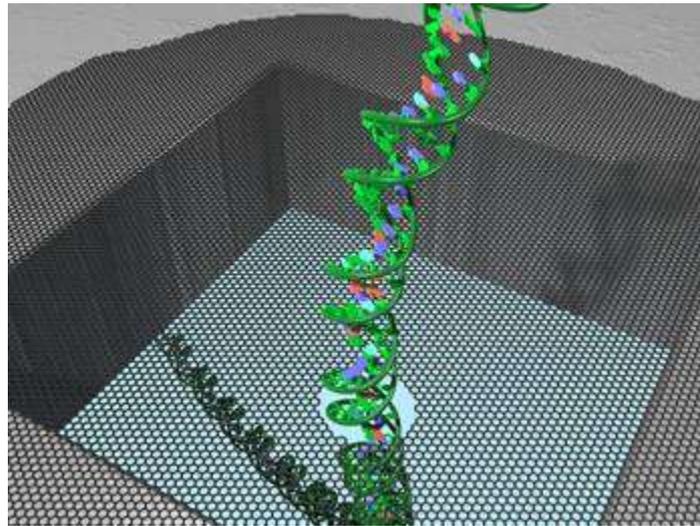


Solid-State Nanopores



LMU

LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Vortrag von Ann-Kathrin Wagner
am 15. Juli 2013

Gliederung

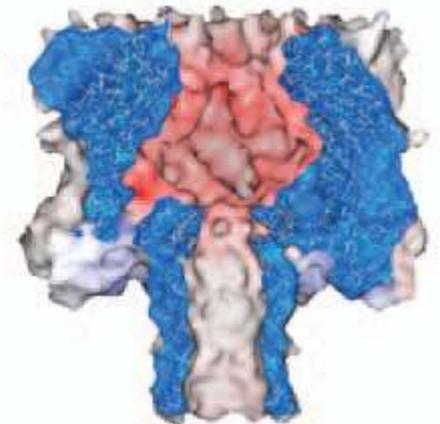
1. Motivation
2. Biologische Poren
3. Herstellung von Festkörper-Poren
4. Experiment
5. Kraftspektroskopie
6. Ausblick
7. Quellen

1. Motivation

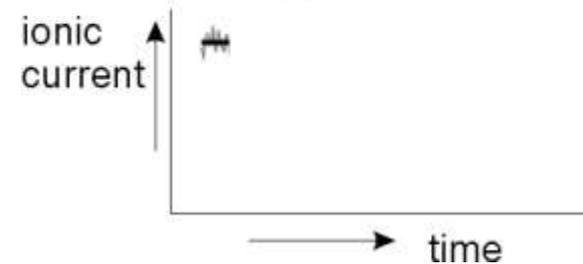
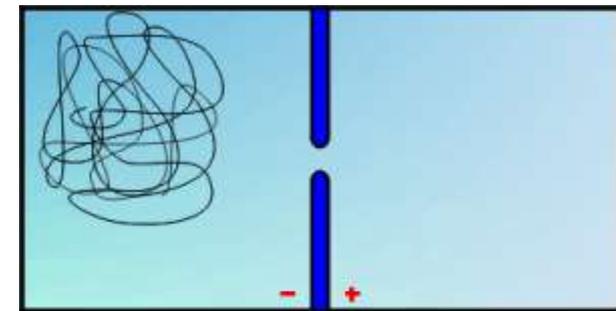
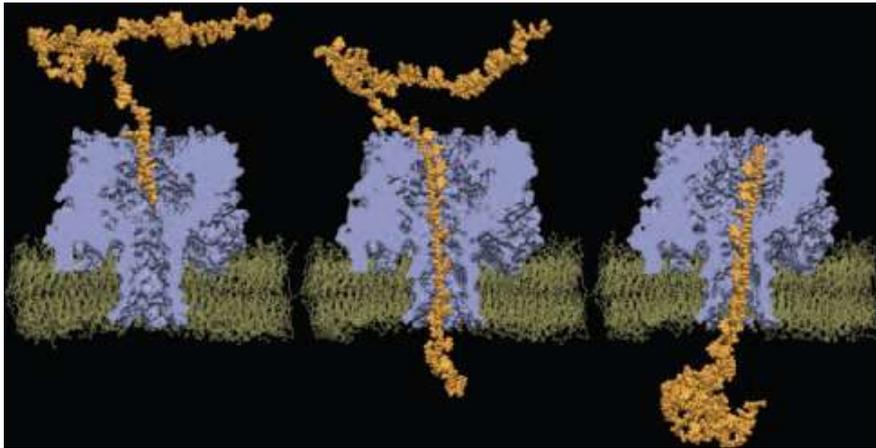
- biologische Zelle besitzt eine Vielzahl verschiedener Arten von Nanoporen
- Geschichte:
 - 1990er Jahre: Vermutung, dass Nanoporen DNA ablesen können
 - 1996: 1. Experimente an α -haemolysin von Kasianowicz am NIST
 - Seit 2002: Festkörper-Poren

2. Biologische Poren

- Protein α -haemolysin
 - ⇒ wird abgesondert von *Staphylococcus aureus* Bakterien
 - ⇒ Protein lagert sich in die Lipidmembran ein
- Durchmesser von $d = 1,4$ nm
 - ⇒ nur ssDNA passt durch



2. Biologische Poren



⇒ Entdeckung der Sequenzierungsmöglichkeit

2. Biologische Poren

Problem:

- Signal-to-Noise-Ratio zu hoch, um einzelne Basen auflösen zu können
- Außerdem:
fixe Größe, limitierte Stabilität bei Veränderungen im pH-Wert, in den Salzkonzentrationen und der Temperatur

⇒ **Festkörper-Poren**

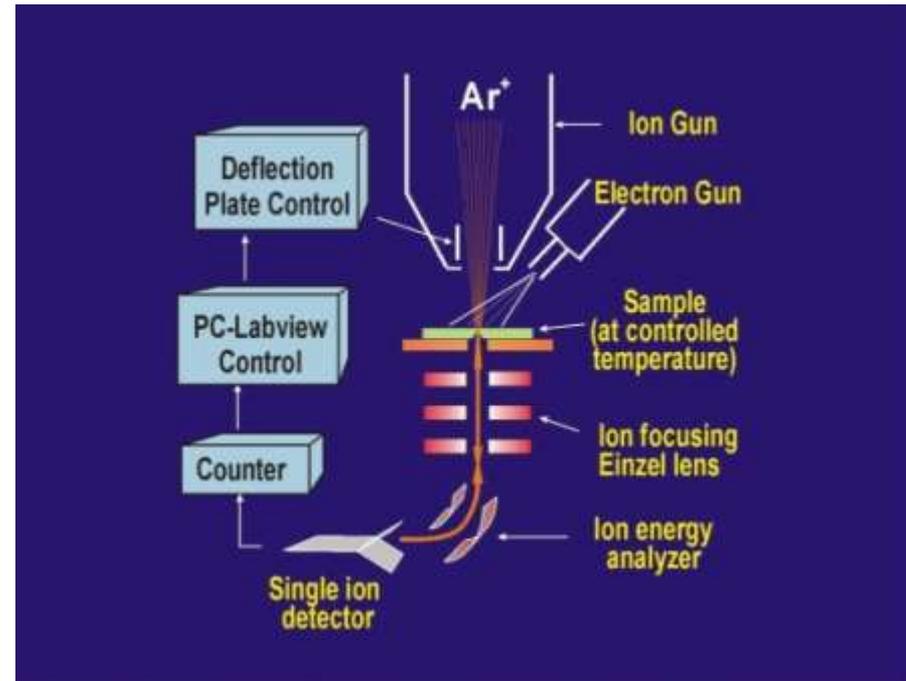
3. Herstellung von Festkörper-Poren

- Ätzen von Löchern in isolierte Schichten
⇒ größere Löcher
- Schießen eines einzelnen hochenergetischen Schwermetall-Ions durch eine Polymer-Schicht
⇒ entlang des defekten Pfads wird geätzt (Größe der Poren $> 2\text{nm}$)

3. Herstellung von Festkörper-Poren

- **Ion beam sculpting- Methode**

- ⇒ Strahl auf SiN, SiO₂ Oberflächen
- ⇒ fokussierter Ag-Strahl mahlt Loch
- ⇒ Löcherausdehnung ist abhängig von T und von der Ionenrate



3. Herstellung von Festkörper-Poren

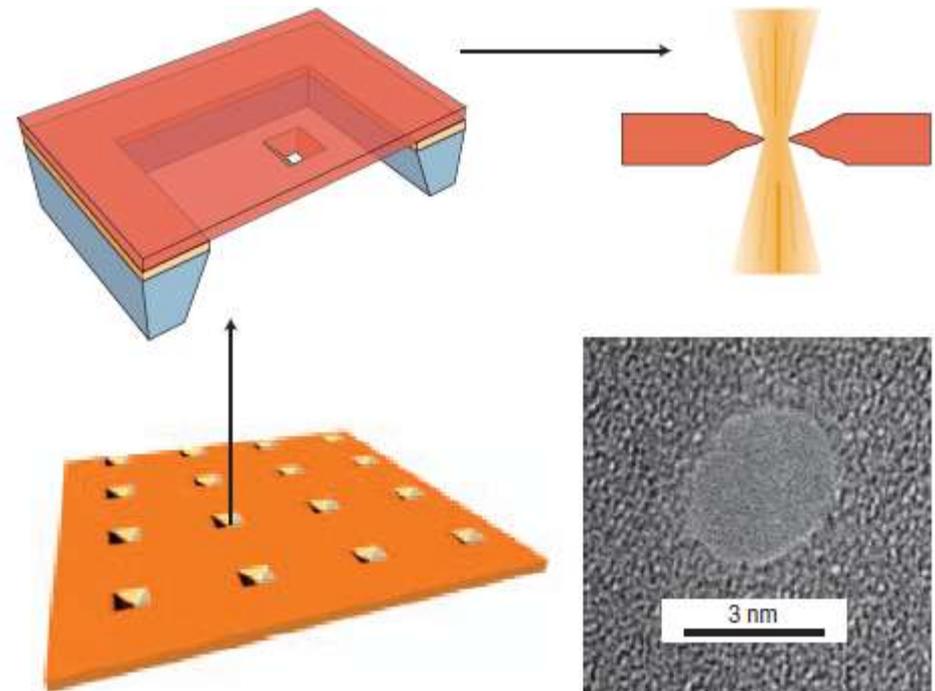
- **TEM-Methode**

⇒ mittels Elektronenstrahl-Lithographie und Ätzen entstehen Poren in den

Membranen aus Si,
SiN, SiO₂

⇒ Sichtbarmachen
mittels **Transmissions-**
elektronen-Mikroskopie

⇒ SiO₂ ändert sich

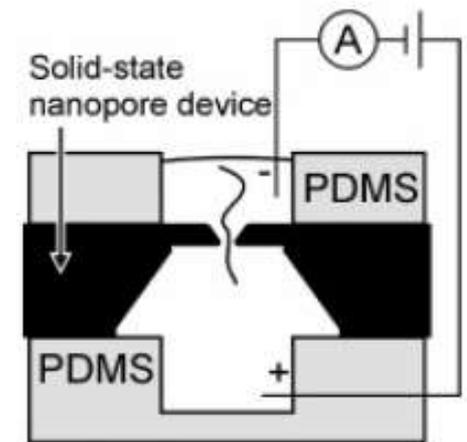


4. Experiment

- Allgemeines:
 - ⇒ Versuche mit dsDNA-Molekülen mit unterschiedlichen Längen (6 557 - 97 000 bp)
 - ⇒ Translokation der dsDNA durch SiO₂-Pore mit einer Tiefe von $d = 20$ nm
 - ⇒ Anlegen eines Stromes von $I = 120$ mV

4.1 Aufbau

- Verwendung einer SiO_2 – Pore mit einem Durchmesser von 10 nm
- Aufbau:
PDMS: Polydimethylsiloxan (Polymer auf Siliziumbasis)
sehr salzige Puffer-Lösung
- Anlegen einer Spannung:
Translokation der DNA wegen Elektrophorese



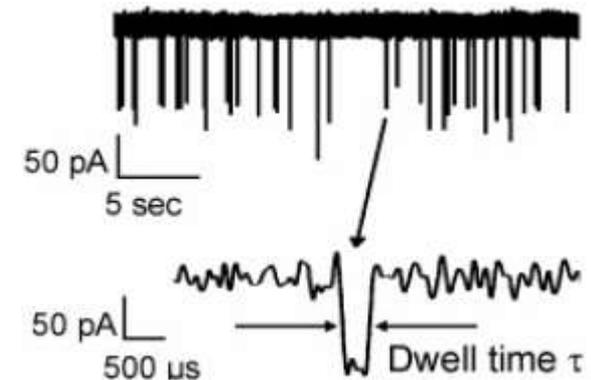
4.2 Ergebnisse

- Detektion der DNA:

Pufferlösung wird während des Translokationsprozesses in der Pore verdrängt

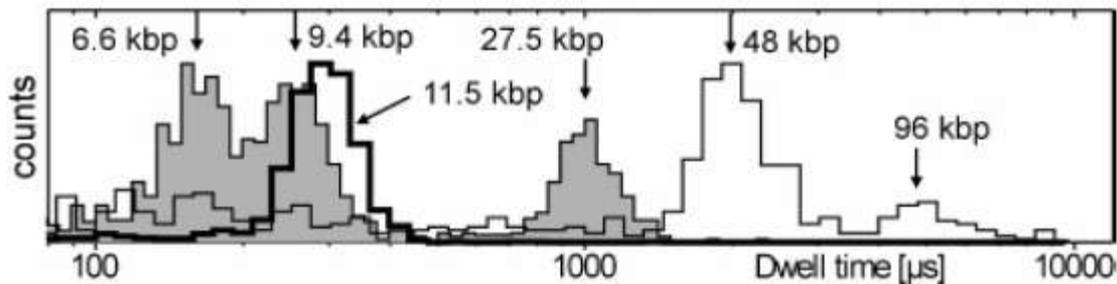
⇒ Stromabfall messbar

⇒ Breite der Abfallzeit \triangleq Maß für die Dauer der Translokation



4.2 Ergebnisse

- Versuchsdurchführung mit drei verschiedenen Lösungen/DNA Längen
 - i. Lineare 11,5 kbp DNA
 - ii. Lineare 48,5 kbp λ -DNA
 - iii. Mix aus 27,5 kbp; 9,4 kbp; 6,5 kbp; 2,3 kbp; 2,0 kbp



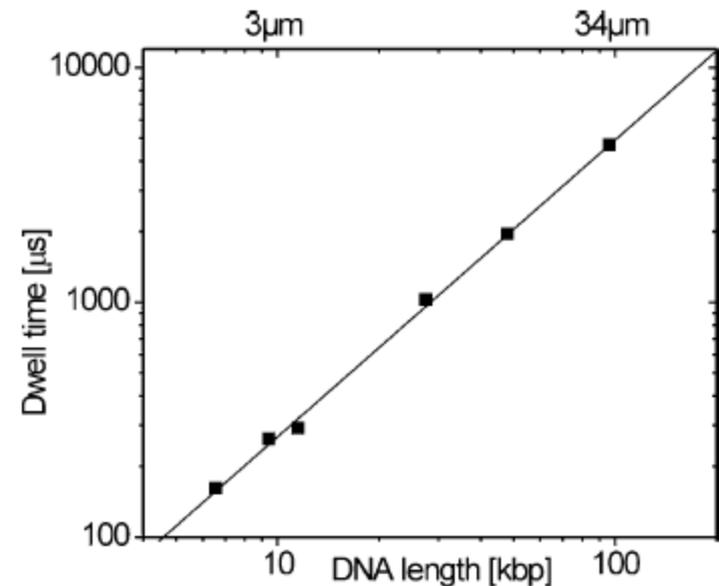
4.2 Ergebnisse

- Jede DNA-Länge besitzt ihr Maximum zu einer anderen Zeit

⇒ wahrscheinlichste Zeit pro Länge

⇒ $\tau \sim L_0^a$

$a = 1,27 \pm 0,03$



4.3 Theoretisches Modell

- Translokationsprozess besteht aus 2 Komponenten
 - i. Einfangen
 - ii. Durchdringen der Pore

⇒ Schnelle vs. Langsame Translokation

Länge des Polymers: $L_0(t) = Nb$ mit b Kuhn-Länge

Zimm-Zeit: $t_z \approx 0,4 \eta (R_g)^3 / (kT)$

mit η Viskosität; R_g Windungsradius des Polymers

⇒ $R_g \sim L_0^v$ mit $v \approx 0,588$ Flory Quellkoeffizient

$D \sim L_0^v$ mit D Diffusionskonst. und $v \approx 0,611 \pm 0,016$

4.3 Theoretisches Modell

- Beispiel für langsame Translokation:
ssDNA durch α -haemolysin

⇒ $v_T \approx 0,8 \mu\text{s}/\text{Base}$

bei einer Länge von 100 Basen: $\tau = 80 \mu\text{s}$

⇒ Zimm-Zeit: $t_z \approx 20 \mu\text{s}$

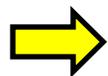
⇒ $t_z \ll \tau$ langsame Translokation

4.3 Theoretisches Modell

- im Experiment ($48,5 \text{ kbp} \triangleq 16,5 \mu\text{m dsDNA}$)

$$\tau = 2 \text{ ms}$$

$$t_z \approx 700 \text{ ms}$$

 $\tau \ll t_z$ schnelle Translokation

- Schnelligkeit beruht auf Verwendung von dsDNA

4.4 Welche Kräfte wirken?

1. Zugkraft

$$F_{\text{Zug}} = 2eV/a \approx 110 \text{ pN}$$

mit e Elementarladung, V Potentialdifferenz,
 $a = 0,34 \text{ nm}$ Nukleotidabstand

⇒ F_{Zug} ist obere Grenze, da Röntgenuntersuchungen die effektive Ladung der DNA verringern (53 – 85%)

⇒ $F_{\text{Zug,eff}} = 20 - 50 \text{ pN}$

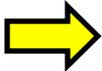
4.4 Welche Kräfte wirken?

2. Viskositätsreibung in der Pore

$$F_{\text{vis}} = 2\pi\eta r d_{\text{Pore}} v_{\text{lin}} / (R-r)$$

mit R Porenradius, r Polymerradius, η Viskosität,

d_{Pore} Porentiefe, v_{lin} lineare Geschwindigkeit der DNA

 $F_{\text{vis}} = 0,3 \text{ pN}$

F_{vis} vernachlässigbar im Vergleich zur Zugkraft

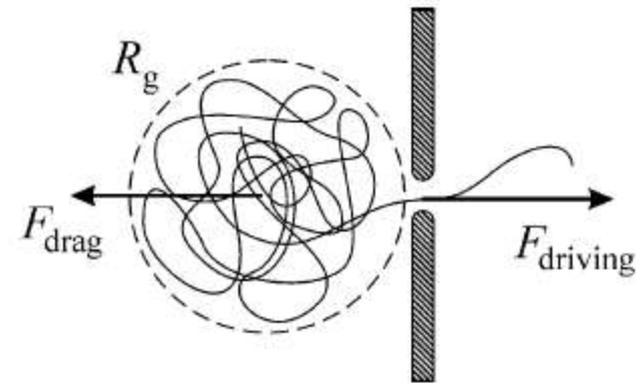
4.4 Welche Kräfte wirken?

3. Hydrodynamische Wechselwirkung

$$F_{\text{drag}} = 6\pi\eta R_g v_g$$

mit v_g Schwerpunkts-
geschwindigkeit des Polymerknäuls

➔ $F_{\text{drag}} \approx 24 \text{ pN}$



Hydrodyn. WW \triangleq Gegenkraft zur Zugkraft

4.5 Theoretische Bestätigung des Experiments

- Model der schnellen Translokation

⇒ Prinzipielle Effekt der hydrodyn. WW ist die Bewegung der DNA durch die Pore zu verhindern

$$\mathbf{F}_{\text{drag}} = \xi_{\text{eff}} \times \mathbf{v}_{\text{blob}} \sim R_g^2 / \tau$$

mit ξ_{eff} Reibungskoeffizient $\sim R_g$, $v_{\text{blob}} \sim R_g / \tau$

⇒ $F_{\text{drag}} = - F_{\text{Zug}} = \text{const}$ während der Translokation
→ $\tau \sim R_g^2$

4.5 Theoretische Bestätigung des Experiments

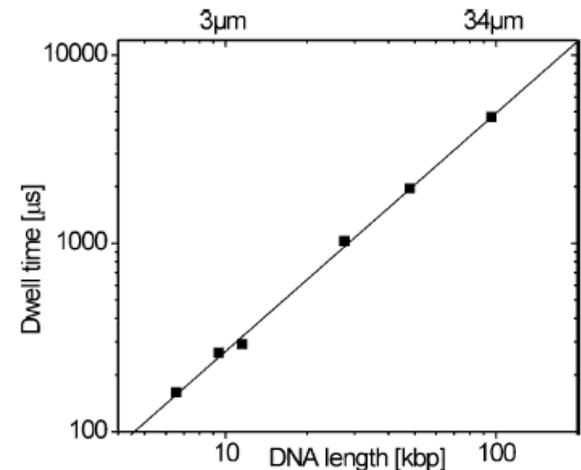
- wähle Randbedingungen so, dass die DNA zusammengeknäult vorliegt und eine Gleichgewichtsbeziehung mittels

$$R_g \sim L_0^v$$

existiert

$$\Rightarrow \tau \sim R_g^2 \sim L_0^{2v}$$

- Theorie: $a = 2v = 1,22$ mit $v = 0,61$
Experiment: $a = 1,27 \pm 0,03$



5. Kraftspektroskopie

- Fragen:

Welche Kräfte wirken auf die DNA und wie groß sind diese? Welche Rolle spielt die Menge der Ladungen?

- DNA wird an Bead befestigt, welches in dem Fokus eines IR-Laser gefangen ist
 - Translokationsprozess bewirkt eine Zugkraft auf das Bead

6. Ausblick

- Sequenzierung
 - DNA bewegt sich zu schnell durch die Pore, um die Basenpaare abtasten zu können (optische Tweezer ziehen das Bead langsam)
 - sehr geringer Basenabstand (Verwendung von Graphen)
- Entzippen von ssRNA (Haarnadeln)

7. Quellen

- **Fast DNA Translocation through a Solid-State Nanopore;** A. Strom, C. Storm, J. Chen, H. Zandbergen, J. Joanny, C. Deeker (2005)
- **Solid-State Nanopores;** C. Deeker (2007)
- <http://ceesdekkerlab.tudelft.nl/research/projects/nanopores/> aufgerufen am 9.7.2013
- **Trapping DNA near a Solid-State Nanopore;** D. Vlassarev, J. Golovchenko (2012)
- **Nanopores sensors for nucleic acid analysis;** B. Venkatesan, R. Bashir (2011)
- <http://labs.mcb.harvard.edu/branton/> aufgerufen am 9.7. 2013
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Nanopore> aufgerufen am 9.7.2013