



Universität Bielefeld

EXPERIMENTELLE BIOPHYSIK
UND ANGEWANDTE NANOWISSENSCHAFTEN

BACHELORARBEIT ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES
BACHELOR OF SCIENCE

Herstellung und Analyse von Flusszellen mit Glas-Nanokapillaren für DNA Translokations-Experimente

Sascha Junge

Oktober 2016

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe. Es wurden keine weiteren Hilfsmittel als die angegebenen verwendet. Diese Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule eingereicht.

Bielefeld, den 13. Oktober 2016

Sascha Junge

Gutachter

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Dr. Martina Viefhues

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Theoretische Grundlagen	8
2.1	Helium-Ionen-Mikroskopie	8
2.2	Leitwertbestimmung der Nanokapillaren	9
2.3	Coulter-Counter	11
3	Material und Methoden	13
3.1	Herstellung der Nanokapillaren	13
3.2	Visualisierung und Modifikation am HIM	16
3.3	Konstruktion der Flusszellen	17
3.4	Befüllen der Flusszellen	18
3.5	Messvorgang	19
4	Ergebnisse und Auswertung	22
4.1	Reduktion der Porendurchmesser	22
4.2	Befüllung mittels Isopropanol	25
4.3	Direkte Befüllung mit Pufferlösung	27
4.4	Wiederverwendbarkeit	28
4.5	DNA-Translokationsexperimente	30
5	Resümee und Ausblick	38
6	Danksagung	43

1 Einleitung

Die Fähigkeit Biomoleküle detektieren und charakterisieren zu können ist ein zentrales Thema aktueller Forschung. Es stehen unterschiedliche Mikroskopieverfahren zur Verfügung, bei denen jedoch zumeist eine Markierung der Partikel notwendig ist. Eine Marker-freie Methode stellt der Coulter-Counter, auch *Resistive Pulse Sensing* genannt, dar. Diese Methode wurde 1953 von W. H. Coulter vorgestellt [1, 2]. Beim Coulter-Counter werden die zu untersuchenden Partikel einer Salzlösung beigegeben, welche in zwei Reservoirs gegeben wird, die über eine Pore verbunden sind. Daraufhin wird eine elektrische Spannung zwischen den Reservoirs angelegt, wodurch ein Ionenfluss durch die Pore entsteht. Gelangen die zu untersuchenden Partikel durch die Pore, ist aufgrund des durch das Partikel blockierten Teils der Pore eine Änderung der Stromstärke zu detektieren. Je nach Partikel können diese durch das elektrische Feld oder über hydrodynamischen Druck durch die Pore gelangen [1, 3].

Zur Detektion von Biomolekülen ist eine besonders kleine Pore wichtig. Diese sollte nur geringfügig größer sein als das zu untersuchende Partikel, da die Änderung der Stromstärke größer ist, je mehr Fläche von der Pore durch das Biomolekül blockiert wird. Bei der Detektion von DNA werden daher Porendurchmesser kleiner als 100 nm benötigt. Die gängige Realisierung solcher Poren, stellen Festkörpernanoporen dar, welche unter anderem in Graphenschichten hergestellt werden können [4].

Die in dieser Arbeit verwendeten Nanokapillaren aus Quarzglas sind eine Alternative zu den Festkörpernanoporen. Im Gegensatz zu diesen sind die Nanokapillaren sowohl billig als auch einfach herzustellen [5].

In den vergangenen Jahren wurden erfolgreich Coulter-Counter Experimente an ihnen durchgeführt [3, 6]. In dieser Arbeit wird sich an den Ergebnissen von Steinbock et al. orientiert [3, 7], sowie den Ergebnissen von Armin Grundmann für die laboreigene Herstellung der Nanokapillaren [8]. Auf Grundlage der von Steinbock et al. beobachteten Reduzierung des Porendurchmessers der Nanokapillaren mithilfe des Rasterelektronenmikroskops [5], wird hier eine ähnliche Modifikation mithilfe des Helium Ionen Mikroskops erreicht. Zudem werden die Poren der Nanokapillaren mit dem Helium Ionen Mikroskop abgebildet und so auf ihren Durchmesser untersucht.

Nach Integration der Nanokapillare in eine Flusszelle werden DNA Translokationen durchgeführt. Die mithilfe eines Labview Programm detektierten Translokationen werden analysiert und mit den Ergebnissen von Steinbock et al. verglichen.

Es wird sich zeigen, dass es mit den laboreigenen Möglichkeiten gelungen ist Nanokapillaren mit Porendurchmessern unter 100 nm herzustellen, mit denen es möglich ist einzelne DNA Moleküle während der Translokation durch die Pore zu detektieren.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Helium-Ionen-Mikroskopie

Das Helium-Ionen-Mikroskop (HIM) dient der Abbildung von Oberflächen in hoher Auflösung. Dies geschieht mittels eines geladenem Ionenstrahls, mit dem die Oberfläche abgerastert wird und aus den gewonnenen Daten der einzelnen Positionen das Bild zusammengesetzt wird. Im Folgenden wird der Aufbau und die Funktionsweise erläutert.

Das Helium-Ionen-Mikroskop verwendet einen Partikelstrahl aus einfach geladenen Helium Ionen. Dieser wird durch ein elektrisches Feld erzeugt, dass in einer Heliumatmosphäre zwischen der Probe und einem Emitter, dessen Spitze zu einer dreiseitigen Pyramide geformt ist, gebildet wird. Die Spitze des Emitters besteht im besten und stabilsten Fall aus drei Atomen, sodass sehr hohe Feldstärken von bis zu 4 V/\AA erreicht werden können [9].

Abbildung 2.1 zeigt schematisch das Prinzip der Helium Ionen Beschleunigung. Neutrale Helium Atome aus der Atmosphäre werden durch das starke elektrische Feld polarisiert und zur Spitze hin beschleunigt. Unmittelbar vor den äußersten Atomen der Spitze befinden sich scheibenförmige Regionen, sogenannte *Ionization Disks*, in denen das Feld stark genug ist, damit Elektronen in die Spitze tunneln können. Bewegen sich die neutralen Helium Atome durch diese Region, geben sie die äußersten Elektronen ab, sodass sie durch ihre anschließend positive Ladung sofort von der Spitze weg Richtung Probe beschleunigt werden. Hierbei erzeugt jedes Helium Atom der Spitze einen eigenen Ionenstrahl. Alle bis auf einen dieser Strahlen werden abgelenkt. Der verbleibende Ionenstrahl wird durch ein optisches System u.a. fokussiert und über die Probe gerastert. Ein an dieser Stelle nennenswerter Bestandteil der Optik ist eine Blende, durch deren Größenwahl der Ionenstrom mit zunehmender Größe stärker wird, jedoch das Auflösungsvermögen schlechter [10].

Erreicht der Ionenstrahl die Probe, werden durch die Kollision der Helium-Atome sogenannte Sekundär-Elektronen (SE) herausgeschlagen. Dies geschieht hauptsächlich durch Übertragung der kinetischen Energie der Helium-Atome auf die Elektronen. Es gibt jedoch noch eine zweite Art Sekundär-Elektronen (SE2), die in zwei Typen zu unterteilen ist. Typ 2 der SE2 spielt so gut wie keine Rolle und beschreibt Elektronen die durch SE entstehen. Hier sind jedoch die Energien der SE meist zu gering um SE2 zu erzeugen. Die andere Möglichkeit besteht durch abgeprallte Helium-Atome, sofern sie noch ausreichend energetisch sind. Sind die SE erzeugt müssen sie erst aus dem Feststoff gelangen ehe sie detektiert werden können. Dieser Prozess ähnelt dem der Diffusion mit einer effektiven Diffusionslänge in der Größenordnung von 1 nm, sodass nur die obersten Nanometer einer Probe zur Bildgebung beitragen. Durch die Entstehung der SE kann es bei nicht-leitenden Proben zu einem Elektronenmangel an der Oberfläche kommen, was die darauffolgende Bildgebung beeinträchtigen kann. Um diesen Elektronenverlust auszugleichen kann mit einer sogenannten Flood Gun nach jedem Messvorgang die Oberfläche mit einem Elektronenstrahl abgefahren werden [12].

Eine bildgebende Methode ist die Zusammensetzung aus den Signalen der SE. Dies erzeugt ein Bild das reich an Informationen über die Oberflächenstruktur der Probe ist.

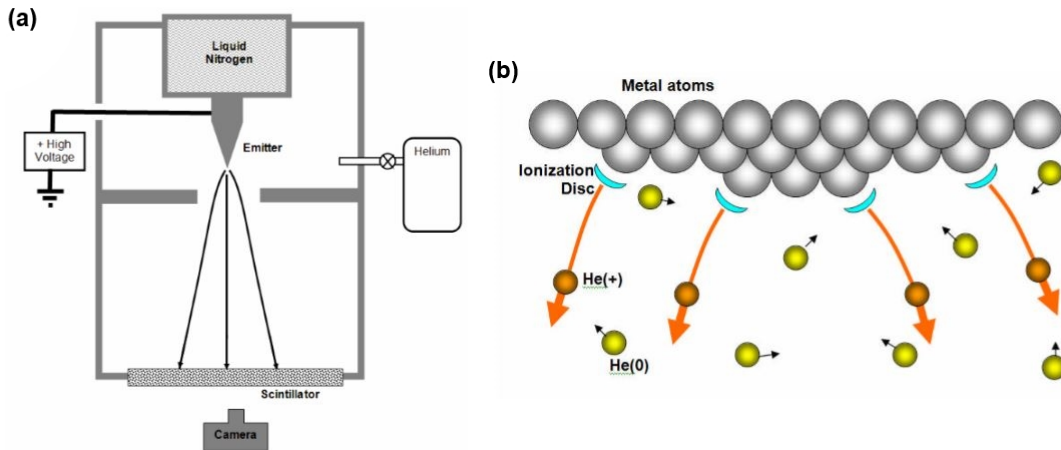


Abbildung 2.1: (a) Grundlegendes Schema eines Feld Ionen Mikroskops [11]. (b) Schematische Darstellung der Helium Ionen Quelle [11].

Für andere Methoden, wie z.B. die Bildgebung durch zurückgeprallte Helium-Atome, wird auf die Literatur verwiesen [12].

Das Auflösungsvermögen des HIM ist durch praktische Bedingungen limitiert, u.a. durch Grenzen der Optik und Erzeugung der Beschleunigungsspannung. Hierbei sind jedoch besonders gute Eigenschaften zu nennen, wie die hohe Helligkeit der Quelle, geringe Energieaufspaltung und geringe Beugungseffekte, die einen maximal fokussierten Punkt auf bis zu 0,25 nm erwarten lassen [9, 10, 13].

2.2 Leitwertbestimmung der Nanokapillaren

Der elektrische Leitwert ist ein Maß dafür, wie gut Strom geleitet werden kann und ist der Kehrwert zum Widerstand. Dieser steht in direktem Zusammenhang mit dem Material und der Geometrie des zu untersuchenden Objekts. Bei experimentell bestimmtem Leitwert können so bei bekanntem Material Rückschlüsse auf die geometrischen Parameter aufgestellt werden. Somit kann mithilfe des Leitwertes bei Nanokapillaren der Porendurchmesser bestimmt werden.

Dafür ist eine genauere Betrachtung der Nanokapillaren erforderlich. Die Nanokapillaren sind aus Quarzglas hergestellt, sodass diese stark isolierend sind und so eine Leitwertbetrachtung der Kapillare selbst unnötig ist. Es wird somit nur das Füllmedium betrachtet und die Auswirkungen der Geometrie des Inneren der Glaskapillare auf dessen Leitwert. Die Glaskapillare kann näherungsweise als zwei in Reihe geschaltete Leiter betrachtet werden. Einer dieser ist zylindrisch, der andere ist ähnlich einem Kegelstumpf.

2 Theoretische Grundlagen

Den Widerstand eines Leiters, mit variierendem Querschnitt, berechnet man mit [1]

$$R = \frac{1}{\sigma} \int_0^l dz \frac{1}{A(z)} \quad (2.2.1)$$

wobei σ der Leitfähigkeit des Füllmediums entspricht, l seine Länge und $A(z)$ den Verlauf seiner Querschnittsfläche. Durch Aufspaltung in einen zylindrischen Teil R_z und einen Kegelstumpfförmigen R_k ergibt sich

$$R = R_z + R_k = \frac{1}{\sigma \pi r^2} + \frac{1}{\sigma \pi r_0 r_1} \quad (2.2.2)$$

Überträgt man das Modell auf die Nanokapillare folgt mit der Länge der Kapillare l , der Länge des spitz zulaufendem Teils l_s , dem Innendurchmesser d und dem Porendurchmesser d_p

$$R = \frac{4}{\sigma \pi d} \left(\frac{l - l_s}{d} + \frac{l_s}{d_p} \right) \quad (2.2.3)$$

Eine experimentelle Messung erfordert weiterhin Reservoirs an beiden Enden der Kapillare und Messelektroden. Dieser zusätzliche Widerstand bestimmt sich über die Breite b und Höhe h des Reservoirs sowie den Abstand der Elektrode zur Kapillare x . Sind beide Elektroden im gleichen Abstand zu der Kapillare gilt

$$R = \frac{4}{\sigma \pi d} \left(\frac{l - l_s}{d} + \frac{l_s}{d_p} \right) + \frac{2x}{\sigma b h} \quad (2.2.4)$$

Diese Formel lässt sich vereinfachen, da der Term $\frac{l-l_s}{d}$ klein gegen $\frac{l_s}{d_p}$ ist, denn die zu untersuchenden Porendurchmesser sind um mehr als vier Größenordnungen kleiner als der Innendurchmesser der Kapillare. Die Abmessungen der Reservoirs sind in der Größenordnung mehrerer Millimeter, sodass dieser Teil-Term ebenfalls vernachlässigt werden kann. So erhält man als Näherung des Leitwerts einer Nanokapillare

$$G \simeq \frac{\sigma \pi d d_p}{4 l_s} \quad (2.2.5)$$

Diese Formel wird in vergleichbarer Literatur ebenfalls genutzt [3]. Bei diesem Modell ist anzumerken, dass es ausschließlich die grobe Geometrie berücksichtigt. Unterstrukturen im Bereich der Pore, sowie Ladungseffekte innerhalb oder außerhalb der Kapillare werden nicht berücksichtigt.

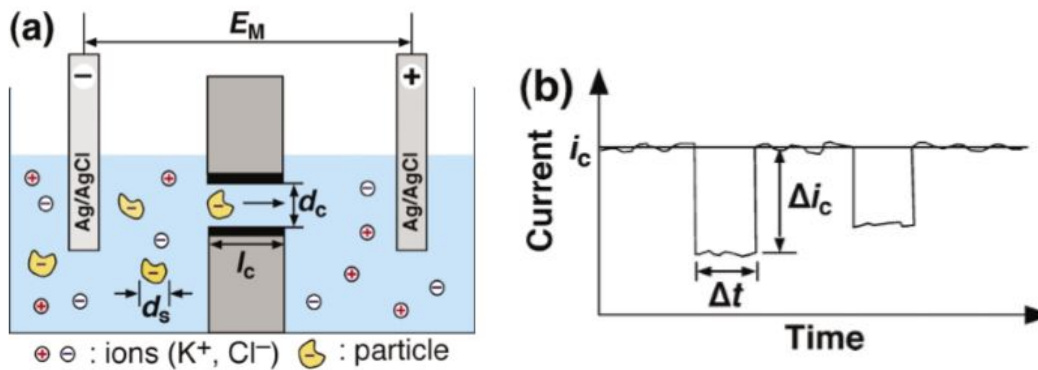


Abbildung 2.2: (a) Schematische Darstellung des Coulter Counter Messaufbaus. (b) Abgebildet sind typische Translokationsevents. Die Stromstärke fällt temporär ab (Peak), solange sich ein Partikel im Kanal befindet. [2]

2.3 Coulter-Counter

Der Coulter Counter, auch bekannt als *Resistive Pulse Sensing*, ist ein Messaufbau mit dem Biomoleküle in einer Elektrolytlösung detektiert werden können, wie zum Beispiel Proteine, Viren oder wie in dieser Arbeit DNA. Erstmals beschrieben und patentiert wurde der Coulter Counter 1953 von Wallace H. Coulter und wurde seitdem hauptsächlich im medizinischen Bereich genutzt zur Bestimmung biologischer Zellkonzentrationen [2]. Die Methode gelangte zu neuer Aufmerksamkeit aufgrund seiner Einfachheit einzelne Moleküle zu detektieren und dem hohen Informationsgehalt.

Das Prinzip des Coulter Counter beruht auf zwei Reservoirs, die durch einen einzigen Kanal verbunden und mit einer Elektrolytlösung gefüllt sind. Über Elektroden in den Reservoirs wird ein Ionenstrom durch den Kanal erzeugt, indem ein konstantes Potential angelegt wird (vgl. Abb. 2.2a). Der messbare Strom ist abhängig von dem aus den Eigenschaften des Kanals resultierenden Widerstands. Dieser ist, wie vorangegangen beschrieben, abhängig von der Querschnittsfläche des Kanals. Bewegen die zu detektierenden Partikel sich durch den Kanal, blockieren sie einen Teil seiner Querschnittsfläche und erhöhen damit den erzeugten Widerstand. Dies bewirkt eine zeitlich begrenzte Änderung der Stromstärke (Peak) (vgl. Abb. 2.2b). Es zeigte sich, dass Art und Stärke der Peaks bei DNA-Detektionen in KCl Lösung abhängig von der Salzkonzentration sind. Hierbei ist beachtlich, dass bei Konzentrationen unter 0.4 M KCl die Blockade des Kanals zu einem Anstieg des gemessenen Stroms führt, welcher stärker bei niedrigeren Konzentrationen wird. Bei Konzentrationen über 0.4 M KCl bewirkt die Translokation des Partikels einen Abfall der Stromstärke, welcher mit steigender Konzentration größer wird [14].

Um möglichst eindeutige Translokationsevents zu messen, gilt es große Peaks zu bekommen. Um dies zu untersuchen, wird die theoretische Änderung des Kanalwiderstands betrachtet. Hierbei entspricht der Kanal der Geometrie der Glasnanokapillare, sodass sich über die Näherung (2.2.1) die Änderung des Widerstands ergibt zu [1]

$$\Delta R = \frac{4}{\pi d_p} \left[\frac{\sin^{-1} \left(\frac{D}{d_p} \right)}{\sqrt{\left(1 - \frac{D^2}{d_p^2} \right)}} - \frac{D}{d_p} \right] \quad (2.3.1)$$

Hierbei ist σ die Leitfähigkeit der Elektrolytlösung, D der Durchmesser des Partikels und d_p der Porendurchmesser der Kapillare. Um die Abhängigkeiten der Parameter voneinander zu verdeutlichen, lässt sich (2.3.1) als Reihenentwicklung darstellen [1]

$$\Delta R = \frac{8D^3}{3\pi\sigma d_p^4} \left[1 + \frac{4}{5} \left(\frac{D}{d_p} \right)^2 + \frac{24}{35} \left(\frac{D}{d_p} \right)^4 + \frac{169}{280} \left(\frac{D}{d_p} \right)^6 + \dots \right] \quad (2.3.2)$$

Bei dieser Darstellung ist gut zu erkennen, dass das Verhältnis zwischen Partikeldurchmesser und Porendurchmesser, D/d_p , entscheidend für die Änderung des Widerstands während einer Partikel-Translokation ist. Um also aussagekräftige Peaks zu erhalten, sollte der Porendurchmesser nicht viel größer sein als das zu untersuchende Objekt. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass bei zu kleinem Porendurchmesser die Pore leicht verstopfen kann. Der Porendurchmesser muss also so gewählt werden, dass die Messung sowohl informationsreich ist, als auch stabil verlaufen kann. In dieser Arbeit werden DNA-Moleküle untersucht, welche in starker Näherung als Zylinder mit einer Querschnittsfläche von 2 nm betrachtet werden können [15]. Somit werden auch Porendurchmesser im Nanometerbereich benötigt.

Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung von Glasnanokapillaren mit Porendurchmessern unter 100 nm, die Bestimmung der Porengröße und anschließende Messungen von DNA-Translokationen. Gute Ergebnisse wurden bereits von Steinbock et al. erzielt, an deren Herangehensweise sich die Messungen der DNA-Translokationen orientieren [3, 6, 7].

3 Material und Methoden

In diesem Abschnitt werden die grundlegenden Methoden zur Umsetzung der Experimente für diese Arbeit dargestellt. Diese gliedern sich in die Herstellung der Nanokapillaren, dem Prozess der Abbildung und dem Schrumpfen der Poren der Nanokapillaren unter dem Helium Ionen Mikroskop, dem Zusammenbau und dem Befüllen der Flusszelle, sowie den anschließenden Messvorgängen. In den Tabellen 3.3 und 3.4 sind die hierfür verwendeten Materialien aufgezeigt.

3.1 Herstellung der Nanokapillaren

Das Zentrum der zu konstruierenden Flusszelle ist die Glaskapillare mit der Nanopore. Um diese herzustellen, werden Quarz-Glaskapillaren verwendet mit einem Innendurchmesser von 0,3 mm und einem Außendurchmesser von 0,5 mm. Um die Pore in der gewünschten Größe herzustellen, wird die Glaskapillare lokal erhitzt und auseinandergezogen. Durch die Hitze wird das Glas verformbar, sodass dieses sich durch den Zug verdünnt und letztendlich trennt. Hierbei entstehen theoretisch zwei identische Spitzen mit geringerem Innendurchmesser. Um diesen Prozess möglichst reproduzierbar zu gestalten, wird ein Mikropipettenzieher verwendet. Hierbei ist zu beachten, dass eigentlich baugleiche Geräte bei gleicher Konfiguration zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können [16].

Das Gerät besitzt zwei Schienen, die ausgelenkt werden können, sodass an jeder ein Ende der Kapillare befestigt werden kann. Der Mittelpunkt der Kapillare befindet sich dann über einer Vorrichtung in der sich ein Laser befindet. Dieser erhitzt die Kapillare, während durch die Rückstellkraft der Schienen ein stetiger Zug auf die Kapillare ausgeübt wird. Zusätzlich kann noch ein kräftiger Zug auf die Kapillare ausgeübt werden (vgl. Abbildung 3.1). Dieser Vorgang ist über fünf Parameter konfigurierbar und kann über mehrere Zyklen laufen. Die zur Verfügung stehenden Parameter Heat, Filament, Velocity, Delay und Pull sind in Tabelle 3.1 erläutert.

Die hier verwendete Konfiguration (vgl. Tabelle 3.2) basiert auf einer Publikation von Steinbock et al. [3] und wurde von Armin Grundmann für das laboreigene Gerät optimiert, um Kapillaren mit einem Innendurchmesser der Spitze von unter 100 nm herzustellen [8]. Die Kapillare wird hierbei asymmetrisch eingespannt, sodass man aus einer Kapillare je zwei modifizierte Kapillaren mit einer ungefähren Länge von 2 cm und 5 cm erhält. Das längere Stück kann man erneut asymmetrisch einspannen und erhält so eine zweite modifizierte Kapillare mit der Länge von 2 cm, sowie ein Reststück mit zwei Spitzen. Dieses Vorgehen ist nötig, damit die Kapillaren im späteren Verlauf mithilfe des HIMs untersucht und bearbeitet werden können. Hierbei limitiert die Größe der Probenkammer des HIMs die Maße der Kapillare.

3 Material und Methoden

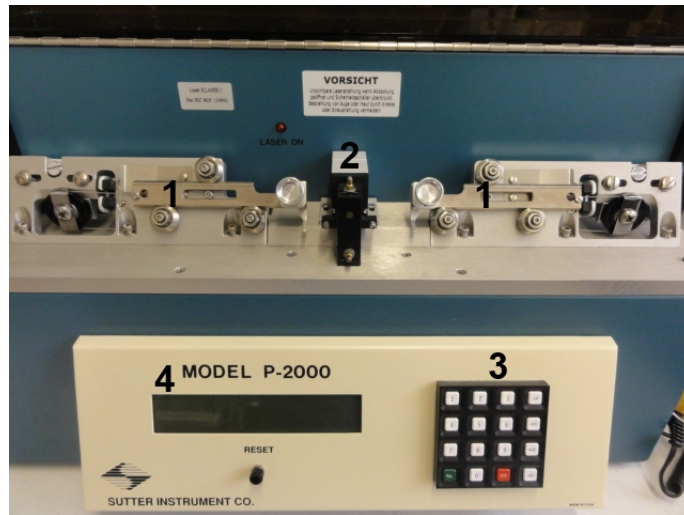


Abbildung 3.1: Der Mikropipettenzieher P-2000 von Sutter Instruments sind. Zu sehen sind (1) die zwei Schienen an denen die Kapillare eingespannt sind, (2) die Vorrichtung mit dem Laser, (3) sowie das Bedienfeld und (4) Anzeigefeld zur Konfiguration des Zugprogramms.

Tabelle 3.1: Erläuterung der Parameter zur Konfigurierung des Mikropipettenzieher

Heat	Mit diesem Parameter wird die Intesität des Laser kontrolliert. Einstellbar von 0-999 in ganzzahligen Schritten, wobei 999 die maximale Intensität darstellt.
Filament	Hiermit wird die zu erhitzende Strecke bestimmt, die der Laser abfährt. Es kann aus vorkonfigurierten Längen gewählt werden und der Parameter in ganzzahligen Schritten zwischen 0 und 15 variiert werden.
Velocity	Hiermit wird die Geschwindigkeit der Zugarme beim Zugvorgang gesteuert. Dies ist einstellbar im Bereich von 0 bis 255, wobei letzteres die höchste Geschwindigkeit ergibt.
Delay	Hiermit kann man das zeitliche Auftreten des Zugvorgangs im Verhältnis zum Abschalten des Laser einstellen. Konfigurierbar von 0-255 ergibt sich abzüglich 128 die Wartezeit in Millisekunden. Hierbei ergibt ein negativer Wert, dass der Zugvorgang eingeleitet wird, bevor der Laser abgeschaltet wird.
Pull	Dieser Parameter steuert die Stärke des Zuges während des Zugvorgangs und ist von 0 bis 255 einstellbar, wobei 255 den stärksten Zug ergibt und 0 keine zusätzliche Zugkraft.

Tabelle 3.2: Das Zugprogramm von Armin Grundmann, das im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde um Nanokapillaren mithilfe des P-2000 herzustellen

Cycle	HEAT	FIL	VEL	DEL	PULL
1	520	3	10	128	0
2	520	3	10	128	0
3	520	3	10	128	0
4	520	3	15	128	255

Tabelle 3.3: Verwendete Materialien und Software

Glaskapillaren	Quarzglas, Länge 75 mm, Außendurchmesser 0,5 mm, Wandstärke 0,1 mm, Hilgenberg GmbH, Deutschland
Aluminiumbauteile	maßgefertigt, Mechanische Werkstatt der Universität Bielefeld, Deutschland
Einwegspritzen	Injectr 10 ml, B. Braun Melsungen AG, Deutschland; Norm-Jectr 1 ml, Henke-Sass, Wolf GmbH, Deutschland
Spritzenaufsatz	MicroFil TM , World Precision Instruments, Inc., USA
Spritzenfilter	0,2 μ m Celluloseacetat Membranfilter, VWR International, LLC, USA
Petrischalen	9 cm Durchmesser, Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Objektträger	3 \times 1 Zoll, IDL GmbH & Co KG, Deutschland
PDMS	Sylgardr 184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning Midland, USA
Reinstwasser	Milli-Qr, Millipore GmbH, Deutschland
Isopropanol	reinst, BDH Prolabo, VWR International S.A.S., Frankreich
Salzsäure	37 %, BDH Prolabo, VWR International S.A.S., Frankreich
Salpetersäure	65 %, Merck KGaA, Deutschland
Pufferlösung	1 M Kaliumchlorid, VWR International BVBA, Belgien; 10 mM Tris HCL, Fluka Chemie GmbH, Schweiz; 1 mM EDTA; Reinstwasser; pH 8; steril gefiltert
Elektroden	Ag/AgCl-Elektroden, Eigenbau
LabView	Software, 2009, 9.0.1 (32-bit), National Instruments Corp.
MatLab	Software, 7.11.0 R2010b 32-bit, MathWorks, Inc.
ImageJ	Software, 1.48v, National Institutes of Health, USA
Paint.NET	Software, v3.5.10, dotPDN LLC, Rick Brewster, and contributors

Tabelle 3.4: Verwendete Geräte

Mikropipettenzieher	Model P-2000, Sutter Instruments, USA
Helium-Ionen-Mikroskop	Orion Plus, Zeiss, Deutschland / USA
Plasmaanlage	Eigenbau
Lichtmikroskope	Eclipse Ti-U, Nikon Corporation, Japan BX51 TRF, Olympus Corporation, Japan
Patch-Clamp Amplifier	Axopatch 200B, Axon Instruments, Inc., USA
Datenschnittstellen	M3i.4831-Exp, Spectrum Systementwicklung Microelectronic GmbH, Deutschland; PCI-6052E, National Instruments Corp.
BNC-Adapter	BNC 2090, National Instruments Corp.
Sputteranlage	MED 020, Bal-Tec GmbH, Deutschland
Digitalkamera	Sony, Cyber-shot DSC-HX5V, Japan

3.2 Visualisierung und Modifikation am HIM

Um den Durchmesser der Pore der modifizierten Kapillare zu bestimmen, bedarf es der Betrachtung mithilfe eines hochauflösenden Mikroskops. In dieser Arbeit wird diese mithilfe des Helium Ionen Mikroskops untersucht. Hierfür muss die Pore der Kapillare senkrecht zur Abbildungsrichtung in die Probenkammer eingebracht werden. Da diese in der Höhe begrenzt ist, wurde wie zuvor erwähnt eine Länge von 2 cm für die Kapillare gewählt. Um effizienter zu arbeiten, wird ein Probenhalter aus Aluminium verwendet, mithilfe dessen sich sechs Kapillaren gleichzeitig in die Probenkammer einbringen lassen (vgl. Abbildung 3.2). Hierfür besitzt der Probenhalter sechs Bohrungen mit einem Durchmesser von 0,6 mm, in die die Kapillaren hineingestellt werden können. Da die Durchmesser der Bohrungen nur wenig größer sind als die Außendurchmesser der Kapillaren, sind diese gut fixiert, was zu einer besseren Auflösung beim Abbilden führt. Um dem im Abschnitt 2.1 erwähnten Problem vorzubeugen, dass sich nichtleitende Materialien schlechter abbilden lassen, werden die Kapillaren, nachdem sie in den Probenhalter eingebracht worden sind, mit Gold bedampft. Hierfür wird eine Sputteranlage verwendet, die um die Probe ein Gold-Ionen-Plasma erzeugt, von dem sich langsam und gleichmäßig einzelne Goldpartikel auf der Kapillare ablagern. Die Geometrie der Kapillare bleibt somit erhalten. Über eine Vorrichtung wird das Bedampfen mit Gold automatisch abgebrochen, sobald sich eine bestimmte Schichtdicke auf einem Sensor abgelagert hat. Der Vorgang wurde in allen Experimenten terminiert, sobald die Schicht eine Dicke von 30 nm erreicht hat.

Die vom HIM gewonnenen Informationen über die Oberflächenstruktur werden abgebildet und als Bilddatei im TIFF-Format ausgegeben. Für die Messung relevante Daten wie zum Beispiel die Höhe des Ionenstroms (Blanker Current), Belichtungszeit (Dwell Time) und ein Maßstab werden in diesem Bild gespeichert und dargestellt. Die Größe

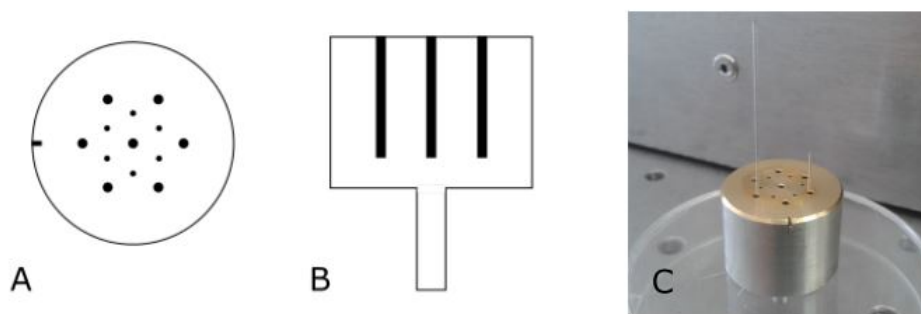


Abbildung 3.2: Von Armin Grundmann entwickelter Probenhalter für Glaskapillaren Analysen am Helium Ionen Mikroskop mit einem Radius von 10 mm und einer Höhe von 15 mm. Die inneren kleinen Bohrlöcher haben einen Durchmesser von 0,6 mm und eine Tiefe von 14 mm und werden zum Halten der Kapillaren genutzt [8]. (a) Schematische Ansicht von oben. (b) Schematischer Querschnitt. (c) Eingebachte Glaskapillaren in den Probenhalter. Die linke ungekürzte ist zu lang um in die Probenkammer eingebracht zu werden. Die nach der hier beschriebenen Methode verkürzte rechte Kapillare kann in die Probenkammer eingebracht werden.

der Pore wird manuell mit der Software ImageJ bestimmt, indem eine Maßlinie in das Bild gelegt wird. Hierbei gilt es zu beachten den Abstand mit der geringsten perspektivischen Verzerrung zu wählen. Die Wahl des Ionenstroms erfolgte je nach maximaler Tagesleistung des Gerätes um 0,5 pA bei gewählter Blendengröße von 10 μm .

Durch konstante Bestrahlung der Spitze wird diese unter Einwirkung der Helium Ionen verformt. Hierbei wird gezielt die Spitze der Kapillare bestrahlt, sowie gezielt ein Teilbereich der Glaswände, die diese Formen.

3.3 Konstruktion der Flusszellen

Die Flusszelle ist die Umgebung in der alle Experimente an der Kapillare stattfinden. Sie besteht aus zwei Reservoirs, die einzig durch die Kapillare verbunden sind. In Abbildung 3.3a ist der schematische Aufbau gut zu erkennen.

Hergestellt wird sie aus PDMS. Hierzu wird Prepolymer und Linker, im Verhältnis 10:1, jeweils mit einer Einwegspritze in eine Petrischale gegeben und verrührt. Anschließend wird die Mischung im Exsikkator für etwa 30 Minuten entgast, um so Lufteinschlüsse in der Struktur zu vermeiden. Das entgaste PDMS wird in eine Gussform aus Aluminium gegeben, sodass es beim Aushärten die gewünschte Form annimmt (vgl. Abbildung 3.3b). Um den Vorgang des Aushärtens zu beschleunigen, wird die befüllte Gussform im Ofen für mindestens 90 Minuten bei 85 Grad Celsius gebacken. Nachdem das PDMS ausgehärtet ist, wird es mithilfe eines Skalpell aus der Gussform gelöst und

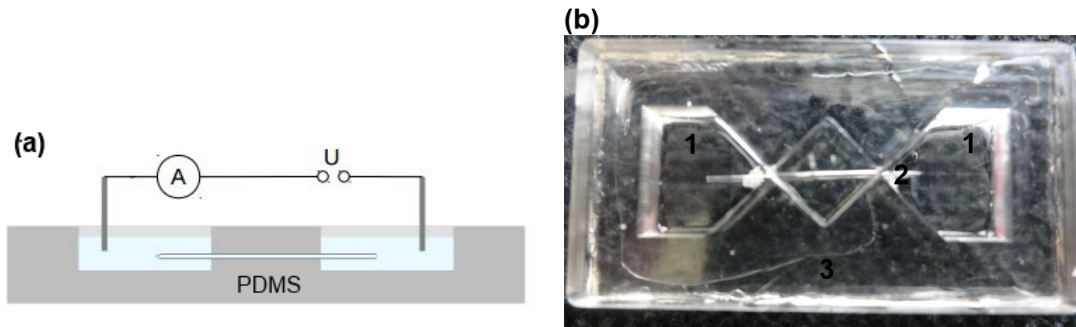


Abbildung 3.3: (a) Schematischer Aufbau der Flusszelle [8]. (b) Flusszelle aus ausgehärtetem PDMS mit (1) Reservoirs, (2) Kapillare und (3) PDMS-Form

es werden mögliche Überstände abgeschnitten. Die Kapillare wird in die dafür vorgesehene Einbuchtung gelegt und mit PDMS umgossen, sowie mit einem kleinen Deckel aus PDMS verschlossen. Hierauf folgt wieder ein Backvorgang im Ofen, jedoch sind hier aufgrund der geringen Menge PDMS schon 30 min ausreichend. Zur besseren Handhabung wird die Flusszelle auf einen Glasobjektträger gedrückt. Dies ermöglicht eine einfache Betrachtung unter dem Lichtmikroskop.

Zu beachten ist, dass die Kapillare, falls sie zuvor mit einer Goldschicht bedampft worden ist zur Betrachtung unter dem HIM, mit Königswasser behandelt werden muss, um die Goldschicht abzulösen. Das Königswasser wird hergestellt aus Salzsäure und Salpetersäure im Verhältnis 3:1. Die Kapillaren werden in dieses eingetaucht bis die Grünfärbung durch das Gold nicht mehr zu sehen ist und anschließend in Wasser gereinigt.

Die Reservoirs der fertigen Flusszelle besitzen ein Fassungsvermögen von $450 \mu\text{l}$.

3.4 Befüllen der Flusszellen

Die hergestellte Flusszelle muss im nächsten Schritt mit der Elektrolytlösung befüllt werden. Es wird eine Kalium-Chlorid-Pufferlösung gewählt. Es wurden 300 ml dieser Lösung für das Experiment angesetzt. Die Lösung ist 1M KCL, 1mM Tris und 0,1 mM EDTA. Das EDTA wird beigefügt um im späteren Verlauf die Interaktionen der DNA mit dem Glas zu reduzieren [17].

Um Experimente an der Flusszelle durchführen zu können, muss gewährleistet werden, dass ein Ionenfluss durch die Kapillare stattfinden kann. Typische Störungen, die dies verhindern, sind Luftblasen oder Verunreinigungen innerhalb der Kapillare, welche an der Pore oder am konischen Teil der Kapillare zu Verstopfungen führen können. Um Verschmutzungen möglichst auszuschließen wird die Pufferlösung mit einem $0,2 \mu\text{m}$ Cellulose-Acetat Membranfilter gefiltert. Zur Vermeidung von Luftblasen wird die Lösung mit Hilfe einer Einwegspritze und einem Verschlussstopfen entgast.

Um die Kapillare zu Befüllen wurden zwei verschiedene Methoden gewählt.

Die erste Methode ist das Befüllen der Reservoirs mit Isopropanol und anschließenden Entgasen im Exsikkator mit Unterdruck bis zu 0,2 mbar. Hierdurch entweicht die

Luft aus der Kapillare und diese füllt sich mit dem Isopropanol. Dieser Vorgang erfolgt innerhalb weniger Minuten. In Einzelfällen bleibt eine kleine Luftblase in Nähe der konisch zusammenlaufender Spitze zurück, die sich aber innerhalb kürzester Zeit auflöst. Anschließend wird das Isopropanol aus den Reservoirs entfernt. Zurück bleibt die vollständig mit Isopropanol befüllte Kapillare. Die Reservoirs werden dann mit der erwünschten Pufferlösung aufgefüllt. Anschließend vermischt sich das Isopropanol mit der Pufferlösung und ermöglicht so einen Ionenfluss durch die Kapillare.

Die zweite Methode beinhaltet eine direkte Befüllung mit der Pufferlösung. Die Reservoirs werden befüllt und die Kapillare verbleibt zunächst voller Luft. Anschließend wird die Flusszelle wieder in den Exsikkator eingebracht und es wird ein Unterdruck erzeugt. Die Luft entweicht aus der Kapillare und der Puffer wird hineingezogen. Dieser Prozess dauert länger als bei Methode eins und kann mehrere 30 minütige Entgasungsperioden erfordern (hierbei wurden die Reservoirs mit Pufferlösung aufgefüllt, sobald ein Großteil verdampft war). Es verbleibt meist trotzdem eine Luftblase im konischen Teil der Kapillare. Diese kann man versuchen mithilfe einer MicroFil-Spritze herauszuziehen oder zu verkleinern. Hierbei muss jedoch das Risiko einer Verschmutzung durch Abschabungen der Spitze der MicroFil-Spritze beachtet werden, die zur Verstopfung der Kapillare führen können.

Da beschrieben wurde, dass eine Hydrophilisierung der Glaskapillare durch Sauerstoffplasma das Befüllen erleichtert [6], wurden die Flusszellen mit den eingebauten Kapillaren für 30-120 Sekunden mit Sauerstoffplasma behandelt.

3.5 Messvorgang

Ist das Befüllen der Flusszelle ohne Blockade in der Kapillare gelungen, kann man diese in die Messvorrichtung einbringen. Diese besteht aus einer elektromagnetisch abgeschirmten Box, die sich auf einem schwingungs-gedämpften Tisch befindet. In dieser Box kann über zwei Ag/AgCl-Elektroden eine Spannung mit dem BNC-Adapter und dem Axopatch 200B Patch-Clamp Amplifier angelegt werden (vgl. Abbildung 3.4). Die Auswertung erfolgt am Computer, der die Messdaten über zwei Messkarten empfängt. Die Messkarte des Modells M3i.4831-Exp zeichnet die gemessene Stromstärke mit 65 Megasamples pro Sekunde auf, die andere, PCI-6052E, die angelegte Spannung mit 333 Kilosamples pro Sekunde. Es erfolgt eine Live-Auswertung und Aufzeichnung der Messwerte mittels eines von Lukas Bogunovic entwickelten und von Armin Grundmann optimierten LabView-Programms. Aufgrund der großen Datenmengen erfolgt eine Mittlung über eine bestimmbare Anzahl an Rohdaten. Dieser Vorgang wird als Binning bezeichnet. Bei der Messung am Axopatch 200 B wird mit einem alpha gain von 0,5 und einem beta gain von 1 oder 0,1 gearbeitet [7].

Als erstes wird der Leitwert der Flusszelle gemessen, um die Pore charakterisieren zu können. Hierfür wird je eine Elektrode in ein Reservoir gehängt und eine Spannung angelegt. Bei einer positiven Spannung befindet sich die Anode in dem Reservoir mit der Spitze der Kapillare. Es werden Spannungen zwischen -200 mV und 200 mV angelegt und die dazugehörige Stromstärke gemessen. Hierbei wurden mindestens 20 Datenpaare aufgenommen, wobei bei jeder Spannung über mehrere Sekunden gemessen wurde. Da hierbei

3 Material und Methoden

die zeitliche Auflösung nicht wichtig ist, wurde ein Binning von 50000 gewählt, um die Datengröße möglichst gering zu halten, was einer zeitlichen Auflösung von etwa 0,8 ms entspricht. Durch das Ein- und Abschalten der Spannung sind kleine Übergangsbereiche bei der Messung entstanden, bei denen die Stromstärke stark schwankte. Diese Bereiche wurden bei der Ermittlung des Leitwertes nicht berücksichtigt. Um den Leitwert zu ermitteln, wird der Strom gegen die Spannung aufgetragen. Es werden zwei lineare Fits gelegt, die durch den Ursprung verlaufen. Einer für den positiven der andere für den negativen Bereich, da hier je nach Versuchsbedingungen deutliche Abweichungen auftreten können.

Nach gelungener Leitwertmessung kann die Kapillare zur Translokationsmessung benutzt werden. Vor der eigentlichen DNA Messung wird eine Kontrollmessung durchgeführt, bei der die Lösung ohne DNA vorliegt. Hierbei sollten keine Peaks gemessen werden. Ist dies bestätigt kann DNA hinzugegeben werden. Es wird eine 15,6 nM λ -DNA Stammlösung verwendet. Es wird 1 μ l dieser Lösung mit einer Pipette möglichst nah vor die Spitze der Kapillare gegeben. Hierbei ist wichtig die Spitze nicht zu berühren, da es sonst zu einem Bruch kommen kann. Anschließend wird die Flusszelle wieder in den zuvor erwähnten Messaufbau eingebaut und eine Spannung von +200 mV angelegt. Die Rohdatenaufnahme erfolgt bis auf das Binning wie zuvor. Da bei der Messung die Durchtrittszeiten der DNA im Millisekundenbereich liegen, wurde hier ein Binning von 500 gewählt, was einer zeitlichen Auflösung von ungefähr 8 μ s entspricht. Die Daten wurden über einen Zeitraum von 5 Minuten aufgenommen. Die so erhaltene Datei hatte eine Größe um die 1,5 Gigabyte. Die Rohdaten werden im Nachhinein auf Peaks untersucht mithilfe eines weiteren Labview-Programms. Als Kriterium für einen Peak wird die Standardabweichung durch das Rauschen herangezogen. Überschreitet ein gemessener Stromstärkewert das n-fache dieser Standardabweichung wird er als Peak erkannt. Bei dieser Arbeit hat sich ein n von 4 als gute Bedingung erwiesen. Die Dauer des Events wird bestimmt über das Intervall des ersten Überschreitens der Abweichung vor dem Peak bis zum ersten Unterschreiten der Abweichung nach dem Peak. Die Stromstärkeänderung während eines Events wurde näherungsweise als niedrigster Stromstärkewert während des Events bestimmt.



Abbildung 3.4: Foto des Messaufbaus für die Leitwertmessungen und die DNA Translokationsexperimente. Links zu sehen ist ein schall- und schwingungsgedämpfter Tisch, mit einer lichtdicht verschließbaren Messkammer. In dieser befindet sich eine weitere verschließbare Messkammer, in der die Flusszellen an die Elektroden angeschlossen worden sind. Der zu sehende Laser und das Lichtmikroskop wurden für diese Experimente nicht genutzt. Von den genutzten Geräten sind rechts der Computer zu sehen, sowie der BNC-Adapter und Axopatch (von unten nach oben).

4 Ergebnisse und Auswertung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Glaskapillaren mit Porendurchmessern unter 100 nm angefertigt werden, die eine erfolgreiche DNA-Translokations Messung ermöglichen, um so mittels der Coulter-Counter Methode die DNA zu detektieren und charakterisieren. Hierfür wurden, wie in Kapitel 3 beschrieben, Glaskapillaren mit einem Mikropipettenzieher gezogen und die Pore anschließend mithilfe des Helium Ionen Mikroskops verkleinert. Diese wurden anschließend in eine Flusszelle eingebaut. Es wurde der elektrische Leitwert bestimmt und DNA Translokationen durch die Pore detektiert und anschließend ausgewertet.

Die erwähnten Methoden und die gewonnenen Ergebnisse werden in diesem Kapitel dargestellt, ausgewertet und diskutiert. Die Ergebnisse werden gegliedert dargestellt. Hierbei wird zu erst die Herstellung geeigneter Glaskapillaren mit Porendurchmessern unter 100 nm betrachtet. Anschließend wird auf die beiden Befüllmethoden eingegangen und deren unterschiedlichen Vor- und Nachteile diskutiert. Hierfür wird auf die Charakterisierung der Glaskapillare durch den elektrischen Leitwert eingegangen und dieser zur Überprüfung eines gelungen Befüllvorgangs genutzt. Abschließend werden die DNA Translokationsexperimente dargestellt und ausgewertet.

4.1 Reduktion der Porendurchmesser

Die Herstellung der Glaskapillaren mit dem Mikropipettenzieher führte zu Durchmessern von durchschnittlich 101 ± 33 nm (vgl. Tabelle 4.1) und erzielte somit in größerer Stichprobe kleinere Durchmesser als von Armin Grundmann beobachtet [8].

Das darauffolgende Verfahren am Helium Ionen Mikroskop zur Reduktion der Porendurchmesser unterlag größeren Schwankungen im Bezug auf die erreichte Reduktion. Es stellte sich heraus, dass die Reduktion schneller und verlässlicher erfolgte bei manueller Anpassung der Parameter während des Vorgangs. Es wurden gezielt Teile der Randbereiche der Glaskapillare mit dem Helium Ionen Mikroskop abgebildet, die so nacheinander eine Reduktion der Pore von allen Seiten aus bewirkte. Die so erreichte Reduktion lies sich in 5-10 Minuten erzielen. Diese Methode erwies sich effektiver, als die gesamte Pore statisch über die gleiche Zeit abzubilden. In Abbildung 4.1 und 4.2 sind zwei Porenreduktionen im Vorher-Nachher-Vergleich dargestellt.

Die Stärke der Reduktion unterlag mehreren Faktoren. Zum einen spielt die Ausrichtung der Spitze der Kapillare zum Ionenstrahl eine wichtige Rolle. Diese kann die Reduzierung des Porendurchmessers stark erschweren oder komplett verhindern. Weiterhin steht die Höhe der Stromstärke mit der gearbeitet wird, welche je nach Tagesleistung des Helium Ionen Mikroskops variieren kann, im Zusammenhang mit der Effektivität des Vorgangs. Sie hat Auswirkungen auf die Geschwindigkeit, mit der die Pore verkleinert wird, und aufgrund der Experimente lässt sich vermuten, auch darauf wie stark sie sich verkleinern lässt. Als letztes deuten die Experimente daraufhin, dass es noch spezifische Einflüsse durch die jeweilige Glaskapillare gibt. Hier sind vor allem Strukturunterschiede im Bereich der Pore zu nennen, die zu unterschiedlichen Reduktionen der Porendurchmesser führten. Die hier dargestellten Beobachtungen sind rein qualitativer

4.1 Reduktion der Porendurchmesser

Tabelle 4.1: Porendurchmesser der hergestellten Kapillaren vor der Reduktion des Porendurchmessers und danach. Die Nummerierung erfolgte nach Versuchsobjekt. Von insgesamt 26 mit dem Mikropipettenzieher hergestellten Kapillaren wurden die hier dargestellten mit dem HIM untersucht und bearbeitet.

	Porendurchmesser beim Herstellen [nm]	Porendurchmesser nach Reduktion [nm]
Durchschnitt	101 ± 33	64 ± 22
Kapillare 5	131 ± 6	76 ± 8
Kapillare 6	118 ± 7	70 ± 7
Kapillare 7	86 ± 9	47 ± 9
Kapillare 8	54 ± 8	31 ± 9
Kapillare 9	67 ± 7	47 ± 9
Kapillare 10	160 ± 8	43 ± 6
Kapillare 11	94 ± 9	78 ± 9
Kapillare 12	verschlossen	-
Kapillare 13	53 ± 8	29 ± 9
Kapillare 14	100 ± 9	76 ± 9
Kapillare 15	73 ± 9	66 ± 8
Kapillare 16	98 ± 9	86 ± 9
Kapillare 17	109 ± 8	58 ± 9
Kapillare 18	162 ± 6	110 ± 8
Kapillare 19	100 ± 8	61 ± 8
Kapillare 20	114 ± 6	80 ± 8

Natur. Für eine genauere Beschreibung bedürfte es einer quantitativen Untersuchung, die im Rahmen dieser Arbeit nicht zielführend gewesen wäre. Das Ziel dieser Arbeit verlässlich Glaskapillaren mit einem Porendurchmesser unter 100 nm herzustellen, die sich für DNA-Translokationsexperimente eignen, ist im Rahmen der dargestellten Methoden gelungen. Die Porendurchmesser nach dem Reduktionsverfahren am HIM betrug durchschnittlich 64 ± 22 nm (vgl. Tabelle 4.1).

4 Ergebnisse und Auswertung

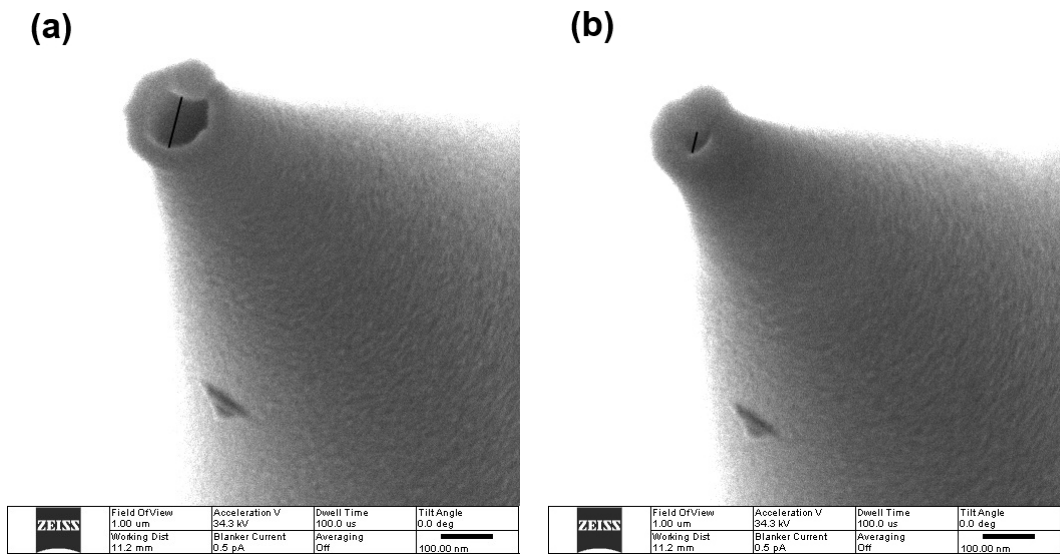


Abbildung 4.1: Beispiel einer erfolgreichen Reduktion des Porendurchmessers an Kapillare 6 (mit Gold beschichtet). (a) Die Spitze der Kapillare vor der Reduktion mit einem Porendurchmesser von 118 nm. (b) Die Spitze nach der Reduktion mit einem Porendurchmesser von 70 nm.

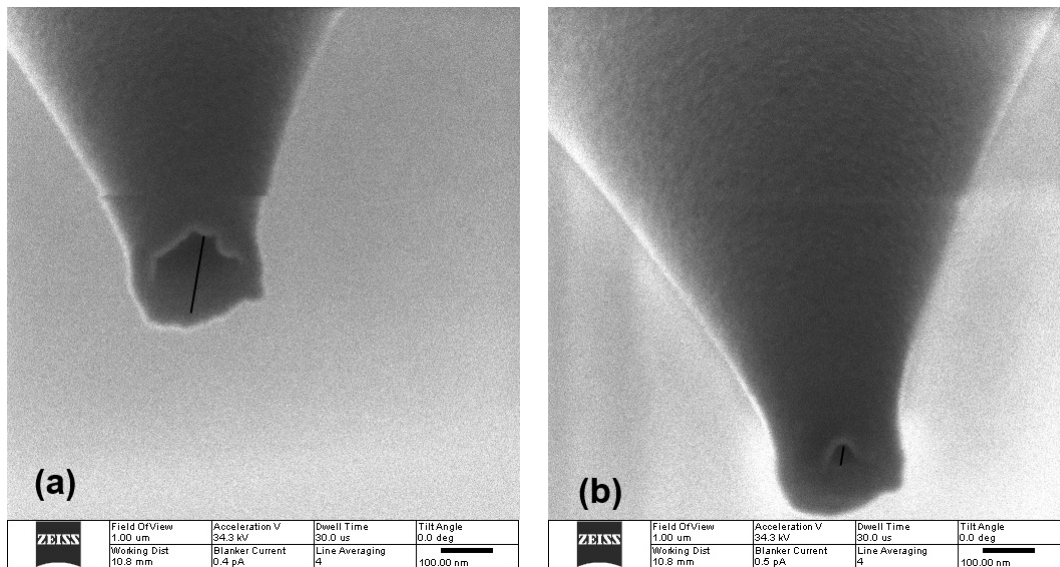


Abbildung 4.2: Beispiel einer erfolgreichen Reduktion des Porendurchmessers an Kapillare 10 (mit Gold beschichtet). (a) Die Spitze der Kapillare vor der Reduktion mit einem Porendurchmesser von 160 nm. (b) Die Spitze nach der Reduktion mit einem Porendurchmesser von 43 nm.

4.2 Befüllung mittels Isopropanol

Um die Befüllung der Glaskapillare zu vereinfachen wurde Isopropanol aufgrund seiner geringen Oberflächenspannung gewählt. Unter Vakuum zog sich das Isopropanol innerhalb weniger Minuten in die Kapillare und sorgte für eine Befüllung frei von Luftbläschen.

Nach Austausch des Isopropanols in den Reservoirs gegen die gewünschte Elektrolytlösung, KCl-Puffer, konzentrierte sich das Isopropanol noch in der Kapillare, vor allem in der Spitze und somit an der Pore. Aufgrund der geringen Leitfähigkeit von Isopropanol, das nahezu vollständig isolierend wirkt, ließen sich nicht direkt Messungen an der Flusszelle durchführen. Mit der Zeit vermischte sich das Isopropanol mit der Pufferlösung und verflüchtigte sich. Dieser Vorgang konnte über die Leitwertmessung der Kapillare nachvollzogen werden.

Ein typischer Verlauf ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Mischvorgang einen längeren Zeitraum in Anspruch nahm. Hierbei ist zu beachten, dass jeden Tag ein gewisser Teil der Flüssigkeit aus den Reservoirs verdampfte. Um den Flüssigkeitsverlust auszugleichen wurden die Reservoirs mit MilliQ-Wasser nachgefüllt, um die Konzentration der Pufferlösung konstant zu halten. Nach 3 Tagen war ein deutlicher Anstieg der Leitfähigkeit zu erkennen (vgl. Abbildung 4.3c). Tauschte man nun die Flüssigkeit der Reservoirs gegen frische Pufferlösung aus, entfernte man den Großteil des verbliebenen Isopropanols aus dem System und erhielt einen weiteren starken Anstieg des Leitwerts der zu dem Höchstwert für diese Kapillare führte (vgl. 4.3d).

Der hier zu erwartende Leitwert kann mithilfe der Formel 2.2.5 bestimmt werden. Im gezeigten Beispiel, bei einem Porendurchmesser von ungefähr 31 nm, wäre der zu erwartende Leitwert $G \approx 72 \text{ nS}$. Der zuletzt erreichte Leitwert ist in guter Annäherung und entspricht in etwa der von Steinbock festgestellten Diskrepanz [3]. Es ist zudem ein deutlicher Unterschied im Leitwert zu erkennen je nach Polung der Spannung. Der Grund für das Entstehen konnte nicht mit Sicherheit bestimmt werden. Es lässt sich jedoch sagen, dass dieser Effekt mit dem Isopropanol zusammenhängt, da er bei Isopropanol freien Messungen im vermessenen Bereich nicht beobachtet wurde. Weiterhin fiel auf, dass der Verlauf der U-I-Kennlinie mit fortschreitender Zeit nicht mehr linear war. Dies hängt mit kondensatorischen Auf- und Entladungsvorgängen zusammen, die bei befüllten Flusszellen schon bereits nach 24 Stunden auftreten können und sich mit zunehmender Dauer der Befüllung immer mehr verstärken. Diese Effekte wurden mit steigender Spannung stärker. Außerdem begann die Stromstärke nach längerer Befüllung kontinuierlich um mehrere pA pro Sekunde zu steigen.

Hier wird auch der große Nachteil der Befüllmethode mittels Isopropanol deutlich. Trotz der anfänglich einfachen Befüllung war die Kapillare erst nach längerer Zeit vermessbar. Zu diesem Zeitpunkt waren jedoch schon so viele Störungen im System, dass eine exakte Leitwertbestimmung kaum möglich ist. Außerdem blieb grade bei höheren Spannungen über 100 mV die Stromstärke nicht mehr konstant und änderte sich in Sekunden um mehrere pA, was eine Untersuchung von DNA-Translokationen zusätzlich stark erschwerte, wenn nicht gar unmöglich machte. Mit dem Ziel DNA-Translokationen zu untersuchen musste also ein anderer Ansatz gewählt werden, der es ermöglichte die Experimente innerhalb der ersten Stunden nach Befüllung durchzuführen.

4 Ergebnisse und Auswertung

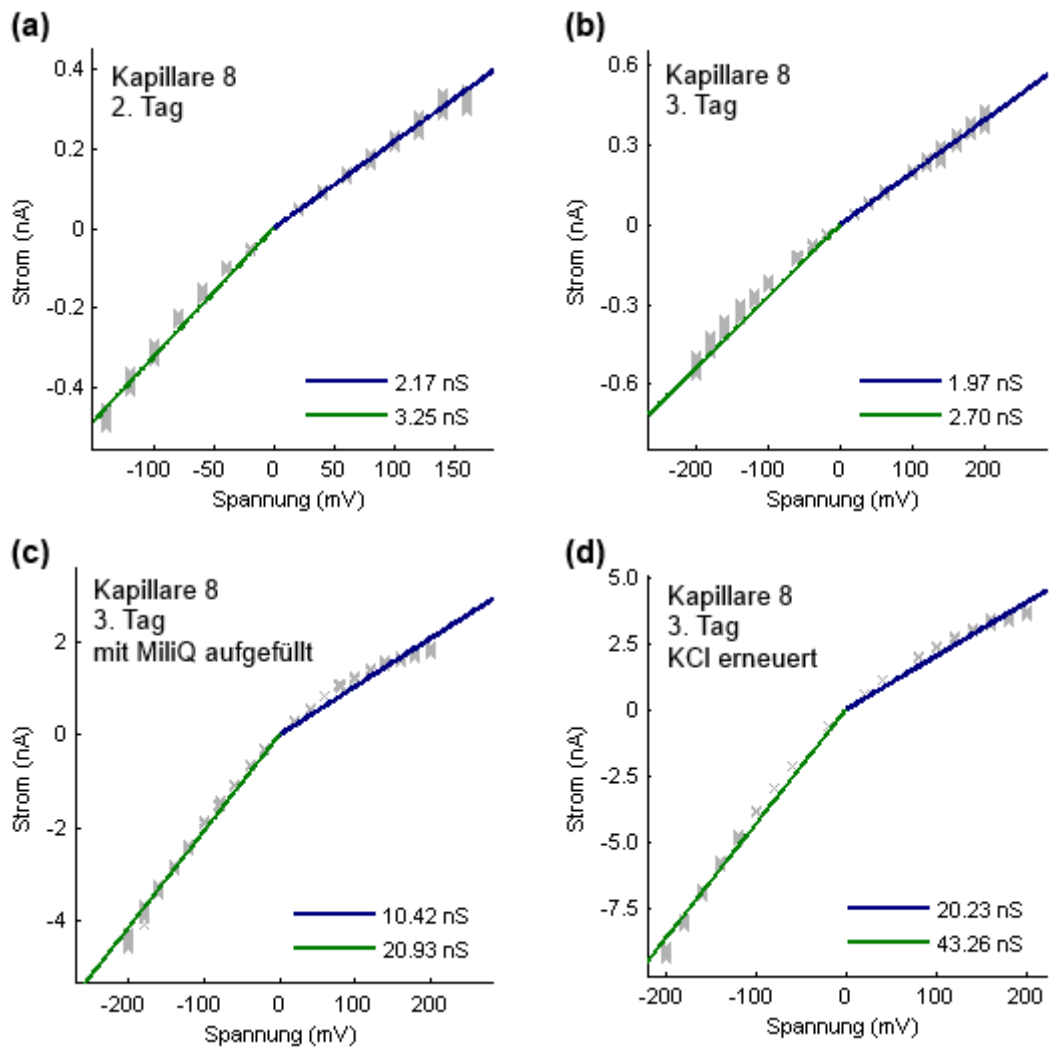


Abbildung 4.3: Hier abgebildet ist eine typische Leitwertentwicklung über mehrere Tage nach der Befüllung mit Isopropanol und anschließendem Austausch gegen KCl am Beispiel der Flusszelle mit Kapillare 8. (a) Zwei Tage nach der Befüllung. (b) Drei Tage nach der Befüllung. (c) Am dritten Tag nach der Befüllung, 30 Minuten nach dem Auffüllen mit MiliQ-Wasser (d) Am dritten Tag nach der Befüllung, nach dem Austauschen des Puffers in den Reservoirs mit frischer Pufferlösung.

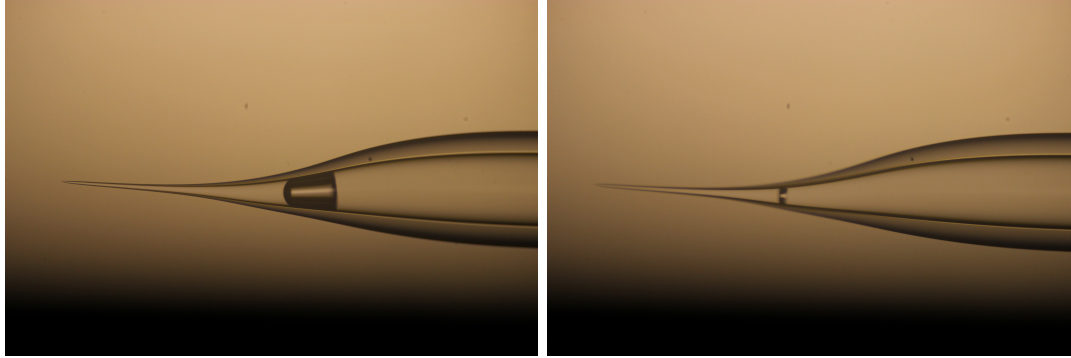


Abbildung 4.4: Aufnahme der Kapillare 4 unter dem Lichtmikroskop mit einer Digitalkamera. (a) Nach einem Entgasungsvorgang von 20 Minuten im Exsikkator. (b) Nach zweifacher Wiederholung des Entgasungsvorgangs.

4.3 Direkte Befüllung mit Pufferlösung

Ziel der direkten Befüllung der Flusszelle mit Pufferlösung war es die sofortige Nutzbarkeit zur Messung zu garantieren. Somit wurde keine Vorfüllung mit Isopropanol durchgeführt, sondern die Kapillare wurde direkt mit der Pufferlösung unter Vakuum befüllt. Dieser Vorgang wurde durch die hohe Oberflächenspannung des Puffers, der hauptsächlich aus Wasser besteht, erschwert. Somit nahm die Zeit, die unter Vakuum benötigt wurde, stark zu.

Es zeigte sich das nach 20-30 Minuten der Großteil der Kapillare befüllt war. Es verblieb meist eine größere Luftblase im konischen Teil (vgl. Abbildung 4.4a). Diese Luftblase verstopfte die Kapillare und verhinderte somit die Nutzung der Flusszelle. Es wurde versucht diese Luftblasen durch mehrmaliges Wiederholen des Entgasungsvorgangs zu entfernen. Eines der besten Ergebnisse ist in Abbildung 4.4b zu sehen. Trotz der Verkleinerung des Lufteinschlusses, blieb die Kapillare weiterhin verstopft. In der Literatur ist eine Verbesserung dieses Vorgangs durch vorgehende Hydrophilisierung durch Sauerstoffplasma beschrieben [6]. Dies konnte nicht bestätigt werden. In den hier bearbeiteten Flusszellen zeigte sich kein Unterschied zu denen die mit Sauerstoffplasma hydrophilisiert wurden waren. Zum Ende der Arbeit wurde festgestellt, dass die Plasmaanlage vermutlich mit oberflächenaktiven Substanzen (Silanen) verschmutzt war, sodass dies Grund für die fehlende Verbesserung sein könnte.

Weiterhin wurde beobachtet, dass diese sichtbaren Luftblasen innerhalb eines Tages verschwanden. Viele dieser Kapillaren waren aber trotzdem nicht messbar und bei den anderen traten die im Abschnitt 4.2 erwähnten Effekte auf. Eine Aussicht diese Luftblasen zeitnah zu entfernen, stellten die MicroFil-Spritzen dar. Mit ihnen ist ein Eindringen in die Kapillare bis zum konischen Teil der Kapillare möglich. An dieser Stelle verengt sich die Kapillare und läuft zur Spitze zusammen. Hier ist der Innendurchmesser zu gering, sodass die MicroFil-Spritze nicht weiter eindringen kann. Da sich die meisten Luftblasen wie in Abbildung 4.4 im konischen Teil befanden, konnten sie auf diese Weise

4 Ergebnisse und Auswertung

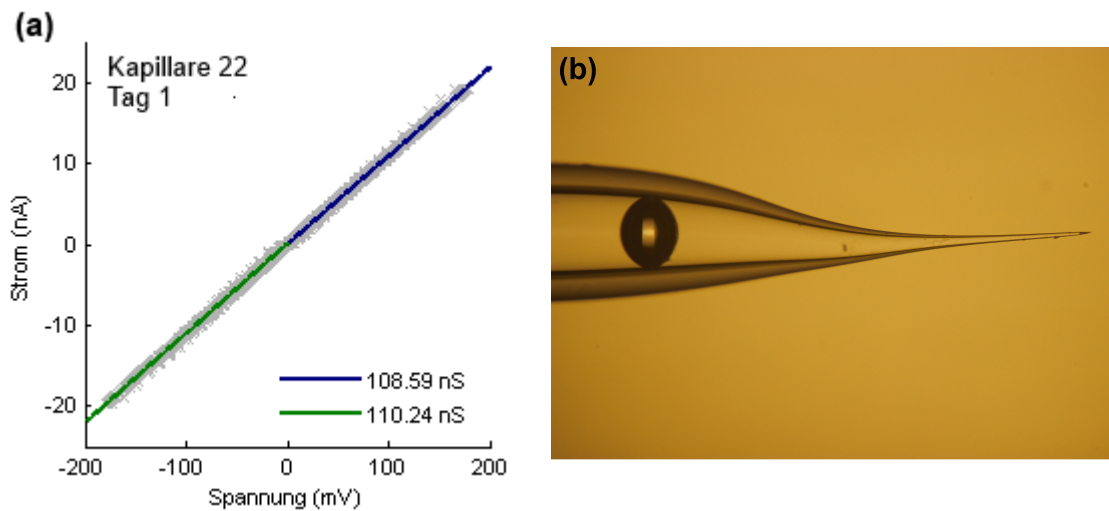


Abbildung 4.5: Kapillare 22. (a) Erfolgreiche Leitwertbestimmung, nach direkter Befüllung mit Pufferlösung, bei einem vermuteten Porendurchmesser von 101 nm ergab ungefähr 110 nS. (b) Aufnahme der Lufteinschlüsse nach dem Entgasen, die erfolgreich entfernt werden konnten, unterm Lichtmikroskop mit einer Digitalkamera.

nicht entfernt werden. In Abbildung 4.5b ist ein Beispiel dargestellt, bei dem es möglich war die Luftblase zu entfernen. Eine zweite kleine Luftblase direkt in der Spitze löste sich durch Anlegen der elektrischen Spannung. Somit konnte Kapillare 22 vermessen werden. Die Leitwertmessung ergab einen Wert von $G = 110$ nS und ist in Abbildung 4.5a dargestellt.

Gut zu erkennen ist der strikt lineare Verlauf und der so gut wie identische Verlauf bei beiden Polungen. Auch hier kann wieder der zu erwartende Leitwert bestimmt werden, um das Ergebnis zu bewerten. Da Kapillare 22 nicht mit dem Helium Ionen Mikroskop untersucht wurde, wird hier der Mittelwert der nicht reduzierten Porendurchmesser in Höhe von 101 nm als Erwartungswert angenommen (vgl. Tabelle 4.1). Der über Formel 2.2.5 bestimmte Porendurchmesser bei einem Leitwert von 110 nS würde ungefähr 47 nm betragen und ist in Anbetracht der erwähnten Diskrepanz in guter Näherung.

4.4 Wiederverwendbarkeit

In diesem Abschnitt gehe ich auf die Frage der Wiederverwendbarkeit der Flusszellen ein.

Als erstes ist hierbei anzumerken, dass eine befüllte Flusszelle nicht wieder in ihren Ausgangszustand zurückgeführt werden konnte. Grund hierfür ist, dass selbst nach mehreren Wochen an der Luft noch Flüssigkeit im konischen Teil der Kapillare aufgrund von Kapillarkräften verblieb. Dieser konnte mittels Vakuumtrocknung über einen Zeitraum

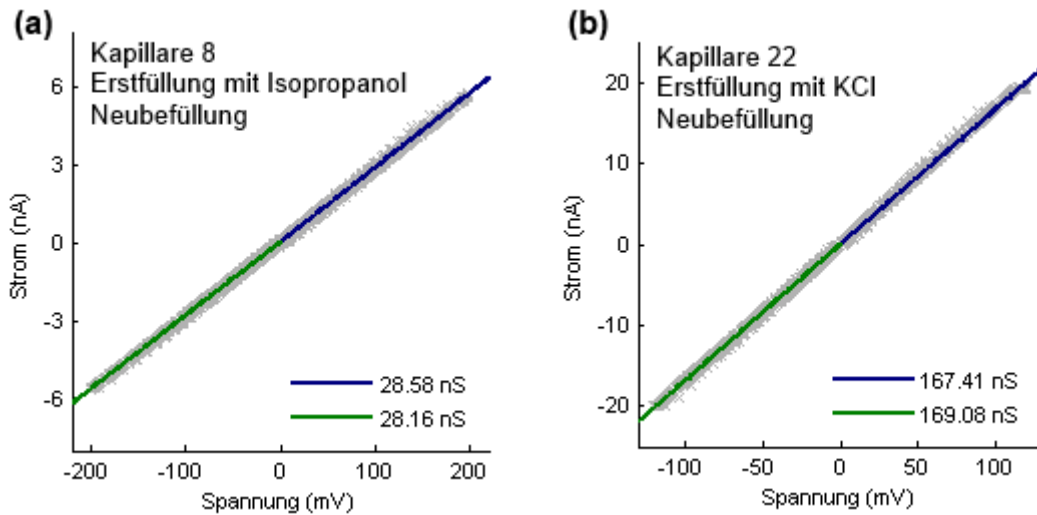


Abbildung 4.6: (a) Kapillare 8, die mit der Isopropanol Methode zuerst befüllt worden war und anschließend getrocknet war. Nach dem Wiederbefüllen mit Puffer war ein ähnlicher Leitwert wie nach dem entfernen des Isopropanols zu beobachten (vgl. Abbildung 4.3d). Dieser betrug 28 nS (vorher ≈ 20 nS). (b) Neubefüllung der Kapillare 22 mit Pufferlösung, nachdem die direkt mit Pufferlösung befüllte Flusszelle getrocknet war, zeigte einen erhöhten Leitwert von ungefähr 168 nS im Vergleich zur Erstbefüllung (110 nS) (vgl. Abbildung 4.5a), was auf erhöhte Salzkrückstände in der Kapillare vor der Wiederauffüllung zurückzuführen war.

von 40-60 Stunden vollständig entfernt werden. Zurück blieben aber Reste der Salzkristalle innerhalb der Kapillare.

Es hat sich als praktisch erwiesen, nach beendeten Gebrauch die Reservoirs zu leeren und die Flusszelle an der Luft trocknen zu lassen. Hiermit wurden übermäßige Salzreste in den Reservoirs vermieden. Eine erneute Befüllung der noch teilweise befüllten Flusszellen gelang meist problemlos. So konnten auf diese Weise getrocknete Flusszellen nach mehreren Wochen direkt mit Pufferlösung wieder befüllt werden. Es zeigte sich bei Flusszellen, die Eingangs mit der Isopropanol Methode befüllt worden waren, dass das Isopropanol nahezu vollständig aus der Lösung entwichen war und es stellte sich der zu erwartende Leitwert ein mit strikt linearen Verlauf. In Abbildung 4.6a ist am Beispiel von Kapillare 8 zu sehen, wie der Leitwert nach dem Entfernen des Isopropanols dem der Neubefüllung ähnelt.

Hierbei ist zu erkennen, dass sämtliche Störungen, die durch zulange Befüllung auftraten (vgl. Abschnitt 4.2), bei ausreichend langer Trocknung nicht mehr auftraten. Die genaue Dauer konnte anhand der hier untersuchten Objekte nicht eindeutig bestimmt werden, ist jedoch auf einen Zeitraum größer einer Woche einzuschätzen.

Eine anschaulichere Beschreibung kann an einer Flusszelle erfolgen, die Eingangs di-

rekt mit Puffer befüllt wurde. Hierfür wird wieder exemplarisch Kapillare 22 betrachtet. In Abbildung 4.6b ist zu erkennen, dass der Leitwert nach Neubefüllung größer war als zuvor. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Großteil der in der Kapillare befindlichen Flüssigkeit während der Trocknung verdampfte und sich das darin enthaltende Salz in der Kapillare absetzte. Füllte man nun die Flusszelle mit Pufferlösung erhielt man eine Erhöhung der Salzkonzentration und somit einen höheren spezifischen Leitwert der Elektrolytlösung. Dies ergab nach 2.2.5 auch einen höheren Leitwert für die Flusszelle. Diese Auswirkung könnte minimiert werden, indem man versuchen würde mit einer MicorFil-Spritze möglichst viel Pufferlösung aus der Kapillare zu ziehen. Auf dieses Vorgehen wurde hier verzichtet, da bei jeder Nutzung der MicroFil-Spritze das Risiko eines Abriebs dieser in der Kapillare besteht und somit einer Verschmutzung oder schlimmstenfalls einer Verstopfung.

Abschließend ist noch die Lebensdauer der Flusszellen zu erwähnen. Es zeigte sich, dass diese unbefüllt mehrere Monate haltbar sind. Dahingegen zeigten sich bei tagelanger Befüllung starke Leitwertsprünge bis hin zu riesigen Leitwerterhöhungen.

4.5 DNA-Translokationsexperimente

Die Ergebnisse zu den DNA-Translokationsexperimenten werden anhand von drei Kapillaren dargestellt. Zum einen an den hier vorgestellten Kapillaren 22, mit einem Leitwert von 168 nS, und Kapillare 8, mit einem Leitwert von 28 nS. Außerdem wurden DNA Translokationen bei Kapillare 6 detektiert, deren Spitze gebrochen war und die einen Leitwert von 400 nS aufwies. Zuerst werden Kapillare 6 und 22 betrachtet und ausgewertet, da diese beide Porendurchmesser über 100 nm besitzen. Anschließend werden anhand von Kapillare 8 die Vor- und Nachteile eines kleineren Durchmessers betrachtet. Abschließend werden die gewonnenen Ergebnisse diskutiert und mit den Ergebnissen aus der Steinbock Arbeitsgruppe [3] verglichen.

Translokationen durch große Poren

Die DNA wurde außerhalb der Kapillare vor die Pore gegeben. An die Elektrode im gegenüberliegenden Reservoir wurde eine Spannung von +0,2 V angelegt. Durch das entstehende elektrische Feld translokierte die negativ geladene DNA, zu dieser Elektrode hin, durch die Pore. Die DNA hatte nun mehrere Möglichkeiten durch die Pore zu gelangen. Der Fall in dem die geringste Stromstärkeänderung auftrat, ist der, wenn die DNA ungefaltet, sozusagen als gestreckte Kette, die Pore durchquerte. Hieraus bildeten sich jetzt mehrere Varianten. Die DNA konnte sich beispielsweise falten und somit doppelagig bzw. mit mehreren Lagen durch die Pore hindurchgehen. Auch war es möglich, dass die DNA nur partiell mehrlagig war, sodass sich Peaks mit Plateaus ergaben. Eine andere Möglichkeit war, dass sich die DNA nur in die Pore einfädelt und nicht hindurchgeht. Dies hatte einen Peak zur Folge, der eine besonders geringe Dauer hatte. Zudem war es möglich, dass mehrere DNA Moleküle gleichzeitig die Pore in einer der erwähnten Varianten durchqueren. Einige Beispiele sind anhand von Kapillare 8 in Abbildung 4.7 dargestellt.

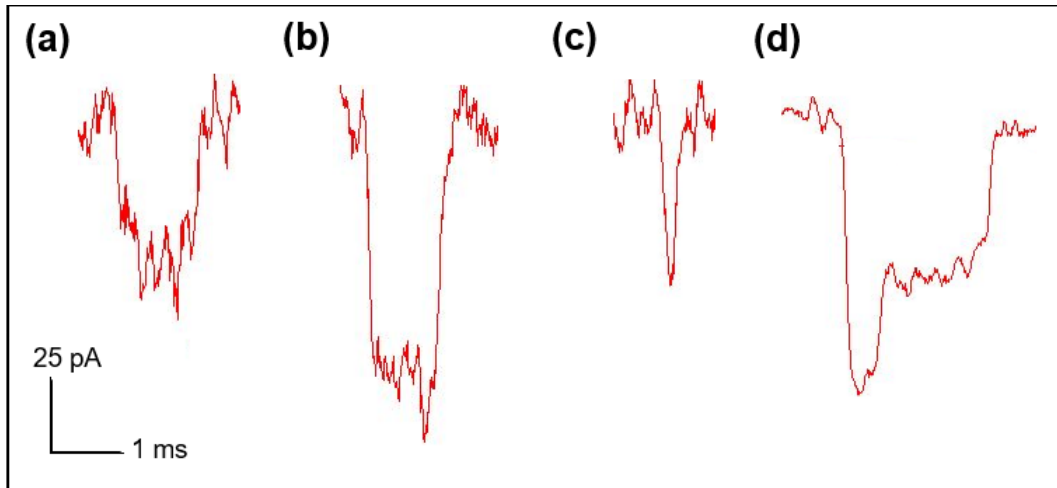


Abbildung 4.7: Translokationsevents der Kapillare 8 mit einem Leitwert von 28 nS. (a) Eine Translokation von einer ungefalteten DNA. (b) Eine Translokation einer doppelsträngigen DNA. (c) Ein Einfädeln der DNA ohne Translokation, das an der sehr kurzen Dauer zu erkennen ist. (d) Ein Plateaupeak, der entweder durch partiell mehrlagige DNA oder zwei sich überschneidende Translokationen entstand.

Die aufgenommenen Rohdaten wurde auf Translokationsevents untersucht. Als Erkennungsmerkmal für ein Event (Peak) wurde eine Abweichung der Stromstärke von mindestens viermal der Standardabweichung gewählt. Die so erhaltenen Peaks wurden auf Höhe und Dauer analysiert. Bei Kapillare 6 befanden sich die Stromstärkeänderung während der Events zwischen -60 und -200 pA bei Translokationsdauern von bis zu 2.5 ms bei einem Rauschen von ungefähr 40 pA. In Abbildung 4.8 sind die 273 aufgenommenen Events nach Häufigkeiten der Peakhöhen aufgetragen und mit einer Multipeak Gauß Funktion gefittet. Es ergeben sich Peaks der Gauß Funktion bei $-113 \pm 0,6$, $-148 \pm 0,6$ und $-193 \pm 14,2$ pA. Es ist zu erkennen, dass die Höhe dieser Peaks ungefähr ein Vielfaches von -50 pA ist. Da die Peakhöhen jeweils Vielfache der Stromstärkeänderung der ungefalteten Translokation sein müssen, lässt sich hieraus schließen, dass der ungefaltete Translokations Modus sich nicht ausreichend vom Rauschen abhob und nur Translokationen von mehrlagiger DNA ausgewertet werden konnten.

Um zu untersuchen, ob es sich um einzelne DNA Stränge handelte die bei einem Event detektiert worden, wurde die Gesamtladung, die während einer Translokation am Durchtritt durch die Pore gehindert wurde, betrachtet. In Abbildung 4.8b ist der Flächeninhalt der Translokationspeaks als Histogramm abgebildet. Sollte es sich immer nur um einen DNA Strang handeln, sollte das Produkt aus Stromstärkeänderung und Translokationsdauer immer gleich sein. Es zeigt sich durch fitten einer Gauß Kurve ein Erwartungswert von $-89,6 \pm 1,4$ fAs. Die einzelnen Werte, die innerhalb des zweiten Peaks bei $-240,1 \pm 2,8$ fAs liegen, sind auf Plateau Translokationen zurückzuführen, die

4 Ergebnisse und Auswertung

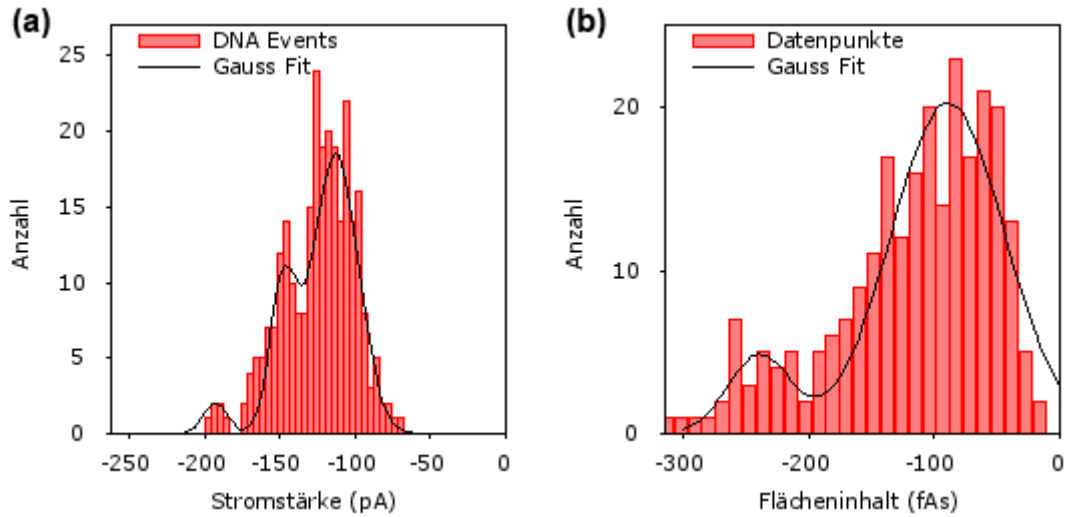


Abbildung 4.8: (a) Stromstärke Histogramm der an Kapillare 6 detektierten 273 Events. An dieses wurde eine Multipeak Gauß Funktion gefittet mit Peaks ungefähr bei $-113 \pm 0,6$, $-148 \pm 0,6$ und $-193 \pm 14,2$ pA. (b) Auftragung des Flächeninhalts der an Kapillare 6 aufgenommenen Translokationsevents in einem Histogramm und ein Gauß Fit mit Peaks bei $-89,6 \pm 1,4$ fAs und $-240,1 \pm 2,8$ fAs.

mit der beschriebenen Auswertungsmethode nicht korrekt verarbeitet werden konnten, und auf die gleichzeitige Translokation von zwei DNA Molekülen.

Mithilfe der Annahme, dass bei jeder Translokation der DNA die insgesamt blockierte Ladung durch den Erwartungswert des Flächeninhalt-Histogramms gegeben ist, kann man die theoretische Translokationsdauer für ungefaltete DNA näherungsweise berechnen,

$$d_{un} = \frac{\text{Flächeninhalt}}{0,5 I_{dl}} = \frac{-89,6 \text{ fAs}}{-56,5 \text{ pA}} = 1,59 \pm 0,02 \text{ ms} \quad (4.5.1)$$

mit der Peakhöhe von der doppelagigen DNA Translokation I_{dl} und dem Fehler nach Gauß.

Als zweites wird Kapillare 22 mit einem Leitwert von 160 nS betrachtet. Es ließen sich Events detektieren im Bereich von -85 pA bis -370 pA bei Translokationzeiten bis zu 4,3 ms bei einem Rauschen von ungefähr 30 pA. In Abbildung 4.9 links sind die Peakhöhen der einzelnen Peaks im Histogramm aufgetragen und mit einer Multipeak Gauß Funktion gefittet. Es finden sich Peaks bei $-140,5 \pm 3,9$ pA, $-225,9 \pm 2,1$ pA, $-312,6 \pm 1,4$ pA. Die Peaks liegen knapp 85 pA auseinander, was wieder dafür spricht, dass auch hier die ungefalteten Translokationen der DNA durch das Auswertungsprogramm nicht vom

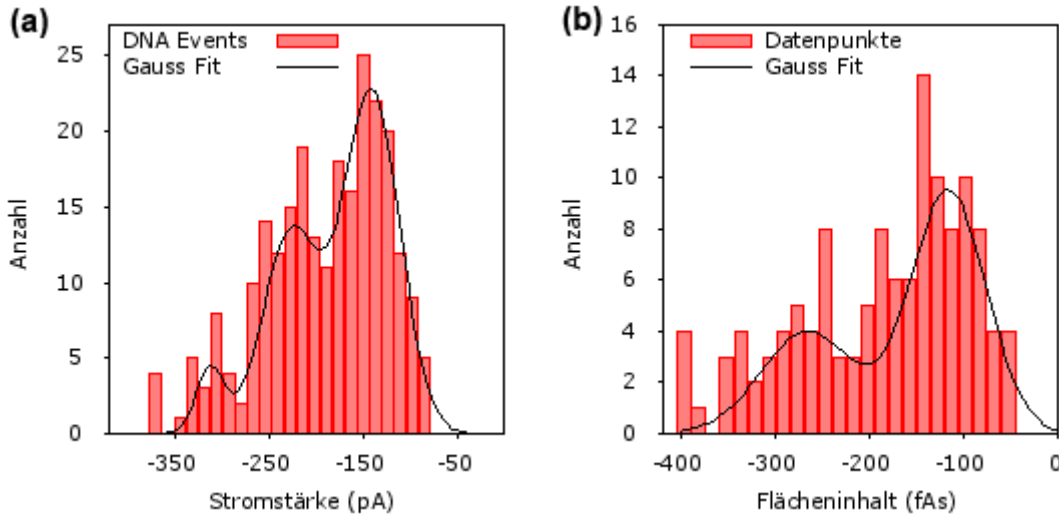


Abbildung 4.9: (a) Stromstärke Histogramm der an Kapillare 22 detektierten 164 Events. An dieses wurde eine Multipeak Gauß Funktion gefittet mit Peaks ungefähr bei $-140,5 \pm 3,9$ pA, $-225,9 \pm 2,1$ pA, $-312,6 \pm 1,4$ pA. (b) Auftragung des Flächeninhalts der an Kapillare 22 aufgenommenen Translokationsevents in einem Histogramm und einem Multipeak Gauß Fit mit Peaks bei $-116,2 \pm 3,0$ fAs und $265,8 \pm 4,3$ fAs. Aufgrund der beiden Peaks im ähnlichen Abstand ist zu erkennen, dass hier häufig zwei DNA Moleküle gleichzeitig translokiert sind.

Rauschen unterschieden werden konnten.

In Abbildung 4.9b ist die während der Translokation insgesamt blockierte Ladung aufgetragen und mit einer Multipeak Gauß Kurve gefittet. Es zeigen sich zwei Peaks bei $-116,2 \pm 3,0$ fAs und $265,8 \pm 4,3$ fAs. Da bei den Translokationen nicht immer die gleiche Ladung blockiert wurde, deutet dies darauf hin, dass teilweise zwei DNA Moleküle die Pore gleichzeitig passiert haben. Dies wird durch den ungefähr gleichen Abstand der Peaks voneinander untermauert.

Wie zuvor kann auch hier näherungsweise die Translokationsdauer für eine ungefaltete DNA Translokation ermittelt werden

$$d_{un} = \frac{\text{Flächeninhalt}}{0,5 I_{dl}} = \frac{-116,2 \text{ fAs}}{-70,3 \text{ pA}} = 1,65 \pm 0,10 \text{ ms} \quad (4.5.2)$$

mit der Peakhöhe von der doppelagigen DNA Translokation I_{dl} und dem Fehler nach Gauß.

4 Ergebnisse und Auswertung

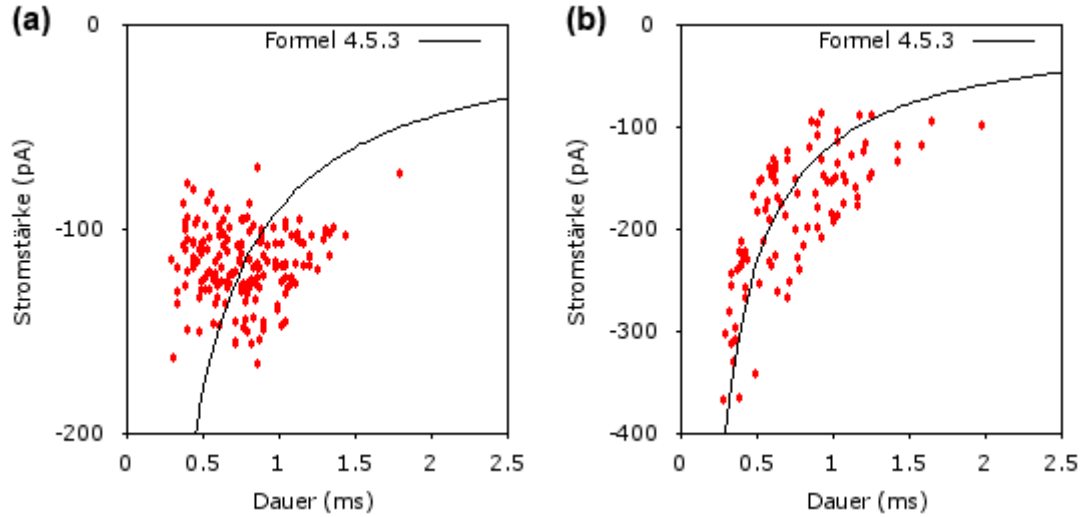


Abbildung 4.10: (a) Auftragung der Stromstärkeänderung gegen die Translokationsdauer der an Kapillare 6 gemessen 181 Events, deren gesamt blockierte Ladung von $-89,6 \pm 60$ pA auf eine einzelne Translokation hinweist. Die schwarze Kurve nutzt Formel 4.5.3 mit den Werten $t_{un} = 1,59$ ms und $I_{un} = 56,5$ pA. (b) Auftragung der Stromstärkeänderung gegen die Translokationsdauer der an Kapillare 22 gemessen 96 Events, deren gesamt blockierte Ladung von $-109,8 \pm 60$ pA auf eine einzelne Translokation hinweist. Die schwarze Kurve nutzt Formel 4.5.3 mit den Werten $t_{un} = 1,65$ ms und $I_{un} = 70,3$ pA.

Ein genereller Zusammenhang zwischen Stromstärkeabfall I während eines Events und der Dauer t von diesem, wurde von Li et al. beschrieben [18]

$$I(t) = \frac{I_{un}t_{un}}{t} \quad (4.5.3)$$

mit I_{un} der Stromstärkeänderung während einer Translokation von ungefalteter DNA und t_{un} der Dauer dieser. Hierbei ist zu beachten, dass dieser Zusammenhang nur für Events gilt, bei denen DNA Moleküle einzeln die Pore passieren. In Abbildung 4.10 sind für Kapillare 6 und 22 alle Datenpunkte, die dieses Kriterium erfüllen, d.h. deren gesamt blockierte Ladung sich im geringsten Peak befindet (vgl. Abbildung 4.8b und 4.9b), abgebildet und mittels den näherungsweise berechneten Werten Formel 4.5.3 aufgetragen. Bei Kapillare 6 ist der Zusammenhang zu erahnen, wohingegen er bei Kapillare 22 sehr deutlich zu erkennen ist.

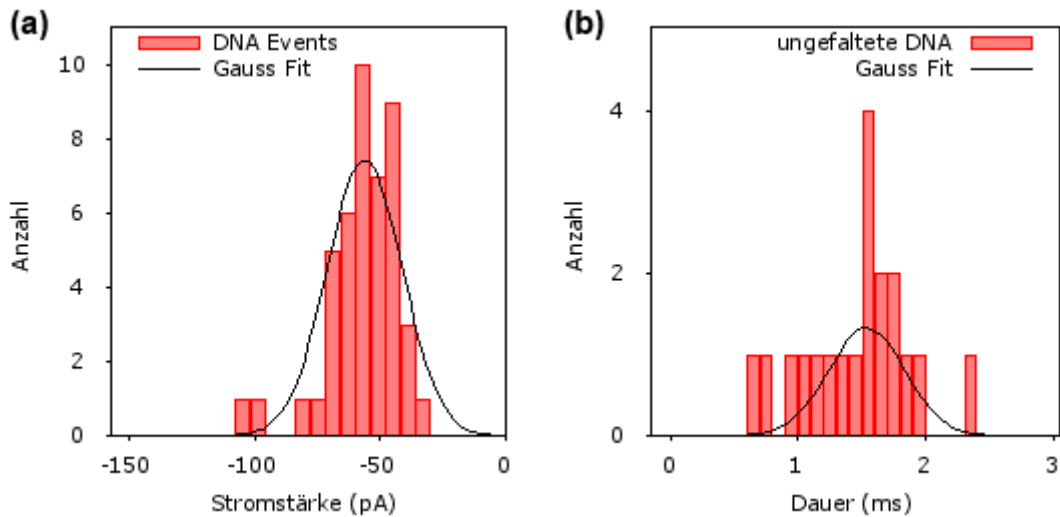


Abbildung 4.11: (a) Stromstärke Histogramm der an Kapillare 8 detektierten 45 Events. An dieses wurde eine Gauß Funktion gefittet mit dem Peak bei $-56,3 \pm 2,2$ pA. (b) Auftragung der Translokationsdauern der an Kapillare 8 detektierten Events mit einer Stromstärkeänderung von $-56,3 \pm 10$ pA. Die Gauß Kurve zeigt einen Erwartungswert von $1,54 \pm 0,05$ ms für eine ungefaltete DNA Translokation.

Translokation durch kleine Pore

Mit Kapillare 8 gelang es mit der am HIM verkleinerten Pore erfolgreich DNA Translokationsexperimente durchzuführen. Der am HIM ermittelte Porendurchmesser betrug 31 nm. Es konnte ein Leitwert von 28 nS bestimmt werden. Es wurden 45 Translokations-events detektiert im Bereich von -35 pA bis -108 pA bei Translokationzeiten bis zu 2,5 ms und einem Rauschen von ungefähr 10 pA. In Abbildung 4.11a sind die Peakhöhen aufgetragen und mit einer Gauß Funktion gefittet. Es ergibt sich ein Peak bei $-56,3 \pm 2,2$ pA. Dies deutet daraufhin, dass hier tatsächlich ungefaltete DNA Translokationen detektiert wurden sind. Aufgrund dessen ist eine direkte Betrachtung der Translokationsdauern der Events um die erwartete Stromstärkeänderung von -56,3 pA sinnvoll, da so die Dauer für Translokationen von ungefalteter DNA direkt abgebildet werden kann. In Abbildung 4.11b sind die Translokationsdauern der Events mit Peakhöhen von $-56,3 \pm 10$ pA aufgetragen. Die Gauß Kurve ergibt einen Erwartungswert von $1,54 \pm 0,05$ ms für eine ungefaltete DNA Translokation.

Eine weiterführende Auswertung ist aufgrund der geringen Anzahl an Events hier wenig sinnvoll. Nichts desto trotz konnte gezeigt werden, dass das Rauschen bei ausreichend kleinen Poren sehr gering wird und so die Detektion von einzelnen DNA Molekülen erlaubt.

4 Ergebnisse und Auswertung

Tabelle 4.2: Zusammenfassung aller wichtigen Parameter und Ergebnissen zu den Translokationsexperimenten an Kapillare 6, 8 und 22.

	Kapillare 6	Kapillare 22	Kapillare 8
Porendurchmesser	>171nm*	~101 nm*	31 nm
elektrischer Leitwert	400 nS	168 nS	28 nS
Rauschen	~40 pA	~30 pA	~10 pA
Anzahl detektierter Events	>273	>164	45
Stromstärkeabfall bei ungefalteter DNA Translokation	-56,5 pA*	-70,3 pA*	-56,3 pA
Translokationsdauer eines ungefalteten DNA Moleküls	1,59 ± 0,02 ms*	1,65 ± 0,10 ms*	1,54 ± 0,05 ms

Diskussion

In Tabelle 4.2 sind alle wichtigen Parameter und experimentellen Ergebnisse auf einen Blick aufgelistet.

Es zeigt sich, dass die Ergebnisse für die Stromblockade durch eine Translokation einer ungefalteten DNA und deren Translokationsdauer bei den unterschiedlichen Kapillaren im Rahmen der Messunsicherheiten übereinstimmen. Die Abweichung bei Kapillare 22 ist, wie in Abschnitt 4.4 diskutiert wurde, auf die erhöhte Salzkonzentration nach der Neubefüllung zurückzuführen. In Abschnitt 2.2 wurde bereits erwähnt, dass der Abfall der Stromstärke mit der Konzentration des Puffers zusammenhängt. Der hier beobachtete Unterschied lässt sich gut mit den Ergebnissen von Steinbock et al. über den Einfluss der Salzkonzentration in Einklang bringen [14]. Ebenso lassen sich die von Steinbock et al. festgestellten Werte für die Stromstärkesenkung während der Translokation von ungefähr -43 pA auf diese Weise in Einklang bringen, da dort ein 0.5 M KCl Puffer genutzt wurde, während hier ein 1 M KCl Puffer genutzt wurde. Ebenso steht die von Steinbock et al. beobachtete Translokationsdauer von 1.56 ms [3] im Einklang mit den hier gemessenen Zeiten.

Somit deutet die Konsistenz der Ergebnisse untereinander und im Vergleich mit denen der Arbeitsgruppe um Steinbock darauf hin, dass die Experimente erfolgreich durchgeführt wurden und DNA Translokationen detektiert werden konnten. Es ließ sich zeigen, dass das Rauschen bei Kapillaren mit Porendurchmesser über 100 nm zu groß ist, um ungefaltete DNA Moleküle zu detektieren. Jedoch ließen sich näherungsweise aus dem gefalteten Zustand gute Ergebnisse für die Translokationen von ungefalteter DNA bestimmen. Bei der Pore, die deutlich kleiner als 100 nm war, war das Rauschen sehr gering (~10 pA) und erlaubte so die Detektion von ungefalteter DNA. Es zeigte sich weiterhin,

*Diese Werte wurden aus den vorhandenen experimentellen Daten näherungsweise bestimmt.

4.5 DNA-Translokationsexperimente

dass die Häufigkeit der detektierten Events bei kleineren Poren geringer war. Zudem wurden bei den größeren Poren teilweise sogar Events detektiert, bei denen mehrere DNA Moleküle gleichzeitig die Pore durchquerten.

5 Resümee und Ausblick

Mit dem Ziel dieser Arbeit aufbauend auf den Ergebnissen von Armin Grundmann mithilfe von Nanokapillaren aus Quarz-Glas DNA Moleküle mit der Coulter-Counter Methode zu detektieren und zu analysieren, wurden die am Mikropipettenzieher hergestellten Nanokapillaren am Helium-Ionen-Mikroskop abgebildet und bearbeitet, sodass sich eine Reduktion des Porendurchmessers ergab. Dies geschah durch eine Verformung der Spitze, durch den beim Abbilden mit dem HIM einwirkenden Ionenstrom. Es zeigte sich, dass ein manuelles Anpassen der Parameter während des Reduktionsvorgangs, vor allem dem gezielten Abbilden von Teilen des Porenrandes, zu den besten Ergebnissen führte. Die so hergestellten Kapillaren erreichten Durchmesser weit unter 100 nm und wurden in eine Flusszelle aus PDMS eingebaut und mit einem für diesen Versuch angesetzten 1 M KCl Puffer befüllt. Es wurden experimentell unterschiedliche Befüllmethoden getestet, um die Nanokapillare bläschenfrei zu befüllen und so einen elektrischen Fluss durch diese zu ermöglichen. Die zwei Erfolg zeigenden Ansätze, mittels Isopropanol Vorfüllung oder direkte Befüllung mit dem Puffer, wurden im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt. Das Verhalten der befüllten Flusszelle wurde qualitativ untersucht und zeigte, dass eine Messung möglichst innerhalb der ersten 24 Stunden nach Befüllung erfolgen sollte, da ansonsten störende Effekte auftreten.

Es zeigte sich für die Isopropanol Methode, dass der sich ergebende Leitwert am Anfang noch stark durch im System verbleibendes Isopropanol beeinflusst war, sodass eine Messung erst nach Tagen erfolgen konnte, was die Methode bei dieser Zielsetzung unbrauchbar machte. Somit blieb die direkte Befüllung mit Puffer als bessere Alternative. Hierbei war jedoch das Gelingen einer bläschenfreien Befüllung der Kapillare der Sonderfall. Trotz vielen hier nicht diskutierten Ansätzen konnte keine zufriedenstellende Befüllmethode gefunden werden.

Bei den Flusszellen, bei denen die Befüllung gelang, ließen sich größtenteils erfolgreich Leitwert Bestimmungen und DNA Translokationsexperimente durchführen und Ergebnisse erzielen, die mit denen anderer Arbeitsgruppen im Einklang stehen [3]. Bei der Kapillare mit einem Porendurchmesser von 31 nm konnten einzelne ungefaltete DNA Moleküle detektiert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei Kapillaren mit Porendurchmessern knapp über 100 nm, nur der ungefaltete Zustand der Translokation sich nicht stark genug vom Rauschen abhob. Anhand der gefalteten Translokationen konnte in guter Näherung auf den ungefalteten Zustand geschlossen werden.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen können die Nanokapillaren aus Quarz-Glas in den Aufbau einer Optischen Pinzette eingebaut werden und so gezielte DNA Translokationen ermöglichen. Dafür wäre es nötig die Flusszelle von oben mit einem Deckglas mit Hilfe von Kleber zu verschließen. Dies bringt neue Schwierigkeiten für die ohnehin schon problematische Befüllung mit sich. Zudem sind die Nanokapillaren mit ihrem Durchmesser von 0,5 mm zu groß um in die vorhandene Messeinrichtung integriert zu werden, da der Arbeitsabstand der Optische Pinzette 0,25 mm beträgt. Der Abstand von 0,25 mm entspricht dem Abstand vom Rand der Kapillare bis zur Spitze. Hinzu kommt jedoch noch die Dicke des Deckgläschens von 0,14 mm, wodurch der Arbeitsabstand zu groß wird. Somit müsste die Kapillare entweder durch eine Dünnere ersetzt werden oder das

Objektiv der Optischen Pinzette gegen ein weniger brechendes ausgetauscht werden, sodass es einen größeren Arbeitsabstand erlaubt. Des Weiteren ist eine Erweiterung des Auswertungsprogramms für die Analyse der Events notwendig.

Abschließend lässt sich sagen, dass das Anwenden der Coulter-Counter Methode an den Nanokapillaren aus Quarz-Glas erfolgreich durchgeführt wurde und dass das Experiment, bei erfolgreicher bläschenfreier Befüllung der Kapillare, eine hohe Erfolgsquote aufweist. Das Problem das zukünftig weiter untersucht werden muss, um mehr Ergebnisse zu erzielen, ist das bläschenfreie Befüllen der Kapillare.

Literatur

- [1] R. W. DeBlois and C. P. Bean. Counting and sizing of submicron particles by resistive pulse technique. *The Review of Scientific Instruments*, 41(7):910, 1970.
- [2] Ronald R. Henriquez, Takashi Ito, Li Sun, and Richard M. Crooks. The resurgence of coulter counting for analyzing nanoscale objects. *The Analyst*, 129, 2004.
- [3] Lorenz J. Steinbock, Oliver Otto, Catalin Chimerele, Joanne Gornall, and Ulrich F. Keyser. Detecting dna folding with nanocapillaries. *NANO Letters*, 10(7):2494, 2010.
- [4] T. Ito, L. Sun, and M. Crooks. Simultaneous determination of the size and surface charge of individual nanoparticles using a carbon nanotube-based coulter counter. *Analytical Chemistry*, 75:2399–2406, 2003.
- [5] L. J. Steinbock, J.F. Steinbock, and A. Radenovic. Controllable shrinking and shaping of glass nanocapillaries under electron irradiation. *NANO Letters*, 13:1717–1723, 2013.
- [6] L. J. Steinbock, Roman D. Bulushev, Swati Krishnan, Camille Raillon, and Aleksandra Radenovic. Dna translocation through low-noise glass nanopores. *ACS NANO*, 7(12):11255–11262, 2013.
- [7] Lorenz J. Steinbock and Ulrich F. Keyser. *Nanopore-Based Technology*. Humana Press, Springer Science and Business Media, 2012. Kapitel 8.
- [8] Armin Grundmann. Herstellung und Charakterisierung von Glas-Nanopipetten für einzelmolekulare Translationsexperimente. Bachelor’s thesis, Universität Bielefeld, 2015.
- [9] B. W. Ward, John A. Notte, and N. P. Economou. Helium ion microscope: A new tool for nanoscale microscopy and metrology. *Journal of Vacuum Science and Technology B*, 24(6):2871, 2006.
- [10] John Notte, Bill Ward, Nick Economou, Ray Hill, Randy Percival, Lou Farkas, and Shawn McVey. An introduction to the helium ion microscope. *ResearchGate*, 2007.
- [11] John Morgan, John Notte, Raymond Hill, and Bill Ward. An introduction to the helium ion microscope. *Microscopy Today*, 14(4):24, 2006.
- [12] Gregor Hlawacek, Vasilisa Veligura, Raoul van Gastel, and Bene Poelsema. Helium ion microscopy. 7500AE Enschede, The Netherlands, 2014. Physics of Interfaces and Nanomaterials, MESA+ Research Institute, University of Twente.
- [13] L. Scipioni, L. A. Stern, J. Notte, S. Sijbrandij, and B. Griffin. Helium ion microscope. *ADVANCED MATERIALS AND PROCESSES*, 2008.

- [14] L.J. Steinbock, A. Lucas, O. Otto, and U. F. Keyser. Voltage-driven transport of ions and dna through nanocapillaries. *Electrophoresis*, 2012.
- [15] N.A. Campbell. *Biologie*. Pearson Studium, 2006.
- [16] Sutter Instruments. Pipette cookbook 2015. *http : //www.sutter.com/PDFs/pipette_cookbook.pdf*, 06 2016.
- [17] Robert D. Bulushev, Lorenz J. Steinbock, Sergey Khlybov, Julian F. Steinbock, Ulrich F. Keyser, and Aleksandra Radenovic. Measurement of the position-dependet electrophoretic force on dna in a glass nanocapillary. *NANo Letters*, 14:6606–6613, 2014.
- [18] J. Li, M. Gershow, D. Stein, E. Brandin, and J.A. Golovchenko. *Nat. Mater*, 2:611–615, 2003.

6 Danksagung

Abschließend möchte ich an dieser Stelle den Personen meinen Dank aussprechen, die mir ermöglicht haben diese Arbeit anzufertigen.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti danken für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe *Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften* und die Bereitstellung der benötigten Materialien und Räumlichkeiten, sowie für die Bewertung dieser Arbeit als erster Gutachter.

Bei Frau Dr. Martina Viefhues bedanke ich mich für die gute und stets freundliche Unterstützung als Betreuerin während meiner Arbeit und dafür meine Arbeit als zweite Gutachterin zu bewerten.

Bei Dr. Lukas Bogunovic bedanke ich mich dafür, mich an dieses Thema herangeführt zu haben, sowie bei Armin Grundmann für die gute Einführung in das Thema. Beiden danke ich für ihre Arbeit am LabView-Programm *NANOPOREN*, das die Datenaufnahme meiner Arbeit ermöglichte.

Weiterhin danke ich Roland Hillmann und Sebastian Knust, die im Laboralltag stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich bedanke mich bei meiner Mutter Brigitte Junge, die mir ermöglicht hat Physik zu studieren und mich auf meinem Weg stets unterstützt hat. In Gedanken bei meinem Onkel und Patenonkel Horst Junge, der meine Jugend über immer für mich da war und zu Beginn dieser Arbeit leider verstarb.

Besonderer Dank gebührt meiner Verlobten Hanna Lubisch, die mir immer unterstützend zur Seite stand und ein unverzichtbarer Teil meines Lebens ist, sowie meinen Kindern Melissa und Finlay, die jeden Tag meines Lebens unendlich bereichern.