

JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN

Erste Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien

Wissenschaftliche Hausarbeit

im Fach Chemie

vorgelegt von

Carl Christoph Hubbe

Thema:

**Optimierung der
optischen Komponenten
einer Kapillarelektrophorese - Apparatur**

Gutachter: Prof. Dr. Herbert Over

Gießen, im September 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Teil	3
2.1	Fluoreszenzfarbstoffe	3
2.1.1	Funktionsweise der Kapillarelektrophorese	3
2.1.2	Prinzip der Fluoreszenz	3
2.1.3	Eigenschaften der gebräuchlichsten Fluorophore	5
2.1.4	Annahmen zur Eignung der einzelnen Fluorophore	8
2.2	Der Laser	12
2.2.1	Allgemeine Funktionsweise des Lasers	12
2.2.2	Verschiedene Lasertypen	14
2.2.3	Der Halbleiter- bzw. Diodenlaser	14
2.2.3.1	<i>Die Leuchtdiode</i>	14
2.2.3.2	<i>Funktionsweise des Halbleiterlasers</i>	18
2.2.4	Der Festkörperlaser	19
2.2.4.1	<i>Der Neodymlaser</i>	19
2.2.5	Der Grün-Laser	21
2.3	Das Spektrometer	22
2.3.1	Huygenssches Prinzip	22
2.3.2	Interferenz von Wellen	22
2.3.3	Beugung am Gitter	24
2.3.4	Abnahme der Intensität mit zunehmender Ordnung	26
2.3.5	Aufbau eines Gitterspektrometers	28
2.4	Trennung der Oligonukleotide	29
2.4.1	Das Gel	30
2.4.2	Trennungsmodelle von DNA-Fragmenten	31
2.4.2.1	<i>Das Ogston-Modell</i>	32
2.4.2.2	<i>Das Reptation-Modell</i>	32
2.4.2.3	<i>Trennung der DNA in verdünnter Lösung</i>	33
2.4.2.4	<i>Einfluss der Polymerkonzentration</i>	35
2.4.2.5	<i>Einfluss des Elektrischen Feldes</i>	36
2.4.2.6	<i>Einfluss der Temperatur</i>	36

3 Berechnungen	37
3.1 Berechnung der Verschiebung des Brennpunkts	37
4 Experimenteller Teil	40
4.1 Versuchsbedingungen	40
4.2 Untersuchungen des Laserstrahls	41
4.2.1 Messungen ohne Filter am Spektrometer	41
4.2.2 Herkunft der Wellenlänge bei 1064 nm	42
4.2.3 Problem des breiten Signalbergs	46
4.3 Erster Versuch einer Kapillarelektrophorese	51
4.4 Vorversuche mit Si-Detektor und Voltmeter	53
4.4.1 Grundlagen für Messungen mit Si-Detektor und Voltmeter	53
4.4.2 Messungen mit dem Silizium-Detektor und Voltmeter	54
4.4.3 Messungen mit Objektträgern	58
4.4.4 Messungen mit größeren Widerständen	59
4.5 Möglichkeit zu Messungen in beleuchtetem Raum	62
4.6 Kapillarelektrophorese mit Si-Detektor und Voltmeter	62
4.6.1 Zweiter Versuch einer Kapillarelektrophorese	62
4.6.2 Dritter Versuch einer Kapillarelektrophorese	64
4.7 Umwandlung analoger in digitale Werte	66
4.8 Kapillarelektrophorese mit dem Computer	67
4.9 Das Programm	71
4.10 Zusammenfassende Betrachtung der durchgeführten Versuche	72
5 Ausblick und persönliche Einschätzung	74
6 Firmenliste	76
7 Literaturverzeichnis	78
8 Danksagung	83
9 Versicherung gemäß § 16 Abs. 10	84

1 Einleitung

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich als zweiter von mindestens zwei Teilen mit dem (Nach-) Bau einer funktionierenden und gleichzeitig preisgünstigen Kapillarelektrophorese-Apparatur. Durch den ersten Teil, der von Bernhard Schwabe ebenfalls in Form einer Zulassungsarbeit zum ersten Staatsexamen geschrieben wurde, ist die Themenstellung meiner Arbeit bereits vorgegeben.¹ Da es bisher nicht möglich war, die Fluoreszenz der Farbstoffe an den DNA-Molekülen zu detektieren, sollte dies mein Auftrag sein.

Die grundlegenden Theorien der Kapillarelektrophorese und ihre Verwendung in Wirtschaft und Forschung sind von Bernhard Schwabe in seiner wissenschaftlichen Hausarbeit genauso beschrieben worden, wie der geplante Einsatzbereich für die von uns entwickelte Apparatur. Das angestrebte Ziel ist noch immer, diese im physikalisch-chemischen Praktikum für Studierende der Chemie und im Besonderen der Biochemie einzusetzen. Auch der Aufbau der Apparatur und die bereits von Schwabe eingesetzten Bauteile möchte ich als bekannt voraussetzen dürfen. Da diese beiden Arbeiten eng aneinander gekoppelt sind, wollte ich Wiederholungen weitestgehend vermeiden.

Die Arbeit enthält zunächst einen theoretischen Teil. Das erste Unterkapitel stellt dabei die verschiedenen und gut erhältlichen Fluoreszenzfarbstoffe vor. Mit dem Hintergedanken, den bereits ausgewählten Farbstoff ROX eventuell durch einen empfindlicheren und damit leichter detektierbaren zu ersetzen, werden einige Abschätzungen und Berechnungen vorgenommen, um herauszubekommen, welcher Farbstoff am stärksten fluoresziert.

Es folgt in einem weiteren Unterkapitel die Beschreibung der für uns interessanten Lasertypen. Ohne das Wissen über deren Funktionsweise ließe sich nämlich ein Teil der aufgenommenen Spektren nicht erklären. Aus demselben Grund schließt sich im folgenden Kapitel die Beschreibung der Arbeitsweise des verwendeten Spektrometers an. Schließlich wird der theoretische Teil noch mit einem Kapitel über die Trennung der DNA-Fragmente in der Kapillare ergänzt. Dieses Kapitel hat zwar nur bedingt mit der eigentlichen Themenstellung meiner Arbeit zu tun, andererseits könnte ohne eine ordentliche Auftrennung der DNA nach ihrer Größe auch keine sinnvolle Detektion über die optischen Elemente erfolgen. Außerdem empfinde ich die bisherige Darstellung zu diesem Thema als zu verkürzt, wenn man bedenkt, dass die Trennung der Fragmente die eigentliche Aufgabe dieser Apparatur ist.

¹ [Vgl.: Schwabe, 2003]

In Kapitel 3 werden Überlegungen angestellt, wie der Detektor am besten eingestellt werden muss, um die vom Farbstoff ausgesandten Photonen zu größtmöglichen Teilen auffangen zu können.

Der größte und auch wichtigste Teil dieser Arbeit ist jedoch der experimentelle Teil. In diesem Bereich der Arbeit werden zunächst alle Bemühungen beschrieben, die ich angestrengt habe, um die Fragen zu klären, die sich aus den bereits von Schwabe durchgeführten Experimenten ergeben hatten. Im weiteren Verlauf werden dann sämtliche Experimente aufgeführt, mit deren Hilfe ich versucht habe, die Fluoreszenz der Farbstoffmoleküle zu detektieren. Nachdem diese Aufgabe erfreulicherweise gelungen ist, schließt meine Arbeit mit einigen Aufnahmen, die ich mit Hilfe des Computers von den Trennungsvorgängen der Fragmente erhalten habe.

Tatsächlich ließe sich noch einige Arbeit in die Feinabstimmung der Apparatur investieren, was aufgrund der begrenzten Zeit, die für eine Staatsexamensarbeit zur Verfügung steht, jedoch nicht möglich war.

In Abbildung 1.1 sieht man die Apparatur, wie sie zum Zeitpunkt des Abschlusses dieser Arbeit aussah.



Abb. 1.1: Kapillarelektrophorese-Apparatur mit Hochspannungsgerät (links oben) und angeschlossenem Rechner (rechts).

2 Theoretischer Teil

2.1 Fluoreszenzfarbstoffe

2.1.1 Funktionsweise der Kapillarelektrophorese

Eines der wichtigsten Bestandteile zur Durchführung einer Kapillarelektrophorese ist der fluoreszierende Farbstoff, mit dessen Hilfe die DNA-Fragmente markiert werden.

Wie bereits in der Arbeit von Bernhard Schwabe beschrieben, ist der Fluoreszenzfarbstoff an die DNA-Fragmente gebunden. Durch die angelegte Hochspannung werden die sich im leicht basischen Milieu befindlichen Nukleinsäureanionenreste mit den daran befindlichen Fluoreszenzfarbstoffmolekülen durch eine Kapillare gezogen. Sobald ein Fluorophor im „Fenster“ der Kapillare erscheint und mit dem Licht eines Lasers angestrahlt wird - in unserem Fall mit einer Wellenlänge von 532 nm - fängt der Farbstoff an, Licht einer definierten Wellenlänge zu emittieren. Diese Fluoreszenz sollte dann von einem geeigneten Detektor gemessen werden.²

Wegen der Wichtigkeit der Fluoreszenzfarbstoffe möchte ich zunächst noch einmal auf deren Funktionsweise eingehen.

2.1.2 Prinzip der Fluoreszenz

Fluoreszenz entsteht über einen Prozess mit mehreren Schritten, welcher vor allem bei Polyaromaten und Heterocyclen stattfindet. Das Diagramm in Abb. 2.1.1 stellt diesen Prozess schematisch dar.

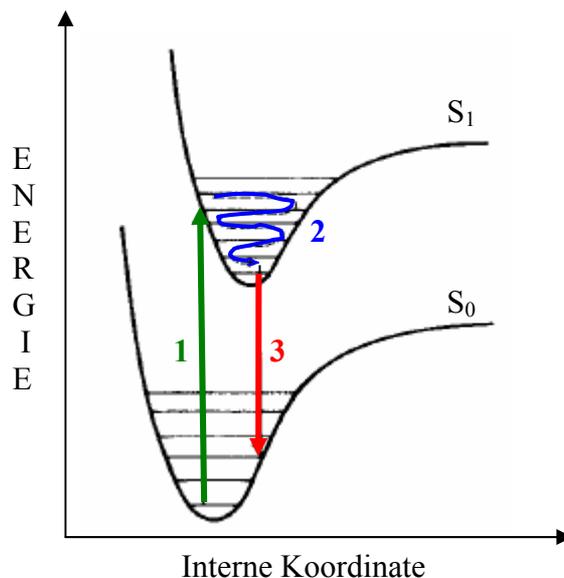


Abb. 2.1.1:
Darstellung der einzelnen Schritte
Anregung (1), Schwingung (2) und
Emission (3) eines Fluorophoren
[Vgl.: Physikalische Chemie: Prinzip
von Franck-Condon, 2004]

² [Vgl.: Schwabe, 2003, S. 11 ff]

In Abb. 2.1.1 sind die Schwingungsniveaus des elektronischen Grundzustandes S_0 und die des ersten elektronisch angeregten Zustandes S_1 dargestellt. Der Abstand zwischen den Atomen eines Moleküls im Grundzustand ist kleiner als im angeregten Zustand. Dies ist in der Abbildung dadurch gekennzeichnet, dass das Minimum der oberen Kurve S_1 im Koordinatensystem nach rechts verschoben ist.³

Der erste Schritt bei der Fluoreszenz ist die Anregung der Farbstoffmoleküle durch die Bestrahlung mit einer externen Quelle.⁴ In unserem Fall ist die Anregungsquelle der Laser mit der Wellenlänge 532 nm. Diese Anregung nennt man Absorption. Sie läuft in der Weise ab, dass ein Elektron aus einem bindenden π -Orbital in den Aromaten des Farbstoffes in ein antibindendes π^* -Orbital angehoben wird.⁵ Nach dem Franck-Condon Prinzip ändert sich der Kernabstand während des Elektronensprungs nicht. In der Darstellung bedeutet dies, dass der elektronische Übergänge "vertikal" stattfinden, d.h. ein Elektron, das aus dem untersten Schwingungsniveau von S_0 nach S_1 angeregt wird, "landet" in S_1 nicht im untersten Schwingungsniveau, sondern auf einem höheren. Im zweiten Schritt relaxiert das Molekül in den untersten Schwingungszustand des elektronisch angeregten Zustandes S_1 . Von diesem kehrt es dann im dritten Schritt unter Emission eines Photons wieder in den Grundzustand S_0 zurück. Auch dies geschieht wiederum nach dem Franck-Condon Prinzip. Das Elektron gelangt deshalb meist in ein etwas angehobenes Schwingungsniveau aus S_0 und relaxiert von dort in das unterste Schwingungsniveau (in der Abbildung 2.1.1 nicht eingezeichnet). Die Folge ist, dass das Fluoreszenzlicht energieärmer ist als das Licht, mit dem angeregt wurde. Demnach besitzen die emittierten Photonen eine größere Wellenlänge.⁶

Es gelangen jedoch nicht alle angeregten Moleküle über den „Umweg“ des Schrittes (2) in den Grundzustand zurück, sondern sie geben ihre Energie teilweise an ihre Umgebung ab, ohne dabei zu fluoreszieren.⁷

Ein guter Fluorophor zeichnet sich durch eine starke Absorption des eingestrahnten Lichts aus. Angegeben wird diese Eigenschaft im molaren Extinktionskoeffizienten ϵ . Des Weiteren ist eine hohe Quantenausbeute $\Phi > 0,7$ erstrebenswert.⁸ Die Quantenausbeute ist das Verhältnis zwischen der Anzahl der emittierten und der Anzahl der absorbierten Photonen pro Zeiteinheit.

³ [Vgl.: Franck-Condon-Prinzip, 2004, S. 1]

⁴ [Vgl.: Johnson, 1996, S. 1]

⁵ [Vgl.: Becker, 1983, S. 72]

⁶ [Vgl.: Franck-Condon-Prinzip, 2004, S. 1]

⁷ [Vgl.: Johnson, 1996, S. 1]

⁸ [Vgl.: TIB MOLBIOL: Formate, 2004, S. 1]

$$\Phi = \frac{\text{Anzahl der emittierten Photonen}}{\text{Anzahl der absorbierten Photonen}}^9 \quad (\text{Gl. 2.1.1})$$

Die Quantenausbeute reagiert empfindlich auf die Umgebung der Fluorophoren. Sie ändert sich z.B. mit dem pH-Wert oder der Temperatur des Lösungsmittels und kann, gebunden an DNA-Fragmente oder Proteine, auch durch diese Anbindung stark beeinflusst werden.¹⁰

Tatsächlich habe ich auch keine Absolutwerte für die Stärke der Fluoreszenz der einzelnen Farbstoffe gefunden. Lediglich die Aussage, dass man keine solchen Werte erhebe, da sie bereits bei geringen Veränderungen der Bedingungen abweichen würden.

2.1.3 Eigenschaften der gebräuchlichsten Fluorophore

Vier übliche Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen DNA-Moleküle markiert werden, sind die unter den folgenden Abkürzungen bekannten Farbstoffe FAM, JOE, TAMRA und ROX.¹¹ Ihre Strukturformeln sind in Abb. 2.1.2 abgebildet. Es ist sehr leicht ersichtlich, dass alle vier Fluorophore Polyaromaten sind.

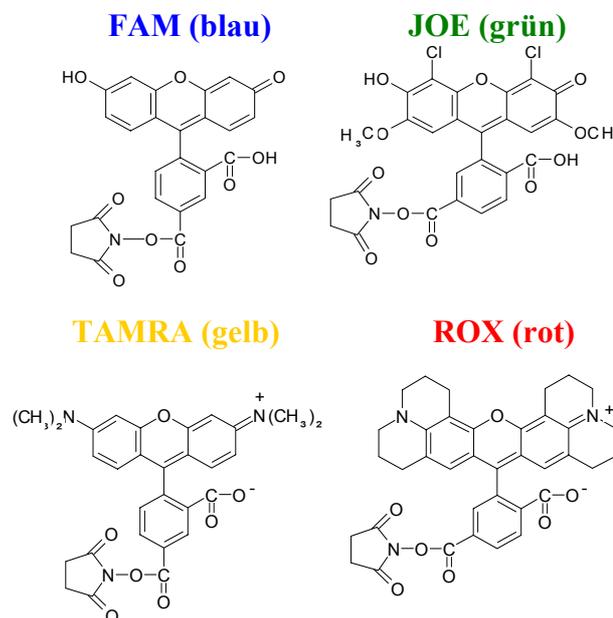


Abb. 2.1.2: Strukturformeln der vier typischen Fluoreszenzfarbstoffe FAM, JOE, TAMRA und ROX [aus: Butler, 2001, S. 154]

⁹ [Vgl.: TOPIC 7.3: Quantum yield, 2004, S. 1]

¹⁰ [Vgl.: PROMEGA: Fluorophore Characteristics, 2004, S. 3]

¹¹ [Vgl.: Butler, 2001, S. 154]

In einem anderen Farbstoffsystem der Firma Applied Biosystems, PowerPlex 16, wird anstelle des Farbstoffes FAM der Farbstoff Fluorescein (FL) eingesetzt. Außerdem enthält das System den roten Farbstoff namens CXR.¹² Dabei handelt es sich jedoch um denselben Farbstoff wie bei ROX. Üblich ist auch die Verwendung des Farbstoffes NED, der, ebenfalls gelb, oftmals den Fluorophor TAMRA ersetzt.¹³ Im Folgenden sind sämtliche Absorptions- und Emissionsspektren der bereits erwähnten Fluoreszenzfarbstoffe abgebildet. Ergänzt wird dies noch durch die Spektren der Farbstoffe TET und HEX. Lediglich das Absorptionsspektrum von NED konnte ich nicht finden.

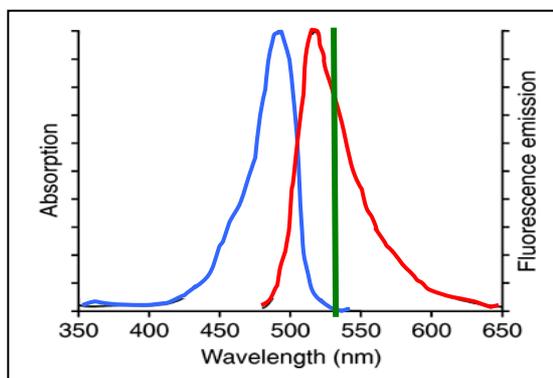


Abb. 2.1.3: Absorptions- und Emissionsspektrum von 5-FAM bei 490/520 nm in Puffer mit pH 9.0 [aus: MOLECULAR PROBES: Spectra-5-FAM/pH 9.0] Der grüne Balken steht für den Laserstrahl bei 532 nm.

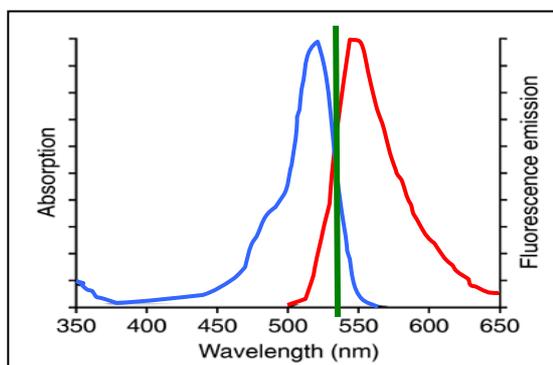


Abb. 2.1.4: Absorptions- und Emissionsspektrum von 6-JOE bei 530/560 nm in Puffer mit pH 9.0 [aus: MOLECULAR PROBES: Spectra-6-JOE/pH 9.0] Der grüne Balken steht für den Laserstrahl bei 532 nm.

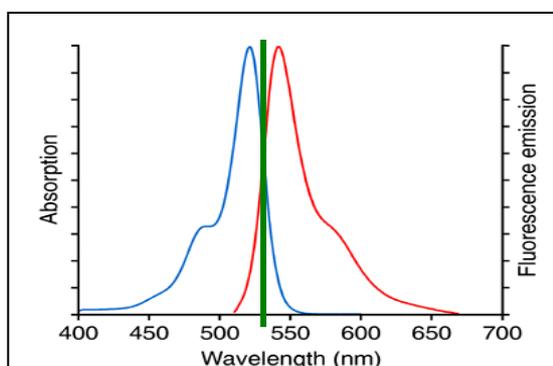


Abb. 2.1.5: Absorptions- und Emissionsspektrum von 6-TET bei 520/550 nm in Puffer mit pH 9.0 [aus: MOLECULAR PROBES: Spectra-6-TET/pH 9.0] Der grüne Balken steht für den Laserstrahl bei 532 nm.

¹² [Vgl.: BUTLER: Chapter 5, 2004, S. 18]

¹³ [Vgl.: Butler, 2001, S. 154]

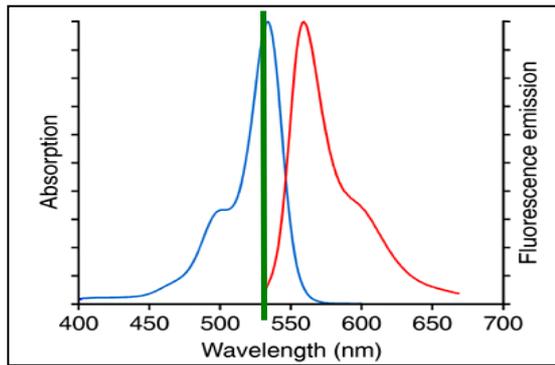


Abb. 2.1.6: Absorptions- und Emissionsspektrum von 6-HEX bei 535/570 nm in Puffer mit pH 9.0 [aus: MOLECULAR PROBES: Spectra-6-HEX/pH 9.0] Der grüne Balken steht für den Laserstrahl bei 532 nm.

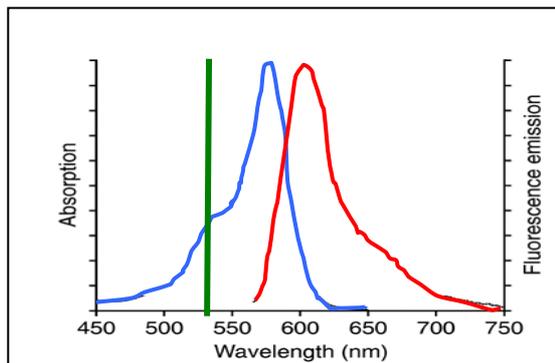


Abb. 2.1.7: Absorptions- und Emissionsspektrum von 5-ROX bei 580/610 nm in Puffer mit pH 7.0 [aus: MOLECULAR PROBES: Spectra-5-ROX/pH 7.0] Der grüne Balken steht für den Laserstrahl bei 532 nm.

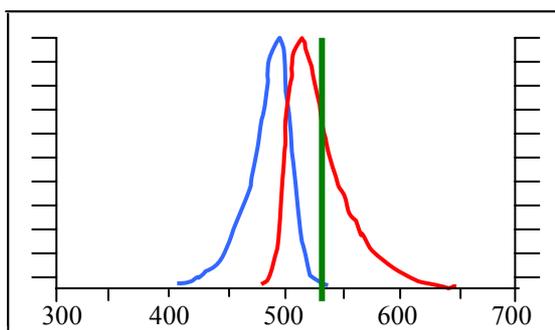


Abb. 2.1.8:
Das Abs.-Maximum von Fluorescein bei 490 nm und das dazugehörige Em.-Maximum bei 514 nm [aus: R-Q PROBES, 2004, S. 7] Der grüne Balken steht für den Laserstrahl bei 532 nm.

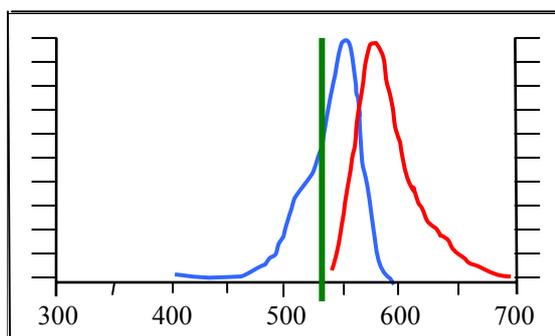


Abb. 2.1.9:
Das Abs.-Maximum von TAMRA bei 555 nm und das dazugehörige Em.-Maximum bei 580 nm [aus: R-Q PROBES, 2004, S. 7] Der grüne Balken steht für den Laserstrahl bei 532 nm.

Die Firma Applied Biosystems hat Angaben zur Empfindlichkeit der Farbstoffe gemacht, jedoch nur vergleichende Werte, keine absoluten. Hierbei fehlen aber sämtliche Angaben, unter welchen Bedingungen diese Werte erhoben wurden.¹⁴

¹⁴ [Vgl.: APPLIED BIOSYSTEMS: Prism™-Tips 5, 2004, S. 4]

	Abnehmende Empfindlichkeit →					
Farbstoff	FAM	JOE/TET	HEX	NED	TAMRA	ROX
Sensitivität	100%	100%	50%	50%	25%	12%

Abb. 2.1.10: Relative Angaben zur Empfindlichkeit von sieben Fluoreszenzfarbstoffen [Vgl.: APPLIED BIOSYSTEMS: PrismTM-Tips 5, 2004, S. 4]

Die Angaben zur Empfindlichkeit lassen sich jedoch erklären, wenn man die ausgesendeten Wellenlängen des verwendeten Lasers kennt. Das System ABI Prism 310 verwendet einen Argonionenlaser, der Licht der Wellenlängen 488 nm und 514 nm aussendet.¹⁵ Betrachtet man nun die Absorptionsmaxima von FAM, JOE und TET, so liegt das Maximum von FAM bei ca. 490 nm und die Maxima von JOE und TET bei etwa 520 nm, also in Bereichen der Laseremissionen. Bei der Anregung mit der größeren Wellenlänge des Lasers erreicht man bei HEX ungefähr 50% des Absorptionsmaximums, bei TAMRA etwa 25% und bei ROX lediglich ein Achtel.

Diese Werte für die Empfindlichkeit entsprechen jedoch nicht genau den zu erreichenden Empfindlichkeiten mit unserem Laser, da dieser Licht der Wellenlänge 532 nm emittiert. In den Abbildungen 2.1.3 bis 2.1.9 habe ich unseren Laserstrahl bei 530 nm jeweils durch einen grünen Strich gekennzeichnet.

Die Eignung der einzelnen Farbstoffe bei einer Anregung durch unseren Laser wird in Kapitel 2.1.4 diskutiert.

2.1.4 Annahmen zur Eignung der einzelnen Fluorophore

Zunächst sollte klar sein, dass alle Farbstoffe für uns unbrauchbar sind, deren Emissionsmaximum im selben Wellenlängenbereich liegt wie die Laserstrahlung. Denn um die Emission der Farbstoffe detektieren zu können, muss die Laserstrahlung vor dem Detektor herausgefiltert werden. Liegen Laserstrahlung und Fluoreszenz jedoch zu dicht beieinander, so würde mit dem Laserlicht immer auch die Fluoreszenz des Farbstoffes weggefiltert. Aus diesem Grund scheiden die Farbstoffe FAM und Fluorescein für uns eigentlich schon aus. Trotzdem werde ich sie unten bei meinen Abschätzungen mit bedenken.

Wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, hat die Firma Applied Biosystems Angaben zur Empfindlichkeit der Farbstoffe gemacht. An den Absorptionskurven sollte man die

¹⁵ [Vgl.: Butler, 2001, S. 155]

Empfindlichkeit bei einer Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 532 nm selbst abschätzen können.

Zu fünf Fluoreszenzfarbstoffen habe ich Angaben zur Quantenausbeute und dem molaren Extinktionskoeffizienten gefunden, siehe Tab. 2.1.11 Zusammen mit diesen Werten lässt sich der am besten geeignete Farbstoff finden.

Fluorophor	FL	FAM	JOE	TAMRA	ROX
Mol. Ext.-Koeffizient ϵ [$l \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$]	91.000	79.000	71.000	103.000	82.000
Quantenausbeute Φ	0,9	0,9	0,6	0,2	0,7

Tab. 2.1.11: Angaben zum molaren Extinktionskoeffizienten ϵ und der Quantenausbeute Φ . Die Werte von FL und FAM wurden bei pH 9,0 gemessen, alle anderen Werte bei pH 7,0 [Vgl.: PROMEGA: Fluorophore Characteristics, 2004, S. 5]

Für die Farbstoffe HEX und TET betragen die Werte für den molaren Extinktionskoeffizienten $73.000 (l \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1})$.¹⁶ Die passenden Quantenausbeuten konnte ich jedoch nicht finden.

Bei einer Laserleistung von etwa 1 mW und der Annahme, dass 70% dieser Leistung nicht von der Kapillare gestreut würden, erhält man eine Leistung von $7 \cdot 10^{-4} \frac{J}{s}$. Dieser Wert, dividiert durch die Energie pro Photon von $3,7 \cdot 10^{-19} J$ bei 532 nm, ergibt schließlich die Anzahl der vom Laser ausgestrahlten Photonen, die von der Kapillare nicht gestreut werden.

$$N_{Kap} = \frac{7 \cdot 10^{-4}}{3,7 \cdot 10^{-19}} \frac{J}{s \cdot J} \approx 1,9 \cdot 10^{15} \cdot s^{-1} \quad (\text{Gl. 2.1.2})$$

Die Extinktion, der Teil der vom Laser eingestrahnten Photonen, der tatsächlich von den Molekülen absorbiert wird, hängt unter anderem vom molaren Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe ab. Außerdem von der Konzentration der Farbstoffmoleküle und der Schichtdicke. Berechnen lässt sich dieser Wert nach Gleichung 2.1.3.¹⁷

$$\text{Ext}_{(\text{Dye})} = c \cdot d \cdot \epsilon_{(\text{Dye})} \quad (\text{Gl. 2.1.3})$$

Für die Konzentration der Farbstoffe wurde der Wert $10^{-7} mol \cdot l^{-1}$ angenommen und der Innendurchmesser der Kapillare beträgt $7,5 \cdot 10^{-3} cm$.

¹⁶ [Vgl.: SYNTHETIC GENETICS: Dye Chart, 2004, S. 1]

¹⁷ [Vgl.: Schwedt, 1995, S. 223 f]

Die Zahl der tatsächlich absorbierten Photonen errechnet sich aus dem Produkt von N_{Kap} und $\text{Ext}_{(\text{Dye})}$.

$$N_{\text{Abs}} = N_{\text{Kap}} \cdot \text{Ext}_{(\text{Dye})} \quad (\text{Gl. 2.1.4})$$

Daraus folgt für die Farbstoffe FL, FAM, JOE, TAMRA und ROX bei den oben angenommenen Werten für die Konzentration des Farbstoffes und Innendurchmesser der Kapillare:

$$\begin{aligned} N_{\text{Abs}} &= (1,9 \cdot 10^{15} \cdot \text{s}^{-1}) \cdot (10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}) \cdot (7,5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}) \cdot \epsilon_{(\text{Dye})} \\ &= 1,425 \cdot 10^6 \text{ mol} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \epsilon_{(\text{Dye})} \end{aligned} \quad (\text{Gl. 2.1.5})$$

Fluorophor	FL	FAM	JOE	TAMRA	ROX
Mol. Ext.-Koeffizient ϵ [$\text{l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$]	91.000	79.000	71.000	103.000	82.000
N_{Abs} [s^{-1}]	$1,30 \cdot 10^{11}$	$1,13 \cdot 10^{11}$	$1,01 \cdot 10^{11}$	$1,47 \cdot 10^{11}$	$1,17 \cdot 10^{11}$

Tab. 2.1.12: Errechnete Werte für die Zahl der absorbierten Photonen pro Sekunde mit Hilfe von Gleichung 2.1.5 und den Werten aus Tab. 2.1.11

Die Zahl der emittierten Photonen berechnet sich aus dem Produkt der Anzahl absorbierten Photonen aus Tab. 2.1.12 und der Quantenausbeute Φ . Die Werte für die Quantenausbeute sind farbstoffspezifisch und in Tabelle 2.1.13 nochmals angegeben.

$$N_{\text{Emiss}} = N_{\text{Abs}} \cdot \Phi_{(\text{Dye})} \quad (\text{Gl. 2.1.6})^{18}$$

Fluorophor	FL	FAM	JOE	TAMRA	ROX
$\Phi_{(\text{Dye})}$ [keine Einheit]	0,9	0,9	0,6	0,2	0,7
N_{Emiss} [s^{-1}]	$1,17 \cdot 10^{11}$	$1,02 \cdot 10^{11}$	$6,06 \cdot 10^{10}$	$2,94 \cdot 10^{10}$	$8,19 \cdot 10^{10}$

Tab. 2.1.13: Errechnete Werte für die Zahl der emittierten Photonen pro Sekunde mit Hilfe von Gleichung 2.1.6 und den Werten aus Tab. 2.1.11 und 2.1.12 unter Anregung im Wellenlängenbereich des jeweiligen Absorptionsmaximums

¹⁸ [Schwabe, 2003, S. 44 ff]

Nun ist jedoch noch zu bedenken, dass die Empfindlichkeit der einzelnen Farbstoffe vom Wert eins nach unten hin abweicht, wenn die Anregung bei einer Wellenlänge geschieht, die nicht im Wellenlängenbereich des Absorptionsmaximums des jeweiligen Farbstoffes liegt. Bei einer Bestrahlung der Farbstoffe JOE bzw. TET und ROX mit 514 nm benötigt man daher achtmal soviel ROX-Moleküle wie von den anderen beiden Farbstoffen, um ein gleich starkes Signal zu erhalten.¹⁹ Die oben errechneten Zahlenwerte für die emittierten Photonen pro Zeiteinheit beachten diesen Faktor jedoch nicht.

In den Abbildungen 2.1.3 bis 2.1.9 ist der Laserstrahl der Wellenlänge 530 nm eingezeichnet. Die in Tab. 2.1.14 eingesetzten Werte für die Empfindlichkeit sind daran von mir abgeschätzt worden. Mit diesen Empfindlichkeitsfaktoren wurden dann die Ergebnisse für N_{Emiss} aus Tab. 2.1.13 multipliziert.

Fluorophor	FL	FAM	JOE	TAMRA	ROX
$N_{\text{Emiss}} [\text{s}^{-1}]$	$1,17 \cdot 10^{11}$	$1,02 \cdot 10^{11}$	$6,06 \cdot 10^{10}$	$2,94 \cdot 10^{10}$	$8,19 \cdot 10^{10}$
Empfindlichkeit [ohne Einheit]	0,03	0,02	0,60	0,58	0,34
$N_{\text{Emiss}(530)} [\text{s}^{-1}]$	$3,51 \cdot 10^9$	$2,04 \cdot 10^9$	$3,64 \cdot 10^{10}$	$1,71 \cdot 10^{10}$	$2,78 \cdot 10^{10}$

Tab. 3.1.14: Errechnete Werte für die tatsächliche Anzahl der emittierten Photonen pro Sekunde bei einer Anregung mit der Wellenlänge von 530 nm

Die stärkste Fluoreszenz sollte sich demnach beim Farbstoff JOE erfassen lassen. Wobei der Unterschied zwischen JOE und ROX jedoch nicht gravierend ist. Da zudem fertig bereitete Lösungen mit DNA-Fragmenten und den daran gebundenen ROX-Molekülen im Handel leicht erhältlich sind, hat sich mein Vorgänger Bernhard Schwabe für den Farbstoff ROX entschieden. Auf dessen Fluoreszenz wurden deshalb auch die Filter ausgerichtet, die, wie in Abb. 4.4.1 ersichtlich, Strahlung zwischen 580 nm und 630 nm durchlassen.

Wie in Abb. 2.1.6 zu erkennen ist, hätte der Farbstoff HEX die größte Empfindlichkeit bei unserer Laseranregung. Seine tatsächliche Emissionsleistung kann ich jedoch nicht errechnen, da ich keine Angaben zur Quantenausbeute dieses Farbstoffes habe.

¹⁹ [Vgl.: APPLIED BIOSYSTEMS: GeneScan Reference Guidem, 2004, S. 15]

2.2 Der Laser

2.2.1 Allgemeine Funktionsweise des Lasers

Bei dem in Kapitel 2.1.2 beschriebenen Vorgang der Fluoreszenz wird Energie durch **spontane Emission** von Photonen abgegeben.²⁰ Diese spontane Emission kommt beim Laser ebenfalls vor, der eigentliche Lasereffekt geschieht jedoch durch **stimulierte Emission**, so wie es der Name bereits zum Ausdruck bringt. Denn Laser ist die Abkürzung für *light amplification by stimulated emission of radiation*.²¹

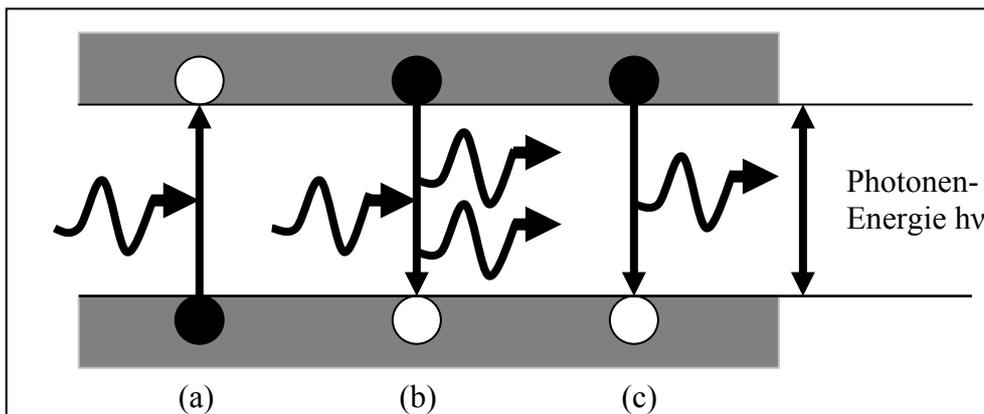


Abb. 2.2.1: Beispiel für Fundamentalarbeit (a), induzierte Emission (b) und spontane Emission (c) [Vgl.: Bludau, 1995, S. 115]

Um zu verstehen, was stimulierte Emission bedeutet, sollten zunächst die Vorgänge der **Fundamentalarbeit** veranschaulicht werden. Dabei wird ein Photon mit der Energie $h\nu$ [$h = 6,6 \cdot 10^{-34}$ Js, $\nu =$ Lichtfrequenz]²² auf die Atome, Ionen oder Moleküle eingestrahlt. Das Photon überträgt seine Energie auf ein Elektron und regt dieses dadurch energetisch an, siehe Abb. 2.2.1 (a). Das Gegenteil davon ist die stimulierte Rekombination. Das eingestrahlte Photon zwingt ein Elektron, vom energetisch höheren Zustand in den tieferen zu wechseln. Dabei wird die Energie in Form eines weiteren Photons abgegeben, welches dieselbe Ausbreitungsrichtung und Energie besitzt wie das stimulierende Photon, siehe Abb. 2.2.1 (b). Die auf diese Weise entstehende Strahlung heißt stimulierte Emission oder auch induzierte Emission. Beide Photonen laufen zusammen und wirken beide als Initialphotonen für neue stimulierte Emissionen. Die Photonenzahl bzw. die Lichtintensität wächst daher lawinenartig an, siehe Abb. 2.2.2 (c).

²⁰ [Vgl.: Atkins, 1987, S. 485]

²¹ [Vgl.: TURKAN, Der Laser, 2004, S. 1]

²² [Vgl.: Donges, 1988, S. 17]

Wie leicht zu erkennen ist, sind Fundamentalabsorption und stimulierte Emission Konkurrenzprozesse. Ob eingestrahelte Photonen absorbiert werden, oder sich durch stimulierte Emission „vermehren“, hängt deshalb davon ab, ob sich die Elektronen mehrheitlich im angeregten oder im Grundzustand befinden. Im thermodynamischen Gleichgewicht ist immer letzteres der Fall.²³ Eine solche Verteilung ist in Abb. 2.2.2 (a) zu sehen.

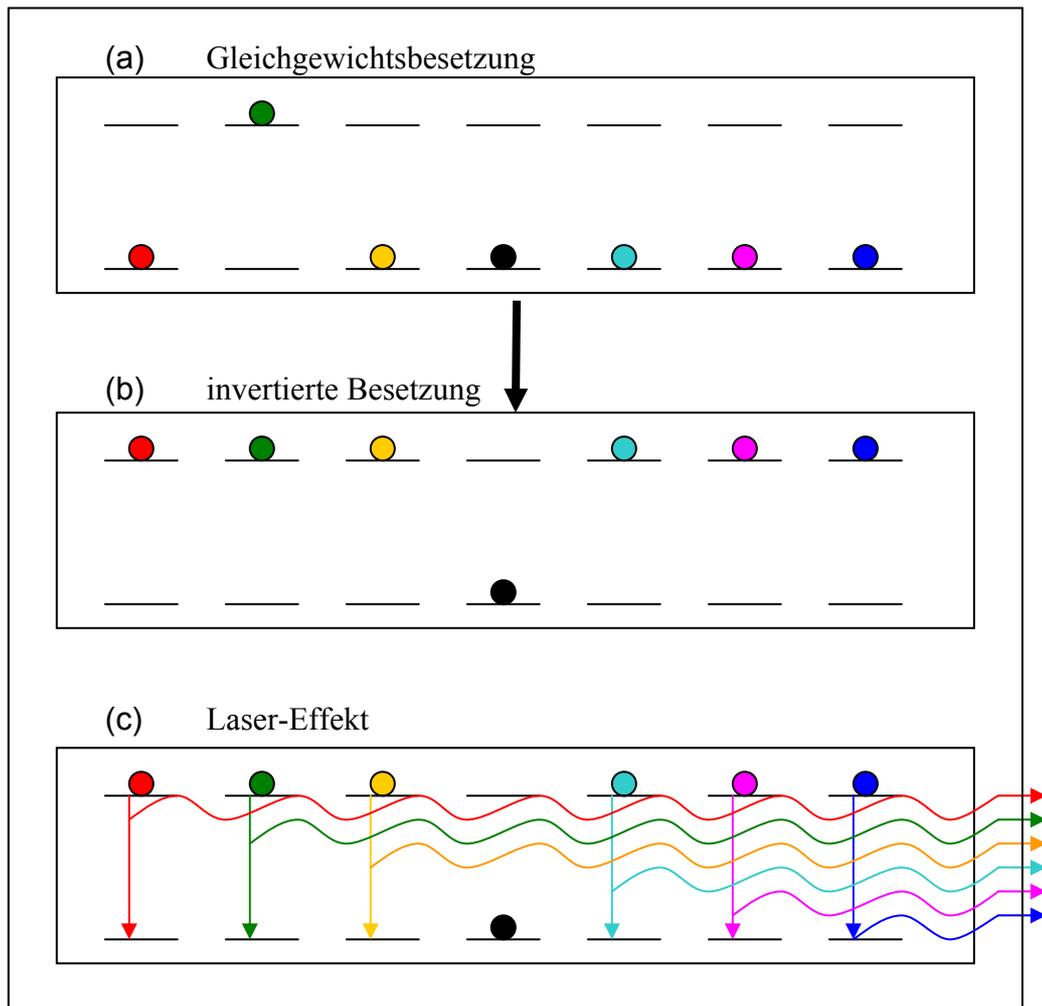


Abb. 2.2.2: Die einzelnen Schritte beim Laser-Prozess. Vereinfachend wurde das nicht existierende Zwei-Niveau-System dargestellt. [Vgl.: Atkins, 1987, S. 485]

Mit Hilfe des Lasers ist es möglich, die Mehrzahl der Atome, Ionen oder Moleküle in den angeregten Zustand zu bringen, siehe 2.2.2 (b); man nennt diesen Zustand Inversionszustand. Diese Probe befindet sich zwischen zwei Spiegeln, von denen einer der beiden halb durchlässig ist. Dieser Bereich des Lasers wird Resonator genannt. Wenn nun ein Atom oder Molekül ein Photon spontan emittiert (Abb. 2.2.1 (c)), so wird

²³ [Vgl.: Bludau, 1995, S. 115 f]

dieses zwischen den Spiegeln hin und her reflektiert. Dabei stimuliert dieses Photon andere angeregte Atome, Ionen bzw. Moleküle zur kohärenten Emission (Abb. 2.2.2 (c)).²⁴ Durch den halbdurchlässigen Spiegel kann ein Teil der Photonen den Laser verlassen und somit kommt es zum Laserstrahl.

In Abb. 2.2.2 ist vereinfachend ein so genanntes 2-Niveau-System dargestellt. Ein solches ist jedoch nicht geeignet, mittels Einstrahlung durch Licht Inversion zu erzeugen. Dies liegt daran, dass mit dem Anwachsen der Elektronen im angeregten Zustand auch die Wahrscheinlichkeit für induzierte Emission in gleichem Maße wächst. Das Strahlungsfeld, welches die Atome anregt, regt die Atome auch gleichzeitig wieder ab. Dadurch werden die oberen Energieniveaus wieder entvölkert. Um Inversion zu erzeugen und um damit Laserlicht zu ermöglichen, benötigt man daher ein 3-Niveau-System oder auch, wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben, ein 4-Niveau-System.²⁵

2.2.2 Verschiedene Lasertypen

Es gibt verschieden Arten von Lasern. Dazu gehören u. a. die **Gaslaser**, die **Farbstofflaser**, die **Halbleiter-** oder **Diodenlaser**, sowie die **Festkörperlaser**. Alle funktionieren nach dem unter Punkt 2.2.1 allgemein beschriebenen Prinzip. Von besonderem Interesse sind für uns der Halbleiter- bzw. Diodenlaser und der Festkörperlaser, da diese beiden in dem von uns verwendeten Laser miteinander kombiniert sind. Nur mit der Grundlage der Funktionsweise unseres Lasers, kann seine spezifische Lichtemission erklärt werden.

2.2.3 Der Halbleiter- bzw. Diodenlaser

Die Grundlage eines Halbleiterlasers ist die Leuchtdiode, oft mit LED, die englische Abkürzung für *light-emitting diode*, bezeichnet.²⁶ Damit lässt sich erklären, warum Halbleiterlaser ein relativ breites Emissionsspektrum haben.

2.2.3.1 Die Leuchtdiode

LED's bestehen aus Halbleitern. Solche Halbleiter besitzen, wie auch Metalle und Isolatoren, ein Leitungs- und ein Valenzband. Die Breite dieser Energiebänder liegt in der Größenordnung von eV. Während sich diese bei Metallen überschneiden (Abb. 2.2.3 (a)), sind sie bei Isolatoren durch große „verbotene Zonen“ getrennt (Abb. 2.2.3 (b)),

²⁴ [Vgl.: Atkins, 1987, S. 485]

²⁵ [Vgl.: Donges, 1988, S. 53]

²⁶ [Vgl.: Halliday, 2003, S. 1246 f]

weshalb bei ihnen die Elektronen nicht vom Valenz- ins Leitungsband gelangen können. Bei Halbleitern oder auch Halbmetallen befindet sich ebenfalls eine verbotene Zone zwischen Valenz- und Leitungsband, die im Vergleich zum Isolator jedoch relativ klein ist (Abb. 2.2.3 (c)). Durch thermische Anregung kann die Zone übersprungen werden, sodass Elektronen dennoch ins Leitungsband gelangen und somit ein Strom fließen kann.

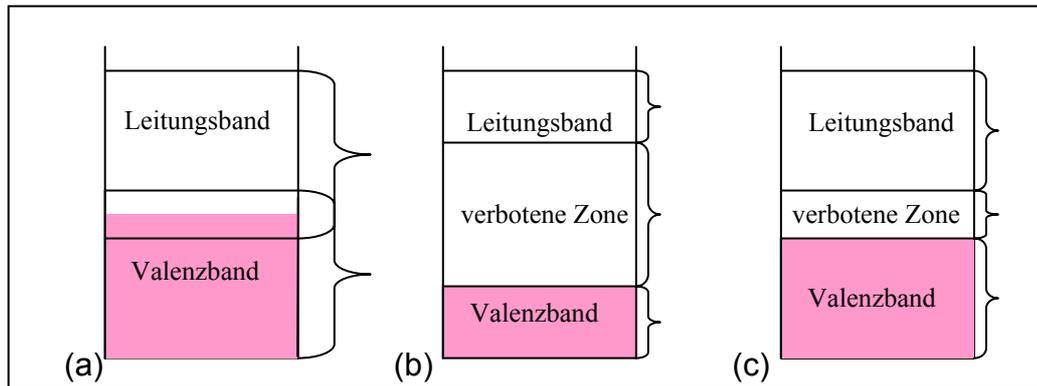


Abb. 2.2.3: Schematische Energiebänderdiagramme. Überschneidung von Valenz- und Leitungsband bei Metallen (a); Trennung von Valenz- und Leitungsband durch breite verbotene Zone bei Isolatoren (b); Trennung von Valenz- und Leitungsband durch schmale verbotene Zone bei Halbleitern (c). [Vgl.: Riedel, 1999, S. 175]

Um die Leitfähigkeit zu erhöhen, kann man die Halbleitergitter, meist bestehend aus Elementen der vierten Hauptgruppe, mit Fremdatomen dotieren.

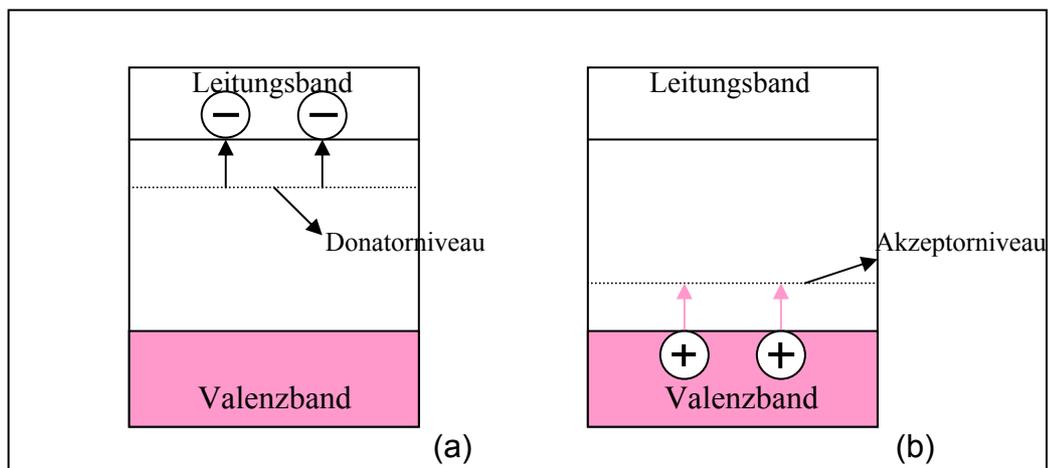


Abb. 2.2.4: Energieniveaudiagramme dotierter Halbleiter. Schematische Darstellung eines n-dotierten Halbleiters (a) und eines p-dotierten Halbleiters (b). [Vgl.: Riedel, 1999, S. 178]

Einerseits lassen sich Elemente der fünften Hauptgruppe einbauen, wie z.B. Arsen. Das „überschüssige“ Valenzelektron ist nur schwach an den Atomrumpf gebunden. Es liegt

im Energiebändermodell in der verbotenen Zone knapp unterhalb des Leitungsbandes auf dem so genannten Donatorniveau (Abb. 2.2.4 (a)). Schon bei geringer Energiezufuhr gelangt das überschüssige Elektron in das Leitungsband, der Strom kann fließen. Solche Halbleiter nennt man **n-Halbleiter**. Andererseits lassen sich auch Elektronen der dritten Hauptgruppe einfügen, z.B. Gallium. Diesem „fehlt“ ein Valenzelektron, welches es durch ein Elektron der benachbarten Halbleiter ersetzen kann. Somit wandern Elektronenleerstellen, auch Defektelektronen genannt. Dazu bedarf es lediglich einer geringen Energiezufuhr, da das Akzeptorniveau der dotierten Atome dicht über dem Valenzband liegt (Abb. 2.2.4 (b)) Diese Art der Halbleiter nennt sich **p-Halbleiter**.²⁷

Wenn nun bei einem reinen Halbleiter ohne Dotierung ein Elektron spontan aus dem Leitungs- in das Valenzband überwechselt, wird dabei ein Photon mit der Energie $h\nu$ frei.²⁸ Liegt ein direkter Halbleiter vor, bei dem das Elektron sowohl im Leitungs- als auch im Valenzband denselben Impuls besitzt, wird diese Energie in Form von Licht freigesetzt.²⁹

Um eine LED zu erhalten, reicht ein reiner Halbleiter jedoch nicht aus, da sich bei Zimmertemperatur nicht genügend Elektronen im Leitungsband befinden, die Licht emittierend in die Löcher im Valenzband zurückfallen könnten. Auch ein dotierter Halbleiter allein führt noch nicht zu einer großen Menge an Emissionsstrahlung. Wie in Abb. 2.2.4 (a) zu erkennen, gibt es bei einem n-dotierten Halbleiter zwar genügend Leitungselektronen, doch nicht ausreichend viele Löcher für die Rekombination. Umgekehrt hat ein p-dotierter Halbleiter zwar viele Löcher im Valenzband, doch fehlen die Elektronen im Leitungsband, die dort hineinfallen könnten, siehe Abb. 2.2.4 (b).

Notwendig ist demnach ein Halbleiter mit einer großen Anzahl an Elektronen im Leitungsband und einer ebensogroßen Anzahl von Löchern im Valenzband. Dies erhält man beim Zusammenfügen eines p-dotierten mit einem n-dotierten Halbleiter, wie in Abb. 2.2.5 schematisch dargestellt. Der angeschlossene Strom dient sowohl der Zufuhr von Elektronen in die n-dotierte Seite als auch der Zufuhr von Löchern in die p-dotierte Seite. Elektronen und Löcher sind nur durch eine schmale Sperrzone getrennt, weshalb es zu vielen Rekombinationen kommt.³⁰

²⁷ [Vgl.: Riedel, 1999, S. 175]

²⁸ [Vgl.: Halliday, 2003, S. 1246]

²⁹ [Vgl.: Atkins, 1997, S. 575]

³⁰ [Vgl.: Halliday, 2003, S. 1246 f]

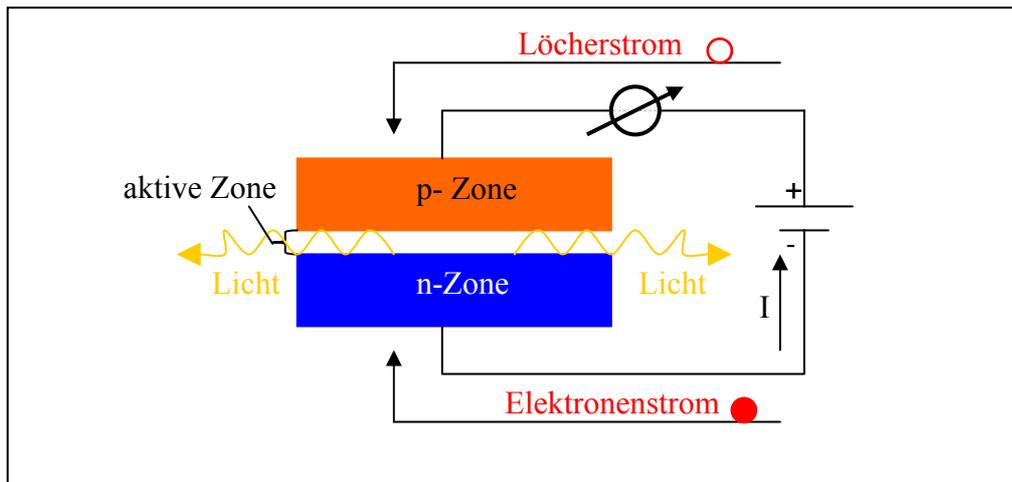


Abb. 2.2.5: Ein in Durchlassrichtung betriebener pn-Übergang. Elektronen werden dem n-dotierten Material und Löcher dem p-dotierten Material zugeführt [Vgl.: Halliday, 2003, S. 1246]

Das durch LED's entstehende Licht ist jedoch nicht monochromatisch, da die Bänder sich über einen Energiebereich erstrecken. Die Annahme, dass die Elektronen nur vom untersten Rand des Leitungsbandes in den obersten Bereich des Valenzbandes gelangen, ist nur näherungsweise erfüllt. Es kommt auch vor, dass Elektronen von einem energetisch höher gelegenen Bereich im Leitungsband in eine tiefere Stelle des Valenzbandes fallen, Abb. 2.2.6 (a). Auf diese Weise werden auch Photonen mit einer höheren Energie gebildet und es entsteht ein breites Spektrum, siehe Abb. 2.2.6 (b).³¹

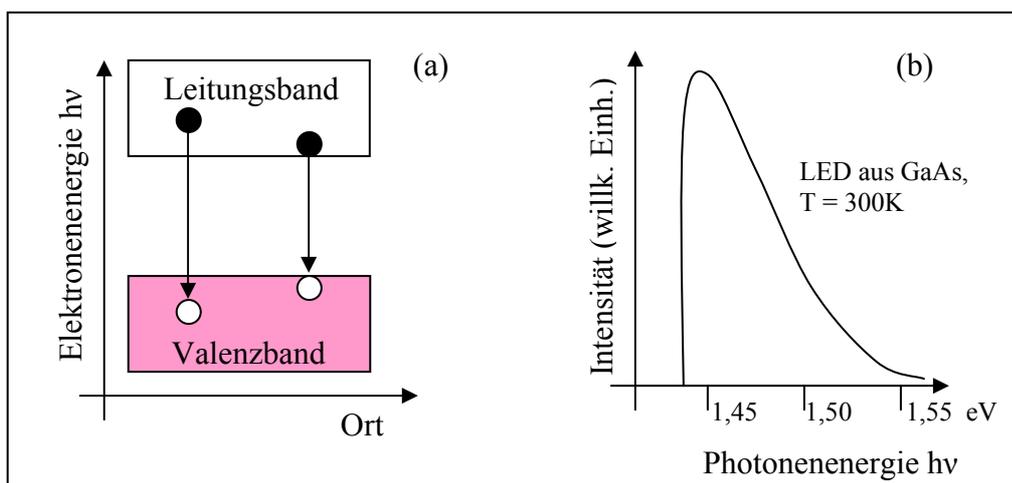


Abb. 2.2.6: Rekombination von Elektronen und Löcher aus unterschiedlichen Energieniveaus (a) und daraus resultierendem breitem Emissionsspektrum am Beispiel einer GaAs-Leuchtdiode [Vgl.: Bludau, 1995, S. 108]

³¹ [Vgl.: Bludau, 1995, S. 108]

2.2.3.2 Funktionsweise des Halbleiterlasers

Eine Leuchtdiode ist noch kein Laser. Es findet nämlich keine induzierte Emission statt und es wird auch kein Resonator verwendet. Allerdings kann die LED als Grundlage des Halbleiterlasers angesehen werden.³²

Kommen ein stark dotierter n-Halbleiter und ein ebenso stark dotierten p-Halbleiter in engen Kontakt zueinander, so erhält man eine p-n-Diode. Es entsteht die Situation, wie in Abb. 2.2.7 (a) schematisch dargestellt. Die Bänder der p- und n-Regionen sind gegeneinander verschoben, doch das Fermi-niveau, besitzt einen konstanten Wert. In der p-Region liegt es daher im Valenzband und in der n-Region im Leitungsband. Beim Anlegen einer Spannung V , fließt ein Strom. Dabei bewegen sich Elektronen aus der n-Region bzw. Löcher aus der p-Region in den p-n-Übergang. Durch das Anlegen der Spannung V hat sich das Fermi-niveau in der n-Region gegenüber dem in der p-Region angehoben, wie es in Abb. 2.2.7 (b) zu erkennen ist. Die schmale Grenzschicht enthält nun sowohl Elektronen als auch Löcher. Es herrscht dort Besetzungsinversion. Die bei der Rekombination freiwerdende Energie wird in Form von Photonen abgestrahlt, wobei sich deren Wellenlänge aus der Höhe der Energielücke ergibt. Die Laseremission ist auf diese schmale Zone beschränkt.

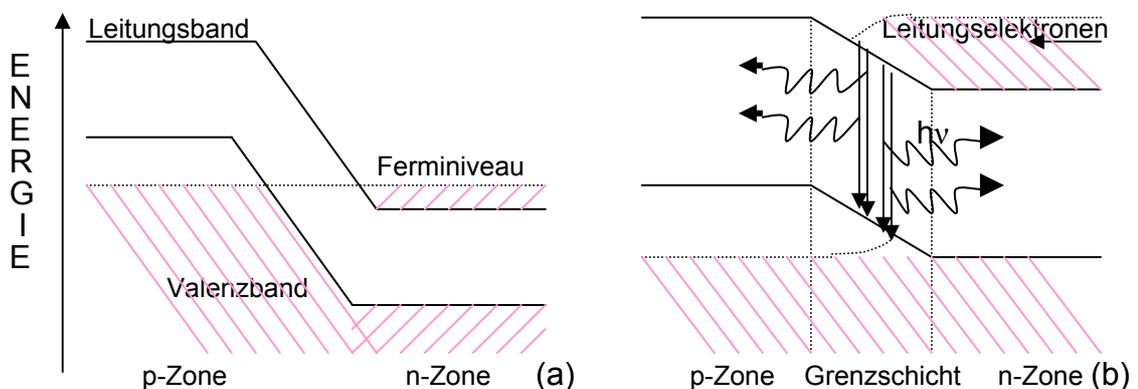


Abb. 2.2.7: p-n-Übergang ohne angelegte Spannung (a) und nach dem Anlegen einer Spannung (b) [Vgl.: Kneubühl, 1988, S. 319]

Der schematische Aufbau eines Diodenlasers ist in Abb. 2.2.5 zu erkennen. Wichtig ist dabei, dass die Stirnflächen planparallel und poliert sind. Denn aufgrund des hohen Brechungsindex der Halbleiter reflektieren sie die Strahlung zu über 30%, sodass die bei den anderen Lasern verwendeten Spiegel nicht notwendig sind. Die Emissionsintensität möglichst gleichwelliger Strahlung hängt stark vom Injektionsstrom ab. Ist

³² [Vgl.: Atkins, 1997, S. 574]

dieser klein, erhält man vorwiegend spontane Emission mit hoher spektraler Breite wie bei einer LED. Erst bei Injektionsströmen über dem so genannten Schwellwert, erhält man fast nur noch induzierte Emission und damit deutlich schmalere Spektren.³³ Dennoch gibt es immer einen kleinen Anteil an spontaner Strahlung und damit auch einen kleinen Anteil niederwelligeren Lichts.

2.2.4 Der Festkörperlaser

Das aktive Medium im Festkörperlaser besteht aus Gläsern oder Kristallen, die mit optisch aktiven Ionen dotiert sind. In der Regel sind diese Ionen aus der Übergangsmetallgruppe oder der Gruppe der seltenen Erden, da sie unbesetzte innere Elektronenschalen besitzen, zwischen denen die Laserübergänge stattfinden. Diese inneren Schalen werden vom Kristallfeld des Wirtskristalls kaum beeinflusst.

Die Dotierung mit Fremdionen beträgt oft weniger als ein Gewichtsprozent. Der übliche Wirkungsgrad dieser Ionen ist sehr klein und liegt typisch bei 0,1 %. Trotzdem lassen sich mit den Festkörperlasern vergleichsweise hohe Leistungen erzielen, da die Dichte laseraktiver Ionen mit einer Größenordnung von ca. 10^{19} cm^{-3} noch um das 10^2 - bis 10^4 -Fache höher ist als beispielsweise beim Gaslaser. Die Anregung geschieht meist mit Diodenlasern, wie auch in unserem Fall.

Die wichtigsten Vertreter der Festkörperlaser sind der Rubin- und der Neodymlaser. Der Neodymlaser wird im folgenden Kapitel beschrieben, da dieser auch in unserem Lasermodul eingebaut ist.

2.2.4.1 Neodymlaser

Der Neodymlaser funktioniert nach dem bereits oben erwähnten Prinzip eines 4-Niveau-Systems. Eine schematische Darstellung findet sich in Abb. 2.2.8.

Das 4-Niveau-System hat den Vorteil, dass sich nur wenige Ionen im angeregten Zustand befinden müssen, um Inversion zu erlangen. Zunächst werden die Ionen durch Lichteinstrahlung angeregt und gelangen aus dem Grundzustand 0 in einen der angeregten Zustände, die zur Vereinfachung in einem Energieband 3 zusammengefasst sind. Von dort gehen sie in das mittlere Energieniveau 2 über. Die Übergangswahrscheinlichkeit $3 \rightarrow 2$ ist dabei sehr hoch, sodass kaum Ionen durch spontane oder induzierte Emission direkt von 3 nach 0 zurückfallen. Der Übergang $3 \rightarrow 2$ verläuft ohne Lichtemission. Der Energiezustand 2 ist metastabil, weshalb sich die Atome in

³³ [Vgl.: Kneubühl, 1988, S. 319 ff]

diesem Energieniveau anhäufen. Die Inversion entsteht nun zwischen dem langlebigen angeregten Zustand 2 und dem angeregten Zustand 1. Der Übergang $1 \rightarrow 0$ verläuft wie der Übergang $3 \rightarrow 2$ ohne Lichtemission und so schnell, dass Zustand 1 quasi nicht besetzt ist.

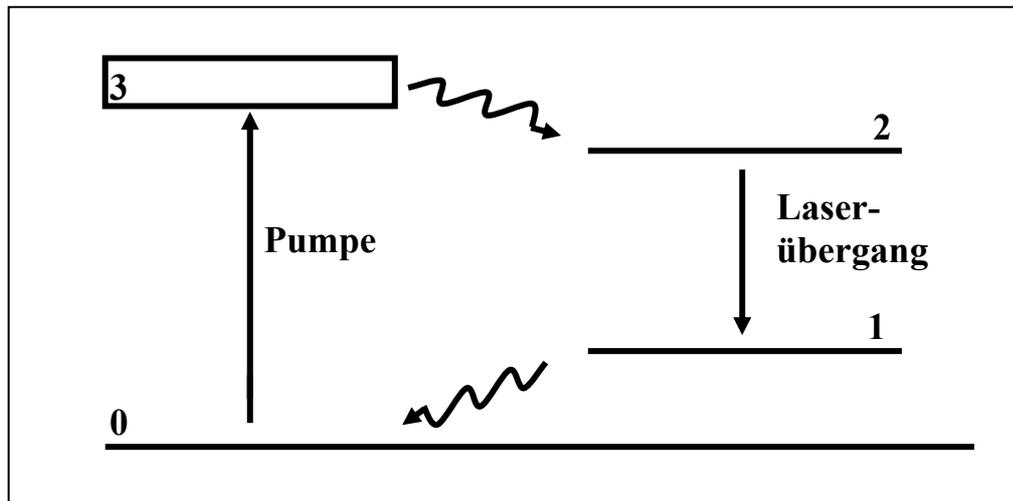


Abb. 2.2.8: Schematische Darstellung eines 4-Niveau-Systems. [Vgl.: Donges, 1988, S. 56]

Wenn N die Anzahl der Ionen ist, gilt demnach:

$$\Delta N = N_2 - N_1 \approx N_2 \quad (\text{Gl. 2.2.1})$$

Inversion zwischen Zustand 1 und 0 ist somit bereits erlangt, wenn sich nur wenige Ionen im Zustand 2 befinden.³⁴

Der am häufigsten verwendete Festkörperlaser ist der Neodymlaser, bei dem die Laserstrahlung von Nd^{3+} -Ionen erzeugt werden. Diese werden in der Regel durch Dotierung in einem YAG-Kristall (Yttrium-Aluminium-Granat: $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) eingebaut, wobei etwa 1% Y^{3+} -Ionen durch Nd^{3+} -Ionen ersetzt werden. Anders, als vereinfachend in Abb. 2.2.8 dargestellt, gibt es nicht nur ein Energieniveau für den Zustand 1 sondern mehrere. Unter üblichen Betriebstemperaturen findet jedoch nur genau ein Laserübergang $2 \rightarrow 1$ statt. Das dabei entstehende Photon hat eine Wellenlänge von 1064 nm. Der unter normalen Bedingungen erreichte Zustand 1 liegt lediglich 0,24 eV über dem Grundniveau 0, weshalb er bei Zimmertemperatur quasi unbesetzt ist.³⁵ Den Inversionszustand erhält man meist über optische Anregung mit GaAs-Diodenlasern. Deren emittierten Photonen von 805 nm bis 809 nm Wellenlänge entsprechen dem Energieniveau eines der Pumpbänder im Nd-Laser.³⁶

³⁴ [Vgl.: Donges, 1988, S. 56 f]

³⁵ [Vgl.: Eichler, 1990, S. 140 ff]

³⁶ [Vgl.: Kneubühl, 1988, S. 340]

2.3 Das Spektrometer

Um die mit dem Spektrometer gemessenen Spektren des emittierten Laserlichts interpretieren und verstehen zu können, sollte die Funktionsweise und der Aufbau dieses Arbeitsgerätes zunächst verstanden werden. Im folgenden Kapitel werden deshalb die theoretischen Grundlagen kurz erläutert.

2.3.1 Huygenssches Prinzip

Nach der Modellvorstellung des Physikers Christian Huygens kann jeder Punkt einer Wellenfläche als Ausgangspunkt einer neuen Welle, der so genannten Elementarwelle, betrachtet werden. Im gleichen Medium breitet sich diese Elementarwelle mit derselben Geschwindigkeit aus wie die ursprüngliche Welle.³⁹ In Abb. 2.3.1 ist die Ausbreitung einer solchen Elementarwelle abgelichtet.

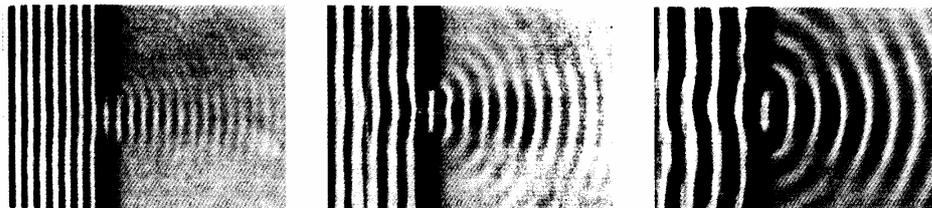


Abb. 2.3.1: Entstehende Kreiswelle (Elementarwelle) an einer Wellenfront am Beispiel einer Wasserwelle [aus: Hecht, 2001, S. 691]

2.3.2 Interferenz von Wellen

In Abb. 2.3.2 (a) ist eine Blende mit zwei Spalten eingezeichnet, an denen jeweils kreisförmige, kohärente Elementarwellen entstehen.

In diesem Fall handelt es sich um Lichtwellen, wobei um L_1 und L_2 graue und schwarze Kreise gezogen sind. Die Radien nehmen von Kreis zu Kreis um $\frac{1}{2} \lambda$ zu. In dem dargestellten Momentbild der Wellenausbreitung stehen die grauen Kreise für die Wellenmaxima und die schwarzen für die Wellenminima. Die in Abb. 2.3.2 (a) in rot eingezeichneten Hyperbeln durchlaufen die Schnittpunkte zweier grauer bzw. schwarzer Kreise. An diesen Hyperbeln werden die aus L_1 und L_2 auslaufenden kohärenten Wellen zur maximalen Intensität verstärkt. Auch die Schnittpunkte der grauen mit den schwarzen Wellen führen zu Hyperbeln (in Abb. 2.3.2 (a) nicht eingezeichnet), auf denen sich die aus L_1 und L_2 ausgehenden Wellen gegenseitig auslöschen.

³⁹ [Vgl.: Hundt, 1974, S. 176]

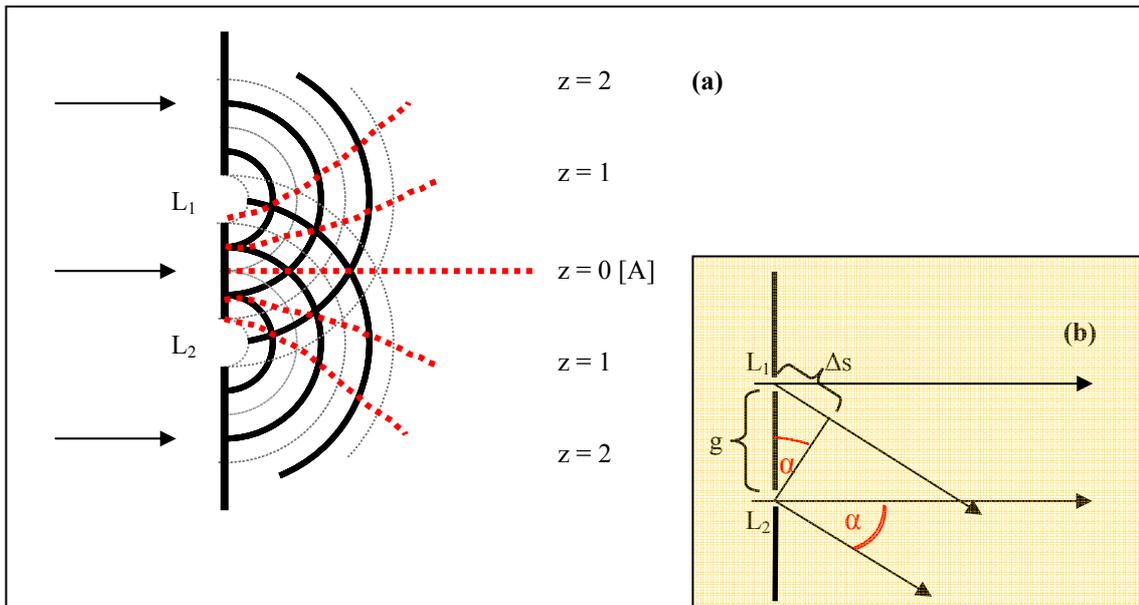


Abb. 2.3.2: Momentbild der Wellenausbreitung zweier kreisförmiger Elementarwellen (a) [Vgl.: Gerthsen, 1966, S. 336]; Darstellung des Gangunterschieds Δs des durch zwei Spalte hindurch tretenden Lichts (b) [Vgl.: Gerthsen, 1966, S. 351]

Das beschriebene Phänomen der Überlagerung zweier Wellen bezeichnet man als Interferenz. Gelangt das Licht, ausgehend von L_1 und L_2 , auf einen Schirm, lassen sich helle und dunkle Streifen darauf erkennen. Der mittlere helle Streifen A wird als Interferenzstreifen nullter Ordnung bezeichnet. Zu beiden Seiten folgen helle Streifen der ersten, zweiten, ..., n-ten Ordnung.⁴⁰

Der Abstand L_1L_2 wird mit g bezeichnet, der Winkel des gebeugten Strahls im Vergleich zu dem durchlaufenden Strahl mit α . Δs ist der so genannte Gangunterschied zwischen benachbarten Gitteröffnungen.

Damit gilt:

$$\Delta s = g \cdot \sin \alpha \quad (\text{Gl. 2.3.1})$$

Beträgt nun der Wert für Δs ein ungeradzahliges Vielfaches einer halben Wellenlänge $[(n + 1) \frac{\lambda}{2}]$, so wird die Strahlung in den dazugehörigen Winkeln α ausgelöscht.⁴¹ Für die Winkel α , für die Δs ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge λ ist ($2n \frac{\lambda}{2}$), entsteht hingegen die größte Verstärkung.⁴²

$$\Delta s = g \cdot \sin \alpha = z \cdot \lambda \quad (z = 0, 1, 2, \dots) \quad (\text{Gl. 2.3.2})$$

⁴⁰ [Vgl.: Gerthsen, 1966, S. 335 f]

⁴¹ [Vgl.: Gerthsen, 1966, S. 351]

⁴² [Vgl.: Gerthsen, 1966, S. 351]

2.3.3 Beugung am Gitter

In einem Spektrometer trifft die Strahlung jedoch nicht auf eine Blende mit nur zwei Öffnungen sondern auf ein Gitter mit N Spalten, siehe Abb. 2.3.3.

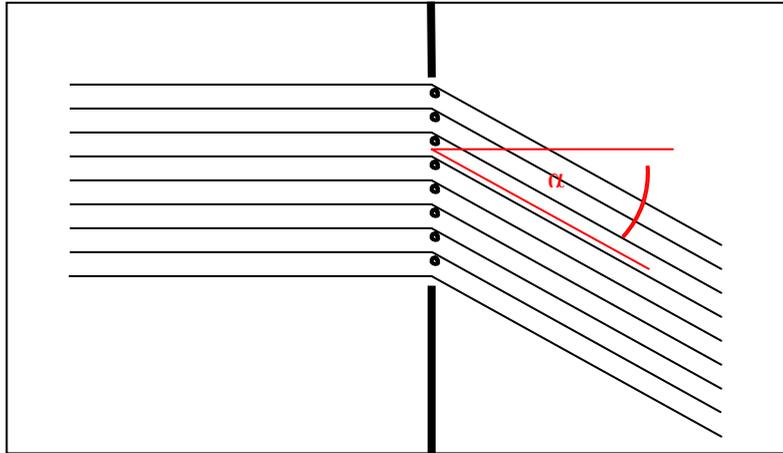


Abb. 2.3.3: Das Beugungsgitter [Vgl. Gerthsen, 1966, S. 352]

Auch in diesem Fall werden die Maxima durch Gleichung 2.3.2 beschrieben. α sei der Winkel, unter dem der Gangunterschied benachbarter Strahlen λ beträgt. Die Helligkeit auf dem Schirm zwischen dem Maximum nullter und erster Ordnung entsteht durch Überlagerung der Strahlen mit einem Gangunterschied zwischen 0 und λ .

Für die Richtung $\alpha_{1/2}$ ist der Gangunterschied zum benachbarten Strahl $\frac{1}{2} \lambda$. Wie in Punkt 2.3.2 erläutert, wird die Strahlung in dieser Richtung ausgelöscht. Betrachtet man Richtung $\alpha_{1/4}$, beträgt der Gangunterschied zum benachbarten Strahl $\frac{1}{4} \lambda$, zum übernächsten jedoch $\frac{1}{2} \lambda$. Somit wird auch die Strahlung in dieser Richtung gelöscht. Dasselbe gilt für die Strahlung mit Richtung $\alpha_{1/6}$, bei der der Gangunterschied zum drittnächsten Strahl $\frac{1}{2} \lambda$ beträgt. Für alle diese Richtungen der Strahlen ließe sich deshalb auf dem Schirm ein dunkler Interferenzstreifen erkennen. Ist die Zahl der Gitterspalten N hinreichen groß, wird die Fläche zwischen den durch Gleichung 2.3.2 bestimmten Maxima so dicht mit dunklen Streifen durchsetzt, dass sie dunkel erscheint. In den Maxima ist somit die gesamte gebeugte Intensität in hellen, schmalen Interferenzstreifen vereinigt.

In Abb. 2.3.5 lässt sich ein solches Spektrum, erzeugt mit einem Beugungsgitter, erkennen. Aus Gleichung 2.3.2, $\Delta s = g \cdot \sin \alpha = z \cdot \lambda$ ($z = 0, 1, 2, \dots$), lässt sich leicht erkennen, warum in den von uns aufgenommenen Spektren bei 1064 nm ein so

großer Peak zu erkennen ist, vergleiche Kapitel 4.2.1. Liegt der Peak erster Ordnung für $z=1$ bei 532 nm, so muss der Peak zweiter Ordnung mit $z=2$ bei 1064 nm liegen.

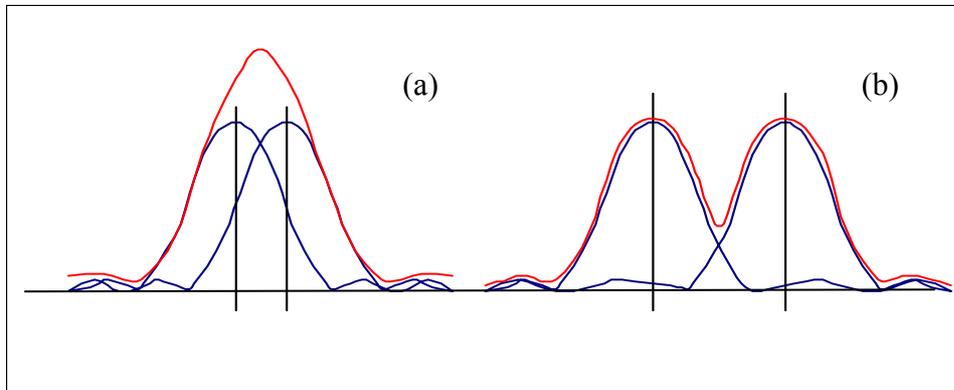


Abb. 2.3.4: Der Abstand der Maxima von sich überlappenden Spektrallinien ist kleiner (a) bzw. größer (b) als die „Halbwertsbreite“ der Signalberge [Vgl.: Gerthsen, 1966, S. 352]

Die Existenz mehrerer Ordnungen hat dabei entscheidende Vorteile. Enthält das untersuchte eingestrahlte Licht Strahlung unterschiedlicher Wellenlängen, so können diese nämlich nur dann getrennt dargestellt werden, wenn der Abstand ihrer Maxima größer ist als die „Halbwertsbreite“ der Peaks. Ist dies nicht der Fall, so erscheinen die Signale der beiden Wellen(längen) als ein Peak, siehe Abb. 2.3.4.

Liegen die Maxima zweier Wellenlängen in erster Ordnung noch so dicht nebeneinander, dass sie als ein Signal erscheinen, so verdoppelt sich ihr Abstand nach Gleichung 2.3.2 für die zweite Ordnung mit $z=2$ (siehe Abb. 2.3.5).

Dies kann genügen, um spektrale Komponenten auflösen zu können.⁴³

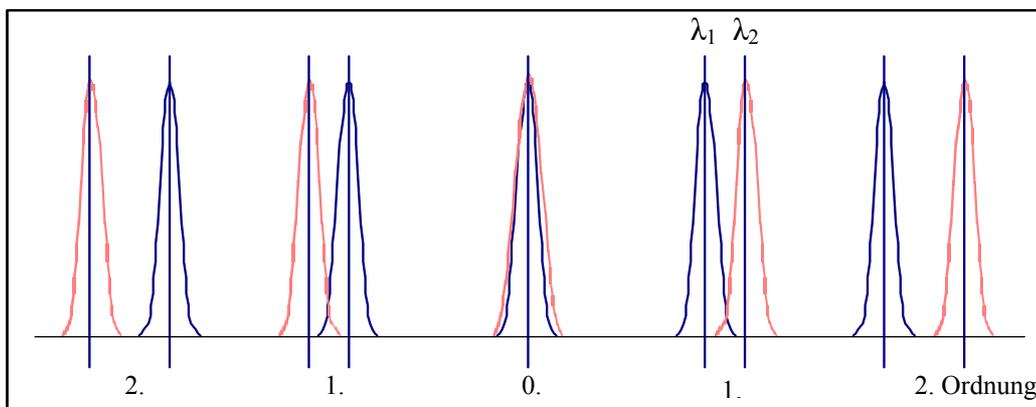


Abb. 2.3.5: Ein mit einem Beugungsgitter erzeugtes idealisiertes Spektrum [Vgl.: Gerthsen, 1966, S. 352]

⁴³ [Vgl.: Gerthsen, 1966, S. 351 f]

2.3.4 Abnahme der Intensität mit zunehmender Ordnung

Das in Abb. 2.3.5 abgebildete Gitterspektrum ist idealisiert dargestellt. In Wirklichkeit wird die Lichtintensität schwächer, bzw. die Signalberge werden kleiner mit zunehmender Ordnung.⁴⁴

Um das Problem veranschaulichen zu können, wird davon ausgegangen, dass die Elementarwellen alle parallel und gleichmäßig über die Spaltbreite verteilt die Spaltebene verlassen. Die Anzahl der Elementarwellen wird auf 60 festgelegt.

Genau wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, löschen sich diejenigen Elementarwellen gegenseitig aus, die einen Gangunterschied von $\frac{1}{2} \lambda$ zueinander besitzen. Für die geradlinige Ausbreitungsrichtung gibt es zwischen den Elementarwellen keinen Gangunterschied (siehe Abb. 2.3.6 (a)), weshalb man für die nullte Ordnung ein Helligkeitsmaximum erhält. Für einen bestimmten Winkelwert $\alpha > 0$ beträgt der Gangunterschied zwischen der ersten und der 60. Elementarwelle gerade $\Delta s = \frac{1}{2} \lambda$. Für einen größeren Winkel α löschen sich dann sowohl die erste und die 59. sowie die zweite und die 60. Welle aus. Schließlich ist der Winkel α so groß, dass Welle eins gegen Welle 31, Welle zwei gegen Welle 32, usw. ... und die 30. gegen die 60. Welle um $\Delta s = \frac{1}{2} \lambda$ verschoben sind, siehe Abb. 2.3.6 (b).

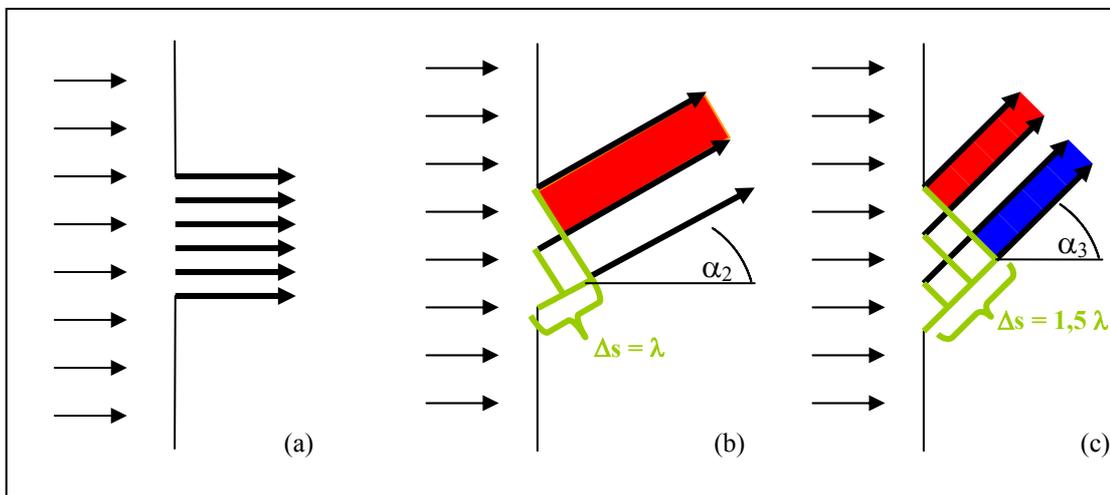


Abb. 2.3.6: Beugung am Spalt. Geradlinige Ausbreitung senkrecht zum Spalt mit Helligkeitsmaximum (a); Zusammenfassung der Wellen 1 bis 30 (rot) und 31 bis 60 (weiß) zu jeweils einem Bündel mit dem Gangunterschied $\Delta s = \frac{1}{2} \lambda$ (b); sowie Zusammenfassung der Wellen 1 bis 20 (rot), 21 bis 40 (weiß) und 41 bis 60 (blau) zu drei Bündeln mit dem jeweiligen Gangunterschied $\Delta s = \frac{1}{2} \lambda$ (c) [Vgl.: Harbeck, 1973, S. 419]

⁴⁴ [Vgl.: Harbeck, 1973, S. 423]

Für diese Richtung herrscht völlige Dunkelheit. Zwischen den beiden Randwellen beträgt der Gangunterschied $\Delta s = \lambda$, sodass für das erste Beugungsminimum gilt:

$$\sin \alpha_2 = \frac{\lambda}{d} \quad (\text{Gl. 2.3.3}),$$

wenn d die Spaltbreite ist.

Wächst Winkel α weiter, so findet wieder ein Teil der Wellen kein „Pendant“ mit dem Gangunterschied $\frac{1}{2} \lambda$, weshalb bis zu einem erneuten Maximum, der ersten Ordnung, die Helligkeit wieder zunimmt. Dieses Maximum erster Ordnung liegt bei:

$$\sin \alpha_3 = \frac{3}{2} \frac{\lambda}{d} \quad (\text{Gl. 2.3.4})$$

In diesem Fall lassen sich die Wellen in drei Bündel zusammenfassen, siehe Abb. 2.3.6 (c), die sich jeweils im Gangunterschied um $\frac{1}{2} \lambda$ unterscheiden. Nun löscht Welle eins Welle 21 aus, die zweite die 22., usw. ... und die 20. löscht die 40. Welle. Ein Drittel der Wellen, nämlich Nummer 41 bis 60, bleiben unbeeinträchtigt. Da sich jedoch nur noch dieses Drittel ausbreiten kann, hat das Maximum erster Ordnung auch nur eine Intensität von ca. 33% im Vergleich zum Maximum nullter Ordnung.

Allgemein gilt, dass immer dann ein Minimum auftritt, wenn der Gangunterschied zwischen den Randwellen ein ganzzahliges Vielfaches von λ beträgt, da man dann eine geradzahlige Anzahl von Wellenbündeln erhält, von denen sich immer zwei gegenseitig auslöschen. Dunkelheit bei der Beugung am Spalt tritt also in folgenden Richtungen auf:

$$\sin \alpha = \frac{n \lambda}{d} \quad (n = 1, 2, 3, \dots) \quad (\text{Gl. 2.3.5})$$

Ist dagegen der Gangunterschied zwischen der ersten und der letzten Elementarwelle ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge plus eine halbe Wellenlänge, so bleibt immer ein Bündel übrig, welches nicht ausgelöscht werden kann. Die Maxima liegen demnach bei:

$$\sin \alpha = \frac{2n+1}{2} \frac{\lambda}{d} \quad (n = 1, 2, 3, \dots) \quad (\text{Gl. 2.3.6})$$

Für das zweite Maximum bleibt jedoch nur noch ein Fünftel der Strahlung, für das dritte Maximum ein Siebtel übrig, sodass die Intensitäten im Vergleich zum Maximum nullter Ordnung im entsprechenden Verhältnis schwächer werden, siehe Abb. 2.3.7.

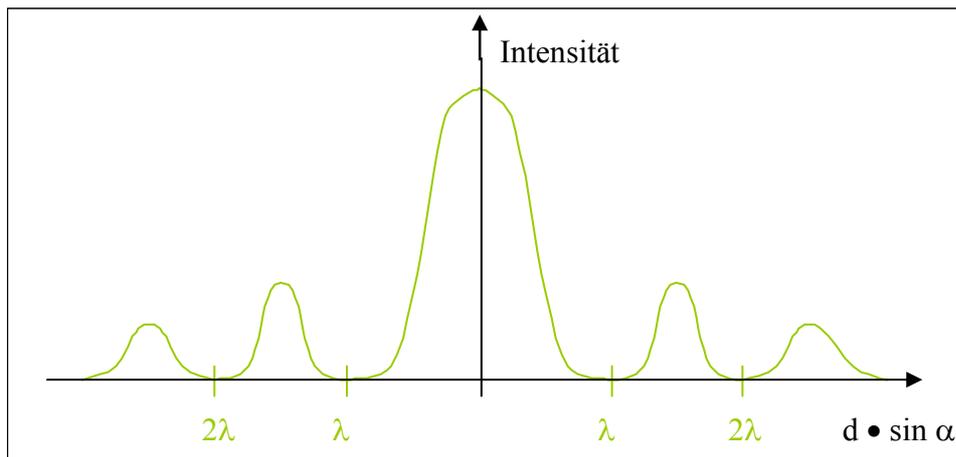


Abb. 2.3.7: Beugungsfigur eines Spaltes mit abnehmender Intensität vom nullten bis zum zweiten Maximum [Vgl.: Schadmand, 2000, Kapitel 16, S. 4]

An den Gleichungen 2.3.5 und 2.3.6 lässt sich sehr leicht erkennen, dass für kleiner werdende Spaltbreiten d der Wert $\sin \alpha$ immer größer wird.⁴⁵

Dass die Spektren und Spektrallinien eines Gitterspektrums mit höherer Ordnung lichtschwächer werden, hat seinen Grund darin, dass jede einzelne Gitteröffnung wiederum als Spalt wirkt und eine Beugungsfigur wie in Abb. 2.3.7 erzeugt, die wegen der Feinheit der Gitteröffnungen sehr in die Breite gezogen ist. Die Gittermaxima liegen hauptsächlich innerhalb des Maximums nullter Ordnung dieser Beugungsfigur, die deshalb zur Seite hin an Intensität verlieren.⁴⁶

2.3.5 Aufbau eines Gitterspektrometers

Die meisten Gitterspektrometer sind anders als die bisher beschriebenen so aufgebaut, dass das Licht nicht das Gitter durchquert, sondern dass es am Gitter reflektiert wird, siehe Abb. 2.3.8. Moderne Gitter werden derart hergestellt, dass man eine reflektierende Aluminiumschicht auf eine planparallele Glasplatte aufdampft. Die Metallschicht wird anschließend eingeritzt.

Diese Art von Gitter hat jedoch einen entscheidenden Nachteil. Es wird nämlich der größte Teil des einfallenden Lichts spiegelnd reflektiert und zwar in nullter Ordnung. Diese entstehende Wellenfront ist für spektroskopische Zwecke jedoch völlig unbrauchbar, da sich sämtliche Wellenlängen des eingestrahnten Lichts überlagern, siehe Abb. 2.3.5.

⁴⁵ [Vgl.: Harbeck, 1973, S. 418 f]

⁴⁶ [Vgl.: Harbeck, 1973, S. 423]

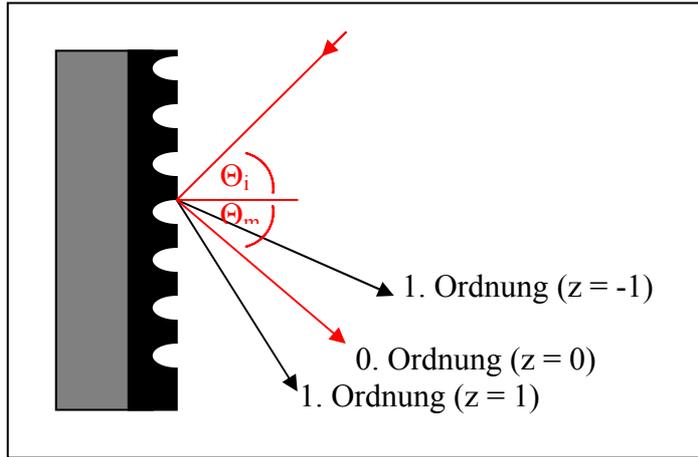


Abb. 2.3.8: Schematische Darstellung eines Reflexionsgitters
[Vgl.: Hecht, 2001, S. 698]

Um die Empfindlichkeit des Spektrometers zu erhöhen, entwarf Robert W. Wood 1910 ein Gitter, wie es vom Prinzip auch in dem von uns verwendeten Spektrometer eingebaut ist, ein so genanntes *blazed grating*.⁴⁷

2.4 Trennung der Oligonukleotide

Wie in Abb. 2.4.1 zu erkennen, ist die DNA so aufgebaut, dass sie im protolysierten Zustand pro Nukleotid genau eine negative Ladung enthält.

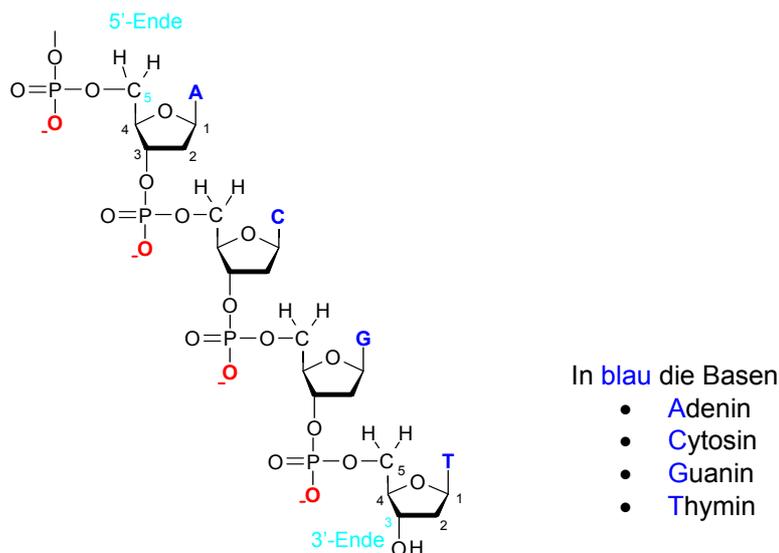


Abb. 2.4.1: Ausschnitt eines DNA-Einzelstranges, bestehend aus vier unterschiedlichen Nukleotiden mit jeweils einer negativen Ladung in basischem Milieu (rot) [Vgl.: Struktur der Nukleinsäure, 2004, S. 3]

⁴⁷ [Vgl.: Hecht, 2001, S. 696 ff]

Dies bedeutet, dass das Verhältnis der Ladung zur Größe aller Oligonukleotide gleich ist. Im elektrischen Feld ist daher eine Separation in einer freien Lösung nicht möglich. Um also dennoch eine Trennung mittels Kapillarelektrophorese zu erhalten, muss eine „siebende Matrix“ verwendet werden, ein **Gel**.⁴⁸ Im Folgenden wird das Wort Kapillarelektrophorese, wie in der Literatur üblich, mit CE abgekürzt, was für das englische „*capillary electrophoresis*“ steht.

Da das Gel eine so entscheidende Funktion bei der CE innehat, soll zunächst beschrieben werden, was ein Gel überhaupt ist und wie genau damit die Trennung der DNA-Stücke ermöglicht wird.

2.4.1 Das Gel

Ein Gel ist eine Materie mit Eigenschaften zwischen einem Feststoff und einer Flüssigkeit. Es lässt sich verformen, doch nach Beendigung der Krafteinwirkung nimmt es seine Ausgangsform wieder an. Es ist elastisch.

Hat man eine **stark verdünnte Lösung** von Polymeren, so berühren sich die Moleküle nicht und die Lösung verhält sich wie eine normale Flüssigkeit. Diese Lösungen unterschreiten die so genannte *overlap threshold concentration* c^* . Erreicht eine Lösung c^* , ist die Konzentration der Polymere gerade so hoch, dass diese sich berühren, sich aber nicht überschneiden.⁴⁹ Steigt die Konzentration der Polymere jedoch an, beginnen diese zu interagieren. Man spricht von *entangled* (engl.: verfangenen) Polymeren. Solche Lösungen sind viskos und elastisch, verhalten sich demnach fast wie ein Gel. Lediglich wenn ihre Form über einen längeren Zeitraum durch Krafteinwirkung verändert wird, erhalten sie, anders als ein echtes Gel, ihre Ausgangsform nicht wieder zurück. Da es zwischen den Polymeren keine chemische Verbindung gibt, nennt sich diese Art von „Gel“ **physikalisches Gel**.

Ein echtes, **chemisches Gel** zeichnet sich dadurch aus, dass die Polymere durch permanente, meist kovalente Bindungen miteinander (verkreuzt) verbunden sind.⁵⁰

Sowohl in stark verdünnten Polymerlösungen als auch in physikalischen und chemischen Gelen lassen sich DNA-Fragmente trennen. Bei der Verwendung chemischer Gele konnte bisher zwar die höchste Effizienz bei der CE erreicht werden, doch zeigen diese in der Praxis entscheidende Nachteile.

⁴⁸ [Vgl.: Heller, 1997, S. 3]

⁴⁹ [Vgl.: Heller, 1997, S. 97]

⁵⁰ [Vgl.: Heller, 1997, S. 6]

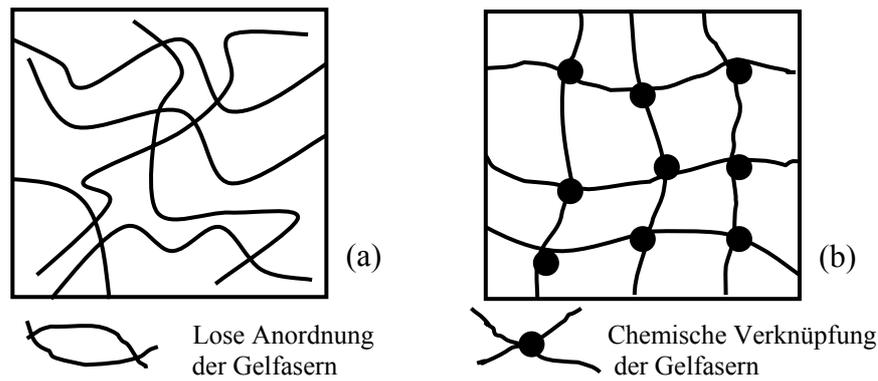


Abb.: 2.4.2: Schematische Struktur eines linearen Polymers (a) und eines Quervernetzten Polymers (b) [Vgl.: Engelhardt, 1994, S. 160]

Damit das chemische Gel nicht durch den Elektroosmotischen Druck (EOF) aus der Kapillare heraustransportiert wird, muss es mit der Kapillarinnenwand vernetzt werden. Dies geschieht in der Regel, indem man die Monomerlösung zusammen mit Radikalstartern und Katalysatoren in die Kapillare einbringt, wo sie dann polymerisiert. Die Kapillarinnenseite muss z.B. mit einer olefinischen Gruppierung belegt sein, sodass sich die Monomere bei der Polymerisation gleichzeitig mit diesen Gruppen verbinden können.⁵¹ Bei der Polymerisation verkleinert sich jedoch das Volumen der Eingefüllten Monomerlösung, wodurch Löcher im „Netz“ entstehen. Darüber hinaus sind diese chemischen Gele thermisch nicht ausreichend stabil.⁵² Des Weiteren ist der Austausch des Puffermediums in den verankerten Gelen nur unter großem Zeitaufwand möglich, der Austausch des Gels selbst ist hingegen gar nicht möglich. Dadurch enthalten die Kapillaren bei Mehrfachverwendung stets einen kleinen Verunreinigungsanteil der zuvor untersuchten Probe. Diese Nachteile lassen sich durch Verwendung physikalischer Gele vermeiden, da diese nach jeder Messung ausgetauscht werden können. Das neue Gel wird mit Druck eingebracht und damit das alte Gel gleichzeitig aus der Kapillare entfernt.⁵³

2.4.2 Trennungsmodelle von DNA-Fragmenten

Die theoretischen Modelle zur Trennung der DNA-Fragmente bei der Verwendung von chemischen und physikalischen Gelen unterscheiden sich dagegen nicht.⁵⁴ Die in den Kapiteln 2.4.2.1 und 2.4.2.2 beschriebenen Theorien werden daher für beide Arten von Gelen angewandt.

⁵¹ [Vgl.: Engelhardt, 1994, S. 163 ff]

⁵² [Vgl.: Heller, 1997, S. 157]

⁵³ [Vgl.: Engelhardt, 1994, S. 163 ff]

⁵⁴ [Vgl.: Heller, 1997, S. 9]

2.4.2.1 Das Ogston-Modell

Zum einen gibt es das Ogston-Modell. Dieses erklärt die Separation der Oligonukleotide sehr einfach. Die Moleküle bewegen sich unterschiedlich schnell durch das Gel, abhängig davon, ob sie Poren finden, durch die sie durchpassen. Kleine Moleküle bewegen sich schneller als große, da es viele kleine Poren gibt, durch die die großen Moleküle nicht passen, siehe Abb. 2.4.3 (a). Nach dieser Logik müsste die Beweglichkeit der Moleküle, die größer sind als die Maschen des Netzes, gegen null gehen.⁵⁵

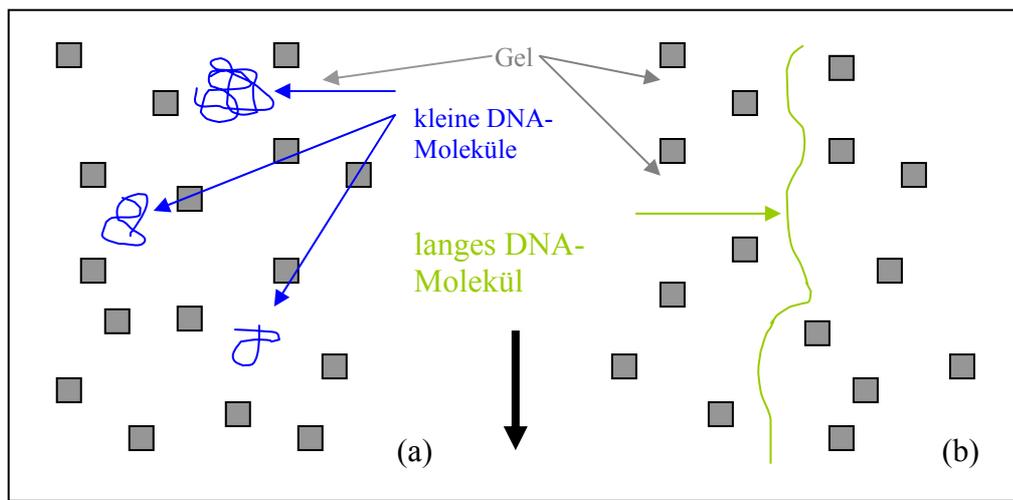


Abb. 2.4.3: Schematische Darstellung des Trennungsprinzips für kleine DNA-Fragmente nach Ogston (a) und dem Reptations-Prinzip (b). Der Pfeil zeigt die Richtung des angelegten elektrischen Feldes an. [Vgl.: Butler, 2001, S. 144]

2.4.2.2 Das Reptation-Modell

Tatsächlich lässt sich aber auch für solch große Moleküle noch eine Wanderungsgeschwindigkeit, wenn auch eine kleinere, feststellen. Für diese großen Moleküle kann das Ogston-Modell jedoch nicht gelten. Das Phänomen der Wanderung der großen Moleküle wird durch das Reptationsmodell (engl. für schleichen, schlängeln) erläutert. Demnach entwirren sich die großen DNA-Fragmente im elektrischen Feld und bewegen sich wie eine Schlange durch die Löcher im Gel, siehe Abb. 2.4.3 (b).

Für DNA-Moleküle, deren Radius im zusammengerollten Zustand größer ist als die durchschnittliche Porengröße, hat sich experimentell ergeben, dass ihre Beweglichkeit μ^* umgekehrt proportional zu ihrer Größe M ist:

$$\mu^* \sim 1/M \quad (\text{Gl. 2.4.1})$$

⁵⁵ [Vgl.: Butler, 2001, S. 143]

Die DNA schlängelt sich jedoch nicht frei durch das Polymer, sondern es bildet sich im Polymer eine so genannte „Röhre“, durch die sich das entsprechende DNA-Fragment bewegt, siehe Abb. 2.4.4. Diese „Röhre“ hat eine Länge L_t und eine Distanz vom einen Ende zum anderen h_x .

Die Beweglichkeit μ^* der DNA ist außerdem gegeben durch den Quotienten dieser beiden Werte zum Quadrat:

$$\mu^* \sim (h_x)^2 / (L_t)^2 \quad (\text{Gl. 2.4.2})$$

Es wird angenommen, dass die Länge der Röhre L_t proportional zur Größe M der DNA ist. Für Entfernung des einen Endes zum anderen der Röhre hingegen nimmt man an, dass gilt: $h_x \sim M^{0,5}$

Je größer also M ist, desto kleiner wird der Wert für μ^* in Gleichung (Gl. 2.4.2).

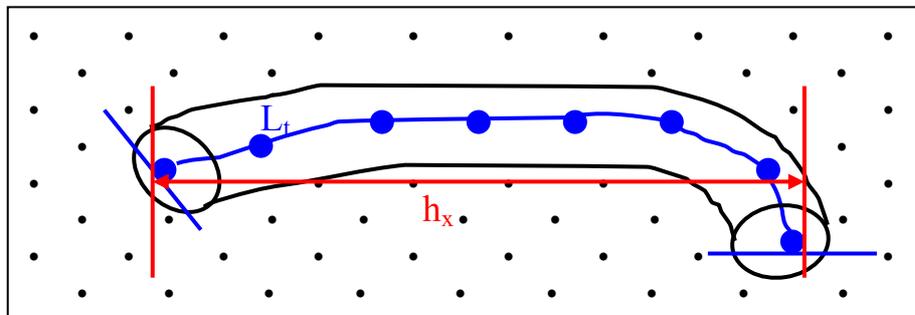


Abb. 2.4.4: Darstellung der im Polymer gebildeten „Röhre“, die die Migrationsgeschwindigkeit der DNA bedingt [Vgl.: Heller, 1997, S. 37]

Die „Röhren“ orientieren sich im angelegten elektrischen Feld, was immer wichtiger für die Beweglichkeit μ^* wird, je größer die DNA-Fragmente sind. Ab einer bestimmten Größe der DNA bzw. der „Röhre“ ist die Orientierung im Feld so stark, dass gilt: $h_x \sim L_t$

Nach Gleichung 2.4.2 wird die Beweglichkeit der Fragmente damit größenunabhängig. Eine Trennung ist deshalb auf diese Weise nicht mehr möglich.

2.4.2.3 Trennung der DNA in verdünnter Lösung

Im Jahre 1993 wurde erstmals festgestellt, dass sich DNA-Fragmente auch in niedrig konzentrierten Lösungen mit $c < c^*$ trennen lassen. Als Polymer wurde Hydroxyethylcellulose (HEC) verwendet. Getrennt werden sollten doppelsträngige (ds) DNA-Fragmente mit einer Größe zwischen 72 Basenpaaren (bp) und 23 kbp. Die Trennungen wurden vergleichend in HEC unterschiedlicher Masse durchgeführt. Einmal betrug die

Masse der HEC-Moleküle $139.000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ mit $c^* = 1,80\%$, bei den Vergleichsmessungen $1.315.000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ mit $c^* = 0,37\%$. Das experimentelle Ergebnis zeigte, dass mit der kleineren HEC nur die kleinen bp bis etwa 1000 bp gut separiert werden konnten. In der Lösung mit großer HEC hingegen wurde eine gute Trennung erreicht für Oligonukleotide oberhalb 603 bp und das bei HEC-Konzentrationen deutlich unter c^* .

Vergleicht man die Ergebnisse mit denen in chemischen und physikalischen Gelen, wird klar, dass man mit der kleineren HEC und $c < c^*$ zwar kleinere Oligonukleotide trennen kann, die Methode der Wahl ist wegen der besseren Resultate jedoch die CE in höher konzentrierten Polymeren, also in physikalischen Gelen. Im Gegensatz dazu erlangt man für die großen Fragmente mit HEC-Konzentrationen $c < c^*$ viel bessere Trennungsergebnisse als in physikalischen Gelen mit $c > c^*$ (siehe Abb. 2.4.6).

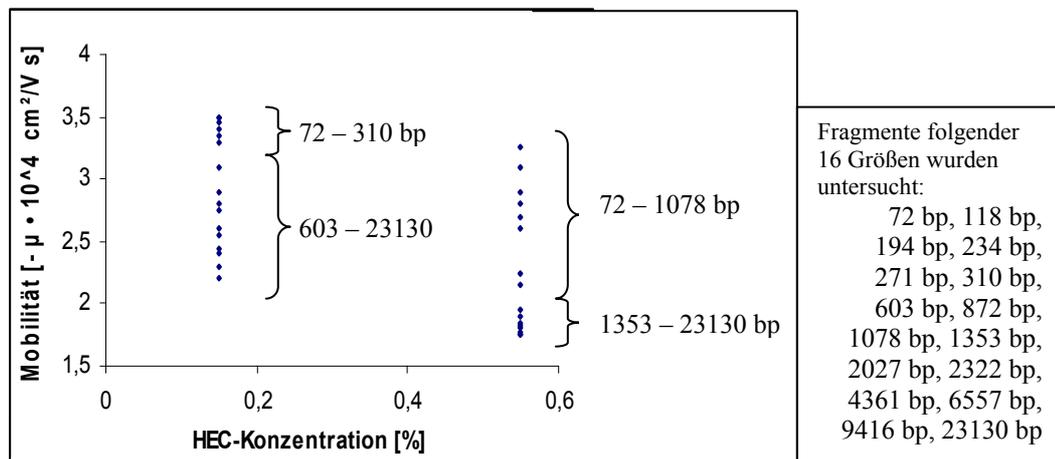


Abb. 2.4.6: Darstellung der Auftrennung verschieden großer dsDNA-Fragmente mittels einer CE in HEC ($M_w = 1.315.000$; $c^* = 0,37\%$) [Vgl.: Heller, 1997, S. 104]

Bei stark verdünnten Polymerlösungen können jedoch weder das Ogston- noch das Reptations-Modell als Antwort für die Trennung der Oligonukleotide herangezogen werden. Eine mögliche Begründung ist, dass sowohl die ungeladenen HEC-Moleküle als auch die dsDNA wenig verformbare Moleküle sind. Die HEC besitzt zudem sperrige Ethylenoxid-Gruppen an ihren Außenseiten. Beim Durchlaufen der dsDNA durch die Polymerlösung werden sich die DNA-Fragmente in den HEC-Molekülen verfangen, welche mit durch die Kapillare getragen werden müssen. Je größer nun die DNA-Fragmente sind, desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass sie auf Polymere treffen und umso mehr Polymere müssen mitgetragen werden. Das Verhältnis von Ladung zu Masse verkleinert sich, was wiederum zur Verlangsamung der DNA-

Fragmente führt. Von den kleinen HEC-Molekülen kann diese Wirkung für die sehr großen DNA-Fragmente nicht oder nur sehr begrenzt ausgehen, da kleine HEC-Moleküle zu leicht sind, um das Verhältnis Ladung zu Masse entscheidend zu verkleinern.⁵⁶

2.4.2.4 Einfluss der Polymerkonzentration

Die von uns untersuchten Oligonukleotide liegen im Bereich bis 1000 bp, sodass die Trennungsmatrix aus einem physikalischen Gel mit einer Polymerkonzentration größer als c^* besteht. Dennoch gibt es auch in diesem Konzentrationsbereich optimalere und weniger geeignete Konzentrationen für das Polymer.

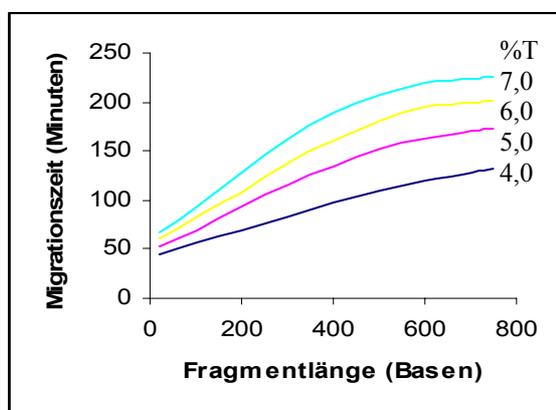


Abb. 2.4.7: Migrationszeit gegen Polymerkonzentration in einem elektrischen Feld von 200 V/cm in einer 30 cm-langen Kapillare bei Zimmertemperatur [Vgl.: Heller, 1997, S. 247]

Bei durchgeführten CE mit Polyacrylamid als Trennungsmatrix wurde die Migrationszeit in einer 30 cm langen Kapillare bei einer angelegten Feldstärke von 200 V/cm für Fragmente im Bereich bis 800 bp in Abhängigkeit der Polymerkonzentration untersucht. Wie in Abb. 2.4.7 ersichtlich, steigt bei einer Polymerkonzentration von 7.0%T die Migrationszeit bis etwa 400 bp linear an. 7.0%T bedeutet, dass im Gesamt-Gel-Volumen die Masse des Polymers 7% ausmacht. Für größere Fragmente flacht die Kurve jedoch ab und ab etwa 600 bp entsteht ein Plateau. Somit ist eine Trennung der Fragmente in diesem Längenbereich nicht mehr möglich. Bei einer Polymerkonzentration von nur 4%T hingegen erhält man eine fast lineare Steigung der Migrationszeit im gesamten Fragmentlängenbereich. Insgesamt verdoppelt sich die Migrationszeit beinahe von zwei auf knapp vier Stunden bei einer Konzentration von 7%T anstelle von 4%T.

Offensichtlich sind die Poren im „Gel“ bei 7%T so klein, dass selbst die kurzen Fragmente lange Zeit benötigen, um hindurchzugelangen. Bei dieser geringen Porengröße gilt anscheinend bereits für Fragmente ab 600 bp, dass $h_x \sim L_t$ ist, da sich die

⁵⁶ [Vgl.: Heller, 1997, S. 99 ff]

„Röhren“ ganz nach dem elektrischen Feld ausrichten. Damit gleicht sich die Geschwindigkeit der unterschiedlich langen Fragmente über 600 bp an.

2.4.2.5 Einfluss des Elektrischen Feldes

Des Weiteren wurde der Einfluss der Spannung auf die Mobilität und Trennungseigenschaften bei der CE getestet. Dazu wurde wiederum eine Kapillare mit einer Länge von 30 cm verwendet und jeweils im Polymer mit einer Konzentration von 4%T gearbeitet. Wie in Abb. 2.3.8 zu erkennen, sinkt die Migrationszeit mit steigendem elektrischen Feld. Allerdings gilt für Feldstärken über 100 V/cm, dass die Kurve aus der Migrationszeit gegen Fragmentlänge nach oben abflacht. Die starke Ausrichtung nach dem elektrischen Feld beginnt bei 300 V/cm bereits bei einer Fragmentlänge von 500 bp.

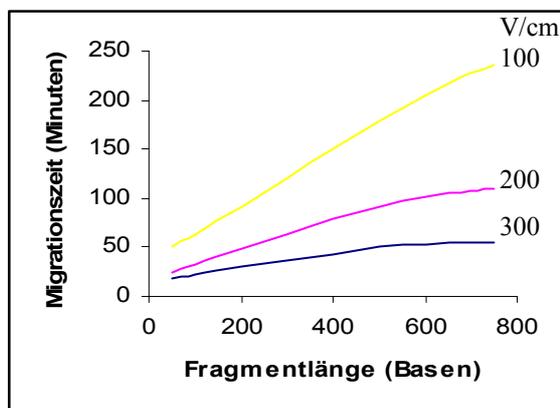


Abb. 2.3.8: Migrationszeit gegen elektrischen Feld in einer 30 cm-langen Kapillare bei Zimmertemperatur und einer Polymerkonzentration von 4%T [Vgl.: Heller, 1997, S. 248]

2.4.2.6 Einfluss der Temperatur

Schließlich wurde der Einfluss der Temperatur auf die Auflösungsfähigkeit mittels CE untersucht, wobei sämtliche Untersuchungen bei einer Feldstärke von 150 V/cm und einer Polymerkonzentration von 5%T durchgeführt wurden. Wie in Abb. 2.3.9 ersichtlich, gibt es eine proportionale Zunahme der Migrationszeit mit der Basenpaarenanzahl nur bei einer Temperatur von 60 °C. Wahrscheinlich kann sich eine hohe Ausrichtung nach dem Feld durch die bei dieser Temperatur starken Bewegungen der Moleküle nicht einstellen.⁵⁷ Zu höheren Temperaturen habe ich keine Angaben gefunden. Diese sollte man jedoch vermeiden, um die Chemikalien zu schonen.

⁵⁷ [Vgl.: Heller, 1997, S. 246 ff]

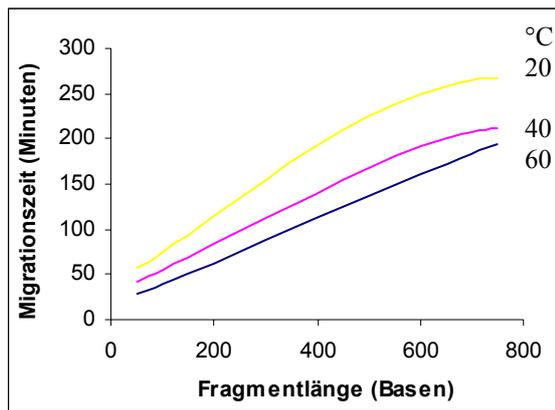


Abb. 2.3.9: Migrationszeit gegen Temperatur in einem elektrischen Feld von 150 V/cm in einer 30 cm-langen Kapillare und einer Polymerkonzentration von 5%T [Vgl.: Heller, 1997, S. 249]

3 Berechnungen

3.1 Berechnung der Verschiebung des Brennpunkts

Ein Problem bei der Detektion der Fluoreszenzstrahlung ist die richtige Positionierung des Silizium-Detektors. Nur in der richtigen Position kann diese Strahlung möglichst vollständig aufgenommen werden. Da das Licht von einem Zwei-Linsen-System eingefangen, parallelisiert und gebündelt wird, entsteht ein Fokus des Lichtstrahls, an dessen Stelle sich der Detektor befinden muss. Die Einstellung geschieht, indem zunächst der Laser eingeschaltet wird und dessen Strahl ohne eingebauten Filter verfolgt wird. Der entstehende Fokus kann erkannt werden, indem man ein Stück Papier in den Strahl hält. Er befindet sich dort, wo sich auf dem Papier der kleinstmögliche Punkt abbildet. Auf diese Stelle muss der Detektor eingerichtet werden. Das Problem ist, dass sich der Fokus nach Einsetzen des bzw. der Filter verschiebt, jedoch nicht erkennbar ist, wie weit. Der Laserstrahl ist nämlich nicht mehr erkennbar, da zu viele Photonen weggefiltert werden. In Abb. 3.1.1 ist eingezeichnet, wie sich ein konvergierender Lasergang verändert, wenn man eine planparallele (Glas-)Platte in den Strahl hält.

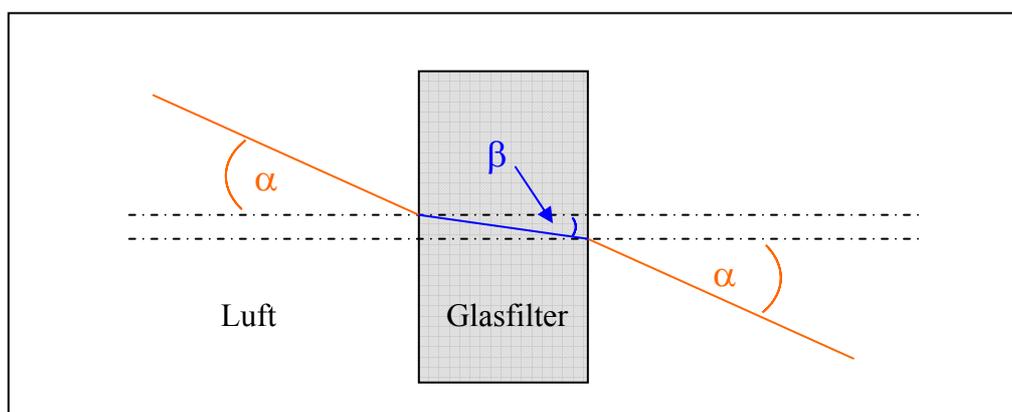


Abb. 3.1.1: Lichtbrechung an den Übergängen Luft → Glas und Glas → Luft [Vgl.: KnowHow: Glasweg am Bino, 2004]

Beim Übergang zwischen Luft und dem optisch dichteren Glas tritt eine Brechung des Lichts zum Einfallslot hin auf. Beim Austritt des Strahls aus dem Filter, wird der Strahl wieder vom Einfallslot weg gebrochen, sodass der einfallende und der austretende Strahl parallel zueinander verlaufen.

Der Brechungsindex ist in erster Linie eine materialabhängige Größe. Für Luft im Vakuum beträgt sie $n = 1$. Des Weiteren ist er jedoch auch wellenlängenabhängig, weshalb sich die Angaben zum Brechungsindex immer auf eine bestimmte Wellenlänge beziehen.

Es gilt nach Snellius:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = n \quad (\text{Gl. 3.1.1})$$

Durch diese Lichtbrechung beim Einbau eines Filters in den konvergierenden Strahlengang wird demnach der Fokus nach hinten verlagert und zwar um die Strecke s , siehe Abb. 3.1.2.

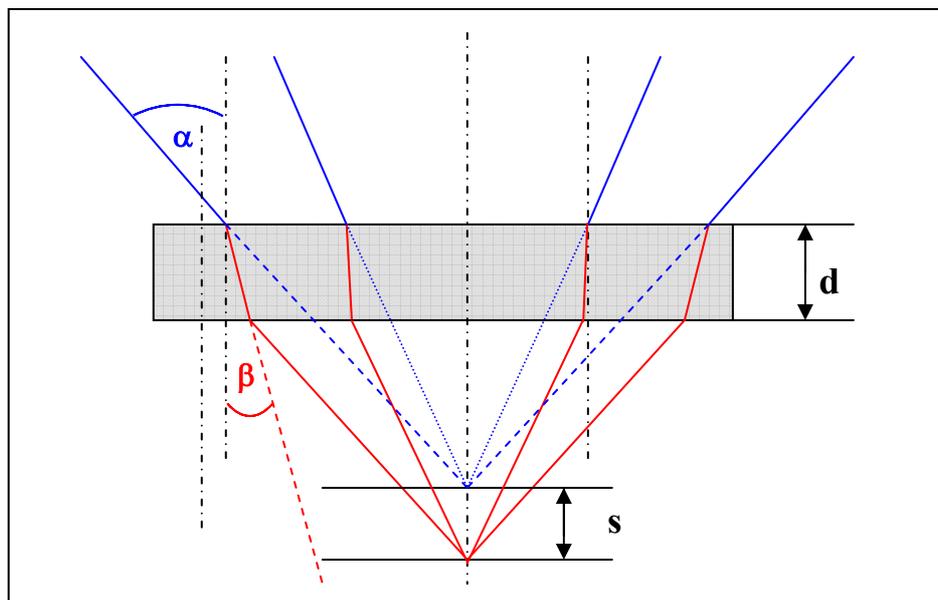


Abb. 3.1.2: Verschiebung des Fokus um die Strecke s ; in blau: Der Strahlengang ohne Glas; in rot: Der Strahlengang mit Glas [Vgl.: Glasweg am Bino, 2004, S. 2]

Die Strecke s lässt sich berechnen nach der Formel:

$$s = d \cdot \left(1 - \frac{\tan \beta}{\tan \alpha} \right) \quad (\text{Gl. 3.1.2})$$

Werden für α und β relativ kleine Winkel angenommen, gilt:

$$s \cong d \cdot \left(1 - \frac{\sin \beta}{\sin \alpha} \right) \quad (\text{Gl. 3.1.3})$$

Mit Gleichung 3.3.1 erhält man somit:

$$s \cong d \cdot \left(1 - \frac{1}{n} \right) \quad (\text{Gl. 3.1.4})^{58}$$

In unserem Fall sind zwei Filter eingebaut, die laut telefonischer Herstellerangaben jeweils aus mehreren dünnen Glasplatten der Dicke von einem Millimeter bestehen. Die Spalte zwischen den Glasplättchen seien vernachlässigbar klein, sodass für die Dicke d ein Wert von 4 mm angenommen werden kann, die von außen messbare Breite des Filterglases. Der Brechungsindex eines Bandpassfilters FB 600-40 der Firma Thorlabs beträgt laut Firmenangaben $n = 2,1$ bei einem Lichtstrahl der Wellenlänge 600 nm. Daraus ergibt sich für s bei zwei eingebauten Filtern:

$$s \cong (2 \cdot 4 \text{ mm}) \cdot \left(1 - \frac{1}{2,1} \right) \cong 4,2 \text{ mm} \quad (\text{Gl. 3.1.5})$$

Die Strecke s , um die der Detektor nach hinten verschoben werden muss, liegt demnach bei 4,2 mm.

Laut Herstellerangaben liegt der Fokus der verwendeten Linse 01 LDX 063 der Firma Melles Griot bei 27,1 mm.⁵⁹ Addiert man die ausgerechneten 4,2 mm hinzu, so kommt man auf ca. 31 mm. Bei dieser Entfernung wurde auch tatsächlich die höchste Fluoreszenz gemessen.

Wie oben erwähnt, ist der Wert für den Brechungsindex n des Weiteren von der Wellenlänge des auf den brechenden Körper eintreffenden Lichts abhängig. Dies gilt auch für optische Linsen, denn die Linsengleichung für dünne Linsen lautet:

$$\frac{1}{f} = (n - 1) \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right) \quad (\text{Gl. 3.1.6})$$

[R_1 und R_2 sind die Werte für die Brechungsmatrix beim Eintreffen und Austreten des Lichtstrahls.]⁶⁰

Der Fokus f ist also von n abhängig und n seinerseits von der Wellenlänge. Licht höherer Wellenlänge (rot) wird weniger stark gebrochen als Licht niedrigerer Wellenlänge (blau). Dies ist in Abb. 3.1.3 schematisch dargestellt.⁶¹

⁵⁸ [Vgl.: KnowHow: Glasweg am Bino, 2004]

⁵⁹ [Vgl.: MELLES GRIOT: 01 LDX 063, 2004]

⁶⁰ [Vgl.: Hecht, 2001, S. 372 f]

⁶¹ [Vgl.: Hecht, 2001, S. 401]

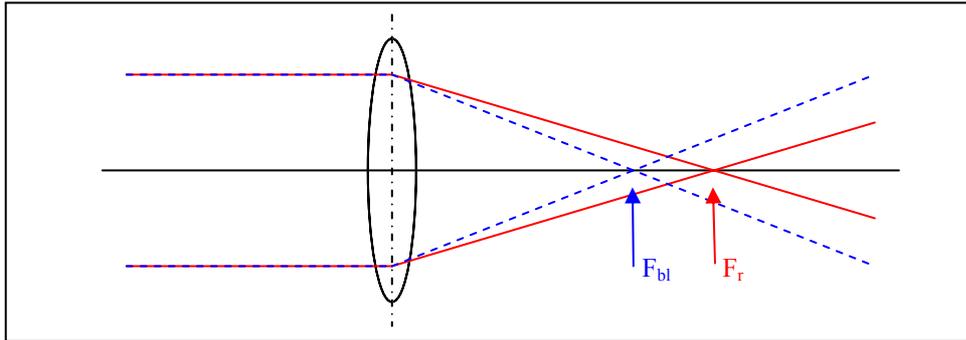


Abb. 3.1.3: Chromatische Aberration übertrieben dargestellt [Vgl.: Hecht, 2001, S. 402]

Die Einstellung des Si-Detektors erfolgt mit dem grünen Laserlicht bei einer Wellenlänge von 532 nm. Die rote Fluoreszenz des Farbstoffes ROX hat eine Wellenlänge von ca. 604 nm. Der Fokus sollte demnach etwas weiter von der Linse entfernt liegen. Laut telefonischer Herstellerangaben der Firma Melles Griot unterscheidet sich der Wert der Brechungsindices jedoch erst in der dritten Nachkommastelle:

Brechungsindex ($\lambda = 532 \text{ nm}$) = 1,519

Brechungsindex ($\lambda = 605 \text{ nm}$) = 1,516

Da die Einstellung des Si-Detektors nicht so genau sein kann, ist dieses Phänomen der chromatischen Aberration für uns vernachlässigbar. Interessant wird dies z.B. bei Fotolinsen, da ohne Korrektur unscharfe Bilder entstehen.⁶²

4 Experimenteller Teil

4.1 Versuchsbedingungen

Dieser Teil der Arbeit beschreibt die Versuche und ihre Ergebnisse, die mit der von meinem Vorgänger Bernhard Schwabe angefertigten Apparatur durchgeführt wurden.

In der Zwischenzeit ist der von Bernhard Schwabe für seine Experimente entlehene Laser mit einer Leistung von 5 bis 10 mW⁶³ durch das ursprünglich geplante Lasermodul GLM-1 der Firma Roithner Lasertechnik mit einer Leistung von

⁶² [Vgl.: Gerthsen, 1966, S. 328]

⁶³ [Vgl.: Schwabe, 2003, S. 50]

ca. 1 - 3 mW ausgetauscht worden,⁶⁴ sodass die Untersuchungen in dieser Arbeit alle mit diesem durchgeführt werden konnten.

Bei dem verwendeten Spektrometer handelt es sich um das CCD-Gerät der Firma „Andor Technologies“, mit dem man über den gesamten für uns interessanten Wellenlängenbereich Emissionsstrahlungen messen kann. Wie bereits aus Schwabes Arbeit bekannt, ist es mit diesem Gerät möglich, die Signale über einen selbst bestimmten Zeitraum zu akkumulieren, um somit das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Darüber hinaus hat man die Möglichkeit, vor der eigentlichen Messung den Hintergrund aufzunehmen und diesen dann vom erhaltenen Messsignal abzuziehen.

Erinnert sei an das Problem Schwabes, dass sich bisher kein Emissionsspektrum des Farbstoffs ROX erkennen lies, sondern dass man lediglich einen Signalberg im gesamten von den Filtern durchgelassenen Wellenlängenbereich von ca. 450 nm bis 700 nm erhalten hat.⁶⁵ Dieser hat seine Form jedoch beibehalten, unabhängig, ob sich der Farbstoff in der Kapillare befand oder nicht. Die Vermutung lag also nahe, dass die emittierte Strahlung aus dem Laser stammte.

4.2 Untersuchungen des Laserstrahls

4.2.1 Messungen ohne Filter am Spektrometer

Zunächst wurde noch einmal eine Messung mit der beschriebenen Apparatur durchgeführt, bei der eine ganz neue und unbefüllte Kapillare verwendet wurde. Sämtliche Filter wurden ausgebaut und die Hintergrundstrahlung wurde vom Spektrometer von der gemessenen Strahlung direkt subtrahiert. Im Vergleich zur Vorarbeit von Herrn Schwabe wurde lediglich der untersuchte Wellenlängenbereich, der nun von ca. 450 nm bis ca. 1100 nm reicht, verändert, wie in Abbildung 4.2.1 zu sehen. Dabei ließ sich neben der großen und erwünschten Emission bei 532 nm und der vergleichsweise geringen Emission im Bereich um 808 nm ein sehr großer Peak bei 1064 nm erkennen. Die Quelle der Emission bei 808 nm wurde bereits in der Arbeit von Herrn Schwabe erkannt. Das Licht stammt aus der im Laser befindlichen Laserdiode, wie auch in meiner Arbeit in Kapitel 2.2.5 genauer erläutert. Die recht große Intensität

⁶⁴ [Vgl.: ROITHNER LASERTECHNIK: Lasermodul GLM-Series, 2004]

⁶⁵ [Vgl.: Schwabe, 2003, S. 56 f]

im Bereich von 1064 nm war jedoch bis dato unerkant geblieben. Die Herkunft dieser Wellenlänge erschien zunächst rätselhaft.

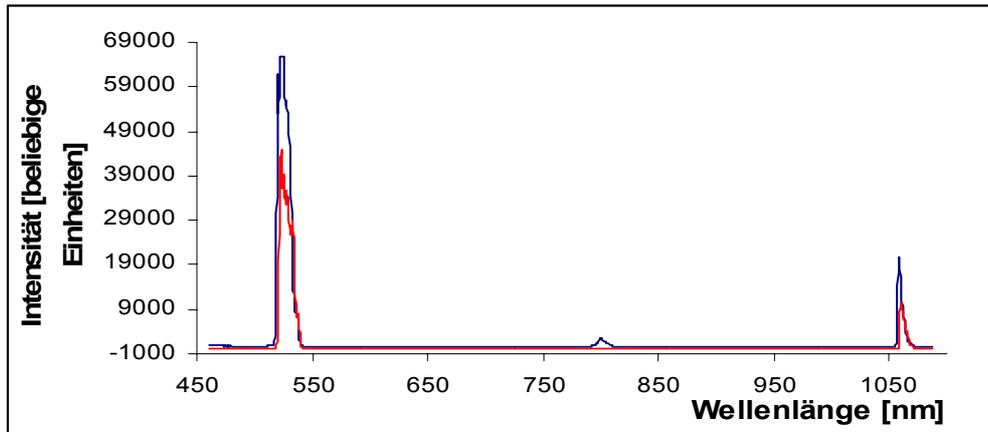


Abb. 4.2.1: Emissionsspektrum des Lasers ohne Filter (blau) [a] und mit Bandpassfilter (rot) [b]

4.2.2 Herkunft der Wellenlänge bei 1064 nm

Die erste Vermutung war, dass dies die Strahlung sei, die ebenfalls aus dem Laser emittiert wird. Wie ebenfalls in Kapitel 2.2.5 beschrieben, gelangt die Strahlung aus der Laserdiode auf einen Festkörperlaser, der Strahlung der Wellenlänge 1064 nm erzeugt. Diese wird erst dann mittels eines Frequenzverdopplers auf die gewünschten 532 nm halbiert. Es erschien aber nicht unwahrscheinlich, dass dennoch ein relativ großer Teil der Strahlung keine Frequenzverdoppelung erführe und bei 1064 nm den Laser verlässt.



Abb. 4.2.2: Foto des Lasers mit dem darüber befindlichen Bandpassfilter FB 530-10 der Firma Thorlabs, eingebaut in die Edelstahlfassung

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde zunächst der Bandpassfilter FB 530-10 der Firma Thorlabs in die Apparatur eingebaut. Dieser sollte laut Werksangaben lediglich

im Bereich zwischen 517 nm und 545 nm strahlungsdurchlässig sein, im gesamten übrigen Bereich zwischen 200 nm und 3000 nm die Transmission der Strahlung um den Faktor 10.000 erniedrigen.⁶⁶ Das vom Hersteller veröffentlichte Transmissionspektrum des Bandpassfilters ist in Abb. 4.2.3 zu sehen. Wie in Abb. 4.2.2 zu erkennen, wurde dieser Filter direkt über den Laserausgang eingebaut.

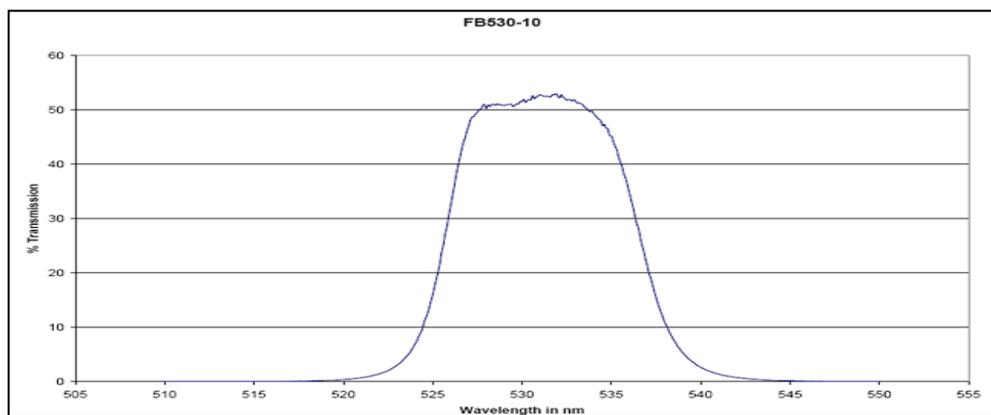


Abb. 4.2.3: Transmissionskurve des Bandpassfilters FB 530-10 der Firma Thorlabs laut Herstellerangabe [aus: THORLABS: FB 530-10, 2004]

Entgegen den Erwartungen hat sich nach Einbau dieses Filters das mit dem Spektrometer aufgenommene Laserspektrum im Vergleich zu Abb. 4.2.1 [a] nur unwesentlich verändert. Der Peak bei 808 nm war zwar verschwunden, doch der Peak bei 1064 nm war immer noch deutlich erkennbar und auch der Peak bei 532 nm wurde nicht halbiert, siehe Abb. 4.2.1 [b].

Zunächst wurde deshalb an einem Transmissionsmessgerät getestet, ob der Bandpassfilter tatsächlich die Strahlung so filtert, wie laut Hersteller angegeben. Tatsächlich entsprach die selbst gemessene Transmissionskurve im Wesentlichen der des Herstellers. Zwischen 1000 nm und 1100 nm war keine Transmission feststellbar, sondern lediglich zwischen 520 nm und 541 nm. Ähnlich wie laut Herstellerangaben betrug die Durchlässigkeit in diesem Bereich ungefähr 55%. Dass der Signalberg bei 532 nm mit BP-Filter jedoch nicht nur 55% des Signalbergs erlangt sondern, wie in Abb. 4.2.1 zu sehen, ca. 70%, kann beispielsweise daran liegen, dass sich der Winkel zwischen einfallendem Laserlicht und dem Filter bei den Messungen leicht verändert hat. Wie bei verschiedenen Messungen festgestellt wurde, verändert sich dadurch die Filterleistung von Interferenzfiltern merklich. Da die gemessene Strahlung bei 1064 nm

⁶⁶ [Vgl.: THORLABS: FB 530-10, 2004]

demnach durch den Filter hätte weggefiltert sein müssen, war klar, dass der Signalberg in diesem Bereich eine andere Ursache haben musste.

Die zweite Möglichkeit für das Entstehen des Peaks bei 1064 nm war, dass es sich dabei um die zweite Ordnung der Strahlung bei 532 nm handelt. Dies ergibt sich aus der Arbeitsweise eines Spektrometers, wie es in Kapitel 2.3 näher erläutert ist.

Für diese Möglichkeit sprach, dass sich die Form der Signalberge bei 532 nm und 1064 nm in etwa entspricht und dass der Signalberg der höheren Ordnung deutlich kleiner ist, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben. Außerdem erschien es somit logisch, dass der Peak bei 1064 nm auch mit dem eingesetzten Bandpassfilter weitestgehend erhalten blieb.

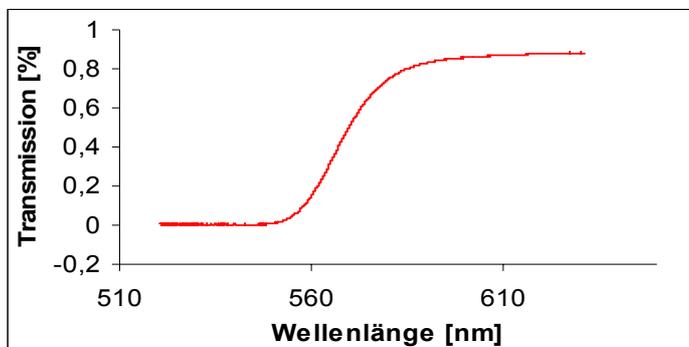


Abb. 4.2.4:
Transmissionsspektrum des Hoch-Pass Filters 03 FCG 489 der Firma Melles Griot im Bereich von 520-630 nm

Wenn diese Annahme richtig sein sollte, so müsste der Signalberg bei 1064 nm verschwinden, wenn der Signalberg bei 532 nm weggefiltert wird. Um dies zu testen, wurde der bereits bekannte Hoch-Pass Filter 03 FCG 489 der Firma Melles Griot eingesetzt. Auch von diesem Filter wurde zur Sicherheit ein Transmissionsspektrum aufgenommen, welches in Abb. 4.2.4 zu sehen ist. Es lässt sich erkennen, dass die Transmission im Bereich um 530 nm null beträgt.

Tatsächlich gibt es in Abb. 4.2.5 nur einen sehr kleinen Peak in diesem Wellenlängenbereich. Im Gegensatz dazu erscheint der Signalberg bei 1064 nm um ein Vielfaches größer. Dies ist jedoch unmöglich, wenn jener Peak tatsächlich die Darstellung des anderen in einer höheren Ordnung sein sollte. Dieses Phänomen allein hätte deshalb die erste These bestätigt, dass der Peak bei 1064 nm aus dem Festkörperlaser in unserem DPSS-Laser stammt.

Bei näherer Betrachtung wurde jedoch klar, dass der Signalberg bei 1064 nm absolut betrachtet viel niedriger ist als der in Abb. 4.2.1. Wurden sowohl der Hoch-Pass Filter 03 FCG 489 als auch der Bandpassfilter eingesetzt, war kein Signalberg im

Wellenlängenbereich zwischen 450 nm bis 1100 nm zu erkennen. Diese Ergebnisse zusammen genommen führten schließlich zu der These, dass es sich bei dem Signalberg bei 1064 nm um eine Zusammensetzung aus zwei Phänomenen handelt. Hauptsächlich besteht dieser Peak aus der zweiten Ordnung des Laserlichts mit der Wellenlänge 532 nm und, zum viel kleineren Teil, aus tatsächlich mit der Wellenlänge 1064 nm ausgesandtem Licht. Mit dieser Annahme ließen sich sämtliche bisher erhaltenen Laserspektren unter Verwendung der einzelnen Filter sinnvoll erklären.

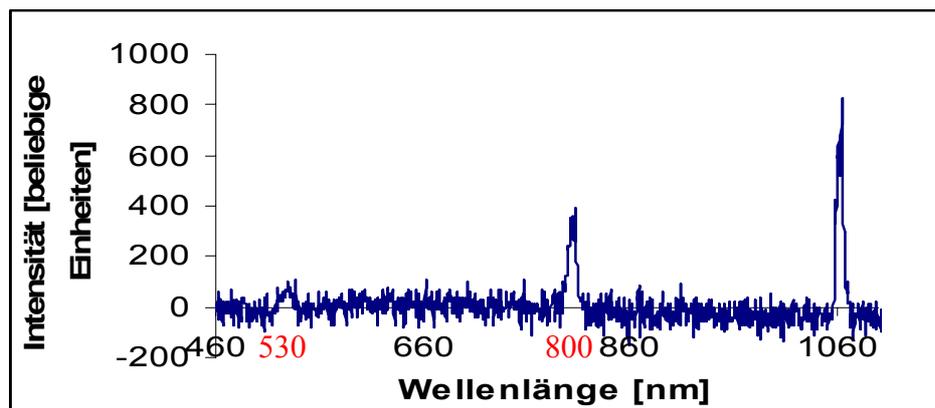


Abb. 4.2.5: Laserspektrum unter Verwendung des Hoch-Pass Filters 03 FCG 489 der Firma Melles Griot

Hinzu kommen die Aufnahmen, die vom Spektrum einer 4-Watt-Glühlampe gemacht wurden. In Abb. 4.2.6 [a] ist ein solches Spektrum zu erkennen, welches ohne Filter gemessen wurde. In Abb. 4.2.6 [b] sehen wir das Spektrum unter Gebrauch des Bandpassfilters FB 530-10 der Firma Thorlabs. Wie zu erwarten, lässt sich ein deutlicher Peak im Bereich um 530 nm erkennen. Des Weiteren sieht man einen deutlichen, wenn auch viel kleineren Signalberg bei 1064 nm. Dies ist wohl die zweite Ordnung des Lichts mit der Wellenlänge 532 nm, denn durch den eingesetzten Filter kann im Bereich 1064 nm eigentlich keine Strahlung hindurchkommen. Wurde hingegen der Hoch-Pass Filter hinzugezogen, verschwanden wiederum sämtliche Signalberge.

Mit dieser Erkenntnis war unser Problem gelöst. Die tatsächlich existierende Strahlung bei 1064 nm konnte durch den Bandpassfilter FB 530-10 herausgefiltert werden. Die zweite Ordnung der Strahlung bei 532 nm störte uns hingegen nicht, denn das Ziel war die Arbeit mit einer Si-Diode und nicht mit dem Spektrometer. Bei einer Diode gibt es jedoch keine höheren Ordnungen.

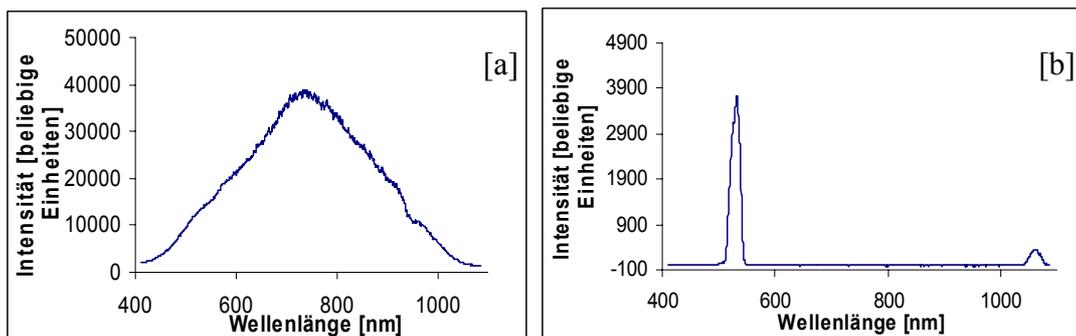


Abb. 4.2.6: Aufgenommene Spektren einer Taschenlampenbirne ohne Filter [a] und mit Bandpassfilter FB 530-10 [b]

4.2.3 Problem des breiten Signalbergs

Ein anderes zu lösendes Problem galt dem breiten Signalberg im gesamten von den Filtern nicht ausgelöschten Wellenlängenbereich zwischen ca. 550 nm und 720 nm, der schon in der Arbeit von Bernhard Schwabe als Problem aufgetreten ist und dessen Herkunft bislang ungeklärt war, siehe Abb. 4.2.7.

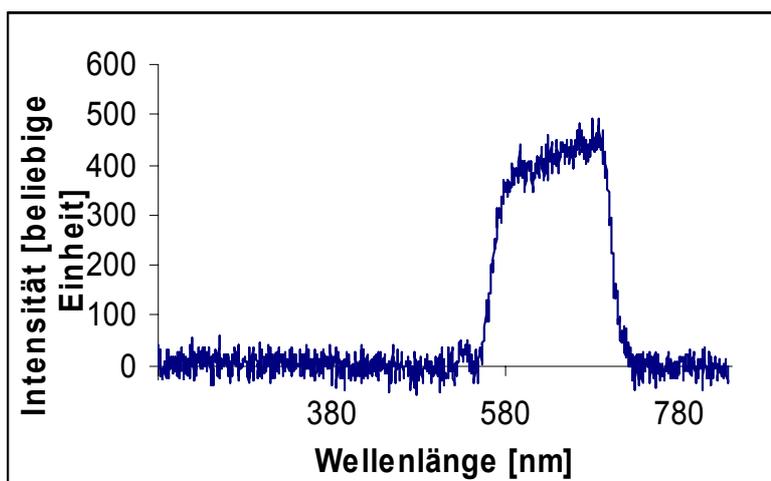


Abb. 4.2.7:
Aufgenommenes Laserspektrum mit folgenden Filtern: Tief-Pass Filter 03SW P414 und Hoch-Pass Filter 03 FCG 489 [aus: Schwabe, 2003, S. 57]

Der Wellenlängenbereich unterhalb von 550 nm wird durch den Hoch-Pass Filter abgeschnitten, der Bereich oberhalb von etwa 720 nm von einem damals eingesetzten Tief-Pass Filter namens 03 SWP 414 der Firma Melles Griot. Mit diesem sollte ursprünglich die Strahlung bei 808 nm entfernt werden.

Aufgrund der von mir zusätzlich entdeckten Strahlung bei 1064 nm wurde dieser Tief-Pass Filter durch den Bandpassfilter FB 530-10 ersetzt. Um aber den Signalberg zu untersuchen, wurden zunächst Messungen gestartet, bei denen lediglich der Hoch-Pass Filter 03 FCG 489 zum Einsatz kam. Wie in Abb. 4.2.8 zu sehen, lässt sich wie erwartet ein deutlicher Peak bei 808 nm erkennen. Ebenfalls sieht man einen kleinen Peak bei

532 nm. Dies ist der Anteil der Laseremission, den der Filter nicht zurückhalten konnte. Deutlich erkennbar ist des Weiteren aber auch der bereits erwähnte Signalberg, der diesmal natürlich nicht bei ca. 720 nm abgeschnitten wurde. Vermutet wurde, dass dieser sich auch weiter in den niederwelligen Bereich erstreckte, wenn auf dieser Seite nicht der Hoch-Pass Filter eingesetzt worden wäre.

Bei einer Vergleichsmessung mit ausgeschaltetem Laser ließen sich keine herausragenden Signale erkennen. Dies bedeutete, dass der Signalberg tatsächlich mit dem Laserlicht zusammenhängen musste. Es stand nämlich zur Vermutung, dass durch den Anodenblock aus durchsichtigem Plexiglas etwas Tageslicht in die Messapparatur gelangen und die Grundlage für den Signalberg sein könnte. Dies konnte aber außerdem dadurch ausgeschlossen werden, dass selbst bei Messungen in einem Raum ohne Fenster und ohne künstliches Licht das Spektrum dem aus Abb. 4.2.8 glich.

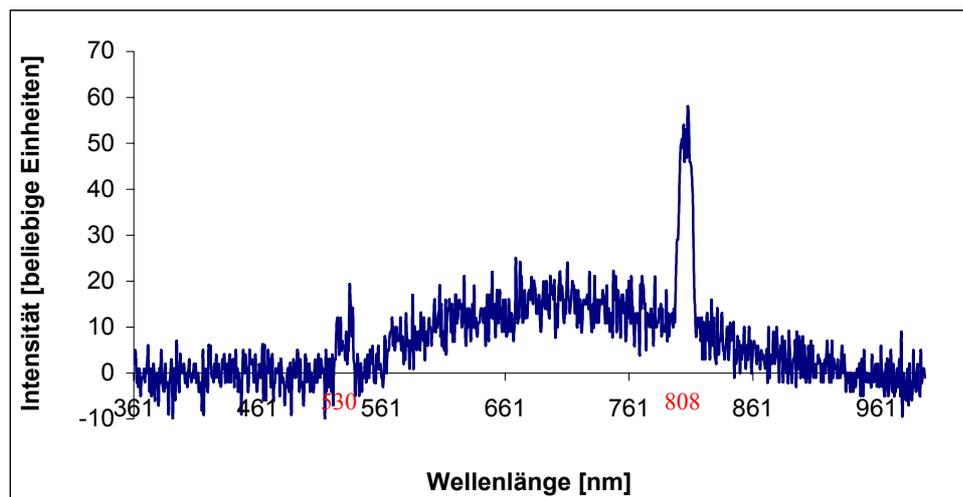


Abb. 4.2.8: Spektrum der Messung des Laserlichts mit dem Hoch-Pass Filter 03 FCG 489

Um auszuschließen, dass nicht etwa das Glas der Kapillare oder die eingebauten Linsen durch den Laser zur Fluoreszenz angeregt wurden und der breite Signalberg sich somit erklären ließe, wurde der Kopf des Spektrometers aus der Apparatur ausgebaut und direkt an den Laserausgang gehalten. Lediglich der Filter 03 FCG 489 wurde noch dazwischen gehalten. Dies musste sein, da andernfalls die Emission bei 532 nm im Vergleich so riesig geworden wäre, dass der Signalberg nicht mehr hätte wahrgenommen werden können, wie auch in Abb. 4.2.1 zu sehen ist.

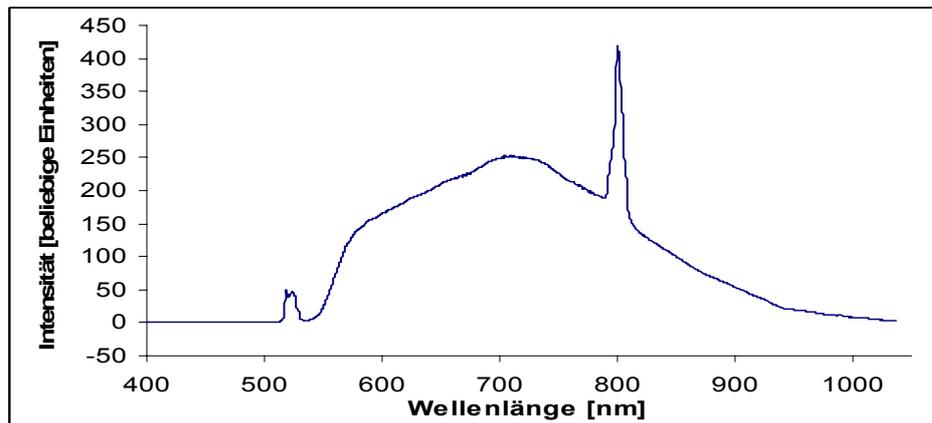


Abb. 4.2.9: Spektrum der Messung des Laserlichts von 500 bis 1050 nm mit dem Hoch-Pass Filter 03 FCG 489. Laser direkt am Kopf des Spektrometers

Abgesehen davon, dass die Intensitäten des eingestrahlt Lichts viel höher ist, stimmt die Form des Spektrums in Abb. 4.2.9 mit der aus Abb. 4.2.8 überein. Dies schien zu belegen, dass die Strahlung aus dem Laser kommen musste. Die Vermutung lag nahe, dass die Strahlung demnach aus dem Halbleiterlaser, der in unserem Lasermodul eingebaut ist, stammt. Nach der Theorie aus Kapitel 2.2.3.2 konnte dies möglich sein, wenn Elektronen aus einem höheren Bereich des Leitungsbandes in einen niedrigeren Bereich des Valenzbandes fallen und somit energiereichere Photonen erzeugen. In der Literatur ist dieses Phänomen zwar beschrieben, doch es gab keine Angaben darüber, wie groß die „Ausbeute“ dieser energiereicheren Strahlung ist und bis in welchen Wellenlängenbereich sich dieses Phänomen erstreckt. Gestützt wurde dies Annahme jedoch durch einen Internetartikel über den Selbstbau eines DPSS-Spektrometers, in dem in einem Nebensatz geschrieben steht, dass der verwendete Diodenlaser ähnlichen Typs auch einen kleinen Anteil sichtbaren Lichts erzeugen würde.⁶⁷ Auf nähere Anfrage konnte ich jedoch keine erhellenden Informationen erlangen.

Der Peak bei 532 nm in Abb. 4.2.8 und 4.2.9 ist ungefähr so hoch ist wie der Signalberg. Bei beiden Messungen war der Hoch-Pass-Filter 03 FCG 489 eingebaut, der die Strahlungsintensität bei 532 nm um den Faktor 10^5 schwächt. Wenn man bedenkt, dass die im Halbleiterlaser entstehende Strahlung ungefähr dieselbe Intensität haben muss, wie die aus dem Lasermodul austretende Strahlung bei 532 nm, so wäre der Signalberg ebenfalls ca. 10^5 Mal schwächer als die eigentliche Strahlung bei 808 nm. Dieser Wert erschien mir als so klein, dass ich die Theorie, dies sei die energiereichere

⁶⁷ [Vgl.: Laspro: Digi-Art, 2004]

Strahlung, die im Halbleiterlaser ebenfalls produziert wird, für durchaus wahrscheinlich hielt. Vernachlässigt wurde dabei allerdings, dass sich der Signalberg sowohl in Abb. 4.2.8 als auch in Abb. 4.2.9 noch in den höherwelligen Bereich oberhalb der 808 nm erstreckt. Dies hätte nach meiner Theorie aber eigentlich nicht sein können. Vielmehr hätte man bei 808 nm eine scharfe Abrisskante erkennen müssen.

Nach dem Eintreffen des Bandpassfilters FB 530-10 der Firma Thorlabs wurden die in Kapitel 4.2.2 durchgeführten Messungen absolviert. Um mögliche Fehlerquellen auszuschließen, wurden der Laser, das Spektrometer und die Filter nicht in die Apparatur für die CE eingebaut, sondern wie in Abb. 4.2.10 schematisch dargestellt, außerhalb der Apparatur aufgebaut.

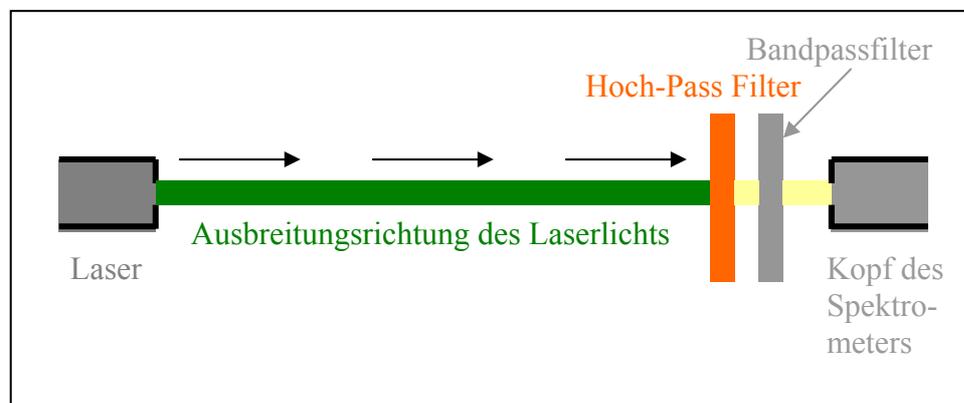


Abb. 4.2.10: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zum Messen der Laserspektren mit dem Hoch-Pass Filter 03 FCG 489 und dem Bandpassfilter FB 530-10

Wie erwartet, ist der große Signalberg im Bereich von etwa 550 nm bis 800 nm auf den Spektren nicht mehr existent. Durch die Kombination beider Filter sollte keine Strahlung mehr den Spektrometerkopf erreichen, was sich bestätigte. Auch diese Ergebnisse schienen die Annahme zu bestätigen, dass diese Emission tatsächlich aus dem Laser stammte und keine Artefakte des Spektrometers sein konnten, da die Emissionen durch den Bandpassfilter weggefiltert wurden. Aufgrund der Annahme, dass nun sämtliche unerwünschte Strahlung weggefiltert worden sei, schien einer erfolgreichen Durchführung einer CE nichts mehr im Wege zu stehen. Ein erster Versuch einer Kapillarelektrophorese wurde gestartet, wie in Kapitel 4.3 beschrieben.

Bei genauerer Betrachtung der in dieser Arbeit abgebildeten Spektren ergibt sich jedoch ein weiterer Widerspruch. Warum ist in Abb. 4.2.5 der erwähnte Signalberg im

Gegensatz zu Abb. 4.2.8 und 4.2.9 nicht zu erkennen, obwohl in allen Fällen der Hoch-Pass Filter 03 FCG 489 zur Messung verwendet wurde?

Der einzige Unterschied bei den Messungen war der Abstand zwischen dem Detektor und dem orangefarbenen Hoch-Pass Filter. Die Spektren in Abb. 4.2.5 und 4.2.9 wurden außerhalb der Apparatur erstellt. Während in Abb. 4.2.5 jedoch ein wenige Zentimeter großer Abstand zwischen Filter und Detektor bestand, betrug dieser Abstand in Abb. 4.2.9 nahezu null Zentimeter. Das Spektrum in Abb. 4.2.8 wurde nach Einbau aller Teile in die Apparatur gewonnen. Durch die Fokussierung des Lichts über das Linsensystem ist der Abstand vom Detektor zum Filter festgelegt, da der Detektor sich im Brennpunkt des Lichts befinden muss. Dieser Abstand war kleiner als 0,5 cm.

Es erschien deshalb sinnvoll, die Auswirkung dieses Filters auf die aufgenommenen Spektren zu untersuchen. Tatsächlich bestätigte sich, dass nur dann der Signalberg zu erkennen war, wenn sich der Hoch-Pass Filter nahe genug am Spektrometerkopf befand, also ab etwa 0,5 cm. Wie in Abb. 4.2.11 zu erkennen, wird der Signalberg immer stärker, je näher der Filter an den Kopf des Spektrometers gelangt. Es ist deshalb kaum noch auszuschließen, dass der orange Hoch-Pass Filter selbst fluoresziert und für die Emission verantwortlich ist. Dass der Signalberg immer höher wird, je näher der Filter an das Messgerät kommt, erklärt sich wohl dadurch, dass die Fluoreszenz des Farbstoffs in alle Raumrichtungen strahlt. Je kleiner der Abstand ist, desto größer ist der Raumwinkel, der in den Detektor des Spektrometers fällt. Die Entfernung vom Laser zum Filter betrug ungefähr 15 cm.

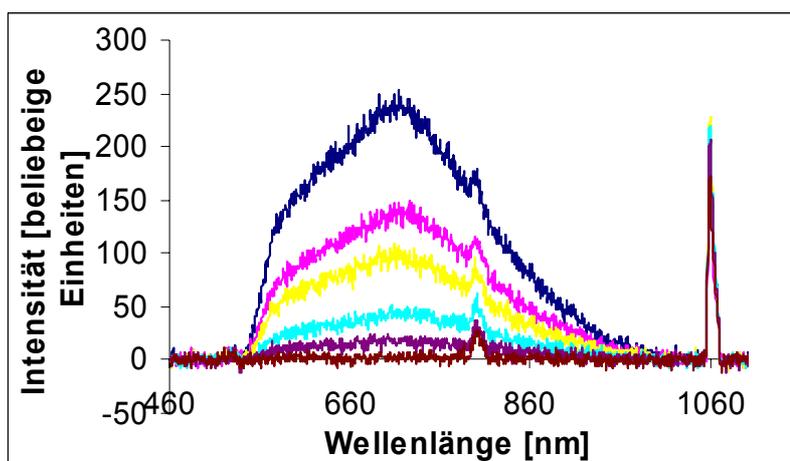


Abb. 4.2.11: Signalberg in Abhängigkeit der Entfernung des Filters 03 FCG 489 vom Kopf des Spektrometers: 0 cm [blau], 0,1 cm [rosa], 0,2 cm [gelb], 0,3 cm [türkis], 0,4 cm [violett], 0,5 cm [braun]

Durchläuft der Laserstrahl zunächst den Hoch-Pass Filter und dann den Bandpassfilter, wie es Abb. 4.2.10 zeigt, ist kein Signalberg zu erkennen, da der Abstand des

Hoch-Pass Filters zum Detektor aufgrund der Breite des Bandpass Filters mindestens 0,6 cm beträgt. Eine solche Anordnung erlaubt der Versuchsaufbau jedoch nicht.

Da diese Emission auf jeden Fall stören würde, wurde der Hoch-Pass Filter durch einen nicht fluoreszierenden Interferenzfilter ersetzt; ein Bandpassfilter derselben Machart und Firma wie der bereits eingesetzte Bandpassfilter FB 530-10.

4.3 Erster Versuch einer Kapillarelektrophorese

Wie oben beschrieben, schien es zunächst, als ob sämtliche Emissionen durch den kombinierten Einsatz des Hoch-Pass Filters 03 FCG 489 und des Bandpassfilters FB 530-10 herausgefiltert worden seien. Aufgrund dieser Annahme wurde der Versuch einer kompletten Kapillarelektrophorese unternommen. Dazu wurden zunächst die Filter, der Laser und der Detektor des Spektrometers in die Apparatur in bekannter Weise eingebaut. In die völlig unbenutzte Kapillare wurde mit der dafür vorgesehenen Spritze unter Druck das Polymer 3100 POP-4 eingefüllt. Am Anodenblock wurde die mit dem Faktor 1:10 verdünnten Pufferlösung „Buffer (10 x) with EDTA“ eingebracht und an der Kathode wurde die Size-Standard-Lösung Genescan[®] 400 HD mit einer Verdünnung im Verhältnis 1:1 mit hochreinem HPLC-Wasser in den vorgesehenen Behälter eingefüllt. (**HPLC** steht für **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography, wofür dieses Wasser Verwendung findet.⁶⁸) Alle diese Chemikalien sind Produkte der Firma Applied Biosystems. Die Size-Standard-Lösung enthält DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, an die Farbstoff ROX chemisch gebunden ist. Die elektrokinetische Injektion erfolgte bei 10 kV und dauerte etwa 8 Sekunden. Danach wurde die Size-Standard-Lösung durch dieselbe Pufferlösung wie die im Anodenblock ersetzt. Die Elektroden bestanden in unserem Fall aus einer Silber-Kupfer-Legierung. Auch während der Elektrophorese wurde eine Spannung von 10 kV angelegt, bei einem Strom von 0,2 mA. Trotz langen Wartens wurde am Bildschirm des Spektrometers kein Peak sichtbar.

Zunächst wurde angenommen, dass vielleicht die Konzentration der fluoreszierenden ROX-Farbstoffe zu niedrig gewesen sein könnte. Aus diesem Grund wurde die Pufferlösung entfernt und wiederum durch die Size-Standard-Lösung ersetzt. Nach einer guten Stunde mit angelegter Spannung war jedoch immer noch kein Signal zu erkennen, obwohl sich nun mit Sicherheit viele Farbstoffmoleküle in der Kapillare befinden

⁶⁸ [Vgl.: HPLC: A Users Guide, 2004]

mussten. Als nächstes wurde vermutet, dass über das Linsensystem in der Apparatur eventuell zu wenig Strahlung aus der Kapillare zum Detektor des Spektrometers gelangte. Dies erschien auch deshalb wahrscheinlich, da der Detektor eine sehr kleine Oberfläche hatte und bereits winzige Abweichungen vom Brennpunkt der Linse die Anzahl der detektierbaren Photonen enorm reduzieren müsste. Aus diesem Grund wurde der Kopf des Spektrometers wieder ausgebaut und direkt über die angestrahlte Kapillare gehalten, wie in Abb. 4.3.1 skizziert.

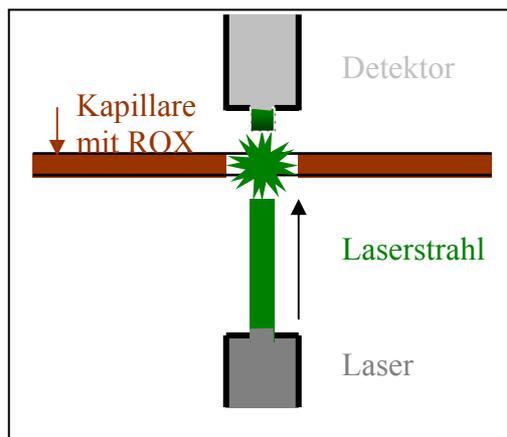


Abb. 4.3.1: Direktes Auffangen der Laserstrahlung mit dem Detektor des Spektrometers

Tatsächlich wurde kein Filter eingebaut, was bei Messungen mit dem Spektrometer eigentlich möglich sein sollte, da ein Gitter gewählt wurde, welches lediglich den Bereich von 582 nm bis 617 nm aufgenommen hat, siehe Abb. 4.3.2. Im Bereich von 604 nm ist ein Signal zu erkennen, also genau in dem Bereich, in dem der Farbstoff ROX sein Emissionsmaximum hat. Es erschien daher wahrscheinlich, dass die aufgenommene Emission tatsächlich vom Farbstoff stammte. Merkwürdig war jedoch, dass die Strahlung nicht mehr zu erkennen war, wenn der Hoch-Pass Filter 03 FCG 489 zwischen die Kapillare und den Detektor eingebaut wurde. Dies ließ sich nicht erklären, da der Filter im Bereich von ca. 580-630 nm eine Durchlässigkeit von über 80% hat, wie in Abb. 4.2.4 ersichtlich.

Bei weiteren Versuchen stellte sich schließlich heraus, dass man dasselbe Spektrum erhielt, wenn der Laser direkt über den Spektrometerkopf gehalten wurde, auch ohne Kapillare dazwischen und dass mit einem weniger gut auflösenden Gitter des Spektrometers dieser Peak bei 604 nm nicht zu erkennen war. Es war demnach klar, dass das Signal bei 604 nm nicht vom Farbstoff stammte. Wahrscheinlich entsteht dieses Spektrum durch Sättigung des Spektrometers bei direkter Lasereinstrahlung. Wenn man die Lasereinstrahlung minderte, etwa durch ein Milchglas oder durch

Verschieben des Lasers, verschwand lediglich das Signal bei 604 nm, stattdessen war aber trotzdem keine Fluoreszenz des Farbstoffes zu erkennen. Die neue Vermutung war, dass das Spektrometer zu unempfindlich zur Messung dieser Strahlung sei.

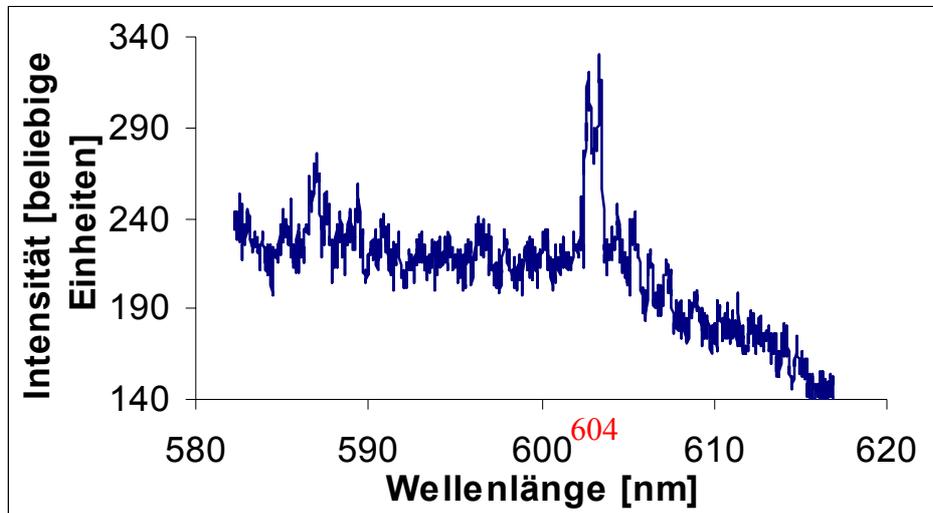


Abb. 4.3.2: Aufgenommenes Spektrum mit Versuchsaufbau wie in Abb. 4.3.1 dargestellt

4.4 Vorversuche mit Si-Detektor und Voltmeter

4.4.1 Grundlagen für Messungen mit Si-Detektor und Voltmeter

Um weiterarbeiten zu können, musste deshalb auf das Spektrometer verzichtet werden. Stattdessen wurde die Strahlung fortan mit einer Siliziumdiode gemessen, die in einen Stromkreis eingebaut ist. Um mit dem nun verwendeten Siliziumdetektor messen zu können, musste jedoch sämtliche Strahlung außer der des Fluoreszenzfarbstoffes unterdrückt werden, denn mit diesem System hätte nicht unterschieden werden können, welche Wellenlänge das eintreffende Licht hat. Zur Erreichung dieses Ziels wurde der Hoch-Pass Filter 03 FCG 489, welcher ja selbst fluoresziert, durch den Bandpassfilter FB 600-40 der Firma Thorlabs ersetzt. Dieser sollte die Strahlung des Farbstoffes laut Herstellerangaben zu ca. 73% durchlassen, die Strahlung des Lasers bei 532 nm jedoch nur zu weniger als 0,01%,⁶⁹ siehe Abb. 4.4.1. Auch die Überprüfung der Transmission an unserem Laborgerät bestätigte den Öffnungsbereich zwischen 575 nm und 633 nm. Die Transmission bei 605 nm lag demnach bei 75%.

⁶⁹ [Vgl.: THORLABS: FB 600-40, 2004]

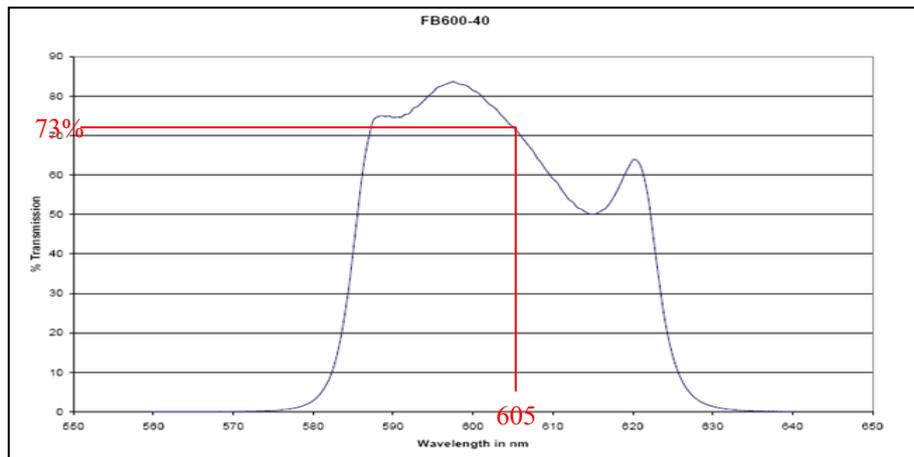


Abb. 4.4.1: Transmissionskurve des Bandpassfilters FB 600-40 der Firma Thorlabs laut Herstellerangabe [aus: THORLABS: FB 600-40, 2004]

Die auf den Detektor eintreffenden Photonen werden in eine Spannung umgewandelt. Die Anzahl der im Stromkreis fließenden Elektronen N_e ist proportional der Anzahl, der auf die Photozelle auftreffenden Photonen N_{ph} . Der Strom I ist demnach proportional zur Anzahl der eintreffenden Photonen N_{ph} : $I \sim N_{ph}$

Aufgrund der eingebauten Filter sollten es nur Photonen des emittierenden Farbstoffes ROX sein, die eintreffen. Wenn kein Farbstoff in der Kapillare ist, dürften deshalb keine Elektronen fließen.⁷⁰

Die Spannung U ist proportional zum Strom I , sodass gilt $U \sim N_{ph}$. Da die Anzahl der eingetroffenen Photonen nicht ausreicht, um am Voltmeter eine erhöhte Spannung ablesen zu können, wurden große Widerstände in den Stromkreis eingebaut.⁷¹

4.4.2 Messungen mit dem Silizium-Detektor und Voltmeter

Um mit dieser Elektronik arbeiten zu können, wurde die Apparatur so gut es ging verschlossen und auch der durchsichtige Anodenblock verklebt, damit möglichst kein Fremdlicht zum Silizium-Detektor gelangen konnte. Trotzdem machten sich Lichtschwankungen im Zimmer bei der Spannungsmessung bemerkbar. Dies ist ein Zeichen für die Empfindlichkeit des Detektors, aber andererseits auch dafür, dass noch Licht in die Apparatur gelangte. Um jedoch vergleichbare Werte zu erhalten, wurden die Messungen in einem fensterlosen und verdunkelbaren Raum fortgesetzt.

⁷⁰ [Vgl.: Harbeck, 1973, S. 316]

⁷¹ [Vgl.: Harbeck, 1973, S. 309]

Zunächst wurde die Apparatur wieder völlig verschlossen und die Spannung mit ausgeschaltetem Laser gemessen. In Tabelle 4.4.1 sind die mit den unterschiedlichen Widerständen gemessenen Werte aufgelistet:

Widerstand [Megaohm]	Spannung [mV]
1	0,15
10	3,10
22	6,58
100	56,80

Tab. 4.4.1

Diese Werte wurden zunächst als so genannter Hintergrund, als Rauschen der oberhalb der Wellenlängen des sichtbaren Lichts liegenden Strahlung, angesehen. Dies konnte jedoch eigentlich gar nicht sein. Denn aufgrund der großen Energiebandlücke des Siliziums von 1,124 eV⁷² können nur Photonen mit einer Wellenzahl größer als ca. 8500 cm⁻¹ detektiert werden. Dies ergaben zuvor im physikalisch-chemischen Institut der Universität Gießen durchgeführte Messungen. Bei Raumtemperatur bedeutet dies in Dunkelheit, dass lediglich 4,43 Photonen pro Sekunde als Hintergrundstrahlung detektiert werden können, bei einer 1 mm² großen Detektoroberfläche.⁷³ Diese Oberflächengröße entspricht in etwa der unseres Detektors mit 1,2 mm².⁷⁴ Diese sehr geringe Anzahl messbarer Photonen konnte die recht hohen gemessenen Spannungen nicht erklären.

Wurde der Laser angeschaltet, so stiegen die gemessenen Spannungswerte bei allen Widerständen, siehe Tab. 4.4.2. Die Messungen wurden erstellt, indem eine leere Kapillare und dahinter der Bandpassfilter FB 600-40 eingebaut wurden.

Widerstand [Megaohm]	Spannung [mV]
1	0,18
10	3,52
22	7,55
100	58,40

Tab. 4.4.2

Dies bedeutet, dass noch Licht des Lasers bis zum Detektor gelangte. Dies musste Licht der Wellenlänge 532 nm sein, da der Bandpassfilter FB 530-10 auf dem Laser saß, der nur dieses Licht durchließ.

⁷² [Vgl.: Mellau, 2003, Kap. 2.1.1]

⁷³ [Vgl.: Mellau, 2003, Kap. 2.7.2]

⁷⁴ [Vgl.: Hamamatsu: Photodiodes, 2004]

Die gemessenen Werte lassen aber auch erkennen, dass die Spannungen mit und ohne Laser bei den einzelnen Widerständen nicht im gleichen Verhältnis stiegen. Beim 1-M Ω -Widerstand stieg die Spannung um den Faktor 1,2. Beim 100-M Ω -Widerstand stieg sie lediglich um den Faktor 1,03.

Später wurde erkannt, dass im dunklen Raum bei geöffnetem Deckel der Kiste über dem Detektor die gemessenen Spannungen sanken; bei 100-M Ω -Widerstand zum Beispiel von 56,80 mV auf 15,2 mV.

Wie in Abb. 4.4.3 zu erkennen ist, sind zwei Leuchtdioden in die Elektronik eingebaut. Waren der 10-M Ω - und der 22-M Ω -Widerstand eingeschaltet, so leuchtete jeweils eine Diode. Beim eingeschalteten 100-M Ω -Widerstand leuchteten sogar beide Dioden. Da die Kiste, in der sich die Elektronik befindet, im Inneren mit Aluminiumfolie ausgekleidet ist, spiegelte sich das Licht dieser Dioden und gelangte somit an den Detektor. Bei verschlossenem Deckel, der auf der Unterseite ebenfalls mit Aluminiumfolie beklebt ist, wurde das Licht zusätzlich von oben auf den Detektor reflektiert. Lediglich beim 1-M Ω -Widerstand blieb die gemessene Spannung bei ausgeschaltetem Laser bei 0,15 mV, mit und ohne Deckel. Dies erscheint auch logisch, da bei diesem Widerstand keine Leuchtdiode leuchtete. Wurden die Dioden so gut wie möglich mit Aluminiumfolie abgedeckt, sank die gemessene Spannung beim 100-M Ω -Widerstand noch einmal von 15,2 mV auf ca. 4 mV. Um also die große Zahl der auf den Detektor eintreffenden Photonen zu minimieren, wurden die Leuchtdioden deaktiviert.

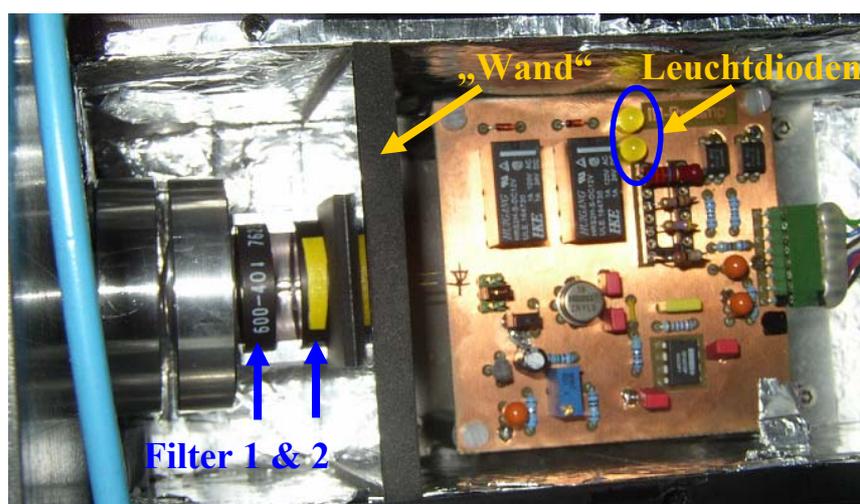


Abb. 4.4.3: Foto der Apparatur aus Vogelperspektive mit zwei Filtern FB 600-40 der Marke Thorlabs und „Wand“ zwischen dem zweiten Filter und dem Detektor

Wie oben erwähnt, gelangte jedoch auch trotz des eingebauten Bandpassfilters FB 600-40 Laserstrahlung bis zum Si-Detektor. Aus diesem Grund wurde der gleiche Bandpassfilter noch ein zweites Mal gekauft und eingebaut, siehe Abb. 4.4.3.

Damit kann die Laserstrahlung mit der Wellenlänge 532 nm um den Faktor 10^8 reduziert werden, sodass praktisch keine Photonen bis zum Detektor gelangen sollten. Die Durchlässigkeit für die Photonen aus dem Fluoreszenzfarbstoff sinkt jedoch auch, sollte aber noch bei $0,75 \cdot 0,75 = 0,56$, also bei ca. 56% liegen.

Die Strahlung, die von den Filtern nicht durchgelassen wird, wird jedoch nicht „geschluckt“, sondern auf die Linsen reflektiert. Diese sind zwar entspiegelt, reflektieren aber dennoch einen kleinen Teil des Lichts, welches dann an den Detektor gelangt. Aus diesem Grund wurde die „Wand“ zwischen Filter und Detektor eingebaut, wie in Abb. 4.4.3 zu erkennen. Somit wird das reflektierte Laserlicht vom Detektor abgeschottet. Diese Wand hat an der Stelle des Filters ein Loch, sodass die gewünschte Strahlung passieren kann.

Nachdem diese Umbauten vollzogen wurden, wurden die Messungen mit und ohne Laser mit leerer Kapillare noch einmal wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.4.3 aufgeführt.

Widerstand [Megaohm]	(a) Spannung [mV]	(b) Spannung [mV]
1	0,09	0,09
10	0,11	0,11
22	0,09	0,09
100	0,01	0,04

Tab. 4.4.3: Gemessene Spannungen bei ausgeschaltetem Laser (a) und bei eingeschaltetem Laser mit leerer Kapillare (b)

An diesen Messwerten lässt sich deutlich erkennen, dass durch den beschriebenen Umbau die auf den Detektor einfallenden Photonen enorm reduziert wurden. Man kann allerdings davon ausgehen, dass nun keine Photonen mehr gemessen wurden, sondern lediglich ein Rauschen beobachtet wurde. Auch die Einstrahlung des Lasers ist lediglich bei dem stärksten Verstärker erkennbar.

Im Folgenden wurde in die Kapillare der Farbstoff ROX eingefüllt. Dazu wurde die bereits bekannte Size-Standard-Lösung um das Fünzigfache verdünnt und mittels Spritze eingefüllt. Die Konzentration der Farbstoffmoleküle musste somit schätzungs-

weise noch über der liegen, die beim Durchlauf der Elektrophorese erreicht wird. Trotzdem konnte keine höhere Spannung gemessen werden als mit unbefüllter Kapillare.

4.4.3 Messungen mit Objektträgern

Aufgrund der Vermutung, dass der Detektor nicht empfindlich genug sei und dass lediglich die Konzentration der fluoreszierenden Farbstoffmoleküle erhöht werden müsste, wurde die Kapillare entfernt. Stattdessen wurde ein Objektträger, eigentlich zum Mikroskopieren gedacht, an den Seiten mit Tesa-Film mehrmals umwickelt, um einen Abstandshalter zu einem zweiten Objektträger zu haben, welcher darauf gelegt wurde. In die Mitte der beiden Glasplättchen wurden einige Tropfen der verdünnten Size-Standard-Lösung getropft, siehe Abb. 4.4.4. Auf diese Weise konnten viel mehr Farbstoffmoleküle angestrahlt werden als mit der Kapillare.

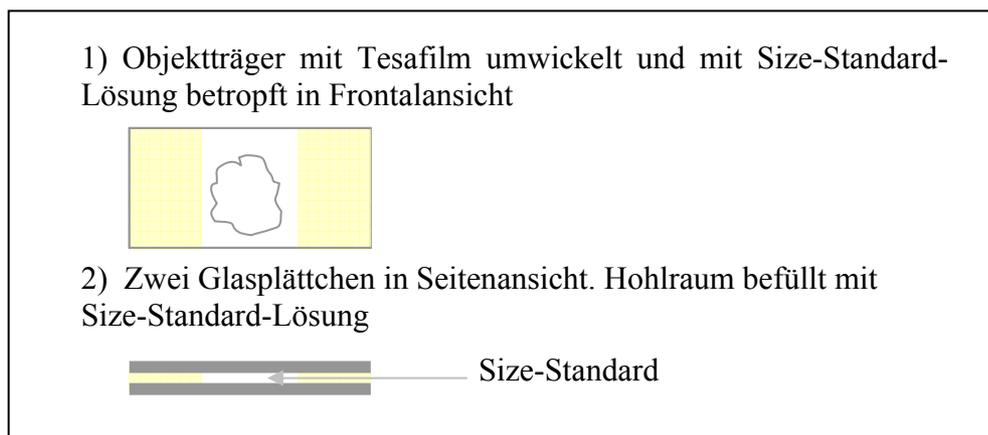


Abb. 4.4.4: Objektträger mit Size-Standard-Lösung

Der Laser wurde aus seinem vorgesehenen Platz genommen und mit einem Stativ so befestigt, dass der Laserstrahl zunächst orthogonal auf die Linse traf, und zwar in deren Mittelpunkt. Die Glasplättchen wurden dann vor der Linse befestigt, wobei der Abstand Linse-Glasplättchen dem Abstand Linse-Kapillare entsprach. Da in dieser Aufstellung die zum Verdunkeln genutzte Kiste um den Laser und die Kapillare entfernt werden musste, kamen nun wieder mehr Photonen bis zum Si-Detektor, denn der Raum war wegen einiger Birnchen anderer Geräte nicht vollkommen dunkel. Die gemessenen Spannungen ohne eingeschalteten Laser sind daher etwas erhöht, siehe Tab. 4.4.4.

Widerstand [Megaohm]	Spannung [mV]
I	0,10
II	0,12
III	0,11
IV	0,20

Tab. 4.4.4:
Gemessene
Spannung bei
ausgeschaltetem
Laser und geöffneter
Verdeckkappe vor
den Linsen

Wurde der Laser angestellt, jedoch keine Objektträger zwischen Laser und Linsen befestigt, erhielt man die Ergebnisse aus Tab. 4.4.5.

Widerstand [Megaohm]	Spannung [mV]
I	0,11
II	0,21
III	0,32
IV	1,00

Tab. 4.4.5:
Gemessene
Spannungen bei
angeschaltetem
Laser und geöffneter
Verdeckkappe vor
den Linsen

Diese Ergebnisse lassen deutlich erkennen, dass bei dieser direkten Bestrahlung trotz der zwei eingebauten Filter immer noch nicht alle Laserstrahlung weggefiltert werden konnte. Als die mit dem Farbstoff benetzten Glasplättchen in den Laserstrahl gehalten wurden, erhöhte sich die gemessene Spannung bei Widerstand IV sehr deutlich von 1,0 Volt auf 4,4 Volt. Leider stellte sich heraus, dass ebenfalls 4,4 Volt gemessen wurden, wenn die Objektträger ohne Farbstoff in den Laserstrahl gehalten wurden. Dies bedeutete, dass nicht die Fluoreszenz des Farbstoffes gemessen wurde, sondern lediglich die der Glasplättchen. Dieser Versuch hat also lediglich gezeigt, dass normales Glas aufgrund seiner eigenen Fluoreszenz nicht für diese Versuche geeignet ist, sodass sich weitere Versuche mit dieser Methode erübrigten.

4.4.4 Messungen mit größeren Widerständen

Eine andere Möglichkeit, die Fluoreszenz sichtbar zu machen, war, die Widerstände gegen größere auszutauschen. Mir standen zwei größere Widerstände zur Verfügung, mit 470 Megaohm und 1000 Megaohm. Die 1-M Ω - und der 10-M Ω -Widerstände wurden gegen diese beiden ausgetauscht.

Bei diffusem Licht wurde getestet, ob die Widerstände alle richtig eingebaut waren. Tatsächlich haben sich die gemessenen Spannungswerte in etwa im selben Verhältnis wie die Widerstände erhöht (Tab. 4.4.6).

Widerstand [Megaohm]	Spannung [mV]
22	23
100	110
470	520
1000	1080

Tab. 4.4.6:
Messung der Spannungen bei diffusem Licht und geöffnetem Deckel über der Elektronik

Als nächstes wurde der Si-Detektor noch einmal neu justiert. Dazu wurde eine LED, die ihr Emissionsmaximum bei 590 nm hat, mit Aluminiumfolie völlig verdunkelt und nur ganz vorne eine kleine Öffnung hineingeritzt. Der Lichtstrahl aus dieser Öffnung wurde dann auf die leere eingebaute Kapillare gerichtet. Dies genau an der Stelle, an der ansonsten der Laserstrahl die Kapillare trifft. Da die beiden eingebauten Bandpassfilter FB 600-40 der Firma Thorlabs diesen Wellenlängenbereich durchlassen, konnte man auf diese Weise den Lichtstrahl verfolgen und genau erkennen, auf welche Stelle der Detektor eingestellt werden musste, vergleiche Abb. 4.4.5.

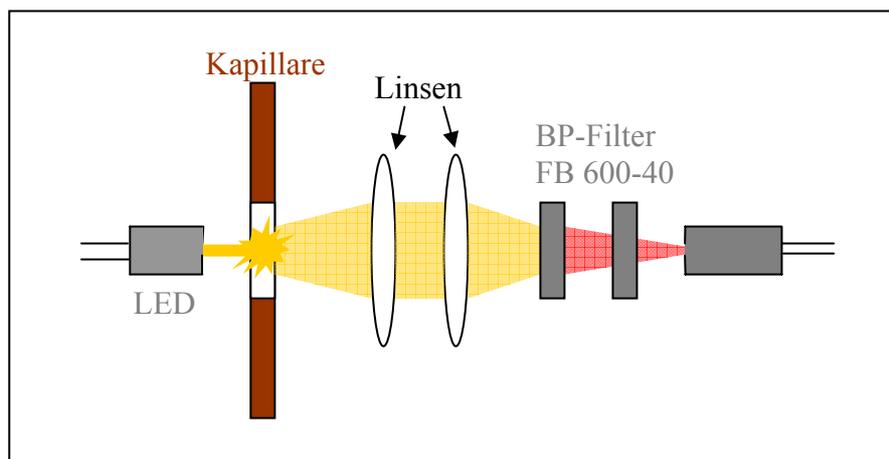


Abb. 4.4.5: Aufbau zur Feststellung des Brennpunktes mit Hilfe einer Leuchtdiode mit dem Emissionsmaximum bei 590 nm

Bei eingeschaltetem Laser wurden diverse Messungen durchgeführt, wobei keine eindeutigen Ergebnisse erkennbar waren. Auch mit zwei leeren Kapillaren wurden unterschiedliche Spannungen gemessen. Die Differenz betrug mehr als 1 mV. Dies

konnte aber nicht nur daran liegen, dass sie nicht in hundertprozentig gleicher Position eingebaut wurden, da der Vorgang mehrmals wiederholt wurde und immer wieder ähnliche Werte erreicht wurden. Schließlich kam ich darauf, dass es an den Verschmutzungen liegen könnte. Nachdem die Kapillaren an den „Fenstern“ mit Ethanol gereinigt worden sind, haben sich die Werte auch tatsächlich angeglichen.

Widerstände mit 22 MΩ und 100 MΩ sind zwar weiterhin in der Elektronik eingebaut, doch wurden mit diesen keine Messungen mehr vollzogen. Die mit den gereinigten leeren Kapillaren bei mehrmaligem Einbau erhaltenen Werte sind in Tab. 4.4.7 angegeben:

Widerstand [Megaohm]	Spannung [mV]
470	+ 0,05 bis + 0,06
1000	- 0,08 bis - 0,03

Tab. 4.4.7

Wurden die Kapillaren mit der fünfzigfach verdünnten Size-Standard-Lösung befüllt, so erhielt man bei den beiden Kapillaren die Ergebnisse aus Tab 4.4.8:

Widerstand [Megaohm]	Spannung [mV]
470	+ 0,5 bis + 0,7
1000	+ 1,0 bis + 1,2

Tab 4.4.8

Diese Resultate ließen eigentlich keinen anderen Schluss zu, als dass tatsächlich ein Signal durch die ROX-Lösung in der Kapillare entstanden ist. Dabei war jedoch noch nicht klar, ob das Signal tatsächlich vom Farbstoff stammte. Denn in der Kapillare befand sich in erster Linie HPLC-Wasser. Dieses Wasser sollte zwar sehr rein sein, eventuelle Verschmutzungen waren jedoch kaum auszuschließen, sodass die Fluoreszenz auch davon hätte stammen können. Dies konnte jedoch an einem erneuten Durchgang einer Kapillarelektrophorese getestet werden. Die Hoffnung war dabei, dass sich die gemessene Spannung im Vergleich zur leeren Kapillare nicht erhöhen sollte, wenn das Polymer eingefüllt würde. Dies wurde ausprobiert und tatsächlich änderten sich die Werte für die gemessenen Spannungen kaum.

4.5 Möglichkeit zu Messungen in beleuchtetem Raum

Wie oben bereits erwähnt, war die Apparatur nicht ganz lichtdicht, sodass immer etwas Licht bis zum Si-Detektor gelangte, wenn der Raum, in dem die Apparatur sich befand, erleuchtet war. Auch ohne Laser wurde daher bei Tageslicht mit dem 470-M Ω -Widerstand eine Spannung von ca. 5 mV gemessen. Da diese Spannung viel höher war, als die durch die Fluoreszenz erreichbare, hätte man diese in einem hellen Zimmer niemals erkennen können. Um nicht ständig in einem verdunkelten Raum arbeiten zu müssen, wurde eine Holzkiste angefertigt, die über die Apparatur gestülpt wurde, siehe Abb. 4.5.1.



Abb. 4.5.1: Apparatur unter der Holzkiste mit Hochspannungsgerät (links) und Voltmeter (vorne)

Die mit dieser Holzkiste gemessenen Werte für die Spannung entsprachen jeweils denen, die im verdunkelten Raum bei vergleichbaren Bedingungen gemessen wurden. Mit diesem Ergebnis konnte die Apparatur nun auch in hellen Räumen aufgestellt werden.

4.6 Kapillarelektrophorese mit Si-Detektor und Voltmeter

4.6.1 Zweiter Versuch einer Kapillarelektrophorese

Bevor ein weiterer Durchlauf einer CE gestartet wurde, wurden noch einmal jene Messungen durchgeführt, die unten unter den Punkten eins bis drei beschrieben sind. Alle diese Messungen fanden mit dem 470-M Ω -Widerstand statt. Die dabei erhobenen Werte sind in Tabelle 4.6.1 angegeben.

1. In der unter der Holzkiste befindlichen Apparatur wurde eine leere Kapillare eingebaut und die Spannung U bei ausgeschaltetem Laser gemessen.
2. Der Laser wurde angestellt, die Kapillare blieb leer.
3. Das bekannte Polymer POP-4 der Firma Applied Biosystems wurde über die Spritze in die Kapillare gefüllt.

Diese Ergebnisse führten zum einen zu der erfreulichen Erkenntnis, dass das Polymer nicht fluoreszierte, was die Möglichkeit einer erfolgreichen CE wahrscheinlich machte. Mit dem Polymer sank die Spannung sogar im Vergleich zu Messung 2, da anscheinend Strahlung des Lasers vom Polymer absorbiert oder reflektiert wird.

	Spannung [mV]
Messung 1	- 0,17
Messung 2	- 0,03
Messung 3	- 0,06

Tab. 4.6.1 Gemessene Spannungen unter den oben angegebenen Bedingungen

Andererseits sieht man jedoch bei diesem starken Verstärker, dass trotz der beiden eingebauten Bandpassfilter und der „Zwischenwand“ immer noch Strahlung des Lasers bis zum Detektor gelangt, vergleiche die Werte aus Messung 1 und 2 in Tab. 4.6.1. Außerdem lag die Spannung mit leerer Kapillare diesmal bei $- 0,03$ mV. In Tabelle 4.4.8 ist die unter gleichen Bedingungen gemessene Spannung angegeben. Sie betrug $+ 0,05$ mV bis $+ 0,06$ mV. Der einzige Unterschied war, dass es am Tag der Durchführung der CE merklich kühler war. Die verwendete Elektronik ist aber sehr temperaturempfindlich. Eventuell könnte noch weniger Wärmestrahlung detektiert worden sein, was jedoch nur einen kleinen Anteil an dieser Veränderung haben sollte. Sicherlich ist auch die Kapillare in einer etwas anderen Position eingebaut worden, was erheblichen Einfluss auf die Anzahl der detektierbaren Photonen hat.

Die Kapillarelektrophorese wurde wieder mit der Size-Standard-Lösung Genescan[®] 400 HD bei einer Verdünnung von 1:50 durchgeführt. Mit dieser Konzentration ist in Kapitel 4.4.4 eine Fluoreszenz gemessen worden.

Laut Angaben der Mitarbeiter der Firma BJ-Diagnostik in Gießen, von denen wir die Chemikalien zur Verfügung gestellt bekommen haben, verwenden diese diesen Standard bei einer Verdünnung von 1:70. Sollte die Fluoreszenz also messbar sein, so befänden wir uns ungefähr in einem ähnlichen Empfindlichkeitsbereich.

Die Injektion der DNA-Fragmente dauerte 15 Sekunden und dies bei einer angelegten Spannung von 10.000 Volt. Danach wurde an der Kathode das Gefäß mit der Pufferlösung angebracht, welche sich auch im Anodengefäß befand. Die CE wurde ebenfalls bei 10.000 Volt durchgeführt. Da die Spannung lediglich mit dem Voltmeter gemessen und angezeigt wurde, diese Werte sich aber ständig änderten, war es mir nicht möglich, diese Werte sinnvoll aufzuschreiben. Ich habe es deshalb auch unterlassen, das Signal als Funktion der Zeit aufzunehmen und dies graphisch darzustellen. Insgesamt war nur klar, dass während der ersten 15 min die Spannung konstant blieb und sie dann in den folgenden 5 min immer wieder anstieg, wobei nach jedem Maximum auch ein Minimum folgte. Ab dieser Zeit ging die Spannung wieder auf den Ausgangswert zurück. Dieser Wert wurde bis zum Ende der Messung beibehalten. Dies deutete darauf hin, dass die DNA-Fragmente alle das „Detektionsfenster“ der Kapillare passiert haben. Die in Tab. 4.6.2 angegebenen Werte zu den entsprechenden Zeiten wurden erhoben.

Zeit [min]	Spannung [mV]
0 bis 15	- 0,06
15 bis 20	+ 0,2 bis + 0,8
20 bis 50	- 0,06

Tab. 4.6.2: Gemessene Maximalwerte für die Spannung während der CE

4.6.2 Dritter Versuch einer Kapillarelektrophorese

In der Hoffnung, eine bessere Auflösung der Fragmente erreichen zu können, indem man das Spannungsfeld deutlich erniedrigt und somit auch die Dauer der Trennung erhöht, wurde die CE ein drittes Mal gestartet. Diesmal dauerte die elektrokinetische Injektion nur 8 Sekunden, was dazu beitragen sollte, dass die DNA-Teilchen von **einem** Punkt aus starteten. Bei zu langer Injektionszeit ist nämlich die Gefahr gegeben, dass die zuerst injizierten Fragmente bereits deutlich weiter in die Kapillare vorgedrungen sind. Dies führt zu einer deutlich schlechteren Auflösung. Da bei der Injektion von nur 8 Sekunden auch die Konzentration der Fragmente kleiner sein musste, wurde bei dieser

Messung der 1000-M Ω -Widerstand eingeschaltet. Auch mit diesem Widerstand konnte man die Strahlung des Lasers erkennen. Ohne Laser lag die gemessene Spannung bei $-1,10$ mV. Mit eingeschaltetem Laser wurden immerhin $-0,4$ mV gemessen.

Da sich auch diesmal die Veränderungen der Spannungswerte sehr schnell einstellten, habe ich immer nur die Zeitpunkte der Maxima und deren Werte aufschreiben können. Zwischen diesen in Tab. 4.6.3 aufgelisteten Maxima wurden stets Minima mit $-0,3$ mV bis $-0,4$ mV erreicht. Erfreulicher Weise war die Zeit bis zur ersten Spannungserhöhung etwa dreimal so lang wie beim vorherigen Durchlauf. Dies entspricht dem Verhältnis der angelegten Spannungen von 10.000 Volt bzw. 3000 Volt. Auch die Zeit, in der Maxima zu erkennen waren, war mit 17 Minuten etwa dreimal so lang wie bei 10.000 Volt. Des Weiteren ist die Detektorspannung danach wieder auf ihren Ausgangswert zurückgegangen.

Die in Tabelle 4.6.3 aufgeschriebenen Werte für die Spannung wurden zu den angegebenen Zeiten gemessen.

Zeit		Spannung [mV]	Zeit		Spannung [mV]
min	sec		min	sec	
0	0	- 0,4	56	20	0,0
47	30	+ 0,4	57	00	0,0
48	10	+ 0,4	59	00	- 0,1
49	30	+ 0,4	60	10	- 0,15
50	15	+ 0,3	62	30	- 0,2
50	30	+ 0,3	64	00	- 0,2
52	00	+ 0,3	65	50	- 0,4
54	00	+ 0,2
54	45	+ 0,1	76	00	- 0,4

Tab. 4.6.3: Gemessene Spannungen beim dritten Durchlauf einer CE; angegeben wurden jeweils nur die erhaltenen Maxima zu den gegebenen Zeiten. Die Minima mit ca. $-0,3$ mV befinden sich jeweils dazwischen.

Diese beiden Durchläufe einer CE waren nun Indiz genug, dass die erhobenen Werte keine Zufallswerte waren. Es war demnach klar, dass sich die DNA-Fragmente in diesem Konzentrationsbereich mit dieser Apparatur detektieren lassen. Um die Signale der fluoreszierenden Farbstoffe an den verschiedenen langen DNA-Fragmenten besser unterscheiden zu können und um deren Abstände voneinander zu erkennen, war die Messung mit dem Voltmeter allerdings nicht mehr sinnvoll bzw. ausreichend. Aus

diesem Grund wurden die Daten mit einem Computer aufgenommen und mit diesem graphisch dargestellt.

4.7 Umwandlung analoger in digitale Werte

Das Ziel war nun, während der Durchführung einer CE, ständig den Wert für die gemessene Detektorspannung gegen die Zeit aufzutragen. Dazu werden die Werte für die Spannung über ein Flachbandkabel zu dem speziell dafür angeschafften Rechner geleitet. In dem Rechner wurde ein AD-Wandler der Firma MEASUREMENT COMPUTING eingebaut, der die ankommenden Analogwerte in digitale Werte umwandelt. Zusätzlich wurde eine Software der Firma SoftWIRE installiert, mit deren Hilfe man ein Programm zusammenstellen konnte, um diese Digitalwerte in eine Kurve eines Koordinatensystems zu übertragen.

Das Programm kann gestartet werden und zeichnet fortlaufend in definierbaren Zeitabständen die Werte für die gemessene Spannung auf. Die Aufzeichnung kann jederzeit unterbrochen werden. Die entstehende Kurve kann man während der Messung beobachten, sie wird jedoch darüber hinaus auch gespeichert. Die gespeicherten Werte können mit dem Excel-Programm geöffnet und weiter verarbeitet werden.

Das erste Problem war, dass die gemessenen Spannungen im Millivolt-Bereich lagen. Der AD-Wandler hat für so kleine Werte jedoch kein ausreichendes Auflösungsvermögen. Deshalb wurde ein Verstärker mit dem Verstärkungsfaktor 1000 zwischengeschaltet, um in den Größenbereich von Volt zu gelangen.

Nun ergab sich aber das nächste Problem, denn bei gleich bleibender Spannung erhielt man anstelle eines geraden Striches eine Sinuskurve mit einer Amplitude im Größenbereich von 0,4 Volt. Dieses starke Rauschen hätte jedoch eine sinnvolle Messung unmöglich gemacht, denn das zu erwartende kleine Signal wären darin verschwunden. Es wurde deshalb die Elektronik mit einem Eisenblech ummantelt, sodass diese nun besser gegen elektromagnetische Strahlung geschützt ist. Auch wurde die zusätzliche 1000-fache Verstärkung in diese geerdete Metallhülle eingebaut. Die Amplitude der Sinuskurve verkleinerte sich durch diese Maßnahmen auf einen Größenbereich von 0,1 Volt. Die aus diesem Grund bereits von Schwabe vorgenommene Auskleidung der Kiste um die Elektronik mit Aluminiumfolie erwies sich demnach als unzureichend.

Für diesen Umbau musste die Elektronik jedoch ausgebaut werden. Um die Si-Diode danach wieder richtig zu justieren, wurde eine Kapillare mit einer ROX-Farbstofflösung befüllt. Dazu wurde eine gesättigte Lösung hergestellt, aus ca. 1 mg ROX in 1 mL HPLC-Wasser. Diese Lösung wurde dann um das 1000-Fache verdünnt. Diese Konzentration reichte aus, um bei richtiger Justage der Diode eine Spannung von ungefähr 7 Volt zu messen. Danach musste die Kapillare natürlich gegen eine saubere ausgewechselt werden. Ob diese jedoch in exakt derselben Stellung eingebaut wurde, wie die Kapillare zum Justieren, kann nicht garantiert werden. Leider hat das Justieren aber gezeigt, dass bereits kleinste Veränderungen der Einstellung einen großen Einfluss auf die gemessene Spannung haben.

4.8 Kapillarelektrophorese mit dem Computer

Der Durchlauf der CE erfolgte in bekannter Weise; mit dem einzigen Unterschied, dass die Werte nun über den Computer direkt in eine Funktion umgewandelt wurden, welche in Abb. 4.8.2 zu sehen ist.

In die Abbildung wurde von mir nachträglich die Zuordnung der DNA-Fragmente zu den passenden Peaks in blau eingezeichnet. Die angegebene Ziffer steht dabei für die Anzahl der Basenpaare, aus der die einzelnen Fragmente bestehen.

Der für die Messung verwendete Size-Standard der Firma Applied Biosystems enthielt die DNA-Fragmente, wie in Abb. 4.8.1 angegeben.

Längen der DNA-Fragmente angegeben in Basenpaaren:
50 bp, 60 bp, 90 bp, 100 bp, 120 bp, 150 bp, 160 bp, 180 bp, 190 bp,
200 bp, 220 bp, 240 bp, 260 bp, 280 bp, 290 bp, 300 bp,
320 bp, 340 bp, 360 bp, 380 bp, 400 bp⁷⁵

Abb. 4.8.1

⁷⁵ [Vgl.: ROX 400: Size Standard Peaks, 2004]

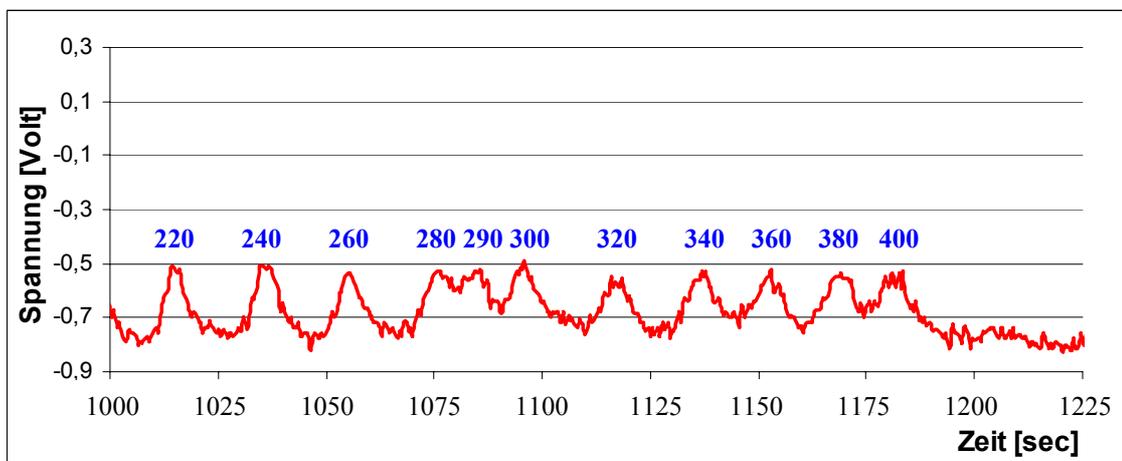
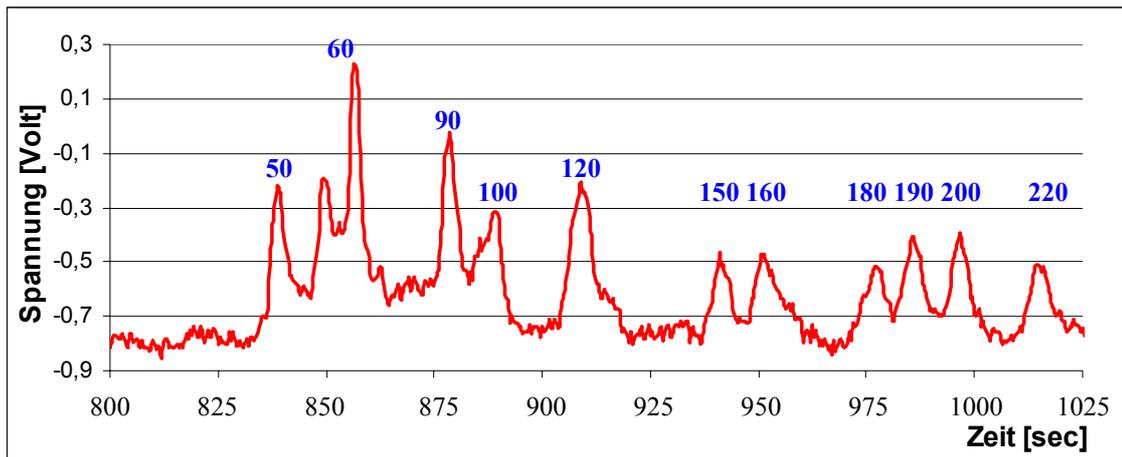


Abb. 4.8.2: Erhaltene Werte für die Spannung während einer CE mit ROX-Size-Standard. Die zeitlichen Messabstände betragen jeweils $\frac{1}{2}$ Sekunde. Injektionszeit: 8 Sekunden; angelegte Spannung während der CE: 10 kV; Verdünnung des ROX-Size-Standards: 1:40.

In Abb. 4.8.3 ist zum Vergleich ein Spektrum des ROX-Size-Standards abgebildet, wie es von der Firma „BJ-Diagnostik“ Gießen mit ihrem Analysegerät aufgenommen wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Rauschen viel kleiner ist als in Abb. 4.8.2 und sich sichtbar größere Abstände zwischen den Peaks befinden. Das Auflösungsvermögen unserer Apparatur ist demnach noch verbesserungswürdig.

Anstelle der Zeit ist in Abb. 4.8.3 auf der x-Achse nur die Größe der DNA-Fragmente in Basenpaaren (bp) angegeben. Zeitangaben wären auch nicht vergleichbar, denn die Firma „BJ-Diagnostik“ verwendet dünnere Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 50 μm und nicht 75 μm sowie ein anderes Gel. Die Kapillare ist im käuflichen Analysegerät ca. 10 cm länger und während der CE wird eine Spannung von 15 kV angelegt und nicht nur eine Spannung von 10 kV, wie bei unserer Apparatur.

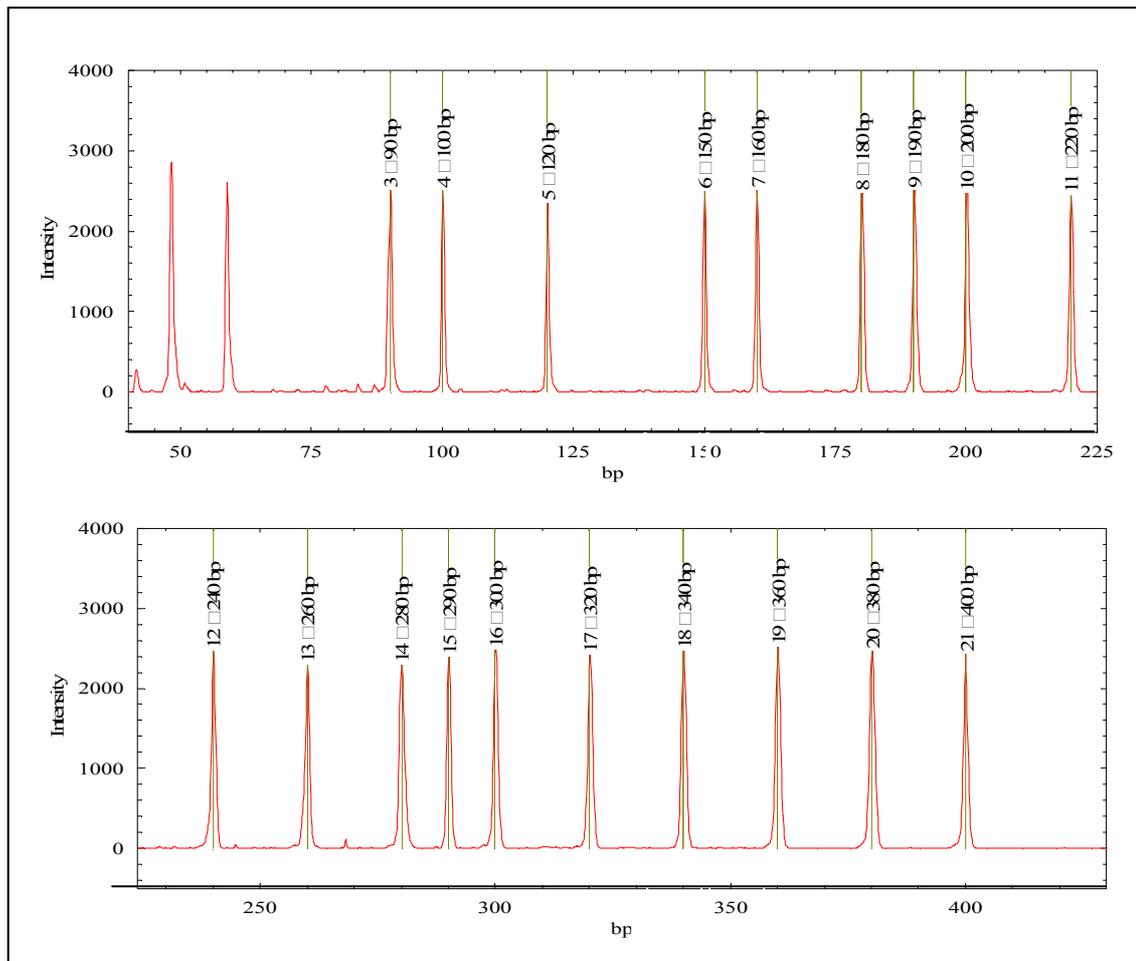


Abb. 4.8.3: Vergleichsspektrum des ROX-Size-Standards. Gemessen und aufgezeichnet mit dem Analysegerät „ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer“. In schwarz: Zuordnung der DNA-Fragmente zu den entsprechenden Peaks. Quelle: Firma „BJ-Diagnostik“ Gießen.

In Abb. 4.8.4 ist eine weitere Kurve zu erkennen. Diese stellt das Bild einer Originallösung dar, wie sie in selber Konzentration auch in der Firma „BJ-Diagnostik“ Gießen verwendet wird. Es handelt sich um eine DNA-Probe eines Mitarbeiters. Eine Auswertung kann jedoch nicht vorgenommen werden, da mir die Zusammensetzung der Lösung nicht bekannt ist. Diese Probe enthält neben dem Farbstoff ROX noch weitere vier Farbstoffe. In wiefern diese Farbstoffe auch detektiert wurden, ist unklar. Der riesige Peak im Bereich zwischen 800 sec und 900 sec nennt sich Primer Peak.⁷⁶ Dieser enthält nach Angaben einer Mitarbeiterin der Firma BJ-Diagnostik Gießen sämtliche Primer (kurze DNA-Bruchstücke⁷⁷), die bei der im Vorfeld durchgeführten Vervielfältigung der DNA-Fragmente nicht verbraucht wurden.

⁷⁶ [Vgl.: PRIMER PEAK, 2004]

⁷⁷ [Vgl.: DHGP: Methoden, 2003, S. 1 f]

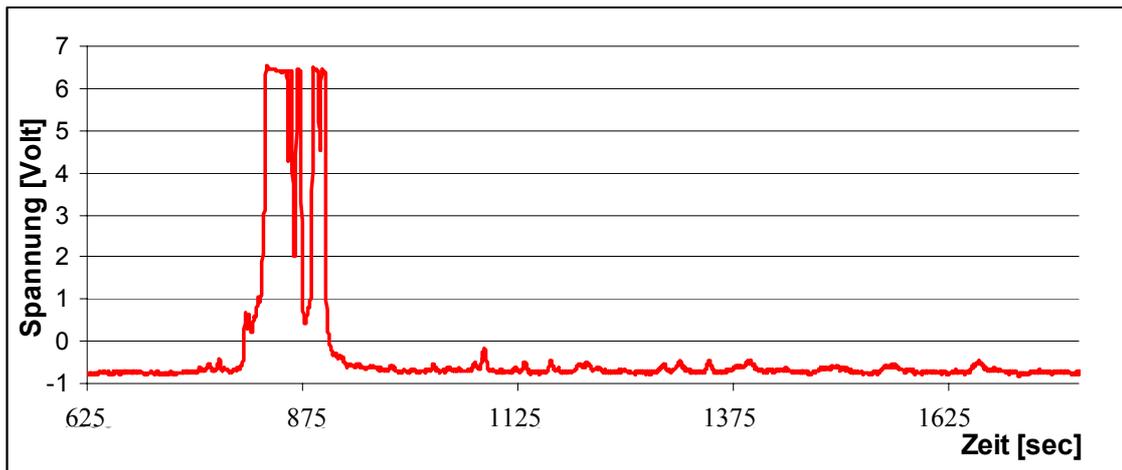


Abb. 4.8.4: Erhaltene Werte für die Spannung während einer CE mit einer DNA-Probe. Die zeitlichen Messabstände betragen jeweils $\frac{1}{2}$ Sekunde. Injektionszeit: 8 Sekunden; angelegte Spannung während der CE: 10 kV

Um zu zeigen, dass man tatsächlich voneinander unterscheidbare Signale erhält und wir uns somit im Empfindlichkeitsbereich der käuflich erhältlichen CE-Apparaturen befinden, habe ich diesen Primer-Peak abgeschnitten, wie in Abb. 4.8.5 ersichtlich.

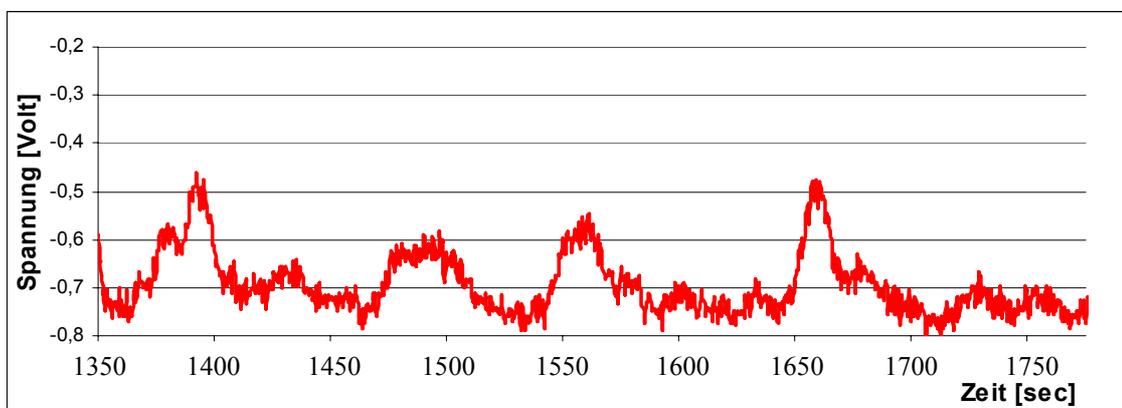
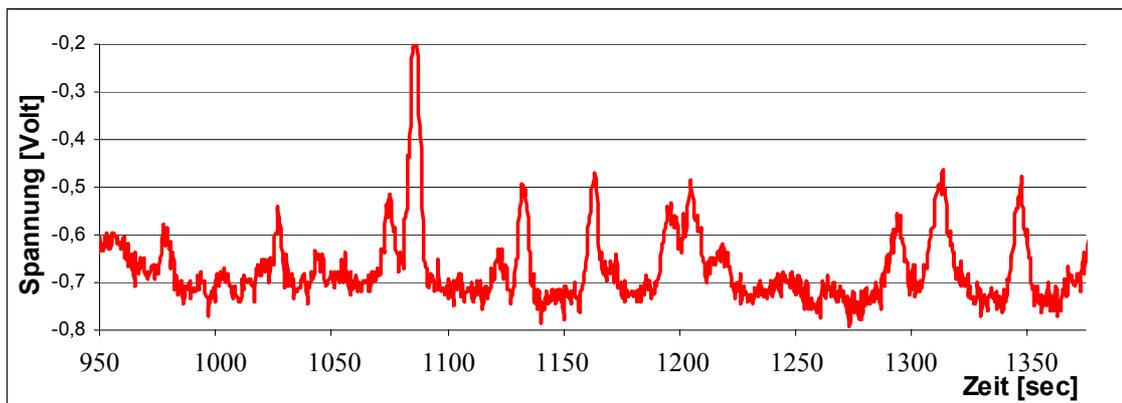


Abb. 4.8.5: Erhaltene Werte für die Spannung während einer CE mit einer DNA-Probe. Die zeitlichen Messabstände betragen jeweils $\frac{1}{2}$ Sekunde. Injektionszeit: 8 Sekunden; angelegte Spannung während der CE: 10 kV

4.9 Das Programm

Da sich bei diesem Programm sehr schnell etwas verändern oder gar löschen lässt, möchte ich das Programm in dieser Arbeit kurz beschreiben, sodass es jederzeit schnell wieder erstellt werden kann. Eine Abbildung des zusammengestellten Programms sieht man in Abb. 4.9.1.

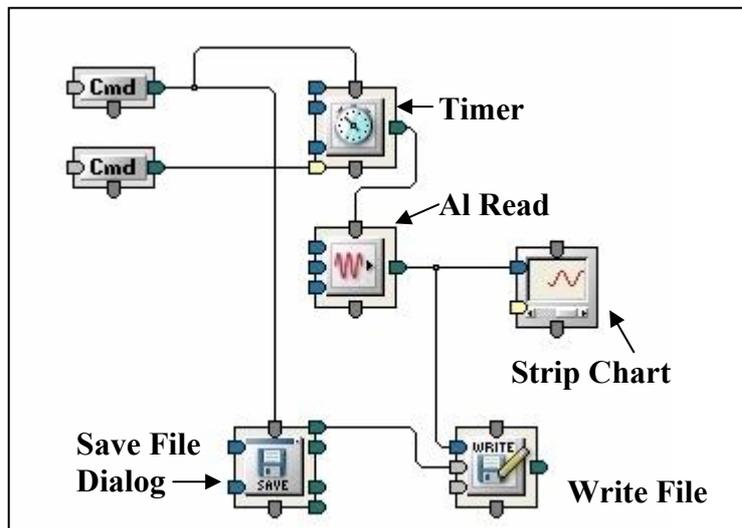


Abb. 4.9.1

Der obere Button mit der Beschriftung **Cmd** ist der Startknopf. Mit dem unteren **Cmd**-Button lassen sich die Aufzeichnungen der Messungen beenden. Drückt man auf Start, so beginnt die Messung und das gleichzeitige Speichern der Daten.

Das Symbol mit der Uhr ist der **Timer**. Mit diesem lässt sich beispielsweise einstellen, in welchem Zeitintervall die Daten erhoben und eingezeichnet werden sollen. Bei den Funktionen in den Abbildungen 4.8.2 bis 4.8.4 wurde der Timer so eingestellt, dass alle 500 Millisekunden ein Spannungswert aufgenommen wurde.

Als nächstes folgt der so genannte **AI Read**. Hiermit wird die Karte eingestellt, von der die Daten kommen, sowie die Kanäle, über die die Daten fließen. Außerdem kann das Auflösungsvermögen verstellt werden. Es wurde Karte 1 gewählt mit dem Namen PCI-DAS1000, sowie Kanal 0. Es wurde das geringste Auflösungsvermögen gewählt, sodass Werte zwischen -10 Volt und +10 Volt gemessen werden können.

Die so verarbeiteten Daten gelangen schließlich zur **Strip Chart**. Damit werden die Daten in ein Koordinatensystem eingezeichnet.

Die beiden unteren Symbole nennen sich **Save File Dialog** und **Write File**. Mit ihnen lassen sich die Daten speichern, um die Dateien später mit Excel öffnen und bearbeiten zu können.

4.10 Zusammenfassende Betrachtung der durchgeführten Versuche

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es mit dieser Arbeit gelungen ist, die bereits von Schwabe fertig gestellte Apparatur so weit zu entwickeln, dass es nun möglich ist, die Fluoreszenzfarbstoffe an den DNA-Fragmenten zu detektieren und dadurch deren Trennung aufzuzeigen. Es ist sogar gelungen, im Konzentrationsbereich zu arbeiten, wie dies auch in dem im Handel erhältlichen Analysegerät „ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer“ der Firma „Applied Biosystems“ geschieht. Dies alles war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht möglich und konnte auch erst nach der Überwindung vieler Schwierigkeiten erreicht werden.

Um zu überprüfen, ob der Laser tatsächlich nur Licht im Wellenlängenbereich von 530 nm emittiert, wurde das Laserlicht mit dem Spektrometer untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der Laser zusätzlich Licht bei 808 nm emittiert, was bereits Schwabe erkannt hatte und erklären konnte. Dieses Licht stammt aus dem im Lasermodul enthaltenen Halbleiterlaser. Zusätzlich wurde jedoch ein sehr großes Signal bei 1064 nm entdeckt, siehe Abb. 4.2.1. Für die Herkunft dieses Signals gab es zwei Theorien. Zum einen konnte die Strahlung ebenfalls aus dem Lasermodul stammen, was bauartbedingt durchaus wahrscheinlich war. Andererseits konnte es sein, dass das Spektrometer bei dieser Wellenlänge die Strahlung in zweiter Ordnung anzeigte. Die Messungen führten jedoch erstmal zu Verwirrung. Es wurde nämlich ein Filter eingesetzt, der das Laserlicht bei 532 nm wegfilterte. Dennoch war ein deutliches Signal bei 1064 nm zu erkennen. Damit schien die Annahme richtig, dass es sich tatsächlich um emittiertes Licht aus dem Laser handelte. Es hätte nämlich das Signal bei 1064 nm mit diesem Filter nicht mehr auftreten dürfen, wenn es sich um die zweite Ordnung gehandelt hätte. Doch beim Einsatz eines Filters, der das Licht der Wellenlänge 1064 nm nicht durchlässt, wurde das Signal nur unwesentlich kleiner als ohne Filter. Demnach konnte es sich bei dem Signal auch nicht um Strahlung bei 1064 nm handeln. Bei genauer Überlegung und unter Bezugnahme einiger weiterer Spektren, war das Problem schließlich doch erklärbar. Das Signal setzt sich sowohl aus der Strahlung in zweiter Ordnung als auch aus tatsächlich existierendem Licht bei 1064 nm in erster Ordnung zusammen. Dieses Ergebnis war für den Fortlauf des Experimentes unproblematisch, denn das Licht bei 1064 nm konnte weggefiltert werden. Das Licht in zweiter Ordnung sollte uns nicht stören, denn im Weiteren sollte anstelle des Spektrometers eine Siliziumdiode verwendet werden, um die Fluoreszenz des Farbstoffes zu detektieren. Damit existiert dieses Signal für uns nicht. Außerdem gab es noch einen breiten, wenn auch vergleichsweise

niedrigen Signalberg im Bereich zwischen 550 nm und 900 nm, wie beispielsweise in Abb. 4.2.9 zu erkennen ist. Auch dessen Herkunft war zu Beginn der Arbeit noch völlig ungeklärt. Erst sehr spät habe ich feststellen können, dass es sich dabei um die Fluoreszenz des orangefarbenen Filters der Firma „Melles Griot“ handelte. Dieser wurde daraufhin gegen zwei nicht fluoreszierende Bandpassfilter der Firma „Thorlabs“ ausgetauscht. Ein weiteres Problem war die richtige Positionierung des Silizium-Detektors. Dies war nicht ganz einfach. Einerseits musste ich im Dunklen arbeiten, um überhaupt eine eventuell messbare Fluoreszenz zu erkennen, andererseits war auch gar nicht klar, ob die geringe Anzahl fluoreszierender Farbstoffe überhaupt ausreichen würde, um diese durch eine erkennbar höhere Spannung sichtbar zu machen.

Es sollte auch immer auf äußerste Sauberkeit der Kapillare geachtet werden. Ich hatte nämlich zunächst nicht beachtet, dass schon kleinste Verschmutzungen auf der Kapillare so stark fluoreszieren, dass die geringe Fluoreszenz der Farbstoffe unter diesem starken Signale verschwindet.

Nachdem es endlich gelungen war, durch Messungen mit dem Si-Detektor die Fluoreszenz des Farbstoffes während einer CE zu erkennen, musste ein Computer angeschlossen werden, der die Analogwerte in Digitalwerte umwandeln kann. Dazu habe ich – mit Hilfe der Software der Firma SoftWIRE – ein Programm erstellt, mit dem man die erhaltenen Digitalwerte in einer Funktion der Zeit graphisch darstellen konnte. Da das Auflösungsvermögen des AD-Wandlers jedoch nicht hoch genug war, musste das Signal um den Faktor 1000 verstärkt werden. Mit diesem zusätzlich eingebauten Verstärker wurde das Rauschen jedoch so groß, dass das kleine Signal der Farbstofffluoreszenz darin verschwunden wäre. Durch eine zusätzliche Abschirmung der Elektronik mit einer Eisenummantelung konnte dieses Rauschen jedoch ausreichend reduziert werden. Nach der wiederholten Justierung der Siliziumdiode, wurden schließlich brauchbare Abbildungen der gemessenen Spannung, aufgetragen gegen die Zeit, erhalten. Aufgrund der mangelnden Zeit, musste eine Weiterentwicklung der Apparatur ausbleiben. Wie es eventuell weitergehen könnte, wird in Kapitel 5 beschrieben.

5 Ausblick und persönliche Einschätzung

Mit dieser Arbeit wurde belegt, dass es möglich ist, mit unserer Apparatur eine Trennung der Nukleinsäuren nach der Größe zu erhalten und diese über die relativ einfache Optik und Elektronik sichtbar zu machen.

Das eigentliche Ziel, die Erstellung eines neuen Praktikumsversuchs, ist dabei meines Erachtens jedoch nur mit Nichten geglückt. Es stellt sich für mich die Frage, ob dies überhaupt ein sinnvoller Versuch im Chemiepraktikum darstellen kann, denn die Chemikalien sind allesamt sehr teuer und können bei Zimmertemperatur nur unzureichend lange gelagert werden. Werden das Polymer und die Pufferlösung jedoch nach jeder Durchführung wieder entnommen, um beides in den Kühlschrank zu stellen, geht zwangsläufig jedes Mal ein relativ großer Teil der Chemikalien verloren. Außerdem müsste die Apparatur dann auch umgehend gereinigt werden, damit nichts antrocknet. Bei der Neubefüllung mit dem Polymer vor Beginn eines Praktikumsversuchs, kann es bei Unachtsamkeit sehr leicht passieren, dass sich in der Apparatur kleine Luftblasen bilden, die eine CE unmöglich machen. Auch müssen relativ große Kräfte beim Befüllen eingesetzt werden. Die Apparatur hingegen erscheint mechanisch nicht sehr stabil. Sinnvoll wäre es meines Erachtens, den Block, an dem das Gel in die Kapillare gepresst wird, von unten zusätzlich abzustützen.

Die Elektronik ist so empfindlich, dass die Apparatur immer erst eine Stunde eingeschaltet sein muss, bevor mit ihr Messungen durchgeführt werden können. Dies liegt an der großen Verstärkung.

Ein ebenfalls nicht gelöstes Problem wurde bereits in Kapitel 4.7 genannt. Schon kleinste Veränderungen der Position des Silizium-Detektors haben enorme Auswirkungen auf die Anzahl der detektierten Photonen. Diese Positionierung könnte zwar stets beibehalten werden, doch bei jedem neuen Einbau einer Kapillare verändert sich die optimale Position des Detektors minimal. Die Kapillare biegt sich nämlich beim Einspannen immer etwas nach oben und dies in unterschiedlichem Maß.

Sollte tatsächlich Interesse daran bestehen, diese Apparatur „praktikumstauglich“ zu machen, würde ich als erstes versuchen, das Polymer selbst kostengünstig herzustellen und zwar in relativ großen Mengen, um danach viele Versuchsreihen durchführen zu können, ohne mehrere hundert Euro investieren zu müssen. Es müsste z.B. ausprobiert werden, wie sich die Auflösung der verschieden großen DNA-Fragmente verändert

bzw. verbessert, wenn man die Injektionszeit verkürzt und stattdessen das angelegte Feld während der Injektion erhöht. Unser Hochspannungsgerät kann allerdings lediglich 10 kV Spannung erzeugen.

Als nächstes würde ich die Apparatur so verändern, dass sich die Diode in alle drei Raumrichtungen verstellen lässt, ohne dabei die Kiste, in der sich die Elektronik befindet, öffnen zu müssen. So ließe sich bedeutend leichter ein idealer Punkt der Diode finden, um die Photonen zu detektieren. Ich bin mir nämlich nicht vollkommen sicher, ob ich tatsächlich die beste Position der Diode gefunden habe. Weiterhin sollte die Führung der Kapillare so verändert werden, dass sich bei ihrem Wechsel ihre Position nicht verändert. Vielleicht sollte darüber nachgedacht werden, die Diode gegen eine andere mit größerer Detektionsfläche auszuwechseln. Wahrscheinlich würde sich dadurch aber das Rauschen noch erhöhen. Auch das Problem mit der Befestigung der Spritze zum einpressen des Polymers in die Kapillare ist noch nicht hinreichend gut gelöst. Die Gefahr, dass diese abbrechen könnte, ist nach wie vor gegeben. Eine Ersatzspritze hielte ich in jedem Fall für anschaffenswert.

In Abb. 5.1 ist der Anodenblock der Apparatur abgebildet. Wenn man die Kapillare mit Gel befüllen möchte, muss man gleichzeitig den Stopfen herunterdrücken, damit das Gel nicht in diese Richtung heraus fließen kann. Man muss den Stopfen jedoch mit so viel Kraft herunterdrücken, dass dies mit der Hand kaum möglich ist. Es wäre sinnvoll, eine Art Schraubzwinde zu konstruieren, um mit dieser während der Befüllung mit dem Gel, den Stopfen herunter zu drücken, um die Öffnung somit zu verschließen.

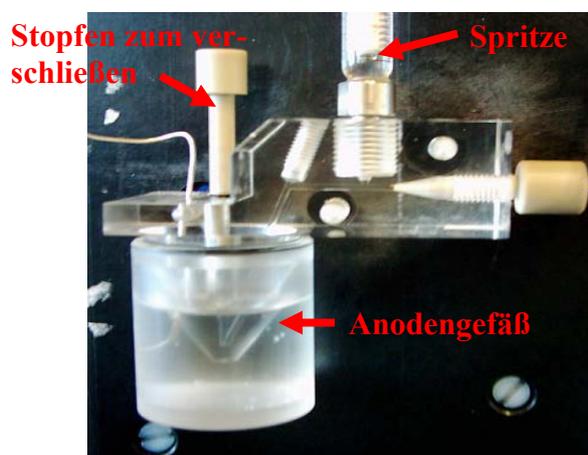


Abb. 5.1: Anodenblock der CE-Apparatur

6 Firmenliste

Nennung aller von mir neu eingeführten Geräte und Chemikalien.

1. Filter:

Thorlabs GmbH; Gausstraße 11; 85757 Karlsfeld; Tel.: 08131-5956-0; Fax: 08131-5956-99; Homepage: <http://www.thorlabs.com>; Artikelnummern: FB530-10 / FB600-40; Preis zum Kaufdatum: 85,80 Euro + Mehrwertsteuer, 88,00 Euro + Mehrwertsteuer.

2. Photodiode:

HAMAMATSU Photonics Deutschland GmbH; Arzberger Straße 10; 82211 Herrsching; Tel.: 08152-375-0; Fax: 08152-2658; Homepage: <http://www.hamamatsu.de>; Artikelnummer: S-2386-18K; kostenloses Muster.

3. Computerzubehör:

ALTERNATE Computerversand GmbH; Philipp-Reis-Straße 9; 35440 Linden; Tel.: 06403-90503700 oder: 0180 5-905040; Fax: 0180 5-905020; Homepage: <http://www.alternate.de>

- Prozessor: AMD Athlon XP 2600+ : 87,00 Euro
- Mainboard: MSI KT 4AV-L: 56,00 Euro
- Arbeitsspeicher: Infineon DIMM 512 MB: 92,00 Euro
- Gehäuse: PC-CASE A-330: 44,00 Euro
- Festplatte (IDE): Hitachi HDS722540VLAT20: 54,00 Euro
- Grafikkarte: Asus A7000/T: 36,00 Euro
- CD-ROM-Laufwerk: Sony CDU 5211: 16,00 Euro
- Maus: Logitech WheelMouse S69 OEM: 12,00 Euro
- Tastatur: Keytronic KT-800: 11,00 Euro
- Kühler: Sharcon Kühler CUS3 3400+: 9,90 Euro
- Bildschirm: Samsung SyncMaster 957 DF 19R: 219,00 Euro

4. Chemikalien:

Applied Biosystems Europe; Tel.: 06151-9670-5335; Homepage:
<http://www.appliedbiosystems.com/index.cfm>;

- Puffer: 10x Genetic Analyzer Buffer with EDTA (25mL);
Produktnummer: 402824; Preis: 88.00 Euro.
- Polymer: 3100 Performance Optimized Polymer 4 (POP-4TH) (7 mL);
Produktnummer: 4316355; Preis: 455 Euro.
- Kit: ROX-Size-Standard: GeneScan®-400HD [ROX]TH;
Produktnummer: 402985; Preis: 405.00 Euro.

7 Literaturverzeichnis

Atkins, Peter: Physikalische Chemie – 1. Aufl. – Weinheim: VCH-Verlag, 1987

Atkins, Peter: Physikalische Chemie – 2. Aufl. – Weinheim: Wiley-VCH-Verlag, 1997

Bludau, Wolfgang: Halbleiter-Optoelektronik, Die Physikalischen Grundlagen der LED's, Diodenlaser und pn-Photodioden – 1. Aufl. – München: Carl Hanser Verlag, 1995

Butler, John: Forensic DNA Typing, Biology & Technology behind STR Markers – 1. Aufl. – San Diego: Academic Press, 2001

Donges, Axel: Physikalische Grundlagen der Lasertechnik, Band 1: Technische Physik – 1. Aufl. – Heidelberg: Dr. Alfred Hüthig Verlag, 1988

Engelhardt, H.; Beck, W.; Schmidt, T.: Kapillarelektrophorese, Methoden und Möglichkeiten – 1. Aufl. – Braunschweig: Vieweg-Verlag, 1994

Gerthsen, Christian: Physik, Ein Lehrbuch zum Gebrauch neben Vorlesungen – 9. Aufl. - Berlin: Springer-Verlang, 1966

Halliday, D.; Resnick, R.; Walker, J.: Physik – 6. Aufl. – Weinheim: Wiley-VCH-Verlag, 2003

Harbeck, Gerd: Brenneke Schuster Physik – 3. Aufl. – Braunschweig: Friedrich Viewegverlag, 1973

Hecht, Eugen: Optik – 3. Aufl. – München: Oldenbourgverlag, 2001

Heller, Christoph: Analysis of Nucleic Acids by Capillary Electrophoresis – 1. Aufl. – Braunschweig: Friedrich Viewegverlag, 1997

Hundt, Ekkehard: Schülerduden Physik, Ein Lexikon der gesamten Schulphysik – 1. Aufl. – Mannheim: Dudenverlag, 1974

Eichler, J.; Eichler, H.-J.: Laser in Technik und Forschung – 1. Aufl. – Heidelberg: Springer-Verlag, 1990

Johnson, D.: Introduction to Fluorescence Techniques, in: Haugland, Richard: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals – 6. Aufl. – Leiden: Molecular Probes, 1996

Kneubühl, F.K.; Sigrist, M.W.: Laser – 1. Aufl. – Stuttgart: Teubner Verlag, 1988

Riedel, Erwin: Anorganische Chemie – 4. Aufl. – Berlin: de Gruyter Verlag, 1999

Schwedt, G.: Analytische Chemie – 1. Aufl. – Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1995

Verwendete Examensarbeit

Schwabe, Bernhard: Wissenschaftliche Hausarbeit im Fach Chemie, Grundlagen für den Aufbau eines Versuchs zur Trennung von DNA-Fragmenten mittels Kapillarelektrophorese – 1. Aufl. – Gießen: 2003

Verwendete Doktorarbeit

Mellau, Georg: Fourier-Transform-Spektroskopie an HCN: Beobachtung und Interpretation neuer Infrarotübergänge zwischen hochangeregten Zuständen – 1. Aufl. – Gießen: 2003

Verwendete Internetseiten

APPLIED BIOSYSTEMS: GeneScan Reference Guide, Chemistry Reference for the ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer

<http://bioinf01.bot.muohio.edu/mucbfg/Files/310GSRefGuide.pdf>, Stand: 19.08.2004

APPLIED BIOSYSTEMS: Prism[™]-Tips 5, Informationen zur automatischen DNA-Sequenzierung und Fragmentanalyse mit den ABI PRISM[™]-Systemen 310, 373 und 377

<http://methdb.igh.cnrs.fr/cgrunau/methods/prismtips5.pdf>, Stand: 21.06.2004

BUTLER: Chapter 5, Commonly Used Short Tandem Repeat Markers

http://www.ib3.gmu.edu/mckenney/STR_1.Butler_chapters_5_8.pdf, Stand: 21.06.2004

DHGB: Methoden

<http://www.dhgp.de/deutsch/intro/strategies/methoden02.html>, Stand 31.08.04

Franck-Condon-Prinzip

<http://www.theochem.uni-duisburg.de/DC/material/farbe/fc/fcinfo.html>, Stand: 27.08.04

Hamamatsu: Photodioes

<http://www.hamamatsu.de/index.php?language=2&id=50728&request=S2386-18K&>,
Stand: 30.06.2004

HPLC: A Users Guide

<http://kerouac.pharm.uky.edu/ASRG/HPLC/hplcmytry.html>, Stand: 25.08.04

Kittel, Achim: Stabilisierung der Ausgangsleistung eines frequenzverdoppelten Festkörperlasers

http://www.epkos.de/Webpage_NLD_Laser.htm, Stand: 21.06.2004

KnowHow: Glasweg am Bino

<http://home.t-online.de/home/UHuebler/knowhow/glasweg.html>, Stand: 22.06.2004

LASPRO: Digi-Art

http://www.laspro.de/body_a.htm, Stand: 21.06.2004

LOT ORIEL GRUPPE: Laser

<http://www.lot-oriel.com/de/htm/spec/s08712.php>, Stand: 21.06.2004

MELLES GRIOT: 01 LDX 063

<http://shop.mellesgriot.com/products/optics/product.asp?dept%5FidCoat=9&dept%5FidOpt=313&dept%5Fid=313&pf%5Fid=01+LDX+063&plga=144576>, Stand: 22.06.2004

MOLECULAR PROBES: Spectra-5-FAM/pH 9.0

<http://probes.com/servlets/spectra?fileid=1359ph9>, Stand: 05.08.2004

MOLECULAR PROBES: Spectra-5-ROX/pH 7.0

<http://probes.com/servlets/spectra?fileid=6124ph7>, Stand: 05.08.2004

MOLECULAR PROBES: Spectra-6-HEX/pH 9.0

<http://probes.com/servlets/spectra?fileid=20091p9>, Stand: 05.08.2004

MOLECULAR PROBES: Spectra-6-JOE/pH 9.0

<http://probes.com/servlets/spectra?fileid=6170ph9>, Stand: 05.08.2004

MOLECULAR PROBES: Spectra-6-TET/pH 9.0

<http://probes.com/servlets/spectra?fileid=20092p9>, Stand: 05.08.2004

Physikalische Chemie: Prinzip von Franck-Condon

<http://www.chemie.uni-hamburg.de/skripte/pc4/Woche4.pdf>, Stand: 27.08.04

PRIMER PEAK

<http://www.ecf.toronto.edu/~sdavies/msr.html>, Stand 31.08.04

PROMEGA: Fluorophore Characteristics: Making Intelligent Choices in Application-Specific Dye Selection

<http://www.promega.com/geneticidproc/ussymp8proc/21.html>, Stand: 22.07.2004

R-Q PROBES: Scandinavian Gene Synthesis AB

<http://www.sgsdna.com/rqprobes.pdf>, Stand: 21.06.2004

ROITHNER LASERTECHNIK: Lasermodul GLM-Series

http://www.roithner-laser.com/green_modules.htm, Stand: 22.06.2004

ROX 400: Size Standard Peaks

http://genetics.med.harvard.edu/~depalma/size_standards.html, Stand: 31.08.04

Struktur der Nukleinsäure: Woraus besteht DNA?

<http://ntbiouser.unibe.ch/trachsel/teaching/MB%20Atelier/Struktur%20der%20Nukleinsaeuren.pdf>, Stand: 20.07.2004

SYNTHETIC GENETICS: Dye Chart

http://content.labvelocity.com/tools/7/167/dye_chart.pdf, Stand: 22.06.20

THORLABS: FB 530-10

http://www.thorlabs.com/ProductDetail.cfm?DID=6&ObjectGroup_ID=1001&Product_ID=27194, Stand: 22.06.2004

THORLABS: FB 600-40

http://www.thorlabs.com/ProductDetail.cfm?DID=6&ObjectGroup_ID=1001&Product_ID=27203, Stand: 23.06.2004

TIB MOLBIOL: Formate

www.tib-molbiol.com/de/lightcycler/principle/formats.html, Stand: 21.06.2004

TOPIC 7.3: Quantum yield

<http://www.plantphys.net/printer.php?ch=7&id=68>, Stand: 21.06.2004

TURKAN: Der Laser, Funktionsprinzip

<http://www.muenster.de/~breitens/referate/laser/laser.htm>, Stand: 21.06.2004

8 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die durch Ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Over und Herrn Prof. Dr. J. Janek sowie deren gesamten Arbeitsgruppen für das freundliche Arbeitsklima und die allgemeine Hilfsbereitschaft. Ohne die monatelange Leihgabe des Spektrometers und des Hochspannungsgerätes, aber auch ohne die Unterstützung in einigen technischen Fragen wäre diese Arbeit kaum möglich gewesen.

Im Besonderen danke ich Herrn Dr. Georg Mellau, der mir als ständiger Ansprechpartner zur Verfügung stand. Er stand mir während der gesamten Arbeit mit Rat, Schlägen und Anregungen zur Seite. Zudem hat er sich um die materielle Seite gekümmert, sodass mir ausreichende Geldmittel zur Verfügung gestellt wurden.

Ferner gilt mein Dank der Elektronik- und der Feinmechanikerwerkstatt. Sämtliche Arbeiten wurden sehr schnell und sehr ordentlich ausgeführt. Bei eventuellen Rückfragen wurde mir stets sehr freundlich weitergeholfen.

Elementar für diese Arbeit war die Unterstützung der Gießener Firma „bj-diagnostik GmbH“. Zum einen wurden mir die nicht billigen Chemikalien für die Versuchsdurchführungen ausgehändigt, zum anderen wurde mir bei vielen Fragen zur praktischen Durchführung einer CE weitergeholfen. Besonders die Mitarbeiterin Mareike Buch stand mir dafür jederzeit zur Verfügung.

Schließlich möchte ich mich noch bei Herrn Dr. A. Seibert bedanken. Er hat als Leiter des Praktikums die finanziellen Mittel immer schnell genehmigt, obwohl zu keinem Zeitpunkt klar war, ob das Gerät jemals funktionstüchtig arbeiten würde.

9 Versicherung gemäß § 16 Abs. 10

Hiermit versichere ich, dass ich die Wissenschaftliche Hausarbeit selbständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die den benutzten Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe. Meine Versicherung gilt auch für bildliche Darstellungen, Skizzen und Zeichnungen.

Gießen, den 09. September 2004

Carl Christoph Hubbe