

**Separation von DNA  
mittels Dielektrophorese  
in Mikrofluidiksystemen**

**Diplomarbeit**

zur Erlangung des Grades eines  
Diplom-Physikers

vorgelegt von

**Henning Höfemann**

Fakultät für Physik

Universität Bielefeld

August 2007



## **Erklärung**

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

Bielefeld, den 24. August 2007

(Henning Höfemann)

## **Gutachter**

PD Dr. Alexandra Ros  
Prof. Dr. Andreas Hüthen

Datum des Einreichens der Arbeit: 24. August 2007



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theorie</b>	<b>3</b>
2.1	Desoxyribonucleinsäure . . . . .	3
2.1.1	Struktur und DNA-Modelle . . . . .	3
2.1.2	Superspiralisierte DNA . . . . .	7
2.1.3	Plasmide . . . . .	10
2.1.4	Detektion von DNA . . . . .	11
2.2	Hydrodynamik in Mikrofluidiksystemen . . . . .	13
2.2.1	Reynoldszahl und Laminarer Fluß . . . . .	13
2.2.2	Hydrostatische Effekte . . . . .	14
2.2.3	Hydrodynamischer Fluß . . . . .	16
2.3	Elektrokinetische Effekte . . . . .	17
2.3.1	Elektroosmose . . . . .	17
2.3.2	Elektrophorese . . . . .	22
2.3.3	Dielektrophorese . . . . .	23
2.3.4	Erzeugung räumlich inhomogener elektrischer Felder . . . . .	28
2.3.5	Bestimmung elektrischer Felder in Mikrofluidiksystemen . . . . .	30
2.4	Statistische Effekte . . . . .	32
2.4.1	Brown'sche Bewegung und Diffusion . . . . .	32
2.4.2	Kramers Rate . . . . .	33
2.4.3	Kramers Rate für ein gekipptes dielektrophoretisches Potential . . . . .	35
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>37</b>
3.1	Materialien und Chemikalien . . . . .	37
3.2	Masterwaferherstellung . . . . .	38
3.2.1	Strukturierung . . . . .	38
3.2.2	Anpresseinheit . . . . .	40
3.3	Mikrofluidik Chip . . . . .	41

3.3.1	Fabrikation . . . . .	41
3.3.2	Beschichtung und Befüllung . . . . .	43
3.4	Messaufbau . . . . .	43
3.4.1	Elektrische Kontaktierung des Mikrofluidik Chips . . . . .	43
3.4.2	Fluoreszenzanregung und Detektion . . . . .	44
3.5	Durchführung der Experimente . . . . .	46
3.5.1	Injektion . . . . .	46
3.5.2	Bestimmung der mittleren Migrationszeit . . . . .	47
3.5.3	Separationsexperimente . . . . .	48
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>49</b>
4.1	Eigenschaften der Mikrofluidik Chips . . . . .	49
4.1.1	Strukturelle Eigenschaften . . . . .	49
4.1.2	Oberflächenbeschichtung . . . . .	52
4.1.3	Elektrische Feldstärke im Mikrofluidik Chip . . . . .	52
4.2	Polarisierbarkeit von DNA . . . . .	54
4.2.1	Dielektrophoretische Fallen . . . . .	54
4.2.2	Polarisierbarkeitsmessungen . . . . .	55
4.2.3	Migrationsgeschwindigkeiten und Mobilitäten . . . . .	63
4.2.4	Frequenzabhängigkeit der Polarisierbarkeit . . . . .	65
4.3	DNA Separationen . . . . .	67
4.3.1	Monomer - Dimer Trennungen . . . . .	69
4.3.2	Komplexe Mischungen von Plasmiden . . . . .	74
4.3.3	Diskussion und Konformationshypothese . . . . .	79
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>84</b>
<b>A</b>	<b>Appendix</b>	<b>86</b>
A.1	Ersatzschaltbild und Widerstandsberechnungen . . . . .	86
A.2	Separationen und Spiking . . . . .	88
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>93</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>95</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>103</b>

# 1 Einleitung

Der kontinuierliche Fortschritt in allen Bereichen der Biologie und anderen Lebenswissenschaften eröffnet immer wieder neue und tiefere Einsichten in die Grundlagen des Lebens. Dabei steht neben dem reinen Erkenntnisgewinn natürlich auch die Entwicklung neuer Produkte und Medikamente im Vordergrund. Diese Entwicklung hat mittlerweile ein sehr hohes Niveau erreicht. Beispielsweise kann eine therapeutische oder präventive Vakzination mit genetischem Material vorgenommen werden [1]. Die Reinheit der dabei verwendeten Plasmid DNA muss gewährleistet und im Rahmen einer Qualitätskontrolle überprüfbar sein.

Der in nahezu allen Wissenschaften zu beobachtende Trend der Miniaturisierung hat im Bereich der Analytik eine Technologie hervorgebracht, die unter dem Stichwort *Lab-on-a-chip* bekannt ist [2]. Hierbei handelt es sich um die Verknüpfung verschiedener miniaturisierter Systeme auf einem Chip. Durch den Einsatz von Mikrofluidik Systemen sind damit nur noch sehr geringe Analytmengen in der Größenordnung weniger Mikroliter erforderlich. Ein weiterer Vorteil gegenüber Standardmethoden liegt zudem in der Integrationsmöglichkeit aller benötigten Komponenten (Transport-, Injektions-, Separations- und Detektionseinheiten) auf einem Mikrofluidik Chip.

Ein schnelles und effizientes Verfahren zur Auftrennung oder Separation von Biomolekülen, insbesondere von DNA, ist nicht nur im Rahmen einer oben genannten Qualitätskontrolle unerlässlich, sondern generell für all jene von großem Interesse, die sich mit Probenaufreinigung, Gen-Sequenzierung und weiterführenden Analysen befassen. Als Standardmethoden zur Auftrennung von DNA Fragmenten unterschiedlicher Länge haben sich die Plattengelelektrophorese und die Kapillargelelektrophorese etabliert. Beide Verfahren beruhen auf der längenabhängigen Migration der DNA Moleküle durch die Poren des Gels [3, 4]. Mit zunehmender Länge der DNA steigt die benötigte Zeit für eine Auftrennung, so dass der Separationsprozess für sehr lange DNA Moleküle, ab einigen hundert Kilobasenpaaren (kbp), mehrere Stunden bis Tage andauern kann. Damit ist die Nutzung dieser Standardmethoden sehr zeitaufwändig und nur bedingt effizient.

Im Zuge der fortschreitenden Miniaturisierung wurden noch andere Ansätze zur Manipulation und Separation von DNA besonders in Mikrofluidik Systemen entwickelt,

von denen ein großer Teil auf „künstlichen Gelen“ beruht. Diese können zum Beispiel aus Feldern dicht angeordneter Mikro- [5, 6] und Nanopfosten [7] oder aus Netzen von geordneten magnetischen Partikeln [8] bestehen. Des Weiteren lassen sich periodische Strukturierungen [9] und entropische Fallen [10] zur Separation verwenden.

Eine weitere alternative Methode zur Auftrennung von DNA-Molekülen beruht auf der Wechselwirkung der Moleküle mit einem inhomogenen elektrischen Feld, wodurch dielektrophoretische Fallen erzeugt und zur Separation von DNA Molekülen genutzt werden können [11]. Das notwendige elektrische Feld lässt sich in einem Mikrofluidik System entweder über Mikroelektroden erzeugen [12] oder durch eine geeignete elektrische Spannung in Kombination mit einer speziellen Strukturierung der Mikrofluidik Kanäle [13]. Die Gesamtzeit für einen Separationsprozess und eine anschließende Detektion beträgt hierbei in [13] nur wenige Minuten.

Mittels geeigneter Mikrostrukturierungsprozesse und des Konzeptes der elektrodenlosen Dielektrophorese soll im Rahmen dieser Arbeit Plasmid DNA in einem Längenbereich von 7 bis 23 kbp unter folgenden Gesichtspunkten untersucht werden: Die Polarisierbarkeit der unterschiedlichen Plasmide soll quantitativ bestimmt werden mit dem Ziel der Entwicklung eines längensensitiven, dielektrophoretischen Separationsverfahrens. Dieses soll zur Trennung von einfachen (Monomer – Dimer) und komplexeren DNA Mischungen (mehrere Plasmide unterschiedlicher Länge) eingesetzt werden. Die Ergebnisse werden bezüglich der Polarisierbarkeiten und Peak-Zuordnungen diskutiert. Basierend auf Vorarbeiten [13] kommt dabei ein gezielt strukturierter und leicht reproduzierbarer Mikrofluidik Chip zum Einsatz. Innerhalb eines Trenn-Kanals, der periodische Reihen von Pfosten und Durchgängen enthält, werden durch das Anlegen einer geeigneten elektrischen Spannung dielektrophoretische Fallen erzeugt, was die Manipulation der DNA ermöglicht.

## 2 Theorie

Die nachfolgenden Kapitel umfassen die theoretischen Grundlagen für die vorliegende Arbeit. Die Schwerpunkte liegen dabei auf den Eigenschaften von DNA sowie den physikalischen Grundlagen, die für die Nutzung eines Mikrofluidik Systems zur Manipulation von Biomolekülen, insbesondere von DNA Molekülen, relevant sind. Dazu zählen unter anderem hydrodynamische, elektrokinetische und statistische Effekte.

### 2.1 Desoxyribonucleinsäure – DNA

DNA steht für Desoxyribonucleinsäure (englisch: *Deoxyribonucleic acid*). Das DNA Molekül ist der Träger der Erbinformation und stellt somit den „Bauplan“ eines jeden Lebewesens dar. Die Kodierung der Information erfolgt durch die Sequenz der DNA Grundbausteine, der Nucleotide, deren Anordnung und die daraus resultierende molekulare Struktur im folgenden Kapitel 2.1.1 näher erläutert wird. Die Konformation der *superspiralisierten* DNA und die DNA Detektion mittels Fluoreszenzfarbstoffen werden in den Kapiteln 2.1.2 bzw. 2.1.4 vorgestellt. Kapitel 2.1.3 gibt einen kurzen Überblick über die sogenannten *Plasmide* und zwei wichtige Anwendungen dieser Gruppe.

#### 2.1.1 Struktur und DNA-Modelle

Bei den bereits erwähnten Grundbausteinen der DNA handelt es sich um die vier Nucleotide Adenosin-, Guanosin-, Cytidin- und Thymin-5'-monophosphat. Jedes Nucleotid besteht aus einem Zucker, einer Phosphatgruppe und einer heterozyklischen Stickstoff Base [14]. Die Kurzschreibweise erfolgt nach den jeweiligen Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymine (A,G,C,T).

Die Basen sind an das C-1-Atom des Zuckers (Desoxyribose) gebunden, der Phosphorsäurerest ist mit der Hydroxylgruppe am C-5-Atom verestert. Durch eine Phosphorsäurediesterbrücke zwischen der 3'-Hydroxylgruppe eines Zuckers und der 5'-Hydroxylgruppe des nächsten wird ein Nucleotidstrang als lineares Polymer aus den Nucleotid-Monomeren aufgebaut. Das DNA Molekül besteht aus zwei derartigen Nucleo-

tidsträngen, welche antiparallel angeordnet sind und sich um eine gemeinsame Achse winden (siehe Abbildung 2.1) [15, 16].

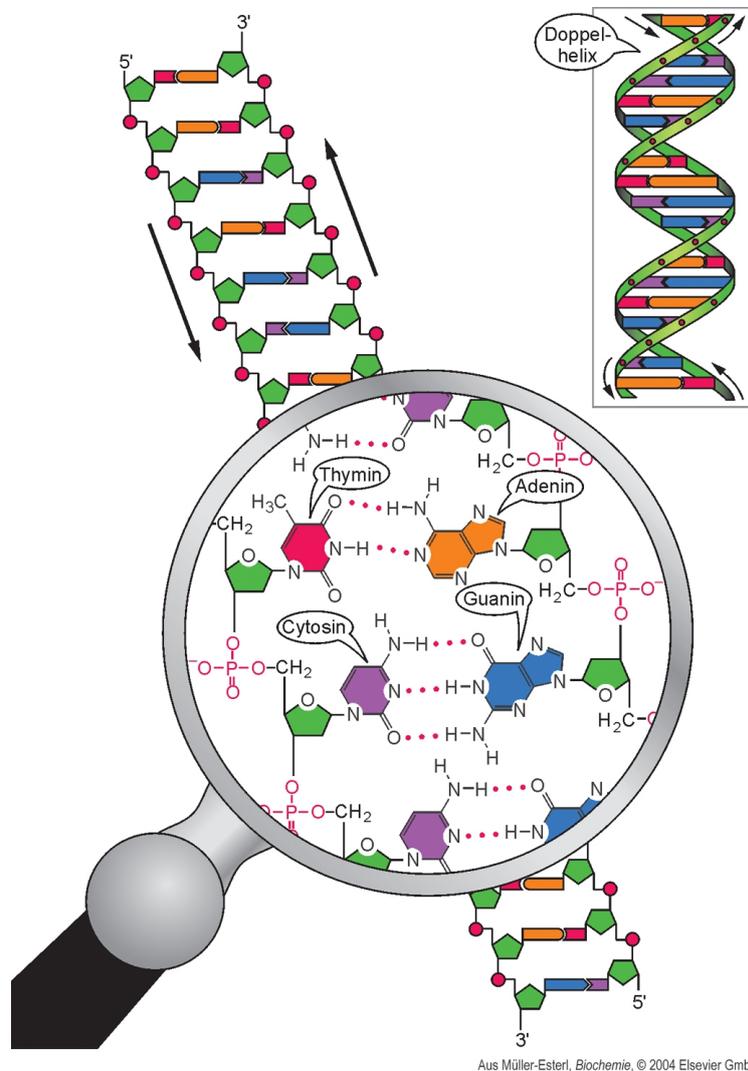


Abbildung 2.1: Struktur der DNA im Detail

*Die Abbildung zeigt im oberen rechten Teil die DNA als rechtsgängige Doppelhelix. Im mittleren Teil sind die gegenläufigen Polynukleotidketten abgebildet. Die Vergrößerung zeigt die komplementär gepaarten Basen A – T und G – C, welche über Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind [17].*

Die daraus resultierende räumliche Struktur wird als Doppelhelix bezeichnet. Das äußere Rückgrat des DNA Moleküls wird durch die Desoxyribosephosphatreste gebildet, während die nach innen gerichteten Basen der Nucleotidstränge sich gegenüberliegen

und komplementäre Basenpaare (Watson-Crick-Basenpaare) bilden. Die aus sterischen Gründen einzig möglichen Kombinationen sind die Basenpaare A – T und G – C, welche durch zwei bzw. drei Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden.

Die am häufigsten in der Natur anzutreffende Form der DNA ist die B-DNA, wobei es sich um eine rechtsgängige Doppelhelix handelt. Eine Helixwindung wird nach 10,4 Basenpaaren vollzogen, was einem Anstieg von 3,4 nm pro Windung (Ganghöhe) entspricht. Der mittlere Durchmesser der Doppelhelix beträgt ca. 2,4 nm. Die Basenpaare liegen in Ebenen, die nahezu rechtwinklig zur Helixachse stehen. Durch Dehydratation kann die B-DNA in eine andere Konformation (A-DNA) überführt werden. Die dehydrierte Form hat einen Durchmesser von ca. 2,6 nm und einen Anstieg pro Windung von ca. 2,5 nm. Diese Doppelhelix verfügt pro Windung über 11 Basenpaare, die in einem Winkel von  $19^\circ$  zur Helixachse stehen.

Neben der A- und B-DNA gibt es noch eine weitere bekannte Konformation, die Z-DNA, welche die Form einer linksgängigen Doppelhelix mit einer Ganghöhe von etwa 4,6 nm annimmt. Sie hat den kleinsten Durchmesser (ca. 1,8 nm) und vollzieht eine Windung nach 12 Basenpaaren, welche in einem Winkel von  $9^\circ$  zur Helixachse stehen. Die Verbindungslinie zwischen den Phosphatgruppen verläuft im Gegensatz zur A- und B-DNA nicht in einer Kurve sondern in einer Zick-Zack-Linie um die Helix. Die Z-DNA-Konformation tritt vor allem bei kurzen Nukleotidketten mit einer alternierenden Purin-Pyrimidin-Basensequenz auf. Da sich die näher beieinander liegenden negativ geladenen Phosphatgruppen gegenseitig abstoßen, lässt sich die Z-DNA über eine hohe Salzkonzentration stabilisieren, welche die Abschirmlänge reduziert [14, 18].

Um die DNA, die in freier Lösung als Knäuel ohne definierte räumliche Struktur vorliegt, theoretisch zu beschreiben, gibt es verschiedene Modelle [19]: Das einfachste Modell ist das FJC-(freely-jointed-chain)-Modell, welches auf einer idealen Kette aus starren Elementen basiert, die sich scharnierartig frei um ihre Verbindungspunkte bewegen können. Das FRC-(freely-rotating-chain)-Modell stellt eine Verbesserung des FJC-Modells dar, da es feste Bindungswinkel berücksichtigt und nur noch die Rotation um die Bindungsstellen zulässt. Das WLC-(worm-like-chain)-Modell geht, im Gegensatz zu den beiden anderen Modellen, von einer kontinuierlichen Flexibilität der Kette aus, die nicht nur auf die Verbindungsstellen der einzelnen Glieder beschränkt ist. Es eignet sich daher besonders für steife Polymere und liefert die realistischste Beschreibung der DNA [19, 20]. Ein weiteres Detail der Beschreibung ist das sogenannte Ausschlussvolumen. Dieses trägt der Tatsache Rechnung, dass sich ein DNA Molekül nicht selbst durchdringen kann, so dass bei einer Überlappung eine repulsive Kraft hervorgerufen wird (sogenannte *self-avoiding chains*).

Mit Hilfe der Persistenzlänge  $l_p$  des Moleküls, die ein Maß für dessen Steifigkeit darstellt, und mit der Gesamtlänge  $L$  gilt im Fall einer langen Kette ( $l_p \ll L$ ) folgende Beziehung für den mittleren quadratischen End-zu-End Abstand  $\overline{R}_{\text{end}}$  und den mittleren Gyrationradius  $\overline{R}_g$  (WLC Modell) [20, 21]:

$$\begin{aligned} 6 \overline{R}_g^2 &= \overline{R}_{\text{end}}^2 \\ &= 2 l_p^2 \left[ \exp\left(-\frac{L}{l_p}\right) + \frac{L}{l_p} - 1 \right] \\ &\stackrel{l_p \ll L}{\approx} 2 l_p L. \end{aligned}$$

Der mittlere Gyrationradius beschreibt die räumliche Ausdehnung eines Makromoleküls unter der Annahme einer kugelförmigen Gestalt mit Schwerpunkt im Zentrum. Er kann in dem hier betrachteten Fall von DNA auch mittels eines Skalengesetzes in Abhängigkeit von der Anzahl  $N$  der Basenpaare angegeben werden:

$$\overline{R}_g \propto N^\nu, \quad (2.1)$$

dabei steht  $\nu$  für eine dimensionsabhängige Zahl, die für verschiedene Modelle verschiedene Werte annimmt und als Flory-Exponent bezeichnet wird. Im WLC Modell und im dreidimensionalen Raum beträgt der Flory-Exponent unter Berücksichtigung des Ausschlussvolumens  $\nu = 0,59$  [20, 21].

Die Persistenzlänge der DNA wird aber nicht nur vom DNA Molekül selbst bestimmt, sondern auch durch den pH-Wert und die Ionenkonzentration der verwendeten Pufferlösung beeinflusst [3, 22]:

Das DNA Molekül kann als Polyelektrolyt aufgefasst werden, dessen negativ geladenes Rückgrat in wässriger Lösung von einer Wolke aus Gegenionen, die die Ladung abschirmen, umgeben ist. Stehen nicht genügend Ionen zur Verfügung, nimmt die Abschirmlänge zu und es kann zur elektrostatischen Abstoßung einzelner Bereiche des Moleküls kommen, was letztendlich zu einer höheren Steifigkeit, bzw. zu einer größeren Persistenzlänge führt. Zum Mechanismus der Abschirmung siehe auch Kapitel 2.3.3. Unter physiologischen Bedingungen beträgt die Persistenzlänge von DNA etwa 50 nm [23].

In komplexeren Lebewesen, zum Beispiel beim Mensch, liegt die DNA nicht als ungeordnetes Knäuel im Zellkern vor, sondern ist in übergeordneten Strukturen komprimiert (siehe Abbildung 2.2). Die DNA bildet dabei durch anderthalbfache Umwicklung bestimmter Proteine (Histone) Komplexe, welche als Nucleosome bezeichnet werden und

die selbst wiederum in einer etwa 30 nm starken Chromatinfaser angeordnet sind. Die Chromatinfaser ist schließlich in einem der 46 Chromosome enthalten [17, 24].

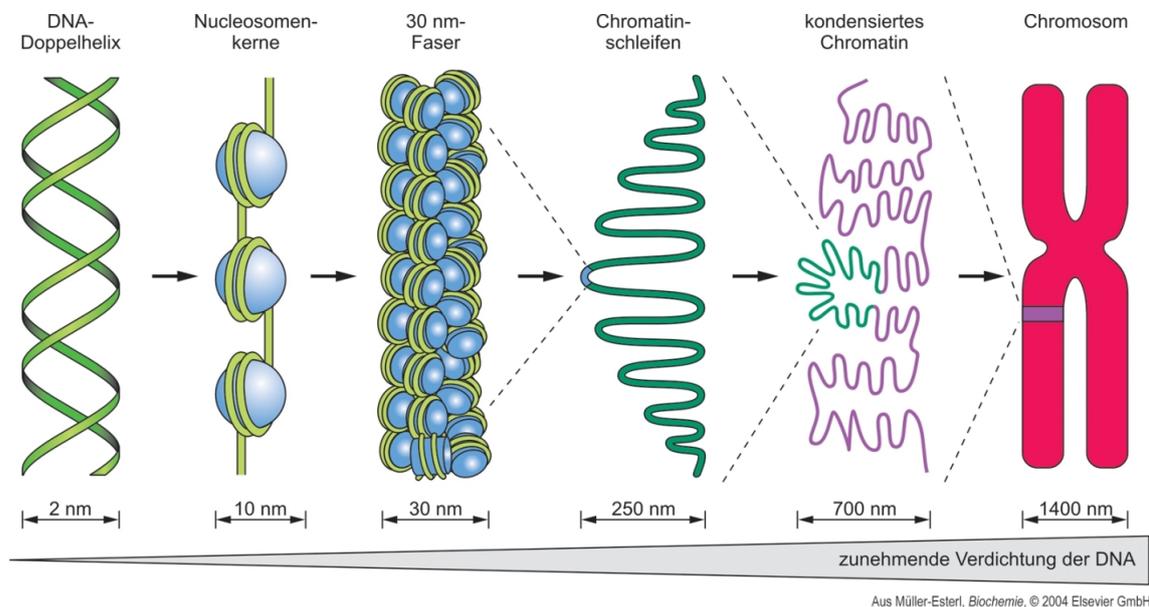


Abbildung 2.2: Übergeordnete Struktur der DNA

Die Abbildung zeigt die Komprimierung der DNA in komplexeren Organismen. Die DNA Doppelhelix bildet mit den Histonen Komplexe (Nucleosome), welche in einer etwa 30 nm starken Chromatinfaser aufgereiht sind. Die Chromatinfaser ist in den sogenannten Chromosomen verdichtet [17].

### 2.1.2 Superspiralisierte DNA

Bei dem in Kapitel 2.1.1 beschriebenen DNA Molekül handelt es sich um die allgemein bekannte doppelhelikale Struktur. Die beiden verwundenen Nucleotidstränge sind durch Wasserstoffbrückenbindungen nicht kovalent miteinander verbunden. Werden Anfang und Ende der Doppelhelix ohne weitere Ver- oder Entwindungen miteinander verknüpft, so dass jeder Strang mit sich selbst kovalent geschlossen ist, so erhält man eine zirkuläre Form der DNA, die als *entspannte zirkuläre* (*relaxed* oder *open circle, oc*) DNA bezeichnet wird. Die beiden Nucleotidstränge lassen sich in dieser Form nicht mehr ohne Spaltung des DNA Rückgrats voneinander trennen, da sie topologisch gebunden sind. In der Natur kommt die zirkuläre DNA bei Viren und Bakterien vor, sie liegt dort jedoch meist in der sogenannten (negativen) *superspiralisierten* Form vor [17]:

Wird die Doppelhelix vor ihrer Verknüpfung zum Ring zum Beispiel durch Enzyme partiell entwunden, gibt es zwei mögliche Konformationen: Einen Ring, der einen entwundenen Bereich („Schleife“) enthält (siehe Abbildung 2.3 D), und die sogenannte *superspiralisierte* (*supercoiled*) Form (siehe Abbildung 2.3 E). Beide Formen sind topologisch äquivalent und werden daher als *topologische Isomere* oder *Topoisomere* bezeichnet. Eine Umwandlung von der superspiralisierten in die entspannte Form ist nur noch durch Schneiden, bzw. Trennung von kovalenten Bindungen in einem oder beiden DNA Strängen möglich.

Das Phänomen der Superspiralisierung lässt sich mathematisch durch die Gleichung

$$Lk = Tw + Wr \quad (2.2)$$

mit den drei Kennzahlen  $Lk$ ,  $Tw$  und  $Wr$  beschreiben. Zur Veranschaulichung dient weiter Abbildung 2.3.  $Lk$  bezeichnet die *Verwindungszahl* (*linking number*), welche definiert ist als die Anzahl der Rechtswindungen eines DNA Stranges um die Helixachse.  $Tw$  steht für die Anzahl der Windungen der Doppelhelix, auch als *Verdrehungen* (*twisting number*) bezeichnet, und  $Wr$  für die Anzahl der *Windungen* (*writhing number*) der Superhelix.  $Lk$  muss im Gegensatz zu  $Tw$  und  $Wr$  ganzzahlig sein [14, 25]. Anschaulich ist die Verdrehung ( $Tw$ ) ein Maß für die Anzahl der Helixwindungen der DNA Stränge umeinander, während die Windung ( $Wr$ ) den Grad der Spiralbildung der Doppelhelixachse angibt und damit ein Maß für die Superspiralisierung ist.

Man unterscheidet zwischen zwei Varianten der Superspiralisierung: Bei der ersten handelt es sich um die natürlich vorkommende *negative* Superspiralisierung, welche, wie oben beschrieben und in Abb. 2.3 dargestellt, durch partielles Entwinden der DNA Stränge, bzw. durch Verringerung der Verwindungszahl, vor dem Ringschluss entsteht. Die daraus resultierende Superhelix ist rechtsgängig und  $Wr$  ist negativ.

Die zweite Möglichkeit besteht in der *positiven* Superspiralisierung. Diese entsteht, wenn vor dem Ringschluss die DNA Stränge zusätzlich „verdrillt“ werden, bzw. die Verwindungszahl erhöht wird. Die Konsequenz ist dabei eine linksgängige Superhelix mit positiver Windung  $Wr > 0$ .

In beiden Fällen wird durch die Veränderung der Verwindungszahl die Anzahl der Basenpaare pro Windung der Doppelhelix geändert, was einer Abweichung von der natürlichen B-Konformation entspricht, welche durch die Wasserstoffbrückenbindungen der Basenpaare stabilisiert wird. Dadurch wird im DNA Molekül eine Torsionsspannung hervorgerufen, die durch Ausbildung der superhelikalen Struktur kompensiert wird.

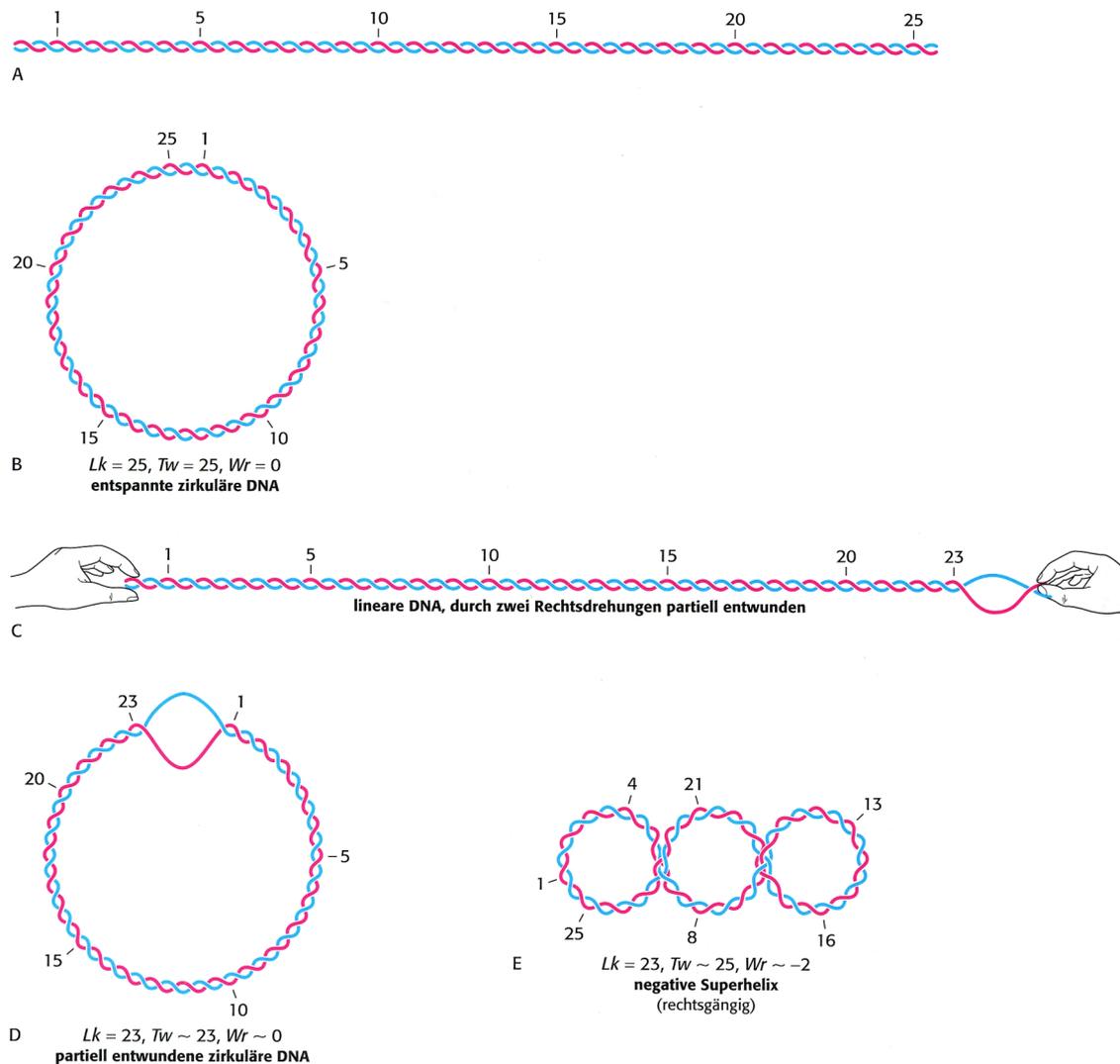


Abbildung 2.3: Superspiralisierung

Die Abbildung zeigt schematisch eine B-DNA Doppelhelix mit 25 Windungen (260 bp), (A). Durch Verknüpfen der Stränge entsteht die zirkuläre entspannte DNA (B). Durch partielles Entwinden vor der Verknüpfung (C) erhält man die partiell entwundene zirkuläre DNA (D) und die topologisch äquivalente superspiralisierte Form (E). Unter den jeweiligen Teilbildern sind die Verwindungszahl ( $Lk$ ), die Verdrehung ( $Tw$ ) und die Windung ( $Wr$ ) angegeben, welche im Haupttext näher erläutert werden [14].

Wird einer der beiden DNA Stränge durchtrennt, erfolgt die Relaxation des DNA Moleküls durch Rotation um die verbleibende Bindungsstelle in die entspannte zirkuläre Form [26].

Zum besseren Verständnis der abstrakten Kennzahlen sei hier noch einmal auf das Beispiel in Abbildung 2.3 verwiesen: Bei der DNA Konformation in Teil (E) der Abbildung handelt es sich um eine rechtsgängige Superhelix mit zwei Windungen ( $Wr = -2$ ). Die DNA Stränge sind nach der partiellen Entwindung nur noch 23 mal um die Doppelhelixachse gewunden ( $Lk = 23$ ) und die Anzahl der Verdrehungen beträgt demnach  $Tw = 25$ .

Superspiralisierte DNA ist viel kompakter als die entspannte Form, was anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahme in Abbildung 2.4 deutlich zu erkennen ist. Sie bewegt sich dementsprechend bei der Zentrifugation und Elektrophorese schneller. Die Agarose-Gelelektrophorese ist damit in der Lage, superspiralisierte DNA Fragmente gleicher Länge nach der Verwindungszahl  $Lk$  mit  $\Delta Lk = \pm 1$  zu trennen [17].

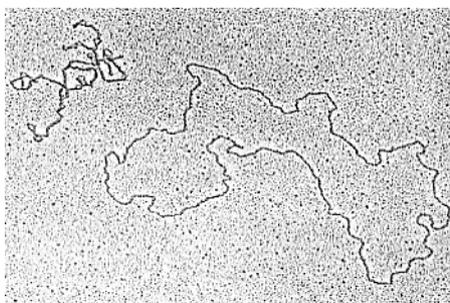


Abbildung 2.4: Topoisomere

*Die Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines zirkulären DNA Moleküls in der entspannten (rechts) und in der deutlich kompakteren superspiralierter Konformation (links) [14].*

### 2.1.3 Plasmide

Plasmide bezeichnen im Allgemeinen in eu- und prokaryotischen Zellen meist extrachromosomal vorkommende zirkuläre DNA Moleküle [27]. Da sie auch im Hauptchromosom von Bakterien auftreten können, werden sie auch gelegentlich Episome genannt. Diese DNA Moleküle haben meist eine Länge von zwei bis zu mehreren hundert kbp. Sie tragen häufig Gene, die der Zelle Merkmale für eine erhöhte Anpassungsfähigkeit an die Umwelt verleihen (Antibiotika-Resistenzen, Toxinproduktion, Reproduzierbarkeit, usw.). Bei der sogenannten ccc-DNA (*c*ovalently *c*losed *c*ircle DNA) handelt es sich um eine spezifische Konformation einer Plasmid DNA, die in Form von vollständig geschlossenen Ringen mit hohem Superspiralisierungsgrad vorliegt.

Im Rahmen der Biotechnologie werden Plasmide u.a. als sogenannte *Plasmid Vektoren* zum gezielten *Klonieren* (oder Kopieren) von DNA Fragmenten eingesetzt. Dabei wird die zu klonierende DNA Sequenz kovalent in den Plasmid-Ring eingebunden, welcher dann in eine Wirtszelle eingeschleust wird. Die Replikation der DNA erfolgt dann per Kultivierung der Zellen. Durch eine anschließende Lyse der Zellen, eine geeignete Aufbereitung und ein spezifisches Schneiden der Plasmid-Ringe erhält man die klonierten DNA Fragmente, welche abschließend, zum Beispiel in einem Agarose-Gel, noch aufzureinigen sind [16, 27, 28].

Eine andere Anwendung ist die Verwendung von Plasmid DNA als genetischer Impfstoff [1], wobei dann körpereigene Zellen die DNA Replikation und die Proteinsynthese ausführen und auf diese Weise als spezifische „Impfstoff-Fabriken“ fungieren. Die so durch die Zellen hergestellten Antigene entsprechen dem Muster einer echten Infektion und lösen eine Immunantwort des Organismus aus [29, 30].

#### 2.1.4 Detektion von DNA

Eine gängige Methode zur optischen Detektion von einzelnen DNA Molekülen ist die Fluoreszenzmikroskopie. Die Grundlage dieser Methode bilden die Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die DNA markiert wird. Die Farbstoffmoleküle können durch Absorption von Energie, welche durch kurzwelliges Licht zugeführt wird, in ein höheres Energieniveau angeregt werden. Nach kurzer Zeit (ca.  $10^{-8}$  s) kann das System unter Emission eines Photons wieder in den Grundzustand relaxieren. Die Energie des emittierten Photons kann höchstens der Energie des absorbierten Photons entsprechen. In der Regel ist sie jedoch kleiner, was einer Vergrößerung der Wellenlänge entspricht (Stokes Verschiebung) [15, 31, 32]. Neben der Relaxation durch Fluoreszenz (F) sind noch weitere Relaxationsprozesse möglich: Durch intermolekulare Wechselwirkungen kann ein Übergang vom angeregten Zustand in einen Triplettzustand erfolgen (ISC, *intersystem crossing*), von wo aus das Molekül durch die Emission eines Photons wieder in den (Singulett-) Grundzustand übergehen kann. Dieser Übergang wird als Phosphoreszenz (P) bezeichnet und ist relativ unwahrscheinlich, da er quantenmechanisch verboten ist. Dieses äußert sich in einer deutlich längeren Lebenszeit im Vergleich zur Fluoreszenz. Die Energie des absorbierten Photons kann auch innerhalb einer lichtgetriebenen chemischen Reaktion umgewandelt werden (Chem). Des Weiteren sind noch strahlungslose Übergänge zurück in den Grundzustand möglich (IC, *internal conversion*). Dazu gehören unter anderem Rotationsrelaxationen und Stoßprozesse des angeregten Fluorophors mit benachbarten Molekülen, was zum sogenannten *Quenching* (Q) führen kann.

Verschiedene mögliche Übergänge zwischen den Energieniveaus eines Systems sind in einem sogenannten Jablonski Diagramm (siehe Abbildung 2.5) zusammengefasst.

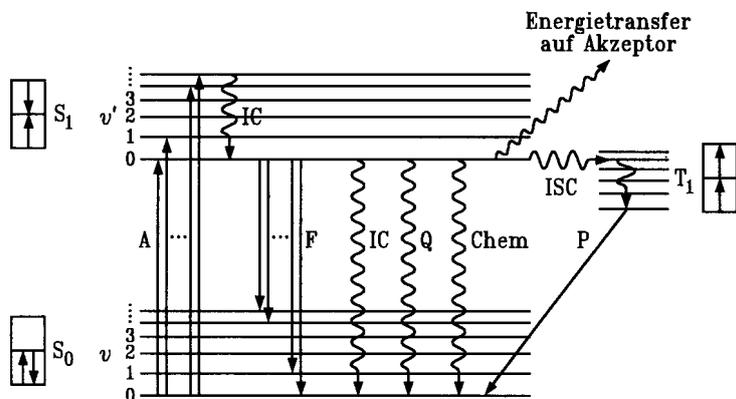


Abbildung 2.5: Jablonski Diagramm

Die Abbildung zeigt die Anregung eines Systems vom Grundzustand  $S_0$  ( $\nu = 0$ ) in verschiedene Schwingungszustände  $\nu'$  des ersten angeregten  $S_1$  Zustands durch Absorption (A). Durch innere Umwandlung (IC) relaxiert das System in den niedrigsten  $S_1$  Zustand, von dem es durch Fluoreszenz (F) wieder zurück in den Grundzustand  $S_0$  übergeht. Weitere mögliche Relaxationsprozesse werden im Haupttext erläutert [15].

Zur Markierung von DNA werden häufig interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, deren Fluoreszenzausbeute im gebundenen Zustand größer ist als in freier Lösung. Zu den bekanntesten Farbstoffen dieser Art gehören das Ethidiumbromid und die Cyanindimere YOYO-1 und TOTO-1. Die Bindung dieser Farbstoffe an die DNA erfolgt, wie oben erwähnt, über Interkalation. Das bedeutet, dass sich die Farbstoffe zwischen den Basenpaarebenen in die DNA einlagern<sup>1</sup> [33, 34, 35]. Die Vergrößerung der Fluoreszenzausbeute entspricht bei den Cyanindimeren einem Faktor von bis zu 3000 [36]. Einen Grund für diese Steigerung liefern die in den Cyanindimeren enthaltenen aromatischen Ringe, welche durch die Interkalation zwischen den Basenpaaren räumlich „fixiert“ werden. Dadurch entfallen die in freier Lösung verfügbaren Rotationsfreiheitsgrade und die damit verbundenen Relaxationsprozesse. Auch Stoßprozesse mit Lösungsmittelmolekülen werden durch die Interkalation erschwert, so dass der Fluoreszenzanteil steigt [36, 37].

<sup>1</sup>Dies kann in einem lebendigen Organismus zu Fehlern bei der DNA Replikation führen, so dass Interkalatoren potentiell krebserregend sind.

## 2.2 Hydrodynamik in Mikrofluidiksystemen

Die Hydrodynamik ist ein Teilgebiet der Strömungslehre und befasst sich mit bewegten Flüssigkeiten und Gasen. Sie liefert u.a. auch Beschreibungen für das Strömungsverhalten von Flüssigkeiten in Kanälen. Auf der Größenskala der Mikrofluidik Systeme treten dabei einige Effekte in den Vordergrund, die auf makroskopischer Ebene vernachlässigbar sind. Diese werden im Folgenden näher erläutert.

### 2.2.1 Reynoldszahl und Laminarer Fluß

Die Reynoldszahl  $Re$  ist eine dimensionslose Größe, mit der sich Strömungen charakterisieren lassen. Die Reynoldszahl ist definiert als

$$Re = \frac{\rho v r}{\eta}. \quad (2.3)$$

Dabei bezeichnen  $\rho$  und  $\eta$  die Dichte und die Viskosität des Fluids,  $v$  seine relative Geschwindigkeit zum umströmten Objekt, bzw. zum durchströmten Kanal, mit Radius  $r$ . Anschaulich entspricht die Reynoldszahl dem Verhältnis zwischen Trägheitskraft und viskoser Kraft, welche für kleine Werte von  $Re$  dominiert [32, 38].

Um die Reynoldszahl für Mikrofluidik Systeme zu berechnen, wird der Radius  $R$  in Gleichung 2.3 durch den hydraulischen Parameter  $D_h$  ersetzt, welcher allgemein wie folgt durch die Querschnittsfläche  $A_Q$  und den Umfang  $U_Q$  des durchströmten Systems definiert ist und sich speziell für rechteckige Kanäle der Breite  $b$  und Höhe  $h$  ( $b \gg h$ ) approximieren lässt [39]:

$$\begin{aligned} D_h &= \frac{4A_Q}{U_Q} \\ &\stackrel{b,h}{=} \frac{2bh}{b+h} \\ &\stackrel{b \gg h}{\approx} 2h. \end{aligned}$$

Man unterscheidet zwischen *laminaren* ( $Re \lesssim 2300$  bei runden Röhren) und *turbulenten* ( $Re \gtrsim 2300$ ) Strömungen [40]. In einem typischen Mikrofluidik System mit einer Kanalbreite von  $b = 100 \mu\text{m}$ , einer Kanalhöhe von  $h = 5 \mu\text{m}$ , einer relativ hohen Geschwindigkeit von  $v = 1000 \mu\text{m/s}$  und der in guter Näherung verwendeten Dichte und Viskosität von Wasser bei  $20^\circ\text{C}$  ( $\rho = 0,998 \text{ g cm}^{-3}$ ,  $\eta = 0,01 \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) erhält man für die Reynoldszahl den Wert  $Re \approx 0,01 \ll 1$ , so dass man immer von einem laminaren Fluß in einem Mikrofluidik System dieser Abmessungen ausgehen kann.

## 2.2.2 Hydrostatische Effekte

Zur Befüllung eines Mikrofluidik Chips werden die Kanäle im einfachsten Fall mit Flüssigkeitstropfen überdeckt, oder Reservoirs mit Flüssigkeit gefüllt. Eine große Rolle spielt dabei die Oberflächenspannung  $\gamma$ , welche auf den unterschiedlichen Energien der Moleküle im Inneren und an den Grenzflächen einer Flüssigkeit beruht. Innerhalb der Flüssigkeit bestehen attraktive Wechselwirkungen zwischen den Molekülen, was auch als Kohäsion bezeichnet wird. Das Fehlen weiterer Wechselwirkungspartner an den Grenzflächen (Luft, Glas, ...) resultiert in einer nach innen gerichteten Kraft auf die äußeren Moleküle. Die Flüssigkeit ist daher bestrebt, ihre Oberfläche zu minimieren. Im Idealfall führt dies zu einem kugelförmigen Flüssigkeitstropfen, da eine Kugel im dreidimensionalen Raum das geringste Verhältnis von Oberfläche zu Volumen aufweist. Der dabei entstehende Innendruck wird durch die sogenannte *Young-Laplace-Gleichung* beschrieben, wobei  $R$  den Krümmungsradius des Tropfens bezeichnet [32]:

$$\Delta p = \frac{2\gamma}{R}.$$

Neben den Kohäsionskräften innerhalb der Flüssigkeit treten an den Grenzflächen zu einem anderen Material, z. B. der Wand einer Glaskapillare, auch Adhäsionskräfte auf. Sind diese größer als die Kohäsionskräfte, kommt es zu einer Benetzung der Oberfläche des Kontaktmaterials. Der dabei entstehende Benetzungs- oder Kontaktwinkel  $\theta_K$  ist dann kleiner als  $90^\circ$ . Allgemein ist der Kontaktwinkel abhängig von den in Kontakt stehenden Materialien und stellt ein Maß für das Verhältnis von Kohäsions- und Adhäsionskraft dar (siehe Abbildung 2.6).

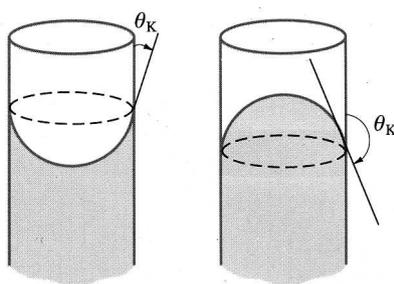


Abbildung 2.6: Kontaktwinkel

Die Abbildung [41] zeigt zwei verschiedene Flüssigkeiten im Inneren einer engen Röhre. Im linken Fall sind die Adhäsionskräfte größer als die Kohäsionskräfte, der Kontaktwinkel ist kleiner als  $90^\circ$  (Bsp.: Wasser in Glaskapillare). Im rechten Fall überwiegen die Kohäsionskräfte, es kommt daher nicht zur Benetzung und der Kontaktwinkel ist größer als  $90^\circ$ .

Ein weiterer Effekt, der auf der Oberflächenspannung beruht, ist die sogenannte Kapillarität oder Kapillarwirkung. Wird eine Kapillare in eine benetzende Flüssigkeit gestellt, so steigt die Flüssigkeit in der Kapillare empor (siehe Abbildung 2.7).

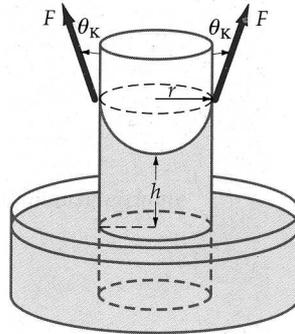


Abbildung 2.7: Kapillarität

Die Abbildung [41] zeigt eine Flüssigkeit, die auf Grund der Kapillarwirkung entgegen der Schwerkraft in einer Kapillare nach oben steigt (z.B. Wasser in einer Glaskapillare).

Die maximale Steighöhe wird erreicht, wenn die aus der Oberflächenspannung resultierende, nach oben zeigende Kraftkomponente durch die auf die Flüssigkeitssäule wirkende Schwerkraft ausgeglichen wird [41]. Sie lässt sich durch folgende Formel berechnen, in die neben dem Kontaktwinkel  $\theta_K$ , die Oberflächenspannung  $\gamma$ , die Dichte  $\rho$  der Flüssigkeit, der Kapillarradius  $r$  und die Erdbeschleunigung  $g$  eingehen:

$$h_{\max} = \frac{2\gamma \cos \theta_K}{\rho r g}.$$

Bei unterschiedlichen Füllhöhen der Reservoirs eines Mikrofluidik Chips entsteht ein Druckunterschied, welcher allgemein auch als hydrostatischer Druck bezeichnet wird, und der sich durch folgende Formel ausdrücken lässt [39]:

$$\Delta p = \rho g \Delta h. \quad (2.4)$$

Dabei steht  $\rho$  für die Dichte der Flüssigkeit,  $g$  für die Erdbeschleunigung und  $\Delta h$  für den Füllhöhenunterschied zwischen zwei Reservoirs, die durch einen Kanal verbunden sind.

### 2.2.3 Hydrodynamischer Fluß

Innerhalb der Kanäle eines Mikrofluidik Systems kann durch einen Druckgradienten eine laminare Strömung erzeugt werden. Dabei handelt es sich um einen stationären, druckgetriebenen Fluß, welcher auch als hydrodynamischer oder Hagen-Poiseuille'scher Fluß bezeichnet wird. Er verkörpert eine Lösung der Navier-Stokes-Gleichung. Als Randbedingung wird dabei die sogenannte *no-slip*-Bedingung angenommen, welche besagt, dass die äußersten Flüssigkeitsmoleküle an den Kanalwänden haften und sich nicht mit dem Fluß mitbewegen.

Auf Grund des hohen Aspektverhältnisses der Breite  $b$  zur Höhe  $h$  der Kanäle des verwendeten Mikrofluidik Systems ( $b \gg h$ , für genaue Maße siehe Kapitel 4.1.1) kann man in guter Näherung den Kanalboden und -deckel als zwei unendlich ausgedehnte Platten im Abstand  $h$  ansehen. Mit der Viskosität  $\eta$  der Flüssigkeit, der Kanallänge  $L_K$ , dem Druckunterschied  $\Delta p$  und der no-slip-Bedingung ( $v_x(z=0) = v_x(z=h) = 0$ ) ergibt sich für das Geschwindigkeitsprofil dann folgende Gleichung [39]:

$$v_x(z) = \frac{\Delta p}{2\eta L_K}(h - z)z. \quad (2.5)$$

Der Hagen-Poiseuille'sche Fluß zeichnet sich daher durch ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil aus (siehe Abbildung 2.8).

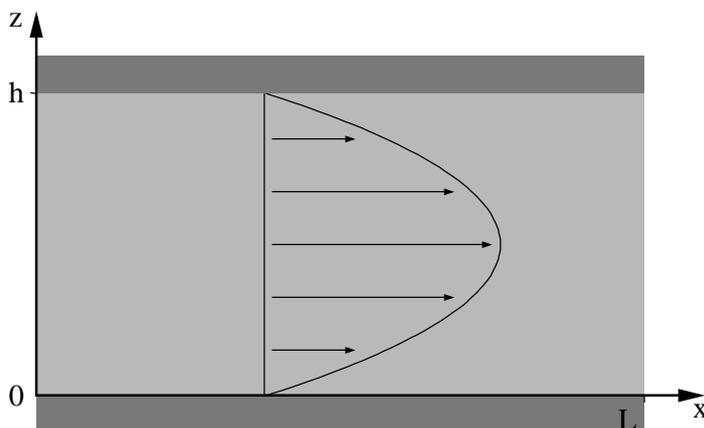


Abbildung 2.8: Hydrodynamischer Fluß

*Die Abbildung zeigt das parabolische Geschwindigkeitsprofil des hydrodynamischen Flusses. Die Geschwindigkeit ist an den Kanalwänden null und nimmt in der Kanalmitte ihr Maximum an.*

Durch Integration über die Kanalhöhe und -breite erhält man aus Gleichung 2.5 einen einfachen Ausdruck für die Flußrate  $Q$  des hydrodynamischen Flusses:

$$Q = \frac{h^3 b}{12\eta L_K} \Delta p.$$

In Mikrofluidik Systemen lassen sich hydrodynamische Flüsse nicht nur mit Hilfe von Pumpen erzeugen sondern auch durch Ausnutzung der in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Effekte. Auf Grund der geringen Querschnittsfläche und Länge der Kanäle führen bereits kleine Druckunterschiede zu beträchtlichen Strömungsgeschwindigkeiten. Wird zum Beispiel bei der Befüllung eines Mikrofluidik Chips eine Füllhöhendifferenz von 2 mm in zwei durch einen Kanal verbundenen Reservoirs erzeugt, so beträgt der Druckunterschied nach Gleichung 2.4 etwa 20 Pa, was nach Gleichung 2.5 eine Geschwindigkeit von ca.  $9 \mu\text{m/s}$  hervorruft. Dabei werden eine typischen Kanalhöhe  $h = 5 \mu\text{m}$  und eine Kanallänge  $L_K = 7 \text{ mm}$ , sowie die Viskosität  $\eta = 0,01 \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$  von Wasser bei  $20^\circ\text{C}$  angenommen. Die Füllhöhe der Reservoirs bietet somit eine Steuerungsmöglichkeit für den hydrodynamischen Fluß [42].

## 2.3 Elektrokinetische Effekte

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikrofluidik Chips sind während der Experimente stets mit einem Elektrolyten gefüllt. Dieses Kapitel beschreibt einige Effekte, die durch geladene Teilchen in den Elektrolytlösungen, durch Oberflächenladungen im Mikrofluidik Chip und durch Anlegen elektrischer Felder entstehen können.

### 2.3.1 Elektroosmose

An den Oberflächen von Glas und Polydimethylsiloxan (PDMS) befinden sich Silanolgruppen ( $-\text{SiOH}$ ). Wird der Chip mit einer Elektrolytlösung (z.B. Puffer) mit einem pH-Wert größer als 2 ( $\text{pH} \geq 2$ ) befüllt, so deprotonieren die Silanolgruppen der Kanaloberflächen und es kommt zu einer negativen Oberflächenladung, deren Stärke vom pH-Wert abhängt [43]. Entlang der Oberfläche bildet sich eine Schicht aus Gegenionen, wodurch die Ladung der Kanalwand abgeschirmt wird. Zunächst erfolgt hier eine genauere Betrachtung dieser Schicht mit Hilfe der Debye-Hückel-Theorie [44, 45].

Die Ladungsdichte  $\rho(z)$  im Abstand  $z$  zur Kanaloberfläche lässt sich schreiben als

$$\rho(z) = \sum_i Z_i e n_i(z), \quad (2.6)$$

dabei steht  $Z_i$  für die Valenz des Ions  $i$ ,  $e$  für die Elementarladung und  $n_i(z)$  für die Ionendichte der Ionensorte  $i$  im Abstand  $z$  von der Oberfläche [44]. Die Ionendichte  $n_i(z)$  lässt sich nach Debye und Hückel mit Hilfe der Boltzmannverteilung beschreiben, was auf die Annahme einer konkurrierenden Beziehung zwischen der elektrostatischen Anziehung der geladenen Oberfläche und der entsprechenden Gegenionen und der Brown'schen Molekularbewegung zurückgeht:

$$\frac{n_i(z)}{n_{i0}} = \exp\left(-\frac{Z_i e \Psi(z)}{k_B T}\right). \quad (2.7)$$

Hier bezeichnet  $n_{i0}$  die Ionendichte ohne die Anwesenheit eines elektrischen Potentials,  $\Psi(z)$  das elektrische Potential und  $k_B T$  die thermische Energie. Durch Einsetzen dieses Ausdrucks in Gleichung 2.6 und nach Vereinfachung folgt:

$$\begin{aligned} \rho(z) &= \sum_i Z_i e n_{i0} \exp\left(-\frac{Z_i e \Psi(z)}{k_B T}\right) \\ &\stackrel{Z_i e \Psi(z) \ll k_B T}{\approx} - \sum_i \frac{Z_i^2 e^2 n_{i0}}{k_B T} \Psi(z). \end{aligned} \quad (2.8)$$

Dabei gehen in die Vereinfachung die Reihenentwicklung der Exponentialfunktion und die Annahme der Ladungsneutralität ( $\sum_i Z_i e n_{i0} = 0$ ) ein.

Die Poissongleichung verknüpft die Ladungsdichte  $\rho(z)$  mit dem elektrischen Potential  $\Psi(z)$ , wobei  $\epsilon$  die Dielektrizitätskonstante bezeichnet:

$$\frac{d^2 \Psi(z)}{dz^2} = -\frac{\rho(z)}{\epsilon}. \quad (2.9)$$

Das Einsetzen der vereinfachten Ladungsdichte (siehe Gleichung 2.8) liefert folgende Differentialgleichung:

$$\frac{d^2 \Psi(z)}{dz^2} = \kappa^2 \Psi(z), \quad \kappa^2 = e^2 \sum_i \frac{Z_i^2 n_{i0}}{\epsilon k_B T}. \quad (2.10)$$

Die Größe  $\kappa^{-1}$  wird auch als Abschirmlänge oder Debye-Länge bezeichnet.

Mit den Randbedingungen  $\Psi(z = 0) = \Psi_0$  und  $\lim_{z \rightarrow \infty} \Psi(z) \rightarrow 0$  lässt sich die Differentialgleichung 2.10 lösen, was zu folgendem Ausdruck für das elektrische Potential führt:

$$\Psi(z) = \Psi_0 \exp(-\kappa z). \quad (2.11)$$

Das elektrische Potential fällt demnach exponentiell mit der Entfernung zur Oberfläche ab und für die Ladungsdichte  $\rho(z)$  ergibt sich folgender Ausdruck:

$$\rho(z) = \epsilon \kappa^2 \Psi_0 \exp(-\kappa z). \quad (2.12)$$

Die vereinfachte Vorstellung einer Schicht aus beweglichen Gegenionen, welche die Ladung der Oberfläche abschirmen, wird durch das *Stern-Modell* verfeinert. Dieses beschreibt eine starre Schicht direkt an der geladenen Oberfläche, welche aus unbeweglichen Gegenionen besteht (Stern-Schicht). Ihre Ausdehnung kann durch die Bjerrum-Länge  $l_B$  abgeschätzt werden [44, 46]:

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

Auf die starre Stern-Schicht folgt die diffuse *Gouy-Chapman-Schicht* aus schwach gebundenen, thermisch beweglichen Gegenionen. Ihre Stärke entspricht der Debye-Länge  $\kappa^{-1}$  aus Gleichung 2.10. Zusammen bilden diese beiden Schichten die sogenannte *elektrische Doppelschicht*, welche in Abbildung 2.9 mit dem zugehörigen Potentialverlauf dargestellt ist. Das elektrische Potential der Oberfläche  $\Psi_0$  fällt innerhalb der Stern-Schicht linear und ab der Grenze zur Gouy-Chapman-Schicht exponentiell ab (vergleiche Gleichung 2.11). An dieser Grenze wird das elektrische Potential  $\Psi(l_B)$  auch als  $\zeta$ -Potential (Zeta-Potential) bezeichnet.

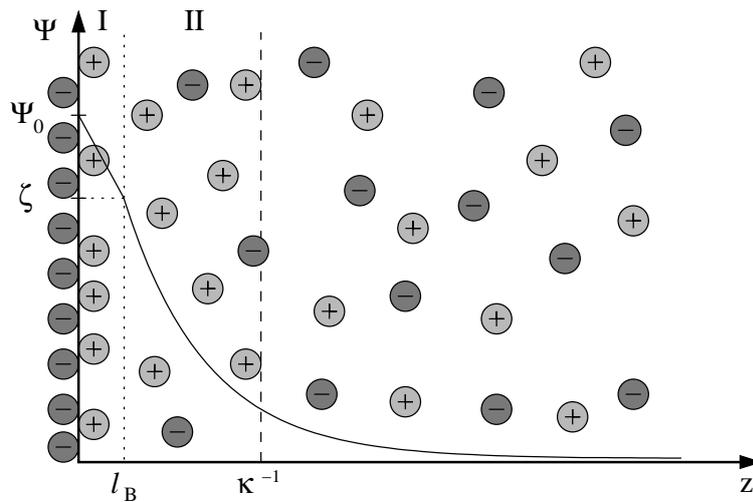


Abbildung 2.9: Elektrische Doppelschicht

Die Abbildung zeigt die elektrische Doppelschicht des Stern-Modells an einer negativ geladenen Oberfläche. Die Doppelschicht besteht aus einer starren (I) und einer diffusen Schicht (II), wobei das elektrische Potential, aufgetragen gegen den Abstand  $z$  zur Oberfläche, innerhalb der Bjerrumlänge  $l_B$  linear bzw. innerhalb der Debye-Abschirm-Länge  $\kappa^{-1}$  exponentiell abfällt.

### Elektroosmotischer Fluß

Wird ein elektrisches Feld parallel zu der geladenen Oberfläche angelegt, so werden die in der Gouy-Chapman-Schicht nur schwach gebundenen Gegenionen und damit die oberflächennahen Flüssigkeitsschichten, in denen sie sich befinden, beschleunigt. Durch die daraus resultierenden Scherkräfte, bzw. durch die Viskosität der Flüssigkeit, werden in kleinen Kanälen auch die Flüssigkeitsschichten fern der Oberfläche mitgezogen und es kommt zur Ausbildung des sogenannten elektroosmotischen Flusses (EOF).

Der Aufbau des EOF erfolgt innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne, die bei runden Kapillaren mit einem Radius von etwa  $100 \mu\text{m}$  nur wenige hundert Mikrosekunden beträgt [47]. Seine Geschwindigkeit  $v_x(z)$  lässt sich berechnen aus der Reibungskraft pro Volumenelement der Ladungsdichte  $\rho(z)$  und der elektrischen Kraft, welche durch das in Kanalrichtung, d.h. senkrecht zu den Kanalwänden, angelegte elektrische Feld  $E_x$ , hervorgerufen wird [39]. Mit Gleichung 2.9 ergibt sich die Bewegungsgleichung der Flüssigkeit ( $Re \ll 1$ ) aus der stationären Navier-Stokes-Gleichung zu:

$$\eta \frac{d^2 v_x(z)}{dz^2} = E_x \rho(z). \quad (2.13)$$

Mit der no-slip Randbedingung und der Annahme eines unendlich breiten Kanals erhält man nach zweimaliger Integration den Ausdruck für die Geschwindigkeit:

$$v_x(z) = \frac{E_x \epsilon \zeta}{\eta} (1 - \exp(-\kappa z)), \quad (2.14)$$

wobei hier das elektrische Potential  $\Psi_0$  bereits durch das  $\zeta$ -Potential ersetzt wurde, da unter Berücksichtigung der no-slip Bedingung genau dieses an der Grenzfläche zwischen starrer und diffuser Schicht vorliegt ( $\Psi(l_B) = \zeta$ ).

Auf Grund der typischen Ausdehnung der Debye-Schicht  $\kappa^{-1}$  von wenigen Nanometern kann der Exponentialterm für große  $z$  vernachlässigt werden und man erhält in guter Näherung die folgende Gleichung für die elektroosmotische Geschwindigkeit  $v_{eo}$ :

$$v_{eo} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} E_x. \quad (2.15)$$

Die Geschwindigkeit innerhalb des elektroosmotischen Strömungsprofils ist also, mit Ausnahme der diffusen Schichten an der Oberfläche, über den gesamten Querschnitt des Kanals konstant (siehe Gleichung 2.15). Das charakteristische, stempelförmige Geschwindigkeitsprofil des elektroosmotischen Flusses ist in Abbildung 2.10 dargestellt.

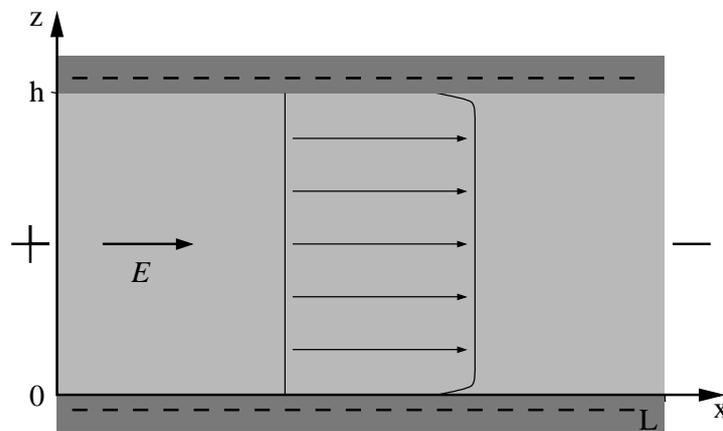


Abbildung 2.10: Elektroosmotischer Fluß

Die Abbildung zeigt das stempelförmige Geschwindigkeitsprofil des EOF. Bei negativ geladenen Wänden, durch Minuszeichen im dunkelgrauen Teil dargestellt, werden die positiven Gegenionen in Wandnähe (hier nicht eingezeichnet) durch ein angelegtes elektrisches Feld  $E$  beschleunigt.

Die elektroosmotische Mobilität  $\mu_{eo}$  lässt sich mit Gleichung 2.15 ausdrücken als:

$$\mu_{eo} = \frac{v_{eo}}{E_x} = \frac{\epsilon\zeta}{\eta}. \quad (2.16)$$

Die elektroosmotische Mobilität ist abhängig von der Viskosität  $\eta$  der Lösung, der Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  und dem  $\zeta$ -Potential. Das bedeutet, dass die Mobilität auch vom pH-Wert und der Ionenkonzentration der Lösung abhängt, da beide das  $\zeta$ -Potential beeinflussen. So führt eine Steigerung des pH-Wertes zu einer höheren Deprotonierung der Silanolgruppen, damit zu einer höheren Ladungsträgerkonzentration auf der Oberfläche und folglich zu einem größeren  $\zeta$ -Potential. Eine höhere Ionenkonzentration der Lösung hingegen verringert das  $\zeta$ -Potential, da mehr Ionen zur Abschirmung der Oberflächenladung vorhanden sind [48, 49]. Eine Steigerung der Viskosität führt ebenfalls zu einer Verringerung der elektroosmotischen Mobilität.

### 2.3.2 Elektrophorese

Die Elektrophorese (EP) bezeichnet allgemein die durch ein angelegtes elektrisches Feld hervorgerufene Bewegung eines geladenen Objekts relativ zu einer stationären Flüssigkeit [39]. Dazu gehören zum Beispiel auch gelöste, bzw. suspendierte Teilchen innerhalb eines gefüllten Mikrofluidik Kanals.

In einer Dimension lautet der Ausdruck für die dielektrophoretische Kraft  $F_{EP}$ , die ein angelegtes elektrisches Feld  $E$  auf ein geladenes Teilchen der Ladung  $Ze$  ausübt,  $F_{EP} = ZeE$ . Das geladene Teilchen erfährt durch diese Kraft eine Beschleunigung, wird aber gleichzeitig innerhalb der umgebenden Flüssigkeit durch eine geschwindigkeitsabhängige Reibungskraft der Form  $F_r = -f_r v$  gebremst. Der Proportionalitätsfaktor  $f_r$  wird Reibungskoeffizient genannt und lässt sich in dieser Situation nach dem Stokes'schen Reibungsgesetz für sphärische Teilchen schreiben als  $f_r = 6\pi\eta r_s$ . Dabei bezeichnet  $\eta$  die Viskosität der Flüssigkeit und  $r_s$  den Stokes'schen Radius des Teilchens. Die maximale Geschwindigkeit des Teilchen ergibt sich aus dem Kräftegleichgewicht zwischen der elektrischen und der Reibungskraft, sie ist proportional zur Stärke des angelegten Feldes:

$$v_{\max} = \frac{Ze}{f_r} E.$$

Der Proportionalitätsfaktor wird als elektrophoretische Mobilität  $\mu_{\text{ep}}$  bezeichnet:

$$\mu_{\text{EP}} = \frac{Ze}{f_r} \stackrel{\text{Stokes}}{=} \frac{Ze}{6\pi\eta r_s}. \quad (2.17)$$

Da die elektrophoretische Mobilität bei gegebener Elektrolytlösung in idealisierter Form nur von der Ladung und Größe des Teilchens abhängt, wird die Elektrophorese in der Biologie und Biochemie als Standardmethode zur Trennung von Proteinen verwendet [21]. Unter der Annahme eines sphärischen Teilchens gilt für seinen Radius  $r_s$  und den Stokes'schen Reibungskoeffizienten der Zusammenhang  $f_r \propto r_s$ .

Für die größenabhängige Trennung von DNA Fragmenten ( $\gtrsim 100$  Basenpaare) in freier Lösung ist die Elektrophorese nicht geeignet, da DNA keine sphärischen Partikel bildet, sondern sich wie ein sogenanntes freies Knäuel (*free-draining-coil*) verhält. Dies führt zu einer nicht größen- bzw. längenabhängigen elektrophoretischen Mobilität  $\mu_{\text{EP}}$  [21]. Dementsprechend müssen für eine elektrophoretische Trennung andere Medien eingesetzt werden, die, zum Beispiel im Fall von Gelen, eine größenabhängige Separation durch die Wechselwirkung der DNA mit den Poren des Gels ermöglichen [50].

Das Migrationsverhalten für DNA, deren Gyrationradius kleiner als die mittlere Porengröße des Gels ist, wird in guter Näherung durch das *Ogston* Modell, in dem das Gel als molekulares Sieb aufgefasst wird, beschrieben. Für längere DNA Moleküle erfolgt die Beschreibung mit dem *Reptation* und dem *Biased Reptation* Modell. Beiden Modellen liegt die Vorstellung einer „schlangenförmigen“ Einhüllenden zugrunde, auf die die Ausdehnung der DNA Moleküle beschränkt ist, und die sie bei der Migration durch das Gel nur an den Enden verlassen können. Damit bewegen sich die DNA Moleküle in diesen Modellen „schlängelnd“ durch die Poren des Gels, wobei beim Biased Reptation Modell zusätzlich die Orientierung der Kopfenden der Moleküle im elektrischen Feld berücksichtigt wird [3].

### 2.3.3 Dielektrophorese

Unter Dielektrophorese (DEP) versteht man im Allgemeinen die Bewegung eines ladungsneutralen, polarisierbaren Teilchens in einer dielektrischen Flüssigkeit, hervorgerufen durch ein inhomogenes elektrisches Feld [39]. Das elektrische Feld  $\vec{E}$ , wobei es sich um ein DC oder AC Feld handeln kann, induziert einen Dipol in dem polarisierbaren Teilchen, welches dann durch die Interaktion des Dipols mit dem elektrischen Feld eine Kraft erfährt [39].

Die folgenden Ausdrücke und Überlegungen beziehen sich auf elektrische Wechselfelder

(AC Felder), welche für die vorliegende Arbeit eine entscheidende Rolle spielen. Bei diesen Wechselfeldern handelt es sich um elektrische Felder, die auf einer zeitabhängigen Wechselspannung  $U(t) = U_{AC} \sin(\omega t)$  basieren. Die Feldamplitude erhält dadurch ebenfalls eine sinusförmige zeitliche Abhängigkeit  $\vec{E}(t) = \vec{E} \sin(\omega t)$  und ist proportional zu der zugrunde liegenden Spannung

$$\vec{E} \propto U_{AC}, \quad (2.18)$$

was im nächsten Kapitel 2.3.5 näher erläutert wird. Die Wurzel aus dem zeitlichen Mittelwert des quadratischen Feldes wird zusammen mit der Richtung des Feldes als  $\vec{E}_{RMS} = \frac{1}{\sqrt{2}} \vec{E}$  bezeichnet.

Für polarisierbare Objekte entsteht durch das elektrische Feld ein Potential  $W$ , das auch als Polarisationsenergie bezeichnet wird [11]:

$$W = -\frac{1}{2} \alpha \vec{E}^2. \quad (2.19)$$

Dabei steht  $\alpha = \alpha(\omega)$  für die frequenzabhängige Polarisierbarkeit des Teilchens [51, 52]. Unter Vernachlässigung von Absorptionseffekten ist  $\alpha(\omega)$  reell und man spricht für  $\alpha > 0$  von positiver und für  $\alpha < 0$  von negativer Dielektrophorese [11, 13].

Mit  $\vec{F} = -\nabla W$  erhält man die zu Beginn erwähnte, zu  $W$  korrespondierende, dielektrophoretische Kraft:

$$\vec{F}_{DEP} = \frac{1}{2} \alpha \nabla \vec{E}^2. \quad (2.20)$$

Der für die dielektrophoretische Kraft notwendige Feldgradient resultiert aus der Inhomogenität des elektrischen Feldes. Für Objekte mit positiver Polarisierbarkeit zeigt die auf sie wirkende dielektrophoretische Kraft nach Gleichung 2.20 und 2.19 in Richtung der höchsten Feldstärke, bzw. der Minima der potentiellen Energie  $W$ . Diese attraktiven Bereiche werden im weiteren Verlauf als dielektrophoretische Fallen bezeichnet.

### **Dielektrophoretische Eigenschaften eines sphärischen Partikels**

Das Phänomen der Dielektrophorese wird im Folgenden am Beispiel eines sphärischen, polarisierbaren Objekts erläutert. Auch die Unterscheidung zwischen positiver und negativer Dielektrophorese wird hier ausführlicher behandelt.

Die bereits erwähnte dielektrophoretische Kraft  $\vec{F}_{DEP}$  (siehe auch Gleichung 2.20) lässt

sich für einen induzierten Dipol, dessen Dipolmoment parallel zum elektrischen Feld und proportional zu dessen Stärke ist, näherungsweise schreiben als [39]:

$$\vec{F}_{\text{DEP}} = (\vec{p} \cdot \nabla) \vec{E}, \quad (2.21)$$

wobei  $\vec{p}$  das Dipolmoment des induzierten Dipols bezeichnet. Die Kraft hängt dabei von der Richtung des elektrischen Feldgradienten und von dem induzierten Dipol ab. Das Vorzeichen des angelegten Feldes spielt jedoch keine Rolle (siehe auch Gleichung 2.20), so dass die durch ein AC Feld hervorgerufene dielektrophoretische Kraft unter Umständen elektrophoretische Kräfte überwiegen kann (siehe auch Gleichung 2.24 und Kapitel 2.4.3).

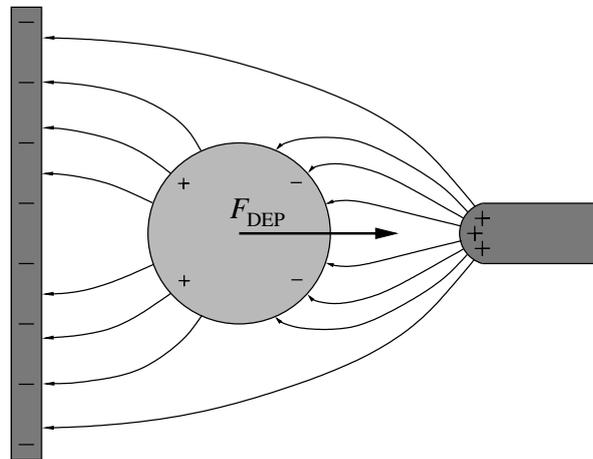


Abbildung 2.11: Dielektrophorese

Die Abbildung zeigt ein sphärisches, polarisierbares Objekt in einem inhomogenen elektrischen Feld. Durch den induzierten Dipol werden die elektrischen Feldlinien verformt. In dem hier dargestellten Fall ist das Objekt besser polarisierbar als das umgebende Medium, so dass die resultierende dielektrophoretische Kraft  $F_{\text{DEP}}$  in Richtung des Feldgradienten zeigt (positive Dielektrophorese).

In Abbildung 2.11 ist ein polarisierbares, sphärisches Teilchen in einem inhomogenen elektrischen Feld dargestellt. Der Fall der hier gezeigten positiven Dielektrophorese tritt auf, wenn das Teilchen besser polarisierbar als das umgebende Medium ist, bzw. wenn allgemein für die Differenz der Dielektrizitätskonstanten des Partikels ( $\epsilon_p$ ) und des Mediums ( $\epsilon_m$ ) gilt:  $\epsilon_p - \epsilon_m > 0$ . Die resultierende Kraft zeigt dann in die Richtung der

höchsten Feldstärke bzw. in Richtung des Feldgradienten. Im Fall negativer Dielektrophorese gilt  $\epsilon_p - \epsilon_m < 0$  und die resultierende dielektrophoretische Kraft zeigt in Richtung niedrigster Feldstärke [39].

Wird zur Erzeugung des Dipols ein AC Feld verwendet, so kann die Unterscheidung zwischen positiver und negativer Dielektrophorese anhand des Vorzeichens des Realteils des sogenannten *Clausius-Mosotti-Faktors*  $K(\omega)$  vorgenommen werden [39, 53]. Der Clausius-Mosotti-Faktor ist definiert als:

$$K(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*}.$$

Hier bezeichnen  $\epsilon_{p,m}^*$  die verallgemeinerten frequenzabhängigen Dielektrizitätskonstanten, oder auch Dielektrizitätsfunktionen, welche sich wie folgt schreiben lassen:

$$\epsilon_{p,m}^*(\omega) = \epsilon_{p,m} - i \frac{\sigma_{p,m}}{\omega}.$$

Dabei steht  $\omega$  für die Frequenz des angelegten Wechselfeldes,  $\epsilon_{p,m}$  für die jeweilige Dielektrizitätskonstante und  $\sigma_{p,m}$  für die jeweilige Leitfähigkeit [52].

Der Realteil des Clausius-Mosotti-Faktors kann Werte zwischen  $-\frac{1}{2}$  und  $+1$  annehmen ( $-\frac{1}{2} < \Re\{K(\omega)\} < 1$ ). Bei  $\Re\{K(\omega)\} > 0$  spricht man von positiver und bei  $\Re\{K(\omega)\} < 0$  von negativer Dielektrophorese [53].

Das Dipolmoment eines kugelförmigen Dipols mit Radius  $R$  entspricht der Gesamtpolarisation des Teilchens. Befindet sich der Dipol in einem elektrischen Wechselfeld mit sinusförmiger Amplitude ( $\vec{E} \sin(\omega t)$ ) und der zeitlich gemittelten Feldstärke  $\vec{E}_{\text{RMS}}$ , so lässt sich das Dipolmoment schreiben als [39]:

$$\vec{p} = 4\pi\epsilon_m \Re\{K(\omega)\} R^3 \vec{E}_{\text{RMS}}. \quad (2.22)$$

Die dielektrophoretische Kraft  $\vec{F}_{\text{DEP}}$  erhält man durch Einsetzen des Ausdrucks für die Polarisation (2.22) in Gleichung 2.20 mit  $(\vec{E} \nabla) \vec{E} = \frac{1}{2} \nabla \vec{E}^2$  [53, 54]:

$$\begin{aligned} \vec{F}_{\text{DEP}} &= 2\pi\epsilon_m \Re\{K(\omega)\} R^3 \nabla \vec{E}_{\text{RMS}}^2 \\ &= \alpha(\omega) \nabla \vec{E}_{\text{RMS}}^2, \end{aligned} \quad (2.23)$$

dabei bezeichnet  $\alpha(\omega)$  wieder die frequenzabhängige Polarisierbarkeit des Partikels [51]. Mit diesem Ausdruck für die dielektrophoretische Kraft  $\vec{F}_{\text{DEP}}$  und der elektrophoretischen Kraft  $\vec{F}_{\text{EP}}$  lässt sich nun die durch elektrische Felder hervorgerufene elektrische

Gesamtkraft  $\vec{F}_{\text{el}}$  auf ein geladenes, polarisierbares Teilchen formulieren, wobei  $\mu_{\text{eff}}$  die effektive Mobilität bezeichnet [55]:

$$\begin{aligned}\vec{F}_{\text{el}} &= \vec{F}_{\text{EP}} + \vec{F}_{\text{DEP}} \\ &= \mu_{\text{eff}} f_r \vec{E}_{\text{EP}} + \alpha(\omega) \nabla \vec{E}_{\text{DEP,RMS}}^2.\end{aligned}\quad (2.24)$$

### Polarisierbarkeit von DNA

Im Hinblick auf DNA ist der in dem obigen Beispiel aufgeführte analytische Ausdruck für die Polarisierbarkeit eines sphärischen Teilchens (siehe Gleichung 2.23) als grobe Näherung zu betrachten, da DNA kein sphärisches Partikel ist. Die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Dipolen, zum Beispiel im Fall benachbarter DNA Moleküle, werden komplett vernachlässigt. Der genaue Polarisationsmechanismus von DNA in Elektrolytlösungen ist bis heute noch nicht vollständig verstanden, so dass theoretische Vorhersagen über die Polarisierbarkeit  $\alpha(\omega)$  nur bedingt möglich sind. An der Existenz der Polarisierbarkeit selbst bestehen jedoch keine Zweifel. Ein einfaches Modell für die Ursache der Polarisierbarkeit basiert auf der Abschirmung eines geladenen Teilchens in einer Elektrolytlösung durch die entsprechenden Gegenionen [55, 56, 57, 58].

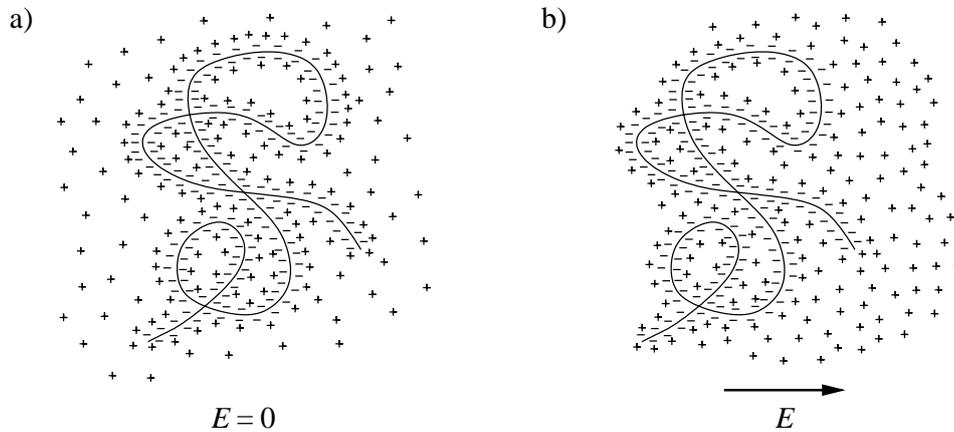


Abbildung 2.12: DNA Polarisierbarkeit (Modell)

Die Abbildung zeigt ein DNA Molekül in Lösung, das auf Grund seines negativ geladenen Rückgrats von einer beweglichen Wolke aus Gegenionen umgeben ist (a). Wird ein elektrisches Feld angelegt (b), kommt es zu einer Ladungsverschiebung, was ein einfaches Modell für die Polarisierbarkeit liefert.

Das DNA Molekül lässt sich als geladener Polyelektrolyt auffassen. Durch elektrostatische Anziehung zwischen den negativen Ladungen des Rückgrats und den positiven Gegenionen in der Elektrolytlösung bildet sich eine diffuse Schicht oder Ionenwolke um das DNA Molekül, welche die Ladung abschirmt (siehe auch Kapitel 2.3.1). Diese Ionenwolke wird durch Anlegen eines elektrischen Feldes deformiert und verschoben (siehe Abbildung 2.12), was zu einem induzierten Dipolmoment führt [58].

Es wird angenommen, dass die Polarisierbarkeit in besonderem Maße von den Eigenschaften der abschirmenden Ionenwolke bestimmt wird. Daher spielt neben Puffereigenschaften und Ionenkonzentration auch die Valenz der Gegenionen eine Rolle [12]. Die Beweglichkeit der Gegenionen kann zum Beispiel durch Überkreuzungen oder Verwindungen des DNA Moleküls beeinflusst werden [59]. Desweiteren existiert eine Frequenzabhängigkeit der Polarisierbarkeit  $\alpha(\omega)$  über einen weiten Frequenz-Bereich ( $10^1$ – $10^7$  Hz), was vor allem im kHz Bereich gut dokumentiert ist [12, 58, 60]. Im niederfrequenten Bereich (50-200 Hz) [55] zeigt DNA eine positive Polarisierbarkeit und damit positive Dielektrophorese.

Zusammengefasst ermöglicht die Polarisierbarkeit der DNA daher die gezielte Manipulation mittels Dielektrophorese. Dazu gehört u.a. das Fangen, Aufkonzentrieren und Separieren in geeigneten Systemen [11, 13, 55, 61].

### 2.3.4 Erzeugung räumlich inhomogener elektrischer Felder

Eine Standardvariante zur Erzeugung eines geeigneten inhomogenen Feldes in einem Mikrofluidik System besteht in der alternierenden Anordnung von Mikroelektroden, welche direkt mit einer Wechselspannungsquelle verbunden werden. Der größte Feldgradient tritt dabei an den Kanten der Elektroden auf (siehe Abbildung 2.13 a), wo sich Teilchen mit positiver Polarisierbarkeit fangen lassen [12, 58].

In dieser Arbeit wird eine andere Methode angewandt, die ohne Mikroelektroden auskommt und dementsprechend als *elektrodenlose Dielektrophorese* bezeichnet wird [51, 55]. Der elektrische Feldgradient entsteht hier bei einer angelegten Spannung (siehe Abbildung 2.13 b) durch eine geeignete Strukturierung des Mikrofluidik Kanals. Durch nichtleitende Hindernisse werden die elektrischen Feldlinien beim Durchtritt durch die Lücken eingeeengt.

Die elektrodenlose Dielektrophorese hat neben der relativ einfachen Herstellungsweise der Mikrofluidik Chips zwei wesentliche Vorteile gegenüber der Mikroelektroden Variante: Die Elektroden zur Spannungsversorgung befinden sich am Anfang und am Ende des Kanals (siehe Kapitel 2.3.5), so dass die Probenlösung im größten Teil des Mikrofluidik

Chips nur mit einem inerten Material, z. B. Glas oder Poly(dimethylsiloxan) (PDMS), in Kontakt kommt. Elektrochemische Reaktionen, z.B. Elektrolyse, können so innerhalb des Kanals vermieden werden. Der zweite Vorteil besteht in der räumlichen Konstanz des elektrischen Feldgradienten über die gesamte Kanalhöhe. Bei der Verwendung von Mikroelektroden sind die Bereiche mit ausreichend hohem Feldgradienten auf eine dünne Schicht über den Elektroden beschränkt.

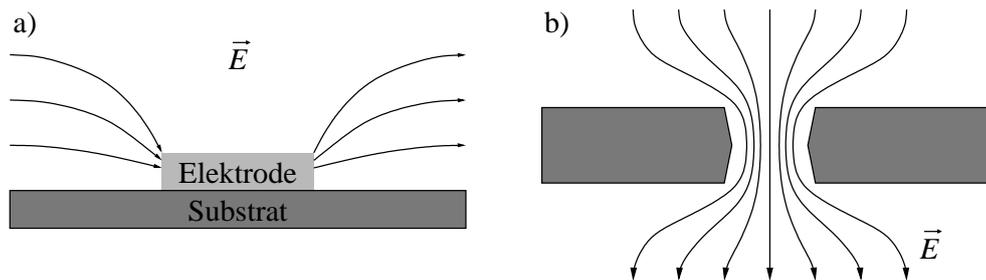


Abbildung 2.13: Dielektrophoretische Fallen

Teil a) der Abbildung zeigt das Prinzip einer dielektrophoretischen Falle, basierend auf Mikroelektroden. Der elektrische Feldgradient ist an den Elektrodenkanten maximal. Teil b) zeigt das Prinzip einer elektrodenlosen dielektrophoretischen Falle. Die elektrischen Feldlinien werden durch isolierende Hindernisse zusammengestaucht, was den notwendigen elektrischen Feldgradienten erzeugt.

Überträgt man die Situation der elektrodenlosen dielektrophoretischen Fallen auf das Bild einer „Energielandschaft“, so lassen sich die dielektrophoretischen Fallen in erster Näherung als rechteckige Potentialtöpfe darstellen, was in Abbildung 2.14 veranschaulicht wird. Die Tiefe  $\Delta W$  der Potentialmulden hängt von der Polarisierbarkeit der Objekte und der Amplitude des elektrischen Feldes ab. Die Position der Fallen wird durch die zugrunde liegende Mikrostruktur bestimmt.

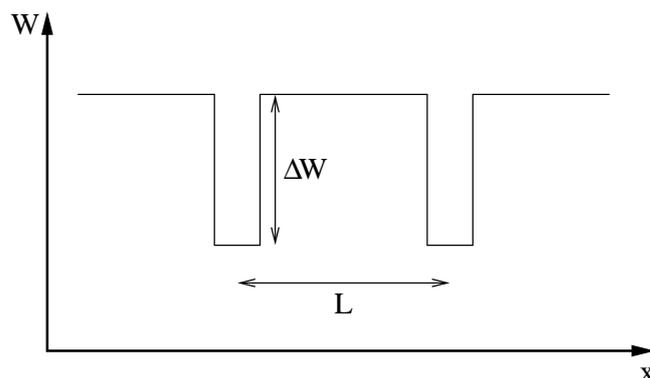


Abbildung 2.14: Potentielle Energie

Die Abbildung zeigt die potentielle „Energiewand“. Die Tiefe der Potentialmulden  $\Delta W$  hängt maßgeblich von der Amplitude des angelegten elektrischen Feldes ab.  $L$  bezeichnet den räumlichen Abstand in Feldrichtung zwischen zwei benachbarten dielektrophoretischen Fallen.

### 2.3.5 Quantitative Bestimmung elektrischer Felder in Mikrofluidiksystemen

Wird an einen Mikrofluidik Chip bekannter Struktur eine elektrische Spannung  $U$  angelegt, wie in Abbildung 2.15 dargestellt, so lassen sich auch ohne explizite Messungen Aussagen über die in den Kanälen vorliegenden Feldstärken treffen. Dazu wird die Geometrie des Mikrofluidikchips in ein äquivalentes elektrisches Ersatzschaltbild überführt, in welchem Kanäle als Widerstände und Kreuzungen als Knoten dargestellt werden [62].

Der elektrische Widerstand  $R_K$  eines mit einer Elektrolytlösung gefüllten Kanals  $K$  lässt sich unter der Annahme eines idealen Leiters durch seine Querschnittsfläche  $A_K$ , seine Länge  $L_K$  und den spezifischen Widerstand des Elektrolyten  $\rho_E$  ausdrücken:

$$R_K = \rho_E \frac{L_K}{A_K}. \quad (2.25)$$

Um eine Aussage über die elektrische Feldstärke in diesem Kanal zu treffen genügt es, das Verhältnis zwischen der Spannung  $U_K$ , die nach den Kirchhoff'schen Regeln über dem Ersatzwiderstand des Kanals abfällt, und der angelegten Gesamtspannung  $U$  zu bestimmen. Dieses Verhältnis der Spannungen lässt sich auf das Verhältnis der

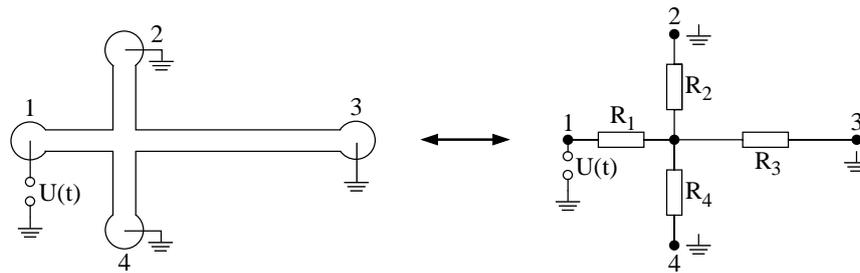


Abbildung 2.15: Ersatzschaltbild

Auf der linken Seite befindet sich die schematische Abbildung eines Mikrofluidik Chips mit typischer Beschaltung für die Injektion einer Probe (siehe Kapitel 3.5.1). Auf der rechten Seite ist das dazu äquivalente Ersatzschaltbild, in dem die Kanäle durch Widerstände und die Kreuzung durch einen Knotenpunkt ersetzt sind, dargestellt. Die Form des Ersatzschaltbildes mit mehrfachen Erdungspunkten dient zur Hervorhebung der Analogie.

betroffenen Ersatzwiderstände zurückführen, so dass folgende Beziehung gilt:

$$\vartheta = \frac{U_K}{U} = \frac{R_K}{R_{\text{ges}}}. \quad (2.26)$$

Dabei ist die Beschaltung des Mikrofluidik Chips zu beachten. Im Fall der in Abbildung 2.15 dargestellten Beschaltung entspricht  $R_{\text{ges}}$  der Summe aus dem Wert von  $R_1$  und dem der Parallelschaltung von  $R_2$  bis  $R_4$ . Um den Spannungsabfall über Kanal 2, 3 oder 4 zu bestimmen, muss ebenfalls der Wert dieser Parallelschaltung für  $R_K$  eingesetzt werden, da über allen an der Parallelschaltung beteiligten Widerständen die gleiche Spannung abfällt. Für den Spannungsabfall über  $R_1$  ist  $R_K = R_1$  zu setzen. Ein eventueller Spannungsabfall über den Reservoirs wird vernachlässigt, da diese im Vergleich zu den Mikrofluidik Kanälen über sehr große Querschnittsflächen verfügen.

Für den Fall, dass einer der Kanäle durch seine Strukturierung verringerte Querschnittsflächen aufweist, muss das in der Widerstandsberechnung berücksichtigt werden. Mehrere parallele Verengungen können dabei als eine größere Öffnung mit entsprechender Querschnittsfläche betrachtet werden. Diese Rechnungen sind auch ohne Kenntnis des spezifischen Widerstands des Elektrolyten möglich. Eine detaillierte Rechnung findet sich in Kapitel 4.1.3.

Da es sich bei all diesen Überlegungen um gerade Kanäle mit konstantem spezifischen Widerstand des Elektrolyten über die gesamte Kanallänge handelt, kann die Stärke

des im Kanal herrschenden elektrischen Feldes  $E_K$  nun durch folgende einfache Formel berechnet werden [63]:

$$E_K = \frac{U_K}{L_K} \stackrel{2.26}{=} \frac{\vartheta \cdot U}{L_K}. \quad (2.27)$$

## 2.4 Statistische Effekte

Neben den Druck- und den elektrokinetischen Effekten spielen auch statistische Prozesse und Effekte eine wichtige Rolle in Mikrofluidik Systemen. In diesem Kapitel wird dazu ein kurzer Überblick über die Brown'sche Bewegung, die Diffusion im Allgemeinen und die Kramers Rate gegeben.

### 2.4.1 Brown'sche Bewegung und Diffusion

Die Brown'sche Bewegung, benannt nach ihrem Entdecker, dem Botaniker Robert Brown (1827), beschreibt die thermisch getriebene Eigenbewegung von Teilchen in einem Medium (z.B. Gas oder Flüssigkeit). Die Ursache dieser ungerichteten Bewegung ist die thermische Energie ( $k_B T$ ), welche zu ständigen Stößen der Moleküle des umgebenden Mediums mit dem Teilchen führt. Unter einem *Brown'schen Teilchen* versteht man ein kleines Teilchen mit Radius im  $\mu\text{m}$ -Bereich oder kleiner, das aber deutlich schwerer und größer als die Moleküle des umgebenden Mediums ist. Die Zeitskala, auf der die Stöße auf molekularer Ebene stattfinden, liegt im Bereich von  $10^{-14}$  s und ist damit sehr viel kürzer als die Zeitskala der resultierenden mittleren Bewegung [64]. Die Bewegung des Teilchens und die dabei zurückgelegte mittlere Entfernung lässt sich vereinfacht mit Hilfe des sogenannten *random-walk*-Modells beschreiben. Dabei bewegt sich das Teilchen in statistisch unabhängigen und für alle Raumrichtungen gleichwahrscheinlichen Schritten durch das umgebende Medium.

Die Ergebnisse, die eine Herleitung für den eindimensionalen Fall liefert [39, 65], lassen sich leicht auf zwei oder drei Raumdimensionen erweitern, wobei hier nur die Annahmen und die Ergebnisse aufgeführt werden:

Unter der Annahme einer konstanten Schrittfolge mit der Schrittlänge  $l$  und der notwendigen Zeit  $t_S$  pro Schritt hat das Teilchen nach einem (längeren) Zeitraum  $t$  die Anzahl

$N = t/t_S$  Schritte zurückgelegt. Für den nach dieser Zeit  $t$  zurückgelegten mittleren quadratischen Weg  $\langle x_N^2 \rangle$  ergibt sich folgender Ausdruck:

$$\langle x_N^2 \rangle = N l^2 = \frac{l^2}{t_S} t.$$

Mit der Einstein-Smoluchowski-Beziehung  $D = \frac{l^2}{2t_S}$ , wobei  $D$  den Diffusionskoeffizienten bezeichnet, und auf  $d$  Raumdimensionen verallgemeinert lässt sich der zurückgelegte Weg  $R_d$  schreiben als:

$$\langle R_d^2 \rangle = 2d D t. \quad (2.28)$$

Der Diffusionskoeffizient ist ein Maß für die Antwort eines Systems auf einen Konzentrationsgradienten. Beispielsweise lässt sich, ohne den Einfluß eines äußeren Feldes, eine homogene Verteilung von Teilchen in einer Lösung betrachten: Wird eine Inhomogenität in dieser Lösung, etwa durch Hinzufügen von Teilchen an einer bestimmten Stelle, erzeugt, so entsteht ein Teilchenfluß  $\vec{j}$ , der bestrebt ist, den Gleichgewichtszustand wieder herzustellen. Dieser Fluß ist proportional zu dem erzeugten Konzentrations- bzw. Dichtegradienten mit dem Diffusionskoeffizienten als Proportionalitätsfaktor. Diese Beziehung wird auch als Fick'sches Gesetz bezeichnet,  $\vec{j} = -D\nabla\rho$ , wobei  $\rho$  für die Teilchendichte steht [65, 66].

### 2.4.2 Kramers Rate

Der Begriff der *Kramers Rate* stammt aus dem Umfeld der Reaktionsratentheorie, deren Anwendung unter anderem in der physikalischen Chemie weit verbreitet ist. Das ursprüngliche Kramers Problem beschreibt ein Brown'sches Teilchen, das sich in einem metastabilen Zustand befindet. Betrachtet man den überdämpften Fall, beispielsweise ein System mit starker Reibung, so dass Trägheitskräfte vernachlässigbar sind, kann die Bewegung des Teilchens in einer Dimension mit der *Langevin-Gleichung* in folgender Form beschrieben werden [67]:

$$f_r \frac{dx}{dt} = -\frac{dW(x)}{dx} + \xi(t).$$

Dabei bezeichnet  $f_r$  den Reibungskoeffizienten,  $W(x)$  das Kramers Potential und  $\xi(t)$  eine stochastische Kraft, die  $\langle \xi(t) \rangle = 0$  und  $\langle \xi(t)\xi(t') \rangle = 2 f_r k_B T \delta(t - t')$  erfüllt (*Gauss'sches weißes Rauschen*). Dabei kann es sich zum Beispiel um die aus den Stößen mit den Molekülen des umgebenden Mediums resultierende Kraft handeln [68].

Das stückweise harmonische Kramers Potential  $W(x)$ , was in Abbildung 2.16 dargestellt ist, lässt sich schreiben als [67, 68]:

$$W(x) - W(x_0) = \begin{cases} \frac{1}{2}\Omega_0^2 x^2 & \text{für } x \approx x_0, \\ W_B - \frac{1}{2}\Omega_B^2 (x - x_B)^2 & \text{für } x \approx x_B, \end{cases} \quad (2.29)$$

wobei sich die Ausgangsposition des Teilchens bei  $x_0$  befindet und  $\Omega_0^2$ , bzw.  $\Omega_B^2$  die Potentialkrümmungen  $\frac{d^2W(x)}{dx^2}$  bei  $x_0$ , bzw.  $x_B$  bezeichnen. Die Änderung des Kramers Potentials erfolgt auf einer Längenskala, die die Ausdehnung des Teilchens um ein Vielfaches übersteigt.

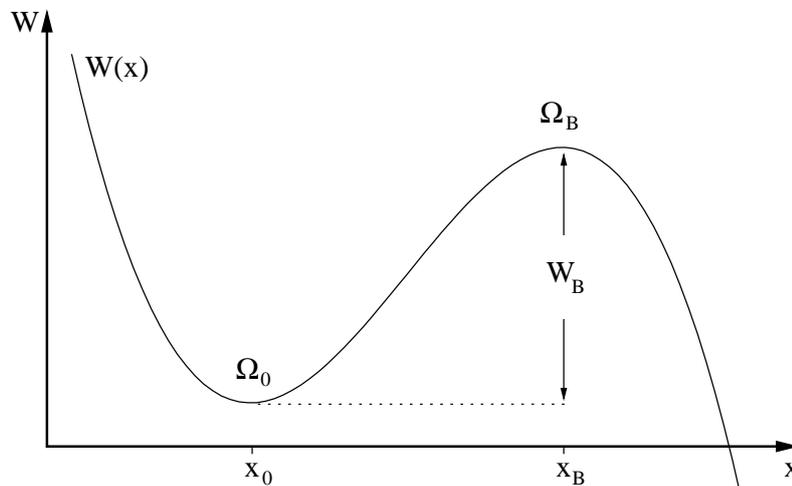


Abbildung 2.16: Kramers Potential

*Die Abbildung zeigt das stückweise harmonische Kramers Potential  $W(x)$  mit der Potentialbarriere der Höhe  $W_B$ . Die Krümmung an der jeweiligen Extremstelle wird durch  $\Omega_0$  und  $\Omega_B$  angegeben.*

Durch thermische Aktivierung kann das Teilchen die einschränkende Potentialbarriere der Höhe  $W_B$  überwinden. Ist jedoch das Verhältnis zwischen der thermischen Energie  $k_B T$  des Teilchens und der Höhe der Potentialbarriere  $W_B$  sehr klein, so kann der Überwindungsprozess als quasistationär betrachtet werden. Das bedeutet, dass die Überwindung der Potentialbarriere ein sehr seltenes Ereignis darstellt. Die Überwindungsrate  $\mathcal{R}_K$  lässt sich dann mit dem Ausdruck der Kramers Rate beschreiben:

$$\mathcal{R}_K = \frac{|\Omega_0 \Omega_B|}{2\pi f_r} \exp\left(-\frac{W_B}{k_B T}\right). \quad (2.30)$$

Dabei bezeichnet  $f_r$  wieder den Reibungskoeffizienten. Die Voraussetzung eines überdämpften Systems ist erfüllt, da auf Grund der geringen Größe und Masse der DNA Moleküle Trägheitseffekte im Vergleich zu Reibungskräften vernachlässigbar sind.

Alternativ lässt sich mit dem Inversen der Kramers Rate (siehe Gleichung 2.30) auch die Zeit  $\tau$  angeben, die ein Teilchen im Mittel zur Überwindung der Potentialbarriere benötigt, bzw. während der es in der Potentialmulde verweilt:

$$\tau \equiv \mathcal{R}_K^{-1} = \frac{2\pi f_r}{|\Omega_0 \Omega_B|} \exp\left(\frac{W_B}{k_B T}\right). \quad (2.31)$$

### 2.4.3 Kramers Rate für ein gekipptes dielektrophoretisches Potential

Das bereits in Kapitel 2.3.3 beschriebene dielektrophoretische Potential  $W$  hängt nach Gleichung 2.19 von der Amplitude eines sinusförmigen elektrischen Feldes  $\vec{E} \sin(\omega t)$  ab. Wird diesem Wechselfeld ein DC Feld überlagert, so kommt es auf Grund der Elektrophorese zu einer „Kippung“ des Potentials. Das DC Feld trägt zwar ebenfalls zu der Stärke der dielektrophoretischen Fallen bei (siehe Kapitel 2.3.3), jedoch ist sein Einfluß bei geringer Feldstärke im Vergleich zu einer großen Amplitude des AC Feldes vernachlässigbar.

Abbildung 2.17 zeigt die aus der Kippung resultierende Energielandschaft. Die Fallen sind hier nicht mehr als rechteckige Potentialtöpfe, sondern durch näherungsweise harmonische Potentialmulden dargestellt.

Die effektive Höhe der Potentialbarriere in Richtung der Kippung, die ein in einer Potentialmulde gefangenes Teilchen „spürt“, lässt sich schreiben als:

$$W_B = \Delta W - \Delta W_{DC}. \quad (2.32)$$

Dabei bezeichnet  $\Delta W_{DC}$  die elektrophoretisch bedingte Verringerung der Potentialbarriere und  $\Delta W$  den dielektrophoretischen Anteil (siehe Gleichungen 2.18 und 2.19). Dieser lässt sich unter der Annahme homogener elektrischer Felder in den Fallen  $\vec{E}_{\text{Falle}}$  und in den Zwischenräumen  $\vec{E}_{\text{ZR}}$  schreiben als [13]:

$$\begin{aligned} \Delta W &= \frac{1}{2} \alpha \left( \vec{E}_{\text{Falle}}^2 - \vec{E}_{\text{ZR}}^2 \right) \\ &\stackrel{2.18}{\propto} \alpha U_{AC}^2. \end{aligned}$$

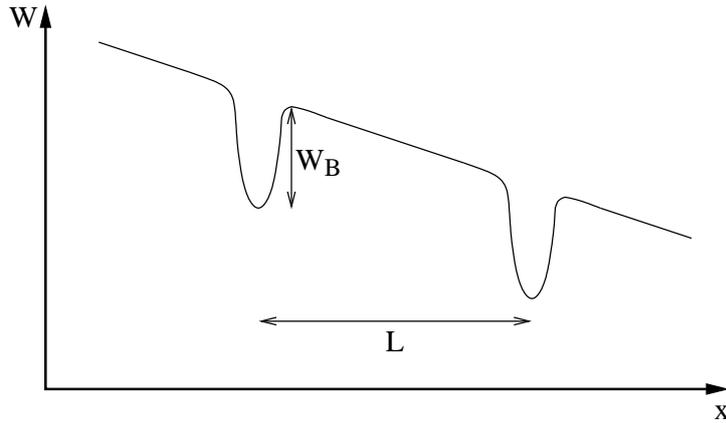


Abbildung 2.17: Energielandschaft

Die Abbildung zeigt schematisch das gekippte dielektrophoretische Potential. Die Falltiefe hängt von der Amplitude des AC Feldes, die Kippung von der Stärke des DC Feldes ab.  $L$  bezeichnet den Abstand benachbarter Fallen und  $W_B$  steht für die effektive Barrierenhöhe (siehe Haupttext).

Für die Potentialkrümmung  $\Omega(x)$  gilt dann unter Vernachlässigung des DC Anteils:

$$\Omega^2(x) = \frac{d^2 W(x)}{dx^2} \propto \alpha U_{AC}^2. \quad (2.33)$$

Mit diesem Ausdruck und Gleichung 2.32 lässt sich die mittlere Aufenthaltszeit  $\tau$  (siehe Gleichung 2.31) eines Teilchens in der Potentialmulde schreiben als:

$$\begin{aligned} \tau &= \frac{2\pi f_r}{|\Omega_0 \Omega_B|} \exp\left(\frac{W_B}{k_B T}\right) \\ &\propto \frac{2\pi f_r}{|\alpha U_{AC}^2|} \exp\left(\frac{\alpha U_{AC}^2}{2 k_B T}\right) \exp\left(-\frac{\Delta W_{DC}}{k_B T}\right). \end{aligned} \quad (2.34)$$

# 3 Materialien und Methoden

Dieses Kapitel enthält eine Auflistung aller verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte. Weiterhin wird der Prozess von der Strukturierung des Masterwafers über die Herstellung der Mikrofluidik Chips bis hin zu deren Einsatz im kompletten Messaufbau für verschiedene Messungen beschrieben.

## 3.1 Materialien und Chemikalien

Der zur Herstellung des Masterwafers notwendige Siliziumwafer (5 Zoll) wurde von CrysTec (Deutschland) erworben. Der Negativ-Fotolack SU-8, sowie der Verdünner  $\gamma$ -Butyrolaceton und der Entwickler Propylenglycolmethyletheracetat stammen von Microresist (Deutschland). Zur Reinigung des Wafers wurden konzentrierte Schwefelsäure p.A. ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) und Wasserstoffperoxid p.A. (30%,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) von Merck (Deutschland) verwendet. Die organischen Lösungsmittel Aceton p.A., Ethanol p.A. und Isopropanol p.A. stammen ebenfalls von Merck (Deutschland).

Poly(dimethylsiloxan) (PDMS, Sylgard 184) von Dow Corning (USA) und Tridecafluoro-1,1,2,2,-tetrahydrooctyl-1-trichlorsilan (TTTS) von ABCR (Deutschland) wurden für die Herstellung der Mikrofluidik Chips verwendet. Platin-Draht der Stärke 0,4 mm wurde bei VWR (Deutschland) erworben, Deckgläser bei Menzel-Gläser (Deutschland) und komprimierter Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) bei Linde (Deutschland).

Das für die Oberflächenbeschichtung der Mikrofluidik Chips eingesetzte bifunktionelle Poly(ethylenoxy)di(triethoxy)-Silan (SIL-3400) stammt von Nektar (USA). Die verwendete Plasmid DNA wurde von der Firma PlasmidFactory in Bielefeld (Deutschland) zur Verfügung gestellt. Zur Ansetzung der Pufferlösung wurden Phosphatpuffer, Natriumchlorid,  $\beta$ -Mercaptoethanol und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) von Fluka (Deutschland), 1,1'-(4,4,7,7-Tetramethyl-4,7-diazaundecamethylen)-bis-4-[3-methyl-2,3-dihydro-(benzo-1,3-oxazol)-2-methyliden]-quinoliniumtetraiodid (YOYO-1, Interkalator) von Molecular Probes (USA) und *Performance-optimized-polymer-6 %* (POP-6) von Applied Biosystems (USA) bezogen. Das für alle Lösungen verwendete deionisierte Wasser stammt aus einer Milli-Q Biocel Anlage von Millipore (USA).

## 3.2 Masterwaferherstellung

### 3.2.1 Strukturierung

Die Herstellung des Masterwafers erfolgt mit Hilfe des Kontaktlithographieverfahrens und ist schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt. Der Prozess folgt im Wesentlichen dem in [9] beschriebenen Verfahren.

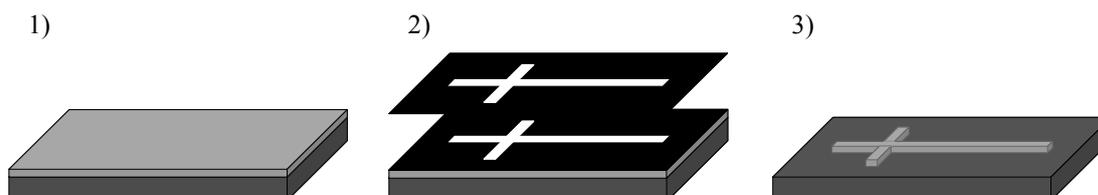


Abbildung 3.1: Mikrostrukturierung

*Die Abbildung zeigt den Mikrostrukturierungsprozess in vereinfachter Form: Der belackte Wafer (1) wird im Kontaktlithographieverfahren durch eine Chrom-Maske belichtet (2). Nach dem Entwickeln bleiben die belichteten Bereiche als Struktur bestehen (3).*

Der verwendete Siliziumwafer wird zunächst für ca. 15 Minuten in Caro'scher Säure, einem Gemisch aus Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid im Verhältnis 3:1, gereinigt. Um eine optimale Haftung des verwendeten SU-8 Negativ Fotolacks zu gewährleisten, wird der Wafer nach gründlichem Spülen mit deionisiertem Wasser zusätzlich in zwei Wasserbädern für jeweils 5 Minuten behandelt. Die Trocknung des Wafers erfolgt durch Trockenschleudern (30 s bei 3000 U/min, Schleudertyp: Delta 10, BLE GmbH, Deutschland) und ein anschließendes 20 minütiges Ausheizen auf einer elektrischen Heizplatte (Heizplatte HT-303D, ATV-Technologie, Deutschland) bei 200 °C.

Der Lack wird durch Aufschleudern (*spin-coating*) auf den Wafer aufgebracht, wobei die Stärke der Schicht von der Viskosität des Fotolacks, der Rotationsgeschwindigkeit und der Dauer des Aufschleuder-Prozesses abhängt (siehe [69]). Dabei kommt ein manueller Belacker von Convac (Schweiz, Modell 1001/ST147) zum Einsatz. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Nach der Belackung des Wafers wird der sogenannte *pre exposure bake* durchgeführt, gefolgt von dem eigentlichen Lithographieprozess, der Belichtung. Die dabei verwendeten Parameter finden sich ebenfalls in Tabelle 3.1. Die Belichtung des Fotolacks auf dem Wafer erfolgt durch eine Chrom-Maske (DeltaMask, Niederlande) in einem Parallel-

UV-Belichter (Modell 811, Oriel Corp., USA), welcher mit der i-Linie einer Quecksilberdampfdrucklampe (Wellenlänge: 365 nm) arbeitet. Um den Kontakt von belacktem Wafer und Chrom-Maske sicherzustellen, werden der Wafer und die Maske während der Belichtung in einer selbstkonstruierten *Anpresseinheit*<sup>1</sup> aufeinandergedrückt, welche im folgenden Kapitel 3.2.2 näher beschrieben wird. Die Belichtungszeit beträgt 12 Sekunden bei 3 bar Stempeldruck. Nach der Belichtung, die in dem verwendeten SU-8 Negativ-Fotolack an den belichteten Stellen eine Polymerisation induziert, erfolgt der sogenannte *post exposure bake* (Parameter siehe Tabelle 3.1), der dann an diesen Stellen zu einer Quervernetzung führt.

verwendeter Lack	Umdrehungen [min <sup>-1</sup> ]	pre exp. bake [min] @ 40/60/90 °C	Belichtung [sek]	post exp. bake [min] @ 40/60/90 °C
SU-8 (5)	2600	5/5/5	12	5/5/20

Tabelle 3.1: Kontaktlithographie – Prozessparameter

*Die Tabelle enthält die Parameter des Kontaktlithographieprozesses für die Herstellung des Masterwafers. Die erwartete Schichtdicke von etwa 5 µm resultiert aus den Parametern des spin-coatings und der verwendeten Konzentration des Fotolacks, SU-8 (5). Der Anpressdruck des Stempels der Anpresseinheit beträgt 3 bar.*

Der nächste Schritt besteht in der Entwicklung des belackten und belichteten Wafers. Dazu wird der Wafer für 130 Sekunden waagrecht in eine Schale mit dem SU-8 Entwickler gegeben. Nach der Entwicklungszeit werden der Entwickler und der gelöste Fotolack der unbelichteten Stellen durch Spülen mit Aceton und Isopropanol entfernt. Dazu wird der Wafer waagrecht gehalten und langsam vom Rand aus mit dem jeweiligen Lösungsmittel geflutet, um eine Unterspülung und Ablösung der belichteten Strukturen zu vermeiden. Die Trocknung des Wafers erfolgt durch ein abschließendes Abblasen mit Stickstoff.

Der vorletzte Schritt in der Masterwaferherstellung besteht im sogenannten *hardbake*, was zu der vollständigen Aushärtung der Strukturen führt. Dazu wird der Wafer für 20 Minuten auf 200 °C erhitzt. Zum Abschluss wird der bereits fertig strukturierte Wafer in der Gasphase silanisiert [70]. Dazu wird der Wafer in einem Exsikkator über einem

<sup>1</sup>Die Konstruktion der Anpresseinheit und der zugehörigen Steuerung erfolgte in enger Kooperation mit Dipl. Phys. Jan Regtmeier, Universität Bielefeld.

Uhrglas positioniert, auf das zuvor wenige Tropfen TTTS gegeben worden sind. Der Exsikkator wird 30 Minuten evakuiert und anschließend für eine Stunde in diesem Zustand belassen. Nach dem Belüften ist der Masterwafer für die Fabrikation der Mikrofluidik Chips bereit.

#### 3.2.2 Anpresseinheit

Der Zweck der Anpresseinheit besteht darin, das Auftreten eines luftgefüllten Zwischenraums zwischen Chrom-Maske und belacktem Wafer zu verhindern. Durch die daraus resultierende Optimierung des Kontakts von Maske und Wafer werden die durch Beugung und Interferenz hervorgerufenen Fehler in der Lackschicht verringert.

Die Anpresseinheit, deren schematische Darstellung in Abbildung 3.2 gegeben ist, besteht im Wesentlichen aus einem Aluminium Grundkörper, einem pneumatischen Stempel (Spannmodul EV-63-5, Festo, Deutschland), einer Gummidichtung und einem Aluminiumrahmen. Der pneumatische Stempel befindet sich innerhalb des Grundkörpers und trägt einen Teller aus Aluminium, auf welchen der belackte Wafer gelegt wird. Die Versorgung des Stempels mit Druckluft erfolgt durch eine druckfeste Schlauchdurchführung durch die Seitenwand des Grundkörpers. Im Verhältnis zum äußeren Rahmen des Grundkörpers ist die Aussparung für Stempel, Teller und Wafer von einer um 2,6 mm abgesenkten Auflagefläche für die Chrom-Maske umgeben. Über die Maske lässt sich eine Gummidichtung legen, welche in der Form zum Rahmen des Grundkörpers und zum Aluminiumrahmen passt. Der Aluminiumrahmen liegt auf der Gummidichtung und bildet den Abschluss der Anpresseinheit. Er wird mit acht Schrauben (M 6) auf dem Rahmen des Grundkörpers fixiert. Die so verbleibenden Hohlräume unter der Maske lassen sich durch eine weitere unterdruckfeste Schlauchdurchführung in der Seitenwand des Grundkörpers evakuieren.

Durch Einstellen der beiden Parameter, Überdruck im Stempel und Unterdruck in den Hohlräumen, lässt sich nun der Wafer von unten gegen die Chrom-Maske pressen. Beim Evakuieren der Anpresseinheit muss die dabei auf die Chrom-Maske wirkende Kraft ständig durch den Stempel kompensiert werden, um ein Zerbrechen der Maske zu verhindern.

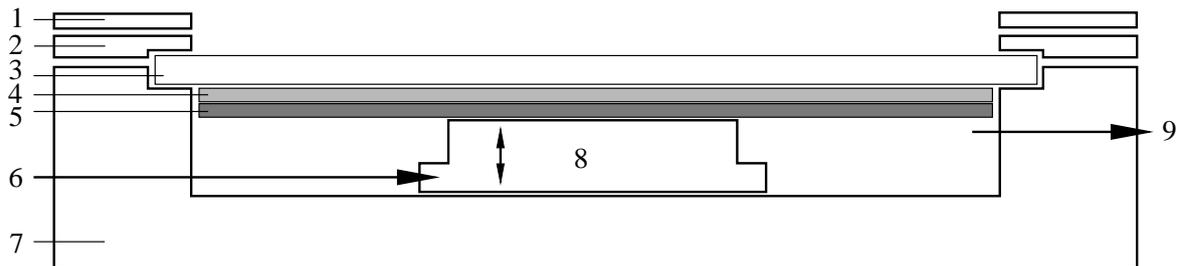


Abbildung 3.2: Anpresseinheit, schematisch

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der Anpresseinheit. Der Aluminiumrahmen (1) drückt die Dichtung (2) auf die Chrom-Maske (3) und den Rahmen der Anpresseinheit (7). Der Wafer (4) liegt auf einem Aluminiumteller (5), welcher auf dem Stempel (8) befestigt ist. Der Stempel kann mit Druckluft befüllt werden (6) und presst so den Wafer gegen die Maske. Der restliche Hohlraum wird über ein Ventil (9) evakuiert. Die Schrauben, die den Aluminiumrahmen auf dem Rahmen der Anpresseinheit fixieren, sind aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht eingezeichnet.

## 3.3 Mikrofluidik Chip

### 3.3.1 Fabrikation

Die Fabrikation der Mikrofluidik Chips, schematisch in Abbildung 3.3 dargestellt, beginnt mit dem Abformen des Masterwafers. Dazu werden 15 g PDMS mit 1,5 g Vernetzer gemischt und über den strukturierten Wafer gegossen. Nach dem Entweichen der beim Anmischen des Polymers entstehenden Luftblasen wird das PDMS in einem Trockenschrank (Modell ED 115, Binder GmbH, Deutschland) bei 85 °C für 4 Stunden ausgehärtet.

Nach dem Aushärten wird die PDMS Schicht vom Wafer abgezogen und mit der strukturierten Seite nach unten in den Deckel einer sauberen PE Schale gelegt. Die Reservoirs der Mikrofluidik Chips werden mit einem Mikroskop und einem daran befestigten Stanzer (Durchmesser: 2 mm) gestanzt. Dazu wird die PDMS Schicht in der PE Schale auf einem xy-Tisch mit Nonius unter dem Objektiv des Mikroskops positioniert, so dass sich die Reservoirs bis auf ca. 100  $\mu\text{m}$  genau platzieren lassen. Nach dem Stanzen wird das PDMS mit einem Skalpell zurechtgeschnitten.

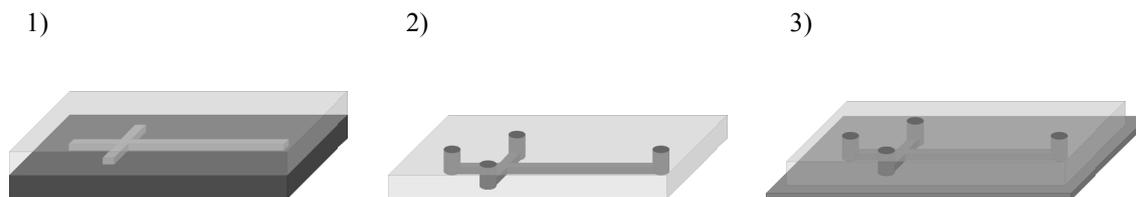


Abbildung 3.3: Mikrofluidikchip – Herstellung

*Die Abbildung zeigt schematisch den Herstellungsprozess des Mikrofluidik Chips: Der strukturierte Masterwafer wird mit flüssigem PDMS überzogen (1). In die aus der ausgehärteten PDMS Schicht ausgeschnittenen Mikrofluidik Chips werden Reservoirs gestanzt (2). Nach der Reinigung und der Oberflächenfunktionalisierung im Sauerstoffplasma werden die Mikrofluidik Chips mit PDMS-beschichteten Deckgläsern geschlossen (3).*

Um die Mikrofluidik Kanäle abzuschließen, werden mit PDMS beschichtete Deckgläser verwendet. Die Deckgläser werden mit Aceton, Ethanol und deionisiertem Wasser im Ultraschallbad gereinigt, dann mit Stickstoff abgeblasen und auf der Heizplatte bei 200 °C von den letzten Wasserresten befreit. Eine PDMS Beschichtung wird durch Aufschleudern von ca. 1 ml flüssigem PDMS mit dem manuellen Belacker (5 s bei 500 U/min zum Verteilen, anschließend 30 s bei 3000 U/min) und abschließendes Aushärten auf der Heizplatte (30 min bei 85 °C) hergestellt. Die Reinigung der PDMS Stücke, sowie der beschichteten Deckgläser, erfolgt ebenfalls mit Aceton, Ethanol und deionisiertem Wasser im Ultraschallbad. Getrocknet wird durch Abblasen mit Stickstoff.

Die gereinigten und getrockneten PDMS Stücke und die beschichteten Deckgläser werden vor dem Zusammenlegen einem Sauerstoffplasma ausgesetzt, so dass die späteren Kontaktflächen zwischen beiden Teilen sowie die Kanalinnenseiten oxidiert werden. Das Plasma wird in einer Anlage erzeugt, die in der Biophysik Gruppe konstruiert wurde (W. Hellmich, T. Duong) und die mit der in [71, 72, 73] verwendeten Anlage vergleichbar ist. Die zu oxidierenden Teile werden auf einem Aluminiumteller zwischen den beiden Elektroden (Plattenabstand: 6,15 cm) positioniert. Das Plasma wird von einer Teslaspule erzeugt (50 kV, 500 kHz) und bei 0,1 mbar Sauerstoffdruck für 30 s aufrecht erhalten. Nach der Oxidation werden die PDMS Stücke und die beschichteten Deckgläser mit den oxidierten Seiten aufeinandergelegt. Dadurch sind die Mikrofluidik Kanäle bis auf die Reservoirs abgeschlossen. Nach einer Wartezeit von ca. 60 min sind die Kontaktflächen kovalent verbunden und die damit fertig gestellten Mikrofluidik Chips können mit der Beschichtung befüllt werden.

Zur Überprüfung der Struktur und der Qualität der Mikrofluidik Kanäle wird auf ein PDMS Stück mit Kanal in einer Hochvakuum-Kleinbeschichtungsanlage (MCS 010, Bal-Tec, Liechtenstein) eine 20 nm dicke Platinschicht aufgesputtert. Die Untersuchung und Vermessung dieser Probe wird dann mit einem Rasterelektronenmikroskop (JSM-880, Jeol, Großbritannien) und der Software WinDISS (point electronic GmbH, Deutschland) vorgenommen.

### 3.3.2 Beschichtung und Befüllung

Die Beschichtung der Oberflächen im Kanalinneren erfolgt mit einer vor jedem Experiment frisch anzusetzenden Lösung von SIL-3400 ( $\approx 3 \mu\text{M}$ ) im Arbeitspuffer. Der Arbeitspuffer besteht aus 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,7), 2 mM NaCl, 1 mM EDTA und 0,1 % (Vol.) POP-6.

Die Befüllung erfolgt mit Hilfe des Unterdrucks einer Wasserstrahlpumpe. Nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten werden die Kanäle mit dem Arbeitspuffer gespült und die Beschichtungslösung durch den Arbeitspuffer ersetzt. Um ein Eintrocknen des Puffers zu verhindern, werden die Mikrofluidik Chips in einer geschlossenen PE Schale, deren Boden mit Wasser bedeckt ist, aufbewahrt.

## 3.4 Messaufbau

### 3.4.1 Elektrische Kontaktierung des Mikrofluidik Chips

Die Kontaktierung des Mikrofluidik Chips erfolgt über Platindrahtelektroden in den Reservoirs. Um eine reproduzierbare Kontaktierung und den sicheren Sitz der Elektroden zu gewährleisten, werden diese in einem Block ( $56 \times 80 \times 5 \text{ mm}^3$ ) aus Poly(methylmethacrylat) (PMMA, Plexiglas) dauerhaft fixiert:

In dem Plexiglas Block befinden sich senkrechte Bohrungen mit einem Durchmesser von 2 mm. Diese dienen zum einen der Reservoirvergrößerung des Mikrofluidik Chips und befinden sich daher an den entsprechenden Positionen. Zum anderen enthalten sie die Elektroden zur Kontaktierung. Die Elektroden werden durch dünne Bohrungen geführt, welche in einem Winkel von  $45^\circ$  zur Oberfläche ausgeführt sind und in die senkrechten Reservoirvergrößerungen münden. An der Oberfläche des Plexiglas Blocks sind die Elektroden mit einem Zwei-Komponenten Epoxid Kleber fixiert.

Die Befestigung des Plexiglasaufsatzes erfolgt nach Reinigung mit deionisiertem Wasser durch einfaches Andrücken auf dem Mikrofluidik Chip und ist reversibel. Eine schematische Darstellung der Kontaktierung befindet sich in Abbildung 3.4.

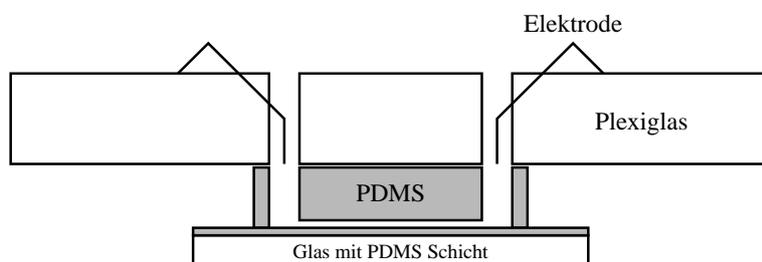


Abbildung 3.4: Kontaktierung des Mikrofluidik Chips

*Die Abbildung zeigt einen Schnitt durch den Mikrofluidik Chip und den im Haupttext näher beschriebenen Plexiglasaufsatz, der die Elektroden beinhaltet.*

Die elektrische Verbindung der Platinelektroden mit den Spannungsquellen erfolgt über Miniaturklemmen (MicroKleps, Conrad Elektronik, Deutschland). Bei den Spannungsquellen handelt es sich um zwei Geräte, HCL 14-12500, von FUG (Deutschland), welche über eine in LabView 6i (National Instruments, USA) geschriebene Software und eine passende Schnittstelle (PCI Messkarten, PCI-6704 und DAQ-6036E, National Instruments, USA) angesteuert werden. Die Erzeugung der für die Dielektrophoreseexperimente notwendigen Sinusspannung geschieht mittels eines Funktionsgenerators (DS 345, Stanford Research Systems, USA), der ebenfalls über die LabView Software gesteuert wird, und einen Hochspannungsverstärker (600H, NanoTechTools, Echandens, Schweiz).

#### 3.4.2 Fluoreszenzanregung und Detektion

Der Messaufbau besteht im Wesentlichen aus einem inversen Mikroskop (Axiovert200, Zeiss, Deutschland) und einer CCD Kamera (Imager 3L, LaVision, Deutschland baugleich mit SensiCam, PCO, Deutschland). Die Aufzeichnung des Videosignals erfolgt per Computer über die passende Videograbberkarte (SensiCam PCI Interface-Board, PCO, Deutschland) und die Bildauswertungssoftware DaVis V.6.2 (LaVision, Deutschland). Eine schematische Darstellung der wichtigsten Elemente des Aufbaus befindet sich in Abbildung 3.5.

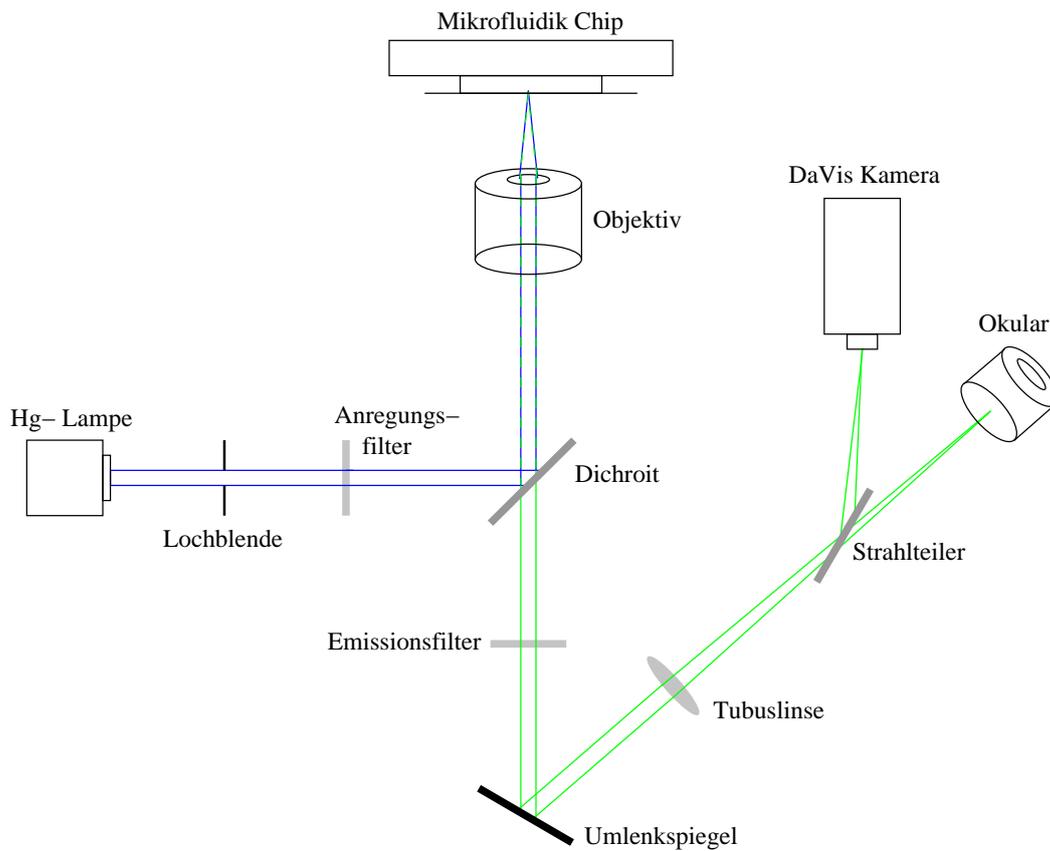


Abbildung 3.5: Versuchsaufbau

Die Abbildung zeigt schematisch die wichtigsten Bestandteile des Versuchsaufbaus.

Zur Fluoreszenzanregung dient das Licht einer Quecksilberdampfampe (HBO50, 50 W, Zeiss, Deutschland). Der Durchmesser des Lichtstrahls der Quecksilber-Kurzbogenlampe kann durch eine variable Lochblende eingestellt werden. Nach Passieren eines Anregungsfilters (BP 450 – 490, Zeiss, Deutschland) wird der Lichtstrahl von einem dichroitischen Spiegel (FT 510 Zeiss, Deutschland) umgelenkt und durch ein 100fach Öl-Immersionsobjektiv (Plan Neofluar, NA 1.3, Zeiss, Deutschland) in den Mikrofluidik Chip fokussiert. Die Positionierung des Mikrofluidik Chips wird mit Hilfe eines motorisierten xy-Tisches (99S008, Ludl Electronic Products, USA) vorgenommen.

Das durch das Objektiv gesammelte Fluoreszenzlicht wird durch den dichroitischen Spiegel und durch einen Emissionsfilter (BP 515 – 565, Zeiss, Deutschland) geleitet, bevor es zur CCD Kamera oder zum Okular umgelenkt wird.

## 3.5 Durchführung der Experimente

Vor der Durchführung der eigentlichen Experimente wird der Arbeitspuffer aus den Reservoirs der Mikrofluidik Chips entfernt. Ein Mikrofluidik Chip wird mit dem Plexiglasaufsatz versehen (siehe Kapitel 3.4.1) und dann befüllt. Die Reservoirs 1,3 und 4 (siehe Abbildung 3.6) werden mit jeweils  $13 \mu\text{l}$  Arbeitspuffer versehen, Reservoir 2 dient zur Aufnahme der DNA Lösung ( $13 \mu\text{l}$ ). Die DNA Lösungen werden durch Verdünnen der verschiedenen Stammlösungen mit Arbeitspuffer hergestellt, die verwendeten DNA Konzentrationen werden bei den jeweiligen Versuchen aufgeführt. Bei den weiteren Bestandteilen der DNA Lösungen handelt es sich um 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,7), 2 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % (Vol.) POP-6 und 0,2 % (vol.)  $\beta$ -Mercaptoethanol. Weiterhin wird den DNA Lösungen YOYO-1 in einem theoretischen Verhältnis von einem YOYO-1 Molekül zu 10 Basenpaaren hinzugefügt.

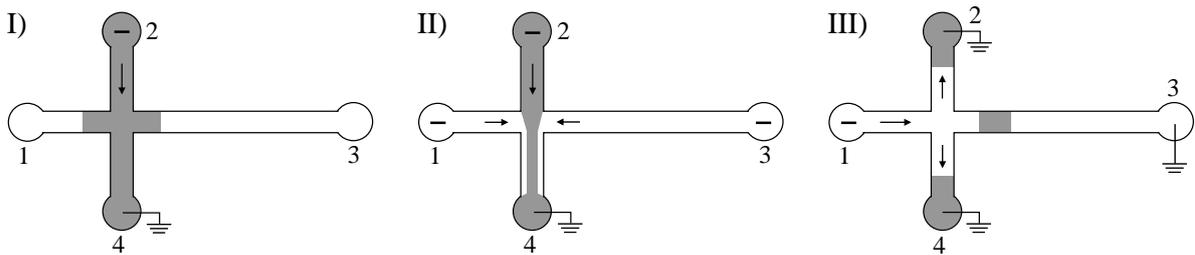
### 3.5.1 Injektion

Um ein definiertes Probenvolumen zu einem definierten Zeitpunkt in den Mikrokanal zu injizieren wird das Verfahren der *pinched injection* (siehe Abbildung 3.6) [74, 75] angewandt. Hierbei handelt es sich um eine Standardinjektionsmethode für Mikrofluidikanwendungen. Durch Anlegen geeigneter elektrischer Potentiale lässt sich das Probenvolumen in der Kreuzung einengen und in den strukturierten Mikrokanal (Separationskanal) injizieren. Die verwendeten Injektionsparameter können situationsabhängig variiert werden. Ein Beispielsatz Injektionsparameter ist in Tabelle 3.2 gegeben.

	$U_1$ [V]	$U_2$ [V]	$U_3$ [V]	$U_4$ [V]
<i>pinching</i>	- 36	- 35	- 70	0 (Erdung)
Injektion	- 12	0 (Erdung)	0 (Erdung)	0 (Erdung)

Tabelle 3.2: Injektionsparameter

*Die Tabelle enthält einen Beispielsatz Injektionsparameter. Die Nummerierung der angelegten Spannungen entspricht der Reihenfolge der Reservoirs in Abbildung 3.6.*

Abbildung 3.6: Injektion (*pinched injection*)

Die Abbildung zeigt die Injektion eines definierten Probenvolumens durch die *pinched injection* Methode: In Bild I wird die DNA aus dem Analytreservoir 2 elektrokinetisch in das Restereservoir 4 transportiert. Durch Anlegen negativer Potentiale an den Reservoirs 1 und 3 lässt sich das Probenvolumen an der Kreuzung einengen (*pinching*, Bild II). Ein negatives Potential an Reservoir 1 und die Erdung der Übrigen führt zur Injektion des Kreuzungsvolumens in den Mikrokanal (Bild III).

### 3.5.2 Bestimmung der mittleren Migrationszeit

Vor der Injektion und den folgenden Messungen wird die DNA durch die Kreuzung gepumpt. Dann wird die angelegte Spannung abgeschaltet und die Flüssigkeit im Kreuzungsbereich anhand der DNA Moleküle auf Strömungen (*Drift*) überprüft. Durch geeignetes Auffüllen der Reservoirs mit Arbeitspuffer werden die eventuell auftretenden hydrodynamisch bedingten Strömungen eliminiert.

Die Injektion der DNA erfolgt dann mit der *pinched injection* Methode (siehe Kapitel 3.5.1). Im letzten Schritt der Injektion wird die DNA elektrophoretisch durch den strukturierten Mikrokanal getrieben. Der dabei angelegten Gleichspannung ( $U_{DC} = 12 \text{ V}$ ) wird eine sinusförmige Wechselspannung mit der festen Amplitude  $U_{AC}$  und der festen Frequenz  $\omega$  überlagert. Die Einflüsse der Amplitude und der Frequenz werden in Kapitel 4.2 beschrieben und diskutiert.

Gleichzeitig mit der Injektion wird die Aufnahme der Messdaten gestartet. Dazu wird ein festes Beobachtungsfenster im strukturierten Mikrokanal gewählt, das sich zwei Pfostenreihen (ca.  $20 \mu\text{m}$ , siehe Kapitel 4.1.1) in Injektionsrichtung hinter der Kreuzung befindet. Der Abstand zu beiden Seitenwänden des Kanals beträgt ebenfalls jeweils ca.  $20 \mu\text{m}$ . Die Aufzeichnung erfolgt über die CCD Kamera und die DaVis Software mit 10 Bildern pro Sekunde (10 fps).

Die aufgezeichneten Bilder (*frames*) werden mit der freien Software ImageJ (Wayne

Rasband, National Institutes of Health, USA) ausgewertet. Die Migrationszeit  $t_{\text{Migration}}$ , die ein DNA Molekül von einer Falle zur nächsten benötigt, wird manuell durch die zeitliche Differenz der Bilder vom Eintritt in die erste Falle ( $\text{frame}_1$ ) und in die darauf folgende Falle ( $\text{frame}_2$ ) bestimmt. Die Bestimmung der Migrationszeit erfolgt durch die Differenzbildung der Eintrittszeiten in zwei aufeinanderfolgende Fallen:

$$t_{\text{Migration}} = \frac{\text{frame}_2 - \text{frame}_1}{10 \text{ fps}}. \quad (3.1)$$

Bei allen Zeitmessungen wird eine DNA Konzentration von  $c_{\text{DNA}} = 30 \text{ pM}$  verwendet.

### 3.5.3 Separationsexperimente

Wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, werden zunächst eventuell vorhandene Strömungen beseitigt. Die Aufzeichnung der Messdaten beginnt wieder gleichzeitig mit der Injektion, welche ebenfalls mit der *pinched injection* Methode durchgeführt wird. Das Beobachtungsfenster befindet sich jedoch zu Beginn der Messung am Ende des Separationskanals. Während die DNA durch die angelegte Gleichspannung  $U_{\text{DC}} = 12 \text{ V}$  elektrophoretisch durch den Trennkanal transportiert wird, wird der Gleichspannung eine sinusförmige Wechsellspannung der festen Frequenz  $\omega$  überlagert. Die Amplitude der Wechsellspannung  $U_{\text{AC}}$  wird jeweils nach einem festen Zeitschritt  $t_{\text{ink}}$  um ein Spannungsincrement  $U_{\text{ink}}$  gesteigert, so dass eine Spannungsrampe entsteht. Am Ende der Spannungsrampe wird die Amplitude der Wechsellspannung auf den maximalen Wert  $U_{\text{AC}} = 420 \text{ V}$  fixiert und die Gleichspannung abgeschaltet ( $U_{\text{DC}} = 0$ ).

Der xy-Tisch und damit auch das Beobachtungsfenster wird nun mit dem Schrittmotor mit einer Scangeschwindigkeit von  $v_{\text{Scan}} = 40 \text{ }\mu\text{m/s}$  in Richtung der Mikrokanalkreuzung gefahren. Die dabei mit 5 fps aufgenommenen Bilder werden mit einem Skript, geschrieben in der DaVis Software eigenen Skriptsprache, in ein Elektropherogramm umgewandelt, was unter Berücksichtigung der Scangeschwindigkeit und der Bildrate in einen Intensitätsplot überführt wird. Darin ist die Fluoreszenzintensität gegen die Position im Mikrofluidik Kanal aufgetragen.

Bei allen Separationsexperimenten wird, falls nicht anders angegeben, eine DNA Konzentration von  $c_{\text{DNA}} = 300 \text{ pM}$  verwendet.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Die folgenden Kapitel beinhalten eine Beschreibung und Diskussion der erzielten Ergebnisse. Kapitel 4.1 ist den Eigenschaften der hergestellten Mikrofluidik Chips gewidmet. In Kapitel 4.2 werden die dielektrophoretischen Fallen und die Ergebnisse der Polarisierbarkeitsmessungen betrachtet. Das letzte Kapitel 4.3 beschäftigt sich aufbauend auf den zuvor diskutierten Ergebnissen mit den durchgeführten DNA Separationen. Es enthält weiterhin eine Hypothese bezüglich möglicher Konformationsunterschiede in der Plasmid DNA, die eine plausible Erklärung einiger Beobachtungen ermöglicht (siehe Kapitel 4.3.3).

### 4.1 Eigenschaften der Mikrofluidik Chips

In diesem Kapitel werden die strukturellen Eigenschaften der Mikrofluidik Chips und der Einfluss der Oberflächenbeschichtung beschrieben. Des Weiteren erfolgt die Berechnung der elektrischen Feldstärke innerhalb des strukturierten Mikrokanals.

#### 4.1.1 Strukturelle Eigenschaften

Die wichtigste Voraussetzung für ein erfolgreiches Experiment ist ein funktionsfähiger und reproduzierbarer Mikrofluidik Chip. Die Reproduzierbarkeit des PDMS Chips ist durch das Abformen vom Masterwafer gegeben. Der Master-Wafer erhält durch das abschließende Silanisieren eine Art „Anti-Haft-Beschichtung“, so dass sich die PDMS Schichten nach dem Aushärten problemlos abziehen lassen. Die Funktionsfähigkeit beruht im Wesentlichen auf einer fehlerlos und vollständig ausgebildeten Strukturierung. Die Bedeutung dieses Punktes wird beim Abschließen des Mikrofluidik Chips mit einem PDMS-beschichteten Deckglas deutlich, da hier nicht vollständig ausgebildete Hindernisse zu unerwünschten Zwischenräumen zwischen Pfosten und Deckglas führen, welche dann nachfolgende Experimente beeinträchtigen.

Zur Charakterisierung und Beurteilung der Struktur dienen die angefertigten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen. Abbildung 4.1 zeigt die schematische Darstellung

mit Beschaltung des Mikrofluidik Chips, worauf im weiteren Verlauf dieses Kapitels noch eingegangen wird, und eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (REM Bild) eines abgeformten PDMS Stücks im strukturierten Kanal. Sowohl die Kanalwände als auch die Hindernisse sind sehr gut ausgebildet, so dass periodische Reihen von Hindernissen (*Pfosten*) und Durchgängen (*Fallen*) entstehen. Die Strukturierung beginnt direkt hinter der Kreuzung und endet im Reservoir drei. Somit ist eine maximale „Arbeitsstrecke“, bzw. Trennstrecke, für die weiteren Versuche gegeben. Die Länge dieser Strecke beträgt 5 mm, was einer Anzahl von ca.  $379 \pm 10$  Pfosten-Reihen entspricht. Die Unsicherheit in dieser Anzahl entsteht durch das manuelle Stanzen des dritten Reservoirs. Jede Reihe besteht aus 10 Pfosten, von denen die äußeren beiden mit den Kanalwänden abschließen, und dementsprechend neun Fallen.

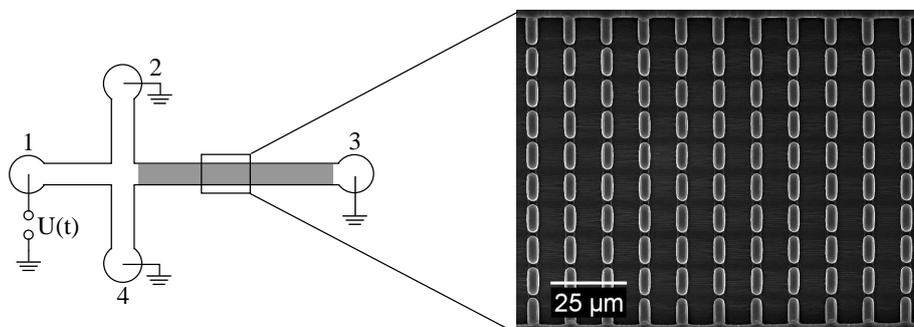


Abbildung 4.1: Mikrofluidik Chip, Übersicht

*Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Mikrofluidik Chips und seine elektrische Beschaltung. Bei dem Ausschnitt aus dem grau eingefärbten strukturierten Teil des Kanals handelt es sich um eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der hergestellten Mikrostruktur. Die periodischen Reihen von Hindernissen und Durchgängen sind gut zu erkennen.*

Bei Abbildung 4.2 handelt es sich um eine weitere rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Pfosten. Die weißen Balken markieren wichtige Abmessungen, deren Werte in Tabelle 4.1 aufgeführt sind. Bei den gemessenen Werten handelt es sich um Mittelwerte über jeweils drei Messwerte aus den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen. Der Fehler, bedingt durch die Ablesungenauigkeit und die Eichunsicherheit des Rasterelektronenmikroskops, ist mit 5 % angesetzt. Die Sollwerte entsprechen den Abmessungen der Strukturen auf der Chrommaske.

In Abbildung 4.2 ist zu erkennen, dass die Ecken der Pfosten nicht mehr eckig sondern abgerundet erscheinen. Die sichtbare obere Seite der Pfosten wird, bedingt durch den Fabrikationsprozess, durch die Vertiefungen im strukturierten Fotolack geformt. An diesen Stellen hat das Licht beim Belichtungsschritt bereits den weitesten Weg zurückgelegt, so dass hier Fehler, die durch Beugung und Reflexion an der Waferoberfläche bedingt sind, am stärksten hervortreten.

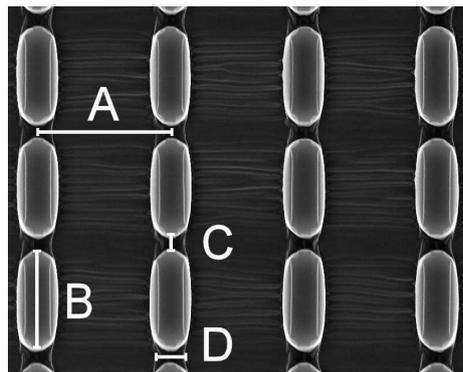


Abbildung 4.2: Strukturmaße, REM Aufnahme

Strukturmaß		Sollwert [ $\mu\text{m}$ ]	Messwert [ $\mu\text{m}$ ]
Periode	A	13	$12,4 \pm 0,6$
Pfostenlänge	B	10	$8,9 \pm 0,4$
Fallenbreite	C	1	$1,6 \pm 0,1$
Pfostenbreite	D	3	$2,6 \pm 0,1$
<i>Kanalbreiten:</i>			
strukturiertes Kanal	—	110	$112,0 \pm 5,6$
Seitenkanäle	⊥	100	$94,4 \pm 4,7$
Strukturhöhe		5	$5,0 \pm 0,2$

Tabelle 4.1: Strukturmaße, Soll- und Messwerte

*Die Abbildung zeigt eine REM Aufnahme der Pfosten im Separationskanal. Die Werte der markierten Strukturmaße befinden sich in der Tabelle.*

Die Abweichungen zwischen den gemessenen und den vorgegebenen Werten beruhen ebenfalls hauptsächlich auf Beugungseffekten, die beim Belichten des Fotolacks auftreten. Weitere Ursachen können in der Belichtungszeit, in Reflexionen an der Wafer-

oberfläche und in dem Kontakt zwischen belacktem Wafer und Chrommaske liegen. Vor allem der letzte Punkt ist kritisch, da bereits ein kleiner Spalt zwischen Maske und Wafer beim Belichten die Beugungs- und Interferenzeffekte verstärkt, was letztlich zu Strukturfehlern in der Fotolackschicht führt, welche sich durch den Abformungsprozess in die Mikrofluidik Chips übertragen. Das Problem eines nicht optimalen Kontaktes zwischen Maske und Wafer wird durch die verwendete Anpresseinheit weitestgehend unterdrückt, da ein eventuell zwischen Maske und Wafer auftretender Zwischenraum minimiert wird.

### 4.1.2 Oberflächenbeschichtung

Die Behandlung der PDMS Mikrofluidik Chips mit dem Sauerstoffplasma (siehe Kapitel 3.3.1) führt zu einer Oxidation der Oberflächen, welche sich dann beim Zusammenlegen kovalent verbinden. Dadurch ist der Mikrofluidik Chip bis auf die Reservoirs „dicht“. Eine weitere Konsequenz der Plasmabehandlung ist der Verlust der Hydrophobizität des PDMS [76]. Durch die verringerte Hydrophobizität erfolgt die Befüllung der Kanäle bereits durch Kapillarkräfte, da die Plasmabehandlung den Kontaktwinkel zwischen PDMS und Wasser von ca.  $115^\circ$  auf weniger als  $10^\circ$  reduziert und damit die Benetzung ermöglicht [72] (siehe Kapitel 2.2.2). Um Lufteinschlüsse und damit eventuell unbeschichtete Stellen an der Kanaloberfläche zu vermeiden, wird zusätzlich eine Wasserstrahlpumpe eingesetzt (siehe Kapitel 3.3.2).

Die verwendete Beschichtung (SIL 3400) zeigt zwei gewünschte Eigenschaften: Erstens vermindert die Beschichtung die Adsorption der DNA an den Kanaloberflächen. Adsorbierte DNA Moleküle verfälschen ortsabhängige Messungen der Fluoreszenzintensität, welche bei den Separationsexperimenten durchgeführt werden. Zweitens reduziert sie den elektroosmotischen Fluß: Nach [72] verringert sich beim Einsatz der oben genannten Beschichtung die Geschwindigkeit des EOF von  $(2,9 \pm 0,1)$  auf  $(0,7 \pm 0,1) \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , was einer Reduktion um 75 % entspricht. Die Reduktion des elektroosmotischen Flusses verhindert unerwünschte Nebeneffekte in der Nähe der Kanaloberflächen, wie zum Beispiel die Bewegung einzelner DNA Moleküle entgegen der elektrophoretischen Migrationsrichtung. Dieses Phänomen lässt sich vereinzelt nach längerem Betrieb eines Mikrofluidik Chips beobachten.

### 4.1.3 Elektrische Feldstärke im Mikrofluidik Chip

Die Kontaktierung der Mikrofluidik Chips erfolgt, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, mit Hilfe eines Plexiglasaufsatzes. Dieser garantiert durch die fixe Position der Platinelek-

troden eine reproduzierbare Spannungsversorgung. Ein weiterer Vorteil dieses Aufsatzes liegt in seiner reservoirvergrößernden Eigenschaft. Das Eliminieren einer Drift ist durch einfaches Pipettieren möglich, da sich so die Füllhöhe in den vergrößerten Reservoirs leicht einstellen lässt (siehe Kapitel 3.5.2). Druckeffekte und daraus resultierende Strömungen, welche durch die Oberflächenspannung von Wassertropfen unterschiedlicher Größe auf den Reservoirs verursacht werden würden (vergleiche Kapitel 2.2.3), können somit weitestgehend unterdrückt werden.

Um die Stärke des elektrischen Feldes innerhalb der Fallen in Abhängigkeit der angelegten Spannung zu berechnen, wird der Spannungsabfall über einer Falle mit Hilfe der Kirchhoff'schen Gesetze bestimmt und ins Verhältnis zur angelegten Gesamtspannung gesetzt (siehe Kapitel 2.3.5, [13]). Mit einer wie in Abbildung 2.15 und Abbildung A.1 angelegten Spannung  $U$  ergibt sich ein Spannungsabfall von

$$6,2 \cdot 10^{-4} \cdot U$$

an jeder Fallenreihe. Der mit der Gauss'schen Fehlerfortpflanzung bestimmte Fehler beträgt etwa 7 % und ist auf die Ungenauigkeiten in den Strukturmaßen zurückzuführen. Die genaue Rechnung befindet sich im Anhang A.1.

Mit dem Ergebnis für den Spannungssabfall (siehe Gleichung A.1), der gemessenen Fallenlänge  $L_F = 2,6 \mu\text{m}$  und Gleichung 2.27 lässt sich nun die mittlere elektrische Feldstärke innerhalb der Falle abschätzen:

$$E_{\text{Falle}} \approx 238 \cdot U \text{ m}^{-1}. \quad (4.1)$$

Bei dieser Berechnung der elektrischen Feldstärke handelt es sich um ein einfaches Modell (siehe Kapitel 2.3.5), das auf folgenden Annahmen basiert: Das mit einer Elektrolytlösung gefüllte Mikrofluidik System lässt sich durch ein elektrisches Ersatzschaltbild darstellen, in dem die Kanäle als Widerstände auftreten. Dabei werden die Flüssigkeit als idealer Leiter und die Pfosten als ideale Isolatoren angesehen. Es wird davon ausgegangen, dass das elektrische Feld sowohl im Raum zwischen den Fallenreihen als auch in den Fallen homogen ist. In der Realität wird es jedoch auf Grund des Übergangs zwischen Fallen und Zwischenräumen Verzerrungen und Inhomogenitäten geben, so dass für die berechnete Feldstärke  $E_{\text{Falle}}$  ein systematischer Fehler von 20 % angenommen wird.

## 4.2 Polarisierbarkeit von DNA

### 4.2.1 Dielektrophoretische Fallen

Zum Fangen von DNA Molekülen, zur Bestimmung der Polarisierbarkeit der DNA und für die Separationsexperimente werden elektrodenlose, dielektrophoretische Fallen verwendet (siehe Kapitel 2.3.3).

Die Zeitabhängigkeit der angelegten Wechselspannung  $U(t) = U_{AC} \sin(\omega t)$  führt auf Grund der Proportionalität der elektrischen Feldstärke zur angelegten Spannung (siehe Kapitel 2.3.3 und Gleichung 4.1) zu einem ebenfalls zeitabhängigen inhomogenen elektrischen Feld der Form  $\vec{E} \sin(\omega t)$ . In der hier verwendeten Mikrostruktur ist die räumliche Periodizität der Potentialmulden eine Folge der Strukturierung des Mikrofluidik Kanals.

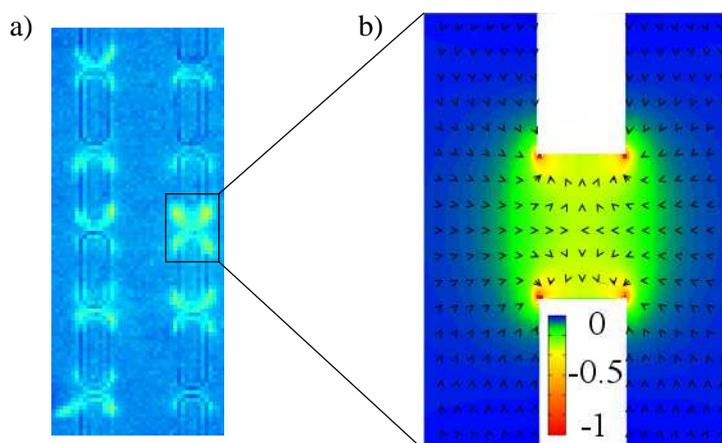


Abbildung 4.3: DNA in dielektrophoretischer Falle

Die Abbildung (a) zeigt gefangene 21 kbp Plasmid DNA in den dielektrophoretischen Fallen des Mikrofluidik Chips ( $U_{AC} = 276 \text{ V}$ ,  $\omega = 60 \text{ Hz}$ ). Teil b) (aus [13]) veranschaulicht die Ergebnisse einer numerischen Simulation des elektrischen Feldes in einer Falle. Die Pfeile weisen in Richtung der auf die DNA wirkenden dielektrophoretischen Kraft und die Stärke der potentiellen Energie, mit Minima an den Ecken der Pforten, ist durch den Farbverlauf gekennzeichnet (willkürliche Einheiten).

Die zwischen den Pforten gefangene DNA ist in Abbildung 4.3 a) gut zu erkennen, was bestätigt, dass DNA unter den gegebenen Bedingungen positive Dielektrophorese zeigt. Es handelt sich hierbei um eine Aufnahme des verwendeten 21 kbp Plasmids im

Mikrofluidik Kanal bei einer angelegten Wechselspannung von  $U_{AC} = 276$  V und einer Frequenz von  $\omega = 60$  Hz.

Teil b) der Abbildung 4.3 zeigt die graphische Darstellung einer numerischen Simulation des elektrischen Feldes im Bereich einer Falle [13]. Die Pfeile weisen in Richtung der, auf die DNA wirkenden, dielektrophoretischen Kraft und die Farbschattierung entspricht der Stärke der potentiellen Energie  $W$  in willkürlichen Einheiten (siehe Gleichung 2.19). Die Potentialminima befinden sich an den Ecken der Pfosten am Ein- und Ausgang der Falle. An diesen Stellen existiert der stärkste elektrische Feldgradient, so dass die DNA Moleküle dort auch die größte dielektrophoretische Kraft erfahren. Die gefangene DNA lässt sich hier beobachten (vergleiche Abbildung 4.3 a).

## 4.2.2 Polarisierbarkeitsmessungen

Das Ziel dieses Kapitels ist die quantitative Bestimmung der Polarisierbarkeit  $\alpha$  für verschiedene Plasmid DNA Längen. Da aber weder die Polarisierbarkeit  $\alpha$  noch das Potential  $W$  direkt messbar ist, erfolgt die Bestimmung von  $\alpha$  durch die Fallenaufenthaltsdauer  $\tau$  (siehe Gleichung 2.31). Diese liefert nach wenigen Rechnungen, die im weiteren Verlauf dieses Kapitels ausgeführt werden, einen Zusammenhang zwischen einer messbaren Zeit, der angelegten Wechselspannung  $U_{AC}$  und der Polarisierbarkeit  $\alpha$ . Die Überlagerung des AC und des DC Feldes (siehe Kapitel 2.4.3) wird durch die Überlagerung der Wechselspannung  $U_{AC}$  und der Gleichspannung  $U_{DC}$  realisiert. Die resultierende zeitabhängige Spannung  $U(t) = U_{AC} \sin(\omega t) + U_{DC}$  führt zu einer Migration der DNA durch den Mikrofluidik Kanal, die durch dielektrophoretische Fallen verlangsamt werden kann: Mit steigender Amplitude  $U_{AC}$  nimmt auch die Stärke der Fallen und damit die Retardation der DNA zu, da das Entkommen durch thermische Aktivierung zunehmend erschwert wird. Die entsprechende Energielandschaft aufeinanderfolgender Fallen in Migrationsrichtung ist vereinfacht in Abbildung 2.17 (Kapitel 2.4.3) dargestellt. Mit anderen Worten wächst mit steigender Amplitude das Verhältnis von dielektrophoretischer zu elektrophoretischer Kraft, was eine messbare, steigende Fallenaufenthaltsdauer  $\tau$  zur Folge hat. Die DNA kann dabei während des gesamten Migrationsprozesses, auch beim Entkommen aus den Fallen, näherungsweise als globuläres Teilchen angesehen werden [13].

Die Höhe der Potentialbarriere (siehe Kapitel 2.4.3), die ein gefangenes DNA Molekül „spürt“ lässt sich schreiben als  $W_B = \Delta W - \Delta W_{DC}$  (siehe Kapitel 2.4.3). Der dielektrophoretische Anteil  $\Delta W$  (siehe Gleichung 2.19) muss unter der Annahme homogener

Felder in den Fallen und in den Zwischenräumen noch um einen Faktor  $\epsilon$  korrigiert werden:

$$\begin{aligned}\Delta W &= \frac{1}{2} \alpha \left( \vec{E}_{\text{Falle}}^2 - \vec{E}_{\text{ZR}}^2 \right) \\ &= \frac{1}{2} \alpha \epsilon \vec{E}_{\text{Falle}}^2.\end{aligned}\tag{4.2}$$

Der Ausdruck für den Korrekturfaktor lautet damit  $\epsilon = 1 - \vec{E}_{\text{ZR}}^2 / \vec{E}_{\text{Falle}}^2$ . Da das elektrische Feld  $\vec{E}_{\text{ZR}}$  in der Mitte des Zwischenraums zwischen zwei Fallenreihen nahezu über der gesamten Querschnittsfläche konstant ist und die Bedingung  $\nabla \vec{E} = 0$  erfüllt, kann das Verhältnis  $\vec{E}_{\text{ZR}}^2 / \vec{E}_{\text{Falle}}^2$  auf das Verhältnis der entsprechenden Querschnittsflächen, bzw. bedingt durch die konstante Kanalhöhe auf das Verhältnis der entsprechenden Breiten, zurückgeführt werden [13]:  $\vec{E}_{\text{ZR}} / \vec{E}_{\text{Falle}} = 9 b_{\text{Falle}} / b_{\text{ZR}}$ . Die Größe  $b_{\text{Falle}} = 1,6 \mu\text{m}$  bezeichnet hier die Fallenbreite und  $b_{\text{ZR}} = 112,0 \mu\text{m}$  die Kanalbreite (siehe Tabelle 4.1), woraus sich ein Verhältnis der mittleren Feldstärken von  $\vec{E}_{\text{ZR}} / \vec{E}_{\text{Falle}} = 0,13$  und für  $\epsilon$  der Wert  $\epsilon = 0,98$  ergibt. Da das elektrische Feld zwischen Falle und Zwischenraum seine Form nicht sprunghaft ändert, wird auch für  $\epsilon$  ein Fehler von 20 % angenommen.

Mit der Proportionalität des elektrischen Feldes zur angelegten Spannung und dem in Kapitel 4.1.3 bestimmten Proportionalitätsfaktor lässt sich die Tiefe  $\Delta W$  der dielektrophoretischen Fallen bestimmen zu:

$$\Delta W = 2,8 \cdot 10^4 \alpha U_{\text{AC}}^2 \text{ m}^{-2}.\tag{4.3}$$

Dieser Wert ist mit einem systematischen Fehler behaftet, der im Wesentlichen auf zwei Quellen zurückzuführen ist. Dabei handelt es sich um die getroffenen Annahmen und Abschätzungen, die zum einen der Berechnung des Korrekturfaktors  $\epsilon$  und zum anderen der Bestimmung der Proportionalitätskonstante  $\vartheta$  zwischen Spannung und Feldstärke (siehe Gleichung 4.1) zugrunde liegen. Werden die bisher angegebenen Fehler mit der Gauss'schen Fehlerfortpflanzung berücksichtigt, so trägt der Vorfaktor in Gleichung 4.3 einen Fehler von etwa 45 %.

Unter Verwendung der Ausdrücke 2.27 und 4.2 liefert die Fallenaufenthaltsdauer  $\tau$  (siehe Gleichung 2.31) einen Zusammenhang zwischen einer messbaren Zeit und der bekannten angelegten Spannung  $U_{\text{AC}}$  :

$$\tau \propto \frac{2 \pi f_r}{|\alpha U_{\text{AC}}^2|} \exp \left( \frac{\alpha \epsilon \vartheta^2 U_{\text{AC}}^2}{2 k_{\text{B}} T} \right) \exp \left( - \frac{\Delta W_{\text{DC}}}{k_{\text{B}} T} \right).\tag{4.4}$$

Die experimentelle Bestimmung der Fallenaufenthaltsdauer erfolgt durch die Differenz der gemessenen Migrationszeit der DNA,  $t_{\text{Migration}}$ , welche durch die Zeitpunkte des Eintritts in zwei aufeinander folgende Fallen bestimmt wird (siehe Gleichung 3.1), und der freien Migrationszeit,  $t_{\text{frei}}$ , welche die DNA für die Distanz zwischen zwei Fallen ohne angelegtes Wechselfeld ( $U_{\text{AC}} = 0$ ) benötigt:

$$\tau = t_{\text{Migration}} - t_{\text{frei}}. \quad (4.5)$$

Bei den Fehlern für die beiden Zeiten  $t_{\text{Migration}}$  und  $t_{\text{frei}}$  handelt es sich um die Standardabweichung über jeweils 30 Messwerte. Eine automatische Auswertung ist auf Grund der möglichen Bewegung der DNA Moleküle senkrecht zur Fokalebene schwierig.

Um aus der mittleren Fallenaufenthaltsdauer  $\tau$  die Polarisierbarkeit  $\alpha$  zu bestimmen, wird die Fallenaufenthaltsdauer logarithmisch gegen das Amplitudenquadrat der angelegten Wechselspannung  $U_{\text{AC}}^2$  aufgetragen:

$$\ln \tau \stackrel{4.4}{=} \text{Konst.} - \ln |U_{\text{AC}}^2| + \frac{\alpha \epsilon \vartheta^2}{2 k_{\text{B}} T} U_{\text{AC}}^2. \quad (4.6)$$

Die Polarisierbarkeit  $\alpha$  kann dann mit Hilfe der folgenden Fit-Funktion  $f(x)$  aus dem Fit-Parameter  $A_1$  bestimmt werden:

$$f(x) = A_0 + A_1 \cdot x - \ln x \quad (4.7)$$

$$\alpha = \frac{2 k_{\text{B}} T}{\epsilon \vartheta^2} A_1. \quad (4.8)$$

Die daraus resultierenden Polarisierbarkeiten für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Plasmide sind am Ende des Kapitels in Tabelle 4.2 zu finden.

Der Plot  $\ln \tau$  vs.  $U_{\text{AC}}^2$  für die Längen 7 kbp, 10,3 kbp und 15,5 kbp ist in Abbildung 4.4 dargestellt, wobei die durchgezogenen Linien den verwendeten Datenfits entsprechen. Bei geringen Amplituden sind Datenpunkte ohne Fehlerbalken dargestellt. Diese werden im jeweiligen Fit nicht berücksichtigt, da die Beschreibung mittels der Kramers Rate erst für eine gewisse Fallentiefe, bzw. eine deutlich messbare mittlere Fallenaufenthaltsdauer gültig ist (siehe Kapitel 2.4.2). Bei sehr niedrigen Amplituden ist die Retardation der DNA Moleküle zu gering für eine gültige Bestimmung von  $\tau$ .

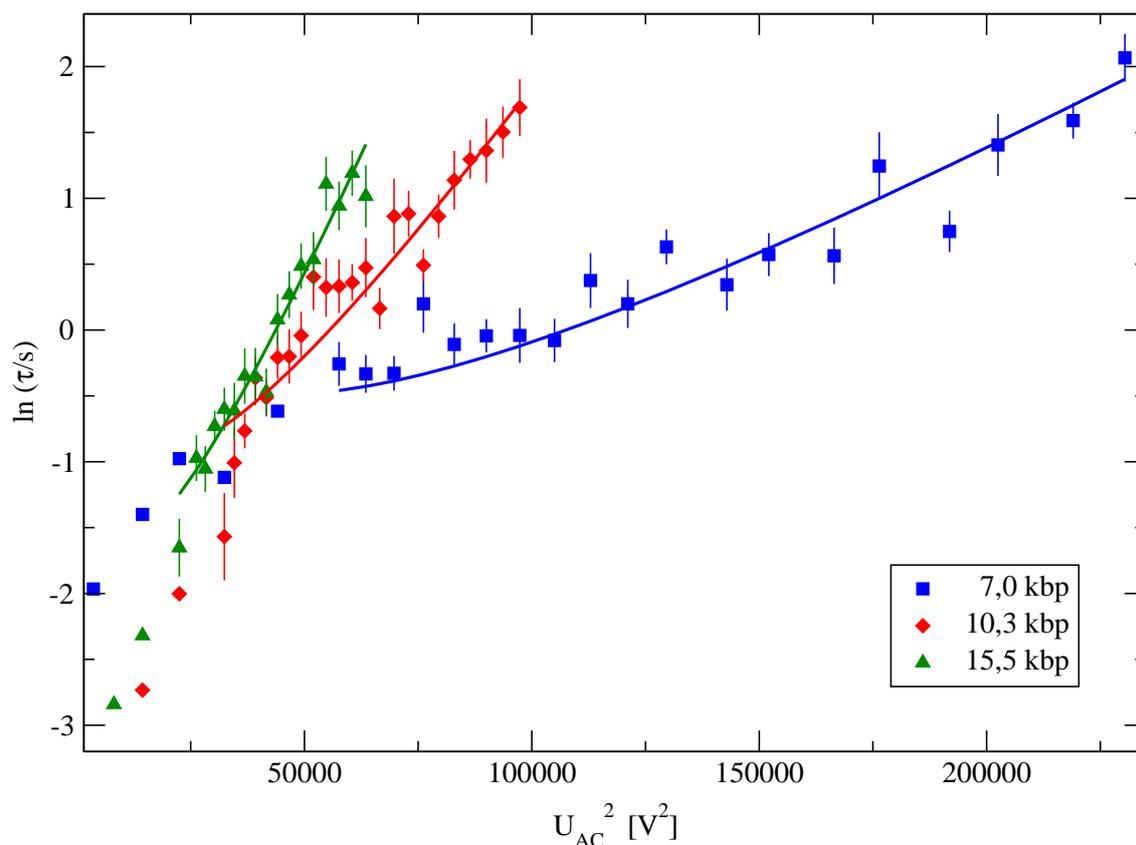


Abbildung 4.4: Auftragung der Fallenaufenthaltsdauer gegen das Quadrat der Amplitude für die Plasmide der Längen 7 bis 15,5 kbp

Die Abbildung zeigt die logarithmische Auftragung der mittleren Fallenaufenthaltsdauer gegen das Quadrat der Amplitude der angelegten Wechselspannung. Bei den durchgezogenen Linien handelt es sich um Datenfits entsprechend Gleichung 4.7.

Der nach Gleichung 4.6 vor allem für große Amplituden  $U_{AC}$  erwartete lineare Anstieg von  $\ln \tau$  ist in Abbildung 4.4 sehr gut zu erkennen. Dabei fällt auf, dass mit der Länge der Plasmid DNA auch die Steigung zunimmt. Mit Gleichung 4.8 existiert daher eine Abhängigkeit der Polarisierbarkeit  $\alpha$  von der Länge der untersuchten Plasmid DNA Moleküle: Mit zunehmender Länge steigt die Polarisierbarkeit.

Dieser Zusammenhang lässt sich auch direkt im Experiment sehr gut beobachten: Längere Plasmide werden bei gleicher Feldstärke stärker von den dielektrophoretischen Fallen zurückgehalten als Kürzere (siehe Kapitel 4.2.3). Die Proportionalität der Fallentiefe zum Quadrat der Feldamplitude (siehe Gleichung 2.19) bestätigt daher die Beobachtung.

Die Experimente zur Bestimmung der Polarisierbarkeit wurden noch mit zwei weiteren

Plasmiden durchgeführt, deren Länge 21, bzw. 23 kbp beträgt. Diese beiden Plasmide bestätigen die Längenabhängigkeit der Polarisierbarkeit jedoch nicht mehr eindeutig, was in Abbildung 4.5 bereits zu erkennen ist. Die Abbildung entspricht der vorangegangenen Abbildung 4.4, enthält aber zusätzlich die Daten und Datenfits der beiden langen Plasmide. Deren zugehörige Steigungen weisen eine starke Ähnlichkeit zu der des 15,5 kbp Plasmids auf.

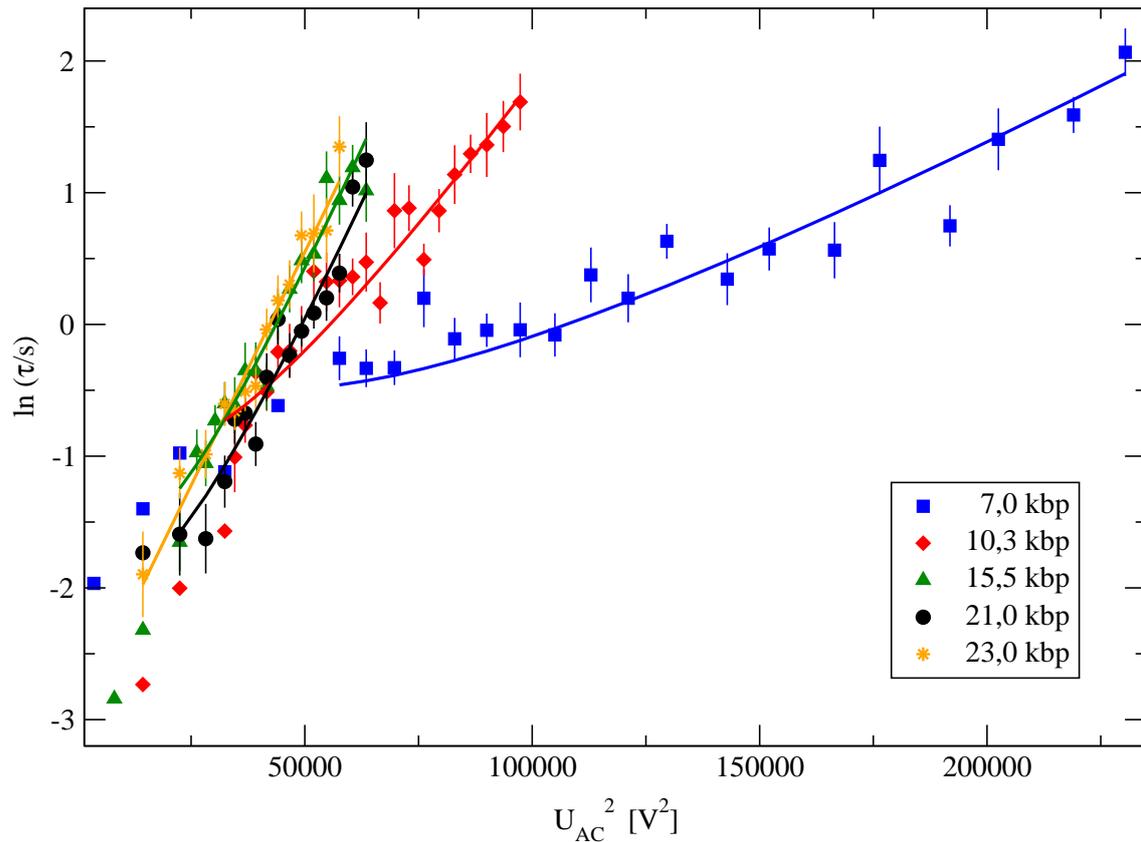


Abbildung 4.5: Auftragung der Fallenaufenthaltsdauer gegen das Quadrat der Amplitude für die Plasmide der Längen 7 bis 23 kbp

Die Abbildung zeigt analog zu Abbildung 4.4 die logarithmische Auftragung der mittleren Fallenaufenthaltsdauer gegen das Quadrat der Amplitude der angelegten Wechselspannung. Die beiden zusätzlichen Plasmide (21 und 23 kbp) weisen eine unerwartete Ähnlichkeit zu dem 15,5 kbp Plasmid auf. Bei den durchgezogenen Linien handelt es sich um Datenfits entsprechend Gleichung 4.7.

Da die chemischen Bedingungen wie pH-Wert, Puffer, DNA und Interkalatorkonzentration bei allen Längen gleich sind, gibt es zwei mögliche Hypothesen. Entweder geht

die bei den kürzeren DNA Proben beobachtete Längenabhängigkeit in eine Art Sättigung über, oder es existiert eine andere Ursache für das abweichende Verhalten der beiden langen Plasmide. Eine mögliche Ursache besteht in einer Konformationsänderung der DNA. Dazu wurden rasterkraftmikroskopische Aufnahmen<sup>1</sup> (AFM Bilder) der hier untersuchten Plasmide nach Abscheidung aus 10 mM Phosphatpuffer auf Aminofunktionalisiertem Glimmer aufgenommen.

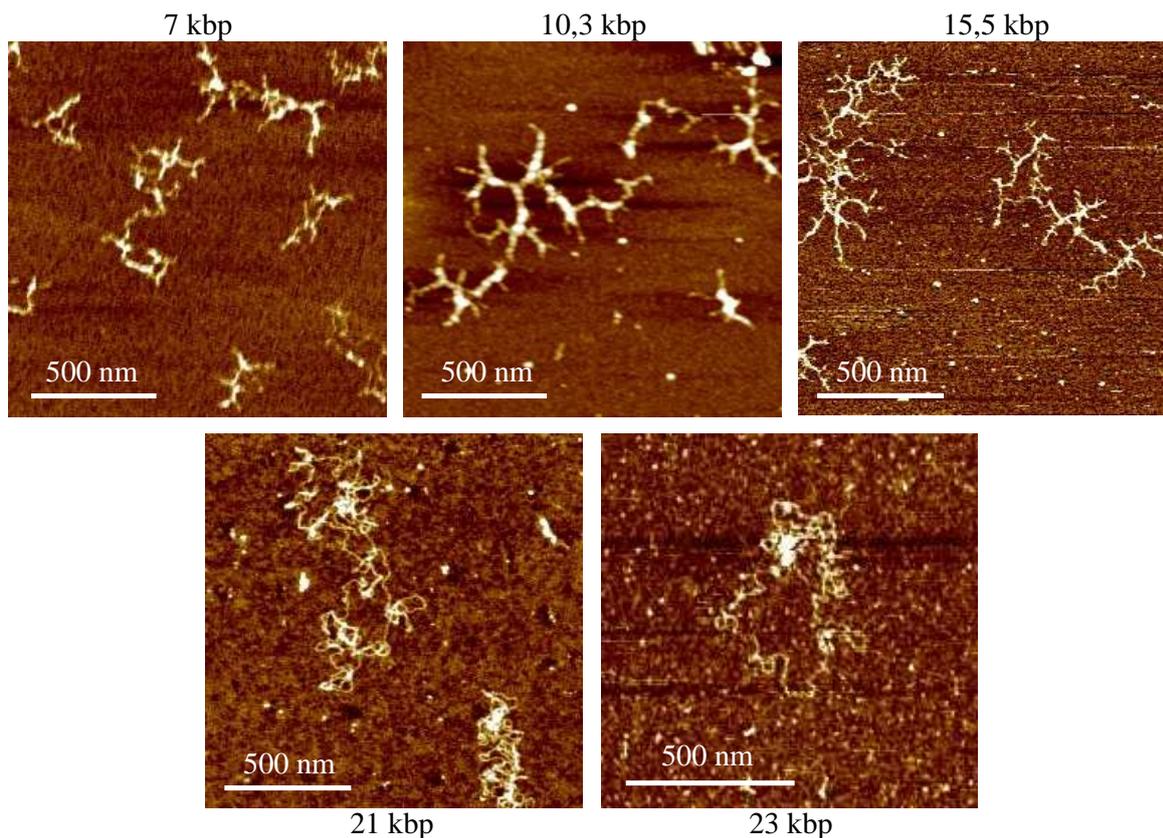


Abbildung 4.6: AFM Aufnahmen der Plasmide

Die Abbildung zeigt rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der verwendeten Plasmid DNA. Die Plasmide der Längen 7 bis 15,5 kbp (obere Zeile) zeigen die für superspiralisierte DNA typischen verästelten Formen. Die beiden langen Plasmide (21 und 23 kbp, untere Zeile) erscheinen offener, bzw. weniger kompakt und verästelte.

Betrachtet man die in Abbildung 4.6 dargestellten AFM Bilder der verschiedenen Plasmide, so fällt auf, dass sich das 21 kbp und das 23 kbp Plasmid in ihrer Struktur

<sup>1</sup>Die hier gezeigten AFM Bilder wurden von Lisa Czaja mit einem Rasterkraftmikroskop (MultiMode AFM, Veeco, USA) mit Aluminium-beschichteten Cantilevern (BS-Tap 300 Al, Budget Sensors, Bulgarien) im *tapping mode* unter Laborbedingungen erstellt.

deutlich von den kürzeren Plasmiden unterscheiden: Die kürzeren Plasmide bilden kompakte, verästelte Strukturen, welche für DNA mit hohem Superspiralisierungsgrad typisch sind [77, 78]. Diese Tertiärstruktur der superspiralisierten DNA ist sehr stark abhängig von der Ionenstärke [70]. Steigende Ionenkonzentrationen führen zu kürzeren Abschirmlängen, was zu einer Verkleinerung des elektrostatisch bedingten Abstands zwischen verschiedenen Teilen der DNA Doppelhelix führt und somit eine stärkere und engere Verwindung der DNA ermöglicht. Da sich aber alle Plasmide in der gleichen Pufferlösung befinden, scheidet die Ionenstärke als Ursache für die unterschiedliche Struktur der längeren DNA aus.

Lange DNA Moleküle (21 und 23 kbp) zeigen hier keine Verästelungen sondern eher die Form eines Knäuels, wobei kompakte und offene Bereiche vorkommen (siehe Abbildung 4.6). Die Ursache dieser unterschiedlichen Erscheinungsform ist unklar. Dies legt die Vermutung nahe, dass zwischen der Veränderung in der Längenabhängigkeit der Polarisierbarkeit und der Strukturänderung ein Zusammenhang besteht, was in Kapitel 4.3.3 näher diskutiert wird. Tabelle 4.2 enthält die berechneten Polarisierbarkeiten für die untersuchten Plasmide.

Plasmid DNA [kbp]	Polarisierbarkeit $\alpha$ [ $\text{Fm}^2$ ]
7	$(0,32 \pm 0,14) \cdot 10^{-29}$
10,3	$(0,80 \pm 0,36) \cdot 10^{-29}$
15,5	$(1,32 \pm 0,59) \cdot 10^{-29}$
21	$(1,29 \pm 0,58) \cdot 10^{-29}$
23	$(1,45 \pm 0,65) \cdot 10^{-29}$

Tabelle 4.2: Polarisierbarkeitswerte der Plasmide

*Die Tabelle enthält die Polarisierbarkeitswerte  $\alpha$  für die Plasmid DNA Proben unterschiedlicher Länge. Besonders auffällig ist das 21 kbp Plasmid, das eine geringere Polarisierbarkeit als das kürzere 15,5 kbp Plasmid aufweist. Die Fehler werden im Haupttext erläutert.*

Die Höhe der angegebenen Fehler ist hauptsächlich auf die systematischen Fehler von jeweils 20 % für den Korrekturfaktor  $\epsilon$  und die Proportionalitätskonstante  $c$  zurückzuführen. Weiterhin wird die Standardabweichung der eingehenden Messwerte und die Raumtemperatur  $T = 22^\circ\text{C} \approx 295\text{ K}$  mit einem Fehler von  $\Delta T = 2\text{ K}$  berücksichtigt. Die Polarisierbarkeitmessungen sind für alle Plasmid DNA Proben bei einer Frequenz der Wechselspannung von  $\omega = 60\text{ Hz}$  und einer Gleichspannung von  $U_{\text{DC}} = 12\text{ V}$  erfolgt (siehe Kapitel 3.5.2).

Polarisierbarkeitswerte für Plasmid DNA in vergleichbaren Längen sind in der aktuellen Literatur kaum zu finden. Einer der verfügbaren Werte für ein 12 kbp langes Plasmid beträgt  $7,88 \cdot 10^{-30} \text{ Fm}^2$  [79] und zeigt damit eine überraschende Übereinstimmung mit dem für das 10,3 kbp Plasmid bestimmten Wert von  $(0,80 \pm 0,36) \cdot 10^{-29} \text{ Fm}^2$ . Die Vergleichbarkeit beider Polarisierbarkeiten ist jedoch nur bedingt gewährleistet, da sich die Messmethode unterscheidet und keine vergleichbaren Pufferbedingungen vorliegen. Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit eingesetzten Phosphatpuffer ist die DNA in Referenz [79] in destilliertem Wasser gelöst.

Für die Längenabhängigkeit der Polarisierbarkeit linearer DNA wird in der Literatur ein Skalengesetz der Form  $\alpha \propto N^\gamma$  mit der Anzahl  $N$  der Basenpaare diskutiert [13, 80, 81]. Die Werte des Exponenten reichen von  $\gamma = 0,4$  bei DNA Längen von 6 – 164 kbp [13] über  $\gamma = 1$  für DNA Längen von 0,3 – 5 kbp [81] bis hin zu  $\gamma = 3$  für kurze DNA Fragmente kleiner als 120 bp [81].

Aus den experimentellen Daten für die hier untersuchte superspiralisierte DNA ergibt sich für den Exponenten der Wert  $\gamma = 1,79 \pm 0,34$ . Für die Berechnung werden dabei nur die Werte der DNA Längen von 7 bis 15,5 kbp berücksichtigt, da die beiden langen Plasmide mit 21 und 23 kbp eine abweichende Struktur unter dem Rasterkraftmikroskop zeigen.

Mit dem DNA Modell aus Kapitel 2.1.1 ist bekannt, dass der Gyrationradius exponentiell mit der Anzahl der Basenpaare skaliert:  $\bar{R}_g \propto N^\nu$ , wobei  $\nu = 0,59$  den Floryexponenten für ein lineares Polymer in drei Dimensionen bezeichnet (siehe Gleichung 2.1). Laut experimenteller Daten aus Referenz [82] skaliert der Gyrationradius superspiralisierter DNA mit einem Exponenten von  $\nu = 0,58$ , was sehr nah am Flory Exponenten für lineare DNA liegt. Es stellt sich daher die Frage nach einem exponentiellen Zusammenhang der Form

$$\alpha \propto \bar{R}_g^\delta$$

zwischen der Polarisierbarkeit  $\alpha$  und dem Gyrationradius  $\bar{R}_g$  der Plasmid DNA mit einem Exponenten  $\delta$ . Anhand der gewonnenen Polarisierbarkeiten lässt sich die Vermutung einer kubischen Abhängigkeit ( $\delta = 3$ ) aufstellen:

$$\alpha \propto \bar{R}_g^3 \propto (N^\nu)^3 = N^{3 \cdot 0,58} = N^{1,74} = N^\gamma, \quad (4.9)$$

was sehr gut zu dem beobachteten Exponenten  $\gamma = 1,79 \pm 0,34$  passt. Diese Abhängigkeit weist auch eine erstaunliche Übereinstimmung mit dem einfach modellierten Beispiel eines sphärischen polarisierbaren Objekts aus dem Theorieteil auf (siehe Gleichung 2.23 in Kapitel 2.3.3).

### 4.2.3 Migrationsgeschwindigkeiten und Mobilitäten

Wie bereits in Kapitel 4.2 erwähnt, lässt sich der Einfluß der Polarisierbarkeit der verschiedenen Plasmide im Experiment auch direkt anhand der *Migrationsgeschwindigkeit* beobachten. Diese wird bestimmt durch den einfachen Zusammenhang

$$v_{\text{Migration}} = \frac{A}{\bar{t}_{\text{Migration}}},$$

wobei  $A$  für die räumliche Periode der Struktur und  $\bar{t}_{\text{Migration}}$  für die mittlere Migrationszeit steht. Die mittlere Migrationszeit entsteht aus der Mittelung über 30 Messungen der Migrationszeit  $t_{\text{Migration}}$  (siehe Kapitel 3.5.2) mit der Standardabweichung als Fehler. Die räumliche Periode der Struktur beträgt  $A = (12,4 \pm 0,6) \mu\text{m}$  (siehe Tabelle 4.1).

In Abbildung 4.7 sind die mittleren Migrationsgeschwindigkeiten der Plasmide gegen die Amplitude der angelegten Wechselspannung aufgetragen. Die Verringerung der Geschwindigkeit mit steigender Amplitude ist deutlich zu erkennen. Auch hier fallen die beiden Plasmide (21 und 23 kbp) auf, da ihr Verhalten dem des 15,5 kbp Plasmids sehr ähnlich ist. Die kürzeste 7 kbp DNA zeigt die geringste Retardation.

Der jeweils letzte Datenpunkt pro DNA Länge stellt die minimale messbare Geschwindigkeit dar. An diesen Punkten ist die DNA nahezu dauerhaft gefangen und eine weitergehende Geschwindigkeitsmessung auf Grund der beschränkten Beobachtungszeit nicht möglich. Der entscheidende einschränkende Faktor für die maximale Beobachtungszeit liegt in der Absorption des Anregungslichts, was trotz schwacher Anregungsintensität nach kurzer Zeit zu einem Zerschneiden der DNA Moleküle führt.

Durch Messung der freien Migrationszeit  $t_{\text{frei}}$  ohne Wechselfeld ( $U_{\text{AC}} = 0$ ) lässt sich über den Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Fallenreihen ( $L_{\text{ZR}} = (9,8 \pm 0,5) \mu\text{m}$ ) auch die freie Geschwindigkeit  $v_{\text{frei}}$  bestimmen, welche nur von der angelegten Gleichspannung  $U_{\text{DC}}$  ( $= 12 \text{ V}$ ) abhängt.

Da die freie Geschwindigkeit von der Länge der DNA unabhängig ist (siehe Kapitel 2.3.2), kann der Mittelwert  $\bar{v}_{\text{frei}}$  über alle DNA Längen gebildet werden. Berechnet man die aus  $U_{\text{DC}}$  resultierende elektrische Feldstärke mit Hilfe des Ersatzschaltbildes, so ergibt sich mit der mittleren freien Geschwindigkeit eine DNA Mobilität in freier Lösung von:

$$\mu_{\text{frei}} = (5,2 \pm 1,6) \cdot 10^{-8} \frac{\text{m}^2}{\text{Vs}}.$$

Der angegebene Fehler wird mit der Gauss'schen Fehlerfortpflanzung berechnet und basiert auf der Standardabweichung zum Mittelwert der freien Geschwindigkeiten und

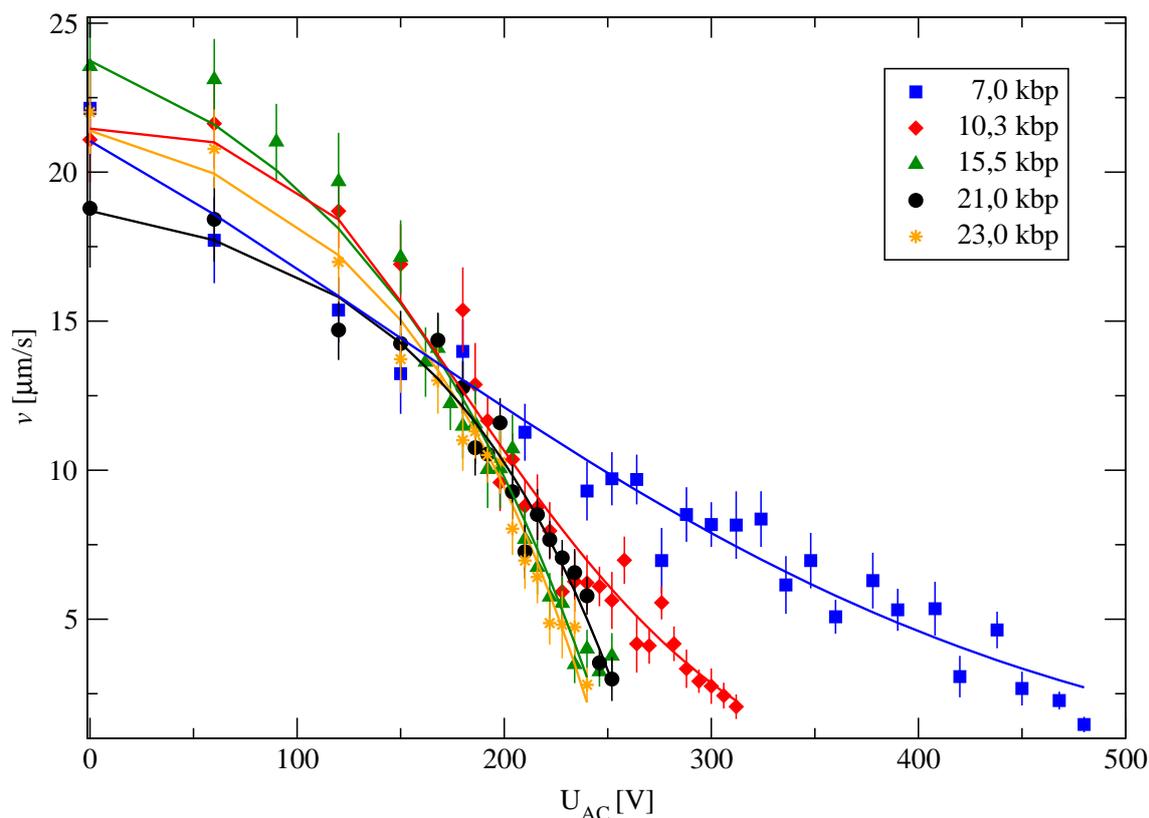


Abbildung 4.7: Migrationsgeschwindigkeiten

Die Abbildung zeigt eine Auftragung der Migrationsgeschwindigkeit gegen die Amplitude der angelegten Wechselspannung  $U_{AC}$ , ( $U_{DC} = 12 \text{ V}$ ,  $\omega = 60 \text{ Hz}$ ). Das 7 kbp Plasmid zeigt die geringste Retardation, während die Geschwindigkeiten der 15,5; 21 und 23 kbp DNA sehr ähnlich sind und die größte Retardation im Verhältnis zu  $U_{AC}$  aufweisen. Die durchgezogenen Linien dienen ausschließlich der Übersichtlichkeit.

den bereits erläuterten systematischen Fehlern. Der erhaltene Wert für die freie Mobilität liegt etwas oberhalb des in der Literatur für lineare DNA aufgeführten Bereichs, welcher von  $3,4 \cdot 10^{-8}$  bis  $4,5 \cdot 10^{-8} \frac{\text{m}^2}{\text{Vs}}$  reicht [83]. Im Gegensatz zu der Annahme, dass sich die Stärke des elektrischen Feldes beim Übergang von einer Falle zum anschließenden Zwischenraum sprunghaft reduziert, wird in der Realität ein kontinuierlicher Übergang vorliegen. Das bedeutet, dass die Feldstärke in einem Teil des Zwischenraums größer ist, als in der Rechnung angenommen. Demnach ist auch die berechnete freie Mobilität größer als der reale Wert. Diesem Umstand wird aber bereits mit der Größe des Fehlers Rechnung getragen.

#### 4.2.4 Frequenzabhängigkeit der Polarisierbarkeit

Die in allen Experimenten verwendete „Arbeitsfrequenz“ des Wechselfeldes  $\omega = 60$  Hz hat sich zwar als praktikabel erwiesen, jedoch fehlten bislang quantitative Messungen zum Einfluß von  $\omega$ . Das Ziel dieses Kapitels ist daher die Untersuchung der Frequenzabhängigkeit der Polarisierbarkeit  $\alpha$ , um ein eventuell vorhandenes Optimierungspotential aufzudecken und zu nutzen.

Dazu werden bei verschiedenen Amplituden  $U_{AC}$  die Migrationszeiten in Abhängigkeit der Frequenz bestimmt. Ein Minimum in der Migrationsgeschwindigkeit bei gegebener Amplitude muss nach den im Theorieteil und in Kapitel 4.2 beschriebenen Zusammenhängen einem Maximum der Polarisierbarkeit  $\alpha$  entsprechen, so dass auf diese Weise prinzipiell Rückschlüsse auf eine Frequenzabhängigkeit gezogen werden können.

Zur Veranschaulichung der Resultate dient Abbildung 4.8, in welcher die Migrationsgeschwindigkeiten  $v$  der verschiedenen Plasmide gegen die Frequenz  $\omega$  des Wechselfeldes für einige Amplituden aufgetragen sind. Alle Plasmide weisen für bestimmte Frequenzbereiche ein erkennbares Minimum auf. Abgesehen von der 23 kbp DNA, deuten die Messdaten auf eine Verschiebung der Geschwindigkeitsminima mit steigender DNA Länge in Richtung niedrigerer Frequenzen hin. Dieser Trend lässt sich auch anhand der Tabelle 4.3 feststellen, welche die DNA Längen und eine grobe Abschätzung der jeweiligen Frequenz minimaler Migrationsgeschwindigkeit enthält. Diese Abschätzung basiert auf den in Abbildung 4.8 dargestellten Messreihen.

Plasmid DNA [kbp]	$U_{AC}$ [V]	$\omega$ [Hz]
7	300	$\approx 100$
10,3	240	$\approx 80$
15,5	210	$\approx 60$
21	210	$\approx 50$
23	210	$\approx 90$

Tabelle 4.3: Frequenzen der Geschwindigkeitsminima

*Die Tabelle enthält die Frequenzen der Geschwindigkeitsminima bei gegebener Amplitude der Wechselspannung. Es handelt sich dabei um grobe Abschätzungen, da die Messungen große Schwankungen aufweisen.*

Eine verlässliche Aussage zu der Lage der Geschwindigkeitsminima in Abhängigkeit der Frequenz lässt sich mit den erzielten Messdaten jedoch nicht treffen, da die verschiedenen Amplituden  $U_{AC}$  keinen direkten Vergleich ermöglichen. Der Versuch einer frequenzabhängigen Geschwindigkeitsmessung mit einer festen Amplitude für alle DNA

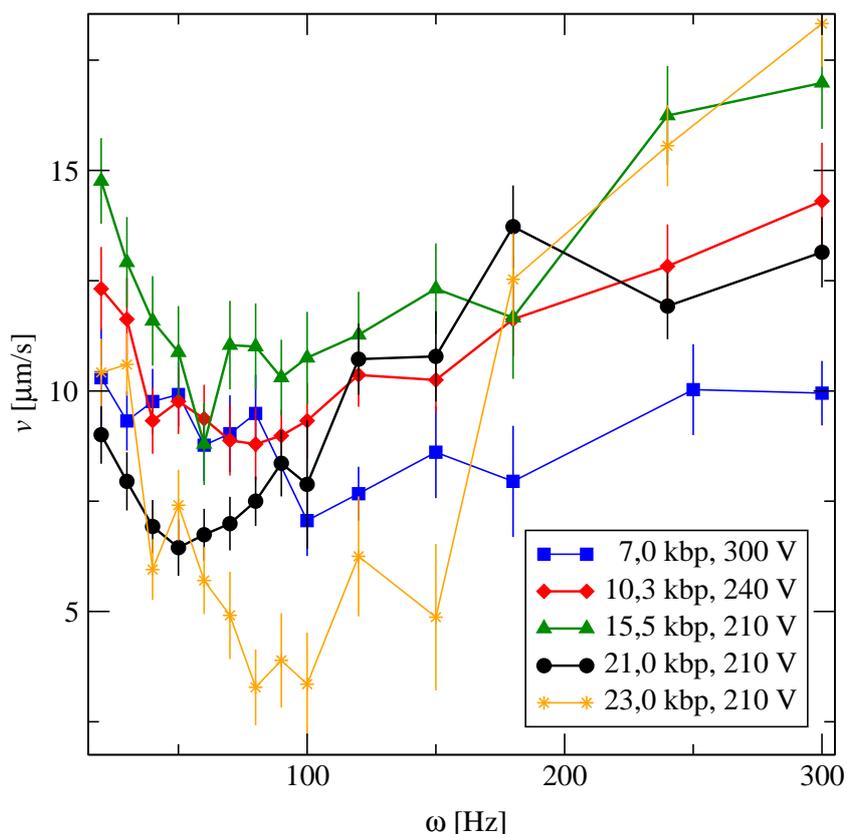


Abbildung 4.8: Frequenzabhängigkeit der Migrationsgeschwindigkeit

Die Abbildung zeigt eine Auftragung der Migrationsgeschwindigkeit gegen die Frequenz der angelegten Wechselspannung. Es sind nur die Messreihen mit der deutlichsten Ausprägung des Geschwindigkeitsminimums dargestellt, wobei die jeweilige Amplitude der angelegten Wechselspannung  $U_{AC}$  hinter der Plasmid-Länge in der Legende aufgeführt ist. Die durchgezogenen Linien dienen ausschließlich der Übersichtlichkeit.

Längen scheitert an der unterschiedlichen Retardation, welche selbst eine Konsequenz der unterschiedlichen Polarisierbarkeiten ist: Beispielsweise lässt sich bei einer Amplitude von  $U_{AC} = 210$  V die Messung für die längeren Plasmide ab 15,5 kbp gut durchführen, während die beiden kürzeren nicht ausreichend retardiert werden und sich kein Minimum feststellen lässt. Bei einer höheren Amplitude lassen sich zwar die kürzeren Moleküle gut beobachten aber die längeren Plasmide sind nahezu ständig gefangen, was eine Messung erschwert.

Auch wenn es sich bei den Frequenzwerten in Tabelle 4.3 um grobe Abschätzungen handelt, zeigen diese, dass die bereits etablierte Arbeitsfrequenz von 60 Hz eine gute Wahl ist.

## 4.3 DNA Separationen

Die beiden vorhergehenden Kapitel 4.2.2 und 4.2.3 zeigen, dass die Polarisierbarkeit der Plasmid DNA langenabhangig ist. Dieses äußert sich in unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten bei vergleichbarer Amplitude der angelegten Wechselfspannung  $U_{AC}$ , mit welcher sich letztendlich die Stärke der dielektrophoretischen Fallen einstellen lässt. Die Idee, DNA Moleküle basierend auf ihrer längenabhängigen Polarisierbarkeit nach Größe zu trennen, wurde in einer theoretischen Arbeit bereits vor über 16 Jahren beschrieben [11]. Das dort diskutierte Konzept beruht auf einer Kombination aus Elektrophorese in freier Lösung (*free flow electrophoresis*) und dielektrophoretischen Fallen. Die experimentelle Umsetzung mit linearer DNA ist jedoch erst vor kurzer Zeit gelungen [13, 84]. Dieses Kapitel enthält nun die Ergebnisse der durchgeführten Separationsexperimente mit der superspiralisierten Plasmid DNA. Der allgemeine Ablauf der Trennversuche ist im Methodenteil beschrieben, siehe Kapitel 3.5.3.

Als erster Anhaltspunkt für die Wahl der Spannungsintervalle für die einzelnen Trennversuche dient Abbildung 4.7, in welcher die Migrationsgeschwindigkeiten gegen die Spannungsamplitude aufgetragen sind. Teilt man die Geschwindigkeitsachse zwischen maximaler und minimaler Geschwindigkeit eines Plasmids in drei Teile, so hat sich das dem mittleren Drittel zugehörige Spannungsintervall als guter Anfangsparameter herausgestellt. Die naheliegenden Gründe dafür sind die mangelnde Retardation im ersten Drittel und die zu große Fallenstarke im letzten Drittel.

Das Ziel jedes Separationsexperiments ist, neben der qualitativen Trennung verschiedener DNA Längen, die Bestimmung der Trenneffizienz. Diese lässt sich angeben anhand der erzielten Auflösung zwischen zwei Peaks in einem Intensitatsplot, welche mit einer Gauss'schen Funktion gefittet werden. Die Auflösung  $Res$  wird mit folgender Formel berechnet [85]:

$$Res = \frac{x_2 - x_1}{2(\sigma_1 + \sigma_2)}, \quad (4.10)$$

wobei  $x_1$  und  $x_2$  die jeweiligen Mittelpunkte der Gauss-Kurven und  $\sigma_1$ , bzw.  $\sigma_2$  die zugehörigen Standardabweichungen bezeichnen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmid DNA Proben enthalten neben der erwarteten superspiralisierten Form (ccc) zum Teil auch die entspannte zirkuläre Form (oc). Weiterhin enthalten die DNA Proben einen gewissen Anteil Dimere (2ccc), wobei es sich um zwei verknüpfte superspiralisierte DNA Moleküle der entsprechenden Länge handelt. Eine schematische Übersicht über die verschiedenen Konformationen befindet sich in Abbildung 4.9. Die nach Konformationen aufgeschlüsselten Zusammensetzungen der verwendeten Plasmide sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Die prozentualen Anteile wurden von der PlasmidFactory mittels Kapillargelelektrophorese (CGE) bestimmt. Der Reinheitsgrad, bzw. der Anteil des superspiralisierten Monomers, liegt zwischen 86 und 95 %. Über das 23 kbp Plasmid liegen keine Informationen bezüglich der verschiedenen Bestandteile vor.

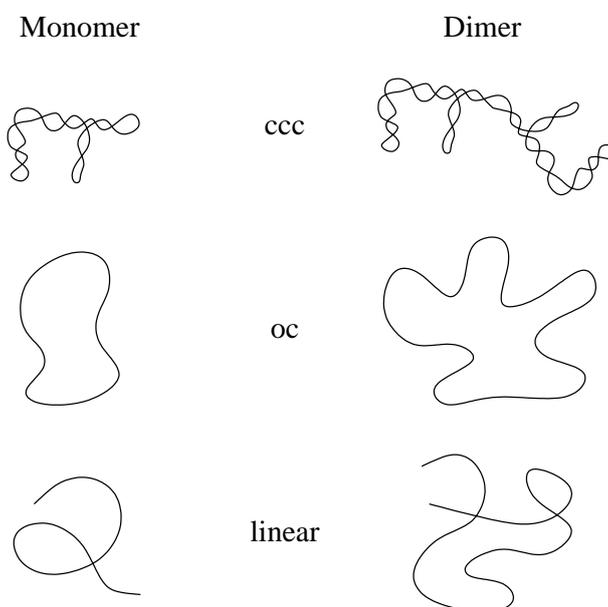


Abbildung 4.9: Konformationen der Plasmid DNA

Die Abbildung zeigt schematisch die Monomere und Dimere der verschiedenen Plasmid DNA Konformationen. Die lineare Variante entsteht zum Beispiel bei der Aufspaltung eines zirkulären Moleküls. Die Abbildung ist angelehnt an [86].

Länge [kbp]	ccc [%]	2ccc [%]	oc [%]
7	88,4	9,8	1,8
10,3	85,7	12,8	1,5
15,5	94,5	4,9	0,6
21	92,1	7,4	0,5
23	-	-	-

Tabelle 4.4: Zusammensetzung der Plasmid DNA

Die Tabelle enthält die Zusammensetzung der verwendeten Plasmid DNA nach vorkommenden Konformationen. Neben dem superspiralisierten Monomer (ccc) tritt auch das zugehörige Dimer (2ccc) und das entspannte zirkuläre Monomer (oc) auf.

### 4.3.1 Monomer - Dimer Trennungen

Zunächst werden DNA Proben mit zwei unterschiedlichen Plasmid Längen untersucht. Dabei handelt es sich um Plasmid Monomere mit ihren jeweiligen Dimeren. Folgende Parameter werden bei allen Trenn-Experimenten konstant gehalten: Die angelegte Gleichspannung  $U_{DC} = 12$  V, welche die elektrophoretische Migration der DNA durch den Trennkanal hervorruft, die Frequenz der überlagerten Wechselspannung  $\omega = 60$  Hz und die Konzentration der jeweiligen Plasmid DNA Lösung, welche, falls nicht anders angegeben,  $c_{DNA} = 300$  pM beträgt. Die restlichen Parameter werden für jede DNA Länge optimiert und die besten Werte für jedes Experiment angegeben.

#### 7 kbp Plasmid DNA

Für das 7 kbp Plasmid wird die Wechselspannung  $U_{AC}$  von 252 V in fünf Schritten zu je  $U_{ink} = 30$  V auf 372 V gesteigert. Die Zeit pro Schritt beträgt  $t_{ink} = 55$  s, so dass die gesamte Trennung in  $t_{ges} = 275$  s erfolgt.

Abbildung 4.10 stellt die basislinien aufgelöste dielektrophoretische Trennung ( $Res \geq 1$ ) des 7 kbp Monomers von seinem Dimer in einem Plot der Intensität gegen die x-Position im Trennkanal dar. Die dargestellte Trenn-Strecke entlang der x-Achse, welche der Bewegungsrichtung der DNA durch den Kanal entspricht, beginnt zwei Fallenreihen hinter dem Injektionspunkt (Kanalkreuzung) und endet kurz vor dem abschließenden Reservoir des Separationskanals. Die ersten zwei Reihen der Strukturierung werden ausgelassen, da hier einzelne DNA Moleküle gefangen werden, die während des Intensitäts-Scans bei abgeschalteter Gleichspannung in den Kreuzungsberich des Mikrofluidik Chips ein-

dringen können. Die durchgezogene rote Linie entspricht den verwendeten Gauss'schen Datenfits, womit die Auflösung nach Formel 4.10 in dieser Trennung  $Res = 3,1$  beträgt.

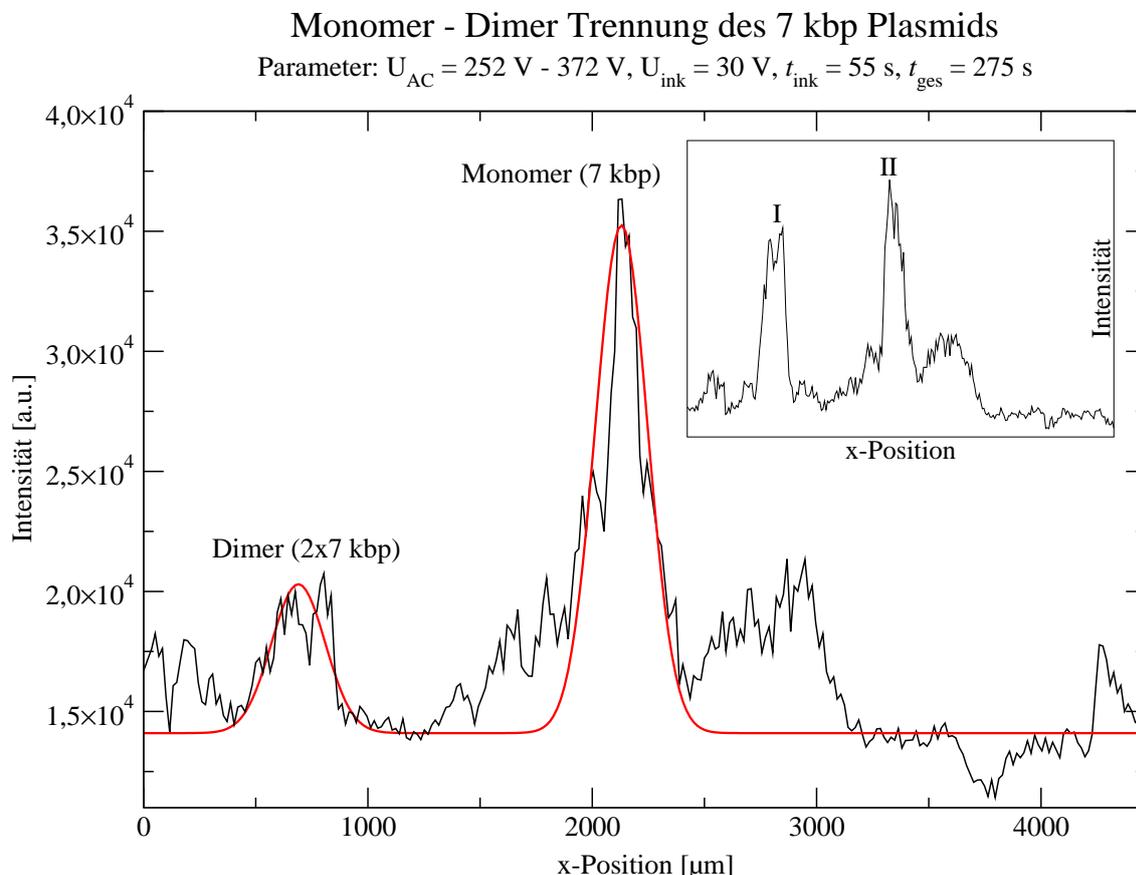


Abbildung 4.10: Auftrennung der 7 kbp Plasmid DNA

Die Abbildung stellt die dielektrophoretische Auftrennung des 7 kbp Plasmids dar. Die Intensitäts Peaks des Monomers und des Dimers sind deutlich zu erkennen. Das im oberen, rechten Teil eingefügte Diagramm zeigt das zugehörige Spiking mit der 15,5 kbp Plasmid DNA. Peak I entspricht der Überlagerung des 7 kbp Dimers mit dem 15,5 kbp Monomer, Peak II entspricht dem 7 kbp Monomer (siehe auch Abbildung A.2).

Eine genaue Analyse der Messdaten zeigt, dass die Peaks zu Beginn der Trennstrecke ( $\approx 500 \mu\text{m}$ ) durch DNA Moleküle, welche an der Kanaloberfläche adsorbiert haben, verursacht werden. Bei dem Intensitätseinbruch bei etwa  $3700 \mu\text{m}$  bis unter die gefittete Null-Linie des Hintergrundrauschens und dem darauf folgenden Peak am Ende der Trennstrecke handelt es sich um Messartefakte. Dazu zählen u.a. Einschlüsse im PDMS, die eine kurzzeitige Verringerung des Intensitätssignals hervorrufen, Bläschen im Immersionsöl und fluoreszierende Fremdkörper. Eine nicht optimale Regulierung der

Fokalebene während des Scans hat ebenfalls einen Einfluß auf das Intensitätssignal, da die PDMS Pforten in verschiedenen Fokalebene das Umgebungslicht unterschiedlich stark streuen. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine höhere DNA Konzentration als 300 pM zur Verminderung des Einflusses von Messartefakten sinnvoll ist. Noch größere Molekülzahlen könnten jedoch zu „Überbelegungen“ in den dielektrophoretischen Fallen oder zu einer verringerten Fallenstärke führen.

Die Form der linken Flanke des Monomer Peaks ist auf zwei Punkte zurückzuführen: Zum einen gelangen einige DNA Moleküle durch eine diffusionsbedingte, stochastische Bewegung in y-Richtung (parallel zu den Fallenreihen) in eine benachbarte Falle und müssen dementsprechend einen etwas längeren Weg zurücklegen, was zu einer geringeren mittleren Geschwindigkeit in x-, bzw. Kanal-Richtung führt. Zum anderen kommt es vor, dass einzelne DNA Moleküle in der Mitte zwischen zwei benachbarten Fallen für kurze Zeit in einem labilen Gleichgewicht vor einem Pforten, was einem Sattelpunkt des Potentials entspricht, verweilen, bevor sie in einer Falle gefangen werden. In beiden Fällen steigt so die mittlere Migrationszeit, bzw. sinkt die Migrationsgeschwindigkeit dieser Moleküle, was eine Verbreiterung auf der linken Seite des Intensitätsmaximums zur Folge hat.

Die Identifikation des Dimer Peaks erfolgt durch ein sogenanntes *Spiking*. Nach Hinzufügen des 15,5 kbp Plasmids zu der 7 kbp Plasmid DNA erscheint das der längeren DNA zugehörige Intensitätsmaximum an der Stelle des vermuteten Dimer Peaks (2x7 kbp), womit auf Grund der ähnlichen Längen und Polarisierbarkeiten die Zuordnung mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit richtig ist. Das Intensitätsdiagramm ist in einer verkleinerten Version in der oberen, rechten Ecke der Abbildung 4.10 eingefügt. Das Diagramm befindet sich in voller Größe in Abbildung A.2 im Anhang A.2.

Der Peak ( $\approx 3000 \mu\text{m}$ ) rechts des Monomer Intensitätsmaximums lässt sich weder auf Artefakte noch auf Verunreinigungen zurückführen. Eine mögliche Erklärung erfolgt nach Betrachtung der anderen Plasmide in Kapitel 4.3.3.

Betrachtet man die Flächeninhalte unter den Intensitätspeaks so können über ihr Verhältnis zueinander Rückschlüsse auf die Konzentrationen des Dimers und des Monomers gezogen werden. Der Flächeninhalt des Dimer Peaks muss dazu auf Grund seiner doppelten Moleküllänge um den Faktor 1/2 korrigiert werden, was zu einem prozentualen Dimer Anteil von  $(11,6 \pm 2,3) \%$  führt. Der Vergleich mit den Angaben des Herstellers (siehe Tabelle 4.4) zeigt, dass der gemessene Wert im Rahmen des Fehlers gut mit dem angegebenen Wert von 9,8 % übereinstimmt. Auf Grund des Fehlers bei der Bestimmung des Hintergrundrauschens und der Peakverbreiterung des Monomer Peaks wird hier ein Fehler von 20 % angenommen.

### 10,3 kbp Plasmid DNA

Abbildung 4.11 zeigt die gelungene Monomer - Dimer Trennung des 10,3 kbp Plasmids.

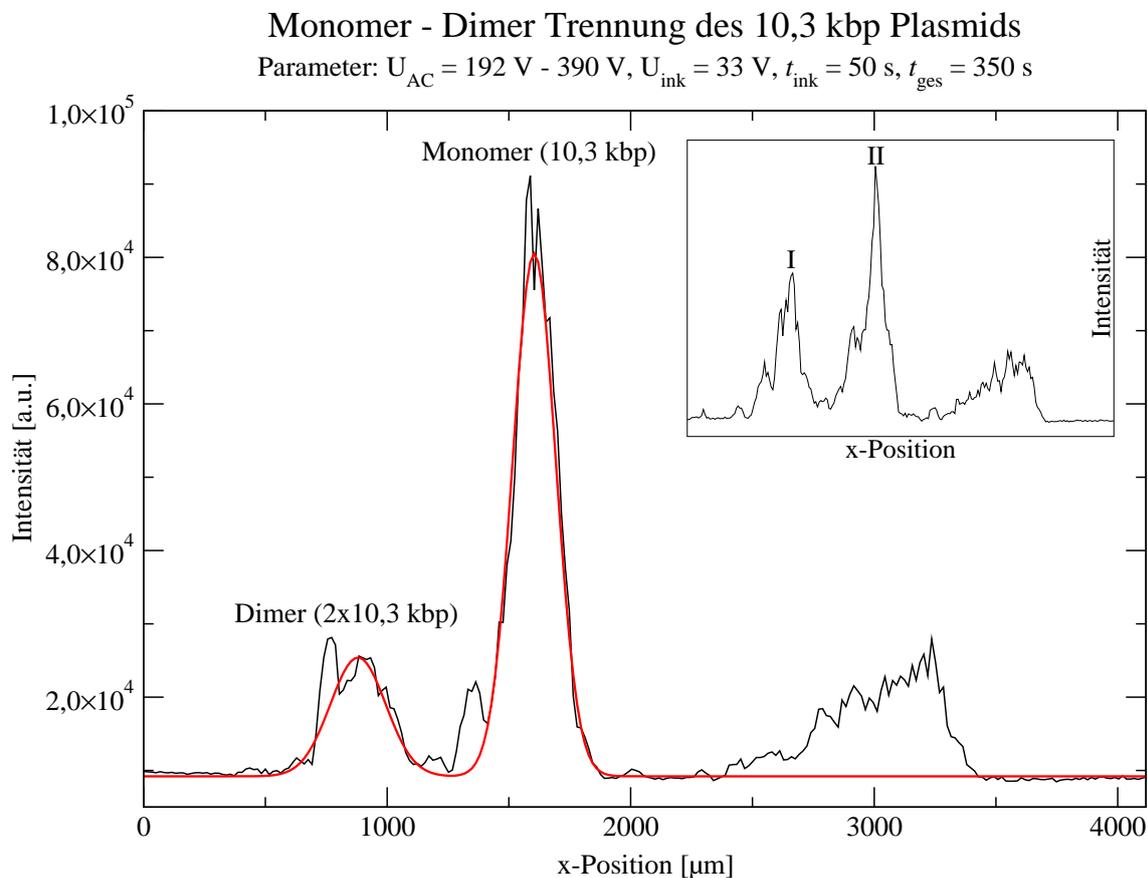


Abbildung 4.11: Auftrennung der 10,3 kbp Plasmid DNA

Die Abbildung zeigt die dielektrophoretische Trennung des 10,3 kbp Plasmids. Auffällig ist der unbezeichnete Peak im rechten Teil des Intensitätsdiagramms (siehe Haupttext). Das im oberen, rechten Teil eingefügte Diagramm zeigt das zugehörige Spiking mit der 21 kbp Plasmid DNA. Peak I entspricht der Überlagerung des 10,3 kbp Dimers mit dem 21 kbp Monomer, Peak II entspricht dem 10,3 kbp Monomer (siehe auch Abbildung A.3).

Die Spannungsrampe von 192 bis 390 V wird in sieben Schritten mit  $U_{ink} = 33 \text{ V}$  und  $t_{ink} = 50 \text{ s}$  gefahren, so dass die Trennung nach 350 s abgeschlossen ist. Mit einer Auflösung von  $Res = 1,8$  liegt auch hier eine basislinienaufgelöste Trennung vor. Die Identifikation des Dimer Peaks findet durch ein Spiking mit der 21 kbp Plasmid DNA statt (siehe Inset in Abbildung 4.10 und Abbildung A.3 im Anhang A.2).

Der 10,3 kbp Monomer Peak weist wie das Intensitätsmaximum des 7 kbp Plasmids (Abbildung 4.10) an seiner linken Flanke ( $\approx 1400 \mu\text{m}$ ) im unteren Teil eine kleine Verbreiterung auf. Besonders auffällig jedoch ist der Peak bei etwa  $3000 \mu\text{m}$  auf der rechten Seite des Monomermaximums. Bei der 10,3 kbp DNA tritt er noch deutlicher als bei der Messung des 7 kbp Plasmids auf. Eine mögliche Erklärung erfolgt in Kapitel 4.3.3.

Betrachtet man das Verhältnis der Flächeninhalte des Monomer- und des Dimer Peaks, so ergibt sich ein gemessener Dimer Anteil von  $(12,8 \pm 2,6) \%$ . Der Vergleich mit dem angegebenen Wert des Herstellers (12,8 % Dimeranteil, siehe Tabelle 4.4) zeigt eine hervorragende Übereinstimmung.

### 15,5 kbp Plasmid DNA

Die Versuche, eine Monomer - Dimer Trennung des 15,5 kbp Plasmids durchzuführen, sind trotz mehrfacher Messungen bei verschiedenen Parametern nicht erfolgreich gewesen. Die wahrscheinlichste Ursache dafür liegt in dem geringen Dimeranteil von unter 5 % (siehe Tabelle 4.4), was eine deutliche Unterscheidbarkeit vom Hintergrundrauschen verhindert. Ein Peak rechts vom Monomer Intensitätsmaximum, welcher bei der 7 kbp und der 10,3 kbp Plasmid DNA zu beobachten ist, tritt nicht auf. Auf eine graphische Darstellung des einzelnen 15,5 kbp Peaks wird daher hier verzichtet.

### 21 kbp Plasmid DNA

Zur Trennung des 21 kbp Monomers von seinem Dimer wird die angelegte Wechselspannung von 186 V auf 240 V in vier Schritten mit  $U_{\text{ink}} = 18 \text{ V}$  und  $t_{\text{ink}} = 50 \text{ s}$  gesteigert. Die gesamte Trennzeit beträgt demnach 200 s. Das zugehörige Intensitätsdiagramm ist in Abbildung 4.12 wiedergegeben.

Das Hintergrundrauschen fällt auf Grund der hohen Intensität der Maxima kaum noch ins Gewicht, so dass messbedingte Artefakte nicht zu erkennen sind. Der kleine Peak bei etwa  $1000 \mu\text{m}$  ist auf adsorbierte DNA an der Kanaloberfläche zurückzuführen. Bei der besonders auffälligen Spitze auf dem Dimer Peak handelt es sich um einen Strukturfehler innerhalb des Mikrofluidik Chips. Eine genaue Analyse des Kamerabildes an dieser Stelle zeigt einen Pfosten mit mangelhaftem Kontakt zum Kanaldeckel. Das Resultat ist ein Spalt, in dem sich mehrere DNA Moleküle festgesetzt haben, was zu diesem „Ausreißer“ in der gemessenen Intensität führt. Der bei der 7 kbp und 10,3 kbp Plasmid DNA auftretende Peak rechts vom Monomer Intensitätsmaximum ist bei dem 21 kbp Plasmid nicht zu beobachten. Die Auflösung zwischen dem Monomer und dem Dimer Peak liegt bei  $Res = 0,9$  und ist damit geringer als bei den kürzeren Plasmiden.

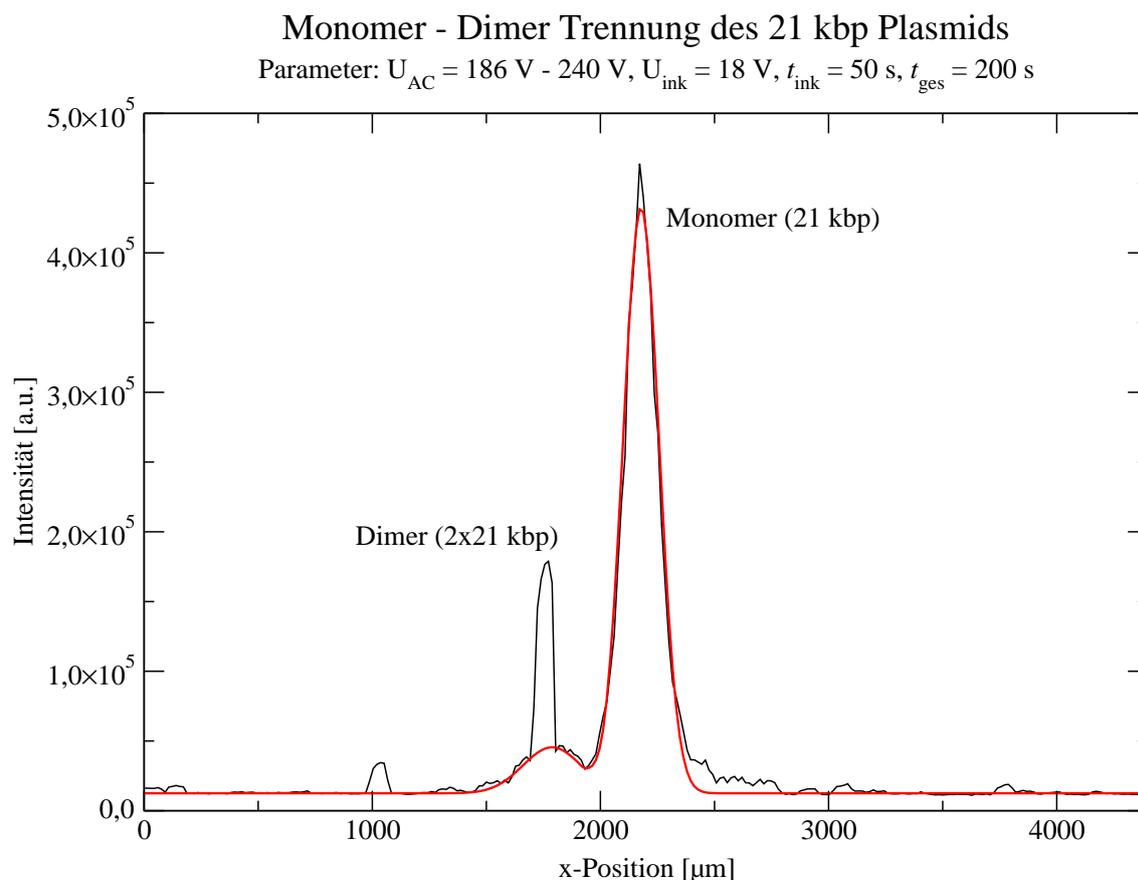


Abbildung 4.12: Auftrennung der 21 kbp Plasmid DNA

Die Abbildung zeigt die dielektrophoretische Trennung des 21 kbp Plasmids. Das Intensitätsdiagramm enthält ein auffälliges Artefakt im Dimer Peak, das jedoch auf einen Fehler im Mikrofluidik Chip zurückzuführen ist (siehe Haupttext).

Ein langes Plasmid mit einer Größe von 40-50 kbp steht nicht zur Verfügung, so dass kein Spiking zur Identifikation des Dimer Peaks vorgenommen werden kann. Jedoch führt die Berechnung der Flächeninhalte unter den Intensitätsmaxima zu einem Dimer Anteil von  $(6,0 \pm 1,2) \%$ , was im Vergleich zu dem Herstellerwert von 7,4 % (siehe Tabelle 4.4) für die vorgenommene Zuordnung spricht.

### 4.3.2 Komplexe Mischungen von Plasmiden

Nach den Monomer - Dimer Trennungen der Plasmide werden in diesem Kapitel einige Trennungen verschiedener Plasmid DNA Mischungen gezeigt und diskutiert. Um Überschneidungen von Intensitätsmaxima ähnlicher DNA Längen, z.B. das 7 kbp Dimer mit

dem 15,5 kbp Monomer, zu vermeiden, werden die Mischungen 7 + 10,3 kbp, 7 + 21 kbp und 10,3 + 15,5 kbp untersucht.

### 7 und 10,3 kbp Plasmid DNA

Das Gemisch von 7 und 10,3 kbp Plasmid DNA ist in einem Verhältnis von 10:7 angesetzt, um Intensitätspeaks ähnlicher Höhe zu erzielen. Die Trennung erfolgt auf einer Spannungsrampe von 228 bis 372 V mit einem Spannungsincrement von 24 V für jeweils 40 s. Die gesamte Separationszeit beträgt 280 s. Das resultierende Intensitätsdiagramm ist in Abbildung 4.13 dargestellt.

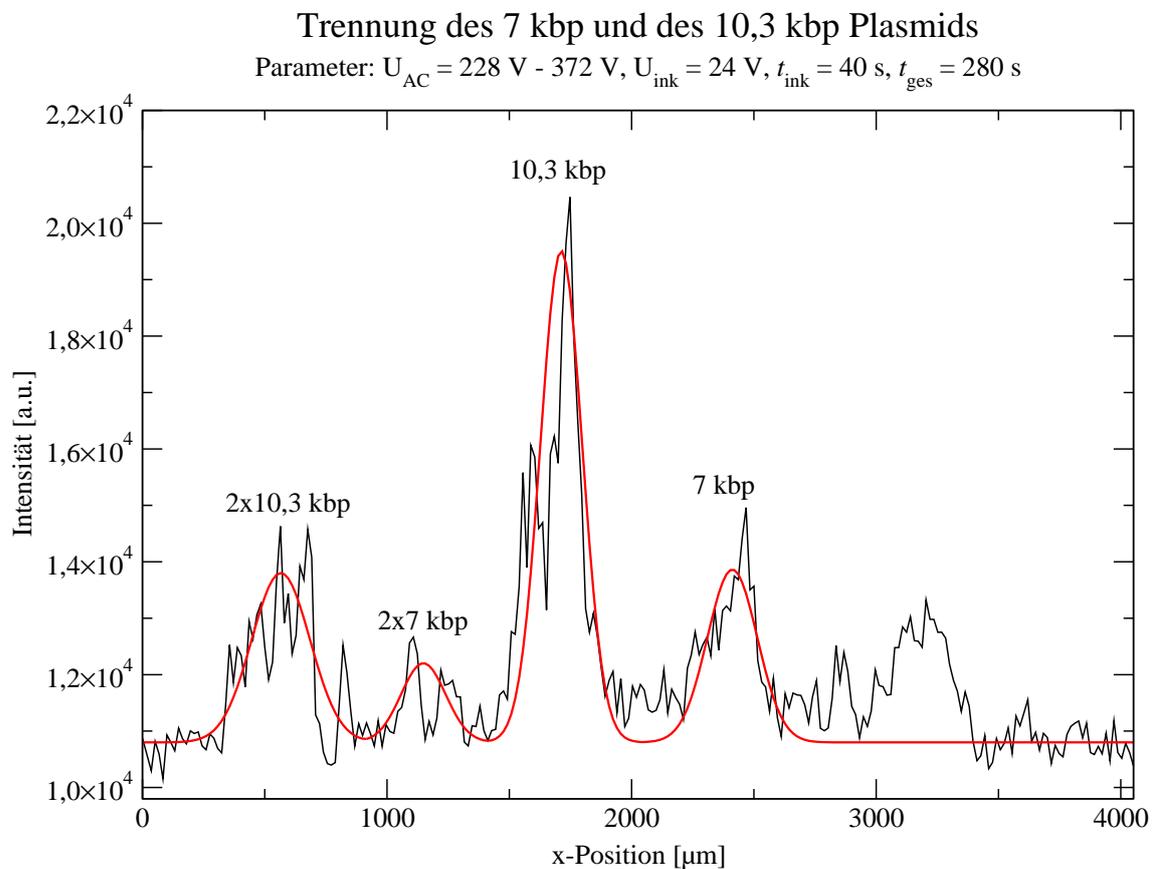


Abbildung 4.13: Auftrennung einer Plasmid DNA Mischung (7 und 10,3 kbp)

Die Abbildung zeigt die dielektrophoretische Auftrennung einer Mischung aus 7 und 10,3 kbp Plasmid DNA. Im rechten Teil des Diagramms ist wieder der von den Monomer - Dimer Trennungen beider Plasmide bekannte zusätzliche Peak zu erkennen.

Zunächst fällt auf, dass der 10,3 kbp Monomer Peak trotz des Mischungsverhältnisses größer ist als der Monomer Peak des 7 kbp Plasmids. Die Berechnung der Peak

Flächen ergibt einen Faktor von etwa 2,3. Dafür gibt es zwei plausible Gründe: Der erste liegt im tatsächlich erzielten Mischungsverhältnis. Beim Ansetzen von Mischungen in einem Maßstab von wenigen Mikrolitern wirken sich Pipettier- und Durchmischungsfehler besonders stark aus. Der zweite Grund kann in der aufgenommenen Menge des Interkalators gefunden werden. Die Diskussion dieser Beobachtung wird weiter in Kapitel 4.3.3 vertieft.

Um die vorgenommenen Peak Identifikationen, welche auf den bisherigen Resultaten der Polarisierbarkeitmessungen und der Monomer - Dimer Trennungen beruhen, zu überprüfen, wird ein Spiking durch Konzentrationsüberhöhung der 7 kbp Plasmid DNA durchgeführt. Dieses bestätigt die Peak Zuordnungen (siehe Abbildung A.4 im Anhang A.2).

Die Auflösung zwischen dem 7 und dem 10,3 kbp Monomer Peak beträgt etwa  $Res = 1,9$ , wobei die kleinen Intensitätsschwankungen zwischen den Peaks vernachlässigt werden. Rechts neben dem 7 kbp Monomer Peak befindet sich der aus den Monomer - Dimer Trennungen des 7 und 10,3 kbp Plasmids bekannte zusätzliche Peak. Er ist unterteilt in zwei Intensitätsmaxima, was aber erst beim Spiking deutlich hervortritt. Nach dem Spiking lässt sich das rechte Maximum dem 10,3 kbp Plasmid zuordnen. Ein Erklärungsversuch findet sich in Kapitel 4.3.3.

### 7 und 21 kbp Plasmid DNA

Zur Trennung des 7 kbp Plasmids von der 21 kbp Variante wird nach den Beobachtungen der vorherigen Trennung ein höheres Mischungsverhältnis von ungefähr 7:1 angesetzt. Die Wechselspannung wird bei dieser Trennung von 198 auf 378 V in sechs Schritten zu je 36 V für 55 s gesteigert. Die Gesamtzeit der Trennung beträgt 330 s. Die Abbildung 4.14 zeigt das resultierende Intensitätsdiagramm.

Auf Grund der bereits bestimmten Polarisierbarkeiten und aller bisher durchgeführten Trennungen kann bei dieser Trennung auf ein Spiking zur Identifikation der Peaks verzichtet werden. Die Zuordnung des 7 und des 21 kbp Monomer Peaks ist eindeutig. Rechts neben dem 7 kbp Peak befindet sich wieder der aus der 7 kbp Probe stammende unbekannte Peak. Bei den kleinen Intensitätserhöhungen zwischen dem 21 kbp und dem 7 kbp Peak handelt es sich vermutlich um das Dimer des 7 kbp Plasmids. Vernachlässigt man dieses, so erhält man eine Auflösung zwischen beiden Peaks von  $Res = 2,9$ .

Das beobachtete Verhältnis der Peakgrößen, bzw. -flächen stimmt auch bei dieser Trennung nicht mit der Erwartung überein. Die Diskussion dieser Beobachtung erfolgt ebenfalls in Kapitel 4.3.3.

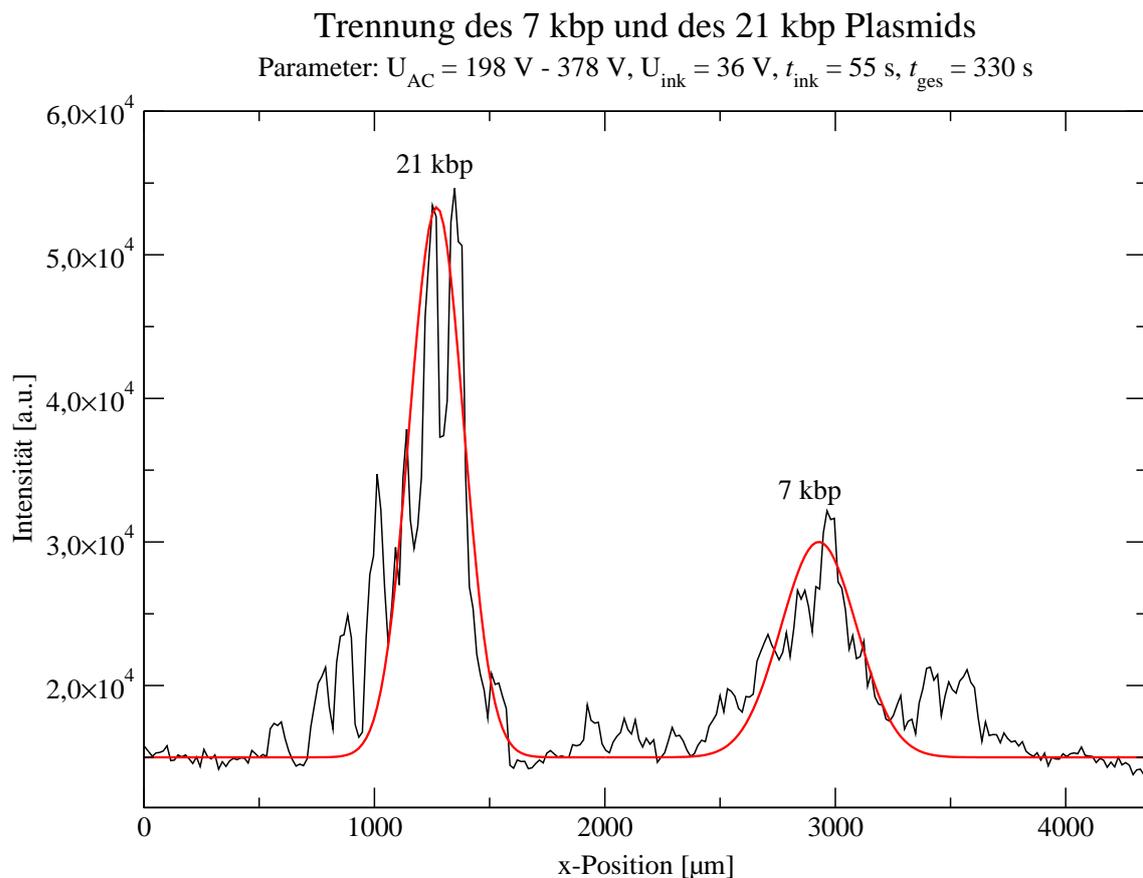


Abbildung 4.14: Auftrennung einer Plasmid DNA Mischung (7 und 21 kbp)

Die Abbildung zeigt die dielektrophoretische Auftrennung einer Mischung aus 7 und 21 kbp Plasmid DNA.

### 10,3 und 15,5 kbp Plasmid DNA

Das Intensitätsdiagramm der Trennung der Plasmid DNA Längen 10,3 und 15,5 kbp befindet sich in Abbildung 4.15. Die verwendete Spannungsrampe beginnt bei 228 V und endet bei 372 V. Die gesamte Trennung dauert 280 s und wird in sieben Schritten zu jeweils 40 s bei einem Spannungsinkrement von 24 V vollzogen.

Um die Peak Identifikationen zu bestätigen wird ein Spiking mit dem 10,3 kbp Plasmid durchgeführt. Dieses zeigt auch, dass es sich bei den kleinen Intensitätserhöhungen rechts des 10,3 kbp Peaks um den unbekanntem Peak aus der 10,3 kbp Plasmid DNA handelt, welcher nach der Konzentrationserhöhung deutlich hervortritt (siehe Abbildung A.5 im Anhang A.2).

Beide Peaks (10,3 und 15,5 kbp) zeigen auf der jeweils linken Seite im unteren Bereich

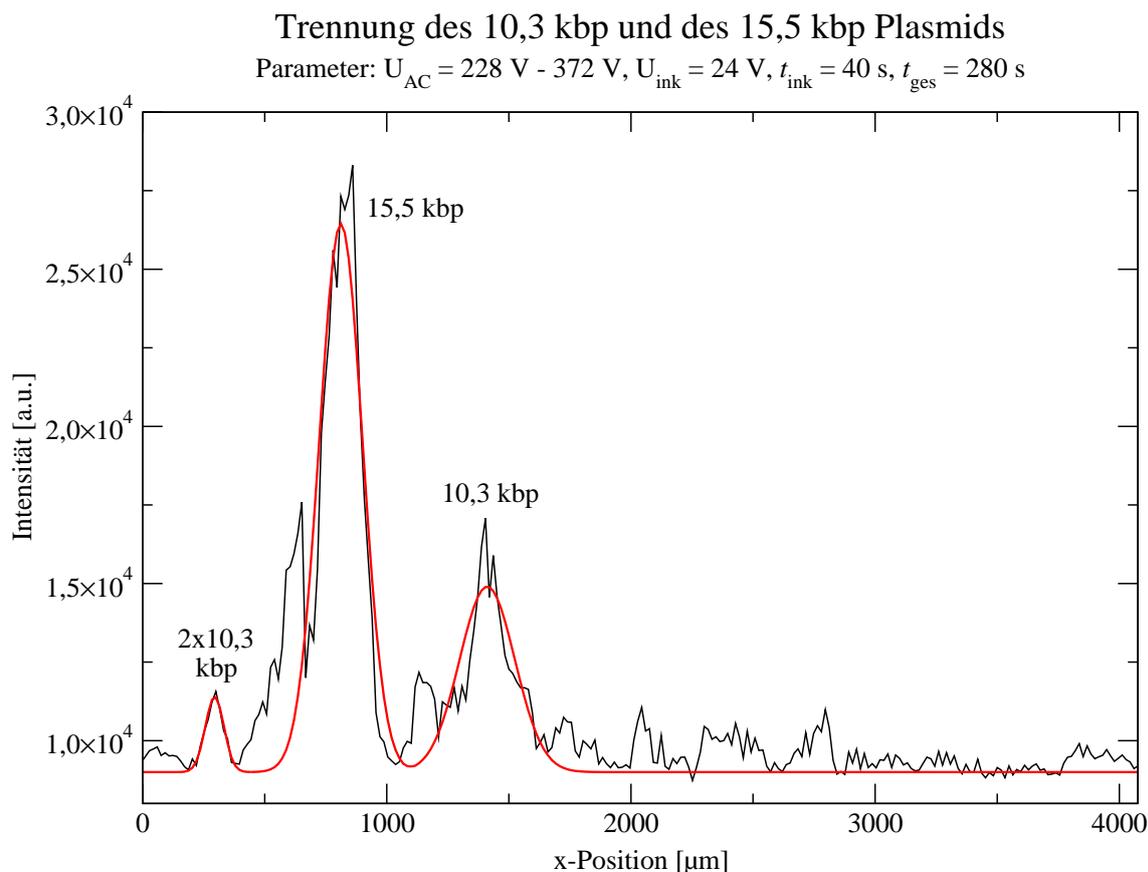


Abbildung 4.15: Auftrennung einer Plasmid DNA Mischung (10,3 und 15,5 kbp)

Die Abbildung zeigt die dielektrophoretische Auftrennung einer Mischung aus 10,3 und 15,5 kbp Plasmid DNA.

eine Peakverbreiterung, deren Ursachen bereits bei der Monomer - Dimer Trennung des 7 kbp Plasmids diskutiert worden sind. Vernachlässigt man diese Verbreiterungen so ergibt sich eine Auflösung von  $Res = 1,3$  zwischen den beiden Intensitätsmaxima. Fast alle Separationen der letzten beiden Kapitel (4.3.1 und 4.3.2) zeigen mit den gewählten Parametern basislinien aufgelöste Trennergebnisse. Theoretisch lässt sich die Auflösung noch weiter verbessern. Dazu müssen die Spannungsschritte  $U_{ink}$  so eingestellt werden, dass mit jedem weiteren Schritt nur die DNA mit der nächstgeringeren Polarisierbarkeit gefangen wird (siehe auch [87]). Eine gleichzeitige Erhöhung des zeitlichen Inkrements  $t_{ink}$  führt dann zu einer größeren räumlichen Trennung. Praktisch ist diese „ideale“ Trennung nur sehr schwer zu erreichen, da eine übermäßige Erhöhung der Zeit pro Spannungsincrement zu einer Diffusionsverbreiterung noch nicht gefangener DNA führt und die für jede DNA charakteristischen Spannungsschritte, bzw. Feldstärken, nicht bekannt sind.

### 4.3.3 Diskussion und Konformationshypothese

Im Folgenden wird eine mögliche Erklärung für den unbekanntenen Peak, der bei der 7 kbp und der 10,3 kbp Plasmid DNA auftritt, ausgeführt. In den jeweiligen Intensitätsdiagrammen der beiden Plasmide befindet sich das beobachtete zusätzliche Intensitätsmaximum rechts neben dem jeweiligen Monomer Peak. Das lässt auf eine geringere Polarisierbarkeit der Substanz schließen. Auf Grund der Fluoreszenz und der Kamerabilder handelt es sich dabei um DNA. Da die Polarisierbarkeit der Plasmid DNA nach den Resultaten aus Kapitel 4.2.2 von der DNA Länge abhängt, besteht der Verdacht, dass es sich um kürzere DNA Fragmente handelt, die beim Pipettieren erzeugt werden. Mehrere Versuche mit wiederholtem Pipettieren und Durchmischen haben jedoch keine Steigerung des Peaks hervorgerufen und bei der 21 kbp Plasmid DNA Probe keinen weiteren Peak erzeugt. Damit können Fragmentierungen durch Pipettierschritte ausgeschlossen werden.

Um zu überprüfen, ob es sich um bereits vorhandene kürzere DNA Stränge handelt, wird eine gelelektrophoretische Trennung durchgeführt<sup>1</sup>. Das Ergebnis ist photographisch in Abbildung 4.16 dargestellt. Bei dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff handelt es sich um Ethidiumbromid (siehe Kapitel 2.1.4).

Auf der rechten Seite der Abbildung befinden sich die nur schwach zu erkennenden Banden eines DNA Markers (1000 bp, konkatemer Leiter), welcher aber für diese Diskussion keine Rolle spielt. Für die Plasmide der Längen 15,5, 10,3 und 7 kbp sinkt wie erwartet mit steigender DNA Länge die zurück gelegte Distanz im Gel. Das 7 kbp Dimer (2ccc) liegt ungefähr auf gleicher Höhe wie das 15,5 kbp Monomer (ccc).

Die Abbildung zeigt weder für das 7 noch für das 10,3 kbp Plasmid eine Bande, die sich weiter als das jeweilige Monomer bewegt hat. Damit ist die Möglichkeit bereits vorhandener kürzerer DNA ausgeschlossen. Im Gegensatz zu den anderen Plasmiden zeigen beide jedoch eine Bande, die sich hinter dem jeweiligen Dimer befindet. Diese Banden sind in der Abbildung mit einem x markiert. Da die Plasmide keine längeren DNA Stränge als die Dimere enthalten, müssen die x-Banden zu einer anderen DNA Konformation gehören, welche einen größeren Gyrationradius aufweist und demnach im Gel stärker retardiert wird. Dafür kommen die lineare und die zirkuläre entspannte Form der DNA (oc) in Frage, deren Gyrationradien im Vergleich zur superspiralisierten Variante (ccc) bei gleicher Basenpaarzahl deutlich größer sind [82]. Dies scheint zunächst einen Widerspruch zu der in Kapitel 4.2.2 beobachteten Abhängigkeit der Polarisation

<sup>1</sup>Agarose Gel (1 %), Trennungsspannung 50 V, Dauer 90 min, durchgeführt von Hanna Bednarz, Lehrstuhl für Proteom- und Metabolomforschung (Prof. Dr. Niehaus), Universität Bielefeld.

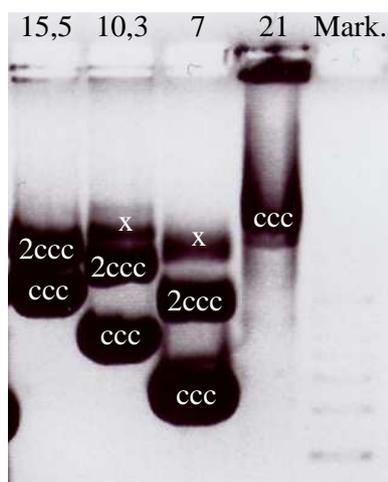


Abbildung 4.16: Gelelektrophoretische Trennung einiger Plasmide

Die Abbildung zeigt die Trennung der Plasmide von 7 bis 21 kbp in einem 1-prozentigen Agarose Gel. Die Bewegungsrichtung verläuft von oben nach unten. Rechts im Bild befindet sich ein nur sehr schwach zu erkennender DNA Marker, der aber für die Diskussion keine Rolle spielt. Das 21 kbp Plasmid ist nur zum Teil in das Gel gelaufen und zeigt eine breit verschmierte Bande. Das 7 und das 10,3 kbp Plasmid zeigen jeweils drei Banden. Für weitere Informationen siehe Haupttext.

vom Gyrationradius darzustellen (siehe Gleichung 4.9). Jedoch gilt erstens die dort beschriebene Abhängigkeit  $\alpha \propto \bar{R}_g^3$  nur für superspiralisierte DNA und zweitens wird ein möglicher Einfluß des Interkalators nicht berücksichtigt, welcher weiter unten im Rahmen der Hypothese noch beschrieben wird.

Die Tabelle 4.4 über die Plasmid-Zusammensetzungen zeigt, dass das 7 kbp Plasmid 1,8 % und das 10,3 kbp Plasmid 1,5 % der oc Form enthält, während der Anteil bei der 15,5 kbp und der 21 kbp DNA um den Faktor 3 geringer ausfällt. Zusätzlich beweist das Gel die Existenz einer DNA Konformation, welche bei der 7 und 10,3 kbp Plasmid DNA zusätzlich zum ccc Monomer und Dimer auftritt. Auf Grund der obigen Überlegungen wird daher angenommen, dass es sich bei den beiden mit x markierten Banden um die oc Konformation der 7, bzw. 10,3 kbp Plasmid DNA handelt. Damit lässt sich dann zwar die Existenz der zusätzlichen Peaks in den jeweiligen Intensitätsdiagrammen erklären, nicht aber deren Position und Größe.

Es ist bekannt, dass bei gleicher Basenzahl die lineare und die entspannte zirkuläre Form von DNA etwa die zweifache Menge des Interkalators Ethidiumbromid in Sättigung aufnehmen als die superspiralisierte Form [88]. Wird daher ein Korrekturfaktor von 0,5 bei

der Berechnung der Flächeninhalte unter den vermeintlichen *oc* Peaks angenommen, so erhält man einen theoretischen *oc* Anteil von 15,5 % beim 7 kbp Plasmid und 15,9 % bei der 10,3 kbp DNA. Im Vergleich mit den Herstellerangaben liegt dies etwa um den Faktor 10 höher.

In dieser Arbeit wird jedoch nicht Ethidiumbromid sondern der Interkalator YOYO-1 unterhalb seiner Sättigungskonzentration [34] verwendet, dessen reale Interkalationsrate bei verschiedenen Konformationen, sowie der Einfluß auf deren Polarisierbarkeit nicht genau bekannt ist. Es wird daher zur Erklärung des unbekanntes Peaks folgende Hypothese aufgestellt:

Da es sich bei der Interkalation um einen Gleichgewichtsprozess handelt und das Verhältnis der YOYO-Aufnahmefähigkeit zwischen *ccc* und *oc* Konformation der Plasmid DNA nicht bekannt ist, wird dieses so aus den Peakflächen der Intensitätsdiagramme berechnet, dass der resultierende *oc* Anteil den Herstellerangaben entspricht. Diese Rechnung führt im Fall des 7 kbp Plasmids zu einer etwa 20-fach höheren YOYO Aufnahme der *oc*-Konformation im Vergleich zur *ccc*-Form. Bei der 10,3 kbp Plasmid DNA führt die gleiche Rechnung zu einem Faktor von ca. 25.

Ist diese Rechnung korrekt, so führt die gesteigerte Aufnahme des positiv geladenen Interkalators zu einer geringeren negativen Nettoladung der *oc* Konformation. Dies resultiert in einer geringeren Anzahl von Gegenionen in der abschirmenden Ionenwolke und damit in einer geringeren Polarisierbarkeit. Die Position, Größe und zugrunde liegende DNA Konformation der beiden unbekanntes Peaks kann auf diese Weise erklärt werden. Unberücksichtigt bleibt bei dieser Hypothese der Einfluß einer gesteigerten Interkalatoraufnahme auf Struktur und Gyrationradius der DNA sowie auf die elektrophoretische Mobilität [89].

Aus den Intensitätsdiagrammen der Trennung des 7 kbp Plasmids von der 10,3 kbp Variante und des zugehörigen Spikings (siehe Abbildung A.4) ergibt sich, dass der unbekanntes Peak des 10,3 kbp Plasmids sich noch weiter rechts befindet als der der 7 kbp DNA. Das bedeutet, dass die vermutete 10,3 kbp *oc* Konformation trotz größerer Länge und Ausdehnung (Positionsvergleich der *x*-Banden im Gel Bild, Abbildung 4.16) schlechter polarisierbar als die vermeintliche 7 kbp *oc* Konformation ist. Dies kann als ein Indiz für die Richtigkeit der weiter oben durchgeführten Rechnung interpretiert werden, nach der die 10,3 kbp *oc* Form noch mehr YOYO-1 als die 7 kbp *oc* DNA im Vergleich zum jeweiligen *ccc* Monomer aufnimmt. Unter der Annahme der Gültigkeit der Hypothese hat dies eine weitere Reduktion der Polarisierbarkeit zur Folge und bie-

tet somit eine mögliche Erklärung für die Reihenfolge der unbekanntenen Peaks in dieser Trennungsstudie.

Das 21 kbp Plasmid (zweite Spur von rechts im Gel Bild), welches sich bereits in den Polarisierbarkeitsmessungen (vergleiche Tabelle 4.2) und in den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen (siehe Abbildung 4.6) von den kürzeren Plasmiden unterscheidet, zeigt auch in der Gelelektrophorese ein abweichendes Verhalten. Es erreicht in der zurückgelegten Distanz im Gel weder die Bande des 10,3 kbp Dimers noch läuft es vollständig in das Gel ein. Ein großer Teil verbleibt am Startpunkt. Des Weiteren ist die erkennbare „Bande“ über eine weite Strecke verschmiert. Diese Beobachtungen führen zu der Vermutung, dass das 21 kbp Plasmid nicht wie die kürzeren Plasmide in einer kompakten, superspiralisierten Form vorliegt, sondern eine weiträumigere Konformation einnimmt. Diese nimmt ein größeres Volumen ein und erfährt somit durch die Siebwirkung des Gels eine stärkere Retardation als die kompakteren Plasmide kleinerer Länge. Die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.6 in Kapitel 4.2 können als Bestätigung für die Vermutung einer derartigen weiträumigeren Konformation aufgefasst werden, da sie die 21 kbp DNA weniger als kompakte superspiralisierte DNA sondern eher als Knäuel zeigen.

Unter der Annahme der Gültigkeit der Hypothese, die zur Erklärung der unbekanntenen Peaks in den Intensitätsdiagrammen der 7 und 10,3 kbp Plasmid DNA aufgestellt worden ist, lässt sich auch die Abweichung des 21 kbp Plasmids in den Polarisierbarkeitmessungen begründen: Die von der superspiralisierten Form abweichende Konformation ermöglicht eine größere YOYO Aufnahme und führt, wie bereits beschrieben, zu einer geringeren Polarisierbarkeit. Ein unterstützendes Indiz für die höhere Interkalator Aufnahme der 21 kbp DNA ist durch das Verhältnis des 21 kbp Plasmid Peaks zum 7 kbp Peak in der Trennung dieser beiden Längen gegeben (siehe Abbildung 4.14). Unter der Annahme einer längen- und konformationsunabhängigen Interkalatoraufnahme sollte bei gleichen DNA Konzentrationen der 21 kbp Peak die dreifache Größe des 7 kbp Peaks besitzen. Die Wahl des in dieser Trennung angesetzten Mischungsverhältnisses von sieben Teilen 7 kbp Plasmid DNA zu einem Teil des 21 kbp Plasmids müsste die Peakfläche des 7 kbp Plasmids im Vergleich zur längeren DNA in etwa verdoppeln. Das Intensitätsdiagramm zeigt jedoch ein anderes Bild und eine Berechnung der Peakflächen führt zu dem Ergebnis, dass die Fläche des 21 kbp Plasmid Peaks ca. das 1,9-fache des 7 kbp Peaks beträgt.

Bei den vorangegangenen Überlegungen und Schlussfolgerungen besteht zusätzlich noch die Möglichkeit, dass die YOYO Aufnahme, unabhängig von der Konformation der DNA, auch von der DNA Länge abhängt. Das Flächenverhältnis der ccc Monomer Peaks bei

der Trennung des 7 kbp Plasmids von der 10,3 kbp DNA (siehe Abbildung 4.13) deutet auf eine mögliche Abweichung von der Proportionalität von YOYO Aufnahme zu DNA Länge hin. Eine genaue Aussage zu diesem Aspekt ist aber auf der Basis der bisherigen experimentellen Daten nicht möglich.

Zusammengefasst lässt sich Folgendes festhalten: Es existiert eine Abhängigkeit der Polarisierbarkeit von der Form der Plasmid DNA, was durch den Unterschied zwischen der 15 und der 21 kbp DNA in den Polarisierbarkeitsmessungen und durch die AFM Bilder belegt ist. Die Frage nach einer Abhängigkeit der Polarisierbarkeit von der aufgenommenen Menge des Interkalators YOYO-1 und nach einer konformationsabhängigen (oc - ccc) Polarisierbarkeit bei gleicher DNA Länge lässt sich auf Basis der Messdaten nicht mit Sicherheit beantworten.

Die getroffene Zuordnung der oc Konformation zu den unbekanntem Peaks in den Intensitätsdiagrammen der 7 und 10,3 kbp Monomer - Dimer Trennungen lässt sich mit den vorangegangenen Überlegungen und Schlussfolgerungen konsistent begründen. Eine Möglichkeit, die Hypothese zu überprüfen, besteht in einem Spiking mit reiner oc DNA der entsprechenden Länge. Derartige DNA Proben sind jedoch bisher nicht verfügbar.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde das Konzept der elektrodenlosen Dielektrophorese erfolgreich in einem strukturierten Mikrofluidik System zur Untersuchung und Manipulation von Plasmid DNA umgesetzt. Die dielektrophoretischen Fallen basieren auf einem elektrischen Wechselfeld, dessen räumliche Inhomogenität durch die Mikrostrukturierung des Trennkanals, bestehend aus periodisch angeordneten Reihen von nichtleitenden Hindernissen, hervorgerufen wird. Die Stärke der energetischen Fallen zwischen den Hindernissen wird durch das Variieren der Wechselfeldamplitude kontrolliert und erlaubt damit ein gezieltes Fangen der polarisierten DNA Moleküle.

Die darauf aufbauenden Experimente haben eine quantitative Bestimmung der Polarisierbarkeit der untersuchten Plasmide (7 bis 23 kbp) ermöglicht. Ein Vergleich des bisher einzig verfügbaren Literaturwertes für ein Plasmid vergleichbarer Länge (12 kbp, [79]) zeigt trotz der Unterschiede in der Messmethode und in den chemischen Bedingungen eine im Rahmen des Fehlers überraschend gute Übereinstimmung mit dem für das 10,3 kbp Plasmid bestimmten Wert. Desweiteren wurde eine Längenabhängigkeit der Polarisierbarkeit festgestellt: Mit Ausnahme der 21 und 23 kbp Plasmid DNA führt eine zunehmende DNA Länge zu einer größeren Polarisierbarkeit, welche kubisch mit dem Gyrationradius skaliert.

Die gewonnenen Erkenntnisse konnten auf ein längenabhängiges, dielektrophoretisches Separationsverfahren übertragen werden. Es wurden Trennungen von Monomeren und Dimeren einzelner Plasmide, sowie von komplexen Gemischen unterschiedlicher DNA Längen durchgeführt. Die Trennzeiten für die, bis auf die Monomer-Dimer Trennung des 21 kbp Plasmids, basislinien aufgelösten Separationen liegen dabei in der Größenordnung von wenigen Minuten. Dies ist mit den in der Literatur veröffentlichten Werten für die Trennung von (linearer) DNA ähnlicher Länge in Mikrofluidik Systemen, zum Beispiel durch entropische Fallen [90], vergleichbar.

Im Verlauf der Arbeit haben sich einige Auffälligkeiten und offene Fragestellungen ergeben, die nicht abschließend behandelt werden konnten und somit Ansätze für weiterführende Untersuchungen in der Zukunft liefern. An erster Stelle stehen die Eigenschaften des 21 und des 23 kbp Plasmids, die sich von den kürzeren Plasmiden deutlich

---

unterscheiden. Entgegen der mit der DNA Länge steigenden Polarisierbarkeit, die bei den Plasmiden der Längen 7 bis 15,5 kbp beobachtet wurde, weist die 21 kbp DNA einen geringeren Wert als das kürzere 15,5 kbp Plasmid auf. Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen zeigen zusätzlich einen strukturellen Unterschied. Die Vermutung eines Zusammenhangs liegt nahe, die Ursachen sind jedoch unklar. Die Beschreibung der Polarisierbarkeit in Abhängigkeit der Anzahl der Basenpaare mit einem Skalengesetz erscheint ohne Berücksichtigung dieser Unterschiede fragwürdig.

Die Beobachtungen bei den Separationsexperimenten führen zu der Vermutung einer längen- und konformationsabhängigen Aufnahme Interkalators YOYO-1. Die Klärung dieser beiden Punkte stellt einen wichtigen Schritt zu einer Untersuchung des Einflusses von Interkalationsrate und DNA Konformation auf die Polarisierbarkeit und auf weiterführende Separationsexperimente dar. In diesem Zusammenhang liegt ein weiterer wichtiger Punkt in der Entwicklung eines besseren Modells der Polarisierbarkeit der DNA, mit welchem sich Aussagen über eine mögliche kritische DNA Länge oder eine eventuelle Sättigung der Polarisierbarkeit, sowie über den Interkalatoreinfluss auf die DNA und ihre Polarisierbarkeit treffen lassen.

Dem erfolgreichen Einsatz des hier beschriebenen Mikrofluidik Systems schließt sich die Herausforderung an, die Auflösungsgrenzen des Separationsverfahrens in Bezug auf Längen- und Konformationstrennung auszuloten. Für entsprechende Messungen sind verschiedene, hoch aufgereinigte DNA Proben mit geringem Längenunterschied, bzw. mit unterschiedlicher Konformation bei gleicher Länge erforderlich, die bisher nicht verfügbar gewesen sind. Zuletzt stellt sich die Frage, ob die Methode zur quantitativen Bestimmung der Polarisierbarkeit sowie das dielektrophoretische Separationsverfahren auch auf andere Biomoleküle, z.B. Proteine, oder Nanopartikel anwendbar ist. Dies soll in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

# A Appendix

## A.1 Ersatzschaltbild und Widerstandsberechnungen

Dieses Kapitel enthält die Berechnung der elektrischen Feldstärke innerhalb der Fallen in Abhängigkeit der angelegten Spannung (siehe Kapitel 2.3.5 und [13]). Dazu wird der Spannungsabfall über jeder Fallenreihe bestimmt. Das in Abbildung 2.15 gezeigte Ersatzschaltbild für den Mikrofluidik Chip kann auf Grund seiner Geometrie noch weiter vereinfacht werden, was in Abbildung A.1 dargestellt ist. Die Kanäle der Reservoirire 1, 2 und 4 haben die gleiche Länge. In der Breite unterscheidet sich Kanal 1 jedoch von den beiden anderen (siehe Tabelle 4.1). Im Ersatzschaltbild (Abbildung A.1) tragen daher die Kanäle 2 und 4 den gleichen Widerstand ( $R_2$ ), während Kanal 1 der Widerstand  $R_1$  und dem strukturierten Kanal zum Reservoir 3 der Widerstand  $R_3$  zugewiesen wird.

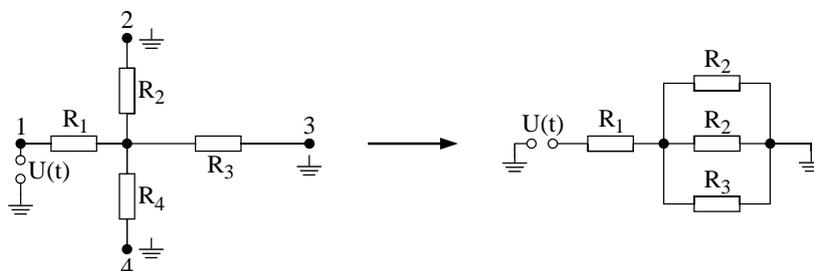


Abbildung A.1: Vereinfachtes Ersatzschaltbild

*Die Abbildung zeigt die elektrische Beschaltung des Mikrofluidik Chips (links, siehe auch Abbildung 2.15) und eine weitere Vereinfachung des Ersatzschaltbildes (rechts).*

Damit ergibt sich für den Gesamtwiderstand  $R_{\text{ges}}$ :

$$\begin{aligned} R_{\text{ges}} &= R_1 + (2 R_2^{-1} + R_3^{-1})^{-1} \\ &= R_1 + R_{\parallel}. \end{aligned}$$

$R_{\parallel}$  bezeichnet dabei den Parallelwiderstand über die Kanäle zu den Reservoirs 2, 3 und 4. Die Pfosten aus PDMS innerhalb der Strukturierung sind Isolatoren und verringern die für die leitende Flüssigkeit zur Verfügung stehende Querschnittsfläche. Daher muss der Ersatzwiderstand des strukturierten Kanals ( $R_3$ ) weiter unterteilt werden in die Summe aus den Widerständen der Fallenreihen ( $R_F$ ) und denen der Zwischenräume zwischen den Reihen ( $R_{ZR}$ ) in Abhängigkeit der jeweils zur Verfügung stehenden Querschnittsfläche.

$$\begin{aligned} R_3 &= 379 R_F + 378 R_{ZR} \\ &\approx 379 (R_F + R_{ZR}) \\ &\stackrel{2.25}{=} 379 \rho \left( \frac{L_F}{A_F} + \frac{L_{ZR}}{A_{ZR}} \right). \end{aligned}$$

$L_F$  bezeichnet hier die Fallenlänge,  $L_{ZR}$  den mittleren Fallenabstand abzüglich der Fallenlänge,  $A_F$  die Summe der Querschnittsflächen aller Fallen einer Reihe und  $A_{ZR}$  die Querschnittsfläche im übrigen Kanal. Die entsprechenden Werte befinden sich in Tabelle 4.1. Der spezifische Widerstand  $\rho$  ist in der weiteren Rechnung nicht mehr von Bedeutung. Mit diesen Vorüberlegungen und den Kirchhoff'schen Gesetzen ist es nun möglich das Verhältnis zwischen dem Spannungsabfall  $U_F$  über einer Fallenreihe, und damit über jeder einzelnen Falle, und der angelegten Gesamtspannung  $U$  zu berechnen:

$$\begin{aligned} \frac{U_F}{U} &= \frac{R_F}{R_3} \cdot \frac{R_{\parallel}}{R_{\text{ges}}} \\ &= 6,2 \cdot 10^{-4} \pm 0,4 \cdot 10^{-4}. \end{aligned} \tag{A.1}$$

Mit einer wie in Abbildung A.1 angelegten Spannung  $U$  ergibt sich ein Spannungsabfall von  $(6,2 \cdot 10^{-4} \pm 0,4 \cdot 10^{-4}) U$  pro Fallenreihe. Der mit der Gauss'schen Fehlerfortpflanzung bestimmte Fehler beträgt etwa 7 % und ist auf die Ungenauigkeiten in den Strukturmaßen zurückzuführen.

## A.2 Separationen und Spiking

Die folgenden Abbildungen dienen zur Ergänzung und Diskussion ausgewählter Monomer - Dimer Trennungen und weiterer Separationsexperimente. Dargestellt sind die Intensitätsdiagramme der jeweiligen Messung im oberen Teil mit einem Intensitätsdiagramm des zugehörigen Spikings im unteren Teil.

Bei den Monomer - Dimer Trennungen wird zur Identifikation des Dimer Peaks ein Plasmid vergleichbarer Länge hinzugefügt, was sich im Intensitätsdiagramm in einer Vergrößerung der gemessenen Intensität an der Stelle des Dimers niederschlägt.

Bei den Versuchen zur Trennung unterschiedlich langer Plasmide wird nach der eigentlichen Intensitätsmessung ein Teil der DNA Lösung aus dem Probenreservoir gegen die 300 pM Lösung eines an der Trennung beteiligten Plasmids ausgetauscht, was zu einer Konzentrationsüberhöhung dieser DNA und damit zu einer Vergrößerung der zugehörigen Peaks führt. Damit lassen sich die beobachteten Peaks mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit zuordnen.

Die Interpretationen und Zuordnungen werden in den Kapiteln 4.3.1, 4.3.2 und 4.3.3 diskutiert und an dieser Stelle nicht wiederholt.

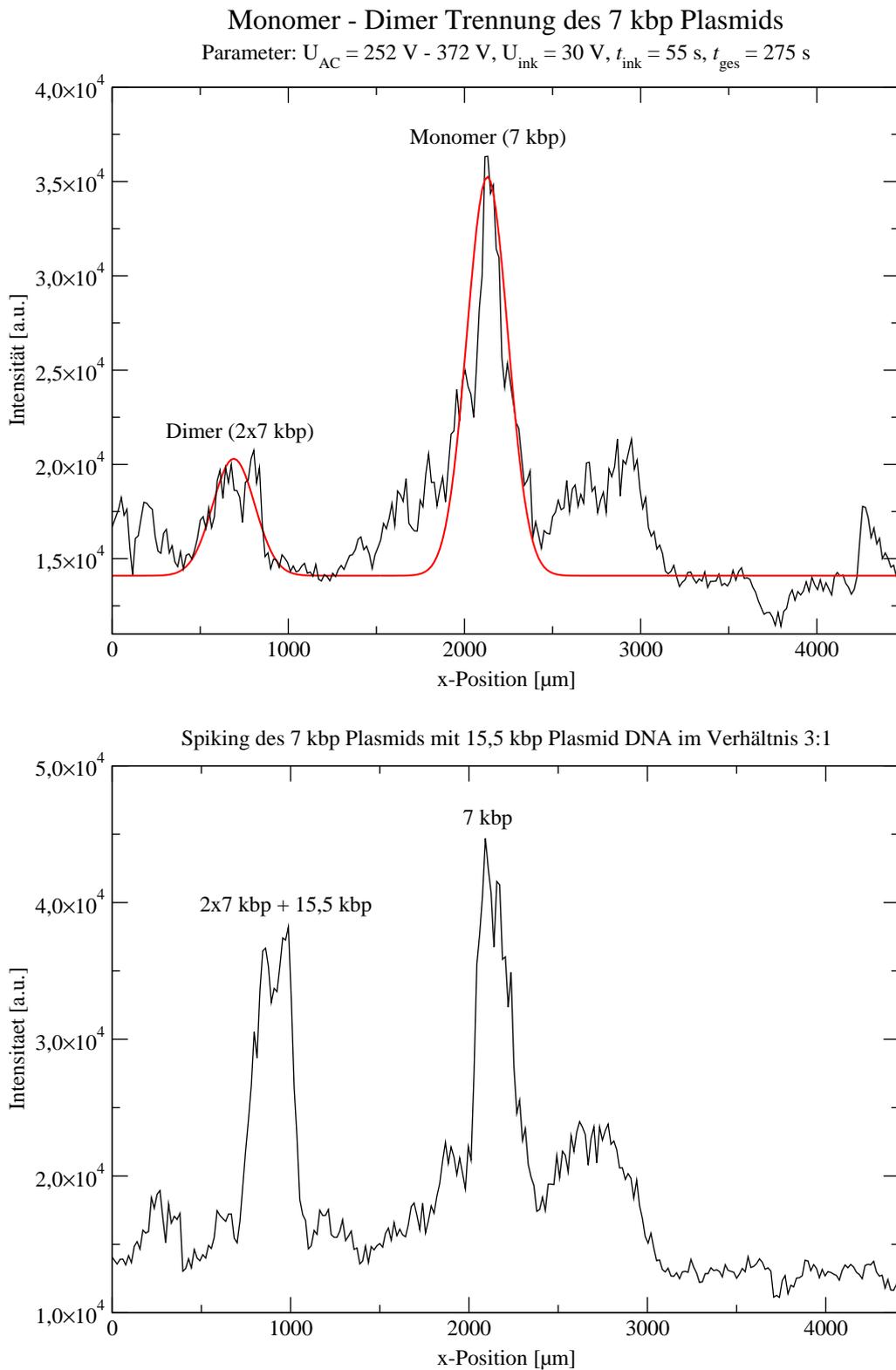


Abbildung A.2: Monomer – Dimer Trennung des 7 kbp Plasmids, Spiking

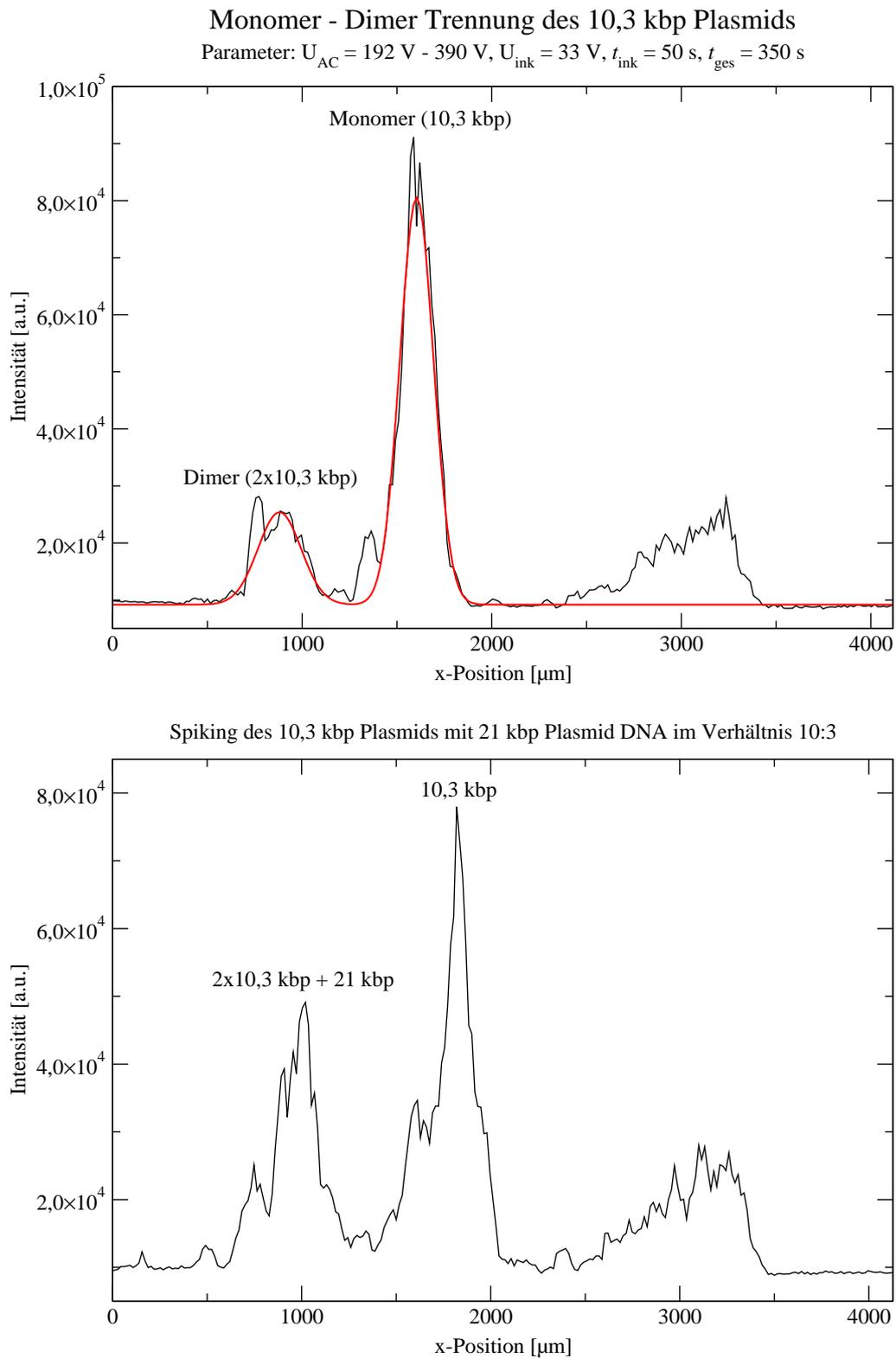


Abbildung A.3: Monomer – Dimer Trennung des 10,3 kbp Plasmids, Spiking

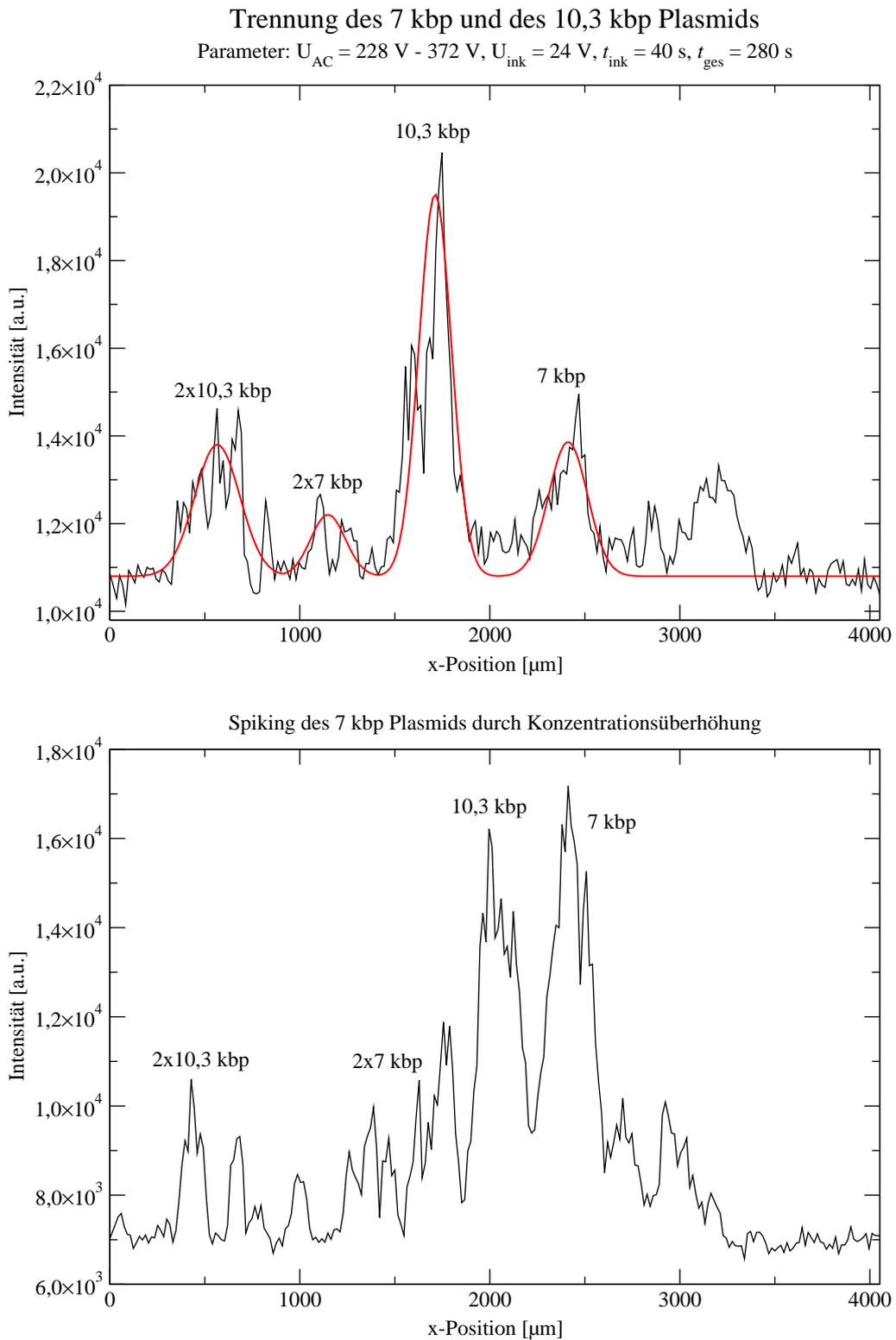


Abbildung A.4: Trennung von Plasmid DNA der Längen 7 und 10,3 kbp, Spiking

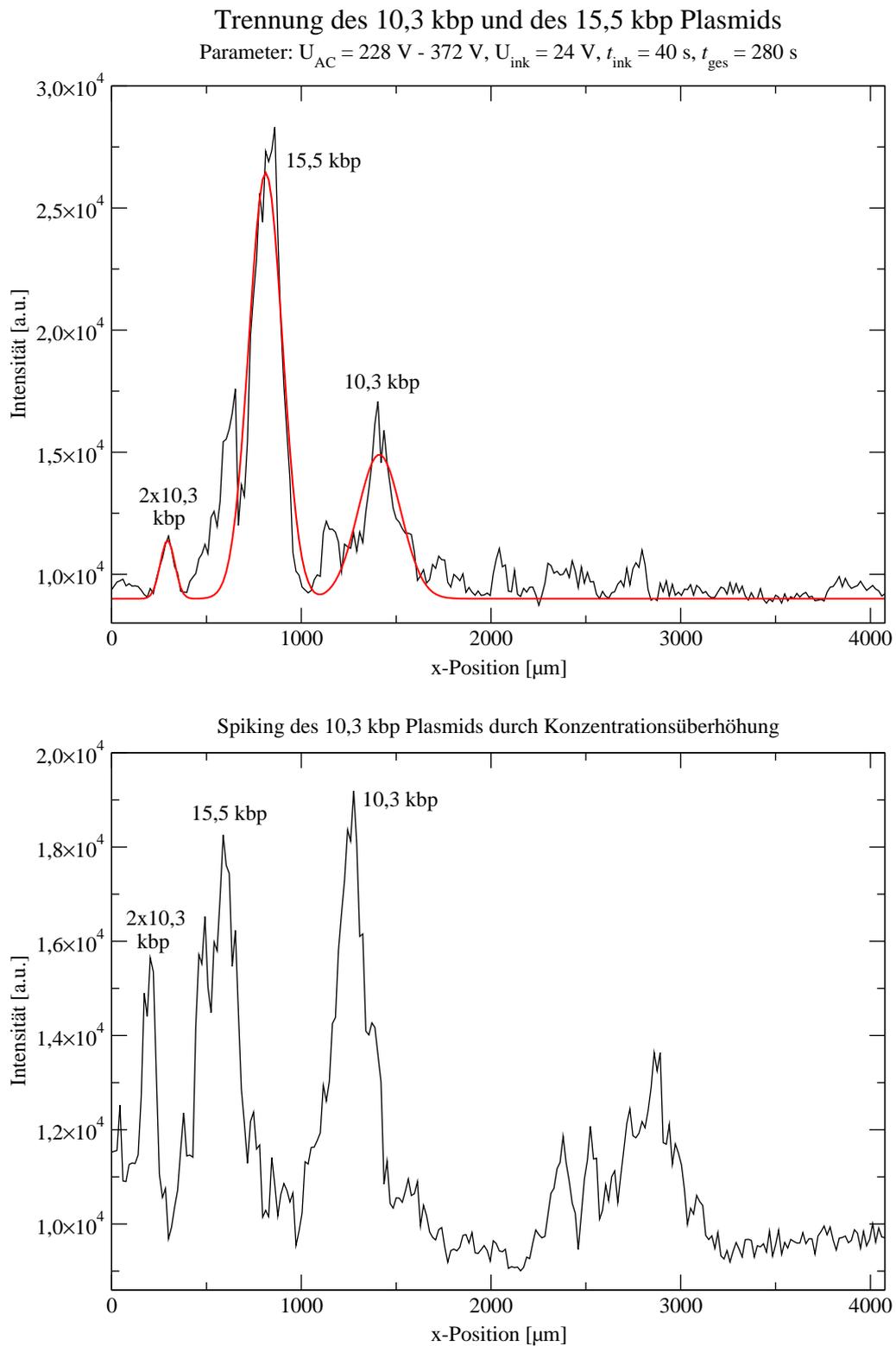


Abbildung A.5: Trennung von Plasmid DNA der Längen 10,3 und 15,5 kbp, Spiking

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Struktur der DNA im Detail . . . . .	4
2.2	Übergeordnete Struktur der DNA . . . . .	7
2.3	Superspiralisierung . . . . .	9
2.4	Topoisomere . . . . .	10
2.5	Jablonski Diagramm . . . . .	12
2.6	Kontaktwinkel . . . . .	14
2.7	Kapillarität . . . . .	15
2.8	Hydrodynamischer Fluß . . . . .	16
2.9	Elektrische Doppelschicht . . . . .	20
2.10	Elektroosmotischer Fluß . . . . .	21
2.11	Dielektrophorese . . . . .	25
2.12	DNA Polarisierbarkeit (Modell) . . . . .	27
2.13	Dielektrophoretische Fallen . . . . .	29
2.14	Potentielle Energie . . . . .	30
2.15	Ersatzschaltbild . . . . .	31
2.16	Kramers Potential . . . . .	34
2.17	Energielandschaft . . . . .	36
3.1	Mikrostrukturierung . . . . .	38
3.2	Anpresseinheit, schematische Darstellung . . . . .	41
3.3	Mikrofluidikchip – Herstellung . . . . .	42
3.4	Kontaktierung des Mikrofluidik Chips . . . . .	44
3.5	Versuchsaufbau . . . . .	45
3.6	Injektion ( <i>pinched injection</i> ) . . . . .	47
4.1	Mikrofluidik Chip, Übersicht . . . . .	50
4.2	Strukturmaße, REM Aufnahme . . . . .	51
4.3	DNA in dielektrophoretischer Falle . . . . .	54

4.4	Auftragung der Fallenaufenthaltsdauer gegen das Quadrat der Amplitude für die Plasmide der Längen 7 bis 15,5 kbp . . . . .	58
4.5	Auftragung der Fallenaufenthaltsdauer gegen das Quadrat der Amplitude für die Plasmide der Längen 7 bis 23 kbp . . . . .	59
4.6	AFM Aufnahmen der Plasmide . . . . .	60
4.7	Migrationsgeschwindigkeiten . . . . .	64
4.8	Frequenzabhängigkeit der Migrationsgeschwindigkeit . . . . .	66
4.9	Konformationen der Plasmid DNA . . . . .	68
4.10	Auftrennung der 7 kbp Plasmid DNA . . . . .	70
4.11	Auftrennung der 10,3 kbp Plasmid DNA . . . . .	72
4.12	Auftrennung der 21 kbp Plasmid DNA . . . . .	74
4.13	Auftrennung einer Plasmid DNA Mischung (7 und 10,3 kbp) . . . . .	75
4.14	Auftrennung einer Plasmid DNA Mischung (7 und 21 kbp) . . . . .	77
4.15	Auftrennung einer Plasmid DNA Mischung (10,3 und 15,5 kbp) . . . . .	78
4.16	Gelelektrophoretische Trennung einiger Plasmide . . . . .	80
A.1	Vereinfachtes Ersatzschaltbild . . . . .	86
A.2	Monomer – Dimer Trennung des 7 kbp Plasmids, Spiking . . . . .	89
A.3	Monomer – Dimer Trennung des 10,3 kbp Plasmids, Spiking . . . . .	90
A.4	Trennung von Plasmid DNA der Längen 7 und 10,3 kbp, Spiking . . . . .	91
A.5	Trennung von Plasmid DNA der Längen 10,3 und 15,5 kbp, Spiking . . . . .	92

# Literaturverzeichnis

- [1] SCHLEEF, M.: *Impfen mit Genen - Strategien für die DNA-Vakzinierung*. transkript, 6:48–49, 2005.
- [2] VILKNER, T., D. JANASEK und ANDREAS MANZ: *Micro total analysis systems. Recent developments*. Anal Chem, 76:3373–3385, 2004.
- [3] VIOVY, J. L.: *Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms*. Review of Modern Physics, 72:813–872, 2000.
- [4] VIOVY, J. L. und T. DUKE: *DNA electrophoresis in polymer solutions: Ogston sieving, reptation and constraint release*. Electrophoresis, 14:322–329, 1993.
- [5] INATOMI, K., S. IZUO, S. LEE, H. OHJI und S. SHIONO: *Electrophoresis of DNA in micro-pillars fabricated in polydimethylsiloxane*. Microelectronic Engineering, 70:13–18, 2003.
- [6] 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*. Nat Biotechnol, 20:1048–1051, 2002.
- [7] 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*. Anal Chem, 76:15–22, 2004.
- [8] MINC, N., C. FÜTTERER, K. D. DORFMAN, A. BANCAUD, C. GOSSE, C. GOUBAULT und J.-L. VIOVY: *Quantitative microfluidic separation of DNA in self-assembled magnetic matrixes*. Anal Chem, 76:3770–3776, 2004.
- [9] DUONG, T. T., 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, 67-68:905–912, 2003.

- [10] FU, J., J. YOO und J. HAN: *Molecular sieving in periodic free-energy landscapes created by patterned nanofilter arrays*. Phys Rev Lett, 97:018103, 2006.
- [11] AJDARI, A. und J. PROST: *Free-flow electrophoresis with trapping by a transverse inhomogeneous field*. Proc Natl Acad Sci U S A, 88:4468–4471, 1991.
- [12] ASBURY, C., A. DIERCKS und G. VAN DEN ENGH: *Trapping of DNA by dielectrophoresis*. Electrophoresis, 23:2658–2666, 2002.
- [13] REGTMEIER, J., T. T. DUONG, R. EICHHORN, D. ANSELMETTI und A. ROS: *Dielectrophoretic Manipulation of DNA: Separation and Polarizability*. Anal Chem, 79:3925–3932, 2007.
- [14] BERG, J.M., J.L. TYMOCZKO und L. STRYER: *Biochemie*. Spektrum, Heidelberg, 5. Auflage, 2003.
- [15] WINTER, R. und F. NOLL: *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Teubner, Stuttgart, 1998.
- [16] KNIPPERS, R.: *Molekulare Genetik*. Thieme, Stuttgart, 2001.
- [17] VOET, D. und J. G. VOET: *Biochemie*. VCH, Weinheim, 2004.
- [18] JOSE, D. und D. PORSCHKE: *Dynamics of the B-A transition of DNA double helices*. Nucleic Acids Res, 32:2251–2258, 2004.
- [19] ANSELMETTI, D.: *Biophysik II*. Vorlesung, Universität Bielefeld, 2005.
- [20] DOI, M. und S. F. EDWARDS: *The Theory of Polymer Dynamics*. Oxford University Press, New York, 1986.
- [21] ROS, R.: *Biophysik II*. Vorlesung, Universität Bielefeld, 2006.
- [22] ARIEL, G. und D. ANDELMAN: *Persistence length of a strongly charged rodlike polyelectrolyte in the presence of salt*. Phys Rev E, 67:011805, 2003.
- [23] ALLAHYAROV, E., H. LÖWEN und G. GOMPPER: *Adsorption of monovalent and multivalent cations and anions on DNA molecules*. Phys Rev E, 68:061903, 2003.
- [24] TRAUT, W.: *Chromosomen*. Springer, Berlin, 1991.
- [25] VOLOGODSKII, A. V.: *Circular DNA*. OnLine Biophysical Chemistry Textbook, <http://www.biophysics.org/btol/supramol.html>, 1999, Download Feb 2007.

- [26] MRAHEIL, M.: *Entwicklung eines molekularbiologischen Testsystems zum Nachweis von Inhibitoren bakterieller Topoisomerasen, deren Wirkung und des DNA-Superspiralisierungsgrades in vivo*. Dissertation, Universität Hamburg, 2004.
- [27] SCHLEE, D. und H.-P. KLEBER: *Biotechnologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1991.
- [28] SZILLUWEIT, R.: *Strukturuntersuchungen von superspiralisierter DNA mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops*. Diplomarbeit, Gutenberg Universität Mainz, 2005.
- [29] KAUFMANN, S. H. E.: *Immunologische Grundlagen neuer Impfstrategien*. Naturwissenschaften, 85:62–72, 1998.
- [30] AUTENRIETH, I. B. und A. NOLL: *Perspektiven für die Entwicklung neuer Impfstoffe*. Monatsschr Kinderheilkd, 146:355–364, 1998.
- [31] LAKOWICZ, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, Berlin, 2. Auflage, 1999.
- [32] VOGEL, H.: *Gerthsen Physik*. Springer, Berlin, 1999.
- [33] LARSSON, A., C. CARLSSON und M. JONSSON: *Characterization of the binding of YO to [poly(dA-dT)]<sub>2</sub> and [poly(dG-dC)]<sub>2</sub>, and of the fluorescent properties of YO and YOYO complexed with the polynucleotides and double-stranded DNA*. Biopolymers, 36:153–167, 1995.
- [34] LARSSON, A., C. CARLSSON, M. JONSSON und B. ALBINSSONT: *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.
- [35] GURRIERI, S., K. S. WELLS, I. D. 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 YOYO*. Anal Biochem, 249:44–53, 1997.
- [36] 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.

- [37] SIMON, L. D., K. H. ABRAMO, J. K. SELL und L. B. MCGOWN: *Oxazole yellow dye interactions with short DNA oligomers of homogeneous base composition and their hybrids*. *Biospectroscopy*, 4:17–25, 1998.
- [38] SCHMID, F.: *Theorie IV*. Vorlesung, Universität Bielefeld, 2005.
- [39] BRUUS, H.: *Theoretical Microfluidics*. Lecture notes, Technical University of Denmark, 2005.
- [40] DORFMÜLLER, T., W. T. HERING und K. STIERSTADT: *Bergmann Schaefer: Lehrbuch der Experimentalphysik, Band I*. Walter de Gruyter, Berlin, 11. Auflage, 1998.
- [41] TIPLER, P. A.: *Physik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2000.
- [42] SINTON, D., L. REN und D. LI: *Visualization and numerical modelling of microfluidic on-chip injection processes*. *J Colloid Interface Sci*, 260:431–439, 2003.
- [43] BREUER, K. (Herausgeber): *Micro- and Nano-Scale Diagnostic Techniques*. Springer, Berlin, 2003.
- [44] GROSSMAN, P. und J. COLBURN: *Capillary electrophoresis: Theory and Practice*. Academic Press, San Diego, 1992.
- [45] MOHANTY, U. und N. C. STELLWAGEN: *Free Solution Mobility of Oligomeric DNA*. *Biopolymers*, 49:209–214, 1999.
- [46] TANAKA, M.: *Electrophoresis of a rod macroion under polyelectrolyte salt: is mobility reversed for DNA?* *Journal of Physics: Condensed Matter*, 16:2127–2134, 2004.
- [47] LIN, C.-H., L.-M. FU und Y.-S. CHIEN: *Microfluidic T-form mixer utilizing switching electroosmotic flow*. *Anal Chem*, 76:5265–5272, 2004.
- [48] KIRBY, B. J. und E. F. HASSELBRINK: *Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations*. *Electrophoresis*, 25:187–202, 2004.
- [49] KIRBY, B. J. und E. F. HASSELBRINK: *Zeta potential of microfluidic substrates: 2. Data for polymers*. *Electrophoresis*, 25:203–213, 2004.

- [50] SLATER, G. W. und J. NOOLANDI: *The biased reptation model of DNA gel electrophoresis: mobility vs molecular size and gel concentration*. Biopolymers, 28:1781–1791, 1989.
- [51] CHOU, C.-F. und F. ZENHAUSERN: *Electrodeless dielectrophoresis for micro total analysis systems*. IEEE Eng Med Biol Mag, 22:62–67, 2003.
- [52] JACKSON, J. D.: *Klassische Elektrodynamik*. Walter de Gruyter, Berlin, 3. Auflage, 2002.
- [53] MORGAN, H., M. P. HUGHES und N. G. GREEN: *Separation of submicron bio-particles by dielectrophoresis*. Biophys J, 77:516–525, 1999.
- [54] ZHENG, L., J. P. BRODY und P. J. BURKE: *Electronic manipulation of DNA, proteins, and nanoparticles for potential circuit assembly*. Biosens Bioelectron, 20:606–619, 2004.
- [55] CHOU, C.-F., J. O. TEGENFELDT, O. BAKAJIN, S. S. CHAN, E. C. COX, N. DARNTON, T. DUKE und R. H. AUSTIN: *Electrodeless dielectrophoresis of single- and double-stranded DNA*. Biophys J, 83:2170–2179, 2002.
- [56] SAIF, B., R. K. MOHR, C. J. MONTROSE und T. A. LITOVITZ: *On the mechanism of dielectric relaxation in aqueous DNA solutions*. Biopolymers, 31:1171–1180, 1991.
- [57] PORSCHKE, D.: *The mechanism of ion polarisation along DNA double helices*. Biophys Chem, 22:237–247, 1985.
- [58] ASBURY, C. L. und G. VAN DEN ENGH: *Trapping of DNA in nonuniform oscillating electric fields*. Biophys J, 74:1024–1030, 1998.
- [59] VAN DER TOUW, F. und M. MANDEL: *Dielectric increment and dielectric dispersion of solutions containing simple charged linear macromolecules. I. Theory*. Biophys Chem, 2:218–230, 1974.
- [60] CASTELLANOS, A., A. RAMOS, GONZÁLEZ A., N. G. GREEN und H. MORGAN: *Electrohydrodynamics and dielectrophoresis in microsystems: scaling laws*. J. Phys. D: Appl. Phys., 36:2584–2597, 2003.
- [61] HÖLZEL, R., N. CALANDER, Z. CHIRAGWANDI, M. WILLANDER und F. F. BIER: *Trapping Single Molecules by Dielectrophoresis*. Phys Rev Lett, 95:1–4, 2006.

- [62] GESCHKE, O., H. KLANK, P. TELLEMAN: *Microsystem Engineering of Lab-on-a-Chip Devices*. Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
- [63] PETSEV, D. N., G. P. LOPEZ, C. F. IVORY und S. S. SIBBETT: *Microchannel protein separation by electric field gradient focusing*. Lab Chip, 5:587–597, 2005.
- [64] FEYNMAN, R. P., R. B. LEIGHTON und M. SANDS: *The Feynman Lectures on Physics*, Band 1. Addison Wesley, New York, 1977.
- [65] DIU, B., C. GUTHMANN, D. LEDERER und B. ROULET: *Grundlagen der statistischen Physik*. Walter de Gruyter, Berlin, 1994.
- [66] LANDAU, L. D., E. M. LIFSCHITZ und W. WELLER: *Hydrodynamik*. Harri Deutsch, Berlin, 1991.
- [67] PARK, P. J. und W. SUNG: *Dynamics of a polymer surmounting a potential barrier: The kramers problem for polymers*. Journal of Chemical Physics, 111:5259–5266, 1999.
- [68] HÄNGGI, P., P. TALKNER und M. BORKOVEC: *Reaction-rate theory: fifty years after Kramers*. Rev. Mod. Phys., 62:251–341, 1990.
- [69] DUONG, T. T.: *DNA-Migration in strukturierten Mikrofluidikkanälen*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld, 2002.
- [70] LYUBCHENKO, Y. L. und L. S. SHLYAKHTENKO: *Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy in situ*. Proc Natl Acad Sci U S A, 94:496–501, 1997.
- [71] AEBI, U. und T. D. POLLARD: *A glow discharge unit to render electron microscope grids and other surfaces hydrophilic*. J Electron Microsc Tech, 7:29–33, 1987.
- [72] HELLMICH, W., JAN R., T. T. DUONG, R. ROS, D. ANSELMETTI und A. ROS: *Poly(oxyethylene) based surface coatings for poly(dimethylsiloxane) microchannels*. Langmuir, 21:7551–7557, 2005.
- [73] HELLMICH, W.: *Einzelzellanalytik in Mikrofluidik-Systemen*. Dissertation, Universität Bielefeld, 2006.
- [74] ZHANG, C. X. und A. MANZ: *Narrow sample channel injectors for capillary electrophoresis on microchips*. Anal Chem, 73:2656–2662, 2001.

- 
- [75] REYES, D. R., D. IOSSIFIDIS, P.-A. AUROUX und A. MANZ: *Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology*. Anal Chem, 74:2623–2636, 2002.
- [76] KIM, J., M. CHAUDHURY und M. OWEN: *Hydrophobic recovery of polydimethylsiloxane elastomer exposed to partial electrical discharge*. Journal of Colloid and Interface Science, 226:231–236, 2000.
- [77] VOLOGODSKII, A. V., S. D. LEVENE, K. V. KLENIN, M. FRANKKAMENETSKII und N. R. COZZARELLI: *Conformational and Thermodynamic Properties of Supercoiled DNA*. Journal of Molecular Biology, 227:1224–1243, 1992.
- [78] VOLOGODSKII, A. V. und N. R. COZZARELLI: *Conformational and Thermodynamic Properties of Supercoiled DNA*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 23:609–643, 1994.
- [79] 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.
- [80] STELLWAGEN, N. C.: *Electric birefringence of restriction enzyme fragments of DNA: optical factor and electric polarizability as a function of molecular weight*. Biopolymers, 20:399–434, 1981.
- [81] ELIAS, J. G. und D. EDEN: *Transient Electric Birefringence Study of the Persistence Length and Electrical Polarizability of Restriction Fragments of DNA*. Macromolecules, 14:410–419, 1981.
- [82] ROBERTSON, R. M., S. LAIB und D. E. SMITH: *Diffusion of isolated DNA molecules: dependence on length and topology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 103:7310–7314, 2006.
- [83] STELLWAGEN, N. C., C. GELFI und P. G. RIGHETTI: *The free solution mobility of DNA*. Biopolymers, 42:687–703, 1997.
- [84] PETERSEN, E., B. LI, X. FANG, H. LUO, V. SAMUILOV, D. GERSAPPE, J. SOKOLOV, B. CHU und M. RAFAILOVICH: *DNA migration and separation on surfaces with a microscale dielectrophoretic trap array*. Phys Rev Lett, 98:088102, 2007.
- [85] GIDDINGS, J. C.: *Unified separation science*. John Wiley Sons, New York, 1991.

- [86] SCHLEEF, M., C. VOSS und T. SCHMIDT: *Novel technology for topological plasmid vaccine characterization*. Nature Labscene, 04:18–19, 2002.
- [87] DUONG, T. T.: *Neue Migrations- und Separationsmechanismen in strukturierten Mikrofluidik-Systemen*. Dissertation, Universität Bielefeld, 2006.
- [88] POPE, L. H., M. C. DAVIES, C. A. LAUGHTON, C. J. ROBERTS, S. J. TENDLER und P. M. WILLIAMS: *Atomic force microscopy studies of intercalation-induced changes in plasmid DNA tertiary structure*. J Microsc, 199:68–78, 2000.
- [89] DANG, F., W. LI, L. ZHANG, M. JABASINI, T. ISHIDA, H. KIWADA, N. KAJI, M. TOKESHI und Y. BABA: *Electrophoretic behavior of plasmid DNA in the presence of various intercalating dyes*. J Chromatogr A, 1118:218–225, 2006.
- [90] HAN, J. und H. G. CRAIGHEAD: *Characterization and optimization of an entropic trap for DNA separation*. Anal Chem, 74:394–401, 2002.

# Danksagung

Mein Dank gilt all jenen, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben, und der gesamten Arbeitsgruppe „Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften“ für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Anselmetti für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, und für praktische Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Alexandra Ros für die gute wissenschaftliche Betreuung während meiner Arbeit und für die vielen konstruktiven Diskussionen und Ideen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Andreas Hütten für seine Bereitschaft, das Zweit-Gutachten zu erstellen.

Zu tiefem Dank bin ich Herrn Jan Regtmeier verpflichtet, der mir auf meinem gesamten Weg durch die Soft Lithographie und die Mikrofluidik hilfreich zur Seite gestanden hat. Ich bedanke mich auch bei Frau Dr. Wibke Hellmich und Herrn Dr. Thanh Tu Duong, die mich mit ihren praktischen Erfahrungen unterstützt haben.

Herrn Dr. Ralf Eichhorn danke ich für seine Unterstützung und Geduld in theoretischen Fragen und für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. Martin Schleef und Herrn Dr. Marco Schmeer von der Plasmid-Factory in Bielefeld für die Bereitstellung der Plasmid DNA Proben und für hilfreiche Gespräche und Anregungen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Lukas Bogunovic für vielfältige Tips zur Graphik-Bearbeitung, Frau Hanna Bednarz für die Durchführung der Gelelektrophorese und der photographischen Darstellung des Ergebnisses in Abbildung 4.16, Frau Lisa Czaja für die Erstellung der rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.6 sowie bei Herrn PD Dr. Robert Ros für seine Erfahrungen und Beurteilungen der AFM Bilder.

Mein abschließender Dank gilt meiner Mutter, die mir das Studium erst ermöglicht hat, und meiner Freundin Wiebke Klein, die mich auch in stressigen Phasen in jeder erdenklichen Hinsicht liebevoll unterstützt hat.