

Guld-nanopartiklers anvendelse i medicinsk diagnosticering og imaging

Moderne medicinsk forskning og detektion af DNA trækker tråde tilbage til 1800-tallets brug af guld-nanopartikler

Af Vikram Kjöller Bhatia, Nano-Science Center, Københavns Universitet

Medicinsk brug af kolloidt guld startede tilbage i det gamle Egypten, hvor datidens alkymister brugte cremer med kolloidt guld til behandling af hjerteproblemer, leddegigt, epilepsi og kræft [1].

Siden hen har kolloidt guld på grund af sine særlige optiske egenskaber været brugt som farvestof i glas, hvor det mest berømte eksempel er Rose-vinduet i Notre Dame, Paris. I 1857 beskrev Faraday for første gang, hvordan man laver guld-nanopartikler ved at reducere en vandig opløsning af

det være sig inden for elektronik, katalyse og senest medicinsk forskning og diagnosticering.

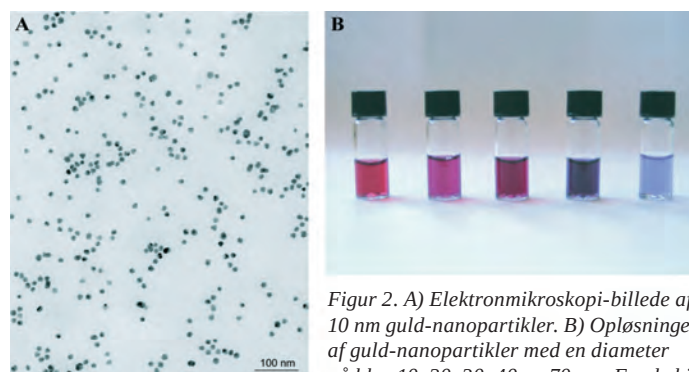
Guld-nanopartiklers syntese og egenskaber

Guld-nanopartiklers syntese afhænger af den ønskede størrelse. To populære syntesemetoder eksisterer for syntesen af små (1-10 nm) og større (10-150 nm) partikler. Store nanopartikler dannes ved at reducere en vandig opløsning tetrachloraurat (AuCl_4^-) med citrat – partikelstørrelsen kan styres med koncentrationen af reducerende agent, der er til stede [2]. Små nanopartikler kan syntetiseres vha. et tofasesystem, hvor partikelvæksten stoppes ved dannelse af et ligand monolag af alkanthiol [3]. Guld-salt-komplekset trækkes af en fasetransfer-agent fra vandig polær fase over i en organisk upolær fase, hvor partiklen dannes og stabiliseres. Partikelstørrelsen styres her med forholdet mellem guld og stabiliserende ligand. Guld-nanopartiklers særlige størrelsesafhængige optiske



Figur 1. Rose-mosaikvinduet i Notre Dame, Paris.

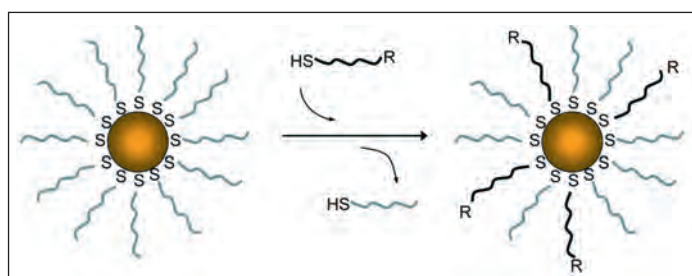
guld(III)chlorid – og siden har brugen af guldpartikler i det 21. århundrede virkelig taget fart. Især inden for nanoteknologi er guld-nanopartikler (Au NP) blevet en af de foretrukne byggeblokke for konstruktionen af større funktionelle systemer,



Figur 2. A) Elektronmikroskopi-billede af 10 nm guld-nanopartikler. B) Opløsninger af guld-nanopartikler med en diameter på hhv. 10, 20, 30, 40 og 70 nm. Forskel i SPR-maks. er årsag til opløsningernes forskellige farve.

egenskaber kommer fra et fænomen, der kaldes Surface Plasmon Resonance, SPR. Det er en koherent oscillation af overflade-elektroner, der gør, at lys med samme bølgelængde som oscillationerne absorberes stærkt. Oscillations-bølgelængden er afhængig af partiklens (boksens) størrelse, og derfor kan guldpartikel-opløsninger skifte farve fra rød til lilla. Da farven kommer fra et fysisk fænomen og ikke et farvestofmolekyle, bleges den ikke, og derfor fremstår katedralvinduet i Paris ligeså farvefuldt, som da det blev til.

Funktionalisering af guld-nanopartikler foregår hovedsagelig ved at udnytte svovls velkendte affinitet for guld, således at thiol-holdige molekyler eller proteiner med cysteiner binder af sig selv til partiklens overflade. Det er også muligt at



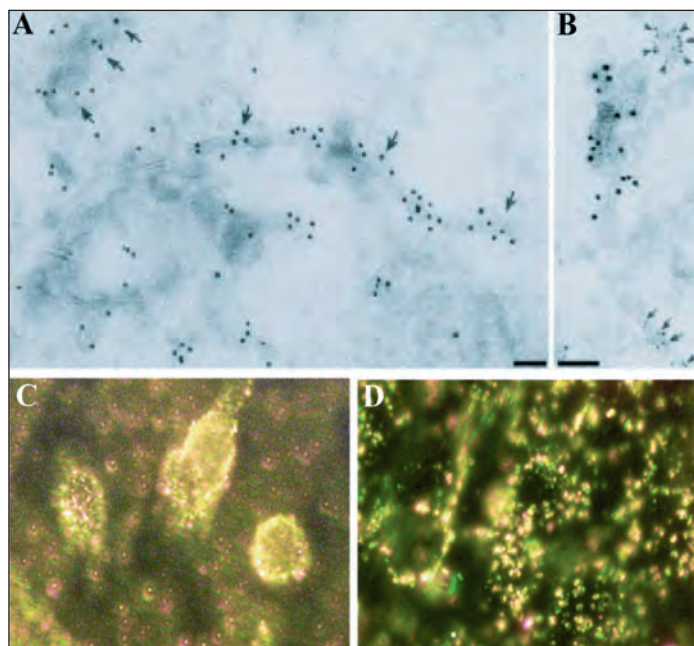
Figur 3. Ligand-udveksling til alkanthioler med funktionelle grupper (-R).

udskifte ligander på partiklen og dermed introducere ønskede funktionaliteter, såsom vandopløselighed (-COOH), stealth (-PEG) og specifik binding (-DNA). Til medicinsk brug i lokalisering/imaging bruges typisk større guldpartikler, hvor antistoffer mod et ønsket protein immobiliseres på partiklerne. Guldpartiklen kan derefter i en mikroskopisk undersøgelse afsløre, om target-proteinet er til stede, hvor og i hvor stor kvantitet.

gelse afsløre, om target-proteinet er til stede, hvor og i hvor stor kvantitet.

Guld-nanopartiklers brug til imaging

Immuno elektronmikroskopi har eksisteret længe, men med adgangen til nanometersmå partikler er det nu muligt at undersøge væv, celler og områder i celler, som kun partikler med nanometerstørrelse har adgang til. Ligeledes har syntesekontrollen af Au NP medført, at det er muligt at bruge forskellige størrelser til at lokalisere forskellige targets. F.eks. hvis man vil undersøge, om et givent protein fungerer i en mistænkt sammenhæng, f.eks.



Figur 4. Guld-nanopartikler i imaging, Elektronmikroskopi (A-B) og Dark Field-mikroskopi (C-D). A) Subcellulær lokalisering af proteinet Sortin Nexin 1 (SNX1) visualiseret med 10 nm Au NP. B) Lokalisering af SNX1 (10 nm Au NP) og transferrin-receptor (5 nm Au NP, markeret med pile) i celle. Interaktion kan udelukkes pga. manglende co-lokalisering [4]. C) Funktionaliserede Au NP binder cancerceller og lyser dem op. D) Raske celler binder i lavere grad Au NP [5].

Ny Metrohm IC

med ny software og intelligente kolonner.

Et sikkert køb

med 3 års garanti på instrumenter og 10 års garanti på suppressor.



Tjek den på:
www.professional-ic.com
eller ring på 70 200 561

Metrohm

i regulering af receptorkoncentration på celleoverfladen, vil man kunne visualisere receptor med en størrelse Au NP og protein-liganden med en anden størrelse. Denne metode er blevet brugt til at bestemme proteinet Sorting Nexin 1's (SNX1) lokalisering og funktion [4]. Her visualiseres proteinet med 10 nm Au NP til et bestemt område i cellen, hvor det har dets funktion. Interaktionen med transferrin-receptoren, visualiseret med mindre Au NP (5 nm), kan udelukkes, da de findes i forskellige subcellulære områder (figur 4).

En af de nye teknikker, der er dukket op inden for de seneste par år inden for imaging og til diskriminering mellem cancer- eller non-cancerceller, er Dark-Field-mikroskopi, som udnytter partiklernes evne til at sprede lys. Nogle cancerceller opregulerer produktionen af bestemte proteiner for bedre at kunne overleve (udkonkurrere) raske celler, og det er især proteinet epidermal-growth factor receptor (EGFR).

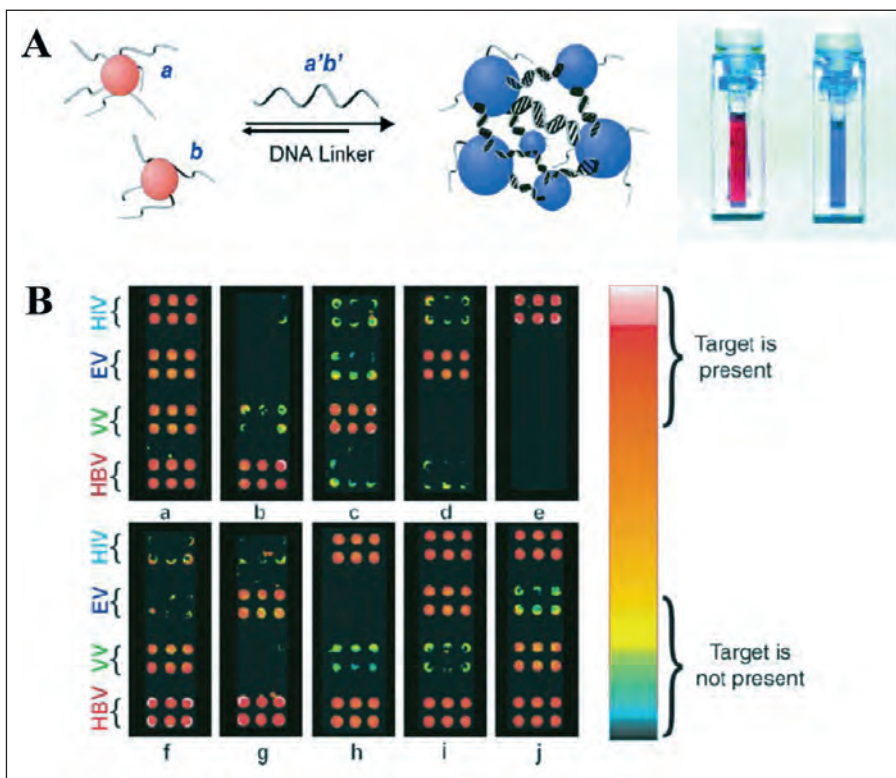
Det er blevet vist, at Au NP konjugeret med antistof mod EGFR binder cancerceller specifikt og dermed »lyser« dem op til forskel fra non-cancerceller [5]. Fremtidig forskning i behandling af kræft går på at hæfte medicin fast på Au NP, så en dobbelfunktion med specifik transport/binding til cancervæv og behandling opnås. En anden tilgang er at anvende Au NP's særlige optiske egenskaber som stærkt lysabsorberende. Ved at belyse partiklerne ved SPR-bølglængden (f.eks. 543 nm) med en laser opnås en høj opvarmning, og energien afsættes som varme i det omkringliggende væv. Dermed kan sygt væv ødelægges uden brug af medicin/kemoterapi og de dertilhørende bivirkninger.

Diagnosticering af virus og kræft vha. guld-nanopartikler

Forskere fra USA har fundet ud af at bruge guld-nanopartikler til detektering af DNA. Det er specielt en gruppe fra North Western University (NWU), der har ført an i brugen af guldpartikler til at detektere DNA [6]. Konceptet er bygget op omkring Au NP's optiske egenskaber, hvor partiklerne har en rød farve, hvis de er langt fra hinanden, og en lilla farve hvis de er tæt på hinanden (aggregerede). Tilstedeværelsen af et stykke DNA, f.eks. fra virus, vil kunne binde to forskellige guldpartikler sammen, der har komplementær DNA til hver deres ende af virus-DNA'et (figur 5A). Binding vil forårsage aggregering af guldpartikler, og dermed kan detektion af DNA visualiseres ved et farveskift.

Forskerne fra NWU har videreudviklet konceptet for DNA-detektion med Au NP, således at det nu er muligt at detektere flere forskellige virus tilstede i en kompleks opløsning. Sensitiviteten af denne metode gør, at det er muligt at måle DNA i femtomolær koncentration. I et forsøg har man taget hepatitis B-, koppe-, ebola- og hiv-virus-DNA-fragmenter, og testet om de ville kunne måles enkeltvis og i opløsninger med kombinationer [7]. Resultaterne i figur 5B viser detektion af det enkelte virus og i stigende grad af blandinger.

Commercialisering af denne måde at detektere DNA på er allerede i fuld gang, og det amerikanske selskab Nanosphere har gjort det muligt at flytte metoden fra laboratoriet ud i verden, hvor den kan gøre nytte. Sidste nye opdagelse er muligheden for at detektere proteiner vha. Au NP. Et proof-of-principle blev udført med en markør for bryst- og prostatakræft (PSA), og resultaterne viste overvældende forbedring ift. eksisterende ELISA-metoder [8].



Figur 5. A) Au NP, med hver sin del af komplementær DNA til et target-DNA, binder dette, aggregerer og opløsningen skifter farve. B) Videreudvikling af Au NP-baseret DNA-detektion. Parallel detektion af hepatitis B (HBV)-, koppe (VV)-, ebola (EV)- og hiv-virus. Enkeltvis b-e og i stigende komplekse opløsninger f-j [7].

Anvendelse af guld-nanopartikler har taget et stort skridt fremad fra 1800-tallets æstetiske anvendelse i glas. Men nutidig medicinsk anvendelse bygger stadig på de samme optiske fænomener. I fremtiden vil guld-nanopartikler fortsat spille en rolle i detektering og måske behandling af sygdomme.

E-mail-adresse
Vikram Kjøller Bhatia: vkb@nano.ku.dk

Referencer

1. Daniel, M. C. & Astruc, D. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews* **104**, 293-346 (2004).
2. Frens, G. Controlled Nucleation for Regulation of Particle-Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature-Physical Science* **241**, 20-22 (1973).
3. Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. & Whyman, R. Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a 2-Phase Liquid-Liquid System. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* 801-802 (1994).
4. Zhong, Q. et al. Endosomal localization and function of sorting nexin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 6767-6772 (2002).
5. El-Sayed, I. H., Huang, X. H. & El-Sayed, M. A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: Applications in oral cancer. *Nano Letters* **5**, 829-834 (2005).
6. Elghariani, R., Storhoff, J. J., Mucic, R. C., Letsinger, R. L. & Mirkin, C. A. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science* **277**, 1078-1081 (1997).
7. Stoeva, S. I., Lee, J. S., Thaxton, C. S. & Mirkin, C. A. Multiplexed DNA detection with biobarcode nanoparticle probes. *Angewandte Chemie-International Edition* **45**, 3303-3306 (2006).
8. Nam, J. M., Thaxton, C. S. & Mirkin, C. A. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science* **301**, 1884-1886 (2003).