

ANALYSE KOMPLEXER BIOLOGISCHER PROBEN MITTELS OBERFLÄCHENVERSTÄRKTER RAMAN-SPEKTROSKOPIE (SERS)

Janine Lange, Hamza Messaoudi, Susanta Kumar Das, Rüdiger Grunwald, Sigurd Schrader, Marcus Frohme, Friedhelm Heinrich

Zusammenfassung

Diese Studie beschäftigt sich mit dem Nachweis biologischer Proben mit Hilfe der Raman-Mikroskopie. Um ausreichende Signalintensitäten auch bei niedrigen Konzentrationen zu erhalten, wurde insbesondere der Effekt der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (SERS) näher untersucht. Als Proben dienten DNA aus Hering-Sperma und das Protein Albumin. Zur Verstärkung des Raman-Spektrums wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Zum Einen wurden in einem chemischen Reduktionsprozess Nanosilberpartikel hergestellt und den biologischen Proben zugemischt. Zum Anderen wurden mit Hilfe laserangeregter periodischer Oberflächenstrukturierung (LIPSS) erzeugte nanostrukturierte Silberoberflächen als Substrate für die Proben verwendet. Diese Methode wurde bislang nicht für die SERS-Analyse biologischer Proben eingesetzt. Erste hier präsentierte Messungen zeigen, dass beide Verfahren signifikante SERS-Verstärkungen liefern und potentiell leistungsstarke Methoden für die zerstörungsfreie Analyse biologischer Proben darstellen.

Abstract

This study deals with the detection of biological samples by means of Raman-microscopy. In particular the surface enhanced Raman scattering (SERS)-effect is analyzed by using herring sperm DNA and the albumin protein. Two different SERS-methods were applied. First silver nano particles were produced in a chemical reduction process and admixed to the biological samples. Second, as a new method for SERS-analysis of biological samples, nanostructured silver substrates were employed, generated by laser induced periodic surface structuring (LIPSS). First measurements, presented here, demonstrate that both approaches represent powerful tools for the non-destructive analysis of biological samples.

I. EINFÜHRUNG

Moleküle können unter anderem mittels Raman-Spektroskopie nachgewiesen werden - eine Methode, die sich seit ihrer Entdeckung im Jahre 1928 zu einem wichtigen Analyseinstrument in verschiedensten Bereichen entwickelt hat (Sur, 2010). Basis der Ramanmessung ist die inelastische Streuung von Licht (typischerweise Laserlicht) an Molekülen, wobei entweder Schwingungsmoden angeregt bzw. Energie von den schwingenden Molekülen auf die Laserphotonen übertragen werden. Die Energie der gestreuten Photonen wird spektroskopisch vermessen, wobei jede Molekülschwingung ihren individuellen molekularen Fingerabdruck im Spektrum des gestreuten Lichtes hinterlässt und so eine Identifizierung der beteiligten Moleküle erlaubt.

Die Raman-Spektroskopie findet unter anderem Anwendung in der Forensik

zur Blutuntersuchung (Boyd et al., 2011), der Pharmazie zur Medikamentenentwicklung (Huong, 1986), der Planeten- und Weltraumforschung zur Untersuchung für Leben auf dem Mars (Böttger et al., 2011) und zunehmend auch in den Biowissenschaften.

Im Unterschied zur weit verbreiteten Fluoreszenzspektroskopie, bei der fluoreszierende Marker verwendet werden, greift die Raman-Spektroskopie nicht in die Chemie der Proben ein. Sie wirft jedoch Probleme bei gering konzentrierten biologischen Proben auf, da der Raman-Prozess typischerweise nichtresonant ist und somit die Intensitäten der Raman-Linien in der Regel relativ schwach sind. Dies erfordert neben einem empfindlichen Nachweis durch gekühlte Silizium-Detektoren (CCD) weitere Maßnahmen zur Signalverstärkung.

Die SERS-Methode (surface-enhanced Raman scattering) wurde erstmalig

1974 von Fleischmann et al. eher unabhängig verwendet. Die Autoren hatten eine Intensitätssteigerung der Raman-Signale bei der Adsorption von Pyridin auf rauen Silberoberflächen beobachtet. Sie führten diesen Effekt zunächst auf die Vergrößerung der effektiven Oberflächen und damit verstärkter Moleküladsorption zurück. (Fleischmann, 1974). Später konnten D. L. Jeanmaire und R. P. Van Duyne (Jeanmaire, 1977) sowie M. Grant Albrecht und J. Alan Creighton (Albrecht, 1977) zeigen, dass der geometrische Effekt den beobachteten hohen Verstärkungsgrad allein nicht erklärt. Jeanmaire et al. postulierten einen elektromagnetischen Effekt, bei dem es durch Anregung von Plasmonenresonanzen (kollektive Elektronenschwingungen) in den Nanostrukturen der aufgerauten Oberflächen zu einer Feldverstärkung im Bereich der Oberflächen kommt, welche zu einem signifikanten Anstieg der Raman-Signale über mehrere Größenordnungen führen kann. Grant Albrecht et al.

gingen dagegen von einem Ladungstransfereffekt aus. Heute ist bekannt, dass beide Mechanismen eine Rolle spielen können, wobei der elektromagnetische Effekt immer vorhanden ist, sofern Oberflächenplasmonen angeregt werden, der Ladungstransfereffekt jedoch eine chemische Bindung der Moleküle an die Oberflächen voraussetzt. Die Trennung beider Effekte ist in der Praxis schwierig.

In den vorliegenden Experimenten kann man davon ausgehen, dass der elektromagnetische Verstärkungseffekt über Plasmonenanregung dominiert, da die Größe der Kolloide und die Strukturdimensionen der LIPSS-Substrate einen sehr starken Einfluss auf den Verstärkungsgrad hatten. Tatsächlich handelt es sich bei der Plasmonenanregung um einen relativ komplexen physikalischen Vorgang, dessen Effizienz von einer Reihe von Faktoren abhängt, wie dem verwendeten Material, der Größe und der Form der Nanostrukturen sowie der anregenden Wellenlänge. Prinzipiell können alle Materialien eingesetzt werden, die über eine ausreichende (metallähnliche) Leitfähigkeit verfügen. Hauptsächlich bisher verwendete Materialien sind Silber, Gold und Kupfer in kolloidaler Form oder als nanostrukturierte Oberflächen.

Wegen der komplexen zugrunde liegenden Mechanismen sind genaue Vorhersagen über die optimalen Strukturdimensionen und Geometrien für eine möglichst effiziente Ramanverstärkung kaum möglich. Auch die bekannten experimentellen Arbeiten liefern bislang keine eindeutigen Aussagen. Die Optimierung solcher Strukturen ist damit ein interessantes experimentelles Forschungsgebiet, dem gerade im Hinblick auf biologische und biomedizinische Anwendungen besondere Bedeutung zukommt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Potential Raman-spektroskopischer Messungen für den biologischen und biomedizinischen Bereich auszuloten, wobei als Testsubstanzen Hering-Sperma-DNA und das Protein Albumin verwendet wurden. Die SERS-Messungen wurden sowohl für kolloidales Silber als auch für peri-

odisch strukturierte Silbersubstrate durchgeführt.

Die hier vorgestellten Arbeiten entstanden in interdisziplinärer Zusammenarbeit der Arbeitsgruppen „Molekulare Biotechnologie und Funktionelle Genomik“ und „Photonik, Laser- & Plasmatechnologien“ der TH-Wildau sowie dem „Max-Born-Institut für nichtlineare Optik und Kurzzeitspektroskopie (MBI)“.

Das kolloidale Silber wurde an der TH-Wildau hergestellt. Die nanostrukturierten Silberoberflächen wurden am MBI mit Hilfe des LIPSS-Verfahrens (laser-induced-periodic surface structuring) erzeugt (Das, 2010). Durch Beschuss der Laseroberfläche mit einem Kurzpuls-Laser mit Pulslängen im Femtosekundenbereich entstehen dabei periodisch strukturierte Oberflächen, wobei die Struktureigenschaften, wie Tiefe und Periodizität, der Strukturen durch verschiedene Laserparameter steuerbar sind. In der vorliegenden Arbeit kamen Strukturen mit Perioden von etwa 250 nm und 530 nm zum Einsatz. Der hier verfolgte Ansatz, solche Proben für SERS-Messungen an biologischen und biomedizinischen Proben zu verwenden, ist neu.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1 HERSTELLUNG VON SILBERKOLLOIDEN

Für die Messung der Proben mit kolloidalem Silber wurden diese unter Ci-

tratreduktion nach der Anleitung von Guicheteau et al. hergestellt (Guicheteau et al., 2006). Dabei wurde das Silber zunächst unter Zugabe von Citrat reduziert. Dazu wurden zwei Ansätze mit jeweils 15 mg und 30 mg Silbernitrat (Merck) in ein 250 ml Becherglas eingewogen, mit Alufolie abgedeckt und unter ständigem Rühren auf ca. 90 °C erhitzt. Dann wurden 2,5 ml 1%ige Natriumcitratlösung (Alfa Aesar) hinzugegeben und für 25 min bei ca. 90 °C gekocht. Nach Abkühlung der Lösung auf Raumtemperatur wurde diese in einen 50 ml Schraubdeckelröhrchen überführt, welches durch Alufolie vor Licht geschützt war. Abschließend wurden die Kolloidgrößen jeweils mittels Steulichtanalyse (Zetasizer) vermessen. Die Kolloiddurchmesser waren in etwa Gauß-verteilt, mit einem Mittelwert bei ca. 35 nm.

II.2 HERSTELLUNG NANOSTRUKTURIERTER SUBSTRATE

Der experimentelle Aufbau zur Herstellung der LIPSS-Substrate ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Der Titan-Saphir-Laser (40 fs, Spitfire, Spectra Physics) wird über dichroitische Spiegel mit Hilfe einer Zylinderlinse auf die Oberfläche abgebildet. Ein im Strahlengang befindlicher BBO-Kristall dient zur Frequenzverdopplung des Laserlichtes, so dass zwei unterschiedliche Anregungswellenlängen ($\lambda_{exc} = 400\text{nm}$ und $\lambda_{exc} = 800\text{nm}$) für die LIPSS-Strukturierung zur Verfügung standen. Das Substrat kann mit Geschwindigkeiten von $v = 0,001$ bis

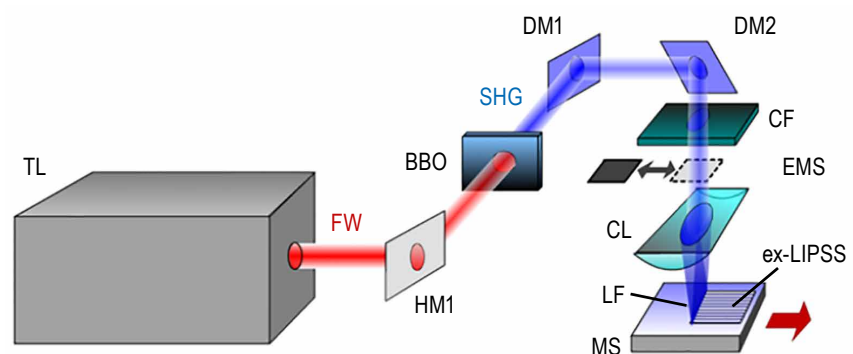


Abb. 1) Experimenteller Aufbau für die erweiterte Laser-induzierte periodische Oberflächenstruktur (ex-LIPSS); TL=Titanium Saphir Laser, FW= Grundwelle, HM1= hochreflektierender Spiegel, BBO= β -Bariumborat Crystal, SHG= 2. Obertonenerzeugung, DM1 und DM2= dichroitischer Spiegel, CF= Farbglassfilter (BG39), EMS= elektromagnetischer Verschluss, CL= zylindrische Linse, LF= Linienfokus, MS = bewegendes Substrat (in xyz-Richtung) (Das,2010).

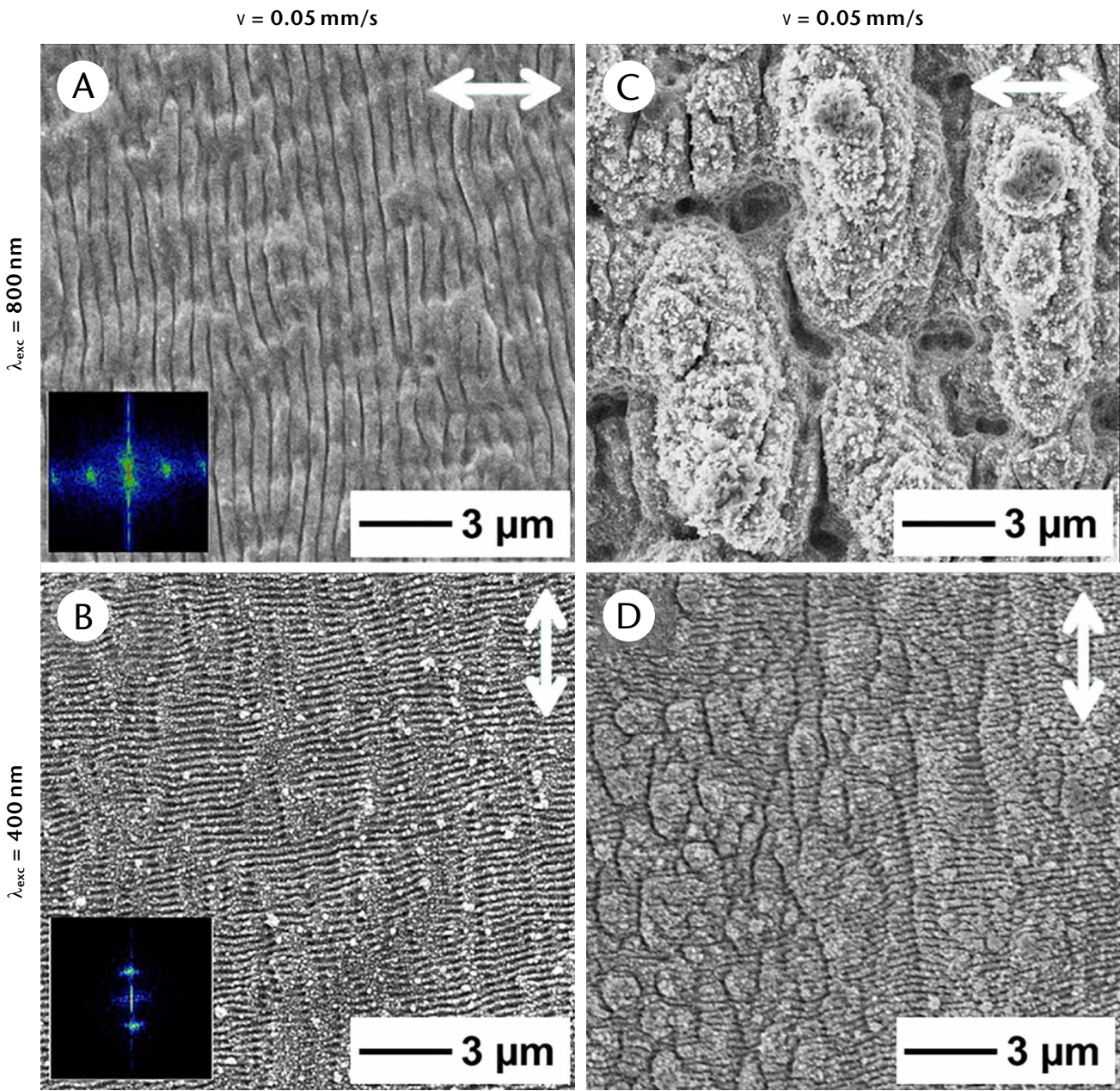


Abb. 2) Rasterelektronenmikroskopaufnahmen eines nanostrukturierten Silbersubstrats bei Wellenlängen von $\lambda_{exc} = 800\text{nm}$ (a,c) und $\lambda_{exc} = 400\text{nm}$ (b,d) mit Scangeschwindigkeiten von $v = 0,05\text{mm/s}$ (a,b) und $v = 0,005\text{mm/s}$ (c,d).

$v = 8\text{mm/s}$ in x-y-Richtung bewegt werden, wobei der Probenstisch in den vorliegenden Experimenten senkrecht zur Fokuslinie bewegt wurde und so zusammenhängende strukturierte Bereiche auf einer Fläche von etwa $2500 \times 500 \mu\text{m}$ entstanden. Die Oberflächenstruktur hing dabei sehr stark von der Wellenlänge und den Vortriebsgeschwindigkeiten ab (Das, 2010).

In Abb. 2a-d) sind Rasterelektronenmikroskop (REM)- Aufnahmen für Wellenlängen von $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$ und $\lambda_{exc} = 800 \text{ nm}$ bei zwei verschiedenen Scangeschwindigkeiten $v = 0,05$ und

$v = 0,005 \text{ mm/s}$ dargestellt. Bei 0.05mm/s bildeten sich linienförmige Strukturen mit wellenlängenabhängigen Perioden von etwa 530 nm und 250 nm (Abb. 2a und 2b), während bei der geringeren Scangeschwindigkeit inselartige Strukturen mit nanorauen Oberflächenprofilen entstanden. In den vorliegenden Experimenten wurden die in Abb. 2a) und 2b) gezeigten Strukturen verwendet.

II. III. PROBENPRÄPARATION

$100 \mu\text{L}$ der 15 mg/ml Hering-Sperma-DNA-Lösung wurden mit $200 \mu\text{L}$ Silberkolloidlösung ($1,8 \cdot 10^{-3}$ und

$8,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$) vermischt. $8 \mu\text{l}$ dieser Lösung wurden dann auf einen Glasobjektträger im Vakuum-Trockner für ca. 5 min getrocknet. Für die Albumin Präparation wurde zunächst eine Konzentration von $102,4 \text{ mg/ml}$ angesetzt. Das Reaktionsgefäß wurde gut gemischt und für ca. 5 min in ein Ultraschallbad gelegt. $8 \mu\text{l}$ dieser Lösung wurden auf einen Glasobjektträger für 5 min im Vakuum-Trockner getrocknet. Anschließend wurden $8 \mu\text{l}$ der $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ Silberkolloidlösung darauf pipettiert und wieder für 5 min im Vakuumtrockner getrocknet. Für die Messungen auf den nanostrukturierten Silberoberflächen wurden

jeweils 2 µl der Proben auf einen strukturierten Oberflächenbereich der Silberproben pipettiert. Das Target mit der Probe wurde anschließend im Vakuum-Trockner getrocknet.

II. IV. SPEKTRENAUFNAHME

Die Spektren wurden mit Hilfe eines konfokalen Raman-Mikroskops (Witec alpha 300) aufgenommen. Dessen Hauptkomponente ist ein Zeiss-Mikroskop mit drei Objektiven (10x/0,2, 50x/0,7 und 100x/0,9). Das Laserlicht wird über Monomodefasern (Modendurchmesser 3,5µm) eingekoppelt und auf die Probe fokussiert. Gegenwärtig stehen zwei Laser mit Wellenlängen von 488 nm und 532 nm zur Verfügung. Das an der Oberfläche gestreute Laserlicht wird auf eine optische Multimode-Faser mit wahlweise 25 µm, 50µm und 100 µm Kerndurchmesser abgebildet. Die spektrale Analyse erfolgt mit Hilfe eines linsenbasierten Spektrometers 300 mm fokaler Länge. Dessen spektrale Auflösung kann durch das verwendete Beugungsgitter im Spektrographen (600Linien/mm und 1800 Linien/mm) und den Durchmesser der Multimode-Fasern im Bereich von etwa $\sim 0,6 \text{ cm}^{-1}$ bis $\sim 7 \text{ cm}^{-1}$ variiert werden. Der Durchmesser der Fasern definiert gleichzeitig die konfokale Auflösung des Mikroskops. Als Detektor dient eine mit einer dreistufigen Peltier-Kühlung (bis $-60 \text{ }^\circ\text{C}$) versehene EMCCD-Kamera (Andor). Die Proben können ortsaufgelöst über einen in x-y-Richtung motorgetriebenen scanbaren Probenstisch und das in z-Richtung scanbare Mikroskop analysiert werden. Eine detaillierte Beschreibung des Raman-Systems findet sich in den Bachelorarbeiten von *Katja Zimmer* (Zimmer, 2012) und *Janine Lange* (Lange, 2013).

III. ERGEBNISSE

III.I SERS-SPEKTREN MIT SILBERKOLLOIDEN

Die intensitätsstärksten Raman-Spektren konnten bei Verwendung des 50x-Objektivs und des 488 nm-Lasers beobachtet werden, der deshalb in den hier präsentierten Messungen eingesetzt wurde. Um sicherzustellen, dass der Laser die DNA nicht schädigt,

wurden zunächst mehrere Spektren bei Variation der Laserleistung von 10 µW bis 25 mW aufgenommen. Hierbei wurde beobachtet, dass es erst oberhalb von 10 mW zu irreversiblen Änderungen der relativen Intensitäten kam, was auf die Schädigung der DNA-Moleküle zurückgeführt wurde. Die Messungen wurden dann bei 1 mW Laserleistung, also weit unterhalb der Zerstörschwelle, durchgeführt. Für die Aufnahme der Spektren wurde das 600L/mm-Gitter verwendet, um den gesamten Raman-relevanten Spektralbereich simultan aufzeichnen zu können. Die spektrale Auflösung lag bei 7 cm^{-1} .

Abb. 3 zeigt typische Spektren von DNA-Proben ohne Kolloide und mit Kolloidkonzentrationen von $1,8 \cdot 10^{-3}$ und $8,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$. Man erkennt eine Reihe charakteristischer Peaks zwischen etwa 600 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} sowie bei 3000 cm^{-1} . Eine detaillierte Identifizierung der Spektren wurde bislang nicht vorgenommen; man kann jedoch davon ausgehen, dass die Peaks in den angeführten Spektralbereichen im Wesentlichen unterschiedlichen DNA-Komponenten zuzuordnen sind. Deutlich zu erkennen ist der SERS-Effekt durch den Intensitätsanstieg bei den Kolloidmischungen gegenüber der reinen DNA-Lösung, wobei die höher konzentrierte Kollo-

idmischung die höchste Verstärkung aufweist. Auch im Falle des Albumin-Proteins (hier nicht dargestellt) wurde ein signifikanter SERS-Effekt beobachtet.

III.II SERS-SPEKTREN AUF NANO-STRUKTURIERTEN SILBEROBERFLÄCHEN

Die in Abb. 4 gezeigten Spektren resultieren von DNA-Proben auf Oberflächen mit Periodizitäten von 530 nm und 250 nm, erzeugt mit einer Wellenlänge des BearbeitungsLasers von $\lambda_{\text{exc}} = 800 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ und Scangeschwindigkeiten $v = 0,05 \text{ mm/s}$ (vgl. Abb. 2a und 2b). In diesem Fall wurde das 10x-Objektiv gewählt, um mit dem Laserfokus eine größere Substratoberfläche zu bedecken und damit eine gute statistische Mittelung über mehrere Perioden zu erreichen. Die Abbildungen 4 c bis 4e zeigen DNA-Spektren auf einem unstrukturierten Bereich der Silberoberfläche c) bzw. auf Substratbereichen mit einer Periode von 530 nm und 230 nm (d und e). Zum Vergleich wurden auch DNA-Spektren auf unstrukturierten Glas- und Siliziumoberflächen aufgenommen (Abb. 4a und 4b). Man erkennt deutlich den Intensitätsanstieg gegenüber den Glas- und Silizium-Substraten, was auf die Plasmonenanregung auf den Silberoberflächen zurückgeführt werden kann. Es ist klar erkennbar, dass

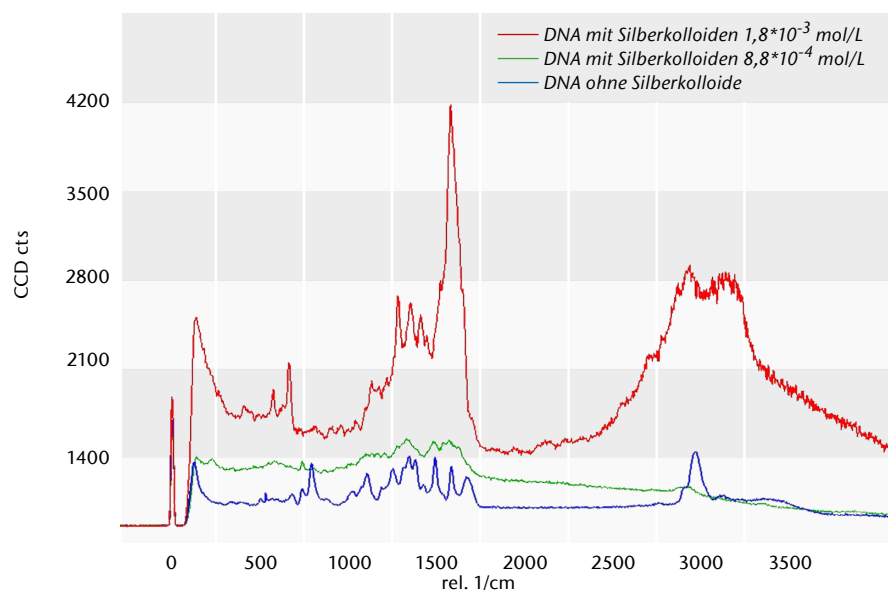


Abb. 3) Raman-Spektrum von Hering-Sperma DNA vermischt mit Kolloidlösungen mit Konzentrationen von $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ und $8,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$ auf Glas getrocknet. Gemessen wurde bei folgenden Parametern: Laserwellenlänge 488 nm, Laserleistung 1 mW, CCD-Detektorintegrationszeit 20 s, Objektiv 50x/0,7

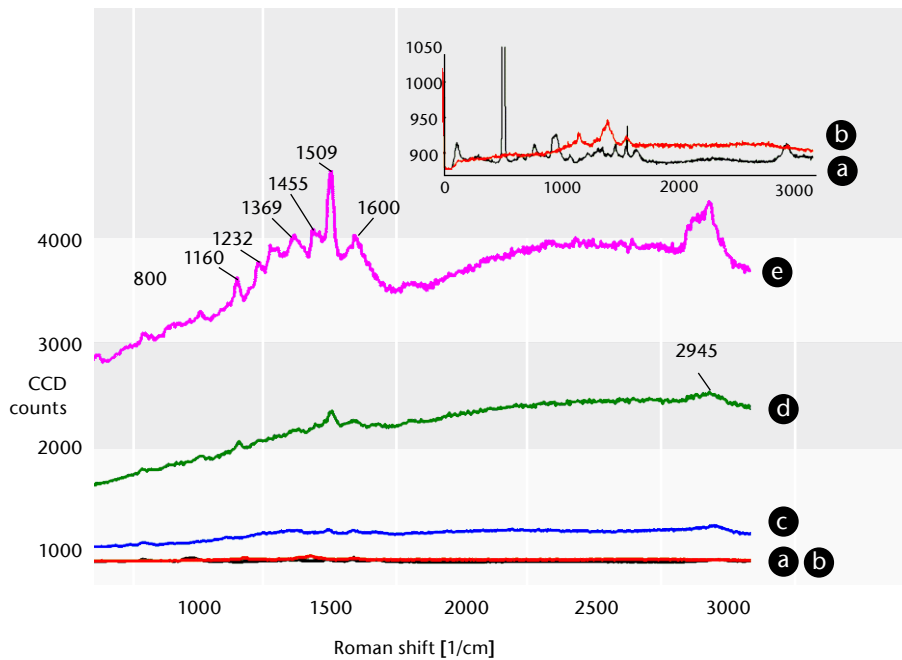


Abb. 4) SERS-Spektrum von Hering-Sperma DNA (15 mg/mL) getrocknet auf Glas auf nicht strukturiertem Ag-Substrat(c), nanostrukturiert mit 800 nm(d), bei 400nm(e) im Vergleich mit unstrukturierten Silizium(a) und Glas (b)-Substrat. Die Einblendung oben rechts zeigt die Kurven a) und b) in gezoomter Darstellung. Die starken Peaks stammen vom Substrat. Messparameter: Objektiv 10x/02, sonst gleiche Parameter wie in Abb. 3

die strukturierten Oberflächen einen stärkeren SERS-Effekt erzeugen, wobei der Verstärkungsgrad bei den kleineren Strukturen (e) am stärksten ist; ein Effekt, der in analoger Weise auch in den Spektren des Albumin-Proteins (hier nicht dargestellt) beobachtet wurde. Die Peakpositionen sind vergleichbar mit denen in Abb. 3.

IV. DISKUSSION

Die DNA-Spektren in Abb. 3 und 4 zeigen eine Reihe charakteristischer Peaks. Eine komplette und eindeutige spektrale Identifizierung ist auf Basis der bisher vorliegenden Daten noch nicht möglich. Unsere vorläufige Analyse greift auf Literaturdaten zurück.

Für die charakteristischen Banden zwischen 600 und 1800 cm^{-1} nehmen wir Bezug auf die Arbeit von Ke *et al.* (Ke *et al.*, 1999). Die beiden ausgeprägten Peaks bei 1160 und 1455 cm^{-1} werden Deoxyribose-Phosphat zugeordnet. Die Peaks bei 1232, 1369 und 1509 cm^{-1} gehören vermutlich zu Adenin, während die Bande bei 800 cm^{-1} Streckschwingungen der Hauptkette einer A-Typ-DNA repräsentieren könnte. Die Bande bei 1014 cm^{-1} - nur bei Verwendung der Substrate mit der höheren Periodizität von 230 nm beob-

achtet - sollte C-O-Streckschwingungen zuzuordnen sein. Zusätzlich gibt es Anhaltspunkte für eine Cytosin-Bande bei 623 cm^{-1} und eine auf die Deformationsschwingung der NH_2 -Gruppe zurückzuführende Bande des Adenin-Guanin-Cytosin-Moleküls bei 1600 cm^{-1} . Die Bande bei 2900 und 2945 cm^{-1} repräsentiert sehr wahrscheinlich C-H-Streckschwingungen in den CH_2 -Gruppen (Taylor *et al.*, 1996). Weiterführende Experimente zur genaueren spektralen Identifizierung auch unter Verwendung anderer biologischer Proben und gegebenenfalls verbesserter spektraler Auflösung sind geplant.

Die in Kap. 3 vorgestellten Spektren demonstrieren, dass die SERS-Methode für die Raman-Analyse biologischer Proben äußerst hilfreich ist. Insbesondere bei schwachen Konzentrationen kann auf die SERS-Verstärkung der Signale kaum verzichtet werden.

Der Grad der Verstärkung bei den LIPSS-Substraten ist, wie erwartet, stark von den Strukturdimensionen abhängig. Die hier präsentierten Messungen mit LIPSS-Oberflächen zeigen, dass bei der höheren Periodizität, d.h. kleineren Strukturdimensionen, signifikant höhere Verstärkungsgrade erzielt wurden. Es kann vermutet

werden, dass eine weitere deutliche Steigerung des Verstärkungsfaktors erreicht werden kann, wenn die Strukturen weiter verkleinert werden. Die diesbezügliche Optimierung der Substrate ist Gegenstand geplanter Experimente. In diesem Zusammenhang werden theoretische Simulationen zur Plasmonenanregung hilfreich sein.

Was die Substratmaterialien betrifft, sollen in Zukunft auch nanostrukturierte Kupfer- und Goldoberflächen gegebenenfalls unter Benutzung anderer Laserwellenlängen zum Einsatz kommen. Erste noch nicht veröffentlichte Experimente an nanostrukturierten Kupfer-Substraten zeigten bereits vielversprechende Resultate. Es ist davon auszugehen, dass die Eignung bestimmter Substratmaterialien nicht ausschließlich von den physikalischen Parametern, sondern auch von der Art der biologischen Proben abhängt.

Für eine tiefere Analyse hinsichtlich des durch Kolloide hervorgerufenen SERS-Effektes sind ebenfalls weitere Arbeiten erforderlich. Optimierungen hinsichtlich der Kolloidgrößen und Kolloidmaterialien sowie zum Kolloidherstellungsprozess stehen noch aus. Zum Beispiel ist bisher noch nicht klar, inwieweit durch die bisherige Kolloidpräparation möglicherweise Verunreinigungen zurückbleiben, die die Spektren verfälschen können.

Ein wichtiges zukünftiges Thema stellt auch die Reproduzierbarkeit der Messungen dar. Da die Kolloide in Lösung beweglich sind, können sie sich im Laufe der Zeit - möglicherweise auch durch den Laserbeschuss initiiert - zu größeren Aggregaten zusammenschließen, wodurch es zu inhomogenen Verteilungen mit Bereichen unterschiedlicher Verstärkungsfaktoren kommen kann.

V. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente an Hering-Sperma-DNA und Albumin zeigen die für Silberkolloide im Prinzip zu erwartenden SERS-Effekte, wobei noch keine Optimierung hinsichtlich des SERS-Verstärkungsgrades durch Modifikation der Kolloidgrößen

vorgenommen wurde. Die vorgestellten SERS-Messungen auf LIPSS-strukturierten Oberflächen demonstrieren erstmalig die Eignung solcher Substrate für Raman-Messungen an biologischen Proben. Die hier vorgestellten Messungen haben dabei vorwiegend exemplarischen Charakter, um die prinzipielle Eignung des LIPSS-Verfahrens nachzuweisen. Eine Optimierung der Strukturen hinsichtlich einer möglichst hohen SERS-Verstärkung sollte Gegenstand weiterer Arbeiten sein. Es kann jedoch erwartet werden, dass durch Verkleinerung der Periodizität der Oberflächenstrukturen eine weitere Erhöhung des Verstärkungsfaktors erreicht werden kann. Dabei bietet das LIPSS-Verfahren Vorteile gegenüber im Handel erhältlichen, unter Benutzung lithografischer Verfahren hergestellten SERS-Präparaten, da die Herstellung unterschiedlicher Substrate sehr schnell erfolgt. Dies ist gerade im Hinblick auf eine Optimierung des SERS-Verfahrens von besonderer Bedeutung.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass beide hier vorgestellten Verfahren zur SERS-Verstärkung für den Einsatz in der Raman-Diagnostik an biologischen und biomedizinischen Proben gut geeignet erscheinen. Sie sind je nach Anwendung alternativ einsetzbar. LIPSS-Substrate können z.B. bei einfachen Molekülen wie Einzelstrang-DNA oder einfachen Proteinen zum Einsatz kommen, während sich bei komplexeren Strukturen, wie Proteinen oder Zellen in vielen Fällen die Verwendung von Kolloiden anbieten, da diese durch Diffusion in komplexere Organismen eindringen können und so SERS-Messungen auch im Volumen, z.B. von Bakterien, ermöglichen.

Zu den geplanten weiteren Arbeitsschwerpunkten zählen die Untersuchung des Einflusses von Strukturdimensionen, Kolloidgrößen und Materialien auf den SERS-Effekt sowie die Analyse verschiedener biologischer bzw. biomedizinischer Substanzen. Mittelfristig ist auch daran gedacht, die Raman-Spektroskopie zur in-situ-Messung dynamischer Parameter an biologischen Systemen, wie zum Beispiel zur Analyse von Reaktionskinetiken, einzusetzen.

LITERATUR

- Böttger, U.; Vera, J.-P. de, Fritz, J., Weber, I., Hübers, H.-W., Schulze-Makuch, D., Optimizing the detection of carotene in cyanobacteria in a martian regolith analogue with a Raman spectrometer for the ExoMars mission, *Planetary and Space Science*, 356-362 (2011)
- Boyd, S.; Bertino, F. M., Seashols, S. J., Raman spectroscopy of blood samples for forensic applications, *Forensic Science International*, 124-128 (2011)
- Das, S. K.; Dasari, K., Rosenfeld, A., Grunwald, R., Extended-area nanostructuring of TiO₂ with femtosecond laser pulses at 400 nm using a line focus, *Nanotechnology* 21, 155302 (2010)
- Fleischmann, M., Hendra, P. J., McQuillan, A. J., Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chem. Phys. Lett.* 26 (Nr.2), 163–166 (1974),
- Grant, A. M.; Creighton, J.A., Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode, *Journal of the American Chemical Society*. 99 (Nr.15), 5215–5217 (1977)
- Guicheteau, Christesen, S., Emge, D., Hyre, A., L.Argue, Bacteria Classification via Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Principal Component Analysis, U.S. Army Edgewood Chemical Biological Center(2006), URL: [https://www.google.de/#q=Guicheteau+Bacteria+Classification+via+Surface+Enhanced+Raman+Spectroscopy+and+Principal+Component+Analysis.+U.S.+Army+Edgewood+Chemical+Biological+Center\(2006\).&safe=off&spell=1](https://www.google.de/#q=Guicheteau+Bacteria+Classification+via+Surface+Enhanced+Raman+Spectroscopy+and+Principal+Component+Analysis.+U.S.+Army+Edgewood+Chemical+Biological+Center(2006).&safe=off&spell=1)
- Huong, P. V.; Drug analysis by Raman and micro-Raman spectroscopy, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis* (Vol. 4, No. 6), 811-823 (1986)
- Ke, W.; Yu, D.; Wu, J.; Raman spectroscopic study of the influence on herring sperm DNA of heat treatment and ultraviolet radiation, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (Vol. 55, No.5), 1081-1090 (1999)
- Lange, J., Analyse organischer und komplexer biologischer Proben mittels Raman-Mikroskopie unter Verwendung der SERS-Methode, Bachelorarbeit, TH Wildau (2013)
- Jeanmaire, D. L., Van Duyne, R.P., Surface Raman spectroelectrochemistry, Part I. Heterocyclic, aromatic and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode, *J. Electroanal. Chem*, 84 (Nr.1), 1–20 (1977)
- Sur, U. K., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, Recent Advancement of Raman Spectroscopy, *Resonance*. Resonanz, 154-164 (2010)
- Taylor, C. E.; Garvey, S. D., Pemberton, J. E., Carbon Contamination at Silver Surfaces: Surface Preparation Procedures Evaluated by Raman Spectroscopy and X-ray Photoelectron Spectroscopy, *Analytical Chemistry* (Vol. 68, No. 14), 2401-2408 (1996)
- Weaver G.C. und Norrod, K., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Journal of Chemical Education*, In the Laboratory, 621-624 (1998)
- Zimmler, K., Etablierung von „Surface Enhanced Raman Spectroscopy“ (SERS) für biologische Proben, Bachelorarbeit, TH Wildau (2012)

AUTOREN

- Janine Lange, B.Sc.**
Biosystemtechnik/Bioinformatik
Technische Hochschule Wildau [FH]
Janine.lange@th-wildau.de
- Hamza Messaoudi, M.Sc.**
Max-Born-Institut für Nichtlineare Optik und Kurzzeitspektroskopie
messaoud@mbi-berlin.de
- Dr. Susanta Kumar**
Max-Born-Institut für Nichtlineare Optik und Kurzzeitspektroskopie
susanta@mbi-berlin.de
- Dr. Rüdiger Grunwald**
Max-Born-Institut für Nichtlineare Optik und Kurzzeitspektroskopie
grunwald@mbi-berlin.de.
- Prof. Dr. Sigurd Schrader**
Photonics/Laser & Plasma Technologies
Technische Hochschule Wildau [FH]
sigurd.schrader@th-wildau.de
- Prof. Dr. Marcus Frohme**
Molekularbiologie und funktionelle Genomik
Technische Hochschule Wildau [FH]
Marcus.frohme@th-wildau.de
- Dr. Friedhelm Heinrich**
Photonics- & Plasma Technologien
Technische Hochschule Wildau [FH]
Friedhelm.heinrich@th-wildau.de