

Universität Bielefeld

Fakultät für Physik

Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften

Gruppenleiter: Prof. Dr. Dario Anselmetti

Untersuchung der elektrokinetischen und dielektrophoretischen Migration von *Minicircle*-DNA bei verschiedenen Pufferkonzentrationen

Bachelorarbeit

zur Erlangung des Grades eines

Bachelor of Science

im Studiengang „Molekularer Biotechnologie“

vorgelegt von

Lena Kunze

September 2016

Erstgutachter: Dr. Martina Viefhues

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dario Anselmetti

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig verfasst und gelieferte Datensätze, Zeichnungen, Skizzen und graphische Darstellungen selbstständig erstellt habe. Die AFM-Präparation und -Abbildung wurden von Sören Grannemann durchgeführt. Die Berechnung der elektrischen Felder wurde von Dr. Martina Viefhues durchgeführt. Ich habe keine anderen Quellen als die angegebenen benutzt und habe die Stellen der Arbeit, die anderen Werken entnommen sind – einschließlich verwendeter Tabellen und Abbildungen – in jedem einzelnen Fall unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

Bielefeld, den 29. September 2016

(Lena Kunze)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2 Theorie	3
2.1 Brown'sche Molekularbewegung und Diffusion	3
2.2 Elektrokinetik.....	3
2.2.1 Elektrische Doppelschicht	3
2.2.2 Elektroosmotischer Fluss.....	5
2.2.3 Elektrophorese	6
2.2.4 Dielektrophorese	7
2.3 Joule-Heating.....	10
2.4 DNA.....	11
2.4.1 Aufbau	11
2.4.2 Konformationen	13
2.4.3 Fluoreszenzmarkierung	14
2.4.4 Dielektrophoretische Migration und Trennung von DNA im Mikrofluidikkanal	16
3 Material und Methoden	18
3.1 Herstellung des <i>Masterwafers</i>	18
3.2 Herstellung eines Mikrofluidikchips.....	20
3.3 Präparation der DNA	22
3.4 Experimenteller Aufbau	22
3.5 Durchführung des Experimentes.....	23
4 Auswertung und Diskussion	26
4.1 Herstellung des <i>Masterwafers</i>	26
4.2 Fluoreszenzmarkierung von cccDNA.....	26
4.3 Kontaminationen durch Bakterien	28
4.4 Einfluss der Konzentration des Messpuffers auf die elektrokinetische und dielektrophoretische Migration.....	29
4.4.1 Einfluss des Spannungsbereiches auf die DEP-Migration und Durchführbarkeit der Messungen	33
4.4.2 Frequenzabhängigkeit der dielektrophoretischen Migration	40
5 Zusammenfassung und Ausblick	43
6 Literatur.....	45
7 Anhang.....	47
7.1 Angelegte Gleichspannungen.....	47
7.2 Datenträger	48

7.2.1 Beispielsequenzen zur Auswertung des Migrationsverhaltens	48
7.2.2 Videoaufnahmen der Kontamination durch Bakterien	49
7.3 DEP-Migrationsprofile	50

1 Einleitung

Die Gewinnung, Aufreinigung und Analytik von DNA spielt heutzutage sowohl in der Medizin zur Diagnostik von Gendefekten und Krebserkrankungen als auch in der Pharmazie zur Herstellung von Gen-Vakzinen und -Impfstoffen eine große Rolle [1, 2]. Auch in der Biotechnologie wird DNA zur Herstellung bestimmter Proteine benötigt, was eine genaue Kenntnis und Reinheit der verwendeten DNA erfordert [1]. Neben den etablierten Methoden zur Aufreinigung und Analytik von DNA, wie beispielsweise der Gelelektrophorese oder der Kapillargelelektrophorese, hat die Verwendung von Mikrofluidiksystemen in den letzten Jahren vor allem im pharmazeutischen Bereich deutlich zugenommen [2, 3].

Die Vorteile von Mikrofluidiksystemen liegen darin, dass im Vergleich zu etablierten Methoden zum einen ein deutlich geringeres Probenvolumen zur Detektion benötigt wird und zum anderen die Aufreinigung beziehungsweise Ankonzentrierung des Analyten deutlich weniger Zeit in Anspruch nimmt und zudem in Echtzeit verfolgt werden kann [2].

Bei Mikrofluidiksystemen handelt es sich um Kanalstrukturen im Mikrometerbereich, durch welche die DNA mittels Elektrophorese (EP) oder des elektroosmotischen Flusses geströmt werden kann [3, 4]. Eine Methode für die Aufreinigung und Analytik der DNA besteht darin, diese in einem schmalen Fluss entlang der Kanalwand in Richtung einer in den Kanal integrierten bogen- oder s-förmigen Barriere zu strömen. Diese Barriere verengt die Höhe des Kanals auf wenige hundert Nanometer über die gesamte Kanalbreite und erzeugt somit bei einer angelegten Spannung ein inhomogenes elektrisches Feld. Bei einer zusätzlich zur Gleichspannung angelegten Wechselspannung wird die DNA mittels Dielektrophorese, der Bewegung neutraler, polarisierbarer Partikel innerhalb eines inhomogenen elektrischen Feldes, bei spezifischen Wechselspannungsparametern entlang der Barriere abgelenkt [3, 5]. Diese spezifischen Parameter richten sich nach der Polarisierbarkeit der DNA und sind für DNA verschiedener Länge [6, 7] oder Konformation [8] unterschiedlich. Aus diesem Grund ist es möglich, zwei verschiedene DNA-Fragmente nach der Länge oder der Konformation zu trennen. Dazu werden die Wechselspannungsparameter so gewählt, dass das eine DNA-Fragment abgelenkt wird und das andere Fragment die Barriere ungehindert passiert. Hinter der Barriere entstehen so zwei getrennte Analytströme [3].

Aufgrund der geringen Dimensionen des Kanals existieren viele Einflussfaktoren, die das Trennergebnis der DNA beeinflussen können. Es ist davon auszugehen, dass neben Oberflächeneffekten [3] und durch Druck verursachten Volumenströmen vor allem die Konzentration des Messpuffers [3] und die Temperatur [9, 10] einen starken Einfluss auf das System nehmen. Aufgrund der anliegenden Spannung und des dadurch entstehenden *Joule-Heatings* kann die Temperatur innerhalb des Kanals

stark ansteigen, was zum einen das elektrische Feld und die Geschwindigkeit des Analyten beeinflusst, zum anderen aber auch biologische Proben denaturieren und das empfindliche Kanalsystem zerstören kann [1, 3]. Weiterhin liegen biologische Proben nicht in Reinstwasser vor, welches für vorangegangene Modellsysteme mit Nanopartikeln und Untersuchungen von DNA häufig als Messpuffer verwendet wurde, sondern in physiologischen Lösungen, welche eine deutlich höhere Leitfähigkeit als Reinstwasser aufweisen [1]. Es ist davon auszugehen, dass eine Erhöhung der Leitfähigkeit des Messpuffers ebenfalls das elektrische Feld und die Geschwindigkeit des Analyten im Kanal beeinflusst sowie zu einem stärkeren Joule-Heating führt [1].

Aus diesen Gründen ist es sehr wichtig, den Einfluss der Konzentration des Messpuffers auf die elektrophoretische und dielektrophoretische Migration von DNA zu untersuchen, um die Aufarbeitung und Analytik dieser durch gegebenenfalls erforderliche Veränderungen am System weiter zu verbessern. Außerdem hilft eine genaue Kenntnis der Veränderung der spezifischen Wechsellspannungsparameter mit der Pufferkonzentration, die notwendigen Parameter für Untersuchungen in anderen Messpuffern abzuschätzen und Limitationen festzustellen.

Für diese Ziele wurde in dieser Arbeit die Migration der DNA detailliert über einen Wechsellspannungsbereich von 50 V bis 900 V und einen Frequenzbereich von 50 Hz bis 700 Hz in Messpuffern verschiedener Konzentration untersucht und in DEP-Migrationsprofilen dargestellt, was Tendenzen der spezifischen Wechsellspannungsparameter auf einen Blick ersichtlich macht. Diese werden im Rahmen dieser Arbeit dargestellt und diskutiert.

2 Theorie

2.1 Brown'sche Molekularbewegung und Diffusion

Die Brown'sche Molekularbewegung wurde erstmals im Jahr 1872 durch den Botaniker Robert Brown beschrieben. Dieser beobachtete unter einem Mikroskop eine ungeordnete Bewegung von Pollen auf der Wasseroberfläche. Zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts wurden die Brown'sche Molekularbewegung und die daraus resultierende Diffusion durch Langevin, Smoluchowski und Einstein genauer untersucht [4]. Diese wird durch Stöße der Moleküle mit Molekülen der umgebenden Lösung verursacht [4].

Durch die Brown'sche Molekularbewegung können sich die Moleküle frei in der Lösung bewegen. Dieses Phänomen wird als Diffusion bezeichnet. Der Diffusionskoeffizient D beschreibt dabei die Beweglichkeit des Moleküls in der Lösung und kann über die zurückgelegte mittlere freie Weglänge $\langle x^2 \rangle$ mit der Zeit t und der Dimensionalität d berechnet werden [3]:

$$D = \frac{\langle x(t)^2 \rangle - \langle x(t) \rangle^2}{2dt} \quad (1)$$

Eine Berechnung des Diffusionskoeffizienten ist ebenfalls über die Stokes-Einstein-Gleichung [3, 4] mit der Boltzmann-Konstante k_B , der Temperatur T , der Viskosität der Lösung η und dem Partikelradius R möglich:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (2)$$

2.2 Elektrokinetik

2.2.1 Elektrische Doppelschicht

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikrofluidikchips bestanden aus Polydimethylsiloxan (PDMS). Die Silanol-Gruppen an der Oberfläche des PDMS sind bei Kontakt mit wässriger Lösung mit einem pH-Wert im physiologischen Bereich negativ geladen [3, 4].

Die negativen Ladungen der Oberfläche werden durch Gegenionen abgeschirmt, indem diese sich aufgrund elektrostatischer Anziehungskräfte anlagern. Dadurch entsteht ein Konzentrationsgefälle der Ionen zwischen der Kanalwand und der Mitte des Kanals [4]. Dies ist in Abbildung 1 dargestellt.

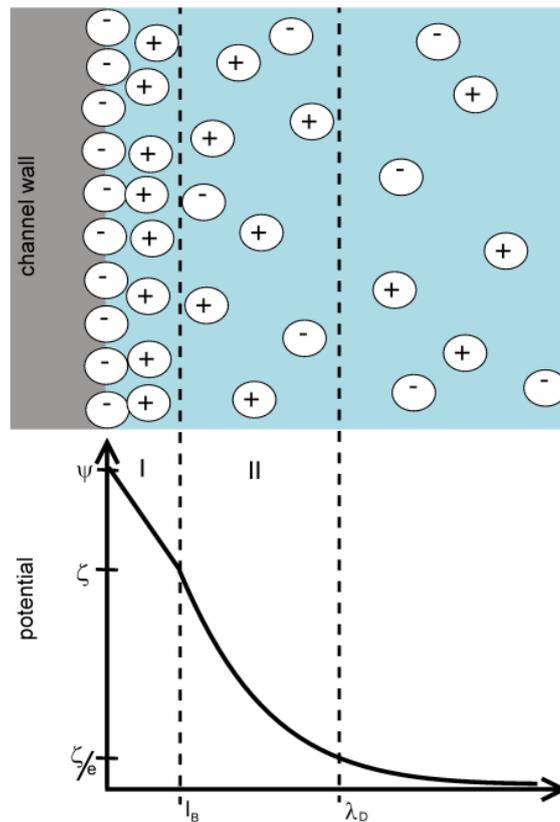


Abbildung 1: Elektrische Doppelschicht an einer negativ geladenen Oberfläche. Der Bereich I ist die Stern-Schicht, in der das ζ -Potential linear abfällt. Der Bereich II ist die diffuse Schicht, in der das Potential exponentiell abfällt. l_B ist die Bjerrum-Länge, welche die Dicke der Sternschicht angibt. λ_D ist die Debye-Länge, welche die Dicke der elektrischen Doppelschicht angibt [3].

An der Oberfläche des PDMS herrscht somit eine im Vergleich zur Mitte des Kanals höhere Konzentration an Kationen. Dieser Bereich wird als Stern-Schicht (I) und ihre Dicke als Bjerrum-Länge bezeichnet, welche ungefähr dem Radius der Gegenionen entspricht [11]. An die Stern-Schicht grenzt die sogenannte diffuse Schicht (II). In dieser Schicht sind die Ionen, anders als bei der Stern-Schicht, frei beweglich, da die elektrostatischen Anziehungskräfte geringer sind [4]. Die Dicke der diffusen Schicht ist dabei abhängig vom Gleichgewicht der elektrostatischen Anziehung und der Diffusion [4].

Innerhalb der Stern-Schicht fällt das ζ -Potential linear mit dem Abstand zur Wand ab. Für die diffuse Schicht hingegen weist das Potential einen exponentiellen Abfall auf. Die Dicke der elektrischen Doppelschicht wird durch die Debye-Länge beschrieben. Die Debye-Länge ist der Abstand zur Oberfläche, bei dem das Potential auf $\frac{1}{e}$ des Oberflächenpotentials abgesunken ist [3].

2.2.2 Elektroosmotischer Fluss

Beim Elektroosmotischen Fluss (EOF) handelt es sich um die Bewegung einer Flüssigkeit relativ zu einer stationären Oberfläche, welche durch ein parallel zur Oberfläche angelegtes elektrisches Feld induziert wird [4]. Das resultierende Flussprofil ist in Abbildung 2 dargestellt.

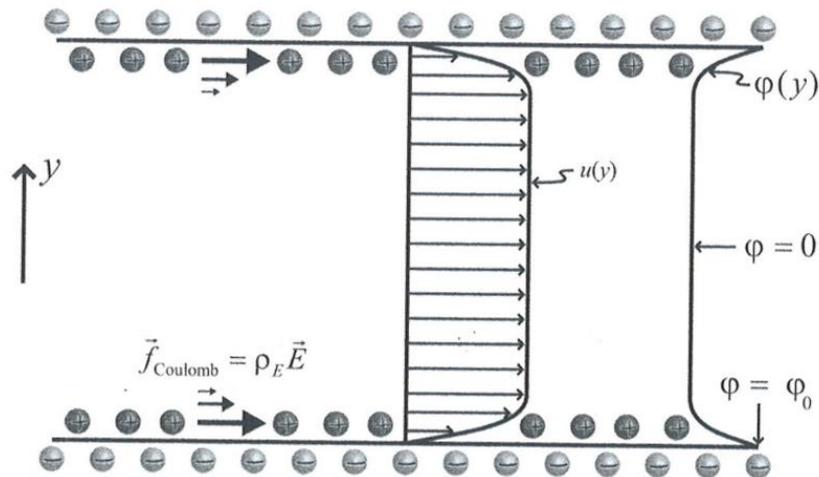


Abbildung 2: Schematische Darstellung der elektrischen Doppelschicht und des EOFs in einem Mikrofluidikkanal. Die Viskosität des Mediums bewirkt außerhalb der elektrischen Doppelschicht einen Volumenstrom. Zur Verdeutlichung des elektroosmotischen Flussprofils wurde die elektrische Doppelschicht stark vergrößert dargestellt. Ihre Dicke liegt normalerweise im Nanometerbereich. Die Fließgeschwindigkeit u des Volumenelementes nimmt innerhalb der Debye-Schicht mit dem Abstand y zur Oberfläche zu. Direkt an der Oberfläche ist kein Fluss vorhanden [12].

Durch das angelegte elektrische Feld werden aufgrund der Coulomb'schen Kraft zwischen den Gegenionen und dem elektrischen Feld die in der diffusen Schicht befindlichen Gegenionen bewegt. Dabei ziehen sie aufgrund der Viskosität des Mediums das Volumen in der Mitte des Kanals mit sich. Die Coulomb'sche Kraft des elektrischen Feldes, die auf die Gegenionen wirkt, wird in der Nähe der geladenen Oberfläche größer, da die Konzentration der Gegenionen zunimmt. Dadurch erfahren diese eine geringere Abschirmung durch die Ionen in der Lösung. Darüber hinaus gilt die *no-slip* Bedingung, sodass die Geschwindigkeit der Gegenionen mit geringerem Abstand zur Oberfläche abnimmt [3]. Direkt an der Oberfläche beträgt die Geschwindigkeit der Gegenionen null [12].

Ein idealer EOF liegt vor, wenn das Oberflächenpotential entlang der Kanalwand konstant ist, das elektrische Feld homogen und zeitlich konstant ist, die Breite des Kanals deutlich größer als die Debye-Länge ist, kein externer Druck angelegt ist und die *no-slip* Bedingung gilt. In diesem Fall ist die elektroosmotische Mobilität μ_{EOF} gegeben durch [3, 13]:

$$\mu_{EOF} = -\frac{\epsilon_0 \epsilon_m \zeta}{\eta} \quad (3)$$

Die elektroosmotische Mobilität ist dabei abhängig von der Feldkonstanten ϵ_0 der Leitfähigkeit des Fluids ϵ_m , dem Oberflächenpotential ζ und der Viskosität η .

2.2.3 Elektrophorese

Bei der Elektrophorese (EP) handelt es sich um die Bewegung eines geladenen Partikels in einem elektrischen Feld relativ zu einer stationären Flüssigkeit. Die Elektrophorese beruht auf demselben Prinzip wie der EOF mit dem Unterschied, dass sich das Bezugssystem ändert. Das heißt, bei der Elektrophorese wird die Oberfläche als mobil und die Flüssigkeit als stationär angesehen. Ebenso verhält sich die elektrophoretische Mobilität analog zur elektroosmotischen Mobilität, unterscheidet sich jedoch durch das Vorzeichen (vgl. Gleichung 3) [3]:

$$\mu_{EP} = + \frac{\epsilon_0 \epsilon_m \zeta}{\eta} \quad (4)$$

Die elektrophoretische Mobilität ist demnach unabhängig von der Größe und Form eines Partikels [3], sodass unterschiedlich große DNA-Moleküle gleichzeitig an der Barriere im Mikrofluidikkanal ankommen.

Die Geschwindigkeit des Partikels ist entsprechend proportional zur elektrophoretischen Mobilität und zur elektrischen Feldstärke [12]:

$$v = \mu_{EP} \cdot E \quad (5)$$

Die auf den geladenen Partikel wirkende Kraft \vec{F}_{EP} ist gegeben durch [9]:

$$\vec{F}_{EP} = q \cdot \vec{E} \quad (6)$$

Sie ist nur abhängig von der Ladung des Partikels q und der elektrischen Feldstärke \vec{E} .

Soll wie in dieser Arbeit negativ geladene DNA (vgl. Abschnitt 2.4.1) mittels Elektrophorese durch den Kanal bewegt werden, ist es sinnvoll, den EOF zu unterdrücken, da dieser der Flussrichtung der DNA entgegengesetzt ist und so eine Bewegung der DNA durch den Kanal reduzieren würde.

Hierzu wird ein sogenanntes *Coating* verwendet. Dabei handelt es sich um ein Polymer, welches sich an die geladene Oberfläche anlagert, sodass sich die elektrische Doppelschicht vollständig in der *Coating*-Schicht befindet. Durch das *Coating* steigt die Viskosität im Bereich der Oberfläche, wodurch

die Bewegung der Gegenionen in der diffusen Schicht verlangsamt wird, sodass diese nicht das Volumen in der Mitte des Kanals mit sich ziehen können [14].

Es wird zwischen dem statischen und dem dynamischen *Coating* unterschieden. Bei der statischen *Coating*-Methode wird der Messpuffer, welcher das *Coating* enthält, für eine *Coating*-spezifische Zeit im Kanal inkubiert, sodass sich das *Coating* an die Oberfläche anlagern kann. Die Inkubationszeit beträgt dabei mehrere Stunden. Für die Messung wird der Messpuffer mit *Coating*, welcher sich im Kanal befindet gegen Messpuffer ohne *Coating* ausgetauscht. Beim dynamischen *Coating* ist die Inkubationszeit mit 30 min deutlich kürzer als beim statischen *Coating*. Die anschließende Messung wird im Gegensatz zum statischen *Coating* mit Messpuffer vorgenommen, welcher *Coating* enthält [13].

In dieser Arbeit wurde ein Propylenoxid-Ethylenoxid *Block-Copolymer*, welches auch als Pluronic F108 bekannt ist, verwendet. Im Fall des Pluronic F108 erfolgt die Anlagerung an die PDMS-Oberfläche durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Silanol-Gruppen des plasmaoxidierten PDMS und dem *Coating* [14].

2.2.4 Dielektrophorese

Die Dielektrophorese (DEP) ist die Bewegung eines neutralen, polarisierbaren Partikels in einem inhomogenen elektrischen Feld. Befindet sich ein solches Partikel innerhalb eines elektrischen Feldes, orientieren sich die Ladungen im Partikel, sodass ein Dipol induziert wird [3].

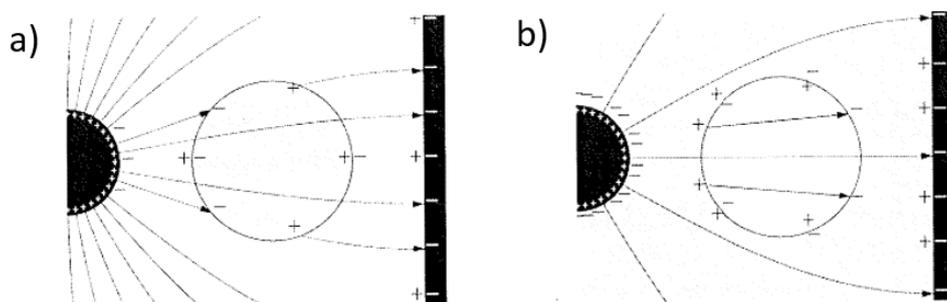


Abbildung 3: Schematische Darstellung der durch ein elektrisches Feld induzierten Ladungsverteilung in und um ein neutrales Partikel. **a)** Das Partikel befindet sich in einem Medium, das weniger stark polarisierbar ist als das Partikel. **b)** Das Partikel befindet sich in einem Medium, das stärker polarisierbar ist als das Partikel [15].

Die Orientierung der Ladungen innerhalb und um das Partikel ist dabei abhängig von der Polarisierbarkeit des Partikels und des umgebenden Mediums. Ist das umgebene Medium weniger stark polarisierbar als das Partikel, so richten sich die Ladungen wie in Abbildung 3 a dargestellt aus. In

diesem Fall handelt es sich um positive Dielektrophorese und das Partikel wird von starken elektrischen Feldern angezogen [11]. Ist das umgebende Medium stärker polarisierbar als das Partikel, handelt es sich um negative Dielektrophorese und die Ladungen richten sich umgekehrt zur positiven Dielektrophorese im elektrischen Feld aus [4, 11] (vgl. Abbildung 3 b). In diesem Fall wird das Partikel von starken elektrischen Feldern abgestoßen [4, 11].

Die wirkende Kraft \vec{F}_{DEP} ist dabei proportional zur Polarisierbarkeit α des Partikels und dem quadratischen Feldgradienten $\nabla \vec{E}^2$ [4]:

$$\vec{F}_{DEP} \propto \alpha \cdot \nabla \vec{E}^2 \quad (7)$$

Das elektrokinetische Phänomen der Dielektrophorese nimmt ebenfalls Einfluss auf geladene Partikel, die sich in einem inhomogenen elektrischen Feld befinden. Hierbei wird die Ionenwolke, die das Partikel umgibt, polarisiert [3].

In einem Mikrofluidikkanal können elektrische Feldgradienten auf zwei verschiedene Arten erzeugt werden. Zum einen durch in den Kanal integrierte Elektroden und zum anderen durch isolierende Pfosten oder Barrieren [3, 9, 11]. In dieser Arbeit wurden isolierende Barrieren verwendet, da diese keine elektrochemischen Reaktionen hervorrufen [16], leicht und reproduzierbar durch Softlithographie herzustellen sind und ein homogenes elektrisches Feld über die gesamte Kanalhöhe erzeugen [3, 9, 16, 17].

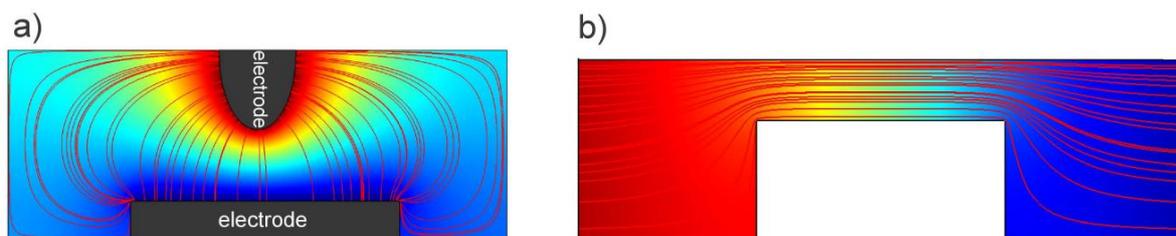


Abbildung 4: Darstellung der Feldlinien (rot) und der Stärke des elektrischen Potentials (farbkodiert). a) Verwendung von Elektroden zur Erzeugung eines inhomogenen elektrischen Feldes. Das elektrische Feld wird mit zunehmendem Abstand zur oberen Elektrode schwächer. b) Verwendung von isolierenden Materialien als Pfosten oder Barriere innerhalb des Kanals. Über der Barriere ist das elektrische Feld homogen [3].

Für die Ablenkung der DNA an der Barriere wird das Superpositionsprinzip von Wechsel (AC)- und Gleichspannung (DC) [5] ausgenutzt. Die angelegte Gleichspannung bewegt die DNA durch Elektrophorese in Richtung der Barriere. Da das elektrische Feld außerhalb des Bereichs der Barriere homogen ist, wirken hier keine dielektrophoretischen Kräfte auf die DNA [5]. Die wirkenden elektroosmotischen Kräfte werden durch die Verwendung von Coating reduziert [14]. Im Bereich der Barriere ist das elektrische Feld, wie in Abbildung 4 b dargestellt, inhomogen [3, 9]. Dadurch wirken dort zusätzlich dielektrophoretische Kräfte auf die DNA. Sie erfährt im Fall von positiver DEP ein Potentialminimum an den Rändern der Barriere. Der resultierende Geschwindigkeitsvektor \vec{u} der DNA ist die Summe der Geschwindigkeitsvektoren der Elektroosmose, Elektrophorese und Dielektrophorese [5]:

$$\vec{u} = (\mu_{EP} + \mu_{EO}) \cdot \vec{E}_{DC} + \frac{1}{2} \mu_{DEP} \nabla |\vec{E}_{AC}|^2 \quad (8)$$

Die linearen elektrokinetischen Effekte (Elektroosmose und Elektrophorese) werden dabei durch das DC-Feld hervorgerufen, während die dielektrophoretischen Effekte durch das AC-Feld hervorgerufen werden [5], da $U_{DC} \ll U_{AC}$ ist.

Die Zeit, die ein Partikel benötigt, um einem Potentialminimum zu entkommen, ist durch die Kramers-Rate gegeben, welche von der thermischen Energie $k_B T$ und der Form des Potentials $\frac{|\Omega_0 \Omega_B|}{2\pi f}$ abhängig ist [3]:

$$k_{Kramers} = \frac{|\Omega_0 \Omega_B|}{2\pi f} \cdot \exp\left\{\frac{W_B}{k_B T}\right\} \quad (9)$$

Die Zeit zum Entkommen des Partikels aus dem Potentialminimum ist demnach abhängig von der Höhe der zu überwindenden Energiebarriere W und der thermischen Energie, welche zur Verfügung steht, um diese zu überwinden [3]:

$$\tau \propto \exp\frac{\Delta W - \Delta W_{DC}}{k_B T} \quad (10)$$

2.3 Joule-Heating

Während der Elektrophorese kommt es zu elastischen Stößen zwischen den durch das angelegte elektrische Feld beschleunigten Ionen und den Molekülen des Elektrolyten. Dabei wird ein Teil der kinetischen Energie in Wärme, die sogenannte Joule'sche Wärme W , umgewandelt. Dieser Prozess ist auch als *Joule-Heating* bekannt. Es gilt [18]:

$$W = U \cdot I \cdot t = R \cdot I^2 \cdot t \quad (11)$$

Da die Stromstärke proportional zur Leitfähigkeit und somit zur molaren Konzentration des Elektrolyten ist, ist die Joule'sche Wärme ebenfalls proportional zur quadratischen elektrischen Feldstärke E , der Äquivalenzleitfähigkeit σ und zur molaren Konzentration c des Elektrolyten [1]:

$$W = E^2 \cdot \sigma \cdot c \quad (12)$$

Die Wärmeentwicklung kann während der dielektrophoretischen Trennung zu Problemen führen. Zum einen kann eine Erwärmung des Messpuffers zu diffusiven Effekten führen, welche das Trennergebnis insbesondere bei *Batch*-Prozessen aufgrund einer Verbreiterung des Flussprofils negativ beeinflussen können [1, 16], zum anderen verringert sich die Viskosität des Messpuffers mit steigender Temperatur, was zu einer erhöhten Geschwindigkeit der DNA innerhalb des Kanals führt [9, 10]. Des Weiteren sind Biomoleküle temperaturempfindlich und können durch hohe Temperaturen denaturiert werden [3]. Bei DNA ist die Denaturierungstemperatur abhängig von der Anzahl der Basenpaare und dem Guanin-Cytosin-Gehalt [19]. Weiterhin können hohe Temperaturen zu einer Schädigung des Kanals beziehungsweise des Mikrofluidikchips führen [3].

2.4 DNA

2.4.1 Aufbau

Desoxyribonukleinsäure (DNA) dient als Träger der Erbinformation aller Lebewesen und der Weitergabe der genetischen Information an die nächste Generation. Somit ist sie essentiell für das Leben [20, 21].

DNA besteht aus einem Ribulose-Phosphat-Rückgrat und den Basen Thymin, Adenin, Cytosin und Guanin, welche kovalent an die Ribulose gebunden sind (vgl. Abbildung 5). Sie liegt bis auf wenige Ausnahmen als Doppelstrang vor. Um die sogenannten komplementären Stränge der DNA miteinander zu verbinden, paaren dabei jeweils die Basen Adenin und Thymin und die Basen Cytosin und Guanin über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander. Diese spezifische Paarung kommt dadurch zu Stande, dass Adenin und Thymin aufgrund ihrer Molekülstruktur jeweils in der Lage sind, zwei Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, während Cytosin und Guanin jeweils drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden [20, 21] (vgl. Abbildung 5)

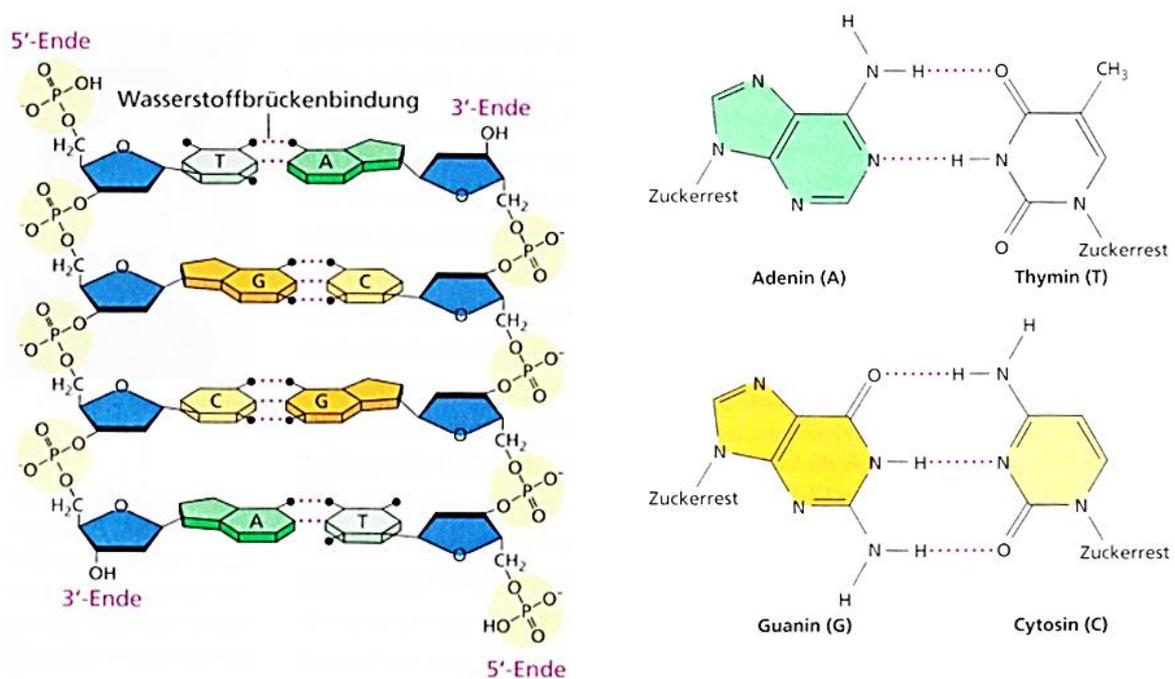


Abbildung 5: Darstellung der partiellen chemischen Struktur der DNA. Die Paarung der komplementären Stränge erfolgt über zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen Thymin (T) und Adenin (A), sowie über drei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen Cytosin (C) und Guanin (G) [20].

In Abbildung 5 ist die DNA aus Gründen der Übersichtlichkeit in entwundener Form dargestellt. In der Realität liegt sie jedoch spiralisiert vor. Unter physiologischen Bedingungen ist die DNA rechtsgängig. Eine vollständige Windung der DNA-Helix ist nach 3,4 nm erreicht und umfasst zehn Basenpaare,

welche sich in einem Abstand von 0,34 nm voneinander befinden. Der Radius der Helix beträgt 1 nm [20, 21] (vgl. Abbildung 6).

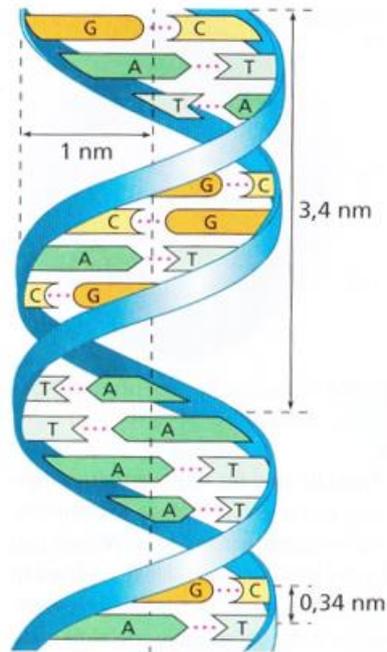


Abbildung 6: Schematische Darstellung der DNA-Helix. Die blauen Bänder stellen das Ribulose-Phosphat-Rückgrat dar. Im Inneren der Helix sind die einzelnen Basenpaarungen, Adenin (A) und Thymin (T) sowie Cytosin (C) und Guanin (G), über Wasserstoffbrückenbindungen zu sehen [20].

Für die Produktion von Proteinen wird die DNA zunächst durch spezifische Enzyme in *messenger*-RNA (mRNA) transkribiert, welche anschließend am Ribosom zum Protein translatiert wird. Die Abfolge der einzelnen Basen in der DNA definiert dabei die Abfolge der Aminosäuren innerhalb des Proteins durch den sogenannten Triplet-Kode. Dabei kodieren jeweils drei hintereinander folgende Basen für eine Aminosäure [20, 21].

In physiologischer Lösung trägt das Rückgrat der DNA eine negative Ladung pro Phosphatgruppe [3, 20]. Die DNA ist deshalb in Lösung von einer Gegenionenwolke umgeben. Dies ist sowohl bedeutend für den Transport der DNA innerhalb des Mikrofluidikkanals durch Elektrophorese, als auch für die Polarisierbarkeit der DNA und die damit verbundene dielektrophoretische Trennung an der Barriere [3].

2.4.2 Konformationen

Je nach Organismus liegt DNA in zwei verschiedenen Konformationen vor. In höheren Organismen ist dies zumeist die lineare Form. Bakterien hingegen besitzen sogenannte Plasmide. Dabei handelt es sich meistens um ringförmige DNA, welche weiter in zwei verschiedene Konformationen unterteilt werden kann [3, 22] (vgl. Abbildung 7).

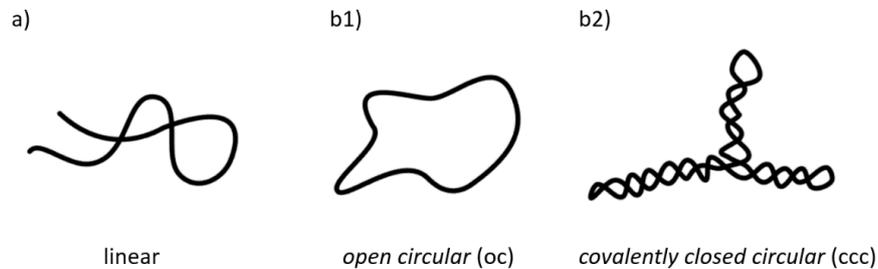


Abbildung 7: Schematische Darstellung der verschiedenen Konformationen doppelsträngiger DNA. a) Lineare DNA. b) Zirkuläre DNA mit Unterteilung in b1) open circular (oc) und b2) covalently closed circular (ccc).

Bei der sogenannten *open circular* (oc) Form handelt es sich um lineare DNA, die durch eine kovalente Bindung zirkularisiert wurde, ohne die DNA stärker zu spiralisieren, als dies in der linearen Form der Fall ist [22, 23]. Die sogenannte *covalently closed circular* (ccc) DNA ist im Vergleich zur oc-Form superspiralisiert. Aufgrund ihrer Fähigkeit, in Zellen einzudringen, besteht ein starkes medizinisches Interesse an cccDNA als Therapeutikum für Gendefekte oder gegen Krebs [22, 23].

Bei der in dieser Arbeit verwendeten DNA handelt es sich um sogenannte *Minicircle*. Diese liegen in der ccc-Form vor [2] und werden von der Firma PlasmidFactory als Gen-Therapeutikum hergestellt. Der Vorteil der Verwendung dieser *Minicircle* gegenüber anderen Gen-Therapeutika liegt darin, dass sie in ihrer Sequenz keine Artefakte des bakteriellen Genoms aufweisen und ausschließlich das *gene of interest* (GOI) und die dazugehörigen regulatorischen Sequenzen tragen [2, 22, 23]. Während der Produktion entstehen über homologe Rekombination aus dem sogenannten Parental-Plasmid der *Minicircle* und das Miniplasmid [2, 22] (vgl. Abbildung 8).

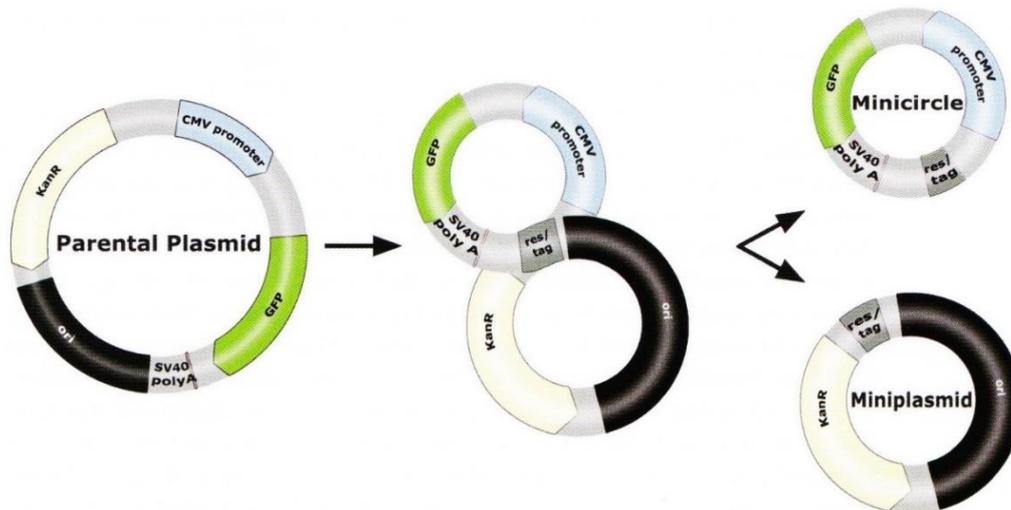


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Minicircle-Produktion. Das Parental-Plasmid, welches der Vervielfältigung des *gene of interest* und der zugehörigen regulatorischen Motive in Bakterien dient, wird über homologe Rekombination in das Miniplasmid und in den *Minicircle* gespalten. Der *Minicircle* wird nach der Aufreinigung durch Affinitäts-Chromatographie als Gen-Therapeutikum verwendet und trägt ausschließlich das *gene of interest* sowie die zugehörigen regulatorischen Motive. Das Miniplasmid trägt die in der Gen-Therapie unerwünschten Bereiche des Parental-Plasmids. Dazu gehören die Antibiotikaresistenz und der *origin of replication* (*ori*) [2].

Für die Produktion von Gen-Therapeutika wird das GOI in ein Bakterien-Plasmid inseriert, welches anschließend in einer Bakterienkultur vervielfältigt wird [2]. Für diesen Prozess werden ein bakterieller Replikationsursprung und ein Selektionsmarker, meist eine Antibiotikaresistenz, benötigt [2, 22]. Das Einbringen bakterieller DNA sowie einer Antibiotikaresistenz in den menschlichen Körper bringt jedoch Risiken mit sich und ist somit nicht erwünscht. Deshalb wird das Parental-Plasmid, welches der Vervielfältigung des GOI in Bakterien dient, durch eine induzierbare homologe Rekombination in das Miniplasmid und den *Minicircle* gespalten. Die homologen Sequenzen sind dabei so positioniert, dass das entstehende Miniplasmid die im Gen-Therapeutikum unerwünschten Bereiche des Parental-Plasmids trägt. Der *Minicircle* hingegen trägt ausschließlich das GOI und die zugehörigen regulatorischen Sequenzen und wird über Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt [2, 22].

2.4.3 Fluoreszenzmarkierung

Die Auflösung eines Mikroskops und somit die minimal darstellbare Objektgröße sind durch das Abbè-Limit [24, 25] gegeben:

$$R = \frac{\lambda}{2 NA} \quad (13)$$

Dabei ist R die noch darstellbare Objektgröße bei einer Wellenlänge λ und der numerischen Apertur NA des verwendeten Mikroskops. Ein gängiges Lichtmikroskop erreicht unter Verwendung eines Ölimmersionsobjektives eine numerische Apertur von 1,4 [26]. Mit einer Wellenlänge von

550 nm liegt die Auflösungsgrenze für Objekte unter einem Lichtmikroskop bei 196 nm. Da sich DNA deutlich unter dieser Auflösungsgrenze befindet [20], erfolgte die Darstellung der DNA in dieser Arbeit durch Fluoreszenzmikroskopie.

Hierzu ist es notwendig, die DNA durch einen geeigneten fluoreszierenden Farbstoff zu markieren. Während der Aufnahme von DEP-Migrations-Profilen werden die DNA-Moleküle über mehrere Minuten belichtet. Aus diesem Grund muss ein Farbstoff verwendet werden, der nicht empfindlich gegenüber *bleaching* ist. Der Fluoreszenzfarbstoff YOYO-1 Iodid¹ eignet sich hierfür sehr gut, da er kaum *bleaching* aufweist [27] und nach der spezifischen Bindung an DNA 1000-fach stärker fluoresziert als ungebunden [28, 29]. Die Bindungsaffinität von YOYO-1 an DNA ist mit $6 \cdot 10^8 \text{ mol}^{-1}$ im Vergleich zu anderen Interkalatoren wie Ethidiumbromid sehr hoch [1, 30, 31]

Bei YOYO-1 handelt es sich um einen bis-Interkalator [28]. Als Interkalator werden in der Biochemie Moleküle bezeichnet, die sich zwischen zwei Basenpaaren in die DNA einlagern [1, 28]. Ein einzelnes YOYO-1-Molekül lagert sich aufgrund seiner chemischen Struktur (vgl. Abbildung 9) an zwei Stellen innerhalb der DNA ein und wird deshalb als bis-Interkalator bezeichnet [28]. Die Einlagerung des Moleküls zwischen die Basenpaare erfolgt über die zwei planaren aromatischen Ringe am Ende der Struktur, welche positiv geladen sind. Diese gehen elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats ein [31].

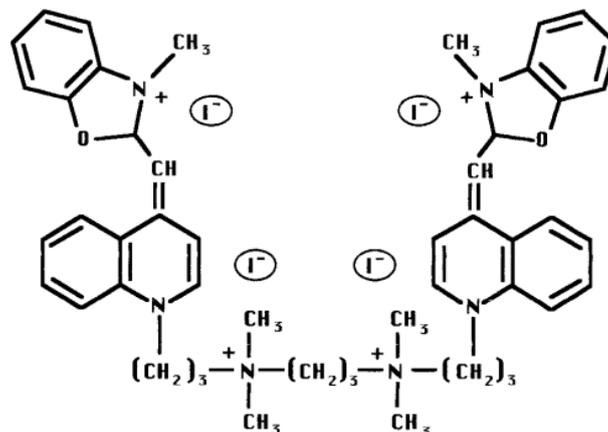


Abbildung 9: Chemische Struktur des Yellow Oxazol Dimers YOYO-1. Die Einlagerung zwischen zwei Basenpaare innerhalb der DNA erfolgt über die zwei planaren aromatischen Ringe, welche positiv geladen sind, und somit elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats eingehen [31].

Durch die Einlagerung des YOYO-1 zwischen die Basenpaare der DNA wird die Konformation des Farbstoffes verändert, was zu einer 1000-fach erhöhten Fluoreszenz-Quantenausbeute führt [3, 31].

¹ 1,1'-(4,4,7,7-Tetramethyl-4,7,-diazundecamethlen)-bis-4-[3-methyl-2,3-dihydro-(benzo-1,3-oxazol)-2-methyliden]-quinolinium Tetraiodid

Das Absorptionsmaximum des interkalierten YOYO-1 liegt bei 457 nm und das Emissionsmaximum bei 510 nm [32].

Bei der Fluoreszenz wird ein Molekül durch die Absorption eines Photons in einen angeregten Zustand, z.B. S_2 , versetzt, indem ein Elektron auf ein höheres Energielevel angehoben wird [33, 34]. Von diesem angeregten Zustand findet ein strahlungsloser Übergang, auch interne Konversion genannt, in den niedrigsten Anregungszustand S_1 statt [24]. Nach einer charakteristischen Zeit von ungefähr 10^{-8} s relaxiert das Elektron unter der Abgabe eines Photons in den Grundzustand S_0 [34] (vgl. Abbildung 10). Durch die vorangegangene interne Konversion erfolgt die Emission bei einer größeren Wellenlänge als die Adsorption [24, 33].

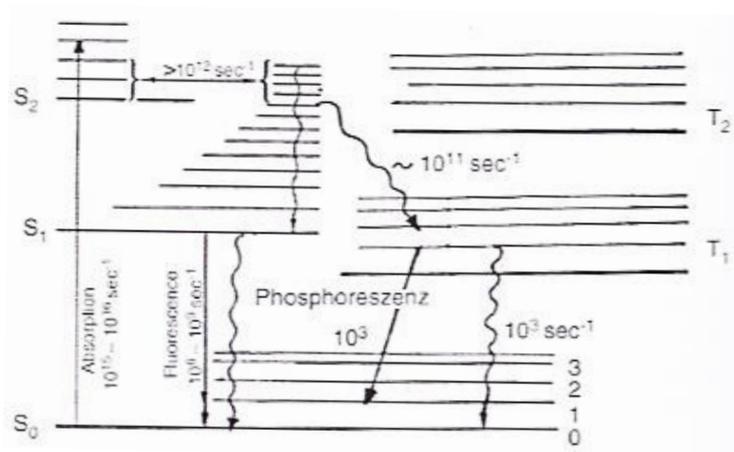


Abbildung 10: Jablonski-Termschema. Das System wird durch Absorption in den angeregten Zustand, z.B. S_2 , versetzt. Durch interne Konversion relaxiert das System in den niedrigsten Anregungszustand S_1 und von dort aus über Fluoreszenz oder einen strahlungslosen Übergang in den Grundzustand S_0 . Durch *intersystem crossing* findet ein Übergang vom angeregten Zustand, z.B. S_2 , in den Triplett-Zustand T statt. Der Übergang in den Grundzustand S_0 erfolgt über Fluoreszenz oder einen strahlungslosen Übergang [24].

Neben der internen Konversion besteht die Möglichkeit des Übergangs des Elektrons in einen der Triplett-Zustände T (*intersystem crossing*) [24]. Der anschließende Übergang aus dem Triplett-Zustand T_1 in den Grundzustand wird als Phosphoreszenz bezeichnet. Die Phosphoreszenz steht in Konkurrenz zur Fluoreszenz, tritt aber seltener auf, da das *intersystem crossing* deutlich langsamer abläuft, als die interne Konversion [24, 33], da es quantenmechanisch verboten ist. Sowohl der Übergang von S_1 in S_0 als auch der Übergang von T_1 in S_0 können ebenfalls strahlungsfrei erfolgen [24].

2.4.4 Dielektrophoretische Migration und Trennung von DNA im Mikrofluidikkanal

Die DNA wird, wie in Abbildung 11 dargestellt, durch Elektrophorese aus dem Reservoir heraus in einem schmalen Fluss an der Kanalwand entlang zur Barriere geströmt. Bei für die verwendete DNA spezifischen Parametern der Wechsellspannung, bei denen die DNA positive Dielektrophorese aufweist, wird diese im Spalt über der Barriere gefangen. Durch die elektrophoretischen Kräfte wird

die DNA entlang der Barriere abgelenkt und verlässt diese an der gegenüberliegenden Kanalseite aufgrund von Diffusion wieder [3].

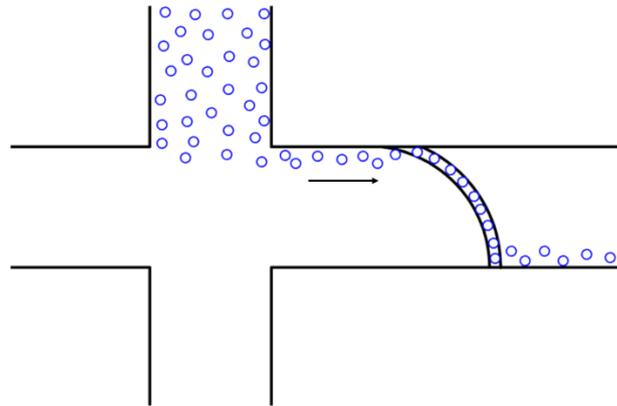


Abbildung 11: Dielektrophoretische Migration von DNA im Mikrofluidikkanal. Die DNA (blau) wird durch Elektrophorese aus dem Reservoir heraus, und in einem schmalen Fluss entlang der Kanalwand zur Barriere geströmt. Bei einer für die verwendete DNA spezifische Wechselspannung und Frequenz wird die DNA durch das erzeugte dielektrophoretische Potential über der Barriere gefangen und durch elektrophoretische Kräfte auf der Barriere entlang zur gegenüber liegenden Kanalwand bewegt. Dort verlässt die DNA die Barriere.

Soll eine Trennung von zwei verschiedenen DNA-Spezies erfolgen, so muss die Wechselspannung so gewählt werden, dass die eine DNA abgelenkt wird, die andere aber ungehindert die Barriere entlang der Kanalwand passiert, da sie nicht gefangen wird [3]. Dies ist in Abbildung 12 dargestellt.

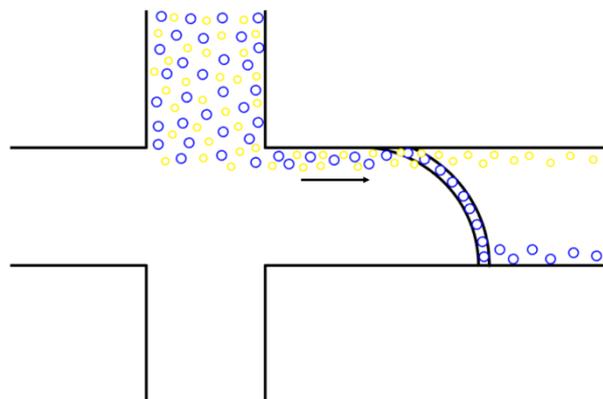


Abbildung 12: Dielektrophoretische Trennung von DNA im Mikrofluidikkanal. Die DNA wird durch Elektrophorese aus dem Reservoir heraus, und in einem schmalen Fluss entlang der Kanalwand zur Barriere geströmt. Die Wechselspannung wird so gewählt, dass die eine DNA (blau) entlang der Barriere abgelenkt wird und die andere DNA (gelb) die Barriere ungehindert entlang der Kanalwand passiert.

Durch Dielektrophorese ist es möglich, DNA nach der Größe [6, 7], sowie der Konformation zu trennen [8], da sich jeweils die Ausdehnung der Gegenionenwolke der DNA unterscheidet. Dies führt zu unterschiedlichen spezifischen Wechselspannungen für die Ablenkung der DNA auf der Barriere.

3 Material und Methoden

3.1 Herstellung des *Masterwafers*

Die Herstellung der Mikrofluidikchips erfolgte mit Hilfe einer Zwei-Schicht-Softlithographie. Hierfür wurde als Negativform ein sogenannter *Masterwafer* benötigt. Dabei handelt es sich um einen Silizium-*Wafer*, auf dem durch Zwei-Schritt-Photolithographie das Negativ der Kanalstrukturen erzeugt wird (vgl. Abbildung 13).

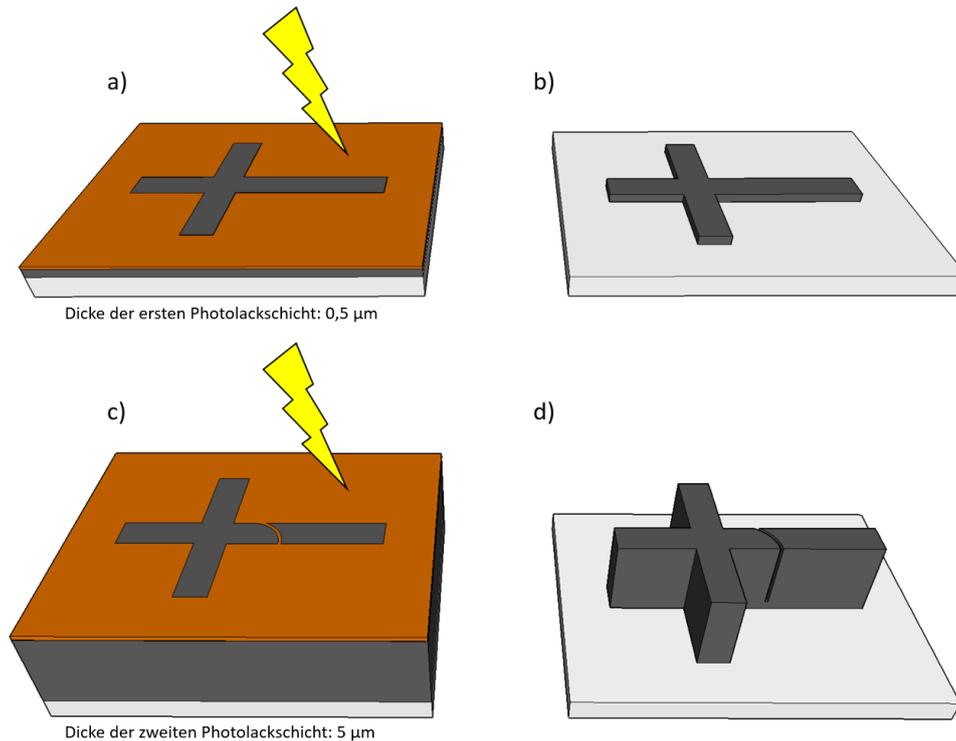


Abbildung 13: Schematische Darstellung der *Masterwafer*-Produktion. a) Die erste Photolackschicht (dunkelgrau) wurde mittels *Spincoating* auf einen Silizium-*Wafer* (hellgrau) aufgetragen und durch eine Chrommaske (braun) belichtet, um die Höhe des Spaltes über der Barriere und das grundlegende Kanallayout zu definieren. b) Silizium-*Wafer* mit erster Photolackschicht nach der Entwicklung. c) Die zweite Photolackschicht wurde mittels *Spincoating* aufgetragen und durch eine Chrommaske belichtet, um die Form der Barriere und die freie Kanalhöhe zu definieren. d) *Masterwafer* mit negativer Reliefstruktur, fertig für die Beschichtung mit PDMS.

Für die Herstellung des *Masterwafers* wurde zunächst ein Silizium-*Wafer* (CrysTec, Deutschland) in Peroxomonoschwefelsäure gereinigt. Hierzu wurden ein Teil Wasserstoffperoxid (30 %, VWR, Deutschland) und zwei Teile Schwefelsäure (95 %, VWR, Deutschland) zusammengegeben. Anschließend wurde der *Wafer* zweimal für 5 min in das Säurebad gegeben, danach gründlich mit Reinstwasser (Anlagenlieferant: Millipore, Deutschland) abgespült und für 5 min in ein Reinstwasserbad gelegt. Der letzte Schritt erfolgte ebenfalls zweimal. Das auf dem *Wafer* verbliebene Wasser wurde durch Zentrifugation (Delta10, Ble-Laboratory Equipment, Deutschland) bei 3000 rpm und 30 s und anschließendes Trocknen auf einer Heizplatte (HAT-303 D, ATV Technologie, Deutschland) bei 200 °C für 15 min entfernt.

Für die erste Schicht des Photolacks, deren Dicke die spätere Höhe des Spaltes über der Barriere bestimmt, wurde SU8 (0,28) Photolack (Microresist, Deutschland) verwendet. Dieser wurde durch *Spincoating* (Convac, Deutschland) bei 1000 rpm für 30 s auf den *Wafer* aufgebracht, um eine Schichtdicke von 0,5 μm zu erreichen. Anschließend wurde der Photolack für 1 min bei 65 °C auf der Heizplatte vorgebacken. Danach wurde der *Wafer* belichtet. Dazu wurde eine mit Chrom beschichtete Glasmaste (Delta Mask, Niederlande), bei der die zu belichtenden Bereiche ausgespart waren, über den *Wafer* gelegt. Die Belichtung erfolgte für 1,7 s im Parallelbelichter (MJB3, Süss MicroTec, Deutschland) durch eine Quecksilberlampe. Der erste Schritt der Photolithographie diente dazu, das grundlegende Kanallayout und die Höhe des Spaltes über der Barriere zu definieren. Anschließend wurde der *Wafer* auf einer programmierbaren Heizplatte (PR 5 SR, Detlef Gestigkeit Elektrotechnik, Deutschland) gebacken. Diese erhitzte den *Wafer* zunächst innerhalb von 5 min auf 40°C und hielt diese Temperatur für 1 min, anschließend wurde die Temperatur innerhalb von 10 min auf 65 °C erhöht und für 5 min gehalten. Zum Schluss wurde die Temperatur innerhalb von 10 min auf 95 °C erhöht und für 3 min gehalten. Nach dem Abkühlen des *Wafers* wurde dieser für 1 min in mr-Dev 600 Entwickler (Microresist, Deutschland) entwickelt, um den nicht-belichteten Photolack zu entfernen, sodass nur noch das Negativ der Kanalstrukturen auf dem *Wafer* zurück blieb. Danach wurde der *Wafer* mit Aceton (absolut, Fisher Scientific, Vereinigtes Königreich) und Isopropanol (absolut, VWR, Deutschland) gewaschen und mit Stickstoff (Linde, Deutschland) getrocknet. Die Höhe der aufgetragenen Schicht wurde mit Hilfe eines Profilometers (DekTak 3030 ST, Stanford Nanofabrication Facility Equipment, USA) bestimmt.

Vor dem Aufbringen der zweiten Photolackschicht, deren Dicke zusammen mit der Dicke der ersten Schicht die Kanalhöhe definiert, wurden zunächst die Passermarken mit durchsichtigem Klebeband abgeklebt, damit diese nicht mit Photolack bedeckt wurden. Die zweite Beschichtung erfolgte mit SU8 (5) Photolack (Microresist, Deutschland) bei 3000 rpm für 30 s im *Spincoater*, um eine Schichtdicke von 5 μm zu erreichen. Das Vorbacken erfolgte auf der programmierbaren Heizplatte mit demselben Temperaturverlauf wie beim Backen nach der ersten Belichtung. Das aufgetragene Klebeband wurde entfernt, sobald die Temperatur der Heizplatte 65 °C betrug. Anschließend wurde eine andere Chrommaske (Delta Mask, Niederlande) auf den *Wafer* aufgebracht. Die Aussparungen auf dieser Maske definierten dabei die Form der Barriere. Die Belichtung erfolgte aufgrund der höheren Schichtdicke des Fotolacks für 7 s. Nach der Belichtung wurde der *Wafer* erneut gebacken, dies erfolgte wiederum auf der programmierbaren Heizplatte mit demselben Temperaturverlauf wie zuvor. Das Entwickeln des *Wafers* wurde analog zur ersten Belichtung durchgeführt und die Qualität der Strukturen unter dem Mikroskop überprüft. Zuletzt wurde der *Wafer* silanisiert. Hierfür wurde er zunächst für 15 min bei 200 °C gebacken und danach zusammen mit 9 μL Tridecafluor-1,1,2,2-

tetrahydrooctyltrichlorsilan (TTTS) (97 %, abcr, Deutschland) in den Exsikkator gegeben. Dieser wurde für 30 min evakuiert und das Vakuum anschließend für 30 min gehalten.

3.2 Herstellung eines Mikrofluidikchips

Die Mikrofluidikchips wurden mittels Zweischicht-Softlithographie hergestellt (vgl. Abbildung 14). Aufgrund der für die Untersuchung von DNA notwendigen kleinen Strukturen bestanden die verwendeten Mikrofluidikchips aus zwei verschiedenen Polydimethylsiloxan (PDMS)-Schichten. Bei der unteren PDMS-Schicht handelte es sich um hartes PDMS (h-PDMS). Dieses ist härter als das weiche PDMS (w-PDMS), stabilisiert die Barriere und verhindert, dass diese kollabiert. Das h-PDMS ist allerdings spröde und bricht somit schnell. Als zweite Schicht wurde deshalb w-PDMS verwendet. Dieses stabilisierte das h-PDMS und verhinderte so Brüche und Risse im Material.

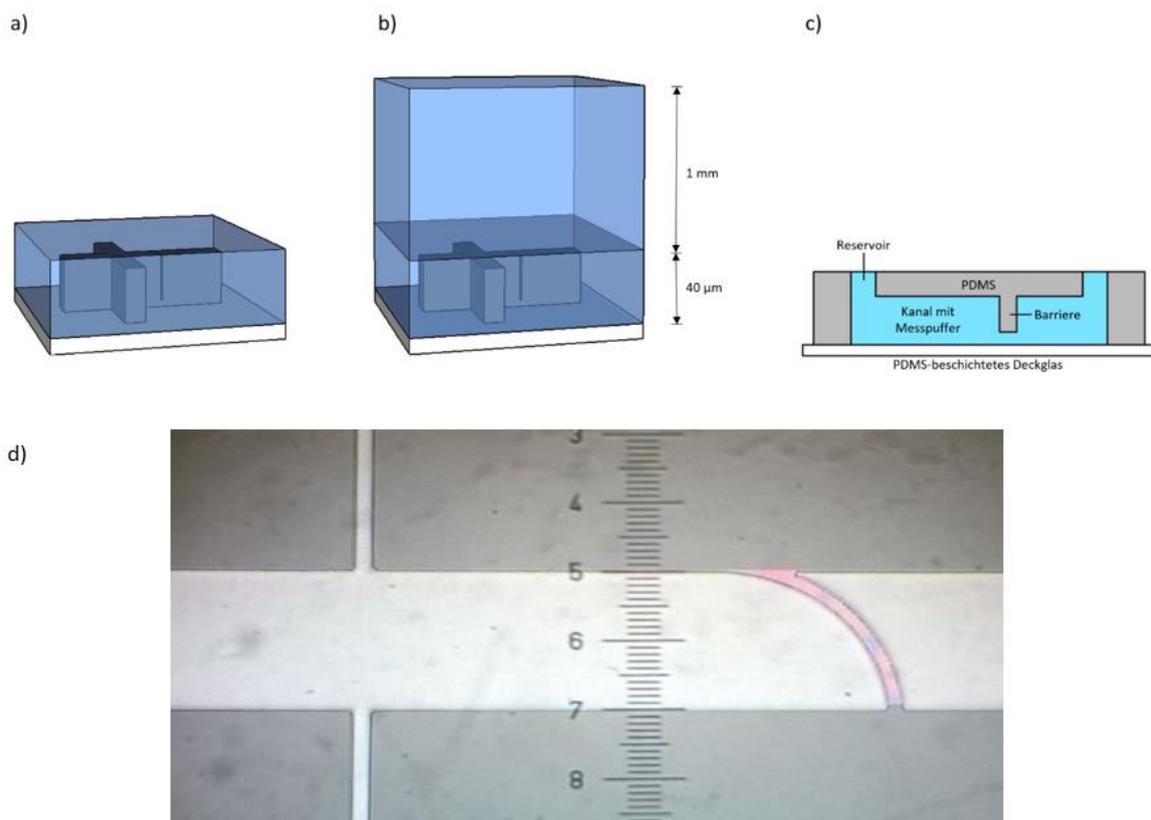


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Zweischicht-Softlithographie und mikroskopische Aufnahme des Kreuzungsbereiches sowie der Barriere innerhalb des verwendeten Mikrofluidikkanals. Aus Darstellungsgründen sind die Schichtdicken des h- und w-PDMS in Abbildung a) und b) nicht maßstabsgetreu abgebildet. Der tatsächliche Maßstab ist der Abbildung zu entnehmen. **a)** Die erste Schicht bestand aus h-PDMS und diente der Stabilisierung der Barriere. **b)** Die zweite Schicht bestand aus w-PDMS und diente der Stabilisierung der ersten Schicht. **c)** Querschnitt des fertig zusammengesetzten PDMS-Chips. Zu erkennen sind der PDMS-Chip (grau), das mit PDMS beschichtete Deckglas (weiß) und der mit Messpuffer gefüllte Kanal (blau). Weiterhin sind die Reservoirs und die Barriere dargestellt. **d)** Kreuzungsbereich und Barriere der verwendeten Kanalstrukturen. Die Aufnahme wurde mit 20-facher Vergrößerung angefertigt, eine Längeneinheit entspricht 50 μm . Die Breite des verwendeten Kanals betrug 100 μm (waagrecht) und 10 μm (senkrecht). Die Breite der bogenförmigen Barriere betrug 10 μm .

Für die Herstellung des h-PDMS wurden 3,4 g *Vinylmethylsiloxane-dimethylsiloxane trimethylsiloxo terminated copolymer* (abcr, Deutschland), 17 μL *Platinum-divinyltetramethyldisiloxane complex* (abcr, Deutschland) und ein Tropfen *2,4,6,8-Tetramethyl-2,4,6,8-tetravinylcyclotetrasiloxane* (Aldrich, USA) vermischt. Vor dem Auftragen durch *Spincoating* für 10 s bei 1500 rpm wurde 1 mL (25-35 % *Methylhydrosiloxane*)-*dimethylsiloxane copolymer* (abcr, Deutschland) zugegeben. Danach wurde der *Wafer* für 3 min bei 65 °C gebacken.

Anschließend wurde das w-PDMS aufgetragen. Hierzu wurden 7mL *Sylgard 184 Silicone Elastomer* (Dow Corning, USA) und 0,7 mL *Sylgard 184 Silicone Elastomer Curing Agent* (Dow Corning, USA) vermischt, über den *Wafer* gegeben und abgewartet, bis das w-PDMS blasenfrei den gesamten *Wafer* bedeckte. Danach wurde der *Wafer* für 40 min bei 65 °C gebacken.

Nach dem Backen wurde das PDMS vom *Wafer* abgezogen, ohne dieses zu biegen [35]. Die benötigten Strukturen wurden ausgeschnitten und Löcher an die Kanalenden gestanzt, welche als Zugang zum Kanal dienten. Danach wurde das ausgeschnittene PDMS nacheinander in Aceton, Ethanol und Reinstwasser für jeweils 10 s im Ultraschallbad (T490A, Elma, Deutschland) gereinigt und mit Stickstoff getrocknet.

Es wurden zusätzlich mit w-PDMS beschichtete Deckgläser (Thermo Scientific, Menzel-Gläser, Deutschland) benötigt. Dazu wurden 0,8 mL w-PDMS mittels *Spincoating* bei 3000 rpm für 30 s auf ein Deckglas aufgetragen und anschließend bei 65°C für 10 min gebacken.

Sowohl die gereinigten PDMS-Ausschnitte als auch die mit PDMS beschichteten Deckgläser wurden mit Hilfe einer selbstgebauten Plasmakammer [36] oxidiert. Hierzu wurde die Plasmakammer zunächst bis auf $5 \cdot 10^{-2}$ mbar evakuiert und anschließend für 2 min mit $6 \cdot 10^{-1}$ mbar mit Sauerstoff (Linde, Deutschland) durchströmt. Die Plasmaoxidation erfolgte anschließend bei 10^{-1} mbar für 30 s. Die PSMS-Ausschnitte befanden sich dabei mit der Kanalseite nach oben auf dem Probenhalter. Direkt im Anschluss wurden die PDMS-Ausschnitte auf die Deckgläser aufgebracht, um die Kanalstruktur zu verschließen. Durch die vorangegangene Plasmaoxidation bildeten sich zwischen den beiden PDMS-Schichten kovalente Bindungen aus, sodass die Chips nach 30 min mit Puffer, welcher *F108-Coating* beinhaltet, befüllt werden konnten. Zur Herstellung des Puffers wurden 0,073 g Pluronic F108 (BASF, Deutschland) mit 10 mL einer 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Reinstwasser-Lösung beziehungsweise einer 1 mM EDTA-Phosphatpuffer-Lösung (Sigma-Aldrich, Deutschland) gelöst, wobei Phosphatpuffer unterschiedlicher Konzentrationen verwendet wurden (vgl. Abschnitt 3.5). Für alle Messungen wurde eine Mischung aus statischem und dynamischem *Coating* verwendet. Hierzu wurde der Puffer mindestens 20 h [14] im Kanal inkubiert, bevor eine Messung erfolgte.

3.3 Präparation der DNA

Als Stammlösung wurde eine cccDNA-Probe der Firma PlasmidFactory mit einer Konzentration von 1 mg mL^{-1} verwendet. Mit einer Länge der DNA von 7164 bp entspricht diese Konzentration einer molaren Konzentration von $0,221 \text{ }\mu\text{M}$ DNA.

Zunächst wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:10 mit einer 1 mM EDTA-Reinstwasser-Lösung verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurde $1 \text{ }\mu\text{L}$ entnommen und mit $1,52 \text{ }\mu\text{L}$ einer $10 \text{ }\mu\text{M}$ YOYO-1 Iodid-Lösung (Molecular Probes, Niederlande) vermischt. Dies entspricht einem Verhältnis der Anzahl der YOYO-1-Moleküle zur Anzahl der Basenpaare von 1:10. Der Ansatz wurde für 2 h auf einem Vortexer (G-560E, Scientific Industries Laboratory Equipment, USA) auf kleinster Stufe inkubiert. Für die Messungen wurde der Fluoreszenz-markierte DNA-Ansatz mit dem Messpuffer auf eine Konzentration von $0,111 \text{ pM}$ DNA verdünnt.

3.4 Experimenteller Aufbau

Für die Darstellung der mit YOYO-1 markierten DNA wurde ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Zeiss, Deutschland) mit motorisierter XY-Stage verwendet. Die Probe wurde durch eine Quecksilberdampflampe (HBO50, Zeiss, Deutschland) belichtet. Alle Experimente wurden mit einem $100\times$ Ölimmersionsobjektiv (PLAN Neofluar, NA 1.3, Zeiss, Deutschland) und einem YOYO-1-Filtersatz, bestehend aus den Filtern BP 450-490, BP 515-565 und FT 510 (Zeiss, Deutschland), sowie einem Graufilter mit 25 % Transmission durchgeführt. Die Aufnahme des Bildmaterials erfolgte mittels einer SensiCam (PCO, Deutschland) und dem Programm DaVis 6.2 (LaVision, Deutschland) bei einem *Binning* von $x = 8$ und $y = 8$ sowie einer Belichtungszeit von 100 ms. Der PDMS-Chip wurde mit Hilfe eines Polymethylmethacrylat (PMMA)-Halters mit eingelassenen Platinelektroden und Reservoirzugängen auf der Stage fixiert (vgl. Abbildung 15).

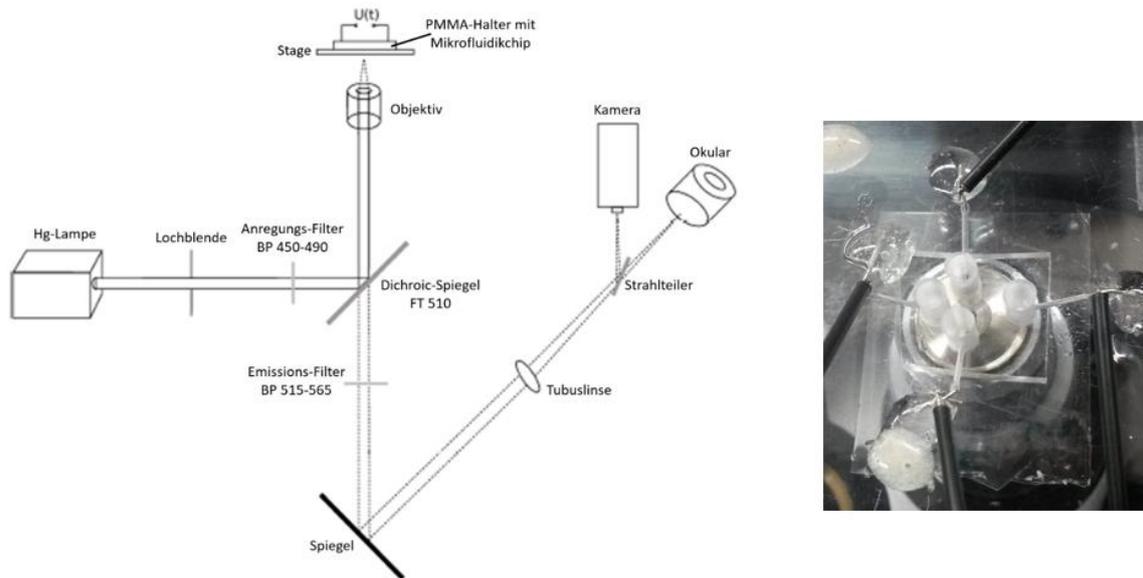


Abbildung 15: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. Links: Für alle Experimente wurde ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop mit dem dargestellten Aufbau verwendet. Rechts: Der PDMS-Chip wurde mit Hilfe eines PMMA-Halters auf der *Stage* angebracht und an die Spannungsquellen angeschlossen [3].

Für die Erzeugung der Gleichspannung wurden FUG-Spannungsquellen (HCL 14-12500, Deutschland) verwendet. Die Erzeugung der Wechsellspannung erfolgte mit einem ADwin-Gold II Funktions-Generator (Jäger, Deutschland) und wurde durch einen AMT-1B60-L (230V) Verstärker (Matsusada Precision, Japan) 100-fach verstärkt. Zur Steuerung der Spannungen und der Frequenz wurde ein angepasstes LabView 9.0.1 Programm verwendet.

3.5 Durchführung des Experimentes

15 μL DNA-Probe wurden in Reservoir 2 pipettiert. Die anderen Reservoirs wurden jeweils mit 15 μL Messpuffer befüllt. Anschließend wurden alle Reservoirs mit einem PDMS-Block abgedichtet, um die Verdunstung der Probe und des Messpuffers, welche während der Messung durch *Joule-Heating* hervorgerufen wird, zu verringern.

Die Kontaktierung des Mikrofluidikchips, die Nomenklatur der Reservoirs sowie das gewünschte Flussprofil der DNA sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

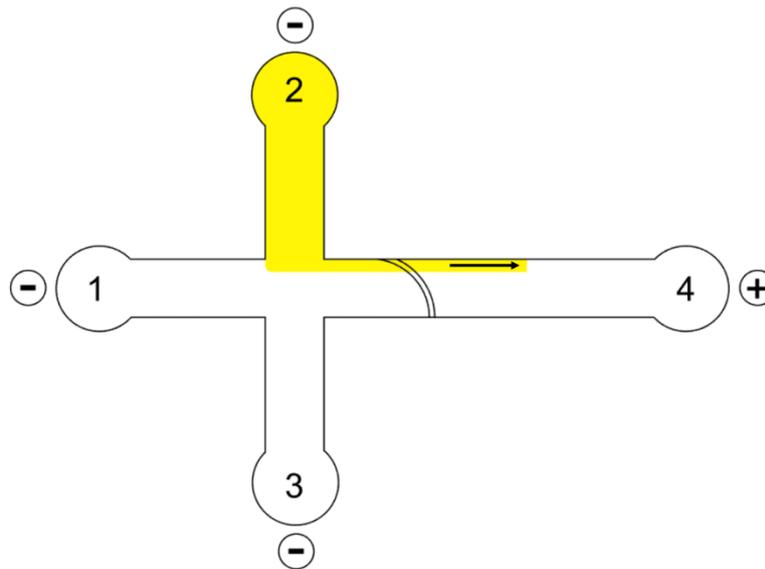


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Kanallayouts mit verwendeter Nomenklatur der Reservoirs und Flussprofil. In Reservoir 2 befand sich die DNA-Probe, in den Reservoiren 1, 3 und 4 befand sich jeweils Messpuffer. An Reservoir 4 wurde eine positive Gleichspannung und an die übrigen Reservoirs eine negative Gleichspannung angelegt, um die DNA aus Reservoir 2 und entlang der Kanalwand zu strömen. Für die Erzeugung des dielektrischen Potentials wurde an Reservoir 4 zusätzlich eine Wechselspannung angelegt.

Für die Erzeugung eines kontinuierlichen Flusses in Richtung der Barriere wurde an das Reservoir 4 eine positive Gleichspannung angelegt. An die anderen Reservoirs wurde jeweils eine negative Gleichspannung angelegt. Die Spannungen wurden so variiert, dass sich ein kontinuierlicher schmaler Fluss der DNA entlang der Kanalwand ausbildete, welcher nicht mehr als ein Drittel der Kanalbreite betrug.

Anschließend wurde am Reservoir 4 zusätzlich eine Wechselspannung angelegt, welche die Gleichspannung überlagerte und so ein dielektrophoretisches Potential an der Barriere erzeugte.

Die für die Ablenkung der DNA benötigten Parameter wurden wie folgt getestet: Zuerst wurde eine Wechselspannung von 50 V angelegt und die Frequenz von 50 Hz bis 700 Hz in 50 Hz-Schritten erhöht. Jede Frequenz wurde dabei für 15 s gehalten. Anschließend wurde die Spannung um 50 V erhöht und wiederum die Frequenz von 50 Hz auf 700 Hz in 50 Hz-Schritten erhöht. Diese Sequenz wurde wiederholt, bis eine Spannung von 900 V erreicht war. Ein Messabschnitt umfasste dabei drei Spannungsschritte, um die Auswirkungen des *Joule-Heatings* zu reduzieren. Zudem wurde zwischen den einzelnen Messabschnitten ungefähr 2 min abgewartet, um den Chip abkühlen zu lassen. Für jede Pufferkonzentration wurden drei Messreihen durchgeführt. Nach jeder Messreihe wurde 15 min gewartet, bis eine neue Messreihe begonnen wurde, um den Chip abkühlen zu lassen. Das Labor wurde zusätzlich auf 20 °C temperiert. Alle Messungen einer Konzentration wurden direkt hintereinander im selben Chip durchgeführt. Während der Durchführung der drei Messreihen einer Konzentration wurde

die angelegte Gleichspannung nicht verändert. Sie unterschied sich jedoch bei den Messungen der einzelnen Konzentrationen, da das Flussprofil jeweils angepasst werden musste.

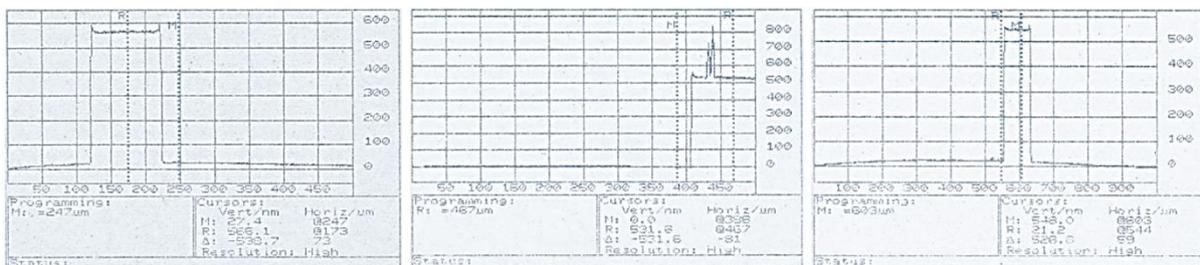
Anschließend wurde die Ablenkung der DNA an der Barriere bei verschiedenen Leitfähigkeiten des Messpuffers untersucht. Hierzu wurde das *F108-Coating* in 0,2 mM, 0,4 mM und 0,6 mM Phosphatpuffer angesetzt.

4 Auswertung und Diskussion

4.1 Herstellung des Masterwafers

Die Vermessung der Höhe der ersten Photolackschicht mittels Profilometer ergab eine Höhe von $532,4 \text{ nm} \pm 4,9 \text{ nm}$ (vgl. Abbildung 17 a). Diese Höhe entspricht im Mikrofluidikchip der Höhe des Spaltes über der Barriere. Die Höhe des freien Kanals, welche der Gesamthöhe der ersten und zweiten Photolackschicht entspricht, beträgt $5267,0 \text{ nm} \pm 2,8 \text{ nm}$ (vgl. Abbildung 17 b). Das Verhältnis der Höhe des freien Kanals und der Höhe des Spaltes über der Barriere beträgt somit ungefähr 9,9. Je größer dieses Verhältnis ist, desto größer ist der Gradient des elektrischen Feldes und somit die dielektrophoretische Kraft.

a)



b)

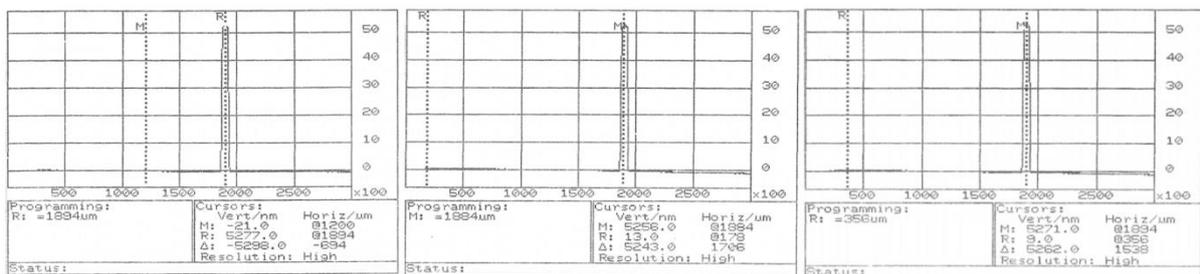


Abbildung 17: Messung der Höhe der Photolackschicht nach der Belichtung der ersten und zweiten Photolackschicht mittels Profilometer. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. **a)** Die Höhe der ersten Photolackschicht, welche die Höhe des Spaltes über der Barriere definiert, beträgt im Mittel $532,4 \text{ nm} \pm 4,9 \text{ nm}$. **b)** Nach der Belichtung der zweiten Fotolackschicht beträgt die Gesamthöhe der ersten und zweiten Photolackschicht und somit die Höhe des freien Kanals im Mittel $5267,0 \text{ nm} \pm 22,8 \text{ nm}$.

4.2 Fluoreszenzmarkierung von cccDNA

Die Fluoreszenzmarkierung der cccDNA wurde wie in Abschnitt 4.2.3 und Abschnitt 3.3 beschrieben mit YOYO-1 durchgeführt. Dabei wurde zunächst kein EDTA hinzugegeben. Dies hatte zur Folge, dass eine Darstellung der cccDNA unter dem Fluoreszenzmikroskop nicht möglich war. Eine Interkalation des YOYO-1 zwischen die Basenpaare der cccDNA hatte vermutlich nicht stattgefunden. Um auszuschließen, dass das verwendete YOYO-1 die Ursache war, wurde eine Fluoreszenzmarkierung von linearer DNA unter denselben Bedingungen durchgeführt. Diese ließ sich im Gegensatz zur cccDNA

problemlos unter dem Fluoreszenzmikroskop darstellen. Nach der Zugabe von EDTA zum cccDNA-Ansatz konnte auch diese erfolgreich fluoreszenzmarkiert werden.

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die räumliche Struktur der cccDNA eine Interkalation des YOYO-1 aufgrund von sterischen Effekten verhindert. So könnte es sein, sich das EDTA an die DNA anlagert, wodurch die Struktur der DNA verändert wird, sodass diese nicht mehr so stark spiralisiert ist. Ein anderer Grund könnte sein, dass die Ionen, die sich an die negative Ladung des DNA-Rückgrats anlagern, durch das EDTA komplexiert werden [37], sodass das positiv geladene YOYO-1 interkalieren kann. Zudem könnte die Komplexbildung der Gegenionen der DNA ebenfalls zu einer räumlichen Veränderung der DNA führen. Zur genaueren Untersuchung des Einflusses von EDTA auf cccDNA wurde diese mittels Rasterkraftspektroskopie (AFM) in Reinstwasser und in einer 1 mM Reinstwasser-EDTA-Lösung dargestellt. Die Konzentration der DNA betrug dabei jeweils 10 ng/μL.

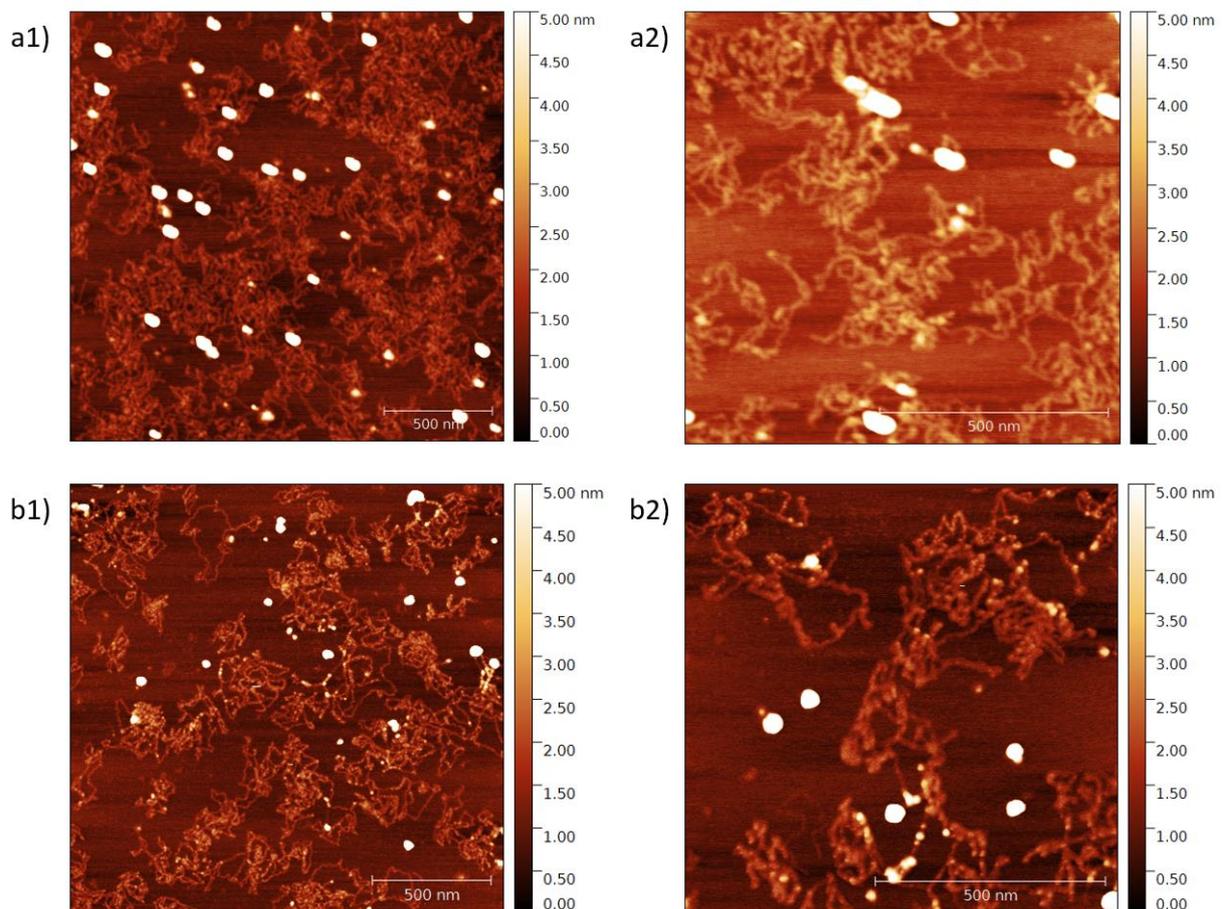


Abbildung 18: Rasterkraftspektroskopische Darstellung von cccDNA. a1) cccDNA in Reinstwasser. **a2)** Vergrößerung der Aufnahme von cccDNA in Reinstwasser. **b1)** cccDNA in 1 mM EDTA-Reinstwasser-Lösung. **b2)** Vergrößerung der Aufnahme von cccDNA in 1 mM EDTA-Reinstwasser-Lösung.

Bei allen Aufnahmen sind deutlich Verunreinigungen innerhalb der Probe erkennbar, welche sich als große weiße Objekte darstellen. Bei der Darstellung dieser sind zudem Spitzenartefakte zu erkennen, welche jedoch keinen Einfluss auf die Darstellung der DNA nehmen. Beim Vergleich der in Abbildung 18 dargestellten rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen von cccDNA in Reinstwasser und einer 1 mM EDTA-Reinstwasser-Lösung fällt auf, dass in Abbildung 18 b1 und Abbildung 18 b2 kugelförmige Objekte an den DNA-Strängen zu erkennen sind. Auch in weiteren Aufnahmen waren diese darstellbar. Dabei könnte es sich um EDTA handeln, welches sich an die DNA angelagert hat. Auch könnte es sein, dass es sich dabei um Verunreinigungen in der Probe handelt, welche sich an die DNA angelagert haben, nachdem das EDTA die Gegenionen des DNA-Rückgrats komplexiert hat. Die Zugabe von EDTA führt demnach zu einer Anlagerung des EDTA an die cccDNA oder zu einer Komplexierung der Gegenionenwolke. Durch eine Strukturveränderung oder eine Freilegung der negativen Ladungen des DNA-Rückgrats kann das YOYO-1 zwischen den Basenpaaren interkalieren. Da diese Strukturveränderung auf Nanoebene erfolgt, ist es möglich, dass sie Einfluss auf das Migrationsverhalten der DNA im Mikrofluidikkanal nimmt.

4.3 Kontaminationen durch Bakterien

Während der Durchführung der Experimente kam es zu einer Kontamination des Messpuffers mit *Escherichia coli*, welche vermutlich über die Pipetten eingebracht wurden, da diese gleichzeitig für Experimente mit diesem Organismus verwendet wurden. Aufgrund der Größe der Zellen von mehreren Mikrometern [20] konnten diese den Spalt über der Barriere mit einer Höhe von rund 530 nm nicht überqueren, verstopften den Kanal und machten den Chip unbrauchbar (vgl. Abbildung 19 und Videosequenzen im Anhang). Zum Zeitpunkt dieser Kontamination befand sich zum einen kein EDTA im Messpuffer und zum anderen wurde ein anderes *Coating* im Messpuffer verwendet. Ein Bestandteil dieses *Coatings* war β -D-Maltosid, welches vermutlich von den Zellen verstoffwechselt werden konnte. Eine Zugabe von 1 mM EDTA zum Messpuffer verhinderte eine erneute Kontamination durch Bakterien, da EDTA ab einer Konzentration von 0,5 mM toxisch für *E.coli* ist [38].

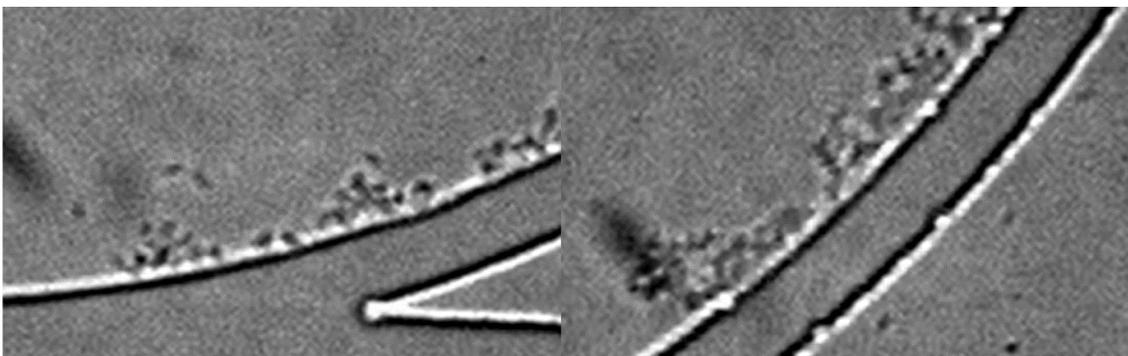


Abbildung 19: Kontamination des Messpuffers mit *E.coli*. Da die Zellen größer sind als der Spalt über der Barriere, sammeln sie sich vor der Barriere und verstopfen den Kanal.

4.4 Einfluss der Konzentration des Messpuffers auf die elektrokinetische und dielektrophoretische Migration

Für die Analyse der elektrokinetischen und dielektrophoretischen Migration von *Minicircle*-DNA bei verschiedenen Konzentrationen des Messpuffers wurde das Migrationsverhalten der DNA an der Barriere für einen Wechselspannungsbereich von 50 V bis 900 V und einen Frequenzbereich von 50 Hz bis 700 Hz mit Hilfe von Videoaufnahmen dokumentiert. Das genaue Vorgehen wurde bereits in Abschnitt 3.5 erläutert. Die angelegten Gleichspannungen für die einzelnen Messungen sind im Anhang in Tabelle 5 bis Tabelle 10 dargestellt.

Für die Auswertung der Videoaufnahmen wird das Migrationsverhalten der DNA in sechs verschiedene Bereiche unterteilt. Die unterschiedlichen Bereiche werden wie folgt farbkodiert:

Tabelle 1: Farbkodierung für die Auswertung des Migrationsverhaltens der *Minicircle*-DNA im Bereich der Barriere.

dunkelrot	Es werden keine DNA-Moleküle an der Barriere abgelenkt . Alle DNA-Moleküle passieren die Barriere ungehindert.
hellrot	Es werden einzelne DNA-Moleküle an der Barriere abgelenkt . Der Großteil der DNA-Moleküle passiert die Barriere ungehindert.
orange	Übergang zwischen dem hellroten und hellgrünen Bereich. Im Mittel wird die Hälfte der DNA-Moleküle an der Barriere abgelenkt .
hellgrün	Alle DNA-Moleküle werden an der Barriere abgelenkt .
dunkelgrün	Alle DNA-Moleküle werden an der Barriere abgelenkt . Die Geschwindigkeit der DNA-Moleküle auf der Barriere ist deutlich schneller als im hellgrünen Bereich.
gelb	Die DNA-Moleküle stagnieren in der Mitte und am Ende der Barriere und wandern sehr schnell zurück .

Beispielsequenzen für die einzelnen Bereiche sind auf dem Datenträger im Anhang zu finden.

Für jede der drei Messreihen bei einer Pufferkonzentration wird mit Hilfe der Farbkodierung des Migrationsverhaltens ein DEP-Migrations-Profil erstellt. Hierzu wird die angelegte Wechselspannung in Tabellenform gegen die Frequenz aufgetragen und das Migrationsverhalten bei den einzelnen Spannungs-Frequenz-Kombinationen farblich gekennzeichnet. Die resultierenden DEP-Migrationsprofile sind in Abbildung 21 dargestellt. Zur besseren Übersicht sind diese zudem im Anhang als separater Ausdruck beigelegt.

Die Messungen in 0,0 mM und 0,2 mM Phosphatpuffer wurden zunächst bei Raumtemperatur durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass aufgrund der langen Messzeit von insgesamt 4 h Joule-Heating-Effekte die Messungen erheblich beeinträchtigten. In Abbildung 21 werden diese Messungen als „warm“ bezeichnet. Dargestellt sind jeweils nur die ersten beiden Messreihen, da die dritte Messreihe bei beiden Konzentrationen nicht mehr auswertbar war, da kaum bis keine DNA mehr mittels Elektrophorese in den Kanal geströmt werden konnte. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Flüssigkeit in den Reservoirs trotz des Verschlusses der Öffnungen durch einen PDMS-Block aufgrund

des Joule-Heatings mit der Zeit verdunstet ist. Die Verdunstung erfolgte vermutlich über die Bohrungen der Zugänge für die Elektroden im PMMA-Halter. Ohne einen Verschluss der Reservoirs durch einen PDMS-Block war eine Messung bereits nach 20 min nicht mehr möglich. Die Verdunstung der Flüssigkeit in den Reservoirs wurde nach der Messung zudem an der Unterseite des zum Verschluss der Reservoirs genutzten PDMS-Blocks in Form von Kondensat besonders deutlich. Dies ist in der folgenden Abbildung zu sehen.

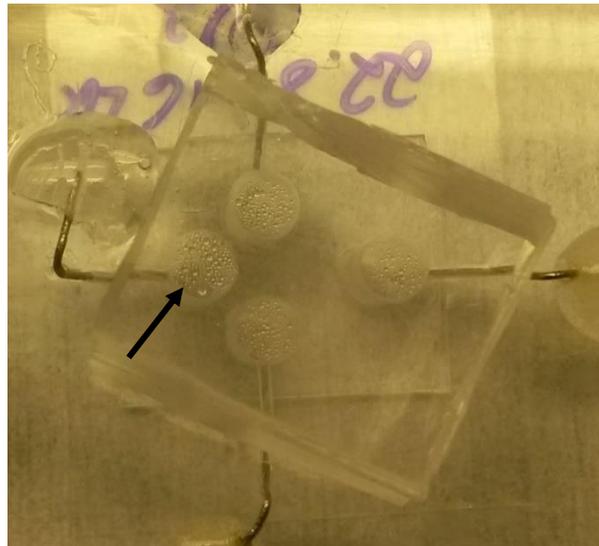


Abbildung 20: Mikrofuidikchip mit Kondensat unter dem zum Verschluss genutzten PDMS-Block nach drei Messreihen.

Weiterhin ist in Abbildung 21 zu erkennen, dass die erste und zweite Messreihe bei Raumtemperatur und einer Messpufferkonzentration von 0,0 mM sehr ähnlich aussehen. Bei der Messung bei Raumtemperatur und einer Messpufferkonzentration von 0,2 mM unterscheiden sich diese jedoch deutlich. Bei der zweiten Messreihe ist im Vergleich zur ersten eine vollständige Ablenkung der DNA (hellgrün) kaum noch vorhanden. Ebenfalls ist der orange Bereich in Bezug auf die Spannung deutlich schmaler. Es scheint eine Abhängigkeit des Joule-Heatings von der Konzentration des Messpuffers zu bestehen. Diese wird später genauer betrachtet.

Die Aufnahme von drei aufeinander folgenden Messreihen im selben Chip war aufgrund des mit der Zeit zunehmenden Joule-Heatings bei Raumtemperatur nicht möglich. Zudem lässt der Vergleich der ersten und zweiten Messreihe bei einer Messpufferkonzentration von 0,0 mM und 0,2 mM darauf schließen, dass das Joule-Heating mit steigender Konzentration des Messpuffers stärker wird, was eine Messung bei höheren Konzentrationen unmöglich macht. Deshalb wurden die Messungen unter Kühlung des Chips durchgeführt. Hierzu wurde das Labor mit Hilfe eines Deckenkühlgerätes auf 20°C temperiert, wobei sich der Chip im direkten Luftstrom des Deckenkühlgerätes befand und somit eine Temperatur von 17 °C am Chip erreicht wurde. Durch die Kühlung konnten drei aufeinander folgende

4.4 Einfluss der Konzentration des Messpuffers auf die elektrokinetische und dielektrophoretische Migration

Messungen im selben Chip sowie Messungen bei höheren Messpufferkonzentrationen durchgeführt werden. Die Messungen unter Kühlung werden in Abbildung 21 als „kalt“ bezeichnet.

4 Auswertung und Diskussion

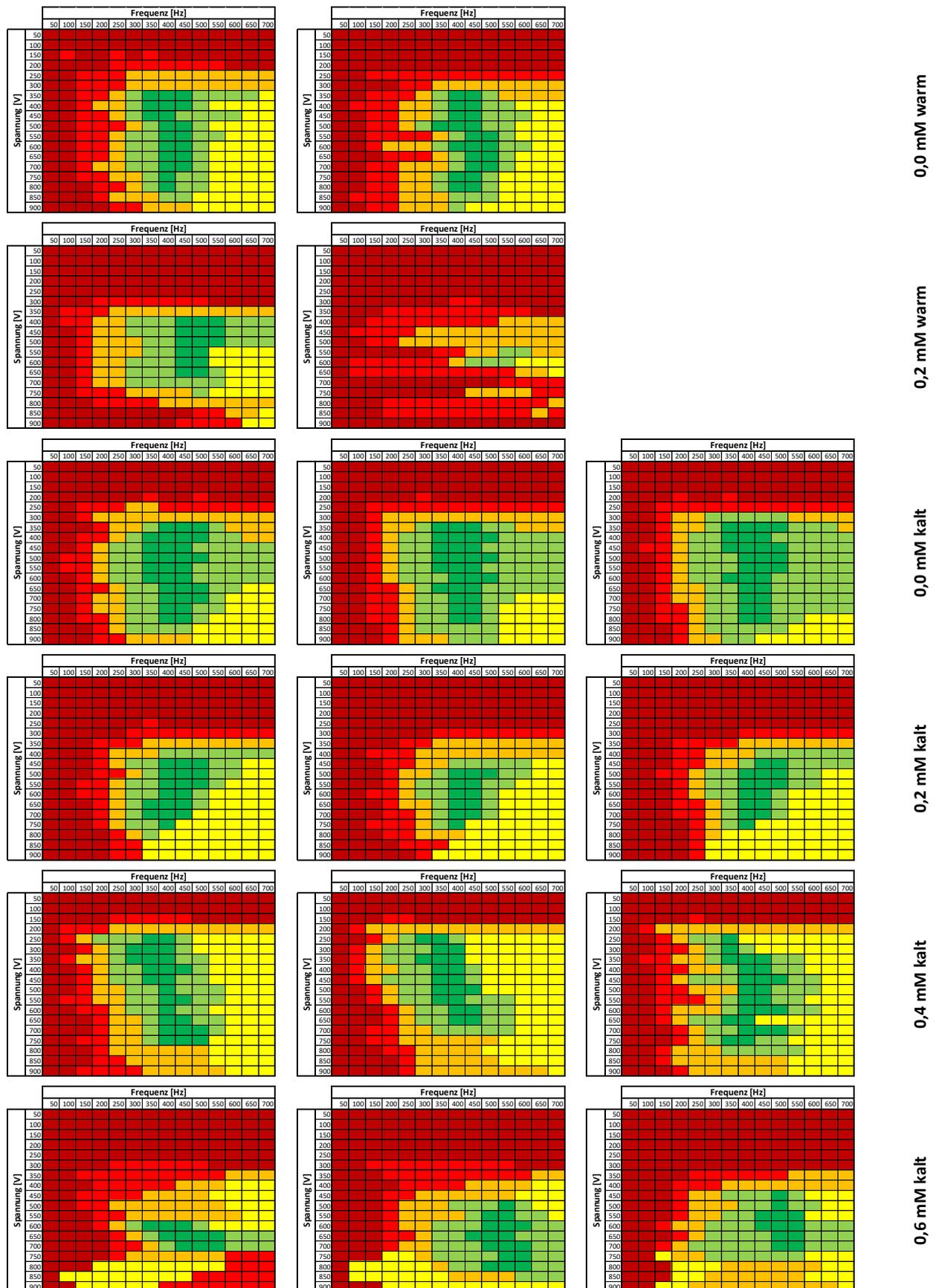


Abbildung 21: DEP-Migrations-Profile für verschiedene Konzentrationen des Messpuffers mit und ohne Kühlung. Dargestellt sind jeweils drei hintereinander im selben Mikrofluidikchip gemessene DEP-Migrations-Profile für die Messpufferkonzentrationen 0,0 mM und 0,2 mM ohne Kühlung (warm) und 0,0 mM, 0,2 mM, 0,4 mM und 0,6 mM mit Kühlung (kalt).

4.4.1 Einfluss des Spannungsbereiches auf die DEP-Migration und Durchführbarkeit der Messungen

Beim Vergleich der DEP-Migrations-Profile in Abbildung 21 fällt auf, dass sich die Grenzen der verschiedenen Bereiche des Migrationsverhaltens sowohl bei verschiedenen Konzentrationen und gleicher Temperatur als auch bei gleicher Konzentration und verschiedener Temperatur unterscheiden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Spannungsbereiche, in denen eine vollständige Ablenkung der DNA stattfindet (hellgrün und dunkelgrün), ist der mittlere Verlauf dieser über alle drei Messreihen, welche bei gleichen DC-Parametern durchgeführt wurden, in Abbildung 22 bis Abbildung 24 dargestellt. Aus Darstellungsgründen werden die Minimalspannungen des hellgrünen und dunkelgrünen Bereiches getrennt dargestellt. Bei der Bestimmung der Minimal- und Maximalspannung U_{min} und U_{max} , zwischen denen die DNA abgelenkt wird, wird die zweite Messreihe bei 0,2 mM und Raumtemperatur sowie die erste Messreihe bei 0,6 mM unter Kühlung aufgrund der deutlichen Abweichung weniger stark gewichtet.

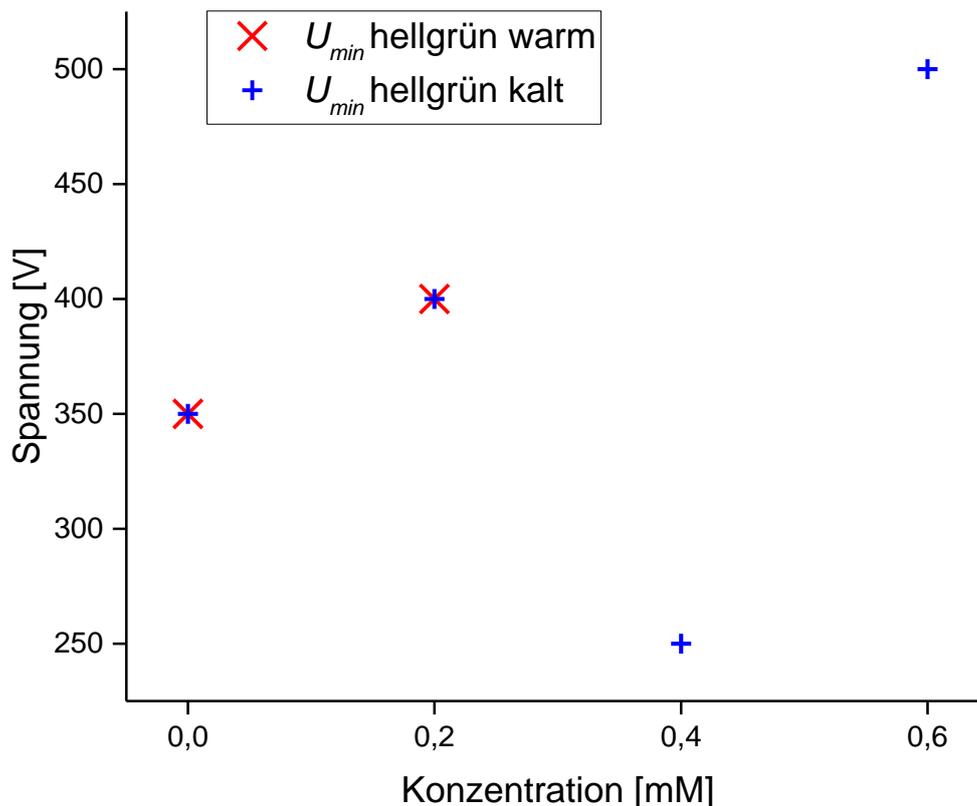


Abbildung 22: Änderung der Minimalspannung U_{min} des hellgrünen Bereiches mit der Konzentration mit und ohne Kühlung.

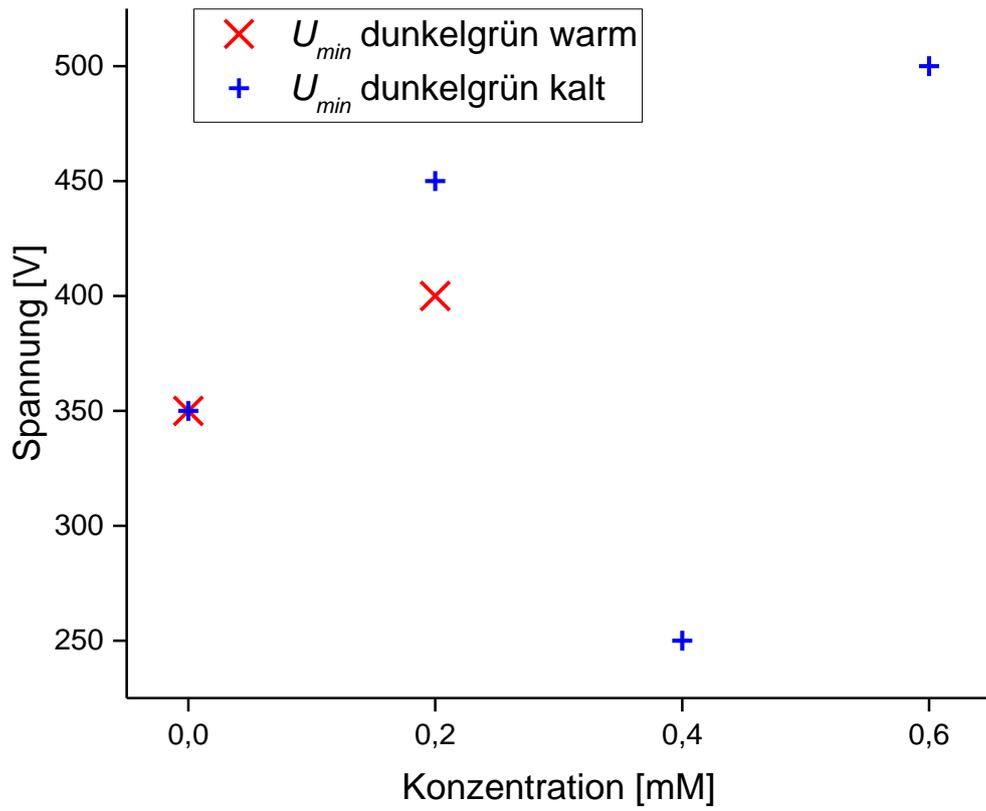


Abbildung 23: Änderung der Minimalspannung U_{min} des dunkelgrünen Bereiches mit der Konzentration mit und ohne Kühlung.

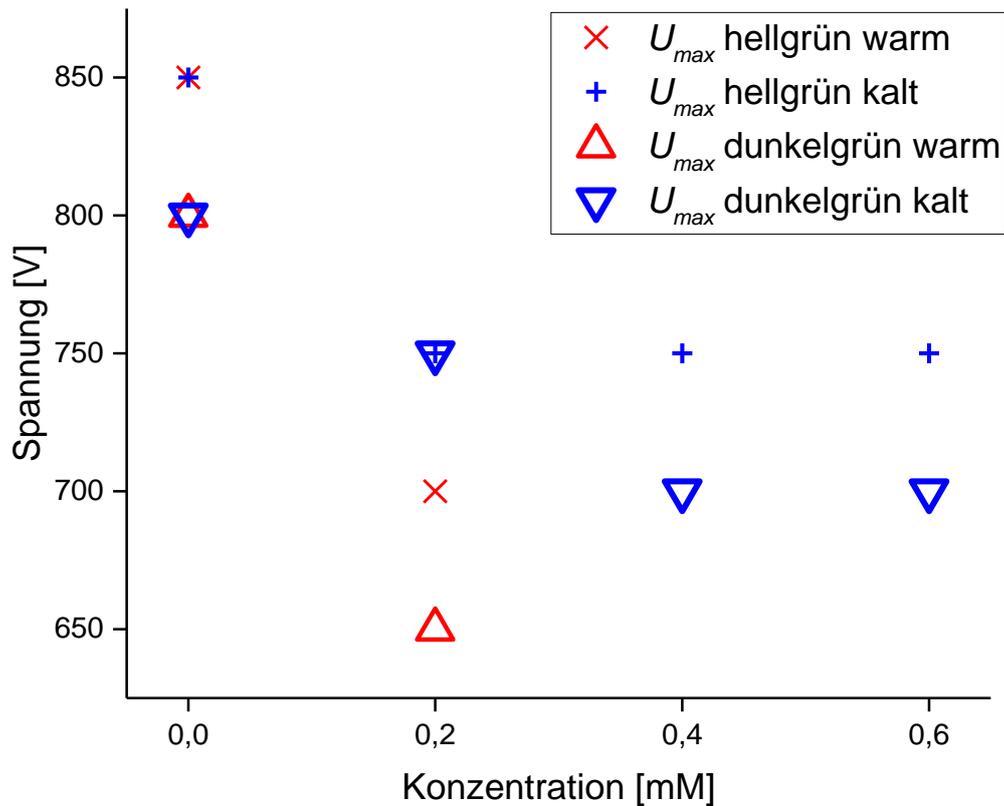


Abbildung 24: Änderung der Maximalspannung U_{max} des hell- und dunkelgrünen Bereiches mit der Konzentration mit und ohne Kühlung.

Beim Vergleich der in Abbildung 22 bis Abbildung 24 dargestellten Änderungen der Minimalspannung U_{min} und Maximalspannung U_{max} der Messungen bei einer Konzentration von 0,0 mM mit und ohne Kühlung fällt auf, dass diese für beide Bereiche übereinstimmen.

Ein Vergleich von U_{min} und U_{max} der Messungen in 0,2 mM Messpuffer mit und ohne Kühlung zeigt, dass bei den Minimalspannungen des hellgrünen Bereiches kein Unterschied besteht. Bei beiden Messungen liegen diese bei 400 V. Die Minimalspannungen des dunkelgrünen Bereiches unterscheiden sich um 50 V. Ohne Kühlung ist eine Minimalspannung von 400 V zu erkennen. Mit Kühlung liegt diese bei 450 V. Die Maximalspannungen für eine Ablenkung unterscheiden sich jedoch deutlich. Mit Kühlung erstrecken sich der hell- und dunkelgrüne Bereich bis zu einer Spannung von 750 V. Ohne Kühlung ist eine vollständige Ablenkung (hellgrün) nur bis 700 V und eine schnelle vollständige Ablenkung (dunkelgrün) bis 650 V möglich. Die Maximalspannung liegt demnach ohne Kühlung niedriger. Theoretisch sollten jedoch gar keine Maximalspannungen vorhanden sein, da die dielektrophoretische Kraft proportional zum elektrischen Feldgradienten ist (vgl. Gleichung 7), welcher mit steigender Spannung zunimmt, sodass die DNA immer stärker gefangen werden sollte. Die Existenz

der Maximalspannung kann dadurch erklärt werden, dass die Joule'sche Wärme proportional zur quadratischen Feldstärke ist (vgl. Gleichung 12). In höheren Spannungsbereichen treten somit verstärkt Joule'sche Effekte auf [9]. Diese führen ebenso wie eine höhere Feldstärke zu einer erhöhten Geschwindigkeit der DNA im Kanal, da die Viskosität des Messpuffers mit der Temperatur abnimmt [10]. Die DNA ist demnach irgendwann zu schnell, um über der Barriere gefangen zu werden. Des Weiteren verringert sich der Gradient des elektrischen Feldes zwischen dem freien Kanal und dem Bereich über der Barriere mit zunehmender Temperatur [10]. In höheren Spannungsbereichen nimmt demnach die dielektrophoretische Kraft ab, da diese proportional zum quadratischen Feldgradienten ist (vgl. Gleichung 7). Für das Entkommen der DNA aus dem Potentialtopf im Randbereich der Barriere muss eine thermische Energie $k_B T$ überwunden werden [3]. Diese wird bei höheren Temperaturen eher erreicht [33]. Die Kühlung reduziert die Joule'schen Effekte, sodass diese einen stärkeren Einfluss auf die Messung ohne Kühlung haben, was sich darin zeigt, dass eine Ablenkung der DNA mit Kühlung noch in Spannungsbereichen möglich ist, in denen ohne Kühlung keine vollständige Ablenkung mehr erreicht wurde.

Der Puffer wird durch Joule'sche Wärme erwärmt. Je länger der Strom anliegt, desto höher steigt die Temperatur [18] (vgl. Gleichung 11). Aus diesem Grund ist jeweils die dritte Messreihe der Messungen ohne Kühlung nicht auswertbar beziehungsweise nicht möglich. Nach einer Messzeit von ungefähr 1 h verringerte sich der DNA-Strom kontinuierlich, bis er nach etwa 2,5 h vollständig versiegte, was eine weitere Messung unmöglich machte. Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, verdunstete während der Messung die Flüssigkeit aus den Reservoirs. Auch dies kann mit der entstehenden Joule'schen Wärme begründet werden. Zudem ist auffällig, dass die zweite Messreihe ohne Kühlung bei einer Konzentration von 0,2 mM deutlich von der ersten abweicht (vgl. Abbildung 21). Diese Abweichung besteht bei der Messung ohne Kühlung und einer Konzentration von 0,0 mM nicht. Joule'sche Effekte führen demnach bei einer Erhöhung der Konzentration deutlich früher zu einer Beeinflussung der Messung, weil die Joule'sche Wärme proportional zur Konzentration des Elektrolyten ist (vgl. Gleichung 12). Messungen bei einer Konzentration von 0,4 mM waren ohne Kühlung gar nicht möglich. Auch war eine Messung nach längerer Ruhezeit in den ohne Kühlung verwendeten Mikrofluidikchips nicht mehr möglich, was darauf schließen lässt, dass die erhöhten Temperaturen im Kanal nicht nur Einfluss auf die Geschwindigkeit der DNA und die Stärke des elektrischen Feldgradienten genommen haben, sondern zusätzlich eine Veränderung des PDMS und somit der Oberfläche des Kanals hervorgerufen haben [3].

Die in Abschnitt 2.3 beschriebene Proportionalität der Joule'schen Wärme zur Konzentration des Elektrolyten zeigt sich ebenfalls im Vergleich der Messungen verschiedener Konzentration bei gleicher Temperatur. Sowohl bei den Messungen ohne Kühlung als auch bei den Messungen mit Kühlung ist

4.4 Einfluss der Konzentration des Messpuffers auf die elektrokinetische und dielektrophoretische Migration

einer Verringerung der maximalen Spannung, bei der eine vollständige Ablenkung der DNA erfolgt, mit der Konzentration festzustellen (vgl. Abbildung 24). Zusätzlich ist diese Verringerung der Maximalspannung ohne Kühlung stärker ausgeprägt. So sinkt diese bei einer Erhöhung der Konzentration von 0,0 mM auf 0,2 mM ohne Kühlung um 150 V (hellgrün) beziehungsweise 200 V (dunkelgrün) ab. Mit Kühlung sinkt sie jedoch nur um 100 V (hellgrün) beziehungsweise 50 V (dunkelgrün) ab. Da die Maximalspannungen der Messungen mit und ohne Kühlung bei einer Konzentration von 0,0 mM zudem nahezu gleich sind, ist davon auszugehen, dass nicht nur eine Erhöhung der Geschwindigkeit der DNA mit der Konzentration (vgl. Gleichung 4 und 5) für die Verschiebung der Maximalspannung verantwortlich ist, sondern auch Joule'sche Effekte daran maßgeblich beteiligt sind. Eine starke Erwärmung des Messpuffers im Kanal wird zudem durch die geringe Wärmeleitfähigkeit von PDMS mit $0,18 \text{ W}^{-1} \text{ K}^{-1}$ [10] im Vergleich zu Glas mit $1,4 \text{ W}^{-1} \text{ K}^{-1}$ [10] gefördert. Eine Wärmeabfuhr erfolgt in den verwendeten Mikrofluidikchips vermutlich über das PDMS-beschichtete Deckglas [10], da dort die PDMS-Schicht im Vergleich zum Rest des Chips dünner ist. Die Etablierung einer Kühlung des Chips wäre demnach sinnvoll, um Messungen über einen längeren Zeitraum und bei höheren Ionen-Konzentrationen zu ermöglichen.

Neben der Verringerung der Maximalspannung mit steigender Konzentration des Messpuffers ist in Abbildung 22 und Abbildung 23 ebenfalls eine Erhöhung der Minimalspannung mit steigender Konzentration bei gleicher Temperatur zu erkennen. Für den hellgrünen Bereich steigt U_{min} sowohl mit als auch ohne Kühlung von 350 V (0,0 mM) auf 500 V (0,6 mM) an. Die Messung bei einer Konzentration von 0,4 mM mit einer U_{min} von 250 V entspricht nicht diesem Verhalten. Die Minimalspannung des dunkelgrünen Bereiches zeigt denselben Verlauf. Aufgrund der nahezu identischen U_{min} bei den Messungen mit und ohne Kühlung ist vermutlich davon auszugehen, dass Joule'sche Effekte in diesen Spannungsbereichen keinen Einfluss nehmen. Vielmehr kann eine Erhöhung von U_{min} mit der Konzentration auf eine Erhöhung der Geschwindigkeit der DNA im Kanal mit der Konzentration zurückgeführt werden, da die Geschwindigkeit proportional zur Konzentration ist (vgl. Gleichung 4 und 5). Die Geschwindigkeiten der DNA bei den einzelnen Messungen wurden anhand der Videoaufnahmen durch Mehrfachbestimmung ermittelt und sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 2: Mittlere Geschwindigkeiten der DNA bei den Messungen mit verschiedenen Messpufferkonzentrationen mit (blau) und ohne Kühlung (rot) und Standardabweichung.

Konzentration [mM]	mittlere Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]
0,0	$51,1 \pm 4,7$
0,2	$57,2 \pm 3,0$
0,0	$54,6 \pm 1,6$
0,2	$63,9 \pm 4,8$
0,4	$37,9 \pm 2,2$
0,6	$109,7 \pm 8,2$

In Tabelle 2 ist zu erkennen, dass die Geschwindigkeiten der DNA bei einer Konzentration von 0,0 mM und 0,2 mM unter Berücksichtigung der Standardabweichung für beide Temperaturen ähnlich sind. Dies spiegelt sich darin wieder, dass bei diesen Temperaturen kein Unterschied in den unteren Spannungsgrenzen zu erkennen ist. Zudem ist ein Anstieg der Geschwindigkeit mit der Konzentration erkennbar. Wären alle Messungen unter denselben Gleichspannungsparametern durchgeführt worden, wäre ein linearer Anstieg der Geschwindigkeit mit der Konzentration zu erwarten. Da jedoch für die Messung der einzelnen Konzentrationen jeweils ein neuer Mikrofluidikchip verwendet wurde, mussten die angelegten Gleichspannungen aufgrund von Oberflächeneffekten für jeden Mikrofluidikchip angepasst werden, um das gewünschte Flussprofil zu erhalten. Dies hatte zur Folge, dass die Messungen der einzelnen Konzentrationen in verschieden starken elektrischen Feldern durchgeführt wurden. Dadurch ist der Anstieg der Geschwindigkeit mit der Konzentration nicht linear.

Während zwischen den Messungen bei Messpufferkonzentrationen von 0,0 mM und 0,2 mM unter Kühlung ein Anstieg der Geschwindigkeit von ungefähr $54,6 \mu\text{m/s}$ auf etwa $63,9 \mu\text{m/s}$ vorliegt, liegt die Geschwindigkeit der DNA bei einer Konzentration von 0,6 mM bei ungefähr $109,7 \mu\text{m/s}$. Wäre der Anstieg der Geschwindigkeit linear, sollte sie jedoch bei ungefähr $83 \mu\text{m/s}$ liegen. Dies könnte dazu geführt haben, dass der Spannungsbereich der Ablenkung im Gegensatz zu einer Messung bei derselben Konzentration mit einer zu erwartenden Geschwindigkeit um $83 \mu\text{m/s}$ leicht verschoben ist. Zur Überprüfung der Spannungsbereiche müssten weitere Messreihen durchgeführt werden, bei der die Geschwindigkeit der DNA den erwarteten Werten entspricht. Die Geschwindigkeit der DNA bei einer Konzentration von 0,4 mM mit $37,9 \mu\text{m/s}$ passt ebenfalls nicht zu dem erwarteten monotonen Anstieg der Geschwindigkeit mit der Temperatur. Sie ist sogar deutlich geringer als die Geschwindigkeit der DNA bei einer Konzentration von 0,0 mM. Dies ist eine mögliche Erklärung für die von der Tendenz abweichenden Spannungsminima der Messung bei einer Konzentration von 0,4 mM.

Um zu überprüfen, ob die nicht gegebene Linearität der Geschwindigkeit mit der Konzentration allein auf die anliegenden elektrischen Felder zurückgeführt werden kann, wird die elektrophoretische Mobilität (vgl. Tabelle 4) für die Messungen in verschiedenen Pufferkonzentrationen berechnet

4.4 Einfluss der Konzentration des Messpuffers auf die elektrokinetische und dielektrophoretische Migration

(vgl. Gleichung 5). Hierzu werden die elektrischen Felder vor der Barriere aus den im Anhang aufgelisteten Gleichspannungen mit Hilfe eines Äquivalenzschaltbildes berechnet (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3: Berechnete Stärke der elektrischen Felder vor der Barriere bei den Messungen der einzelnen Konzentrationen mit (blau) und ohne Kühlung (rot).

Konzentration [mM]	E-Feld [V/m]
0,0	2020
0,2	2875
0,0	4195
0,2	4040
0,4	1165
0,6	1475

Tabelle 4: Berechnete elektroforetische Mobilität der DNA während der Messungen unter verschiedenen Messpufferkonzentrationen mit (blau) und ohne Kühlung (rot).

Konzentration [mM]	elektroforetische Mobilität $\cdot 10^{-8}$ [m ² /(V·s)]
0,0	2,5
0,2	1,9
0,0	1,3
0,2	1,6
0,4	3,3
0,6	7,4

Entsprechend Gleichung 4 ist ein linearer Anstieg der elektroforetischen Mobilität mit der Leitfähigkeit und somit mit der Konzentration des Puffers zu erwarten. In Tabelle 4 ist jedoch zu erkennen, dass dies nicht der Fall ist. Die elektroforetische Mobilität ist bei Raumtemperatur und einer Konzentration von 0,2 mM geringer als bei einer Konzentration von 0,0 mM. Auch ist der Anstieg der elektroforetischen Mobilität mit der Konzentration unter Kühlung nicht linear, sondern eher exponentiell. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass neben den unterschiedlichen elektrischen Feldern andere Effekte Einfluss auf die Geschwindigkeit der DNA genommen haben. Zum einen haben Oberflächeneffekte aufgrund der geringen Dimensionen des Kanals und der Barriere im Mikro- und Nanometerbereich einen starken Einfluss auf die Migration der DNA im Kanal [3], zum anderen treten Joule'sche Effekte mit steigender Konzentration vermehrt auf.

Ein weiterer Grund für den Anstieg der Minimalspannung mit der Konzentration ist die Debye-Länge der Gegenionenwolke um die DNA. Diese nimmt mit zunehmender Ionenstärke ab [7, 39, 40]. Dies führt dazu, dass die Polarisierbarkeit der DNA mit steigender Konzentration des Messpuffers abnimmt [41, 42]. Da die dielektrophoretische Kraft proportional zur Polarisierbarkeit des Partikels ist (vgl. Gleichung 7), sind mit steigender Konzentration des Messpuffers höhere Spannungen nötig, um die DNA zu fangen.

4.4.2 Frequenzabhängigkeit der dielektrophoretischen Migration

Neben der Veränderung der Spannungsgrenzen mit der Konzentration ist in Abbildung 21 eine Frequenzabhängigkeit der DEP-Migration zu erkennen. In der Theorie werden niedrige Frequenzen < 10 kHz mit Null approximiert, sodass in diesem Bereich eine Frequenzunabhängigkeit der Migration bestehen sollte [17]. Eine vereinzelte Ablenkung der DNA (hellroter Bereich) tritt jedoch erst ab einer Frequenz von 150 Hz bis 200 Hz auf, eine vollständige Ablenkung (hellgrün) ab 300 Hz bis 350 Hz und eine vollständige schnelle Ablenkung (dunkelgrün) ab ungefähr 400 Hz (vgl. Abbildung 21). Zu erwarten wäre jedoch gewesen, dass die Ablenkung der DNA für eine feste Wechselspannung immer gleich gut oder schlecht erfolgt, das heißt durchgehend einen Farbbereich aufweist.

Ein möglicher Grund für die Frequenzabhängigkeit der DEP-Migration könnte die Potentiallandschaft an der Barriere sein. Da die DNA für die gewählten Parameter der Wechselspannung positive Dielektrophorese aufweist, erfährt diese an den Rändern der Barriere jeweils ein Potentialminimum [3]. Durch den DC-Offset wird der Potentialverlauf gekippt [43]. Dies ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

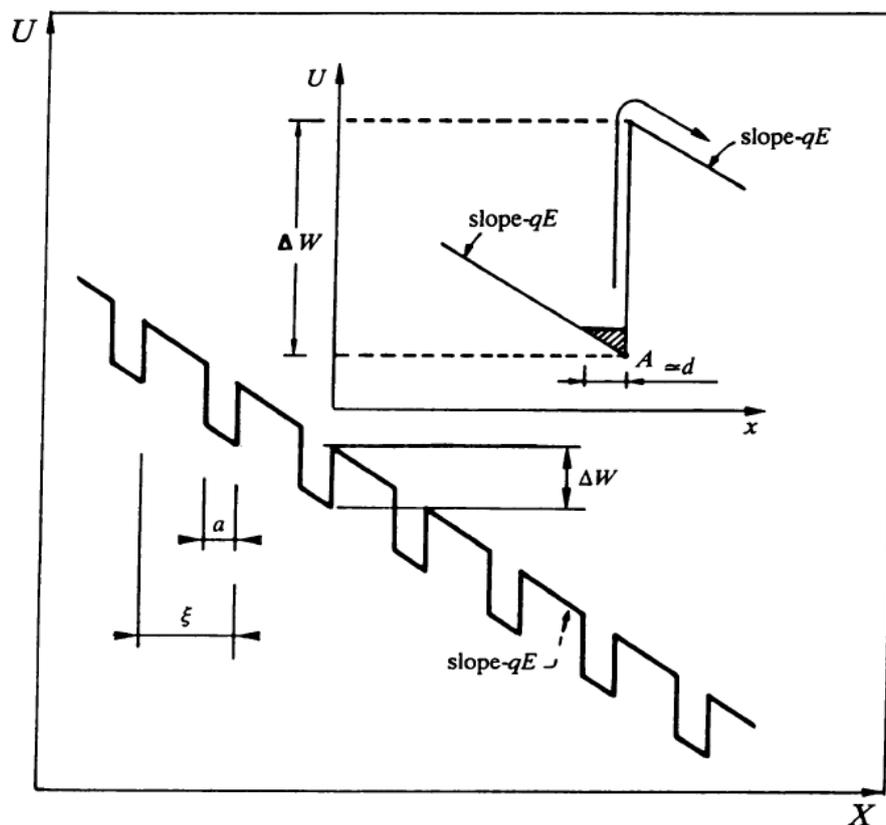


Abbildung 25: Potential, welches ein Partikel erfährt, während es sich aufgrund von Elektrophorese durch ein Netzwerk aus isolierenden Barrieren bewegt. Die Neigung des Potentials wird durch den DC-Offset verursacht. Um aus dem Potentialminimum zu entkommen, muss es die Energiebarriere ΔW überwinden [43].

4.4 Einfluss der Konzentration des Messpuffers auf die elektrokinetische und dielektrophoretische Migration

Der in Abbildung 25 dargestellte Potentialverlauf bezieht sich auf mehrere hintereinander angeordnete Barrieren, die die gesamte Höhe des Kanals ausfüllen. Im Fall von nur einer Barriere, die nicht die volle Höhe des Kanals ausfüllt, sondern den Kanal verengt, weist die Potentiallandschaft zwei Minima auf. Das Potential über der Barriere ist zudem geringer als im freien Kanal (vgl. Abbildung 26 b). Zusätzlich zu der Neigung des Potentials durch den DC-Offset verursacht die AC-Spannung ein Kippen des Potentials in beide Richtungen wie eine Wippe. Wird ein DNA-Molekül in einem Potentialminimum gefangen, so muss es die Energiebarriere ΔW überwinden, um aus diesem zu entkommen [3, 43]. Ist das DNA-Molekül entkommen, so bewegt es sich entlang des Potentialverlaufes bis es im nächsten Potentialminimum auf der anderen Seite der Barriere gefangen wird [5, 43]. Kann das DNA-Molekül die Energiebarriere überwinden, bevor das Potential in die entgegengesetzte Richtung kippt, entkommt die DNA in den freien Kanal auf der anderen Seite der Barriere. Würde die Energiebarriere jedoch erst überwunden, nachdem das Potential bereits wieder gekippt ist, so bewegt sich die DNA erneut auf der Barriere entlang bis zum anderen Potentialminimum. Diese Bewegung zwischen den Potentialminima ist während der Ablenkung aufgrund der langen Belichtungszeit als hantelförmige Darstellung der DNA auf der Barriere zu beobachten [44]. Dies ist in der folgenden Abbildung zu sehen.

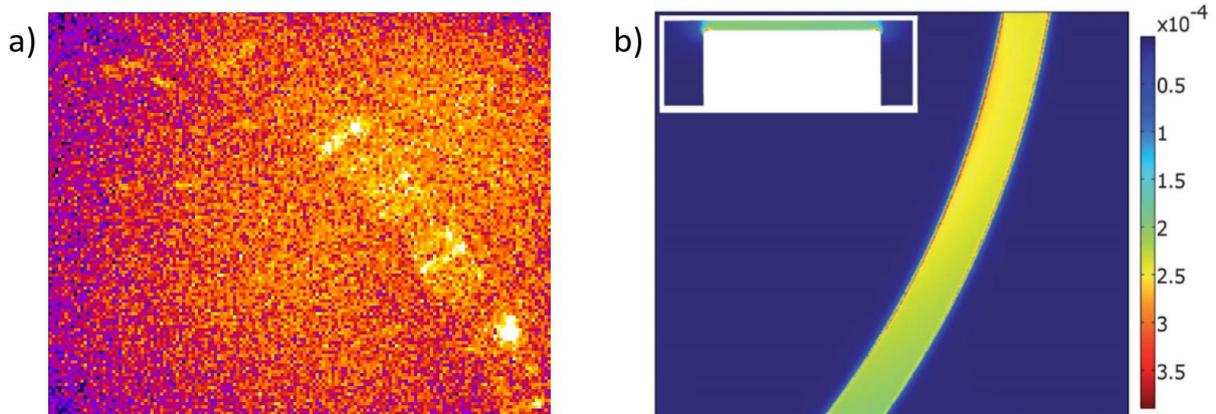


Abbildung 26: DEP-Migration von *Minicircle*-DNA auf der Barriere bei einer Messpufferkonzentration von 0,4 mM, einer Wechselspannung von 300 V und einer Frequenz von 300 Hz und elektrische Feldstärke an und über der Barriere. a) Die Barriere erstreckt sich von der linken oberen bis zur rechten unteren Bildecke. Auf der Barriere wird die DNA abgelenkt. Durch die schnelle Bewegung der DNA zwischen den Potentialminima an den Rändern der Barriere sieht diese hantelförmig aus. **b)** Farbgekodierte Darstellung von $|\vec{E}^2|$. In der Aufsicht ist zu erkennen, dass der Betrag der elektrischen Feldstärke über der Barriere größer ist als im freien Kanal. Im Querschnitt links oben ist zu erkennen, dass der Betrag der elektrischen Feldstärke an den Rändern der Barriere noch einmal stärker ist, als über der Barriere [5].

Eine mögliche Erklärung für die Frequenzabhängigkeit des Fangens wird im Folgenden dargestellt: Die Frequenz der Wechselspannung bestimmt, wie schnell das Potential hin und her kippt. Bei geringen Frequenzen kann die spezifische Zeit (vgl. Kramers-Rate, Gleichung 9 und 10), die das DNA-Molekül benötigt, um vom ersten Potentialminimum in das zweite zu gelangen und diesem zu entkommen, kürzer sein, als ein halber Zyklus der Wechselspannung. Als Folge überquert das DNA-Molekül die Barriere, ohne gefangen zu werden. Mit höherer Frequenz der Wechselspannung verkürzt sich die Zeit

eines halben Zyklus immer weiter, während die Zeit, die das DNA-Molekül benötigt, um der Barriere zu entkommen, gleich bleibt. Ab einer bestimmten Frequenz wird das DNA-Molekül demnach auf der Barriere gefangen und durch die angelegte Gleichspannung entlang der Barriere abgelenkt. Bei einer Verbreiterung der Barriere wäre demnach zu erwarten, dass ein Fangen der DNA bereits bei geringeren Frequenzen erfolgt, da die DNA aufgrund der größeren Strecke mehr Zeit für die Bewegung zwischen den beiden Potentialminima benötigt.

In Abbildung 21 sind gelbe Bereiche zu erkennen. In diesen Bereichen wird die DNA auf der Barriere gefangen und stagniert sowohl am Ende der Barriere als auch ungefähr auf der Hälfte. An diesen Punkten sammelt sich die DNA auf der Barriere und bewegt sich beim Erreichen einer kritischen Masse zurück zum Anfang der Barriere. Diese Bewegung erfolgt im Vergleich zur Abwärtsbewegung sehr schnell. Auf dem Datenträger im Anhang ist dieses Verhalten in der Beispielsequenz des gelben Bereiches zu sehen. Dieser gelbe Bereich der DEP-Migration tritt vor allem bei hohen Frequenzen und hohen Spannungen auf und folgt auf den dunkelgrünen beziehungsweise hellgrünen Bereich innerhalb einer Spannung. Eine Erklärung für den Übergang des dunkelgrünen Bereiches in einen hellgrünen Bereich sowie den anschließenden gelben Bereich bei einer Erhöhung der Frequenz liegt derzeit nicht vor. Ein weiteres Potential parallel zur Barriere oder entropische Effekte, die durch eine notwendige Deformation der DNA durch Umorientierung bei der Bewegung zwischen den beiden Potentialen hervorgerufen werden, könnten mögliche Ursachen sein. Dies muss jedoch durch Simulationen und weitere Experimente noch genauer untersucht werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine längere Messung der DEP-Migration in Mikrofluidikkanälen aus PDMS eine externe Kühlung erfordert. Eine Messung bei Raumtemperatur war aufgrund der starken Verdunstung der Flüssigkeit in den Reservoirien aufgrund von *Joule-Heating* ohne eine Abdichtung der Reservoirie durch einen PDMS-Block nicht möglich, da bereits nach 20 min keine DNA mehr an der Barriere ankam. Eine Wiederverwendung der Chips nach Abkühlung war ebenfalls nicht möglich, da der Chip durch die hohen Temperaturen zerstört wurde [3]. Auch bei einer Abdichtung der Reservoirie war nach einer Messzeit von ungefähr 1 h bei Raumtemperatur und einer Messpufferkonzentration von 0,0 mM eine kontinuierliche Verringerung des DNA-Stroms zu beobachten. Nach 2,5 h versiegte dieser vollständig, sodass nur zwei Messreihen durchgeführt werden konnten. Im Verlauf der Messung bildete sich unter dem PDMS-Block Kondensat, was bestätigt, dass eine starke Verdunstung vorlag. Bei einer Messpufferkonzentration von 0,2 mM war nur die Durchführung einer Messreihe möglich. Durch eine Temperierung des Labors auf 20 °C konnten jeweils drei Messreihen hintereinander im selben Chip durchgeführt werden.

Weiterhin wurde gezeigt, dass die DNA, anders als erwartet, in hohen Spannungsbereichen nicht mehr vollständig gefangen und abgelenkt wird. Es existiert eine Maximalspannung. Dies ist dadurch zu erklären, dass bei hohen Spannungen vermehrt *Joule-Heating*-Effekte auftreten [3, 18]. Diese führen zum einen zu einer erhöhten Geschwindigkeit der DNA im Kanal und zum anderen zu einer Verringerung des elektrischen Feldgradienten [10]. Weiterhin kann die DNA die Energiebarriere des Potentialminimums bei höheren Temperaturen eher überwinden [3]. Auch ist eine Verringerung der Maximalspannung mit zunehmender Konzentration des Messpuffers zu erkennen. Diese Verringerung ist bei den Messungen ohne Kühlung stärker ausgeprägt, was wiederum auf einen starken Einfluss der Temperatur schließen lässt. Mit steigender Konzentration erhöht sich zum einen die Geschwindigkeit der DNA (vgl. Gleichung 4 und 5), zum anderen wird jedoch auch das *Joule-Heating* verstärkt [1].

Neben den Maximalspannungen existieren wie erwartet ebenfalls benötigte Minimalspannungen. Diese erhöhen sich mit zunehmender Konzentration. Da diese Erhöhung sowohl bei den Messungen mit als auch bei den Messungen ohne Kühlung gleich stark ausgeprägt ist und diese bei vergleichsweise geringen Spannungen liegen, kann daraus geschlossen werden, dass Joule'sche Effekte dabei eine geringe oder keine Rolle spielen. Vielmehr werden sie durch eine Erhöhung der Geschwindigkeit der DNA mit der Konzentration sowie eine Verringerung der Polarisierbarkeit der DNA [41, 42] hervorgerufen.

Entgegen der Erwartung besteht eine Frequenzabhängigkeit der DEP-Migration. Die DNA wird erst ab einer bestimmten Frequenz vollständig abgelenkt. Die Minimalfrequenzen waren bei allen Messungen annähernd gleich. Ihre Existenz könnte dadurch erklärt werden, dass bei geringen Frequenzen die Zeit, die die DNA für die Bewegung zwischen dem Potentialminimum auf der einen Seite der Barriere zum Potentialminimum auf der anderen Seite und zum Entkommen aus diesem benötigt, geringer ist als ein halber Zyklus der Wechsellspannung. Infolgedessen passiert die DNA die Barriere, ohne gefangen und abgelenkt zu werden. Ab einer bestimmten Frequenz ist jedoch die Dauer eines halben Zyklus geringer als die Zeit, die die DNA zum Passieren der Barriere benötigt und sie bewegt sich nach dem Überwinden der Energiebarriere zurück zum anderen Potentialminimum. Dadurch wird die DNA gefangen und abgelenkt. Eine Erklärung für die beobachtete Verlangsamung der DNA bei höheren Frequenzen nach vorheriger schneller Ablenkung sowie der anschließenden Stagnation beziehungsweise Bewegung in entgegengesetzter Richtung auf der Barriere liegt derzeit nicht vor. Ein parallel zur Barriere existierendes Potential oder entropische Effekte könnten mögliche Ursachen sein.

Aufgrund der starken Beeinträchtigung der Messungen bei Raumtemperatur durch Joule'sche Effekte und der Verringerung des Spannungsbereichs bei Messungen in Puffer mit höherer Ionenstärke wäre es sinnvoll, eine externe Kühlung des Mikrofluidikchips zu etablieren. Da Glas eine deutlich höhere Wärmeleitfähigkeit aufweist als PDMS wäre eine Kühlung unterhalb des Chips sinnvoll, bringt jedoch aufgrund des Aufbaus Probleme mit sich, da die Detektion der DNA über ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop erfolgt, dessen Ölimmersionsobjektiv in direktem Kontakt mit dem Deckglas steht. Demnach müsste eine Kühlung des Chips von oben erfolgen, dies könnte durch einen kalten Luftstrom erreicht werden, welcher direkt auf den Chip gerichtet ist. Eine weitere Möglichkeit, um Joule'sche Effekte zu verringern, wäre die Verwendung von Mikrofluidikchips aus Glas, wie sie in der Industrie verwendet werden. Ein Vorteil von Glas-Chips wäre neben der besseren Wärmeabfuhr die Wiederverwendbarkeit des Chips [4]. Glas-Chips sind jedoch teurer und aufwendiger in der Herstellung als PDMS-Chips.

Weiterhin wäre es sinnvoll, die Messungen in unterschiedlichen Chips zu wiederholen, um Einflüsse des verwendeten Chips auszuschließen, da alle Messungen einer Konzentration und Temperatur hintereinander im selben Chip vorgenommen wurden. Auch eine Simulation der DEP-Migration unter Berücksichtigung der Geschwindigkeit, die ein DNA-Molekül benötigt, um die Barriere zu überqueren, und der Veränderung der Potentiallandschaft durch die Parameter der Wechsellspannung wäre interessant, um die Erklärung für die Frequenzabhängigkeit der DEP-Migration zu überprüfen und eventuell eine Erklärung für die Stagnation und die entgegengesetzte Bewegung der DNA auf der Barriere zu finden. Messungen in einem Chip mit einer breiteren Barriere könnten ebenfalls zur Überprüfung der Erklärung für die Frequenzabhängigkeit dienen.

6 Literatur

- [1] F. Lottspeich, J. W. Engels, *Bioanalytik*, 3rd ed., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg **2012**.
- [2] M. Schleef, *Minicircle and Miniplasmid DNA Vectors: The Future of Non-Viral and Viral Gene Transfer*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim **2013**.
- [3] M. Viefhues, Analysis and preparation of (bio)nanoobjectsc in nano-microfluidic devices, *Dissertation*, Universität Bielefeld **2012**.
- [4] P. Tabeling, *Introduction to Microfluidics*, 1st ed., Oxford University Press, Oxford **2005**.
- [5] M. Viefhues, R. Eichhorn, E. Fredrich, J. Regtmeier, D. Anselmetti, *Lab on a Chip* **2012** (12), 485.
- [6] M. Viefhues, S. Wegener, A. Rischmüller, M. Schleef, D. Anselmetti, *Lab on a Chip* **2013** (13), 3111.
- [7] C.-F. Chou, J. O. Tegenfeldt, O. Bakajin, S. S. Chan, E. C. Cox, N. Darnton, T. Duke, R. H. Austin, *Biophysical Journal* **2002** (83), 2170.
- [8] J. Regtmeier, R. Eichhorn, L. Bogunovic, A. Ros, D. Anselmetti, *Anal Chem* **2010** (82), 7141.
- [9] B. G. Hawkins, B. J. Kirby, *Electrophoresis* **2010** (31), 3622.
- [10] D. Erickson, D. Sinton, D. Li, *Lab on a Chip* **2003** (3), 141.
- [11] J. C. P. Grossmann, *Capillary Electrophoresis - Theory and Practice*, Academic Press, London **1992**.
- [12] B. J. Kirby, *Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics*, Cambridge University Press, New York **2010**.
- [13] M. Viefhues, S. Manchanda, T.-C. Chao, D. Anselmetti, J. Regtmeier, A. Ros, *Anal Chem* **2011** (399).
- [14] W. Hellmich, J. Regtmeier, T. Duong, R. Ros, D. Anselmetti, A. Ros, *Langmuir* **2005** (21), 7551.
- [15] H. Bruus, *Theoretical Microfluidics*, Oxford University Press, Oxford **2008**.
- [16] S. Sridharan, J. Zhu, G. Hu, X. Xuan, *Electrophoresis* **2011** (32), 2274.
- [17] J. Regtmeier, R. Eichhorn, M. Viefhues, L. Bogunovic, D. Anselmetti, *Electrophoresis* **2011** (32), 2253.
- [18] *Elektromagnetismus*, 9th ed., Lehrbuch der Experimentalphysik, Vol. 2 (Eds: W. Raith), de Gruyter, Berlin **2006**.
- [19] J. M. M. Mandel, *Methods in Enzymology* **1968** (12), 195.
- [20] N. A. Campbell, J. B. Reece, *Biologie*, 8th ed., Pearson, München **2009**.
- [21] D. Sadava, D. M. Hillis, H. C. Heller, M. R. Bererbaum, *Purves, Biologie*, 9th ed., Springer-Verlag, Heidelberg **2012**.
- [22] M. Schleef, M. Blaesens, M. Schmeer, R. Baier, C. Marie, G. Dickson, D. Scherman, *Current Gene Therapy* **2010** (10), 487.
- [23] *Gene Therapy of Cancer*, Methods in Molecular Biology, Vol. 542 (Eds: W. Walther, U. S. Stein), Springer-Verlag **2009**.
- [24] R. M. E. Sackmann, *Lehrbuch der Biophysik*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim **2010**.
- [25] G. F. R. Heintzmann, *Functional Genomics* **2006** (5), 289.
- [26] H. Kawata, J. M. Carter, A. Yen, H. I. Smith, *Microelectronic Engineering* **2002** (9), 31.
- [27] P. Tekola, J. Baak, J. Beliën, J. Brugghe, *Cytometry* **1994** (17), 191.
- [28] B. Kundukad, J. Yan, P. S. Doyle, *Soft Matter* **2014** (10), 9721.
- [29] K. Günther, M. Mertig, R. Seidel, *Nucleic Acids Research* **2010** (38), 6526.
- [30] A. Larsson, C. Carlsson, M. Jonsson, B. Albinsson, *Journal of the American Chemical Society* **1994** (116), 8459.
- [31] S. Gurrieri, K. Sam Wells, I. D. Johnson, C. Bustam, *Analytical Biochemistry* **1997** (249), 44.
- [32] G. T. Hirons, J. J. Fawcett, H. A. Crissman, *Cytometry* **1994** (15), 129.
- [33] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, 5th ed., Wiley-VCH Verlag, Weinheim **2013**.
- [34] D. C. Giancoli, *Physik: Lehr- und Übungsbuch*, 3rd ed., Pearson, Hallbergmoos **2010**.
- [35] *Microchip Capillary Electrophoresis Protocols*, Springer Protocols: Fast and Continuous-Flow Detection and Separation of DNA Complexes and DNA in Nanofuidic Chip Format, Methods in Molecular Biology, Vol. 1274 (Eds: A. Van Schepdael), Springer, New York **2015**.

- [36] J. Regtmeier, T. T. Duong, R. Eichhorn, D. Anselmetti, A. Ros, *Anal Chem* **2007** (79), 3925.
- [37] A. F. Hollemann, N. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 102nd ed., de Gruyter, Berlin **2007**.
- [38] S. Knasmüller, A. Szakmary, A. Wottawa **1989** (216), 189.
- [39] H. Washizu, K. Kikuchi, *J Phys Chem B* **2006** (110), 2855.
- [40] D. Porschke, *Biophys Chem* **1997** (66), 241.
- [41] G. O. F. Parikesit, A. P. Markesteijn, O. M. Piciu, A. Bossche, J. Westerweel, I. T. Young, Y. Garini, *Biomicrofluidics* **2008** (2).
- [42] J. G. Elias, D. Eden, *Macromolecules* **1980** (14), 410.
- [43] J. P. A. Ajdari, *Biophysics* **1991** (88), 4468.
- [44] R. R. C. Zhou, *Physical Review* **2015** (92).

7 Anhang

7.1 Angelegte Gleichspannungen

Tabelle 5: Angelegte Gleichspannungen bei einer Konzentration von 0,0 mM ohne Kühlung.

Elektrode	DC	Position
1	-6	links
2	-11	oben, Probe
3		nicht angeschlossen
4	3	rechts

Tabelle 6: Angelegte Gleichspannungen bei einer Konzentration von 0,2 mM ohne Kühlung.

Elektrode	DC	Position
1	-8	links
2	-9	oben, Probe
3	-11	unten
4	3	rechts

Tabelle 7: Angelegte Gleichspannungen bei einer Konzentration von 0,0 mM mit Kühlung.

Elektrode	DC	Position
1	-7	links
2	-12	oben, Probe
3	-14	unten
4	7	rechts

Tabelle 8: Angelegte Gleichspannungen bei einer Konzentration von 0,2 mM mit Kühlung.

Elektrode	DC	Position
1	-6	links
2	-16	oben, Probe
3		nicht angeschlossen
4	10	rechts

Tabelle 9: Angelegte Gleichspannungen bei einer Konzentration von 0,4 mM mit Kühlung.

Elektrode	DC	Position
1	-6	links
2	-6	oben, Probe
3		nicht angeschlossen
4	1	rechts

Tabelle 10: Angelegte Gleichspannungen bei einer Konzentration von 0,6 mM mit Kühlung.

Elektrode	DC	Position
1	-6	links
2	-10	oben, Probe
3		nicht angeschlossen
4	1	rechts

7.2 Datenträger

7.2.1 Beispielsequenzen zur Auswertung des Migrationsverhaltens

Alle Beispielsequenzen sind der Messung bei einer Pufferkonzentration von 0,4 mM mit Kühlung entnommen. Die jeweils anliegenden Wechselspannungsparameter sind im Folgenden dargestellt:

Tabelle 11: Während der einzelnen Beispielsequenzen anliegende Wechselspannungsparameter bei einer Pufferkonzentration von 0,4 mM mit Kühlung.

	Farbe	Spannung [V]	Frequenz [Hz]
	dunkelrot	50	50
	hellrot	200	100
	orange	200	400
	hellgrün	250	200
	dunkelgrün	350	300
	gelb	400	500

Je nach Länge der Sequenz umfasst diese mehrere Frequenzen. Eine Frequenz wurde während der Messung jeweils für 15 s gehalten. Die Aufnahme erfolgte dabei mit 7,6 Bildern/s. Im vorliegenden Videomaterial entspricht dies aufgrund der langsameren Wiedergabe von 7 Bildern/s rund 16,3 s.

7.2.2 Videoaufnahmen der Kontamination durch Bakterien

Tabelle 12: Auf dem Datenträger gespeicherte Dateien zur Kontamination mit Bakterien und deren Inhalt.

Dateiname	Inhalt
1_Kontamination mit Bakterien_Chip	Aufnahme von Bakterien, die sich vor der Barriere im Kanal ansammeln und diesen verstopfen
2_Kontamination mit Bakterien_Chip	Aufnahme von Bakterien, die sich vor der Barriere im Kanal ansammeln und diesen verstopfen sowie Bakterien, die sich aktiv im Kanal fortbewegen
3_Kontamination mit Bakterien_Puffer	Aufnahme von Bakterien im Puffer

7.3 DEP-Migrationsprofile