

Abbildung 4. Energieprofil der Gasphasenreaktion von Benzol mit C_4H_9^+ ausgehend von der π -Komplexbildung und dem folgenden Übergangszustand zum σ -Komplex; $E(\text{Benzol} + \text{tBu}^+) = \text{Nullpunkt}$. Die obere Kurve repräsentiert die Nullpunktenergien (= gute Näherung an die relativen Enthalpien); zusätzlich sind die potentiellen Energien angegeben.

Unsere Resultate sind in Übereinstimmung mit jenen der Gasphasen-EAS mit Alkylkationen, die auf der Basis massenspektrometrischer^[14–16] und radiolytischer Methoden^[17] erhalten wurden. Holman und Gross zeigten, dass die σ - und π -Komplexe als ineinander umwandelbare Spezies koexistieren können, wobei die Existenz der π -Komplexe für Reaktionen mit großen Carbokationen wie Butyl- und Pentylkationen eindeutig wird.^[14a] Die beträchtliche π -Komplexstabilisierung (hier etwa 10 kcal mol⁻¹) hat auch Bedeutung für die Bildung von Intermediaten in enzymatischen Reaktionen.^[19] Für kondensierte Systeme ist anzumerken, dass über die Existenz der π -Komplexe nur bedingt auf der Grundlage der Gasphasenchemie ionischer Elektrophile entschieden werden kann. Die umfangreichen indirekten Beweise, die Olah^[2] vorlegte, sind aber ein bedeutender Hinweis für die Existenz von π -Komplexen auch in Lösung, d. h., wir können durchaus von einer qualitativen Ähnlichkeit der Strukturbildung in der Ion-Molekülreaktion (Gas) und beim entsprechenden elektrophilen Angriff in bestimmten Reaktionslösungen ausgehen.

Eingegangen am 13. März 2002 [Z18881]

- [1] M. J. S. Dewar, *J. Chem. Soc.* **1946**, 777–781; *Molecular Rearrangements, Part 1* (Hrsg.: P. de Mayo), Wiley-Interscience, New York, 1963.
- [2] G. A. Olah, *Acc. Chem. Res.* **1971**, 4, 240–248.
- [3] a) H. R. Christen, F. Vögtle, *Organische Chemie, Vol. 1*, Salle & Sauerländer, Frankfurt, 1992; b) F. A. Carey, R. J. Sundberg, *Organische Chemie*, VCH, Weinheim, 1995.
- [4] a) M. S. Hubig, J. K. Kochi, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 6807–6818, zit. Lit.; b) K. S. Kim, P. Tarakeshwar, J. Y. Lee, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4145–4185, zit. Lit.
- [5] D. Heidrich, M. Grimmer, *Int. J. Quantum Chem.* **1975**, 9, 923–940; D. Heidrich, P. Hobza, P. Čarsky, R. Zahradník, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1978**, 43, 3020–3023.
- [6] W. C. Ermler, R. S. Mulliken, E. Clementi, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 388–394; H.-J. Köhler, H. Lischka, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 3479–3486; S. Sieber, P. von R. Schleyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6987–6988, zit. Lit.

- [7] D. Kuck, *Mass Spectrom. Rev.* **1990**, 9, 583–630.
- [8] G. A. Olah, R. H. Schlosberg, R. D. Porter, Y. K. Mo, D. P. Kelley, G. D. Mateescu, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 2034–2043.
- [9] P. C. Miklis, R. Ditchfield, T. A. Spencer, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 10482–10489.
- [10] D. Berthomieu, V. Brenner, G. Ohanessian, J. P. Denhez, P. Millié, H. E. Audier, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 712–720.
- [11] G. Tasi, F. Mizukami, M. Toba, S. Niwa, I. Palinko, *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, 1337–1345.
- [12] Gaussian 98 (Revision A.9), M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, J. A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 1998.
- [13] z.B. D. Heidrich, N. J. R. van Eikema Hommes, P. von R. Schleyer, *J. Comput. Chem.* **1993**, 14, 1149–1163; D. Heidrich, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, 1, 2209–2211.
- [14] a) R. W. Holman, M. L. Gross, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 3560–3565; b) R. W. Holman, T. Eary, E. Whittle, M. L. Gross, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 2187–2193.
- [15] a) U. Filges, H. F. Grützmacher, *Org. Mass Spectrom.* **1986**, 21, 673–680; b) D. Berthomieu, H. D. Audier, C. Monteiro, J. P. Denhez, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, 5, 415–420; c) D. Kuck, C. Matthias, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1901–1903; d) D. Berthomieu, H. D. Audier, J. P. Denhez, C. Monteiro, P. Mourguet, *Org. Mass. Spectrom.* **1991**, 26, 271–275.
- [16] In Lit. [15d] werden ICR-Daten über die Existenz des Isopropylkation- π -Komplexes interpretiert.
- [17] F. Cacace, *Acc. Chem. Res.* **1988**, 21, 215–222; siehe auch F. Cacace, M. E. Crestoni, S. Fornarini, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 6776–6784.

Ligandendesign und Biokonjugation kolloidaler Gold-Nanopartikel**

Andrea Schroedter und Horst Weller*

Die Verknüpfung von anorganischen Nanopartikeln mit biologischen Molekülen hat in jüngster Zeit ein rasch expandierendes Forschungsgebiet geschaffen, in dem zahlreiche Aspekte der Biosensorik, der medizinischen Diagnostik und Wirkstoff-Freisetzung bis hin zu grundlegenden Untersuchungen im Bereich der sich selbstorganisierenden Nanoelektronik behandelt werden.^[1] Als ein prominentes Beispiel sei hier die Markierung biologischer Substrate mit Edel-

[*] Prof. Dr. H. Weller, A. Schroedter
Institut für Physikalische Chemie
Universität Hamburg
Bundesstraße 45, 20146 Hamburg (Deutschland)
Fax: (+49) 40-42838-3452
E-mail: weller@chemie.uni-hamburg.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Europäischen Union im Rahmen des „Information Society Technologies“ Programmes gefördert. Herrn A. Kornowsky danken wir für die Anfertigung der TEM-Aufnahmen.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

metall-Nanopartikeln oder fluoreszierenden Halbleiterelementen genannt.^[2,3] Entscheidend für die Herstellung solcher Konjugate aus Nanopartikeln und Biomolekülen ist die Entwicklung einer Oberflächenchemie der Nanopartikel, bei der die stabilisierenden Liganden fest mit dem Nanopartikel verankert sind und endständige funktionelle Gruppen haben, die selektiv für biochemische Kupplungen zur Verfügung stehen. Häufig geschieht die Anbindung an die Partikeloberfläche über Thiolgruppen.^[4-6] Im Falle von Gold-Nanopartikeln lässt sich hier ein sehr einfacher Weg realisieren, indem man thiolierte DNA quasi als Ligand verwendet.^[7-10] In den meisten Fällen reicht aber eine einfache Ligandenbindung an der Teilchenoberfläche nicht aus, um eine dauerhafte Verknüpfung zu bewerkstelligen. Vielmehr stellt sich ein Gleichgewicht ein, bei dem ein stetiger Ligandenaustausch erfolgt. Um dies zu verhindern, wird häufig eine Schale aus Siliciumdioxid über die Sol-Gel-Technik um das eigentliche Teilchen aufgebaut,^[11-14] und die nach außen zeigenden Verknüpfungsgruppen werden als funktionalisierte Alkoxy silane während des Polykondensationsprozesses aufgebracht.^[15,16] Man erhält dabei relativ kompakte Silicathüllen und eine dichte Belegung der Oberfläche mit Kupplungsgruppen.

In einer ideal gestalteten Oberfläche sollte die Zahl der Verknüpfungsgruppen einstellbar sein, und man sollte zusätzliche inerte funktionelle Gruppen einbauen, die die Löslichkeit und das Oberflächenpotential der Teilchen bestimmen. Die Ankergruppen der Liganden sollten auf der Kristallitoberfläche möglichst fest haften, und die Liganden sollten untereinander kovalent vernetzt sein, um dadurch eine Austauschdynamik vollständig zu unterdrücken. Die Kristallitoberfläche sollte zudem dicht belegt sein, damit alle freien Valenzen terminiert sind. Schließlich ist es wünschenswert, dass die Dicke der gesamten, in sich vernetzten Ligandenhülle gering ist, um den Masseanteil des eigentlichen Nanopartikels möglichst hoch halten zu können.

Wir wollen im Folgenden einen Syntheseweg für eine derart optimierte Ligandenhülle beschreiben und exemplarisch die Kupplung an Biotin und die Konjugatbildung der biotinylierten Teilchen mit Avidin darstellen. Aufgrund der hohen chemischen Resistenz haben wir diese Synthese zunächst für Gold-Nanopartikel entwickelt, erste Versuche zeigen jedoch, dass dieser Weg auch auf Halbleiter-Nanopartikel übertragbar ist.

Der schematische Aufbau der Ligandenhülle ist in Abbildung 1 gezeigt. Zunächst wurden Gold-Nanopartikel durch

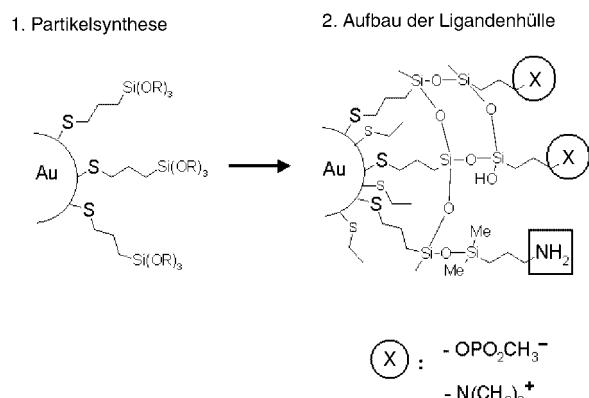
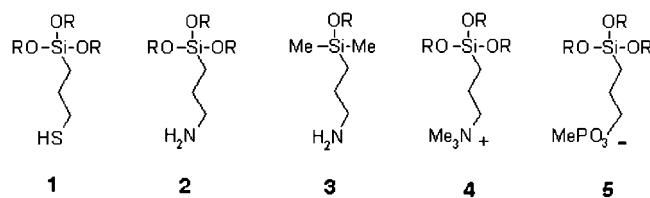


Abbildung 1. Aufbau der Ligandenhülle.

Reduktion von KAuCl_4 mit NaBH_4 in Propanol in Gegenwart des Liganden 3-Sulfanylpropyltrimethoxysilan **1** hergestellt.



Man erhält hierbei Partikel mit einem mittleren Durchmesser von etwa 2.2 nm und einer Standardabweichung von 21 %. Die Thiolgruppe des Liganden **1** bindet sehr fest an die Teilchenoberfläche, und die Trimethoxysilyl-Gruppe erlaubt weitere Funktionalisierung und Quervernetzung der Liganden. Wurde die dazu nötige Polykondensation in Gegenwart von überschüssigem Aminopropyltrimethoxysilan **2** durchgeführt, so erfolgte unter unseren Bedingungen eine relativ rasche Koagulation. Dies lässt darauf schließen, dass die Trialkoxysilylgruppen der Liganden **1** und **2** ausgedehnte interpartikuläre Netzwerke gebildet haben. Wir konnten diesen Koagulationsschritt vermeiden, indem wir die Polykondensation in Gegenwart von 3-Aminopropyltrimethoxysilan **3** durchführten. Ligand **3** hat nur eine kondensierbare Alkoxygruppe und wirkt somit im Polykondensationsprozess terminierend. Als Ergebnis erhält man einen Niederschlag hydrophiler Kolloide, die sich in H_2O lösen (klare Lösung). Die Partikel können mit Propanol gewaschen und wieder in H_2O redispergiert werden. Abbildung 2 zeigt

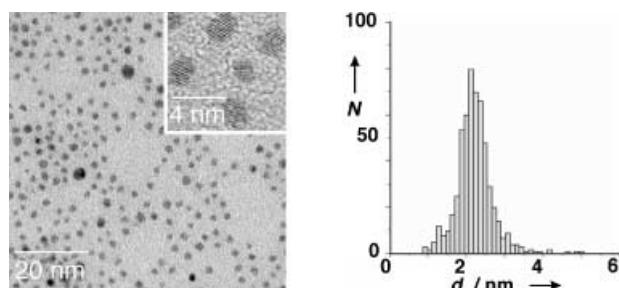


Abbildung 2. TEM-Aufnahme der silicatbeschichteten und aminofunktionalisierten Gold-Nanokristalle und das zugehörige Histogramm.

eine Transmissionselektronenmikroskopieaufnahme und das dazugehörige Histogramm. Man erkennt kristalline gut von einander getrennte Partikel, der Mindestabstand zwischen den Teilchen beträgt etwa 1.5 nm, was ziemlich genau der Länge von zweimal der Summe aus Ligand **1** und **3** entspricht. Das bei Gold häufig auftretende Phänomen, dass außenständige Aminliganden an die Oberfläche eines zweiten Teilchens binden und so zur Koagulation führen,^[17] wird offenbar durch die vernetzten Liganden verhindert. Hierfür spricht auch das Absorptionsspektrum (Abbildung 3), in dem sich eine interpartikuläre Bindung durch eine zusätzliche Bande bei $\lambda > 600$ nm zeigen würde. Das IR-Spektrum der gereinigten Partikel zeigt alle erwarteten Schwingungen der gekoppelten Ligandenhülle und ist mit den jeweiligen Zuordnungen in den Hintergrundinformationen gezeigt.

Wir haben die Zahl der frei zugänglichen Amingruppen an der Oberfläche der Partikel mithilfe des Fluoreszenzindika-

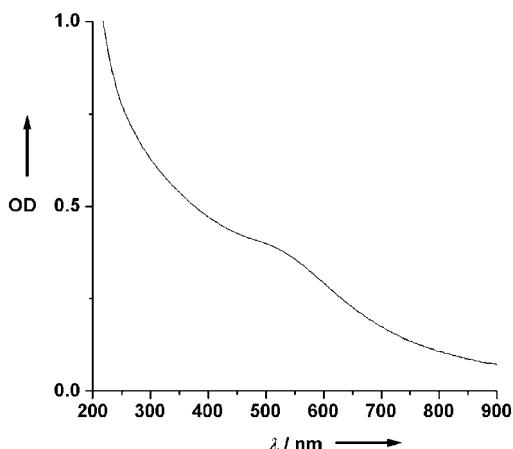


Abbildung 3. UV/Vis-Spektrum einer kolloidalen Lösung der silicatbeschichteten und aminofunktionalisierten Gold-Nanopartikel in Wasser.

tors Fluorescamin bestimmt.^[18-19] In Abbildung 4a ist die Menge Amins – umgerechnet in Zahl pro Goldpartikel – als Funktion der bei der Polykondensation zugegebenen Menge des Liganden **3** gezeigt. Man erkennt, dass schon bei relativ geringen Konzentrationen von **3** bereits 3–4 Aminoliganden pro Teilchen nachweisbar sind und die Erhöhung der Konzentrationen von **3** nur zu einer geringen Zunahme der detektierbaren Aminoliganden führt. Aufgrund des relativ geringen Raumbedarfs der gewählten Liganden ist eine derartig kleine Zahl von Aminogruppen pro Teilchen schwer verständlich, vielmehr drängt sich der Verdacht auf, dass die Aminopropylgruppe bei der Polykondensation nicht nur so eingebaut wird, dass die Aminogruppen nach außen zeigen,

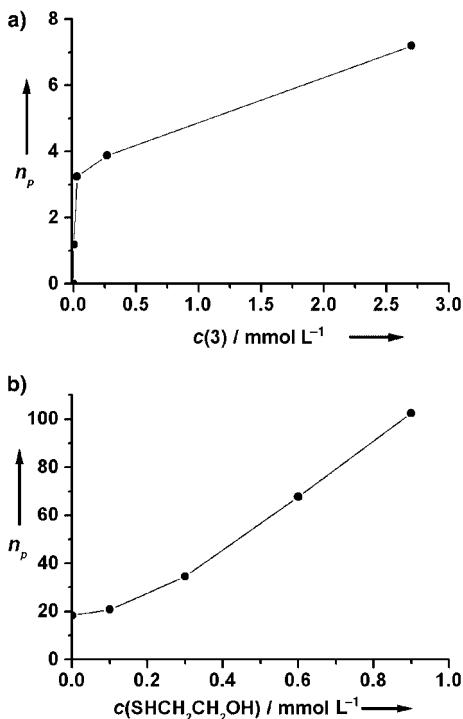


Abbildung 4. Anzahl der mit Fluorescamin bestimmten Aminogruppen pro Partikel (n_p) a) in Abhängigkeit der während des Kondensations schrittes eingesetzten Konzentration von **3** und b) in Abhängigkeit von der 2-Sulfanylethanol-Konzentration. Diese Verbindung wurde als zusätzlicher Ligand vor dem Kondensations schritt mit **3** zugesetzt.

sondern auch eine Rückbindung an die Teilchenoberfläche erfolgt. Dies ist leicht verständlich, da die voluminösen Trimethoxysilylendgruppen, des ursprünglich eingesetzten Liganden **1**, eine vollständige Bedeckung der Goldpartikel mit Thiolatgruppen verhindern. Aminogruppen, die rückgebunden an der Teilchenoberfläche fixiert sind, lassen sich natürlich nicht mit Fluorescamin nachweisen, da dieses Molekül nur mit freien primären Aminen reagiert und kaum bis an die Teilchenoberfläche gelangen kann.

Um den Aminorückbindungsprozess zu untermauern und gegebenenfalls zu verhindern, haben wir während der Polykondensation zusätzlich den kurzkettigen Liganden 2-Sulfanylethanol zugegeben. Ziel war es, die vom Liganden **1** an der Partikeloberfläche freigelassenen Koordinationsstellen zu blockieren und somit die Aminorückbindung zu verhindern. In Abbildung 4b ist wiederum die Zahl der mit Fluorescamin detektierbaren Aminogruppen, diesmal als Funktion der 2-Sulfanylethanolkonzentrationen gezeigt. Man erkennt hier sehr deutlich, dass die 2-Sulfanylethanol-Moleküle die Aminogruppen sozusagen nach außen zwingen.

Mit der bisher beschriebenen Synthese erhält man wasserlösliche Nanopartikel mit einer fest gebundenen Ligandenhülle und nach außen zeigenden Aminogruppen, welche sich hervorragend für Kupplungen mit biologischen Molekülen eignen. So lässt sich z.B. die Aminogruppe mit dem aktivierte n Ester des Biotins umsetzen,^[20-22] einem Molekül, das mit herausragender Selektivität und Spezifität mit Avidinproteinen konjugiert. Die Biotin-Avidin-Kupplung stellt ein lehrbuchhaftes Beispiel für das molekulare Schlüssel-Schloss-System bei Lebensprozessen dar. Bei den Nanopartikeln ergibt sich allerdings mit zunehmendem Grad der Biotinylierung das Problem, dass die zunächst durch Aminogruppen hydrophile Partikeloberfläche immer stärker hydrophob wird und die biotinylierten Teilchen in wässriger Umgebung allmählich ausfallen. Wir haben dieses Problem dadurch gelöst, dass wir während des Polykondensationsschrittes außer dem Liganden **3** noch den mit einer quartären Ammoniumgruppe funktionalisierten Liganden **4** beigemischt haben. Quartäre Ammoniumgruppen lassen sich nicht mit Biotin verknüpfen, sondern bewirken nur im gesamten verfügbaren pH-Bereich eine positive Oberflächenladung der Partikel und sorgen so auch bei der Biotinylierung der Aminoliganden für die gewünschte Wasserlöslichkeit der Teilchen. Über das Verhältnis von Ligand **3** und **4** kann die Zahl der Kupplungsgruppen an der Oberfläche eingestellt werden.

Für eine mögliche Ankupplung negativ geladener Biomoleküle wie DNA lässt sich Ligand **4** gegen **5** austauschen, wodurch die Oberflächenladung der Partikel insgesamt negativ wird und eine Koagulation verhindert wird. Erste Experimente mit DNA konnten erfolgreich durchgeführt werden und werden in einem kommenden Artikel beschrieben.

Um die Konjugatbildung der biotinylierten Partikel nachzuweisen, haben wir fluoreszenzmarkiertes Avidin mit unterschiedlichen Mengen an biotinylierten Partikeln versetzt. Die sich bildenden Konjugate haben eine so große Molmasse, dass sie leicht durch Zentrifugieren aus der Lösung abgetrennt werden können. Die Fluoreszenzintensität im Überstand ist in Abbildung 5 als Funktion der zugegebenen Menge biotiny-

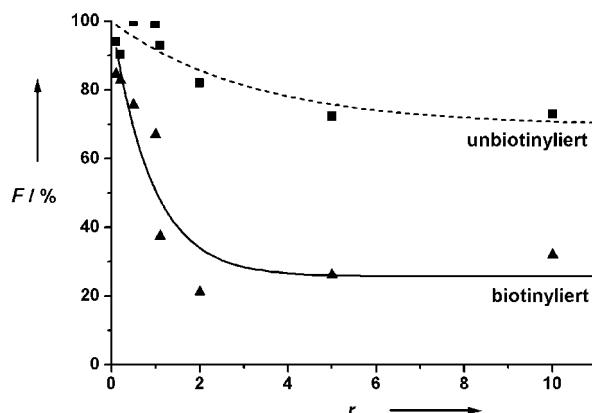


Abbildung 5. Abnahme der Fluoreszenz durch FITC-Avidin im Überstand nach dem Zentrifugieren der Mischungen von FITC-Avidin mit biotinylierten und unbiotinylierten Partikeln als Funktion des molaren Partikel/Avidin-Verhältnisses.

lierter Partikel dargestellt. Auf der x -Achse ist das Verhältnis von biotinylierten Partikeln zu vorgelegtem Avidin angegeben. Man erkennt, dass bereits ab etwa 2 Goldpartikeln pro Avidin die Fluoreszenzintensität im Überstand auf etwa 20% des ursprünglichen Wertes abgesunken ist, was auf eine spezifische Ankupplung schließen lässt. Dass die Fluoreszenzintensität nicht gänzlich zurückgeht, lässt vermuten, dass entweder ein Teil des Avidins nicht kupplungsfähig ist, ein gewisser Prozentsatz der Konjugate durch das Zentrifugieren nicht abgetrennt werden konnte oder eine kleine Menge der Fluoreszenzsondenmoleküle als Monomere und nicht an Avidin angekuppelt vorliegen. Als Blindexperiment haben wir einer identischen Avidinvorlage die entsprechende Menge der nicht biotinylierten, aber ansonsten identischen Goldpartikel zugesetzt. Man beobachtet eine schwache Abnahme der Fluoreszenz nach dem Zentrifugieren, was wir durch einen geringen Anteil unspezifischer Adsorption erklären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir erstmalig eine Synthese für funktionalisierte Nanopartikel vorgestellt haben, die es erlaubt, die Ligandenhülle bei minimaler Dicke kovalent zu verknüpfen und somit statisch an die Teilchenoberfläche zu binden. Darüber hinaus konnte die gesamte Ligandenhülle endständig zur Lösung mit einer frei wählbaren Anzahl von funktionellen Kupplungsgruppen versehen werden und gleichzeitig Löslichkeit und Oberflächenladung durch zusätzliche kovalent gebundene Hilfsliganden eingestellt werden. Sowohl vor wie nach der Biotinylierung waren die derart oberflächenmodifizierten Partikel über Monate stabil und zeigten keine Anzeichen von Koagulation. Die hervorragende Eignung zur spezifischen Biokonjugatbildung zeigte sich in der Biotin-Avidin-Kupplung.

Experimentelles

Alle genutzten Chemikalien waren vom höchsten verfügbaren Reinheitsgrad und wurden von Merck, Sigma, Aldrich, Fluka und ABCR bezogen. Das Millipore-Wasser wies einen spezifischen Widerstand von $18.2\text{ M}\Omega\text{ cm}$ auf.

UV/Vis-Absorptionsspektren wurden mit einem Varian Cary 50 Einstrahlspettrometer aufgenommen. Fluoreszenzspektren wurden bei Raumtem-

peratur mit einem FluoroMax-2 ISA Instruments Inc. Fluoreszenzspektrometer gemessen. Hochauflösende transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Phillips CM 300 UT Mikroskop angefertigt, das mit einer LaB_6 -Kathode bei 300 KV arbeitet und mit einem EDX Detektor und einer CCD-Kamera Typ Gatan 694 ausgestattet ist.

Partikelsynthese: Für die Synthese der mit **1** stabilisierten Gold-Nanokristalle wurde KAuCl_4 in Gegenwart von **1** mit NaBH_4 reduziert. Dafür wurde 1.5 mg KAuCl_4 erst in 80 μL H_2O und dann in 20 mL 2-Propanol gelöst und unter Röhren 0.58 μL **1** und 0.2 mg NaBH_4 (in 240 μL H_2O gelöst) zugegeben. Im nächsten Schritt wurde die Oberfläche der entstandenen 2.2 nm großen Gold-Kolloide in Anwesenheit verschiedener Alkoxyisilane kondensiert.

Für die Aminofunktionalisierung wurden jeweils zu einem 20 mL-Reaktionsansatz $x\text{ }\mu\text{L}$ **3** ($x\text{ }\mu\text{L}$ (entspricht $c(\mathbf{3})$ im Reaktionsansatz); 0.01 μL (2.7 μM); 0.1 μL (27 μM); 1 μL (270 μM); 10 μL (2.7 mM)) mit trockenem DMF jeweils auf ein Volumen von 10 μL verdünnt, 40 μL einer 50-proz. Methanolösung von **4** und 1.5 mL 25-proz. NH_3 -Lösung zugegeben und 16 h gerührt. Der resultierende kolloidale Niederschlag wurde jeweils dreimal in Propanol gewaschen und in 10 mL H_2O redispergiert. Die Anzahl der NH_2 -Gruppen wurde von derart gereinigten Soluten bestimmt. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Oberfläche der Goldpartikel vor dem Kondensationsschritt mit 2-Sulfanylethanol geschützt. Direkt nach dem Reduktionsschritt wurde zu je 20 mL Kolloidlösung $x\text{ }\mu\text{L}$ 2-Sulfanylethanol ($x\text{ }\mu\text{L}$ (entspricht c im Reaktionsansatz); 0.14 μL (100 μM); 0.42 μL (300 μM); 0.84 μL (600 μM); 1.26 μL (900 μM)) zugefügt und dann mit 10 μL **3** und 1.5 mL 25-proz. NH_3 -Lösung kondensiert. Die Kolloide wurden wie oben gereinigt und in 10 mL H_2O gelöst.

In einem Vergleichsexperiment wurde den fertigen Kolloidlösungen nach Präparation der Hülle entsprechende Mengen 2-Sulfanylethanol zugesetzt und die Anzahl der NH_2 -Gruppen bestimmt. Es wurde keine Erhöhung festgestellt.

Nachweis der NH_2 -Gruppen mit Fluorescamin: Zu jeweils 600 μL der gereinigten Kolloidlösungen wurden 400 μL H_2O , 1 mL 50 mM Boratpuffer (pH 9) und 100 μL einer Fluorescaminlösung (2.8 mg in 1 mL Aceton) gegeben und 30 min gerührt. Absorptionsspektren und Emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 390\text{ nm}$) wurden von den auf 1/5 verdünnten Lösungen aufgenommen.

Die Synthese der negativ geladenen, aminofunktionalisierten Gold-Nanokristalle wurde in Methanol durchgeführt. Die Reduktion erfolgte mit gleichen Mengen wie oben beschrieben. Danach wurde nacheinander unter Röhren 45 μL einer 50-proz. Methanolösung von **5**, 10 μL **3**, 500 μL H_2O und 500 μL einer 50-proz. Methanolösung von Tetramethylammoniumhydroxid zugegeben und die Mischung 25 min unter Rückfluss gekocht. Die abgekühlte Lösung wurde mit 26 μL Trimethylchlorosilan versetzt und dann erneut 10 min unter Rückfluss gekocht. 5 mL der resultierenden klaren Lösung wurden mit 1.5 mL H_2O am Rotationsverdampfer auf 1 mL eingeengt und über eine Sephadex G-25-Säule gereinigt.

Biotinylierung: Die Kolloide aus einem 20-mL-Ansatz, die mit einer Mischung aus 10 μL **3** und 40 μL **4** kondensiert wurden, wurden in 3 mL H_2O gelöst und intensiv gegen einen 5 mM K_2HPO_4 -Puffer (pH 7) dialysiert. 0.7 mg Succinimidyl-6-biotinamidoheptanoat wurden unter Schutzgas in 140 μL trockenem DMF gelöst und unter Röhren zum Sol gegeben. Nach 14 Stunden wurde die klare Lösung durch Dialyse gereinigt. Die quantitative Bestimmung der NH_2 -Gruppen vor und nach der Biotinylierung diente als Hinweis für die Biotinylierung und ergab einen Belegung von durchschnittlich zwei Biotingruppen pro Partikel.

FITC-Avidin-Partikel-Konjugate: Für eine Experimentserie mit unterschiedlichen Partikel/Avidin-Verhältnissen wurden $x\text{ }\mu\text{L}$ der gereinigten Lösung biotinylierter Kolloide ($x\text{ }\mu\text{L}$ (Partikel/Avidin-Verhältnis); 7.5 μL (0.25); 15 μL (0.5); 30 μL (1); 75 μL (2.5); 150 μL (5); 300 μL (10)) mit H_2O auf 300 μL aufgefüllt und 15 μL einer FITC-Avidin-Lösung (0.15 mg Protein mL^{-1}) zugegeben und für 20 min geschüttelt.

Die Mischungen wurden jeweils mit H_2O auf 3 mL aufgefüllt und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Von den Überständen wurden Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm aufgenommen.

Eine identische Experimentreihe wurde mit den gleichen jedoch unbiotinylierten Partikeln durchgeführt.

Eingegangen am 25. Januar 2002 [Z18961]

- [1] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4254–4287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *113*, 4128–4158.
- [2] M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, *281*, 2013–2016.
- [3] W. C. W. Chan, S. Nie, *Science* **1998**, *281*, 2016.
- [4] M. Giersig, P. Mulvaney, *Langmuir* **1993**, *9*, 3408–3413.
- [5] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D. J. Schiffrin, C. Kiely, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1655–1656.
- [6] T. H. Galow, A. K. Boal, V. M. Rotello, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 576–579.
- [7] A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez Jr., P. G. Schultz, *Nature* **1996**, *382*, 609–611.
- [8] R. C. Mucic, J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12674–12675.
- [9] C. J. Loweth, W. B. Caldwell, X. Peng, A. P. Alivisatos, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1925–1929; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1808–1812.
- [10] D. Zanchet, C. M. Micheel, W. J. Parak, D. Gerion, A. P. Alivisatos, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 32–35.
- [11] W. Stöber, A. Fink, J. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62.
- [12] L. M. Liz-Marzán, M. Giersig, P. Mulvaney, *Langmuir* **1996**, *12*, 4329–4335.
- [13] T. Ung, L. M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, *Langmuir* **1998**, *14*, 3740–3748.
- [14] F. Caruso, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 11–22.
- [15] P. A. Buining, B. M. Humbel, A. P. Philipse, A. J. Verkleij, *Langmuir* **1997**, *13*, 3921–3926.
- [16] D. Gerion, F. Pinaud, S. C. Williams, W. J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8861–8871.
- [17] S. L. Westcott, S. J. Oldenburg, T. R. Lee, N. J. Halas, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *300*, 651–655.
- [18] M. Weigle, S. L. DeBernard, J. P. Tengi, W. Leimgruber, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 5927–5928.
- [19] S. Udenfriend, S. Stein, P. Böhnen, W. Dairman, W. Leimgruber, M. Weigle, *Science* **1972**, *178*, 871–872.
- [20] K. Hofmann, G. Titus, J. A. Montibeller, F. M. Finn, *Biochemistry* **1982**, *21*, 978–984.
- [21] J. J. Leary, D. J. Brigati, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 4045–4049.
- [22] M. Li, K. K. W. Wong, S. Mann, *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 23–26.

zierung einzelner Moleküle“ zu realisieren. Diese Idee nährt die Hoffnung, die Sequenzanalyse von Genomen deutlich zu beschleunigen, weil bis zu 50 000 bp lange DNA-Fragmente „lesbar“ wären und dadurch die Sequenzinformation schneller zusammengesetzt werden könnte.^[1–5] Die verschiedenen Strategien zur Realisierung der Einzelmolekül-Sequenzierung basieren auf der Tatsache, dass einzelne fluoreszierende Moleküle innerhalb von Millisekunden^[6] identifiziert werden können, und sie kombinieren die sequentielle enzymatische Hydrolyse individueller DNA-Moleküle mit einer sich unmittelbar anschließenden Detektion der freigesetzten Monomere anhand ihrer Fluoreszenzcharakteristika wie Wellenlänge, Fluoreszenzlebensdauer oder einer Kombination beider Eigenschaften.^[5,7]

Zwei ungewöhnliche enzymatische Aktivitäten werden für diese Technik benötigt, erstens die vollständige und sequenztreue Synthese von DNA-Kopien ausschließlich aus fluoreszenzmarkierten Analoga der vier Nucleobasen (A, G, C und T) sowie zweitens die exonucleolytische Hydrolyse der vollständig markierten DNA. Kürzlich haben wir bereits eine Lösung für das Problem der vollständigen enzymatischen Markierung präsentiert, die durch das Klenow-Fragment (KF) der *E. coli*-DNA-Polymerase I möglich ist: Wir haben dieses Enzym als die erste natürliche Polymerase identifiziert, die auch in alleiniger Gegenwart Rhodamin-markierter Desoxynucleosid-Triphosphate ihre volle Aktivität und Genauigkeit beibehält.^[8] Wir haben ferner gezeigt, dass der vollständige Austausch aller Pyrimidinbasen eines Strangs, d.h. die vollständige Markierung aller Basenpaare, durch ein fluoreszierendes Analogon mit KF in einer so genannten Primer-Verlängerungsreaktion erreicht werden kann.^[9]

Die Tatsache, dass eine natürliche DNA-Polymerase in Gegenwart sperriger, Rhodamin-markierter Substrate voll funktionsfähig ist und darüber hinaus auch das sterisch wie elektronisch anspruchsvolle DNA-Zwischenprodukt weiterverarbeiten kann, ermutigte uns, eine Reihe natürlicher Exonucleasen auf Aktivität gegenüber Substrat-DNA zu untersuchen, deren einer Strang ausschließlich fluoreszenzmarkierte Analoga der Pyrimidinbasen enthielt (fluoreszierende Nucleotide: Tetramethylrhodamin-dUTP und Rhodamine-Green-dCTP). In ersten Experimenten untersuchten wir deshalb die Substratakzeptanz durch die Exonuclease des Bakteriophagen λ , Schlangengift-Phosphodiesterase sowie durch zwei DNA-Polymerasen mit bekannter 5'-3'-Exonucleaseaktivität, T7-DNA-Polymerase und KF, und verfolgten deren Reaktionen online in einem Fluorimeter (LS-50; Perkin-Elmer). Da hochgradig Rhodamin-markierte DNA in der Regel nicht mehr fluoresziert (bis auf solche Sequenzen, die homopolymere A:T-(bzw. A:U)-Regionen enthalten), erwarteten wir einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität durch exonucleolytisch freigesetzte Nucleotide. Das Fluoreszenzverhalten der Reaktionssysteme änderte sich jedoch in keinem der untersuchten Fälle, eine hydrolytische Reaktion fand also nicht statt. Da hochgradig markierte DNA in wässrigen Lösungen eine starke Tendenz zur Bildung von Aggregaten aufweist, untersuchten wir auch die Zugabe verschiedener organischer Lösungsmittel wie Acetonitril oder DMSO (maximal 10 % v/v). Obwohl bekannt war, dass diese Lösungsmittel die Löslichkeit der markierten DNA deutlich

Ein weiterer Schritt in Richtung Einzelmolekül-Sequenzierung: *Escherichia-coli*-Exonuclease III degradiert DNA mit Fluoreszenzmarkierungen an jedem Basenpaar

Susanne Brakmann* und Sylvia Löbermann

Der internationale Wettlauf zur Sequenzierung des menschlichen Genoms sowie der Genome verschiedener Modellorganismen ermutigte Bestrebungen, eine „Sequen-

[*] Dr. S. Brakmann
Angewandte Molekulare Evolution
Institut für Zoologie
Universität Leipzig
Talstraße 33, 04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-97-36848
E-mail: sbrakma@rz.uni-leipzig.de

S. Löbermann
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Am Faßberg, 37077 Göttingen (Deutschland)

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.