

**NEUE MIGRATIONS- UND
SEPARATIONSMECHANISMEN
IN STRUKTURIERTEN
MIKROFLUIDIK-SYSTEMEN**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Thanh Tu Duong

Fakultät für Physik
Universität Bielefeld

Mai 2006

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und dabei keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Mit einer Auslegung in der Universitätsbibliothek bin ich einverstanden.

Bielefeld, den 12. Mai 2006

(Duong, Thanh Tu)

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti
Prof. Dr. Friederike Schmid

Datum des Einreichens der Arbeit: 12. Mai 2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Stand der Forschung	3
2.2	Struktur und Funktion von DNA	5
2.3	DNA-Detektion	8
2.4	Transport- und Migrationsphänomene in Mikrofluidik-Systemen	11
2.4.1	Pervaporationsgetriebener Transport	12
2.4.2	Elektrokinetische Transportphänomene	14
	Elektroosmotischer Fluss	14
	DNA-Elektrophorese	17
	Dielektrophorese	18
2.4.3	Brown'sche Migrationsphänomene	24
3	Experimentelle Methoden	27
3.1	Chemikalien	27
3.2	Experimenteller Aufbau	28
3.3	Herstellung von PDMS-Mikrofluidik-Chips	30
3.3.1	Präparation von PDMS-Mikrofluidik-Chips	30
3.3.2	Reservoirvergrößerung & Elektrische Kontaktierung	34
3.4	Messmethoden und Versuchsdurchführungen	35
3.4.1	Messung der makroskopischen Pervaporation	35
3.4.2	Reduzierung der Pervaporation	36
3.4.3	Bestimmung der DNA Migrationsgeschwindigkeiten	37
3.4.4	Pinched-Injektion	38
3.4.5	Absolut Negative Mobilität	38

3.4.6	Dielektrophoretische Messungen	39
4	Ergebnisse und Diskussion	41
4.1	Pervaporation	41
4.1.1	Pervaporation durch eine PDMS-Membran	41
4.1.2	Pervaporationsinduzierte Strömungen in Mikrofluidik-Kanälen	43
4.1.3	Reduktion der Pervaporation	46
4.1.4	Einfluss der Pervaporation auf den EOF	50
4.2	DNA-Migration in Mikrofluidik-Kanälen	52
4.2.1	Mobilität in unstrukturierten Mikrofluidik-Kanälen	52
4.2.2	Bistabile Migrationsmodi in strukturierten Mikrofluidik-Kanälen	55
4.2.3	Elektrophoretische Separation von λ und $T2$ -DNA	59
4.3	Neue Separationsmechanismen in AC-Feldern	65
4.3.1	Absolut Negative Mobilität	66
4.3.2	Dielektrophoretische Separation von DNA	69
	Auftrennung von λ - und $T2$ -DNA	73
	Auftrennung von Plasmid-DNA	76
	Vergleich mit dem Stand der Forschung	83
5	Zusammenfassung & Ausblick	87
	Publikationsliste	91
	Literaturverzeichnis	95
	Danksagung	109

1 Einleitung

Die fortschreitende demographische Entwicklung hin zu einer älter werdenden Gesellschaft führt zu einem wachsenden Interesse nach neuen Erkenntnissen der Bio- bzw. Lebenswissenschaften, welche neue Medikamente, Therapie-, Analyse- und Diagnostikverfahren hervorbringen. Die Genomik als ein Teilgebiet der Lebenswissenschaften beschäftigte sich u.a. beim Humangenomprojekt [1] mit der Entschlüsselung des menschlichen Erbguts, um Krankheiten, die genetischen Ursprungs sind, auffindig zu machen. Mit den aus der Genomik gewonnenen Technologien und Erkenntnissen ist man heute in der Lage, Nukleinsäuren bzw. Plasmid-DNA-Moleküle für therapeutische Zwecke oder als vorbeugende Maßnahme zur Vakzination zu verwenden [2].

Die wesentliche Grundlage für ein besseres Verständnis der komplexen biologischen Prozesse und Zusammenhänge auf zellulärer Ebene (*System Biologie* [3]) bilden schnelle und effiziente Analysen (Separation bzw. Auftrennung, Aufreinigung, Strukturaufklärung etc.) der Biomoleküle. Die Suche nach schnelleren und effizienteren Methoden werden die Erkenntnisse und das Wissen auf dem Gebiet der Life-Sciences entscheidend mitprägen.

Für die Entwicklung neuer Analysemethoden ist ein detailliertes und fundiertes Wissen über die Migration von Biomolekülen auf molekularer Ebene notwendig. Die Untersuchung neuer Migrations- und Separationsmechanismen von Biomolekülen, insbesondere der DNA, in Mikrofluidik-Systemen ist Gegenstand dieser Arbeit. Der Schwerpunkt wird hierbei nicht auf die Basenpaar aufgelöste Sequenzierung von kurzen DNA-Molekülen gelegt, sondern auf die Separation von langen DNA-Molekülen, die mit den Standardmethoden nur schwer zugänglich sind. Für die Separation von sehr langen DNA-Molekülen, wie sie zum Beispiel für die *physikalische Kartierung* [4 – 6] von DNA-Abschnitten benötigt wird,

werden effizientere Separationsmethoden benötigt. Dieses gilt insbesondere für die Qualitätskontrolle bei der Produktion von o.g. Plasmid-DNA-Molekülen, die bis zu mehrere hundert *kbp* lang sein können [2, 7] und sich ebenfalls mit den Standardmethoden nur schwer auftrennen lassen [8, 9]. Die in dieser Arbeit untersuchten Migrations- und Separationsmechanismen von DNA-Molekülen basieren nicht wie bei der Gelelektrophorese auf den Wechselwirkungen der Biopolymere mit dem Porennetzwerk des Gels, sondern auf den Wechselwirkungen eines inhomogenen elektrischen Feldes mit den DNA-Molekülen in geeignet strukturierten Mikrofluidik-Kanälen. Mit der Miniaturisierung auf Mikrofluidik-Chips werden also nicht lediglich künstliche Porennetzwerke oder Siebe nachgebildet. Vielmehr lassen sich durch die vielfältigen Mikrostrukturierungsmöglichkeiten in Verbindung mit variablen elektrischen Feldern Migrationsmechanismen erzielen, die vollkommen neue Möglichkeiten und Verfahren zur Trennung und Aufreinigung hervorbringen. Beispielsweise wird in Kapitel 4.2.3 gezeigt, dass sich λ - von *T2*-DNA-Molekülen in einem Mikrofluidik-Kanal mit einfacher Strukturierung trennen lassen. Mit Hilfe von periodischen Wechselfeldern lassen sich ebenfalls λ - von *T2*-DNA sowie Plasmid-DNA verschiedener Länge voneinander mit Hilfe von dielektrophoretischen Fallen separieren (s. Kapitel 4.3.2).

Des Weiteren kann gezeigt werden, dass sich Polymerkugeln mit $2\ \mu\text{m}$ Durchmesser paradoxerweise entgegen einer nicht zu starken statischen Kraft bewegen (s. Kapitel 4.3.1) und scheinbar das Newton'sche-Gesetz und den 2. Hauptsatz der Thermodynamik außer Kraft setzen können.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Stand der Forschung

Die rasant fortschreitende Entwicklung der Bio- und Lebenswissenschaften in den letzten Jahren war nur mit der Hilfe von schnellen und effizienten Analysemethoden von Biomolekülen möglich. Hierbei stellen die Separation und Aufreinigung eine wesentliche Rolle dar. Als Standardmethoden für die Auftrennungen von Biomolekülen werden die Plattengelelektrophorese in Agarose oder Acrylamid und die Kapillarelektrophorese mit Gelen oder verdünnten Polymerlösungen verwendet [10 – 13]. Mit diesen Methoden lassen sich nur DNA-Moleküle mit einer Länge von $< 40 \text{ kbp}$ erfolgreich auftrennen [6]. Dieser auftrennbare Längenbereich lässt sich unter Verwendung von verdünnten Polymerlösungen in Kapillaren und von gepulsten Feldern in der Plattengelelektrophorese in den *Mbp*-Bereich erweitern [14]. Als nachteilig erweist sich die für die Trennung benötigte Zeit, die mehrere Stunden bis Tage betragen kann [4, 6, 15 – 17].

Die Kapillargelelektrophorese ist gegenüber der Plattengelelektrophorese eine miniaturisierte Methode. Die Idee der Miniaturisierung beschäftigt die Forscher seit jeher, um wertvolle Probensubstanzen und die benötigte Zeit für die Analysen zu reduzieren. Damit einher ging seit 1990 eine explosionsartige Zunahme der Publikationen zu diesem Themengebiet [18]. Zeitgleich prägten Manz et al. den Begriff des „miniaturized total chemical analysis system“ (μ -TAS) [19] und zeigten die mögliche Steigerung der Leistungsfähigkeit der Analysen durch Skalierung bzw. Verkleinerung [20].

Die Verkleinerung der Gelelektrophorese führte zu der Herausforderung, Mikrokanäle mit hochviskosen Gelen zu füllen. Dies ist zwar technisch

schwierig, doch konnten mit diesem Verfahren erfolgreich DNA-Moleküle sequenziert werden [21, 22]. Zudem konnte mit den Methoden aus der Mikro- und Nanotechnologie bzw. -elektronik erstmals künstliche Gele aus Pfostenstrukturen hergestellt werden [15, 23 – 26]. Diese künstlichen Gelstrukturen haben gegenüber natürlichen Gelen den großen Vorteil, dass ihre Poren einheitlich groß und geordnet sind [24, 17]. Es konnte gezeigt werden, dass sich extrem lange DNA-Moleküle in solchen mikro- bzw. nanostrukturierten Pfostenarrays effektiv auftrennen lassen [15, 17, 26].

Die Nanostrukturierungsverfahren bieten aber die weitergehende Möglichkeit Kanäle herzustellen, die kleiner als die Persistenzlänge der DNA sind. Ein Mikrokanal, der sich periodisch auf die Persistenzlänge der DNA verengt und wieder größer wird, wirkt als entropische Falle für die DNA. Der Mechanismus, der bei der entropischen Falle für die Längenabhängigkeit sorgt, ist in den Publikationen [27 – 29, D3] näher beschrieben. Fallen die periodischen Verengungen des Mikrokanals in die Größenordnung des Gyrationradius der DNA, so ist ebenfalls eine längenabhängige Mobilität vorhanden, die aber nicht rein entropischer Natur ist [D1, D5]. Dieser wird in Kapitel 4.2.2 näher erläutert. Die genannten neuen Verfahren zur Auftrennung der DNA nach Länge mittels Mikrostrukturierung sind schnell und eignen sich besonders gut für lange DNA-Moleküle.

Die Dielektrophorese (s. Kapitel 2.4.2) stellt eine potenzielle Alternative dar, Biomoleküle schnell und in geringster Menge aufzutrennen. Die theoretische Idee der dielektrophoretischen Separation von DNA ist seit längerem bekannt [5, 30, 31], doch es besteht immer noch kein eindeutiges theoretisches Verständnis der Polarisierbarkeit von DNA und der DNA Dielektrophorese [32 – 36]. Zahlreiche Publikationen beschreiben die Möglichkeit des Fangens und der Aufkonzentrierung mit Hilfe von dielektrophoretischen Fallen [32, 37, 38], doch ist bis zu diesem Zeitpunkt noch über keine erfolgreiche experimentelle Auftrennung von DNA berichtet worden.

2.2 Struktur und Funktion von DNA

Die Basis für das Leben auf der Erde bildet das DNA-Molekül (*Deoxyribonucleic Acid*) als Träger der Erbinformation. Diese Information wird als Abfolge einer komplementären Doppel-Nukleotidsequenz von Generation zu Generation weitergegeben. Die Bausteine der Nukleotidsequenz bestehen aus den vier Nukleotiden Adenosin-, Guanosin-, Cytidin- und Thymin-5'-monophosphat. Der Einfachheit halber erfolgt die Nomenklatur der Nukleotide nur nach ihren heterozyklischen Stickstoffbasen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin (A,G,C,T) [39]. Die Stickstoffbasen der Purin-Derivate (Adenin und Guanin) und der Pyrimidin-Derivate (Cytosin und Thymin) sind mit dem C-1-Atom der Pentose verknüpft, wobei der Phosphorsäurerest mit der OH-Gruppe am C-5-Atom verestert ist. Die Verbindung der 3'-Hydroxylgruppe eines Nukleotids mit der 5'-Phosphatgruppe eines anderen Nukleotids über eine Phosphorsäureesterbindung führt zur Bildung eines Nukleotidstrangs. Zwei Nukleotidstränge sind, wie in Abb. 2.1 gezeigt, so miteinander verwunden, dass sich immer nur die zwei komplementären Basen A-T und G-C gegenüberstehen. A-T Basenpaare bilden dabei zwei und G-C drei Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die Konformation, die in lebenden Zellen am häufigsten vorkommt ist die B-DNA bzw. nach ihren Strukturaufklärern Watson-Crick benannte Form, die eine rechtsgängige Helix bildet. Für eine Windung werden 10 Basenpaare benötigt, was einem Anstieg von 3,4 nm pro Windung bedeutet. Der Durchmesser der Helix beträgt 2.37 nm. Durch Dehydratation der B-DNA wird eine Konformationsänderung induziert, die A-DNA genannt wird [40, 41].

In freier Lösung liegt die DNA als Knäuel vor. Die theoretische Beschreibung des statistischen DNA-Knäuels kann durch Skalierungsgesetze beschrieben werden. Die gängigen Beschreibungen folgen dem FJC- (*freely-jointed-chain*), FRC- (*freely-rotating-chain*) und dem WLC-Modell (*worm-like-chain*) [42], wobei letzteres Modell die DNA theoretisch am Besten beschreibt. Der mittlere quadratische End-zu-End Abstand

$$\bar{R}_e^2 = 2l_p^2 \left[\exp\left(-\frac{L}{l_p}\right) + \frac{L}{l_p} - 1 \right] \quad (2.1)$$

ergibt für den Fall einer langen Kette, d.h. $l_p \ll L$

$$\bar{R}_e^2 \simeq 2l_p L = 6 \cdot \bar{R}_g^2, \quad (2.2)$$

mit der Persistenzlänge l_p und der Konturlänge L .

Der End-zu-End Abstand bzw. der mittlere Gyrationradius \bar{R}_g der DNA skaliert mit $\bar{R}_g \propto N^\nu$, wobei ν der sogenannte Flory-Exponent unter Beachtung des Ausschluss-Volumens und der Dimension d von $\nu = 1/2$ auf $\nu = \frac{3}{2+d}$ korrigiert werden muss [42]. Die Persistenzlänge l_p der DNA als geladener Polyelektrolyt¹ kann in unterschiedlichen Ionenkonzentrationen und pH -Werten des Puffers verschiedene Werte annehmen [6, 43]. Die in dem Puffer vorhandenen (Gegen-)Ionen bilden eine Ionenwolke um das DNA-Molekül herum und schirmen die DNA-Ladungen nach außen hin ab, so dass insgesamt die Elektroneutralität erhalten bleibt. Bei geringer Ionenkonzentration des Puffers ist die Ausdehnung der Ionenwolke groß (hohe Abschirmlänge, s. Kapitel 2.4.2), wodurch sich die geladenen Nukleotide gegenseitig abstoßen und die Steifigkeit des Biopolymers zunimmt [6, 43]. Der typische Wert für die Persistenzlänge l_p der DNA liegen unter physiologischen Bedingungen bei ca. 50 nm [44].

Die Gesamtlänge der menschlichen DNA beträgt ca. $3 \cdot 10^9$ Basenpaare [39] und ergibt aneinandergereiht eine Konturlänge von etwa $L = 0.34 \text{ nm/bp} \cdot 3 \cdot 10^9 \text{ bp} \approx 1 \text{ m}$, was einem Gyrationradius nach Gleichung (2.2) von ca. $\bar{R}_g \approx 250 \text{ }\mu\text{m}$ unter physiologischen Bedingungen entspricht. Um diesen DNA-Strang bzw. dieses DNA-Knäuel in einer geordneten Struktur in den Zellkern einer Zelle zu packen, die wesentlich kleiner als $250 \text{ }\mu\text{m}$ ist, wird die DNA, wie in Abb. 2.1 gezeigt, 1,5 mal um je einen Histonkomplex gewickelt. Die DNA-Histonkomplexe ordnen sich wiederum zu einer übergeordneten Struktur einer 30 nm dicken Chromatinfaser in eines von 23 Chromosomenpaaren beim Menschen [39].

¹Die äquivalente theoretische Beschreibung einer geladenen Wand in einer Polyelektrolytlösung wird in Kapitel 2.4.2 beschrieben.

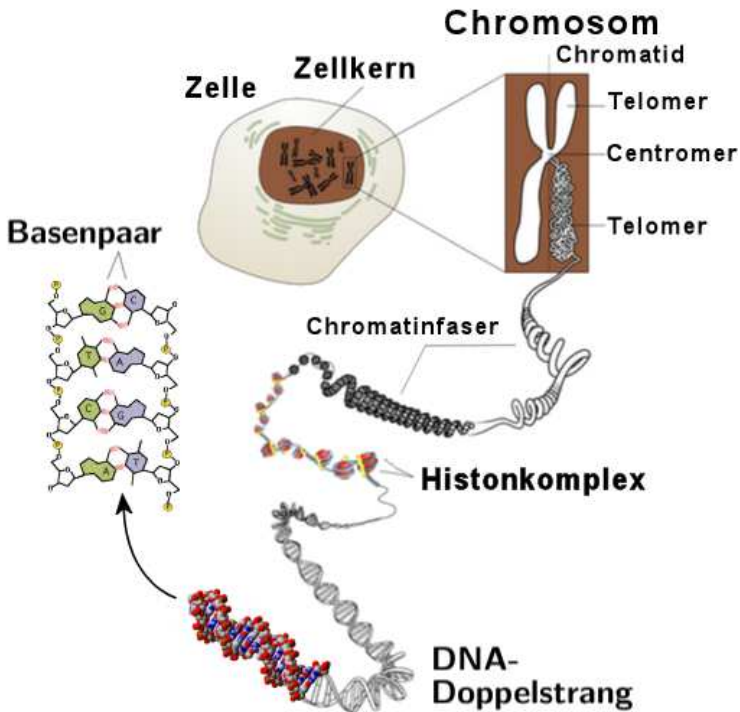


Abbildung 2.1: Aufbau und übergeordnete Struktur der DNA

Die DNA besteht aus den vier Basen A, C, G und T. Dabei sind die Basenpaare A-T und G-C jeweils komplementär zueinander und binden über zwei bzw. drei Wasserstoffbrückenbindungen aneinander. Zwei komplementäre Nucleotidstränge winden sich um sich selbst und bilden eine DNA-Doppelhelix. In höher entwickelten Organismen bildet die Doppelhelix mit Histonen Histonkomplexe, die sich wiederum zu einer ca. 30 nm dicken Chromatinfaser anordnen. Die Chromatinfaser bildet mit Proteinen eine übergeordnete Struktur in Form eines sogenannten Chromosoms. Die Abbildung ist angepasst an [45].

2.3 DNA-Detektion

Das Abbe'sche Kriterium besagt, dass mit der klassischen Optik nur Objekte abgebildet werden können, die mindestens halb so groß sind wie die Wellenlänge λ des für die Abbildung verwendeten Lichts. Mit physikalischen und chemischen Tricks ist es aber möglich, das Abbe'sche Kriterium indirekt zu umgehen.

Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen ist die weit verbreitetste Methode für die optische Detektion von einzelnen DNA-Molekülen. Die Klasse der DNA-Interkalatoren, wie z.B. Ethidiumbromid und die Cyanine, eignen sich aufgrund ihrer Erhöhung der Fluoreszenzausbeute im interkalierten bzw. gebundenen Zustand besonders dafür. Die Cyanine wie YOYO-1, POPO-1, TOTO-1 etc. nehmen eine besondere Stellung in der Detektion einzelner DNA-Stränge ein, da die Fluoreszenzausbeute im gebundenen Zustand um einen Faktor von bis zu 3000 zunimmt [46, 47]. Die Bindung an die DNA erfolgt dabei durch Interkalation zwischen den Basenpaaren der DNA [46 – 48]. Es soll im Folgenden in kurzer Form erläutert werden, wie die erhöhte Fluoreszenz durch Interkalation zustande kommt.

Wird ein System in einen Zustand höherer Energie angeregt, so kann dieses System nach einer gewissen Zeit wieder zurück in den Grundzustand relaxieren. Die Abb. 2.2 zeigt das Jablonski-Diagramm eines nicht näher spezifizierten Systems bzw. Moleküls. Die Anregung in ein höheres (Rotations- bzw. Vibrations-)Energieniveau kann beispielsweise durch ein Photon geeigneter Energie erfolgen. Von dort aus kann das angeregte System durch Aussenden eines Photons zurück in den Grundzustand relaxieren. Eine strahlungslose Relaxation zurück in den Grundzustand ist durch sekundäre Prozesse, wie z.B. durch Stöße, Rotationsrelaxation etc., ebenfalls möglich [40, 49].

Die chemische Zusammensetzung bzw. die Struktur der interkalierten Form von YOYO-1 ist in Abb. 2.3 gezeigt. Man nimmt an, dass der Hauptgrund für die gesteigerte Fluoreszenzausbeute in der sterischen Einschränkung des Quinoline-Rings liegt. In freier Lösung kann dieser Ring rotieren, wodurch überschüssige Energie über Rotation des Rings und nachfolgende Stöße mit dem Lösungsmittel abgegeben werden kann.

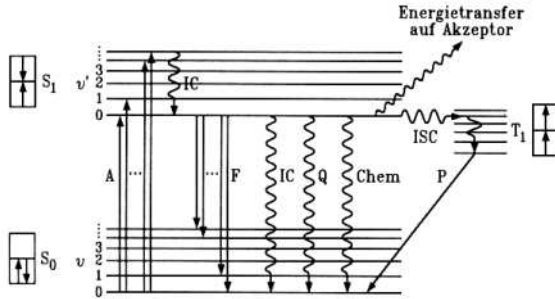


Abbildung 2.2: Jablonski-Diagramm [40]

Die Anregung erfolgt für gewöhnlich vom Grundzustand S_0 in ein höheres Niveau. Erfolgt, wie hier beispielsweise gezeigt, die Anregung in ein höheres Vibrationsniveau ν_i des S_1 Zustands, so erfolgt zunächst eine Relaxation in den niedrigsten S_1 Zustand, bevor das System in den Grundzustand S_0 des Systems übergeht. Dieser Prozess wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die quantenmechanisch verbotene und damit unwahrscheinliche Relaxation vom Triplett- in den Singulett-Zustand wird als Phosphoreszenz bezeichnet.

Im interkalierten Zustand kann eine Relaxation über Rotation nicht erfolgen [47, 50]. Zusätzlich erfolgt eine Abschirmung von den Lösungsmittelmolekülen. Im Fall von Ethidiumbromid ist beispielsweise bekannt, dass die Abschirmung von Stößen mit polaren Lösungsmitteln im interkalierten Zustand der Hauptgrund für die gesteigerte Fluoreszenzausbeute ist [51].

Für die Untersuchung neuer Migrationsmechanismen von DNA-Molekülen muss gewährleistet werden, dass sich die Migration der DNA unter dem Einfluss von YOYO-1 nur unwesentlich verändert. Carlsson et al. konnten experimentell zeigen, dass sich die Migration kaum ändert [54], obwohl die Persistenzlänge l_p als Maß für die Steifigkeit des Moleküls um etwa 30 % zunimmt [55].

Neben der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen konnte kürzlich gezeigt

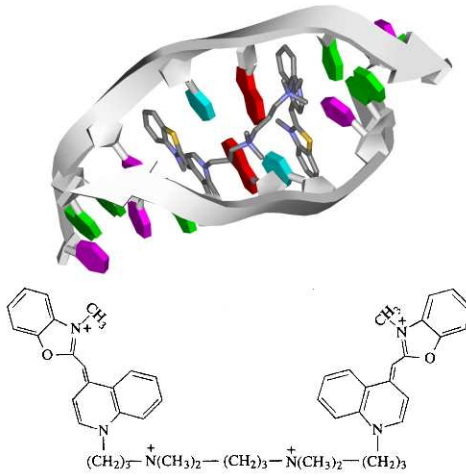


Abbildung 2.3: Chemische Struktur [52, 53] und Interkalation von YOYO-1 in DNA

Das obere Teilbild zeigt die Bis-Interkalation von YOYO-1 in die DNA über 2 Basen. Die Methylenbrücke ist parallel zur DNA ausgereichtet, wobei die Ringstrukturen zwischen die Basenpaare der DNA interkalieren. Das untere Teilbild zeigt die chemische Struktur von YOYO-1.

werden, dass die Erhöhung des Kontrastunterschieds durch Ausnutzen des optischen Dichteunterschieds des DNA-Knäuels und des Mediums für die optische Detektion im Durchfluss verwendet werden kann [56]. Durch den Dichteunterschied kommt es zu einer Laufzeitverzögerung des Lichts am Objekt. Durch Überlagerung mit einem Referenzstrahl kommt es zur Interferenz, wodurch das „durchsichtige“ Objekt sichtbar wird.

2.4 Transport- und Migrationsphänomene in Mikrofluidik-Systemen

Das Verhalten von Strömungen in Röhren kann mit einer charakteristischen Größe, der dimensionslosen Reynoldszahl

$$Re = \frac{\rho v R}{\eta},$$

beschrieben werden. R , ρ , η und v sind der Durchmesser der Röhre, die Dichte und die Viskosität sowie die Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit. Für Werte $Re < 2300$ sind die Strömungen in einer runden Röhre laminar, wobei sie für $Re > 2300$ turbulent werden [57]. Für Mikrofluidik-Systeme mit Kanalradien von typischerweise $1 \mu m < R < 300 \mu m$ und Strömungsgeschwindigkeiten von $v < 1000 \mu m/s$ ist $Re \ll 1$ und die Strömung ist damit laminar.

Mit der Miniaturisierung der Kanäle in den Mikrometermaßstab müssen neue Methoden für den Transport der Flüssigkeiten entwickelt werden, da eine einfache Skalierung makroskopischer Pumpen ohne Weiteres nicht möglich ist. Durch die Verkleinerung der Dimensionen steht ein neues Repertoire an physikalischen Effekten zur Verfügung, die im Makroskopischen nicht zur Geltung kommen. Beispielsweise wird in mikrofluidischen Kanälen ein Flüssigkeitsstrom induziert, wenn sich auf den Reservoirs Flüssigkeitstropfen mit unterschiedlichen Krümmungsradien r befinden [58, 59]. Die Tropfen mit unterschiedlichen Krümmungsradien erzeugen unterschiedliche Innendrucke,

$$P = \frac{2\gamma}{r}, \tag{2.3}$$

die durch einen Flüssigkeitsstrom ausgeglichen werden. γ ist hierbei die Oberflächenspannung der Flüssigkeit. Die Differenz der Innendrucke können aufgrund leicht unterschiedlicher Krümmungsradien Werte erreichen, die einer Differenz der Füllhöhe der Reservoirs von 1 cm und mehr entsprechen können [58, 59]. Ein Druckunterschied von ΔP verursacht dabei

näherungsweise eine Strömungsgeschwindigkeit von [58]

$$v \approx \frac{h^2}{3\eta} \left(\frac{\Delta P}{L} \right), \quad (2.4)$$

die von der Länge L und der Querschnittsfläche h^2 des Kanals sowie der dynamischen Viskosität der Flüssigkeit abhängig ist.

Ein Wassertropfen mit einem Krümmungsradius von 2 mm erzeugt einen Druck, der dem Druck einer Wassersäule von 8 mm Höhe entspricht und ca. $P \approx 70 \text{ Pa}$ beträgt. Wird eine typische Kanalhöhe von $h = 9 \text{ }\mu\text{m}$ sowie eine Kanallänge von 11 mm angenommen, so ergibt sich eine druckgetriebene Geschwindigkeit von $v \approx 180 \text{ }\mu\text{m/s}$. Für die grobe Abschätzung sind die Oberflächenspannung und die Viskosität von Wasser angenommen worden.

Eine andere Methode zur Erzeugung eines Flüssigkeitstransports ist die Thermophorese. Bei der Thermophorese wird die lokale Erhitzung einer Flüssigkeit in einem Mikrokanal mittels eines IR-Lasers realisiert [60]. Neben der lokal thermalen Aufheizung mittels eines IR-Lasers kann eine Aufheizung auch durch ein elektrisches Wechselfeld erzeugt werden [61]. Das mechanische Pumpen einer Flüssigkeit kann durch die periodische Bewegung einer Membran erzeugt werden. Piezokeramische Membranen eignen sich hierfür besonders, da wegen ihrer hohen Betriebsfrequenz störendes Pulsieren verhindert wird. Peristaltische Pumpen arbeiten ebenfalls mit beweglichen Membranen. Bei diesen wird stoßweise Druckluft auf einen mit Luft oder Wasser gefüllten Mikrokanal übertragen, der sich über eine dünne Membran getrennt oberhalb des eigentlichen Mikrokanals befindet. Aufgrund der Fülle an mikrofluidischen Pumpensystemen soll an dieser Stelle auf den Review-Artikel [11] verwiesen werden. Im folgenden werden nur die für diese Arbeit wichtigen Transportphänomene ausführlicher behandelt.

2.4.1 Pervaporationsgetriebener Transport

Die Gasdurchlässigkeit von Polymeren ist ein viel untersuchtes Phänomen und gut verstanden. Die Durchlässigkeit für Wasser (Pervaporation)

ist im Fall von Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) zwar bekannt, doch der Einfluss auf Mikrofluidiksysteme ist erst vor kurzem aufgedeckt worden.

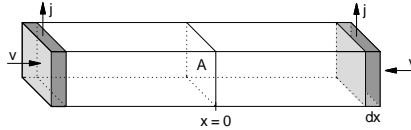


Abbildung 2.4: Pervaporationsinduzierte Strömung

Eine Flüssigkeit durchströmt am Reservoirzugang mit einer Geschwindigkeit v die Querschnittsfläche A . Die einströmende Flüssigkeitsmenge pro Zeiteinheit dt entspricht $-A d(dx/dt) = j dx$.

Die Abb. 2.4 zeigt einen Mikrokanal mit Querschnittsfläche A . Die Verdampfung (bzw. der Verdampfungsstrom j) entlang des Kanals erzeugt am Reservoirzugang eine Strömung mit der Geschwindigkeit v , die in Richtung Mitte ($x = 0$) des Kanals zeigt. Die Verdampfungs menge $j \cdot dx$ ist gleich der Menge, die durch den Kanal mit der Querschnittsfläche A und der Geschwindigkeit dv läuft, d.h. es gilt

$$-A \cdot dv = j \cdot dx. \quad (2.5)$$

Die Lösung der Differentialgleichung liefert den linearen Zusammenhang [62]

$$v(x) = -\frac{j}{A}x = -kx. \quad (2.6)$$

Die Strömungsgeschwindigkeit nimmt von den beiden Reservoirs zu der Mitte ($x = 0$) des Kanals linear und symmetrisch ab.

Diese intuitive Herleitung für den pervaporationsgetriebenen Transport ist ein stark vereinfachtes Modell, bei dem Drücke, Randeﬀekte etc. vernachlässigt sind. Bei der genauen Herleitung muss die Navier-Stokes-Gleichung in Verbindung mit der Kontinuitätsgleichung unter Beachtung der Randbedingungen gelöst werden. Die Näherung der Lösung lautet

$$v(x) = \frac{Jx}{h\rho}$$

und wird in der Publikation von Randall und Doyle [63] hergeleitet. Hierbei steht J für

$$J = -\frac{\pi D c_0}{w \ln \frac{w}{4R}}.$$

Dabei ist D die Diffusionskonstante des Wassers durch das PDMS, c_0 die maximale Wasserkonzentration im PDMS, w , h die Breite bzw. Höhe des Kanals, ρ die Dichte des Wassers und R die Dicke der PDMS-Schicht. Zusammengefasst ergeben sich durch die Miniaturisierung hohe Werte für das Oberflächen-zu-Volumen Verhältnis. Dadurch reicht die geringste Durchlässigkeit für Wasser aus, um eine merkliche Menge Flüssigkeit durch das Polymer pervaporieren zu lassen und eine Strömung zu induzieren. Damit die Kontinuitätsgleichung erfüllt ist, muss also durch die Pervaporation entweichendes Wasser von den Reservoirs nachgeführt werden. Dieses gilt allerdings nur für hydrophile Kanaloberflächen. Im Falle von hydrophoben Kanalwänden könnte das entweichende Wasser durch Luft ersetzt werden.

2.4.2 Elektrokinetische Transportphänomene

Neue Transportphänomene treten auf, wenn zur Verringerung der Dimensionen noch elektrische Felder ins Spiel kommen. Prominente Beispiele dafür sind der elektroosmotische Fluss und die Elektrophorese.

Elektroosmotischer Fluss

Der elektroosmotische Fluss (EOF) ist ein elektrohydrodynamischer Effekt. Die Ursache für das Zustandekommen des EOFs liegt in der Bewegung der Gegenionen an der Grenzfläche eines Puffers zur Kanalwand und soll im Folgenden mit der Debye-Hückel-Theorie beschrieben werden [64, 65].

Befindet sich die Kanalwand mit einem Puffer in Kontakt, so wird die Wand in Abhängigkeit des pH -Werts des Puffers protoniert bzw. deprotoniert und bildet mit den entsprechenden Ladungen ein Oberflächenpotential Ψ_0 aus. In dem Puffer befindliche Gegenionen schirmen die Ladungen

der Wand nach außen hin ab. Die Abschirmung erfolgt dabei nicht instantan, sondern allmählich über kondensierte und schwach gebundene bzw. freie Gegenionen. Die Schicht der immobil kondensierten Gegenionen ist die sogenannte *starre* bzw. *Stern Schicht*. Die Dicke dieser Schicht ist durch die Bjerrum-Länge [66, 67]

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

gegeben, wobei $\epsilon = \epsilon_0\epsilon_r$ die Dielektrizitätskonstante des Mediums und $k_B T$ die thermische Energie sind. Die schwach gebundenen Gegenionen bilden nach der *starren Schicht* die sogenannte *diffuse Schicht* aus, die beide zusammen die elektrische Doppelschicht ergeben. Das Oberflächenpotential Ψ_0 fällt innerhalb der Bjerrum-Länge linear ab, wohingegen es anschließend in der *diffusen Schicht* exponentiell mit

$$\Psi = \Psi_0 \exp(-\kappa r)$$

abfällt. Die Konzentration der Gegenionen ist gegenüber den Coionen an der Wand überhöht und nimmt nach außen hin ab, sodass sich eine Gleichgewichtsverteilung beider Ionensorten bei Abständen größer κ^{-1} ausbildet.

$$\kappa^{-1} = \left(4\pi l_B \sum_k z_k^2 C_k \right)^{-\frac{1}{2}}$$

wird als die Debye- bzw. Abschirmlänge bezeichnet, die von der Ionenkonzentration der Pufferlösung abhängig ist [65]. An der Grenzfläche der *starren* und *diffusen Schicht* treten bei Strömungen Scherkräfte auf. Das Potenzial an dieser Grenzfläche wird, wie in Abb. 2.5 gezeigt, als ζ -Potential bezeichnet [65].

Wird ein elektrisches Feld angelegt, so werden die Majoritätsladungsträger bzw. die überschüssigen Gegenionen der *diffusen Schicht* beschleunigt und bewirken durch Scherkräfte ein Mitziehen oberflächenferner Schichten. Wie in Abb. 2.6 gezeigt, bildet sich mit der Zeit ein flaches stempelförmiges Profil aus, welches gegenüber einem hyperbolischen Strömungsprofil den Vorteil bietet, dass sich keine zusätzliche Verbreiterung

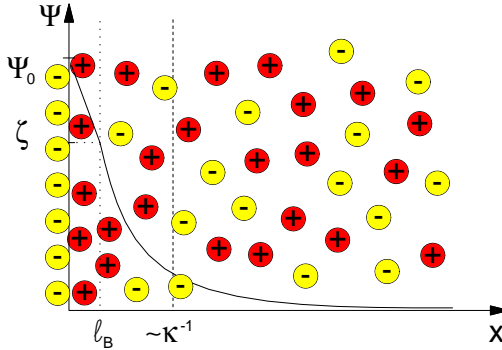


Abbildung 2.5: Zeta-Potenzial

Der Potenzialverlauf an einer geladenen Wand bzw. eines Polyelektrolyten nimmt in einer Elektrolytlösung mit dem Abstand ab. Innerhalb der Bjerrumlänge l_B sinkt das Potenzial linear, danach erfolgt der Abfall in der diffusen Schicht exponentiell. Innerhalb der Abschirmlänge κ^{-1} nimmt die Konzentration der überschüssigen Gegenionen ab, bis sich die Konzentrationen der Gegen- und Coionen ausgleichen.

des Analyten ausbildet. Somit eignet sich der EOF besonders für Auftrennungszwecke [65, 68, 69]. Der zeitliche Aufbau des elektroosmotischen Flusses vollzieht sich für eine Kapillare mit einem Radius von ca. $R = 100 \mu m$ innerhalb von wenigen hundert Mikrosekunden [70] bis hin zu einhundert Millisekunden für einen Kanal mit größerem Radius $R = 3,4 mm$ [71].

Die Mobilität des elektroosmotischen Flusses kann durch Lösen der Navier-Stokes-Gleichung beschrieben werden und ist

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta}{\eta}. \quad (2.7)$$

Die Gleichung (2.7) kann auch in Abhängigkeit der Oberflächenladung σ als

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{\sigma}{4\pi\eta} \kappa^{-1}$$

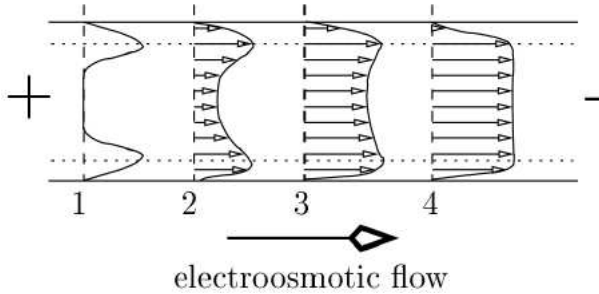


Abbildung 2.6: Zeitliche Entwicklung des EOF [72]

(1) Die überschüssigen Gegenionen in der Nähe der Wand werden vom elektrischen Feld beschleunigt. (2+3) Durch Reibung bzw. Impulsübertrag auf die anderen Schichten des laminaren Flusses werden mit der Zeit wandferne Bereiche der Flüssigkeit mitbewegt. (4) Mit der Zeit bildet sich ein stempelförmiges Strömungsprofil aus.

formuliert werden. Je höher die Oberflächenladung, desto höher ist die elektroosmotische Mobilität. Andererseits gilt, je höher die Ionenkonzentration, desto kleiner ist κ^{-1} und desto kleiner ist die elektroosmotische Mobilität.

DNA-Elektrophorese

Als Elektrophorese wird im Allgemeinen die Migration geladener Teilchen in einer Lösung unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes bezeichnet. Die Kraft $F_e = -qE$, die ein elektrisches Feld E auf eine Ladung q ausübt, beschleunigt den Ladungsträger solange, bis dessen Gleichgewichtsgeschwindigkeit v erreicht ist. Die Gleichgewichtsgeschwindigkeit v entspricht derjenigen Geschwindigkeit, bei der die geschwindigkeitsabhängige Reibungskraft $F_r = -fv$ gleich F_e ist, d.h.

$$v = \frac{qE}{f}. \quad (2.8)$$

Für ein globuläres Teilchen nimmt das Volumen mit $V = \frac{4\pi r^3}{3}$ zu, d.h. der Stokes'sche-Reibungskoeffizient $f = 6\pi\eta r$ skaliert mit $m^{1/3}$, wobei m die Masse ist. Für die DNA gilt dieses jedoch nicht, da sie sich wie ein sogenanntes *free-draining-coil* verhält [73] und somit $f \propto m \propto N$ wird. Damit ergibt sich keine größenabhängige Mobilität

$$\mu_{\text{EP-DNA}} = \frac{v}{E} = \frac{q}{f} \propto \frac{2N}{N} \quad (2.9)$$

und damit keine Längenauftrennung für die DNA in freier Lösung. Dieser Sachverhalt gilt genau genommen nur für DNA-Moleküle mit einer Länge von mehr als ca. 100 Basenpaaren [64, 74, 75]. Unterhalb dieser Grenze ist der Unterschied in der Mobilität jedoch zu klein, um effiziente Auftrennungen durchzuführen. Die konstante Mobilität aus Gleichung (2.9) sagt eine lineare Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der elektrischen Feldstärke voraus. Bei höheren Feldstärken kann sich aufgrund der Relaxationskraft infolge der deformierbaren Ionenwolke um das Biomolekül eine Abweichung von der linearen Geschwindigkeit ergeben [65]. Insgesamt ergibt sich die apparente Gesamtmobilität μ_{app} der DNA in Verbindung mit dem EOF zu

$$\mu_{\text{app}} = \mu_{\text{EOF}} + \mu_{\text{EP-DNA}}.$$

Dielektrophorese

Der Begriff der Dielektrophorese bezieht sich allgemein auf die Wechselwirkung eines elektrischen Dipols mit einem inhomogenen elektrischen Feld. Dabei kann der Dipol statisch sein oder mittels eines elektrischen Wechselfelds induziert werden [76, 77]. Der Dipol koppelt an das inhomogene elektrische Feld an und deformiert selbiges. Für die dielektrophoretische Kraft gilt

$$\vec{F}_{\text{DEP}} = (\vec{p} \cdot \nabla) \vec{E}, \quad (2.10)$$

wobei \vec{p} das Dipolmoment darstellt [78, 79].

Um eine Abschätzung des Dipolmoments zu erhalten, wird der Dipol der Einfachheit halber durch eine kleine dielektrische Kugel mit dem Radius R angenähert, welche das elektrische Feld außerhalb von R in gleicher Weise wie den Dipol deformiert. Innerhalb dieser dielektrischen Kugel wird das äußere Feld auf [80]

$$\vec{E}_i = \left(\frac{3\varepsilon_m}{\varepsilon_p + 2\varepsilon_m} \right) \vec{E}$$

abgeschwächt. $\varepsilon_{p/m}$ sind dabei die frequenzabhängigen elektrischen Dielektrizitätskonstanten

$$\varepsilon_{p/m} = \varepsilon_{p/m} - i \frac{\sigma}{\varepsilon_0 \omega} \quad (2.11)$$

des Partikels bzw. des Mediums, wobei σ die Leitfähigkeit und $\varepsilon_{p/m}$ die relativen Permittivitätszahlen sind [79, 81, 82].

Die Polarisation innerhalb der dielektrischen Kugel, die sich in einem Dielektrikum befindet, ist

$$\vec{P} = (\varepsilon_p - \varepsilon_m) \vec{E}_i.$$

Damit ergibt sich die Polarisation zu

$$\vec{P} = 3 \frac{\varepsilon_p - \varepsilon_m}{\varepsilon_p + 2\varepsilon_m} \varepsilon_m \vec{E} = 3 \underline{CM}(\omega) \varepsilon_m \vec{E},$$

wobei $\underline{CM}(\omega)$ als Clausius-Mosotti-Factor bezeichnet wird [80].

Das Dipolmoment $\vec{p} = \frac{4\pi}{3} R^3 \vec{P}$ entspricht der Gesamtpolarisation des Partikels mit Radius R . Damit erhält man für das Dipolmoment

$$\vec{p} = 4\pi \varepsilon_m \underline{CM}(\omega) R^3 \vec{E}. \quad (2.12)$$

Das Einsetzen von Gleichung (2.12) in (2.10) ergibt unter Verwendung der Relation $\vec{E} \nabla \vec{E} = \frac{1}{2} \nabla \vec{E}^2$

$$\vec{F}_{\text{dep}} = 2\pi \varepsilon_0 \varepsilon_m R^3 \cdot \Re(\underline{CM}(\omega)) \nabla \vec{E}^2 = \alpha(\omega) \nabla \vec{E}^2, \quad (2.13)$$

wobei $\alpha(\omega)$ als die oben bereits erwähnte frequenzabhängige Polarisierbarkeit des Partikels bezeichnet wird. Die auf ein Teilchen wirkende Gesamtkraft [33, 77] \vec{F}_{tot} ist

$$\vec{F}_{\text{tot}} = f_{\text{drag}} \mu_{\text{EP}} \vec{E}_{\text{EP}} + \alpha \nabla \vec{E}^2. \quad (2.14)$$

Aufgrund der Nichtlinearität von \vec{F}_{DEP} ist das Ausnutzen dielektrophoretischer Kräfte dann möglich, wenn $\frac{\mu_{\text{EP}}}{\alpha}$ klein und die Feldstärke hoch genug sind [30, 33].

Die obige Herleitung der Polarisierbarkeit gilt genau genommen für die DNA nicht, da die DNA keine ideale dielektrische Kugel ist und sich zudem im inhomogenen Bereich des elektrischen Feldes stark deformieren kann. Ferner betrachtet die Herleitung die Wechselwirkung des Feldes mit einem einzigen Dipol, obwohl bekannt ist, dass die gegenseitige Wechselwirkung zweier Objekte untereinander das elektrische Feld zusätzlich beeinflusst [83]. Diese vereinfachte Betrachtung liefert jedoch eine einfache Lösung für die dielektrophoretische Kraft und ein grobes Verständnis für die Mechanismen, die bei der Dielektrophorese eine Rolle spielen.

Für die in einer Elektrolytlösung vorliegenden Biomoleküle wie z.B. der DNA ist bekannt, dass diese kein ausgezeichnetes Dipolmoment² besitzen [35, 36]. Durch Anlegen eines Wechselfelds kann jedoch durch Polarisation des Moleküls ein Dipolmoment induziert werden, wobei $\alpha(\omega)$ die frequenzabhängige Polarisierbarkeit angibt und ein Maß dafür ist, wie schwer oder einfach das Molekül ein Dipolmoment ausbildet. Die DNA ist beispielsweise aufgrund ihrer frei beweglichen Co- und Gegenionen sehr einfach polarisierbar [35, 36].

Das frequenzabhängige Verhalten von Biomolekülen wurde oft untersucht und ist in der Literatur beschrieben [32, 37, 77, 85, 86]. Die Abb. 2.7 zeigt schematisch das typische Antwortverhalten des realen und imaginären Anteils der komplexen Permittivität $\underline{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega)$ von Biomolekülen in Abhängigkeit der Frequenz [87]. Die physikalischen Mechanismen für das Zustandekommen der α -, β -, δ - und γ -Relaxationen sollen nun kurz erläutert werden.

²DNA-Moleküle mit einer Länge von ca. 400 – 850 bp, was dem Größenbereich der Kuhnlänge $l_k = 2l_p$ unter entsprechenden Pufferbedingungen entspricht, zeigen ein kleines permanentes Dipolmoment [36, 84].

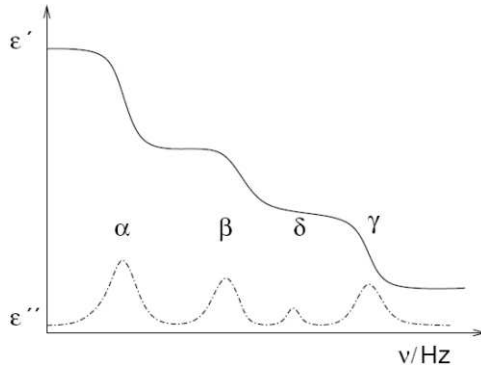


Abbildung 2.7: Typisches idealisiertes dielektrisches Spektrum [87]

Die Abbildung zeigt die typische Antwort des realen und imaginären Anteils der Permittivität eines biologischen Systems in Abhängigkeit der Frequenz. Die Relaxationen α , β , δ und γ sind für die DNA im Text näher erläutert.

Für die Beschreibung der Relaxationen wird das Rückgrat der DNA als Isolator mit einer leitenden Schicht aus kondensierten Gegenionen nach Gleichung (2.11) betrachtet [79, 81, 82]. Ähnlich wie in Kapitel 2.4.2 wird die DNA von einer diffusen Ionenwolke umhüllt. Beim Anlegen eines elektrischen (Wechsel-)Feldes wird diese durch die Verschiebung der Gegenionen deformiert und dadurch ein elektrisches Dipolmoment induziert [81, 88]. Das Dipolmoment ist aufgrund von Trägheitskräften i.d.R. nicht mit dem Wechselfeld in Phase.

Allgemein spiegeln die verschiedenen Relaxationsprozesse verschiedene physikalische Prozesse wider, die sich auf unterschiedlichen Zeitskalen abspielen. Beispielsweise wird die γ -Relaxation bei einer Frequenz oberhalb von 1 GHz durch die Reorientation von teilweise gebundenen dipolaren H_2O -Molekülen zurückgeführt [35]. Die β - und δ -Relaxationen bei 2 MHz und 12 MHz sind auf konzentrationsabhängige Wechselwirkungen der DNA-Moleküle untereinander und auf Fluktuationen in der

Verteilung der gebundenen bzw. kondensierten Gegenionen zurückzuführen [35, 89]. Die Relaxation bei 12 MHz wird auch einer Maxwell-Wagner-Grenzflächenpolarisation aufgrund unterschiedlicher elektrischer Eigenschaften des Puffers und des DNA-Rückgrats zugeschrieben [37, 90, 91]. Der niederfrequente Bereich der α -Relaxation unterhalb des 137 kHz-Bereichs spielt hier für das Verständnis der längenabhängigen DNA-Dielektrophorese die entscheidende Rolle [32, 35]. Dieser langsame Relaxationsprozess ist trotz der vorhandenen Längenabhängigkeit und der starken Ausprägung der Polarisierbarkeit ($7.88 \cdot 10^{-30} \text{Fm}^2$ bei 137 kHz [37]) jedoch noch nicht gut verstanden, da in diesem Bereich hydrodynamische Effekte, elektroosmotisch induzierte Strömungen um die DNA-Moleküle und elektrophoretische Bewegung der DNA-Moleküle die Ergebnisse der dielektrischen Spektroskopie überlagern [91]. Dieser Bereich zeichnet sich durch zwei Effekte aus, die für die dielektrophoretische Separation der DNA von Bedeutung sind [35, 37].

- i) Die Bewegung der Gegenionen der diffusen Schicht über die gesamte Größe des DNA-Moleküls [35, 37] führt zu einer Gesamtpolarisation (s. Abb. 2.8 a, b)) des Moleküls [92].
- ii) Die Gegenionen der diffusen Schicht können sich entlang der DNA über eine sogenannte Subunit bzw. Untereinheit, die der Kuhn-Länge L_k oder der doppelten Persistenzlänge L_p entspricht [35, 37, 89] bewegen. Eine weitere freie Bewegung der Gegenionen wird aufgrund einer *Potenzialbarriere* infolge eines Bruchs oder einer Unstetigkeit in der Konformation des Moleküls erschwert. Als Unstetigkeiten in der Konformation werden in der Literatur Biegungen, Knicke und (Über)Kreuzung von DNA-Abschnitten (s. Abb. 2.8 c, d)) diskutiert, die zu einer Art *Potenzialbarriere* führen können [37, 89].

Da die Polarisierbarkeit der DNA stark von dem Verhalten der Ionenwolke um die DNA abhängig ist, spielt die Zusammensetzung des Puffers für die Dielektrophorese eine große Rolle. So ist bekannt, dass die Polarisierbarkeit von DNA bei hohen Ionenkonzentrationen sowie bereits bei geringen Konzentrationen von multivalenten Gegenionen wie z.B. Mg^{2+}

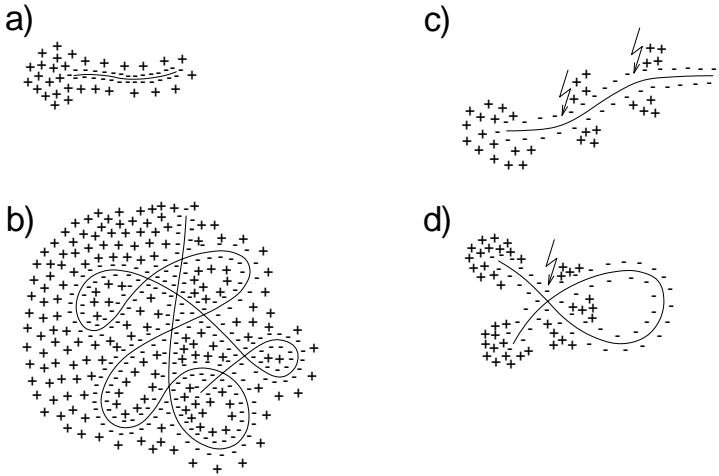


Abbildung 2.8: Modelle zur DNA-Polarisierbarkeit

Ein elektrisches Feld führt zu einer Ladungsverschiebung entlang eines a) kurzen DNA-Moleküls bzw. zu einer b) gesamten Ladungsverschiebung eines DNA-Knäuels. Knicke und Knotenpunkte kennzeichnen sogenannte Subunits c, d) und führen infolge dieser Unstetigkeiten zu einer Art Potenzialbarriere (durch Pfeile gekennzeichnet), die eine freie Bewegung der Gegenionen behindert und die Polarisierbarkeit $\alpha(\omega)$ beeinflussen.

abnimmt [32, 90]. Unter geeigneten Bedingungen impliziert der große Frequenzbereich der Polarisierbarkeit für DNA, dass eine Manipulation von DNA mit dielektrophoretischen Fallen bis in den MHz -Bereich möglich sein sollte. Tatsächlich konnte dies von mehreren Gruppen gezeigt werden [32, 34, 93].

Insgesamt ist die Dielektrophorese eine leistungsfähige Methode zur Manipulation von polarisierbaren Teilchen aller Art [77]. So lassen sich beispielsweise auch andere Biomoleküle wie Zellen [94], Viren [88], Proteine [34, 93] und andere Objekte wie Nanotubes [34, 95] etc. fangen, verschieben bzw. transportieren und separieren. Weiterhin können mit

der Dielektrophorese niedrig konzentrierte Probensubstanzen an einem bestimmten Ort für Analysezwecke gezielt aufkonzentriert [96] oder einzelne DNA-Moleküle über zwei getrennte Elektrodenstrukturen gespannt werden [97]. Mit der dielektrophoretischen Levitation lassen sich Objekte unter geeigneten Bedingungen gezielt so verschieben, dass keine Berührung mit begrenzenden Wänden stattfindet [79, 98].

2.4.3 Brown'sche Migrationsphänomene

Die Brown'sche Molekularbewegung bzw. das thermische Rauschen führt bei vielen Experimenten oft zu einem Verschmieren der Messergebnisse. Um den Einfluss dieser Störung zu verringern, werden Experimente häufig bei tiefen Temperaturen durchgeführt. So ist der Gedanke aufgekommen, das sonst störende thermische Rauschen und die verbreiternde Brown'sche Molekularbewegung technisch auszunutzen [D10].

Wird auf ein ruhendes klassisches System eine statische Kraft F ausgeübt, so erwartet man, dass das System der Kraft folgt. Dieses typische Antwortverhalten eines Systems auf eine äußere Kraft ist in der Abb. 2.9 a) gezeigt [99]. Das Gleichrichten der thermischen Bewegung molekularer Teilchen kann trotz Abwesenheit einer mittleren Kraft zu einem Teilchenstrom j (Abb. 2.9 b)) führen und wird Ratscheneffekt genannt. Ein Gleichrichten dieser Brown'schen Bewegung ist nur unter bestimmten Bedingungen wie im thermodynamischen Nichtgleichgewichtszustand und der örtlichen oder zeitlichen Asymmetrie des gleichrichtenden Systems möglich [99].

Ein nicht intuitives Antwortverhalten des Systems entgegen einer äußeren Kraft wird Absolut Negative Mobilität (ANM) genannt [100, 101, D7, D10]. Das wesentliche Merkmal von ANM ist in Abb. 2.9 c) gezeigt. Trägt man die mittlere Geschwindigkeit der Partikel bzw. den Partikelstrom j gegen die Kraft auf, so verläuft die Kurve im zeitlichen Mittel mit einer negativen Steigung durch den Nullpunkt, d.h. die Partikel laufen im zeitlichen Mittel entgegengesetzt einer nicht zu großen statischen Kraft [101, 102]. Experimentell konnte ANM für Elektronen von Zeuner et al. (dort: *absolute negative conductance*) gezeigt werden [103]. Von der Realisierung von ANM mit makroskopisch klassischen Teilchen wird im

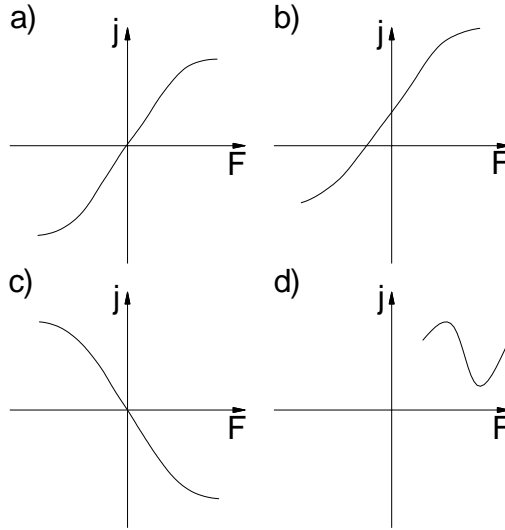


Abbildung 2.9: Antwortverhalten verschiedener Systeme auf eine äußere Kraft [99]

a) Ein System im thermodynamischen Gleichgewicht reagiert auf eine äußere Kraft mit einem Strom in Richtung der wirkenden Kraft. b) Ratscheneffekt: Bei verschwindender Kraft ergibt sich bei der Ratsche ein von Null verschiedener Strom. c) Absolut Negative Mobilität: Die Bewegung des Systems erfolgt entgegen der äußeren Kraft. d) Differentielle Negative Mobilität: Die Bewegung des Systems erfolgt in Richtung der Kraft, nimmt aber in einen bestimmten Bereich mit zunehmender Kraft ab.

Kapitel 4.3.1 und in den Publikationen [D7, D10] berichtet. Entgegen der Ratsche wird ANM in einem räumlich sowie zeitlich symmetrischen System realisiert [101]. Die Differentielle Negative Mobilität (DNM) d) zeigt eine Abnahme des Partikelstroms j bei zunehmender Kraft F für einen bestimmten Kraftbereich.

3 Experimentelle Methoden

Der experimentelle Aufbau und die experimentellen Methoden dieser Arbeit werden im Folgenden beschrieben. Dazu gehören sowohl die Herstellung und Präparation der Mikrofluidikchips als auch die Vorgehensweise bei den verschiedenen Messungen und deren Auswertung. Zunächst folgt eine Herkunftsangabe der verwendeten Chemikalien.

3.1 Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten λ - und T2-DNA-Moleküle wurden von Fluka (Deutschland) bezogen. Die Plasmid-DNA Proben wurden freundlicherweise von der PlasmidFactory (Deutschland) zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung des Puffers wurden Tris-Puffer, Phosphatpuffer, NaCl und β -Mercaptoethanol von Fluka (Deutschland) sowie ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) von Sigma (Deutschland), YOYO-1 (1,1'-(4,4,7,7-tetramethyl-4,7-diazaundecamethylene)-bis-4-[3-methyl-2,3-dihydro-(benzo-1,3-oxazole)-2-methylidene]-quinolinium tetraiodide) von Molecular Probes (USA) und performance-optimized-polymer-6% (POP-6) von Applied Biosystems (USA) erworben. Bei dem verwendeten Wasser handelte es sich um deionisiertes Wasser aus einer Milli-Q Biocel-Anlage von Millipore (USA).

Für die Herstellung des Masterwafers wurden der negative Fotolack SU-8(50), Verdünner γ -butyrol acetone, Entwickler propyleneglycolmethylether acetate von Microresist (Deutschland) gekauft. Die Si-Wafer stammten von CrysTec (Deutschland). Die für die Reinigung verwendeten Lösungsmittel wie Isopropanol p.A., Schwefelsäure p.A. H_2SO_4 , Wasserstoffperoxid p.A. H_2O_2 kamen von Merck (Deutschland).

Deckgläser von Menzel (Deutschland), Poly(dimethylsiloxane) PDMS

(Sylgard 184) von Dow Corning (USA) und Tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl-1-trichlorsilane (TTTS) von ABCR (Deutschland) wurden für die Fabrikation der Mikrofluidik-Chips verwendet.

Die benötigten Chemikalien für die Funktionalisierung der Mikrofluidik-Chips waren Polyethyleneoxy(POE)-polyoxypropylene(POP)-PEOtriblock copolymers Pluronic F108 (MW ~ 14600 , F108) sowie Poly(ethyleneoxy)di(triethoxy)-silane MW ~ 3400 g/mol (Si-POE₍₇₀₎-Si, PEG-3400) und stammten von BASF (Deutschland) bzw. von Nektar (USA).

3.2 Experimenteller Aufbau

Die Messapparatur (s. Abb. 3.1) besteht aus einem Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert200, Zeiss, Deutschland), einer empfindlichen CCD-Kamera (Imager3LS, LaVision baugleich mit Sensicam, PCO beide Deutschland), der dazu passenden Videograbberkarte (SensiCam PCI Interface-Board, PCO, Deutschland), der Software für die Bildauswertung (DaVis V.6.2, LaVision, Deutschland), einer motorisierten xy-Stage (99S008, Ludl Electronic Products LEP, USA), zwei PCI-Messkarten (PCI-6704, DAQ-6036E, National Instruments, USA) sowie einer in LabView 6i (National Instruments, USA) geschriebenen Software zur Geräteansteuerung/Datenaufzeichnung und vier Spannungsquellen (3x HCL 14 - 12500 & 1x HCN 14 - 12500, FUG, Deutschland). Für die dielektrophoretischen Experimente wird zusätzlich ein Hochspannungsverstärker (600H, NanoTechTools, Echandens, Schweiz) benötigt, der ebenfalls durch ein in LabView geschriebenes Programm angesteuert wird.

Das Mikroskop mit der Kamera ist in Abb. 3.2 schematisch abgebildet. Als Lichtquelle dient eine Quecksilber-Kurzbogenlampe (HBO100 (100 W), Zeiss, Deutschland). Der Lichtstrahldurchmesser kann mittels der Lochblende eingegrenzt werden, bevor der Lichtstrahl durch einen Anregungsfilter (BP 450 – 490, Zeiss, Deutschland) und den dichroitischen Spiegel (FT 510, Zeiss, Deutschland) durch das Objektiv umgeleitet wird. Mit dem motorisierten xy-Tisch kann die Probe justiert werden. Das Fluoreszenzlicht wird mit dem Objektiv eingefangen und durch den dichroitischen Spiegel geleitet. Noch vorhandenes Anregungslicht wird

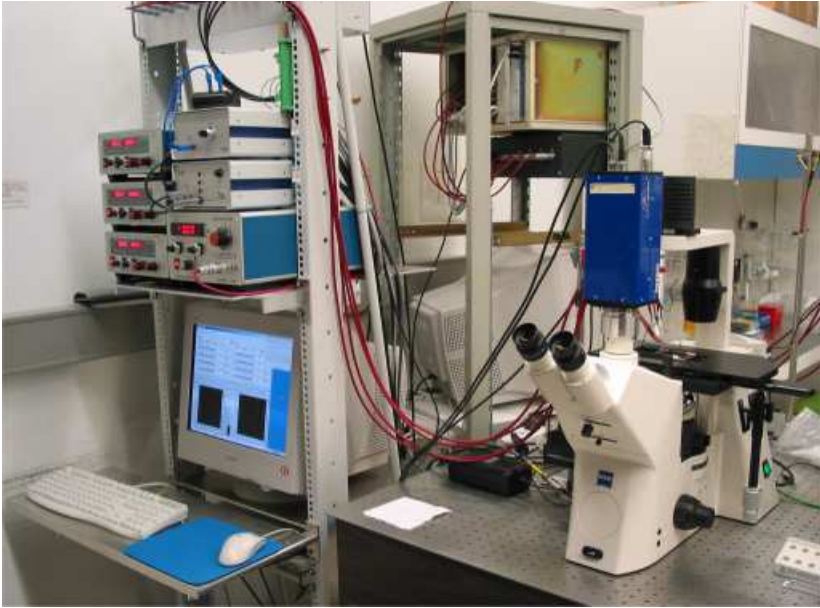


Abbildung 3.1: Experimenteller Versuchsaufbau

Die Abbildung zeigt einen Teil der experimentellen Versuchsanlage. Zu sehen sind vier Spannungsquellen, das Epifluoreszenzmikroskop, eine CCD-Kamera und der Computer mit dem LabView Programm für die Kontrolle des Mikrofluidikchips.

durch den Sperrfilter (BP 515 – 565, Zeiss, Deutschland) herausgefiltert. Anschließend wird das Fluoreszenzlicht über ein Linsensystem auf die Kamera bzw. das Okular abgebildet.

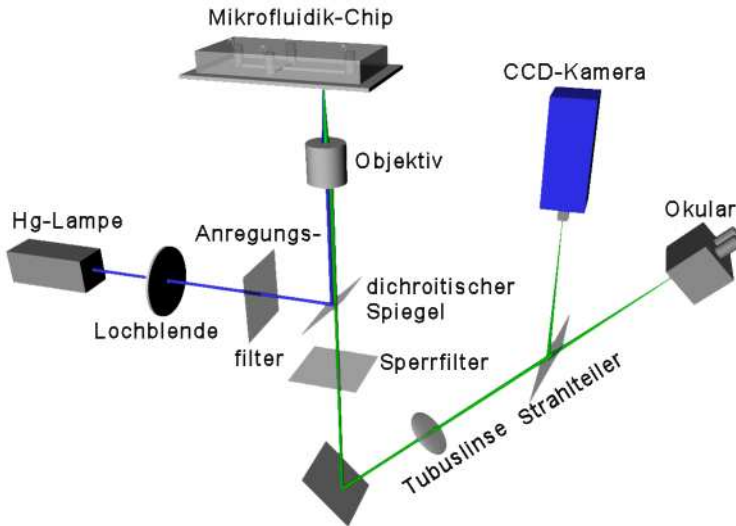


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau

Der schematische Aufbau zeigt den wesentlichen Teil des experimentellen Versuchsaufbaus in einer 3D-Ansicht im Detail.

3.3 Herstellung von PDMS-Mikrofluidik-Chips

Die Herstellung und Präparation von PDMS-Mikrofluidik-Chips wurde bereits in den Arbeiten [104, D1] ausführlich beschrieben. Es sollen hier daher nur die wesentlichen Schritte angeführt werden. Die elektrische Kontaktierung folgt im Anschluss.

3.3.1 Präparation von PDMS-Mikrofluidik-Chips

Die für diese Arbeit verwendete Herstellungsmethode der PDMS-Mikrofluidik-Chips basiert auf der Kontaktlithographie eines mit SU-8

beschichteten Si-Wafers und ist in Abb. 3.3 zusammengefasst. Hierfür wird auf einem zuvor mit Caro'scher Säure ($H_2SO_4 : H_2O_2$ im Verhältnis 3 : 1) gereinigtem Si-Wafer der Negativ-Fotolack SU-8 bestimmter Dicke durch das sogenannte *spin-coating*-Verfahren aufgebracht. Die gewünschte Schichtdicke kann hierbei durch die Umdrehungsfrequenz und die Viskosität des verwendeten Fotolacks eingestellt werden [104, 105]. In Tabelle 3.1 sind die für diese Arbeit verwendeten Prozessparameter für die verschiedenen Fotolackdicken angegeben. Nach dem Spincoaten erfolgt der sogenannte *prebake* (vgl. Tab. 3.1). Anschließend wird der so beschichtete Wafer durch eine Chrom-Maske (DeltaMask, NL) mit der i-Linie einer Hg-Dampfdrucklampe (365 nm) belichtet. Durch die Belichtung wird eine sogenannte *Lewis-Säure* erzeugt, die eine kationische Polymerisation des SU-8 induziert. Durch die Polymerisation entsteht nach dem Ausbacken (*post exposure bake*) eine äußerst stabile Quervernetzung des Epoxid-Harzes. In einem Entwicklerbad wird der Wafer von den nicht belichteten SU-8 Regionen befreit und anschließend mit Aceton und Isopropanol gereinigt. Der so einmal hergestellte Masterwafer kann dabei für mehrere Abformungsprozesse wiederverwendet werden.

Für den Abformungsprozess wird PDMS genutzt. Der *curing agent* wird mit dem *prepolymer* im Verhältnis 1:10 nach gründlicher Vermischung auf den mit TTTS silanisierten Wafer gegossen und für 4,5 h bei 85 °C ausgebacken. Nach dem Ausbacken wird die PDMS-Schicht von dem Masterwafer abgezogen und die Reservoirlöcher mit Hilfe eines Mikroskops gestanzt. Mit dem auf dem xy-Tisch des Mikroskops vorhandenen Nonius lassen sich die Reservoirlöcher mit einer Genauigkeit von ca. $\pm 100 \mu m$ positionieren. Zum Stanzen wird das Objektiv des Mikroskops durch einen Stanzer ausgetauscht.

Nach der Reinigung der PDMS-Mikrostruktur und des optional mit PDMS beschichteten Deckglases¹ im Ultraschallbad mit Aceton, Ethanol und Wasser werden das (mit PDMS beschichtete) Deckglas und die strukturierte Seite des PDMS in einer selbst konstruierten kapazitiven Sauerstoff-Plasmaanlage (500 kHz, 50 kV) nach [106] für 30 s bei einem

¹Die Messungen der Kapitel 4.2.2, 4.2.3 und 4.3.1 sind mit nicht beschichteten Deckgläsern durchgeführt worden. Die Beschichtung erfolgt analog zur Beschichtung eines Si-Wafers mit SU-8 bei einer Umdrehungsfrequenz von 3000 rpm.

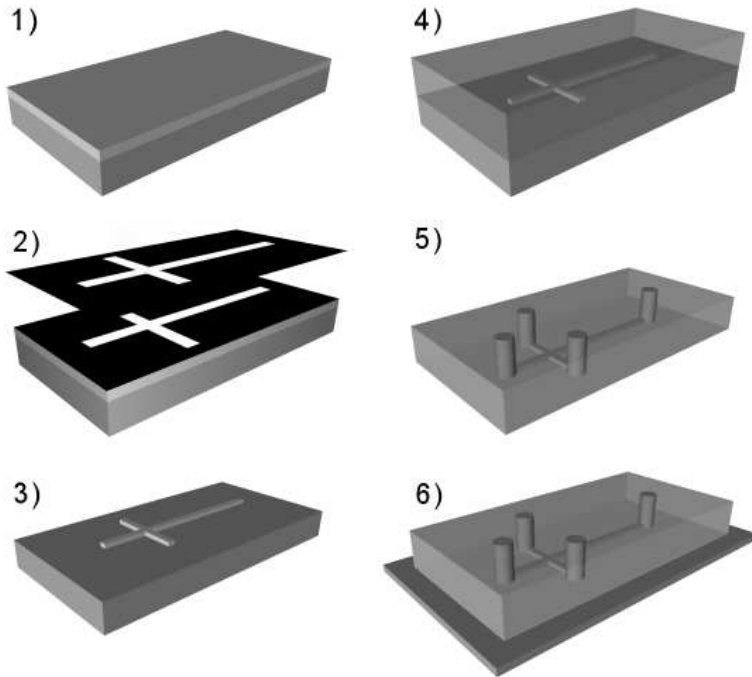


Abbildung 3.3: Zusammenbau des Mikrofluidik-Chips

Der mit dem negativen Fotolack SU-8 beschichtete Wafer (1) wird durch eine Chrommaske (2) mittels Kontaktlithographie belichtet (Hg, i -Linie, $\lambda = 365 \text{ nm}$). Nach der Entwicklung (3) dienen die belichteten Strukturen als negativer Abdruck (Masterwafer) für die PDMS-Abformung (4). Das Stanzen der Reservoirlöcher (5) durch das PDMS erfolgt nach dem Abziehen von dem Masterwafer. Im letzten Schritt (6) werden die PDMS-Struktur sowie ein optional mit PDMS beschichtetes Deckglas nach der Oxidation in einem Sauerstoffplasma irreversibel zusammengebracht. Das Deckglas bildet mit den Strukturen des PDMS und den Reservoirs einen Mikrofluidik-Chip.

3.3 Herstellung von PDMS-Mikrofluidik-Chips

SU-8 (X)	Höhe [μm]	$\nu_{30\text{sek}}$ [min^{-1}]	soft bake [min] @40/65/90°C	expos. [sek]	post exp. bake [min] @40/65/90°C
2	2	2000	3/5/5	10	3/5/20
5	5	2000	3/5/5	18,5	3/5/20
10	10	2000	3/5/5	30	3/5/20
50	200	1000	5/10/-	-	-/-/-
		1000	5/10/15	120	10/60/60

Tabelle 3.1: SU-8 Prozessparameter

In der Tabelle sind die Prozessparameter für die Herstellung der Masterwafer unterschiedlicher Höhen angegeben. Das X steht dabei für die SU-8 Formulierung. Für die Herstellung der Sättigungsstruktur (letzte Zeile) wird der Fotolack in einem doppelten Spin-Coating-Verfahren auf den Silizium-Wafer aufgebracht. Vor der Auftragung der zweiten Fotolackschicht erfolgt ein unvollständiges soft bake. Die Entwicklungszeit der Masterwafer im Entwicklerbad beträgt für die Strukturen bis ca. 10 μm zwischen 1 – 2 min. Die Entwicklungszeit für die 200 μm hohe Sättigungsstruktur beträgt ca. 30 min.

Sauerstoffdruck von 10^{-1} mbar oxidiert. Beide so behandelten Flächen werden danach derart aufeinandergelegt, dass durch das Abschließen der strukturierten PDMS Seite mit dem (mit PDMS beschichteten) Glas die Mikrokanäle entstehen. Nach kurzer Zeit hat sich eine irreversible kovalente Verbindung zwischen Glas und PDMS gebildet [107, D6], sodass nach einer Stunde eine optionale Oberflächenmodifikation der Mikrokanäle mittels PEG-3400 (im Arbeitspuffer gelöst, s.u.) vorgenommen werden kann. Nach erfolgter Funktionalisierung mit PEG-3400 muss dieses nach ca. 30 Minuten durch den Arbeitspuffer (10 mM Phosphatpuffer; pH 8, 3; 2 mM NaCl, 1 mM EDTA) mittels Unterdruck einer Wasserstrahlpumpe ausgetauscht werden. Optional wird dem Puffer eine auf 0,1 %ige POP-6 (v/v) Lösung zur Reduktion des EOF hinzugegeben. Weitere Details zu der Herstellung von PDMS-Mikrofluidikchips sind den Arbeiten [104, D1] zu entnehmen.

3.3.2 Reservoirvergrößerung & Elektrische Kontaktierung

Die Bewegungen der DNA und μ Beads werden durch elektrische Felder induziert. Die einfache, schnelle und reproduzierbare Kontaktierung ist in Abb. 3.4 gezeigt. In das Plexiglas sind deckungsgleich zum PDMS-Mikrochip größere Reservoirlöcher gebohrt, in welche jeweils ein Pt-Drahtende ($d = 0.4 \text{ mm}$, VWR, Deutschland) eingefasst ist. Über das andere Ende der Pt-Drähte wird mittels Miniaturklemmen (MicroKleps, Conrad Elektronik, Deutschland) der elektrische Kontakt zu den Spannungsquellen hergestellt. Aufgrund der guten Adhäsionseigenschaften von PDMS lässt sich dieses reversibel an Plexiglas anbringen und das Plexiglas mit den eingefassten Pt-Elektroden anschließend wiederverwenden.

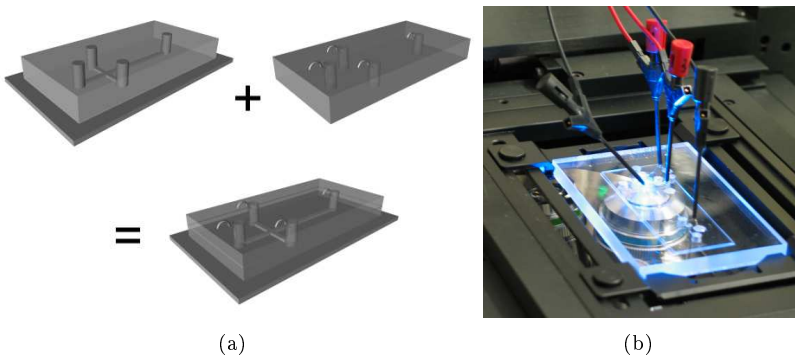


Abbildung 3.4: Elektrische Kontaktierung

Elektrische Kontaktierung mit Hilfe einer Plexiglasstruktur mit angepassten Reservoirlöchern und Pt-Draht. Die rechte Figur zeigt die experimentelle Realisierung und die Kontaktierung mit MikroKleps.

3.4 Messmethoden und Versuchsdurchführungen

3.4.1 Messung der makroskopischen Pervaporation

Für die quantitative Bestimmung der Pervaporation wird die Verdampfungs­menge durch eine PDMS-Membran bekannter Größe und Dicke bestimmt. Dazu wird in eine Petrischale ein Loch mit 3 mm Durchmesser gebohrt, durch das später destilliertes Wasser eingefüllt wird. Als Deckel der Petrischale dient eine PDMS-Membran, die in einem doppelten Abgussverfahren hergestellt wird. Die erste Lage PDMS wird dabei für eine Stunde in einer größeren Petrischale bei 85 °C nicht vollständig ausgebacken. Anschließend wird die gleiche Menge PDMS nochmals hinzugegeben und die Petrischale mit dem Loch so darauf abgelegt, dass das PDMS den Deckel der Petrischale bildet. Dieses Konstrukt (s. Abb. 3.5) wird dann bei 85 °C für weitere 4 Stunden ausgebacken. Mit einem Skalpell wird das PDMS um die Petrischale mit Loch freigeschnitten. Durch das Loch kann nun destilliertes Wasser eingefüllt und mit mehreren Lagen Tesafilm abgeklebt werden.

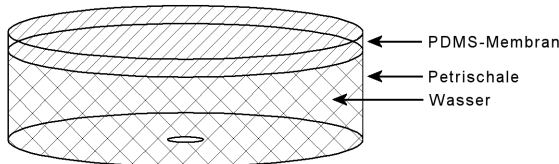


Abbildung 3.5: Petrischale mit PDMS-Membran

Durch das Loch wird die mit der PDMS-Membran abgeschlossene Petrischale mit Wasser gefüllt. Nach dem Abdichten des Einfüll-Lochs kann das Wasser nur durch die PDMS-Membran „pervaporieren“. Die Pervaporationsrate ergibt sich aus der Fläche der PDMS-Membran und dem Massenverlust infolge von Pervaporation über die Zeit.

Die durch eine PDMS-Membran verursachte Verdunstung hat eine Massenabnahme zur Folge, die mit einer Analysenwaage (CP224S,

Sartorius, Deutschland) bestimmt werden kann. Aufgrund der geringen Massenabnahme und der damit verbundenen langen Messzeit, wurde der staubarme Reinraum als Messort ausgewählt.

Um über eine lange Zeit Messungen durchführen zu können, wird die Analysenwaage über einen seriellen RS232 → TCP/IP Wandler (ADAM-4571L Data Gateway, Advantech Co., Ltd., USA) mit einem Messrechner verbunden, der über ein LabView-Programm die Waage fernsteuert. Das LabView Programm zeichnet dabei über einen Zeitraum von ca. 16,5 h alle 300 Sekunden die Werte auf.

3.4.2 Reduzierung der Pervaporation

Für die Reduzierung der Pervaporation werden zwei Strategien untersucht. Zum einen wird der Mikrofluidikkanal mit einer Polyethylenterephthalat (PET-)Folie als Dampfsperre abdeckt und zum anderen wird das PDMS mit Hilfe eines zweiten PDMS-Kanals (s. Abb. 3.6, im Folgenden als Milli-Kanal bezeichnet) gesättigt, welcher mit einer Querschnittsfläche von $4 \text{ mm} \times 200 \text{ }\mu\text{m}$ wesentlich größer als der Mikrokanal ist und auf den sonst vollständig autarken Mikrokanal aufgesetzt wird. Der Milli-Kanal wird – bis auf den doppelten Beschichtungsprozess (s. Tab. 3.1, letzte Zeile) mit der viskoserer SU-8 (50) Formulierung und einem doppelten *soft bake* Prozess nach jeweils einem *spin-coating*-Vorgang – analog zu der Beschreibung in Kapitel 3.3.1 hergestellt.

Für die Bestimmung der Zeitkonstanten, bis die Sättigung die Strömungsgeschwindigkeit in dem Mikrokanal auf den e -ten Teil reduziert hat, wird die Oberseite des PDMS-Mikrokanals nicht zusätzlich in der Sauerstoff-Plasmaanlage oxidiert. Für das einfachere Befüllen dieses *Millikanals* werden jedoch für alle anderen Messungen zusätzlich die PDMS-Oberflächen der Mikrochips direkt nach dem Zusammenbau oxidiert.

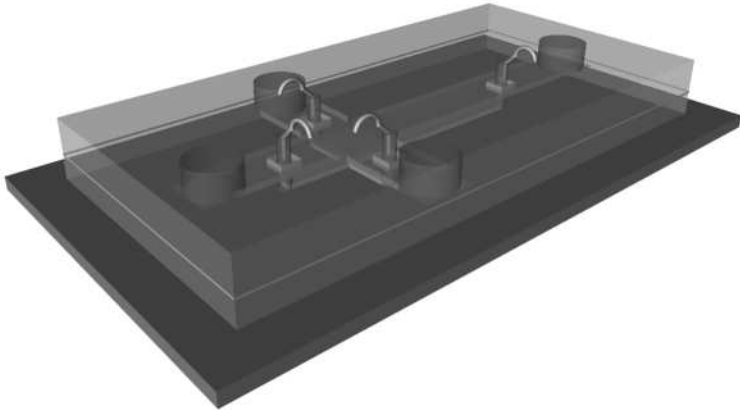


Abbildung 3.6: Milli-Kanal zum Sättigen des PDMS

Eine zweite strukturierte PDMS-Schicht bildet mit dem Mikrofluidik-Chip einen zweiten Kanal. Der zweite (Milli-)Kanal ist 4 mm breit, ca. 200 μm hoch und befindet sich oberhalb des Mikrofluidik-Kanals. Mikro- und Milli-Kanal haben keinen direkten Kontakt miteinander. Das Einfüllen von Wasser in den Milli-Kanal sättigt den PDMS-Bereich des darunter liegenden Mikrokanals mit Wasser.

3.4.3 Bestimmung der DNA Migrationsgeschwindigkeiten

Für die Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeiten der DNA werden zwei verschiedene Methoden verwendet. Die teilweise hohen Geschwindigkeiten und insbesondere die unterschiedlichen Konzentrationen der verwendeten DNA-Lösungen machen eine automatisierte Auswertungsmethode schwierig. In diesem Fall wurde manuell ausgewertet. Die zwei Methoden werden im Folgenden kurz vorgestellt:

Manuelle Bestimmung: Die manuelle Bestimmung erfolgt durch Unter-
einanderlegen der Bilderserie und wird nur dann verwendet, wenn

eine automatische Auswertung nicht möglich ist. Für die Auswertung wird die Migrationsstrecke durch die dafür benötigte Zeit geteilt. Der Fehler wird über die Gauss'sche Fehlerfortpflanzung unter Verwendung von Δt entsprechend der halben Belichtungszeit und $\Delta x = 5$ Pixeln ermittelt. Aus einer Bilderserie werden 20 aufeinanderfolgende Bilder zur Auswertung herangezogen.

Particle Image Velocimetry: Die Particle Image Velocimetry (PIV) eignet sich hervorragend, wenn die mittlere Geschwindigkeit vieler Moleküle bestimmt werden soll. Die verwendete PIV-Software, DaVis 6.0, nutzt als statistisches Werkzeug die Kreuzkorrelation, um die wahrscheinlichste Bewegung der Moleküle von zwei aufeinanderfolgenden Bildern zu bestimmen. Für die Auswertung werden die PIV-Daten bzw. Geschwindigkeiten von 20 aufeinanderfolgenden Bildern bestimmt.

3.4.4 Pinched-Injektion

Das für diese Arbeit verwendete Verfahren, um ein definiertes Probenvolumen zu einem definierten Zeitpunkt in einen Mikrokanal zu injizieren, ist die sogenannte *pinched-injection* Methode (s. Abb. 3.7) [11, 21, 108]. Im Ersten Schritt kann durch Anlegen geeigneter Spannungen ein Probenvolumen an der Kreuzung eingeengt werden. Durch Umschalten der Spannungen wird das definierte Probenvolumen injiziert und separiert. Neben der Pinched-Injection existieren die *floating* und *gated-injection*-Methode, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll.

3.4.5 Absolut Negative Mobilität

Die Präparation der Mikrochips für die ANM-Messungen erfolgt wie oben (Kapitel 3.3.1) beschrieben. Die Funktionalisierung des Mikrochips erfolgt hierbei jedoch nicht mit dem PEG-3400 und POP-6, sondern mit einer $100 \mu\text{M}$ F-108 Lösung in einem 100mM Phosphatpuffer bei pH 8,2. Nach einer Inkubationszeit von 2–20 Stunden wird die F108 Lösung durch denselben Puffer ohne F108 ersetzt. Der Austausch erfolgt durch

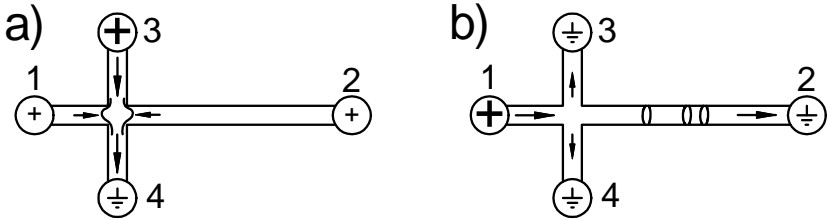


Abbildung 3.7: Pinched-Injection Methode

Die Polaritäten für das Einengen des Probenvolumens a) und der anschließenden Injektion b) gelten nur für den Fall, dass die elektrophoretische der elektroosmotischen Mobilität überwiegt. Der Injektionsschritt ist auch mit veränderten Potenzialen und Polaritäten an den Reservoirs 3 und 4 möglich.

Anlegen eines geringen Vakuums einer Wasserstrahlpumpe. Die elektrische Kontaktierung erfolgt wie in Abbildung 3.4 beschrieben.

Nach der chemischen Oberflächenfunktionalisierung wird eine geeignete Konzentration einer Partikelemulsion in die Reservoirs gegeben. Die geladenen Partikel ($r = 1 \mu\text{m}$ CML, IDC, USA) werden hydrodynamisch in den strukturierten Mikrokanal gespült. Befinden sich genügend Partikel in dem mittleren Bereich, so werden die Reservoirs ausgeglichen, sodass keine Strömung mehr vorhanden ist. Die Bestimmung der Geschwindigkeit der μBeads , die für die Messung der *Absolut Negativen Mobilität* verwendet werden, erfolgt mit der freien Software ImageJ unter Verwendung des Tracking-Plugins *MT2* (multiple tracker 2). Die von dem Programm ausgegebenen Positionen und Verschiebungen werden anschließend in Geschwindigkeiten umgerechnet.

3.4.6 Dielektrophoretische Messungen

Die Präparation und elektrische Kontaktierung des Mikrochips für die dielektrophoretischen Messungen erfolgt wie in Kapitel 3.3.1 und Kapitel 3.3.2 beschrieben. Aufgrund der verhältnismäßig großen Dimensionen bzw. Querschnittsflächen von $A = 100 \times 6 \mu\text{m}^2$ des Mikrokanals sind Strö-

mungen und Konzentrationsänderungen infolge der Pervaporation nicht sichtbar. Eine Sättigung des PDMS nach Kapitel 3.4.2 ist daher nicht notwendig.

Für die Messung wird die Lösung aus Reservoir 3 (s. Abb. 3.7) gegen eine DNA-Lösung ausgetauscht. Vor der ersten Messung wird der Mikrofluidikkanal auf mögliche Strömungen hin kontrolliert. Dafür wird die DNA Richtung Kreuzung gepumpt, dort angehalten und die übrigen Reservoirs mit Puffer so aufgefüllt, bis keine Netto-Strömung mehr erkennbar ist. Nach dem Ausgleich der Reservoirs kann die Position des Messortes am Ende des Separationskanals 2 über die xy-Stage des Mikroskops angefahren und die Messung gestartet werden. Die Injektion der DNA-Lösung nach der *pinched injection* Methode (s. Kapitel 3.4.4) und die Aufzeichnung der Messdaten werden gleichzeitig gestartet.

Für alle dielektrophoretischen Messungen bleibt zunächst der Detektionsort fix, wobei die Amplitude der sinusförmigen Wechselspannung U_{AC} in einer Rampe nach einer Zeit τ um jeweils einen diskreten Schritt U_{inc} erhöht wird. Für die elektrophoretische Migration wird der Wechselspannung eine Gleichspannung U_{DC} überlagert. Kurz bevor die DNA-Moleküle den Detektionspunkt erreichen, wird die Fallenstärke bzw. die Amplitude des Wechselfeldes auf einen Wert von $U = 420 \text{ V}$ gestellt. Anschließend wird der Schrittmotor der xy-Stage (und damit auch der Detektionspunkt) mit 50 Schritten pro Sekunde ($v \hat{=} 10 \mu\text{m/s}$) Richtung Kanalkreuzung gefahren. Das Elektropherogramm wird anschließend unter Verwendung von $x = vt$ ab dem Zeitpunkt, an dem der Schrittmotor gestartet wurde, in ein sogenanntes Dielektropherogramm umgewandelt. Das so erhaltene Dielektropherogramm spiegelt die Positionen wider, an denen verschiedene DNA-Typen gefangen wurden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Der Ergebnisteil gliedert sich in drei Abschnitte. Die Pervaporation bildet dabei einen einleitenden Abschnitt für ein besseres Verständnis der Verdunstungseffekte, die zu störenden Strömungen und Konzentrationsänderungen führen. Im Abschnitt 4.2 wird der Einfluss der Kanalgeometrie auf die Migration diskutiert. Schließlich werden im letzten Abschnitt neue Migrations- und Separationsmechanismen in AC-Feldern vorgestellt, die bisher standardmäßig eingesetzte Verfahren zur Aufreinigung und Auftrennung ergänzen können.

4.1 Pervaporation

Während der Messungen in den Mikrokanälen treten häufig ungewollt störende Strömungen auf, die die Messungen stark beeinflussen und daher eliminiert werden müssen. Im folgenden Abschnitt 4.1.1 wird die Pervaporation von Wasser durch PDMS-Membranen unterschiedlicher Dicken und Mischungsverhältnisse untersucht, um ein Verständnis für die Größenordnungen der Evaporations- bzw. Pervaporationsraten zu bekommen. Anschließend werden im Abschnitt 4.1.2 die Einflüsse der durch die Pervaporation induzierten Flüsse auf die Mikrokanäle untersucht und anschließend im Abschnitt 4.1.3 eine Strategie zur Verringerung der Pervaporation entwickelt.

4.1.1 Pervaporation durch eine PDMS-Membran

In Kapitel 3.4.1 wurde der Messaufbau und die Herstellung der Mikrofluidik-Chips bereits erläutert. Da der Reinstrom bei nahezu konstanter Temperatur von 18°C sowie einem leichten Überdruck von ca.

20 Pa gegenüber dem Außendruck gehalten werden kann und kontrollierte Luftströmungen vorherrschen, lassen sich grobe Aussagen zur Größenordnung der Verdampfungsrate machen. Abb. 4.1 zeigt die Massenabnahme einer mit Wasser gefüllten Petrischale über einen Zeitraum von ca. 16,5 h und in Tabelle 4.1 sind die Verdampfungsraten für verschiedene PDMS-Dicken und Mischungsverhältnisse (*curing agent* : *prepolymer*) angegeben.

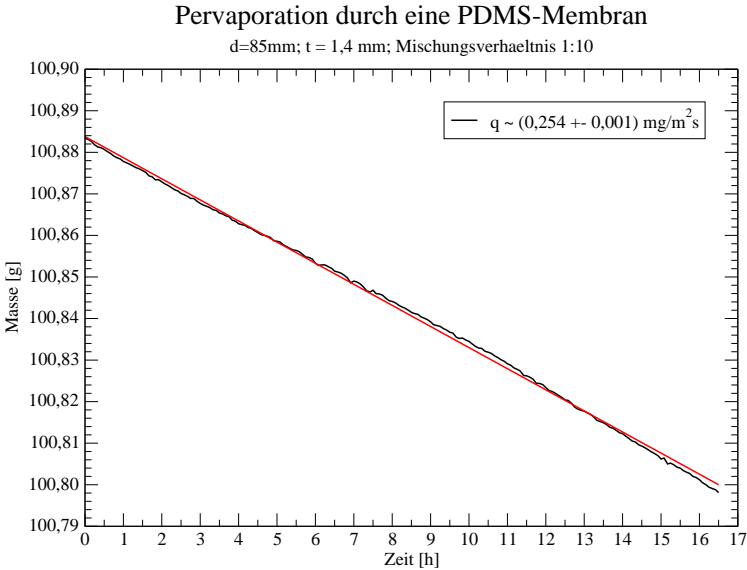


Abbildung 4.1: Massenverlust aufgrund von Pervaporation

Beispielmessung für die Pervaporation durch eine PDMS-Membran und der damit verbundenen Massenabnahme. Die Steigung bzw. der Abfall geteilt durch Fläche der PDMS-Membran ergibt die Pervaporationsrate, die in Tabelle 4.1 für verschiedene Dicken und Mischungsverhältnisse angegeben ist.

Vergleicht man die Werte aus Tabelle 4.1 mit der mittleren freien Evaporationsrate, so ergibt sich für die Pervaporation durch eine PDMS-

Membran gegenüber der freien Evaporation eine Reduktion der Pervaporationsrate auf ca. 0,1 – 4 %. Der Vergleich der Pervaporationsraten mit Liang et al. [109] und Watson et al. [110] zeigt, dass deren Werte um eine Größenordnung größer sind. Dieses kann auf unterschiedliche PDMS-Formulierungen zurückgeführt werden oder auf Pervaporationseffekte eines Ethanol-Wasser-Gemischs. Wie bereits geschildert, sollen die vorgestellten Daten nur einen groben Anhaltspunkt für die Größenordnungen der Evaporationsraten geben.

Mischungsverhältnis; Dicke d [mm];	Pervaporationsrate Q [$\frac{mg}{m^2s}$]
typische freie Evaporationsrate ohne PDMS-Membran*	≈ 40
0,75:10; $d = 1,4$	0,414
1:10; $d = 1,4$	0,254
1,25:10; $d = 1,4$	0,220
1:10; $d = 2,1$	0,149
1:10; $d = 2,8$	0,108

Tabelle 4.1: Pervaporationsraten

Die Verdampfungsraten durch PDMS-Membranen unterschiedlicher Mischungsverhältnisse (curing agent : prepolymer) und Dicken. Der Durchmesser der PDMS-Membran beträgt jeweils $D = 85$ mm.

*Die freie Evaporationsrate ist nach Penman [111] von der Temperatur, Druck, Wind etc... abhängig

4.1.2 Pervaporationsinduzierte Strömungen in Mikrofluidik-Kanälen

Die geringen Kanaldimensionen verursachen bei kleinsten Volumenströmen in den Kanälen hohe Strömungsgeschwindigkeiten. In PDMS-Mikrokanälen mit Kanal-Querschnittsflächen kleiner als $\sim 20 \times 20 \mu m^2$ macht sich eine Strömung bemerkbar, die zwischen zwei Reservoirs symmetrisch in Richtung Mitte des PDMS-Mikrokanals linear abnimmt und

nicht durch die unterschiedlichen Füllhöhen und Krümmungsradien der Reservoirs bzw. Wassertropfen erklärt werden kann. Da die Strömungsgeschwindigkeiten sehr hoch sein können (s. Abb. 4.2), kann der Effekt nicht durch (gerichtete) Diffusion infolge von Konzentrationsunterschieden oder unterschiedlicher chemischer Potenziale verursacht werden.

Die Lösung des Phänomens liefert der symmetrische Fluss selbst: Die durch die Pervaporation entweichende Menge Wasser wird aus den Reservoirs nachgeliefert und verursacht eine Flüssigkeitsströmung, die umso größer ist, je kleiner der Querschnitt ist. Dabei nimmt die Geschwindigkeit, wie in Kapitel 2.4.1 erläutert, von der Kanalmitte linear zu beiden Reservoirs hin zu. Dieses Verhalten ist in Abb. 4.2 für zwei Mikrokanäle mit $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ Querschnittsfläche gezeigt. Der Mikrokanal, der mit der dünneren PDMS-Schicht ($d = 14,6 \mu\text{m}$) abgeschlossen ist, zeigt gegenüber dem mit einer dicken PDMS-Schicht ($d = 500 \mu\text{m}$) eine deutlich höhere Strömungsgeschwindigkeit und damit höhere Pervaporationsrate, was in Übereinstimmung mit dem Ergebnis aus dem vorangegangenen Kapitel 4.1.1 steht.

Berechnet man für diese Mikrokanaldimensionen die Pervaporationsraten Q , wobei die Kanaloberfläche als Verdampfungsfläche betrachtet wird, so ergeben sich Werte von $Q_{d=500 \mu\text{m}} \approx 45 \text{ mg/m}^2\text{s}$ und $Q_{d=14,6 \mu\text{m}} \approx 60 \text{ mg/m}^2\text{s}$, die vergleichbar mit der freien Evaporationsrate an Luft sind.

Die Abb. 4.3 zeigt die Abhängigkeit von $k = j/A$ nach Gleichung (2.6) für verschiedene Querschnittsflächen A der Kanäle. Die drei abweichenden Werte bei $A^{-1} = 0,2/0,27/0,4$ sind auf systematische Fehler bei der Messreihe bzw. der Auswertung zurückzuführen. Werden diese Werte vernachlässigt, so ergibt sich eine Abweichungen von der Gleichung (2.6) zu

$$v(x) \propto \frac{x}{A^{\natural}} \quad (4.1)$$

Der Exponent $\natural = 0,85 \pm 0,16$ bestätigt innerhalb der Fehlergrenzen die Messungen von Verneuil [62], die einen Exponenten von $\natural = 0,85$ ermittelt haben.

Durch die hohen Strömungsgeschwindigkeiten und kleinen Kanaldimensionen ändert sich auch die Konzentration des Puffers sehr schnell. In

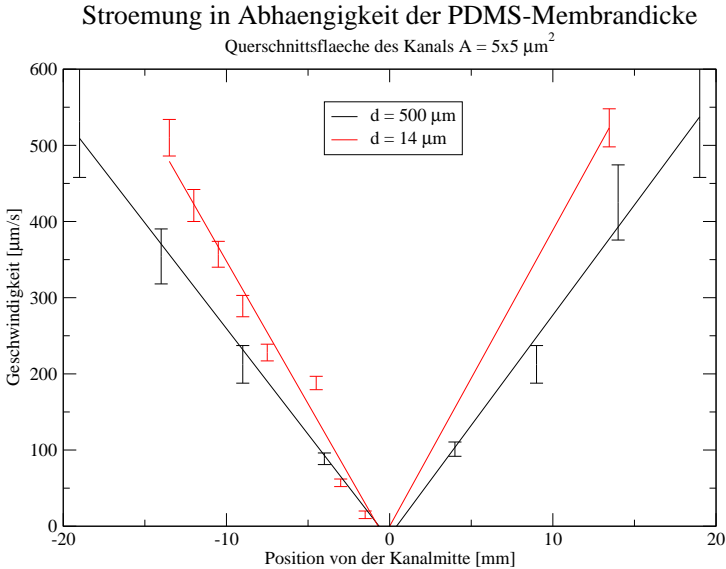


Abbildung 4.2: Strömungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Kanalposition und Dicke der PDMS-Schicht

Die Strömungsgeschwindigkeit ist in Abhängigkeit von der Kanalposition gezeigt. Deutlich zu erkennen ist die größere Steigung und damit höhere Verdampfungsrate für Mikrokanäle mit dünnen PDMS-Schichten.

Abb. 4.4 sind Bilder aus einer Videosequenz dargestellt, die Konzentrationsänderung einer 2 M NaCl Lösung in einem $5 \times 5 \mu\text{m}^2 \times 30 \text{ mm}$ Mikrokanal dokumentieren. Nach 37 Minuten bildet sich innerhalb von 10 Sekunden ein NaCl-Kristall, der danach stetig weiterwächst. Das Einsetzen der Kristallisation beginnt, wenn die Konzentration in die Sättigung geht. Für NaCl beträgt dieser Wert unter Normalbedingungen ca. $c = 6,1 \text{ M}$ [112], d.h. die Konzentration in der Mitte des Mikrokanals verdreifacht sich nach ca. 37 Minuten. Dieser Umstand verdeutlicht, wie wichtig es ist, die Pervaporation zu verringern.

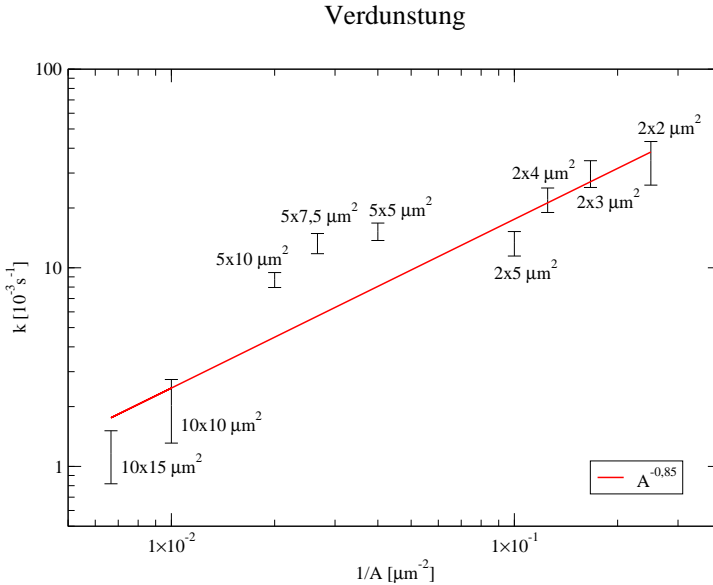


Abbildung 4.3: Doppelt-logarithmische Darstellung von Gl. (2.6)

Die Messung zeigt eine nicht-lineare Abhängigkeit von k zur inversen Querschnittsfläche A^{-1} des Mikrofluidik-Kanals.

4.1.3 Reduktion der Pervaporation

Die zunächst einfachste Methode, die Pervaporation zu verringern besteht darin, den PDMS-Mikrokanal mit einer Dampfsperre aus Polyethylenterephthalat (PET) abzudecken. Als Alternative bietet sich die Sättigung des PDMS mit Wasser an.

Die einfache Abdeckung des PDMS-Kanals mit PET hat aufgrund der nicht mit PET bedeckten Seitenflächen nicht den erwünschten Effekt. Setzt man diesen Wert in Relation zum Kanalvolumen, so ist klar, dass eine Sättigung des PDMS durch Pervaporation aus dem Mikrokanal sehr lange dauern würde.

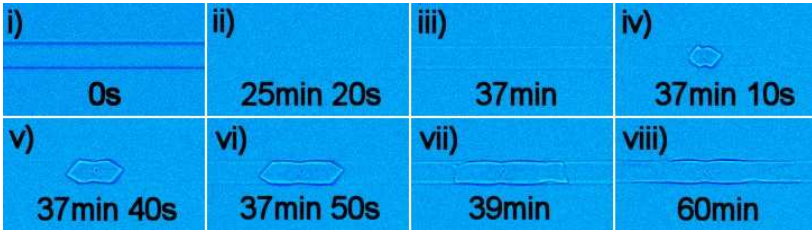


Abbildung 4.4: Kristallisation von NaCl

(i) Anfangs beträgt die Konzentration der NaCl-Lösung $\sim 2\text{ M}$ und der Brechungsindex $n = 1.352$ [112]. (ii) Nach ca. 25 Minuten hat sich die Konzentration so geändert, dass sich die Brechungsindizes der NaCl-Lösung und des PDMS ($n \approx 1,4 - 1,44$ für oxidiertes PDMS [113]) angeglichen haben. Dadurch lässt sich der Kanal nicht mehr vom Hintergrund unterscheiden. (iii) Durch weitere Pervaporation übersteigt der Brechungsindex der Salzlösung den vom PDMS und der Kanal wird langsam wieder sichtbar. (iv) Nach ca. 37 Minuten ist die Sättigungskonzentration von $6,1\text{ M}$ erreicht und es bildet sich innerhalb von nur 10 Sekunden ein Salzkristall aus (v-viii), der stetig weiterwächst.

Das Sättigen des PDMS-Mikrokanals mit Wasser ist am aussichtsreichsten, um die Strömung bzw. Pervaporation und Konzentrationsänderungen des Puffers zu unterdrücken. Dazu wird ein Mikrokanal für 24 Stunden in ein Wasserbad gelegt, damit das PDMS Wasser aufnehmen kann. Nach Herausnahme aus dem Wasserbad hat das PDMS eine leichte Trübung angenommen. Die Messung der Strömungsgeschwindigkeit muss direkt nach dem Befüllen der Reservoirs des linearen Kanals erfolgen. Die Abb. 4.5 zeigt die Zunahme der Strömungsgeschwindigkeit für einen $1,5 \times 1,5\ \mu\text{m}^2 \times 10\text{ mm}$ langen Kanal mit einer $d = 500\ \mu\text{m}$ dicken PDMS-Schicht nach Herausnahme aus dem Wasserbad. Man erkennt deutlich, dass die Strömung wieder zunimmt und sich nach einer charakteristischen Zeit einem konstanten Wert annähert. Die charakteristische Zeit für die Wiederaufnahme der Strömung wird durch anfitzen der Messpunkte an die exponentielle Funktion $f(t) = A_0 \pm A_1 \exp(t/\tau)$ bestimmt. Die charakteristische Zeit τ gibt die Zeit an, in der die (gespiegelte) Kurve auf

den e -ten Teil abgefallen ist.

Die Verwendung einer doppelt so dicken PDMS-Schicht ($d = 1 \text{ mm}$) führt fast zu einer Verdopplung der Zeitspanne, bis sich die Strömungsgeschwindigkeit auf den normalen Wert einstellt (s. Tabelle 4.2). Diese Methode ist daher nicht geeignet, um die Pervaporation dauerhaft zu verringern.

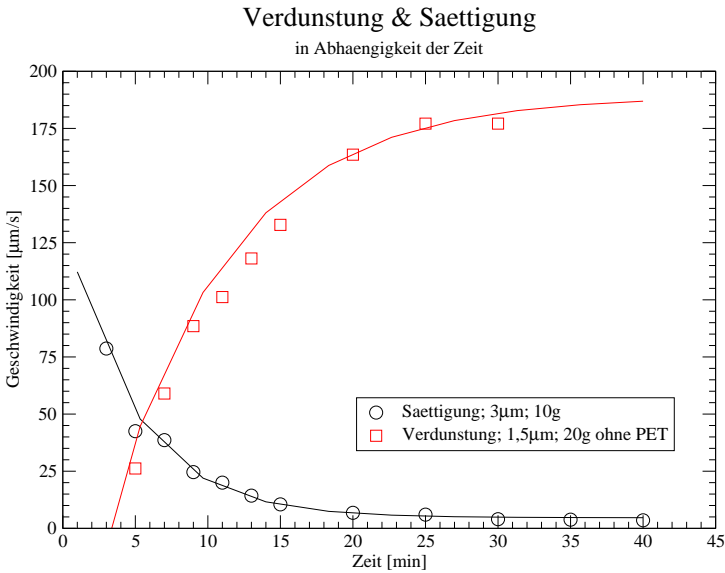


Abbildung 4.5: Strömungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Zeit

Wird der Mikrofluidik-Kanal mit dem Milli-Kanal gesättigt, so nimmt die Geschwindigkeit mit der Zeit exponentiell ab. Die Strömungsgeschwindigkeit nimmt mit der Zeit zu, wenn der gesättigte PDMS-Mikrokanal aus einem Wasserbad herausgenommen wird.

Die Verwendung von PET als Dampfsperre wird, wie oben beschrieben, auch für die Sättigung untersucht. Dafür wird der PDMS-Mikrochip direkt nach der Herausnahme aus dem Wasserbad mit PET abgedeckt und

die Strömungsgeschwindigkeit wird bestimmt. Wie man aus der Tabelle 4.2 entnehmen kann, wird die Pervaporation nur verzögert. Insgesamt ist die charakteristische Zeitkonstante für die Wiederherstellung der Strömung auch hier nur von der Dicke der PDMS-Schicht abhängig und unabhängig von der Kanalgröße. Der Grund dafür liegt darin, dass das vom Kanal in das PDMS übergehende Wasser schnell genug abtransportiert wird.

Die Reduktion der Pervaporation durch Sättigung mit Wasser ist vielver-

	Querschnittsfläche A [μm^2]; Dicke d [mm]	Zeit τ [min]
Verdunstung ohne PET	$A = 3 \times 3$; $d = 1000$	8.4 ± 4.3
	$A = 1,5 \times 3$; $d = 1000$	9.1 ± 1.6
	$A = 3 \times 3$; $d = 500$	5.1 ± 2.0
Verdunstung mit PET	$A = 3 \times 3$; $d = 1000$	13.7 ± 2.4
	$A = 1,5 \times 3$; $d = 1000$	15.3 ± 2.8
	$A = 3 \times 3$; $d = 500$	7.5 ± 2.9
Sättigung	$A = 3 \times 3$; $d = 1000$	11.2 ± 2.8
	$A = 1,5 \times 3$; $d = 1000$	10.2 ± 5.7
	$A = 3 \times 3$; $d = 500$	5.6 ± 2.2
	$A = 1,5 \times 3$; $d = 500$	5.5 ± 0.6

Tabelle 4.2: Zeitdauer für die Reduktion und Wiederherstellung der Strömungen

Die charakteristische Zeitdauer für die Wiederherstellung und Reduktion der Pervaporation ist von der Dicke der PDMS-Schicht des Mikrofluidik-Kanals abhängig und unabhängig von der Größe des Mikrofluidik-Kanals. Eine Abdeckung mit PET verlängert die Dauer bis zum Wiedereinsetzen der vollständigen Strömungsgeschwindigkeit.

sprechend, jedoch muss der PDMS-Kanal weiterhin mit einem Wasserbad in Kontakt stehen. Daher wird ein Milli-Kanal (s. Abb. 3.6) verwendet, um den Mikrochip während der gesamten Messzeit mit Wasser gesättigt zu halten. Die nahezu vollständige Reduktion der Pervaporation erfolgt innerhalb von nur 30 Minuten nach Aufsetzen und Befüllen des Milli-

Kanals (s. Abb. 4.5). Die Abnahme der Strömungsgeschwindigkeit auf den e -ten Teil des Anfangswertes wird hier wie oben berechnet und ist in Tabelle 4.2 angegeben. Auch hier zeigt sich, dass die Sättigung und Abnahme der Pervaporation für dünne PDMS-Microchips schneller vonstatten geht als für dicke PDMS-Schichten. Die für die Sättigung benötigte Zeit τ ist hier ebenfalls von der Kanalgröße unabhängig. Die verbleibende Strömungsgeschwindigkeit von weniger als $5 \mu\text{m}/\text{s}$ (s. Abbildung 4.5) kann auf unterschiedliche Füllhöhen der Reservoirs oder Krümmungsradien der Reservoirtröpfchen zurückgeführt werden.

4.1.4 Einfluss der Pervaporation auf den EOF

Die Reduktion der Pervaporation durch Sättigung des PDMS-Mikrofluidik-Kanals ist eine einfache Methode und funktioniert recht gut, doch bei den Messungen zeigte sich ein zunächst nicht erklärbares Phänomen. Die Migrationsrichtung der DNA verlief nicht mehr definiert in eine Richtung. Besonders nachdem die DNA mit der *pinched-injection-Methode* in den Separationkanal injiziert wurde, dominierte mal die elektrophoretische, mal die elektroosmotische Richtung. Aufgrund der Beschichtung der Mikrokanäle mit PEG-3400 sollte der elektroosmotische Anteil aber vernachlässigbar sein [D6].

Für die Änderung der Migrationsrichtung ist der Milli-Kanal bzw. die durch ihn bedingte Sättigung des PDMS und die dadurch entstehenden Osmose verantwortlich. Durch die Sättigung des PDMS-Microchips mit Wasser entsteht an der Grenzfläche Mikrokanal-PDMS eine Unstetigkeit in der Konzentration. Das Wasser aus dem PDMS gelangt nach und nach in den Kanal und verdünnt den Puffer von der Kanalwand aus. Dadurch erhöht sich das ζ -Potenzial und der EOF setzt wieder ein.

Um dieses Phänomen gänzlich zu unterdrücken, muss der EOF komplett eliminiert werden. Gleichung (2.7) beschreibt, dass der EOF auf zwei Weisen unterdrückt werden kann. Zum einen kann die Pufferkonzentration soweit erhöht werden, bis das ζ -Potenzial klein genug ist. Zum anderen kann die Viskosität η des Puffers erhöht werden. Die erste Methode eignet sich nicht, da wie oben beschrieben, nach kurzer Zeit die Konzentration an der Wand wieder verdünnt werden würde. Für die Unterdrückung des

EOF wird daher POP-6 hinzugefügt, welches die Viskosität des Puffers dauerhaft erhöht.

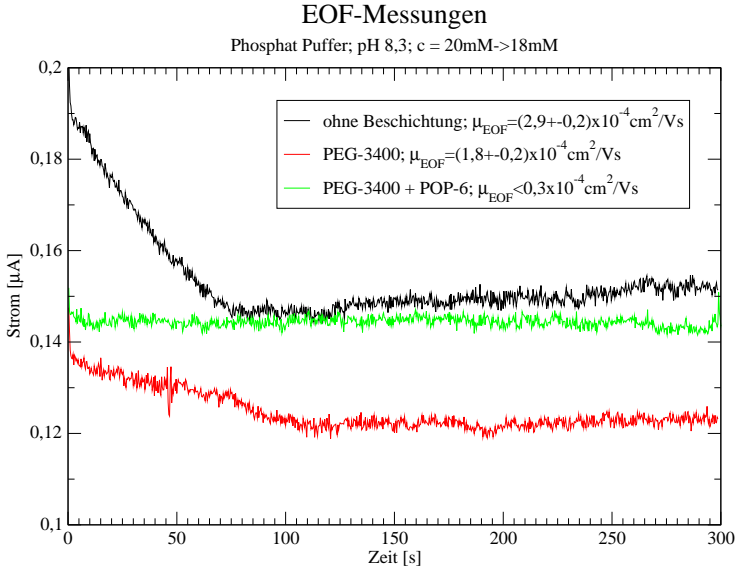


Abbildung 4.6: Bestimmung des EOF mit der Current-Monitoring-Methode nach Huang [114]

Ohne Beschichtung der Mikrofluidik-Kanalwände besitzt der EOF einen hohen Wert. Die Funktionalisierung mit PEG-3400 reduziert den EOF um ca. 38 %. Die Zugabe von POP-6 reduziert den EOF auf unter 10 % (hier nicht gezeigt: Messintervall 300 – 600 s) des ursprünglichen Wertes.

Die Abb. 4.6 zeigt die Bestimmung des EOF mit der Current-Monitoring-Methode nach Huang [114] für einen nativen Kanal, für einen Kanal mit PEG-3400 Beschichtung und einen mit PEG-3400 Beschichtung + zusätzlicher Zugabe von POP-6. Alle Kanäle wurden vor dem Zusammenbau zunächst in einem Sauerstoffplasma oxidiert. Die PEG-3400 Beschichtung reduziert den EOF um 36% von $\mu_{\text{EOF}} = (2,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ auf

$\mu_{\text{EOF-PEG3400}}(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-4} \text{cm}^2/\text{Vs}$. Die Hinzugabe von POP-6 unterdrückt die EOF-Mobilität auf unter $\mu_{\text{EOF-POP-6}} \leq 0,3 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2/\text{Vs}$ und ist damit vernachlässigbar.

Der Wert für die Mobilität ohne Behandlung ist in sehr guter Übereinstimmung zu den von Hellmich et al. berichteten Wert [D6]. Die Mobilität nach der PEG-3400 Behandlung weicht zu den Werten von Hellmich et al. aufgrund der unterschiedlichen Protokolle für die Oberflächenfunktionalisierung der PDMS-Mikrokanäle ab. Beispielsweise wurde für die Funktionalisierung ein anderer Puffer sowie eine kürzere Inkubationszeit vorgenommen. Für Details sei auf Kapitel 3.3.1 sowie die Publikation [D6] verwiesen.

4.2 DNA-Migration in Mikrofluidik-Kanälen

In den nun folgenden Abschnitten wird die DNA-Migration in freier Lösung untersucht. Zunächst sollen die Ergebnisse der Mobilitäten in unstrukturierten Mikrofluidik-Kanälen vorgestellt werden. Anschließend wird die DNA-Migration in strukturierten Mikrofluidik-Kanälen besprochen, die trotz der verhältnismäßig simplen Strukturierung im Größenbereich des Gyrationradius der DNA komplexe Migrationsphänomene hervorbringen.

4.2.1 Mobilität in unstrukturierten Mikrofluidik-Kanälen

In Kapitel 2.4.2 wurde das *free-draining-coil* Verhalten der DNA bereits erläutert, welches zu der konstanten und längenunabhängigen Mobilität der DNA in freier Lösung führt. Diese Betrachtung gilt streng genommen nur in unendlich ausgedehnten Kanälen, in denen keine Randeffekte auftreten. Werden Mikrokanäle verwendet, die in der Größenordnung des Gyrationradius der DNA sind, so können zusätzlich Wechselwirkungen der DNA mit den Wänden auftreten.

In der Abb. 4.7 sind die elektrophoretischen Geschwindigkeiten für λ - und T2-DNA in unterschiedlichen Kanaldimensionen in Abhängigkeit der Feldstärke gezeigt. Zu erkennen ist, dass die Geschwindigkeiten der

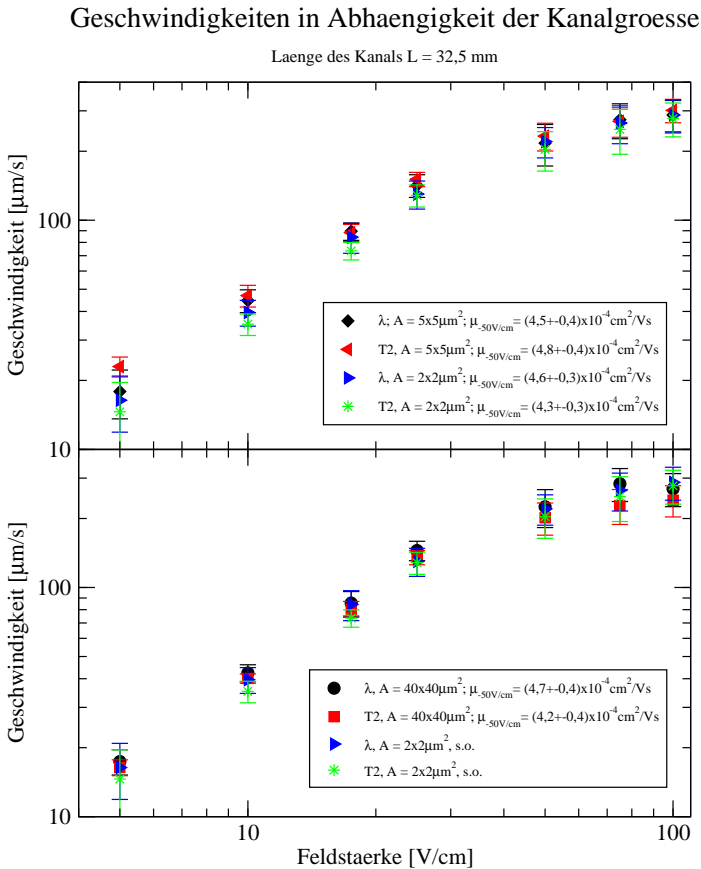


Abbildung 4.7: Feldstärkenabhängige Geschwindigkeit von λ - und T2-DNA

Die Geschwindigkeiten der beiden DNA-Sorten unterscheiden sich in den unterschiedlichen Querschnittsflächen der Kanäle nicht. Die leichte Abweichung vom linearen Verhalten wird auf Retardierungseffekte infolge der deformierten Ionenwolke um die DNA zurückgeführt.

DNA-Moleküle in diesem Puffersystem (Phosphat-Puffer + POP-6, s. Kapitel 3.3.1) bis ca. 50 V/cm linear mit der Feldstärke zunehmen und danach eine leichte Abweichung vom linearen Verhalten zeigen. In der Abbildung sind daher die mittleren Mobilitäten bis zu einer Feldstärke von 50 V/cm ausgerechnet und angegeben. Innerhalb der Fehlergrenzen zeigen beide DNA-Typen in den unterschiedlich großen Kanalquerschnitten von $A = 2 \times 2 \text{ } \mu\text{m}^2 - 40 \times 40 \text{ } \mu\text{m}^2$ keinen Unterschied in der Mobilität. Ein absoluter Vergleich der gemessenen Mobilitäten mit den Werten anderer Gruppen ist schwierig, da andere Puffersysteme verwendet werden. Doch bei vergleichbaren Ionenkonzentrationen und pH -Werten haben Stellwagen in anderen Puffern ebenfalls Werte um die $\mu_{\text{app}} = 4,3 - 4,9 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ gemessen [115].

Das Abflachen der Geschwindigkeit bei höheren Feldstärken wird hier auf einen Retardationseffekt zurückgeführt [65]. Eine anschauliche Erklärung dieses Effekts bedeutet, dass durch das elektrische Feld und die Bewegung der DNA im Puffer die Ionenwolke um die DNA deformiert wird. Dadurch wirkt bei höheren Feldstärken eine zusätzliche retardierende Kraft. Dieser Effekt ist nach bestem Wissen bisher für DNA nicht in der Literatur diskutiert worden, doch bestehen durchaus Anzeichen dafür. Beispielsweise haben Kang et al. [56] einen ähnlichen Geschwindigkeitsverlauf in Abhängigkeit der Feldstärke in einem 10 mM Gly-Gly Puffer bei pH 8,2 gemessen, der aber schon bereits bei ca. 20 V/cm eine deutliche Verringerung der Steigung aufweist. Die Abnahme der Mobilität bei höheren Feldstärken wird von ihnen jedoch nicht diskutiert.

Bei weiterer Verkleinerung der Kanalquerschnitte ($<$ Gyrationradius der DNA) ist aber davon auszugehen, dass sich die DNA-Mobilitäten ändern. Erste Ansätze für die Untersuchung der DNA-Mobilitäten in kleineren Kanälen wurden beispielsweise von Tegenfeldt et al. [116] unternommen, die die mittlere Ausdehnung von DNA-Molekülen in 100 nm dicken Kanälen untersuchten. Eine Messung der Mobilitäten wurde jedoch nicht durchgeführt. In der Arbeit von Pernodet et al. [117] wird die längenabhängige freie DNA-Mobilität auf einem flachen Si-Wafer gezeigt. Die lokale Reibungskraft zwischen der Oberfläche und der darauf adsorbierten DNA sorgt dabei für eine längenabhängige Mobilität. Insgesamt kann gesagt werden, dass sich die mittleren DNA-Mobilitäten in den untersuch-

ten Mikrokanälen mit Querschnittsflächen von $A = 2 \times 2 \mu\text{m}^2 - 40 \times 40 \mu\text{m}^2$ innerhalb der Fehlergrenzen nicht unterscheiden.

4.2.2 Bistabile Migrationsmodi in strukturierten Mikrofluidik-Kanälen

In diesem Abschnitt wird die DNA-Migration in strukturierten Mikrofluidik-Kanälen untersucht, die auf dem ersten Blick an entropische Fallen erinnern. Entropische Falle zeichnet sich dadurch aus, dass der Mikrokanal sich periodisch auf die Persistenzlänge der DNA verengt und wieder größer wird. Hier fallen die periodischen Verengungen des Mikrokanals (s. Abb. 4.8) in die Größenordnung des Gyrationradius der DNA. Die Dimensionen aller Kanten des periodischen Kanals sind dabei gleich groß. Die Abb. 4.8 zeigt die elektrische Feldverteilung in einer solchen Struktur, die sich aus der Lösung der Poisson-Gleichung mit den entsprechenden Randbedingungen ergeben. Die Dirichlet-Randbedingungen beschreibt die Potenziale φ_i an den Elektroden bzw. Reservoirs, und die Neumann-Randbedingung beschreibt den senkrechten Verlauf der elektrischen Feldlinien $\frac{d\varphi}{dn} = 0$ zum Normalenvektor der isolierenden PDMS Grenzfläche.

Die experimentelle Arbeit zu der DNA-Migration in den strukturierten Mikrofluidik-Kanälen wird parallel von der Arbeitsgruppe *Theorie der Kondensierten Materie* in Form von molekulardynamischen (MD-)Simulationen begleitet [D3, D5]. In den MD-Simulationen wird die DNA als Kugel-Feder-Modell beschrieben, wobei N die Anzahl der Kugeln ist. Dabei repräsentiert jeweils eine Kugel mehrere DNA-Basenpaare und die Federn zwischen den Kugeln die Bindungen zwischen DNA-Segmenten [118, 119]. Obwohl bei der Modellierung der MD-Simulationen keine hydrodynamischen Wechselwirkungen oder Wechselwirkungen mit den Ionen des Puffers bzw. der (Gegen-)Ionenwolke um die DNA berücksichtigt werden, bestätigen die Simulationen den Mechanismus für das Zustandekommen der längenabhängigen Mobilität in entropischen Fallen. Zusätzlich liefert das vereinfachte Modell sogar einen weiteren bis dato nicht in Betracht gezogenen diffusiv gesteuerten Effekt [D3] und damit ein tieferes Verständnis für den entropischen Fallen-Mechanismus.

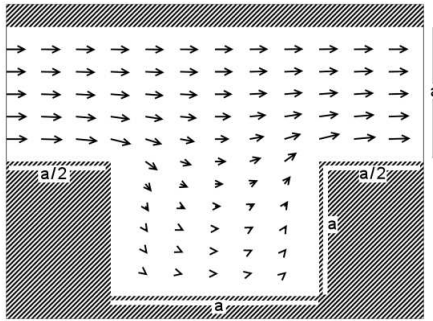


Abbildung 4.8: Elektrisches Feld eines strukturierten Mikrofluidik-Kanals [118]

Die Länge und Ausrichtung der Pfeile geben den Verlauf und die Stärke des elektrischen Felds in dem strukturierten Mikrokanal wieder. Das elektrische Feld im unteren, inhomogenen Bereich ist deutlich schwächer als im oberen Teil.

Der Vergleich der experimentellen und simulierten DNA-Migration ist in Abb. 4.9 gezeigt. Dabei zeigt der linke Teil der Abbildung 4.9 (a-d) die angedeutete periodische Strukturierung sowie fluoreszenzmikroskopische Konformationsschnappschüsse von elektrophoretisch migrierender T2-DNA in zeitlichen Abständen von jeweils 40 ms. Dabei strecken sich zwei T2-DNA-Moleküle von Box zu Box und kollabieren in den Boxen zu kompakten Knäueln. Die roten Pfeile markieren ein Molekül, das anscheinend nicht von der Strukturierung und dem inhomogenen elektrischen Feld beeinflusst wird. In rechten Teilbild e) sind Schnappschüsse aus einer MD-Simulationen einer vergleichbar langen Kette ($N = 200$ Kugeln) gezeigt. Die Übereinstimmungen der experimentellen und theoretischen Migration sind deutlich zu erkennen.

Durch Langzeitbelichtung des CCD-Chips der Kamera lassen sich „verschmierte“ Spuren der DNA-Moleküle aufzeichnen. Bei den MD-Simulationen erhält man durch Übereinanderlegen vieler einzelner Schnappschüsse ein sogenanntes Monomer-Dichte-Histogramm, wel-

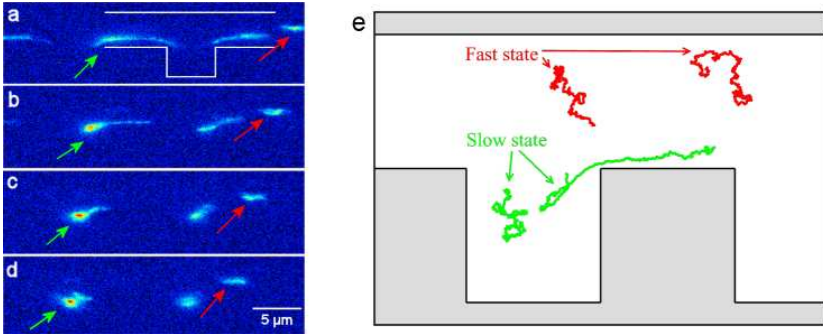


Abbildung 4.9: Migration in strukturierten Mikrofluidik-Kanälen [118, D5]

(a-d) Die grünen und roten Pfeile kennzeichnen jeweils ein Molekül in zeitlichen Abständen von 40 ms. (e) Der Vergleich mit den Konfigurationen aus den Simulation zeigen eine exzellente Übereinstimmung. Die DNA knäult sich im langsamen Zustand in dem inhomogenen Bereich und streckt sich über die Strukturierung, während sie im homogenen Teil knäuelformig bleibt.

ches vergleichbar mit der experimentellen Langzeitbelichtung ist. Auf der linken Seite der Abb. 4.10 sind die experimentell ermittelten Monomer-Dichte-Histogramme von λ -DNA für verschiedene Feldstärken [a) 43 V/cm, b) 86 V/cm, c) 130 V/cm] gezeigt. Die Intensität der fluoreszierenden DNA-Moleküle ist dabei invers-proportional zu ihrer Geschwindigkeit bzw. zur anliegenden Feldstärke. Bei höherer Feldstärke ist die verarmte Zone deutlicher zu erkennen.

Die Histogramme der MD-Simulationen (rechte Seite der Abb. 4.10) zeigen zusätzlich die Verteilung der Monomer-Dichte in Abhängigkeit der Länge der Kette. Die Monomer-Dichte-Histogramme zeigen, dass sich kurze DNA-Moleküle im schnellen, oberen homogenen Bereich des strukturierten Mikrokanals stabilisieren. Für $N = 100$ und $E = 0,5 \cdot E_0$ ist eine verarmte Zone schwach zu erkennen, wobei sie für $N = 200$ bei $E = E_0$ sehr gut sichtbar ist. Lange Ketten bevorzugen schon bereits bei

kleinen Feldstärken die untere langsamere Phase. Die Umrechnung der theoretischen Einheiten in SI-Einheiten ist in [118, D5] angegeben. Für die gezeigten Strukturen sind die wichtigsten Umrechnungsfaktoren in der Abbildungsunterschrift angegeben.

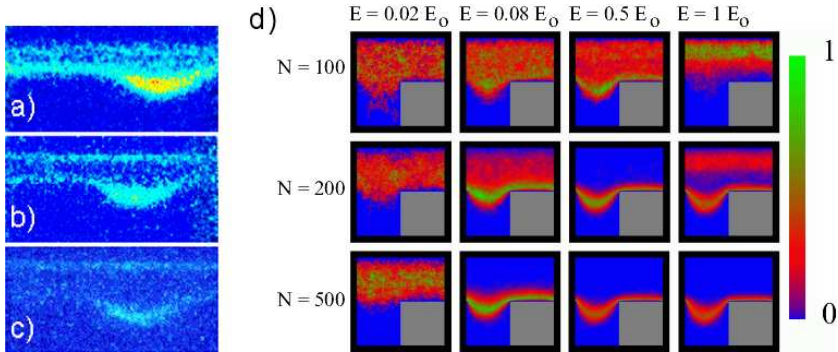


Abbildung 4.10: Bistabile-Migrationsmodi [118]

Linke Seite: Experimentelle Aufnahmen durch Langzeitbelichtung für verschiedene Feldstärken a) 43 V/cm b) 86 V/cm c) 130 V/cm. Mit steigender Feldstärke nimmt die Intensität infolge kürzerer Aufenthaltzeiten ab. Rechte Seite d): Monomer-Dichte-Histogramm für verschiedene Parameter und Kettenlängen N . Die Umrechnungsfaktoren für eine $5 \mu\text{m}$ Struktur sind: $\lambda\text{-DNA} = 48,5 \text{ kbp} \hat{=} 140 \text{ Beads}$, $T2\text{-DNA} = 164 \text{ kbp} \hat{=} 490 \text{ Beads}$, $E_0 \hat{=} 430 \text{ V/cm}$.

Die durch die verarmte Zone getrennten Bereiche entsprechen einer schnell und langsam migrierenden Phase. Das Zustandekommen der beiden Phasen bzw. der Mechanismus, der für die Stabilisierung sorgt, soll nun näher erläutert werden. Die Abb. 4.11 zeigt den Übergang einer Kette mit $N = 500$ Beads von der schnellen zur langsamen Phase. Zunächst befindet sich die DNA-Kette im oberen Bereich des strukturierten Mikrokanals, wo das elektrische Feld homogen ist. Nach einiger Zeit wandert ein Teil - bzw. eine Schlaufe - der DNA diffusiv getrieben in den elektrisch inhomogenen Teil der Struktur. Der zurückgebliebene Teil der DNA wird in diesem elektrisch schwächeren Feld abgebremst und

übt auf das gesamte Molekül eine bremsende Kraft aus. Die wirkende Kraft ist in dem Kräfteparallelogramm dargestellt und zeigt nach unten. Dadurch wird die DNA nach und nach auseinandergezogen und in den strukturierten Bereich hinuntergezogen. Die gestreckte Form bewirkt, dass sich die Kette entlang der elektrischen Feldlinien bewegt. Kommt das führende Anfangsstück dabei in den schwachen Teil des inhomogenen Feldes, so kann dieses nicht mehr rechtzeitig zur nächsten Box wandern und wird von den nachfolgenden Segmenten eingeholt, wodurch die Kette zu einem Knäuel kollabiert.

Der zuständige Mechanismus, der für die Stabilisierung der schnellen Phase sorgt, konnte bisher noch nicht exakt identifiziert werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass das Strecken der DNA entropische Energie kostet [118, D5]. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn das Molekül an den Ecken der Strukturierung gestreckt wird. Der Drang nach der energetisch günstigeren geknäuelten Form induziert einen Drift zum homogenen Bereich der Struktur. Eine weitere mögliche Erklärung liefert die Struktur selbst in Verbindung mit der Diffusion. Befindet sich das Molekül im engeren Bereich der Struktur, so diffundiert das Molekül infolge von Stößen mit der Wand im Mittel in den mittleren Bereich des Kanals. Diese Erklärung würde einen weiteren verarmten Bereich an der oberen Kante des Kanals erklären, der in den Bildern nur schwach ausgeprägt ist.

4.2.3 Elektrophoretische Separation von λ und $T2$ -DNA

Der vorherige Abschnitt zeigt, dass selbst eine relativ einfache Strukturierung zu einer unerwartet komplexen Migration von DNA führen kann. Die verhältnismäßig große Strukturierung ($5 \times 5 \mu m^2$) des Mikrokanals (s. Abb. 4.12 unten) führt bei hohen elektrischen Feldern zu bistabilen Migrationsmodi. Die Möglichkeit, dass ein und dasselbe DNA-Molekül zwischen der schnellen und langsamen Phase hin- und herspringen kann, macht eine elektrophoretische Separation verschieden langer DNA jedoch schwierig bzw. sogar unmöglich. Die Verkleinerung der Kanalkonstruktionen (s. Abb. 4.12 oben, mitte) in den Bereich des Gyrationradius

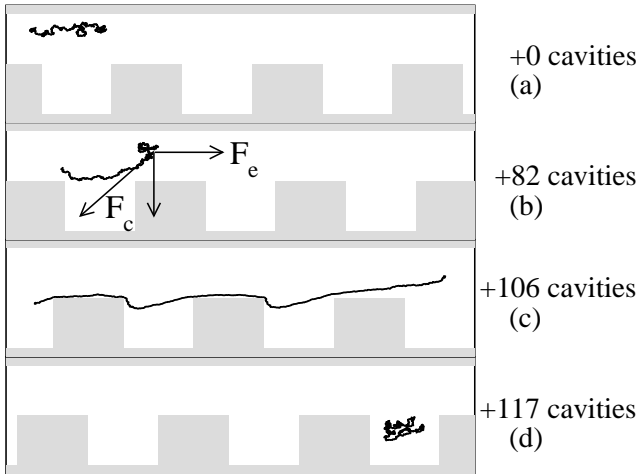


Abbildung 4.11: Übergang von der „schnellen“ in die „langsame“ Phase [118, D5]

(a) zeigt die Anfangskonformation. (b) Per Diffusion gelangt ein Teil der DNA unter den Einfluss des inhomogenen Bereichs des elektrischen Feldes, wodurch es eine in die Strukturierung gerichtete Kraft erfährt. (c) Dadurch wird die gesamte DNA abgebremst und streckt sich über die Strukturierung. (d) Im elektrisch inhomogenen und schwachen Teil der Struktur kann das führende Ende der DNA vom nachfolgenden Rest überholt werden, sodass die DNA zu einem Knäuel kollabiert.

der λ - und T2-DNA führt zu einer Unterdrückung des bistabilen Verhaltens [104, D5].

Es konnte bereits gezeigt werden, dass in solch strukturierten Mikrokanälen, eine längenabhängige Mobilität vorhanden ist (s. Abb. 4.13) [104, D1]. In dem vorherigen Abschnitt 4.2.1 ist gezeigt worden, dass in nicht strukturierten Kanälen ähnlicher Größe keine längenabhängige Mobilität vorhanden ist. Durch die Strukturierung wird also eine längenabhängige

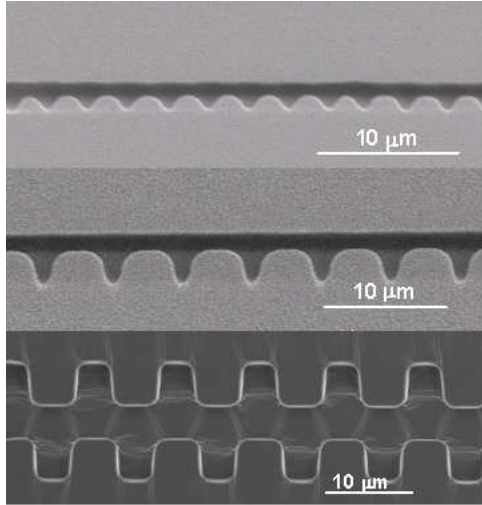


Abbildung 4.12: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von strukturierten Mikrokanälen

Die Abbildung zeigt strukturierte Mikrokanäle. Die Größe der Strukturierungen betragen von oben nach unten $1, 5/3/5 \mu\text{m}$.

ge Mobilität induziert. Interessanterweise sind in entropischen Fällen die Mobilitäten langer DNA-Moleküle höher als die kurzer Moleküle [27 – 29, D3], wohingegen sich die Mobilitäten bei den verwendeten Geometrien gegenteilig verhalten. Die Abb. 4.13 zeigt die Geschwindigkeit für λ - und $T2$ -DNA in Abhängigkeit der Feldstärke in einem $3 \mu\text{m}$ und $1,5 \mu\text{m}$ (s. Abb. 4.12) strukturierten Mikrokanal. Die Steigung der Kurve entspricht der Mobilität und ist für die kurze λ -DNA ($1,6 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$) höher als die der längeren $T2$ -DNA ($1,1 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$) [104, D2].

Die höhere Mobilität für kürzere Ketten konnte in den MD-Simulationen, wie in Abb. 4.14 gezeigt, erst bei höheren Feldstärken verifiziert werden [118, D5]. Die Erklärung liefert Abb. 4.10. Bei kleinen Feldstärken $E = 0,02 \cdot E_0$ wird der strukturierte Mikrokanal von kurzen sowie lan-

4 Ergebnisse und Diskussion

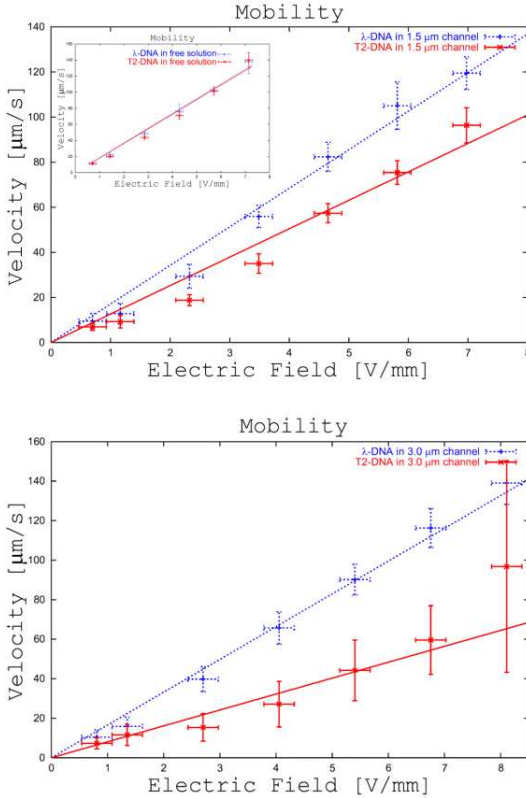


Abbildung 4.13: Mobilität in strukturierten Mikrokanälen [D1]

Die beiden Figuren zeigen die längenabhängige Mobilität von λ - und T2-DNA in 1,5 μm (oben) und 3 μm (unten) strukturierten Mikrofluidik-Kanälen (s. Abb. 4.12 oben + mitte). Das Inset der linken Figur zeigt zusätzlich die längenunabhängige Mobilität in einem $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ großen Mikrokanal.

gen Ketten gleichermaßen eingenommen, wobei die höhere Diffusion der kurzen Ketten sogar dafür sorgt, dass auch die Boxen stärker eingenommen werden. Dadurch können die kurzen Ketten für eine gewisse Zeit in der Box gefangen werden, wo das elektrische Feld schwächer ist. Wird die Feldstärke erhöht, so zeigt sich, dass die langen Ketten sehr schnell in den inhomogenen und langsameren Zustand übergehen, wobei kürzere Moleküle nicht so stark in den inhomogenen Bereich wandern.

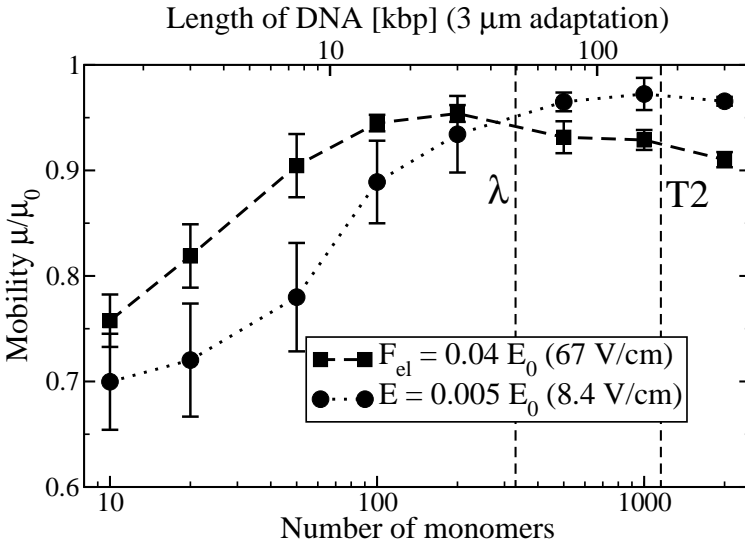


Abbildung 4.14: Mobilitätsumkehr für hohe Feldstärken [118, D5]

Bei geringen Feldstärken ist die Mobilität wie bei entropischen Fallen für kurze DNA-Moleküle geringer als für lange DNA-Moleküle. Bei hohen Feldstärken dreht sich der Trend um [118, D5]. Die quantitativen Ergebnisse der reduzierten Mobilitäten $\mu/\mu_0 \approx 0,99 \pm 0,1$ für λ -DNA und $\mu/\mu_0 \approx 0,63 \pm 0,03$ für T2-DNA [D1, D5] stimmen mit der Simulation zwar nicht überein, doch ist das qualitative Verhalten richtig.

Um zu zeigen, dass sich die längenabhängige Mobilität für die Separation

einer DNA-Mischung ausnutzen lässt, müssen die zu trennenden Moleküle von einem definierten Punkt aus gleichzeitig loswandern. Dies wird ermöglicht durch Anwendung der pinched-injection-Methode wie sie in Kapitel 3.4.4 beschrieben wurde. Die Injektion mehrerer und einer einzelnen DNA ist in Abb. 4.15 gezeigt. Durch Variation der Injektionsparameter und der DNA-Konzentration lässt sich die gewünschte Anzahl von Molekülen in einen Kanal injizieren.

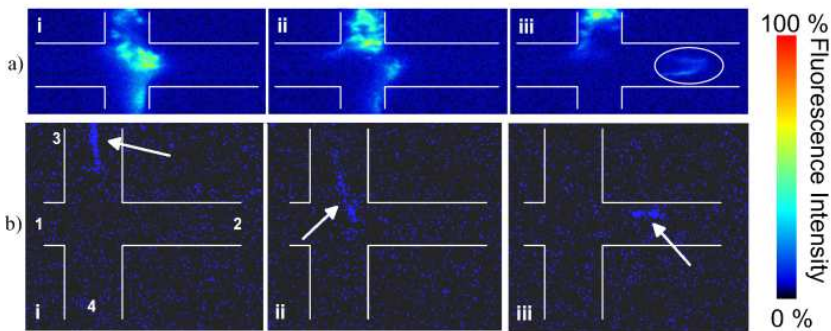


Abbildung 4.15: Injektion eines einzelnen und mehrerer DNA-Moleküle [D2, D4]

Im oberen Teilbild a) ist die Injektion von mehreren DNA-Molekülen gezeigt, wobei das untere Teilbild b) die Injektion eines einzelnen DNA-Moleküls zeigt. Die Konzentration betragen a) 60 pM bzw. b) 6 pM.

Unter Verwendung der o.g. pinched-injection-Methode ist es inzwischen gelungen, die längenabhängige Mobilität von DNA in strukturierten Mikrokanälen für die Separation von DNA auszunutzen [D2, D4]. Die Abb. 4.16 zeigt die Separation einer 60 pM λ / $T2$ -DNA-Mischung nach 30 Sekunden. Die kürzere λ -DNA erreicht den Detektor ca. 2 Sekunden vor der ca. um den Faktor 3,4 längeren $T2$ -DNA. Die Höhenverhältnisse der Fluoreszenz-Peaks entsprechen etwa dem Längenverhältnis der beiden DNA-Sorten und stimmen daher mit den verwendeten DNA-Konzentrationen gut überein.

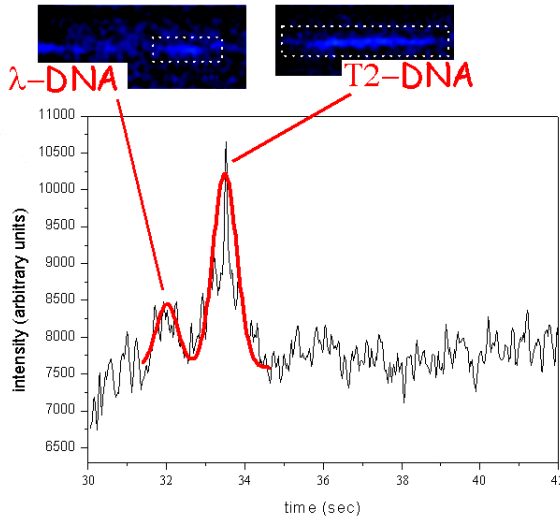


Abbildung 4.16: Elektrophoretische Separation von λ - und $T2$ -DNA in freier Lösung [D2, D4]

Der Detektionspunkt für die Aufzeichnung des Elektropherogramm liegt 3 mm von der Kreuzung (entspricht 500 Perioden) entfernt. Die verwendete DNA-Konzentration beträgt 60 pM und die Separationsfeldstärke 50 V/cm. Die Kanalhöhe ist 2,7 μm .

4.3 Neue Separationsmechanismen in AC-Feldern

In diesem letzten Abschnitt sollen neue Migrationsmechanismen vorgestellt werden, die auf elektrischen Wechselfeldern und teilweise diffusiven Prozessen beruhen. Im Kapitel 2.4.3 wurden bereits Brown'sche Migrationsphänomene wie Ratschen und ANM kurz erläutert. Im folgenden Kapitel 4.3.1 wird eine Separationsmöglichkeit für kolloidale Teilchen, hier Latexkugeln, vorgestellt. Danach wird im Kapitel 4.3.2 die erstmalig-

ge erfolgreiche dielektrophoretische Separation von DNA demonstriert.

4.3.1 Absolut Negative Mobilität

Mit der Mikro- und Nanotechnologie ist man heute erstmals in der Lage, nicht nur die Eigenschaften der kleinsten Teilchen zu beobachten, sondern auch direkt zu beeinflussen bzw. manipulieren. Im Folgenden wird die experimentelle Realisierung der ANM für makroskopische Objekte (hier: Polystyren-Kugeln) demonstriert. Die symmetrische Mikrostruktur ist in Abb. 4.18 gezeigt und besteht aus alternierend schmalen und breiten Durchgängen. Dabei können die Beads mit einem Durchmesser von $2 \mu\text{m}$ die breiten Bereiche von $3,1 \mu\text{m}$ durchqueren, wohingegen diese an den engen Durchgängen von $1,7 \mu\text{m}$ gefangen werden. Ein schmaler Durchgang steht einem breiten Durchgang einer benachbarten Spalte gegenüber.

Wie bereits in Kapitel 2.4.3 erwähnt, tritt ANM im Gegensatz zum Ratscheneffekt in räumlich und zeitlich symmetrischen Systemen auf. In Abb. 4.17 ist die Realisierung der zeitlich symmetrischen Kraft dargestellt. Die symmetrisch wechselnde Kraft bzw. anliegende Spannung $U_{\text{AC}}(t)$ mit der Amplitude $U_0 = \pm 30 \text{ V}$ a) wird von einer statischen Störung U_{DC} b) überlagert. Daraus resultieren eine starke und schwache Kraftkomponente $U_{\text{DC}} \pm U_0$, die sich jeweils nach der Zeit $\tau = 25$ Sekunden abwechseln. Die Symmetrie der Wechselspannung (bei $U_{\text{DC}=0}$) und der Strukturierung führt zu keiner bevorzugten Netto-Bewegung. Erst die Überlagerung des Wechselfeldes mit der statischen Störung U_{DC} führt zu einer gerichteten Teilchenbewegung.

Die Figur a) der Abb. 4.18 zeigt den Fall der langsamen Bewegung einer Polystyren-Kugel infolge der schwachen Kraft ($U_{\text{DC}} - U_0 < 0$, $0 < U_{\text{DC}} < U_0$). Der von der grünen Linie eingegrenzte Bereich gibt die Region an, in der die elektrischen Feldlinien die Polystyren-Kugel zu dem schmalen Durchgang führen und fangen. Per Diffusion kann die Kugel aus diesem Bereich entkommen und zur nächsten Spalte wandern. Der rot markierte Bereich an den Rändern der eingezeichneten Verteilung deutet die Wahrscheinlichkeit für das Entkommen an. Auf dem Rückweg (Figur b) der Abb. 4.18 wirkt eine stärkere Kraft ($U_{\text{DC}} + U_0 > 0$), wo-

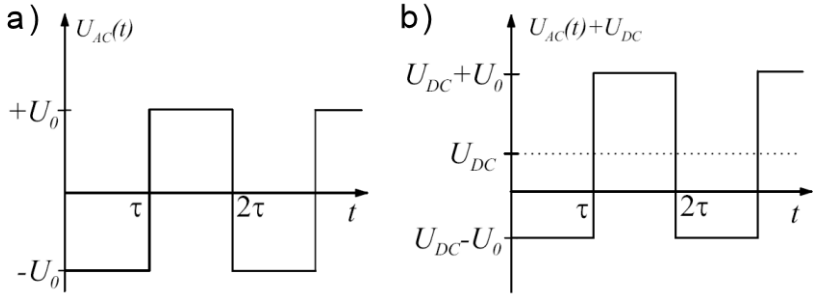


Abbildung 4.17: Realisierung der Kräfte [D8, D10]

a) Die Kraft U_{AC} wechselt nach der Zeit τ das Vorzeichen. Im zeitlichen Mittel ergibt sich eine Netto-Kraft von Null. b) Eine statische Störung U_{DC} mit $U_{DC} < U_0$ führt zu einer starken und schwachen Kraft mit entgegengesetzten Vorzeichen.

durch die Kugel schneller ist und daher weniger Zeit zum Diffundieren hat. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit geringer, dass die Kugel die Falle umlaufen kann. Insgesamt ergibt sich somit eine Netto-Bewegung in Richtung der schwachen Kraft. Der untere Teil der Abb. 4.18 zeigt eine typische Trajektorie als stroboskopische Aufnahme bzw. die Position der Kugel nach jeweils 100 ms .

Die Abb. 4.19 zeigt die Messpunkte für verschiedene Werte von U_{DC} mit $0 < U_{DC} < U_0 = \pm 30\text{ V}$. Die experimentellen Messpunkte bestehen dabei aus den Messungen von jeweils 40 Kugeln über einem Zeitraum von 200 Sekunden. Die durchgezogene Linie zeigt den theoretischen Verlauf und gibt die experimentellen Messpunkte gut wieder. Für die theoretischen Simulationen wurde die Bewegung einer Kugel mit einer stochastischen Dynamik beschrieben, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll [102, D10].

Da die Antwort des Systems sehr stark von der Diffusionskonstante und damit von der Partikelgröße abhängig ist [D10], wird es zukünftig möglich sein, diesen Effekt für die Separation von unterschiedlich großen Partikeln mit unterschiedlicher Diffusionskonstante auszunutzen. Die ANM stellt

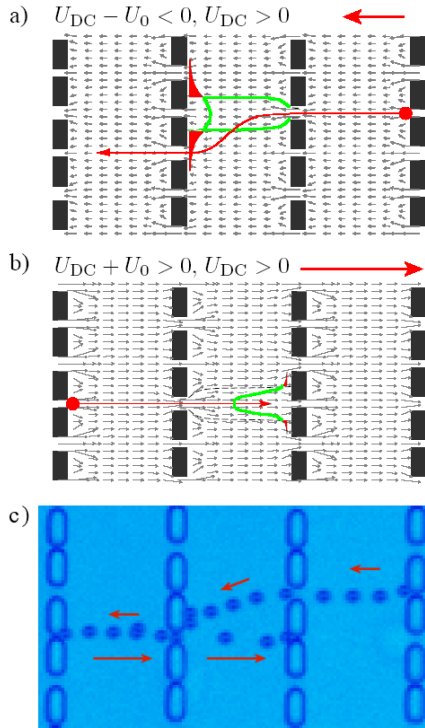


Abbildung 4.18: Absolut Negative Mobilität [D10]

Die skizzierten Verteilungen zeigen die Trajektorien und Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der Kugeln für den Fall einer a) schwachen und b) starken Kraft. Im Falle der langsamen Bewegung (a) hat die Kugel gegenüber der schnellen Bewegung (b) mehr Zeit, der Falle zu entgehen. Dadurch ergibt sich im zeitlichen Mittel insgesamt eine mittlere Bewegung der Kugel entgegen der statischen Kraft U_{DC} . Im unteren Teil (c) ist eine typische Trajektorie als stroboskopische Aufnahme gezeigt. Die Veränderung der Position des Beads entspricht jeweils einem Zeitsprung von 100 ms.

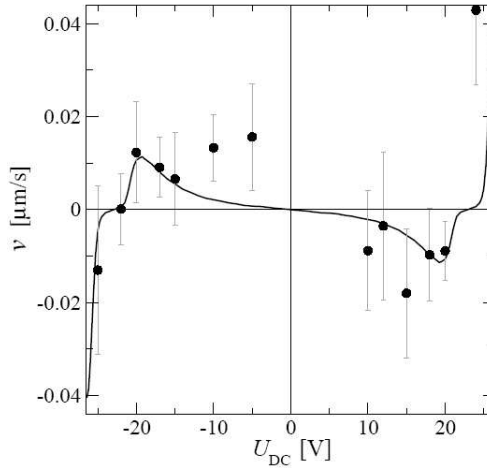


Abbildung 4.19: Absolut Negative Mobilität in Abhängigkeit der statischen Kraft [102, D7, D10]

Die Messpunkte kennzeichnen die experimentell ermittelten Geschwindigkeiten der Absolut Negativen Mobilität. Die durchgezogene Linie entspricht der numerischen Simulation. Das Experiment und die theoretische Simulation stimmen innerhalb der Fehlergrenzen überein.

damit eine neue potenzielle Möglichkeit dar, die sonst störende Diffusion für die Auftrennung von Biomolekülen auszunutzen.

4.3.2 Dielektrophoretische Separation von DNA

Für die dielektrophoretische Separation von DNA werden dielektrophoretische Fallen verwendet, die ohne mikrostrukturierte Elektroden auskommen. Anstelle der mikrostrukturierten Elektroden werden elektrisch isolierende Pfostenstrukturen verwendet, die in dem PDMS-Mikrofluidik-Kanal integriert sind. Durch die Verwendung von isolierenden Pfostenstrukturen entfällt der zusätzliche Schritt für das Aufdampfen von Elektrodenstrukturen.

Das Antwortverhalten von DNA-Molekülen auf Feldeigenschaften wie Frequenz und Amplitude wird seit längerem untersucht [31 – 33]. Bisher konnte das unterschiedliche Antwortverhalten jedoch noch nicht für eine erfolgreiche Separation von DNA mittels Dielektrophorese verwendet werden, obwohl theoretische Ansätze existieren [5, 30]. Mit der Abb. 4.20 wird ein Design für ein Mikrofluidik-Chip vorgeschlagen, mit der eine dielektrophoretische Separation durchgeführt werden kann. Die Kanäle 1, 2 und 3, 4 sind $100\ \mu\text{m}$ bzw. $90\ \mu\text{m}$ breit. Eine detaillierte elektronenmikroskopische Ansicht der Strukturierung zeigt Abb. 4.21. Die Strukturierungen bestehen aus $7,4\ \mu\text{m} \times 2,2\ \mu\text{m}$ großen isolierenden Pfosten, die $6\ \mu\text{m}$ hoch sind und durch einen vertikalen Abstand von $2,3\ \mu\text{m}$ voneinander getrennt sind. Der horizontale Spaltenabstand beträgt ca. $21,1\ \mu\text{m}$.

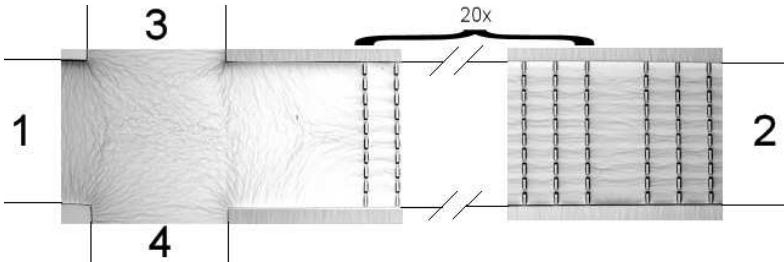


Abbildung 4.20: Strukturiertes Mikrokanal für dielektrophoretischen Messungen

Das Bild besteht aus einer Fotomontage zweier elektronenmikroskopischer Aufnahmen. Die Zu- und Ableitungskanäle sind angedeutet eingezeichnet. Die Strukturierung wird nach jeder 20. Spalte durch eine weggelassene Spalte unterbrochen. Die Kanäle mit den Zahlen 1, 2, 3 und 4 enden wie in Abb. 3.7 jeweils an unterschiedlichen Reservoirs. Die Kanäle 1, 2 und 3, 4 sind $100\ \mu\text{m}$ bzw. $90\ \mu\text{m}$ breit.

Die isolierenden Pfostenstrukturen führen dazu, dass das elektrische Feld inhomogen wird. Die Berechnung des elektrischen Felds E erfolgt analog zu Kapitel 4.2.2. Um die Kraftverteilung der dielektrophoretischen Fallen qualitativ zu verstehen, wird ∇E^2 für die aus dem Experiment verwendete Struktur berechnet [D12]. Dabei ist das elektrische Wechsel-

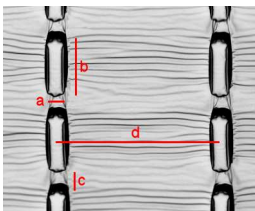


Abbildung 4.21: Vergrößerung des strukturierten Mikrokanals

Vergrößerter Ausschnitt der $6\ \mu\text{m}$ hohen Struktur aus Abb. 4.20. Die Abmaße der Strukturierung und Durchgänge sind: $a = 2,2\ \mu\text{m}$; $b = 7,4\ \mu\text{m}$; $c = 2,3\ \mu\text{m}$; $d = 21,1\ \mu\text{m}$.

feld parallel zur horizontalen Achse. Der rechte Teil der Abb. 4.22 b) zeigt schematisch den ∇E^2 -Anteil der Kraft für eine dielektrophoretische Falle. An den Ecken der Pfosten befinden sich die Bereiche, an denen das elektrische Feld am inhomogensten ist. Der linke Teil der Abbildung a) zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme dielektrophoretisch gefangener λ -DNA. Der Vergleich der beiden Bilder zeigt, dass für den Fall der deformierbaren DNA die dielektrophoretische Falle mit den vier Punkten höchster Kraft genau genommen aus zwei dielektrophoretischen Fallen besteht. Dabei bilden jeweils zwei fokussierende Bereiche parallel zum elektrischen Feld für DNA eine Falle aus.

Im Gegensatz zu üblichen Elektropherogrammen, die im Durchfluss aufgenommen werden, werden die DNA-Moleküle bei dieser Methode komplett gefangen. Die Messmethode für die dielektrophoretische Separation ist in Kapitel 3.4.6 bereits beschrieben worden und soll an dieser Stelle nochmal kurz zusammengefasst werden.

Für die Separation wird die DNA-Lösung mit der *pinched-injektion*-Methode in den Separationskanal einer Kreuzungsstruktur injiziert. Für die elektrophoretische Migration der DNA wird einer Wechselspannung U_{AC} eine Gleichspannung U_{DC} überlagert. Nach der Zeit τ wird die Amplitude der Wechselspannung um jeweils U_{inc} erhöht, bis das Ende der Rampe bei $U_{AC} = U_{end}$ erreicht ist. Danach wird die Amplitude der Spannung auf $420\ \text{V}$ eingestellt und U_{DC} ausgeschaltet, sodass alle DNA-

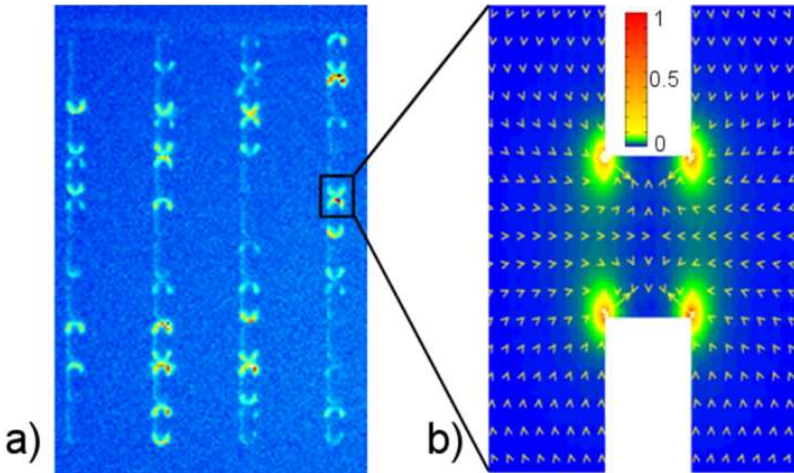


Abbildung 4.22: Dielektrophoretisches Kraftfeld [D12]

Das linke Bild a) zeigt dielektrophoretisch gefangene λ -DNA. Wegen der Deformierbarkeit der DNA können sie sich symmetrisch um die Pforten legen. Die rechte Seite b) der Abbildung zeigt qualitativ die räumliche Verteilung der dielektrophoretischen Kräfte. Die Pfeile geben die Richtung der Kraft an, die ein Dipol spüren würde.

Moleküle gefangen werden. Im Anschluss daran fährt der Schrittmotor des xy-Tisches mit einer konstanten Geschwindigkeit v den strukturierten Bereich an der CCD-Kamera vorbei. Diese Messmethode hat gegenüber der Durchflussmethode den Vorteil, dass sich wegen der geringeren Laufstrecken keine zusätzlichen Verbreiterungen der Peaks ergeben.

Die für die dielektrophoretische Separation verwendete Mikrostrukturierung wurde ursprünglich für Elektropherogramme im Durchfluss optimiert, d.h. das o.g. Fehlen jeder 21. Pfortenspalte sollte ursprünglich als Detektionsfenster dienen. Läuft die CCD-Kamera über diesen Bereich, so bricht das Intensitätssignal infolge von nicht vorhandener DNA ein und ergibt ein Artefakt. Durch das sogenannte *Binning*, d.h. Zusammenfassen von mehreren Messpunkten, verliert man zwar einige Informationen,

doch die Artefakte können geglättet werden, ohne die Aussagekraft zu schwächen. Dem *Binning* entspricht eine Mittelwertbildung der zusammengefassten Messpunkte.

Auftrennung von λ - und T2-DNA

Eine dielektrophoretische Separation von λ - und T2-DNA, angedeutet durch die blauen Gauss-Fits, ist in der Abb. 4.23 gezeigt. Das Inset der Abb. 4.23 zeigt den Rampenverlauf der Spannung bzw. den Verlauf der dielektrophoretischen Fallenstärke mit der Zeit. Die Zeitachse kann wie zuvor bereits erwähnt ab dem Zeitpunkt, an dem die xy-Stage in Richtung Kanalkreuzung gefahren wird, unter Verwendung von $x = vt$ in eine Ortsskala umgewandelt werden, wobei $v = 10\mu\text{m/s}$ die Geschwindigkeit des Schrittmotors der xy-Stage ist. Dadurch ist eine eindeutige Zuordnung der Position möglich, bei der die verschiedenen DNA-Typen gefangen werden. Eine eindeutige Zuordnung bezüglich der Feld- bzw. Fallenstärke zum Zeitpunkt des Fangens ist jedoch nicht möglich, da die Geschwindigkeit der DNA nichtlinear von der Fallenstärke abhängig ist. Starke Scherkräfte bei der Präparation bzw. beim Pipettieren der T2-DNA können zu Strangbrüchen führen, die sich durch den stark veräuschten Untergrund der Abb. 4.23 bemerkbar machen. Zusätzlich bewirkt eine hohe Konzentration von DNA, dass sich mehrere DNA-Moleküle sehr nahe kommen können und sich miteinander verknäueln. Dadurch kann sich das Knäuel aus mehreren DNA-Molekülen effektiv wie ein einzelnes längeres Molekül verhalten, wodurch sich die Polarisierbarkeit verändert. Beispielsweise ist es möglich, dass die Polarisierbarkeit von mehreren λ -DNA-Molekülen in etwa der eines T2-DNA-Moleküls entspricht.

In Abb. 4.24 sind die separat gemessenen Elektropherogramme von λ - und T2-DNA gezeigt. Die längere T2-DNA ist wie erwartet aufgrund ihrer Größe leichter polarisierbar, wodurch sie gleich nach der Injektion in den Separationskanal gefangen wird. Die kürzere λ -DNA kann wegen ihrer geringeren Polarisierbarkeit weiter laufen, bis die Spannungsrampe den Wert erreicht, bei der die Kraft ausreichend ist, um auch die λ -DNA zu fangen. Vergleicht man die Positionen der beiden Peaks der

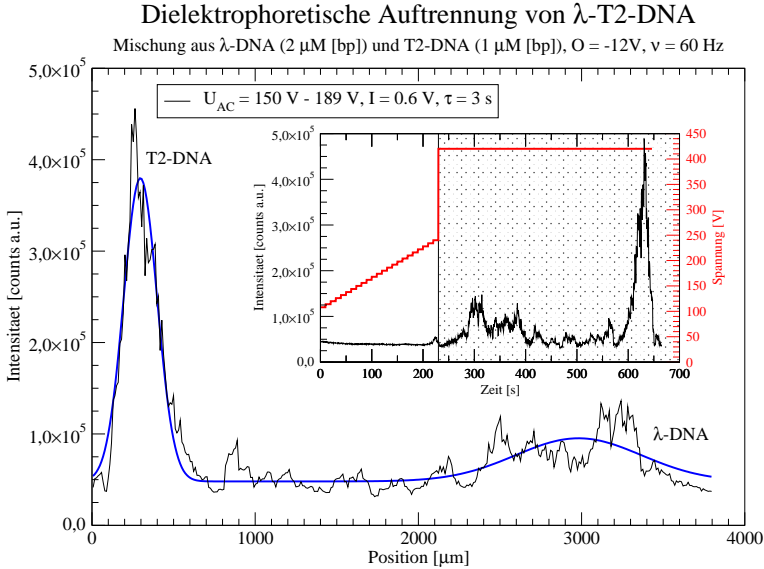


Abbildung 4.23: Dielektrophoretische Separation von λ - und T2-DNA

Die Abbildung zeigt die dielektrophoretische Separation von λ - und T2-DNA nach einem 4fach-Binzing. Das Inset zeigt die Originaldaten. Für die Rampe wird die Spannung alle $\tau = 3\text{ sek}$ beginnend bei $U_{AC} = U_{start} = 150\text{ V}$ um $U_{inc} = 0,6\text{ V}$ inkrementiert bzw. erhöht. Danach wird die Rampe bei $U_{AC} = U_{end} = 189\text{ V}$ angehalten bzw. die Amplituden der Spannung auf $U = 420\text{ V}$ eingestellt, U_{DC} ausgeschaltet und der strukturierte Bereich mit dem Schrittmotor mit einer Geschwindigkeit von v abgefahren. Die x-Achse des Elektropherogramms wird anschließend mittels $x = vt$ in eine Ortsskala umgewandelt und einem 4x-Binzing unterworfen.

Abbildungen 4.23 und 4.24, so sind die Fangpositionen der λ -DNA leicht versetzt. Dieses kann auf einen Alterungseffekt des Mikrofluidikchip zurückgeführt werden, da die separaten Messungen der λ - und T2-DNA

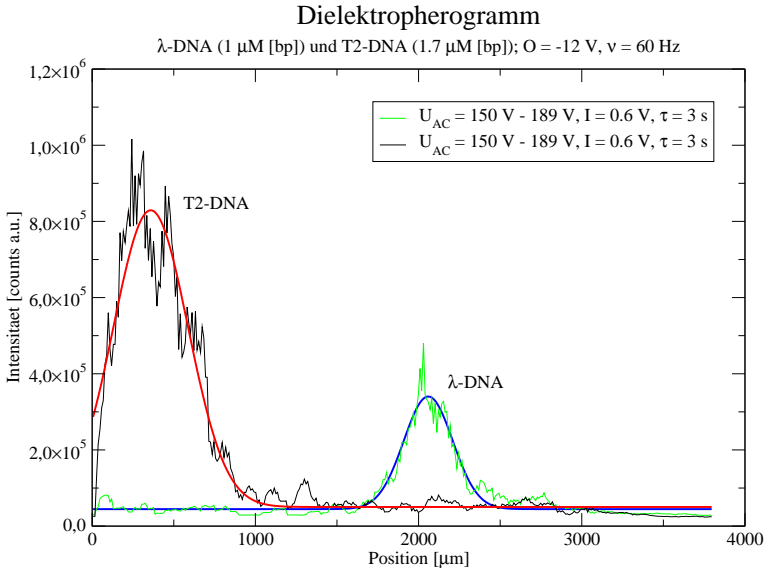


Abbildung 4.24: Dielektropherogramme von λ - und T2-DNA

Die Separat gemessenen Dielektropherogramme von λ - und T2-DNA ermöglichen die Identifizierung der in Abb. 4.23 gezeigten Auftrennung. Der linke Peak entspricht der T2-DNA und der rechte Peak der λ -DNA.

nach gründlicher Reinigung in demselben Kanal durchgeführt wurden. Für die λ -T2-DNA-Mischung wurde ein neuer Kanal verwendet. Der Versatz des λ -Peaks kann zudem durch einen zusätzlichen Spannungsabfall erzeugt worden sein, der durch die gefangene T2-DNA verursacht wurde. Ebenfalls können kleine Unterschiede in den Füllhöhen der Reservoirs zu geringen Drifts und damit zu Verschiebungen der Elektropherogramme führen.

Auftrennung von Plasmid-DNA

Die Auftrennung von DNA-Molekülen unterschiedlicher Länge spielt in den Lebenswissenschaften eine wichtige Rolle. Neben der „normalen“ DNA spielen Plasmide seit ihrer Entdeckung für therapeutische Medikationen oder als vorbeugende Maßnahme zur Vakzination eine immer größere Bedeutung in der Medizin [120]. Bei der Produktion bzw. Kultivierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkolonien (beispielsweise *Escherichia coli*) erhält man nicht nur die therapeutisch wirksame Variante covalently-closed-circle (ccc), sondern auch die weniger und nicht-aktiven open-circle (oc) und linearen Moleküle. Die drei verschiedenen Konformationen sind in der Abbildung 4.25 schematisch dargestellt und können dabei nicht nur als Monomere, sondern auch als Multimere vorkommen [9].

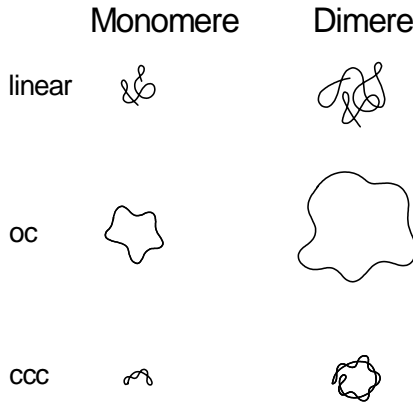


Abbildung 4.25: Plasmid-DNA Konformationen

Die verschiedenen Plasmid-DNA Konformationen und ihre entsprechenden Dimere sind schematisch dargestellt. Hierbei stehen (ccc) für covalently-closed-circle und (oc) für open-circle.

In der Abbildung 4.26 ist eine AFM-Aufnahme von Plasmid-DNA verschiedener Konformationen zu sehen. Da nicht alle Konformationen ei-

ne erfolgreiche Therapie versprechen, muss das Plasmid-DNA-Gemisch vor der Auslieferung und Anwendung noch aufgetrennt bzw. aufgereinigt und einer Qualitätskontrolle unterzogen werden. Die Standardmethoden zur Auftrennung von Plasmid-DNA sind die Platten- und Kapillarelektrophorese. Aufgrund der speziellen Konformationen unterscheiden sich die Migrationseigenschaften von Plasmid-DNA deutlich von „normaler“ DNA.

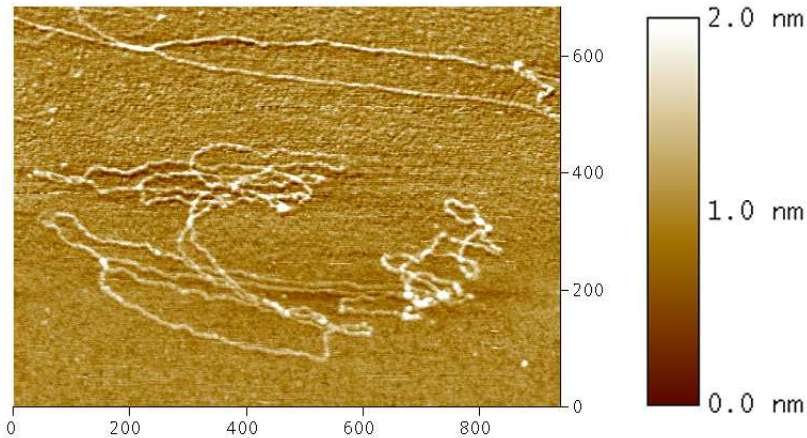


Abbildung 4.26: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme von DNA

Die rasterkraftmikroskopische Aufnahme zeigt verschiedene Konformationen von Plasmid-DNA. Oben im Bild befindet sich ein lang gestrecktes Molekül, unten rechts ein (ccc-Monomer) superspiralisiertes DNA-Molekül. Die Konformation der DNA-Moleküle links unten (zirkulär) und darüber (ccc-Dimer) oben sind nicht eindeutig zu erkennen.

Mischung aus 7 kbp ccc-Monomeren und -Dimeren Die Abb. 4.27 zeigt die Auftrennung einer 7 kbp langen ccc-Monomer (90%) und -Dimer (10%) Plasmid-DNA bei verschiedenen Parametern. Die durchgezogenen Linien zeigen jeweils die Fits zweier Gauss-Kurven. Obwohl der untere

4 Ergebnisse und Diskussion

Versuch in einer deutlich kürzeren Zeit $t = \frac{U_{\text{end}} - U_{\text{start}}}{U_{\text{inc}}} \cdot \tau$ durchgeführt worden ist, können diese zwei Peaks nach dem Rayleigh-Kriterium als aufgelöst betrachtet werden. Die zwei kleinen Einbrüche in den linken Peaks der beiden Versuche deuten darauf hin, dass die CCD-Kamera über einen Bereich gefahren ist, in dem die 21. Struktursäule weggelassen wurde. Das Fehlen von DNA in diesem Bereich führt kurzzeitig zu einem Einbruch im Intensitätssignal.

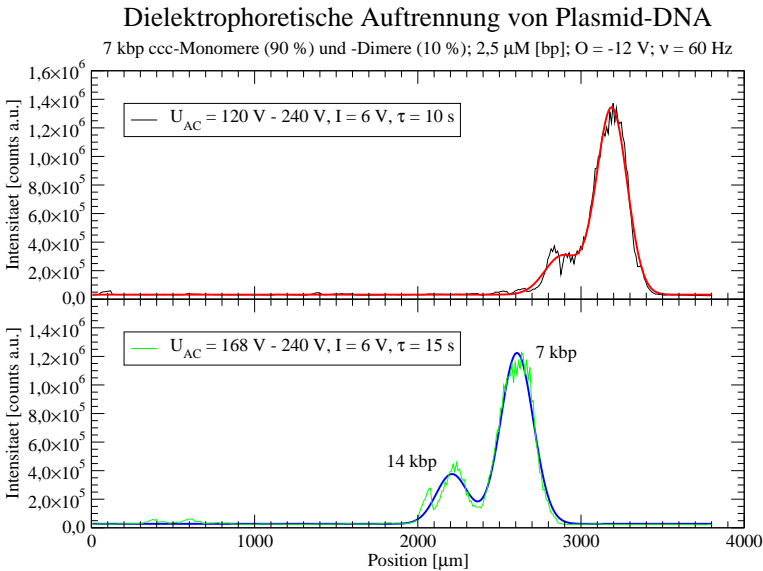


Abbildung 4.27: Auftrennung von 7 kbp und 14 kbp Plasmid-DNA

Die Abbildungen zeigen die nicht optimierte Auftrennung einer 7 kbp langen ccc-Monomer und ccc-Dimer Plasmid-DNA Probe. Die verbesserten Parameter der Spannungsrampe sorgen für eine kürzere Separationszeit und bessere Auftrennung.

Die Optimierung der Trennparameter führt wie in Abb. 4.28 eingesetzt zu einer Basislinien aufgelösten Trennung. Wesentlich für die Auftren-

nungseffizienz bzw. Auflösung ist nicht die Auftrennungszeit t , sondern die Gesamtwahl der Parameter. Wird das Inkrement U_{inc} genügend klein gewählt, so ließe sich die Auflösung prinzipiell durch Erhöhen von τ beliebig steigern. Das Inkrement U_{inc} muss dabei so gewählt werden, dass bei der sukzessiven Erhöhung der Spannung bzw. Feldstärke immer nur jeweils eine weitere DNA-Sorte gefangen wird und die restlichen DNA-Sorten weiter migrieren können.

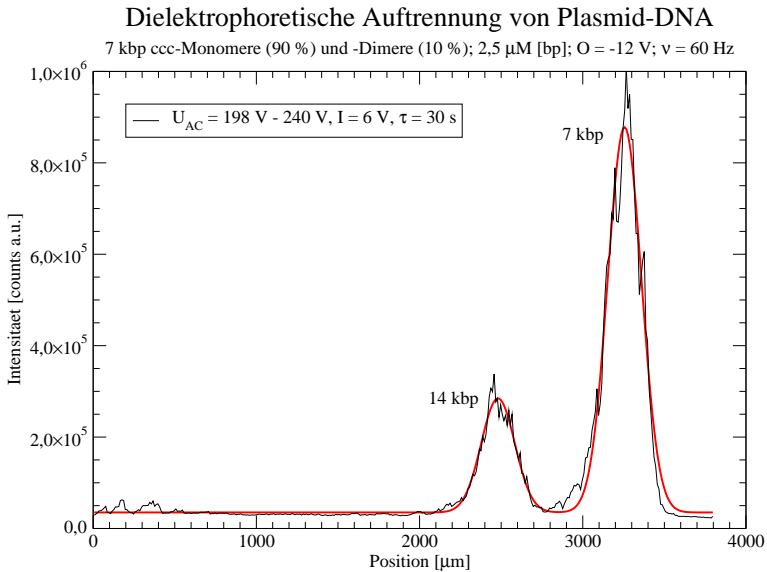


Abbildung 4.28: Basislinien aufgelöste Separation von 7 kbp und 14 kbp Plasmid-DNA

Mit optimierten Rampen-Parametern lassen sich die ccc-Monomere sehr gut von den ccc-Dimeren Basislinien aufgelöst separieren.

Mit den aus den Dielektropherogrammen gewonnenen Intensitäten lässt sich das Verhältnis der ccc-Monomere und -Dimere der 7 kbp langen Plasmid-DNA Probe bestimmen. Das Verhältnis der beiden Konforma-

tionen ist vom Hersteller mit 90% ccc-Monomer und 10% ccc-Dimer (9:1) angegeben. Die doppelte Länge des Dimers gegenüber dem Monomer führt zu einem Korrekturfaktor von 1/2 für die Fläche des Dimer-Peaks und es ergibt sich ein prozentualer Anteil von $(12,6 \pm 2,7)\%$. Das so korrigierte Verhältnis von 1,3 : 8,7 stimmt innerhalb des Fehlers mit den Herstellerangaben gut überein.

Mischung aus 7 kbp ccc-Monomeren und -Dimeren + 21 kbp (linear, oc, ccc)-Monomeren und -Dimeren

Die Hinzugabe von 21 kbp und 42 kbp langer Plasmid-DNA zu den linearen-, oc-, und ccc-Konformationen führt, wie in Abb. 4.29 gezeigt, zu einem weiteren Peak. Trotz der geringeren Spannungsamplitude zu Beginn der Messung wurden alle neu hinzugegebenen längeren Plasmide in einem einzigen Peak gefangen.

Die Ergebnisse der weiteren Verringerung der Anfangsspannungen sind in Abb. 4.30 gezeigt. Der große Rampenbereich und die verkürzte Zeit pro Inkrement führen zu einer nicht ganz Basislinien aufgelösten Trennung der 7 kbp und 14 kbp langen ccc-Plasmide. Zusätzlich sind jetzt mehrere „Peaks“ bzw. Muster in beiden Elektropherogrammen wiederzuerkennen. Die benutzte Konzentration der 21 kbp und 42 kbp langen Plasmid-DNA ist hier zu jedoch gering, um genauere Aussagen zu treffen.

Mischung aus 21 kbp (linear, oc-, ccc)-Monomeren und -Dimeren

Die Separation der 21 kbp und 42 kbp langen Plasmid-DNA mit ihren drei Konformationen ist in Abb. 4.31 gezeigt. Die verwendete Konzentration ist so eingestellt, dass die Peaks deutlich zu erkennen sind. Die beiden Messungen wurden mit leicht veränderten Rampenparametern durchgeführt, um die Positionen, an denen die Plasmide gefangen werden, zu verschieben. Dadurch kann sichergestellt werden, dass das Absinken der Fluoreszenz nicht durch o.g. Artefakte hervorgerufen wird. Die beiden Kurven der Abb. 4.31 sind im Vergleich zur Abb. 4.30 trotz gleicher Rampenparameter nach links verschoben. Die Erklärung dafür ist analog zu Kapitel 4.3.2.

Aus dem letzten Abschnitt ist bekannt, dass die längeren Dimere aufgrund ihres größeren Gyrationradius früher gefangen werden als die

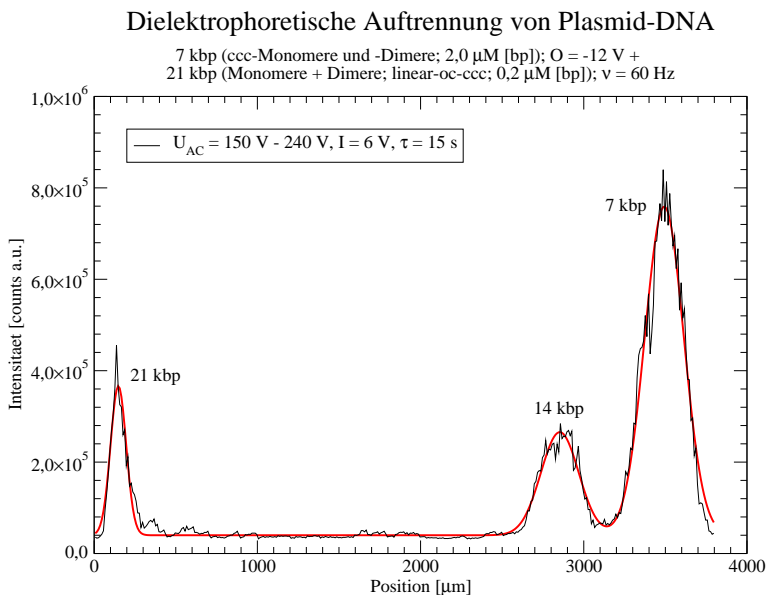


Abbildung 4.29: Separation einer Plasmid-DNA Mischung

Die Probe enthält 7 kbp und 14 kbp ccc-Plasmide und zusätzlich noch 21 kbp Plasmide in linearer, oc- und ccc-Form als Monomere und Dimere. Die mit 21 kbp längeren Moleküle werden sofort nach der Injektion gefangen. Die einzelnen Konformationen sind nicht voneinander getrennt.

Monomere. Die Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Plasmiden ist hier jedoch nicht zwingend, da der Gyrationradius bei der Plasmid-DNA nicht nur von der Länge des Moleküls abhängig ist, sondern auch von der Konformation. Nach der *Juxtaposition-Theorie* [121, 122] ist der Gyrationradius der oc-Konformation eines Moleküls größer als die der linearen und ccc-Form. Es ist daher möglich, dass der Gyrationradius des ccc-Dimers kleiner ist als der Gyrationradius des oc-Monomers (vgl. Abb. 4.25). Zudem ist die Polarisierbarkeit und letztendlich die auf

Dielektrophoretische Auftrennung von Plasmid-DNA

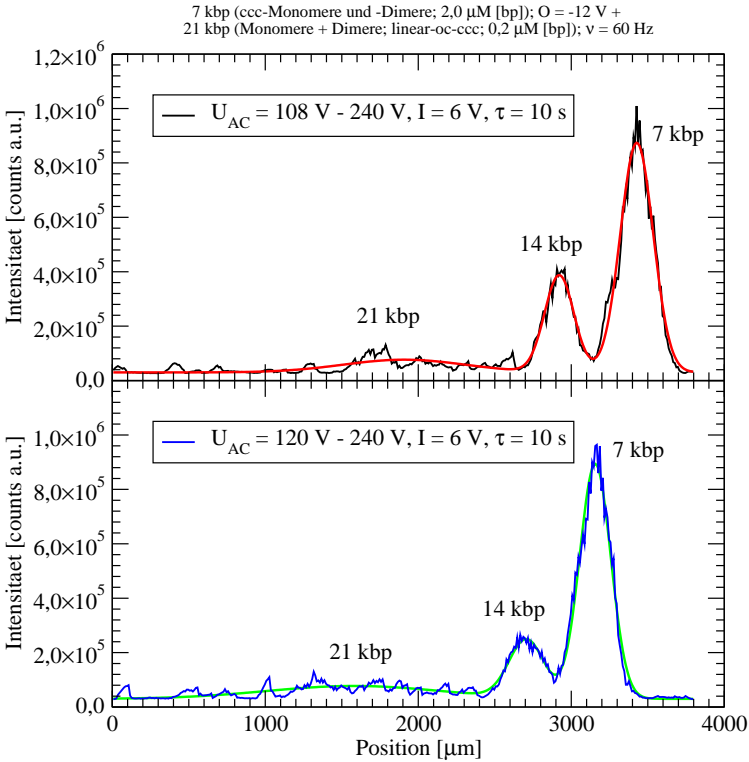


Abbildung 4.30: Separation einer Plasmid-DNA Mischung

Die Spannungsrampe beginnt bei einem niedrigeren Wert. Dadurch werden die 21 kbp langen DNA-Plasmide nicht sofort in den dielektrischen Fallen gefangen. Wird der Anfangswert der Rampe leicht erhöhet, so werden die Moleküle früher gefangen und die Peaks wandern im Dielektropherogramm nach links.

ein DNA-Molekül wirkende Kraft nicht nur von der Größe bzw. Länge

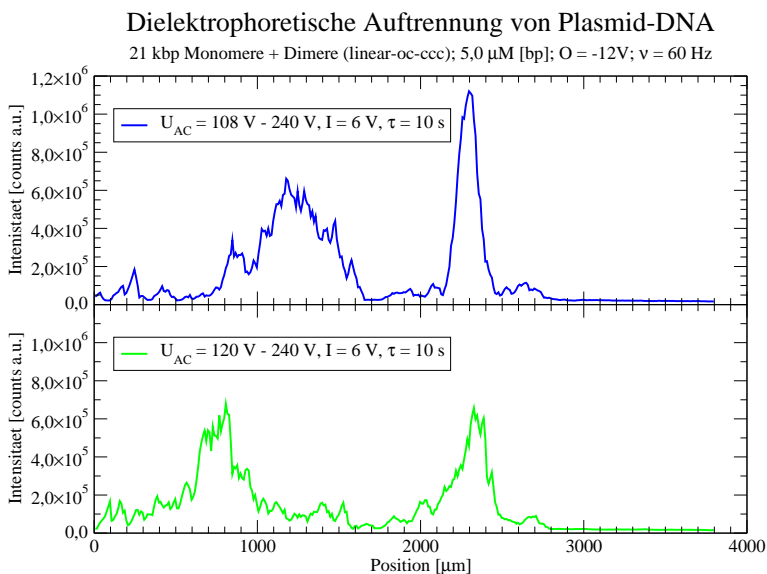


Abbildung 4.31: Separation von 21 *kbp* langer Plasmide

Die Abbildung zeigt die Separation der Plasmid-DNA-Mischung aus 21 *kbp* (linear, oc-, ccc)-Monomeren und -Dimeren. Eine genauere Zuordnung der einzelnen Peaks zu den Konformationen ist aufgrund der unbekanntem Probenzusammensetzung nicht möglich — näheres im Text.

der DNA abhängig, sondern auch von der *Subunit* bzw. Untereinheit (s. Kapitel 2.4.2). Eine genaue Zuordnung der Peaks zu den Längen und Konformationen ist daher nicht möglich.

Vergleich mit dem Stand der Forschung

In den vorangegangenen Abschnitten konnte die Dielektrophorese erstmals für die Separation von DNA-Molekülen erfolgreich gezeigt werden.

Zudem kann insgesamt gefolgert werden, dass die dielektrophoretischen Auftrennungen sowohl mit veränderten Parametern als auch die Stabilität von Mikrochip zu Mikrochip sehr gut reproduzierbar sind. Die Analysezeit der Messungen setzen sich aus der Separations- und Detektionszeit zusammen, wobei die Detektionszeit durch schnelleres Verfahren des xy-Tisches verkürzt werden kann. Betrachtet man nur die Separationszeit, so wurden alle Separationen innerhalb von nur 200 – 225 Sekunden durchgeführt.

Neben der oben erwähnten längenabhängigen Polarisierbarkeit und Kraft spielt ein weiterer Mechanismus (s. Abb. 4.32) für die dielektrophoretische Separation eine wesentliche Rolle. Die theoretischen Grundlagen zu diesem Fallenmechanismus gehen auf eine Arbeit von Ajdari und Prost zurück [5]. Das inhomogene elektrische Feld, welches durch die isolierenden Pfostenstrukturen erzeugt wird, führt zu dielektrophoretischen Fallen. In der Potenzial-Landschaft entspricht die Falle einer Potenzialmulde mit einer Tiefe von $\Delta\phi$. Das Gefälle des Potenzialverlaufs $-qE_{DC} = -qU_{DC}/d$ (d -Abstand zwischen den Elektroden) entspricht der zusätzlich anliegenden Gleichspannung U_{DC} . Die Erhöhung der Amplitude der Wechselspannung in einer Rampe führt dazu, dass die Potenzialmulden mit der Zeit immer tiefer werden. Ist die Potenzialmulde tief genug, so werden die DNA-Moleküle gefangen und können nur mit Hilfe der zusätzlichen thermischen Energie $k_B T$ aus der Potenzialmulde per Diffusion entweichen. Folglich werden kürzere DNA-Moleküle zusätzlich zur geringeren Polarisierbarkeit aufgrund ihrer höheren Diffusionskonstante erst bei höheren Fallenstärken gefangen.

Die Dielektrophorese als neue Methode zur Separation von Molekülen kann also sowohl Moleküle nach Diffusionskoeffizienten als auch nach Polarisierbarkeit trennen. Interessant ist noch die Trennung nach den verschiedenen Konformationen der Plasmid-DNA, die bisher aber nur aus der Abbildung 4.31 gedeutet werden kann.

Zum Schluss soll die erzielte Auflösung R dieser neuen Separationsmethode mit anderen Methoden verglichen werden. Die Auflösung R lässt sich mit

$$R = \frac{x_2 - x_1}{2(\sigma_1 + \sigma_2)} \quad (4.2)$$

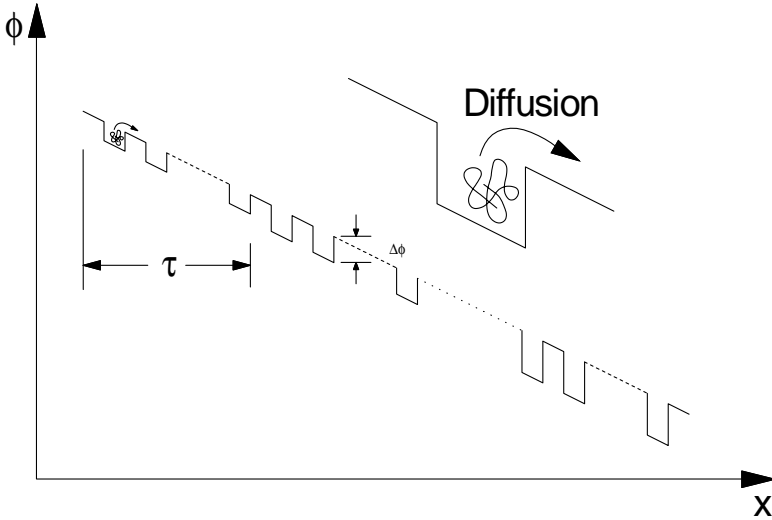


Abbildung 4.32: Potenzialverlauf in dem verwendeten Mikrofluidik-System mit dielektrophoretischen Fallen

Gezeigt ist der Potenzialverlauf in dem verwendeten Mikrofluidik-System. Die dielektrophoretischen Fallen entsprechen den Potenzialfallen mit einer Tiefe von $\Delta\phi$. Die Spannungsrampe verursacht eine stärker werdende Kraft, was durch tiefere Potenzialmulden angedeutet ist. Nach der Zeit τ wird die Spannung wie zuvor beschrieben erhöht. Das Molekül benötigt die Energie $E > \Delta W \propto \int \nabla\phi d\vec{r}$, um nicht in der Falle gefangen zu werden. Ist $E \leq \Delta W$, so kann das Molekül mit zusätzlicher Hilfe der Diffusion bzw. der thermischen Energie $k_B T$ der Falle entgehen.

berechnen. Dabei sind x_i und σ_i die Positionen der Peaks bzw. die Standardabweichungen der Peakbreiten. Für die Separation der λ -/ $T2$ -DNA-Mischung (48,5 kbp bzw. 164 kbp) ergibt sich eine Auflösung von $R = 2,95$ bei einer Separationszeit von ca. 200 Sekunden. Dieses ist im Vergleich zu dem Ergebnis von Minc et al., die von einer Auflösung von $R = 2,16$ für die Separation einer λ - und $T4$ -DNA-Mischung in einem

Array aus magnetischen Kugeln in 150 Sekunden berichten, eine deutliche Verbesserung der Auflösung [123]. Han und Craighead konnten eine DNA-Mischung aus 37,9 *kbp* und 167 *kbp* langen DNA-Molekülen in entropischen Fallen innerhalb von 15 Minuten separieren [124]. Die erreichte Auflösung ist mit $R = 1,95$ angegeben.

Die Auflösung für die 7 *kbp* und 14 *kbp* langen *ccc*-Plasmid-DNA beträgt $R = 1,93$ und ist damit kleiner als bei der Separation der $\lambda/T2$ -Mischung. Trotz der geringeren Auflösung ist die Basislinien aufgelöste Trennung in nur 210 Sekunden bemerkenswert. Plasmid-DNA-Lösungen werden üblicherweise mit der Kapillargelelektrophorese in Agarose aufgetrennt [7, 9]. Die dort benötigte Separationszeit ist mit etwa 20 – 40 Minuten sehr lang.

Der signifikant größte Vorteil der Dielektrophorese gegenüber anderen Methoden ist die Fähigkeit, extrem dünne und kaum nachweisbare Lösungen gezielt aufkonzentrieren zu können. Die Auflösung lässt sich wie oben bereits beschrieben (s. Kapitel 4.3.2) für die Dielektrophorese durch Erhöhen von τ quasi beliebig steigern und ist daher nur bedingt aussagekräftig. Die Verringerung des Spaltenabstands zwischen den Pfostenstrukturen und die damit verbundene Erhöhung der Anzahl an dielektrophoretischen Fallen würde zu einer weiteren Verringerung von σ und damit Erhöhung der Auflösung führen.

5 Zusammenfassung & Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Separationsmethoden für lange Nukleinsäureketten sowie für ein Modellsystem in Form von Mikro-Kugeln in Mikrofluidik-Kanälen entwickelt. Als Material für die Mikrofluidik-Kanäle ist Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) verwendet worden, da sich neben der Biokompatibilität die Analysesysteme einfach und kostengünstig herstellen lassen. Die geringe Permeabilität von PDMS für Wasser führte in den Mikro-Kanälen zu unerwünschten Strömungen. Durch Sättigung des PDMS mit Wasser aus einem zweiten Kanal, der sich oberhalb des eigentlichen Trennkanals befindet, konnte der Effekt erfolgreich vermindert werden.

Für die Untersuchung neuer Separationsmechanismen ist ein detailliertes und fundiertes Verständnis der Migrationsmechanismen von großer Bedeutung. Die hier entwickelten Mechanismen basieren auf der Mikrostrukturierung, die im Gegensatz zur Erzeugung künstlicher Gelstrukturen oder Sieben mittels Nanostrukturierung einfacher zu handhaben ist. Es konnte gezeigt werden, dass bereits ein einfaches Strukturierungsdesign, bestehend aus alternierend schmalen und breiten Bereichen, ein unerwartetes bistabiles Migrationsverhalten für DNA hervorbringt. In einem solchen strukturierten Mikrofluidik-Kanal konnten λ - und T2-DNA-Moleküle durch Anpassung der Kanalgeometrie separiert werden.

Die vielseitigen und variablen Möglichkeiten des Strukturierungsdesigns gestatten in Verbindung mit elektrischen Wechselfeldern die Entwicklung neuer und paradoxer Migrationskonzepte. Dazu gehören die Dielektrophorese und die *Absolut Negative Mobilität*. Bei der Dielektrophorese wird der DNA durch ein alternierendes elektrisches Feld ein Dipolmoment induziert. Dieser Dipol wechselwirkt mit dem räumlich inhomogenen elek-

trischen Feld, das mittels einer geeigneten geometrischen Strukturierung erzeugt wurde. Damit ergibt sich die Möglichkeit, DNA-Moleküle ohne Hilfe einer mechanischen Vorrichtung energetisch zu fangen. Seit längerem existieren sowohl theoretische Konzepte zur dielektrophoretischen DNA-Separation wie auch erste experimentelle Anhaltspunkte zur längenabhängigen DNA-Polarisierbarkeit. Von der Realisierung einer DNA-Separation mittels Dielektrophorese ist bis zu diesem Zeitpunkt nicht berichtet worden.

In dieser Arbeit ist es erstmalig gelungen, DNA-Moleküle dielektrophoretisch zu trennen. Dazu wurde eine Mikrostrukturierung entwickelt, in der innerhalb von 4 Minuten eine Separation von λ und $T2$ -DNA (48,5 *kbp* bzw. 164 *kbp*) gelang. Des Weiteren konnten unterschiedlich lange Plasmid-DNA-Moleküle einer Lösung separiert werden, was mit Standard-Methoden nur schwer zu erreichen ist. Daher ist diese erfolgreiche Separation aufgrund der großen Bedeutung von Plasmid-DNA-Molekülen für die zukünftige Verwendung als Biopharmazeutika insbesondere hervorzuheben.

Als Separationsmechanismus wurden die größenabhängige Polarisierbarkeit der DNA sowie ein thermisches bzw. diffusives Entkommen der DNA-Moleküle aus den dielektrophoretischen Fallen diskutiert. Erste Ergebnisse zeigen, dass gleich lange Plasmide unterschiedlicher Konformationen separierbar sind. Die vollständige Aufklärung des Separationsmechanismus und der Polarisierbarkeit von DNA bleibt den zukünftigen Untersuchungen vorbehalten. Insgesamt hat sich die Dielektrophorese für die Separation von DNA-Molekülen als eine einfache und zuverlässige Methode herausgestellt.

Die paradoxe Bewegung eines Teilchens entgegen einer nicht zu starken äußeren Kraft wird als *Absolut Negative Mobilität* bezeichnet. Dieser Effekt konnte erstmalig für makroskopische Objekte (Mikro-Kugeln) demonstriert werden. Die ANM zeigt eine sehr starke Abhängigkeit von der Diffusionskonstante, was den zukünftigen Einsatz für die Separation von unterschiedlich großen Molekülen mit unterschiedlicher Masse ermöglicht.

Zusammenfassend können mit den aus dieser Arbeit hervorgegangenen Resultaten die Lab-On-A-Chip Technologie um neue vielversprechende

Ansätze erweitert werden. Zum einen können durch gezielte Ausnutzung der Pervaporation neuartige Pumpen konstruiert werden, die ohne externe Energiequelle auskommen. Zum anderen bietet die Dielektrophorese das große Potenzial, die Standardmethoden für die Auftrennung von Nucleinsäuren nicht nur zu ergänzen, sondern auch teilweise zu ersetzen. Neben der schnellen Separierbarkeit ist ihre weitere Stärke die Fähigkeit geringste Probenmengen für einen einfacheren Nachweis aufkonzentrieren zu können. Mit der Möglichkeit der Fokussierung lassen sich die erzielbaren Auflösungen für die Separationen beliebig steigern. Dieses ist mit einer geeigneten Strukturierung möglich, in der die separierten Analyten anschließend einzeln fokussiert werden. Die Erweiterung des ANM Konzepts für die Trennung von Biomolekülen, insbesondere der DNA, lässt sich mit Hilfe von dielektrophoretischen Fallen verwirklichen. Ein entsprechendes Design für die Mikrostrukturierung wird derzeit in der Arbeitsgruppe diskutiert und erarbeitet.

Publikationsliste

Veröffentlichungen

- [D1] T. T. DUONG, G. KIM, R. ROS, M. STREEK, F. SCHMID, J. BRUGGER, D. ANSELMETTI UND A. ROS: *Size Dependent Free Solution DNA Electrophoresis in Structured Micro Fluidic Systems*, Microelectronic Engineering, 67-68C: 905–912, 2003
- [D2] T. T. DUONG, M. STREEK, R. ROS, F. SCHMID, A. ROS UND D. ANSELMETTI: *Gel-Free Electrophoresis of λ - and T2-DNA in Structured PDMS Microfluidic Devices*, Proceedings of the μ TAS 2003 (ISBN: 0-9743611-0-0) Vol. 1, 749–752, Boston 2003
- [D3] M. STREEK, F. SCHMID, T. T. DUONG UND A. ROS: Mechanisms of DNA separation in entropic trap arrays: *A Brownian dynamics simulation*, Journal of Biotechnology, 112: 79–89, 2004
- [D4] A. ROS, W. HELLMICH, T. T. DUONG UND D. ANSELMETTI: *Towards Single Molecule Analysis in PDMS Microdevices: From the Detection of UltraLow Dye Concentrations to Single DNA Molecule Studies*, Journal of Biotechnology, 112: 65–72, 2004
- [D5] M. STREEK, F. SCHMID, T. T. DUONG, D. ANSELMETTI AND A. ROS: *Two-state Migration of DNA in structured Microchannel*, Phys. Rev. E, 71: 11905, 2005
- [D6] W. HELLMICH, J. REGTMEIER, T. T. DUONG, R. ROS, D. ANSELMETTI UND A. ROS: *Poly(oxyethylene) Based Surface Coatings for Poly(dimethylsiloxane) Microchannels*, Langmuir, 21: 7551–7557, 2005

[D7] A. ROS, R. EICHHORN, J. REGTMEIER, T. T. DUONG, P. REIMANN UND D. ANSELMETTI: *Brownian Motion: Absolute Negative Particle Mobility*, Nature, 436: 928, 2005

[D8] J. REGTMEIER, T. T. DUONG, R. EICHHORN, D. ANSELMETTI, P. REIMANN UND A. ROS: *Novel Migration Phenomena in Structured Microfluidic Devices*, Proceedings of the μ TAS 2005, Boston, (ISBN: 0-9743611-1-9) Vol. 1: 340–342, Boston 2005

[D9] W. HELLMICH, K. LEFFHALM, A. SISCHKA, T. T. DUONG, N. JENSEN, K. NIEHAUS, K. TÖNSING, A. ROS UND D. ANSELMETTI: *Towards Single Cell Fingerprinting in Microfluidic Device Format: Single Cell Manipulation, Protein Separation and Detection*, Proceedings of the μ TAS 2005 (ISBN: 0-9743611-1-9) Vol. 1: 406–408, Boston 2005

[D10] J. REGTMEIER, R. EICHHORN, T. T. DUONG, P. REIMANN, D. ANSELMETTI UND A. ROS: *Particle Sorting by Absolute Negative Mobility in a Microfluidic Device*, eingereicht, 2006

[D11] A. ROS, W. HELLMICH, J. REGTMEIER, T. T. DUONG UND D. ANSELMETTI: *Bioanalysis in Structured Microfluidic Systems*, eingereicht, 2006

[D12] T. T. DUONG, J. REGTMEIER, R. EICHHORN, P. REIMANN, A. ROS UND D. ANSELMETTI: *Dielectrophoretic Separation of DNA*, in Vorbereitung, 2006

Konferenzbeiträge

T. T. DUONG, A. ROS, R. ROS UND D. ANSELMETTI: *DNA Electrophoresis in Topographically Structured μ -Fluidic Devices* (Vortrag), NanoTech, Montreux (CH) 2002
T. T. DUONG, M. STREEK, R. ROS, F. SCHMID, A. ROS UND D. ANSELMETTI: *Gel-Free Electrophoresis of λ - and T2-DNA in Structured PDMS Microfluidic Devices* (Poster), Proceedings of the μ TAS 2003 (ISBN: O-9743611-0-0) Vol. 1, 749–752, Boston 2003

T. T. DUONG, M. STREEK, F. SCHMID, D. ANSELMETTI UND A. ROS: *Gel-Free Electrophoresis of λ - and T2-DNA in Structured PDMS Microfluidic Devices* (Poster), DPG - Frühjahrstagung 2004, Regensburg

T. T. DUONG, A. ROS UND D. ANSELMETTI: *Anomalous Flow in Microfluidic Poly(dimethylsiloxane) Channels* (Poster), DPG - Frühjahrstagung 2005, Berlin

Literaturverzeichnis

- [1] INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM: *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature, 431:931–945, 2005.
- [2] SCHLEEF, M.: *DNA-Wirkstoffe - Herstellung und Qualitätssicherung*. Chemie Ingenieur Technik, 73(10):1353–1357, 2001.
- [3] HEATH, J. R., M. E. PHELPS und L. HOOD: *NanoSystems Biology*. Molecular Imaging and Biology, 5(5):312–325, 2003.
- [4] MAGNUSDOTTIR, S., H. ISAMBERT, C. HELLER und J.-L. VIOVY: *Electrohydrodynamically Induced Aggregation During Constant and Pulsed Field Capillary Electrophoresis of DNA*. Biopolymers, 49:385–401, 1999.
- [5] AJDARI, A. und J. PROST: *Free-flow electrophoresis with trapping by a transverse inhomogeneous field*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:4468–4471, 1991.
- [6] VIOVY, J.: *Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms*. Reviews of Modern Physics, 72(3):813–72, 2000.
- [7] SCHLEEF, M. und T. SCHMIDT: *Animal-free production of ccc-supercooled plasmids for research and clinical application*. The Journal of Gene Medicine, 6:45–53, 2004.
- [8] SCHMIDT, T., K. FRIEHS, M. SCHLEEF, C. VOSS und E. FLASCHHEL: *Assessing the Homogeneity of Plasmid-DNA: An Important Step towards Gene Therapy*. PACE Setter, 4(2):1–3, 2000.

- [9] SCHMIDT, T., K. FRIEHS, M. SCHLEEF, C. VOSS und E. FLASCHTEL: *Quantitative Analysis of Plasmid Forms by Agarose and Capillary Gel Electrophoresis*. Analytical Biochemistry, 274:235–240, 1999.
- [10] DUKE, T.: *Separation techniques*. Current Opinion in Chemical Biology, 2(5):592–596, 1998.
- [11] REYES, D. R., D. IOSSIFIDIS, P. A. AUROUX und A. MANZ: *Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology*. Analytical Chemistry, 74(12):2623–36, 2002.
- [12] AUROUX, P. A., D. IOSSIFIDIS, D. R. REYES und A. MANZ: *Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications*. Analytical Chemistry, 74(12):2637–52, 2002.
- [13] DOVICH, N. J. und J. ZHANG: *Wie die Kapillarelektrophorese das menschliche Genom sequenzierte*. Angewandte Chemie, 112(24):4635–4640, 2000.
- [14] SHI, X., W. R. HAMMOND und D. M. MORRIS: *Dynamics of DNA during pulsed field electrophoresis in entangled and dilute polymer solutions*. Analytical Chemistry, 67(18):3219–22, 1995.
- [15] BAKAJIN, O., A. T. DUKE, J. TEGENFELDT, F. C. CHOU, S. S. CHAN, H. R. AUSTIN und C. E. COX: *Separation of 100-kilobase DNA molecules in 10 seconds*. Analytical Chemistry, 73(24):6053–6056, 2001.
- [16] CHOU, H. P., C. SPENCE, A. SCHERER und S. QUAKE: *A micro-fabricated device for sizing and sorting DNA molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(1):11–3, 1999.
- [17] O. TEGENFELDT, J., C. PRINZ, H. CAO, R. L. HUANG, R. H. AUSTIN, S. Y. CHOU, E. C. COX und J. C. STURM: *Micro- and nanofluidics for DNA analysis*. Anal Bioanal Chem, 378(7):1678–1692, 2004.

- [18] HU, S. und N. J. DOVICH: *Capillary electrophoresis for the analysis of biopolymers*. Analytical Chemistry, 74(12):2833–50, 2002.
- [19] MANZ, A., N. GRABER und H. M. WIDMER: *Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing*. Sens. Actuators, B1:244–48, 1990.
- [20] MANZ, A., D. J. HARRISON, E. M. J. VERPOORTE, J. C. FETTINGER, A. PAULUS, H. LUDI und H. M. WIDMER: *Planar chips technology for miniaturisation and integration of separation techniques into monitoring systems. Capillary electrophoresis on a chip*. J.Chromatogr. B, 539:1–66, 1992.
- [21] LIU, S., Y. SHI, W. W. JA und A. R. MATHIES: *Optimization of high-speed DNA sequencing on microfabricated capillary electrophoresis channels*. Analytical Chemistry, 71(3):566–73, 1999.
- [22] WOOLLEY, T. A. und A. R. MATHIES: *Ultra-high-speed DNA sequencing using capillary electrophoresis chips*. Analytical Chemistry, 67(20):3676–80, 1995.
- [23] KAJI, N., Y. TEZUKA, Y. TAKAMURA, M. UEDA, T. NISHIMOTO, H. NAKANISHI, Y. HORIIKE und Y. BABA: *Separation of long DNA molecules by quartz nanopillar chips under a direct current electric field*. Analytical Chemistry, 76(1):15–22, 2004.
- [24] TURNER, S. W., A. M. PEREZ, A. LOPEZ und H. G. CRAIGHEAD: *Monolithic nanofluid sieving structures for DNA manipulation*. J. Vac. Sci. Technol. B, 16(6):3835–40, 1998.
- [25] VOLKMUTH, D. W. und H. R. AUSTIN: *DNA electrophoresis in microlithographic arrays*. Nature, 358(6387):600–2, 1992.
- [26] HUANG, L. R., J. O. TEGENFELDT, J. J. KRAEFT, J. C. STURM, R. H. AUSTIN und E. C. COX: *A DNA prism for high-speed continuous fractionation of large DNA molecules*. Nature Biotechnology, 20(10):1048–1051, 2002.

- [27] HAN, J. und H. G. CRAIGHEAD: *Separation of long DNA molecules in a microfabricated entropic trap array*. Science, 288(5468):1026–9, 2000.
- [28] HAN, J. und G. H. CRAIGHEAD: *Entropic trapping and sieving of long DNA molecules in a nanofluidic channel*. Journal of Vacuum Science and Technology - A Vacuums Surfaces and Films, 17(4):2142–47, 1999.
- [29] HAN, J., W. S. TURNER und G. H. CRAIGHEAD: *Entropic Trapping and Escape of Long DNA Molecules at Submicron Size Constriction*. Phys Rev Lett, 83(8):1688–91, 1999.
- [30] NEDELCO, S. und J. H. P. WATSON: *Size separation of DNA molecules by pulsed electric field dielectrophoresis*. Journal of Physics D: Applied Physics, 37:2197–2204, 2004.
- [31] LAO, A. I. und I. M. HSING: *Flow-based and sieving matrix-free DNA differentiation by a miniaturized field flow fractionation device*. Lab on a Chip, 5(6):687–690, 2005.
- [32] ASBURY, C. L., A. H. DIERCKS und G. V.D. ENGH: *Trapping of DNA by dielectrophoresis*. Electrophoresis, 32:2658–2666, 2002.
- [33] CHOU, C.-F., J. O. TEGENFELDT, O. BAKAJIN, S. S. CHAN, E. C. COX, N. DARNTON, T. DUKE und R. H. AUSTIN: *Electroless Dielectrophoresis of Single- and Double-Stranded*. Biophys J, 83:2170–2179, 2002.
- [34] ZHENG, L., J. P. BRODYB und P. J. BURKE: *Electronic manipulation of DNA, proteins, and nanoparticles for potential circuit assembly*. Biosens. Bioelectron., 20(3):606–619, 2004.
- [35] SAIF, B., R. K. MOHR, C. J. MONTROSE und T. A. LITOVITZ: *On the mechanism of dielectric relaxation in aqueous DNA solutions*. Biopolymers, 31(10):1171–1180, 1991.

- [36] PORSCHKE, D.: *The mechanism of ion polarisation along DNA double helices*. Biophysical Chemistry, 22(3):237–247, 1985.
- [37] BAKEWELL, D. J., I. ERMOLINA, H. MORGAN; J. MILNER und Y. FELDMAN: *Dielectric relaxation measurements of 12 kbp plasmid DNA*. Biochim Biophys Acta, 1493:151–158, 2000.
- [38] CUMMINGS, E. B. und A. K. SINGH: *Dielectrophoretic Trapping Without Embedded Electrodes*. <http://www.ca.sandia.gov/chembio/microfluidics/pdfs/article4177-19.pdf>, 21-10-2005.
- [39] LODISH, H., D. BALTIMORE, A. BERK, S.L. ZIPURSKY, P. MATSUDAIRA und J. DARNELL: *Molekulare Zellbiologie*. Walter de Gruyter, New York, 1996.
- [40] WINTER, R. und F. NOLL: *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Teubner, 1998.
- [41] JOSE, DAVIS und DIETMAR PORSCHKE*: *Dynamics of the BA transition of DNA double helices*. Nucleic Acids Res, 32(7):2251–58, 2004.
- [42] DOI, M. und S. F. EDWARDS: *The Theory of Polymer Dynamics*. Oxford University Press, New York, 1986.
- [43] ARIEL, G. und D. ANDELMAN: *Persistence length of a strongly charged rodlike polyelectrolyte in the presence of salt*. Physical Review E, 67(1):011805:1–11, 2003.
- [44] ALLAHYAROV, E., H. LOWEN und G. GOMPPER: *Adsorption of monovalent and multivalent cations and anions on DNA molecules*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 68(6 Pt):061903, 2004.
- [45] N.N.: *Chromosom*. http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Chromosom-_und_DNA.png, 03.05.2006.

- [46] LARSSON, A., C. CARLSSON, M. JONSSON und B. ALBINSSON: *Characterization of the Binding of the Fluorescent Dyes YO and YOYO to DNA by Polarized Light Spectroscopy*. J Am Chem Soc, 116:8459–8465, 1994.
- [47] NETZEL, T. L., K. NAFISI, M. ZHAO, J. R. LENHARD und I. JOHNSON: *Base-Content Dependence of Emission Enhancements, Quantum Yields, and Lifetimes for Cyanine Dyes Bound to Double-Strand DNA: Photophysical Properties of Monomeric and Bichromophoric DNA Stains*. Journal of Physical Chemistry, 99:17936–17947, 1995.
- [48] GURRIERI, S., S. K. WELLS, D. I. JOHNSON und C. BUSTAMANTE: *Direct visualization of individual DNA molecules by fluorescence microscopy: characterization of the factors affecting signal/background and optimization of imaging conditions using YO-YO*. Analytical Biochemistry, 249(1):44–53, 1997.
- [49] LAKOWICZ, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 1999.
- [50] SIMON, D. L., H. K. ABRAMO, K. J. SELL und B. L. MCGOWN: *Oxazole yellow dye interactions with short DNA oligomers of homogeneous base composition and their hybrids*. Biospectroscopy, 4(1):17–25, 1998.
- [51] LEPECQ, J.-B. und C. PAOLETTI: *A Fluorescent Complex Between Ethidium Bromide and Nucleic Acids - Physical - Chemical - Characterization*. J. Mol. Biol., 21(1):87–106, 1967.
- [52] AKERMAN, B. und E. TUITE: *Single- and double-strand photocleavage of DNA by YO, YOYO and TOTO*. Nucleic Acids Res, 24(6):1080–90, 1996.
- [53] CARLSSON, C., A. LARSSON, M. JONSSON, B. ALBINSSON und B. NORDEN: *Optical and Photophysical Properties of the Oxazole*

- Yellow DNA Probes YO and YOYO*. Journal of Physical Chemistry, 98(40):10313–21, 1994.
- [54] CARLSSON, C., A. LARSSON und M. JONSSON: *Influence of optical probing with YOYO on the electrophoretic behavior of the DNA molecule*. Electrophoresis, 17(4):642–51, 1996.
- [55] QUAKE, R. S., H. BABCOCK und S. CHU: *The dynamics of partially extended single molecules of DNA*. Nature, 388(6638):151–154, 1997.
- [56] KANG, S. H., S. LEE und E. S. YEUNG: *Direct Observation of Single Native DNA Molecules in a Microchannel by Differential Interference Contrast Microscopy*. Analytical Chemistry, 76(15):4459–64, 2004.
- [57] DORFMÜLLER, T., W. T. HERING und K. STIERSTADT: *Bergmann Schaefer: Lehrbuch der Experimentalphysik, Band I*. Walter de Gruyter, 11. Auflage, 1998.
- [58] SINTON, D., L. REN und D. LI: *Visualization and numerical modeling of microfluidic on-chip injection processes*. J Colloid Interface Sci, 260(2):431–439, 2003.
- [59] CRABTREE, H. J., E. C. CHEONG, D. TILROE und C. J. BACKHOUSE: *Microchip injection and separation anomalies due to pressure effects*. Analytical Chemistry, 73(17):4079–86, 2001.
- [60] BRAUN, D., N. L. GODDARD und A. LIBCHABER: *Exponential DNA Replication by Laminar Convection*. Physical Review Letters, 91(15):158103–1–4, 2003.
- [61] CASTELLANOS, A., A. RAMOS, A. GONZALEZ, N. G. GREEN und H. MORGAN: *Electrohydrodynamics and dielectrophoresis in microsystems: scaling laws*. Journal of Physics D: Applied Physics, 36:2584–2597, 2003.

- [62] VERNEUIL, E., A. BUGUIN und P. SILBERZAN: *Permeation-induced flows: Consequences for silicone-based microfluidics*. Euphys. Lett., 68(3):412–418, 2004.
- [63] RANDALL, G. C. und P. S. DOYLE: *Permeation-driven flow in poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102(31):10813–10818, 2005.
- [64] MOHANTY, U. und N. C. STELLWAGEN: *Free Solution Mobility of Oligomeric DNA*. Biopolymers, 49:209–214, 1999.
- [65] GROSSMANN, P. D und J. C. COLBURN: *Capillary Electrophoresis - Theory & Practice*. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1992.
- [66] TANAKA, M.: *Electrophoresis of a rod macroion under polyelectrolyte salt: is mobility reversed for DNA?* Journal of Physics: Condensed Matter, 16:2127–2134, 2004.
- [67] DESERNO, M., F. JIMENEZ-ANGELES, C. HOLM und M. LOZADACASSOU: *Overcharging of DNA in the presence of salt: Theory and Simulation*. J. Phys. Chem. B, 105(44):10983–10991, 2001.
- [68] GHOSAL, S.: *Effect of Analyte Adsorption on the Electroosmotic Flow in Microfluidic Channels*. Analytical Chemistry, 74:771–775, 2002.
- [69] DODGE, A., K. FLURI, E. VERPOORTE und F. N. DE ROOIJ: *Electrokinetically driven microfluidic chips with surface-modified chambers for heterogeneous immunoassays*. Analytical Chemistry, 73(14):3400–9, 2001.
- [70] LIN, C.-H., L.-M. FU und Y.-S. CHIEN: *Microfluidic T-Form Mixer Utilizing Switching Electroosmotic Flow* Lin, C.-H.; Fu, L.-M.; Chien, Y.-S.; Analytical Chemistry, 76(18):5265–72, 2004.

- [71] MANZ, B., J. P. STILBS, B. JÖNSSON, O. SÖDEMAN und P. T. CALLAGHAN: *NMR Imaging of the Time Evolution of Electroosmotic Flow in a Capillary*. Journal of Physical Chemistry, 99(23):11297–11301, 1995.
- [72] DUCREE, J.: *myFluidix*. <http://www.myfluidix.com>, 02.10.2005.
- [73] OLIVERA, M. B., P. BAINE und N. DAVIDSON: *Electrophoresis of the Nucleic Acids*. Biopolymers, 2:245–257, 1964.
- [74] STELLWAGEN, N. C., C. GELFI und P. G. RIGHETTI: *The Free Solution Mobility of DNA*. Biopolymers, 42:687–703, 1997.
- [75] STELLWAGEN, E. und N. C. STELLWAGEN: *Determining the electrophoretic mobility and translational diffusion coefficients of DNA molecules in free solution*. Electrophoresis, 23(16):2794–2803, 2002.
- [76] RATANACHOO, K., P. R. C. GASCOYNE und M. RUCHIRAWAT: *Detection of cellular responses to toxicants by dielectrophoresis*. Biochimica et Biophysica Acta, 1564:449–458, 2002.
- [77] C.GASCOYNE, P. R. und J. VYKOUKAL: *Particle separation by dielectrophoresis*. Electrophoresis, 23:1973–1983, 2002.
- [78] CHOU, C.-F. und F. ZENHAUSERN: *Electrodeless Dielectrophoresis for Micro Total Analysis Systems*. IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine, 22(6):62–67, 2003.
- [79] JONES, T. B.: *Basic Theory of Dielectrophoresis and Electrorotation*. IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine, 22(6):33–42, 2003.
- [80] JACKSON, J. D.: *Klassische Elektrodynamik*. Walter de Gruyter, Berlin - New York, 3. Auflage, 2002.
- [81] MORGAN, H., N. G. GREEN, M. P. HUGHES, W. MONAGHAN und T. C. TAN: *Large-area travelling-wave dielectrophoresis particle separator*. J. Micromech. Microeng., 7:65–70, 1997.

- [82] RAMOS, A., H. MORGAN, N. G. GREEN und A. CASTELLANOS: *Ac electrokinetics: a review of forces in microelectrode structure*. Journal of Physics D: Applied Physics, 31:2338–2353, 1998.
- [83] KANG, K. H. und D. LI: *Dielectric Force and Relative Motion between Two Spherical Particles in Electrophoresis*. Langmuir, 22:1602–1608, 2006.
- [84] PORSCHKE, D.: *Macrodipoles - Unusual electric properties of biological macromolecules*. Biophysical Chemistry, 66:241–257, 1997.
- [85] MORGAN, H., M. P. HUGHES und N. G. GREEN: *Separation of Submicron Bioparticles by Dielectrophoresis*. Biophys J, 77:516–525, 1999.
- [86] MORGAN, H., M. P. HUGHES und N. G. GREEN: *Separation of Submicron Bioparticles by Dielectrophoresis*. Biophysical Journal, 77:516–525, 1999.
- [87] KNOCKS, A.: *Dielektrische Spektroskopie an Lösungen kleiner, biochemisch relevanter Modellsysteme*. Dissertation, Fakultät für Chemie der Ruhr-Universität Bochum, 2001.
- [88] MORGAN, H., M. P. HUGHES und N. G. GREEN: *Separation of Submicron Bioparticles by Dielectrophoresis*. Biophysical Journal, 77:516–525, 1999.
- [89] TOUW, F. v.D. und M. MANDEL: *Dielectric increment and dielectric dispersion of solutions containing simple charged linear macromolecules. I. Theory*. Biophysical Chemistry, 2:218–241, 1974.
- [90] MOHANTY, U. und Y. ZHAO: *Polarization of Counterions in Polyelectrolytes*. Biopolymers, 38:377–388, 1996.
- [91] GIMSA, J.: *Particle characterization by AC-electrokinetic phenomena: 1. A short introduction to dielectrophoresis (DP) and electrorotation (ER)*. Colloids and Surfaces A, 149:451–459, 1999.

- [92] BORDI, F., C. CAMETTI und R. H. COLBY: *Dielectric spectroscopy and conductivity of polyelectrolyte solutions*. Journal of Physics: Condensed Matter, 16:R1423–R1463, 2004.
- [93] WASHIZU, M., S. SUZUKI, O. KUROSAWA, T. NISHIZAKA und T. SHINOHARA: *Molecular Dielectrophoresis of Biopolymers*. IE-EE Transactions on Industry Applications, 30(4):835–843, 1994.
- [94] LAPIZCO-ENCINAS, BLANCA H., BLAKE A. SIMMONS, ERIC B. CUMMINGS, und YOLANDA FINTSCHENKO: *Dielectrophoretic Concentration and Separation of Live and Dead Bacteria in an Array of Insulators*. Analytical Chemistry, 76(6):1571–9, 2004.
- [95] KRUPKE, R., F. HENNRICH, H. V. LHNEYSSEN und M. M. KAPPES: *Separation of Metallic from Semiconducting Single-Walled Carbon Nanotubes*. Science, 301(5631):344–347, 2003.
- [96] CUMMINGS, E. B. und A. K. SINGH: *Dielectrophoresis in Microchips Containing Arrays of Insulating Posts: Theoretical and Experimental Results*. Analytical Chemistry, 75:4724–4731, 2003.
- [97] NAMASIVAYAM, V., R. G. LARSON, D. T. BURKE und M. A. BURNS: *Electrostretching DNA molecules using polymer-enhanced media within microfabricated devices*. Analytical Chemistry, 74(14):3378–85, 2002.
- [98] ROSENTHAL, A., B. M. TAFFA und J. VOLDMAN: *Quantitative modeling of dielectrophoretic traps*. Lab on a Chip, 6:508–515, 2006.
- [99] EICHHORN, R., P. REIMANN, B. CLEUREN und C. VAN DEN BROECK: *Moving backward noisily*. Chaos, 15(2):026113, 2005.
- [100] REIMANN, P.: *Brownian motors: noisy transport far from equilibrium*. Physics Reports, 361:57–265, 2002.
- [101] EICHHORN, R., P. REIMANN und P. HANGGI: *Paradoxical motion of a single Brownian particle: absolute negative mobility*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 66(6 Pt):066132, 2002.

- [102] REGTMEIER, J.: *Absolut negative Mobilität*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, Fakultät für Physik, 2005.
- [103] ZEUNER, S., B. J. KEAY, S. J. ALLEN, K. D. MARANOWSKI, A. C. GOSSARD, U. BHATTACHARYA und M. J. W. RODWELL: *Transition from classical to quantum response in semiconductor superlattices at THz frequencies*. Physical Review B, 53(4):R1717–R1720, 1996.
- [104] DUONG, T. T.: *DNA-Migration in strukturierten Mikrofluidik-Kanälen*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, Fakultät für Physik, 2002.
- [105] EMSLIE, G. A., T. F. BONNER und G. L. PECK: *Flow of viscous liquid on a rotating disk*. Journal of Applied Physics, 29(5):858–62, 1958.
- [106] AEBI, U. und T. D. POLLARD: *A glow-discharge unit to render electron microscope grids and other surfaces hydrophilic*. Journal of Electron Microscopy Technique, 7:29–33, 1987.
- [107] SMITH, P. J. und M. J. OWEN: *Plasma treatment of polydimethylsiloxane*. Journal of Adhesion Science and Technology, 8(10):1063, 1994.
- [108] ZHANG, X. C. und A. MANZ: *Narrow sample channel injectors for capillary electrophoresis on microchips*. Analytical Chemistry, 73(11):2656–62, 2001.
- [109] LIANG, L. und E. RUCKENSTEIN: *Pervaporation of ethanol-water mixtures through polydimethylsiloxane-polystyrene interpenetrating polymer network supported membranes*. Journal of Membrane Science, 114(2):227–234, 1996.
- [110] WATSON, J. M. und M. G. BARON: *The behaviour of water in poly(dimethylsiloxane)*. Journal of Membrane Science, 110:47–57, 1996.

- [111] PENMAN, H. L.: *Natural Evaporation from Open Water, Bare Soil and Grass*. Proceedings of the Royal Society of London, Series A, 193(1032):120–145, 1948.
- [112] LIDE, D. R.: *CRC - Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, 85. Auflage, 2004.
- [113] SCHNYDER, B., T. LIPPERT, R. KÖTZ, A. WOKAUN, V. GRAUBNER und O. NUYKEN: *UV-irradiation induced modification of PDMS films investigated by XPS and spectroscopic ellipsometry*. Surface Science, 532-:1067–71, 2003.
- [114] HUANG, X., J. M. GORDON und N. R. ZARE: *Current-monitoring method for measuring the electroosmotic flow rate in capillary zone electrophoresis*. Analytical Chemistry, 60(17):1837–1838, 1988.
- [115] STELLWAGEN, E. und N. C. STELLWAGEN: *Probing the Electrostatic Shielding of DNA with Capillary Electrophoresis*. Biophys J, 84:1855–1866, 2003.
- [116] TEGENFELDT, J. O., C. PRINZ, H. CAO, S. CHOU, W. W. REISNER, R. RIEHN, Y. M. WANG, E. C. COX, J. C. STURM, P. SILBERZAN und R. H. AUSTIN: *The dynamics of genomic-length DNA molecules in 100-nm channels*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(30):10979–83, 2003.
- [117] PERNODET, N., V. SAMUILOV, K. SHIN, J. SOKOLOV, H. M. RAFAILOVICH, D. GERSAPPE und B. CHU: *DNA electrophoresis on a flat surface*. Phys Rev Lett, 85(26 P):5651–4, 2000.
- [118] STREEK, M. A.: *Brownian Dynamics Simulation of Migration of DNA in structured Micrichannels*. Dissertation, Universität Bielefeld, Fakultät für Physik, 2005.
- [119] STREEK, M. A.: *Migration von DNA auf strukturierten Oberflächen in einem äußeren Feld*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, Fakultät für Physik, 2002.

- [120] SCHLEEF, M.: *Impfen mit Genen - Strategien für die DNA-Vakzinierung*. Itranskript, 6:48–49, 2005.
- [121] JIAN, H., T. SCHLICK und A. VOLOGODSKII: *Internal Motion of Supercoiled DNA: Brownian Dynamics Simulations of Site Juxtaposition*. J Mol Biol, 284:287–296, 1998.
- [122] HUANG, J., T. SCHLICK und A. VOLOGODSKII: *Dynamics of site juxtaposition in supercoiled DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(3):968–973, 2001.
- [123] MINC, N., C. FUTTERER, K. D. DORFMAN, A. BANCAUD, C. GOSSE, C. GOUBAULT und J. L. VIOVY: *Quantitative microfluidic separation of DNA in self-assembled magnetic matrixes*. Analytical Chemistry, 76(13):3770–6, 2004.
- [124] HAN, J. und H. G. CRAIGHEAD: *Characterization and Optimization of an Entropic Trap for DNA Separation*. Analytical Chemistry, 74:394–401, 2002.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit und während der Promotion unterstützt haben.

Zunächst gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti und Frau Dr. Alexandra Ros für das erneut entgegengebrachte Vertrauen und die wissenschaftliche Betreuung, welche diese Arbeit erst ermöglichte. Ebenfalls gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Friederike Schmid für ihre Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik von der theoretischen Seite während der Begleitung dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. Martin Streek möchte ich mich für die von Beginn an sehr spannende und erfolgreiche Zusammenarbeit auf dem Gebiet der *DNA-Migration in strukturierten Mikrofluidik-Kanälen* bedanken. Trotz seiner neuen beruflichen Tätigkeit fand er stets Zeit für weitere Diskussionen.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Reimann und Herrn Dr. Ralf Eichhorn möchte ich mich auch ganz herzlich bedanken. Sie haben das Projekt *Absolut Negative Mobilität* (ANM) aus theoretischer Seite initiiert, wissenschaftlich begleitet und hatten für Fragen stets ein offenes Ohr. Herrn Carsten Oberpenning, der mit seiner Staatsexamensarbeit die grundlegenden experimentellen Bausteine für das Projekt ANM gelegt hat, möchte ich meinen Dank aussprechen.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn Jan Regtmeier, der die weiterführenden Arbeiten auf dem Gebiet der ANM erfolgreich abgeschlossen hat. Die gute Zusammenarbeit und die fruchtbaren Diskussionen mit ihm führten auf dem Gebiet der DNA-Dielektrophorese zu den sehr interessanten Resultaten und tieferen Verständnis der dielektrophoretischen Kräfte. Ferner bedanke ich mich bei Herrn Dr. Robert Ros, Frau Dr. Katja Tönsing und Frau Gabi Krome für wissenschaftliche sowie nicht-wissenschaftliche Diskussionen aller Art und Hilfe bei bürokratischen Notwendigkeiten. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Chief-

Engineer Christoph Pelargus für den technischen Support und bei Herrn Dr. Rainer Eckel für seine unendliche Geduld beim Wiederholen chemischer Grundlagen bedanken.

Herzlichen Dank natürlich auch an die Kollegen der Arbeitsgruppe *Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften*, die an dieser Stelle leider nicht alle erwähnt werden können. Die abwechslungsreichen Diskussionen jeder Art, die Feierabend-Bier-Sessions, die gemeinsamen Grillnachmittage und das Finnbahn-Meeting vermisse ich jetzt schon.

Selbstverständlicher Dank ebenso an die Mitarbeiter der Mechanik- und Elektronik-Werkstatt für die Verwirklichungen der Konstruktionspläne etc. Vielen Dank auch an Herrn Henning Höfemann für die Unterstützung bei den AFM-Aufnahmen.

Ganz besonders danke ich Herrn Dirk Weber für die angenehmen Trainingsläufe vor dem Hermannslauf sowie Frau Claudia Fischer für das Korrekturlesen der Arbeit und meinem Bruder Thanh Liem Truong für die Hilfe bei der Erstellung der 3D-Grafiken

Der Familie Fischer sowie meiner Familie möchte ich ganz besonders herzlich danken, da deren Unterstützungen das Studium überhaupt ermöglicht hat.

Last but not least möchte ich mich bei meiner Freundin Wibke für meine Launen beim Zusammenschreiben der Arbeit und bei der Jobsuche entschuldigen. Für Deine Unterstützung während dieser schwierigen Zeit gibt es nicht die richtigen Worte! I♡U

Curriculum Vitae

Thanh Tu Duong

-
- 07.2002 - 05.2006 Universität Bielefeld, Dissertation
*Neue Migrations- und Separationsmechanismen
in strukturierten Mikrofluidik-Systemen*
- 06.2005 PlasmidFactory-Nachwuchspreis, Science Fair 2005,
Berufseinstiegsmesse in der Universität Bielefeld
- 07.2001 - 07.2002 Universität Bielefeld, Diplomarbeit
*DNA-Migration in strukturierten
Mikrofluidik-Kanälen*
- 10.1998 - 07.2001 Universität Bielefeld, Hauptstudium der Physik
- 08.1994 - 07.1998 Oberstufenkolleg a. d. Universität Bielefeld
Abitur & äquivalentes Grundstudium der Physik
- 08.1988 - 06.1994 Luisenrealschule, Bielefeld
- 08.1984 - 07.1988 Grundschule Stieghorst, Bielefeld
- 30.01.1978 geboren in Rach Gia, Vietnam
-