Nanogaatjes voor DNA-analyse

Gaatjes van enkele nanometers doorsnee in een dun membraan kunnen gebruikt worden om DNA te screenen op het niveau van enkele moleculen. Met een elektrisch veld worden enkele DNA-moleculen van kop tot staart door een enkel nanogaatje getrokken. Uit de verandering van de ionenstroom die door het gaatje loopt, kan essentiële informatie verkregen worden over het passerende molecuul. We geven een kort overzicht van verschillende toepassingen, waarbij zal blijken dat deze simpele nanogaatjes verrassend veelzijdig zijn. Aan de ene kant leveren ze een nieuwe, krachtige technologie om DNA uit te lezen. Aan de andere kant verschaffen ze nieuwe inzichten in de biologie. En dat is zeer relevant, want ons lichaam zit vol met natuurlijke nanogaatjes. Stefan Kowalczyk en Cees Dekker

Een nanogaatje, oftewel een gaatje op de nanometer schaal, is een nieuw type sensor waarmee enkele (bio)moleculen, zoals DNA, kunnen worden gedetecteerd. Een biologische cel zit vol met verschillende types poriën die gevormd worden door eiwitten en die het transport verzorgen van ionen, eiwitten en polynucleotiden zoals DNA. Mede hierdoor geïnspireerd zijn recent kunstmatige nanogaatjes gemaakt door met een gefocusseerde elektronenbundel een gaatje te branden in een vaste-stofmembraan. Als je het membraan dan in een zoutoplossing plaatst en er een elektrisch veld over aanlegt, zal er een stroom van ionen door het gat gaan lopen. Vervolgens kun je moleculen zoals DNA toevoegen. Omdat DNA negatief geladen is, wordt het onder invloed van het elektrisch veld door het nanogaatje gedreven. Op het moment dat het molecuul het gat binnentreedt wordt de stroom gedeeltelijk geblokkeerd. Het blijkt dat we zo verrassend veel kunnen leren over de structuur van de moleculen [1].

Deze detectiemethode waarbij je een object detecteert als het een vernauwing passeert is niet nieuw. Na enige strubbelingen (“*You can’t patent a hole!*”) kreeg Wallace Coulter al in 1953 een patent op zijn uitvinding voor het geautomatiseerd tellen en bepalen van de grootte van deeltjes die bewegen door een vernauwing in een vloeistofkanaal. De werking is simpel: met een vacuümpomp zuig je de te bestuderen oplossing door een buisje met aan het uiteinde een klein gat (doorsnee van enkele micrometers), waarover een spanning staat. Terwijl de oplossing door het

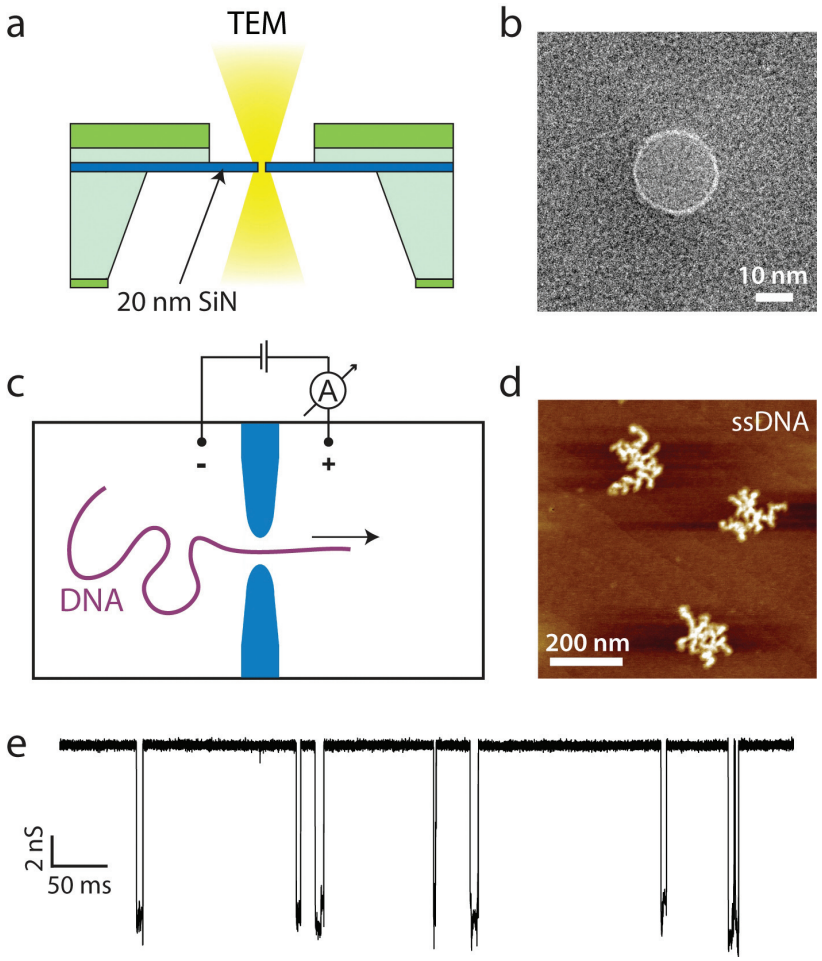
Stefan Kowalczyk (1983) studeerde wis- en natuurkunde aan de Universiteit van Amsterdam. In 2006 studeerde hij af in de richting mathematische fysica en vertrok vervolgens voor een jaar naar de State University of New York in Stony Brook waar hij zich meer in de vaste-stoffysica en biologie verdiepte. Sinds 2007 doet hij een promotieonderzoek bij de afdeling Bionanoscience aan de TU Delft onder begeleiding van Cees Dekker.

S.W.Kowalczyk@tudelft.nl

Cees Dekker (1959) studeerde experimentele natuurkunde in Utrecht waar hij in 1988 ook promoveerde op een onderwerp in de vaste-stoffysica. In de jaren 90 verwierf zijn groep aan de TU Delft wereldfaam met onderzoek naar de elektrische eigenschappen van koolstof nanobuisjes. In 1999 werd hij hoogleraar moleculaire biofysica bij de TU Delft en verlegde hij zijn vakgebied naar de biofysica. Vorig jaar zette hij daar een geheel nieuwe afdeling Bionanoscience op. Dekker is nu tevens directeur van het Kavli Instituut voor Nanoscience Delft.

gat wordt geduwd wordt de stroom incidenteel geblokkeerd als er een deeltje (een cel bijvoorbeeld) voorbij komt. De grootte en de frequentie van de interrupties kan worden gerelateerd aan het type en aantal deeltjes dat passeert. Tegenwoordig worden machines gebaseerd op dit principe in praktisch elk ziekenhuislaboratorium gebruikt om bloedcellen te tellen.

Door de opkomst van de nanotechnologie is het nu mogelijk om veel kleinere gaatjes te fabriceren dan die in de tijd van Coulter: gaatjes die nog 1000 keer zo klein zijn en die een doorsnede hebben van slechts enkele nanometers [2]. Hiermee kunnen we zelfs enkele moleculen detecteren! Hoe maken we deze gaatjes? Met standaardtechnieken uit de silicium microfabricage kan een dun (~20 nm) vrijstaand membraan van siliciumnitride (SiN) worden gemaakt. Door vervolgens dit membraan op één punt te beschieten met een hoge-intensiteit elektronenbundel in een transmissie-elektronenmicroscoop (TEM) kan een gaatje worden geboord (figuur 1a). Als de gewenste grootte is bereikt, wordt de TEM bundel uitgeschakeld en kun je direct in de TEM een plaatje maken van het resultaat. Figuur 1b toont een gat van 20 nm. Nanogaatjes met een diameter van typisch 1 - 100 nm in diameter kunnen worden gebruikt voor een verscheidenheid aan metingen.

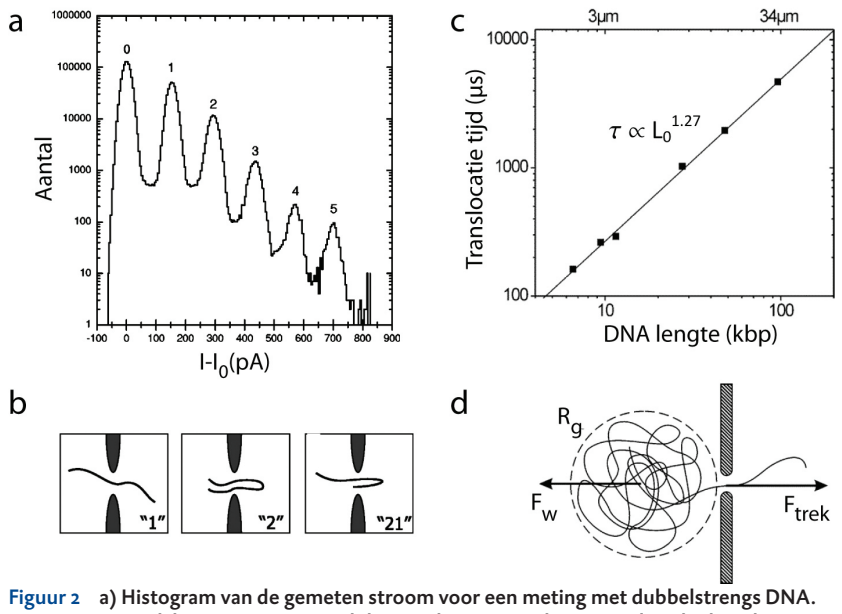


Figuur 1 a) Schets van de fabricage van een nanogaatje. In een dun (~20 nm) vrijstaand membraan schiet men lokaal een gat met een elektronenbundel. b) TEM-opname van een nanogaatje met een doorsnede van 20-nm in een SiN-membraan. c) Negatief geladen DNA-moleculen worden vanuit het negatief geschakelde reservoir elektroforetisch door het nanogaatje getrokken. Dit resulteert in een tijdelijke afname van de stroom. d) AFM-opname van opgekruld enkelstrengs DNA. e) De gemeten geleiding door een nanogaatje voor een oplossing met DNA. Elke piek in de geleiding correspondeert met een enkel DNA-molecuul dat door het nanogaatje wordt getrokken. Naar referentie [3].

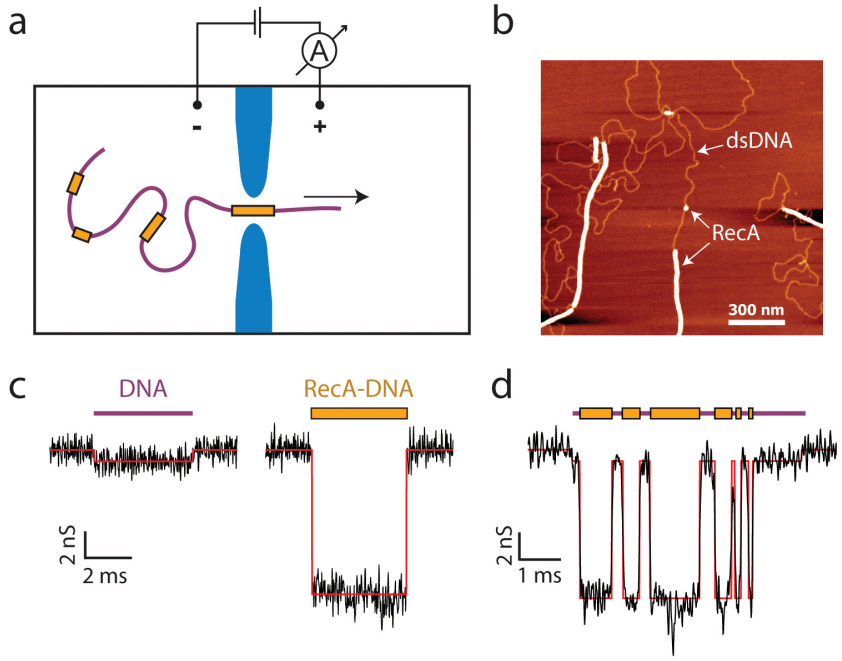
Enkele moleculen detecteren

Na de fabricage plaatsen we de nanogaatjes vervolgens als enige connectie tussen twee reservoirs die gevuld zijn met een waterige oplossing met ionen (een elektrolyt; meestal gebruikt men KCl met een concentratie van 1 mol/liter). Elektrodes (Ag/AgCl) worden aan weerszijden van het nanogaatje geplaatst. Zodra er een spanningsverschil wordt aangelegd (typisch 0,1 V), gaat er een ionenstroom door het gaatje stromen (doorgaans enkele nA). De gemeten lineaire stroom-spanningcurves (I-V-curves) komen goed overeen met de geleiding van de zoutoplossing, rekening houdend met de afmetingen en geometrie van het gat.

De volgende stap is het toevoegen van het te bestuderen molecuul aan één van de reservoirs. Dit kunnen zowel biologische (DNA, RNA, eiwit) als niet-biologische (gefabriceerde nanodeeltjes, colloïden, koolstof nanobuisjes, et cetera) objecten zijn, het principe is heel breed toepasbaar. Negatief geladen DNA-moleculen worden vanuit het negatief geschakelde reservoir onder invloed van het elektrisch veld door het nanogaatje getrokken (figuur 1c). Dit zogenaamde translocatieproces resulteert in een tijdelijke, gedeeltelijke blokkade van de ionenstroom. Elk piekje in de experimentele data (een *event*) wordt veroorzaakt door een enkel DNA-molecuul dat het gaatje passeert. Door in te zoomen op de afzonderlijke pieken, kunnen we, afgaande op de tijdsduur en amplitude van de pieken, iets zeggen over het DNA. Zo kan bijvoorbeeld DNA van verschillende lengtes worden geïdentificeerd uit verschillende translocatie-tijden. Dit lijkt op de traditionele DNA-lengtedetectie met behulp van gel-elektroforese (een in de biologie veel gebruikte scheidingstechniek die moleculen onder invloed van een elektrisch veld laat bewegen door een gel, waarbij kleine moleculen sneller voortbewegen dan grote moleculen). In het nanogaatje kan hezelfde gerealiseerd worden op het niveau van enkele moleculen, waarbij er dus maar een minimale hoeveelheid materiaal nodig is. Figuur 1d laat een opname zien van opgekruld enkelstrengs DNA, gemaakt met een tastmicroscoop (AFM). Als dit DNA door een nanogaatje wordt getrokken, worden er pieken in de gemeten geleiding geobserveerd (figuur 1e). We hebben laten zien [3] dat het enkelstrengs DNA, dat plaatselijk dubbelstrengs DNA vormt door hybridisatie (het samenvoegen van twee complementaire DNA-strengen tot een enkele dubbele helix), kan worden ontrafeld als een hoge spanning wordt aangebracht over het nanogaatje, een spanning die



Figuur 2 a) Histogram van de gemeten stroom voor een meting met dubbelstrengs DNA. De piek bij een stroomverschil van nul correspondeert met de geleiding door een open gat (zonder DNA erin): de eerste piek met één stuk DNA in het gaatje, de tweede piek met een dubbelgevouwen molecuul, zoals weergegeven in b). c) De translocatie tijd τ (de tijd dat een molecuul onderweg is door het gaatje) schaalt niet lineair met de lengte van het molecuul Lo, maar via $\tau \propto L_o^{1,27}$. d) Schets van de elektrostatische en wrijvingskrachten die op het DNA werken tijdens het translocatieproces. Naar referentie [4, 5].



Figuur 3 a) Een DNA-molecuul met eiwitten die gebonden zijn op bepaalde locaties langs het DNA wordt door een nanogaatje getrokken. b) AFM-opname van dubbelstrengs DNA-moleculen die gedeeltelijk bedekt zijn met RecA-eiwit (de witte stukken). Het molecuul is dikker op de plekken waar het eiwit bindt. c) en d) De gemeten geleiding als functie van de tijd voor translocatie van verschillende moleculen. Het linker event in c) bereikt slechts het lage DNA-niveau, terwijl het rechter event veel dieper is en correspondeert met een volledig met eiwit bedekt DNA-molecuul. Ook meer ingewikkelde events kunnen worden gedetecteerd d), waarmee de locaties van eiwitten langs DNA kunnen worden bepaald. Naar referentie [6].

correspondeert met de kracht die nodig is om de dubbele helix te ontrafelen ($F = qE$, corresponderend met een kracht van een tiental pN).

Uit metingen blijkt dat DNA niet alleen van kop naar staart, maar ook gevouwen door een nanogaatje kan worden getransloceerd [4]. Figuur 2 laat een histogram zien van de gemeten stroom voor een meting met dubbelstrengs DNA. De piek bij een stroomverschil van nul correspondeert met een open gat (zonder DNA erin), de eerste piek met één stukje DNA in het gaatje, de tweede piek met een dubbelgevouwen molecuul (zoals weergegeven in figuur 2b) in het gat, et cetera. Een andere vondst is dat de translocatietijd τ (de tijd dat een molecuul onderweg is door het gaatje) verrassend genoeg niet simpelweg lineair schaalt met de lengte Lo van het molecuul, maar een machtswetafhankelijkheid laat zien: $\tau \propto L_o^{1,27}$, zie figuur 2c. Dit kan met een simpel schalingsmodel worden begrepen: aan de ene kant ondervindt het DNA een constante drijvende elektrostatische kracht van het elektrische veld ($F_{trek} = qE$), terwijl aan de andere kant de random kluwen van het in elkaar gekrulde lange DNA-molecuul door de oplossing moet worden getrokken hetgeen geassocieerd is met een hydrodynamische wrijvingskracht F_w (zie figuur 2d). Aangezien dit de dominante krachten zijn in het systeem moet gelden $F_w = -F_{trek}$. Deze krachtsbalans leidt via enkele stappen tot bovenstaande schaalwet [5].

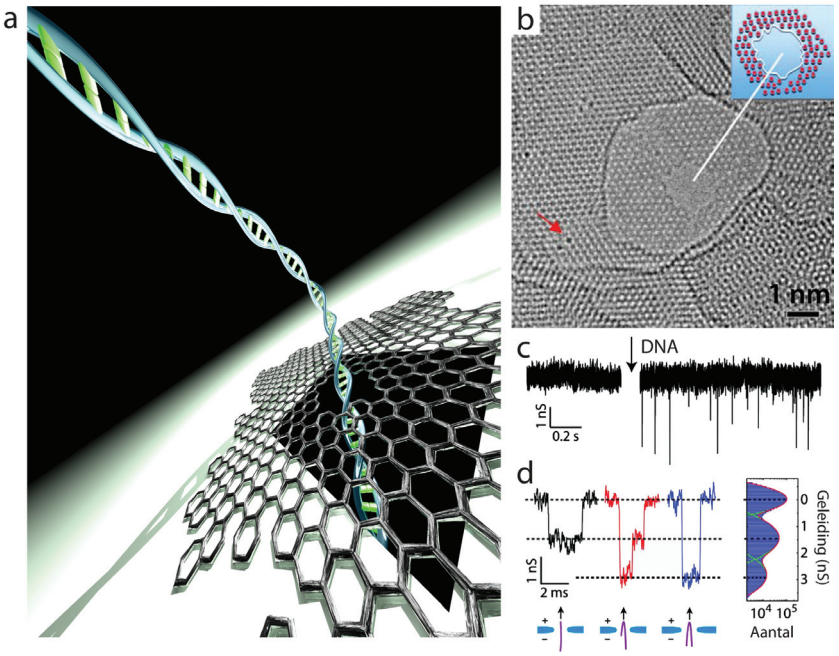
Eiwitten op DNA uitlezen

Er is veel meer mogelijk dan alleen het detecteren van kaal DNA. Recent is het gelukt [6] om de locaties van eiwitten op DNA te bepalen met een nanogaatje (figuur 3a). Detectie van de lokale positie van eiwitten die gebonden zijn aan het DNA is behalve voor wetenschappelijke inzichten, ook belangrijk voor medische toepassingen. De aanwezigheid en activiteit van genen kan bijvoorbeeld worden vastgesteld aan de hand van de aanwezigheid van bepaalde eiwitten. In de eerste nanogatstudie van eiwitten op DNA hebben we het recombinatie-eiwit A (RecA) – belangrijk bij de reparatie van DNA-breuken – gebruikt om eiwitfilamenten te vormen op dubbelstrengs DNA. Figuur 3b laat een AFM-opname zien van DNA-moleculen die gedeeltelijk bedekt zijn met RecA. Het molecuul

is dikker op de plekken waar het eiwit bindt (de witte stukken).
Als zo'n DNA-eiwitsliert door een nanogaatje wordt getrokken, wordt er een extra hoge weerstand, oftewel een kleinere stroom, gemeten op de momenten dat een eiwit zich in het gat bevindt. Figuren 3c en 3d laten de gemeten geleiding zien voor verschillende verplaatsingen, corresponderend met verschillende moleculen. Het valt op dat er twee blokkadeniveaus worden gemeten: een kleine blokkade (met een geleidingsverlaging van ongeveer 1 nS) voor DNA, en een grote (ongeveer 10 nS) voor DNA met daarop RecA. Het linker event in figuur 3c bereikt slechts het lage niveau. Dit geeft aan dat er geen eiwitten op dit DNA-molecuul zitten. Het rechter event daarentegen is veel dieper en correspondeert met een volledig met eiwit bedekt DNA-molecuul. De ingewikkelde events zoals te zien in figuur 3d zijn het meest interessant, want hier meten we zowel de eiwitfilamenten als de plekken met kaal DNA langs het molecuul. Hiermee hebben we aangetoond dat we met een nanogaatje kunnen achterhalen òf en, zo ja, waar er een eiwit op het DNA zit. De resolutie van de techniek is heel goed: de eerste metingen lieten al een resolutie zien van vijf eiwitten en recent zijn we bezig de techniek te optimaliseren naar een resolutie van slechts één enkel eiwit.

Nanogaatjes in grafeen voor superresolutie metingen

Recent is het ons en twee andere onderzoeksgroepen gelukt om nanogaatjes te maken in het unieke materiaal grafeen en eerste metingen te doen aan DNA-transport door zulke grafeen nanogaatjes [7]. Figuur 4a toont een impressie van zulk DNA transport door een nanogaatje in grafeen. Een belangrijk doel bij dit onderzoeksgebied is het realiseren van *sequencing*: het base voor base uitlezen van de genetische informatie van een enkel DNA-molecuul. Voor zulke superresolutie metingen zijn grafeen nanogaatjes ideaal. Grafeen bezit de bijzondere eigenschap dat er lagen van slechts één atoom dik van kunnen worden gemaakt. Nanogaatjes in SiN hebben het nadeel dat het siliciumnitride een bepaalde dikte (ongeveer 20 nm) heeft, waardoor het stroomsignaal wordt uitgemiddeld over een

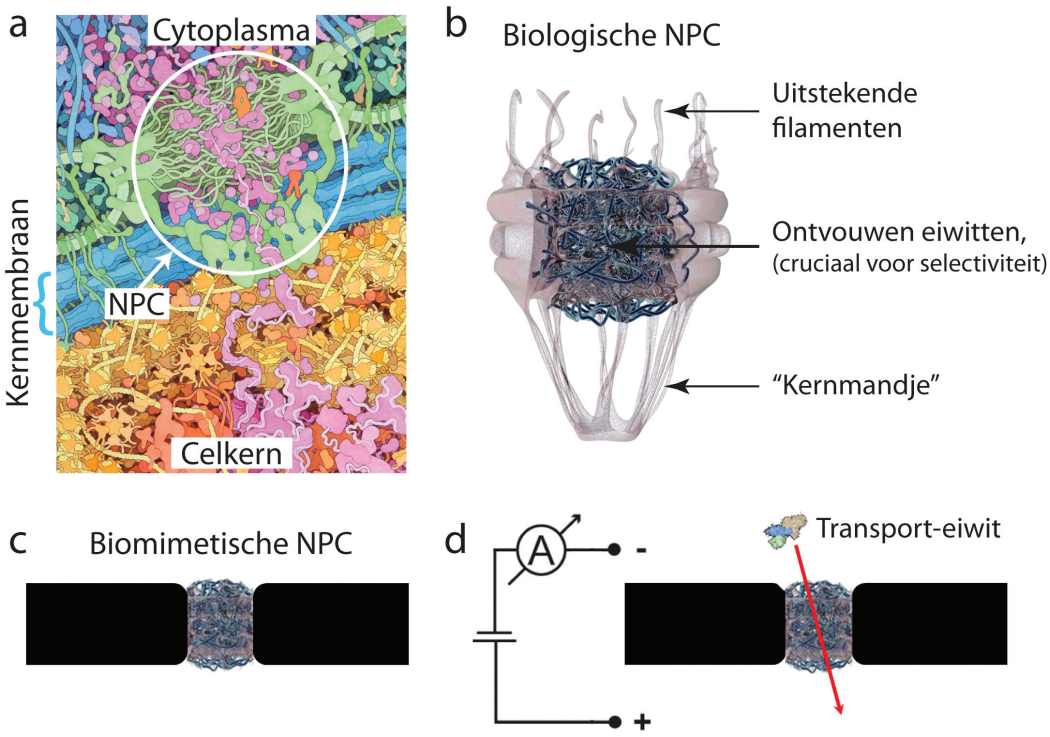


Figuur 4 a) Artistieke impressie van DNA-transport door een nanogaatje in grafeen (credits: TU Delft/Tremani). b) TEM-opname van een klein (1,5 nm) nanogat in grafeen [8]. c) Metingen van DNA-translocatie door een grafeen nanogaatje. Naar referentie [7].

groot aantal basen die, op een onderling afstand van ongeveer 0,5 nm, tegelijk in het gaatje zitten. Grafeen kent dit nadeel niet. Bovendien is grafeen, in tegenstelling tot SiN, een uitstekende geleider in het vlak, hetgeen extra uitleesmogelijkheden biedt zoals tunneling over een spleet waar het DNA doorheen vloeit [9].
Áls sequencing mogelijk wordt met nanogaatjes – zover is het nog niet, maar de potentie is er – dan biedt het een aantal belangrijke voordelen. Zo zijn er geen fluorescente labels nodig en is een zeer lange DNA-uitleeslengte (megabaseparen) mogelijk en hoeft het DNA niet – zoals wel het geval is bij de nu gebruikelijke sequencing methodes – in heel korte stukken (van ongeveer 100 baseparen) te worden geknipt om later met een computer te worden gereconstrueerd, wat soms zeer complex kan zijn en tot fouten leidt. Bovendien zijn zowel de nanogaatjes zelf als de uitleesapparatuur relatief goedkoop. Ook kunnen er individuele moleculen worden uitgelezen en zou het aflezen met behulp van deze techniek veel sneller kunnen gaan dan met de snelste huidige methodes.

Krachten op DNA meten

Met een optisch pincet kan men zelfs krachten op een DNA-molecuul in een nanogaatje uitoefenen en meten. Hierbij wordt het DNA aan één uiteinde bevestigd aan een microscopisch klein (~1 µm) bolletje. Het bolletje wordt vastgehouden in het brandpunt van een laserbundel, terwijl het DNA het nanogaatje in wordt getrokken door een aangelegd elektrisch veld. Uit de verandering in de positie van het bolletje op het moment dat het DNA wordt gevangen, kan de trekkracht op een enkel DNA-molecuul in het elektrische veld worden bepaald [10]. Deze kracht is 0,24 ± 0,02 pN/mV, onafhankelijk van de zoutconcentratie in 0,02 tot 1 mol/liter KCl. Dit komt overeen met 0,5 elektronen per DNA-basepaar, hetgeen suggereert dat de lading van het DNA ($2e^-$ per basepaar) sterk wordt afgeschermd in een oplossing. Naast de DNA-lading blijkt ook de hydrodynamica van het systeem relevant voor het begrip van de kracht die een DNA-molecuul ondervindt in een elektrisch veld [11].
Deze opstelling kan in de toekomst worden gebruikt voor andere interessante metingen. Zo zou de secundaire structuur van RNA kunnen worden bepaald door sequentieel haarspeldachtige RNA-moleculen uit elkaar te trekken. Een betere kennis van deze structuren is van belang voor de biologie. Een andere veelbelovende onderzoeksrichting is het bepalen van de sterkte van interacties tussen DNA en eiwitten. Dit zou als volgt kunnen



Figuur 4 (a) Artistieke impressie van een *nuclear pore complex* (NPC) in de cel [12]. b) Globale structuur van het NPC [13]: hydrofobe interacties en de uitgestrektheid van de eiwitketens in het centrum van het NPC spelen een belangrijke rol in de selectiviteit van het NPC. c) Schets van ons biomimetische NPC. Eiwitten uit het biologische NPC worden vastgemaakt aan een kunstmatig nanogaatje. d) Transport van enkele receptoreiwitten door het biomimetische NPC kan met hoge resolutie worden gemeten. Naar referentie [14].

gaan: DNA wordt door het nanogaatje getrokken, vervolgens wordt een eiwit gebonden en wordt de DNA-streng weer teruggetrokken. Als het gaatje klein genoeg wordt gemaakt, zal het eiwit er niet doorheen passen en moet het, bij een bepaalde – te meten – kracht loslaten. Zo kan de opstelling gebruikt gaan worden voor het bestuderen van de krachten die spelen bij DNA dat in de celkern opgerold zit om speciale eiwitten, genaamd histonen.

Biomimetische nanogaatjes

De nanogaatjes blijken niet alleen handig voor detectie van DNA. Omdat eiwitstructuren met nanogaatjes bij een groot aantal processen in de cel een sleutelrol spelen, kunnen we met onze artificiële nanogaatjes pogen daar iets over te leren. Eén van de meest uitdagende biologische nanogaatjes is het *nuclear pore complex* (NPC), een groot complex van eiwitten in het kernmembraan, zie figuur 5a [12]. Deze gaatjes, opgebouwd uit 30 verschillende types eiwitten en met een diameter van zo'n 40 nm, vormen de enige toegangsweg tot de celkern. Het bijzondere aan deze met ongevouwen eiwitten gevulde gaatjes is dat ze *selectief* bepaalde eiwitten en RNA-moleculen laten passeren of juist tegenhouden. Hoe doen ze dat? Hydrofobe interacties en de uitgestrektheid van de eiwitketens in het centrum van het NPC (figuur 5b [13]) lijken een rol te spelen, maar een goed begrip van het microscopische mechanisme van het transport ontbreekt vooralsnog.

In de levende cel is het erg lastig om hoge-resolutiemetingen te doen aan het transport van een enkel molecuul door zo'n NPC. Wij zijn gestart met een project om biomimetische NPCs te realiseren (figuur 5c,d), waarbij we natuurlijke NPCs proberen na te bootsen. Het is mogelijk gebleken om de belangrijkste eiwitten van het NPC, namelijk juist diegenen die verantwoordelijk zijn voor de selectiviteit, te bevestigen in onze kunstmatige nanogaatjes en om selectief transport van eiwitten door dit kunstmatige NPC te meten [14]. We kunnen hiermee het systeem onderdeel voor onderdeel (*bottom-up*) bestuderen en kijken wat elk afzonderlijk onderdeel doet. Met deze biomimetische aanpak hopen we het fundamentele mechanisme van transport door het NPC te kunnen ontrafelen.

Gegeven de in dit artikel besproken veelzijdigheid aan toepassingen van nanogaatjes, voorspellen we dat nanogaatjes nog lange tijd een interessante bron zullen zijn van nieuwe vondsten in wetenschap en technologie.

Referenties

1 C. Dekker, *Nature Nanotechnology* **2** (2007) 209.
2. A.J. Storm *et al.*, *Nature Materials* **2** (2003) 537.
3. S.W. Kowalczyk, *et al.*, *Nano Letters* **10** (2010) 1414.
4. A.J. Storm *et al.*, *Physical Review* **E 71** (2005) 051903.
5. A.J. Storm *et al.*, *Nano Letters* **5** (2005) 1193.
6. S.W. Kowalczyk, *et al.*, *Nano Letters* **10** (2010) 324.
7. G.F. Schneider *et al.*, *Nano Letters* **10** (2010) 3163; C.A. Merchant, *et al.*, *Nano Letters* **10** (2010) 2915; S. Garaj *et al.*, *Nature* **467** (2010) 190.
8. B. Song *et al.*, http://arxiv.org/abs/1102.0971 (2011).
9. H.W.Ch. Postma, *Nano Letters* **10** (2010) 420; S. Huang *et al.*, *Nature Nanotechnology* **5** (2010) 868.
10. U.F. Keyser *et al.*, *Nature Physics* **2** (2006) 473.
11. S. van Dorp *et al.*, *Nature Physics* **5** (2009) 351.
12. D.S. Goodsell, *The Machinery of Life*.
13. S.S. Patel, http://sites.google.com/site/sspatel/nuclearporecomplex2
14. S.W. Kowalczyk *et al.*, *Nature Nanotechnology*, *under review*.