

2. Grundlagen

In diesem Kapitel soll auf die physikalischen, biologischen und chemischen Grundlagen eingegangen werden, die für das Verständnis der Messmethode notwendig sind. Da diese drei Gebiete sehr viele und große thematische Überschneidungen aufweisen und an der gerade betrachteten Grundlage in einem sehr oft nicht genau bestimmbareren Anteil beteiligt sind, möchte ich eine weitere Unterteilung bewusst vermeiden.

2.1 Fluoreszenz

2.1.1 Absorption

Der Übergang vom Grundzustand Ψ_0 in den angeregten Zustand Ψ_1 eines Moleküls kann durch die Absorption elektromagnetischer Strahlung geeigneter Frequenz vor sich gehen. Die Übergangsenergie lässt sich wie folgt darstellen:

$$\Delta E = E_1(\Psi_1) - E_0(\Psi_0) = h \cdot \nu = \Delta E_e + \Delta E_{\text{vib}} + E_{\text{rot}} \quad (2.1)$$

Elektronische Übergänge (ΔE_e) finden bei Zimmertemperatur gemäß der Boltzmannverteilung nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-37} statt und gehen daher fast ausschließlich vom elektronischen Grundzustand aus. Sie werden durch UV bzw. VIS- Licht angeregt. Die Übergangsenergien fluoreszenter Farbstoffe liegen im Bereich weniger eV und somit im Energiebereich des sichtbaren Lichtes (1,5 - 3,0 eV). Als Beispiel wurde der in vielen meiner Versuche verwendete fluoreszente Farbstoff Indodicarbocyanin (Cy5) ausgewählt. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 648 nm, was einer Energiedifferenz von ca. 1,92 eV (185 kJ/mol) entspricht.

Da neben den Elektronenübergängen auch noch Vibrationen (ΔE_{vib}) und Rotationen (ΔE_{rot}) angeregt werden, ist die Absorptionsbande, vor allem für größere Moleküle in Lösung nicht scharf, sondern aufgefüchert.

Ein Maß für die Übergangswahrscheinlichkeit eines Elektrons aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand ist die dimensionslose Oszillationsstärke f . In der klassischen Betrachtungsweise gibt sie den Bruchteil der Elektronen wieder, die diesen Übergang vollziehen. Der quantenmechanische Ausdruck für die Oszillationsstärke f_{01}

eines Überganges aus dem Grundzustand mit der Wellenfunktion Ψ_0 in einen angeregten Zustand mit der Wellenfunktion Ψ_1 lautet:

$$f_{01} = \text{constant} \cdot \Delta E \cdot |\mu_{01}|^2 \quad (2.2)$$

mit ΔE als Anregungsenergie für den elektronischen Übergang und μ_{01} als Übergangsdipolmoment. Das Übergangsdipolmoment ist definiert durch:

$$\mu_{01} = \int \Psi_0 \cdot \boldsymbol{\mu} \cdot \Psi_1 \, dx dy dz \quad (2.3)$$

mit $\boldsymbol{\mu}$ als Dipolmomentoperator.

Bei einem erlaubten Übergang entspricht die Größe dieses Übergangsdipolmoments etwa der Verschiebung einer Elementarladung um die Länge einer Bindung (10^{-10} m). Die Stärke eines Übergangs, die sich in der Intensität der Absorption oder Emission äußert, hängt vom Quadrat des Übergangsdipolmoments ab.

2.1.2 Emission

Die Emission von Photonen aus elektronisch angeregten Zuständen bezeichnet man als Lumineszenz. Sie wird in zwei verschiedene Prozesse eingeteilt: Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Energieniveaus und Übergänge können bei einem vielatomigen Molekül (Fluoreszente Farbstoffe) nicht mehr als Funktion des Atomabstandes dargestellt werden. Eine schematische Darstellung, die unabhängig von der Größe oder Komplexität eines Moleküls eine Beschreibung erlaubt, ist in Form eines Termschemas (Jablonski-Diagramm) möglich (Abbildung 2.1).

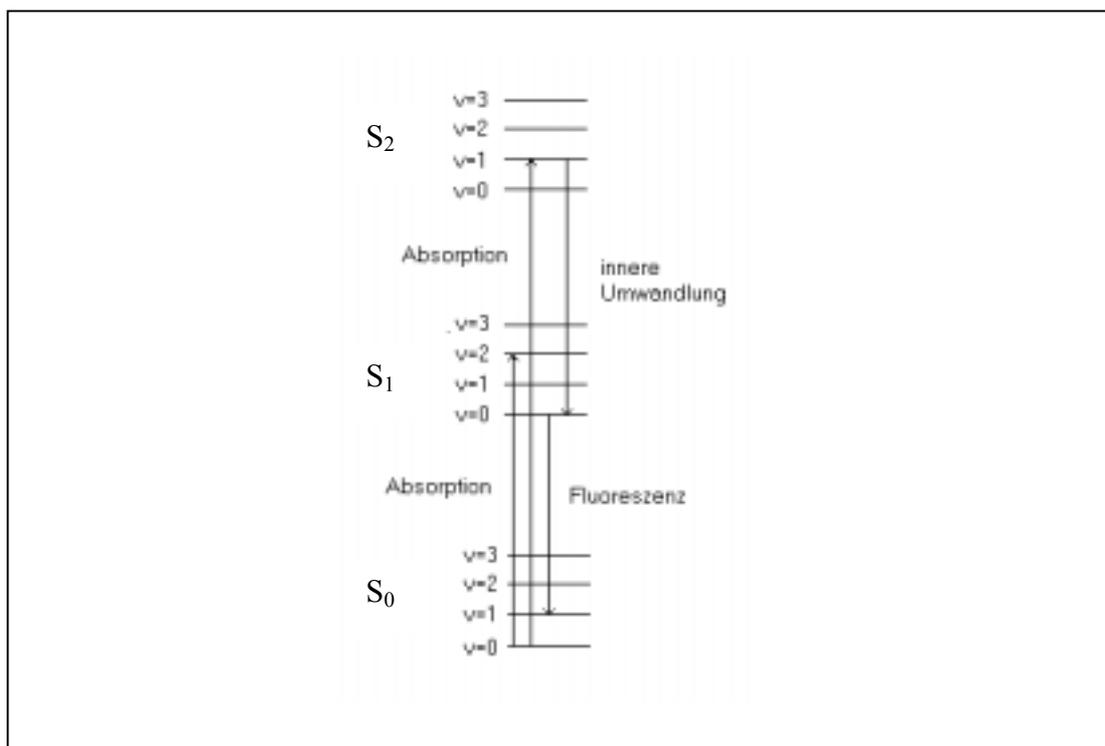


Abbildung 2.1: Energieniveaus und Übergänge können bei einem vielatomigen Molekül nicht mehr als Funktion des Atomabstandes dargestellt werden. Eine schematische Darstellung, die unabhängig von der Größe oder Komplexität des Moleküls eine Beschreibung erlaubt, ist in Form eines Termschemas (Jablonski-Diagramm) möglich. Wir sehen ein solches Termschema mit dem elektronischen Grundzustand S_0 und dem ersten, sowie einem zweiten angeregten Singulettzustand (S_1 und S_2), wobei die einzelnen Niveaus weiter in Schwingungsniveaus unterteilt sind ($v = 0, 1, 2, 3 \dots n$). Die Schwingungsniveaus teilen sich weiter auf in Rotationsniveaus; sie sind der Übersichtlichkeit halber nicht eingezeichnet.

Die Lichtanregung erfolgt bei Zimmertemperatur, unter Beachtung von Auswahlregeln, vom untersten Schwingungsniveau des S_0 -Zustandes sehr schnell (10^{-15} s) in den Singulettzustand S_1 , dessen schwingungsangeregten Unterniveaus und in höhere Singulettzustände S_2, S_3 usw. Dabei ändern sich die Spinverhältnisse nicht. Aus den höheren Singulettzuständen (innere Umwandlung) und Schwingungszuständen (Schwingungsrelaxation) erfolgt wiederum sehr schnell (innerhalb von ca. 10^{-12} s) durch strahlungslose Deaktivierung ein Übergang in den Schwingungsgrundzustand von S_1 ; die Energie hierbei wird durch Stöße an Nachbarmoleküle abgegeben. Der Zustand S_1 besitzt eine längere Lebensdauer (10^{-9} s- 10^{-6} s) und kann seine Energie beim Übergang in den Grundzustand S_0 als Fluoreszenz abgeben.

Bei fluoreszenzfähigen Systemen ist das emittierte Licht fast immer höchstens so kurzwellig wie das absorbierte (Stokes-Regel).

2.1.3 Fluoreszente Farbstoffe

Fluoreszente-Farbstoffe sind Moleküle mit konjugierten Doppelbindungen (häufig Aromate), die über delokalisierte Elektronensysteme verfügen. Die elektronischen Energieniveaus sind in eine Vielzahl von Rotations- und Vibrationsniveaus unterteilt, so dass weder die Anregung noch die Emission mit diskreten Energien erfolgen müssen. In Abbildung 2.2 sind die zwei in meinem Systemaufbau verwendeten Farbstoffe dargestellt und charakterisiert.

Der Extinktions-Koeffizient $\epsilon(\lambda)$ eines Farbstoffs gibt an, welcher Anteil der Photonen eines Lichtstrahls beim Durchlaufen einer Strecke d durch den gelösten Farbstoff von diesem absorbiert wird. Dieser Anteil ist abhängig von der Konzentration C des Farbstoffs in der Lösung und der Wellenlänge λ der eintreffenden Photonen. Die Einheit des Extinktions-Koeffizienten ist $\epsilon = [\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}]$. Die Anzahl der nicht absorbierten Photonen nimmt mit zunehmender Strecke d exponentiell ab. Der Zusammenhang der oben angegebenen Größen wird durch das Lambert-Beer'sche Absorptions-Gesetz beschrieben (Haken & Wolf, 1990):

$$I = I_0 \cdot e^{-\epsilon(\lambda) d} \quad (2.4)$$

Hierin gibt I_0 die in die Farbstoff-Lösung eintretende Licht-Intensität an und I den nach Durchlaufen der Strecke d austretenden (also nicht absorbierten) Anteil der Licht-Intensität. Das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt nur für monochromatisches Licht und verdünnte Lösungen, in denen ausschließlich der gelöste Stoff absorbiert.

Die Effizienz der Umsetzung der absorbierten Photonen in emittierte Fluoreszenz-Lichtquanten wird durch die Quantenausbeute angegeben. Die Quantenausbeute q eines Fluoreszenz-Farbstoffs ist wie folgt definiert (Haken und Wolf, 1992):

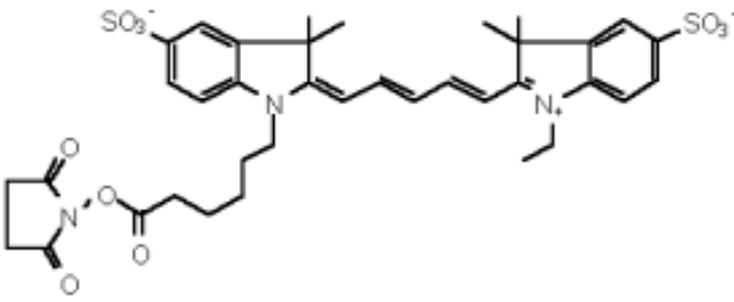
$$\text{Quantenausbeute } q = \frac{\text{Zahl der emittierten Quanten}}{\text{Zahl der absorbierten Quanten}} \quad (2.5)$$

Die Quantenausbeute trägt keine Einheit; sie kann Werte von null bis eins annehmen. Der bestmögliche Wert von $q = 1$ wird erreicht, wenn es zu den oben geschilderten

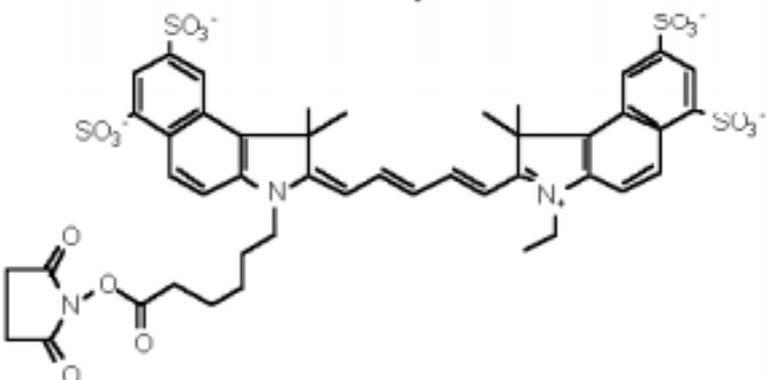
strahlenden Übergängen keine konkurrierenden strahlungslosen Prozesse und keine elastischen Emissionen gibt.

Der Gesamt-Wirkungsquerschnitt des Fluoreszenz-Prozesses ist durch das Produkt aus dem Extinktions-Koeffizienten $\varepsilon(\lambda)$ und der Quantenausbeute q gegeben und kann damit als ein Qualitätskriterium für Fluoreszenzfarbstoffe dienen.

Indodicarbocyanin CY 5



Indodicarbocyanin CY 5.5



Fluoreszenz-Farbstoff	Absorptions-Maximum [nm]	Emissions-Maximum [nm]	Extinktions-Koeffizient $\epsilon \cdot 10^3$ [cm ⁻¹ M ⁻¹]	Quanten-Ausbeute φ	Anregungs-Lichtquelle
CY 5	648	665	250	0,28	HeNe-Laser rot 633 nm
CY 5.5 (Indodicarbocyanin)	678	703	250	0,28	Laser-Diode rot 675 nm

Abbildung 2.2: Die Strukturen, Absorptionsmaxima, Emissionsmaxima, Extinktionskoeffizienten und Quantenausbeuten, der in diesem Versuchsaufbau eingesetzten fluoreszenten Farbstoffe Indodicarbocyanin Cy5 und Cy5.5. Ebenfalls aufgeführt sind die verwendeten Anregungslichtquellen.

2.2 Laser als Anregungslichtquelle

Erst das Laserlicht erlaubt durch seine Eigenschaften einen Systemaufbau wie er sich durch das Arakis-Sequenziersystem darstellt. Von seinen Eigenschaften wirken sich besonders die durch keine andere Lichtquelle in dieser Kombination erreichte hohe spektrale Leistungsdichte, Kohärenz (darausfolgend die geringe Divergenz und Monochromasie) und die fast vollständig erreichbare Polarisation des Laserlichts besonders positiv auf die Leistungsfähigkeit des Systems aus.

Im Folgenden soll aufbauend auf der Theorie der Laser und am Beispiel des Helium/Neon-Lasers die Auswahl des Lasers als Anregungslichtquelle für das Arakis-Sequenziersystem begründet werden.

2.2.1 Grundlagen des Lasers

Die Basis für Laser- und Maserlicht ist die von Einstein postulierte, stimulierte (erzwungene) Emission, die das genaue Gegenteil zur Absorption ist. Ein elektromagnetisches Strahlungsfeld kann ein Teilchen entweder zum Übergang in einen energetisch höheren oder tieferen Zustand veranlassen, falls seine Frequenz gerade mit der Energiedifferenz zwischen den beiden Zuständen übereinstimmt, d.h.

$$\nu = \Delta W/h \quad (2.6)$$

ist. Die beiden entgegengesetzten Vorgänge (Absorption und stimulierte Emission) haben quantenmechanisch betrachtet die gleiche Wahrscheinlichkeit.

Ob die Absorption oder die stimulierte Emission überwiegt hängt lediglich von den Anzahldichten N_2 (angeregter Zustand) und N_1 (Grundzustand) ab. Bei $N_1 > N_2$ überwiegt die Absorption, die einfallende Welle ist gedämpft. Bei $N_2 > N_1$ verstärkt sich die Welle ständig durch erzwungene Emission.

Im thermischen Gleichgewicht ist immer:

$$N_2 < N_1 \quad (2.7)$$

Es gilt nämlich nach Boltzmann:

$$N_2 = N_1 e^{-h\nu/kT} \quad (2.8)$$

(k = Boltzmann-Konstante, T = absolute Temperatur)

Da jedoch die Wahrscheinlichkeit für die Absorption und die induzierte Emission gleich sind, überwiegt die Absorption. Die Anzahl der induzierten Quanten ist geringer als die Anzahl der absorbierten Quanten, so dass keine Lichtausstrahlung beobachtet wird. Deshalb muss man dafür sorgen, dass der angeregte Zustand stärker besetzt ist als der Grundzustand.

In einem System mit Besetzungsinversion befinden sich mehr Atome in einem höheren Energieniveau als in einem niedrigeren. Umformen von Gleichung (2.8) nach T ergibt:

$$T = -\frac{h\nu}{k \ln\left(\frac{N_2}{N_1}\right)} \quad (2.9)$$

Für $N_2 > N_1$ (Besetzungsinversion) erhalten wir einen Zustand, dem eine negative absolute Temperatur zugeordnet ist. Diese Auslegung folgt jedoch aus der formalen Anwendung der Boltzmann-Formel auf die Energieniveaus. Physikalisch bedeutet eine negative absolute Temperatur eine Besetzungsinversion. Als Beispiel wird der in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete He/Ne-Gaslasers beschrieben (Siehe Abbildung 2.3).

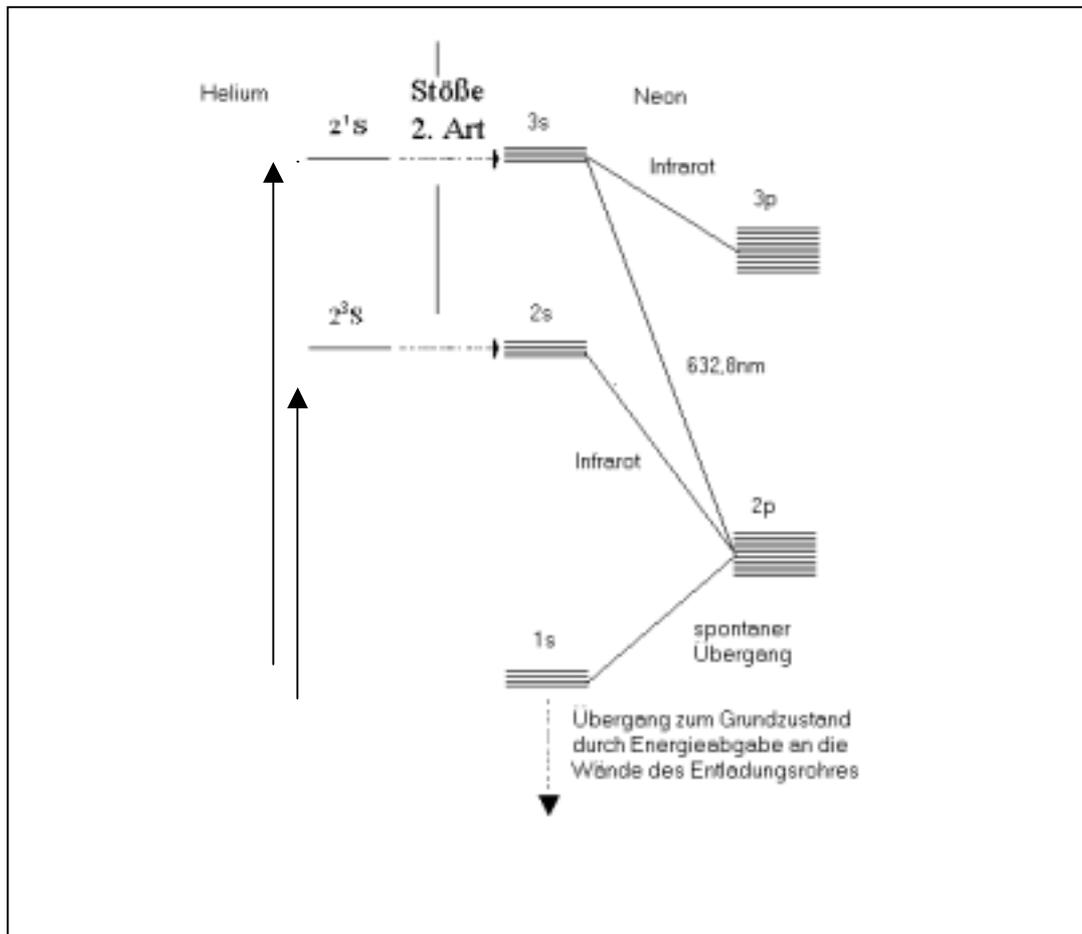


Abbildung 2.3: Der Helium/Neon-Gaslaser: Eine Gasentladungsröhre enthält ein Gemisch aus Helium und Neon. Helium hat zwei metastabile Niveaus 2^1S und 2^3S , die durch Elektronenstöße besetzt werden. Optische Übergänge in den 1^1S Grundzustand sind aufgrund der Auswahlkriterien nicht möglich.

Da die 2^1S und 2^3S Niveaus des Heliums nur wenig höher liegen als die angeregten Niveaus $3s$ und $2s$ des Neons, kann die Energie der Helium Niveaus durch Stöße 2. Art auf die Neon Niveaus übertragen werden. Da die Lebensdauer der s Zustände ungefähr 10 mal länger als die der p Zustände ist wird eine Besetzungsinversion zwischen den Niveaus $2s$ und $2p$ sowie $3s$ und $3p$ erzeugt. Beim Helium-Neon Laser wird also eine Besetzungsinversion auf dem Umweg über die Helium Atome und die Stöße 2. Art erzeugt.

Voraussetzung für Laserlicht ist die Rückkopplung in einem geeigneten Resonator, dessen Eigenfrequenz exakt der emittierten Frequenz entsprechen muss. Dies geschieht bei Gas- und Feststofflasern meistens mit einem Fabry-Perot Resonator. Bei ihm werden die Stirnflächen eines Kristalls von abgestimmter Länge exakt parallel

geschliffen oder verspiegelt, so dass sich durch mehrfach Reflexion eine stehende Welle ausbildet. Nur die senkrecht zu den Spiegeln hin- und herlaufenden Wellen bleiben im Resonator und werden durch induzierte Emission verstärkt. Ein Teil davon wird durch eine nur teilweise verspiegelte Stirnfläche als der eigentliche Laserstrahl ausgekoppelt.

2.2.2 Eigenschaften von Laserstrahlung

In der nachfolgenden Tabelle sind eine Reihe von charakteristischen Eigenschaften von "klassischen" Lichtquellen im Vergleich zu Lasern aufgelistet.

Lichtquelle	Lichtleistung P [Watt]	Fokussierte Leistungs- dichte [Watt/cm ²]	Bandbreite $\Delta\nu$ [s ⁻¹]	Kohärenz- länge l_k [cm]	Räumlicher Öffnungs- winkel Θ^2 [sterad]
Sonne	$\sim 10^{26}$	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^{14}$	$5 \cdot 10^{-5}$	4π
Quecksilber- Höchstdruck- lampe (100W)	~ 5	$\sim 1,5 \cdot 10^3$	$\sim 5 \cdot 10^{14}$	$6 \cdot 10^{14}$	$\sim 4\pi$
Spektrallampe	$< 10^{-3}$	-	$\sim 10^9$	~ 30	$\sim 4\pi$
He/Ne-Laser	10^{-2}	$4 \cdot 10^4$	10^2	$3 \cdot 10^8$	10^{-8}
Argon-Laser	10^2	$5 \cdot 10^8$	10^6	$3 \cdot 10^4$	10^{-8}

·gilt für eine fehlerfreie 5cm-Linse mit der Apertur NA=1

Nur 5% der von der Quecksilberdampfampe abgestrahlten Leistung liegen im Sichtbaren. Bei der Spektrallampe ist eine Lichtleistung von $< 10^{-3}$ Watt angegeben. Allerdings ist das Licht auf wenige Spektrallinien konzentriert.

Monochromasie:

Laserlicht ist extrem einfarbig oder monochromatisch, dies ist eine Konsequenz der Kohärenz. Die relative Bandbreite $\Delta\nu$ des He/Ne-Lasers liegt bei 10^2 Hz.

Da das Arakis-Sequenziersystem mit bis zu 5 unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gleichzeitig betrieben wird, ist die mit Lasern erreichte spektrale Auflösung von besonderer Wichtigkeit.

Polarisation:

Die Eigenschaft der fast vollständigen Polarisation des Laserlichtes wird im Arakis-System ausgenutzt, um den fluoreszenten Untergrund des Streulichts (Rayleigh-Streuung) zu minimieren. Der Helium-Laser sendet aufgrund der an beiden Seiten des Lasers angebrachten Brewster-Fenster, die Halbleiter-Laser in Abhängigkeit von der Orientierung der p-n-Übergänge, linear polarisiertes Licht aus.

Wird die Polarisationsrichtung des Anregungslichts derart gelegt, dass die Schwingungsrichtung des E-Feld Vektors senkrecht zu den Detektoren steht, so zeigt das gestreute Licht ein Minimum in Richtung der Detektoren. Ein Nachteil ist allerdings, dass dieses Streulicht die Eigenfluoreszenz des Gels erhöht.

Ausbreitung der Strahlen:

Von besonderer Bedeutung ist die TEM₀₀-Grundmode (Transverse electromagnetic wave), da sie den kleinsten Strahlradius und die geringste Divergenz besitzt. Die radiale Verteilung der Leistungsdichte quer zur Strahlrichtung ist durch eine Gauß-Verteilung gegeben:

$$E(r) = E_{\max} \exp(-2r^2/w^2) \quad (2.10)$$

Der Strahldurchmesser $2w$ (oder der Strahlradius w) beschreibt die Stelle ($r = w$) an der die Laserleistung auf $e^{-2} \approx 13,5\%$ gefallen ist.

Resonatoren werden im allgemeinen durch zwei sphärische Spiegel mit verschiedenen Krümmungsradien begrenzt. Die Grundmode hat die Form eines sogenannten „Gaußschen Strahls“, bei dem sich eine Strahltaile w_0 bildet.

Der Laserstrahl breitet sich nahezu parallel mit einem kleinen Divergenzwinkel θ (He/Ne-Laser $\approx 10^{-8}$ sr) aus. Auch dieses resultiert aus der Kohärenz. Der Divergenzwinkel θ ergibt sich zu:

$$\Theta = \lambda / \pi w_0 \quad (2.11)$$

Aus dieser Formel lässt sich erkennen, dass kurzwelliges Licht einen kleineren Divergenzwinkel aufweist als langwelliges und sich somit besser fokussieren lässt.

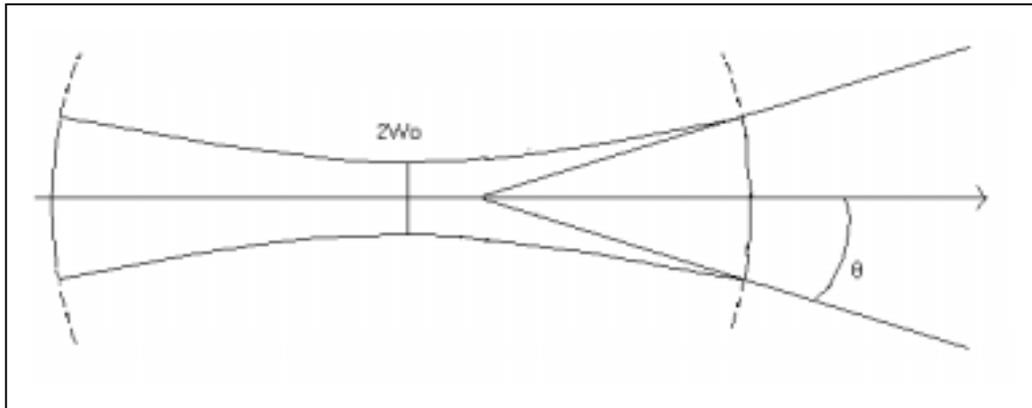


Abbildung 2.4 Ausbreitung eines TEM_{00} – Laserstrahls inner- und außerhalb eines Resonators mit zwei sphärischen Spiegeln. (Die Linsenwirkung des Ausgangsspiegels wird nicht berücksichtigt).

Fokussierung

Ein sehr wichtiges Charakteristikum des Lasers, sein nahezu paralleles Licht und daher seine sehr gute Fokussierbarkeit, kommt im Arakis-Sequenziersystem zum tragen. Die Grenze der Fokussierbarkeit liegt bei einem Durchmesser der Wellenlänge. Die sehr gute Fokussierbarkeit wirkt sich vorteilhaft auf die elektrophoretische Auflösung aus. Der Strahl lässt sich wie im Arakis-Sequenziersystem realisiert, durch plangeschliffenes Glasplättchen und geeignete Linsen in das Elektrophorese-Gel einkoppeln.

2.3 Untergrundstrahlung des Messaufbaus

Passiert der Laserstrahl - wie im Arakis-System - das Gel, so wird nicht nur das Emissionslicht der fluoreszenten Farbstoffe der markierten DNA-Fragmente detektiert, sondern es treten eine Reihe unterschiedlicher, die Untergrundstrahlung ausmachender Quellen hinzu. Diese können sowohl kohärente, als auch inkohärente Streuung der Gel-Matrix, des Wassers und Glasfluoreszenz sein. Bei kohärenter Streuung (Rayleigh Streuung) ist zwischen Ein- und Abstrahlung kein Zwischenprozess eingeschaltet, das heißt, es bleibt eine feste Phasenbeziehung erhalten.

Betrachtet man eine Anregung eines Argon-Lasers (488 nm), so zeigen sich zusätzlich zur sehr starken Rayleigh-Streuung, zwei Raman Streulicht-Maxima des Glases (Typ: B 270) bei 555 nm und 610 nm. Des weiteren tritt ein Raman Streulicht-Maximum des Wassers bei 580 nm auf.

Als Streuung bezeichnet man den Vorgang der Ablenkung elektromagnetischer Strahlung durch Materieteilchen. Sie streuen die auftreffende Welle, weil diese die Elektronen in Schwingung versetzt. Im Molekül entsteht somit ein Dipolmoment, das mit der Frequenz ω der Welle schwingt. In größeren Molekülen sind es viele Dipole. Die Intensität S der Streuung ist proportional zu ω^4 und $\sin^2\varphi$:

$$S \sim \omega^4 \sin^2\varphi \quad (2.12)$$

Im Arakis System hat dies zwei Konsequenzen. Zum einen wird kurzwelligeres Laser Anregungslicht stärker gestreut als langwelliges, das heißt, dass bei der Auswahl geeigneter fluoreszenter Farbstoffe bevorzugt langwellige ausgesucht werden.

Zum anderen macht sich die Streuung störend bemerkbar, wenn die Detektoren senkrecht zur Polarisationsrichtung des Laserlichts stehen. Dies kann durch geeignetes Drehen der Polarisationsrichtung (siehe auch Kapitel 2.2.2.) des Laserlichts verhindert werden.

Bedingung für *Rayleigh-Streuung* ist, dass die räumliche Ausdehnung der streuenden Materieteilchen kleiner ist, als die Wellenlänge λ der gestreuten Welle. Sie kann durch optische Inhomogenität der bestrahlten Substanz, das heißt örtliche und zeitliche Schwankung der Dichte, welche in reinsten Flüssigkeiten und Gasen allein schon durch die thermische Molekularbewegung (Brownsche Bewegung) entsteht, auftreten.

Der Raman-Effekt: Streuung lässt sich durch die Photonentheorie dadurch erklären, dass die Energie der einfallenden Photonen das streuende Atom oder Molekül in nicht erlaubte Zustände hebt, weswegen das Photon sofort und weitgehend unter Verlust der ursprünglichen Flugrichtung wieder abgegeben wird.

Falls neben dem Ausgangsniveau noch weitere Niveaus liegen, so kann die Rückkehr auch in eines von diesen erfolgen. Die Energiedifferenz $h \cdot \Delta\nu$ wird dem Photon zugeführt oder entnommen. Die Verschiebung kann zu größeren Wellenlängen (Stokes-Linien) oder zu kleineren (Anti-Stokes Linien) hin geschehen. Reine Stokes Linien treten auf, falls der Ausgangszustand der Grundzustand war.

Einige der in dieser Arbeit untersuchten Membranen geben durch das elektrische Feld Stoffe in das Gel ab, die unter dem Einfluss der Laserstrahlung die Untergrundstrahlung der Messung erhöhen. Durch Messungen des Untergrundes

der Photodioden lassen sich solche Membranen ausschließen, die Untergrundstrahlung erhöhen.

Als nicht akzeptable Untergrundänderungen werden solche bezeichnet, die den dynamischen Bereich der Photodioden über einen größeren Datenpunktbereich um 30% oder mehr erhöhen. Ebenfalls nicht tolerierbar sind Untergrundänderungen, die Zusatzsignale erzeugen. Die Messungen für eine Vorabselektion dieser für weitere Untersuchungen ausscheidenden Membranen sind einfach, das heißt ohne Proben durchführbar.

2.4 Desoxyribonukleinsäure (DNA)

Die DNA ist ein unverzweigtes Kettenmolekül, das der Speicherung und Übertragung der Erbinformation dient. In Eukaryonten sind die DNA Moleküle mit Proteinen komplexiert (Chromosomen) und befinden sich im Zellkern. Jede Spezies weist eine für sie charakteristische Anzahl und Form der Chromosomen auf.

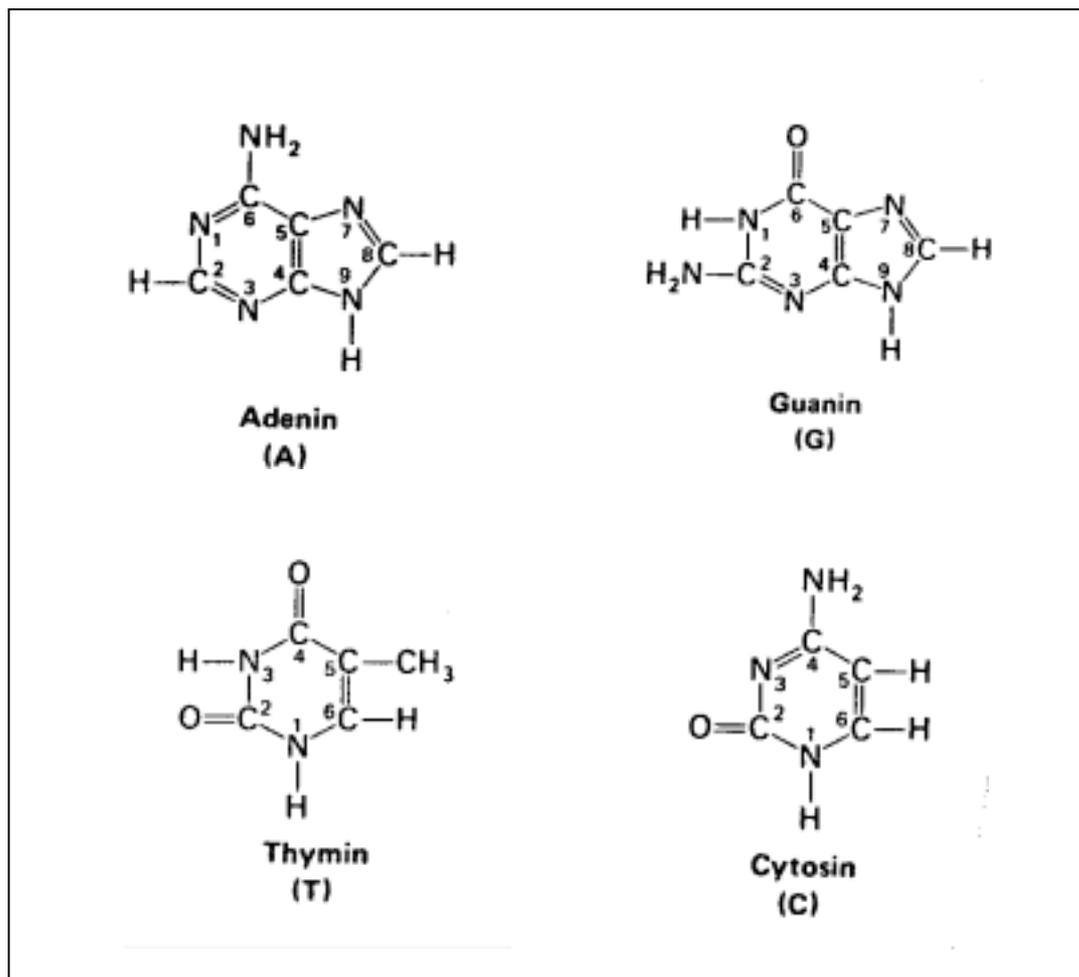


Abbildung 2.5: Die vier in der DNA auftretenden Stickstoffbasen

Die DNA ist ein langes, unverzweigtes Polymer, das aus nur 4 Untereinheiten, den Desoxyribonukleotiden (kurz Nukleotiden) aufgebaut ist. Diese wiederum setzen sich zusammen aus einem Zucker, der 2-Desoxy -D- Ribose, einem Phosphorsäurerest und einer Stickstoffbase.

Die vier verschiedenen Stickstoffbasen, die man in der DNA antrifft, sind: Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) und Cytosin (C). Die vier unterschiedlichen Nukleotide werden im allgemeinen Sprachgebrauch nach ihrer Base benannt. Zwei benachbarte Nukleotide werden durch eine kovalente Phosphodiesterbindung zwischen dem dritten Kohlenstoffatom des einen Zuckers und dem fünften des anderen zusammengehalten.

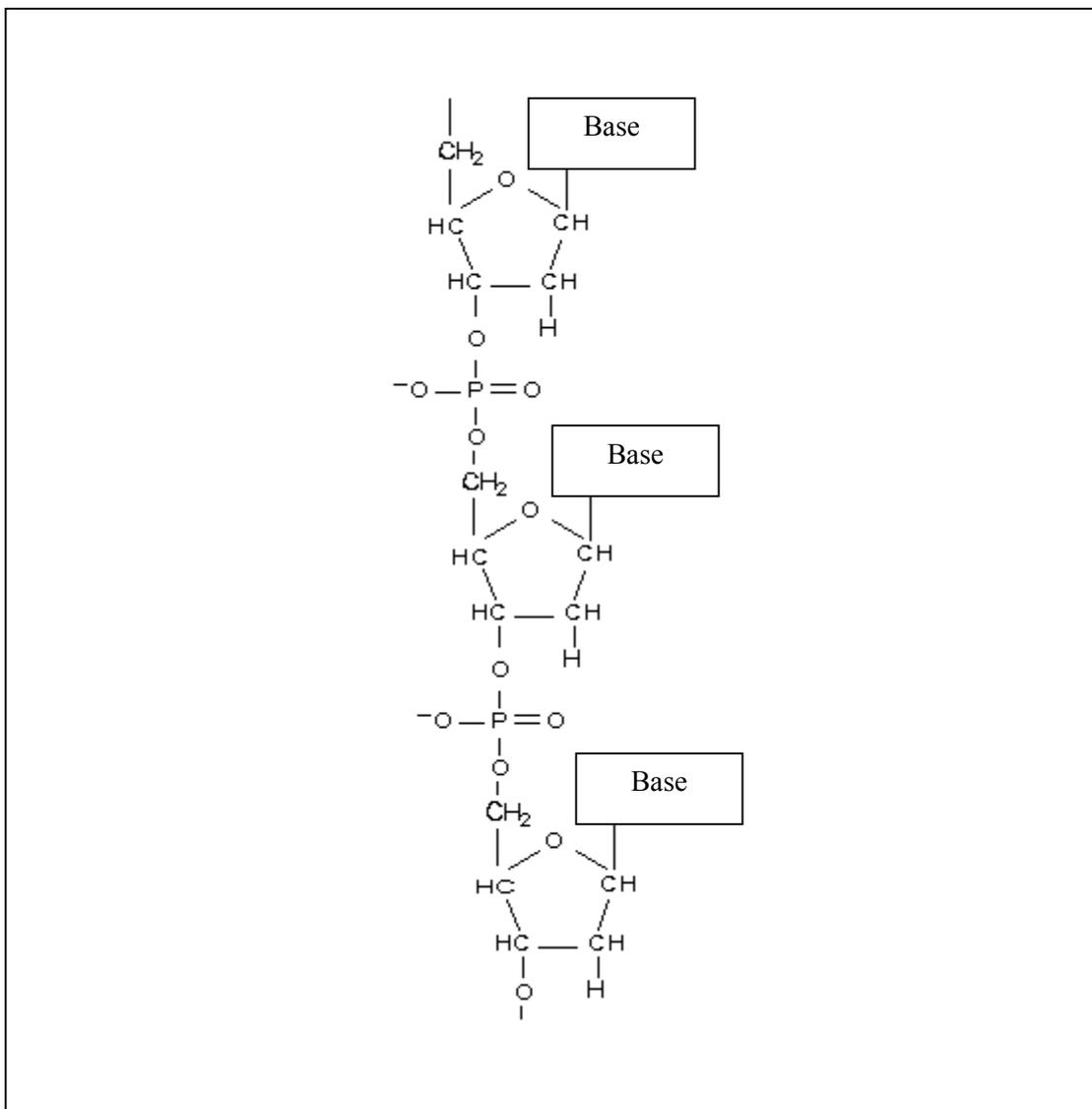


Abbildung 2.6: Chemische Struktur eines Ausschnitts der DNA

Einer Konvention zufolge beginnen DNA Sequenzen immer links mit dem 5'-Phosphatende und enden mit dem 3'-Hydroxylende. Wie aber ist die genetische Information in der Zelle gespeichert und wie wird sie von einer Zelle auf die andere übertragen?

1953 schlossen James Watson und James Crick aus Röntgen-Diffraktionsbildern, dass die DNA eine Doppelhelix ausbildet. Die wichtigsten und noch heute gültigen Eigenschaften ihres Modells werden im Folgenden beschrieben:

- Die Purinbasen (Adenin und Guanin) und die Pyrimidinbasen (Cytosin und Thymin) befinden sich im Inneren der Helix. Die Phosphat- und Desoxyribose Einheiten liegen außen.
- Diese Annahme verlangt, dass die Basen der beiden DNA Stränge extrem nahe beieinander liegen und sich daher eine spezifische Basenpaarung zwischen einer großen Purinbase (Adenin oder Guanin) und einer kleinen Pyrimidinbase (Cytosin oder Thymin) einstellt.
- Aus vorhergehenden Untersuchungen und Modellannahmen ging hervor, dass sich komplementäre Basenpaare (auch Watson Crick Basenpaare genannt) zwischen Adenin und Thymin und zwischen Guanin mit Cytosin bilden. Die beiden Stränge werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen zusammengehalten. Hierbei paart sich Adenin mit Thymin durch zwei und Cytosin mit Guanin durch drei Wasserstoffbrückenbindungen. Diese Wasserstoffbrücken bilden sich zwischen den reaktiven Amino-, Imino- und Carboxylgruppen der Purin- und Pyrimidinbasen aus (Abbildung 2.7).
- Die beiden DNA Stränge sind in gegenläufiger Richtung um eine gemeinsame Achse gewunden. Das heißt dem 5'- Ende des einen Stranges liegt das 3` Ende des anderen Stranges gegenüber.
- Die DNA ist kein starres Gebilde, sondern weist einen hohen Grad an struktureller Plastizität auf. Unter physiologischen Bedingungen nimmt die DNA die sogenannte B-Konformation ein. Hierbei handelt es sich um eine rechtsgängige helikale Struktur. In ihr liegen die einzelnen Basenpaare 0,34 nm auseinander, und der Durchmesser beträgt 200nm. Für eine vollständige Windung werden 10 Basenpaare benötigt. Entlang der Achse finden sich an der Außenseite der Doppelhelix die sogenannte kleine und große Furche in alternierendem Wechsel.

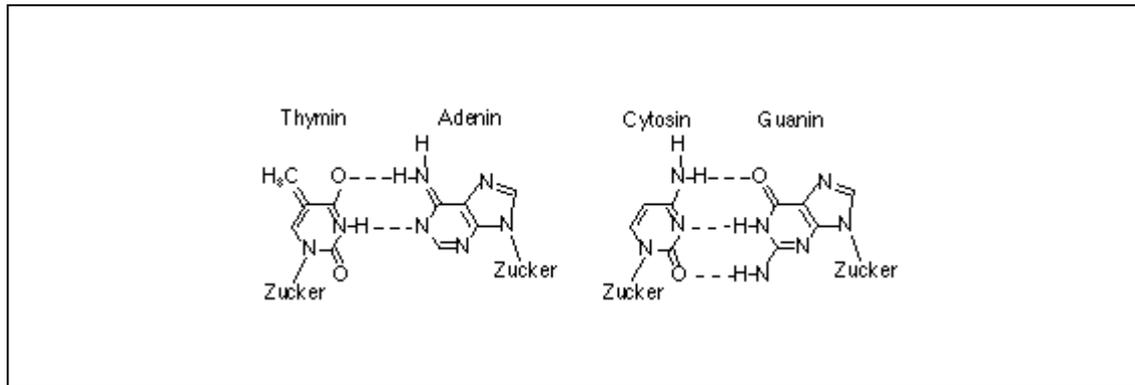
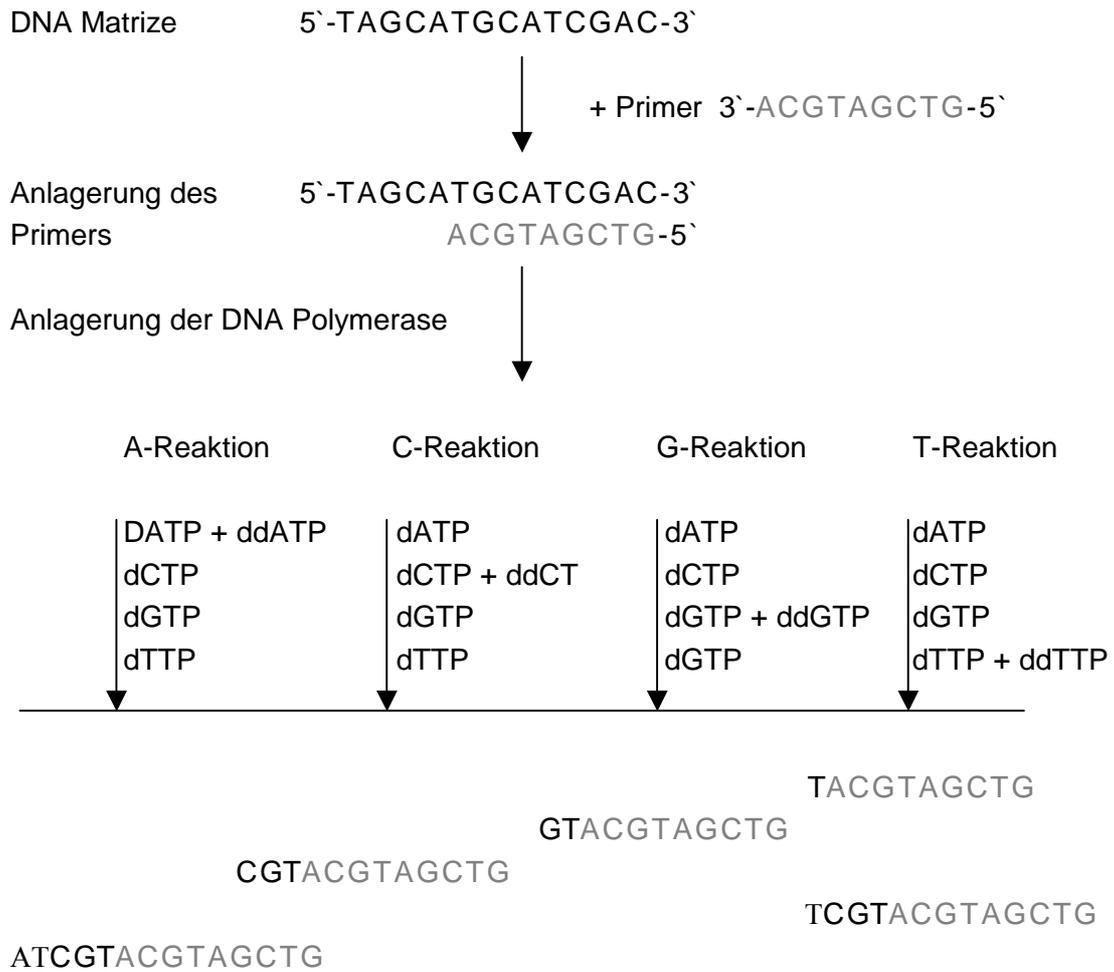


Abbildung 2.7: Die Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen Thymin und Adenin und zwischen Cytosin und Guanin

2.4.1 DNA-Sequenzierung

Das enzymatische Kettenabbruchverfahren lässt sich wie folgt erklären. Eine Polymerasereaktion wird in vier Reaktionsgefäßen durchgeführt (Abbildung 2.8). In jedes Gefäß wird die zu sequenzierende DNA-Matrize und ein kurzes DNA-Fragment (Primer, üblicherweise 20 Nukleotide lang) zugegeben, da die für den DNA-Aufbau verwendeten DNA-Polymerasen (Enzyme) einen kurzen Doppelstrangabschnitt mit freiem 3'-Hydroxylende brauchen. Das Enzym (die DNA Polymerase) und die vier in der DNA vorkommenden Nukleotide in Form ihrer 2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphate (dNTP) und jeweils ein unterschiedliches 2',3'-Dideoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat (ddNTP) werden ebenfalls hinzugegeben. Letztere werden von der DNA-Polymerase als Substrat erkannt und eingebaut, jedoch terminieren sie einen weiteren Kettenaufbau aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe. So kann in jedem Reaktionsansatz die Polymerasereaktion selektiv bei A, C, G oder T abgebrochen werden. Das Verhältnis von ddNTP's zu dNTP's sorgt dafür, dass eine Menge von teilweise aufgebauten DNA-Molekülen entsteht, die sich in ihrer Länge nur um ein Nukleotid unterscheiden.

Die resultierenden markierten DNA-Stränge werden in einem Polycrylamidgel der Länge nach separiert und aus der räumlichen Abfolge der spezifischen Abbrüche, die Sequenz des zu sequenzierenden DNA-Stranges bestimmt. Bei dieser Methode muss mit DNA Mengen gearbeitet werden - gewöhnlich 1,5 µg pro 1 Kb Konstruktlänge - die nicht für alle zu sequenzierenden Systeme auf einfache Art und Weise zu erreichen waren.



Elektrophoretische Trennung

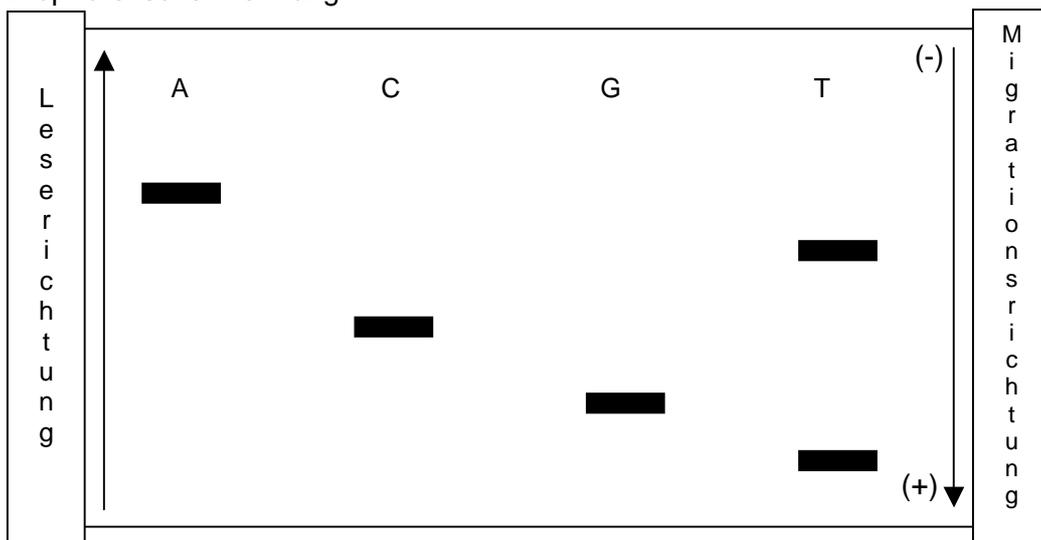


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Sanger-DNA-Sequenzierung

Ein Durchbruch in der DNA Amplifikation gelang durch die "Polymerase Chain Reaction" (PCR) und die an die DNA Sequenzierung angepasste Form des "Cycle Sequencing" durch die Reinigung hitzestabiler DNA Polymerasen (Innis, 1988; Lee 1991; Murray, 1989).

Das Verfahren der PCR beruht auf einem Zyklus dreier unterschiedlicher Schritte.

In einem Reaktionsgefäß befinden sich die meist doppelsträngige Ursprungs-DNA (Template), zwei für die jeweiligen Stränge komplementäre Primer, die hitzebeständige Polymerase und die 2'-Desoxynukleotide, A, C, G und T.

- 1) Die doppelsträngige DNA Matrize wird denaturiert, das heißt die beiden komplementären Stränge unter großer Hitzezufuhr (typisch 95°C, 15s) getrennt.
- 2) Bei angepasster Temperatur (typisch 55°C, 30s) erfolgt das Anlagern (Annealing) des Primers an den jeweiligen DNA Strang.
- 2) Bei einer, für die jeweilige hitzestabile Polymerase spezifischen Temperatur (68°C, 60s) geschieht der Einbau der 2'-Desoxynukleotide und erzeugt einen DNA-Strang, der wiederum als Matrize dient.

Die Schritte eins bis drei werden abhängig von der Versuchsanforderung typischerweise 30 mal wiederholt und somit der Bereich der DNA Matrize, der zwischen den beiden Primern liegt amplifiziert.

2.5. Elektrophorese

Als Elektrophorese bezeichnet man eine Technik zur Trennung geladener, kolloidaler Teilchen aufgrund ihrer unterschiedlichen Beweglichkeit in einem elektrischen Feld. Diese sehr verbreitete Methode erlaubt unter anderem die Separation makromolekularer Ionen, Viren, biologischer Zellen, submolekularer Organellen, Aminosäuren und Nukleinsäuren. Die Trennung von DNA-Molekülen muss in einem - wie ein molekulares Sieb wirkenden - unterstützenden Medium (Agarose, Papier oder Polyacrylamid) geschehen, da DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe, aufgrund gleichbleibendem Verhältnis von Ladung zu Reibungskoeffizient (2.15), bei der Elektrophorese in freier Lösung identische Mobilitäten aufweisen.

Die Migrationsgeschwindigkeit (cm/sec) eines Teilchens in einem elektrischen Feld der Stärke 1 V/cm nennt man elektrophoretische Mobilität. Ihre Dimension ist cm²/secV

und das Vorzeichen entspricht der Nettoladung des Teilchens. Unterschiedliche Mobilitäten sind die Grundlage für die Trennung von Substanzen.

Man betrachte ein isoliertes Teilchen, das in einem perfekten Isolator gelöst ist. Wird nun ein gleichförmiges elektrische Feld \mathbf{E} angelegt, dann wirkt auf das Teilchen mit der Nettoladung Q eine Kraft $Q \cdot \mathbf{E}$. Wird das Teilchen nun aus der Ruhelage beschleunigt, so wirkt eine Reibungskraft $f \cdot (dx/dt)$ in entgegengesetzter Richtung, wobei f der Reibungskoeffizient und dx/dt die Geschwindigkeit des Teilchens ist. Die resultierende dieser beiden Kräfte ist nach Newtons zweitem Gesetz $m \cdot (d^2x/dt^2)$. Daraus folgt Gleichung (2.4).

$$m \cdot (d^2x / dt^2) = Q \cdot E - f \cdot (dx/dt) \quad (2.13)$$

Diese Gleichung kann gelöst werden mit:

$$dx/dt = Q \cdot E / (f \cdot (1 - e^{-(f/m)t})) \quad (2.14)$$

Da der Wert f/m viel größer als 1 ist ($10^{12} - 10^{14}$ für Teilchen molekularer Größe), nimmt der Wert von $e^{-(f/m)t}$ in $10^{-14} - 10^{-12}$ Sekunden auf $1/e$ ab. Deshalb reduziert sich Gleichung (2) nach Zeiten größer 10^{-11} Sekunden auf:

$$dx/dt = Q \cdot E / f \quad (2.15)$$

Entsprechend dieser Gleichung geht das Teilchen nach dem Anlegen eines elektrischen Feldes sehr schnell in einen Gleichgewichtszustand über, in dem die Reibungskraft gleich der elektrischen Kraft ist. Dann migriert es mit konstanter Geschwindigkeit (3).

Für kugelförmige Teilchen ist der Reibungskoeffizient f gleich $6\pi\eta a$, wobei a der Radius des Teilchens und η der Viskositätskoeffizient der Lösung ist. Q/a kann durch $\epsilon\Psi_0$ ersetzt werden, wobei $\Psi_0 = Q/\epsilon a$ das Potential an der Oberfläche der Kugel und ϵ die Dielektrizitätskonstante des Teilchens ist. Die Mobilität der Kugel ergibt sich dann zu:

$$\mu = E^{-1} dx/dt = \epsilon \cdot \Psi_0 / (6 \cdot \pi \cdot \eta) \quad (2.16)$$

Da diese Beziehung offensichtlich für Teilchen, die sich in einem perfekten Isolator bewegen, hergeleitet wurde, muss sie zur Beschreibung der Elektrophorese von Makromolekülen modifiziert werden, da diese sich in elektrolytischen Lösungen abspielt. Man muss in Betracht ziehen, dass sich eine ionische Atmosphäre um das

geladene kolloidale Teilchen ausbildet. Wegen der elektrostatischen Kräfte zwischen den geladenen Gruppen des Teilchens und den Ionen des Lösungsmittels, ist das Teilchen von einer diffusen Ionenwolke entgegengesetzten Vorzeichens umgeben. Das Vorhandensein dieser Ionenwolke resultiert in geringeren Mobilitäten als durch Gleichung (4) vorhergesagt.

In der Praxis, für zeitlich aufgelöste Detektionssysteme, ergibt sich die Mobilität μ aus:

$$\mu = L_{\text{eff}} / (t_m \cdot E) = (L_{\text{eff}} \cdot L_{\text{ges}}) / (t_m \cdot U) \quad (2.17)$$

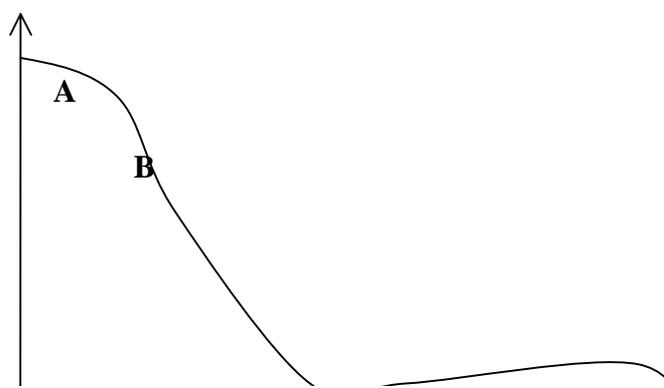
Hierbei ist L_{eff} die Strecke, die die zu analysierende Probe vom Probenauftragen bis zur Detektion im Trennmedium durchläuft und t_m die dafür benötigte Zeit. L_{ges} entspricht der Gesamtlänge des Trennungssystems und U ist die anliegende Spannung. Aus L_{ges}/U ergibt sich die elektrische Feldstärke E .

Gelelektrophorese:

Die Gelelektrophorese für Einzelstrang DNA Moleküle in der Sequenzierung erreicht eine Einzelbasenunterscheidbarkeit von einem bis ungefähr 1500 Nukleotiden.

Obwohl große technologische Fortschritte erzielt worden sind, ist der Prozess der Migration dieser großen, flexiblen Polyelektrolyte in pseudozufälligen Netzwerken erstaunlicherweise wenig verstanden. Im folgenden wird ein Überblick über unterschiedliche Modelle gegeben. Diese Modelle sind abhängig von der Größe der DNA, der mittleren Porengröße des Trennmediums und der elektrischen Feldstärke. Abbildung 2.9 zeigt schematisch wo diese Modelle anzusiedeln sind. Nukleinsäuren migrieren mit größenunabhängigen Mobilitäten durch Lösungen. Die "Siebcharakteristik" des Geles ist notwendig, um eine größenabhängige Trennung der DNA zu erzielen.

Log [Mobilität]



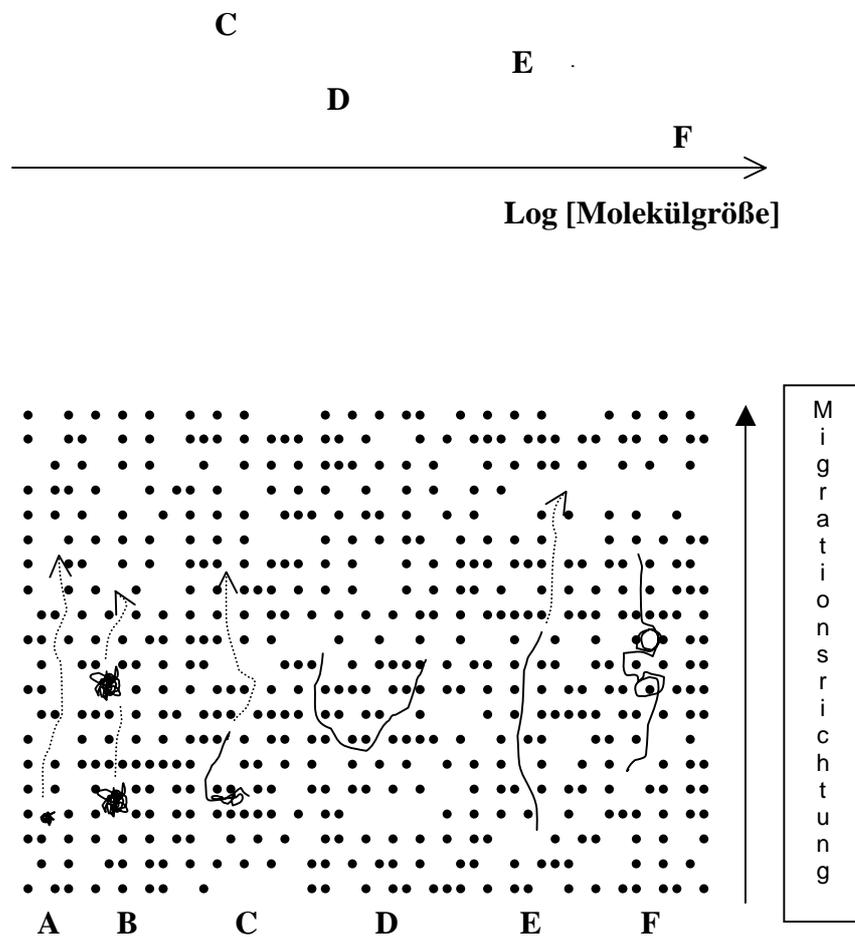


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Modelle der DNA Migration im Gel:

- A) Das Ogston Modell
- B) Das Entropiefalle Modell
- C) Das "nahe Gleichgewicht Kriechmodell"
- D) Das "Kriechfalle" Modell
- E) Das "orientiertes Kriechen" Modell
- F) Das "Falle" Modell

A) Das Ogston Modell:
 Es gilt für kleine DNA-Moleküle, verglichen mit dem mittleren Porenradius des Gels. Die Annahme ist, dass die DNA eine starre, kugelförmige Gestalt besitzt. Die elektrischen Feldstärken sind so gewählt, dass eine Umorientierung möglich ist wenn die DNA in einer Sackgasse immobilisiert ist. Es gilt für den Bereich zwischen 30 und

300 Nukleotiden (Konturlänge L Doppelstrang DNA: $0,34 \cdot 10^{-9}$ x M). Für die Mobilität gilt folgende Beziehung (Ogston1958):

$$\ln \mu = \ln \mu_0 - \alpha N \quad (2.18)$$

Hierbei ist μ_0 die Mobilität der DNA in freier Lösung, N ihre Länge und α eine Proportionalitätskonstante, die die Gelkonzentration einbezieht.

B) Das Entropiefalle Modell:

Es gilt für der DNA-Moleküle deren Größe vergleichbar mit dem mittleren Porenradius des Gels ist. Die Moleküle verbringen den größten Teil der Migrationszeit in Poren, deren Durchmesser größer ist als der Moleküldurchmesser. Das System muss daher viel Energie gegen die Entropiekräfte aufbringen, um die Moleküle durch die kleineren Poren zu den größeren zu befördern. Die Mobilität μ ist proportional zu $1/N^v$, wobei v zwischen 1,5 und 2,5 liegt.

C) Das "nahe Gleichgewicht Kriechmodell":

Es hat seine Gültigkeit für DNA-Moleküle, deren Durchmesser größer als die mittlere Porengröße des Geles ist und für thermische Kräfte, die nahezu denen gleichzusetzen sind, die durch das elektrische Feld erzeugt werden. Um sich durch das jetzt zu enge Gelnetzwerk zu bewegen, streckt sich das DNA-Knäuel teilweise unter dem Einfluss des elektrischen Feldes.

D) Das "Kriechfalle" Modell:

Die DNA ist vollständig gestreckt und beide Enden, die sich wie ein U um einen Gelknoten biegen, ziehen im Mittel mit der gleichen Kraft. Dieses überraschende Mobilitätsminimum konnte durch Computersimulationen vorhergesagt werden.

E) Das "orientiertes Kriechen" Modell:

Die DNA ist in Richtung des elektrischen Felde vollständig gestreckt. Die DNA-Moleküle migrieren mit größenunabhängigen Geschwindigkeiten. Dieses Modell gibt auch die Trenngrenze eines Geles und seiner Elektrophoresebedingungen vor. Bei

ungefähr 35V/cm liegt diese Grenze bei ungefähr 1400 Nukleotiden. Bei höheren elektrischen Feldern verschiebt sich diese Grenze zu kleineren Nukleotidzahlen.

F) Das "Falle" Modell:

Sehr große DNA Moleküle migrieren nicht in das Gel. Zum Beispiel wandern intakte menschliche Chromosomen nicht in Gele. Man nimmt an, dass sich die DNA um die Gelfasern wickelt und verknotet.

2.6 Polymermembranen

Polymertechnologie und Biochemie haben eines gemeinsam, dass bei Anwendungen nicht die chemische Struktur, sondern die Leistung im Vordergrund steht. So wie "Hormon" eine ähnliche Funktion chemisch sehr verschiedener Substanzen charakterisiert, stellt zum Beispiel "schlagfestes Polymeres" auf die Schlagfestigkeit ab. Die in dieser Arbeit vorgegebene Leistung lässt sich vielleicht am ehesten zwischen der Papierchromatographie und der Papierelektrophorese einstufen. Deshalb wurde auch ein speziell für die Papierchromatographie entwickeltes Papier und das in der Papierelektrophorese heutzutage am weitesten verbreitete Celluloseazetat in die Untersuchungen aufgenommen. Des weiteren wurden die heutzutage in der DNA-Hybridisierungs- und Filtrationstechnik verwendeten Polymermembranen untersucht. Nach der Schilderung der Problemstellung stellten Polymermembranhersteller ("Schleicher & Schuell", "Macherey & Nagel" und "Pall") weitere für diese Anwendung in Frage kommende Polymeres für Tests zur Verfügung.

Die Palette an Werkstoffen zur Herstellung der untersuchten Polymermembrantypen ist reichhaltig. Dabei wird zwischen cellulosischen und vollsynthetischen Polymeren unterschieden, wobei besonders Celluloseacetat, Polyamid (Nylon) und Polyethersulfone zu nennen sind (Abbildung 2.9). Das Hohlräumvolumen liegt zwischen 70-85% des gesamten Membranvolumens.

Celluloseacetat

steigender Temperatur größer, da die Dipole beweglicher werden. Die relativen Permeabilitäten werden durch polare Zusätze stark erhöht, z.B. durch Wasser ($\epsilon_r = 78,4$ bei 25°C).

Bei festen Zusatzstoffen wird das Auswandern der Zusatzstoffe "Ausbluten" genannt. Dieses Zusatzstoffe können, nach dem Erreichen des Laserstrahles im Trenngel, zu Änderungen des Photodiodenuntergrundes führen. Die in Polymeren eingearbeiteten niedermolekularen Zusatzstoffe sind entweder organische Verbindungen (Farbstoffe, Weichmacher, usw.) oder anorganische Stoffe (Füllstoffe, Pigmente, usw.). Sie werden in Additive und Modifikatoren unterteilt. Additive werden in kleineren Anteilen verwendet (meist weniger als 5%). Im Gegensatz zu den in größeren Anteilen verwendeten Modifikatoren beeinflussen sie praktisch nicht die mechanischen Eigenschaften. Additive und Modifikatoren werden nach der Polymerisation zugesetzt; sie erleichtern die Verarbeitung und verbessern die Endeneigenschaften. Sie sind von den Polymerisationshilfsmitteln zu unterscheiden, welche die Polymerisation fördern (Initiatoren, Katalysatoren, usw.). Die Gewichtsanteile an Zusatzstoffen sind bei Fasern meist gering. Sie betragen im Mittel bei Papieren 5%, bei Kunststoffen jedoch 23% und bei Elastomeren ca. 60%. In Polymere eingearbeitete Zusatzstoffe versuchen sich häufig zu entmischen und wandern an die Oberfläche bzw. an oder in den Kontaktstoff. In unserem Versuchsaufbau wird das Auswandern, elektrisch geladener Zusatzstoffe, noch wesentlich durch das angelegte elektrische Feld verstärkt.

2.7 Chemische Bindungen und Wechselwirkungen

Beim Auftragen der in dem polaren Lösungsmittel Formamid gelösten DNA auf die Membran wird der Großteil der Probenlösung durch Kapillarität - falls die Membran ebenfalls überwiegend polar ist - in die Membran absorbiert. Die sich dann in der Membran befindenden DNA Moleküle werden durch unterschiedliche Wechselwirkungen an der Membranoberfläche adsorbiert.

Abhängig von der Stärke des Zusammenhalts, der durch die Bindungsenergie (das ist die zur Bildung oder Spaltung der betreffenden Bindung erforderliche Energiebetrag) ausgedrückt wird, unterscheidet man Hauptvalenzbindungen und Nebenvalenzbindungen. Folgende Bindungsformen können die Adsorption hervorrufen:

Hauptvalenzbindungen

Die kovalente Bindung

Der wichtigste Bindungstyp in organischen Molekülen ist die starke (chemische) kovalente Bindung. Sie ist durch ein gemeinsames Elektronenpaar zwischen zwei in einem Molekül benachbarten Atomen charakterisiert. Die Bindungsenergien reichen von ungefähr 150 bis 900 kJ/mol. Die Länge dieser Bindung liegt zwischen 0,1 und 0,17 nm.

Die Ionische Bindung

Es handelt sich hierbei um elektrostatische Kräfte, die zwischen Ionen entgegengesetzter Ladung, zum Beispiel zwischen den Carboxyl- ($-\text{COO}^-$) und den Aminogruppen ($-\text{NH}_3^+$), auftreten. Die Bindungsenergie liegt zwischen 80 und 800 kJ/mol und die Länge der Bindung im Bereich von 0,25-0,28 nm. In wässrigem Milieu (oder allgemein in der Umgebung eines polaren Lösungsmittles), sinkt die Anziehung ungleichnamiger Partner aufgrund der Dielektrizitätskonstanten des Wassers von 78,4 bei 25°C auf $1/78,4$. Es genügt somit die thermische Energie bei Zimmertemperatur so dass, um die relativ schwache ionische Interaktion zu überwinden, die Stoffe ins wässrige (allgemein: polare) Medium dissoziieren.

Nebenvalenzbindungen

Neben der kovalenten Bindung sind die Moleküle zur Ausbildung einer Anzahl verschiedener Nebenvalenzen oder schwachen Interaktionen (Wechselwirkungen) befähigt. Oft wird auch der Begriff schwache Bindung genannt. Das mag zu Missverständnissen führen, weil man bei einem ΔG (freie Enthalpie) von 4 bis 30 kJ/mol kaum von einer Bindung reden darf. Diese Beträge liegen nämlich nur knapp über denen der thermischen Molekularbewegung von 3 bis 3,2 kJ/mol. Unter physiologischen Bedingungen werden Nebenvalenzen kontinuierlich geschlossen und wieder gebrochen, wobei die Halbwertszeit meist nur den Bruchteil einer Sekunde ausmacht.

Unter allen Reaktionsbedingungen besteht die Tendenz, die jeweils stärkst mögliche Wechselwirkung einzugehen. Die Nebenvalenzen sind besonders deshalb so wichtig, weil sie sich additiv verhalten und in der Summe außerordentlich stabile

Molekülkonformationen oder Aggregate bedingen. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Gestalt der beteiligten Reaktionspartner. Je komplementärer die Strukturen zueinander sind, desto mehr schwache Wechselwirkungen können eingegangen werden. In der vorliegenden Arbeit müssen die optimalen Bedingungen allerdings nicht unbedingt die sein, die die stärkste mögliche Wechselwirkung hervorrufen. Sie sollten gerade stark genug sein, ein einfaches Herunterwaschen der DNA von der Membran zu verhindern und erst durch ein äußeres elektrisches Feld den Transfer der DNA in das Gel gestatten.

Die Wasserstoffbrücken

Sie sind im Wesentlichen elektrostatischer Natur. Sie besitzen ungefähr 5 bis 10 % der Stärke ionischer Bindungen. Das ΔG liegt in der Größenordnung von 8-40 kJ/mol. Die Länge einer Wasserstoffbrücke liegt zwischen 0,27 und 0,31 nm. Wasserstoffbrücken bilden sich zwischen einem stark elektronegativen Atom (z.B. Stickstoff N und Sauerstoff O) eines Moleküls und einem Wasserstoffatom (H), das kovalent an ein anderes elektronegatives Atom gebunden ist, aus. Bei Makromolekülen können sowohl inter- als auch intramolekulare Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Sie sind am stärksten, wenn die beteiligten Moleküle linear angeordnet sind. Sobald zwischen zwei beteiligten Gruppen Winkel liegen, nimmt die Stärke drastisch ab.

Die Van der Waal'sche Wechselwirkung

Van der Waal'sche Kräfte sind schwache elektrostatische Kräfte, die durch geringfügige, fluktuierende Ladungsverschiebungen in den beteiligten chemischen Gruppen hervorgerufen werden. Die Bindungsenergien liegen zwischen 0,08–42 kJ/mol. Sie sind deshalb nur geringfügig höher als die Energie der Molekularbewegung von zirka 3 bis 4 kJ/mol. Die Länge einer Wasserstoffbrücke liegt bei ungefähr 0,35 nm Å. Durch diese Wechselwirkung werden häufig Moleküle der gleichen Art zusammengehalten. Die Wechselwirkungen sind von den Abständen der in Beziehung stehenden Atome (oder Atomgruppen bzw. Moleküle) abhängig. Bei zu geringen Abständen dominieren abstoßende Kräfte (Überlappung von Elektronenschalen).

Hydrophobe Wechselwirkung

Die hydrophobe Wechselwirkung beruht auf der Abstoßung zwischen nichtpolaren Molekülen (CH-Gruppen, die Basen der DNA) und ihrer polaren Umgebung (Wasser, Formamid, OH-Gruppen, NH-Gruppen). Aufgrund der Wasserstoffbrücken-Wechselwirkung zwischen Wassermolekülen besitzt Wasser eine besondere Struktur,

die eine hohe Oberflächenspannung verursacht. Gibt man ein nichtpolares Molekül in das Wasser, müssen Wassermoleküle auseinandergedrängt werden, das heißt, es wird Energie in das System gesteckt. Für das Gesamtsystem bedeutet dies eine ungünstigere Energiebilanz. Addiert man nun ein zweites nichtpolares Molekül wird das Gesamtsystem versuchen, die Energiebilanz so gering wie möglich zu halten. Dies spiegelt sich in der Zusammenlagerung der beiden nichtpolaren Moleküle wieder. Dieser Prozess setzt sich beliebig fort. Die Größenordnung der Bindungsstärke liegt bei ungefähr 4kJ/mol. Wenn man die Struktur des Wassers dadurch ändert, dass man Salze zusetzt, so werden die hydrophoben Wechselwirkungen beeinflusst. Allgemein gilt: Erhöht man die ionische Stärke, so erhöht sich die Stärke der hydrophoben Wechselwirkung. Beispiele hydrophober Gruppen sind das Kohlenwasserstoff Molekül und die Base eines Nukleotids (π Elektronenwolken befinden sich wegen Resonanz über und unter den Ringen). Als Beispiel eines hydrophilen Moleküls sei die OH-Gruppe genannt.

Bemerkungen:

- Schwache Wechselwirkungen sind additiv.
- Viele schwache Wechselwirkungen können starke Anziehungen bewirken.
- Alle schwachen Wechselwirkungen können selbst durch geringe Variation der Bedingungen geschlossen und wieder geöffnet werden.
- Da schwache Wechselwirkungen nur über kurze Distanzen wirken, hängt ihre Anzahl vom Grad der Komplementarität zweier Moleküle oder ihrer Untereinheiten ab.

2.8 Elektrophoretische Auflösung

Um die unterschiedlichen Experimente dieser Arbeit vergleichen zu können wird eine Messgröße benötigt, die die Qualität der Separation in einem Gel ausdrückt. In der Elektrophoreseliteratur wurden unterschiedliche Ausdrücke wie "Effizienz", "Selektivität" oder "Plattenhöhe" verwendet, was zu einigem Durcheinander führte. Die Leistungsfähigkeit eines jeden elektrophoretischen Systems hängt von zwei Faktoren ab:

1. Dem Abstand der Bänder, der oft "Selektivität" genannt wird (in unserem System ein zeitlicher Abstand, da der Laserstrahl die Ziellinie unterschiedlich schnell migrierender DNA Moleküle darstellt).

2. Der Band- oder Signalbreite der "Effizienz", die in "theoretischen Platten" ausgedrückt wird. Sie hängt unter anderem von der Diffusion, dem Temperaturgradienten über die Geldicke, der Adsorption, der Laserstrahldicke und der vertikalen räumlichen Ausdehnung der Startzone ab.

Nur die "Selektivität" oder nur die "Effizienz" als Ausdrucksmittel der Trennleistung eines Systems zu benutzen, ist trotz weiter Verbreitung nicht ausreichend. Die in dieser Arbeit verwendete Definition der elektrophoretischen Auflösung R_s pro Nukleotid (Abbildung 2.11), ist das Verhältnis aus dem zeitlichen Abstand der Maxima zweier Signale Δt geteilt durch die mittlere Halbwertsbreite der beiden Signale, $(t_{h2} + t_{h1})/2$.

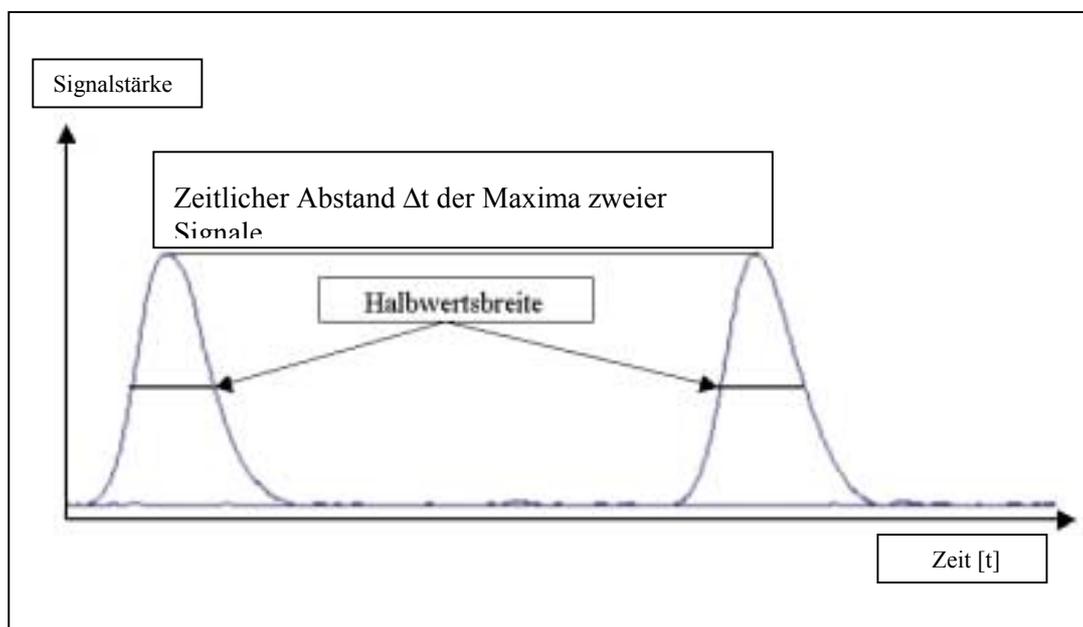


Abbildung 2.11: Die elektrophoretische Auflösung R_s ergibt sich aus dem Verhältnis der zeitlichen Abstände der Maxima zweier Signale Δt , geteilt durch die mittlere Halbwertsbreite der beiden Signale.

Die Halbwertsbreite eines Signals berechnet sich aus der Differenz der Signalzeiten bei Halbwertshöhe. Um die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Größenmarker herzustellen, wird dieser Wert durch die Anzahl der zwischen ihnen liegenden Nukleotide ΔN geteilt. Daraus folgt für die auf Einbasenabstand normierte elektrophoretische Auflösung:

$$R_s = \Delta t / [\frac{1}{2} \cdot (t_{h2} + t_{h1}) \cdot \Delta N] \quad (2.19)$$

Der zeitliche Abstand Δt berechnet sich aus der Differenz der Datenpunkte der Maxima der beiden in die Berechnung eingehenden Signale, multipliziert mit der Integrationszeit.

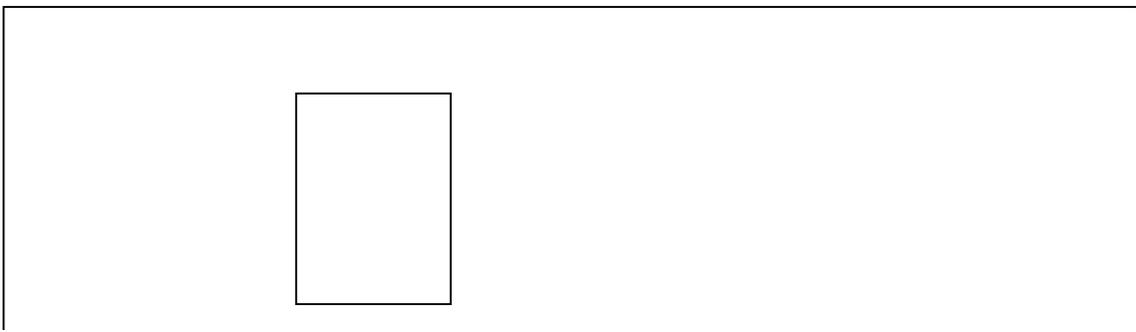
Die mittlere Halbwertsbreite zweier Signale berechnet sich aus der Summe der Halbwertsbreiten der beiden Signale, multipliziert mit der Integrationszeit geteilt durch 2. Durch das Auftreten der Integrationszeit als Faktor sowohl im Zähler als auch im Nenner ergibt sich:

$$R_s = \Delta D / [\frac{1}{2} \cdot (D_{h2} + D_{h1}) \cdot \Delta N] \quad (2.20)$$

Hierbei ist ΔD die Differenz der Datenpunkte der Maxima der beiden Signale und D_{h2} und D_{h1} deren Halbwertsbreiten ausgedrückt in Datenpunkten. Die elektrophoretische Auflösung R_s pro Nukleotid ist eine dimensionslose Größe.

2.9 Startzonenbetrachtung der Membranbeladung

Bei dem Auftragen der Probe auf die Membran wird die Probenlösung durch Kapillarität in die Membran aufgenommen. Nach dem Auftragen der Probenlösung auf die Membran besitzen die DNA Moleküle eine räumliche Ausdehnung, die abhängig vom aufgetragenen Probenvolumen ist. In der folgenden Betrachtung richtet sich die Aufmerksamkeit auf die elektrophoretische (vertikale) Auflösung, die von größter Wichtigkeit für die Sicherheit der Sequenzierdaten ist. Deshalb muss diese bei jeder Art der Untersuchung bestimmt werden. Die Möglichkeiten, die elektrophoretische Auflösung zu erhöhen, gehen aus Abbildung 2.12 hervor.



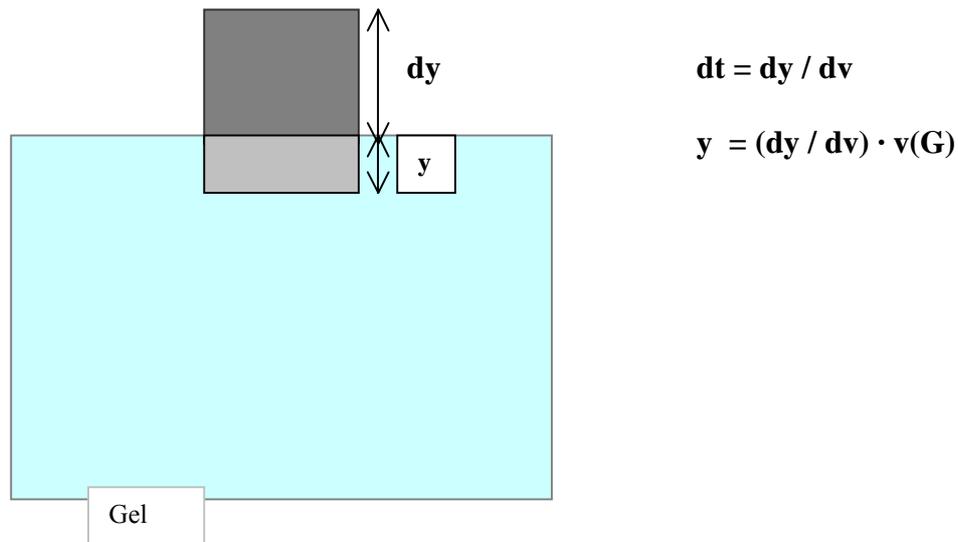


Abbildung 2.12: Diese Abbildung zeigt den mit dem Gel in Kontakt gebrachten Zahn eines Membrankammes. Hierbei entspricht dy der räumlichen Ausdehnung der Probe in der Membran und dt der Zeit bis das letzte DNA Fragment, nach dem Anlegen des äußeren elektrischen Feldes, in das Gel eintritt. Die Geschwindigkeit des jeweiligen DNA-Fragments in der Membran wird mit dv und in dem Gel mit $v(G)$ bezeichnet. Die durch das Beladen des Geles verursachte räumliche Ausdehnung im Gel y ergibt sich aus $y = (dy / dv) \cdot v(G)$.

2.10 Simulation des elektrischen Transferfeldes

Da die negativ geladenen DNA-Moleküle bei ihrem Eintritt in das Gel in umgekehrter Richtung den elektrischen Feldlinien des elektrischen Transferfeldes folgen, wurde um

die geeignete Membrangeometrie zu bestimmen das Programm „Quickfield“ der Firma Tera Analysis eingesetzt. Dieses löst numerisch die Laplace-Gleichung

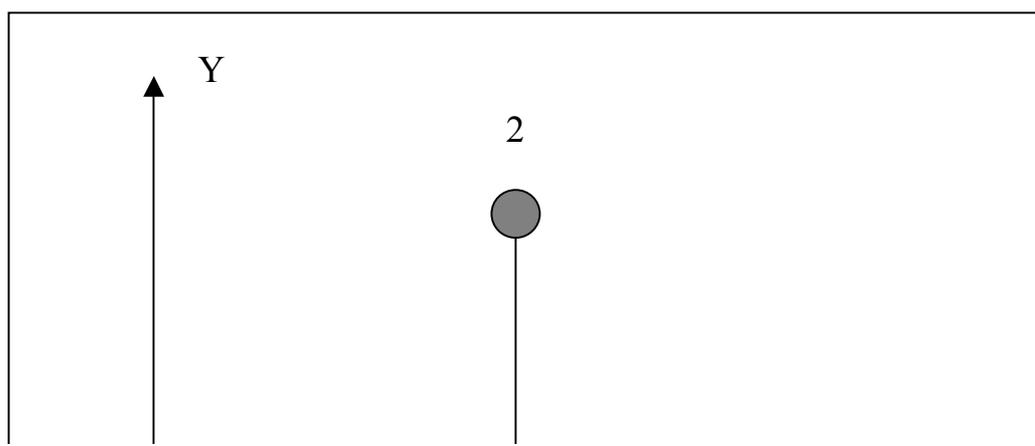
$$\Delta U = 0 \quad (2.21)$$

mit der Methode der finiten Differenzen. Das Programm berechnet die elektrischen Felder einer vorgegebenen Geometrie nach Eingabe der Randbedingungen.

Weiterhin gilt die folgende Tatsache: Jede Lösung der Laplace-Gleichung, d.h. jede Ortsfunktion $U(x,y)$, für die $\Delta U = 0$ ist, und die Randbedingungen des Problems erfüllt, ist eindeutig bestimmt. Zum besseren Verständnis dieses Programms, sollte man mit den Grundlagen dieser Approximationsmethode vertraut sein. Deshalb wird diese Methode nachfolgend zusammenfassend beschrieben.

Die Methode der finiten Differenzen

Die Grundlage dieser Methode ist, dass ein Netz, das aus Rechtecken oder Dreiecken besteht, über die betrachtete Region gelegt wird. Anstelle des in der gesamten Region definierten Skalarfeldes $U(x,y)$, werden nur noch die Werte von U in den Netzpunkten betrachtet. Bekannte Werte dieses Netzwerkes ergeben sich aus den Randbedingungen. Die anderen Werte lassen sich über die sogenannte „Fünfpunkt-Formel“, näherungsweise berechnen.



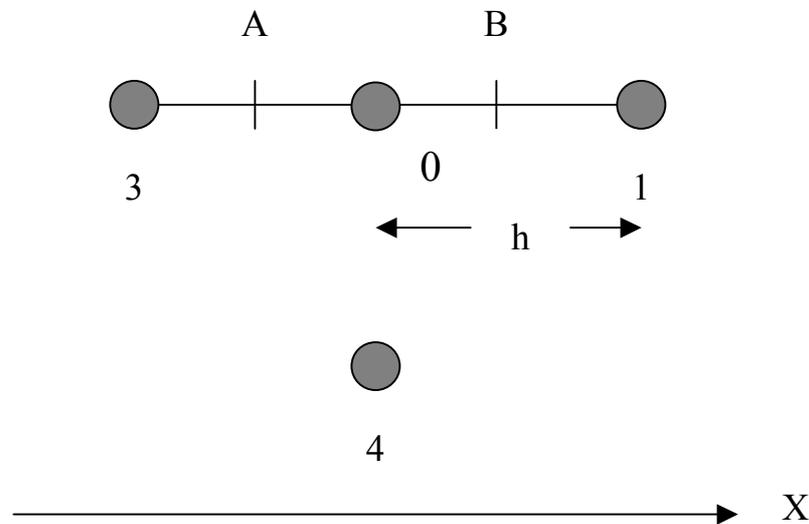


Abbildung 2.13: Der Netzknoten 0 und seine nächsten Gitternachbarn 1, 2, 3 und 4, wobei h der Abstand zwischen dem Netzknoten 0 und den Gitternachbarn ist. Die Punkte A und B sind die Mittelpunkte der Strecken von 3 und 1 nach 0.

Man hat es bei dieser Methode mit einer Region von fünf benachbarten Netzknoten zu tun (Abbildung 2.13). Es wird angenommen, dass U_0, U_1, U_2, U_3 und U_4 die Werte von U an den fünf Netzknoten bedeuten und dass h der Abstand zwischen Null und den Punkten von eins bis vier ist. Wir kennen darüber hinaus den Punkt A, der Mittelpunkt zwischen 0 und 3 ist. Man kann nun die partielle Ableitung von U nach x im Punkt A durch $(U_0 - U_3) / h$ abschätzen. Das gleiche Vorgehen wendet man auf den Punkt B an und erhält approximiert durch $(U_1 - U_0) / h$ seine partielle Ableitung von U nach x .

Da die Werte der ersten partiellen Ableitung von U nach x in A und B bekannt sind, kann man die zweite partielle Ableitung von U nach x in 0 abschätzen. Sie ist gegeben durch:

$$\frac{\partial^2 U}{\partial x^2} \approx \frac{\left(\frac{\partial U(A)}{\partial x} - \frac{\partial U(B)}{\partial x} \right)}{\partial h} \quad (2.22)$$

Setzt man die vorher gewonnenen Näherungen für die ersten Ableitungen ein, so erhält man:

$$\frac{\partial^2 U}{\partial x^2} \approx \frac{(U_1 - U_0)/h - (U_0 - U_3)/h}{h} = \frac{U_1 + U_3 - 2U_0}{h^2} \quad (2.23)$$

Die gleiche Herleitung für die Y-Richtung ergibt:

$$\frac{\partial^2 U}{\partial y^2} \approx \frac{U_2 + U_4 - 2U_0}{h^2} \quad (2.24)$$

Addiert man diese beiden Resultate so erhält man:

$$\Delta U = (U_1 + U_2 + U_3 + U_4 - 4U_0)/h^2 \quad (2.25)$$

Dies ist das allgemeine Resultat der Methode der finiten Differenzen und wird als „Fünfpunkt-Formel“ bezeichnet. Sie lässt sich folgendermaßen interpretieren: Sucht man die approximierten Werte von U in allen Netzpunkten, wobei U die Laplace-Gleichung erfüllen muss, so erhält man die Bedingung, dass U für alle benachbarten Netzpunkte folgende Bedingung erfüllen muss:

$$U_1 + U_2 + U_3 + U_4 - 4U_0 = 0 \quad (2.26)$$

Diese Gleichung nach U_0 umgeformt ergibt:

$$U_0 = (U_1 + U_2 + U_3 + U_4)/4 \quad (2.27)$$

Dadurch erhält man das Potential jedes inneren Punktes aus dem arithmetischen Mittel der Potentiale seiner vier nächsten Gitternachbarn. Falls man es mit N inneren Punkten zu tun hätte, könnte man N Gleichungen aufstellen. Insgesamt erhält man N lineare Gleichungen mit N Unbekannten.

Eine der verbreitetsten Methoden dieses Problem zu lösen, ist die *Relaxationsmethode* (vollständig die *Methode der aufeinanderfolgenden Relaxationen*). Sie ist kurz gesagt ein häufig wiederholtes Abtasten der Gitterpunkte der ganzen Region unter Berücksichtigung der Gleichung (2.27), wobei jeder innere Gitterpunkt abwechselnd zum Zentralpunkt 0 wird. Eine der Möglichkeiten dieses durchzuführen, ist vergleichbar mit dem Lesen eines Buches. Man durchläuft die Gitterpunkte von links nach rechts in der jeweiligen Zeile und durchfährt die aufeinanderfolgenden Zeilen von oben nach unten.

