

Spitzenverstärkte Raman-Spektroskopie an RNA-Einzelsträngen: Vorschlag für eine direkte Sequenzierungsmethode

Elena Bailo und Volker Deckert*

Die Sequenzierung von DNA oder Proteinen ist ein komplexer Vorgang und erfordert anspruchsvolle Analysemethoden.^[1,2] Zwar ist die DNA-Sequenzierung eine leistungsstarke Methode, allerdings werden andere Techniken benötigt, um spezielle DNA-Fragmente zu trennen und bildlich darzustellen.^[3] Ferner nutzen die herkömmlichen Techniken große Mengen an DNA und sind nicht in der Lage, die Basenzusammensetzung eines Stranges direkt auszulesen. Es ist daher von großem Interesse, eine Methode zu entwickeln, mit deren Hilfe sich die Informationen der verschiedenen Basenpaare auslesen lassen, ohne dass dazu eine Markierung von RNA oder DNA nötig ist. Zu den bisherigen Versuchen in diese Richtung zählen das Ziehen von DNA-Einzelsträngen durch Nanoporen, das Detektieren der elektrischen Eigenschaften und die Herleitung der Sequenz.^[4–6] Weiterhin gab es Versuche zur rastertunnelmikroskopischen Sequenzierung von DNA.^[7,8] Die größte Schwierigkeit ist dabei der niedrige Kontrast des Verfahrens, der gewöhnlich einen statistischen Ansatz zur Evaluierung der Daten notwendig macht. Unsere Experimente zeigen, dass bei Einsatz von nahfeldoptischen Techniken in Kombination mit Schwingungsspektroskopie eine direkte Identifizierung der Basen mit hohem Kontrast an isolierten RNA-Einzelsträngen möglich ist. Standard-Raman-Spektroskopie macht die Identifizierung der Basen einfach, obwohl die laterale Auflösung und die Empfindlichkeit der Methode weit von der nötigen Einzelstrang- oder Einzelbasendetektion entfernt sind. Hier zeigen wir, dass spitzenverstärkte Raman-Streuung (tip-enhanced Raman scattering, TERS) wesentliche Vorteile gegenüber der konventionellen Raman-Spektroskopie bietet: Sie ist, mit nur wenigen Sekunden Aufnahmezeit, eine schnelle und hochempfindliche Methode mit einer lateralen Auflösung bis hin zu einigen Nucleobasen. Diese Eigenschaften ermöglichen eine TERS-Kartierung entlang eines Poly(cytosin)-RNA-Stranges.^[9,10] Die Resultate demonstrieren, welches Potenzial dieses Prinzip für die Identifizierung der Zusammensetzung und die Sequenzierung polymerer Biomakromoleküle (DNA, RNA, Peptide) hat.

Spektren, die mithilfe spitzenverstärkter Raman-Streuung von einem RNA-Einzelstrang aus einem Cytosin-Homopolymer (poly(C)) erhalten wurden, konnten in einer Auflösung von wenigen Nucleobasen gemessen werden. Die

allgemeine Experimentanordnung ist in Abbildung 1 dargestellt. Ein Standard-Transmissions-TERS-Aufbau wird verwendet, um den Laserstrahl auf eine mit Silber bedampfte

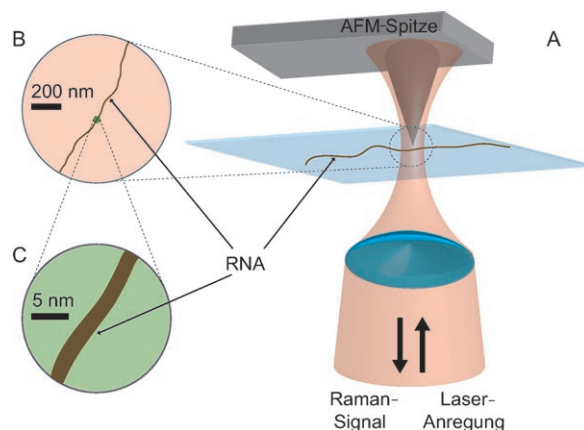


Abbildung 1. A) Experiment für spitzenverstärkte Raman-Streuung entlang eines RNA-Einzelstranges. B) Detailansicht in Größe des Laserfokus. C) Detailansicht bei Vergrößerung bis auf die Größe der Spitze.

Rasterkraftmikroskop (AFM)-Spitze zu fokussieren. Hierbei wird die Probe unabhängig bewegt, um die Probenoberfläche im Fokus zu halten. Ähnliche Aufbauten wurden bisher eingesetzt, um Infrarot- und Raman-Spektren von nanoskaligen Materialien wie Polymeren,^[11] molekularen Monoschichten^[12] oder Kohlenstoff-Nanoröhren^[13] zu verstärken. In Abbildung 2 ist die Topographie eines RNA-Einzelstranges aus homopolymerem Cytosin gezeigt. Um eine Raman-Streuung durch andere Komponenten als die RNA zu vermeiden, wurden so wenig Pufferlösungen und andere Chemikalien wie möglich eingesetzt. Aus diesem Grund war das Hauptproblem die natürliche Aufwicklung der Einzelstränge, die eine umfangreiche Suche nach linearen RNA-Einzelsträngen für die Messungen notwendig machte. Die im Höhenprofil (Abbildung 2) gezeigte Stranghöhe stimmt gut mit dem bekannten RNA-Durchmesser überein und unterstützt die Identifizierung eines Einzelstranges. Die effektiv von der AFM-Spitze gemessene Größe ist eine Faltung von Probe und Spitze. Daher ist der gemessene Durchmesser von ca. 10 nm weitgehend der silberbedampften Spitze zuzuordnen und entspricht sehr gut dem durch Rasterelektronenmikroskopie (REM) ermittelten Spitzendurchmesser von ca. 20 nm. Die Länge der Homopolymerkette erscheint länger als erwartet. Die knotenartige Struktur in der Nähe der Strangmitte zeigt an, dass es sich höchstwahrscheinlich um zwei aneinanderhängende Stränge handelt. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die nachfolgenden Experimente, da die Länge

[*] E. Bailo, Dr. V. Deckert
ISAS – Institute for Analytical Sciences
Bunsen-Kirchhoff-Straße 11, 44139 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231–1392–120
E-Mail: bailo@isas.de
deckert@isas.de
Homepage: <http://www.isas.de>

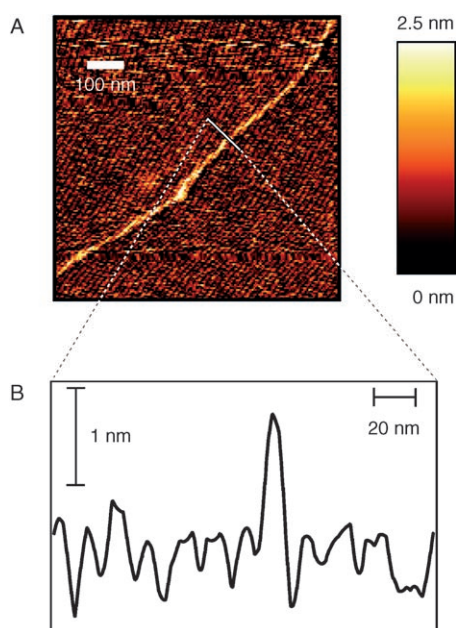


Abbildung 2. Topographie eines RNA-Einzelstranges aus Cytosin-Homopolymeren. A) Höhenbild eines einzelnen Poly(cytosin)-RNA-Einzelstranges auf einer Glimmeroberfläche. Diese Darstellung ist basislinienkorrigiert. B) Höhenprofil des RNA-Einzelstranges an der in (A) markierten Stelle.

der Stränge hier nicht relevant ist. Wichtig ist zu erwähnen, dass neben der RNA keine weiteren topographischen Strukturen auftreten. Somit können andere chemische Verbindungen (z.B. Kristalle der Pufferlösung) für diesen Bereich ausgeschlossen werden. Dadurch wird die eindeutige Auswertung der Raman-Spektren erleichtert.

Vorhergehende TERS-Messungen an einzelnen, nanometergroßen Kristallen oder Monoschichten von Nucleobasen zeigten die individuellen „Fingerabdrücke“ der einzelnen Basen, und die charakteristischen Schwingungen, die für eine genaue Zuordnung notwendig sind, konnten leicht identifiziert werden.^[14,15] Im Vergleich zu den vorangegangenen Untersuchungen sind die technischen Toleranzen für TERS-Experimente an DNA- und RNA-Einzelsträngen wesentlich enger gefasst. Die feldverstärkende Spitze muss während der gesamten Dauer des Raman-Experimentes über dem Homopolymer gehalten werden. Es ist entscheidend, dass eine Probedrift weitestgehend ausgeschlossen wird, damit nachfolgende Messpunkte ebenfalls auf dem RNA-Strang liegen. In unserem Experiment wurden TERS-Spektren an sieben verschiedenen Positionen des RNA-Einzelstranges gemessen (Abbildung 3). Alle erhaltenen Spektren zeigen die Hauptbanden von Cytosin. Die beobachteten Fluktuationen von Bandenintensitäten und -positionen, die die statistischen Variationen übersteigen, werden weiter unten diskutiert. Wichtiger in diesem Zusammenhang ist, dass die Resultate die Stabilität des Aufbaus bestätigen, da die RNA immer wieder gefunden werden konnte. Um eine Kontaminierung der Spitze auszuschließen, wurden Referenzmessungen an Positionen ohne RNA durchgeführt. Hier konnten außer den Raman-Banden von Silicium (Hintergrundstreuung der AFM-Spitze) und Glimmer (Substrat) keine Hinweise auf

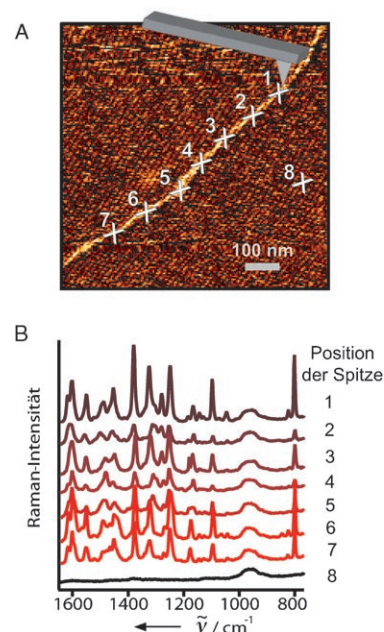


Abbildung 3. TERS-Experiment entlang eines RNA-Stranges. A) Im Topographiebild (vgl. Abbildung 2 A) wurden sieben benachbarte Punkte auf der RNA für TERS-Experimente und ein zusätzlicher Punkt neben der RNA (8) als Referenz festgelegt. B) Raman-Spektren, die an den in (A) markierten Positionen aufgenommen wurden.

RNA- oder andere Raman-Banden entdeckt werden. Dieser Vergleich ermöglicht auch eine Bestimmung der realen Raman-Verstärkung. Hierbei folgen wir hauptsächlich der Vorgehensweise in Lit. [16,17].

Zur Abschätzung der Verstärkung muss sowohl die Zahl der Moleküle, die das TERS-Signal liefern, wie auch die Zahl der Moleküle des Referenzsignals bestimmt werden. Der Durchmesser des Laserfokus betrug 1 μm . Im Fall der Referenz nehmen wir an, dass ein RNA-Strang durch den gesamten Durchmesser des Laserfokus gestreckt vorliegt (wie in Abbildung 1B gezeigt). Das Signal neben dem RNA-Strang (Abbildung 3B, Spektrum an Position 8) wurde dann als Referenz verwendet. In unserem Fall wurde an dieser Stelle, unter sonst identischen Messbedingungen, kein Signal beobachtet.

Im Fall des TERS-Spektrums ist nur ein kleines RNA-Fragment von 20 nm Länge für das gesamte Signal verantwortlich (siehe Abbildung 1C). Demzufolge beträgt das Verhältnis zwischen der Zahl der Basen des Referenzsignals (ca. 3000 Basen) und der Zahl der Basen des TERS-Signals etwa 50. In Verbindung mit dem Signal/Rausch-Verhältnis zwischen Referenz- und TERS-Spektrum (etwa 200:1) kann eine Gesamtverstärkung von mindestens 10^4 angenommen werden. In diese sehr vorsichtige Abschätzung ist der Einfluss der oszillierenden Spitze nicht mit einbezogen, und alle verwendeten Parameter (Größe der Spitze, Signal/Rausch-Verhältnis) wurden konservativ geschätzt. Ungeachtet dessen sind die vorliegenden TERS-Experimente in Bezug auf die Empfindlichkeit sehr zufrieden stellend. Das Signal/Rausch-Verhältnis von ca. 200 stammt von 30–60 Basen unterhalb der TERS-Spitze. Unter der Annahme, dass eine homogene Signalverstärkung von jeder einzelnen Nucleobase mit einem

Signal/Rausch-Verhältnis von 3–7 zum Spektrum beiträgt, ist jede einzelne Base unterscheidbar. Dies bedeutet, dass Einzelbasenempfindlichkeit erreicht wurde – eine Voraussetzung für die Sequenzierung mit TERS.

Bei einer detaillierteren Betrachtung der Spektren des RNA-Stranges (Abbildung 3B) zeigen sich geringe Veränderungen der Bandenintensitäten und -positionen. Intensitätsänderungen, die auf unterschiedliche RNA-Konzentrationen zurückzuführen sind, können ausgeschlossen werden; das AFM-Bild gibt keine Hinweise auf weitere RNA-Stränge oder andere Spuren von Molekülen, die Einfluss auf die Raman-Spektren nehmen. Eine bessere Erklärung für die Intensitätsänderungen ist die Abhängigkeit der Verstärkung von kleinen Abstandsänderungen zwischen der Spitze und der Probe.^[18–20] Da die Probe in diesem Experiment recht klein ist, können Positionsverschiebungen der Spitze auch unterhalb eines Nanometers Intensitätsänderungen hervorrufen. In unserem Fall weist der RNA-Strang eine definierte Richtung auf, aber spezifische Krümmungen in der Orientierung benachbarter Basen können Änderungen der Intensitäten und der Intensitätsverhältnisse deutlicher Banden hervorrufen.

Solange die Wechselwirkungen zwischen benachbarten Basen nur wenig variieren, können Bandenverschiebungen vernachlässigt werden, und die Bandenpositionen sollten für alle Cytosingruppen gleich sein. Abbildung 3 zeigt jedoch eine geringe Verschiebung der Raman-Banden. Die Position der TERS-Spitze in Bezug auf das Molekül bietet eine plausible qualitative Erklärung. Watanabe et al. demonstrierten, dass es eine starke Abhängigkeit zwischen der Position des Silberatoms und der Orientierung des untersuchten Moleküls gibt.^[21,22] Unter den meisten chemisch relevanten Bedingungen nehmen das Silberatom und das Analytmolekül selbstständig die energetisch günstigste Position ein. Die RNA jedoch ist, bedingt durch die eingeschränkte Bewegungsfreiheit, auf dem Substrat fixiert, und die silberbeschichtete TERS-Spitze wird in einer bestimmten Position gehalten, die das gesamte System in eine spezifische Anordnung zwingt. Dies bewirkt, dass sich die Banden von den aus Messungen in Lösungen oder von Einzelmolekülen her bekannten Positionen verschieben.

Weitere Unterschiede zwischen Standard-Raman- und nahfeldoptischen Raman-Experimenten wie TERS sind die Änderung der Polarisationsrichtung und die Feldverteilung. Längsgerichtete Felder spielen z. B. im Nahfeld eine wichtige Rolle,^[23] daher können neue Auswahlregeln auftreten. Der gleiche Effekt zeigt sich bei starken Feldgradienten an Metalloberflächen, wie Ayars et al. nachwiesen.^[24] Alle diese Effekte können die Variationen in den Spektren erklären. Wichtig ist, dass sich die Spektren eindeutig den aus der Literatur bekannten Raman-Banden des Cytosins zuordnen lassen.^[25,26] Daher sollte eine Unterscheidung von anderen Komponenten einfach und das Sequenzieren natürlicher RNA-Stänge möglich sein.

Anzumerken ist, dass für diesen Ansatz keine laterale Auflösung einzelner Basen notwendig ist. Die Bewertung der Daten ist einfacher, wenn nur wenige Basen zum Signal beitragen, dabei ist es aber ausreichend, wenn Einzelbasenempfindlichkeit in einem einzigen Spektrum erreicht werden

kann. Bestehen die gemessenen Daten aus den Spektren einiger benachbarter Nucleobasen, kann die Sequenz abgeleitet werden, wenn die Spitze lateral in Intervallen von jeweils einem Base-Base-Abstand bewegt wird (Abbildung 4).

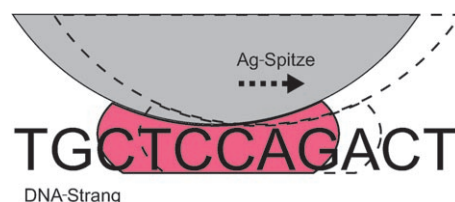


Abbildung 4. Sequenzierung einer Nucleotidsequenz mit TERS. Die Information über die Sequenz wird durch seitliches Verschieben der Spitze von Base zu Base erhalten.

Spektrale Änderungen von einer Position zur Nächsten können dann Veränderungen in der Sequenz zugeordnet werden. Wir erachten TERS als ein wichtiges Hilfsmittel zur direkten Sequenzierung kettenförmiger Biomoleküle, das hohe Empfindlichkeit, hohen Kontrast und hohe laterale Auflösung bietet. Weiterführende Experimente an anderen Biomolekülen wie etwa Peptiden werden folgen.

Experimentelles

Ein RNA-Einzelstrang aus einem Cytosin-Homopolymer mit einer Länge zwischen 290 und 434 Basen (GE Healthcare Europe) wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die RNA wurde in einem organischen Puffer gelöst, um einen physiologischen pH-Wert zu erreichen. 20 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure) und 20 mM MgCl_2 (beides Sigma-Aldrich) wurden eingesetzt, um den Einzelstrang mit der Phosphatseite auf Glimmer (BAL-TEC) zu fixieren. Die Konzentration von Poly(cytosin) betrug 10^{-5} M. 1 μL RNA-Lösung wurde auf die Glimmeroberfläche aufgebracht und unter einem ständigen Argonstrom getrocknet. Vor dem TERS-Experiment wurde überschüssige HEPES- MgCl_2 -Lösung mit bidestilliertem Wasser entfernt und die Probe nochmals getrocknet.^[27]

Der allgemeine TERS-Aufbau wurde schon beschrieben.^[9,14] Für das TERS-Experiment wurde eine Non-Contact-Spitze aus Silicium (NSG10, NT-MDT) mit 20 nm Silber (99.99 % rein, Balzers Materials) durch thermisches Bedampfen (BAL-TEC MDS 020) mit einer Geschwindigkeit von 0.06 nm s^{-1} beschichtet. Die Spitzen wurden unter Argon gelagert und innerhalb von zwei Tagen eingesetzt. Für alle TERS-Messungen lag die Laserleistung bei 1 mW auf der Probe (530.9 nm, Kryptonionen-Laser). Die Aufnahmezeit betrug 15 s. Bei allen gezeigten Spektren handelt es sich um Rohdaten ohne Basislinienkorrektur oder Glättung. Das Signal/Rausch-Verhältnis der TERS-Spektren wurde über die Division der Intensität der höchsten Raman-Bande durch die doppelte Standardabweichung des Rauschens in einem signalfreien Bereich des Spektrums berechnet.

Eingegangen am 3. September 2007,
veränderte Fassung am 18. Oktober 2007
Online veröffentlicht am 10. Januar 2008

Stichwörter: Oberflächenanalyse · Raman-Spektroskopie · Rastersondenverfahren · RNA · Sequenzanalyse

- [1] J. Prober, G. Trainor, R. Dam, F. Hobbs, C. Robertson, R. Zargursky, A. Cocuzza, M. Jensen, K. Baumeister, *Science* **1987**, 238, 336.
- [2] H. Steen, M. Mann, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5, 699.
- [3] N. J. Dovichi, *Electrophoresis* **1997**, 18, 2393.
- [4] J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, D. W. Deamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 13770.
- [5] J. Lagerqvist, M. Zwolak, M. Di Ventra, *Nano Lett.* **2006**, 6, 779.
- [6] Y. Astier, O. Braha, H. Bayley, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1705.
- [7] M. Grubb, H. Wackerbarth, J. Ulstrup, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 7734.
- [8] T. Ohshiro, Y. Umezawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 10.
- [9] R. M. Stöckle, Y. D. Suh, V. Deckert, R. Zenobi, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, 318, 131.
- [10] M. S. Anderson, *Appl. Phys. Lett.* **2000**, 76, 3130.
- [11] B. Knoll, F. Keilmann, *Nature* **1999**, 399, 134.
- [12] B. Ren, G. Picardi, B. Pettinger, R. Schuster, G. Ertl, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 141; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 139.
- [13] A. Hartschuh, E. J. Sánchez, X. S. Xie, L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 90, 095503.
- [14] A. Rasmussen, V. Deckert, *J. Raman Spectrosc.* **2006**, 37, 311.
- [15] K. F. Domke, D. Zhang, B. Pettinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6708.
- [16] C. Budich, U. Neugebauer, J. Popp, V. Deckert, *J. Microsc.*, im Druck.
- [17] U. Neugebauer, P. Rösch, M. Schmitt, J. Popp, C. Julien, A. Rasmussen, C. Budich, V. Deckert, *ChemPhysChem* **2006**, 7, 1395.
- [18] A. Downes, D. Salter, A. Elfick, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 6692.
- [19] D. Richards, R. G. Milner, F. Huang, F. Festy, *J. Raman Spectrosc.* **2003**, 34, 663.
- [20] J. Renger, S. Grafström, L. M. Eng, V. Deckert, *J. Opt. Soc. Am. A* **2004**, 21.
- [21] H. Watanabe, Y. Ishida, N. Hayazawa, Y. Inouye, S. Kawata, *Phys. Rev. B* **2004**, 69, 155418.
- [22] H. Watanabe, N. Hayazawa, Y. Inouye, S. Kawata, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 5012.
- [23] N. Hayazawa, Y. Saito, S. Kawata, *Appl. Phys. Lett.* **2004**, 85, 6239.
- [24] E. J. Ayars, H. D. Hallen, C. L. Jahncke, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, 85, 4180.
- [25] J. S. Kwiatkowski, J. Leszczynski, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 941.
- [26] J. Florian, V. Baumruk, J. Leszczynski, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 5578.
- [27] H. G. Hansma, I. Revenko, K. Kim, D. E. Laney, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 713.