapper um einen statistischen Fehler der Messung zu berechnen. Dieser Bootstrapper wählt dazu 10.000 mal zufällig $\frac{2}{3}$ aller bereits gewichteten Werte aus und berechnet ihre Standardabweichung von $\langle t \rangle$ und bildet anschließend den Mittelwert aller Abweichungen, um ihn als Fehler für das ermittelte $\langle t \rangle$ anzugeben.

Die Werte für $\langle t \rangle$ und $\Delta\langle t \rangle$ werden zurück an 'dna.pl' übergeben, welches sie dann an den Benutzer ausgibt.

Diese Prozedur wird nun von 'dna.pl' automatisch für alle gemessenen Werte von U_{AC} wiederholt und die jeweiligen Ergebnisse auf dem Bildschirm oder auf Wunsch in einer Datei ausgeben.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Fabrikation von Mikrofluidik-Chips

Abbildung 21 zeigt die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines produzierten Mikrofluidik-Chips. Tabelle 1 enthält eine Übersicht über alle Längenmessungen und einen Vergleich zu den entsprechenden Vorgaben. Vergleicht man sie mit den Abmessungen der Belichtungsmaske aus Kapitel 3.1.2, so sind zum Teil deutliche Abweichungen zu erkennen. Als Fehlerquelle hierfür

Parameter	Vorgabe [μm]	Messung [μm]
a	110	100 ± 3
b	100	$95 \pm 2,85$
c	100	$97 \pm 2,91$
d	20	$21 \pm 0,63$
e	1	$2,3 \pm 0,07$
f	10	$7,4 \pm 0,22$
g	3	$2,2 \pm 0,07$

Tabelle 1: Vergleich der Längenvorgaben aus Kapitel 3.1.2 mit den Messungen im Rasterelektronenmikroskop.

kommt zunächst der manuell ausgeführte Herstellungsprozess der Chips in Frage. Kritische Prozesse sind insbesondere die optische Belichtung durch einfaches Auflegen der Chrom-Maske auf den Photolack ohne die Anwendung eines Mask-Aligners sowie das manuelle Aufkleben des Chips auf dem Probenhalter des Elektronenmikroskops. Im ersten Fall hat dies möglicherweise zu einer leicht unscharfen Abbildung und schrägen Belichtungskanten geführt. Das manuelle Aufkleben des Chips kann dazu geführt haben, dass die mikroskopischen Strukturen leicht verzerrt auf dem Probenhalter fixiert worden sind, da ausgehärtetes PDMS flexibel und dehnbar ist. Insgesamt sind die angegebenen Messwerte mit einer Standardabweichung von unter 2 % jedoch sehr gut reproduzierbar und akzeptabel.

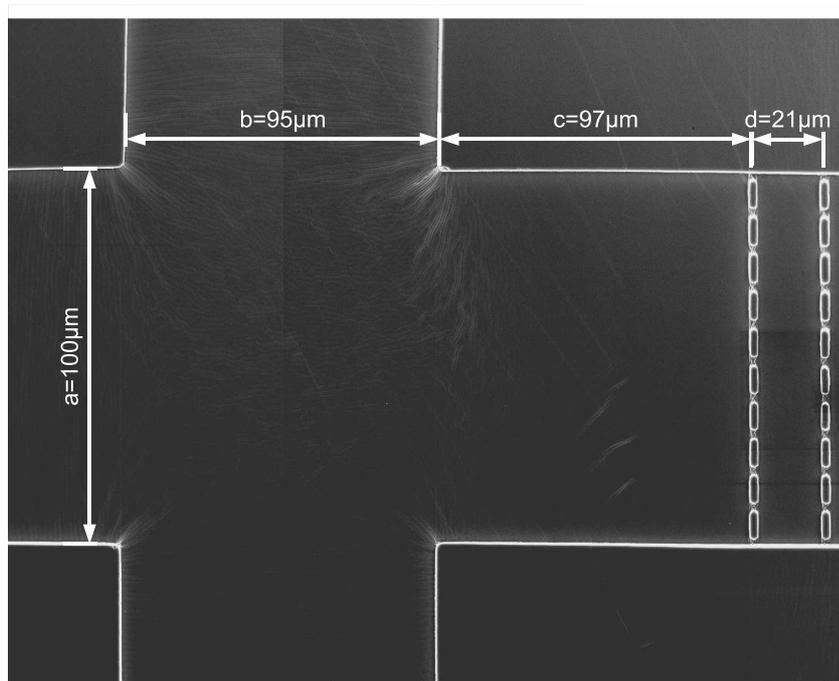


Abbildung 21: Rasterelektronenmikroskopieaufnahme der Kreuzungsregion und vom Beginn des Strukturierungsbereiches.

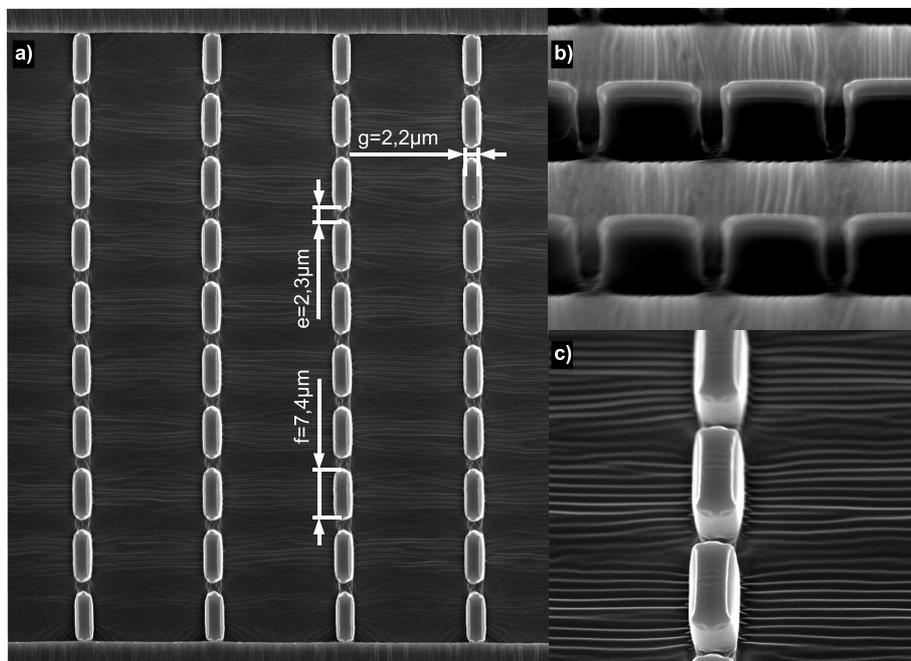


Abbildung 22: a: Vergrößerte Draufsicht auf die ersten vier Fallenreihen. b zeigt eine perspektivische Frontalansicht unter einem Winkel von 60° . In c ist die Seitenansicht einer Fallenreihe zu sehen. Die deutlich erkennbaren parallel verlaufenden Streifen sind vermutlich Artefakte aus dem Lithografieprozess.

4.2 Verbessertes automatisches Auswertungsverfahren

Je nach Rechenleistung des verwendeten Computers und Anzahl gemessener Werte von U_{AC} benötigt 'dna.pl' für eine komplette Auswertung aller Messwerte etwa ein bis zwei Minuten. Eine manuell ausgeführte Auswertung durch Abzählen der Fallenaufenthaltszeit (Kapitel 3.2.2) benötigt pro Wert von U_{AC} etwa 15 bis 20 Minuten, sodass man für eine Messreihe mit 10 Messwerten 2,5 Stunden benötigt. Die vorgestellte Automatisierung kann den Arbeitsprozess der Auswertung also bis zu 150-fach beschleunigen. Zudem ist dieses Verfahren statistisch sicherer, weil die unbewusste Bevorzugung bestimmter Moleküle beim manuellen Auszählen unterbunden wird. Zum Vergleich der Verfahren zeigt Abbildung 23 den Plot U_{AC} vs. $\ln \tau$

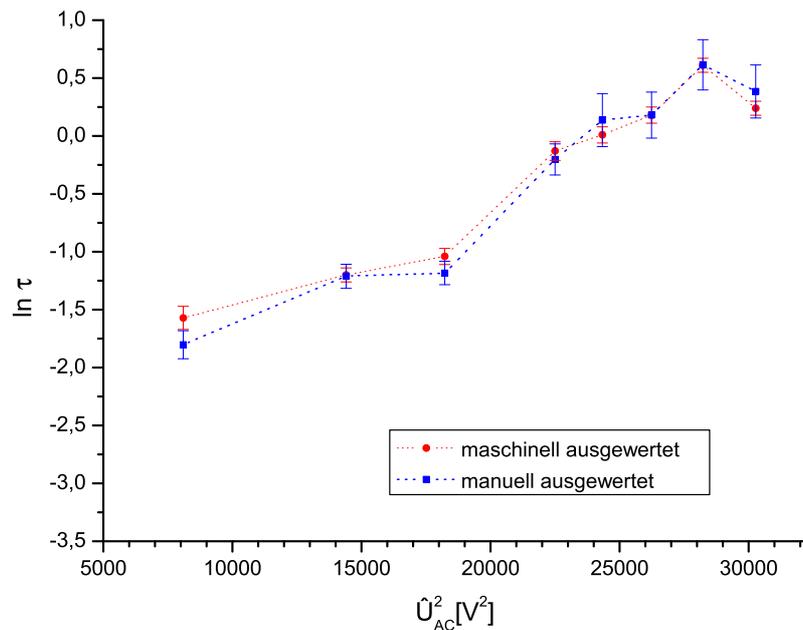


Abbildung 23: Vergleich der Verfahren zur Ermittlung der durchschnittlichen Fallenaufenthaltszeit τ für verschiedene Werte von U_{AC} .

für λ -DNA ohne Natriumchlorid-Zugabe. Die Werte für τ wurden im Falle der blauen Linie manuell ermittelt und im Falle der roten Linie mit Hilfe des vorgestellten Skriptes. Manuell ergibt sich daraus eine Polarisierbarkeit von $3,08 \pm 0,14 \cdot 10^{-29} \text{Fm}^2$, wohingegen die maschinelle Auswertung auf das Ergebnis von $2,81 \pm 0,66 \cdot 10^{-29} \text{Fm}^2$ führt. Grundsätzlich ist keine

systematische Abweichung der Werte im Diagramm zu erkennen. Die Differenz im Ergebnis ist im Vergleich zu den Abweichungen, beispielsweise aufgrund der Exemplarstreuungen der Chips vernachlässigbar. Zudem umfasst die maschinell erzeugte Statistik die Fallenaufenthaltszeiten *sämtlicher* beteiligter Moleküle. Bei den benutzten Konzentrationen sind dies ca. 2000 pro Injektion statt 30 wie beim manuellen Auszählen. Das neue Verfahren zeichnet sich also insbesondere durch eine umfangreichere Statistik und erheblich verbesserten Benutzerkomfort aus.

4.3 Abhängigkeit der Polarisierbarkeit von der Ionenstärke des Puffers

Das in Kapitel 3.2 beschriebene Verfahren wurde angewendet, um für verschiedene Ionenstärken I die Polarisierbarkeit α zu bestimmen. Dies geschah anhand von zwei verschiedenen DNA Längen (12.000 und 48.500 Basenpaare) um eine mögliche Längenabhängigkeit der Ergebnisse zu untersuchen (Tabelle 2). Die angegebenen Fehlerintervalle folgen aus der Statistik der automatisierten Auswertung (Kapitel 3.2). Eine wesentliche Beobachtung ist, dass die Polari-

12kbp-DNA		λ -DNA	
I [10^{-2}]	α [10^{-29}Fm^2]	I [10^{-2}]	α [10^{-29}Fm^2]
0,48	$5,13 \pm 0,15$	1,13	$3,44 \pm 0,54$
0,74	$3,11 \pm 0,11$	2,13	$2,10 \pm 0,83$
0,99	$3,30 \pm 0,13$	4,13	$2,19 \pm 0,03$
1,48	$4,64 \pm 1,59$	5,13	$1,73 \pm 0,08$
2,21	$2,65 \pm 0,17$		
3,73	$1,79 \pm 0,07$		
4,74	$1,76 \pm 0,11$		

Tabelle 2: Ermittelte Polarisierbarkeiten α für 12kbp- und λ -DNA für verschiedene Ionenstärken I im Vergleich.

Das übermäßig große Fehlerintervall für $I = 1,48 \cdot 10^{-2}$ in der linken Tabelle ist auf Probleme beim Injektionsprozess zurück zu führen.

sierbarkeit mit zunehmender Ionenstärke abnimmt (Abbildungen 24 und 25). Dieses Verhalten kann anhand folgender Überlegungen plausibel gemacht werden.

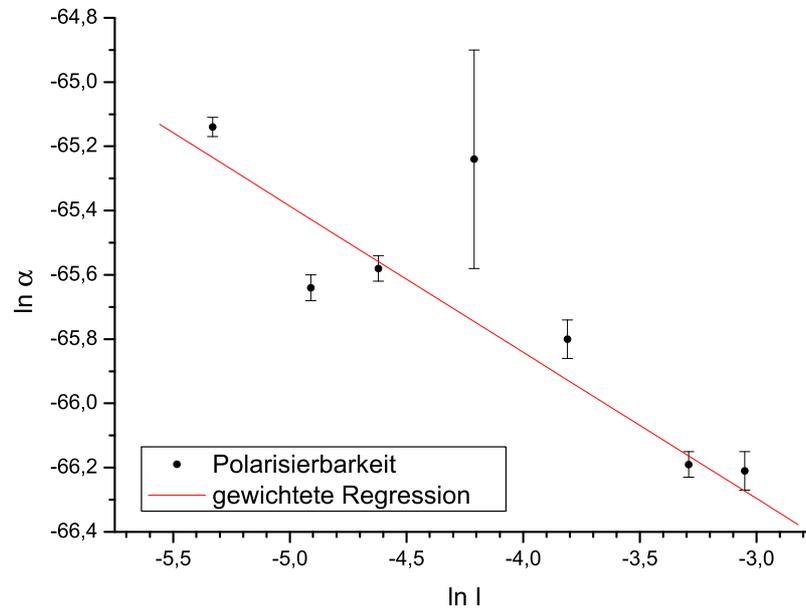


Abbildung 24: Abhängigkeit der Polarisierbarkeit von der Ionenstärke des Puffers für DNA-Stränge der Länge 12 kBp. Die Steigung der Regressionsgerade beträgt $m_{12\text{kBp}} = -0,46 \pm 0,02$.

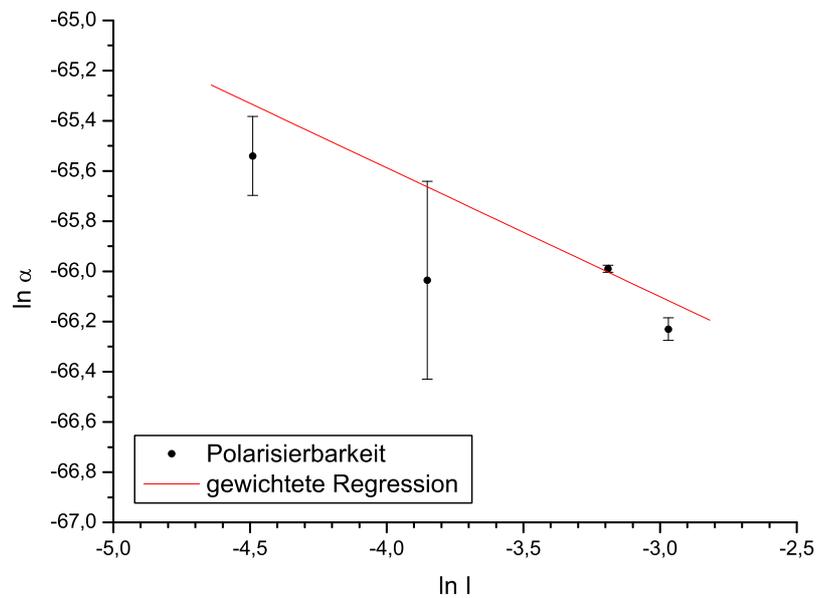


Abbildung 25: Abhängigkeit der Polarisierbarkeit von der Ionenstärke des Puffers für λ -DNA-Stränge. Die Steigung der Regressionsgerade beträgt $m_{\lambda} = -0,51 \pm 0,1$.

Eine ionenstärkenabhängige Größe, welche mit der Polarisierbarkeit zusammen hängen könnte ist die Debye-Länge aus Gleichung (6). Für die Relation zwischen der Ionenstärke und der Debye-Länge gilt

$$\lambda_D \propto \frac{1}{\sqrt{I}}$$

Postuliert man, dass die Polarisierbarkeit proportional zur Debye-Länge ist, ergibt sich daraus folgende Relation:

$$\begin{aligned} \alpha &\propto \lambda_D \propto \frac{1}{\sqrt{I}} \\ \Rightarrow \ln \alpha &= -\frac{1}{2} \ln I \end{aligned}$$

Indem man den Zusammenhang wie in den Abbildungen 24 und 25 doppelt logarithmiert darstellt, kann man aus der Steigung der linearen Regression den Exponenten dieses Zusammenhanges ermitteln. Theoretisch sollten diese Steigungen folglich $m_{\text{theo}} = -0,5$ betragen. Die Behauptung stimmt mit den gemessenen Werten gut überein. Im Falle der 12kBp-DNA ergibt sich eine Steigung von $m_{12\text{kBp}} = -0,46 \pm 0,02$ und im Falle der λ -DNA $m_\lambda = -0,51 \pm 0,1$. Das Fehlerintervall der Endergebnisse ist durch Ermittlung der mit $\frac{1}{\sigma^2}$ gewichteten linearen Regression entstanden. Die theoretischen Werte liegen im Falle der 12kBp-DNA im 2σ -Intervall und im Falle der λ -DNA im 1σ -Intervall der jeweiligen experimentellen Ergebnisse.

Die vorliegenden Daten sind konsistent mit der Behauptung, dass die Polarisierbarkeit der studierten linearen DNA-Moleküle in wässriger Lösung unter Erhöhung der Ionenstärke proportional zur Debye-Länge skaliert. Dieser Effekt kann gut ausgenutzt werden, um Trennungsvorgänge auf Basis von dielektrophoretischen Fallen zu optimieren. Indem die Ionenkonzentration im DNA-Puffer gezielt abgesenkt wird, kann die Polarisierbarkeit der Moleküle verbessert werden. Dies führt zu längeren Fallenaufenthaltszeiten und somit zu einer verbesserten Ortsauflösung der dielektrophoretischen Trennungsexperimente.

4.4 Abhängigkeit der Polarisierbarkeit von der YOYO-Konzentration

Weiterhin wurde die Abhängigkeit der Polarisierbarkeit von linearer 12kbp-DNA von der Interkalatorkonzentration (YOYO-1) untersucht (Tabelle 3). Diese Daten sind in Abbildung 26

Basenpaare pro YOYO	α [10^{-29}Fm^2]
1	$1,76 \pm 0,03$
5	$1,81 \pm 0,04$
12,5	$1,46 \pm 0,04$
15	$0,59 \pm 0,02$
17,5	$0,77 \pm 0,05$
20	$0,85 \pm 0,03$
22,5	$1,1 \pm 0,32$
25	$2,22 \pm 0,07$
30	$2,45 \pm 0,06$

Tabelle 3: Ermittelte Polarisierbarkeiten α für 12kbp-DNA für verschiedene YOYO-Konzentrationen.

grafisch dargestellt. Die angegebenen Fehlerintervalle stammen aus der während der Auswertung aufgestellten Statistik. Auffällig ist das Minimum des Plots bei etwa 15 Basenpaare pro YOYO-Molekül. Dieses Minimum ist jedoch im Vergleich zu den Abweichungen, die aufgrund der Exemplarstreuung der Chips auftreten, sehr flach. Man könnte daher annehmen, dass die Interkalation von YOYO keinen Einfluss auf die Polarisierbarkeit hat.

Allerdings konnte durch weitere Messungen in diesem Bereich das Minimum klar bestätigt werden. Daher sei die folgende spekulative Erklärung für das Minimum formuliert.

Hypothese zum Polarisationsminimum

In Abbildung 26 ist zu erkennen, dass der Plot, welcher die YOYO-Konzentration der Polarisierbarkeit gegenüberstellt, ein Minimum bei etwa 15 Basenpaaren pro YOYO aufweist. Dies lässt darauf schließen, dass dort der dominante Polarisationsprozess wechselt.

Beispielsweise fanden Larsson et al. mit Hilfe von optischer Spektroskopie Hinweise darauf,

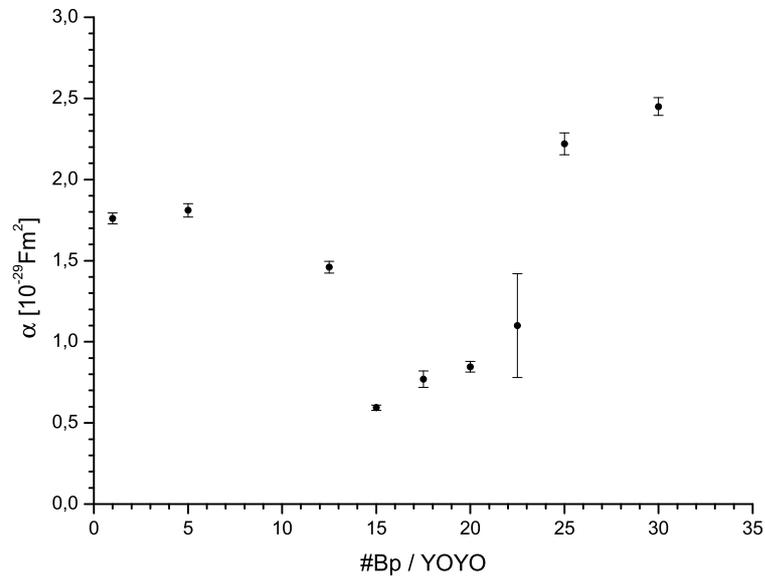


Abbildung 26: Abhängigkeit der Polarisierbarkeit von der YOYO-Konzentration in der Pufferlösung für 12kbp-DNA-Stränge.

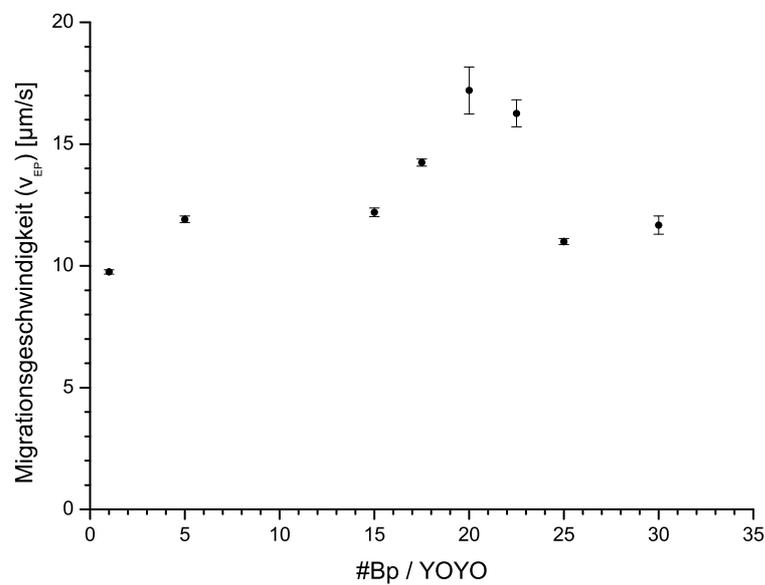


Abbildung 27: Abhängigkeit der elektrophoretischen Geschwindigkeit mit $U_{AC} = 0$ von der YOYO-Konzentration für 12kbp-DNA-Stränge. Der Wert bei 12,5 Basenpaare pro YOYO wurde wegen unverhältnismäßig großer Standardabweichung verworfen.

dass der Anlagerungsmechanismus von YOYO an die DNA bei ca. 8 Basenpaare pro YOYO wechselt [39]. Für niedrigere YOYO-Konzentrationen bisinterkaliert es stets, wobei die beiden Monomere des Moleküls in unterschiedliche Bindungstaschen der DNA eindringen. Für größere Konzentrationen wurde in deren Studie vermehrte Anlagerung von YOYO an das Molekül (Groove Binding) vermutet.

Nun kann im Diagramm rechtsseitig des Minimums der Abfall der Polarisierbarkeit mit steigender YOYO-Konzentration auf zwei Weisen erklärt werden.

Da es sich um einen Gleichgewichtsprozess handelt, nimmt mit steigender Interkalatorkonzentration einerseits auch die Zahl der interkalierten YOYO-Moleküle zu. Dadurch wird die Nettoladung des DNA-Moleküls mehr und mehr ausgeglichen, was auch das langsame Abfallen der elektrophoretischen Geschwindigkeit in der entsprechenden Region in Abbildung 27 erklärt. Die abnehmende Oberflächenladung der DNA-Moleküle hat zwar keine Auswirkungen auf deren Debye-Länge, aber es werden zunehmend weniger Ionen aus der Lösung benötigt, um das Potential des DNA-Moleküls abzuschirmen. Dadurch wird es schlechter polarisierbar.

Als zweite Erklärungsmöglichkeit wächst andererseits mit zunehmender Interkalatorkonzentration auch die Anzahl der YOYO-Moleküle, welche sich frei im Puffer aufhalten und nicht interkalieren. Damit wird die Ionenstärke der Flüssigkeit erhöht und folglich sinkt die Debye-Länge und somit auch die Polarisierbarkeit. Bei einer DNA-Konzentration von 50 pMol/l und im Falle einer 1:8 Mischung mit YOYO befinden sich 75 nMol/l YOYO im System. Laut [39] liegt die Bindungskonstante für YOYO für diesen Konzentrationsbereich etwa bei 10^{10} mol^{-1} . Folglich befinden sich nur $\frac{1}{10^{10}}$ der zugegebenen YOYO-Moleküle in freier Lösung. Daher liegen nur noch $7,5 \cdot 10^{-18} \text{ Mol/l}$ YOYO ungebunden vor. Im Vergleich zu einer Flüssigkeit ohne YOYO erhöhen diese freien Moleküle ihre Ionenstärke nur noch um $\Delta I = 6 \cdot 10^{-17}$. Dieser Effekt ist folglich bei weitem nicht so signifikant wie bei den Natriumchlorid-Experimenten mit 12kbp-DNA, da dort die Anzahl der Na^+ - und der Cl^- -Ionen wesentlich größer ist. Angesichts der nur minimal zunehmenden Ionenstärke scheint der zuerst beschriebene Effekt der dominanteren in der Region rechtsseitig des Minimums zu sein.

Linksseitig des Minimums im Diagramm könnte allerdings auch ein alternativer Bindungsmechanismus zu [39] auftreten. Falls das DNA-Molekül bereits deutlich mit YOYO versetzt

ist, könnten einzelne Interkalatormoleküle damit beginnen, nur noch Monointerkalation zu zeigen. Ursache hierfür könnte beispielsweise eine bereits belegte Nachbarbindungsstelle sein oder die Abstoßung der vierfach geladenen YOYO-Moleküle untereinander. Dies würde dazu führen, dass positive Ladungen mit dem netto nur noch schwach geladenen Strang fest assoziiert werden, da sie über das Rückgrat des YOYO-Dimers fest mit der DNA verbunden sind. Wie die folgende Abschätzung zeigen wird, sind am Polarisationsprozess eines 12kbp-DNA-Stranges nur etwa 10 negative Ladungen effektiv beteiligt. Somit könnte eine kleine Menge dieser monointerkalierten YOYO-Moleküle hier schon für einen merklichen Effekt sorgen und die Polarisierbarkeit für wachsende YOYO-Konzentrationen steigen lassen.

Die Anzahl effektiv beitragender Ladungen kann nun wie folgt ermittelt werden. Allgemein gilt für ein Dipolmoment betragsmäßig

$$d = q \cdot l .$$

Dabei ist q die Ladung im System und l ihr Abstand. Andererseits gilt aber auch

$$d = \alpha E$$

Diese Gleichungen werden gleichgesetzt und nach q aufgelöst.

$$q = \frac{\alpha E}{l} \tag{39}$$

Für l kann der hydrodynamische Radius des 12kbp-Moleküls, welcher von Regtmeier et. al gemessen wurde (unpubliziert), benutzt werden:

$$l = 2R_H = 0,32\mu m$$

Bei einer Spannung von $U_{AC} = 100V$ resultiert folgendes elektrisches Feld in der Falle [8]:

$$E_{\text{trap}} = 210 \cdot U_{AC}$$

Daraus resultiert eine effektive polarisierte Ladung von

$$q = 1,64 \cdot 10^{-18}C \approx 10 \cdot e^- . \quad (40)$$

Somit ist plausibel, dass nur sehr wenige monointerkalierte YOYO-Moleküle nötig sind, um die Polarisierbarkeit merklich zu verändern. Pro Molekül werden zwei Ladungen in die Bilanz eingebracht, welche jedoch nicht vollständig den Polarisationsprozess beeinflussen können, da sie immer noch durch das Verbindungsstück der YOYO-Monomere in Bezug zur DNA lokalisiert sind.

Insgesamt ist die Korrelation zwischen Änderungen der Polarisierbarkeit und der Zugabe von YOYO spürbar, wenn man diese Daten mit denen aus den Ionenmessungen vergleicht. Da die YOYO-Konzentration jedoch direkte Auswirkungen auf die Qualität der Bildgebung hat, ist diese Möglichkeit der Manipulation der Polarisierbarkeiten von DNA ungeeigneter als im Fall von verschiedenen Natriumchloridkonzentrationen. Es ist also sinnvoller die YOYO-Konzentration nach optischen Gesichtspunkten zu wählen, um ein optimales Ergebnis bei der Fluoreszenzmikroskopie zu erhalten.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Mit Hilfe eines Mikrofluid-Chips, welcher elektrodenlose dielektrophoretische Fallen erzeugen kann, wurden lineare 12kbp- und λ -DNA-Moleküle hinsichtlich der Zusammenhänge zwischen Ionenstärke der Pufferlösung und der Polarisierbarkeit α der DNA untersucht. Der erste experimentelle Befund zeigt, dass die Polarisierbarkeit α unter Erhöhung der Ionenstärke der Pufferlösung sinkt. Die Ergebnisse sind außerdem konsistent mit der Behauptung, dass α linear mit der Debye-Länge λ_D bezüglich der Oberfläche der Moleküle skaliert.

$$\alpha \propto \lambda_D$$

Im zweiten Teil der Arbeit wurde diese Untersuchung mit variabler Konzentration von YOYO, einem interkalierende Fluoreszenzfarbstoff, durchgeführt. Der Zusammenhang zwischen dieser Konzentration und der Polarisierbarkeit war durch ein Minimum bei ca. 15 Basenpaaren pro YOYO-Molekül charakterisiert, was auf einen Wechsel des dominanten Polarisationsmechanismus hindeutet. In der Diskussion hierzu wurde eine Hypothese für dieses Verhalten aufgestellt.

Die Manipulation der Ionenstärken der Pufferlösungen, in denen sich die DNA während der Untersuchung befindet, durch Zugabe von Natriumchlorid hat einen wesentlich größeren Einfluss auf ihre Polarisierbarkeit als die Änderung der YOYO-Konzentration, wenn man bedenkt, dass diese prozentual gesehen erheblich stärker verändert wurde, als die des Natriumchlorids.

Die Auswertung der gewonnenen Videodaten wurde mit einem neuen automatisierten Verfahren durchgeführt. Dieses zeichnet sich im Vergleich zu der bereits etablierten manuellen Vorgehensweise durch die Erfassung sämtlicher beteiligter Moleküle und extrem schnelle Auswertung aus.

Weitere Studien zu diesem Thema könnten vorwiegend drei Aspekte untersuchen. Zunächst sollte der gefundene lineare Zusammenhang zwischen Polarisierbarkeit und Debye-Länge für weitere DNA-Größen untersucht werden, um zu zeigen, dass er entsprechend skalierbar ist.

Zweitens sollten nach der Untersuchung von linearen Strängen auch andere Konformationen wie Plasmide oder covalently-closed-circular-DNA (ccc-DNA) untersucht werden. Es ist anzu-

nehmen, dass die gefundene lineare Gesetzmäßigkeit aufgrund der komplexen Geometrie dieser DNA-Formen nicht mehr gültig ist.

Um die erläuterte Hypothese bezüglich der YOYO-Konzentration zu festigen bzw. zu verbessern, wäre eine Messung mit dem YOYO Monomer YO denkbar. Es ist anzunehmen, dass der Anstieg linksseitig des Minimums in Abbildung 26 dann nicht mehr auftritt, weil YO nur monointerkalieren kann.

Die benutzte Technik zur Polarisationsmessung eröffnet aber auch viele weitere Möglichkeiten der Anwendung. So ist es denkbar, weitere Molekülspezies hinsichtlich ihrer Polarisierbarkeitsmechanismen zu untersuchen. Insbesondere große biologische Makromoleküle zeigen hier ein noch nicht vollständig verstandenes Verhalten.

Auch die Manipulation von nicht-biologischen Molekülen wie Kohlenstoff-Nano-Röhren in solchen Mikrofluidik-Chips ist denkbar. So haben beispielsweise Krupke et al. mit Hilfe von Nanoelektroden solche Moleküle nach ihrer Leitfähigkeit sortiert [21]. Diese Trennung wäre in dem hier untersuchten System ebenfalls denkbar.

Literaturverzeichnis

- [1] TEGENFELDT, J.O. ; PRINZ, C. ; CAO, H. ; HUANG, R.L. ; AUSTIN, R.H. ; CHOU, S.Y. ; COX, E.C. ; STURM, J.C.: Micro- and nanofluidics for DNA analysis. In: *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004), S. 1678–1692
- [2] CALLADINE, C.R. ; DREW, H. R. ; LUISI, B. F. ; TRAVERS, A.A. ; WISSMANN, Jorunn (Hrsg.): *DNA - Das Molekül und seine Funktionsweise*. Heidelberg u.A. : Elsevier, 2006
- [3] HAN, J. ; CRAIGHEAD, H.G.: Separation of Long DNA Molecules in a Microfabricated Entropic Trap Array. In: *Science* 288 (2000), S. 1026–1029
- [4] AJDARI, A. ; PROST, J.: Free-flow electrophoresis with trapping by a transverse inhomogenous field. In: *Biophysics* 88 (1991), S. 4468–4471
- [5] BAKAJIN, O. ; DUKE, T.A.J ; TEGENFELD, J.O. ; CHOU, C.-F. ; CHAN, S.S. ; AUSTIN, R.H. ; COX, E.C.: Separation of 100-Kilobase DNA Molecules in 10 Seconds. In: *Anal. Chem.* 73 (2001), S. 6053–6056
- [6] CHOU, C.-F. ; BAKAJIN, O. ; TURNER, S.W.P. ; DUKE, T.A.J ; CHAN, S.S. ; COX, E.C. ; CRAIGHEAD, H.G. ; AUSTIN, R.H.: Sorting by diffusion: An asymmetric obstacle course for continuous molecular separation. In: *PNAS* 96 (1999), S. 13762–13765
- [7] MINC, N. ; FÜTTERER, C. ; GOSSE, C. ; DORFMAN, K.D. ; VIOVY, J.-L.: Fast separation of long dna in a microchip. In: *Micro Total Analysis Systems, Proceedings of μ TAS 2003* (2003), S. 1311–1314
- [8] REGTMEIER, J. ; DUONG, T.T. ; EICHHORN, R. ; ANSELMETTI, D. ; ROS, A.: Dielectrophoretic manipulation of DNA: Separation and polarizability. In: *Anal. Chem.* 79 (2007), S. 3925–3932
- [9] PARK, P.J. ; SUNG, W.: Dynamics of a polymer surmounting a potential barrier: The Kramers problem for polymers. In: *Journal of chemical physics* 111 (1999), S. 5259–5266

- [10] CHOU, C.-F. ; TEGENFELDT, J.O. ; BAKAJIN, O. ; CHAN, S.S. ; COX, E.C. ; DARTON, N. ; DUKE, T.A.J ; AUSTIN, R.H.: Electrodeless Dielectrophoresis of Single- and Double-Stranded DNA. In: *Biophysical Journal* 83 (2002), S. 2170–2179
- [11] REGTMEIER, J. ; DUONG, T.T. ; ROS, A. ; ANSELMETTI, D.: Fast separation of λ - and T2-DNA with electrodeless dielectrophoresis. In: *Micro Total Analysis Systems, Proceedings of μ TAS 2006* Vol. 1 (2006), S. 648–650
- [12] PETERSEN, E. ; LI, B. ; FANG, X. ; LUO, H. ; SAMUILOV, V. ; GERSAPPE, D. ; SOKOLOV, J. ; CHU, B. ; RAFAILOVICH, M.: DNA Migration and Separation on Surfaces with a Microscale Dielectrophoretic Trap Array. In: *Physical Review Letters* 98 (2007), S. 088102–1–4
- [13] WASHIZU, H. ; KIKUSHI, K.: Electric Polarizability of DNA in Aqueous Salt Solution. In: *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006), Nr. 6, S. 2855–2861
- [14] WASHIZU, H. ; KIKUSHI, K.: Electrical Polarizability of Polyelectrolytes in Salt-free Aqueous Solution. In: *J. Phys. Chem. B.* 106 (2006), Nr. 43, S. 1089–5647
- [15] BREUER, K. S. (Hrsg.): *Micro- and Nano-Scale Diagnostic Techniques*. New York : Springer, 2003
- [16] TABELING, P.: *Introduction to Microfluidics*. Oxford : Oxford University Press, 2005
- [17] STÖCKER, H.: *Taschenbuch der Physik*. 5. Auflage. Frankfurt am Main : Verlag Harri Deutsch, 2007
- [18] SINTON, D. ; LEN, L. ; LI, D.: Visualization and numerical modelling of microfluidic on-chip injection processes. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 260 (2003), S. 431–439
- [19] REGTMEIER, J.: *Alternativer Migrationsmechanismus in Mikrofluidiksystemen: Absolut negative Mobilität*. Bielefeld, Universität Bielefeld, Diplomarbeit, Februar 2005
- [20] PROBSTEIN, R.F.: *Physicochemical Hydrodynamics*. 2. Auflage. Hoboken : Wiley, 2003

-
- [21] KRUPKE, R. ; HENNRICH, F. ; LÖHNEUSEN, H. v. ; KAPPES, M.M.: Separation of Metallic from Semiconducting Single-Walled Carbon Nanotubes. In: *Science* 301 (2003), S. 344–347
- [22] BRONSTEIN, I.N. ; SEMENDJAJEW, K.A. ; MUSIOL, G.: *Taschenbuch der Mathematik*. 6. Auflage. Verlag Harri Deutsch, 2005
- [23] REIMANN, P.: Brownian motors: Noisy transport far from equilibrium. In: *Physics Reports* 361 (2002), S. 57–265
- [24] EICHHORN, R. ; P.REIMANN ; CLEUREN, B. ; BROECK, C. van d.: Moving Backward Noisily. In: *Chaos* 15 (2005), S. 026133
- [25] KRAMERS, H.A.: Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. In: *Physica VII* 7 (1940), Nr. 4, S. 284–304
- [26] HÄNGGI, P. ; TALKNER, P. ; BORKOVEC, M.: Reaction-rate theory: fifty years after Kramers. In: *Reviews of Modern Physics* 62 (1990), April, Nr. 2, S. 251–341
- [27] REIMANN, P. ; SCHMID, G.J. ; HÄNGGI, P.: Universal equivalence of mean first-passage time and Kramers Rate. In: *Physical Review E* 60 (1999)
- [28] COLLINS, F.S. ; GREEN, E.D. ; GUTTMACHER, A.E. ; GUYER, M.S.: A Vision for the future of genomics research. In: *Nature* 422 (2003), S. 1–13
- [29] MÜLLER-ESTERL, W.: *Biochemie*. Elsevier, 2004
- [30] WATSON, J.D. ; CRICK, F.H.: Molecular structure of nucleic acids. In: *Nature* 171 (1953), Nr. 4356, S. 737–738
- [31] STRYER, L.: *Biochemie*. 4. Auflage. Heidelberg u.A. : Spektrum, 1999
- [32] In: IHMELS, H. ; OTTO, D.: *Topics in Current Chemistry*. Bd. 258: *Intercalation of Organic Dye Molecules into Double-Stranded DNA - General Principles and Recent Developments*. Springer, 2005, S. 161–204

- [33] WING, R. ; DREW, H. ; TAKANO, T. ; BROKA, C. ; TANAKA, S. ; ITAKURA, K. ; DICKERSON, R.E.: Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. In: *Nature* 287 (1980), S. 775–778
- [34] OLIVERA, B.M. ; BAINE, P. ; DAVIDSON, N.: Electrophoresis of the nucleic acids. In: *Biopolymers* 2 (1964), S. 245–257
- [35] HERMANS, J. J.: Sedimentation and Electrophoresis of Porous Spheres. In: *Journal of Polymer Science* 18 (1955), S. 527–534
- [36] SCHLEEF, M. (Hrsg.): *DNA pharmaceuticals : formulation and delivery in gene therapy, DNA vaccination and immunotherapy*. Weinheim : WILEY-VCH, 2005
- [37] RYE, H.S. ; YUE, S. ; WEMMER, D. E. ; QUESADA, M. A. ; HAUGLAND, R. P. ; MATHIES, R. A. ; GLAZER, A.N.: Stable Fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications. In: *Nucleic Acids Research* 20 (1992), Nr. 11, S. 2803–2812
- [38] GURRIERI, S. ; WELLS, K. S. ; JOHNSON, I.D. ; BUSTAMANTE, C.: Direct Visualization of Individual DNA Molecules by Fluorescence Microscopy: Characterization of the Factors Affecting Signal/Background and Optimization of Imaging Conditions Using YOYO. In: *Anal. Biochem.* 249 (1997), S. 44–53
- [39] LARSSON, A. ; CARLSSON, C. ; JONSSON, M. ; ALBINSSON, B.: Characterization of the Binding of the Fluorescent Dyes YO and YOYO to DNA by Polarized Light Spectroscopy. In: *J. Am. Chem. Soc* 116 (1994), S. 8459–8465
- [40] AEBI, U. ; POLLARD, T. D.: A Glow discharge Unit to Render Electron Microscope Grids and Other Surfaces Hydrophilic. In: *Journal of Electron Microscope Technique* 7 (1987), S. 29–33
- [41] JACOBSON, S.C. ; HERGENRÖDER, R. ; KOUTNY, L.B. ; R.J.WARMACK ; RAMSEY, J.M.: Effects of Injection Schemes and Column Geometry on the Performance of Microchip Electrophoresis Devices. In: *Anal. Chem.* 66 (1994), S. 1107–1113

-
- [42] EICHHORN, R.: *Particle Distribution after passing N traps where $k_B T \ll \Delta W$* . Dezember 2006, unpublished
- [43] RASBAND, W.S.: *ImageJ*. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2005.
- [44] ADAM, G. ; HITTMAIR, O.: *Wärmetheorie*. 2. Auflage. Braunschweig : Vieweg, 1978
- [45] ANTOSIEWICZ, J. ; PORSCHKE, D.: An unusual electrooptical effect observed for DNA fragments and its apparent relation to a permanent electric moment associated with bent DNA. In: *Biophysical Chemistry* 33 (1989), S. 19–30
- [46] BANHOLCZER, A. ; PYELL, U.: Some considerations concerning the composition of the mobile phase in capillary electrochromatography. In: *Journal of Chromatography A* 869 (2000), S. 363–374
- [47] DANG, F. ; LI, W. ; ZHANG, L. ; JABASINI, M. ; ISHIDA, T. ; KIWADA, H. ; KAJI, N. ; TOKESHI, M. ; BABA, Y.: Electrophoretic behavior of plasmid DNA in the presence of various intercalating dyes. In: *Journal of Chromatography A* 1118 (2006), S. 218–225
- [48] DEWARRAT, F. ; CALAME, M. ; SCHÖNENBERGER, C.: Orientation and Positioning of DNA Molecules with an Electric Field Technique. In: *Single Molecules* 3 (2002), S. 189–193
- [49] DUONG, T.T.: *Neue Migrations- und Separationsmechanismen in strukturierten Mikrofluidik-Systemen*. Bielefeld, Universität Bielefeld, Dissertation, 2006
- [50] GASCOYNE, P.R. ; VYKOUKAL, J.: Particle separation by dielectrophoresis. In: *Electrophoresis* 23 (2002), S. 1973–1983
- [51] HELLMICH, W.: *Einzelzellanalytik in Mikrofluidik-Systemen*. Bielefeld, Universität Bielefeld, Dissertation, Juni 2006
- [52] HIDA, T.: *Brownian Motion*. Berlin : Springer-Verlag, 1980
- [53] KRENN, H.: *Physik 2. Vorlesungsscript*, 2007

- [54] NGUYEN, N.-T. ; WERELEY, S.T.: *Fundamentals and applications of microfluidics*. Bd. 1. Norwood : Artech House inc., 2002
- [55] PAPULA, L.: *Mathematische Formelsammlung für Ingenieure und Naturwissenschaftler*. 8. Auflage. Wiesbaden : Vieweg, 2003
- [56] PORSCHKE, D.: Macrodipoles - Unusual electric properties of biological macromolecules. In: *Biophysical Chemistry* 66 (1997), S. 241–257
- [57] PROCK, A. ; MCCONKEY, G.: *Topics in chemical physics*. New York : Elsevier, 1962
- [58] RAU, D.C. ; CHARNEY, E.: Electric dichroism of DNA - Influence of the ionic environment on the electric polarizability. In: *Biophysical Chemistry* 17 (1983), S. 35–50
- [59] RAU, D. C. ; CHARNEY, E.: Polarization of the ion atmosphere of a charged cylinder. In: *Biophysical Chemistry* 14 (1981), S. 1–9
- [60] SCHWARTZ, R.L. ; PHOENIX, T.: *Einführung in Perl*. 3. Auflage. Beijing [u.a.] : O'Reilly, 2003
- [61] VOGEL, H.: *Gerthsen Physik*. 20. Auflage. Berlin : Springer, 2000
- [62] FREIFELDER, D. (Hrsg.): *The DNA Molecule - Structure and properties*. San Francisco : W. H. Freeman and Company, 1978

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen meiner ersten wissenschaftlichen Arbeit beigetragen haben. Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe „Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften“ und die großzügige Bereitstellung der nötigen Gelder und Materialien für meine Arbeit danken. Zudem ermöglichte er mir, das „EuroNanoforum 2007“ kostenfrei zu besuchen und dort das erste Mal mit den „Großen“ der Branche in Kontakt treten zu können.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Frau PD Dr. Alexandra Ros für die vielen Stunden wertvoller Diskussion und die Bereitschaft, meine Arbeit noch neben ihrem Habilitationsvorhaben zu begutachten, bedanken. Ihre Anregungen, besonders auch Aspekte der Chemie näher zu untersuchen, waren wesentlich für den Erfolg dieser Arbeit. Zudem stammten ebenfalls Gelder für die Ausführung der Experimente aus ihrem Etat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dipl. Phys. Jan Regtmeier. Er war es, der mich für dieses faszinierende Arbeitsgebiet der Mikrofluidik gewinnen konnte und meine Arbeit maßgeblich überwacht hat. Unter seiner Anleitung erlernte ich die nötigen Experimentiertechniken im Labor. Da wir thematisch sehr eng miteinander zusammen gearbeitet haben, ergaben sich oft wertvolle Diskussionen. Auch für seine Anregungen bezüglich meines Präsentationsvortrages und die Korrektur meines ersten Manuskriptes bin ich ihm sehr dankbar.

Herr Dr. Ralf Eichhorn hat wichtige theoretische Vorarbeiten für dieses Projekt geleistet und das zweite Gutachten geschrieben. Die häufigen Diskussionen mit ihm und Jan waren sehr interessant und lehrreich.

Ich möchte mich außerdem bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für das freundliche und unkomplizierte Arbeitsklima und die Offenheit miteinander bedanken. Es hat mir großen Spaß gemacht, mit Euch zusammen zu arbeiten.

Meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Dietrich Bödeker möchte ich ganz herzlich für seine persönliche Betreuung meines bisherigen Studiums und die zahlreichen Symposia mit einigen Kommilitonen danken. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Ditmar Kiel und Herrn Ralph Prüssmeier,

meinen Physiklehrern für die solide Ausbildung, die sie mir haben zukommen lassen, bedanken.

Schließlich gilt ein ganz besonderer Dank meinen Eltern Marion und Nikola Bogunovic. Sie waren es, die mir im Alter von sechs Jahren meinen ersten Elektronikbaukasten geschenkt haben und somit mein Interesse an der Naturwissenschaft geweckt haben. Sie haben mich seit dem konsequent in meinem Interessenschwerpunkt unterstützt und mir nun das Studium der Physik ermöglicht. Dafür bin ich ihnen zutiefst dankbar.

A Quellcodes der Auswertungsanwendungen

A.1 Hauptscript: „dna.pl“

Instruktionsprache: Perl

```
001  #! /usr/bin/perl -w
002  #bootstrap.c and most of dna.pl by Lukas Bogunovic, Bielefeld University
003
004  #####
005  #Konfigurationsparameter für die lokale Umgebung
006  #
007  #IJ Pfad?
008  #${ijpath} soll auf den Pfad zeigen, indem die IMAGEJ-Installation liegt.
009  #Dies ist normalerweise etwas wie "/home/user/imagej".
010  $ijpath="/home/lukas/ep-auswertung";
011  #####
012
013  print "\n\nScript zur Auswertung von DNA-Migrationsdaten.\n";
014  print "Dieses Script geht davon aus, dass sämtliche Messpunkte\n
015  in je einem Ordner in einem Mutterpfad liegen. Jetzt Mutterpfad eingeben:\n\n";
016  print "\t >>";
017  $mutterpfad = <STDIN>;
018  chomp ($mutterpfad);
019  @verzeichnis = &getDirEntry($mutterpfad);
020  $len=@verzeichnis; #Messung der Länge der Liste.
021  chdir ($mutterpfad);
022  print "Es wurden $len Datenpunkte (Verzeichnisse) gefunden.\n\n";
023  print "-----\n";
024
025  for ($i=1;$i<=$len;$i++)
026  {
027    $name=shift(@verzeichnis);
028    chomp ($name);
029    $path= $mutterpfad."/".$name;
030    chdir ($path);
031    $macro= $path.'/ep-macro.txt';
032
033    $ijmacro="run(\"Clear Results\");
034        dir = \"$path.\"
035        list = getFileList(dir);
036        run(\"Image Sequence...\", \"open=\"$path./img_0001.TIF number=1000
037        starting=1 increment=1 scale=100 file=\");
038        makeRectangle(72, 1, 13, 125);
039        run(\"Set Measurements...\", \" mean redirect=None decimal=6\");
```

```

040         for (i=0; i<list.length; i++)
041         {
042             run("\Measure\");
043             run("\Next Slice [>]\");
044         }
045         run("\Input/Output...\", \"jpeg=75 file=.dat\");
046         saveAs("\Measurements\", \"\".$path.\".dat\");
047         close();
048         run("\Window Closer\");
049         run("\Quit\");";
050
051     &writeFile($ijmacro,$macro);
052     chdir ($ijpath);
053     system("./jre/bin/java -mx256m -cp ij.jar ij.ImageJ $path/ep-macro.txt");
054     system("more +2 $path.dat > $path.dat.temp");
055     $ergebnis='bootstrap $path.dat.temp';
056     print ("\n\nGewichteter Mittelwert betragt: \n\n$ergebnis\n\n");
057     @results[$i]=$ergebnis;
058 }
059
060 print "\n#####\n";
061 print "\nErgebnisse\n";
062 print "\n#####\n";
063
064 for ($i=1;$i<=$len;$i++)
065 {
066     print @results[$i];
067 }
068
069 print "\n#####\n";
070 chdir ($mutterpfad);
071 system("rm *.dat");
072 system("rm *.temp");
073 exit (0);
074
075 #####
076 #by T.T.Duong. University of Bielefeld, 2001
077 sub writeFile
078 {
079     my ($data,$file) = @_;
080     open (WRITE,">$file") die "Kann nicht in $file schreiben.\n\n";
081     print WRITE $data;
082     close WRITE;
083 }
084 #####
085

```

```
086 #####
087 #by T.T.Duong. University of Bielefeld, 2001
088 sub getDirEntry
089 {
090     my $dirToDo = shift '';
091     my $temp;
092     my @dirEntry ;
093     opendir(DIRHANDLE,$dirToDo) die "\n\n\n$dirToDo gibt es nicht!\n\n";
094     foreach $temp (sort readdir(DIRHANDLE))
095     {
096         if(!grep /^\.(\.)*?$/, $temp)
097         {
098             push(@dirEntry,$temp);
099         }
100     }
101     closedir(DIRHANDLE);
102     return @dirEntry;
103 }
104 #####
```

A.2 Bootstrapper zur Ermittlung von Standardabweichungen: „bootstrap.c“

Instruktionsprache: ANSI-C

```
001 #include <stdio.h>
002 #include <math.h>
003 #include <sys/types.h>
004 #include <time.h>
005 #include <stdlib.h>
006 #include "readin.h"
007 #define NMAX 20000
008
009 int main(int argc, char **argv )
010 {
011     double xin[NMAX] , yin[NMAX];
012     double xeval[NMAX], yeval [NMAX];
013     double max=0,mittelwert[NMAX], stdawsum=0,stdaw=0,var=0;
014     int p=66,n=0;
015     int rnd=0,i=0,end=0,ndata=0;
016     double mean=0,sumx=0,sum=0;
017     double sum_mid=0,nulllinie=0;
018
019     srand( (unsigned)time( NULL ) );
020     ndata=readin(argv[1],xin,yin)-1;
021     max=floor(p*ndata/100);
022     end=max;
023     sum_mid=0;
024
025     for (i=1;i<=60;i++)
026     {
027         sum_mid=sum_mid+yin[i];
028     }
029     nulllinie=sum_mid/60;
030
031     for (i=1;i<=ndata;i++)
032     {
033         yin[i] = yin[i] - nulllinie;
034     }
035
036     for (i=1;i<=ndata;i++)
037     {
038         sum=sum+(yin[i]*xin[i]);
039         sumx=sumx+yin[i];
040     }
041
042     mean=sum/sumx;
043     for (n=1; n<=10000; n++)
044     {
```

```
045     for (i=1;i<=end;i++)
046     {
047         rnd=1+(rand() % (ndata));
048         xeval[i]=xin[rnd];
049         yeval[i]=yin[rnd];
050     }
051     sum=0;
052     sumx=0;
053     for (i=1;i<=end;i++)
054     {
055         sum=sum+(xeval[i]*yeval[i]);
056         sumx=sumx+yeval[i];
057     }
058     mittelwert[n]=sum/sumx;
059 }
060
061 for (n=1;n<=10000; n++)
062 {
063     stdawsum= stdawsum+pow(abs(mittelwert[n]-mean),2);
064 }
065
066 var=stdawsum/10000;
067 stdaw=sqrt(var);
068 printf ("%s\t%f\t%f\t%f\n",argv[1],mean,stdaw,nulllinie);
069 return (0);
070 }
```

A.3 Klasse zum Einlesen von Dateien: „readin.h“

Instruktionsprache: ANSI-C

```
001 | #include <stdlib.h>
002 |
003 | /*****
004 | int readin(char *fname, double x[], double y[])
005 | -----
006 |
007 | Einlesen von Daten Paaren x[i] y[i] (i=0..(ndata-1)) aus der
008 | Datei fname. Die Funktion liefert die Anzahl der eingelesenen
009 | Daten Paare zurück.
010 |
011 | *****/
012 | int NMAX=10000;
013 | int readin(char *fname, double x[], double y[])
014 | {
015 |     FILE    *fin;
016 |     int     i=1,ndata;
017 |     fin = fopen(fname,"r");
018 |     do
019 |     {
020 |         if (i>NMAX)
021 |         {
022 |             printf("Number of input lines > NMAX.\n Please redefine NMAX
023 |                 and recompile.\n");
024 |             exit(1);
025 |         }
026 |         if (fscanf(fin,"%le %le",&x[i],&y[i]) == 2)
027 |             i++;
028 |     }
029 |     while(!feof(fin));
030 |     ndata=i;
031 |     fclose(fin);
032 |     return(ndata);
033 | }
```