MASTERARBEIT

Untersuchungen über das Hybridisierungsverhalten von DNA-funktionalisierten Gold-Nanopartikel in freier Lösung und in Kombination mit Lateral Flow Tests

Ausgeführt am

Department für Agrarbiotechnologie der Universität für Bodenkultur

Standort Tulln

Eingereicht von

Spacek Stefan, Bakk. techn.

Matrikelnummer: 0740713

Studienkennzahl: H 066 417

Betreut von

Univ.Prof.DI Dr. Rudolf Krska

Ao.Univ.Prof.Mag.Dr.rer.nat. Robert Mach

DI Dr.techn. Kurt Brunner

Wien, am

_____

(Stefan Spacek)

DANKSAGUNG

Zu Beginn möchte ich mich bei meinen Eltern Maria und Josef für die große Unterstützung bedanken, welche sie mir während meines gesamten Ausbildungsweges entgegengebracht haben. Weiters möchte ich mich bei all jenen Personen bedanken, die mir bei dieser Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen beiden Hauptbetreuern Rudi Krska und Robert Mach sowie Kurt Brunner, der bei jeder Frage stets für mich da war und bei Problemen immer mit einem hilfreichen Tipp aushelfen konnte.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung……..…..7

Abstract……..……..8

Abkürzungsverzeichnis……..9

1. EINLEITUNG 10

1.1. Verwendungszweck, Synthese und besondere Eigenschaften von (Gold)nanopartikel 10

1.1.1. Warum Nanopartikel in der Molekularen Diagnostik ? 10

1.1.2. Allgemeine Herstellung von NP 12

1.1.3. Einzelne Schritte der Synthese mit Hilfe der Turkevich-Frens-Methode 13

1.1.4. Stabilität von GNP 15

1.1.5. GNP als optische Signalgeber 16

1.1.6. Qualitative Überprüfung und quantitative Bestimmung von GNP 17

1.2. Modifizierte GNP 18

1.2.1. Selbstanlagernde Monoschichten an Goldoberflächen 18

1.2.1.1. Erste Versuche 18

1.2.1.2. Charakteristik der Au-S Bindung 19

1.2.1.3. Nicht Au-S Bindungen 20

1.2.2. Einsatz von DNA-GNP in der Bioanalytik 21

1.2.2.1. Anwendung von DNA als Klebstoff in der GNP-Bioanalytik 21

1.2.2.2. Funktionalisierung von Oligonukleotiden an GNP mit Hilfe der Au-SH Bindung 22

1.2.2.3. Wechselwirkungen zwischen unmodifizierter DNA und GNP 23

1.2.2.4. Praktische Durchführung der Funktionalisierung und Optimierungsstrategien 25

1.2.2.5. Zusätzliche Stabilisierung der DNA-GNP 27

1.2.3. Veränderte Eigenschaften der DNA- DNA Hybridisierung durch die Konjugierung mit GNP 27

1.2.4. Hybridierungszusätze 29

1.3. Lateral Flow Tests kombiniert mit DNA-GNP 30

1.3.1. Einleitung 30

1.3.2. Verwendung von funktionalisierten GNP für den Nachweis von Biomolekülen in Lateral Flow Tests 31

1.3.2.1. Lateral Flow Immunoassays: 31

1.3.2.2. Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay 32

1.3.2.3. Nucleic Acid Lateral Flow Assay 33

1.3.3. Bestandteile eines LFD-Streifen 35

1.3.3.1. Aufgabezone 35

1.3.3.2. Conjugate-Pad 36

1.3.3.3. Membran ... 36
1.3.3.4. Absorbent-Pad ... 36

2. ZIEL DER ARBEIT ... 37

3. MATERIAL UND METHODEN ... 38

3.1. Allgemein verwendete Geräte und Materialien ... 38

3.2. Puffer und Stocklösungen ... 38
3.2.1. DNA und Streptavidin-Verdünnungspuffer ... 39
3.2.2. Phosphatpuffer (Stocklösung) ... 39
3.2.3. NaCl-Lösung (Stocklösung) ... 39
3.2.4. LFD-Laufpuffer bzw. Puffer für Hybridisierungsansätze ... 39

3.3. Vorbereitung kommerziell erhaltener Oligonukleotide und Streptavidin ... 40

3.4. Synthese und Größenüberprüfung der hergestellten 13 nm Goldnanopartikel ... 40
3.4.1. Herstellung von 13 nm Goldnanopartikel ... 40
3.4.2. Bestimmung der Größe mittels UV-VIS-Spektroskopie ... 41
3.4.3. Bestimmung der Größenverteilung mittels TEM ... 41

3.5. Funktionalisierung von GNP mit SH-DNA ... 41
3.5.1. Funktionalisierung der Goldnanopartikel ... 42
3.5.2. Nachweis von gebundener DNA mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie ... 43
3.5.3. Nachweis von gebundener DNA mittels quantitativer real-time-PCR ... 43

3.6. Schmelzversuche von hybridisierten DNA-GNP ... 44
3.6.1. Herstellung des Reaktionsansatzes ... 44
3.6.2. Bestimmung des Schmelzbereiches ... 44

3.7. Versuche mit Streptavidin-Streifen ... 45
3.7.1. Aufbau der Streifen ... 45
3.7.2. Sprayen von Streptavidin als Capture-Molekül ... 46
3.7.3. Verwendete DNA-Konjugate als Testsysteme ... 46
3.7.4. Hybridisierungsansatz für die Versuche an Teststreifen ... 47
3.7.5. Durchführung der Testläufe und Auswertung ... 49

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION ... 50

4.1. Größenüberprüfung der Goldnanopartikel ... 50
4.1.1. Bestimmung der Größe mittels UV-VIS-Spektroskopie ... 50
4.1.2. Bestimmung der Größenverteilung mittels TEM ... 51

4.2. Überprüfung des Funktionalisierungserfolges ... 52
4.2.1. Nachweis von gebundener DNA mittels TEM ... 52
4.2.2. Nachweis von gebundener DNA mittels quantitativer real-time-PCR ... 54
4.2.2.1. Vergleich zwischen DNA-Konzentration in der Endlösung und den Waschlösungen ... 54
4.2.2.2. Bestimmung der Anzahl gebundener DNA auf einem GNP ... 55

4.3. Bestimmung des Schmelzbereiches der DNA-Goldnanopartikel ... 56
4.3.1. Einfluss verschiedener Zusätze auf den Schmelzbereich ... 57
4.3.2. Einfluss von Mismatches auf den Schmelzbereich ... 58

4.4. Versuche mit Streptavidin-Teststreifen ... 60
4.4.1. Versuch A – Realisierbarkeit des 3K-Aufbaus ... 60
4.4.2. Versuch B – Benötigte Zeit für die Hybridisierung ... 61
4.4.3. Versuch C - Mobilität der DNA-GNP entlang der NC-Membran ... 62
4.4.4. Versuch D - Einfluss der Umgebungstemperatur auf das Testergebnis ... 63
4.4.5. Versuch E – Linker mit eingebauten Mismatches als DNA-Modifikation ... 64
4.4.6. Versuch F - Systematische Verkürzungen der $M1_{Linker}$ bzw. $M2_{Linker}$ ... 66
4.4.7. Versuch G – Verdünnung des gesamten Reaktionsansatzes ... 68
4.4.8. Versuch H – Systematische Verdünnung der Linker und Biotin-DNA ... 69
4.4.9. Versuch I –Linker und Biotin-DNA jeweils unterschiedlich stark verdünnt ... 70
4.4.10. Versuch J –Realisierbarkeit des 2-Komponenten-Aufbaus ... 71
4.4.11. Versuch K- Systematische Verdünnung der Biotin-Linker ... 72

5. ZUSAMMENFASSUNG ... 74
6. LITERATUR ... 76

Kurzfassung

Die Entwicklung von Schnelltests für den Nachweis von Biomolekülen ist ein aufstrebendes Gebiet innerhalb der Molekularen Diagnostik. Sehr häufig werden solche Schnelltests in Form von Lateral Flow Tests konzipiert. Neben Heim-Schwangerschaftstests als bekanntestes Beispiel, finden Lateral Flow Tests mittlerweile in vielen Bereichen Anwendung. Vor allem dort, wo ein Ergebnis rasch benötigt wird und nur auf technisch einfache Mittel zurückgegriffen werden kann.

Im Zuge dieser Arbeit wurden kurze DNA-Sequenzen als Zielmoleküle ausgewählt und es sollte versucht werden, diese mit Hilfe von DNA funktionalisierter Goldnanopartikel nachzuweisen. Hierfür wurden im ersten Teil dieser Arbeit Goldnanopartikel synthetisiert, mit Thiol-modifizierten DNA-Strängen funktionalisiert und mittels Elektronenmikroskopie, UV-VIS-Spektroskopie und quantitativer PCR charakterisiert. Zusätzlich wurde auch mittels eines Hybridisierungstests der Funktionalisierungserfolg getestet und Schmelzeigenschaften der miteinander verbundenen DNA-Goldnanopartikel bestimmt. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die hergestellten DNA-Goldnanopartikel mittels Lateral Flow Tests auf ihre Einsatztauglichkeit getestet. Neben der Überprüfung der Machbarkeit des Testaufbaus, wurden im Anschluss daran weitere Versuche durchgeführt um ein besseres Verständnis von den Bindungseigenschaften der DNA-Konjugate auf Testreifen zu erhalten.

Abstract

The development of rapid tests is an emerging field in molecular diagnostics. Rapid tests are often designed in the form of lateral flow devices. Such tests are increasingly applied in a multitude of fields, where results need to be generated fast and by simple means, a well-known example being the home pregnancy test.

The aim of this study is to detect specific short DNA sequences using DNA functionalized gold nanoparticles. In the first part of this study gold nanoparticles where synthesized, functionalized with thiol modified DNA strands and characterized by electron microscopy, UV-VIS spectroscopy and quantitative real-time PCR. Furthermore hybridization tests were performed to check the success of functionalization and getting information on the melting properties of DNA-linked gold nanoparticles.

In the second part of this study the utility of the DNA gold nanoparticles were tested by running several lateral flow tests. Besides testing for feasibility, additional experiments have been conducted to achieve a better understanding of the binding properties of DNA-conjugates on test strips.

Abkürzungsverzeichnis

2K-Aufbau	2-Komponenten-Aufbau
3K-Aufbau	3-Komponenten-Aufbau
AK-GNP	Antikörper-Goldnanopartikel-Konjugat
CL	Capture-Linie
CP	Conjugate-Pad
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
GNP	Goldnanopartikel
LFD	Lateral Flow Tests
LFIA	Lateral Flow Immunoassay
NaCl	Natrium Chlorid
NC	Nitrocellulose
NP	Nanopartikel
PB	Phosphatpuffer
RTM	Rastertunnelmikroskopie
SDS	Natriumdodecylsulfat
-SH	-Thiol
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
STV	Streptavidin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
T_m	mittlere Schmelztemperatur
UHQ-H_2O	Ultra-high Quality-H_2O
USTEM	Universitärer Service für Transmissions-Elektronenmikroskopie

1. Einleitung

1.1. Verwendungszweck, Synthese und besondere Eigenschaften von (Gold)nanopartikel

1.1.1. Warum Nanopartikel in der Molekularen Diagnostik ?

Der Einsatz von Nanopartikel (NP) für die Analytik von Biomolekülen ist ein seit mehreren Jahrzehnten aufstrebender Bereich. Die dafür eingesetzten NP beziehungsweise Nanomaterialen werden zumeist über deren Größe definiert. So bezeichnet zum Beispiel die Europäische Kommission Partikel dann als Nanomaterialien, wenn ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm liegen [2]. Die Besonderheit von Partikeln in Nanoform liegt in der vergrößerten, frei zur Verfügung stehenden Oberfläche. Denn je kleiner der Durchmesser eines Partikels wird umso mehr vergrößert sich das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen (Abbildung 1).

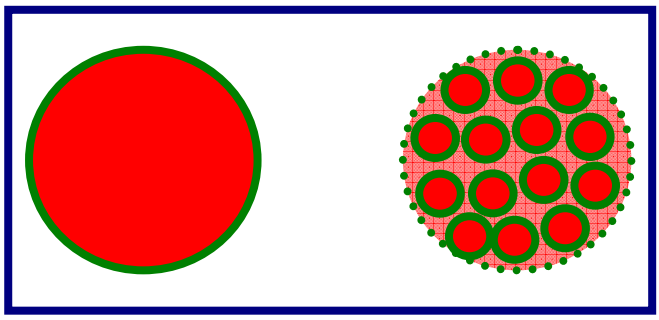

Abbildung 1. Schematische Darstellung der Erhöhung des Oberflächen zu Volumenverhältnisses, wenn der Partikeldurchmesser verkleinert wird. Die dunkelgrünen Bereiche repräsentieren die für physikalische oder chemische Reaktionen frei zur Verfügung stehende Oberfläche.

Eben diese drastisch vergrößerte Gesamtoberfläche einer Lösung mit NP ermöglicht es chemophysikalische Vorgänge, in einer relevanten Größenordnung, zwischen den Partikeln und deren Umgebung ablaufen zu lassen. So besteht zum Beispiel die Möglichkeit eine Vielzahl an Biomolekülen, wie zum Beispiel Proteine oder DNA, an die Oberfläche von NP adsorbieren zu lassen. Gezielt gewählt, können diese

Biomoleküle funktionelle Eigenschaften aufweisen. Für den Bereich Molekulare Diagnostik von Interesse sind dabei Moleküle, welche spezifisch an andere Moleküle - so genannte Zielmoleküle – binden können (Abbildung 2). Diese Zielmoleküle können zum Beispiel potentielle Allergene, toxische Substanzen oder andere Indikationsmoleküle sein an deren Anwesenheit, Abwesenheit oder Konzentration man innerhalb einer Probe interessiert ist.

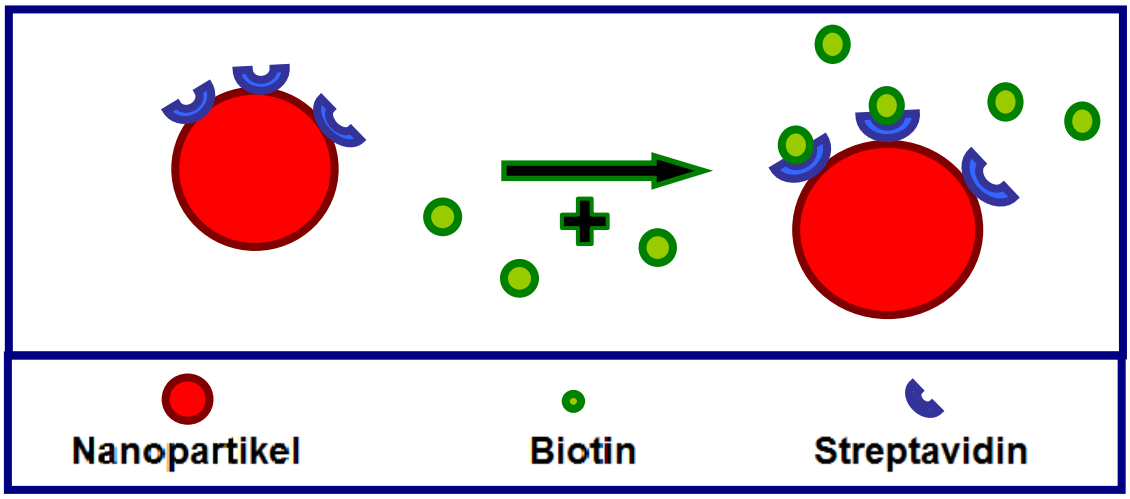

Abbildung 2. Beispiel für eine hochspezifische Bindung zwischen zwei Biomolekülen links: Nanopartikel-Streptavidinkonjugat (Sonde) rechts: Zugefügtes Biotin (Zielmolekül) bindet spezifisch an Streptavidin.

Die zweite bemerkenswerte Eigenschaft von NP ist die Tatsache, dass Partikel, elektromagnetische Wellen auf eine besondere Weise absorbieren können (siehe Kapitel 1.1.5). Dieser Effekt, die sogenannte Oberflächen Plasmonen Resonanz (SPR), ist verantwortlich für die sehr starke Färbung von NP (Abbildung 3).

Abbildung 3. Verschiedene Farben von Nanopartikeln aufgrund unterschiedlicher Formen und Größen [3].

Ein NP kann also als spezifischer Einfänger von Zielmolekülen und zusätzlich als anschließender Signalerzeuger agieren. Diese Kombination von zwei analytisch wichtigen Fähigkeiten machen NP beziehungsweise deren Konjugate mit Biomolekülen zu einem seit vielen Jahren erfolgreich eingesetzten Material im Bereich der Molekularen Diagnostik.

Zusätzlich zu den oben genannten Eigenschaften, sollten NP einfach herzustellen, in einer einheitlichen Größe, stabil und möglichst kostengünstig sein. Gold hat sich in der Vergangenheit als ideales Material für die Erzeugung von NP bewährt. Goldnanopartikel (GNP) gehören zweifelsfrei zu den am häufigst eingesetzten NP und man kann auf jahrzehntelange wissenschaftliche Forschung zurückgreifen. GNP haben einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten, bei einem Durchmesser von rund 15 nm weisen sie eine tiefrote Färbung auf und sind somit ein ausgezeichnetes Material für optische Nachweismethoden [4].

1.1.2. Allgemeine Herstellung von NP

Eine sehr häufig angewandte Stragie um NP herzustellen ist die sogenannte bottom-up Methode. Ausgehend von den einzelnen Atomen wird ein Partikel in Nanogröße durch eine Art Kristallisation aufgebaut. Im konkreten Fall von GNP werden üblicherweise zweiwertige Goldionen (Au^{2+}) zu metallischen Goldatomen reduziert. Da die Löslichkeit von metallischen Goldatomen sehr gering ist, kommt es innerhalb kürzester Zeit zu einer Ausbildung von Kristallen, welche ab einer gewissen Größe als NP bezeichnet werden. Durch gezieltes Einstellen von Prozessparametern kann die Größe und Form der gebildeten Partikel beeinflusst werden. Als Merkmale für die Qualität eines Herstellungsverfahrens von NP dienen in erster Linie Einfachheit des Prozesses, Reproduzierbarkeit sowie Stabilität und einheitliche Größe der erhaltenen NP.

Na_3Citrat als Reduktionsmittel für die Au^{2+}-Ionen wurde erstmals 1951 [5] vorgeschlagen. In der usprünglichen Variante konnten damit kugelförmige GNP in einer wässrigen Umgebungslösung mit einer Größe von ungefähr 20 nm produziert

werden. 22 Jahre später zeigten weitere Versuche, dass das stöchiometrische Verhältnis von Au^{2+}-Ionen zu Na_3Citrat die Größe der produzierten GNP beeinflusst. Umso höher die Konzentration an zugesetztem Reduktionsmittel, desto mehr NP-Keime werden sich zu Beginn des Syntheseprozesses bilden. Dadurch erhöht sich die Anzahl an produzierten NP bei gleichzeitiger Verringerung des erreichten Enddurchmessers der gebildeten NP. Durch Variation der Zugabe von Na_3Citrat konnten monodisperse GNP in einem Größenbereich zwischen 16 und 147 nm hergestellt werden [6]. Um die Reduktion der Au^{2+}-Ionen, üblicherweise eine wässrige $HAuCl_4$-Lösung, zu beschleunigen wird diese erhitzt und erst nach Erreichen des Siedepunktes wird Na_3Citrat hinzugefügt. Nach der Zugabe des Reduktionsmittels lässt man den Reaktionsansatz noch ungefähr 15 Minuten sieden um eine vollständige Reaktion zu gewährleisten. Diese Vorgehensweise wird als die Turkevich-Frens-Methode bezeichnet [6] und gehört zu den am meisten angewendeten Verfahren für die Herstellung von GNP. Im Laufe der Zeit wurde eine Vielzahl von Alternativen zu Citrat als Reduktionsmittel gefunden. So gibt es zum Beispiel erfolgreiche Versuche Ascorbinsäure [7] oder auch die Aminosäure Tryptophan [8] für die Herstellung von GNP zu verwenden.

Eine weitere sehr populäre Methode ist die Synthese von GNP in organischer Phase. Hierbei wird in einem H_2O/Toluol-Zweiphasensystem $HAuCl_4$, mit Hilfe des Reduktionsmittels Tetraoctylammoniumbromid und in Anwesenheit von Dodekanthiol, reduziert und zu GNP aufgebaut. Als Ergebnis erhält man in der oberen, organischen Phase eine bräunliche Flüssigkeit mit GNP im Größenbereich von 1-3 nm, welche automatisch mit den im Syntheseprozess zugesetzten Dodekanthiolen funktionalisiert sind [9].

1.1.3. Einzelne Schritte der Synthese mit Hilfe der Turkevich-Frens-Methode

Im Laufe der Synthese von GNP können mehrere Farbumschläge beobachtet werden, welche Rückschlüsse auf die jeweilige geometrische Form der gebildeten

Goldcluster zulässt (Abbildung 4). Die anfängliche blass-gelbliche $HAuCl_4$-Lösung entfärbt sich nach Zugabe des Reduktionsmittels schlagartig. Wenige Momente danach ändert sich die Farbe auf dunkelblau bis schwarz. Sobald ein Partikeldurchmesser von ungefähr 2 nm erreicht wird ändert sich die Farbe auf rot [10]. Dies ist ein guter Hinweis darauf, dass sich kugelförmige, einzelnd vorliegende NP gebildet haben.

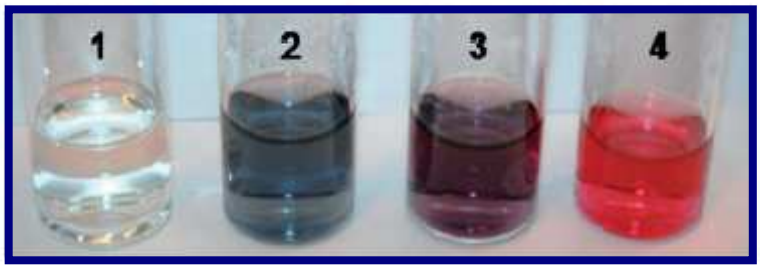

Abbildung 4. Unterschiedliche Prozesschritte während der Herstellung von GNP und deren spezifische Farben. 1: Gelöste Goldionen. 2: Bereits reduziertes Gold ca. 60 Sekunden nach der Zugabe von Citrat. 3: Reduziertes Gold kurz vor der Ausbildung von kugelförmigen GNP. 4: Endgültige Farbe der GNP [11].

Während die rote Färbung der Endlösung leicht erklärbar ist, kommt die kurzfristige Farbänderung nach der Zugabe des Reduktionsmittels auf dunkelblau eher unerwartet. Aufnahmen der dunkelblauen Lösung mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zeigten, dass sich die gebildeten Kristalle zu schlangenartigen Aggregaten zusammengefügt haben (Abbildung 5). Diese Form ist ein Zwischenschritt zur Ausbildung der kugeflförmigen NP und verursacht die dunkelblaue Farbe [10].

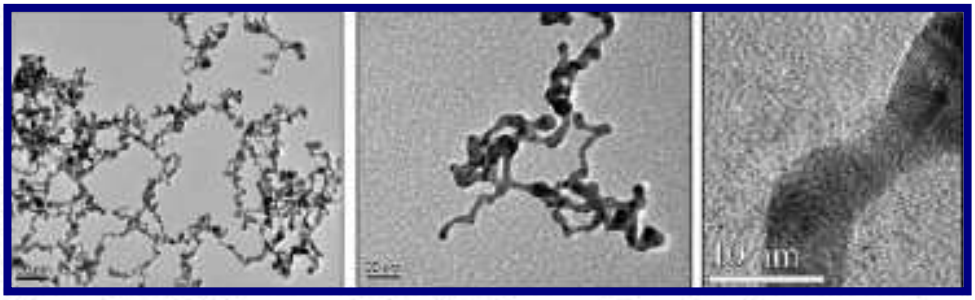

Abbildung 5. TEM-Aufnahmen von GNP unmittelbar nach der Zugabe von Citrat. Die Aufnahmen zeigen, dass sich die GNP zu schlangenartigen Aggregaten zusammenschließen. Dieser kurzfristig vorliegende Zustand wird als Grund für die schwarze Farbe vermutet [10].

1.1.4. Stabilität von GNP

Partikel in Nanoform befinden sich generell in einem instabilen Zustand und neigen zur Ausbildung von Aggregaten. Um diese Agglomeration zu verhindern, ist es nötig die Oberfläche der fertigen GNP mit einer Art Schutzschicht zu modifizieren. Zumeist ist es jedoch so, dass die für die Reduktion der Au^{2+}-Ionen eingesetzten Moleküle im Anschluss an die fertigen GNP spontan an deren Oberfläche adsorbieren. Diese Schutzschicht kann die GNP auf Grund sterischer Effekte vor einer unerwünschten Aggreagtion schützen. Ist das Schutzmolekül geladen, kommt es zusätzlich zu einer elektrostatischen Abstoßung der GNP untereinander. Im konkreten Fall der Turkevich-Frens-Methode, adsorbieren Citrat-Moleküle an die Oberfläche der gebildeten GNP und wirken als guter Stabilisator. Die, aufgrund des adsorbierenden Citrats, negativ geladenen GNP stoßen sich gegenseitig ab (Abbildung 6) und eine unerwünschte Bildung von GNP-Aggregaten wird unterdrückt. Bei kühler und dunkler Lagerung können Citrat-GNP über mehrere Monate gelagert werden [12].

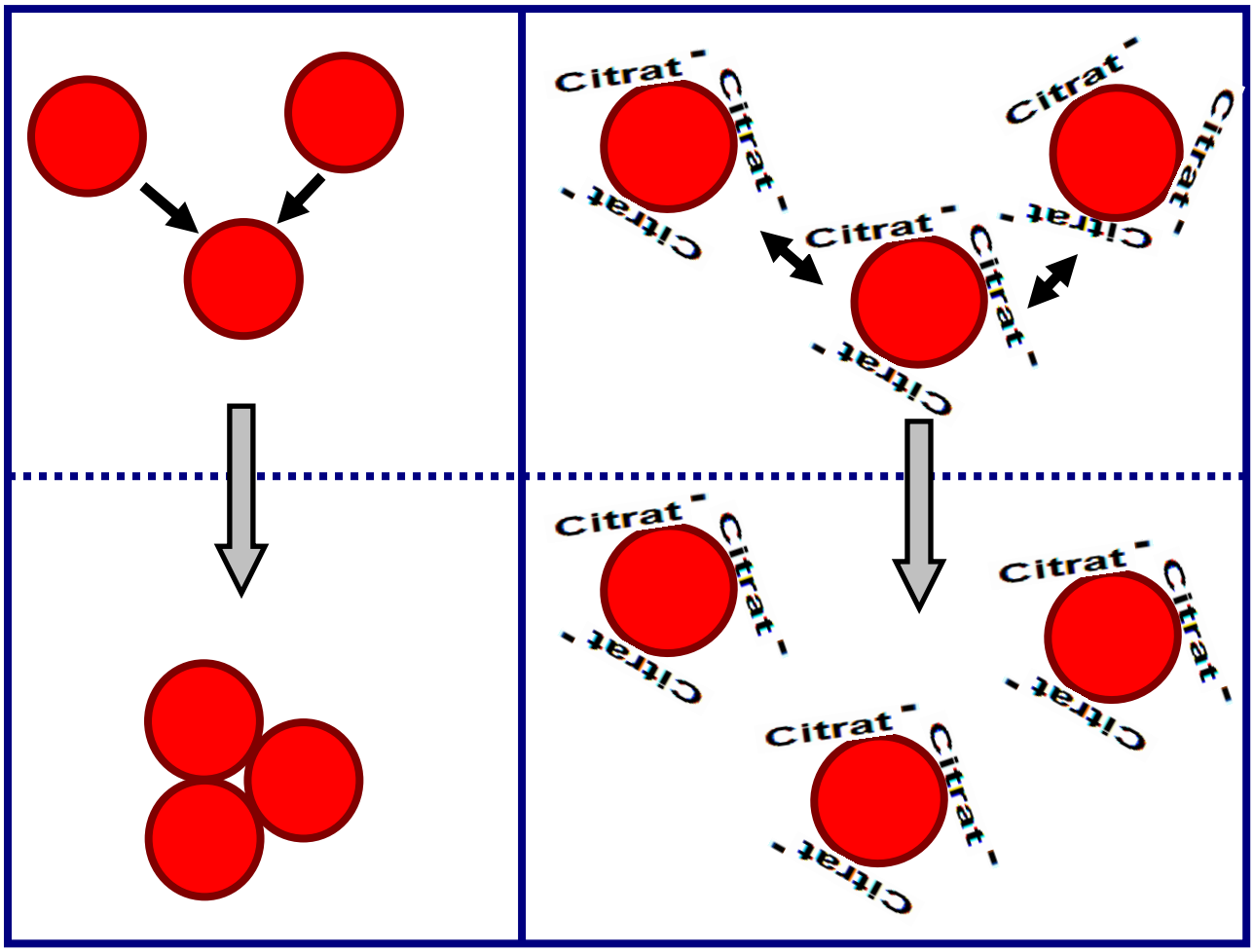

Abbildung 6. Links: Ungeschützte Nanopartikel neigen spontan zu der Ausbildung von Aggregaten. Rechts: Elektrostatische Abstoßung zwischen den negativ geladenen GNP-Citrat-Konjugaten verhindert eine unerwünschte Aggreagtion der NP.

1.1.5. GNP als optische Signalgeber

Charakteristisch für viele Metalle, welche in Nanoform vorliegen, ist deren intensive Farbe. Dies macht NP zu idealen Materialen für analytische Aufgaben in denen eine einfache, optische Detektionsmethode ausreicht oder sogar erwünscht ist. GNP sind, je nach Größe und Form, zumeist rot gefärbt. Der Effekt der SPR tritt erst ab einem Partikeldurchmesser von ungefähr <100 nm auf. Im Detail handelt es sich um eine oszillierende Bewegung der frei beweglichen Elektronen im Metallverband der NP (Abbildung 7). Diese Oszillation des Leitungsbandes wird durch elektromagnetische Strahlung (Licht) induziert.

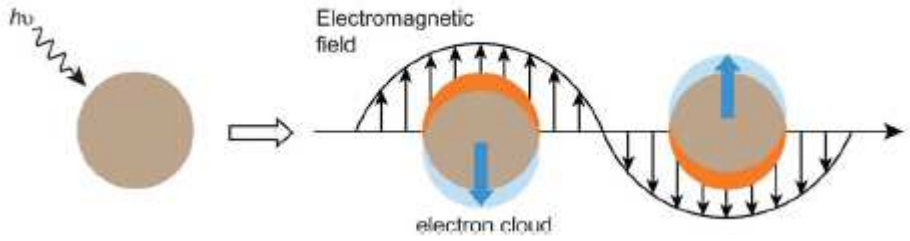

Abbildung 7. Schematische Erklärung der Ursache für den SPR-Effekt. Eleketromagnetische Strahlung trifft auf ein NP. Durch diese Strahlung wird eine oszillierende Bewegung der frei beweglichen Elektronen an der Metalloberfläche induziert [13].

Die SPR ist abhängig von Größe und Form der Partikel [14, 15]. Zusätzlich hat die Ausbildung von Partikelaggregaten einen deutlichen Einfluss auf die SPR. So sind zum Beispiel einzeln vorliegende GNP mit einem Durchmesser von ungefähr 13 nm intensiv rot gefärbt. Sobald diese aber aggregieren ändert sich die Farbe ins bläuliche

1.1.6. Qualitative Überprüfung und quantitative Bestimmung von GNP

Die SPR einer NP-Lösung kann einfach und schnell mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden. Da das Absorptionsmaximum maßgeblich von Form und Größe der NP abhängt, ist es also möglich über eine photometrische Bestimmung Rückschlüsse auf die geometrische Form der NP ziehen zu können. Damit steht eine schnelle und einfache Methode für die Überprüfung des Syntheseerfolges zur Verfügung, welche in der Praxis auch routinemäßig eingesetzt wird. GNP mit einer Größe von 13 nm besitzen ihr Absorptionsmaximum bei ungefähr 519 nm, Partikel in der Größe von 60 nm bei 533 nm [11]. Innerhalb dieses Bereiches weist die Abhängigkeit des Absorptionsmaximums vom Durchmesser ein lineares Verhalten auf (Abbildung 8).

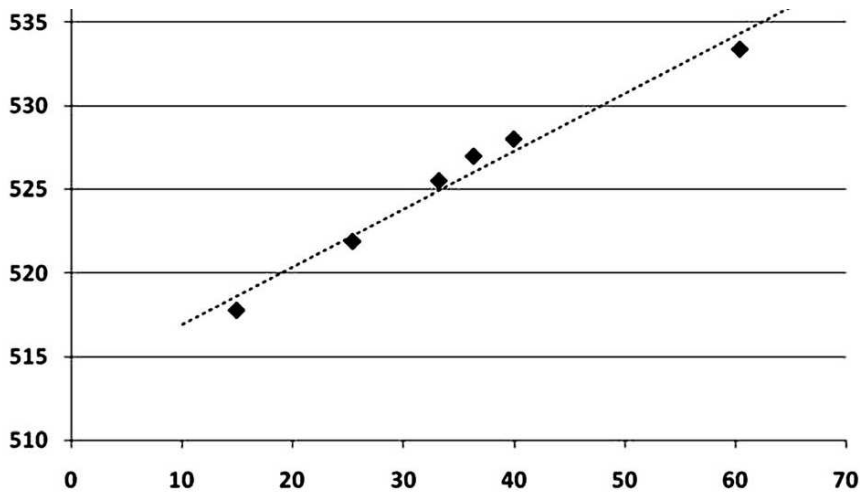

Abbildung 8. Linearer Zusammenhang zwischen der Größe und dem Absorptionsmaximum von GNP zwischen 13 und 60 nm [11].

Alternativ zur Photometrie, steht mit der Transmissionselektronemikroskopie eine weitere Methode zur Verfügung um die geometrische Form der GNP genauer analysieren zu können.

Im Gegensatz zur Größe, stellt die Bestimmung der Partikelanzahl innerhalb einer Lösung ein größeres Problem dar. Standardmäßig wird von der eingewogenen Goldmenge, mit Hilfe der Dichte und dem Volumen der GNP (welche idealisiert als kugelförmig angenommen werden) auf die theoretische Partikelanzahl umgerechnet. Für diese Art der Berechnung muss davon ausgegangen werden, dass die gesamten Goldionen im Zuge der Synthese verbraucht werden [6].

1.2. Modifizierte GNP

1.2.1. Selbstanlagernde Monoschichten an Goldoberflächen

1.2.1.1. <u>Erste Versuche</u>

Bevor GNP gezielt mit funktionellen Molekülen modifiziert wurden, gab es bereits Versuche makroskopische Goldoberflächen mit einer selbstanlagernden Monoschicht zu überziehen und damit die Eigenschaften der Metalloberfläche zu modifizieren. So ist es zum Beispiel möglich die Oxidationsempfindlichkeit von Metallen aufgrund der

schützenden Monoschicht deutlich zu reduzieren. Diese grundlegende Forschung lieferte Erkenntnisse, die einen wichtigen Beitrag zu der Entwicklung von hochfunktionellen modifizierten GNP, wie man sie heutzutage einsetzt, führte.

Das Phänomen, dass gewisse organische Moleküle, genauer gesagt ihre funktionellen Gruppen, relativ stark an die Oberfläche einer Goldschicht binden können, wurde erstmals, mit auf Schwefelresten basierenden Endgruppen, in den frühen 80er Jahren genauer untersucht. Zu Beginn wählte man Disulfide aus um das Bindungsverhalten von funktionellen Gruppen an Goldoberflächen zu untersuchen [16-18] und kam zu der Erkenntnis, dass diese Disulfid enthaltenden Moleküle ohne größeren Aufwand spontane Monoschichten auf der Oberfläche von Gold ausbilden. In weiterer Folge wurden zahlreiche Versuche mit verschiedenen schwefelhaltigen, organischen Verbindungen durchgeführt (Abbildung 9). Unter anderem ebenfalls mit Thiol-Alkanen [19-21]. Eben diese Thiolgruppen (SH) haben sich im Laufe der Zeit als beliebte Ankergruppe für die Funktionalisierung von Metalloberflächen etabliert.

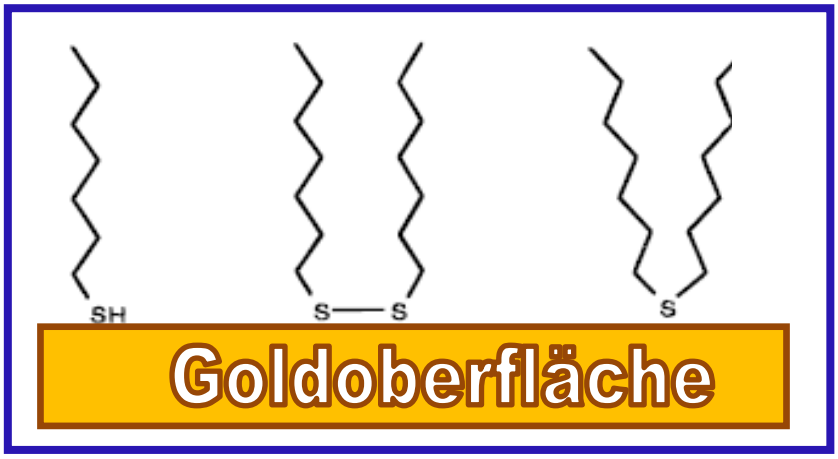

Abbildung 9. Häufig eingesetzte Modifikationen auf Schwefelbasis für die spezifische Adsorption von organischen Molekülen an Goldoberflächen. Von links nach rechts: Alkylthiol, Dialkyldisulfid, Dialkylsulfid.

1.2.1.2. <u>Charakteristik der Au-S Bindung</u>

Neben der reinen Machbarkeit von Au-Thiol (-SH) Monoschichten wurde ebenfalls die genauere Charakteristik dieser Bindung untersucht [22, 23]. So ergaben Messungen, dass die Stärke der Bindung zwischen einem Thiolrest und einer

Goldoberfläche bei dem relativ hohen Wert von ca. 160 kcal/mol liegt [24]. Die Ausbildung von Monoschichten auf Au-Oberflächen kann auch mit bildgebenden Verfahren wie der Rastertunnelmikroskopie (RTM) beobachtet werden (Abbildung 10).

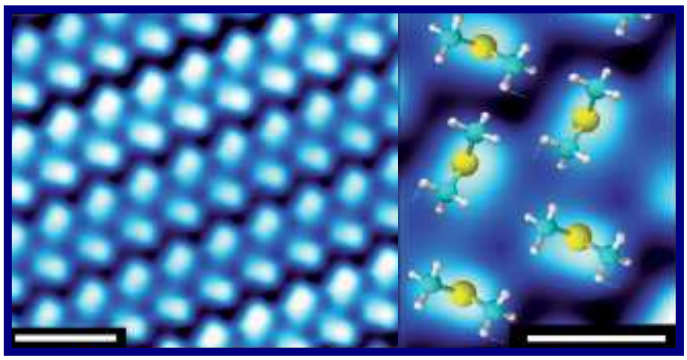

Abbildung 10. Links: RTM-Aufnahme einer Au-Oberfläche mit adsorbiertem Dimethlysulfid. Rechts: Vergrößerter Teilabschnitt des Bildes mit graphischer Darstellung der Orientierung der Dimethlysulfid-Moleküle [25].

1.2.1.3. Nicht Au-S Bindungen

Neben der spontanen Bindung von schwefelhaltigen Gruppen an Goldoberflächen gab es in weiterer Folge ebenfalls Bestrebungen Monoschichten mit anderen Elementen zu erzeugen. Als vielversprechend erwiesen sich Stickstoff-Verbindungen [26]. Die Stärke einer einfachen Au-N Bindung beträgt ungefähr 8 kcal/mol [27]. Konkret wurden zum Beispiel primäre Amine [28] oder die Aminosäure Lysin [29] für die Beschichtung verwendet (Abbildung 11).

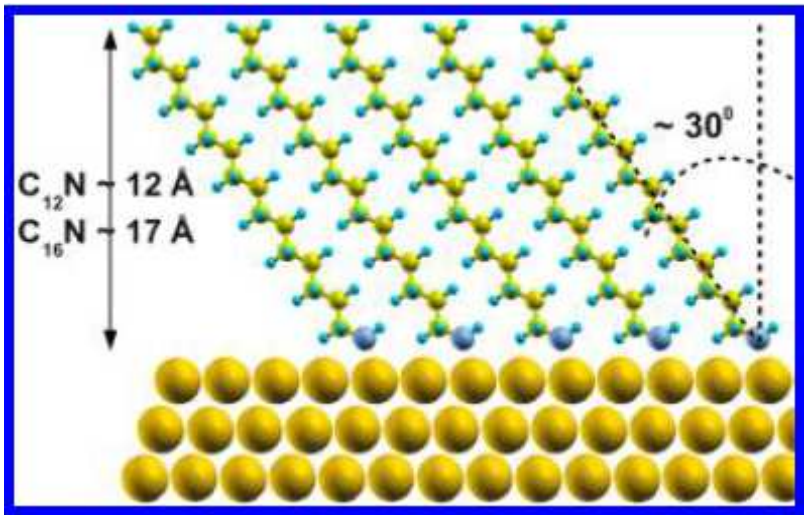

Abbildung 11. Schema einer Au-Oberfläche mit adsorbierten Aminoalkanen. Analog zu Thiolalkanen bindet hier spezifisch die terminale NH_2-Gruppe an die Au-Oberfläche. Bei einer dichten Beladung mit Aminoalkanen beträgt der Neigungswinkel ungefähr 30°. Die Daten wurden mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie ermittelt. [30].

Ebenfalls existiert die Möglichkeit Monoschichten auf Goldoberflächen mit phosphathaltigen Verbindungen zu erzeugen. So wurde zum Beispiel Tricyclohexylphosphine erfolgreich an Au-Oberflächen adsorbiert und charakterisiert [31]. Ebenso gab es Versuche mit adsorbierten Dimethylphenylphosphine, Methyldiphenylphosphine und Triphenylphosphine [32].

1.2.2. Einsatz von DNA-GNP in der Bioanalytik

1.2.2.1. <u>Anwendung von DNA als Klebstoff in der GNP-Bioanalytik</u>

Die positiven Erfahrungen, welche mit der Erzeugung von Au-SH Monolayern gemacht wurden und durch die erfolgreiche Anwendung von GNP-Protein-Biokonjugaten in der Molekularen Diagnostik, führten 1996 zu einer Publikation, welche erstmals die Funktionalisierung von Thiol-modifizierter DNA (SH-DNA) auf GNP [33] beschreibt und zusätzlich eine erste analytische Anwendungsmöglichkeit demonstriert (Abbildung 12).

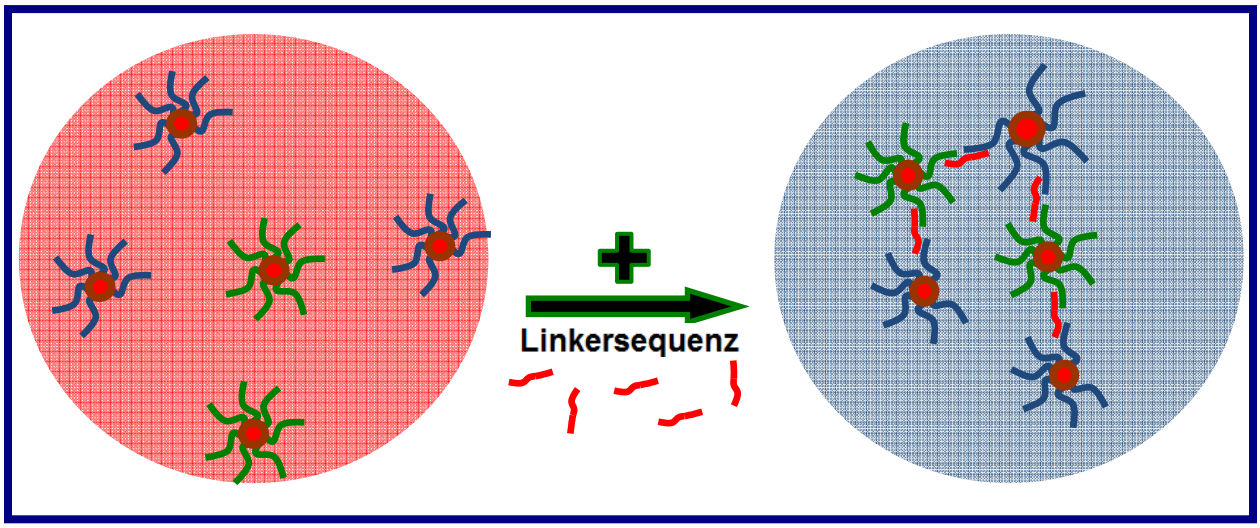

Abbildung 12. Links: Mischung aus zwei verschiedenen DNA-GNP. Rechts: Nach der Zugabe der komplementären DNA-Sequenz verbinden sich die DNA-GNP, sie aggregieren und die Lösung verfärbt sich blau.

Konkret ging es in dem Experiment um zwei Lösungen mit GNP, die mit verschiedenen Oligonukleotidsequenzen funktionalisiert und anschließend miteinander vermischt wurden. Wenn man nun eine, zu den beiden Sequenzen teilkomplementäre, Linkersequenz hinzufügt, kommt es zu einer Aggregation der GNP. Aufgrund dieser Aggregtion ändert sich die SPR der GNP und die ursprünglich rote Lösung verfärbt sich Richtung Blau. Sobald die entstandenen Aggregate eine kritische Größe überschreiten, werden sie instabil und präzipitieren, wodurch sich die Lösung entfärbt. Die eingesetzte Linkersequenz könnte zum Beispiel eine DNA-Sequenz sein, welche spezifisch nachgewiesen werden soll.

Neben der oben beschriebenen Anwendung wurden im Laufe der Zeit zahlreiche Tests entwickelt die in erster Linie auf die Analytik von DNA abzielten. Einen guten Überblick über bereits publizierte Anwendungsmöglichkeiten findet man bei Zanoli et al. [34].

1.2.2.2. Funktionalisierung von Oligonukleotiden an GNP mit Hilfe der Au-SH Bindung

Die am häufigsten durchgeführte Methode um spezifische Bindungen zwischen GNP und DNA herzustellen, ist es DNA-Sequenzen mit einem Thiol-Rest zu modifizieren (Abbildung 13).

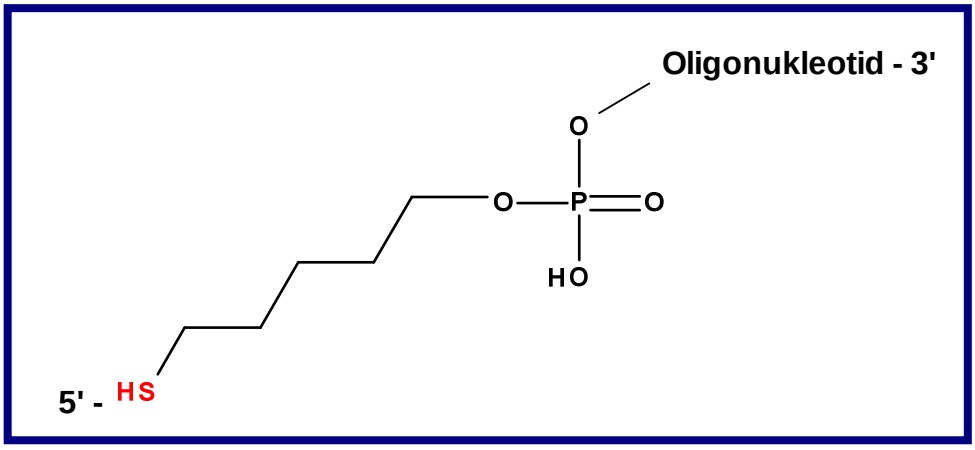

Abbildung 13. Mit Hilfe von Phosphoramtitin 5'Thiol-modifiziertes Oligonukelotid. Diese endständige Thiolmodifizierung eignet sich ausgezeichnet für die Funktionalisierung von GNP mit DNA.

Trotz der hohen Bindungsstärke zwischen der Goldoberfläche und dem Schwefelrest sind Au-SH Bindungen bei steigenden Temperaturen [35] bzw. längerer Lagerzeit [36, 37] nur begrenzt stabil und es kommt zu einer unerwünschten Verringerung der Dichte an direkt gebundenen DNA-Molekülen. Um die Langzeitstabilität der Konjugate zu erhöhen wurden Alternativen zum Thiol-Rest gesucht. So gibt es zum Beispiel Versuche mit cyclischen Disulfidverbindungen [38, 39] oder multiple Thiolreste [40] als Modifizierung für die Oligonukleotide einzusetzen.

1.2.2.3. Wechselwirkungen zwischen unmodifizierter DNA und GNP

Neben Au-SH Bindung für die Funktionalisierung von DNA wurde beobachtet, dass DNA auch direkt an GNP adsorbieren kann [41-44]. Der genaue Mechanismus wie die Adsorption von unmodifizierter DNA an GNP erfolgt ist nicht vollständig geklärt [45]. Verschiedene Theorien wie hydrophobe Wechselwirkungen (Nelson and Rothberg 2011) und spezifische Adsorption der Nukleinbasen stehen zur Diskussion. Auf jeden Fall kann beobachtet werden, dass weniger unmodifizierte DNA an GNP adsorbiert als es bei SH-DNA der Fall ist. Als Grund hierfür kann angegeben werden, dass bei unmodifizierter DNA, anders als bei einer spezifischen Au-S Bindung,

mehrere Kontaktpunkte zwischen GNP und DNA bestehen und somit weniger Platz für weitere DNA-Moleküle zur Verfügung steht.

Als ideal für die Adsorption von DNA-Basen an GNP hat sich Adenin herausgestellt [44]. Diese Affinität von Adenin zu Au-Oberflächen kann man sich zunutze machen und unmodifizierte DNA so designen, dass sie aufgrund eines multiplen Adeninrests möglichst gut an GNP bindet. So kann zum Beispiel über die Länge des Adeninrests einer DNA-Sequenz die DNA-Dichte kontrolliert werden (Abbildung 14).

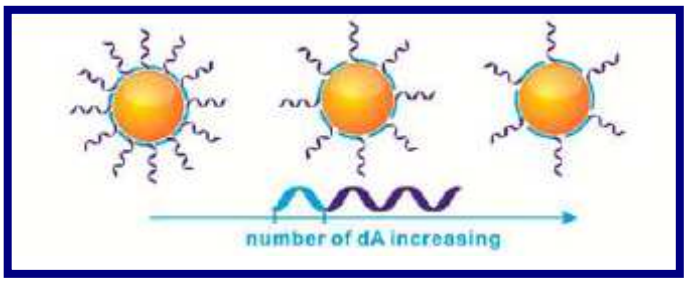

Abbildung 14. Einfluss der Länge des Adeninrests auf die Beladungsdichte der DNA auf GNP [46].

Die Adsorption von Adenin an GNP ist stark genug, dass sich in einer Sekundärstruktur (Haarnadel-Schleife) vorliegende DNA, zugunsten der Adsorption von Adenin an die Au-Oberfläche, auflöst (Abbildung 15).

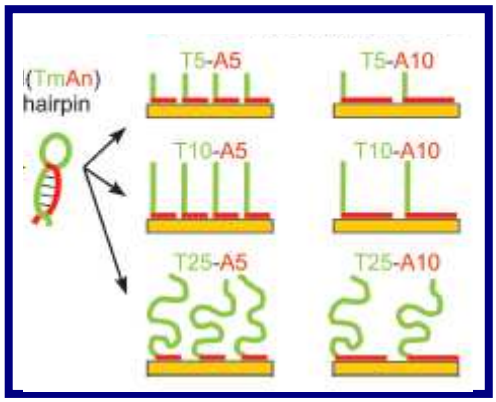

Abbildung 15. Haarnadel-Konfiguration einer multiplen A-T Bindung wird zugunsten der Adsorption des Adeninrests an die Goldoberfläche aufgelöst. Diese Grafik unterstreicht zusätzlich nochmals die Bedeutung der Länge des Adeninrests auf die Beladungsdichte [47].

Problematisch kann die unspezifische Adsorption von DNA an GNP dann werden, wenn der Signalbereich der DNA ungewollt mit der Au-Oberfläche reagiert. Dies kann

die Hybridisierungsgeschwindigkeit negativ beeinflussen. Um dem entgegen zu wirken, sollte der Signalbereich einer DNA möglichst so gewählt werden, dass er möglichst weit von der Oberfläche des Partikels entfernt ist [48]. Ein sorgfältiges Design der DNA-Sequenz hat somit einen nicht unbedeutenden Einfluss auf das Hybridisierungsverhalten zwischen den DNA-GNP und einer DNA-Linkersequenz.

1.2.2.4. Praktische Durchführung der Funktionalisierung und Optimierungsstrategien

Ein wichtiger Schritt hin zu der Entwicklung von qualitativ hochwertigen DNA-GNP ist eine reproduzierbare Anlagerung der Oligonukleotide an die Au-Oberfläche. Da aber DNA ein stark geladenes Molekül ist, verhindern, aufgrund elektrostatischer Abstoßung, bereits an die GNP gebundene DNA-Stränge die Anlagerung von weiteren geladenen Molekülen. Dies führt zu einer Entschleunigung der Adsdorptionsgeschwindigkeit und vermindert effektiv die Anzahl von gebundener DNA auf der Au-Oberfläche [49]. Zusätzlich zu der oben genannten Problematik, neigt DNA zu intramolekularen Wechselwirkungen und weiters kann es zu unspezifischen Bindungen zwischen DNA und GNP kommen. Diese praktischen Hindernisse erschweren die kontrollierte Herstellung von DNA-GNP in Hinsicht auf Anzahl und Art der Bindung zwischen DNA-Molekülen und einem GNP.

Die wohl am häufigsten durchgeführte Methode um DNA-GNP herzustellen verwendet als Ausgangsprodukt die von Turkevich-Frens citratstabilisierten-GNP. Im Anschluss werden die adsorbierten Citratmoleküle durch die Zugabe von SH-DNA ersetzt. Hierbei wird Citrat von der SH-DNA, welche eine viel größere Affinität zu der Au-Oberfläche hat, verdrängt. Für eine anschließende möglichst quantitative Funktionalisierung ist es notwendig, dass die negativen Ladungen der DNA-Stränge durch positiv geladene Gegenionen abgeschirmt werden. In den meisten Fällen wird diese Abschirmung mit Zugabe von Natrium Chlorid (NaCl) in die Funktionalisierungslösung gewährleistet. Jedoch hat derselbe Effekt, nämlich die Verringerung der Abstoßung gleichgeladener Moleküle, wiederrum einen negativen Einfluss auf die Stabilität der GNP. Eine Erhöhung der Salzkonzentrationen verringert

gleichzeitig die Abstoßung der GNP untereinander und als Konsequenz daraus erleichtert dies eine Aggregierung der GNP. Diese unkontrollierte und höchst unerwünschte Erzeugung von Goldclustern verhindert die Erzeugung von genau definierten DNA-GNP und muss daher während der Funktionalisierung so gut wie möglich verhindert werden. Ein eleganter Kompromiss zwischen ausreichender Anlagerung von DNA und guter Stabilität der GNP erreicht man, indem die Salzkonzentration über mehrere Schritte langsam erhöht wird [12]. Durch diese stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration, können sich nach jeder weiteren Erhöhung der NaCl-Konzentration wieder mehr Oligonukleotide an die GNP anlagern und erhöhen somit durch sterische und elektrostatische Effekte die Stabilität der GNP. Dies ermöglicht in weiterer Folge eine erneute Erhöhung der Salzkonzentration. Erste in der Literatur beschriebene Versuche mit dieser Strategie konnten bis zu 2 bis 3 Tage dauern. Die letztendliche Salzendkonzentration beeinflusst die Dichte an adsorbierter DNA. Typische Salzendkonzentrationen liegen in dem Bereich von ca. 0,1 bis 1 M NaCl. Der große Nachteil dieser Methode ist der hohe Zeitaufwand. Daher wurden Optimierungsmöglichkeiten gesucht um den Funktionalisierungsprozess beschleunigen zu können. Am stärksten durchgesetzt hat sich dabei der Einsatz von Stabilisatoren, welche sich an die GNP anlagern und somit die Wahrscheinlichkeit einer Aggregierung durch sterische Effekte verringern. Durch die verbesserte Stabilität der GNP können die Intervalle zwischen den Salzkonzentrationserhöhungen deutlich verringert werden und die Dauer der Funktionalisierung beträgt ungefähr einen Tag [49].

Eine weitere Möglichkeit den Vorgang der Funktionalisierung zu beschleunigen, wurde mit einer Methode beschrieben, in der der pH-Wert des Funktionalisierungsmediums herabgesenkt wurde. Damit wird zugleich die Nettoladung der DNA herabgesetzt und somit die Abstoßung der DNA-Moleküle untereinander reduziert [50].

1.2.2.5. Zusätzliche Stabilisierung der DNA-GNP

Die Zugabe von Stabilisatoren um ein unerwünschtes Aggregieren der DNA-GNP zu verhindert hat sich sehr bewährt. So kann zum Beispiel die Stabilität der DNA-GNP dadurch erhöht werden, indem nach erfolgter Funktionalisierung die noch übriggebliebene freie Goldoberfläche mit leicht adsorbierenden Molekülen abgesättigt wird. Hierfür bieten sich in erster Linie Moleküle an, welche ungeladen sind und standardmäßig bereits eine Thiolgruppe enthalten [51]. Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz von Biomolekülen wie zum Beispiel Bovine Serum Albumin (BSA), welches häufig bei der Erzeugung von Protein-GNP-Konjugaten verwendet wird.

Neben einer abschließenden Stabilisierung der DNA-GNP, existieren ebenfalls Stabilisatoren, welche bevorzugt zu Beginn der Funktionalisierung eingesetzt werden. Wichtig dabei ist, dass der verwendete Stabilisator die Funktionalisierung von GNP mit DNA nicht beeinträchtigt. Zumeist handelt es sich um ionische oder nichtionische Detergenzien [52] wie zum Beispiel Tween 80 [53] oder Natriumdodecylsulfat (SDS) [49].

Auch die DNA-GNP umgebende Flüssigkeit kann die Stabilität beeinflussen. Versuche mit DNA-GNP, welche sich in einer Lösung mit einer hohen Konzentration von Polymeren befinden, halten sich auch in relativ hohen NaCl-Konzentrationen stabil. Unter denselben Bedingungen aber ohne Polymere kommt es hingegen zu einer Aggregation [54, 55].

1.2.3. Veränderte Eigenschaften der DNA- DNA Hybridisierung durch die Konjugierung mit GNP

Der Schmelzbereich von frei vorliegenden Oligonukleotiden verläuft normalerweise über einen relativ weiten Temperaturbereich. Die Temperatur, bei welcher die Hälfte aller Oligonukleotidsequenzen aufgeschmolzen ist, bezeichnet man als den T_m-Wert.

Da sowohl Länge als auch Basenabfolge einen Einfluss auf den T_m-Wert haben, wird dieser häufig als Charakterisierungsmerkmal für eine Oligonukelotidsequenz verwendet. Eine bemerkenswerte Eigenschaft von DNA-GNP ist das veränderte Schmelzverhalten zwischen zwei miteinander hybridisierten DNA-GNP. So zeigten Versuche mit hybridisierten DNA-GNP, dass sich der Schmelzbereich (Abbildung 16) deutlich verschmälert [56-58].

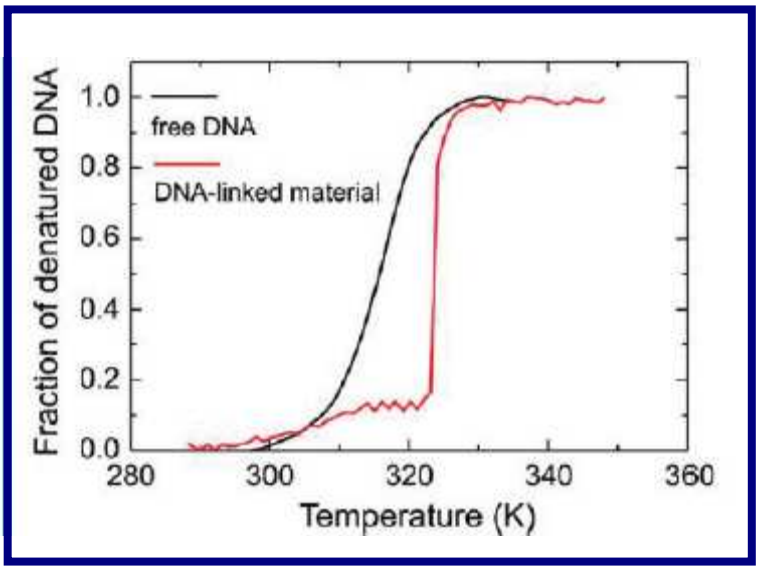

Abbildung 16. Frei in Lösung vorliegende dsDNA hat einen wesentlich größeren Schmelzbereich als DNA, welche mit GNP verbunden ist [56].

Der verschmälerte Schmelzbereich von hybridisierten DNA-GNP eröffnet interessante Einsatzmöglichkeiten. Denn umso schmäler der Schmelzbereich umso genauer kann man, aufgrund eines Farbumschlages, den Schmelzvorgang beobachten. So besteht die Möglichkeit, sogar auf Basis einer einfachen, optischen Auswertung, zwischen perfekt zusammenpassenden Sequenzen und welchen mit Mismatches zu unterscheiden [59].

Der T_m-Wert von in Lösung frei vorliegenden, hybridisierten Oligonukleotiden kann mit Hilfe mathematischer Berechnungen zufriedenstellend vorhergesagt werden. Bei hybridisierten DNA-GNP ist diese relativ einfache Vorhersage nicht möglich. So zeigten Schmelzversuche, dass derzeit kein klarer Zusammenhang zwischen der ausgetauschten Art der Base und der Änderung des T_m-Werts bekannt ist [60]. Sowohl Art der ausgetauschten Base als auch deren Position innerhalb der Sequenz

können maßgeblich die Änderung der Schmelztemperatur beeinflussen. Unerwartet ist ebenfalls die Beobachtung, dass die Einbringung von Mismatches zu einer Erhöhung des Schmelzpunktes führen kann [61].

1.2.4. Hybridierungszusätze

Der Einsatz von „Hybridisierungszusätzen“, wie jene die bereits von Assays mit freien Oligonukleotiden bekannt sind, ist noch relativ unerforscht. Da für eine zukünftige Analysenmethode mit GNP-Sonden die Hybridisierungseigenschaften eine wichtige Rolle spielen, wurde dieser Paramter innerhalb dieser Arbeit unter besonderer Aufmerksamkeit mitberücksichtigt. Wie bereits von frei in Lösung vorliegenden Oligonukleotiden bekannt, wird das Hybridisierungsverhalten vom umgebenden Lösungsmittel deutlich beeinflusst. Zum Beispiel kann sich eine Umgebungslösung bestehend aus H_2O und zusätzlich Ethanol als beschleunigend auf die Hybridisierungsgeschwindigkeit von DNA-GNP auswirken. Ebenfalls kann durch die Zugabe von Ethanol eine Herabsenkung des T_m-Werts erreicht werden [62].

1.3. Lateral Flow Tests kombiniert mit DNA-GNP

1.3.1. Einleitung

Von Dünnschichtchromatographie (DC) und Immunoassays inspiriert, wurden in den 80er Jahren die ersten kommerziellen Lateral Flow Tests (LFD) entwickelt [63, 64]. Vom Prinzip her werden die nachzuweisenden Moleküle, ähnlich wie bei einer DC, mittels eines Laufpuffers, eine Membran entlang hinaufbefördert und an einer Capture-Linie (CL) spezifisch eingefangen. Die CL wurde zuvor auf der Membran fixiert. Um die eingefangenen Moleküle als optisch erkennbare Linie auswerten zu können, müssen diese mit einem Signalerzeuger markiert werden. Im optimalen Fall bindet lediglich das nachzuweisende Zielmolekül an der CL (Abbildung 17). Der restliche Teil der Flüssigkeit sollte die CL passieren können und sich am oberen Ende des LFD-Streifens ansammeln. Dieser Testaufbau ermöglicht den spezifischen Nachweis eines bestimmten Moleküls innerhalb kurzer Zeit mit einfachen Mitteln.

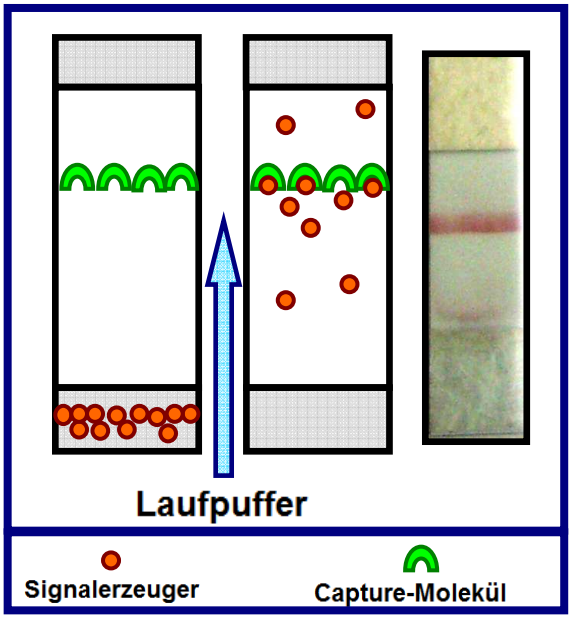

Abbildung 17. Einfaches Schema zur Verdeutlichung wie es zu einer gefärbten Linie auf einer LFD-Membran kommt. Links: Signalerzeuger befinden sich am unteren Ende des Streifens. Mitte: Mit Hilfe eines Laufpuffers werden die Signalerzeuger entlang des Streifens transportiert und von den Capture-Molekülen spezifisch eingefangen. Rechts: Aufnahme eines positiven LFD-Streifens mit der , für GNP charakteristischen, roten Linie, welche mit freiem Auge gut auswertbar ist.

Ursprünglich wurden LFDs für den Nachweis von Proteinen und Hormonen entwickelt und vermarktet. Die Tests mit den höchsten Verkaufszahlen sind dabei zweifelsfrei Schwangerschaftstests. Hierbei wird spezifisch auf das Vorhandensein des Schwangerschaftshormons Humane Choriongonadotropin in Urin getestet. Im Laufe der Zeit konnte das Analysenspektrum jedoch stark vergrößert werden. So haben zum Beispiel Anwendungen für den Nachweis von Infektionskrankheiten ebenfalls sehr hohe Absatzzahlen [65].

1.3.2. Verwendung von funktionalisierten GNP für den Nachweis von Biomolekülen in Lateral Flow Tests.

Die Fähigkeit von GNP, welche auf Grund ihrer intensiven Farbe sehr gute optische Signalerzeuger sind, Biomoleküle wie Proteine oder DNA, die wiederrum als spezifische Capture-Moleküle fungieren können, an sich binden zu können, macht funktionalisierte GNP zu einem der am häufigsten eingesetzten Signalerzeugern in LFDs.

1.3.2.1. Lateral Flow Immunoassays:

Die zahlenmäßig am stärksten vertretenen Tests basieren rein auf der Verwendung von GNP-Protein-Konjugaten und werden als Lateral Flow Immunoassays (LFIA) bezeichnet. Zumeist werden die GNP mit Antikörpern (AK-GNP) funktionalisiert. Zusätzlich wird auch auf der LFD-Membran ein Antikörper als CL fixiert. Analog zu einem Sandwich-Assay kann nun ein Analyt (Antigen) an der CL eingefangen und anschließend vom AK-GNP optisch markiert werden (Abbildung 18).

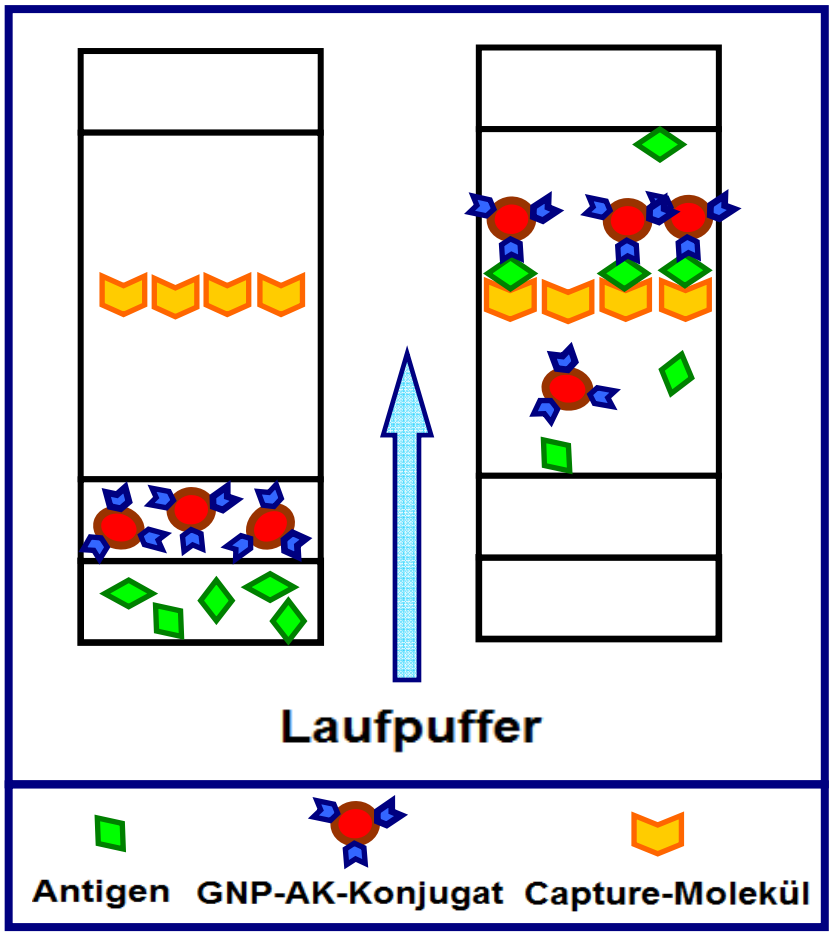

Abbildung 18. LFD mit einem typischen Antikörper-Sandwichtestaufbau. Links: Der Analyt (Antigen) und die Signalerzeuger (GNP-AK-Konjugat) befinden sich gesammelt am unteren Ende des LFD-Streifens. Rechts: Die auf der Membran fixierte CL (bestehend aus Antikörpern) fängt spezifisch den Analyt ein. Am anderen Ende des Analyts bindet zusätzlich der Signalerzeuger und es bildet sich eine rote Linie auf dem Teststreifen aus.

1.3.2.2. Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay

Ebenfalls gut etabliert sind Tests, welche zwar Proteine als Biokonjugat für die GNP verwenden aber trotzdem für den Nachweis von DNA eingesetzt werden [66-70]. Hierbei wird typischerweise die nachzuweisende DNA mittels PCR amplifiziert. Durch den Einsatz von modifizierten (zum Beispiel Haptene) Primern erhält man ein Amplikon, welches potentiell an Antikörper binden kann (Abbildung 19). Dieses Amplikon entspricht also dem Antigen in einem LFIA.

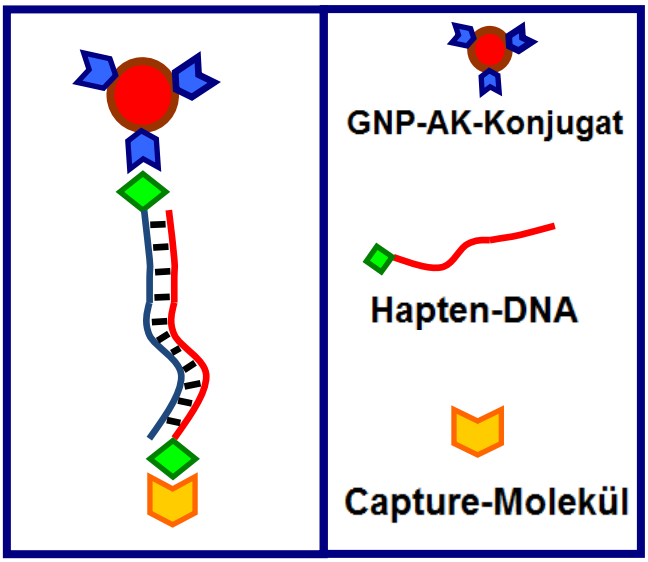

Abbildung 19. Durch Amplifizierung modifizierte dsDNA-Sequenz, welche sowohl von der CL als auch vom AK-GNP spezifisch eingefangen werden kann.

1.3.2.3. Nucleic Acid Lateral Flow Assay

Die großen Fortschritte, welche in der Entwicklung von DNA-GNP gemacht wurden, führten zu der Entwicklung von LFDs die ganz ohne Protein-Konjugate auskommen [71-78]. Dies vereinfacht deutlich den Testaufbau für den Nachweis von DNA-Sequenzen. Im einfachsten Fall können Oligonukleotide direkt auf der Membran als CL fixiert werden. Der nachzuweisende Analyt (DNA-Sequenz) bindet an die DNA-GNP und dieser Komplex kann nun von der CL eingefangen werden (Abbildung 20).

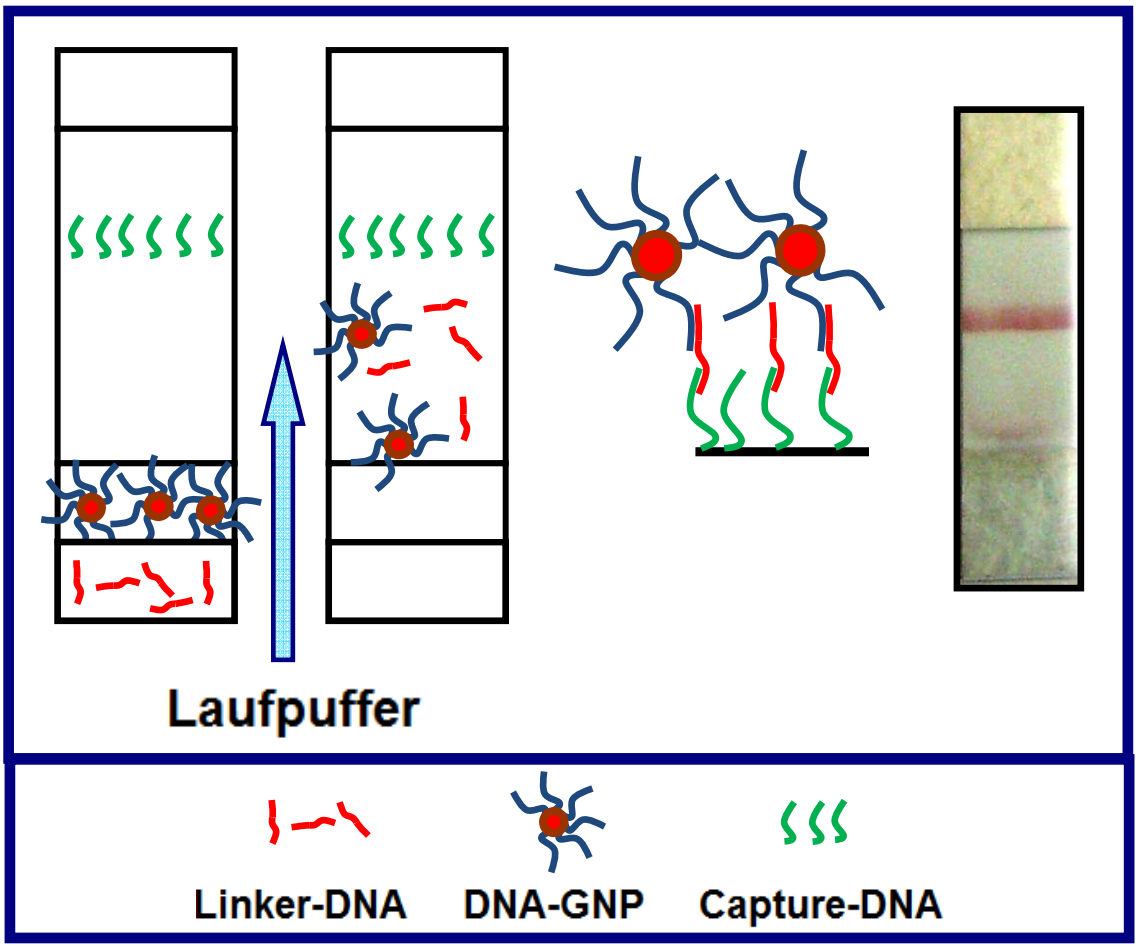

Abbildung 20. Links: DNA-GNP und die nachzuweisende DNA-Sequenz befinden sich am unteren Ende des Teststreifens. Mitte: Ausbildung des Capture-DNA-Analyt-DNA-GNP-Sandwich. Rechts: Ausbildung einer optisch sichtbaren roten Linie auf einem LFD-Streifen

Dieser sehr minimalistische Testaufbau lässt einige Variationsmöglichkeiten zur Optimierung zu. So können für eine stabilere Fixierung der als CL fungierenden Oligonukleotide auf der Membran, diese zum Beispiel mit Streptavidin (STV) [71] oder Biotin modifiziert werden. Oder es wird gänzlich auf DNA als CL verzichtet und stattdessen verwendet man ausschließlich STV [72]. In diesem Fall muss der Analyt jedoch eine terminale Biotinmodifizierung enthalten. Neben dem spezifischen Nachweis von DNA-Sequenzen ist es möglich mit DNA-GNP auch andere Substanzen wie zum Beispiel Schwermetalle nachzuweisen [79].

1.3.3. Bestandteile eines LFD-Streifen

Grundsätzlich ist jeder LFD bezüglich seiner materiellen Bestandteile ähnlich aufgebaut. Geringfügige Unterschiede im verwendeten Material sind jedoch möglich und dienen zur Optimierung in Hinsicht auf die jeweiligen analytischen Erfordernisse. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Bestandteile findet man in dem Buch ‘‘Lateral Flow Immunoassays“ [80]. Im Folgenden wird nur kurz auf die wichtigsten Bestandteile eines LFD-Streifens eingegangen (Abbildung 21).

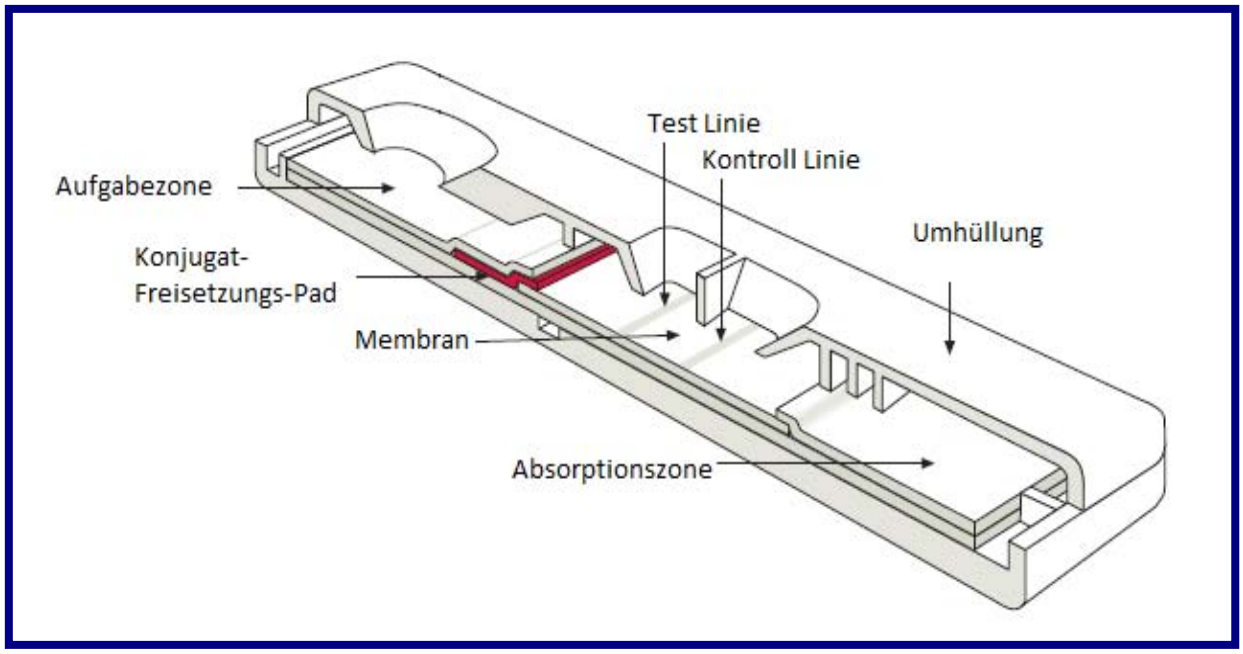

Abbildung 21. Skizze eines typischen LFT-Streifens und seinen wichtigsten Bestandteilen [1].

1.3.3.1. <u>Aufgabezone</u>

Die zumeist aus Zellulose bestehende Aufgabezone dient zur Aufnahme der Probenflüssigkeit. Abhängig von der Probe, kann es zu verschiedenen unerwünschten Adsorptionen kommen. Die Probe muss vom Material quantitativ aufgenommen und rasch an den nächsten Streifenabschnitt weitergegeben werden können.

1.3.3.2. Conjugate-Pad

Am häufigsten wird Glasfaser als Material für das Conjugate-Pad (CP) verwendet. Zwischen Aufgabezone und Membran gelegen, dient es in erster Linie für die Fixierung des GNP-Konjugats. Entscheidend dabei ist, dass die GNP möglichst stabil auf dem CP gelagert werden können und, dass bei Einwirkung des Laufpuffers die selbigen wieder rasch, quantitativ und reproduzierbar freigegeben werden.

1.3.3.3. Membran

Standardmäßig wird für Membranen Nitrocellulose (NC) verwendet. NC wird seit langem in Western Blots eingesetzt und ist in Hinsicht auf ihre Mikrostruktur gut charakterisiert. Unterschiede in der Membran findet man in der Regel lediglich in der Auswahl der Porengröße. Der Porendurchmesser bestimmt den cut-off also bis zu welcher Größe die Partikel noch durch die Membran wandern können. Zusätzlich beeinflusst der Durchmesser der Poren die Flussgeschwindigkeit der Probenflüssigkeit. Die Flussgeschwindigkeit wiederrum bestimmt die Parameter Selektivität und Sensitivität des Nachweises. Daher sollte die Porengröße der eingesetzten NC individuell an jeden Assay angepasst werden.

1.3.3.4. Absorbent-Pad

Als mobile Phase fungiert beim LFD zumeist die Probenflüssigkeit selbst, welche allein durch Kapillarkräfte vom Absorptions-Pad hinauf gesaugt wird. Das Absorbent-Pad besteht üblicherweise aus einem dichten Zellulosematerial, welches eine konstante Aufsauggeschwindigkeit und -kapazität garantieren muss.

2. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es einen Streifentest zu entwickeln, welcher auf Basis von DNA-GNP, für den spezifischen Nachweis einer bestimmten DNA-Sequenz eingesetzt werden kann. Dafür sollen alle Teilschritte hin zum fertigen LFD-Streifen selbst durchgeführt werden.

Im ersten Schritt müssen ungefähr 13 nm große GNP synthetisiert werden und anschließend mittels TEM und UV-VIS-Spektroskopie Größe und Form bestimmt werden. Anschließend sollen die synthetisierten GNP mit SH-DNA funktionalisiert werden und der Funktionalisierungserfolg mittels quantitativer real-time PCR überprüft werden. Neben einer instrumentellen Überprüfung des Funktionalisierungserfolges, sollen auch Hybridisierungsversuche mit den selbst hergestellten DNA-GNP durchgeführt werden. Zusätzlich sollen die Schmelzeigenschaften der hybridisierten DNA-GNP genauer untersucht werden und verschiedene Hybridisierungszusätze auf ihre Funktion als potentielle Schmelzbereichmodifikatoren getestet werden.

Nach der erfolgreichen Durchführung der oberen Schritte, sollen die selbst hergestellten DNA-GNP in praktischen Anwendungsbeispielen verwendet werden um auf LFD-Teststeifen spezifisch DNA-Sequenzen nachzuweisen. Im Anschluss daran sollen systematische Tests durchgeführt werden um Selektivität und Sensitivität des LFD-Tests besser verstehen zu können.

3. Material und Methoden

3.1. Allgemein verwendete Geräte und Materialien

Tabelle 1 führt Geräte auf, welche im Zuge dieser Arbeit verwendet wurden und keinem speziellen Versuch zuordenbar sind.

Bezeichnung	Hersteller
Milli-Q-Plus Anlage	Milipore
Beckman GS-15 Zentrifuge	Beckman
MixMate (Vortexer)	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Waage (max. 3200 g, min. 0,5 g, e=0,1 g, d=0,01 g)	Satorius
Waage (max. 1000 g, min. 0,001 g, e=0,01 g, d=0,01 g)	Satorius
Tubes (1.5 mL, 2 mL)	Eppendorf
Tubes (50 mL)	Sarstedt
Kolbenhubpipetten (1-10 µL, 2-20 µL, 2-100 µL, 20-200 µL, 20-1000 µL)	Eppendorf
Pipettenspitzen (10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Peqlab

Tabelle 1: Auflistung der allgemein verwendete Geräte und Materialien.

3.2. Puffer und Stocklösungen

Für die Bereitung aller Puffer, Lösungen und Verdünnungen wurde ausschließlich UHQ-H_2O aus der Milli-Q-Plus Anlage als Wasserquelle verwendet. Tabelle 2 enthält weitere Reagenzien, welche für die Herstellung der Puffer verwendet wurden.

Bezeichnung	Hersteller
Na_2HPO4	Merck
NaH_2PO4	Merck
NaCl	Roth
UHQ-H_2O	intern

Tabelle 2: Verwendete Materialien für die Bereitung von Puffern und Stocklösungen.

3.2.1. DNA und Streptavidin-Verdünnungspuffer

Oligonukleotid-Sequenzen bzw. Streptavidin wurde von kommerziellen Anbietern bezogen. Für die Reyhdrierung der Bestellungen wurde ein Phosphatpuffer (PB) (50 mM; pH 8,0) verwendet.

3.2.2. Phosphatpuffer (Stocklösung)

Für die Hybridisierung der DNA-GNP wurde ein Phosphatpuffer (0,5 M, pH 8,0) als Stocklösung verwendet. Dieser Puffer wurde sowohl bei den Hybridisierungsversuchen in wässriger Lösung als auch bei den Versuchen mit LFD-Streifen verwendet.

3.2.3. NaCl-Lösung (Stocklösung)

Neben der Standardkonzentration von 0,25 M NaCl in den Reaktionsansätzen wurden auch Versuche mit erhöhter oder erniedriegter NaCl-Konzentration durchgeführt. Hierbei wurde immer mit einer 2 M NaCl-Stocklösung für das Einstellen der Endkonzentration gearbeitet.

3.2.4. LFD-Laufpuffer bzw. Puffer für Hybridisierungsansätze

Für alle Hybridisierungsversuche wurde standardmäßig mit einem Phosphatpuffer (25 mM; 0,25 M NaCl, pH 8,0) gearbeitet. Dieser wurde ebenfalls als Laufpuffer für alle LFD-Versuche verwendet.

3.3. Vorbereitung kommerziell erhaltener Oligonukleotide und Streptavidin

Modifizierte und unmodifizierte DNA wurde in lyophilisierter Form entweder von Eurofins oder Sigma Aldrich bezogen und mit DNA-Verdünnungspuffer (50 mM Phosphatpuffer) auf eine Endkonzentration von 100 µmol/L eingestellt. Das dabei benötigte Volumen ist abhängig von der Syntheseausbeute der Oligonukleotide und wurde jeweils in einem beiliegenden Data-Sheet angegeben. Anschließend wurde die DNA im Thermomixer bei 65℃ für 10 min unter Sc hütteln (1400 rpm) aufgelöst und bei -18℃ im Gefrierschrank aufbewahrt.

Oligonukleotid-Sequenzen, welche als Primer für die quantitative real-time-PCR fungierten, wurden ausgehend von der Stocklösung (100 µmol/L) zusätzlich 1:16 mit Diethyldicarbonat (Roth) behandeltem Wasser verdünnt und ebenfalls bei -18℃ gelagert.

STV (Sigma Aldrich) wurde mit 50 mM Phosphatpuffer auf eine Endkonzentration von 1 mg/mL eingestellt.

3.4. Synthese und Größenüberprüfung der hergestellten 13 nm Goldnanopartikel

3.4.1. Herstellung von 13 nm Goldnanopartikel

Für die Synthese der GNP wurden 100 mL einer 1 mM $HAuCl_4$ –Lösung (Sigma-Aldrich) in einen 250 mL Rundkolben überführt und mittels Heizhaube zum Kochen gebracht. Nach 10 Minuten wurden 10 mL einer 38,8 mM Natriumcitrat-Lösung (Roth) hinzugefügt und für weitere 10 Minuten gekocht. Danach wurde der Kolben von der Heizquelle entfernt. Nach einer Stunde Abkühlzeit wurde die Goldlösung in 50 mL Tubes überführt und bei 4℃ dunkel gelagert.

3.4.2. Bestimmung der Größe mittels UV-VIS-Spektroskopie

Für die photometrische Messung wurde 1 mL der GNP-Lösung 1:4 mit UHQ-H_2O verdünnt und die verdünnte Lösung in eine Küvette aus Kunststoff (Roth) überführt. Anschließend wurde die Absorption mit einem Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda in einem Bereich von 450 bis 650 nm aufgenommen.

3.4.3. Bestimmung der Größenverteilung mittels TEM

Die TEM-Analysen wurden extern vom Universitären Service für Transmissions-Elektronenmikroskopie (USTEM) durchgeführt. 1 µL GNP-Lösung wurde auf 3 mm TEM-Grids mit Formvar/Carbon-Beschichtung (wurden vom USTEM bereitgestellt) pipettiert und vollständig getrocknet. Pro Charge wurde der Durchmesser von jeweils 100 Partikeln ermittelt. Insgesamt wurden TEM-Aufnahmen von drei verschiedenen Chargen ausgewertet und von diesen der Mittelwert für die Ermittlung der Größenverteilung berechnet.

3.5. Funktionalisierung von GNP mit SH-DNA

Tabelle 3 führt Materialien auf, welche für die Funktionalisierung der GNP benötigt wurden.

Bezeichnung	Hersteller
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich
Ethylacetat	Roth
Natrium Dodecyl Sulfat	Roth
Tween 20	Roth

Tabelle 3: Für die Funktionalisierung der GNP verwendete Geräte und Reagenzien.

3.5.1. Funktionalisierung der Goldnanopartikel

Die verwendete SH-DNA wurde zwecks besserer Stabilität in gebundener Form (DNA-S-S-DNA) geliefert. Für die Aktivierung der SH-DNA musste diese Disulfidbindung zu Beginn reduziert werden. Hierfür wurden 40 µL 50 mM PB (pH 8,0), 40 µL SH-DNA (100 µM) und 4 µL 100 mM Dithiothreitol (DTT) in ein 1,5 mL Tube überführt. Der Aktivierungsansatz wurde bei 550 rpm am Thermomixer für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Um das DTT anschließend zu entfernen wurden 100 µL Ethylacetat beigemengt. Die Proben wurden gevortext und die obere Phase (Ethylacetat + DTT) wurde mit einer Pipette vorsichtig entfernt. Dieser Vorgang wurde insgesamt vier Mal durchgeführt. Unmittelbar nach der Extraktion wurden 40 µL der aktivierten DNA mit 1000 µL der GNP-Lösung vermischt und gevortext. Für die Stabilisierung wurden 10 µL einer 1%igen SDS-Lösung hinzugefügt, gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden 20 µL eines 0,5 M PB (pH 8,0) hinzugefügt und für 20 Minuten schwach geschüttelt. Um die Menge an gebundener DNA zu erhöhen, wurde die NaCl-Konzentration stufenweiße erhöht. Die Konzentration wurde unter Zugabe von 2 M NaCl schrittweise um 0,1 M erhöht. Zwischen jeder Konzentrationssteigerung wurden die Proben 30 Minuten bei Raumtemperatur und 600 rpm geschüttelt. Standardmäßig wurde der Funktionalisierungsansatz auf 0.4 M NaCl eingestellt. Die fertig funktionalisierten Goldnanopartikel wurden über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Um die ungebundenen DNA-Stränge zu entfernen, mussten die Proben gewaschen werden. Hierfür wurden die GNP für 50 Minuten bei 9600 rpm abzentrifugiert und der klare Überstand mit einem hohen Anteil an freier DNA wurde mittels Pipette entfernt. Danach wurde der dunkelrote Rückstand in 1000 µL einer 0.1%igen Tween 20 Lösung resuspendiert, gevortext und wieder 45 Minuten bei 9600 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt vier Mal durchgeführt. Die gewaschenen Goldnanopartikel wurden in 1000 µL UHQ-H_2O resuspendiert und bei 4℃ im Kühlschrank gelagert.

3.5.2. Nachweis von gebundener DNA mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie

Mit Hilfe von speziellen Präparationsmethoden wurde der Kontrast von DNA soweit erhöht, dass diese mittels TEM visualisiert werden konnte. Sowohl die Methoden zur Kontrasterhöhung als auch die anschließenden TEM-Analysen wurden vollständig vom Institut für Biophysik an der BOKU Wien übernommen.

3.5.3. Nachweis von gebundener DNA mittels quantitativer real-time-PCR

Für Analysen mit PCR wurden die GNP mit folgender DNA-Sequenz funktionalisiert: SH-GTA TGC CTA GCA CGG AAT TAA CTT GCT AGC CGG GGT ATT TTT GCA CTT GTG AAG TC und für die Messung wurde folgendes Primerpaar verwendet: GCC TAG CAC GGA ATT AAC TTG (forward) bzw. CTT CAC AAG TGC AAA AAT ACCC (reverse). Pro PCR-Ansatz wurden 7,5 µL Kapa SYBR Fast (Master-Mix mit Polymerase,), 5,02 µL Diethyldicarbonat-H_2O, 0,24 µL Primer (forward), 0,24 µL Primer (reverse) zusammengemischt und mit 2 µL Probe bzw. H_2O für die Negativprobe versetzt. Unmittelbar vor Zugabe der Probe wurde bei Bedarf mittels NanoVue (GE Healthcare) die OD_{520} bestimmt. Je nach erwarteter DNA-Konzentration wurden die Proben verdünnt (Faktor 10^{-2} bzw. 10^{-3}). Pro Run wurden mindestens vier Standards verwendet, welche sich um jeweils eine 10er Potenz in ihrer molaren Konzentration unterschieden. Hierfür wurde dieselbe DNA-Sequenz verwendet, mit welcher auch die GNP funktionalisiert worden sind. Die PCR-Runs wurden mit einem Eppendorf-Cycler durchgeführt. Für die Initialisierung wurden die Proben für 3 min auf 95°C erhitzt. Anschließend erfolgten 45 Zyklen mit 95°C für 15 Sekunden und 62,5°C für 45 Sekunden.

3.6. Schmelzversuche von hybridisierten DNA-GNP

3.6.1. Herstellung des Reaktionsansatzes

Für die Bestimmung des Schmelzbereiches wurde standardmäßig ein Hybridisierungsansatz mit einem Endvolumen von 200 µL und einer Enkonzentration von 0,25 M NaCl und 25 mM PB verwendet.10 µL 0,5 M PB (pH 8,0), 122 µL UHQ-H_2O, 25 µL 2 M NaCl, 20 µL 3'-Au-DNA (OD_{520} ~ 0,140), 20 µL 5'-Au-DNA (OD_{520} ~ 0,140) und 3 µL Linker-DNA wurden in ein 1,5 mL Tube pipettiert und gevortext. Danach wurde der Ansatz für 15 min im Thermomix auf 75℃ erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und über Nacht bei 4℃ gekühlt gelagert. Am darauf folgenden Tag wurden die Tubes für einige Sekunden zentrifugiert, sodass sich, bei erfolgreicher Hybridisierung, ein schwarz gefärbtes (aggregierte GNP) Pellet am Boden ausbildet. Neben dem Standard-Reaktionsansatz wurden ebenfalls Versuche durchgeführt bei denen die NaCl-Konzentration variiert oder andere Zusätze (Tabelle 4) verwendet wurden. Zusätzlich wurde die Sequenz der Linker-DNA variiert. Neben dem vollständig komplementären Original-Linker, wurde ebenfalls Linker-DNA mit eingebauten Mismatches getestet.

Bezeichnung	Hersteller
Betain	Sigma-Aldrich
Formamid	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
Glycerin	Sigma-Aldrich

Tabelle 4: Auflistung der verschiedenen Hybridisierungsansätze, welche im Zuge der Schmelzversuche durchgetestet wurden.

3.6.2. Bestimmung des Schmelzbereiches

Schmelzbereiche von hybridisierten Proben wurden optisch durch das Freiwerden von gelösten GNP aus dem aggregierten Pellet bestimmt. Dazu wurde die Probe im Thermomixer stufenweise erhitzt (+1℃ / 2 Minuten). In der Zwischenzeit wurde durch vorsichtiges Kippen des Eppendorf Tubes beobachtet ob sich ein Teil des

Pellets verflüssigt hat. Sobald kein Pellet mehr vorhanden war, wurde die Probe als komplett aufgeschmolzen eingestuft. Für die Auswertung wurde nicht der gesamte Schmelzbereich angegeben sondern eine mittlere Schmelztemperatur. Hierfür wurde mit folgender Formel gerechnet:

$$\text{Mittlere Schmelztemp.} = [(\text{Schmelztemp.}_{Ende} - \text{Schmelztemp.}_{Anfang}) / 2] + \text{Schmelztemp.}_{Anfang}$$

Formel 1: Berechnung der mittleren Schmelztemperatur der miteinander hybridisierten DNA-GNP.

3.7. Versuche mit Streptavidin-Streifen

3.7.1. Aufbau der Streifen

Für den Aufbau der Streifen wurde als Unterlage eine laminierte, einseitig klebende Laminat Karte verwendet. Für die Membran wurden 2,5 cm eines Membranbogens heruntergeschnitten und in die Mitte der klebenden Unterlage gleichmäßig aufgelegt. Anschließend wurde auf die eine Seite ein Streifen Glass Fiber Conjugate-Pad geklebt, sodass die Membran ca. 2 mm überdeckt wurde. Danach wurde das Absorbent-Pad auf die obere Seite der Laminat-Karte geklebt, wobei das Pad wieder 2 mm die Membran überlappte. Die überschüssige Laminat-Karte wurde abgeschnitten. Anschließend wurden für die Versuche einzelne Teststreifen mit einer Breite von 0,75 cm zugeschnitten. Abbildung 22 zeigt den Aufbau der Membran.

Abbildung 22: Aufnahme einer fertig zusammengeklebten Membran.

3.7.2. Sprayen von Streptavidin als Capture-Molekül

Um den Sprayer vorerst zu reinigen wurde er mit 250 µL 96%igem Ethanol, anschließend mit 250 µL einer 0,05%igen Bioterch-Lösung und zuletzt mit 250 µL 50 mM PB jeweils 5 Mal gespült. Danach wurde der Sprayer 5 Mal jeweils mit 100 µL einer 1 mg/mL Streptavidin-Lösung gespült. Für den eigentlichen Sprayvorgang wurde die Membran mit Magneten unterhalb der Düse fixiert und mit einer Konzentration von 0,667 µL/cm in der Mitte der 2,5 cm breiten Membran besprüht. Die fertigen LFD Teststreifen wurden geschnitten und im Exsikkator aufbewahrt.

3.7.3. Verwendete DNA-Konjugate als Testsysteme

Es wurden zwei verschiedene Aufbauarten verwendet (Abbildung 23). Die erste Art besteht aus der Kombination DNA-GNP und Biotin-DNA verbunden durch einen DNA-Linker. Gemeinsam ergeben sie ein System, welches einerseits durch die Biotinmodifizierung an STV (Testlinie) binden kann und andererseits durch den Au-Rest eine optische Auswertbarkeit des Bindungserfolges möglich macht. Die zweite Art beinhaltet ebenfalls eine DNA-GNP-Komponente. Jedoch wurde auf die Biotin-DNA verzichtet und anstatt dessen die Linker-DNA, welche direkt mit dem DNA-GNP

hybridisiert, endständig biotinyliert. Typ 1 wird in weiterer Folge als der 3-Komponenten-Aufbau (3K-Aufbau) und Typ 2 als der 2-Komponenten-Aufbau (2K-Aufbau) bezeichnet.

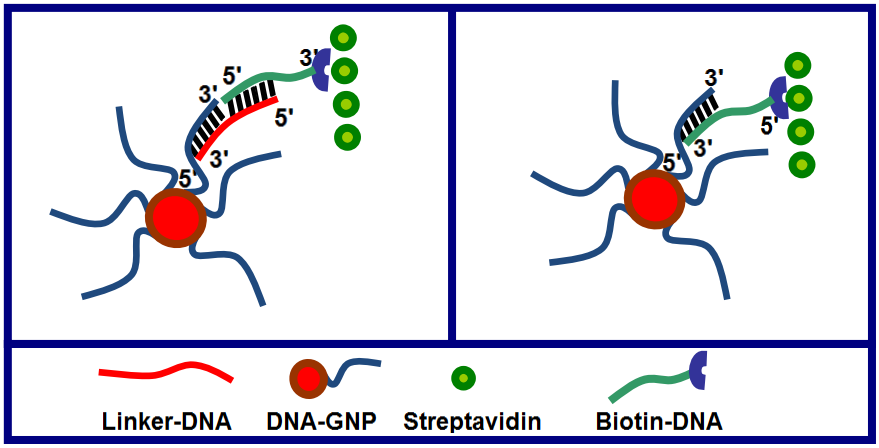

Abbildung 23: Schematische Darstellung der Beiden Hybridisierungsstrategien. Links: Typ 1 mit drei Komponenten. Rechts: Typ 2 mit zwei Komponenten.

3.7.4. Hybridisierungsansatz für die Versuche an Teststreifen

Für den 3K-Aufbau wurde standardmäßig folgender Ansatz verwendet: 60 µL DNA-GNP (OD_{520} ~ 0,140), 3 µL Linker (100 µM, Sequenzen siehe Tabelle 6), 3 µL Biotin-DNA (100 µM) und 160 µL Hybridisierungspuffer. Für die DNA-GNP wurden zwei verschiedene DNA-Sequenzen verwendet. Jede Sequenz wurde jeweils am 5'-Ende oder am 3'-Ende mit einer Thiol-Gruppe modifiziert bezogen. Somit ergeben sich insgesamt vier verschiedene DNA-GNP-Typen, welchem im Zuge der Versuche mit STV-LFD-Teststreifen synthetisiert und zum Einsatz kamen (Tabelle 5).

Beim 2K-Aufbau verringert sich der Ansatz um eine Komponente. Hier wurden 60 µL DNA-GNP (OD_{520} ~ 0,140), 3 µL Biotin-Linker (100 µM) und 160 µL Hybridisierungspuffer verwendet. Der Biotin-Rest wurde ebenfalls sowohl 3'-Endständig als auch 5'-Endständig synthetisiert bezogen.

Bezeichnung	Typ	Sequenz (3' - 5')
M1 5'-SH	SH-DNA	AGG TTG GTG-A(20)-SH
M1 3'-SH	SH-DNA	SH-A(20)-TTT CTT CTG CA
M1 5'-Au	DNA-GNP	[AGG TTG GTG-A(20)-SH]n-Au
M1 3'-Au	DNA-GNP	Au-[SH-A(20)-TTT CTT CTG CA]n
M1 5'-Biotin	Biotin-DNA	AGG TTG GTG-A(20)- Biotin
M1 3'-Biotin	Biotin-DNA	Biotin -A(20)-TTT CTT CTG CA
M2 5'-SH	SH-DNA	TTA TAA CTA TTC CTA-A(20)-SH
M2 3'-SH	SH-DNA	SH-A(20)-CTC CCT AAT AAC AAT
M2 5'-Au	DNA-GNP	[TTA TAA CTA TTC CTA-A(20)-SH]n-Au
M2 3'-Au	DNA-GNP	Au-[SH-A(20)-CTC CCT AAT AAC AAT]n
M2 5'-Biotin	Biotin-DNA	TTA TAA CTA TTC CTA-A(20)-Biotin
M2 3'-Biotin	Biotin-DNA	Biotin-A(20)-CTC CCT AAT AAC AAT

Tabelle 5: Auflistung der unterschiedlichen eingesetzten modifizierten DNA-Sequenzen.

Bezeichnung	Typ	Sequenz (5' - 3')
$M1_{Linker}$	Linker	AAA GAA GAC GTT CCA ACC AC
$M1_{Linker}$ 3'-Biotin	Biotin-Linker	AAA GAA GAC GTT CCA ACC AC -Biotin
$M1_{Linker}$ 5'-Biotin	Biotin-Linker	Biotin-AAA GAA GAC GTT CCA ACC AC
$M2_{Linker}$	Linker	GAG GGA TTA TTG TTA AAT ATT GAT AAG GAT
$M2_{Linker}$ 3'-Biotin	Biotin-Linker	GAG GGA TTA TTG TTA AAT ATT GAT AAG GAT-Biotin
$M2_{Linker}$ 5'-Biotin	Biotin-Linker	Biotin-GAG GGA TTA TTG TTA AAT ATT GAT AAG GAT

Tabelle 6: Auflistung der unterschiedlichen Linker, welche im Zuge dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

Die Volumina des Reaktionsansatzes wurden nach Bedarf angepasst. Um potentielle Pipettierfehler möglichst gering zu halten, wurden die Volumina des Standardansatzes jedoch maximal halbiert um nicht weniger als 1,5 µL pipettieren zu müssen. Durch die Vielzahl an unterschiedlichen Versuchen, welche unter anderem auch die Variation einzelner Komponenten bezüglich ihrer Konzentration oder DNA-Sequenz beinhalteten, wurde häufig mit modifizierten Reaktionsansätzen gearbeitet. Hierbei wurde ein Teil der jeweiligen Stock-Lösung modifiziert und ausgehend davon wurde mit den oben genannten Volumina die entsprechenden Hybridisierungsansätze hergestellt.

3.7.5. Durchführung der Testläufe und Auswertung

Für die Testläufe wurden 0,75 cm breite STV-LFD-Streifen verwendet. 20 µL des jeweiligen Reaktionsansatzes wurden auf das CP pipettiert und im Anschluss in einen Behälter mit LFD-Laufpuffer platziert. Sobald das Absorbent-Pad vollständig mit Laufpuffer angesaugt war (ungefähr 3 Minuten) wurden die Streifen aus dem Behälter mit Laufpuffer entfernt und luftgetrocknet. Die Auswertung des Ergebnisses erfolgte rein qualitativ mit den Bewertungsmöglichkeiten positiv (+), negativ (-) oder sehr schwach positiv (~). Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgte rein auf Basis der Farbintensität welche die Testlinie annahm. Ein beispielhaftes Foto für negative bzw. positive Farbreaktionen befindet sich in Abbildung 24.

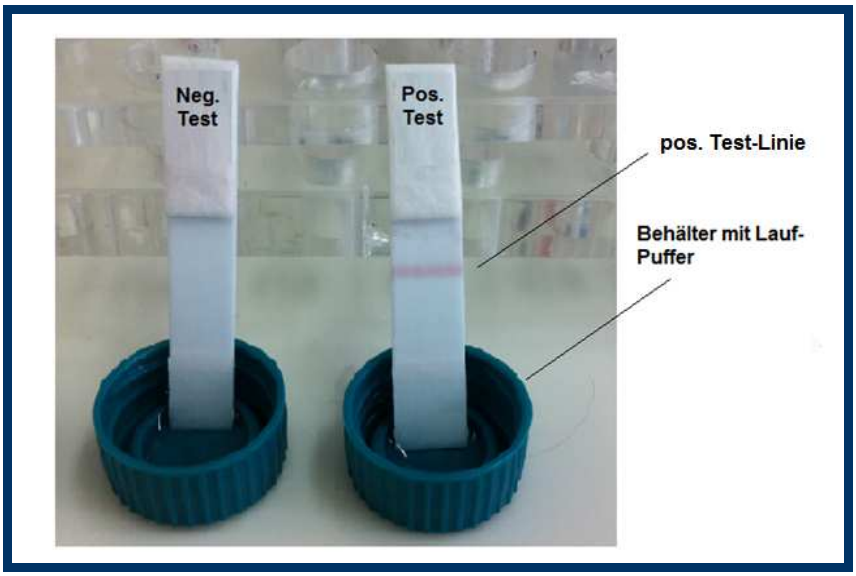

Abbildung 24: Beispiel für ein negatives Testresultat (links) und einem positiven Testresultat (rechts).

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Größenüberprüfung der Goldnanopartikel

Insgesamt wurden 7 Chargen zu jeweils 100 mL an GNP hergestellt. Die Lösungen wiesen eine klare, weinrote Färbung auf.

4.1.1. Bestimmung der Größe mittels UV-VIS-Spektroskopie

Alle sieben hergestellten Chargen wurden direkt nach der Synthese photometrisch auf ihr Absorptionsmaximum überprüft (Abbildung 25).

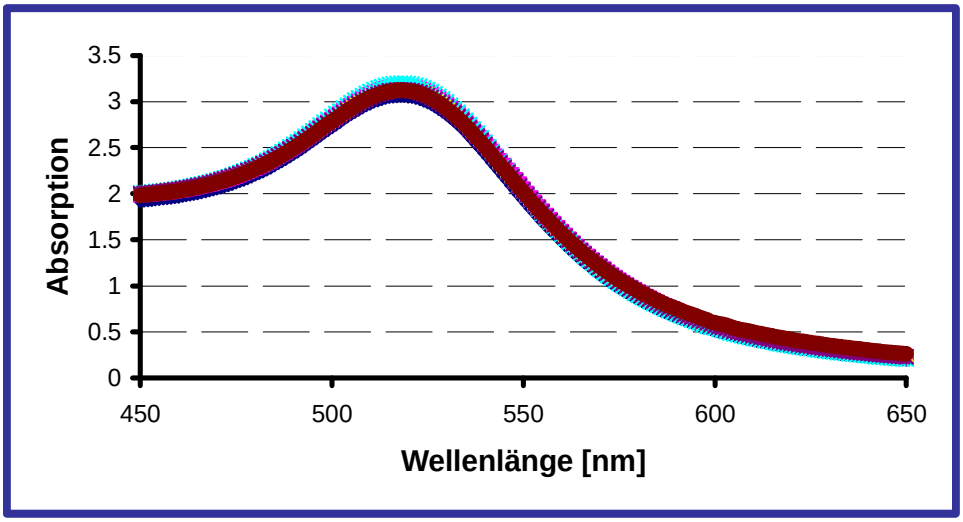

Abbildung 25: Übereinander gelegte UV-VIS Scans der unterschiedlichen GNP-Batches. Gemessen wurde im Bereich von 450 nm bis 650 nm.

Es zeigte sich, dass das Absorptionsverhalten bei allen Chargen sehr ähnlich ist. Die höchste Extinktion liegt bei allen gemessenen GNP-Lösungen bei ungefähr 520 nm. Dieses Ergebnis deckt sich mit bekannten Daten aus der Literatur und deutet auf eine erfolgreiche Produktion von 13 nm Partikeln hin [81]. Ebenfalls befindet sich die bei 520 nm gemessene Absorptionsintensität bei allen Proben in einem ähnlichen Bereich, sodass davon ausgegangen werden kann, dass eine ausreichend gute Reproduzierbarkeit des Syntheseprozesses gewährleistet ist.

4.1.2. Bestimmung der Größenverteilung mittels TEM

Eine genauere Überprüfung von Größe und Form der GNP erfolgte mit Hilfe von TEM-Analysen. Abbildung 26 zeigt eine von zahlreichen TEM-Aufnahmen, welche im Zuge dieser Arbeit aufgenommen worden sind. Ein hoher Anteil der Partikel weist einen Durchmesser im gewünschten Bereich von ungefähr 13 nm auf.

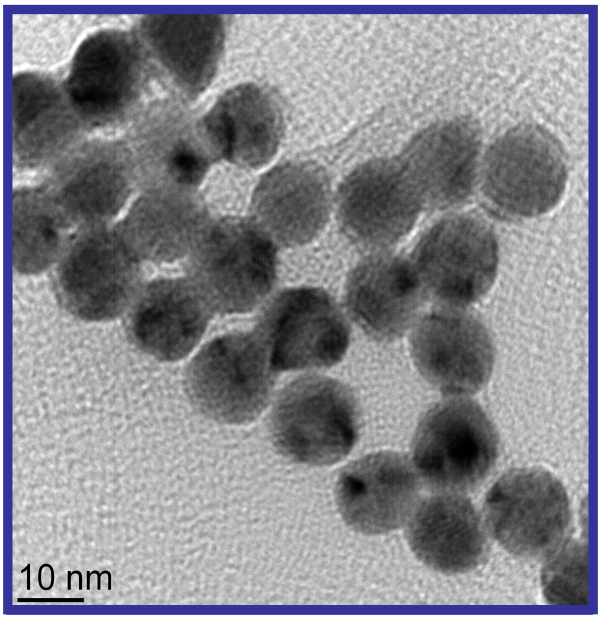

Abbildung 26: Typische TEM-Aufnahme von einer der hergestellten GNP-Lösungen.

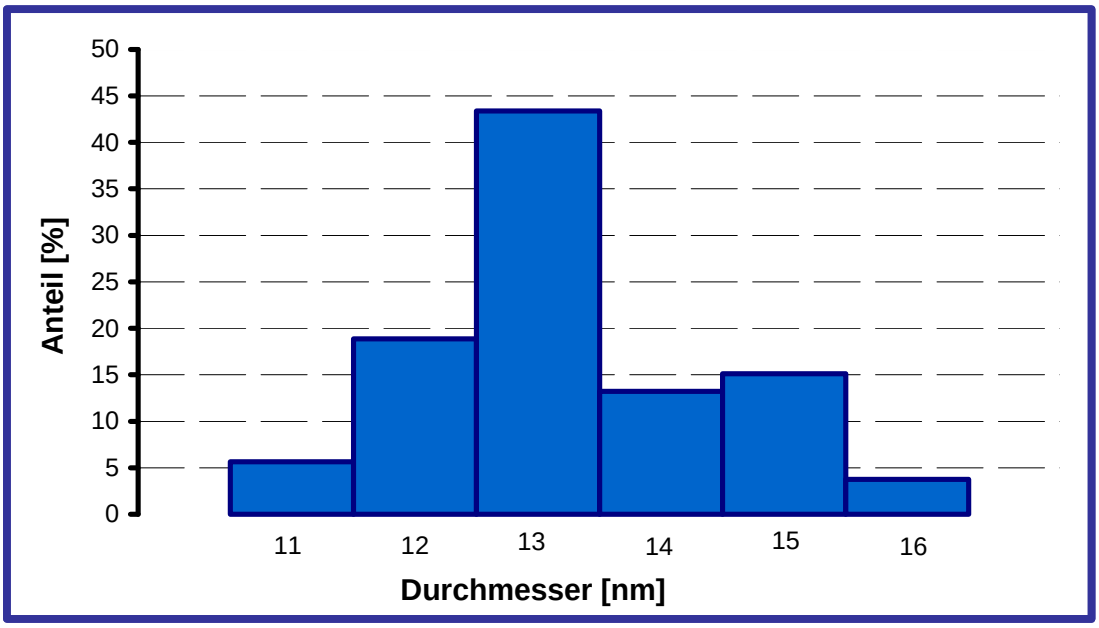

Abbildung 27: Mittlere Größenverteilung der synthetisierten GNP. Ausgewertet wurden drei verschiedene Synthesechargen. Pro Charge wurden 100 Partikel vermessen.

4.2. Überprüfung des Funktionalisierungserfolges

4.2.1. Nachweis von gebundener DNA mittels TEM

Für die Anfertigung eines TEM-Präparates, muss die GNP-Lösung eingetrocknet werden. Durch den Wasserverlust neigen die GNP zu einer verstärkten Aggregation. GNP welche zuvor mit DNA funktionalisiert worden sind, zeigen diese Aggregatbildung nicht und bleiben räumlich voneinander getrennt (Abbildung 28).

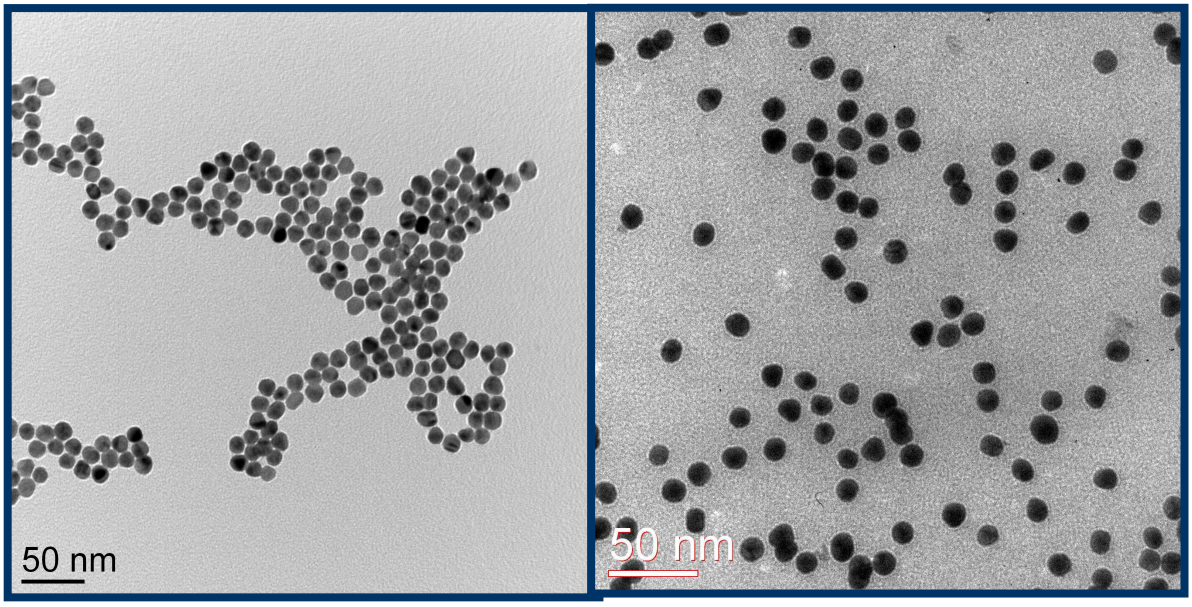

Abbildung 28: links: GNP ohne gebundene DNA, rechts: räumlich stärker getrennte Partikel aufgrund der sterischen Behinderung hervorgerufen durch gebundene DNA.

Zusätzlich kann auf den Aufnahmen, welche vom Institut für Biophysik (BOKU, Wien) gemacht wurden, deutlich eine Art gräulicher Schleier rund um die dünkler dargestellten GNP beobachtet werden. Dieser Schleier entspricht der DNA, welche vor der TEM-Messung speziell vorbehandelt worden ist (Abbildung 29). Diese gräulichen Bereiche sind zumeist rund um die GNP gelegen. Dies bestätigt die Assoziation der DNA mit den GNP, sagt jedoch nichts über die Art der Bindung aus.

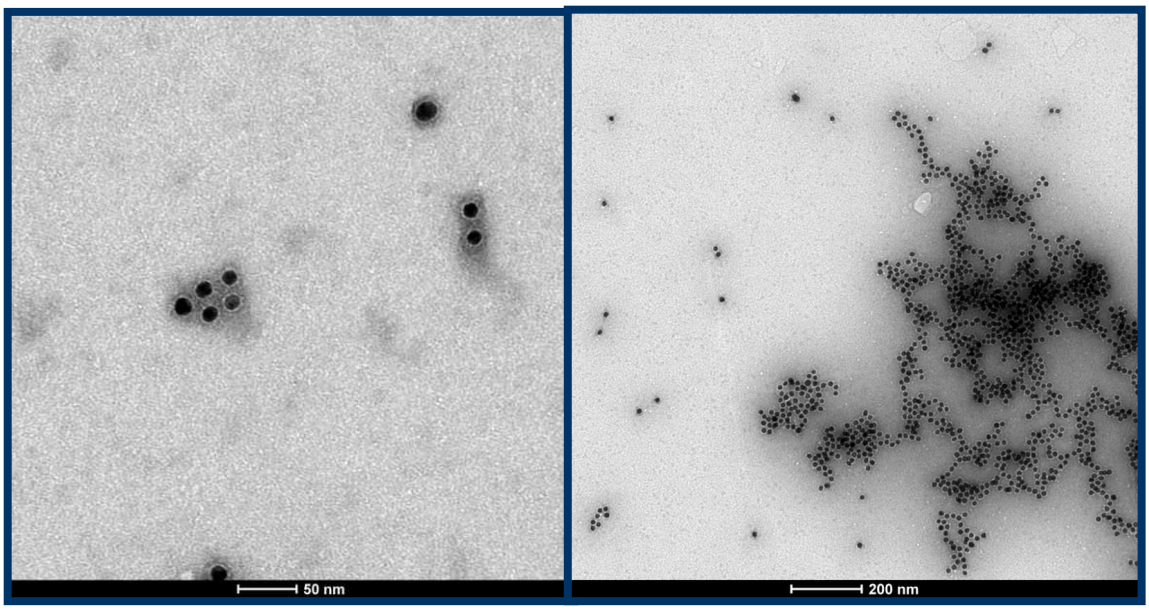

Abbildung 29: TEM-Aufnahmen von GNP. Der Schleier um die GNP kommt von der gebundenen DNA.

4.2.2. Nachweis von gebundener DNA mittels quantitativer real-time-PCR

4.2.2.1. Vergleich zwischen DNA-Konzentration in der Endlösung und den Waschlösungen

Nach erfolgter Funktionalisierung wurden die Proben insgesamt 4 x gewaschen. DNA, welche im Zuge der Funktionalisierung nicht bindet und somit frei vorliegt, befindet sich im Überstand. Gemessen wurde jeweils der Überstand nach einem Waschschritt und zusätzlich die resuspendierte Goldnanopartikel Lösung nach insgesamt vier Waschschritten. Es zeigte sich, dass bereits nach vier Waschschritten der Anteil an freier DNA gegenüber der gebundenen DNA typischer Weise bei unter 1% liegt (Abbildung 30). Dies ist einerseits wichtig weil freie DNA in der GNP-Lösung einen späteren Nachweistest negativ beeinflussen könnte. Und andererseits ist es ein guter Hinweis darauf, dass ein hoher Anteil an DNA mit dem Goldpartikel relativ stark assoziiert sein muss. Andernfalls könnte kein so großer Unterschied im DNA-Gehalt zwischen Überstand 4 und Endlösung zustande kommen.

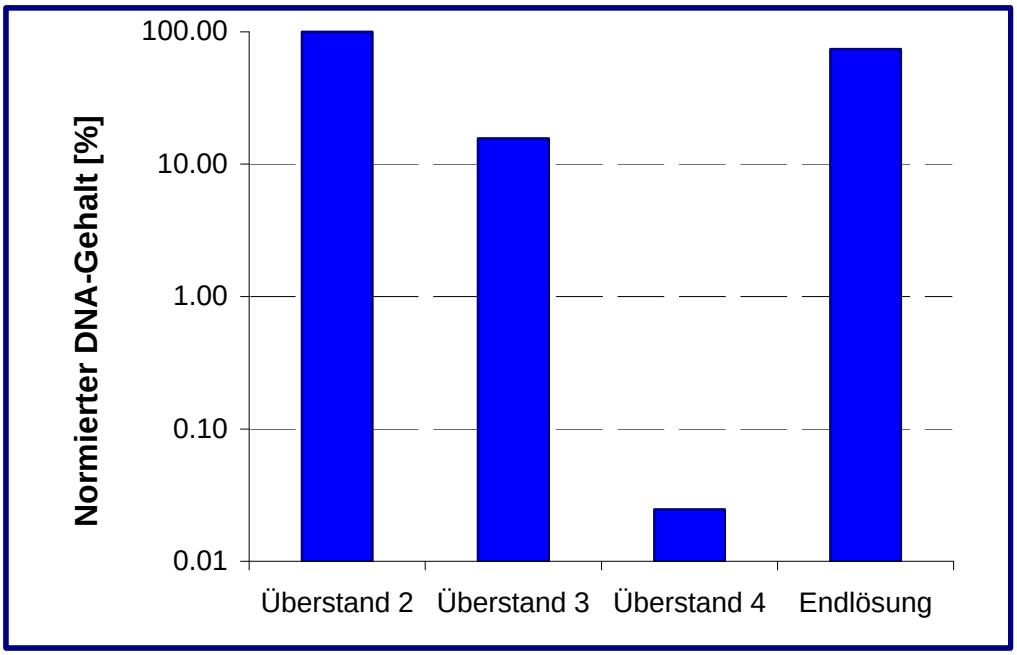

Abbildung 30: Relation von freier DNA zu gebundener DNA. Gegenüberstellung der vier Mal gewaschenen Probe (Endlösung) und den letzten drei Überständen der Waschschritte.

4.2.2.2. Bestimmung der Anzahl gebundener DNA auf einem GNP

Die via PCR gemessenen Ergebnisse der DNA-Dichtebestimmung wurden in Relation zu der berechneten GNP-Konzentration pro PCR-Ansatz gestellt. Die GNP-Konzentration ergibt sich aus der Messung der Absorption bei 520 nm unmittelbar vor Herstellung des PCR-Ansatzes. Mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten, welcher für 13 nm GNP ungefähr 1,85 x 10^8 beträgt [12, 81], kann mittels lambert-beerschem Gesetz der Gehalt an GNP im PCR-Ansatz bestimmt werden. Die berechnete DNA-Dichte pro GNP weichte deutlich von der zu erwartenden Anzahl an gebundener DNA ab. Während Quantifizierungen mittels Fluoreszenzmessung in der Größenordnung von ungefähr 150 SH-DNA-Moleküle / GNP liegen [82], lieferte die PCR-Quantifizierung der selbst funktionalisierten DNA-GNP theoretisch gebundene DNA-Partikel im einstelligen Bereich (Tabelle 7).

		Berechnete DNA-Stränge / GNP	
Wiederholung	**DNA-GNP**	**0,4 M NaCl**	**0,8 M NaCl**
1	M3 5'-Au	1,96	3,47
2	M3 5'-Au	1,21	3,05
3	M3 5'-Au	1,79	-
Mittelwert	M3 5'-Au	1,65	3,26

Tabelle 7: Ergebnisse der Quantifizierung mittels qRT-PCR. Gemessen wurden 4 x gewaschene DNA-GNP mit 2 unterschiedlichen NaCl-Endkonzentrationen. Die erhaltenen DNA-Konzentrationen wurden in Relation zu der theoretisch berechneten Au-Partikelanzahl gestellt.

Die Fluoreszenmessung markierter DNA-Stränge stellt die häufigste Methode dar um die DNA-Dichte auf GNP zu messen. Jedoch wurden auch alternative Bestimmungsmethoden publiziert. Eine Quantifizierungsmethode [83], welche mit Hilfe von quantitativer real-time-PCR die Anzahl an DNA-Strängen analysiert, wurde als vergleichbar zu der Fluoreszenzmethode beschrieben. Genaue Gründe, warum bei den, im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, solch stark abweichende Resultate erzielt wurden, konnten nicht herausgefunden werden. Vermutlich liegt es an Unterschieden im PCR-Assay. Zum Beispiel wurde anders als in der ursprünglichen Methode anstatt Fluorescein, SYBR Green I als Farbstoff verwendet. Obwohl Absorptionsmaximum und Emissionsmaximum der beiden Farbstoffe ident

sind, könnte SYBR Green I doch für eine negative Beeinflussung des Ergebnisses verantwortlich sein. Der zufällige Fehler der durchgeführten Messungen ist gering, wie sich durch vergleichbare Ergebnisse bei wiederholter Messung zeigt. Ebenfalls zeigt sich ein Trend wenn man die DNA-GNP mit den zwei unterschiedlich hohen NaCl-Endkonzentrationen vergleicht.

4.3. Bestimmung des Schmelzbereiches der DNA-Goldnanopartikel

Die Bestimmung des Schmelzbereichs erfolgte rein durch Beobachtung, wie durch stetige Erhöhung der Temperatur, der schwarze Niederschlag der drei erfolgreich hybridisierten Teilkomponenten M2 3'-Au, $M2_{Linker}$ und M2 5'-Au sich allmählich löste und freigewordene DNA-GNP die Lösung rot färbten. Diese Methode ist zwar sehr einfach durchzuführen und verlangt nur einen minimalen instrumentellen Aufwand, jedoch wurden einige Nachteile festgestellt. Der Startpunkt konnte zwar auf Grund der entstehenden, rot gefärbten Schlieren rund um das Pellet gut bestimmt werden, trotzdem unterlag es einer gewissen subjektiven Beurteilung ab wann eine Probe als ‘‘schmelzend“ eingestuft wurde. Eine ähnliche Problematik wurde bei der Bestimmung der Endtemperatur festgestellt, da sich oftmals ein kleiner, unlöslicher Anteil des Pellets noch in Lösung befindet, welcher auch mit steigender Temperatur nicht mehr gelöst werden konnte. Während des eigentlich Schmelzvorgangenes hat das reine Beobachten den Nachteil, dass eine Quantifizierung des bereits geschmolzenen Anteils nicht präzise genug möglich ist. Somit kann auch nicht jener Zeitpunkt erkannt werden, bei welchem 50% der DNA-GNP bereits geschmolzen vorliegen. Angaben über den T_m-Wert der Probe sind daher nicht möglich. Für eine präzisere Analyse wäre also eine instrumentelle Messung, zum Beispiel durch die Messung der Zunahme der Absorption bei 520 nm nötig gewesen. Für eine Abschätzung des Schmelzbereiches, zum Beispiel um Einflüsse von Hybridisierungszusätzen auf die Schmelztemperatur zu bestimmen, stellt die oben beschriebene Vorgehensweise jedoch eine rasche und einfache Methode dar.

4.3.1. Einfluss verschiedener Zusätze auf den Schmelzbereich

Analog zum Hybridisierungsverhalten von freier DNA, wird die Schmelztemperatur der hybridisierten DNA-GNP von der Konzentration an gelöstem NaCl beeinflusst (Abbildung 31). Hierbei konnte mit der Modell-DNA 2 ein klarer Zusammenhang zwischen steigender NaCl-Konzentration und steigendem Schmelzbereich beobachtet werden.

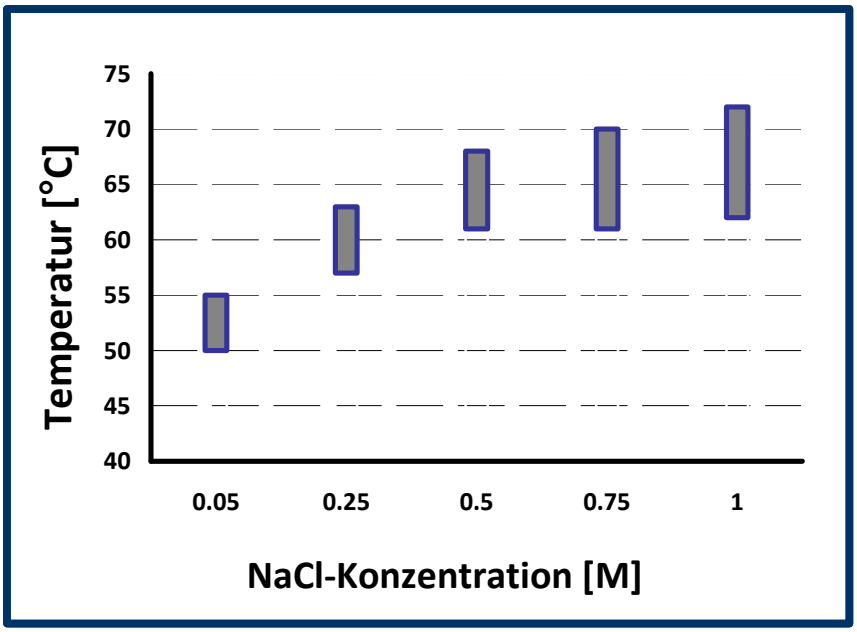

Abbildung 31: Einfluss der Konzentration an NaCl im Hybridisierungsansatz auf den Schmelzbereich der hybridisierten M2 DNA-GNP. Das untere Ende eines Balken entspricht dem Start des Schmelzvorganges und das obere Ende jenem Zeitpunk sobald kein Pellet mehr sichtbar ist.

Neben der NaCl-Konzentration wurde im Zuge dieser Arbeit zusätzlich der Einfluss verschiedener Zusätze auf das Schmelzverhalten der DNA-GNP untersucht (Abbildung 32). Von Interesse war es, ob manche Zusätze den Schmelzbereich deutlich hinabsetzen, hinaufsetzen oder verschmälern könnten. Es zeigte sich, dass die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) in höheren Konzentrationen (10%) eingesetzt, den Schmelzbereich verschmälert. Der Effekt konnte in einer abgeschwächten Form ebenfalls bei Glycerin und Formamid beobachtet werden. Bei den letzten beiden genannten tritt jedoch zusätzlich der Effekt der Schmelztemperaturerniedrigung auf. Eine Erniedrigung der Schmelztemperatur

spielte bei DMSO, in den getesteten Konzentrationen, eine deutlich kleinere Rolle. Der Einfluss von Betain auf das Schmelzverhalten ist bei den drei getesteten Konzentrationen weniger stark ausgeprägt als es bei den anderen Zusätzen der Fall war.

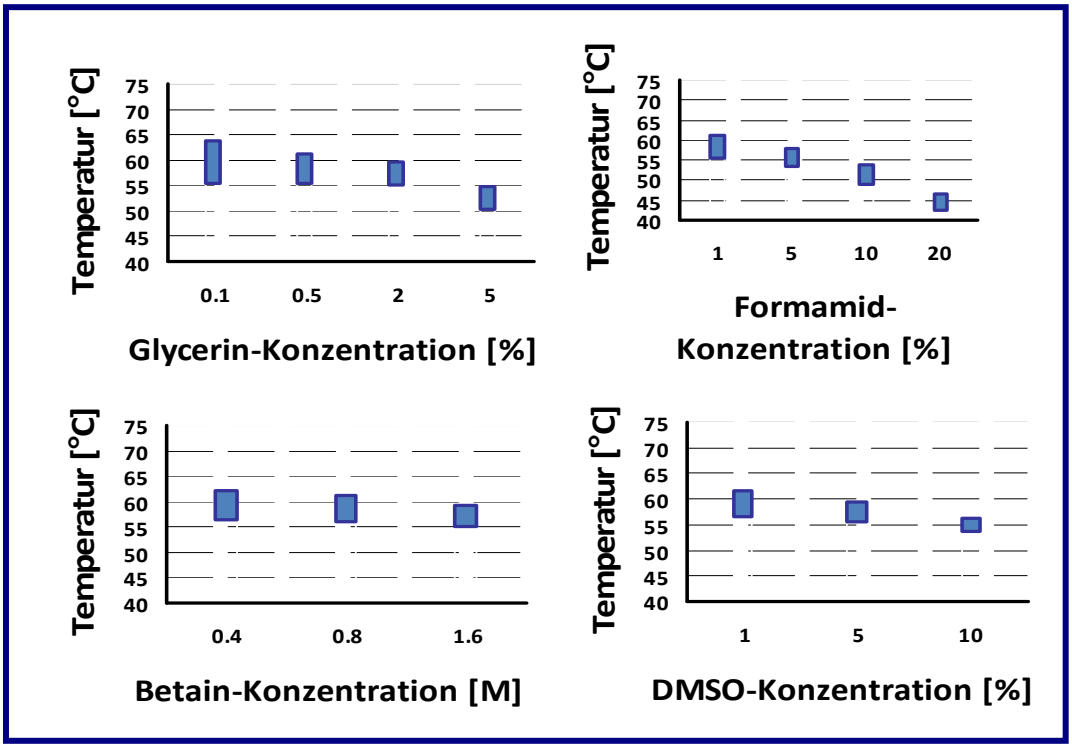

Abbildung 32: Einfluss der Konzentration an Glycerin (links oben), Formamid (rechts oben), Betain (links unten) bzw. DMSO (rechts unten) im Hybridisierungsansatz auf den Schmelzbereich. Das untere Ende eines Balken entspricht dem Start des Schmelzvorganges und das obere Ende jenem Zeitpunk sobald kein Pellet mehr sichtbar ist.

4.3.2. Einfluss von Mismatches auf den Schmelzbereich

Insgesamt wurden 23 verschiedene Modifizierungen der M2 Linker-DNA designt (Tabelle 8). Anders als bei Hybridisierungsreaktionen von unmodifizierten Oligonukleotiden, zeigte sich dass die Schmelztemperatur von DNA-GNP nicht so einfach kalkulierbar ist. Anzahl und Art der Basenpaarungen (G-C oder A-T) sind nicht die einzigen Einflussfaktoren, vielmehr zeigte sich, dass vor allem die Position an welcher sich ein Mismatch befindet einen großen Einfluss auf die Schmelztemperatur haben kann [60]. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen eingebauten Mismatches und Schmelztemperatur hergestellt werden.

Linker	Sequenz 5‘ – Seite					3‘ - Seite					Temp. [°C]
$M2_{Linker}$Original	GAG	GGA	TTA	TTG	TTA	AAT	ATT	GAT	AAG	GAT	61,5
$M2_{Linker}$Mism.1	GAG	GTA	TTA	TTG	TTA	AAT	ATT	GAT	AAT	GAT	45,5
$M2_{Linker}$Mism.2	GAG	GGC	TTA	TTG	TTA	AAT	ATT	GAT	ACG	GAT	46,5
$M2_{Linker}$Mism.3	TAG	GAA	TTA	TTG	TTA	AAT	ATT	AAT	AAG	TAT	33,0
$M2_{Linker}$Mism.4	GCG	GGA	TGA	TTG	TTA	AAG	ATT	GAT	ACG	GAT	59,0
$M2_{Linker}$Mism.5	GAG	GAA	TTA	TTG	TCA	AAC	ATT	GAT	AAG	AAT	44,0
$M2_{Linker}$Mism.6	GAA	GTA	TTA	TTT	TTA	AAT	ATT	TAT	AAA	TAT	46,0
$M2_{Linker}$Mism.7	GCG	GGA	CTA	TTG	GTA	AAG	ATG	GAT	AAG	GCT	35,5
$M2_{Linker}$Mism.8	GCG	GGA	GTA	TTT	TTA	ACT	ATT	GAT	AAA	TAT	44,5
$M2_{Linker}$Mism.9	TAG	GGA	TTA	TTG	TTA	AAT	ATT	GAT	AAG	GAT	59,0
$M2_{Linker}$Mism.10	TCG	GGA	TTA	TTG	TTA	AAT	ATT	GAT	AAG	GAT	51,5
$M2_{Linker}$Mism.11	TCA	GGA	TTA	TTG	TTA	AAT	ATT	GAT	AAG	GAT	52,5
$M2_{Linker}$Mism.12	GAG	GGA	TTA	TTG	TTA	AAT	ATT	GAT	AAG	GAC	55,0
$M2_{Linker}$Mism.13	GAG	GGA	TTA	TTG	TTA	AAT	ATT	GAT	AAG	GGC	55,0
$M2_{Linker}$Mism.14	GAG	GGA	TTA	TTG	TTA	AAT	ATT	GAT	AAG	TGC	52,0
$M2_{Linker}$Mism.15	TAG	GAA	TTA	TTG	TTA	AAT	ATT	GAT	AAG	GAT	45,5
$M2_{Linker}$Mism.16	GAG	GAA	TTA	TTG	TTA	AAT	ATT	GAT	AAG	GAT	52,0
$M2_{Linker}$Mism.17	GAG	GGA	TTA	TTG	TTA	AAT	ATT	AAT	AAG	TAT	54,0
$M2_{Linker}$Mism.18	GAG	GGA	TTA	TTG	TTA	AAT	ATT	GAT	AAG	TAT	51,5
$M2_{Linker}$Mism.19	GAG	GGA	TTA	TTG	TTA	AAT	ATT	AAT	AAG	GAT	47,0
$M2_{Linker}$Mism.20	GCG	GGA	CTA	TTG	GTA	AAT	ATT	GAT	AAG	GAT	45,0
$M2_{Linker}$Mism.21	GCG	GGA	CTA	TTT	TTA	AAT	ATT	GAT	AAG	GAT	25,0
$M2_{Linker}$Mism.22	GAG	GGA	TTA	TTG	TTA	AAG	ATG	GAT	AAG	GCT	49,5
$M2_{Linker}$Mism.23	GAG	GGA	TTA	TTG	TTA	ACT	ATT	GAT	AAA	TAT	42,0

Tabelle 8: Mittlere Schmelztemperatur von M2 Linker-DNA mit unterschiedlichen Mismatches.

4.4. Versuche mit Streptavidin-Teststreifen

4.4.1. Versuch A – Realisierbarkeit des 3K-Aufbaus

Zu Beginn einer Reihe von Anwendungsversuchen mit STV-LFD-Teststreifen wurde der 3K-Versuchsaufbau (3.7.3/Abbildung 23) mit allen vier hergestellten DNA-GNP (M1 5'-Au, M1 3'-Au, M2 5'-Au, M2 3'-Au) durchgetestet (Tabelle 9). Hierbei zeigte sich, dass nur Systeme funktionierten, bei denen sich sowohl Au-Rest als auch Biotin-Rest an jeweils entgegengesetzten Enden des DNA-Konjugates befanden.

DNA-GNP	Linker	Biotin-DNA	Ergebnis
M1 5'-Au	$M1_{Linker}$	M1 3'-Biotin	**+**
M1 3'-Au	$M1_{Linker}$	M1 3'-Biotin	-
M1 5'-Au	$M1_{Linker}$	M1 5'-Biotin	-
M1 3'-Au	$M1_{Linker}$	M1 5'-Biotin	**~**
M2 5'-Au	$M2_{Linker}$	M2 3'-Biotin	**+**
M2 3'-Au	$M2_{Linker}$	M2 3'-Biotin	-
M2 5'-Au	$M2_{Linker}$	M2 5'-Biotin	-
M2 3'-Au	$M2_{Linker}$	M2 5'-Biotin	-

Tabelle 9: Ergebnis des Machbarkeitstests des 3-Komponenten-Aufbaus.

Bei Reaktionsansätzen, bei denen eine dieser Komponenten mittig angeordnet ist, kam es auf Grund von sterischer Behinderung zu keiner ausreichenden Hybridisierung und somit zu keiner stabilen Ausbildung des gewünschten DNA-Konjugates (Abbildung 33). Weiters konnte beobachtet werden, dass Ansätze mit 5'-Au-DNA zu wesentlich stärker sichtbaren Testlinien führten als jene mit 3'- Au-DNA (siehe Versuch 4.4.3).

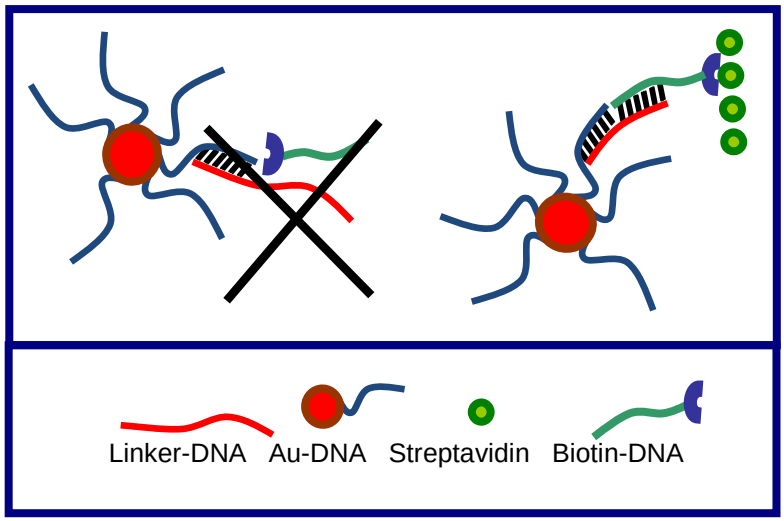

Abbildung 33: Links: Der mittig angeordnete Biotinrest sorgt dafür, dass sich kein vollständiges DNA-Konjugat ausbilden kann. Rechts: Au-Rest und Biotinrest sind endständig, entgegengesetzt angeordnet und behindern damit nicht die Ausbildung des DNA-Konjugates.

4.4.2. Versuch B – Benötigte Zeit für die Hybridisierung

Um die benötigte Dauer der Hybridisierung zu ermitteln wurde ein Reaktionsansatz unmittelbar nach Herstellung geviertelt und jeder Teil unterschiedlich lange inkubiert. Es konnte kein Intensitätsunterschied bei der roten Testlinie zwischen den unterschiedlichen Reaktionsansätzen beobachtet werden (Tabelle 10). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Bildung des DNA-Konjugates nahezu spontan verläuft. Anders als in wässriger Lösung, wo durchaus mit einer gewissen Hybridisierungszeit gerechnet werden muss, wird die Ausbildung der Konjugate in den Poren der festen NC-Membran stark beschleunigt. Vermutlich wirkt sich die dadurch erhöhte räumliche Nähe bzw. die verminderte Mobilität beschleunigend auf die Ausbildung der Konjugate aus. Im Anschluss an diesen Versuch wurde daher bei allen weiteren Experimenten auf eine Vorhybridisierungszeit verzichtet.

DNA-GNP	Linker	Biotin-DNA	Dauer Hybridisierung	Ergebnis
M1 5'-Au	$M1_{Linker}$	M1 3'-Biotin	20 h	+
M1 5'-Au	$M1_{Linker}$	M1 3'-Biotin	60 min	+
M1 5'-Au	$M1_{Linker}$	M1 3'-Biotin	15 min	+
M1 5'-Au	$M1_{Linker}$	M1 3'-Biotin	direkt aufgetragen	+

Tabelle 10: Minimal benötigte Hybridisierungsdauer der 3 Komponenten um ein positives Testergebnis zu erhalten. Die Hybridisierung der Komponenten erfolgte auf den LFD-Teststreifen nahezu spontan.

4.4.3. Versuch C - Mobilität der DNA-GNP entlang der NC-Membran

Wie bereits im Versuch A beschrieben, erzeugten bei den beiden verwendeten Modell-DNA-Sequenzen Konjugate mit terminalem 3'-Au-Rest schlechtere Signale als jene mit 5'-Au-Ende. Um dieses Phänomen näher zu Untersuchen, wurden spezielle Mobilitätstests durchgeführt (Tabelle 11). Es zeigte sich, dass Konjugate mit 3'-Au-Ende, sobald sie auf die eigentliche NC-Membran treffen, ihre Löslichkeit verlieren und sich in weiterer Folge ein Präzipitat ausbildet, welches vom verwendet Laufpuffer nicht mehr weiter nach oben transportiert werden kann (Abbildung 34). Die Gründe hierfür sind unklar. Im Zuge dieser Arbeit wurden lediglich zwei verschiedene DNA-Sequenzen (M1, M2) für die Funktionalisierung von GNP eingesetzt. Weitere, mit 3'-SH-DNA funktionalisierte, DNA-GNP wären notwendig um zu überprüfen ob dieser Effekt generelle Gültigkeit hat. Üblicherweise wird in der Literatur bei Arbeiten, welche sich mit DNA-GNP in Kombination mit LFD-Tests beschäftigen, 5'-SH-DNA verwendet [71, 72, 74, 75, 77, 78, 84]. Da mit der hergestellten 5'-Au-DNA zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde in weiter Folge auch nur noch mit dieser gearbeitet und keinen weiteren Versuche mit 3'-Au-DNA durchgeführt.

Biotin-DNA + Linker	DNA-GNP	Ergebnis
M1 3'-Biotin + $M1_{Linker}$	M1 5'-Au	Gute Mobilität durch die NC-Membran
M1 5'-Biotin + $M1_{Linker}$	M1 3'-Au	Präzipitiert sofort bei Übergang von Absorptionpad zu NC-Membran
M2 3'-Biotin + $M2_{Linker}$	M2 5'-Au	Gute Mobilität durch die NC-Membran
M2 5'-Biotin + $M2_{Linker}$	M2 3'-Au	Präzipitiert sofort bei Übergang von Absorptionpad zu NC-Membran

Tabelle 11: 3-Komponenten-Aufbau mit 3' -Au-DNA präzipitiert nach dem Übergang auf die NC-Membran sofort und lässt sich vom Laufpuffer nicht mehr weiter transportieren.

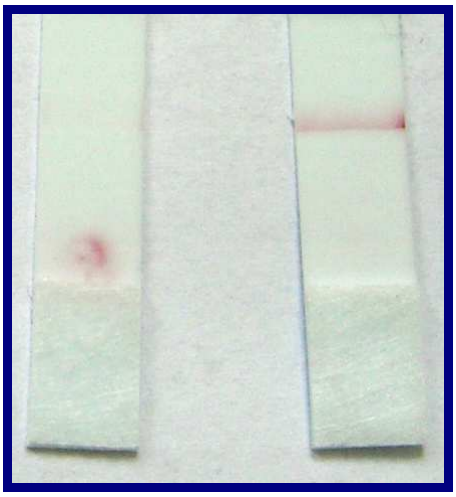

Abbildung 34: 3K-Ansatz wurde direkt auf die NC-Membran aufgetragen. Es wurde entweder 3'-Au-DNA (links) oder 5'-Au-DNA (rechts) verwendet. Nach 8 Minuten wurden beide Streifen in ein Gefäß mit STV-Laufpuffer platziert. Das DNA-Konjugat am linken Streifen konnte in weiterer Folge nicht mehr hinaufwandern.

4.4.4. Versuch D - Einfluss der Umgebungstemperatur auf das Testergebnis

Um potentielle Einflüsse der Umgebungstemperatur auf das Testergebnis zu eruieren, wurden Versuche an drei verschiedenen Orten mit jeweils unterschiedlicher Umgebungstemperatur durchgeführt. Alle Versuche verliefen positiv (Tabelle 12). Es konnte bei den drei Temperaturen kein Unterschied im Testsignal beobachtet werden.

Biotin-DNA + Linker	DNA-GNP	Temperatur	Ergebnis
M1 3'-Biotin + $M1_{Linker}$	M1 5'-Au	4°C	+
M1 3'-Biotin + $M1_{Linker}$	M1 5'-Au	Raumtemperatur	+
M1 3'-Biotin + $M1_{Linker}$	M1 5'-Au	37°C	+
M2 3'-Biotin + $M2_{Linker}$	M2 5'-Au	4°C	+
M2 3'-Biotin + $M2_{Linker}$	M2 5'-Au	Raumtemperatur	+
M2 3'-Biotin + $M2_{Linker}$	M2 5'-Au	37°C	+

Tabelle 12: Einfluss unterschiedlicher Umgebungstemperaturen auf das Testergebnis. Alle verwendeten Utensilien wurden zuvor 24 h bei der entsprechenden Temperatur äquilibriert.

Die Unempfindlichkeit des Testsystems auf die Umgebungstemperatur, zumindest in einem gewissen Temperaturbereich, ist durchaus von Bedeutung. Ein großer Vorteil von Analysen basierend auf LFD-Streifen ist deren einfache Handhabung und deren flexibler Einsatzbereich. Da außerhalb eines Labors nicht immer eine konstante Analysentemperatur gewährleistet werden kann, müssen die Streifentests eine gewisse Unempfindlichkeit auf Temperaturunterschiede aufweisen. Da die Ausbildung der DNA-Konjugate in einer festen Membran stattfindet, wird der Hybridisierungsvorgang stark begünstigt (siehe Kapitel 4.4.2) und mögliche negative Temperatur-Effekte, mit welchen in freier Lösung zu rechnen sein könnte, werden dadurch abgeschwächt.

4.4.5. Versuch E – Linker mit eingebauten Mismatches als DNA-Modifikation

Die für Kapitel 4.3.2 designten DNA-Linker mit eingebauten Mismatches ersetzten in dieser Versuchsreihe die originale M2-Linker-DNA. Alle modifizierten Linker lieferten positive Testergebnisse (Tabelle 13). Jedoch enthielten die Linker jeweils nur maximal drei Mismatches. Um eine ungefähre Ahnung zu bekommen, wieviele Mismatches für ein negatives Testergebnis notwendig wären, müssten weitere Linker designt werden, welche deutlich mehr als drei eingebaute Mismatches enthalten.

Linker	Sequenz 5‘ – Seite	Sequenz 3‘ - Seite	Ergebnis
$M2_{Linker}$Original	GAG GGA TTA TTG TTA	AAT ATT GAT AAG GAT	+
$M2_{Linker}$Mism.1	GAG GTA TTA TTG TTA	AAT ATT GAT AAT GAT	+
$M2_{Linker}$Mism.2	GAG GGC TTA TTG TTA	AAT ATT GAT ACG GAT	+
$M2_{Linker}$Mism.3	TAG GAA TTA TTG TTA	AAT ATT AAT AAG TAT	+
$M2_{Linker}$Mism.4	GCG GGA TGA TTG TTA	AAG ATT GAT ACG GAT	+
$M2_{Linker}$Mism.5	GAG GAA TTA TTG TCA	AAC ATT GAT AAG AAT	+
$M2_{Linker}$Mism.6	GAA GTA TTA TTT TTA	AAT ATT TAT AAA TAT	+
$M2_{Linker}$Mism.7	GCG GGA CTA TTG GTA	AAG ATG GAT AAG GCT	+
$M2_{Linker}$Mism.8	GCG GGA GTA TTT TTA	ACT ATT GAT AAA TAT	+
$M2_{Linker}$Mism.9	TAG GGA TTA TTG TTA	AAT ATT GAT AAG GAT	+
$M2_{Linker}$Mism.10	TCG GGA TTA TTG TTA	AAT ATT GAT AAG GAT	+
$M2_{Linker}$Mism.11	TCA GGA TTA TTG TTA	AAT ATT GAT AAG GAT	+
$M2_{Linker}$Mism.12	GAG GGA TTA TTG TTA	AAT ATT GAT AAG GAC	+
$M2_{Linker}$Mism.13	GAG GGA TTA TTG TTA	AAT ATT GAT AAG GGC	+
$M2_{Linker}$Mism.14	GAG GGA TTA TTG TTA	AAT ATT GAT AAG TGC	+
$M2_{Linker}$Mism.15	TAG GAA TTA TTG TTA	AAT ATT GAT AAG GAT	+
$M2_{Linker}$Mism.16	GAG GAA TTA TTG TTA	AAT ATT GAT AAG GAT	+
$M2_{Linker}$Mism.17	GAG GGA TTA TTG TTA	AAT ATT AAT AAG TAT	+
$M2_{Linker}$Mism.18	GAG GGA TTA TTG TTA	AAT ATT GAT AAG TAT	+
$M2_{Linker}$Mism.19	GAG GGA TTA TTG TTA	AAT ATT AAT AAG GAT	+
$M2_{Linker}$Mism.20	GCG GGA CTA TTG GTA	AAT ATT GAT AAG GAT	+
$M2_{Linker}$Mism.21	GCG GGA CTA TTT TTA	AAT ATT GAT AAG GAT	+
$M2_{Linker}$Mism.22	GAG GGA TTA TTG TTA	AAG ATG GAT AAG GCT	+
$M2_{Linker}$Mism.23	GAG GGA TTA TTG TTA	ACT ATT GAT AAA TAT	+

Tabelle 13: Ausgehend vom Original, wurden in die Sequenz der $M2_{Linker}$ unterschiedliche Mismatches eingebaut und deren Einfluss auf das Testergebnis ermittelt.

4.4.6. *Versuch F - Systematische Verkürzungen der $M1_{Linker}$ bzw. $M2_{Linker}$*

Eine angelegte Versuchsreihe bei der der originale M1-Linker systematisch verkürzt wurde ergab, dass bei Baseneliminierungen sowohl vom 5'-Ende als auch vom 3'-Ende ausgehend 5 übrigbleibende Basen notwendig waren, damit die jeweilige Seite noch stabil an das Konjugat binden kann (Tabelle 14).

		Sequenz			Länge	
Linker	**Verkürzung**	**5' -Seite**	**3'- Seite**	**Ergebnis**	**5' - Seite**	**3' - Seite**
$M1_{Linker}$	Original	AA AGA AGA CGT	TCC AAC CAC	+	11	9
$M1_{Linker}$	5' -2	AGA AGA CGT	TCC AAC CAC	+	9	9
$M1_{Linker}$	5' -4	A AGA CGT	TCC AAC CAC	+	7	9
$M1_{Linker}$	5' -6	GA CGT	TCC AAC CAC	+	**5**	9
$M1_{Linker}$	5' -7	A CGT	TCC AAC CAC	-	4	9
$M1_{Linker}$	5' -8	CGT	TCC AAC CAC	-	3	9
$M1_{Linker}$	5' -9	GT	TCC AAC CAC	-	2	9
$M1_{Linker}$	3' -2	AA AGA AGA CGT	TCC AAC C	+	11	7
$M1_{Linker}$	3' -4	AA AGA AGA CGT	TCC AA	+	11	**5**
$M1_{Linker}$	3' -5	AA AGA AGA CGT	TCC A	-	11	4
$M1_{Linker}$	3' -6	AA AGA AGA CGT	TCC	-	11	3
$M1_{Linker}$	3' -7	AA AGA AGA CGT	TC	-	11	2
$M1_{Linker}$	5' -1+3' -1	A AGA AGA CGT	TCC AAC CA	+	10	8
$M1_{Linker}$	5' -2+3' -2	AGA AGA CGT	TCC AAC C	+	9	7
$M1_{Linker}$	5' -3+3' -3	GA AGA CGT	TCC AAC	+	8	**6**
$M1_{Linker}$	5' -3+3' -4	GA AGA CGT	TCC AA	-	8	5

Tabelle 14: Ausgehend vom Original, wurde die Sequenz des $M1_{Linker}$, systematisch verkürzt und der Einfluss der Verkürzung auf das Testergebnis ermittelt.

Bei anschließenden Verkürzungsversuchen mit dem M2-Linker (Tabelle 15) führten bei beiden Seiten Verkürzungen bis zu den letzten 7 Basen noch zu einem positiven Ergebnis.

Linker	Verkürzung	Sequenz		Ergebnis	Länge	
		5' -Seite	3'- Seite		5' -Seite	3' -Seite
$M2_{Linker}$	Original	GAG GGA TTA TTG TTA	AAT ATT GAT AAG GAT	+	15	15
$M2_{Linker}$	5' - 8	A TTG TTA	AAT ATT GAT AAG GAT	+	7	15
$M2_{Linker}$	5' -10	TG TTA	AAT ATT GAT AAG GAT	-	5	15
$M2_{Linker}$	5' -12	TTA	AAT ATT GAT AAG GAT	-	3	15
$M2_{Linker}$	3' - 8	GAG GGA TTA TTG TTA	AAT ATT G	+	15	7
$M2_{Linker}$	3' -10	GAG GGA TTA TTG TTA	AAT AT	-	15	5
$M2_{Linker}$	3' -12	GAG GGA TTA TTG TTA	AAT	-	15	3

Tabelle 15: Ausgehend vom Original, wurde die Sequenz des $M2_{Linker}$, systematisch verkürzt und der Einfluss der Verkürzung auf das Testergebnis ermittelt.

Auf Basis dieser zwei untersuchten DNA-Sequenzen ist es nicht möglich allgemein gültige Rückschlüsse auf die minimal benötigte Basenanzahl der DNA-Konjugate zu machen. Die Zahl wird vermutlich stark von den jeweils verwendeten DNA-Sequenzen abhängen. Trotzdem deuten die oben beschriebenen Ergebnisse darauf hin, dass die benötigte Basenanzahl einer speziellen Sequenz zumindest ungefähr kalkulierbar ist und sich vermutlich in einem Bereich zwischen 3-7 Basen befindet. Weitere Modell-DNA-Sequenzen wären vonnöten um diese Hypothese zu überprüfen.

4.4.7. Versuch G – Verdünnung des gesamten Reaktionsansatzes

In diesem Versuch wurde die minimal benötigte Konzentration an GNP im Reaktionsansatz ermittelt, welche noch zu einer ausreichenden Rotfärbung der Testlinie führt. Ausgehend vom originalen Reaktionsansatz (OD_{520} ~ 0,140) genügte bereits ein Verdünnungsschritt um den Faktor 10 um kein auswertbares Ergebnis mehr zu erhalten (Tabelle 16). In darauffolgenden Versuchen (4.4.8) konnte ausgeschlossen werden, dass das negative Testsignal auf die Mitverdünnung der anderen Komponenten (Linker-DNA; Biotin-DNA) zurückzuführen ist. Diese liegen in einem sehr großen Überschuss vor und wesentlich höhere Verdünnungsstufen werden benötigt damit kein deutlich positives Signal mehr erzeugt werden kann.

DNA-GNP	Linker	Biotin-DNA	Verdünnung	OD_{520} GNP	Ergebnis
M1 5'-Au	$M1_{Linker}$	M1 3'-Biotin	1:5	~ 0,0078	**+**
M1 5'-Au	$M1_{Linker}$	M1 3'-Biotin	1:10	~ 0,0039	-
M1 5'-Au	$M1_{Linker}$	M1 3'-Biotin	1:20	~ 0,002	-

Tabelle 16: Um die minimale Au-Konzentration, die noch zu einem optisch auswertbaren Ergebnis führt, zu ermitteln, wurden unterschiedlich starke Verdünnungen des Reaktionsansatzes hergestellt.

4.4.8. Versuch H – Systematische Verdünnung der Linker und Biotin-DNA

Bei gleichzeitiger Verdünnung der Linker-DNA und Biotin-DNA konnte mit einer Verdünnung um den Faktor 20000 gerade noch eine sichtbare Testlinie erzeugt werden (Abbildung 35). Dies entspricht einer Konzentration von 0,5 nM der M1-Linker-DNA bzw der M1-3'-Biotin-DNA in 20 µL Testansatz.

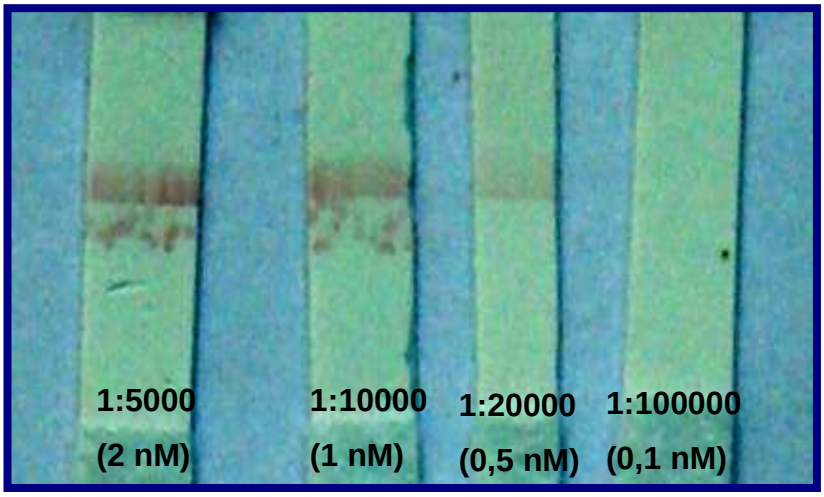

Abbildung 35: Fotografie der 3K-Verdünnungsreihe. Der Streifen mit 1:20000 verdünnter M1-Linker-DNA bzw. M1-3'-Biotin-DNA weist eine gerade noch sichtbare Testlinie auf.

Eine zusätzliche Variation der DNA-GNP-Konzentration (Rotfärbung) innerhalb drei angelegter Verdünnungsstufen hatte keinen Einfluss auf die benötigte Konzentration an Linker und Biotin-DNA (Tabelle 17). Da jedoch mit diesem Versuch der kritische Verdünnungsbereich innerhalb der 10^{-3} und 10^{-4}-Verdünnung nicht abgedeckt wurde, wären weitere Versuche von Interesse, um festzustellen ob sich in jenem Bereich die Konzentration an GNP eventuell doch positiv bzw. negativ auf das Testergebnis auswirken könnte.

Ansatz	OD_{520} GNP	Biotin-DNA + Linker	Verdünnung	DNA-GNP	Ergebnis
Original	**~ 0,039**	M1 3'-Biotin + $M1_{Linker}$	1:5000	M1 5'-Au	+
Original	**~ 0,039**	M1 3'-Biotin + $M1_{Linker}$	1:10000	M1 5'-Au	+
Original	**~ 0,039**	M1 3'-Biotin + $M1_{Linker}$	1:100000	M1 5'-Au	-
H.2	**~ 0,013**	M1 3'-Biotin + $M1_{Linker}$	1:5000	M1 5'-Au	+
H.2	**~ 0,013**	M1 3'-Biotin + $M1_{Linker}$	1:10000	M1 5'-Au	+
H.2	**~ 0,013**	M1 3'-Biotin + $M1_{Linker}$	1:100000	M1 5'-Au	-
H.3	**~ 0,140**	M1 3'-Biotin + $M1_{Linker}$	1:5000	M1 5'-Au	+
H.3	**~ 0,140**	M1 3'-Biotin + $M1_{Linker}$	1:10000	M1 5'-Au	+
H.3	**~ 0,140**	M1 3'-Biotin + $M1_{Linker}$	1:100000	M1 5'-Au	-

Tabelle 17: Pro Ansatz wurden Biotin-DNA und Linker-DNA gleich stark verdünnt und der Einfluss der Verdünnung auf das Testergebnis ermittelt. Die jeweiligen Verdünnungsstufen wurden weiters mit 3 Reaktionsansätzen unterschiedlicher Au-Konzentrationen getestet.

4.4.9. Versuch I –Linker und Biotin-DNA jeweils unterschiedlich stark verdünnt

Um jene Komponente zu finden, welche bezüglich der Verdünnungsstufe limitierend auf ein positives Ergebnis wirkt, wurden Linker-DNA und Biotin-DNA jeweils unterschiedlich stark verdünnt. Sowohl Biotin-DNA als auch Linker-DNA liegen als Stocklösung in gleicher Molarität vor. Somit ist die Anzahl an Molekülen direkt miteinander vergleichbar. Der Versuch zeigte, dass bei Verdünnung der Biotin-DNA um den Faktor 10^4 immer noch ein positives Ergebnis beobachtet werden kann (Tabelle 18). Linker-DNA um denselben Faktor verdünnt führt hingegen zu einem negativen Ergebnis.

Linker	Verdünnung	Biotin-DNA	Verdünnung	Ergebnis
$M1_{Linker}$	1:10000	M1 3'-Biotin	1:10000	**+**
$M1_{Linker}$	1:100000	M1 3'-Biotin	1:10000	-
$M1_{Linker}$	1:10000	M1 3'-Biotin	1:100000	**~**

Tabelle 18: Um den limitierenden Verdünnungsfaktor zu bestimmen, wurden Linker-DNA und Biotin-DNA pro Ansatz unterschiedlich stark verdünnt.

Weitere Versuche mit alternativen DNA-Sequenzen wären notwendig um die vorliegenden Ergebnisse auf ihre allgemeine Gültigkeit hin zu überprüfen. In Anbetracht der Ergebnisse des Versuchs I könnte man jedoch die Hypothese aufstellen, dass die Hybridisierung zwischen DNA-GNP, welche eine Vielzahl an ssDNA-Strängen tragen, und dem Linker-DNA aus thermodynamischer Perspektive gesehen problematischer ist und daher höhere Konzentrationen an Linker-DNA fordert als die anschließende Hybridisierung der Biotin-DNA mit dem bereits halbfertigen Konjugates aus DNA-GNP und Linker-DNA.

4.4.10. Versuch J –Realisierbarkeit des 2-Komponenten-Aufbaus

Im Anschluss an die 3K-Testreihe wurden Versuche mit Biotin-modifizierter Linker-DNA durchgeführt (Tabelle 19). Diese kombiniert das zuvor verwendete Duo aus Linker-DNA und Biotin-DNA (siehe Abbildung 23). In einem ersten Versuch wurde die Realisierbarkeit des angestrebten DNA-Konjugates überprüft. Wie bereits durch Realisierbarkeitsversuche mit dem 3K-Aufbau gezeigt werden konnte, haben auch beim 2K-Aufbau sterische Effekte einen wesentlichen Einfluss auf die erfolgreiche Ausbildung eines stabilen DNA-Konjugates. Nur wenn sich die zwei Bestandteile GNP und Biotin an den jeweils anderen Enden des Konjugates befinden (Abbildung 36) kann sich dieses vollständig ausbilden.

Linker	DNA-GNP	Ergebnis
$M1_{Linker}$ 3'-Biotin	M1 3'-Au	+
$M1_{Linker}$ 3'-Biotin	M1 5'-Au	-
$M1_{Linker}$ 5'-Biotin	M1 3'-Au	-
$M1_{Linker}$ 5'-Biotin	M1 5'-Au	-
$M2_{Linker}$ 3'-Biotin	M2 3'-Au	+
$M2_{Linker}$ 3'-Biotin	M2 5'-Au	-
$M2_{Linker}$ 5'-Biotin	M2 3'-Au	-
$M2_{Linker}$ 5'-Biotin	M2 5'-Au	+

Tabelle 19: Auf zwei Komponenten verkürzter Aufbau. In einem ersten Versuch wurden alle denkbaren Kombinationen der zwei unterschiedlichen Modell-DNA-Sequenzen auf ihre Realisierbarkeit geprüft.

Jedoch konnte mit der theoretisch funktionierenden Kombination aus $M1_{Linker,}$ 5'-Biotin und M1 5'-Au keine positive Testlinie erzeugt werden. Dies entspricht einem gegenteiligen Phänomen zum 3K-Aufbaus, bei welchem ausschließlich 5'-Au-DNA erfolgreich eingesetzt werden konnte. Bei Modell-DNA 2 konnte zwar der Versuch mit beiden DNA-GNP Varianten positiv durchgeführt werden, jedoch erzeugte auch hier die Variante mit 5'-Au-DNA ein deutlich schlechteres Signal.

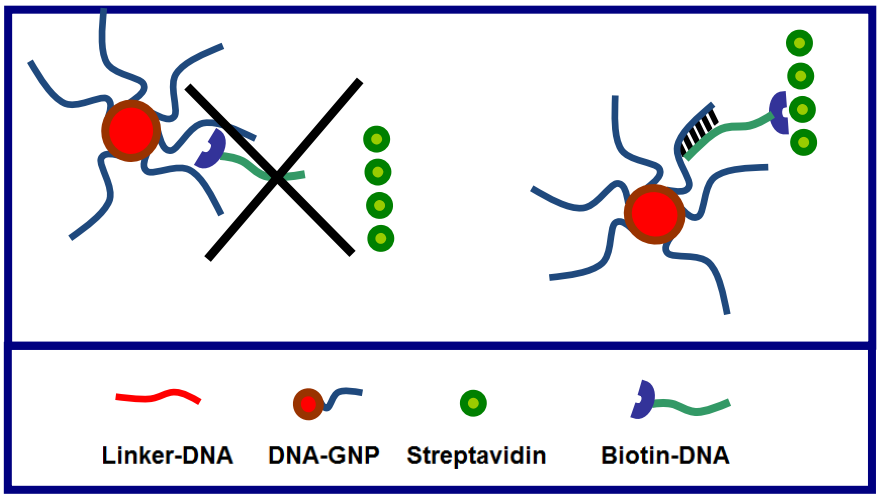

Abbildung 36: Links: Der mittig angeordnete Biotinrest sorgt dafür, dass sich kein vollständiges DNA-Konjugat ausbilden kann. Rechts: Au-Rest und Biotinrest sind endständig, entgegengesetzt angeordnet und behindern damit nicht die Ausbildung des DNA-Konjugates.

4.4.11. Versuch K- Systematische Verdünnung der Biotin-Linker

In einem weiterführenden Versuch wurde der Biotin-Linker systematisch verdünnt. Sowohl bei Modell-DNA 1 als auch bei Modell-DNA 2 konnte bei der 6,4 x 10^{-4} Verdünnung noch ein positives Ergebnis beobachtet werden (Tabelle 20). Diese kritische Verdünnungsstufe entspricht einer molaren Konzentration von 1,6 nM und befindet sich in einem ähnlichen Bereich wie jene, welche bei den Verdünnungsversuchen mit dem 3K-Aufbaus ermittelt wurde.

Linker	Verdünnungsstufe	Konzentration	DNA-GNP	Ergebnis
$M1_{Linker}$ 3'-Biotin	8×10^{-3}	12,8 nM	M1 3'-Au	+
$M1_{Linker}$ 3'-Biotin	$1,6 \times 10^{-4}$	6,4 nM	M1 3'-Au	+
$M1_{Linker}$ 3'-Biotin	$3,2 \times 10^{-4}$	3,2 nM	M1 3'-Au	+
$M1_{Linker}$ 3'-Biotin	$6,4 \times 10^{-4}$	1,6 nM	M1 3'-Au	+
$M1_{Linker}$ 3'-Biotin	$1,28 \times 10^{-5}$	0,8 nM	M1 3'-Au	-
$M1_{Linker}$ 3'-Biotin	$2,56 \times 10^{-5}$	0,4 nM	M1 3'-Au	-
$M2_{Linker}$ 3'-Biotin	8×10^{-3}	12,8 nM	M2 3'-Au	+
$M2_{Linker}$ 3'-Biotin	$1,6 \times 10^{-4}$	6,4 nM	M2 3'-Au	+
$M2_{Linker}$ 3'-Biotin	$3,2 \times 10^{-4}$	3,2 nM	M2 3'-Au	+
$M2_{Linker}$ 3'-Biotin	$6,4 \times 10^{-4}$	1,6 nM	M2 3'-Au	+
$M2_{Linker}$ 3'-Biotin	$1,28 \times 10^{-5}$	0,8 nM	M2 3'-Au	-
$M2_{Linker}$ 3'-Biotin	$2,56 \times 10^{-5}$	0,4 nM	M2 3'-Au	-

Tabelle 20: Um den mindest nötigen Konzentrationsbereich des Biotin-Linker zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe angelegt und auf STV-LFDs getestet. Bei einer molaren Konzentration von 1,6 nM des Biotin-Linker im Testansatz konnte gerade noch ein positives Testsignal erzeugt werden.

5. Zusammenfassung

Im Zuge dieser Arbeit wurden alle benötigten Schritte hin zu der Entwicklung eines DNA-GNP basierten LFD-Assays selbst durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist mit Hilfe von DNA-GNP spezifisch DNA-Sequenzen auf LFD-Streifen nachweisen zu können. Während auf AK-GNP basierende LFD-Assays sehr gut etabliert sind und in der Literatur eine hohe Anzahl von Anwendungsbeispielen gefunden werden kann, findet man über DNA-GNP basierende LFD-Assays wesentlich weniger Informationen.

Die Synthese der ungefähr 13 nm großen GNP erfolgte nach einer gut etablierten Methode und die anschließende Überprüfung zeigte, dass die GNP in gewünschter Größe und Form reproduzierbar hergestellt werden konnten. Ebenfalls konnte die Funktionalisierung mit DNA-Strängen erfolgreich durchgeführt werden. Lediglich der Versuch die DNA-Dichte auf GNP mittels quantitativer real-time PCR zu bestimmen verlief nicht zufriedenstellend. Hierbei konnten keine vergleichbaren Ergebnisse mit der in der Literatur beschriebenen DNA-Dichte erzielt werden. Jedoch war es möglich mit Hilfe der PCR-Daten eine Aussage darüber zu treffen, dass sich deutlich mehr DNA-Stränge auf den GNP befinden als in der Waschlösung nach vier Waschschritten. Anschließende Hybridisierungsversuche in freier Lösung zeigten ebenfalls, dass die Funktionalisierung erfolgreich sein musste. Im Zuge dieser Hybridisierungsversuche wurde eine einfache Methode zur Bestimmung des Schmelzbereiches entwickelt. Zusätzlich wurden systematische Versuche mit Hybridisierungszusätzen durchgeführt und deren Einfluss auf die Schmelztemperatur untersucht. Es zeigte sich, dass die Möglichkeit besteht, durch bestimmte Zusätze, den Schmelzbereich gezielt beeinflussen zu können. Somit können Hybridisierungszusätze eine potentielle Rolle bei der Optimierung von LFD-Assays einnehmen. Weiters wurden Mismatch-Linker designt und der Einfluss dieser Mismatches in der Linker-DNA auf den dadurch veränderten Schmelzbereich untersucht. Es zeigte sich, dass Mismatches in der Linker-DNA einen sehr bedeutenden Einfluss auf den Schmelzbereich haben können. Jedoch gelang es

nicht theoretisch vorherzusagen welche Basen in der Linker-DNA verändert werden müssen um den Schmelzbereich gezielt ändern zu können.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden LFD-Streifen selbst zusammengeklebt und mit STV als Testlinie besprüht. Es wurde eine Vielzahl von Streifentests durchgeführt und es konnte demonstriert werden, dass die zuvor geplanten Assays in der Praxis funktionieren und zumindest synthetische Modell-DNA nachgewiesen werden kann. In Zukunft wäre es von Interesse ob auch aus biologischem Material gereinigte und anschließend vervielfältigte DNA ebenfalls mit Hilfe der entwickelten Assays nachweisbar ist. Weiters besteht noch viel Optimierungsbedarf bezüglich den verschiedenen Parametern, welche ausschlaggebend für die Selektivität und Sensitivität eines LFD-Assays sind.

6. Literatur

1. Anonym, *Rapid Lateral Flow Test Strips.* Millipore, 2008.
2. Anonym, *Commission Recommendation On The Definition of Nanomaterial 2011/696/EU.* Official Journal of the European Union 2011: p. L 275/38 - 40.
3. Rodriguez-Gonzalez, B., et al., *Multishell bimetallic AuAg nanoparticles: synthesis, structure and optical properties.* Journal of Materials Chemistry, 2005. **15**(17): p. 1755-1759.
4. Baptista, P., et al., *Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(3): p. 943-950.
5. Turkevich, J., P.C. Stevenson, and J. Hillier, *A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold.* Discussions of the Faraday Society, 1951(11): p. 55-&.
6. Frens, G., *Controlled Nucleation for Regulation of Particle-Size in Monodisperse Gold Suspensions.* Nature-Physical Science, 1973. **241**(105): p. 20-22.
7. Kimling, J., et al., *Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited.* Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(32): p. 15700-15707.
8. Selvakannan, P., et al., *Water-dispersible tryptophan-protected gold nanoparticles prepared by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by the amino acid.* Journal of Colloid and Interface Science, 2004. **269**(1): p. 97-102.
9. Brust, M., et al., *Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a 2-Phase Liquid-Liquid System.* Journal of the Chemical Society-Chemical Communications, 1994(7): p. 801-802.
10. Pong, B.K., et al., *New insights on the nanoparticle growth mechanism in the citrate reduction of Gold(III) salt: Formation of the au nanowire intermediate and its nonlinear optical properties.* Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(17): p. 6281-6287.
11. Cvak, B., et al., *Synthesis and characterization of colloidal gold particles as labels for antibodies as used in lateral flow devices.* Analyst, 2012. **137**(8): p. 1882-1887.
12. Liu, J. and Y. Lu, *Preparation of aptamer-linked gold nanoparticle purple aggregates for colorimetric sensing of analytes.* Nature Protocols, 2006. **1**(1): p. 246-252.
13. Yeh, Y.C., B. Creran, and V.M. Rotello, *Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology.* Nanoscale, 2012. **4**(6): p. 1871-1880.
14. Liz-Marzan, L.M., *Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles.* Langmuir, 2006. **22**(1): p. 32-41.
15. Toderas, F., et al., *Tuning the plasmon resonances of gold nanoparticles by controlling their size and shape.* Journal of Optoelectronics and Advanced Materials, 2008. **10**(9): p. 2282-2284.
16. Nuzzo, R.G. and D.L. Allara, *Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces.* Journal of the American Chemical Society, 1983. **105**(13): p. 4481-4483.

17. Nuzzo, R.G., F.A. Fusco, and D.L. Allara, *Spontaneously Organized Molecular Assemblies .3. Preparation and Properties of Solution Adsorbed Monolayers of Organic Disulfides on Gold Surfaces.* Journal of the American Chemical Society, 1987. **109**(8): p. 2358-2368.
18. Troughton, E.B., et al., *Monolayer Films Prepared by the Spontaneous Self-Assembly of Symmetrical and Unsymmetrical Dialkyl Sulfides from Solution onto Gold Substrates - Structure, Properties, and Reactivity of Constituent Functional-Groups.* Langmuir, 1988. **4**(2): p. 365-385.
19. Porter, M.D., et al., *Spontaneously Organized Molecular Assemblies .4. Structural Characterization of Normal-Alkyl Thiol Monolayers on Gold by Optical Ellipsometry, Infrared-Spectroscopy, and Electrochemistry.* Journal of the American Chemical Society, 1987. **109**(12): p. 3559-3568.
20. Bain, C.D., J. Evall, and G.M. Whitesides, *Formation of Monolayers by the Coadsorption of Thiols on Gold - Variation in the Head Group, Tail Group, and Solvent.* Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**(18): p. 7155-7164.
21. Bain, C.D. and G.M. Whitesides, *Formation of Monolayers by the Coadsorption of Thiols on Gold - Variation in the Length of the Alkyl Chain.* Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**(18): p. 7164-7175.
22. Andreoni, W., A. Curioni, and H. Gronbeck, *Density functional theory approach to thiols and disulfides on gold: Au(111) surface and clusters.* International Journal of Quantum Chemistry, 2000. **80**(4-5): p. 598-608.
23. Hasan, M., D. Bethell, and M. Brust, *The fate of sulfur-bound hydrogen on formation of self-assembled thiol monolayers on gold: H-1 NMR spectroscopic evidence from solutions of gold clusters.* Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(7): p. 1132-1133.
24. Ulman, A., *Formation and structure of self-assembled monolayers.* Chemical Reviews, 1996. **96**(4): p. 1533-1554.
25. Jewell, A.D., et al., *Effect of Head-Group Chemistry on Surface-Mediated Molecular Self-Assembly.* Chemistry-a European Journal, 2012. **18**(23): p. 7169-7178.
26. Kumar, A., et al., *Investigation into the interaction between surface-bound alkylamines and gold nanoparticles.* Langmuir, 2003. **19**(15): p. 6277-6282.
27. Chen, F., et al., *Effect of anchoring groups on single-molecule conductance: Comparative study of thiol-, amine-, and carboxylic-acid-terminated molecules.* Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(49): p. 15874-15881.
28. Leff, D.V., L. Brandt, and J.R. Heath, *Synthesis and characterization of hydrophobic, organically-soluble gold nanocrystals functionalized with primary amines.* Langmuir, 1996. **12**(20): p. 4723-4730.
29. Selvakannan, P.R., et al., *Capping of gold nanoparticles by the amino acid lysine renders them water-dispersible.* Langmuir, 2003. **19**(8): p. 3545-3549.
30. de la Llave, E., et al., *Organization of Alkane Amines on a Gold Surface: Structure, Surface Dipole, and Electron Transfer.* Journal of Physical Chemistry C, 2014. **118**(1): p. 468-475.
31. Uvdal, K., I. Persson, and B. Liedberg, *Tricyclohexylphosphine Adsorbed on Gold.* Langmuir, 1995. **11**(4): p. 1252-1256.
32. Westermark, G., et al., *An infrared study on the chemisorption of tertiary phosphines on coinage and platinum group metal surfaces.* Colloids and

Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 1999. **150**(1-3): p. 31-43.
33. Mirkin, C.A., et al., *A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials.* Nature, 1996. **382**(6592): p. 607-609.
34. Zanoli, L.M., R. D'Agata, and G. Spoto, *Functionalized gold nanoparticles for ultrasensitive DNA detection.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. **402**(5): p. 1759-1771.
35. Li, F., et al., *Thermal Stability of DNA Functionalized Gold Nanoparticles.* Bioconjugate Chemistry, 2013. **24**(11): p. 1790-1797.
36. Herdt, A.R., et al., *DNA dissociation and degradation at gold nanoparticle surfaces.* Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2006. **51**(2): p. 130-139.
37. Bhatt, N., et al., *Dissociation and Degradation of Thiol-Modified DNA on Gold Nanoparticles in Aqueous and Organic Solvents.* Langmuir, 2011. **27**(10): p. 6132-6137.
38. Letsinger, R.L., et al., *Use of a steroid cyclic disulfide anchor in constructing gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates.* Bioconjugate Chemistry, 2000. **11**(2): p. 289-291.
39. Dougan, J.A., et al., *Enhanced oligonucleotide-nanoparticle conjugate stability using thioctic acid modified oligonucleotides.* Nucleic Acids Research, 2007. **35**(11): p. 3668-3675.
40. Li, Z., et al., *Multiple thiol-anchor capped DNA-gold nanoparticle conjugates.* Nucleic Acids Research, 2002. **30**(7): p. 1558-1562.
41. Li, H.X. and L. Rothberg, *Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(39): p. 14036-14039.
42. Nelson, E.M. and L.J. Rothberg, *Kinetics and Mechanism of Single-Stranded DNA Adsorption onto Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles in Colloidal Solution.* Langmuir, 2011. **27**(5): p. 1770-1777.
43. Zhang, X., et al., *Instantaneous Attachment of an Ultrahigh Density of Nonthiolated DNA to Gold Nanoparticles and Its Applications.* Langmuir, 2012. **28**(49): p. 17053-17060.
44. Zhang, X., et al., *Polarity Control for Nonthiolated DNA Adsorption onto Gold Nanoparticles.* Langmuir, 2013. **29**(20): p. 6091-6098.
45. Zhang, X., M.R. Servos, and J.W. Liu, *Surface Science of DNA Adsorption onto Citrate-Capped Gold Nanoparticles.* Langmuir, 2012. **28**(8): p. 3896-3902.
46. Pei, H., et al., *Designed Diblock Oligonucleotide for the Synthesis of Spatially Isolated and Highly Hybridizable Functionalization of DNA-Gold Nanoparticle Nanoconjugates.* Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(29): p. 11876-11879.
47. Opdahl, A., et al., *Independent control of grafting density and conformation of single-stranded DNA brushes.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(1): p. 9-14.
48. Prigodich, A.E., et al., *Tailoring DNA Structure To Increase Target Hybridization Kinetics on Surfaces.* Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(31): p. 10638-10641.
49. Hurst, S.J., A.K.R. Lytton-Jean, and C.A. Mirkin, *Maximizing DNA loading on a*

range of gold nanoparticle sizes. Analytical Chemistry, 2006. **78**(24): p. 8313-8318.
50. Zhang, X., M.R. Servos, and J.W. Liu, *Instantaneous and Quantitative Functionalization of Gold Nanoparticles with Thiolated DNA Using a pH-Assisted and Surfactant-Free Route.* Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(17): p. 7266-7269.
51. Stakenborg, T., et al., *Increasing the stability of DNA-functionalized gold nanoparticles using mercaptoalkanes.* Journal of Nanoparticle Research, 2008. **10**: p. 143-152.
52. Aslan, K. and V.H. Perez-Luna, *Surface modification of colloidal gold by chemisorption of alkanethiols in the presence of a nonionic surfactant.* Langmuir, 2002. **18**(16): p. 6059-6065.
53. Xu, S.M., et al., *Rapid Synthesis of Stable and Functional Conjugates of DNA/Gold Nanoparticles Mediated by Tween 80.* Langmuir, 2011. **27**(22): p. 13629-13634.
54. Zhang, X., M.R. Servos, and J.W. Liu, *Ultrahigh Nanoparticle Stability against Salt, pH, and Solvent with Retained Surface Accessibility via Depletion Stabilization.* Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(24): p. 9910-9913.
55. Shin, J., X. Zhang, and J.W. Liu, *DNA-Functionalized Gold Nanoparticles in Macromolecularly Crowded Polymer Solutions.* Journal of Physical Chemistry B, 2012. **116**(45): p. 13396-13402.
56. Lee, O.S., T.R. Prytkova, and G.C. Schatz, *Using DNA to Link Gold Nanoparticles, Polymers, and Molecules: A Theoretical Perspective.* Journal of Physical Chemistry Letters, 2010. **1**(12): p. 1781-1788.
57. Jin, R.C., et al., *What controls the melting properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies?* Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(6): p. 1643-1654.
58. Park, S.Y., et al., *Sharp melting in DNA-linked nanostructure systems: Thermodynamic models of DNA-linked polymers.* Journal of Physical Chemistry B, 2007. **111**(30): p. 8785-8791.
59. Storhoff, J.J., et al., *One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes.* Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(9): p. 1959-1964.
60. Harris, N.C. and C.H. Kiang, *Disorder in DNA-linked gold nanoparticle assemblies.* Physical Review Letters, 2005. **95**(4).
61. Harris, N.C. and C.H. Kiang, *Defects can increase the melting temperature of DNA - Nanoparticle assemblies.* Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(33): p. 16393-16396.
62. Smith, B.D. and J.W. Liu, *Assembly of DNA-Functionalized Nanoparticles in Alcoholic Solvents Reveals Opposite Thermodynamic and Kinetic Trends for DNA Hybridization.* Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(18): p. 6300-+.
63. Leuvering, J.H.W., et al., *Sol Particle Agglutination Immunoassay for Human Chorionic-Gonadotropin.* Fresenius Zeitschrift Fur Analytische Chemie, 1980. **301**(2): p. 132-132.
64. Goverde, B.C., et al., *Evaluation of a Sol Particle Immunoassay for Pregnancy Detection.* Fresenius Zeitschrift Fur Analytische Chemie, 1982. **311**(4): p. 361-

361.
65. Ngom, B., et al., *Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **397**(3): p. 1113-1135.
66. Mens, P.F., et al., *Development, validation and evaluation of a rapid PCR-nucleic acid lateral flow immuno-assay for the detection of Plasmodium and the differentiation between Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax.* Malaria Journal, 2012. **11**.
67. Mens, P.F., et al., *Molecular diagnosis of malaria in the field: development of a novel 1-step nucleic acid lateral flow immunoassay for the detection of all 4 human Plasmodium spp. and its evaluation in Mbita, Kenya.* Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2008. **61**(4): p. 421-427.
68. Blazkova, M., et al., *Development of a nucleic acid lateral flow immunoassay for simultaneous detection of Listeria spp. and Listeria monocytogenes in food.* European Food Research and Technology, 2009. **229**(6): p. 867-874.
69. Blazkova, M., et al., *Immunochromatographic strip test for detection of genus Cronobacter.* Biosensors & Bioelectronics, 2011. **26**(6): p. 2828-2834.
70. Ang, G.Y., C.Y. Yu, and C.Y. Yean, *Ambient temperature detection of PCR amplicons with a novel sequence-specific nucleic acid lateral flow biosensor.* Biosensors & Bioelectronics, 2012. **38**(1): p. 151-156.
71. Mao, X., et al., *Disposable Nucleic Acid Biosensors Based on Gold Nanoparticle Probes and Lateral Flow Strip.* Analytical Chemistry, 2009. **81**(4): p. 1660-1668.
72. Glynou, K., et al., *Oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for DNA analysis by hybridization.* Analytical Chemistry, 2003. **75**(16): p. 4155-4160.
73. Aveyard, J., et al., *One step visual detection of PCR products with gold nanoparticles and a nucleic acid lateral flow (NALF) device.* Chemical Communications, 2007(41): p. 4251-4253.
74. Lie, P.C., et al., *A lateral flow biosensor for detection of nucleic acids with high sensitivity and selectivity.* Chemical Communications, 2012. **48**(2): p. 236-238.
75. Rastogi, S.K., et al., *DNA detection on lateral flow test strips: enhanced signal sensitivity using LNA-conjugated gold nanoparticles.* Chemical Communications, 2012. **48**(62): p. 7714-7716.
76. Mao, X., et al., *Molecular beacon-functionalized gold nanoparticles as probes in dry-reagent strip biosensor for DNA analysis.* Chemical Communications, 2009(21): p. 3065-3067.
77. Hou, S.Y., et al., *MicroRNA detection using lateral flow nucleic acid strips with gold nanoparticles.* Talanta, 2012. **99**: p. 375-379.
78. Xu, H., et al., *Aptamer-Functionalized Gold Nanoparticles as Probes in a Dry-Reagent Strip Biosensor for Protein Analysis.* Analytical Chemistry, 2009. **81**(2): p. 669-675.
79. Guo, Z.Y., et al., *A test strip platform based on DNA-functionalized gold nanoparticles for on-site detection of mercury (II) ions.* Talanta, 2012. **93**: p. 49-54.
80. Tse, R.C.W.H.Y., *Lateral Flow Immunoassay.* 2009.
81. Liu, X.O., et al., *Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands.* Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2007.

58(1): p. 3-7.
82. Demers, L.M., et al., *A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles.* Analytical Chemistry, 2000. **72**(22): p. 5535-5541.
83. Kim, E.Y., et al., *A real-time PCR-based method for determining the surface coverage of thiol-capped oligonucleotides bound onto gold nanoparticles.* Nucleic Acids Research, 2006. **34**(7).
84. Soliman, H. and M. El-Matbouli, *Loop mediated isothermal amplification combined with nucleic acid lateral flow strip for diagnosis of cyprinid herpes virus-3.* Molecular and Cellular Probes, 2010. **24**(1): p. 38-43.