

Auf dem Weg zur DNA-Sequenzierung durch  
eine Nanopore in einer  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran,  
detektiert mittels einer Kohlenstoffnanoröhre



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER  
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT PHYSIK

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

**Juri Allerdings**

aus Wosnesenka (Kasachstan)

im Jahr 2015

---

Promotionsgesuch eingereicht am: 10.04.2015

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. C. Strunk

Prfungsausschuss:

Prof. Dr. I. Morgenstern

Prof. Dr. C. Strunk

Prof. Dr. J. Zweck

Prof. Dr. F. Giebl

Datum Promotionskolloquium: 30.06.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Grundlagen</b>	<b>3</b>
1.1 DNA . . . . .	3
1.1.1 Aufbau der DNA . . . . .	3
1.1.2 Lambda-Phage DNA . . . . .	7
1.1.3 Hydratation der DNA . . . . .	9
1.1.4 DNA-Denaturierung und Faltung . . . . .	11
1.1.5 DNA-Sequenzierung mit der Sanger-Methode . . . . .	14
1.2 Elektrophorese . . . . .	16
1.3 Transport und Coulomb-Effekte eines Elektrolyts . . . . .	17
1.4 Leitwert von Festkörper-Nanoporen . . . . .	20
1.4.1 Eintrittswiderstand . . . . .	22
1.4.2 Leitwert nach Godin . . . . .	23
1.5 Stromblockaden verursacht durch DNA . . . . .	25
1.6 Translokationszeiten der DNA durch eine $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Nanopore . . . . .	27
<b>2 Materialien und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1 Messmethode . . . . .	28
2.2 Messsystem . . . . .	30
2.3 Messzellen . . . . .	32
2.3.1 Messzelle für DNA-Sequenzierung . . . . .	32
2.3.2 Messzelle für DNA-Translokationen . . . . .	35
2.4 Spritzpumpe . . . . .	38
2.5 Verwendete DNA . . . . .	39
2.6 Pufferlösungen für die DNA . . . . .	39
2.7 Probenherstellung . . . . .	40
2.7.1 Aufbau der $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Proben . . . . .	41
2.7.2 Wachstum von CNTs auf $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen . . . . .	41
2.7.3 Herstellung von Festkörper-Nanoporen mit TEM . . . . .	46
2.7.4 Herstellung von Festkörper-Nanoporen mit FIB . . . . .	48
2.8 Hydrophilie . . . . .	49

2.8.1	Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> -Proben . . . . .	50
2.8.2	PDMS-Dichtung . . . . .	52
<b>3</b>	<b>Experimentelle Ergebnisse</b>	<b>54</b>
3.1	Verwendete Proben . . . . .	54
3.2	Verschiedene Pufferlösungen . . . . .	55
3.3	Konzentration des Elektrolyts . . . . .	57
3.4	Elektroden . . . . .	59
3.5	Leitwert der Nanoporen . . . . .	60
3.6	DNA Translokationen . . . . .	62
3.6.1	Translokation gefalteter DNA . . . . .	62
3.6.2	Translokation ungefalteter DNA . . . . .	67
3.7	Einfluß der Elektrode . . . . .	71
3.8	Erhöhung der Lebensdauer von Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> -Membranen . . . . .	74
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>78</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>80</b>
	<b>Literatur</b>	<b>81</b>

## Einleitung

Ein Forschungsbereich, der immer mehr an Bedeutung gewinnt und eine große Sektion der Biologie darstellt, ist die Genetik. Sie beschäftigt sich mit den Erbinformationen und deren Weitergabe. Neben dem Aufbau und den verschiedenen Funktionen der Gene befindet sich das Genom im Fokus der Untersuchungen. Das menschliche Genom ist in 46 Chromosomen kodiert und enthält rund 100.000 Gene [1]. Im Jahr 1990 wurde das Humangenomprojekt gegründet, das das Genom des Menschen seit April 2003 vollständig entschlüsselt hat [2, 3, 4]. Um die Gene identifizieren und untersuchen zu können, sind schnelle und kostengünstige Sequenzierungen der Basenpaare der Desoxyribonukleinsäure (DNA) nötig, in deren Abfolge die Erbinformationen codiert sind.

Die DNA-Sequenzierung findet in Bereichen der Medizin und Biochemie Anwendung. Man verwendet hauptsächlich die Methode von Maxam und Gilbert [5] und die Didesoxymethode [6] nach Sanger (1980 Nobelpreis für Chemie) zur DNA-Sequenzierung. Beide Methoden sind aufwendig im Bezug auf die Kosten und die Zeit [7, 8]. Um die Forschung an effektiveren Methoden zu stimulieren, wurden von verschiedener Seite Prämien bzw. Forschungspreise für kostengünstige DNA-Sequenzierung ausgeschrieben [9, 10]. So wurde eine Prämie von „Archon Genomics X PRIZE“ von 10 Millionen Dollar ausgesetzt. 100 Human-Genome sollen innerhalb von 30 Tagen mit einem maximalen Fehler von eins pro einer Million Basen und einer Genauigkeit von 99,9% abgelesen werden [11]. Die Kosten der Entschlüsselung eines menschlichen Genoms sollen dabei 1.000 Dollar nicht überschreiten. Durch die Forschungsgelder begünstigt, haben sich viele Teams das Ziel gesetzt, die DNA-Sequenzierung zu revolutionieren.

Da die Nachfrage nach den DNA-Sequenzierungen immer mehr ansteigt, wurde das EU-Projekt „Nano DNA Sequencing“ gegründet und für eine Laufzeit von drei Jahren angelegt. Daran waren Arbeitsgruppen aus Regensburg, Lausanne, Belgrad, Dublin und Jerusalem mit insgesamt 15 Wissenschaftlern beteiligt. Das Ziel des Projektes war es ein neuartiges DNA-

Sequenzierungsverfahren zu entwickeln. Das neue Verfahren beruht auf 50 nm  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen, durch die unter Zuhilfenahme eines TEMs (Transmissionselektronenmikroskop) bzw. FIB (*focused ion beam*) Nanoporen gebohrt werden. Auf der Membran wird eine Kohlenstoffnanoröhre (CNT) gewachsen. Wird die DNA durch die Nanopore geführt, können die einzelnen Basenpaare aufgrund ihrer Wechselwirkung mit der CNT identifiziert werden.

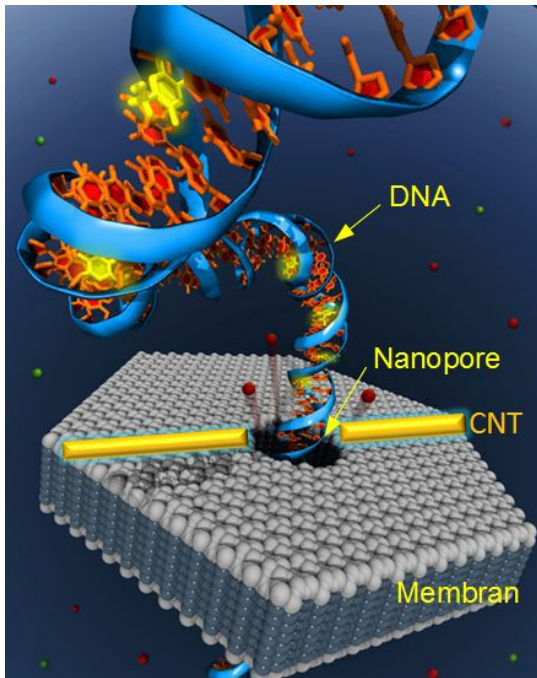


Abbildung 1: (Bildquelle: [12])

Vernachlässigt man die Wechselwirkung der DNA-Oligomere mit deren Umgebung (Wasser, Ionen und die Nanopore) und nimmt an, dass die DNA-Base in der Nanopore fest orientiert ist, ist die Detektierung des charakteristischen Signals einer Base durch eine Nanopore mit dem Durchmesser von 1 nm möglich und ebenso die Unterscheidung zwischen den einzelnen Basenpaaren [13]. Das EU-Projekt hat sich zur Aufgabe gestellt, dieses theoretische Konzept experimentell umzusetzen.

Für die Realisierung der Messungen wurden zwei Messzellen entwickelt. Ein Faradaykäfig und eine Spritzpumpe wurden aufgebaut und ein Messsystem mit einer zeitlichen Auflösung von 100 kHz mit einem Multimeter kreiert. Im Laufe der Arbeit hat sich eine Methode zur Steigerung des Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses bei den ionischen Strommessungen durch die Festkörpnanoporen und eine Methode zur Erhöhung der Lebensdauer der Membranen herauskristallisiert.

# 1 Grundlagen

In diesem Kapitel werden die grundlegenden Effekte behandelt, die für das Verständnis dieser Arbeit notwendig sind. Die durchgeführten Messungen wurden mit der Desoxyribonukleinsäure (DNS) bzw. engl. DNA vollzogen. In dieser Arbeit wird der Ausdruck DNA benutzt, da in der deutschsprachigen Fachliteratur „DNA“ sehr viel häufiger als DNS benutzt wird. Die DNA ist komplex in der Struktur und hat verschiedene Formen. Aus diesem Grund wird im ersten Teil des Kapitels auf die DNA eingegangen. Im zweiten Abschnitt des Kapitels wird die Elektrophorese als Antriebskraft der DNA in einem Elektrolyt und die Wechselwirkungen zwischen den Ionen in einem Elektrolyt behandelt. Am Ende wird die Theorie der Festkörper-Nanoporen beschrieben, die sich mit dem Leitwert, mit den Stromblockaden, verursacht durch die DNA, und mit den Translokationszeiten der DNA durch die Nanoporen beschäftigt.

## 1.1 DNA

DNA ist ein Biomolekül, das die Erbinformationen trägt. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung für die Genetik. Das Molekül erlangte in den letzten Jahren das Interesse der Physiker, wegen seiner Einsatzmöglichkeit als kleinster Transistor. Man arbeitet bereits an einem DNA Feld-Effekt Transistor (DNA-FET) [14, 15]. Er hat ähnliche Struktur wie ein MOSFET, mit der Ausnahme, dass das „Gate“ durch eine Schicht aus unbeweglichen Einstrang-DNA-Molekülen ersetzt ist. Wenn die komplementären DNA Stränge hybridisieren ändert sich der Ladungswert in der Nähe der Oberfläche, was den Stromtransport durch die Halbleiterstücke moduliert.

### 1.1.1 Aufbau der DNA

Im Jahr 1953 publizierten Francis Crick und James Watson ein Strukturmodell, welches die Ergebnisse bis dato zusammenfasste und die noch heute gültig sind [16]. Es wurde fest gehalten, dass es zwei DNA-Stränge

## 1.1 DNA

---

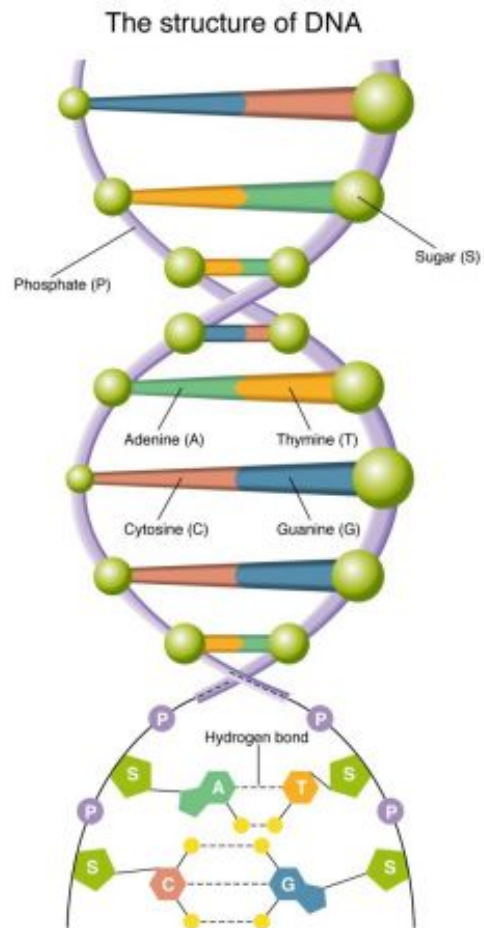


Abbildung 2: DNA als Doppelhelix. Die zwei Rückgrate der DNA, die aus Zucker und Phosphat bestehen, werden über vier mögliche Basen (Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin) miteinander verbunden. (Bildquelle: [17])



## 1.1 DNA

---

gibt, die umeinander schraubenförmig verdreht sind. Diese Struktur wurde DNA-Doppelhelix genannt. DNA ist ein lineares Polymer. Es besteht im Normalzustand aus zwei Strängen, die alternierend aus Zucker Desoxyribose und Phosphat aufgebaut sind [18]. Die beide Stränge, auch Rückgrate der DNA genannt, sind durch organische Basen so verbunden, dass sie eine Doppelhelix-Form bilden, wie in der Abbildung 2 dargestellt ist. Liegt die DNA in Form einer Doppelhelix vor, so spricht man von der dsDNA (*double stranded Desoxyribonucleinacid*). Sind hingegen die Stränge nicht miteinander über die Basen verbunden, so handelt es sich um eine ssDNA (*single stranded DNA*).

Bei den organischen Basen handelt es sich um Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin. Die Basen sind an jeder Zuckereinheit (Desoxyribose) des Rückgrats der DNA angehängt und können nur mit ihren entsprechenden Basenpartnern Bindungen eingehen. Adenin kann über zwei Wasserstoffbrücken mit Thymin und Cytosin über drei Wasserstoffbrücken mit Guanin binden. Die Stränge sind antiparallel aufgebaut. Jeder Strang besitzt eine Polarität in Form eines sogenannten 5 - und 3 -Endes (Abbildung 3). Während der eine Strang mit 5 anfängt und mit 3 endet, läuft der andere Strang von 3 nach 5. Im Allgemeinen kann die DNA in verschiedenen räumlichen Anordnungen vorliegen [19]. Eine B-Form-DNA besitzt 10,4 Basenpaare pro Windung und ist rechtsdrehend [20], d.h. im Uhrzeigersinn aus der Richtung 5– > 3 betrachtet. Rund 99% der menschlichen DNA hat diese Form [21]. Man spricht von der Z-Form der DNA wenn sie linksdrehend ist und pro Windung aus 12 Basenpaaren besteht. Die dritte Form der DNA ist die A-Form [18]. Diese DNA besitzt 11 Basenpaare pro Windung und ist rechtsdrehend. Im Folgenden beziehen sich alle Aussagen auf die B-Form-DNA, die allgemeine Form der DNA.

Die exakte Reihenfolge der Basenpaare in der DNA wird als Sequenz bezeichnet. Das menschliche Genom<sup>1</sup> hat 3,27 Milliarden Basenpaare (bp).

---

<sup>1</sup>Genom bzw. Erbgut eines Lebewesens umfasst die gesamten vererbaren Informationen.

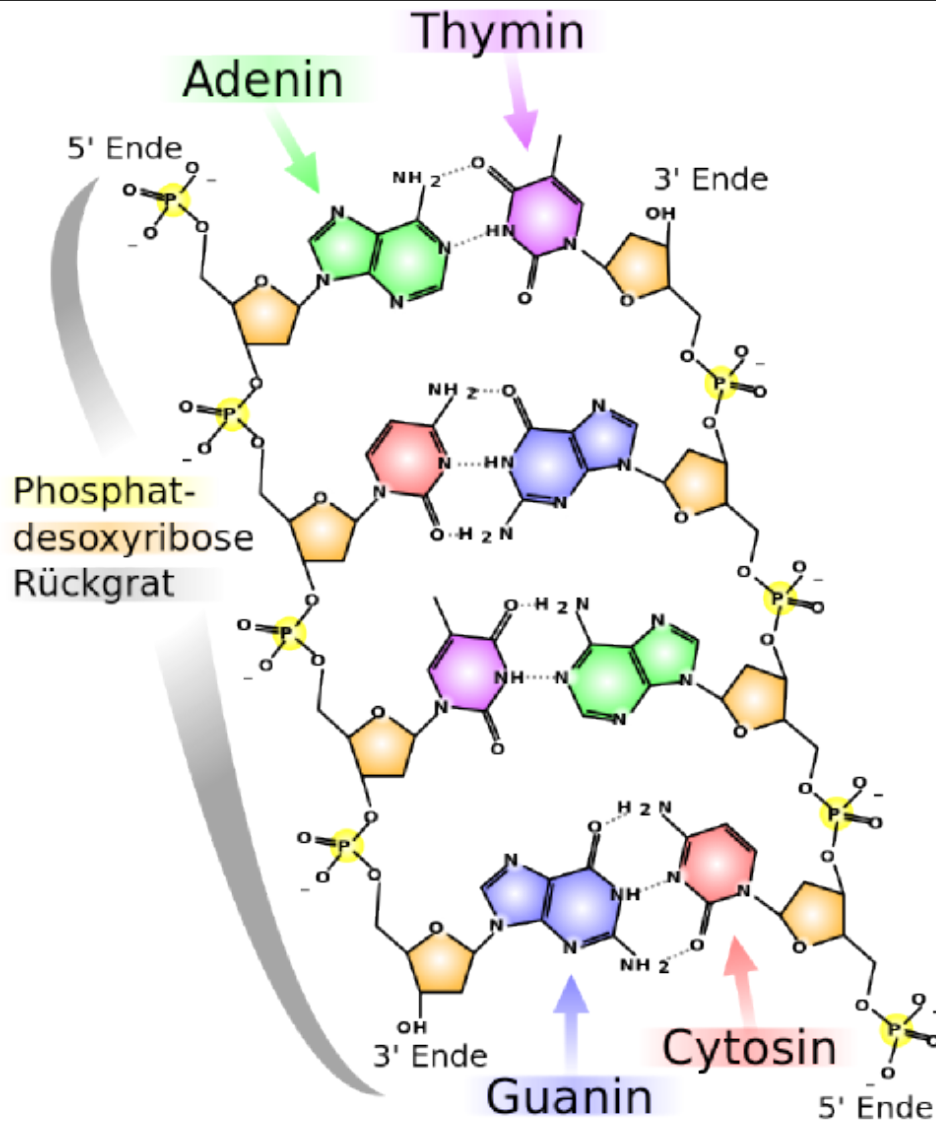


Abbildung 3: Chemische Struktur der DNA. Die zwei Phosphatdesoxyribose-Rückgrate der DNA werden über die Basen miteinander verbunden. Dabei binden Adenin mit Thymin über zwei und Guanin mit Cytosin über drei Wasserstoffbrücken. Während der eine Strang von 5 nach 3 rechtsdrehend verläuft, fängt der andere Strang mit 3 an und endet mit 5 (Bildquelle: [22]).

## 1.1 DNA

---

Reiht man die DNA-Stränge der Länge nach aneinander, so würde sich eine Länge von 1,8 m ergeben. Der Abstand zwischen zwei Basenpaaren in der dsDNA beträgt 0,34 nm [23]. Bei der B-Form DNA macht die Doppelhelix eine Drehung von  $36^\circ$  pro Basenpaar (bp). Der Durchmesser der dsDNA beträgt 2,2 nm [24].

Die dsDNA weist eine sogenannte große und eine kleine Furche auf (Abbildung 4). Sie werden durch die nicht diametrale<sup>2</sup> Haftung der glykosidischen Bindungen am Zucker des Rückgrats gebildet. Für die B-Form der DNA ist die kleine Furche 0,6 nm breit und 0,75 nm tief, die große 1,2 nm breit und 0,85 nm tief [25]. Die DNA ist kein starres Molekül, neben dem Abstand zwischen den Basenpaaren kann auch die Verdrehung der Basenpaare variieren. Die Verdrehung ist sequenzabhängig und beträgt zwischen  $28^\circ$  und  $42^\circ$  pro bp. Die beiden gebundenen Basenpaare können ebenfalls gegen einander verdreht sein (*propeller twisting*). Eine zusätzliche Stabilisierung der Doppelhelix-Struktur erfährt die dsDNA durch die van-der-Waals-Wechselwirkung der übereinander gestapelten Basenpaare. In den Phosphatgruppen ist die negative Ladung der DNA lokalisiert, diese wird durch die Gegenionen abgeschirmt, die sich am Rückgrat anlagern (siehe Kapitel 1.1.3). Die Konzentration der Salzlösung ist verantwortlich für die Konformation der DNA. Ist die Salzkonzentration sehr hoch, so folgt die Minimierung der Expositionsfläche der DNA zum Lösungsmittel, was zu einer hohen Dichte führt. Bei einer niedrigen Salzkonzentration ist die DNA eher gestreckt und kann sogar in eine entwundene Struktur übergehen, wenn elektrische Felder angelegt werden.

### 1.1.2 Lambda-Phage DNA

$\lambda$ -DNA ist das Genom des  $\lambda$ -Bakteriophagen, eines Virus der Gruppe Caudovirales, welches sich auf das Darmbakterium *Escherichia coli* als Wirt spezialisiert hat.  $\lambda$ -DNA hat in der Geschichte der Virusforschung, molekular

---

<sup>2</sup>Diametral bezeichnet zwei Punkte auf einem Kreis oder einer Kugeloberfläche, die Antipoden sind. Die Endpunkte des Durchmessers sind diametral.

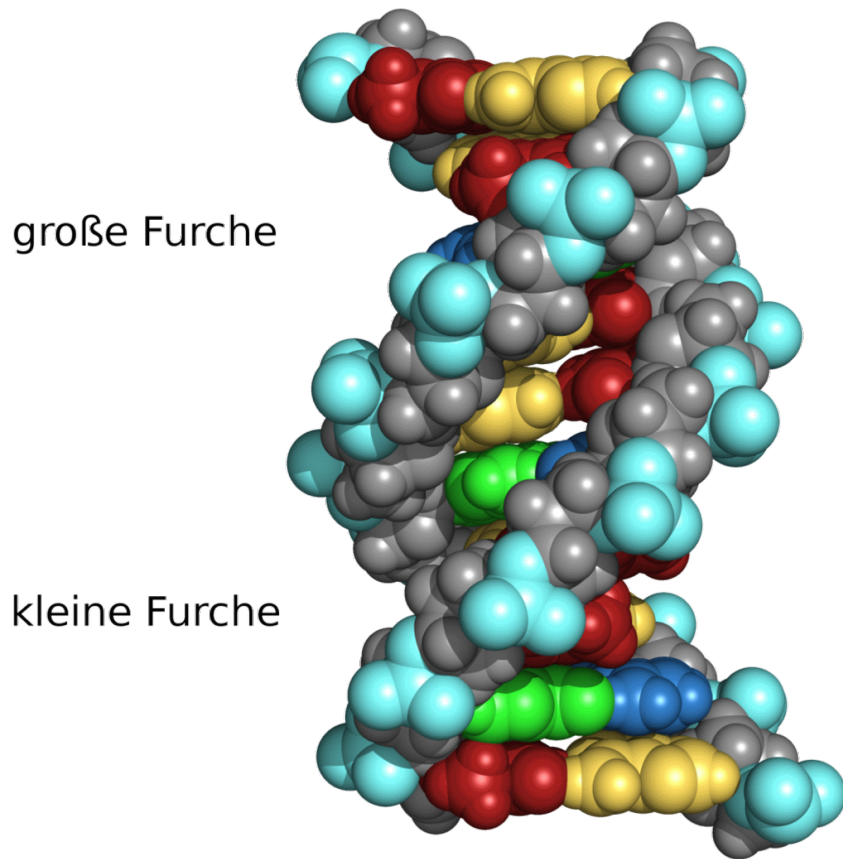


Abbildung 4: Die große und die kleine Furche einer Doppelhelix-DNA (Bildquelle: [26]).

laren Genetik und gentechnologischen Verfahren eine wichtige Bedeutung. 1982 wurde die vollständige Genomsequenz von Frederick Sanger ermittelt. Das Genom des Darmbakteriums *Escherichia coli* besitzt 4,6 Millionen Basenpaare und eine Kontourlänge von  $16,5 \mu\text{m}$  [27].  $\lambda$ -Phagen können entweder ihre DNA in das Bakteriengenom integrieren oder die Wirtszelle zerstören. Der Phage besitzt ein Kapsoid, das die dsDNA enthält und einen nicht kontraktilen Schwanz. Das Genom des  $\lambda$ -Phagen hat eine DNA-Sequenz mit 48.502 Basenpaaren (bp) [28].

Nach der Infektion eines Bakteriums bildet sich die lineare Phagen-

DNA durch die bakterielle DNA-Ligase zu einem Kreis. Durch die Integrase erfolgt der Einbau der zirkulären DNA in das Bakterienchromosom. Im Wirt verbleibt die Virus-DNA als Prophage. Die Expression der Baktriophagen-DNA wird durch das Repressor-Protein zunächst unterdrückt. Beim lysogenen Zyklus dringt die  $\lambda$ -DNA in das Genom der Wirtszelle ein und wird so lange repliziert bis sie aktiviert wird. Veränderungen in der Umgebung, z.B. Erhöhung der Temperatur, leiten den lytischen Zyklus ein. Hierbei kommt es zur Aktivierung der Virus-DNA, der Freisetzung der Phagen und der Zerstörung der Wirtszelle [29]. Durch die Integration der Phagen-DNA in die Bakterien-DNA können diese Genabschnitte dort gezielt eingebracht und exprimiert werden. Dieses Verfahren wird in der Biotechnologie eingesetzt [30].

### 1.1.3 Hydratation der DNA

In einem Lösungsmittel bilden Wassermoleküle um die DNA Mantelschichten, die sich je nach Konzentration des Elektrolyts in Struktur und Dichte unterscheiden. Aus diesem Grund ist diese sogenannte Hydratation der DNA ein wichtiger Faktor, der die Stabilität und die Struktur der DNA beeinflusst. Wasser ist wegen seiner Polarität ein gutes Lösungsmittel für polare Moleküle wie die DNA, da Wasser um dessen Bindungen konkurriert und so die Bindungskräfte schwächt [31]. In den Mantelschichten sind die Wassermoleküle höher geordnet als im sogenannten Bulkwasser<sup>3</sup>. Dies führt dazu, dass die Entropie des Wassers erniedrigt wird. Bei der spontanen Faltung von Makromolekülen, im Sinne der Energieminimierung, wird Wasser freigesetzt, was als hydrophober Effekt bezeichnet wird.

Die potenziellen Donator- und Akzeptorstellen für Wasserstoffbrücken, die Wechselwirkungen mit Proteinen oder Wasser eingehen können, liegen in der großen und der kleinen Furche. In der kleinen Furche dienen das Stickstoffatom N-3 eines Purins [ $C_5H_4N_4$ ] (Adenin, Guanin) sowie das Sauerstoffatom

---

<sup>3</sup>Bulkwasser bezeichnet Wasser, bei dem die Wassermoleküle nur untereinander und nicht mit fremden Molekülen wechselwirken.

O-2 eines Pyrimidins [ $C_4H_4N_2$ ] (Thymin, Cytosin) als Wasserstoffakzeptoren. In der großen Furche liegen das Stickstoffatom N-7 des Guanin und Adenin als ein potenzieller Akzeptor sowie das Sauerstoffatom O-4 des Thymin und das Sauerstoffatom O-6 des Guanin. Die Aminogruppen am C-6 des Adenin und C-4 des Cytosin können als Wasserstoffdonatoren dienen [32].

Die große Furche ist für Wechselwirkungen und Bindung mit Proteinen wichtiger als die kleine Furche, da sie mehr Merkmale zur Unterscheidung eines Basenpaares hat und mehr Kontaktfläche für die Wassermoleküle bietet [33]. Wie genau die Wassermoleküle an die DNA binden, ob als Mantel oder als immobilierter Wasserblock, ist schwer nachweisbar, weil das Wasser für Röntgenbeugungsuntersuchungen zu schwach an die DNA gebunden ist. Die Bindung von Wassermolekülen an die Basenpaare ist hingegen besser untersucht als an das Phosphat-Zucker-Rückgrat [34].

Das Rückgrat der DNA ist leicht negativ geladen und wird durch die Ausbildung einer Hydratationshülle um es herum stabilisiert. In einer trockenen Umgebung ist diese Hülle stark vom Wassergehalt abhängig und wird dichter mit höherer Luftfeuchtigkeit. Die Feuchtigkeit ist auch für die Form der DNA entscheidend. So binden für die B-Form der DNA 18 bis 19 Wassermoleküle pro Basenpaar und für die A-Form 13 - 15 Moleküle. 5 bis 6 Wassermoleküle binden pro Basenpaar, wenn die Luftfeuchtigkeit bei 0% liegt [32]. Adenin-Thymin-Basenpaare wechselwirken mit Wasser schwächer als die Guanin-Cytosin-Basenpaare, da sie eine Wasserstoffbrücke weniger aufweisen [35].

Bei einer Hydratationshülle mit wenig Wassermolekülen sind die Moleküle stark am Rückgrat der DNA lokalisiert und es erfolgt keine Diffusion mit dem Bulkwasser. Wenn es zu einer Diffusion kommt, dann werden zuerst die Wassermoleküle an der kleinen Furche abgebaut, da das Wasser hier schwächer gebunden ist als am Rückgrat. Wassermoleküle des Bulkwassers haben andere Eigenschaften, als die Wassermoleküle am Rückgrat der DNA. So sind die Wassermoleküle am Rückgrat mobiler als die im Bulkwasser [34], das Wasser verliert seine Tetraederstruktur, während die Kompressibilität

größer [36] und die Dichte kleiner ist.

Entzieht man der DNA alle Wassermoleküle der Hydratationshülle, so verliert sie an Strukturstabilität. Die negativen Ladungen des Phosphatrückgrates können nicht mehr durch die Gegenionen abgeschirmt werden, wie im nativen Zustand, und die DNA denaturiert. Setzt man die DNA einem elektrischen Feld aus, so wird im Mantel aus Wasser und Gegenionen, die die negative Ladung des Rückgrats abschirmen, ein Dipol induziert. Mit Hilfe dieses Dipols kann man die DNA in einem homogenen elektrischen Feld bewegen und in einem inhomogenen Feld zusätzlich strecken [37].

Aus diesen Gründen ist die Hydratation wichtig für die Strukturform der DNA-Doppelhelix und für den Transport der DNA durch ein angelegtes elektrische Feld.

### 1.1.4 DNA-Denaturierung und Faltung

Da bei den Messungen in dieser Arbeit es in erster Linie um die Detektierung von dsDNA handelt, die ungefaltet vorliegt, sind die Kenntnisse der Denaturierung und der Faltung der DNA signifikant.

Für die Analyse der einzelnen DNA-Stränge ist es üblich, die Doppelhelix zu denaturieren [38]. Unter Denaturierung der DNA versteht man die Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den jeweiligen Basenpaaren. Bei der Denaturierung von dsDNA entstehen zwei komplementäre ssDNA-Stränge. Die Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleinbasen kann durch mehrere Parameter begünstigt werden [39], z.B. durch Erhöhen der Temperatur. Die Umkehrung der DNA Denaturierung wird Hybridisierung genannt. Je nach Medium wird ab einer bestimmten Temperatur die thermische Vibration des DNA-Moleküls stärker als die Bindung der DNA Basen. Beim Überschreiten dieser Temperatur werden die Wasserstoffbindungen aufgebrochen und die Doppelhelixstruktur der DNA wird aufgespalten.

Als Schmelztemperatur  $T_M$  (*temperature of melting*) der dsDNA wird die Temperatur bezeichnet, bei der die Hälfte der DNA als Einzelstränge vor-

## 1.1 DNA

---

liegt. Um die Schmelztemperatur zu bestimmen, wird die Lichtabsorption bei der Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dabei wird der Effekt der Hyperchromizität [40] ausgenutzt, der besagt, dass die doppelsträngige DNA (dsDNA) weniger Licht absorbiert als die einzelsträngige DNA (ssDNA), wie in der Abbildung 5 zu sehen ist. Die Lichtabsorption wird wegen der Wechselwirkungen zwischen den  $\pi$ -Systemen der übereinanderliegenden Basen reduziert [41].

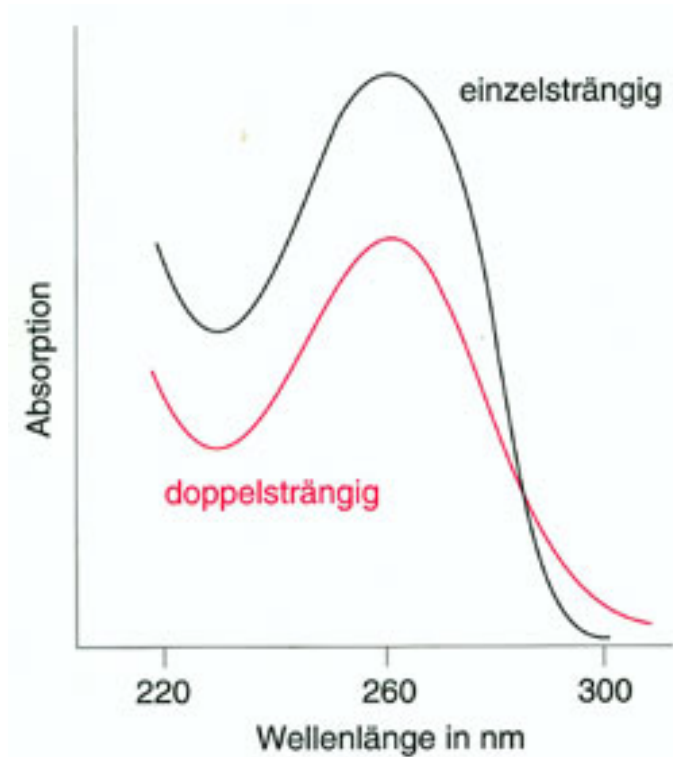


Abbildung 5: Absorptionsspektrum der ssDNA und dsDNA. Die doppelsträngige DNA absorbiert bei 260 nm mehr Licht als die ssDNA. (Bildquelle: [42])

Im Allgemeinen hängt  $T_M$  von der Strukturform der DNA, dem GC-Gehalt des DNA-Moleküls  $c[GC]/c[GCAT]$ , der Länge der DNA und der



Na<sup>+</sup>-Konzentration  $c[\text{Na}^+]$  in der Lösung ab. Zur Berechnung von  $T_M$  für eine dsDNA mit mehr als 100 bp gilt [39]:

$$T_M = 354,6 \text{ K} + 0,41 \text{ K} \left( \frac{c[\text{GC}]}{c[\text{GCAT}]} \right) + 16,6 \text{ K} * \ln(c[\text{Na}^+]) \quad (1)$$

Dabei liegt für die meisten Medien die Schmelztemperatur jeweils um die 350 K [39]. Wurde die dsDNA nicht weit über  $T_M$  erhitzt, so bleibt der Prozess der Denaturierung reversibel und bei einer Erniedrigung der Temperatur auf  $T \leq 20$  K findet für die meisten Medien die Hybridisierung statt [43].

Es existiert auch der Vorgang der chemischen Denaturierung. Der native Bereich für die dsDNA liegt zwischen den pH-Werten 6,0 und 8,0. Wählt man eine Pufferlösung für die DNA, die stark basisch oder sauer ist, so wird der Hydrationsmantel der DNA verändert und die Ladung der Nukleinbasen wird verschoben, was zu einer schwächeren Bindung zwischen den Basen bis hin zur Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen führt.

Neben der Denaturierung der DNA ist die Faltung der dsDNA ebenso ein wichtiges Merkmal für ihre Struktur. Kommen DNA-Moleküle bzw. verschiedene Bereiche eines langen DNA-Moleküls einander näher als ein Nanometer, so wechselwirken sie miteinander über die Wassermoleküle der Hydrathülle. Auf diese Weise können verschiedene Bereiche des Rückgrates eines langen DNA-Moleküls sich miteinander verbinden. So können Kristalle aus dicht gepackter DNA entstehen, wobei die DNA Moleküle untereinander mit einer dünnen und stark lokalisierten Wasserschicht verbunden sind [44]. Bei diesem Prozess weisen die Cytosin-reichen Sequenzen die stärksten Wechselwirkungen untereinander auf [45]. Die B-Form der dsDNA hat 15 Möglichkeiten zur Faltung, sie kann z.B. über Rückgrat-Rückgrat, kleine Furche-kleine Furche oder Rückgrat-Furche wechselwirken [46]. Wie genau die Faltung der DNA erfolgt, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Krasniqi et al. haben 2012 die Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat (EDTA) als den Stoff identifiziert, der den Pufferlösungen hinzugegeben werden sollte, um die Faltung der dsDNA zu verhindern [47]. EDTA bindet in einer Pufferlösung die bivalenten Metallionen. Diese Metal-

tionen tendieren eine stärkere Bindung bei einer Faltung zu verursachen. Die stärkere Bindung beruht auf der höheren lokalen negativen Ladungsdichte, welche die ungefalteten Abschnitte bzw. die Enden des Moleküls, die für eine Bindung verfügbar stünden, reduziert.

### 1.1.5 DNA-Sequenzierung mit der Sanger-Methode

Das Ziel dieser Arbeit ist eine neue Methode für die DNA-Sequenzierung zu entwickeln. In diesem Abschnitt wird die momentan großtechnisch verwendete DNA-Sequenzierungsmethode beschrieben; dies ist die sogenannte Didesoxymethode nach Sanger. Im Jahr 1975 entwickelten Coulson und Sanger eine enzymatische Methode, die auch als Kettenabbruch-Synthese bezeichnet wird. 1977 wurde mit dieser Methode die erste vollständige Genom-Sequenzierung einer Bakteriophage vorgestellt [6].

Zu Beginn wird die dsDNA durch Erwärmung denaturiert. Es entstehen so zwei Einzelstränge (ssDNA). Als Ausgangspunkt dient ein kurzes, komplementäres DNA-Oligonukleotid mit bekannter Sequenz (Primer), der am 3-Ende des ssDNA-Abschnitts bindet (siehe Abbildung 6). Hierbei entsteht ein kurzer Doppelstrang, der durch das Enzym DNA-Polymerase<sup>4</sup> den kürzeren der beiden komplementären Stränge verlängert. In vier parallelen Ansätzen wird je eine der vier Basen zum Teil als Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) zugegeben (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP), die keine freie Hydroxylgruppe mehr besitzt. Aufgrund der fehlenden 3-OH-Gruppe, die für die Bindung mit dem nächsten Nukleotid notwendig ist, kann die Kettenverlängerung nicht erfolgen und es kommt zum sequenzspezifischen Kettenabbruch. Dadurch entsteht ein Gemisch mit unterschiedlichen Längen des DNA-Moleküls, wobei sich am 3-Ende eine bestimmte Base befindet. Wurde z.B. ddATP hinzugegeben, so enden alle Moleküle mit Adenin. Danach werden die unterschiedlich langen Bruchstücke in einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch nebeneinander aufgetrennt (siehe Abschnitt

---

<sup>4</sup>DNA-Polymerasen sind Enzyme, die die Zusammensetzung von DNA aus Desoxyribonukleotiden an einem DNA-Rückgrat katalysieren.

## 1.1 DNA

1.2). Nun liegen die Fragmente, die sich in der Länge selbst nur um ein Basenpaar unterscheiden, voneinander getrennt. Nach dem Vergleich der vier Gemische liest man die Sequenz auf einem fotografischen Film ab. Die komplementäre Sequenz dazu ist die Basen-Sequenz des gesuchten Einstrang-DNA-Moleküls.

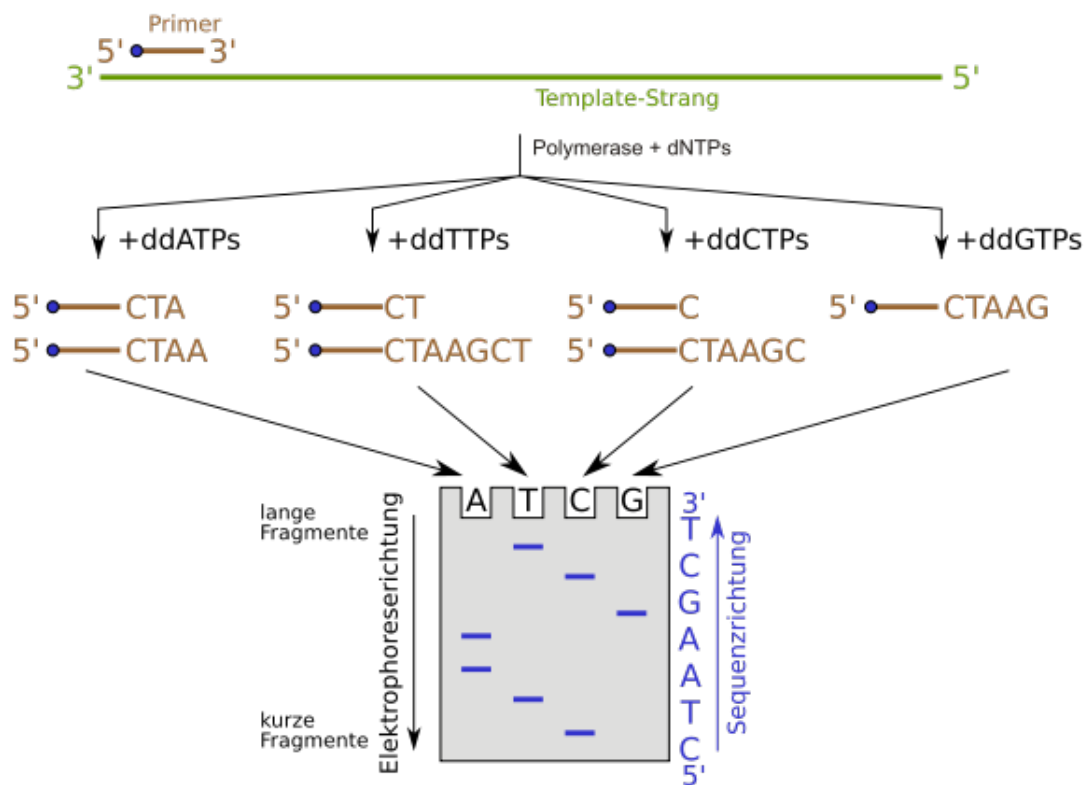


Abbildung 6: DNA Sequenzierung mit der Sanger-Methode. Die blauen Punkte stellen eine radioaktive Markierung dar, die am Ende des Verfahrens für die Ablesung der Sequenz notwendig ist (Bildquelle: [48]).

Diese Methode hat inzwischen zahlreiche Modifikationen erfahren. Anstelle der radioaktiven Markierung werden heute fluoreszierende Verbindungen (Farbstoffe) verwendet [50, 51]. An jedes der vier ddNTPs wird ein Farbstoff gekoppelt, somit brauchen die vier Gemische von einander nicht getrennt

zu werden und können in einem Gefäß untersucht werden. Die Kettenabbruchprodukte werden mit Hilfe von Kapillarelektrophorese<sup>5</sup> von einander getrennt und mit einem Laser zum Fluoreszieren angeregt. Die unterschiedlichen Farben der ddNTPs können von einem Detektor erkannt werden, und die Sequenz der Basen des zu bestimmenden DNA-Stranges in einem Elektropherogramm<sup>6</sup> abgelesen werden.

## 1.2 Elektrophorese

Elektrophorese ist die Wanderung von geladenen kolloidalen Teilchen in einem elektrischen Feld. Mittels dieser Methode lassen sich Moleküle nach Ladung und Größe trennen. Ursache hierfür ist die unterschiedliche Geschwindigkeit aufgrund der verschiedenen Massen bzw. Ladungen der Moleküle im Medium. Neben Anwendungen, wie z.B. der Analyse des roten Blutfarbstoffs (Hämoglobin-Elektrophorese) [52] wird diese Methode auch zur DNA Untersuchung benutzt. Eine spezielle Form der Elektrophorese ist die Gelelektrophorese, die eine Standardmethode in der Biochemie ist [53] und zur Untersuchung der DNA-Fragmente benutzt wird. Hierbei werden die zu untersuchenden DNA-Stücke in ein Gel auf einer Ablage mit mehreren Mulden injiziert. Durch das Anlegen der elektrischen Spannung bewegen sich die DNA-Stücke zu den Enden der Ablage. Je nach Länge der Stränge landen die DNA-Stücke wegen den unterschiedlichen Massen und Ladungen in verschiedenen Mulden dem Abstand zu den Elektroden entsprechend. Diese Technik spielt eine wichtige Rolle in der Identifizierung der Gene für Krankheitsdiagnose und andere Formen der Genforschung, wie der Agarose Gelelektrophorese [54].

Elektrophorese ist somit der Effekt, der bei den Messungen in dieser Arbeit für die gezielte Bewegung der DNA, mit Hilfe der angelegten Span-

---

<sup>5</sup>Kapillarelektrophorese ist ein Verfahren analog zur Gelelektrophorese, mit dem Unterschied, dass statt Gelmulden Kapillaren zur Trennung der Moleküle verwendet werden.

<sup>6</sup>Unter einem Elektropherogramm versteht man in diesem Fall die Sequenz der vier Farbsignale am Detektor.

nung, durch die Nanopore verantwortlich ist.

### 1.3 Transport und Coulomb-Effekte eines Elektrolyts

Die Debye-Hückel-Theorie befaßt sich mit den elektrostatischen Wechselwirkungen von Ionen in Elektrolytlösungen [55]. Die Coulombschen Abstoßungs- und Anziehungskräfte ziehen eine Abweichung der Aktivität  $a_i$  der Ionensorte  $i$  von ihrer molaren Konzentration  $c_i$  gemäß

$$a_i = f_i c_i \quad (2)$$

mit sich. Die Debye-Hückel-Theorie gibt Gleichungen an, mit denen der individuelle Aktivitätskoeffizient  $f_i$  in Abhängigkeit von Konzentration, Temperatur und Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels berechnet werden kann. Mehr zu der Debye-Hückel-Theorie findet man in [55]. Hier wird nicht weiter drauf eingegangen, da sie nicht von großer Bedeutung für diese Arbeit ist.

Unter einem Elektrolyt versteht man eine chemische Verbindung, die im festen, flüssigen oder gelösten Zustand in Ionen getrennt ist. Diese Ionen bewegen sich gerichtet in Anwesenheit eines elektrischen Feldes. In einer elektrolytischen Lösung ziehen sich entgegengesetzt geladene Ionen an, gleich geladene Ionen stoßen sich ab. Deswegen sind Ionen in einem Elektrolyt nicht willkürlich verteilt, stattdessen in einer Nahordnung, in der Kationen sich mit höherer Wahrscheinlichkeit in der Nähe von Anionen aufhalten und umgekehrt. Die Elektroneutralität der Lösung bleibt dabei erhalten [56]. Die Ionen können sich in einer Lösung nicht vollständig regelmäßig anordnen im Gegensatz zum Ionengitter, weil Elektrolytmoleküle als Dielektrikum die Coulombschen Wechselwirkungen abschwächen, was bewirkt, dass die thermische Bewegung zu einer stärkeren Verteilung der Ionen führt. Jedes Ion ist im zeitlichen Mittel Zentrum einer Wolke aus entgegengesetzt geladenen Ionen. Diese Ionenwolken schirmen die Ladung des Zentralions ab, dies zieht die Einführung der Aktivität als wirksame Konzentration bei Ionen mit sich.

Ein wichtiger Effekt für Lösungen ist die **Solvatisierung** [57]. Sie beschreibt den Prozess, wenn Ionen in einem polaren Lösungsmittel aufgrund der elektrischen Ladung Kräfte auf die Lösungsmitteldipole ausüben. Diese Kräfte führen zu einer geordneten Struktur in einem Lösungsmittel, was mit Solvathülle bezeichnet wird [58]. Der hydrodynamische Radius bzw. der Stokes'sche Radius des Ions beschreibt den effektiven Radius in Lösung, der die Lösungsmittelmoleküle in der Solvathülle des Ions berücksichtigt. Für den Transport von Protonen in einem Elektrolyt ist der Grotthuß-Mechanismus entscheidend, was erklärt, dass die Protonen sich nicht einzeln bewegen, sondern eine Umlagerung von Wasserstoffbrückenbindungen in einer Kette von Wassermolekülen statt findet, die den Ladungstransport bewirkt. Dies erklärt die Zeit von 1,5 ps, die ein Proton braucht, um von einem Wassermolekül zum nächsten zu gelangen [59].

Eine weitere Einflussgröße für die Bewegung der Ionen in Flüssigkeit ist der **Relaxationseffekt**. Die sphärische Hülle aus Gegenionen kann sich nicht beliebig schnell an die wechselnde Position des wandernden Ions anpassen. Es resultiert eine Verzerrung der Ionenhülle, die hinter dem wandernden Ion hergezogen wird. Das Ladungszentrum der Hülle wird dabei etwas hinter das Ion verschoben. Auch der **elektrophoretische Effekt** beeinflusst den Ladungstransport in einem Elektrolyt. Man versteht darunter die Verstärkung der Reibung durch die Ionenwolke und somit die Herabsetzung der Beweglichkeit der Ionen und damit auch ihre Leitfähigkeit [60].

Jedes ideale Coulomb-Potential wird in einer Lösung durch die umgebende, ebenfalls geladene Ionenwolke gestört. Das Potential wird von den hauptsächlich entgegengesetzt geladenen Nachbarionen abgeschirmt. Für den Wert des tatsächlichen Potentials in jeder Entfernung vom Zentrum eines Zentralions muss somit das ideale Coulomb-Potential korrigiert werden. Die Korrektur wird als exponentiell abnehmend angenommen und wird durch einen Abklingfaktor  $\lambda_D$ , **Debye-Länge** bzw. Abschirmparameter genannt, beschrieben [61]. Die Debyelänge wird beschrieben durch

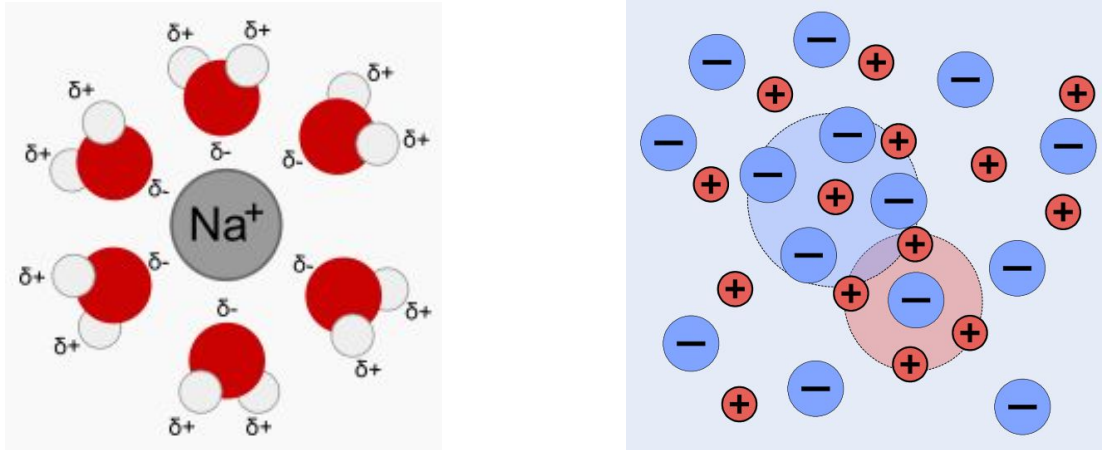


Abbildung 7: Links die Solvatisierung eines Natriumions. Rechts die Ionenverteilung in einer Lösung (Bildquelle: [49]).

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}{2 N_A e^2 I_d}} \quad (3)$$

Dabei beschreibt  $\epsilon_0$  die elektrische Feldkonstante,  $\epsilon_r$  die Permittivität bzw. die dielektrische Leitfähigkeit,  $k_B$  die Boltzmannkonstante,  $T$  die Temperatur in Kelvin,  $e$  die Elementarladung,  $N_A$  die Avogadrokonstante und  $I_d$  die Ionenstärke des Elektrolyts.

Bei Raumtemperatur vereinfacht sich die Formel zu

$$\lambda_D = \frac{3,05}{\sqrt{c}} \text{Å} \quad (4)$$

wobei Å für Ängström steht und die Konzentration  $c$  in mol/L angegeben wird. Für eine 0,1 molare Lösung ergibt sich eine Debye-Länge von ca. 0,96 nm und für 1 molare Lösung von 0,3 nm.

Die Debye-Länge ist richtungsunabhängig, weswegen oft auch von einem Debye-Radius gesprochen wird. Die wesentlichen Kontrollgrößen für die Debye-Länge sind Polarität der Moleküle, Temperatur und Konzentration der Elektrolytlösung. Mit zunehmender Temperatur nimmt die Debye-

Länge zu, da der Abschirmeffekt mit zunehmender Wärmebewegung geringer wird.  $\lambda_D$  nimmt mit steigender Dielektrizitätskonstanten zu und mit steigender Ionenstärke ab, weil diese den Abschirmeffekt erhöht. Somit liegt das tatsächliche Potential-Abklingverhalten am Abklingverhalten des idealen Coulomb-Potentials umso näher, je größer  $\lambda_D$  ist. Je kleiner die Debye-Länge ist, desto stärker ist die Abschirmung des Coulomb-Potentials des Zentrions durch die Umgebung und das Potential klingt entsprechend rascher ab, als im Vakuum.

## 1.4 Leitwert von Festkörper-Nanoporen

In den letzten 20 Jahren wurden Festkörper-Nanoporen, nanometergroße Löcher in dünnen künstlichen Membranen, immer attraktiver wegen ihres Einsatzes als Einzelmolekül-Sensor für die Detektion und die Analyse von biologischen Makromolekülen [62, 63]. Das Verständnis des ionischen Leitwerts durch die Nanopore stellt die Basis aller Nanoporen-Experimente dar. In diesem Unterkapitel werden Modelle und Theorien vorgestellt, die nach dem heutigen Wissen für den Leitwert durch die Festkörper-Nanoporen gelten.

Bringt man zwei mit einem Elektrolyt wie z.B. KCl gefüllte Kanäle in Kontakt zu einander durch eine zylindrische Nanopore, so ergibt sich für den Leitwert durch die Nanopore [64]:

$$G = \frac{\pi d_{\text{Pore}}^2}{4 L_{\text{Pore}}} \left[ (\mu_{\text{K}} + \mu_{\text{Cl}}) n_{\text{K,Cl}} e + \mu_{\text{K}} \frac{4 |\sigma_{\text{O}}|}{d_{\text{Pore}}} \right] \quad (5)$$

Der gesamte ionische Strom durch die Nanopore ergibt sich aus der Summe des Beitrages der Bulk-Ionen in der Lösung und dem Beitrag der Gegenionen, die die Oberflächungladung abschirmen. Bei  $\text{Si}_3\text{N}_4$  bzw.  $\text{SiO}_2$  Nanoporen sind Kaliumionen die Gegenionen, die die negative Ladung der Oberfläche abschirmen [65, 66]. Der Leitwert  $G$  einer zylindrischen Nanopore mit KCl-Elektrolyt hängt somit vom Durchmesser  $d_{\text{Pore}}$  und der Länge  $L_{\text{Pore}}$  der Nanopore, der Teilchenzahldichte  $n_{\text{K,Cl}}$  vom Kalium bzw. Chlorid und der



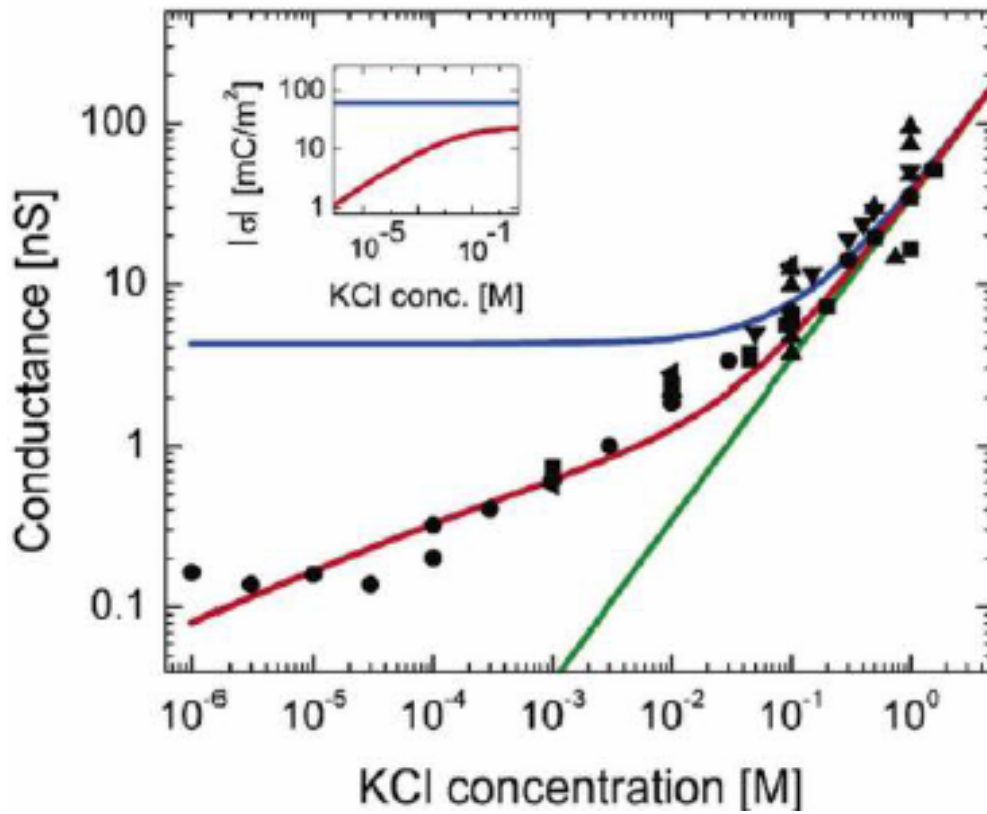


Abbildung 8: Messergebnisse der Arbeitsgruppe C. Dekker aus dem Jahr 2005. Aufgetragen ist der Leitwert  $G$  in nS gegen die KCl-Konzentration in Mol einer  $\text{SiO}_2$ -Nanopore. Der blaue Fit stellt ein Model für konstante Oberflächenladung, der rote für variable Oberflächenladung dar und der grüne Fit ist die Berechnung aus dem Bulk Elektrolyt (Bildquelle: [64]).

Elementarladung  $e$  ab.  $G$  hängt außerdem von der Oberflächenladungsdichte  $\sigma_O$  der Nanopore und den elektrophoretischen Beweglichkeiten vom Kalium und Chlorid  $\mu_K$  und  $\mu_{Cl}$  ab. Der Einfluss der Oberflächenladung in der Nanopore ist dabei stark an die Konzentration des Elektrolyts gebunden.

In der Abbildung 8 sind die Messergebnisse und Kalkulationen der Arbeitsgruppe C. Dekker (TU Delft) aus dem Jahr 2005 zu sehen. Der blaue Fit stellt ein Model für konstante Oberflächenladung, der rote für variable und der grüne für Bulk-Elektrolyt dar. Man erkennt, dass der Einfluss der

Oberflächenladung der Nanopore bei kleinen Konzentrationen des Elektrolyts ( $[\text{KCl}] < 100 \text{ mM/l}$ ) sehr dominant ist [67]. Geht man hingegen zu hohen Konzentrationen des Elektrolyts (*high-salt regime*  $[\text{KCl}] > 100 \text{ mM/l}$ ), so wird der Leitwert durch die Nanopore vergleichbar mit der des Bulk-Elektrolyts und die gemessenen Ergebnisse stimmen mit den errechneten sehr gut überein. Das führt dazu, dass bei hohen Konzentrationen, höher als  $100 \text{ mM/l}$ , der Einfluss der Oberflächenladung im Vergleich zum Bulk-Elektrolyt vernachlässigt werden kann.

### 1.4.1 Eintrittswiderstand

Wenn man den elektrischen Widerstand eines Mediums zwischen zwei sphärischen Elektroden, die in das Medium eingetaucht wurden, betrachtet, so ist der Widerstand - auf den ersten Blick überraschenderweise - unabhängig vom Abstand zwischen den Elektroden, sondern nur von deren Größen. Dies ist der Fall, weil der Widerstand in der Engstelle dominierend ist, in der der elektrische Strom durch die Elektroden hervorgerufen wird. Basierend auf diese Idee argumentierte Hille, dass der Eintrittswiderstand einer Pore ebenfalls nur von den Porendimensionen und nicht von makroskopischen Größen abhängen sollte [68]. Insbesondere nahm er an, dass der Eintrittswiderstand  $R_E$  unter Berücksichtigung einer semi-sphärischen Kuppel über dem Poreneintritt als eine effektive Elektrode, führt zu

$$R_E = \frac{\rho}{\pi d} \quad (6)$$

mit  $\rho$  als spezifischer Widerstand und  $d$  als Durchmesser des Kanals. Zusätzlich hat Vodyanov 1992 den Ionenkanal-Widerstand eingeführt [69]:

$$R = R_{\text{ch}} + 2R_E \quad (7)$$

Der Widerstand  $R$  eines Ionen-Kanals setzt sich zusammen aus dem Widerstand entlang des Kanals  $R_{\text{ch}}$  und den beiden Eintrittswiderständen  $R_E$  an den Enden des Kanals. Der Eintrittswiderstand beschreibt den elektrischen Widerstand entlang des konvergenten Weges aus dem Bulk-Elektrolyt

zum Ende bzw. dem „Mund“ der Nanopore [70]. Er ist proportional zu  $\sigma$  der spezifischen Leitfähigkeit und  $r$  dem Radius der runden Nanopore. Mit der Eintrittswiderstand ergibt sich für den Leitwert [71]:

$$G = \sigma \left[ \frac{4l}{\pi d^2} + \frac{1}{d} \right]^{-1} \quad (8)$$

$\sigma$  ist die spezifische Leitfähigkeit durch die Nanopore,  $d$  ist der Durchmesser und  $l$  die Länge der Nanopore.  $R_{\text{ch}}$  ist hierbei gleich  $\frac{4l}{\sigma \pi d^2}$  der Beitrag der Oberflächenladung ist nicht enthalten, da die Konzentration vom KCl-Elektrolyt bei 1 M/l ist und somit *high-salt-regime* besteht ( $[\text{KCl}] > 100 \text{ mM/l}$ ), bei dem der Einfluss der Oberflächenladung vernachlässigt wird.  $\frac{1}{\sigma d}$  steht für  $2 R_{\text{E}}$  und reflektiert den Einfluss des Eintrittswiderstandes.

In der Abbildung 10 sind die experimentelle Ergebnisse der Arbeitsgruppe vom Dekker aus dem Jahr 2011 dargestellt. Die Messungen wurden an Proben durchgeführt, die alle eine Membrandicke von 20 nm hatten. Aus dem Graphen ist erkennbar, dass die gemessenen Punkte näher an den Fit mit der effektiven Membrandicke von 8,6 nm statt 20 nm liegen. Ein Jahr später lieferte Godin mit seinem Team den Grund für diese Abweichung.

#### 1.4.2 Leitwert nach Godin

Godin et. al. verwendete das Modell 2012 insofern, als die Länge der Nanopore von der Form der Nanopore abhinge [72]. Für eine mit dem TEM produzierte Nanopore ist die Form der Pore stark vom Fokuss des Elektronenstrahls des TEMs abhängig und hat einen sanduhrförmigen Querschnitt der Länge nach. Dadurch wird die effektive Länge der Nanopore reduziert und beträgt 1/2 der ursprünglichen Länge der Nanopore bzw. der Membrandicke. Dies führt zu einer weiteren Modifizierung der Gleichung für den Leitwert durch eine Nanopore:

$$G = \sigma \left[ \frac{4l_{\text{eff}}}{\pi d^2} + \frac{1}{d} \right]^{-1} \quad (9)$$

In dieser Gleichung ist die Länge der Nanopore durch die effektive Länge

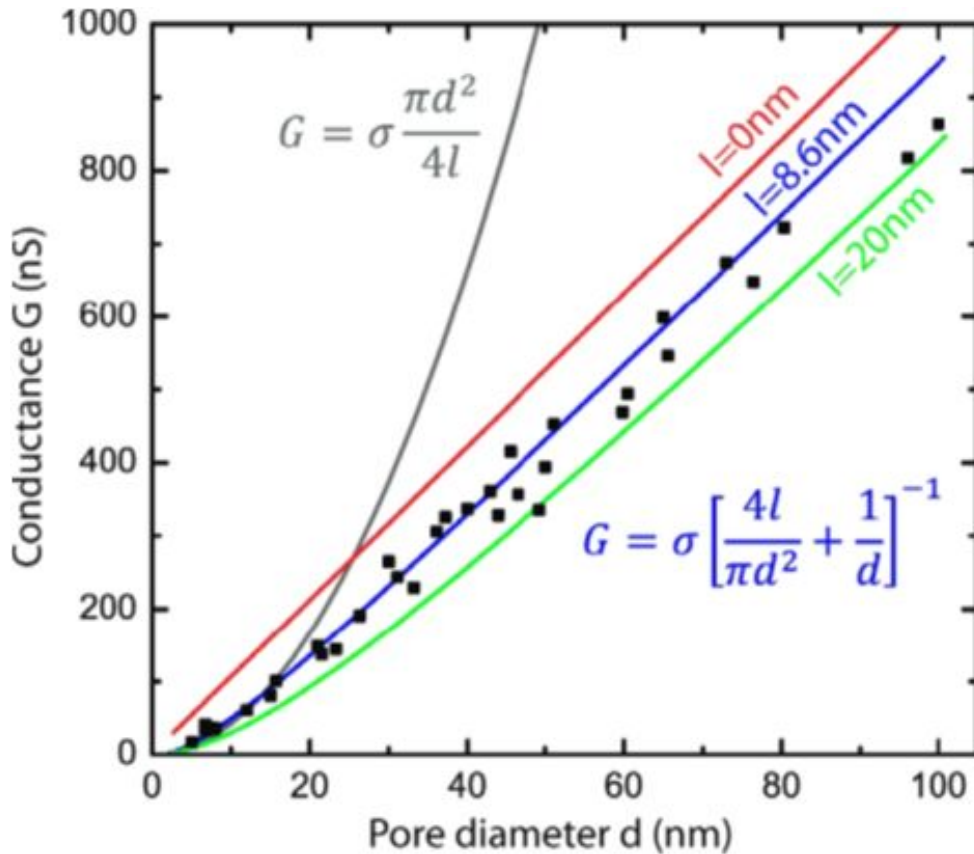


Abbildung 9: Leitwert  $G$  gemessen in nS gegen Porendurchmesser  $d$  in nm, veröffentlicht vom Dekker et. al. in 2011. Alle gemessenen Proben hatten eine 20 nm dicke  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran. Der graue Fit ist die Berechnung für eine zylindrische Nanopore ohne Beachtung des Eintrittswiderstands. Der rote Fit ist die Kalkulation für eine 0 nm lange, der blaue für eine 8,6 nm lange und der grüne für eine 20 nm lange Nanopore mit der Berücksichtigung des Eintrittswiderstands (Bildquelle: [71]).

$l_{eff}$  ersetzt und ist die Hälfte von der Membrandicke.  $\sigma$  ist die spezifische Leitfähigkeit vom 1 M/l KCl-Elektrolyt bei 299 K und beträgt 11,3 S/m [73].

Löst man Gleichung 9 nach dem Durchmesser  $d$  der Nanopore auf, so erhält man

$$d = \frac{G}{2\sigma} + \frac{G}{2\pi\sigma} \sqrt{\pi \left(1 + \frac{16\sigma l_{eff}}{G}\right)} \quad (10)$$

Diese Gleichung wird später verwendet, um aus dem gemessenen Leitwert die Größe der entsprechenden Nanopore zu ermitteln.

## 1.5 Stromblockaden verursacht durch DNA

Ohne hier nochmals im Detail auf die Struktur der DNA einzugehen, seien hier einige Eigenschaften, die für die Translokationsmessungen der DNA wichtig sind, genannt. Die doppelsträngige DNA hat einen Durchmesser von 2,2 nm. Für die Translokationen wird  $\lambda$ -phage dsDNA verwendet. Diese DNA besitzt 48,5 kbp (kilo Basenpaare) und ist 16,49  $\mu\text{m}$  lang. In einer wässrigen und pH-neutralen Lösung ist die DNA negativ geladen. 2005 wurde in der Arbeitsgruppe C. Dekker gemessen, dass die effektive Ladung der DNA pro Einheitslänge bei  $q_{\text{DNA}} = 0,58 \pm 0,02$  Elektronen pro Basenpaar [74] liegt.

Die Anwesenheit einer dsDNA in der Nanopore resultiert zu einer Stromblockade durch die Nanopore. Der Beitrag der Stromblockade verursacht durch die dsDNA in der Nanopore wird wie folgt beschrieben [64]:

$$\Delta G = G(d) - G(d_{\text{mit DNA}}) \quad (11)$$

$$d_{\text{mit DNA}} = \sqrt{(d^2 - d_{\text{DNA}}^2)} \quad (12)$$

Der Querschnitt der Nanopore ist bei Anwesenheit der DNA mit dem Durchmesser  $d_{\text{DNA}}$  um den Querschnitt der DNA reduziert auf einen effektiven Durchmesser der Nanopore  $d_{\text{mit DNA}}$ . Die Amplitude der Stromblockade, verursacht durch die Anwesenheit der DNA in der Nanopore, hängt demnach vom Porendurchmesser ab. Abbildung 10 zeigt, dass die Amplitude der

### 1.5 Stromblockaden verursacht durch DNA

Stromblockade für kleine Nanoporen steigt und für große Nanoporen kleiner wird [64]. Die Stromblockade durch eine 5 nm Nanopore hat im Vergleich zu der Stromblockade durch 15 nm und 65 nm Nanoporen die größte Amplitude und die kleinste Translokationszeit, während die Stromblockade durch die 65 nm Nanopore eine kleinere Amplitude und eine größere Translokationszeit aufweist.

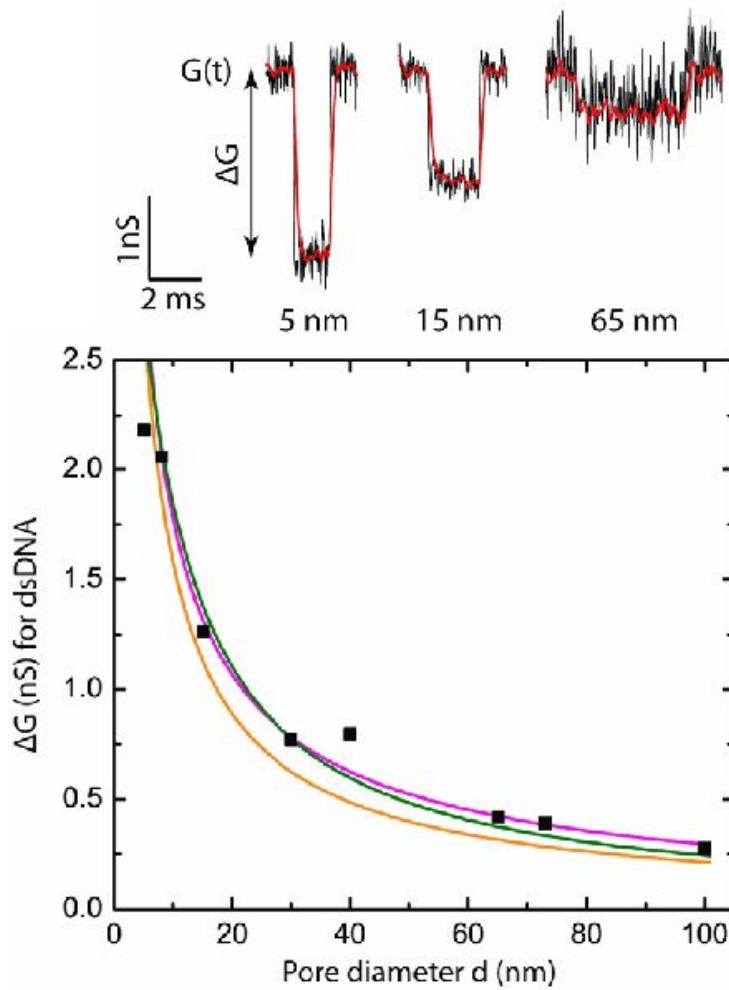


Abbildung 10: Leitwertabnahme  $\Delta G$ , die durch die DNA in der Nanopore verursacht wird, gegen den Durchmesser der Nanopore  $d$ . Aus [75].

## 1.6 Translokationszeiten der DNA durch eine $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Nanopore

Die Translokationszeit  $\tau$  der DNA durch Festkörper-Nanoporen wird in [75] als proportional zu der Länge des Moleküls  $L_0$  mit Exponent von 1,27 beschrieben. Die Messungen dazu wurden mit dsDNA Molekülen mit einer angelegten Spannung von 120 mV in 1 Mol/l KCl-Lösung durchgeführt. Im Durchschnitt wird eine Translokationsgeschwindigkeit  $v_0$  von 10 nm/s beobachtet. Dies entspricht einer mittleren Geschwindigkeit von 24 bp/ $\mu\text{s}$  für die Translokationen von dsDNA mit verschiedenen Längen bei 120 mV angelegter Spannung durch eine Nanopore mit 10 nm Durchmesser in einer 1 Mol/l KCl-Lösung.

Bei den verwendeten Lambda Hind III-Marker handelt es sich um dsDNA mit folgenden Fragmentgrößen in Basenpaaren: 23120, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125. Die Anzahl der Basenpaare ergibt für die Fragmente die Translokationszeiten: 0,78 ms, 0,25 ms, 0,157 ms, 94  $\mu\text{s}$ , 42  $\mu\text{s}$ , 35  $\mu\text{s}$ , 7  $\mu\text{s}$  und 1  $\mu\text{s}$ .

Die Translokationszeiten variieren je nach Puffer, da in verschiedenen Pufferlösungen dsDNA weniger oder mehr gefaltet vorliegen kann. Je höher die angelegte Spannung ist, desto stärker ist die molekültreibende Kraft und desto kleiner ist die Translokationszeit.

## 2 Materialien und Methoden

In diesem Kapitel wird die Messmethode und das Messsystem beschrieben. Anschließend wird auf die Messzellen eingegangen, die für die Realisierung der DNA-Translokationsmessungen entwickelt wurden. Danach wird die für die Messungen benutzte DNA dargestellt. Im Anschluß werden die verwendeten Pufferlösungen erklärt. Zum Ende dieses Kapitels wird der Aufbau der Proben und die Herstellung der Nanoporen in den  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen präsentiert. Zum Abschluss wird die Hydrophilität und die Methoden diese zu verbessern beschrieben.

### 2.1 Messmethode

Das Prinzip der Messmethode für die DNA-Sequenzierung ist in der Abbildung 11 dargestellt. Über die  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran wird die Kohlenstoffnanoröhre (CNT) gewachsen und kontaktiert. Anschließend wird die Nanopore mit dem TEM durch die CNT und die Membran gebohrt. Die Probe mit der Nanopore wird in die Messzelle zwischen Messkanal 1 und 2 eingebaut. Die Messkanäle werden mit der Messlösung gefüllt und eine Spannung wird angelegt.

Durch die angelegte Spannung  $V_{ION}$  zwischen den Messkanälen bewegt sich die dsDNA aus einem Messkanal in den anderen. Während der dsDNA-Translokation wird die Kapazität an der CNT gemessen, die zwischen den Enden der CNT, die nach der Bohrung resultierten, an der Nanopore entsteht. Durch die Anwesenheit der Ladung der DNA zwischen den Enden der Kohlenstoffnanoröhre wird die Kapazität zwischen den beiden Enden der CNT verändert. Je nach Base des DNA-Abschnitts variiert die Ladung im DNA-Segment. Aus den Kapazitätsschwankungen, die zwischen den Enden der CNT und dem DNA-Molekül entstehen, sollen so die entsprechende Signale der einzelnen DNA-Basen zugeordnet und die Sequenz der DNA bestimmt werden.



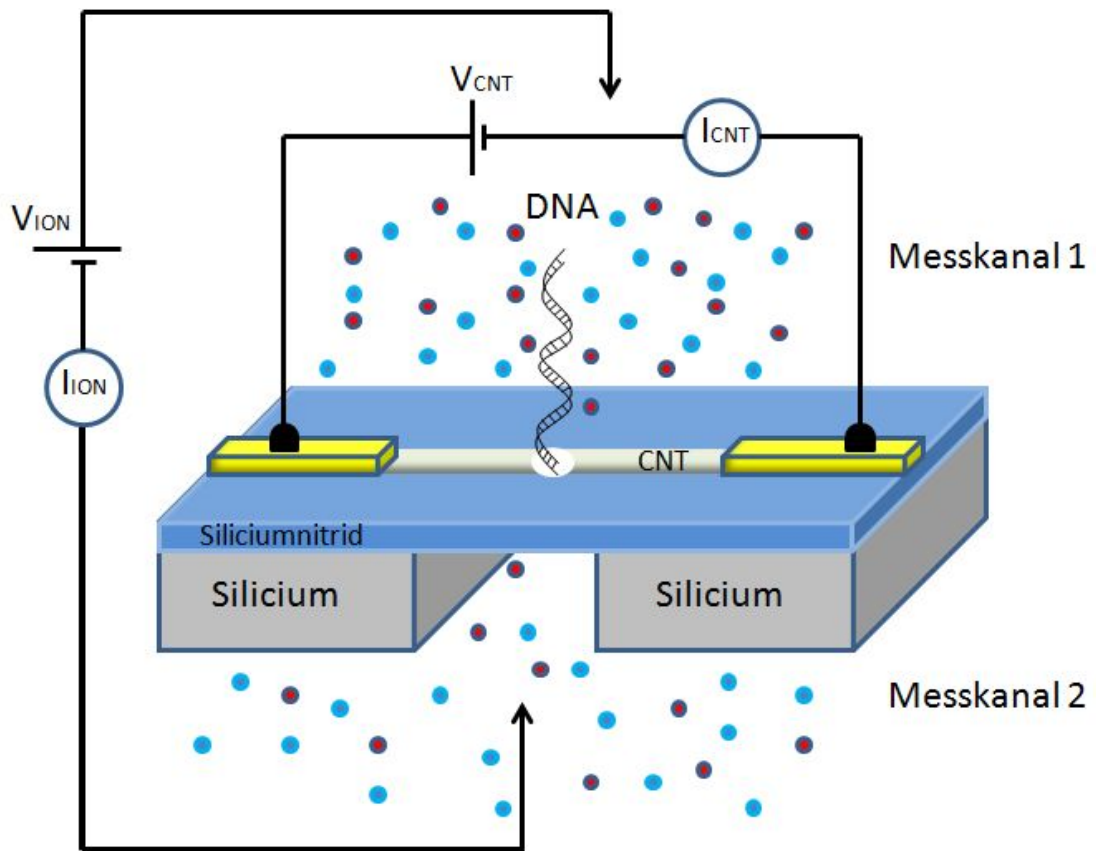


Abbildung 11: Messkonzept für die DNA-Sequenzierung. Die Siliziumprobe ist grau dargestellt. Die oberste Schicht der Probe besteht aus  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . Die Probe ist von einer Seite geätzt, so dass eine dünne  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran entsteht. Auf der Membran ist eine Kohlenstoffnanoröhre (grau) gewachsen, die mit Goldstreifen (gelb) kontaktiert ist. Durch die CNT und die  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran wurde eine Nanopore (weiss) gebohrt. In einem Elektrolyt, das aus positiven (rote Kreise) und negativen (blaue Kreise) Ionen besteht, befindet sich die  $\lambda$ -DNA. Durch die angelegte Spannung  $V_{ION}$  zwischen den Messkanälen bewegt sich das DNA-Molekül von einem Messkanal in das andere. Während der Translokation der DNA durch die Nanopore werden die Kapazitätsschwankungen mit der angelegten Spannung  $V_{CNT}$  an der Kohlenstoffnanoröhre gemessen.

## 2.2 Messsystem

Andere Arbeitsgruppen, die an Ionenstrommessungen durch Nanoporen arbeiten, verwenden den *Axopatch 200 B*. Das Gerät wurde speziell für die Messung von sehr kleinen ionischen Strömen entwickelt und hat eine Bandbreite von 10 kHz und ist digitalisiert auf 100 kHz. Es verwendet einen 4-Pol-Bessel-Tiefpassfilter mit 100 kHz Grenzfrequenz und hat eine Abtastfilterung bei 250 kHz [76]. Da die genaueren Daten der Messelektronik nicht bekannt sind und wir mehr Freiheiten diesbezüglich anstrebten, wurde eigene Messtechnik für die Translokationsmessungen umgesetzt.

In der Abbildung 12 ist die Schaltung der verwendeten Messelektronik dargestellt. An der Spannungsquelle *Yokogawa 7651* wird eine Spannung angelegt, die zu einem ionischen Strom in der Messzelle durch die Nanopore führt. Dieser ionische Strom zwischen den Messkanälen wird über den Stromvorverstärker *DL Instruments Model 1211* mit dem digitalen Multimeter *Agilent 34401 A* detektiert. Basierend auf den digitalen Multimeter *Agilent 34401 A*, das mit der Integrationszeit von  $1,4 \mu\text{s}$  und einer zeitlichen Auflösung von 100 kHz (obere Grenze des Geräts) betrieben, wurde das Signal über den Stromvorverstärker *DL Instruments Model 1211* detektiert. Das detektierte Signal vom Multimeter und die angelegte Spannung am *Yokogawa* werden über die GPIB-Verbindungen am PC aufgenommen.

Der Vorteil dieser Methode ist, dass man die Bias-Spannung für die  $I(t)$ -Messungen beliebig anlegen kann, während der *Axopatch* nur diskrete Spannungseinstellungen (z.B. 0,12 V) ermöglicht. Ein weiterer Vorteil ist die Transparenz unserer Anordnung. Beim Multimeter wurde jeder einzelner Schritt programmiert und jedes eingebautes Bauelement ist bekannt. Wobei bei den *Axopatch* das „Innenleben“ und die einzelnen Bauelemente eher Verschlussache sind, um das Reproduzieren des teureren Messgerätes zu erschweren. Das Rauschen der beiden Messmethoden ist in etwa gleich stark und beträgt ca. 100 pA. Der Nachteil dieser Messanordnung liegt darin, dass bereits nach einer Messzeit von 0,1 Sekunden der Zwischenspeicher des Multimeters voll ist und vor der weiteren Messung geleert werden muss. Auf diese

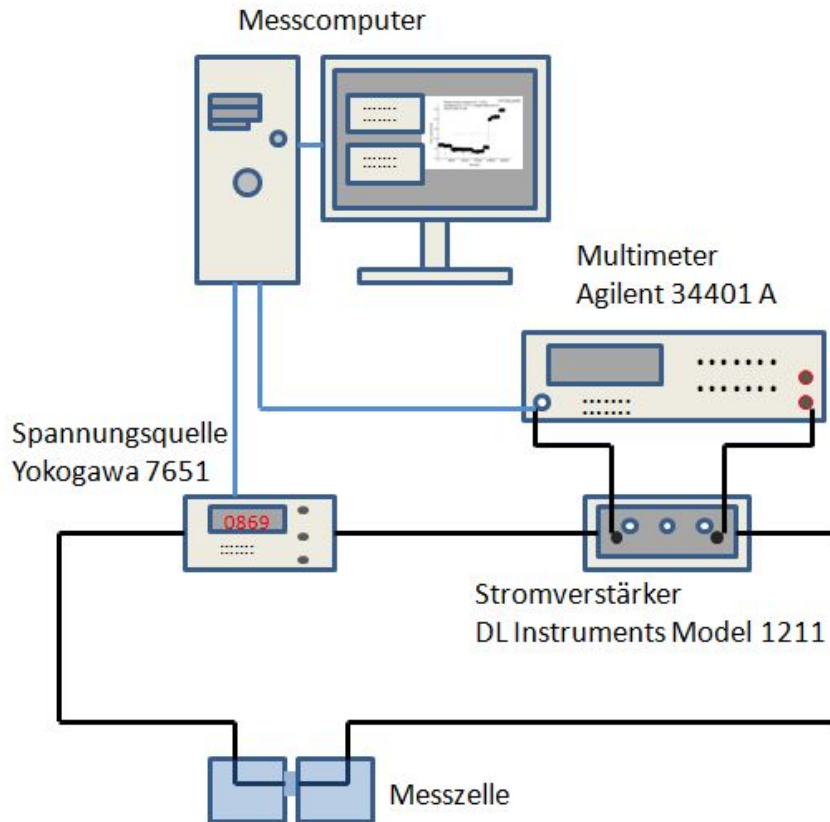


Abbildung 12: Die verwendeten Geräten wurden wie folgt verbunden. Mit Spannungsquelle *Yokogawa 7651* wurde eine Spannung zwischen den Messkanälen der Messzelle angelegt. Der so entstandene ionische Strom zwischen den Messkanälen wurde über den Stromvorverstärker *DL Instruments Model 1211* mit dem digitalen Multimeter *Agilent 34401 A* an den PC weitergeleitet. Das Messsignal wurde am Messcomputer, das über die GPIB-Kabel mit dem Multimeter und dem Yokogawa verbunden ist, ausgewertet. Die blauen Linien stehen für die Datenverbindung zwischen dem Messrechner mit dem Multimeter und der Spannungsquelle.

Weise entsteht eine Messzeit von 0,1 Sekunden und eine Wartezeit von 0,3 Sekunden, in der der Zwischenspeicher des Multimeters geleert und für die weitere Messung vorbereitet wird.

### 2.3 Messzellen

Für die Durchführung der Translokationsmessungen wurden zwei Typen von Messzellen entwickelt, die spezielle Zwecke erfüllen sollen. Während die Messzelle 1 für die Sequenzierung der DNA entwickelt wurde und mit Kontaktstiften ausgestattet ist, wurde Messzelle 2 für Messungen bei variablen Temperaturen konzipiert und enthält hierfür Peltierelemente und einen Temperatursensor. Beide Messzellen bestehen aus Polymethylmethacrylat (kurz PMMA oder umgangssprachlich Acrylglas bzw. Plexiglas genannt). Zum Einen ist Plexiglas ein Kunststoff und die DNA haftet nicht daran wie z.B. an Metallen. Zum Anderen ist Plexiglas durchsichtig, so dass die Injizierung von Pufferlösungen beobachtet werden kann und die Möglichkeit die Fluoreszenz der DNA beobachten zu können gegeben ist, da es im fernen UV-Bereich durchlässig ist [77]. Außerdem ist Plexiglas beständig gegen Säure und Laugen und ermöglicht Verbindungen durch Kleben oder Schweißen. Das Messvolumen sollte sehr gering sein, damit nur geringe DNA-Mengen benötigt werden. Das Entweichen der Luft beim Befüllen der Messkanäle ist sehr wichtig und wurde bei beiden Messzellen auf verschiedene Arten gelöst.

#### 2.3.1 Messzelle für DNA-Sequenzierung

Zuerst wurde die Messzelle für die DNA-Sequenzierung entwickelt. Sie besteht aus PMMA, besitzt ein Messvolumen von 2 x 15 ml und ist ca. (100 x 40 x 40) mm groß.

Wie in der Abbildung 13 zu sehen ist, besteht die Sequenzierungs-Messzelle (Messzelle 1) aus zwei Teilen aus PMMA, die zusammen geschraubt werden. Jedes Teil der Messzelle hat eine Öffnung für die Elektrode, die oben eine Mikroklemme als Anschluss hat. Als Elektroden werden Ag-Stifte mit 0,9 mm

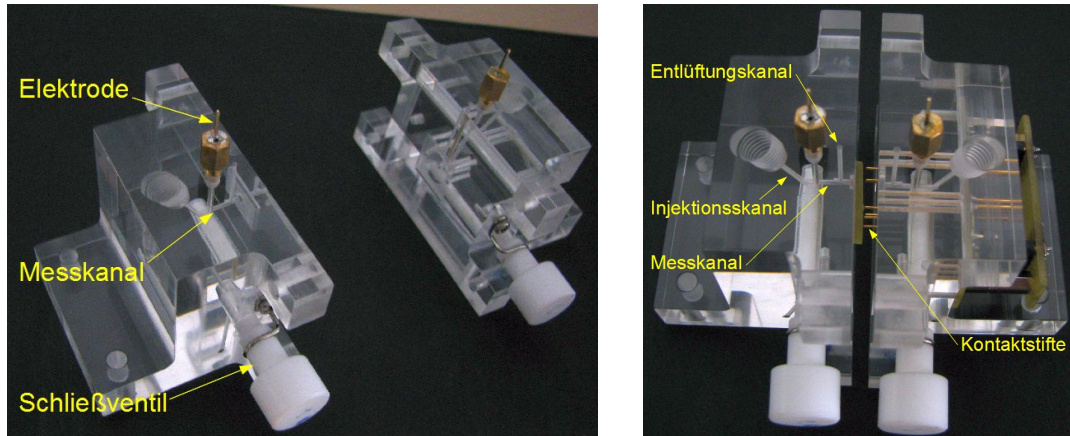


Abbildung 13: Zweiteilige Messzelle zur DNA-Sequenzierung aus PMMA. Die Messzelle ist 40 mm breit und 40 mm hoch. Die weißen Stifte sind die Schließventile. In der Mitte verlaufen die Messkanäle.

Durchmesser verwendet, die in einer 1 Mol/l KCl Lösung 30 Minuten bei einer angelegten Spannung von 1 V aufgeladen wurden. Die so entstandenen AgCl-Elektroden wurden in eine Messingschraube mit einer Mikroklammer geklebt. Die große Bohrung oben mit Gewinde ist der Injektionskanal; über diesen Zugang wird der Messkanal mit einem Elektrolyt bzw. einer Pufferlösung gefüllt. Der große weiße Stift hat eine Bohrung und dient als Schließventil, mit dem die Verbindung zwischen Injektionskanal und Messkanal unterbrochen werden kann. In der Mitte der beiden Messsteile innen ist eine Vertiefung für den Probenadapter und eine weitere Vertiefung für Silikon-Dichtungsringe angebracht. Während auf der linken Messzelle die Vertiefung für einen O-Ring mit 0,9 mm Innendurchmesser sich befindet, der den linken Messkanal zur Rückseite des Probenadapters abdichtet, ist auf der rechten Messzelle die Vertiefung für einen O-Ring mit einem Innendurchmesser von 4,8 mm, der den rechten Messkanal zur Frontseite des Probenadapters abdichtet.

Die  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Probe mit der Nanopore wird auf einen Probenadapter, der in der Abbildung 14 links zu sehen ist, mit einem Kleber „Silicone Gasting Compound“ in die Vertiefung des Probenadapters geklebt. Die Kontakte der

## 2.3 Messzellen

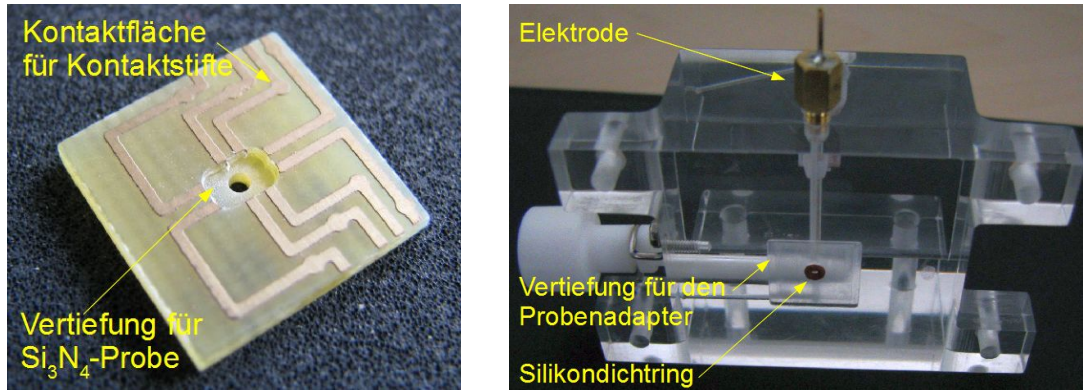


Abbildung 14: Links der Probenadapter, in den die  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Probe reingeklebt wird. Rechts die rechte Messzelle. Hier erkennt man die Vertiefung, in die der Probenadapter platziert und mit dem O-Ring zur Messzelle abgedichtet wird.

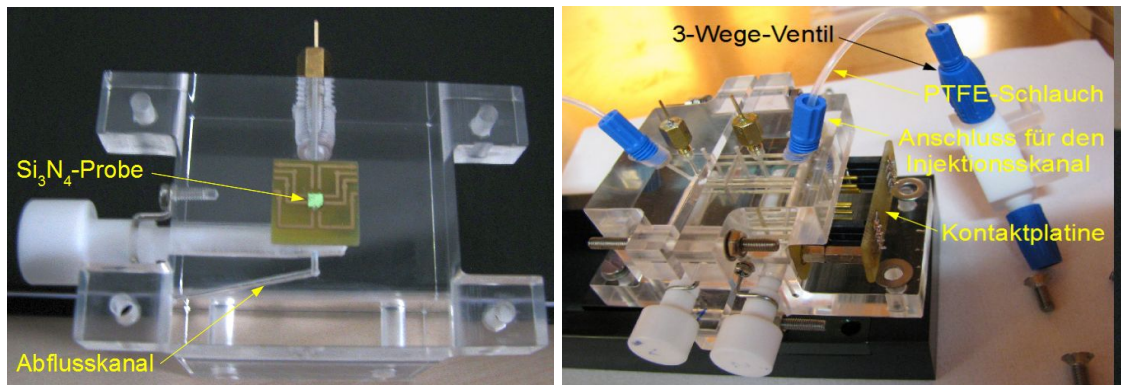


Abbildung 15: Links die rechte Messzelle mit dem Probenadapter, auf den eine  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Probe eingeklebt ist. Die Messzelle ist 40 mm hoch. Rechts die Messzelle mit den Anschlüssen für die Injektion und mit der Kontaktplatine, die über die Kontaktstifte mit dem Probenadapter verbunden ist.

Kohlenstoffnanoröhre werden mit Golddraht auf die Goldkontakte des Probenadapters gebondet. Rechts in der Abbildung 14 ist die Messzelle mit dem 0,9 mm O-Ring zu sehen, auf das der Probenadapter anschließt, siehe Abbildung 15 links. Der O-Ring mit 4,8 mm Durchmesser wird auf der Vorderseite des Probenadapters platziert. Auf diese Weise dichtet der O-Ring die  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Probe mit den Bonddrähten, die innerhalb des O-Rings auf der Vorderseite des Probenadapters liegen, von den Kontaktflächen auf dem Probenadapter, die weiter am Rand vom Probenadapter liegen, ab. Auf diese runde Goldkontaktflächen treffen die Kontaktstifte des Kontaktstiftadapters, der in der Abbildung 15 rechts zu sehen ist.

Für den Anschluss der Injizierungskanäle wurden PTFE (Polytetrafluorethylen)-Schläuche verwendet. Die 3-Wege-Ventile und Anschlussschrauben (blau im Bild) sind ebenfalls aus PTFE. PTFE ist Säure- und Lauge-resistent, weist keine metallische Eigenschaften auf und wird aus diesem Grund sehr häufig auch in der Medizin verwendet.

Mit dieser Messzelle kann der ionische Strom gemessen werden, der zwischen den beiden Messkanälen durch die  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Nanopore fließt. Gleichzeitig kann über die Kontaktstifte der Widerstand und die Kapazität der Kohlenstoffnanoröhre abgegriffen werden kann.

### 2.3.2 Messzelle für DNA-Translokationen

Wie die Messzelle 1 für die DNA-Sequenzierung besteht auch die Messzelle 2 für die DNA-Translokationen aus PMMA. Die DNA-Translokation kann zwar auch mit der Messzelle für die DNA-Sequenzierung gemessen werden, aber wegen der fehlenden Kontaktstifte konnte hier das Design vereinfacht und weiter optimiert werden. Während die Messzelle 1 Entlüftungskanäle hat, die sich knapp vor dem Anschluss des Probenadapters befinden (siehe Abbildung 14 rechtes Bild), besitzt die Messzelle 2 keine Entlüftungskanäle und die Luft kann während des Befüllens über den Abflusskanal entweichen. Die Messzelle 2 wurde in erster Linie konzipiert, um die Messflüssigkeit erhitzen und abkühlen zu können. Messungen im Bereich von 273 K bis



## 2.3 Messzellen

---

363 K konnten mit der Messzelle 2 realisiert werden. Da Messzelle für die DNA-Translokation quasi die zweite Generation der DNA-Messzelle darstellt, wurden die Erfahrungen mit Messzelle 1 übernommen, so dass die Messzelle 2 besser für die DNA-Translokationen geeignet ist als die Messzelle 1.

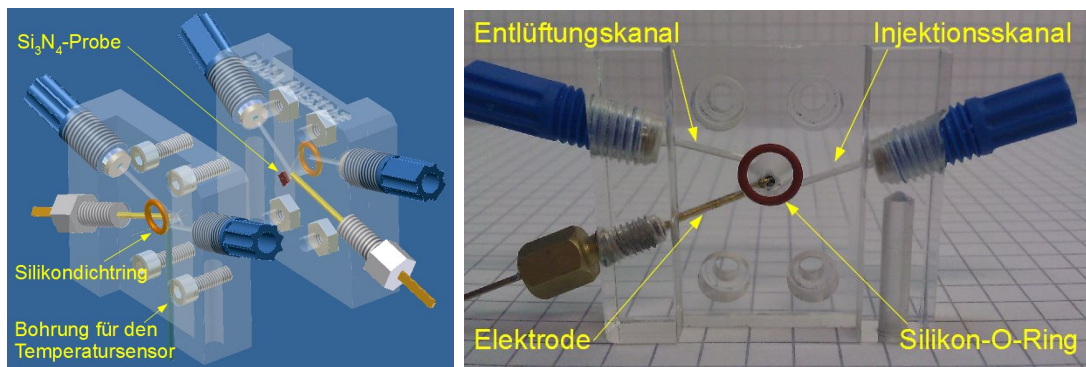


Abbildung 16: Zweiteilige Messzelle für die DNA-Translokationen aus PMMA. Links der Entwurf der Messzelle auf einem CAD-Bild. Blau sind die Anschlussschrauben, gelb die AgCl-Elektroden, orange die Dichtungsringe und rot ist die  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Probe dargestellt. Rechts das Foto der Messzelle mit rotem O-Ring und gelber Goldelektrode, die bis in das Messvolumen rein geschraubt ist.

In Abbildung 16 links ist der Entwurf der Messzelle für DNA-Translokation zu sehen. Wie schon Messzelle 1 besteht auch diese Zelle aus zwei Teilen. Zwischen die Teile wird die  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Probe mit der Nanopore positioniert, und die beiden Teile werden mit einander verschraubt. Das Besondere dieser Messzelle ist der konusförmige Messkanal, der wegen seiner Form das Entweichen der Luft in den oben angeordneten Abflußkanal erlaubt. Während der Elektrolyt bzw. die Pufferlösung über den Injektionskanal, der am unteren Ende des Messreservoirs angebracht ist, hinein gepumpt wird, drückt die Flüssigkeit die enthaltene Luft nach oben in den Abflusskanal. Auf diese Weise fallen die zusätzlichen Bohrungen für die Entlüftung weg. Im Entwurf sind die blau-



## 2.3 Messzellen

---

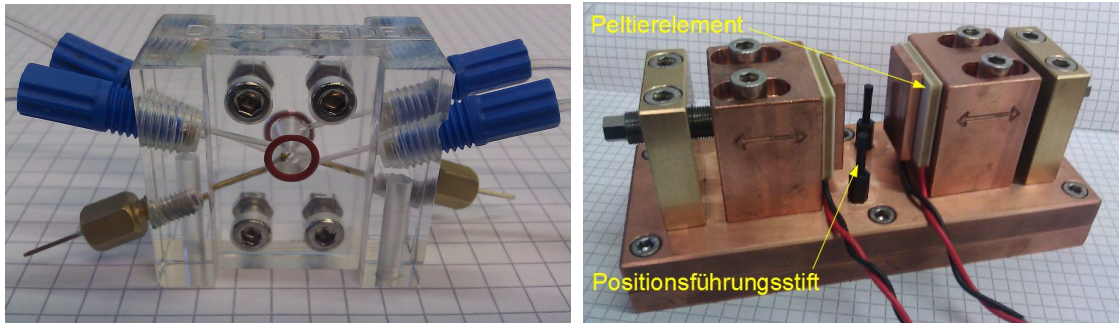


Abbildung 17: Messzelle für die DNA-Translokationen. Links sind zwei Messhälften mit einander verschraubt. Rechts ist das Gerüst, auf das die Messzelle aufgesetzt wird, mit den Peltierelementen in der Mitte und den Temperaturreservoirs als Kupferblöcke, an die die Peltierelemente angeklebt sind.

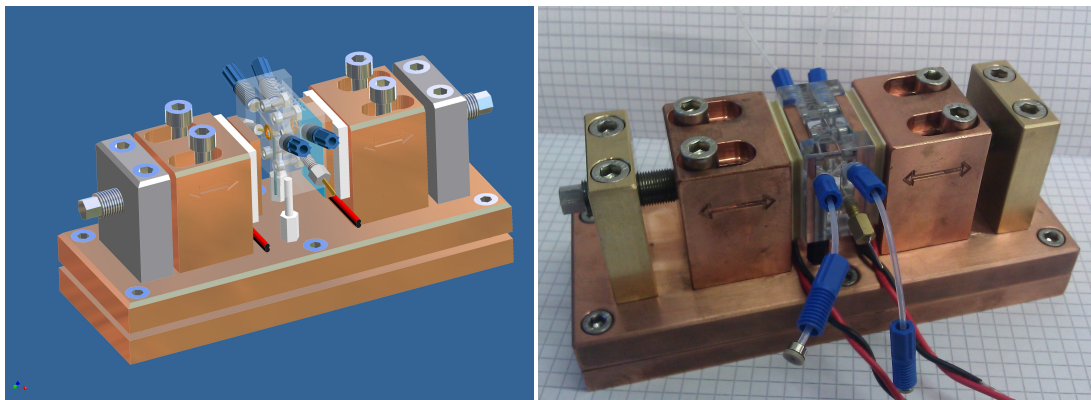


Abbildung 18: Messzelle 2. Links der Entwurf der fertigen Messzelle mit den einzelnen Komponenten auf einer CAD-Aufnahme und rechts das reale Bild der Messzelle mit den Komponenten.

## 2.4 Spritzpumpe

---

en Schrauben die Anschlusschrauben aus PTFE. In der Mitte der rechten Messzelle ist rot dargestellt die Probe zu sehen. Die gelben Stifte stellen die AgCl-Elektroden dar, orange sind die Silikon-O-Ringe, die das Messvolumen zu den Peltierelementen abdichten. Das Messvolumen pro Messkanal beträgt ca. 40  $\mu\text{l}$ . Die Größe der Messzelle 2 beträgt in etwa (30 x 35 x 20) mm.

## 2.4 Spritzpumpe

Um die DNA-Lösung mit einer gezielten Menge und bei einem kleinen konstanten Druck in das Messreservoir zuführen zu können, wurde eine Spritzpumpe für die Injektion entwickelt (Abbildung 19).

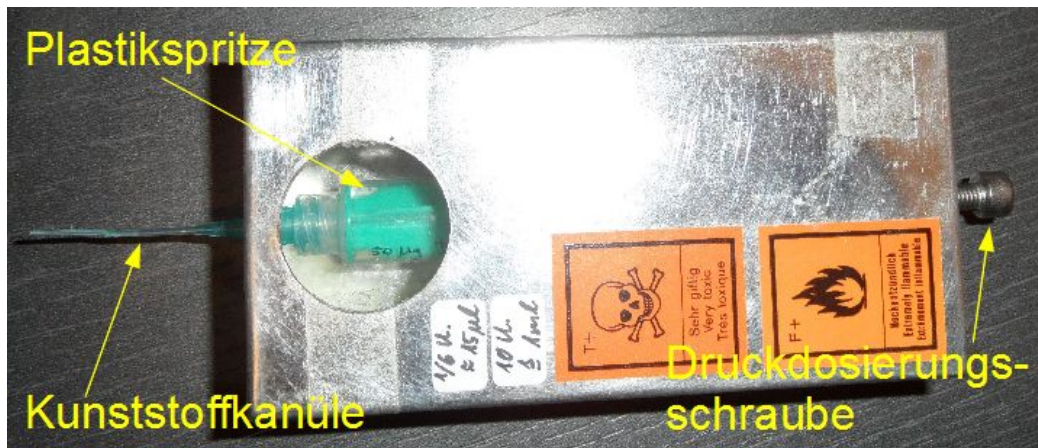


Abbildung 19: Die selbstgebaute Spritzpumpe bestehend aus einer Plastikspritze mit Kunststoffkanüle und einer Schraube mit mehreren Schraubenmutter. Durch das Drehen der Schraube wird stufenweise Druck auf die Spritze ausgeübt und die Lösung aus der Spritze durch die Kanüle gepumpt.

An eine Schraube, rechts im Bild, wurden Schraubenmutter geklebt und die Schraube am Gehäuse aus Aluminium befestigt. In das Gehäuse wird eine

Spritze mit der zu injizierenden Lösung platziert. Durch das Drehen an der Schraube (Druckdosierungsschraube) wird Druck auf die Spritze ausgeübt und so die Flüssigkeit der Spritze durch die Kunststoffkanüle in das Messreservoir eingeführt. Durch zehn volle Umdrehungen der Schraube wird 1 ml des Inhalts injiziert.

## 2.5 Verwendete DNA

Für das Ziel des Projektes soll die sogenannte  $\lambda$ -DNA sequenziert werden. Das Genom des  $\lambda$ -Phagen hat eine DNA-Sequenz mit 48502 bp (Basenpaare). Die  $\lambda$ -DNA ist kommerziell erhältlich und wurde bei *BioLabs New England* gekauft. Die Länge des dsDNA-Moleküls mit 48502 bp ist 16,4  $\mu\text{m}$  lang in gestreckter Form. Da die  $\lambda$ -Phagen DNA teuer ist, wurden viele Vormessungen mit kostengünstigeren DNA-Sequenzen, den  $\lambda$ -DNA Hind-III-Markern, vollzogen. Hierbei handelt es sich um das  $\lambda$ -Phagen-Genom, das in folgenden Fragmentgrößen der Länge nach in Basenpaaren aufgespalten wurden: 23120, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125. Diese Marker werden unter Verwendung von anmethylierter  $\lambda$ -DNA und Restriktionsendonuklease Hind III hergestellt. Die  $\lambda$ -DNA Hind-III-Marker sind ebenfalls kommerziell erhältlich und wurden bei *Carl Roth* in Karlsruhe gekauft.

## 2.6 Pufferlösungen für die DNA

Wie aus den vorherigen Kapiteln ersichtlich ist, ist die DNA ein hochreaktives und verformbares Molekül, dessen Form von mehreren Parametern abhängt. Einer dieser Parameter ist die Pufferlösung, in der sich die DNA-Moleküle befinden. Für die Messungen ist eine ungefaltete, gestreckte DNA erforderlich. Hierfür sind Substanzen, welche den pH-Wert im Bereich von 6,0 bis 8,0 puffern, nötig [78]. Als Elektrolyt wurde für alle Messungen Kaliumchlorid (KCl) verwendet; es eignet sich als Elektrolyt für pH-Bereiche von 1 bis 13.

Folgende Substanzen wurden in den Messungen verwendet: Für das

## 2.7 Probenherstellung

---

Phosphat-Puffer, das im pH-Bereich von 5,4 bis 8,0 puffert, wurden 91,6 mg Dinatriumhydrogenphosphat [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ] mit 70,7 mg Natriumhydrogenphosphat [ $\text{NaHPO}_4$ ] in 50 ml Reinstwasser gemischt. Die Lösung hatte eine Konzentration von 10 mM/l und einen pH-Wert von 7,4.

Tris-Puffer wurde aus 645 mg Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid [ $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{-HCl}$ ] und 116 mg Tris(hydroxymethyl)aminomethan [ $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$ ] in 50 ml Reinstwasser zusammen gesetzt. Die Lösung wies eine Konzentration von 100 mM/l und einen pH-Wert von 7,5.

PBS (phosphat buffered saline) wurde aus 818 mg Natriumchlorid [ $\text{NaCl}$ ], 177 mg Dinatriumhydrogenphosphatdehydrat [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ], 20 mg Kaliumchlorid [ $\text{KCl}$ ], 24 mg Kaliumdihydrogenphosphat [ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ] und 1 l Reinstwasser vermischt. Es ergab sich eine Lösung mit einem pH-Wert von 7,3 und einer Konzentration 100 mM/l.

Das Essigsäure-Acetat-Puffer wurde aus 42,35 mg Essigsäure [ $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ] und 7,65 mg Natriumacetat [ $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ] mit 50 ml Reinstwasser gemischt. Die Lösung ergab einen pH-Wert von 4,0 und eine Konzentration von 100 mM/l.

Der pH-Wert der Lösungen wurde mit dem pH-10-Stift der Firma *VWR* bestimmt. Unmittelbar vor den pH-Messungen wurde das pH-Messgerät in Puffern mit den pH-Werten 4, 7 und 10 kalibriert.

Es wurden mehrere verschiedene Pufferlösungen verwendet, da die dsDNA gefaltet bei den Messungen vorlag und mit den Variationen des Puffers wurde versucht, die richtige Pufferlösung zu finden, bei der die dsDNA ungefaltet detektiert werden kann. Erst nach dem Besuch in Lausanne wurde die Essigsäure-Acetat-Pufferlösung für die Messungen eingesetzt.

## 2.7 Probenherstellung

Die Arbeitsgruppen aus dem Projekt, die an den Ionenstrommessungen durch Nanopore tätig sind, haben  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen verwendet, wobei je nach Gruppe die Membrandicke und das Herstellungsverfahren der Proben variieren. Ein typisches Gerät, das in anderen Arbeitsgruppen zur Produk-

tion von Nanoporen durch die  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran benutzt wird, ist TEM. In Regensburg wurde neben dem TEM auch noch FIB zur Herstellung von Nanoporen verwendet.

### 2.7.1 Aufbau der $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Proben

Die verwendeten Membranen wurden kommerziell hergestellt und bei *Applied NanoStructures Inc.* (Santa Clara, USA) gekauft. Die Proben bestehen aus einer 300  $\mu\text{m}$  dicken hoch n-dotierten Si-Schicht, über der 300 nm  $\text{SiO}_2$  als Isolatorschicht und danach 50 nm *super low stress*  $\text{Si}_3\text{N}_4$  mit LPCVD (low pressure chemical vapour deposition) aufgebracht wurden. Im Anschluss wurden Si und  $\text{SiO}_2$  so gezielt weg geätzt, dass auf einer (2,5 x 2,5)-mm Probe zwei Membranen mit den Querschnitten von (30 x 106)  $\mu\text{m}$  und (56 x 106)  $\mu\text{m}$  entstanden. Die Dicke der Membranen beträgt, so wie die Dicke der  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Schicht, 50 nm.

### 2.7.2 Wachstum von CNTs auf $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen

Mit dem Ziel, dass die Kohlenstoffnanoröhren (engl. *carbon nanotubes*, CNTs) als Detektoren für die DNA-Sequenzierung dienen sollen, werden sie auf den Membranen gewachsen. Dafür werden zunächst Katalysatorpartikel aus  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  und  $\text{MoO}_2(\text{acac})_2$  auf die Oberfläche von  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen lokal aufgetragen [79]. Im CVD- (chemical vapor deposition) Ofen wachsen aus den Katalysatorpartikeln bei 1173 K unter Durchfluss von  $\text{CH}_4$ , Argon und  $\text{H}_2$  einwandige Kohlenstoffnanoröhren (engl. *single walled carbon nanotubes*, SWCNTs). Nach dem Wachstum werden am REM Positionen und Länge der Kohlenstoffnanoröhren festgehalten. Am Rasterkraftmikroskop (engl. *atomic force microscope*, AFM) wird der Durchmesser der Nanoröhren vermessen, um sicher zu stellen, dass es sich um SWCNTs und nicht mehrwandige Kohlenstoffnanoröhre (engl. *multi walled carbon nanotube*, MWCNTs) handelt. Es folgt die Kontaktierung der Nanoröhren mit 55 nm Pd und 25 nm Au. Anschließend wird durch die  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran und durch die Nanoröhre eine Nanopore mit dem Elektronenstrahl des Transmis-

## 2.7 Probenherstellung

---

sionselektronenmikroskops (TEMs) gebohrt. Mit dem Fokus des Elektronenstrahls und mit der Bestrahlungszeit kann der Durchmesser der entstandenen Nanopore variiert werden.

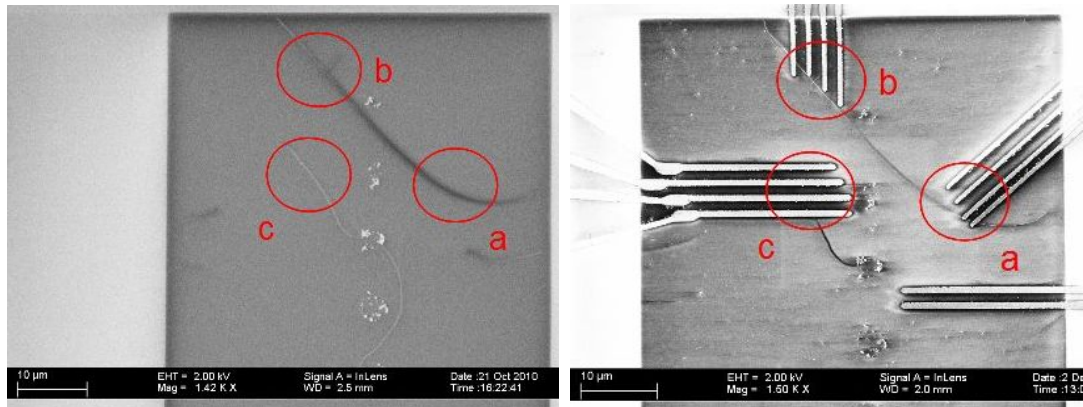


Abbildung 20: REM-Aufnahme zweier Nanoröhren, die auf einer Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-Membran gewachsen sind. Rechts die Nanoröhren nach der Kontaktierung mit 55 nm Pd und 25 nm Au. Die Kontakte sind in drei Bereiche A, B und C unterteilt.

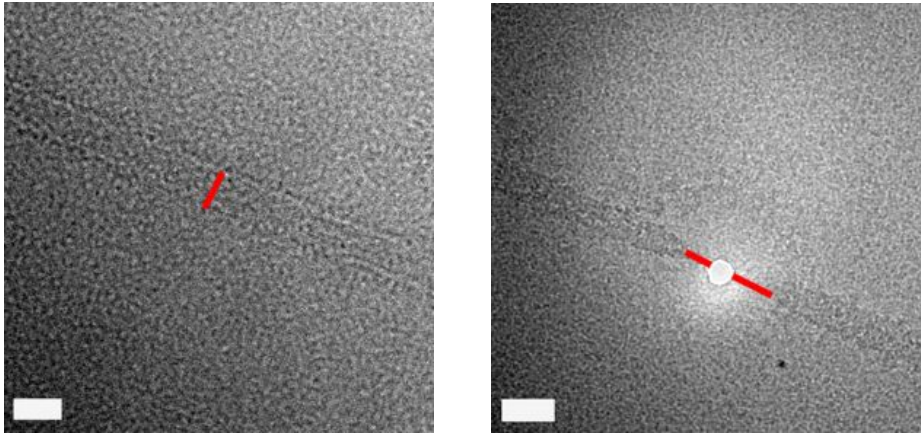


Abbildung 21: TEM Aufnahmen der Nanoröhre aus dem Bereich A vor (linkes Bild) und nach (rechtes Bild) dem Bohren einer 10 nm Nanopore mit dem Elektronenstrahl. Die Maßstabsskala beträgt 20 nm. Der Abstand von der Nanopore bis zur Nanoröhre ist links etwa 5 nm und rechts ca. 15 nm. Die TEM Bilder wurden vom Matthias Heise am *Philips Tecnai* TEM aufgenommen.

In den Abbildungen 20 bis 26 sind REM Aufnahmen von Kohlenstoffnanoröhren vor und nach dem Kontaktieren mit Pd und TEM Bilder der Nanoröhren vor und nach dem Bohren mit dem Elektronenstrahl dargestellt. Um den Bereich der Zerstörung der Nanoröhre um die Nanopore zu minimieren, wurde der Elektronenstrahl auf der Rückseite der Membran, nicht die Oberfläche mit der Nanoröhre, ausgerichtet. Der zerschossener Bereich der Kohlenstoffnanoröhre ist bei dieser Methode zwar kleiner, als wenn man direkt über der Nanoröhre bohren würde, aber es besteht so die Möglichkeit, dass die Nanopore die Nanoröhre nur zum Teil (wie in Abbildung 26) oder gar nicht trifft, wie in Abbildung 24 zu sehen ist. Auf den REM Bilder sind die Nanoröhren weiße bzw. schwarze dünne Fäden. Die CNTs sind wegen der Aufladung durch den Elektronenstrahl auf den REM-Aufnahmen sichtbar. Die weiße rundförmige Strukturen auf der Membran sind die Katalysatorpartikel, aus denen die Nanoröhren wachsen. Die Maßstabsskala der TEM-Bilder ist um den Faktor 1000 kleiner als der REM-Aufnahmen. Die dunkle



## 2.7 Probenherstellung

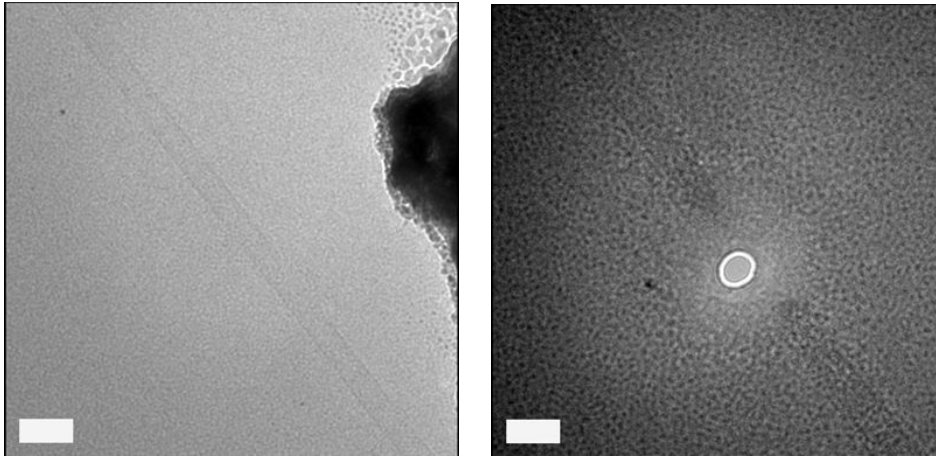


Abbildung 22: TEM Aufnahmen der Nanoröhre aus dem Bereich B vor und nach dem Bohren mit dem Elektronenstrahl. Links die TEM-Aufnahme der Nanoröhre vor dem Bohren. Rechts die Nanoröhre nach dem Bohren einer 10 nm Nanopore. Die Maßstabsskala beträgt 20 nm. Der Abstand von der Nanopore bis zur Nanoröhre ist links und rechts ca. 15 nm. Die TEM Bilder wurden vom Matthias Heise am *Philips Tecnai* TEM aufgenommen.

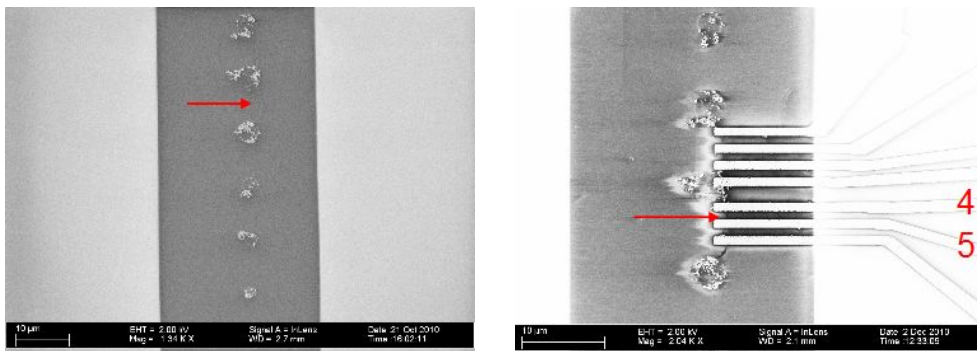


Abbildung 23: REM Aufnahmen einer Probe mit Nanoröhre. Links REM-Bild der Nanoröhre auf der  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran. Rechts Bild nach dem Kontaktieren der Nanoröhre. Die Maßstabsskala beträgt 10  $\mu\text{m}$ .

Schatten an die die Nanoröhre angrenzt, sind die Pd-Au-Kontakte.



## 2.7 Probenherstellung

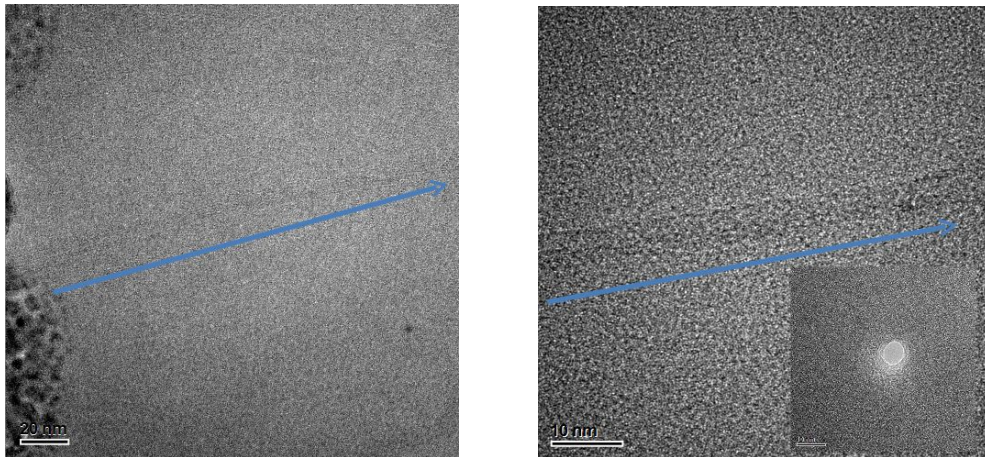


Abbildung 24: TEM Aufnahmen der Nanoröhre zwischen den Kontakten 4 und 5. Links die TEM-Aufnahme vor dem Bohren mit dem Elektronenstrahl. Rechts die Nanoröhre nach dem Bohren einer 10 nm Nanopore. Die Maßstabsskala beträgt 20 nm auf dem linken und 10 nm auf dem rechten Bild. Die CNT befindet sich über dem blauen Pfeil. Die Nanopore mit dem Durchmesser von etwa 10 nm liegt nicht in der Nähe der Nanoröhre. Die TEM Bilder wurden vom Matthias Heise am *Philips Tecnai* TEM aufgenommen.

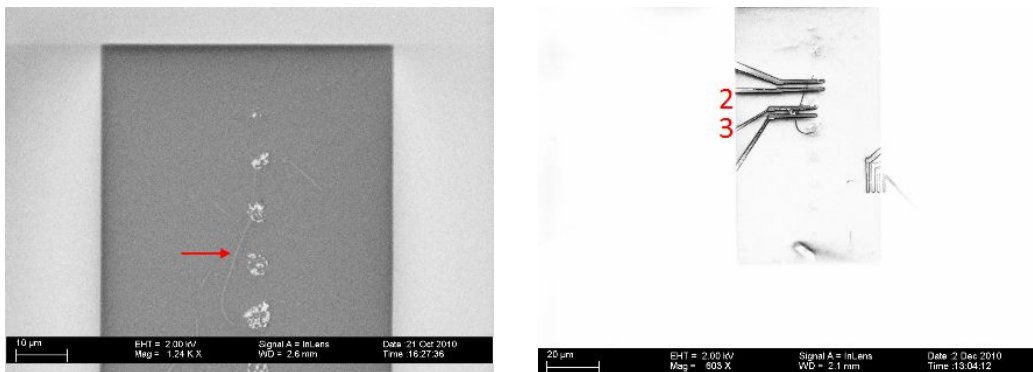


Abbildung 25: REM Aufnahmen einer weiteren Probe mit Nanoröhre. Links das REM-Bild der Nanoröhre auf der  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran. Rechts das Bild nach dem Kontaktieren der Nanoröhre. Die Maßstabsskala beträgt 10  $\mu\text{m}$  links und 20  $\mu\text{m}$  rechts.

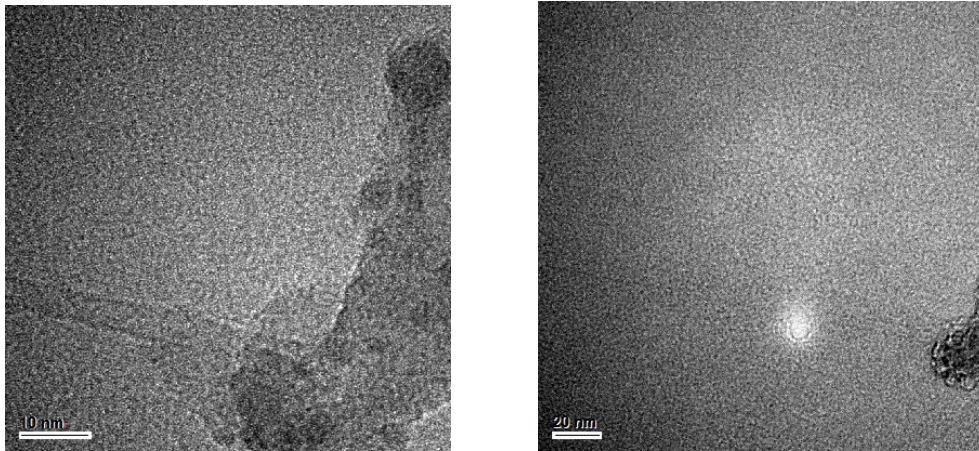


Abbildung 26: TEM Aufnahmen der Nanoröhre zwischen den Kontakten 2 und 3. Links die TEM-Aufnahme vor dem Bohren mit dem Elektronenstrahl. Rechts die Nanoröhre nach dem Bohren einer 10 nm Nanopore. Die Maßstabsskala beträgt 10 nm auf dem linken und 20 nm auf dem rechten Bild. Die Nanopore mit dem Durchmesser von etwa 10 nm geht nur zum Teil durch die Nanoröhre. Die TEM Bilder wurden vom Matthias Heise am *Philips Tecnai* TEM aufgenommen.

### 2.7.3 Herstellung von Festkörper-Nanoporen mit TEM

Die verbreitetste Methode Festkörper-Nanoporen herzustellen, ist die Verwendung eines TEM (Transmissionselektronenmikroskop) auf  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen. Dabei wird der fokussierte Elektronenstrahl des TEMs mit 300 kV beschleunigt und auf die dünne Membran ausgerichtet. Die Dosierung wird so gewählt, dass die entstandene Nanopore einen Durchmesser von möglichst kleinen Durchmesser von einigen nm hat. Die Bohrungen der Nanoporen mit dem TEM wurden vom Matthias Heise durchgeführt. An der Universität Regensburg sind zwei TEMs in der Arbeitsgruppe von Prof. Zweck im Einsatz, ein Philips CM 30 und ein Philips Tecnai. Die Probenhalter der TEMs sind für kleine Proben ausgelegt nicht größer als 2,2 x 2,2 mm. Da unsere gelieferte Proben mit zwei Membranen aber 2,5 x 2,5 mm groß sind, ist eine Reduzierung der Probenfläche nötig. Dazu wurden die Proben mit einem Diamantritzer angekratzt und vorsichtig gebrochen, so dass Proben mit

## 2.7 Probenherstellung

---

(2,0 x 2,0) mm bis (2,2 x 2,2) mm Flächen entstehen.

Während die derzeitige Auflösungsgrenze vom TEM bei 0,05 nm liegt, bleibt die Realisierung einer 1 nm Nanopore aufgrund der Abtragung des Materials von der Oberfläche mittels eines Elektronenstrahls nicht trivial. Die notwendige Energie der Elektronen, um Material durch Kollisionen von der Oberfläche abzutragen, liegt bei etwa 100 keV. Eine mögliche Verschiebung der Probe während der Bestrahlung, die verwendete Blenden, die angelegte Spannung und die Wechselwirkungen unter der Elektronen begrenzen den kleinsten Durchmesser der entstehenden Nanopore. Eine Nanopore mit einem Durchmesser von etwa 10 nm, die mit dem TEM Philips Tecnai bei 300 kV produziert wurde, ist in Abbildung 27 zu sehen.

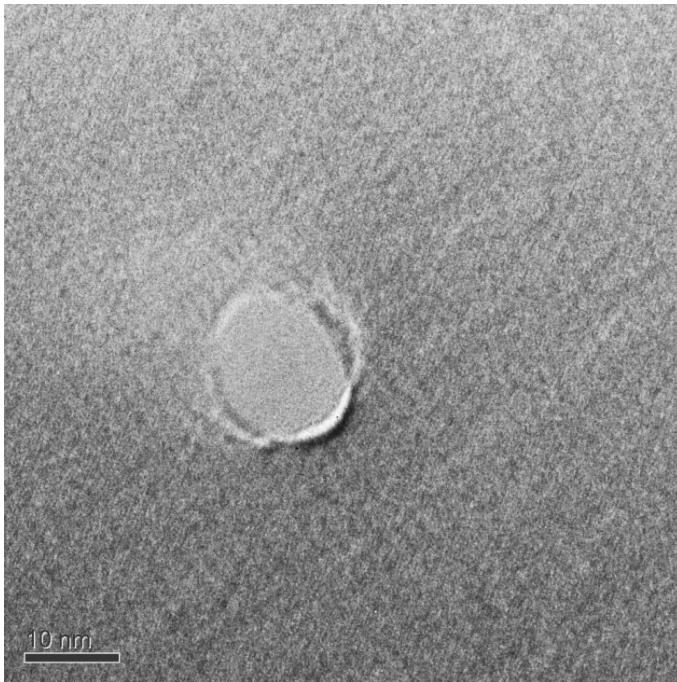


Abbildung 27: TEM-Aufnahme einer Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-Nanopore mit Durchmesser von ca. 10 nm. Die Pore wurde durch eine 50 nm dicke Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-Membran mit dem Elektronenstrahl des TEM Philips Tecnai gebohrt. Das TEM Bild wurde vom Matthias Heise am Philips Tecnai TEM aufgenommen.

### 2.7.4 Herstellung von Festkörper-Nanoporen mit FIB

Eine weitere Möglichkeit, Nanoporen in  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen durch Kollisionsprozesse herzustellen, stellt die Verwendung eines FIB-Geräts (*focused ion beam*) dar. Bereits 2008 hat die Arbeitsgruppe um Prof. Kotula Nanoporen mit einem Durchmesser von 20 nm auf der Ausgangsseite der Pore mit dem FIB unter Zuhilfenahme eines Partikeldetektors auf der Rückseite der Probe hergestellt [80]. Wenn der Ionenstrahl auf die Vorderseite der Probe die Membran trifft, so wird der Partikeldetektor hinter die Rückseite der Probe platziert. Auf diese Weise kann der Ionenstrahl abgeschaltet werden, sobald am Detektor die ersten durch die Membran transmittierten Galliumatome des FIBs gemessen werden.

Das Auflösungsvermögen eines FIBs mit Galliumatomen, die oft zum Materialabtrag und somit für hohe Emissionströme (50 nA bei 30 kV) konzipiert wurden, beträgt etwa 10 nm. Die kleinstmöglichen Nanoporen, die mit dieser Methode fabriziert werden können, haben einen Durchmesser von etwa 20 nm. Aufgrund der höheren Masse der Galliumatome im Vergleich zu den Elektronen sind bei dieser Methode keine so hohe Spannungen von über 100 kV, wie beim TEM erforderlich. Ohne Verwendung eines Partikeldetektors werden die mit dem FIB produzierten Nanoporen größer. Die kleinsten so hergestellten Nanoporen weisen einen Durchmesser von 300 nm. In der Abbildung 28 ist z.B. eine Nanopore mit 280 nm Durchmesser auf der REM-Aufnahme zu sehen. Die Dicke der Membranen, die beim Bohren mit FIB verwendet werden, können zwischen 50 und 1000 nm variieren, während die Membrandicke beim Bohren mit dem TEM nicht mehr als 100 nm betragen darf, um für die Elektronen noch transparent zu sein. Mit dem TEM können somit kleinere Nanoporen bis hin zu einem 1 nm Durchmesser auf sehr dünnen Membranen (20 bis 100 nm) hergestellt werden. Mit dem FIB sollte man mehr als 50 nm dicke Membranen verwenden, wobei die Dicke auch 1  $\mu\text{m}$  überschreiten kann. Ebenso kann der Durchmesser der Nanoporen hergestellt mit dem FIB von 20 nm bis mehrere Mikrometer betragen.



Abbildung 28: REM-Aufnahme einer Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-Nanopore mit dem Durchmesser von ca. 280 nm. Die Pore wurde durch eine 50 nm dicke Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-Membran mit dem Gallium-Ionenstrahl bei 30 kV Beschleunigungsspannung und 1 pA Emissionsstrom gebohrt.

## 2.8 Hydrophilie

Hydrophilie bedeutet wasserliebend. Es kommt aus dem altgriechischen vom hydro „Wasser“ und philos „liebend“. Das Gegenteil der Hydrophilie ist Hydrophobie und bedeutet wasserabweisend. Der Grund für diesen Unterschied stellt die Polarität der Moleküle dar [81]. Jedem Element wird die Elektronegativitätszahl (EN) [82] zugeordnet, die ein Maß für die Fähigkeit eines Atoms, in einer chemischen Bindung Elektronenpaare an sich zu binden, ist. Für ein Molekül aus zwei gleichen Atomen wie O<sub>2</sub> ist die Elektronegativitätsdifferenz der einzelnen Atome gleich Null, und somit ist das Molekül unipolar. Die polarste Verbindung zwischen zwei Atomen stellt Lithiumfluorid dar. Sie hat eine Elektronegativitätsdifferenz (F, EN = 4,17; Li, EN = 0,97)  $\Delta EN = 3,2$ . Im Allgemeinen spricht man von einer unpolaren

## 2.8 Hydrophilie

---

Verbindung bei  $\Delta EN < 0,5$  und von einer polaren Verbindung für  $\Delta EN > 0,5$ . Mit der Hydrophilie ist die Löslichkeit eines Stoffes eng verbunden. So lassen sich Stoffe gut miteinander lösen, wenn beide Stoffe polar bzw. beide unpolar sind.

Wasser ist eine polare Verbindung mit einer Elektronegativitätsdifferenz von  $\Delta EN = 1,3$  (Wasser  $EN = 2,2$  und Sauerstoff  $EN = 3,5$ ). Aus diesem Grund lösen sich die polaren Substanzen gut in Wasser auf und nur sehr schlecht in unpolaren Lösungsmitteln.

In der Praxis kann man den Grad der Hydrophilie relativ leicht bestimmen. Betrachtet man den Tropfen Wasser auf einer Oberfläche, so ist der Winkel zwischen der Oberfläche und dem Wassertropfen für hydrophobe Stoffe zwischen  $0^\circ$  und  $90^\circ$  (siehe Abbildung 29). Für hydrophile Stoffe liegt der Winkel zwischen  $90^\circ$  und  $180^\circ$ . Bei hydrophoben Stoffen „versucht“ das Wasser die Kontaktfläche zum Substrat zu minimieren. Je hydrophober ein Stoff ist, desto kleiner ist der Kontaktwinkel zum Wassertropfen und desto kleiner ist dementsprechend die Kontaktfläche. Bei hydrophilen Stoffen hingegen verteilt sich der Wassertropfen breitflächig auf der Oberfläche. Je hydrophiler das Element ist, desto größer ist der Kontaktwinkel und desto größer ist die Berührungsfläche. Wie in Abbildung 29 zu sehen, ist bei der unbehandelten  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Probe die Oberfläche hydrophob. Der Wassertropfen verteilt sich sehr schlecht auf der Probe. Er ist sehr hoch und der Kontaktwinkel ist kleiner als  $90^\circ$  (rechtes Bild der Abbildung 29). Nach der Ablagerung von 1 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$  [83] auf der sonst hydrophoben  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Oberfläche wird die Oberfläche hydrophil, und der Wassertropfen verteilt sich breitflächig, während der Kontaktwinkel zwischen der  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran und dem Wassertropfen über  $90^\circ$  beträgt (linkes Bild der Abbildung 29).

### 2.8.1 $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Proben

Hydrophilität bzw. wasserliebende Eigenschaft der  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Oberfläche ist ein wichtiger Schritt für die Translokationsmessungen. Im Laufe dieser Arbeit wurden 3 Methoden getestet, um die Hydrophilie der sonst hydro-

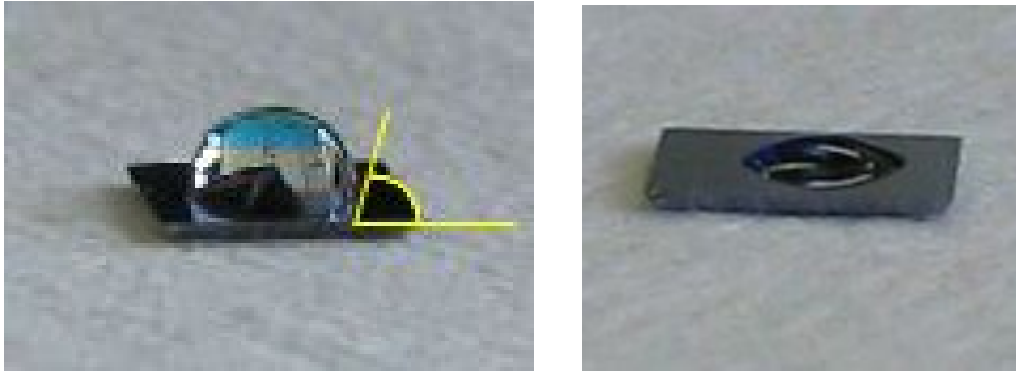


Abbildung 29: Ein Wassertropfen auf der Oberfläche einer  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran. Links ist der Wassertropfen sehr hoch, der Kontaktwinkel ist kleiner als  $90^\circ$ . Die  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Oberfläche ist noch unbehandelt und deswegen hydrophob. Rechts ist die  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Probe nach der Auftragung von 1 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$  mit der ALD zu sehen. Die Oberfläche ist nun hydrophil, der Kontaktwinkel ist größer  $90^\circ$  und der Wassertropfen verteilt sich flach auf der Oberfläche der Probe.

phoben  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Oberfläche zu erhöhen. Da die Flüssigkeit durch ein extrem kleines Loch, die Nanopore, passieren soll, ist eine thermische Behandlung der Oberfläche nicht ausreichend.

Die erste Methode ist das chemische Ätzen der Oberfläche mit 98%-ige Schwefelsäure gelöst in 30%-igen Hydrogenperoxyd [84]. Mit dieser Methode erreicht man sehr gut hydrophiles Verhalten der  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Proben. Der Nachteil dieser Methode ist die Belastung der empfindlichen  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran in der turbulenten Ätzmischung, außerdem verliert die Oberfläche ihre hydrophile Eigenschaft, sobald die Probe aus der wässrigen Umgebung entnommen wird.

Die zweite Methode die Hydrophilie der  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Probe zu steigern, ist das Aufbringen von  $\text{Al}_2\text{O}_3$  auf die Oberfläche von  $\text{Si}_3\text{N}_4$  mittels *atomic layer deposition* (ALD) [83]. Bereits das Deponieren von wenigen Monolagen  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ist ausreichend, um die hydrophilen Eigenschaften der Probe zu steigern. Diese Methode wurde favorisiert, da sie im Vergleich zu anderen Methoden

am schonensten für die  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen ist und außerdem die hydrophile Eigenschaften der Oberfläche auch nach dem Entnehmen aus der Flüssigkeit über einen längeren Zeitraum konstant gut bleiben.

Im letzten Jahr der Arbeit wurde auch eine dritte Methode getestet, die aus der Gruppe Prof. C. Dekker TU Delft stammt. Bei dieser Methode geht es darum, die Probe unmittelbar nach dem Bohren der Nanopore mit dem TEM bzw. FIB in einer Mischung aus Wasser und Ethanol im Verhältnis 1:1 zu lagern. Diese Methode weist die besten hydrophilen Eigenschaften im Vergleich zu den anderen beiden Rezepten auf, doch die Lagerung in der flüssigen Umgebung stellt für die Membranen eine größere Belastung dar, so dass nahezu alle  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen nach der Lagerung im Ethanolwasser durchgebrochen waren. Nach vielen Versuchen wurde diese Methode aufgegeben; mehr Details dazu folgen in Kapitel 3.

### 2.8.2 PDMS-Dichtung

Für die meisten Zwecke sind Silikon-Dichtungen ein guter und effizienter Mittel zum abdichten. Kommt man aber in den Bereich von 1 mm Innendurchmesser und kleiner, so stellt die hydrophobe Eigenschaft der Silikondichtungen ein größeres Hindernis dar. Für einen O-Ring mit 0,9 mm Innendurchmesser im ungequetschten Zustand reduziert sich z.B. der Innendurchmesser bei Belastung auf 0,5 mm und weniger. In diesem Fall sind die hydrophoben Oberflächen des O-Rings sehr nah an einander und das Passieren der Flüssigkeit durch den O-Ring kann nicht mehr erfolgen.

Eine Abhilfe bieten PDMS-Dichtungen an [85]. PDMS steht für Polydimethylsiloxan und ist ein Polymer auf Siliziumbasis, das durchsichtig und chemisch stabil ist. Die einzelnen Komponenten werden im Verhältnis 10:1 vermischt und anschließend im Ultraschallbecken von Luftbläschen befreit. Die Lösung wird in eine Form gegossen und am besten bei niedrigen Temperaturen (z.B. 2 h bei  $80^\circ\text{C}$ ) ausgehärtet. Der so entstandener PDMS-Film hat in etwa eine Dicke von 0,2 mm. Danach wird die benötigte Form mit dem Skalpel geschnitten und mit einem Stift ein ca. 1 mm großes Loch in



die Dichtung gestochen. In dieser Form hat die Dichtung noch hydrophobe Eigenschaften, weswegen eine Oberflächenbehandlung nötig ist.

Zwei Methoden wurden für die Behandlung der Oberfläche der PDMS-Dichtung ausprobiert. Die gängigste Methode ist die Behandlung der Dichtung mit dem Plasmaverascher, mit dem organische Stoffe und Verunreinigungen von der Oberfläche entfernt werden [86]. Diese Behandlung wurde lange praktiziert, bis bei einem Vergleich der Hydrophilität mit Proben aus Lausanne (AG Prof. Radenovic) festgestellt wurde, dass die PDMS-Dichtungen aus der Schweiz bei gleicher Behandlung mit dem Plasmaverascher bessere Hydrophilität aufweisen. Nach diesem Befund wurden neue Methoden getestet und das chemische Ionenätzen mit der RIE (*reactive ion etching*) mit Hilfe des  $O_2$ - und  $CHF_3$ -Gases als effektivere Methode zur Steigerung der Hydrophilität entdeckt. Die Hydrophilität der PDMS-Dichtungen nach der Behandlung mit der RIE ist stärker als die der PDMS-Dichtungen aus der Schweiz. Die noch besseren hydrophile Eigenschaften erwiesen sich später als ein Nachteil, wie im folgenden Kapitel dargelegt.

## 3 Experimentelle Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die experimentellen Ergebnisse der ionischen Strommessungen durch die Nanoporen vorgestellt. Zuerst kommt eine Übersicht der verwendeten Proben. Danach werden die Leitwertmessungen mit verschiedenen Puffern und bei verschiedenen Konzentrationen präsentiert, die für die Auswahl der Pufferlösung und für die Prüfung der Messzellen auf die Dichtheit gedient haben. Im Anschluss folgen die Leitwertmessungen mit unterschiedlichen Elektroden, bei denen verschiedene Elektrodenmaterialien verglichen wurden. Danach wird auf die Translokationsmessungen eingegangen.

Alle Messungen sowohl mit der Messzelle 1 als auch 2 wurden innerhalb eines Faraday-Käfigs durchgeführt, der eigens dafür gebaut wurde, um die Störsignale zu minimieren. Die Kabel, die die Geräte außerhalb des Käfigs mit denen innerhalb verbinden, wurden mit Ferritkernen versehen, um hochfrequente Störungen auf Leitungen außerhalb des Faraday-Käfigs zu dämpfen. Die Elektrolyt- und die Pufferlösungen wurden über Spritzen mit Kunststoffnadeln in die Messreservoirs eingespritzt. Sobald Proben mit Membranen in die Messzelle eingebaut waren, wurden die Flüssigkeiten über die selbstgebaute Spritzpumpe, die in der Abbildung 19 dargestellt ist, in die Kanäle eingeführt, um die Druckschwankungen während des Spritzvorgangs zu minimieren und um bei DNA-Injektionen die zugegebene Menge genau dosieren zu können.

### 3.1 Verwendete Proben

Eine Übersicht der verwendeten Proben bzw. Nanoporen.

Von den Proben 2B und 2D liegen TEM Aufnahmen vor (Abbildung 30). Die Aufnahmen wurden vom Matthias Heise mit dem Philips Tecnai TEM bei 300 kV gemacht. Aus den TEM-Bilder erkennt man, dass die Probe 2B einen Durchmesser von ca. 20 nm und Probe 2D von 8 nm haben. TEM-Bilder von der Probe 4 gibt es leider nicht, aber aus den Messungen des Leitwerts ergibt

### 3.2 Verschiedene Pufferlösungen

---

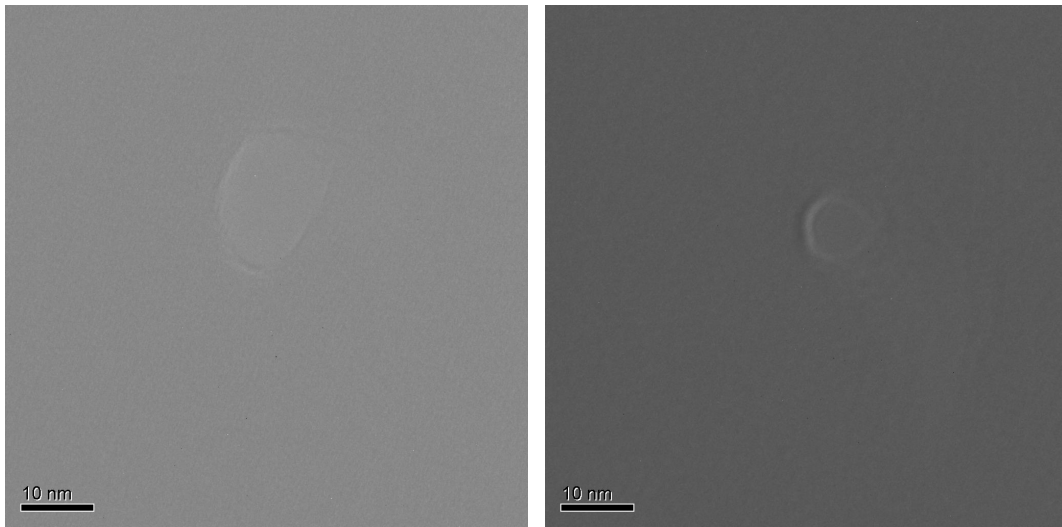


Abbildung 30: TEM Aufnahmen von Nanoporen. Links die Probe 2B mit der Nanopore mit ca. 20 nm Durchmesser und rechts die Probe 2D mit der Nanopore von ca. 8 nm Durchmesser. Die TEM Bilder wurden vom Matthias Heise am Philips Tecnai TEM aufgenommen.

sich nach der Gleichung 10 ein Durchmesser der Nanopore von etwa 6,7 nm. Der Durchmesser der Nanopore von der Probe 6rot ist unbekannt, da keine TEM-Aufnahmen von der Nanopore existieren und die Messungen des Leitwerts hohe ionische Ströme liefern, die auf die durchgebrochene Membranen zurück zu führen sind.

### 3.2 Verschiedene Pufferlösungen

Zu Beginn wurde der elektrische Leitwert von verschiedenen Pufferlösungen gemessen. In der Abbildung 31 ist der ionische Strom in  $\mu\text{A}$  gegen die angelegte Spannung in V von Kaliumchlorid, Phosphatpuffer und Trishydroxymethyl-aminomethanpuffer zu sehen. Die Messungen wurden mit der Messzelle 1 bei Raumtemperatur durch ein 1-mm-Loch (Loch des Probenhalters von der Messzelle 1) mit AgCl-Elektroden und bei gleichen Konzentrationen der Puffer durchgeführt.

Wie aus den Kennlinien der Abbildung 31 zu erkennen ist, ist der Leit-

### 3.2 Verschiedene Pufferlösungen

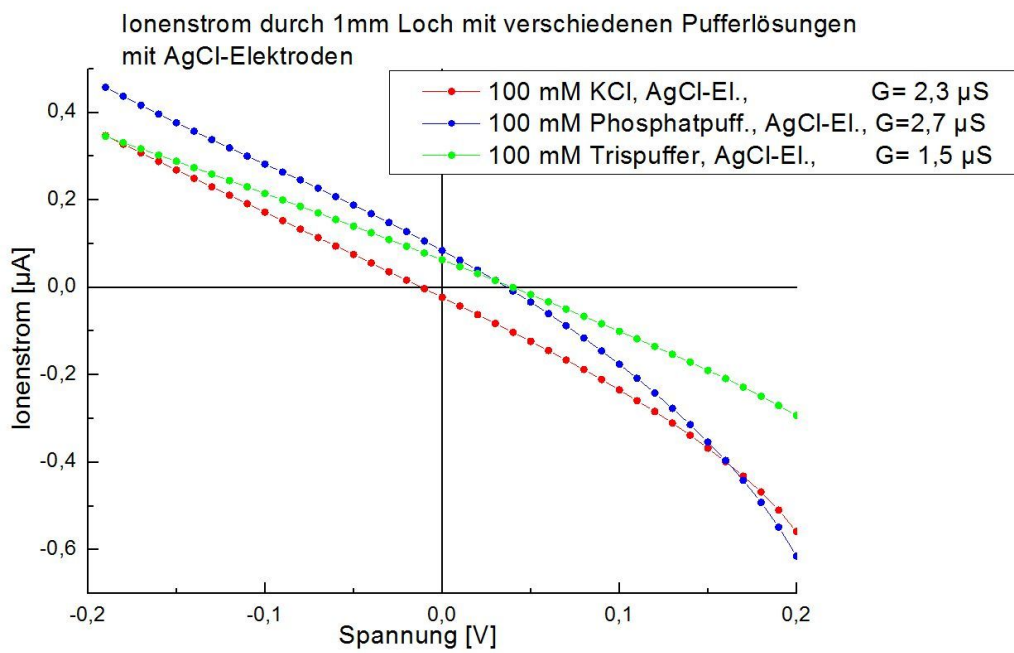


Abbildung 31: I-V-Kennlinien von KCl, Phosphat- und Trispuffer. Der ionische Strom wurde durch ein 1-mm-Loch bei einer Konzentration von 100 mM/l gemessen. Dabei wurden stets die AgCl-Elektroden verwendet.

wert der verwendeten Lösungen in etwa gleich groß, wobei der vom Phosphatpuffer etwas höher ist. Aus diesem Grund wurden die Messungen in den ersten Monaten mit dem Phosphatpuffer vollzogen. Später stellte sich heraus, dass die Phosphatpufferlösung zwar sehr gut für kurze DNA-Fragmente (20 bp) geeignet ist, aber für längere DNA-Fragmente mit 50.000 Basenpaaren, wie die  $\lambda$ -DNA, ist dieses Puffer nicht geeignet. Bei der Verwendung von Phosphatpuffer sind die langen DNA-Fragmente gefaltet und können so nur sehr schwer die Nanoporen passieren. Acetatpuffer mit der Beimischung von EDTA ist beispielweise eine gute Lösung für lange DNA-Fragmente. Mit dem Erscheinen des Artikels [47] von B. Krasniqi wurde klar, dass die EDTA die Faltung der dsDNA verhindern kann und deswegen eine Beimischung von EDTA in die Pufferlösung erforderlich ist.

### 3.3 Konzentration des Elektrolyts

In der Abbildung 32 sind I-V-Kennlinien mit verschiedenen Konzentrationen, von 10 mM/l bis 3 M/l von Kaliumchlorid dargestellt. Die Messungen wurden mit AgCl-Elektroden von +0,2 V bis -0,2 V mit der Messzelle 1 bei Raumtemperatur aufgenommen. Dabei wurden die Messungen immer bei +0,2 V gestartet. Der ionische Strom wurde zwischen dem Messreservoir 1 und Messreservoir 2 durch die 1 mm-Öffnung des Probenadapters von der Messzelle 1 aufgenommen.

Die Trägheit des Systems, sprich die sprunghafte Erhöhung des ionischen Stromes bei einer angelegten Spannung und danach ein langsames Abklingen auf die lineare Proportionalität des Stromes in Abhängigkeit von der angelegten Spannung, erkennt man sehr gut an den Leitwertmessungen bei verschiedenen Konzentration des Elektrolyts. Bei den I-V-Kennlinien (Abbildung 32) von KCl durch ein 1-mm-Loch mit AgCl-Elektroden erkennt man an den 3 Mol- (schwarze Quadrate) und 1 Mol-Kennlinien (blaue Dreiecke) die Trägheit des Systems. Die Kalium- und Chloridionen bewegen sich relativ schnell zu den Elektroden, wenn die Spannung von 0 V auf +0,2 V erhöht wird. Erst nach einiger Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den fließen-

### 3.3 Konzentration des Elektrolyts

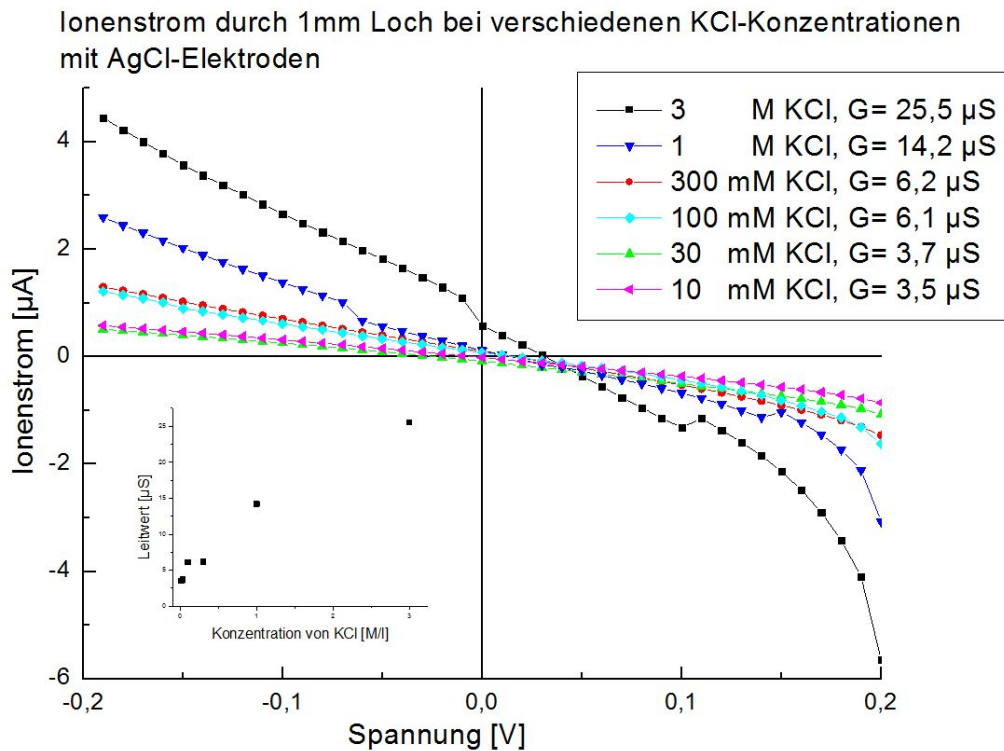


Abbildung 32: I-V-Kennlinien vom KCl-Elektrolyt. Der ionische Strom wurde durch ein 1-mm-Loch bei den verschiedenen Konzentration von KCl gemessen. Dabei wurden stets die AgCl-Elektroden verwendet. Eingefügt ist der Graph des Leitwertes aufgetragen gegen die Konzentration von KCl in M/l.

den Ionen zu den Elektroden und den Gegenionen ein und der ionische Strom steigt linear mit der Spannung ein. Ein Versatz des ionischen Stroms ist bei der 3 M-Kennlinie zwischen 0,1 - 0 V und bei der 1 M-Kennlinie zwischen 0,15 bis - 0,05 V ebenfalls sichtbar. Eine mögliche Ursache hierfür könnte ein Luftbläschen, das sich an der Oberfläche des Lochs kurz festgehalten hat, sein. Rein theoretisch könnte es sich auch um einen Schmutzpartikel bzw. ein größeres Bakterium handeln, da bei diesen Messungen noch keine Filter für die Elektrolyt- und Pufferlösungen verwendet wurden. Die Luftbläschen, die bereits bei so großen Öffnungen eine wichtige Rolle spielen, gewinnen noch weiter an Aufmerksamkeit wenn die Öffnung, durch die die Flüssigkeit

passieren soll, kleiner wird.

Unter anderem dienten die Konzentrationsvariationen auch dazu, die Messzellen auf die Abwesenheit von Leckstellen zu testen, indem die zu erwartende Leitwerte verglichen wurden. Bei Auftretenden Leckströmen wurden die Dichtungen ausgetauscht bzw. die Schrauben, die die beiden Hälften der Messzelle zusammen halten, fester angezogen.

### 3.4 Elektroden

Die I-V-Kennlinien der Abbildung 33 wurden durch die 1 mm-Öffnung des Probenadapters von der Messzelle 1 in 100 mM/l KCl Elektrolyt aufgenommen. Die Messungen wurden stets bei +0,2 V gestartet und liefen bis -0,2 V. Diese Messungen erfolgten bei Raumtemperatur mit der Messzelle 1.

Ursprünglich war die Verwendung von Goldelektroden für die Messungen vorgesehen. Doch bald darauf wurden auch andere Elektroden in Betracht gezogen. Ein Vergleich der Messsignale bei verschiedenen Elektroden ist in Abbildung 33 zu sehen. Das Messsignal ist bei Au-Elektroden am schwächsten und bei den AgCl-Elektroden am stärksten. Allein wegen der Leitfähigkeit ist die Verwendung von AgCl-Elektroden sinnvoll. Hinzu kommt die Eigenschaft, dass die DNA-Fragmente sich schnell an den Goldoberflächen anhaften und bei den AgCl-Oberflächen tun sie es nicht, wie von der Arbeitsgruppe von Prof. Radenovic aus Lausanne mitgeteilt wurde. Nach diesen Erkenntnissen wurden alle Messungen nur noch mit den AgCl-Elektroden durchgeführt. Die Elektroden wurden unter den gleichen Bedingungen aufgeladen und nach einem Einsatz von mehr als 3 Wochen immer neu aufgeladen, da eine Abnahme des Signals mit den älteren Elektroden beobachtet wurde.

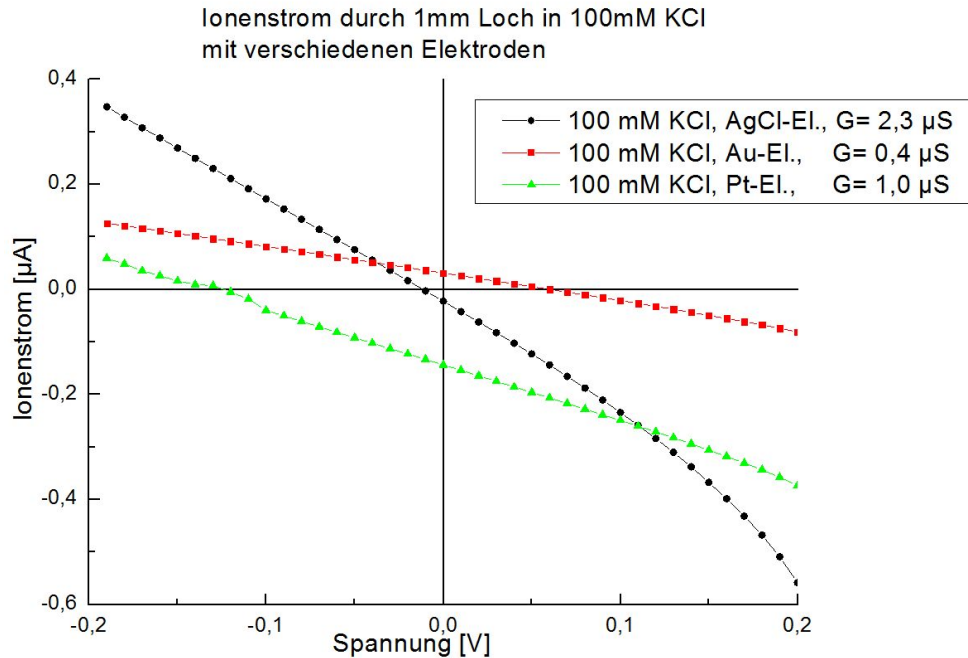


Abbildung 33: I-V-Kennlinien vom 100 mM/l KCl-Elektrolyt unter Verwendung von AgCl-, Gold- und Platinelektroden.

### 3.5 Leitwert der Nanoporen

Die I-V-Kennlinien der Abbildung 34 wurden mit der Messzelle 1 bei Raumtemperatur aufgenommen. Es wurden AgCl-Elektroden verwendet. Der ionische Strom wurde durch die Nanopore der Probe 2B, mit einem Durchmesser von etwa 25 nm, aufgenommen. Die blau Kennlinie wurde in einer 1 M/l Kaliumchloridlösung von +0,2 V bis -0,2 V aufgezeichnet. Die Messung mit der roten Kennlinie verlief von +0,1 V bis -0,1 V in einer 10 mM/l Phosphatlösung.

Der Leitwert durch die Nanopore wird hauptsächlich durch die verwendete KCl-Konzentration bestimmt und die Pufferlösung (Acetat- bzw. Phosphatpuffer), die eine viel kleinere Konzentration hat, hat einen vernachlässigbaren Beitrag dazu, wie in der Abbildung 34 zu sehen ist. Bei der KCl-Kennlinie ist bei +0,2 V der schnellere Anstieg des Stroms zu be-



### 3.5 Leitwert der Nanoporen

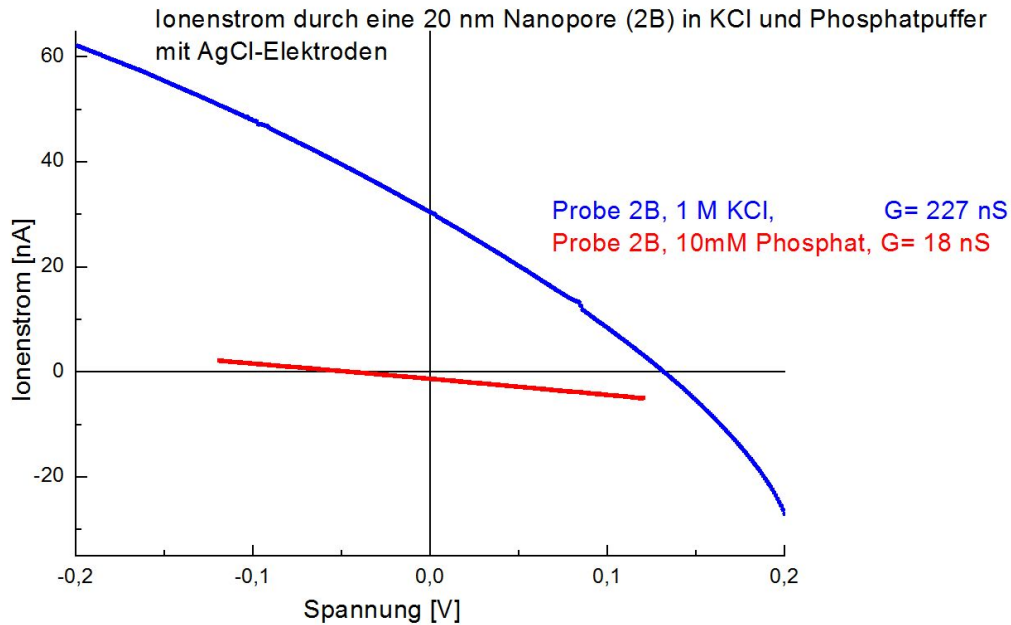


Abbildung 34: I-V-Kennlinien durch eine Nanopore mit 20 nm Durchmesser. Der ionische Strom wurde mit AgCl-Elektroden von -0,12 bis 0,12 V für die 10 mM/l Phosphatlösung und von 0,2 bis -0,2 V für die KCl-Lösung aufgenommen.

obachten und auch zwei Artefakte bei ca. 0,08 V und bei -0,1 V, die auf die Luftbläschen zurück zu führen sein könnten. Beim Vergleich der Leitwerte,  $G = 18 \text{ nS}$  für 10 mM/l Phosphat und  $G = 227 \text{ nS}$  für 1 M/l KCl, ist erkennbar, dass der ionische Strom einer Mischung aus 1 M/l KCl und 10 mM/l Phosphatpuffer durch die Leitfähigkeit des 1 M/l KCl-Elektrolyts dominiert wird.

Eine weitere wichtige Feststellung ist der hohe ionische Strom durch die Nanopore. Wie in der Abbildung 30 zu sehen ist, beläuft sich die Größe der Nanopore von der Probe 2B auf ca. 20 nm Durchmesser laut der TEM-Aufnahme aus Abbildung 30.

Setzt man die Größe der Nanopore von 20 nm in die Gleichung 10 ein,

so ergibt sich ein Leitwert von 87 nS. Dabei ergibt sich aus der Messung des ionischen Strom der Leitwert von 227 nS. Der experimentell ermittelte Leitwert ist um den Faktor 2,6 höher als der Wert laut der Gleichung 9. Auch bei der Probe 2D, die laut der TEM-Aufnahme eine Nanopore mit etwa 8 nm Durchmesser hat (Abbildung 30 rechts), ist der experimentell ermittelte Leitwert von 110 nS im Vergleich zum theoretischen Leitwert nach der Gleichung 10 von 18 nS um den Faktor von 6,1 größer als aus der Gleichung erwartet.

Eine mögliche Ursache für so hohen ionischen Strom kommt im Unterkapitel Einfluss der Elektrode.

## 3.6 DNA Translokationen

Nachdem anfängliche Probleme mit der Hydrophilität und der Messelektronik behoben wurden, konnten die  $I(t)$ -Messungen mit dem Ziel der Detektion von DNA-Translokationen aufgenommen werden. Die zeitliche Auflösung der  $I(t)$ -Messungen liegt bei 100 kHz. Die verwendeten Elektroden bestehen aus AgCl, mit einem Durchmesser von ca. 0,9 mm.

Anhand der Blockadendauer können die Translokationen von gefalteter und ungefalteter DNA unterschieden werden. Die ungefaltete DNA liegt gestreckt vor und passiert die Nanopore viel schneller als die gefaltete DNA.

### 3.6.1 Translokation gefalteter DNA

Die ersten  $I(t)$ -Messungen ergaben Translokationen mit einer Strom-Blockadendauer von 50 ms und 100 ms (siehe Abbildung 35 und 36). Im Vergleich zu der Translokationszeit des längsten Hind III DNA-Fragments von 0,78 ms bei der Basenpaarlänge von 23.120 und angelegten 0,12 V, ist die experimentell ermittelte Translokationszeit um vielfaches höher als erwartet. Dies führt dazu, dass die dsDNA gefaltet ist [87]. Im gefalteten Zustand liegt die dsDNA als eine Art Knoten vor. Die Blockadendauer des Ionenstromes durch die Nanopore der gefalteten DNA ist sehr viel größer als für die ungefaltete dsDNA, da es sehr viel länger dauert, bis eines der beiden Enden

des langen dsDNA-Moleküls den Weg zum Eingang der Nanopore findet [88] und die Faltung der DNA erst aufgelöst werden muss bevor die DNA die Nanopore passieren kann.

Aus den  $I(t)$ -Kennlinien der gefalteten DNA (Abbildung 35 bis 39) ist ersichtlich, dass der ionische Strom fluktuiert und das Rauschen bei dieser Messung bei ca. 100 pA liegt. Das Rauschen ist dabei proportional zu der angelegten Spannung an den Elektroden, zum Nanoporendurchmesser und der Konzentration des verwendeten Elektrolyts.

Betrachtet man die zwei größten Stromblockaden der Messung der Abbildung 36 näher, so erkennt man die Blockadendauer von 100 ms beim ersten Translokationsereignis und von 50 ms beim zweiten Ereignis. Der Grund warum bei dieser Messung die dsDNA gefaltet vorlag, ist die Pufferlösung. Bei diesen Messungen wurde die EDTA der Pufferlösung nicht beigemischt.

Auch die Messergebnisse von der Probe 2D ergaben ebenfalls Blockadendauer, die im Bereich um die 0,1 Sekunden liegen, wie in der Abbildung 38 zu sehen ist. Der höhere ionische Strom, als bei der Probe 2B, resultiert wegen der 10-fachen Konzentration des Elektrolyts bei der Messung des Stroms durch die Nanopore der Probe 2D. Die Stromfluktuationen sind bei diesen Messungen geringer, während das Rauschen größer als bei der Messung mit der Probe 2B ist.

Die  $I(t)$ -Messung der Abbildung 35 bis 36 wurden mit der Messzelle 2 bei Raumtemperatur aufgenommen. Dabei wurden AgCl-Elektroden in der Pufferlösung aus 100 mM/l KCl, 1 mM/l PBS-Puffer und 0,1 mM/l EDTA verwendet. Der ionische Strom wurde bei +0,12 V angelegter Spannung durch die Nanopore der Probe 2B, die laut Abbildung 30 einen Durchmesser von 20 nm hat, aufgenommen. Der pH-Wert der Mischung lag bei 7,7. Die hinzu gegebene Menge der Hind III DNA beträgt 15 nM/l. Der gemessene Leitwert der Probe 2B beträgt 227 nS. Bei der Leitwertmessung der Probe 2B erkennt man in der Abbildung 36 und 37 ein periodisches Rauschen. Hierbei handelt es sich um das 50-Hz-Rauschen, das bei dieser Messung nicht eliminiert werden konnte.

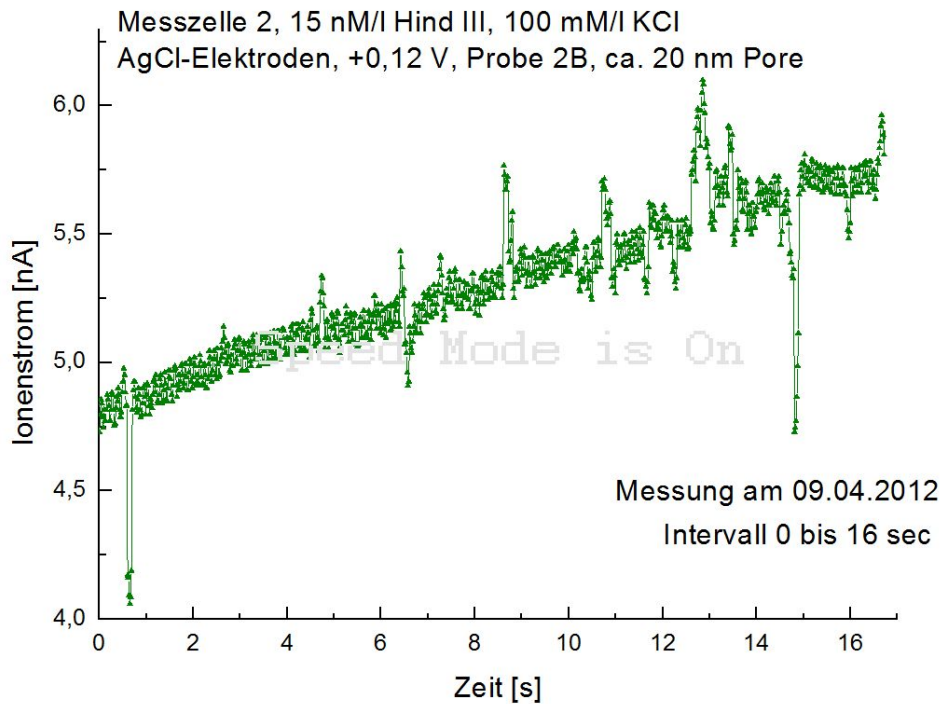


Abbildung 35:  $I(t)$ -Kennlinie, gemessen durch die Nanopore der Probe 2B. Verwendete Elektroden sind AgCl. Die Elektrolytlösung ist 100 mM/l KCl und die Konzentration der Hind III DNA liegt bei 15 nM/l. Der ionische Strom wurde gemessen bei einer angelegten Spannung von 0,12 V.

Die  $I(t)$ -Kennlinien der Abbildung 36 und 37 sind die Ausschnitte aus der  $I(t)$ -Kennlinie der Abbildung 35.

Die  $I(t)$ -Messung der Abbildung 38 wurden mit der Messzelle 1 bei Raumtemperatur aufgenommen. Dabei wurden AgCl-Elektroden in der Pufferlösung aus 1 M/l KCl, 10 mM/l Tris-Puffer und 1 mM/l EDTA verwendet. Der ionische Strom wurde bei +0,12 V angelegter Spannung durch die Nanopore der Probe 2D, die laut Abbildung 30 einen Durchmesser von 8 nm hat, aufgenommen. Der pH-Wert der Mischung lag bei 7,5. Die hinzu gegebene Menge der Hind III DNA beträgt 15 nM/l. Der gemessene Leitwert der Probe 2D beträgt 110 nS. Die  $I(t)$ -Kennlinie der Abbildung 39 ist der Ausschnitt aus der  $I(t)$ -Kennlinie der Abbildung 38.

### 3.6 DNA Translokationen

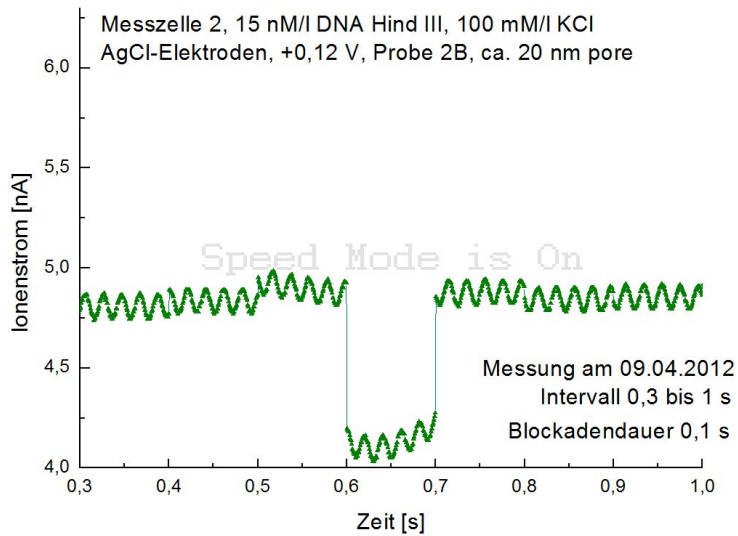


Abbildung 36:  $I(t)$ -Messung durch die Probe 2B mit AgCl-Elektroden in 100 mM/l KCl. Es ist die Vergrößerung der ersten Stromblockade bei der 0,6-ten Sekunde der Abbildung 35.

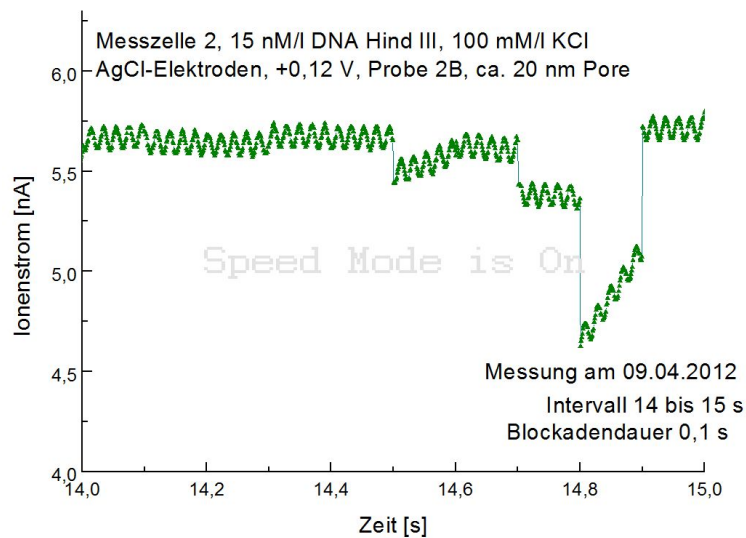


Abbildung 37:  $I(t)$ -Messung durch die Probe 2B mit AgCl-Elektroden in 100 mM/l KCl. Es ist die Vergrößerung der zweiten Stromblockade bei der 16-ten Sekunde der Abbildung 35.

### 3.6 DNA Translokationen

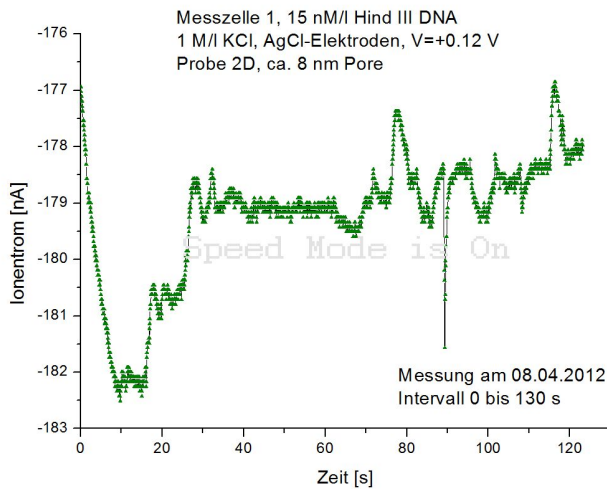


Abbildung 38:  $I(t)$ -Kennlinie durch die Nanopore der Probe 2D. Verwendete Elektroden sind AgCl. Die Elektrolytlösung ist 1 M KCl und die DNA Hind III Konzentration beträgt 15 nM/l. Der ionische Strom wurde bei einer angelegten Spannung von 0,12 V gemessen.

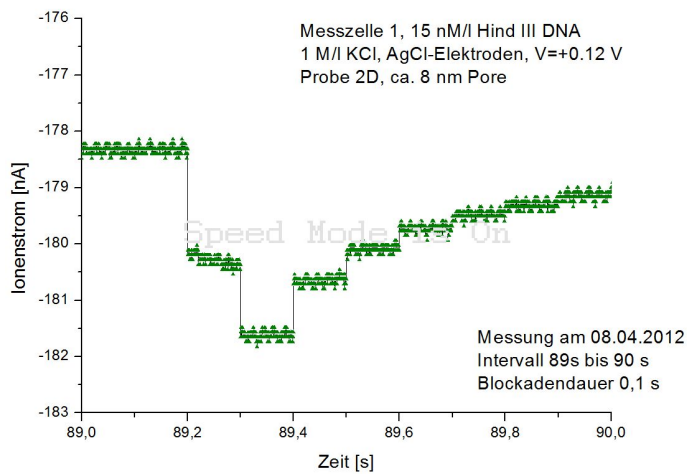


Abbildung 39:  $I(t)$ -Kennlinie durch die Nanopore der Probe 2D. Verwendete Elektroden sind AgCl. Die Elektrolytlösung ist 1 M KCl und die DNA Hind III Konzentration beträgt 15 nM/l. Der ionische Strom wurde gemessen bei der angelegten Spannung von 0,12 V. Messbereich von 89 bis 90 s aus der Abbildung 38.

#### 3.6.2 Translokation ungefalteter DNA

Nach vielen Messungen von Ereignissen mit der gefalteten dsDNA, die alle eine Blockadendauer im Bereich von 50 ms bis 100 ms hatten, wurde beschlossen die  $I(t)$ -Messungen an einem Axopatch 200 B in Lausanne zu wiederholen. Die in Regensburg hergestellten  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Proben mit Nanoporen bedeckt mit 1 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$  wurden zusammen mit der Messzelle 2 in die Schweiz nach Lausanne genommen. Die folgende  $I(t)$ -Messung wurde in Lausanne mit dem Axopatch 200B, mit der Messzelle 2 und mit  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Proben aus Regensburg durchgeführt. Die Messmischung besteht aus 1 M/l KCl + 10 mM/l Acetatepuffer + 1 mM/l EDTA und hat einen pH-Wert von 4,0. Es wurden AgCl-Elektroden und Hind III DNA mit der Konzentration von 15 nM/l benutzt. Die Messung des ionischen Stroms aus der Abbildung 40 erfolgte bei Raumtemperatur durch die Nanopore der Probe 4 mit dem Durchmesser von 8 nm. Der gemessene Leitwert beträgt 13 nS.

Die  $I(t)$ -Messungen aus den Abbildungen 41 bis 43 sind vergrößerte Ausschnitte aus der  $I(t)$ -Messung der Abbildung 40.

Aus der  $I(t)$ -Messung der Abbildung 40, die in Lausanne gemacht wurde, erkennt man ein Rauschsignal von ca. 100 pA und ebenfalls starke Fluktuationen des Ionenstroms, der von 1,5 nA sprunghaft auf 3,0 nA ansteigt. Es sind 3 Stromblockaden zu erkennen. Vergrößert man die drei Ereignisse, so erkennt man in den Abbildungen 41 bis 43, dass die beiden Stromblockaden vom Ereignis 2 und 3 die Translokationszeit von etwa 50  $\mu\text{s}$  aufweisen. Diese Zeit ist der Translokationszeit von 2.322 bp DNA-Fragment der Lambda Hind III-Marker mit 42  $\mu\text{s}$  am nächsten (siehe Abschnitt „Translokationszeiten der DNA durch eine  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Nanopore“). Die Translokationszeit vom Ereignis 1 mit 110  $\mu\text{s}$  liegt nahe an 94  $\mu\text{s}$  (Kapitel 1.6) entsprechend dem Hind III-DNA Fragment mit 4.361 Basenpaaren. Der Ereignis 1 könnte auch noch ein Doppelereignis sein, bei dem 2 DNA-Fragmente mit der Länge von 2.322 bp nacheinander die Nanopore passieren, das die Doppelmuldenstruktur der Stromblockade erklären würde.

Sehr interessant ist die Amplitude der Stromblockade, die mit 0,3 nA

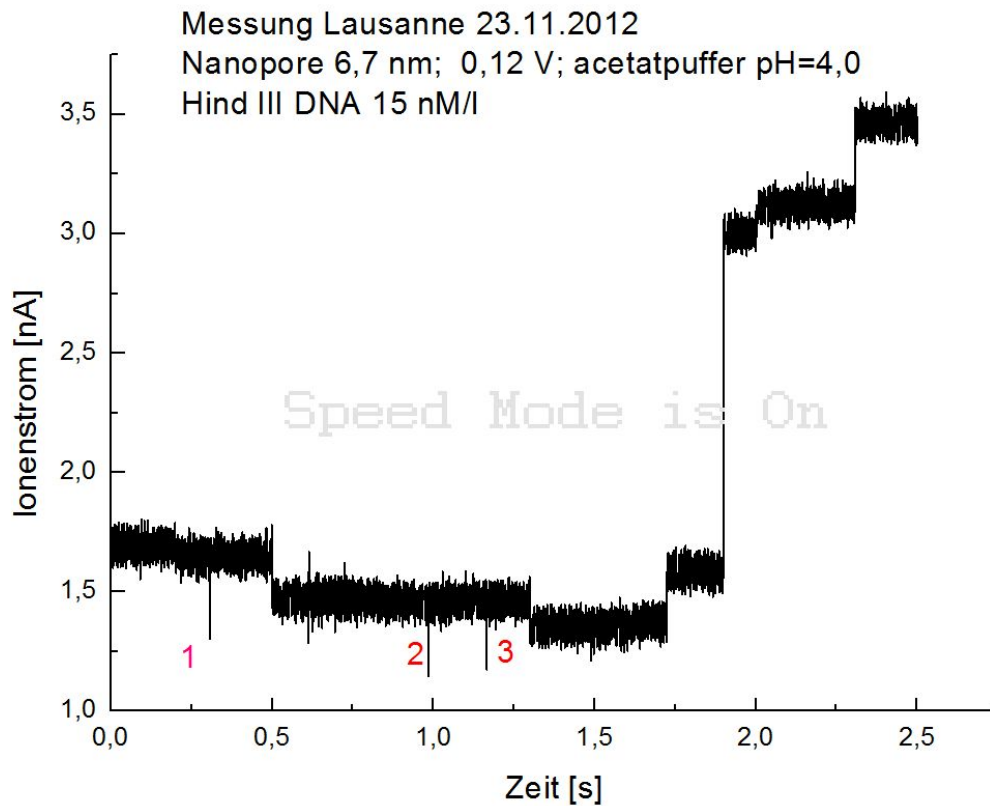


Abbildung 40:  $I(t)$ -Kennlinie durch die Nanopore der Probe 4. Verwendete Elektroden sind AgCl. Die Messlösung ist 1 M/l KCl + 10 mM/l Acetatpuffer + 1 mM/l EDTA und die Konzentration der Hind III DNA liegt bei 15 nM. Der ionische Strom wurde gemessen bei der angelegten Spannung von 0,12 V.

bzw. 0,35 nA fast doppelt so groß ist, wie sie theoretisch für eine Nanopore mit einem Grundsignal von 1,6 nA (Nanopore mit 6,7 nm Durchmesser) mit 0,15 nA zu erwarten wäre (Gleichung 11). Selbst die Berechnung der Stromblockade durch eine 2,5-nm-große Nanopore - Durchmesser der dsDNA beträgt 2,2 nm - wurde laut Berechnung nach Gleichung 11 nur 0,23 nA betragen und wäre somit kleiner als gemessen. Nach der Kombination aus dem höheren Ionenstrom und stärkeren Stromblockade als es die Theorie liefert, ergab sich die Idee mit dem Einfluss der Elektrode.



### 3.6 DNA Translokationen

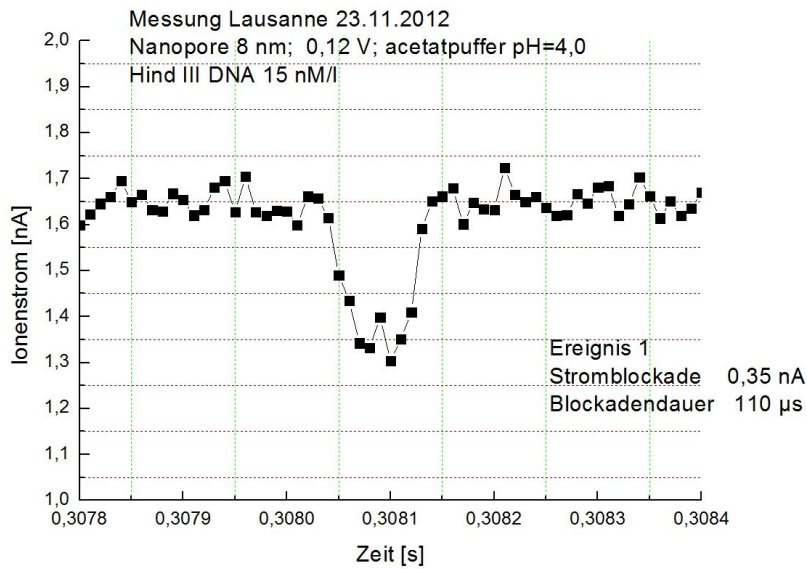


Abbildung 41:  $I(t)$ -Messung vergrößert um den Ereignis 1. Die Stromblockade beim Ereignis 1 beträgt 0,35 nA und die Translokationszeit liegt bei 110  $\mu$ s.

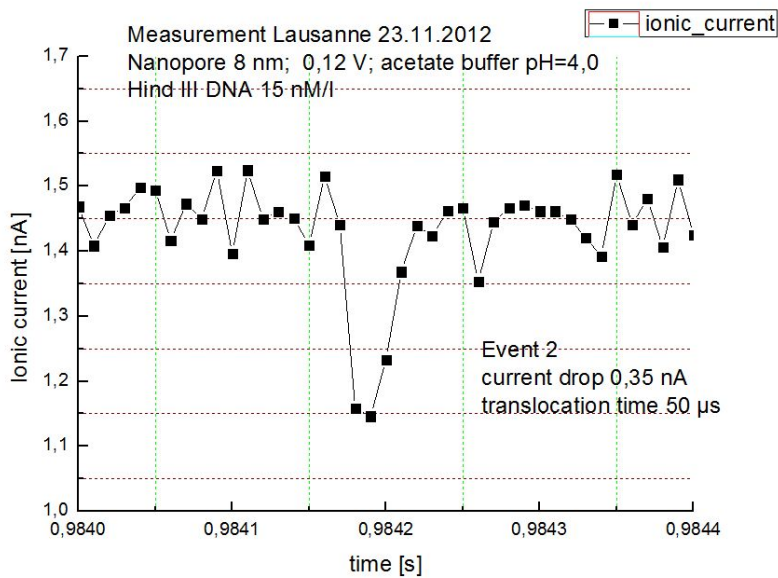


Abbildung 42:  $I(t)$ -Messung vergrößert um den Ereignis 2. Die Stromblockade beim Ereignis 2 beträgt 0,35 nA und die Translokationszeit liegt bei 50  $\mu$ s.

### 3.6 DNA Translokationen

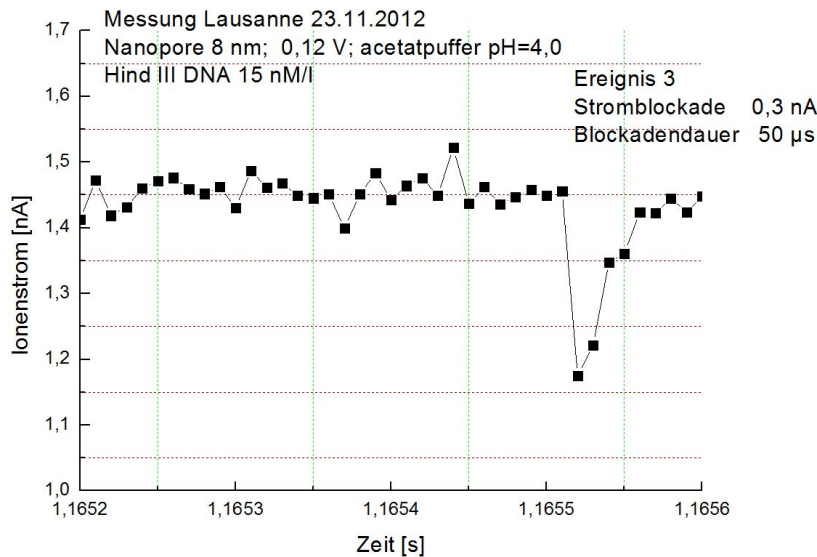


Abbildung 43:  $I(t)$ -Messung vergrößert um den Ereignis 3. Die Stromblockade beim Ereignis 3 beträgt 0,3 nA und die Translokationszeit liegt bei 50  $\mu$ s.

Nach der erfolgreichen Messung von ungefalteten dsDNA-Translokationen in Lausanne kann die Messanordnung mit dem digitalen Multimeter *Agilent 34401 A* und die dafür programmierte Software als möglicher Grund für die Messung von Translokationen mit der Blockadendauer länger als 0,05 s nicht ausgeschlossen werden. Das Rauschen mit beiden Messgeräten bei +0,12 V und 1 M/l KCl liegt jeweils bei 100 pA. Die Integrationszeit von *Agilent* beträgt 1,4  $\mu$ s und die von *Axopatch* ist leider unbekannt. Dabei kommen die Integrationszeit der Messpunkte und das verursachte Rauschen durch die Messgeräte als Ursache nicht in Frage. Im Gegensatz zu dem *Axopatch* wurden für die Messungen mit dem *Agilent* keine Besselfilter verwendet. Wobei die Besselfilter die Signale ab einer bestimmten Frequenz dämpfen und eine konstante Gruppenlaufzeit und ein lineares Phasenverhalten im Durchlassbereich bieten. Die 4-Pol-Besselfilter vom *Axopatch* verstärken das Signal zu Rauschen Verhältnis in dem Messbereich. Bei 100 pA Rauschen und einer Amplitude der Stromblockade von 300 pA können auch die Besselfilter als

Ursache ausgeschlossen werden. Somit bleibt die Frage bestehen, warum die Translokationen der ungefalteten dsDNA mit dem *Axopatch* beobachtet werden konnten und mit dem *Agilent* diese Translokationen nicht nachweisbar waren, trotz der gleichen Messbedingungen.

### 3.7 Einfluß der Elektrode

Die I-V-Messung aus der Abbildung 44 wurde mit der Messzelle 2 bei Raumtemperatur vollzogen. Dabei wurden AgCl-Elektroden und ein 1 M/l KCl-Elektrolyt verwendet. Der ionische Strom wurde durch Probe „6 rot“ von + 1,0 V bis -1,0 V aufgenommen. Rote Kennlinie entspricht der Messung mit der frisch aufgeladener AgCl-Elektrode und die blau Kennlinie der Elektrode, die 3 Wochen nach dem Aufladeprozess verwendet wurde. Beide Elektroden wurden bei 1 V angelegter Spannung eine Stunde lang in einer 1 M/l KCl-Lösung mit Platin (Pt) als Gegenelektrode aufgeladen.

Als eine mögliche Ursache für den höheren Ionenstrom durch die Nanopore und stärkere Stromblockade durch die dsDNA als aus der Theorie hervorgeht, kommt der Einfluss der Elektrode in Frage. Die Theorie für den Leitwert durch die Nanopore besagt zwar laut Hille [68], dass der Eintrittswiderstand unabhängig von den makroskopischen Größen wie dem Elektrodendurchmesser ist und auch in den Publikationen mit dem Leitwert werden die Dimensionen der Elektroden nicht erwähnt. Unsere Messungen zeigen aber, dass die verwendeten Elektroden einen Einfluss auf den Leitwert haben (siehe die I-V-Messung aus der Abbildung 44).

Aus dieser I-V-Messung geht hervor, dass der Zustand der Elektrode eine Rolle für die Stärke des Stromsignals spielt. Mit einer frisch aufgeladenen AgCl-Elektrode misst man ein 4 Mal so hohes Stromsignal, wie mit der gleichen Elektrode, die 3 Wochen nach der Aufladung verwendet wurde, trotz der Lagerung der Elektroden in 10 mM/l KCl-Lösung und Abdeckung mit Aluminiumfolie, um die Entladung zu verhindern.

Der Beitrag aus den verwendeten Elektroden zum Leitwert durch die Nanopore ist bei anderen Arbeitsgruppen anders, weil sie schwächere Elek-

### 3.7 Einfluß der Elektrode

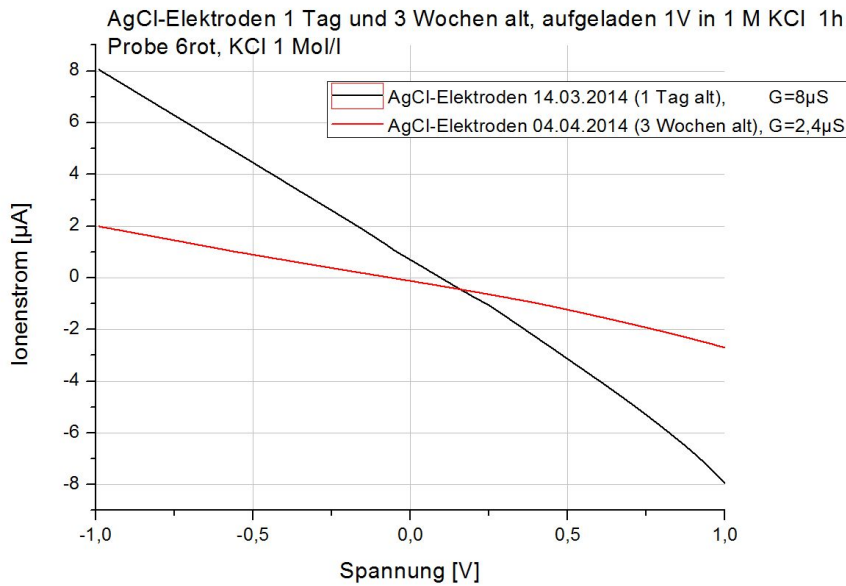


Abbildung 44: I-V-Kennlinie mit der Probe 6 rot mit AgCl-Elektroden in 1 M/l KCl-Lösung. Schwarze Messkurve entspricht der Messung mit der AgCl-Elektrode, die vor einem Tag aufgeladen wurde und die rote Messkurve beschreibt die gleiche Messung mit der AgCl-Elektrode, die drei Wochen nach der Aufladung verwendet wurde.

troden verwendet haben. Der Durchmesser der AgCl-Elektroden der Arbeitsgruppe aus Lausanne liegt bei 0,1 mm. Die Elektroden in Lausanne werden kurz vor der Messung in einer 1 M/l KCl-Lösung 1 bis 2 Minuten aufgeladen. Wir verwendeten AgCl-Elektroden mit 1 mm Durchmesser und haben die Elektroden 1 Stunde lang aufgeladen. Das könnte der Grund für den 3 bis 6 Mal höheren Leitwert bei unserem Messsystem sein.

Definiert man  $R_{\text{total}}$  für die Messung des ionischen Stromes durch eine Nanopore als die Summe aus den Beiträgen von  $R_{\text{ch}}$ , dem Beitrag vom Nanoporenkanal, von  $R_{\text{E}}$ , dem Eintrittswiderstand und  $R_{\text{Elektrode}}$ , dem Beitrag von der Elektrode, zu definieren. Da der Widerstand, der von der Elektrode verursacht wird, als Serienwiderstand zu den Widerständen von der Nanopore und dem Eintritt, steht.

### 3.7 Einfluß der Elektrode

---

$$R_{\text{total}} = R_{\text{ch}} + R_{\text{E}} + R_{\text{Elektrode}} \quad (13)$$

$R_{\text{Elektrode}}$  ist dabei vom Aufladeprozess der Elektrode abhängig. Je länger die Aufladung des Silberstabes in der KCl-Lösung erfolgt, um so dicker ist die AgCl-Schicht auf dem Silberstab.

Für den Gesamtleitwert ergäbe sich demnach

$$G_{\text{total}} = \frac{1}{R_{\text{ch}} + R_{\text{E}} + R_{\text{Elektrode}}} = \frac{1}{\frac{1}{\sigma} \left[ \frac{4l_{\text{eff}}}{\pi d^2} + \frac{1}{d} \right] + R_{\text{Elektrode}}} \quad (14)$$

Für diesen Fall bekäme man folgende Werte für die Proben 2B und 2D:

Probe	$R_{\text{total}}$	$R_{\text{Godin}}$	$R_{\text{ch}}$	$R_{\text{E}}$
2B	4,4 [MΩ]	11,5 [MΩ]	7,1 [MΩ]	4,4 [MΩ]
2D	9,1 [MΩ]	55,1 [MΩ]	44,0 [MΩ]	11,1 [MΩ]

Probe	$d$	$l_{\text{eff}}$	$G_{\text{total}}$	$G_{\text{Godin}}$
2B	20 nm	25 nm	227 nS	87 nS
2D	8 nm	25 nm	110 nS	18 nS

mit  $G_{\text{total}}$  als der gemessene Leitwert und  $G_{\text{Godin}}$  als der Leitwert nach der Gleichung 9.

Da die einzelnen Beiträge zum Gesamtwiderstand  $R_{\text{total}}$  zum Teil größer als der gemessene Gesamtwiderstand sind, sind unsere Leitwerte nicht mit der Gleichung 9 für den Leitwert nach Godin mit einem zusätzlichen Beitrag von der Elektrode konform.

Bei einer großen Rauigkeit der Membranoberfläche mit 2 nm bezogen auf die 50 nm Dicke der Membran, läge der Fehler durch die effektive Länge der Membran bei 4%. Der Durchmesser der Nanopore, den man aus einem TEM-Bild entnimmt, sollte die Maximalangabe für den Durchmesser sein, da es davon abhängt in welcher Höhe der Nanopore der Fokus des TEMs während

der Bildaufnahme ist. Sollte der tatsächliche Durchmesser der Nanopore kleiner sein bzw. die engere Stelle der Nanopore vom Fokus des TEMs weiter entfernt, so sollte man dennoch bei der Messung des Leitwertes durch die Nanopore einen Leitwert messen, der nicht höher liegt als der TEM-Aufnahme entsprechend. Es ist ebenfalls nicht bekannt, was mit den Innenwänden der Nanopore nach dem Bohren mit dem Elektronenstrahl und nach dem Eintauchen in eine Elektrolytlösung passiert. Es ist anzunehmen, dass Fremdatome aus der Luft oder Ione des Elektrolyts sich an die Wände der Nanopore binden. Beide Prozesse würden den tatsächlichen Durchmesser der Nanopore bei der Messung kleiner machen und somit zu einem kleineren Leitwert führen. Ein Leitwert, das bis zu 5 Mal höher bei der Messung vorliegt, als durch die Leitwertgleichung erwartet, kann auf diese Weise nicht erklärt werden.

Unter Beachtung des Modells von Elektrodenwiderstand und der Fehlerbetrachtung der Gleichung von Godin stehen unsere Messergebnisse nicht im Einklang zu der Leitwertgleichung 9 nach Godin.

### 3.8 Erhöhung der Lebensdauer von $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen

Im Laufe der vielen durchgeführten Messungen ergab sich, dass die Verwendung von zwei Membranen auf einer Probe einen Nachteil darstellt. Neben den geometrischen Schwierigkeiten die Öffnung der PDMS-Dichtung mit 1 mm Durchmesser für eine 2 x 2 mm Probe möglichst zentral zu platzieren, damit die beiden Membranen, deren Mittelpunkte 700  $\mu\text{m}$  von einander entfernt sind, in der Öffnung der Dichtung liegen und nicht von ihr bedeckt sind (Bild 45), zeigten sich zusätzliche mechanische Probleme. Die Proben mit den Nanoporen im Ethanolwasser (Wasser zu Ethanol 1:1) zu lagern, war keine effektive Modifikation. Praktisch bei allen Proben, die im Ethanolwasser aufbewahrt wurden, brachen die Membranen, auch wenn die Probe mit den  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen nur für wenige Stunden in die Flüssigkeit gelegt wurde. Aus diesem Grund wurde die Methode vom Dekker zur Aufbewahrung der Proben und zur Aufrechterhaltung der Hydrophililität der Proben durch das Lagern im Ethanolwasser für unsere Proben aufgegeben und die

### 3.8 Erhöhung der Lebensdauer von $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen

---

Ablagerung von 1 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$  wieder praktiziert.

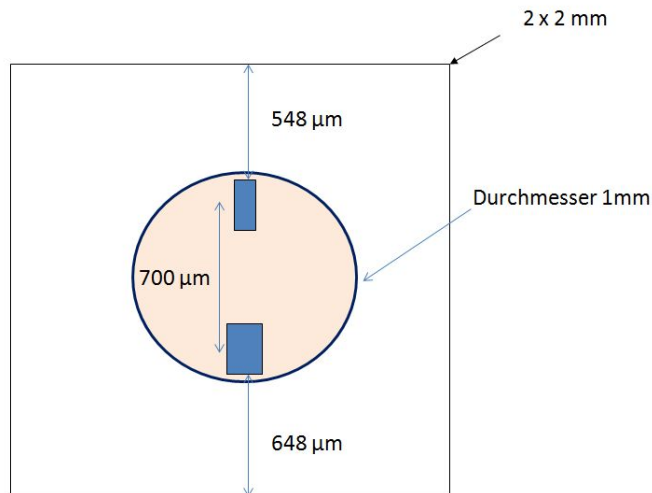


Abbildung 45: Die Geometrie der PDMS-Dichtung mit einem 1-mm-Loch in der Mitte in der Relation zu einer 2 x 2 mm Probe mit zwei Membranen.

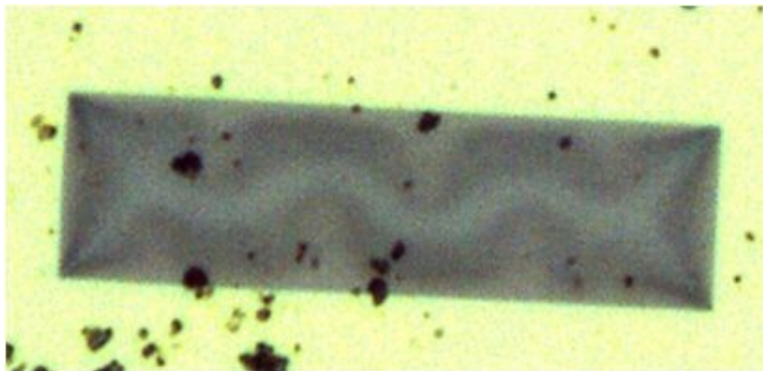


Abbildung 46: Eine intakte  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran. Solange die Membran unverletzt ist, ist eine typische Wölbung der Oberfläche zu erkennen.

Nachdem sehr viele Membranen durchgebrochen waren und nur wenige Membranen die Lagerungen überstanden haben, ergab sich eine interessante

### 3.8 Erhöhung der Lebensdauer von $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen

---

Feststellung. In allen Fällen bei denen nur 1 Membran die Lagerung ohne Risse bzw. Durchbrüche überstand, war es die Membran mit der Nanopore. Pro Probe mit 2 Membranen wurde jeweils nur eine Membran mit einer Nanopore versehen, und nur die Membran, die einen Loch hatte, auch wenn sehr klein, wies höhere Stabilität gegen die Strapazen bzw. Druckschwankungen auf.

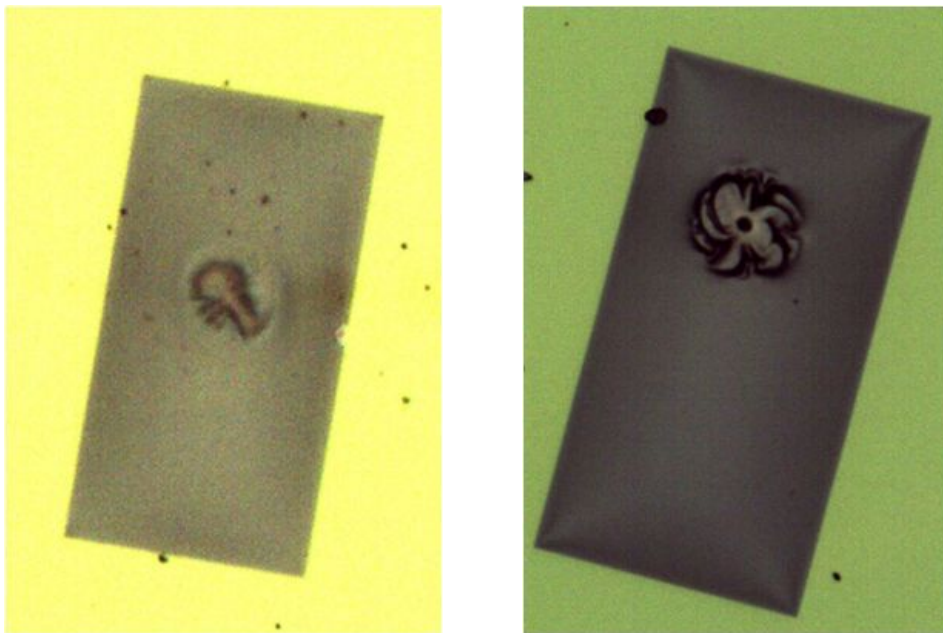


Abbildung 47:  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen. Rechts ist eine Membran nach einem Versuch eine Nanopore mit dem FIB zu bohren. Obwohl keine Nanopore zu erkennen ist, wurde durch den Abtrag des Materials auf der Oberfläche der Membran die Oberflächenspannung der Membran verändert und die Oberflächenwölbung ist nicht mehr zu sehen. Links ist eine Membran nach einem Bohrversuch ohne einer Nanopore. Rechts ist eine Membran mit einer Nanopore. Durch das Bohren einer Nanopore durch die Membran wurde die Oberfläche entspannt. Die typische Wölbung der Oberfläche ist nicht mehr zu sehen.

Im Laufe der Arbeit ergab sich die Wölbung der Membranoberfläche als ein sehr gutes Indiz dafür, dass die Membran noch intakt bzw. nicht durch-



### 3.8 Erhöhung der Lebensdauer von $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen

---

gebrochen ist. Auch Membranen mit kleinen Faserrissen, die zunächst nicht zu sehen waren, wiesen keine typische Oberflächenwölbung wie im Bild 45 rechts zu sehen ist, auf. Eine Verletzung der Membran durch das Bohren, einen Riss oder ein Loch führte dazu, dass die Wölbung der Membranoberfläche verschwand (Abbildung 47). Da bei unseren Proben nur eine der beiden Membranen mit einer Nanopore versehen wurde, ergab sich ein Vergleich zwischen einer Membran mit und ohne Nanopore bzgl. der Stressresistenz, auch wenn ungewollt. Da die Untersuchung der Membran-Lebensdauer bzw. Stressresistenz nicht im Fokus der Arbeit lag und diese Feststellung nach vielen gescheiterten Messungen sich herausstellte, konnte diese These nicht ausreichend überprüft werden. Es ergaben sich starke Indizien, dass die Anwesenheit einer Nanopore in einer  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran, die Robustheit dieser Membran im Vergleich zu einer Membran ohne einer Nanopore erhöht.

## 4 Zusammenfassung

Der Versuch die DNA-Sequenzierung mit Kohlenstoffnanoröhren als Detektoren während der Translokation durch  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membranen zu verwenden, ist innerhalb der gesetzten Frist nicht erfolgreich gewesen. Alle Teilnehmer des EU-Projekts konnten nach Ablauf der Frist keine erfolgreiche DNA-Sequenzierung vorweisen. Unter anderem sind die Gründe warum die Realisierung nicht statt finden konnte, zum einen die Zerstörung der Kohlenstoffnanoröhre auf einem größeren Bereich um die Nanopore herum, auch wenn die Bohrung der Nanopore mit dem TEM von der Rückseite der Probe erfolgt. So dass die Enden der Nanoröhre von der DNA in der Nanopore weiter entfernt sind, und somit die Empfindlichkeit der Kapazitätsmessungen verschlechtert ist. Zum anderen tauchte die Frage auf, ob generell eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Basenpaaren mit den Kapazitätsmessungen möglich sei. Da die Basenpaare nicht starr zu einander sind, und der Abstand zwischen den Basenpaaren variiert, was die Ortsauflösung der einzelner Basenpaare weiter erschwert.

Auch wenn das gewünschte Ziel nicht erreicht wurde, so wurden einige neue Erkenntnisse auf diesem nicht einfachen Arbeitsbereich erzielt. Das Konzept für die Messkanäle horizontal zu einander und nicht vertikal, wie bisher von den Gruppen verwendet wurde, anzuordnen hat sich als ein Fortschritt erwiesen. Nicht nur das Problem der Luftbläschen, sondern auch die Handhabung der Messzelle wurden damit einfacher. Die Verwendung von 1 mm-Elektroden statt 0,1 mm-Elektroden bietet den Vorteil an, dass das Grundsignal des ionischen Stroms durch die Nanopore im Vergleich zu den herkömmlichen Elektroden unter gleichen Bedingungen höher ist. Was zu einem besseren Verhältnis von Signal zu Rauschen und Stromblockaden zu Signal führt. Für die stärkere Belegung dieses Arguments sind weitere Messungen hierzu nötig.

Aus einem Nachteil hat sich eine positive Bilanz ziehen können. Die Verwendung von zwei Membranen auf einer Probe hat sich als nicht vorteilhaft gezeigt. Doch hierbei ergaben sich Indizien darauf, dass die Bohrung ei-

ner Nano- bzw. Mikropore durch eine  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran die Lebensdauer bzw. die Druckresistenz einer  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Membran erhöht. Um aus diesem Indiz ein Beleg zu machen, müssten mehr Messungen dazu gemacht werden.

## Danksagung

Bei Prof. Strunk möchte ich mich für die Vergabe dieses sehr interessanten und anspruchsvollen Themas bedanken.

Ich möchte mich an dieser Stelle recht herzlich bei allen bedanken, die mir dabei geholfen haben, diese Arbeit zu verfassen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Alexandra Radenovic, Prof. Dr. Sergey Ganichev und Prof. Dr. Dominique Bougeard, die mir in dieser Zeit mit Ratschlägen geholfen haben.

Ein Dankeschön möchte ich an Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht, Dr. Thomas Hirsch, Wolfgang Schmucker, Camille Raillon und Dr. Ke Liu, die mir gute Ratschläge aus dem Bereich Chemie gegeben haben, aussprechen.

Für viele interessante Diskussionen über die Physik bedanke ich mich herzlichst bei meinen Freunden: Dr. Peter Olbrich, Dr. Jörg Köhler, Dr. Christina Zoth, Dr. Paul Sander, Dr. Christina Reitmaier, Dr. Daniel Schmidt, Dr. Christoph Drexler, Tobias Herrmann und Alois Dirnaichner. Ein großes Danke auch für die Korrekturleser.

Auch bei meinen Kollegen im Büro Prof. Dr. Sung-Ho Jhang, Dr. Andreas Hüttel, Ina Schneider, Elisabeth Weber, Dr. Ondrej Vavra und Klaus Kronfeldner möchte ich einen Dank aussprechen, denn sie waren immer offen für Diskussionen und sorgten für eine gute Stimmung in der Arbeitsgruppe. Weiterer Dank geht an Florian Olbrich, der das Messprogramm für die  $I(t)$ -Messungen geschrieben hat, an Ralf Grüner, der die zweite Messzelle entwickelt hat und Matthias Heise, der die TEM Bilder gemacht hat.

An alle anderen, die ich hier nicht erwähnt habe, vielen Dank für die Unterstützung und nette Unterhaltungen.

## Literatur

- [1] F. Antequera und A. Bird: **Number of CpG islands and genes in human and mouse**, *Proc. Natl. Acad.Sci.*, Vol 90, 11995-11999, (1993)
- [2] T. Ideker, T. Galitski und L. Hood: **A New Approach to decoding life**, *Annual Reviews, Genetic*, Vol. 2, 343-372,(2001)
- [3] M. D. Adams, J. M. Kelley, J. D. Gocayne, M. Dubnick, M. H. Polymeropoulos, H. Xiao, C. R. Merrill, A. Wu, B. Olde, R. F. Moreno, A. R. Kerlavage, W. R. McCombie und J. C. Venter: **Complementary DNA Sequencing: Expressed Sequence Tags and Human Genome Project**, *Science*, Vol. 252, 1651-1656, (1991)
- [4] F. S. Collins, A. Patrinos, E. Jordan, A. Chakravarti, R. Gesteland und L. Walters: **New Goals of the U.S. Human Genome Project: 1998-2003**, *Science*, Vol. 282, 682-690, (1998)
- [5] A. M. Maxam und W. Gilbert: **A new method for sequencing DNA**, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 74, No. 2, 560-564, (1976)
- [6] F. Sanger, S. Nicklen und A. R. Coulson: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**, *Proc. Natl. Acad. Sci*, Vol. 74, No. 12, 5463-5467, (1977)
- [7] J. Shendure, G. J. Porreca, N. B. Reppas. X. Lin, J. P. McCutcheon, A. M. Rosenbaum, M. D. Wang, K. zhang. R. D. Mitra und G. M. Church: **Accurate Multiplex Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome**, *Science*, Vol. 309, 1728-1733, (2005)
- [8] T. D. Read, S. L. Salzberg, M. Pop, M. Shumway, L. Umayam, L. Jiang, E. Holtzapple, J. D. Busch, K. L. Smith, J. M. Schupp, D. Solomon, P. Keim und C. M. Fraser: **Comparative Genome Sequencing for Discovery of Novel Polymorphisms in Bacillus anthracis**, *Science*, Vol 296, 2028-2034, (2002)

## LITERATUR

---

- [9] G. V. Soni und A. Meller: **Progress toward Ultrafast DNA Sequencing Using Solid-State Nanopores**, *Clinical Chemistry*, Vol. 53, No. 11, 1996-2001, (2007)
- [10] G. F. Schneider und C. Dekker: **DNA sequencing with nanopores**, *Nature Biotechnology*, Vol 30, No. 4, 326-328, (2012)
- [11] L. Kedes, E. Liu, C. V. Jongeneel und G. Sutton: **Judging the Archon Genomics X PRIZE for whole human genome sequencing**, *Nature Genetics*, Vol. 43, No. 3, 175, (2011)
- [12] <http://www.physics.upenn.edu/~robertjo/gallery/>, *online seit: 08.2004*, *Zeitpunkt des downloads: 12.02.2015*, (2015)
- [13] M. E. Gracheva, A. Aksimentiev und J. P. Leburton: **Electrical signatures of single-stranded DNA with single base mutations in a nanopore capacitor**, *Nanotechnology*, Vol. 17, 3160-3165, (2006)
- [14] K. Keren, R. S. Berman, E. Buchstab. U. Sivan und E. Braun: **DNA-templated Carbon Nanotube field-effect transistor**, *Science*, Vol. 302, 1380-1382, (2003)
- [15] G. Maruccio, P. Visconti, V. Arima, S. D'Amico, A. Biasco, E. D'Amone, R. Cingolani und R. Rinaldi: **Field effect transistor based on a modified DNA base**, *Nano Letters*, Vol. 3, No. 4, 479-483, (2003)
- [16] J.D. Watson und F. H. C. Crick, : **The structure of DNA**, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. 18, 123-131, (1953)
- [17] <http://www.simplyscience.ch/teens-liesnach-archiv/articles/was-ist-dna/dossier/26387/item/0.html>, *online seit: 01.10.2008*, *Zeitpunkt des downloads: 23.01.2015*
- [18] W. Fuller, W. H. F. Wilkins, H. R. Wilson und L. D. Hamilton: **The molecular Configuration of Desoxyribonucleic Acid**, *J. Mol. Biology*, Vol. 12, 60-80, (1965)

## LITERATUR

---

- [19] A. Bacolla und R. D. Wells: **Non-B DNA Conformations, Genomic Rearrangements, and Human Disease**, *JBC*, Vol. 279, No. 46, 47411-47414, (2004)
- [20] C. Bustamante, Z. Bryant und S. B. Smith: **Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics**, *Nature*, Vol. 421, 423-427, (2003)
- [21] R. D. Wells: **Non-B DNA conformations, mutagenesis and disease**, *Trends in Biochemical Science*, Vol. 32, No. 6, 271-278, (2007)
- [22] [http://de.wikipedia.org/wiki/Desoxyribonukleinsäuremediaviewer/File:Chemische\\_struktur\\_derDNA.svg](http://de.wikipedia.org/wiki/Desoxyribonukleinsäuremediaviewer/File:Chemische_struktur_derDNA.svg),  
*online seit: 15.01.2001, Zeitpunkt des downloads: 23.01.2015*,
- [23] S. O. Kelley und J. K. Barton: **Electron Transfer between Bases in Double Helical DNA**, *Science*, Vol 283, No. 54, 375-381, (1999)
- [24] D. Fologea, E. Brandin, J. Uplinger, D. Branton und J. Li: **DNA conformation and base number simultaneously determined in a nanopore**, *Electrophoresis*, Vol. 28, 3186-3192, (2007)
- [25] J. M. Berg, J. L. Tymoczko und L. Stryer: **Biochemie**, *Spektrum Akademischer Verlag*, 5. Auflage, (2003)
- [26] [http://de.wikipedia.org/wiki/Desoxyribonukleinsäuremediaviewer/File:DNA\\_Furchen.png](http://de.wikipedia.org/wiki/Desoxyribonukleinsäuremediaviewer/File:DNA_Furchen.png),  
*online seit: 15.01.2001, Zeitpunkt des downloads: 23.01.2015*,
- [27] U. F. Keyser, B. N. Koeleman, S. van Dorp, D. Krapf, R. M. M. Smeets, S. G. Lemay, N. H. Dekker und C. Dekker: **Direct force measurements on DNA in a solid-state nanopore**, *Nature physics*, Vol. 2, 473-477, (2006)
- [28] H. Pulyaeva, D. Wheeler, M. M. Garner und A. Chrambach: **Molecular sieving of lambda phage DNA in polyacrylamide solutions as a function of the molecular weight of the polymer**, *Electrophoresis*, Vol. 13, 608-614, (1992)

## LITERATUR

---

- [29] D. Hanahan: **Studies on Transformation of Escherichia coli with Plasmids**, *J. Mol. Biol.*, Vol. 166, 557-580, (1982)
- [30] R. Simon, U. Priefer und A. Puehler: **A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria**, *Nature Biotechnology*, Vol. 1, 784-791, (1983)
- [31] R. M. Pashley: **Hydration Forces between Mica Surfaces in aqueous Electrolyte solutions**, *Journal of Colloid and Interface Science*, Vo. 80, No. 1, 153-162, (1980)
- [32] H. Kleine: **Dissertation "Ladungstransport durch DNA"**, (2004)
- [33] M. Sundaralingam und B. Pan: **Hydrogen and hydration of DNA and RNA oligonucleotides**, *Biophys. Chemistry*, Vol. 95, 273-282, (2002).
- [34] B. Schneider, K. Patel und H. M. Berman: **Hydration of the phosphate group in double-helical DNA**, *Biophysical Journal*, Vol. 75, 2422-2434, (1998).
- [35] W. Saenger: **Principles of Nucleic Acid Structure**, *Biochemical Education*, Vol. 13, 92,(1984)
- [36] T. V. Chalikian, J. Voelker, A. R. Srinivasan, W. K. Olson und K. J. Breslauer: **The hydration of nucleic acid duplexes as assessed by a combination of volumetric and structural techniques**, *Biopolymers*, Vol. 50, No. 5, 459-471,(1994)
- [37] C. L. Asbury und G. van den Engh: **Trapping of DNA in nonuniform oscillating electric fields**, *Biophysical Journal*, Vol. 74, No. 2, 1024-1030,(1998)



## LITERATUR

---

- [38] D. Fologea, M. Gershow, B. Ledden, D. S. McNabb und J. A. Golovchenko, J. Li: **Detecting Single Stranded DNA with a Solid State Nanopore**, *Nano Letters*, Vol. 8, (2005)
- [39] C. Schildkraut und S. Lifson: **Dependence of the melting Temperature of DNA on Salt Concentration**, *Biopolymers*, Vol. 3, 195-208, (1965)
- [40] R. J. Fiel. J. C. Howard, E. H. Mark und N. D. Gupta: **Interaction of DNA with a porphyrin ligand: evidence for intercalation**, *Nucleic Acids Research*, Vol. 6, No. 9, 3093-3118, (1979)
- [41] V. A. Bloomfeld: **Nucleic Acids Structures, Properties and Functions**, *Hardback*, (2000)
- [42] „<http://www.nugi-zentrum.de>“, aktueller Status: offline , Zeitpunkt des downloads: 18.10.2014
- [43] E. P. Geiduschek: **On the Factors Controlling the Reversibility of DNA Denaturation**, *J. Mol. Biology*, Vol. 4, 467-487, (1962)
- [44] M. Feig und B. M. Pettitt: **A molecular simulation picture of DNA hydration around A- and B-DNA**, *Biopolymers*, Vol 48, 199-209,(1998)
- [45] D. Y. Petrovykh, H. Kimura-Suda, L. J. Whitman und M. J. Tarlov: **Quantitative Analysis and Characterization of DNA Immobilized on Gold**, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 125, No. 17, 5219-5226,(2004)
- [46] H. M. Berman: **Crystal studies of B-DNA: The answers and the questions**, *Biopolymers*, Vol. 44, No. 1, 23-44,(1997)
- [47] B. Krasniqi und J. S. Lee: **The importance of adding EDTA for the nanopore analysis of proteins**, *Metallomics*, Vol. 4, 539-544 ,(2012)

## LITERATUR

---

- [48] <http://de.wikipedia.org/wiki/DNA-Sequenzierungmediaviewer/File:Didesoxy-Methode.svg>, *online seit: 15.01.2001, Zeitpunkt des downloads: 23.01.2015*, (2015)
- [49] <http://de.wikipedia.org/wiki/Solvatisierungmediaviewer/File:Na2BH2O.svg>, *online seit: 15.01.2001, Zeitpunkt des downloads: 23.01.2015*
- [50] J. M. Prober, G. L. Trainor R. J. Dam, F. W. Hobbs, C. W. Robertson, R. J. Zagursky, A. J. Cocuzza, M. A. Jensen und K. Baumeister: **A system for Rapid DNA Sequencing with Fluorescent Chain-Terminating Dideoxynucleotides**, *Science*, Vol. 238, 336-341, (1987)
- [51] J. Ju, C. Ruan, C. W. Fuller, A. N. Glazer und R. A. Mathies: **Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis**, *Proc. Natl. Acad. Science*, Vol. 92, 4347-4351, (1995)
- [52] R. M. Schmidt und S. Holland: **Standardization in abnormal hemoglobin detection. An evaluation of hemoglobin electrophoresis kits**, *Clin. Chemistry*, Vol. 20, No. 5, 591-594, (1974)
- [53] S. Panyim und R. Chalkley: **High resolution acrylamide gel electrophoresis of Histones**, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 130, 337-346, (1968)
- [54] M. Yoshida, I. Miyoshi und Y. Hinuma: **Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease**, *Proc. Natl. Acad. Science*, Vol. 79, 2031-2035, (1982)
- [55] K. S. Pitzer: **Thermodynamics of Electrolytes. I. Theoretical Basis and General Equations**, *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 77, No. 2, 268-277, (1973)

## LITERATUR

---

- [56] P. W. Atkins und J. De Paula: **Physikalische Chemie**, 3. Auflage, (2006)
- [57] D. Eisenberg und A. D. McLachlan: **Solvation energy in protein folding and binding**, *Nature*, Vol. 319, No. 16, 199-203, (1986)
- [58] J. Tomasi, B. Mennucci und R. Cammi: **Quantum Mechanical Continuum Solvation Models**, *Chem. Review*, Vol. 205, 2999-3093, (2005)
- [59] A. Douhal, S. K. Kim und A. H. Zewail: **Femtosecond molecular dynamics of tautomerization in model base pairs**, *Nature*, Vol. 378, 260-263, (1995)
- [60] G. Wedler und H. J. Freund: **Lehrbuch der Physikalischen Chemie**, 4. Auflage, (1997)
- [61] M. M. Kohonen, M. E. Karaman und R. M. Pashley: **Debye Length in Multivalent Electrolyte Solutions**, *Langmuir* 2000, Vol. 16, 5749-5753, (2000)
- [62] J. Nakane, M. Akesson und A. Marziali: **Evaluation of nanopores as candidates for electronic analyte detection**, *Electrophoresis*, Vol. 23, 2592-2601, (2002)
- [63] M. Wanunu, W. Morrison, Y. Rabin, A. Y. Grosberg und A. Meller: **Electrostatic Focusing of Unlabeled DNA into Nanoscale Pores using a Salt Gradient**, *Nat. Nanotechnol.*, 160-165, (2010)
- [64] R. M. M. Smeets, U. F. Keyser, D. Krapf, M. Wu, N. H. Dekker und C. Dekker: **Salt Dependence of Ion Transport and DNA Translocation through solid-state nanopores**, *Nanoletters*, Vol. 6, No.1, 89-95, (2005)
- [65] H. S. White und A. Bund: **Ion Current Rectification at Nanopores in Glass Membranes**, *Langmuir*, Vol. 24, 2212-2218, (2007)

- [66] D. Stein, M. Kruithof und C. Dekker: **Surface-Charge-Governed Ion Transport in Nanofluidic Channels**, *Physical Review Letters*, Vol. 93, No.3, 035901, (2004)
- [67] H. Chang, F. Kosari, G. Andreadakis, M. A. Alam, G. Vasmatzis und R. Bashir: **DNA-Mediated Fluctuations in Ionic Current through Silicon Oxide Nanopore Channels**, *NanoLetters*, Vol. 4, No.8, 1551-1556, (2004)
- [68] B. Hille: **Ionic channels in nerve membranes**, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Vol. 21, 1-32,(1970)
- [69] I. Vodyanoy und S. M. Bezrukov: **Sizing of an ion pore by access resistance measurements**, *Biophysical Society*, Vol. 62, 10-11, (1992)
- [70] J. E. Hall: **Access Resistance of a Small Circular Pore**, *The Journal of general Physiology*, Vol. 66, 531-532, (1975)
- [71] S. W. Kowalczyk, A. Y. Grosberg, Y. Rabin und C. Dekker: **Modeling the conductance and DNA blockade of solid-state nanopores**, *Nanotechnology*, Vol. 22, 315101, (2011)
- [72] E. Beamish, H. Kwok, V. Tabard-Cossa und M. Godin: **Precise control of the size and noise of solid-state nanopores using high electric fields**, *Nanotechnology*, Vol. 23, 405301, (2012)
- [73] J. Kestin, H.E. Khalifa und J. Correia: **Tables of the dynamic and kinematic viscosity of aqueous KCl solutions in the temperature range 25 - 150°C and the pressure range 0,1 - 35 MPa**, *J. Phys. Chem.*, Vol. 10, No. 57, (1981)
- [74] C. Dekker: **Solid-state nanopores**, *Nature Nanotechnology*, Vol. 2, 209-215, (2007)

- [75] A. J. Storm, J. H. Chen, H. W. Zandbergen und C. Dekker: **Translocation of double-strand DNA through a silicon oxide nanopore**, *Physical Review*, Vol. 71, 051903, (2005)
- [76] V. Tabard-Cossa, D. Trivedi, M. Wiggin, N. N. Jetha und A. Marziali: **Noise analysis and reduction in solid-state nanopores**, *Nanotechnology*, Vol. 18, 1-6, (2007)
- [77] D. Markovitsi, T. Gustavsson und A. Banyasz: **Absorption of UV radiation by DNA: Spatial and temporal features**, *Mutation Research*, Vol. 704, No. 1, 21-28, (2009)
- [78] H. C. Bimboim und J. Doly: **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA**, *Nucleic Acids Research*, Vol. 7, No. 6, 1513-1524, (1979)
- [79] J. Kong, H. T. Soh, A. M. Cassell, C. F. Quate und H. Dai: **Synthesis of individual single-walled carbon nanotubes on patterned silicon wafers**, *Nature*, Vol. 395, 878-881, (1998)
- [80] N. Patterson, D. P. Adams, V. C. Hodges, M. J. Vasile, J. R. Michael und P. G. Kotula: **Controlled fabrication of nanopores using a direct focused ion beam approach with back face particle detection**, *Nanotechnology*, Vol. 19, No. 23, 235304, (2008)
- [81] J. Xue, C. S. Jung und M. W. Kim: **Phase Transitions of liquid-crystal films on air-water interface**, *Physical Review Letters*, Vol. 60, No. 3, 474-477, (1992)
- [82] H. O. Pritchard und H. A. Skinner: **The Concept of Electronegativity**, *Chem. Review*, Vol. 55, No. 4, 745-786, (1955)
- [83] M. D. Groner, F. H. Fabrequette, J. W. Elam und S. M. George: **Low-Temperature Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Atomic Layer Deposition**, *Chem. Mater*, Vol. 16, 639-645, (2004)

- [84] D. Zhou, T. Guo, Y. Yang und Z. Zhang: **Surface imprinted macroporous film for high performance protein recognition in combination with quartz crystal microbalance**, *Sensors and Actuators, Vol. 153, 96-102*, (2011)
- [85] T. Fujii: **PDMS-based microfluidic devices for biomedical applications**, *Mircoelectronic Engineering, Vol. 61, 907-914*, (2002)
- [86] K. Suzuki, S. Okudaira, N. Sakudo und I. Kanomata: **Microwave Plasma Etching**, *Jap. Journal of Appl. Physics, Vol. 16, No. 11, 1979-1984*, (1977)
- [87] J. Li, M. Gershow, D. Stein, E. Brandin und J. A. Golovchenko: **DNA molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope**, *nature materials, Vol. 2, 611-615*, (2003)
- [88] S. W. Kowalczyk, M. W. Tuijtel, S. P. Donkers und C. Dekker: **Unraveling Single-Stranded DNA in a Solid-State Nanopore**, *Nano Letters, Vol. 10, No. 4, 1414-1420*, (2010)