

Self-Assembled Nanoparticle Probes for Recognition and Detection of Biomolecules

Dustin J. Maxwell, Jason R. Taylor & Shuming Nie
Journal of the American Chemical Society 2002

Überblick

- 1) Einführung Nanobiosensoren
- 2) Funktionsprinzip, Herstellung und Untersuchung von Goldnanopartikeln in der Arbeit von Maxwell et al. 2002
- 3) Aktuelle und zukünftige Anwendungsmöglichkeiten von Nanopartikeln

Einführung Nanobiosensoren

Prinzip:

Fluorophor gekoppelt an ein Biomolekül und einen kovalent gebundenen Quencher ('Dämpfer')

Fluoreszenz wird durch strahlungsfreien Energietransfer an Quencher unterbunden

Bindung an Zielmolekül bewirkt Konformationsänderung die Fluorophor von Quencher Wirkung befreit

Einführung Nanobiosensoren

Beispiele:

Allosterische Proteine an Fluorophoren

Katalytisch aktive Nukleinsäuren (Ribozyme)

Zinkfinger-Peptide

Signalaptamere

Molekulare Beacons ('Leuchtsignale')

Einführung Nanobiosensoren

Zielsetzung der Arbeit von Maxwell et al.:

Entwicklung eines Bionanosensors mit einem Metall-Nanopartikel als Kern, der gleichzeitig als Nanogerüst für die Oligonukleotidkette und auch als Nanoquencher, also Akzeptor der Fluorophorenergie dient.

Funktionsprinzip, Herstellung und Untersuchung von Goldnanopartikeln

Aufbau:

Goldnanokristall

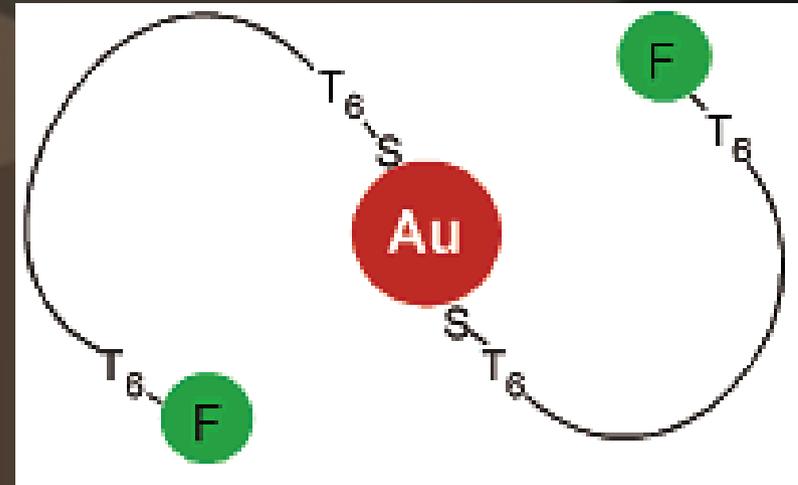
Thiolgruppe (3')

Thyminspacer

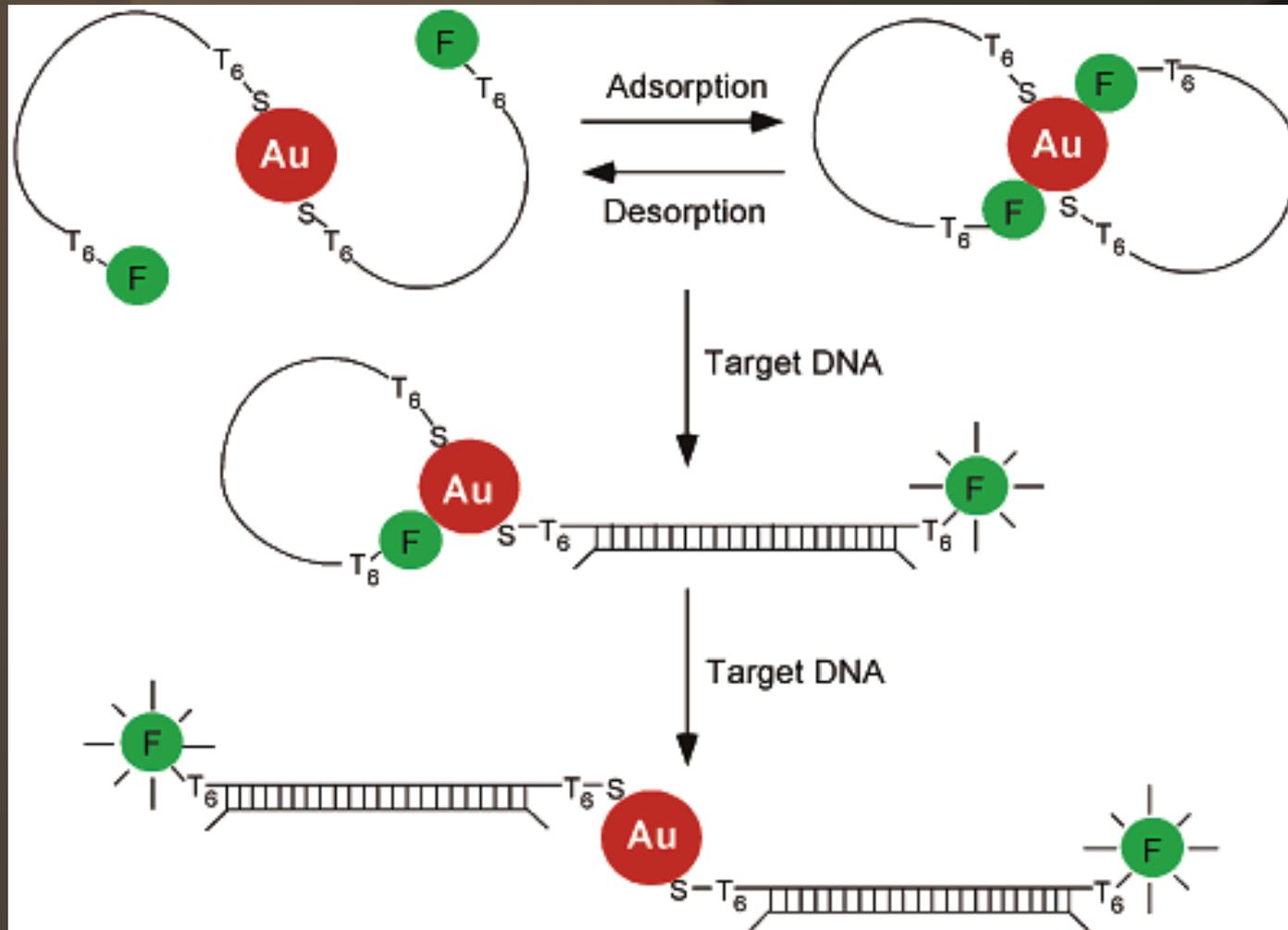
Oligonukleotidkette

Thyminspacer

Fluorophor (5')



Funktionsprinzip, Herstellung und Untersuchung von Goldnanopartikeln



Funktionsprinzip, Herstellung und Untersuchung von Goldnanopartikeln

1) Synthese der Goldnanopartikel durch Reduktion von Tetrachloridogoldsäure.

→ Charakterisierung per TEM & UV-Vis

2) Synthese der Bionanosensoren durch Inkubation der Goldnanopartikel mit Überschuss Oligonukleotiden (SH+T₆+DNA+T₆+Fluorophor).

→ Oligos / Goldpartikel Verhältnis (durch Messen der DNA-Menge (Fluoreszenz) bzw. Goldpartikelmenge (Absorption))

Funktionsprinzip, Herstellung und Untersuchung von Goldnanopartikeln

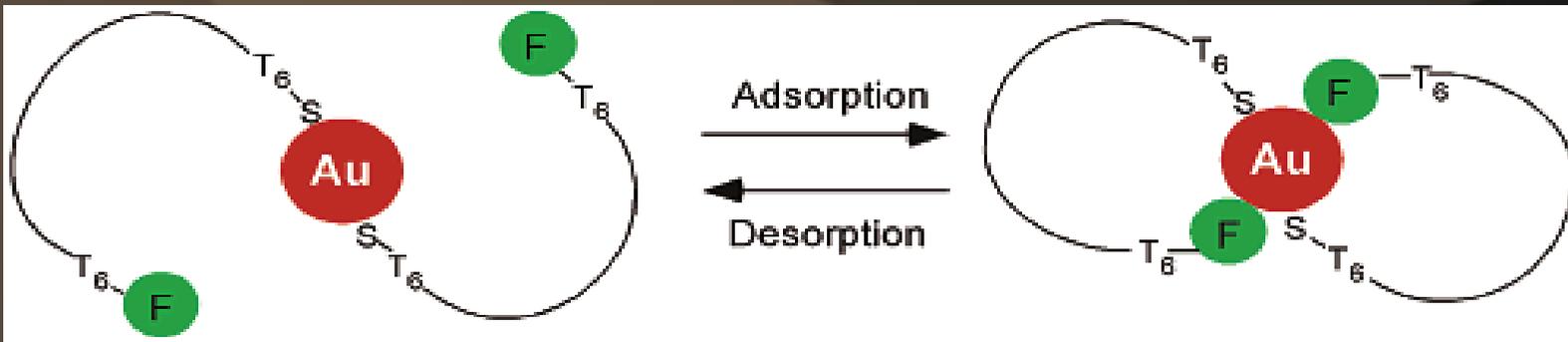
→ Charakterisierung per TEM & UV-Vis:

- ♦ stark monodispers
- ♦ Goldpartikel-Durchmesser durchschnittl. 2,5nm
- ♦ Absorptionsmaximum bei 510nm
- ♦ $\epsilon = 6,5 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$

→ Oligos / Goldpartikel Verhältnis:

- ♦ 1-2 Oligonukleotide pro Goldpartikel
- ♦ insgesamt ca. 80% fähig zur Hybridisierung

Funktionsprinzip, Herstellung und Untersuchung von Goldnanopartikeln

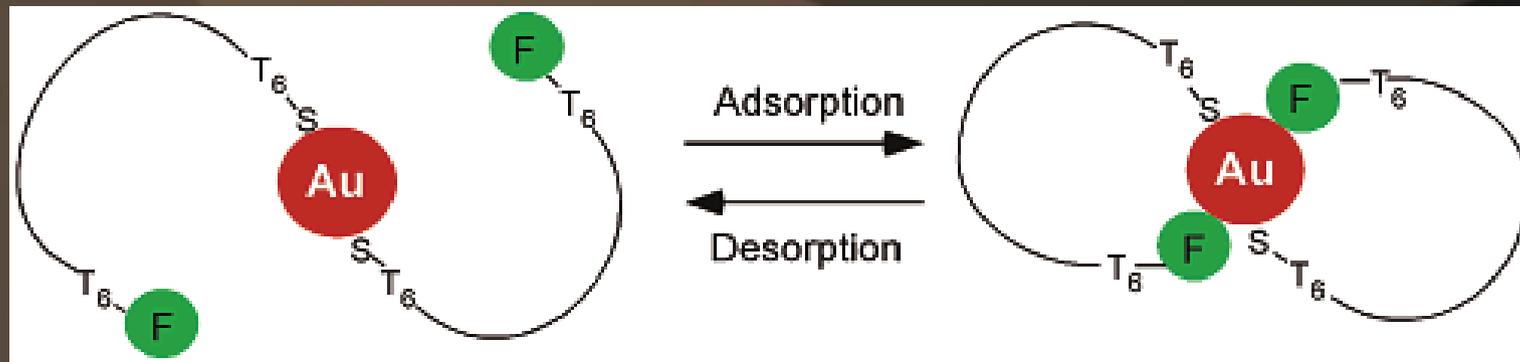


Quenching-Mechanismus:

Fluorophor bindet reversibel an Metalloberfläche

Energie des angeregten Fluorophors wird strahlungsfrei über Dipol-Dipol-Ww auf Akzeptor übertragen (Prinzip des Förster Resonanz Energie Transfers)

Funktionsprinzip, Herstellung und Untersuchung von Goldnanopartikeln

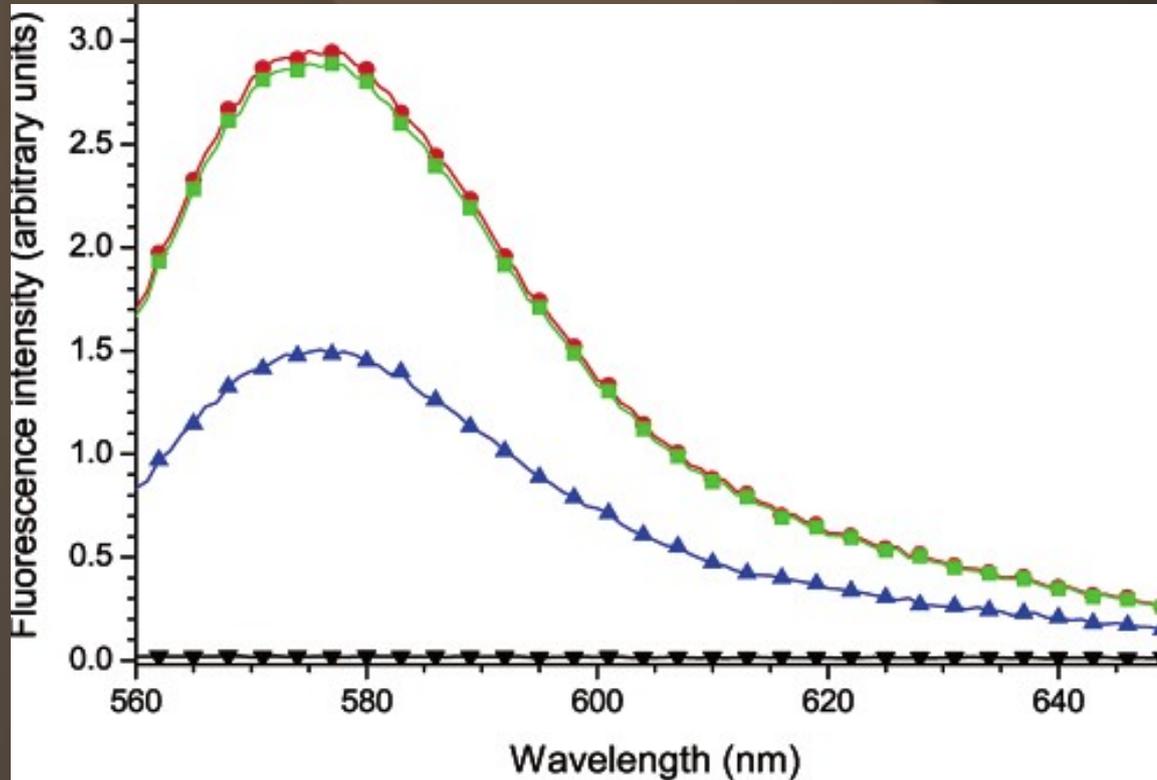


Quenching-Mechanismus:

Akzeptor sind Gold-Oberflächenplasmonen

Anregung und Oszillation verstärken das elektrische Feld der Oberfläche, also auch die Energietransfer-Effizienz (ABER: Kein Energietransfer mehr bei Distanz (10nm) der geöffneten Konformation!)

Funktionsprinzip, Herstellung und Untersuchung von Goldnanopartikeln



Rot: ohne Quencher

Grün: mit Dabcyl

Blau: mit Goldpartikeln

**Schwarz: Goldpartikel
+ MgCl₂**

Fluoreszenz-Spektrum TMR-markierter Oligonukleotide; KEINE Thiolgruppe am 3' Ende!

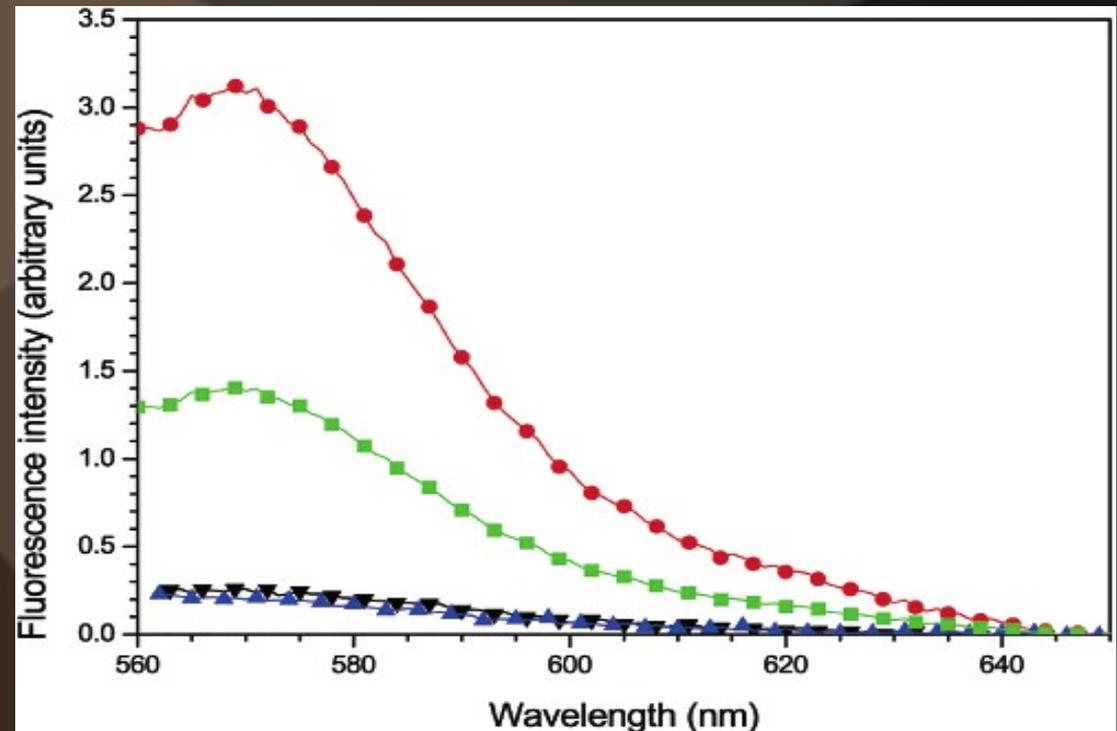
Funktionsprinzip, Herstellung und Untersuchung von Goldnanopartikeln

Rot: perfekt komplementär

Grün: single-base mismatch

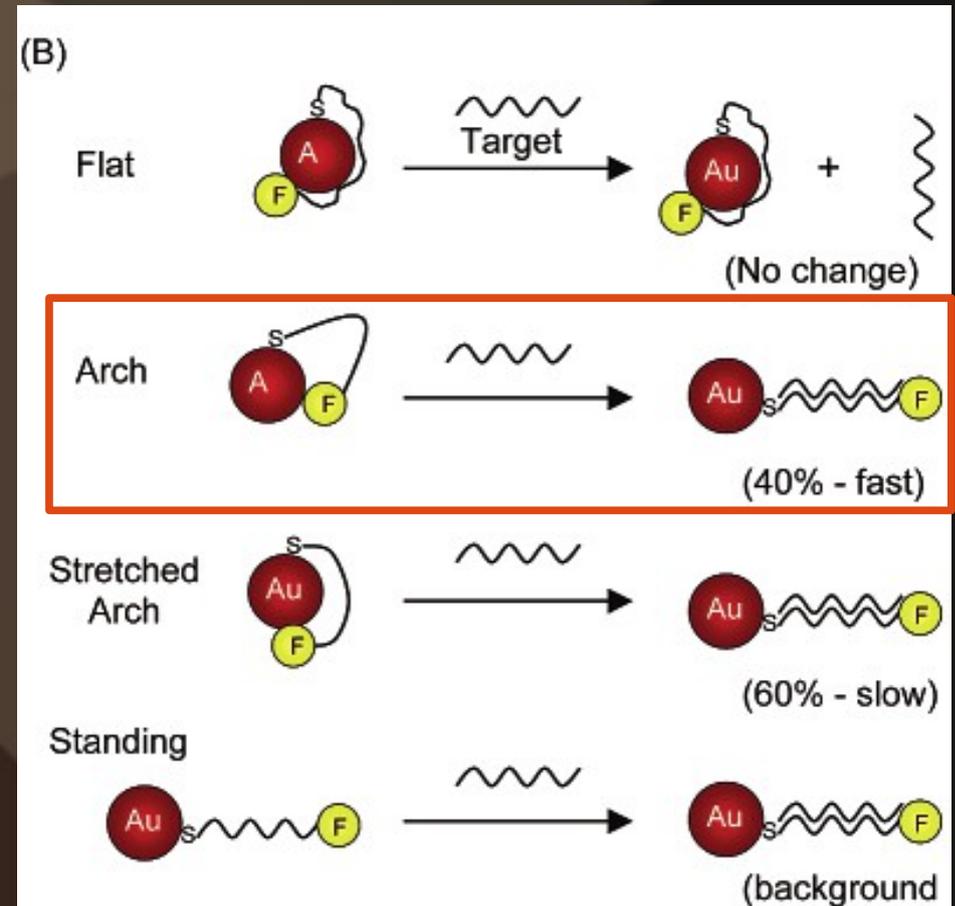
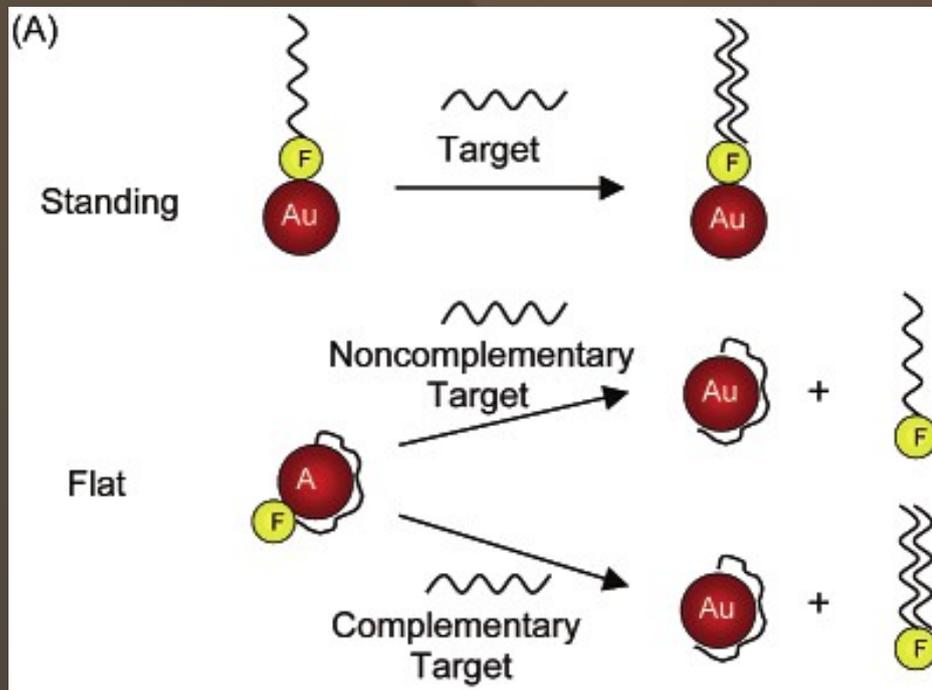
Blau: nicht komplementär

Schwarz: Kontrolle ohne Ziel-DNA



Fluoreszenzspektren der Nanobiosensoren zur Untersuchung der Spezifität der Ziel-DNA-Erkennung

Funktionsprinzip, Herstellung und Untersuchung von Goldnanopartikeln



Funktionsprinzip, Herstellung und Untersuchung von Goldnanopartikeln

Voraussetzungen:

- ◆ Nanobiosensor FLUORESZIERT NICHT, wenn nicht an Zielsequenz gebunden
- ◆ Bindet stabil an DNA
- ◆ Bindet spezifisch
- ◆ Nanobiosensor FLUORESZIERT, wenn an Zielsequenz gebunden

Funktionsprinzip, Herstellung und Untersuchung von Goldnanopartikeln

- Fluoreszenz wird komplett durch Goldpartikel gedämpft (Oligonukleotide → Kationen) & Fluorophor auch thermisch stabil an Goldpartikel gebunden
- Stabile Bindung an DNA; Oberflächenbindung der organischen Farbstoffe an Goldpartikel deutlich kleiner als Energie, die die zwei DNA-Stränge aneinander bindet.
- Reduzierte Bindung an Single-base mismatch
- Strahlungsfreier Energietransfer auf das Goldpartikel funktioniert nur auf 1-2nm Entfernung

Funktionsprinzip, Herstellung und Untersuchung von Goldnanopartikeln

Vergleich mit Molecular Beacons und anderen Detektionsverfahren:

- ◆ Binden and Ziel-Sequenz & Signalgebung in einem
- ◆ Nanopartikel benötigt keinen Stamm
- ◆ Ähnliche Spezifität wie molekulare Beacons, aber hitzeresistenter
- ◆ Höhere Quenching Leistung als Dabcyl
- ◆ Kinetik-Verbesserung durch Konformationsselektion

Aktuelle und zukünftige Anwendungsmöglichkeiten

Goldpartikel-Konjugate mit Peptiden oder Substraten bestimmter Enzyme → Echtzeit-Messung katalytischer Vorgänge

Konjugate mit DNA und Proteinen → Proteine finden zum Wirkort (Zellen oder Bereiche innerhalb der Zelle); Oligonukleotide erkennen Ziel-DNA/RNA

Quellen

- ♦ Maxwell, D. J., Taylor, J. R. and Nie, S. 2002. Self-Assembled Nanoparticle Probes for Recognition and Detection of Biomolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 9606-9612.
- ♦ Dubertret, B., Calame, M. and Libchaber, A. J. 2001. Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nature Biotechnology* 19: 365 – 370.
- ♦ http://www.cytodiagnosics.com/gold_nanoparticle_properties.php [01.06.2013]
- ♦ <http://de.wikipedia.org/wiki/Förster-Resonanzenergietransfer> [01.06.2013]