

Biyolojik Ölçümler ve Nanopartiküller

[Bioassays and Nanoparticles]

Oytun Portakal

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Patoloji Laboratuvarı, 06100 Sıhhiye-Ankara

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Dr. Oytun Portakal

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Patoloji Laboratuvarı,
06100 Sıhhiye, Ankara
Tel: 0312 305 1180
e-mail:oytun@hacettepe.edu.tr

ÖZET

Nanometre boyutlarındaki inorganik bileşikler diğer maddelerden daha farklıdır, çünkü elektron tutucu etki gibi yapısal boyutlarına özgül özelliklere sahiptirler. Bu bileşikler “nanopartikül” olarak adlandırılırlar. 1970’lerden beri bilim insanları nanopartikülleri incelenmekte ve özelliklerini belirlemeye çalışmaktadır. Çalışmalar başlangıçta optik ve elektronik cihazlar üzerinde yoğunlaşmışken, şimdi biyoölçümler üzerinde çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Bu kısa yazı, biyoölçümlerde nanopartiküller ile yapılan son uygulamaları ele almaktadır. .

Anahtar Kelimeler: Biyoölçüm, nanopartikül, nanonokta, bio-barkod, nanobar-kod, nanokabuk, nanomateryal.

ABSTRACT

Inorganic compounds with nanometer dimensions are different from the bulk materials because of having some specific features about their structures, like electronic confinement effects. These compounds are called “nanoparticles”. Since the 1970s scientists have investigated nanoparticles to identify and determine their properties. In the beginning, studies centered on optic and electronic devices, however, researches now focus on bioassays. This short view outcomes recent applications in bioassays with nanoparticles.

Key Words: Bioassay, nanoparticle, nanodot, bio-barcode, nanobarcode, nanoshell, nanomaterial.

Kayıt tarihi : 29 Mart 2007, Kabul tarihi: 12 Aralık 2007
[Received: 29 March 2007, Accepted: 12 December 2007]

1960'ların başında, biyolojik ölçümlerde radyoimmünoassay (RIA)'ın keşfi yüksek duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle bir devrim olarak nitelendirildi. Ancak bu metod potansiyel radyoaktif tehlike varlığı ve radyoaktif atıkların özel olarak yok edilmesi gibi dezavantajlar taşıyordu. Kemiluminesans ve floresan işaretleyiciler ve metal atomları gibi radyoaktif olmayan işaretleyicilerin keşfi, radyoaktif metodların bu dezavantajlarını ortadan kaldırdı ve DNA dizi analizi ve biyolojik ölçümler gibi birçok alanda kullanılmaya başlandı. 1990'larda araştırmacılar nanopartiküllere yöneldiler (1-3). Nanopartiküller 100 nm'den küçük ve boyutlarına özgül özelliklere (elektron tutucu etki, geçici miktatsızlık özelliği, yüzey plazmon rezonansı gibi) sahip bileşiklerdir. Boyutları ve bu özellikleri nedeniyle biyolojik sistemlere kolayca entegre olabilirler. Biyoölçümler için ilk nanopartikül uygulamaları 1970'lerde 5-50 nm çaplı koloidal altın kullanımı ve elektron mikroskop için immunositokimyasal prob kullanımı ile başlamıştır (4). Araştırmalar peptid, protein ve nükleik asit gibi biyolojik moleküllere bağlanabilen ve optik, elektronik ve manyetik özelliklere sahip nanopartiküllerin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Şu anda üzerinde çalışılan konu süspansiyon içinde yer alan nanopartiküllerdir.

Nanopartiküller biyoölçümlerde farklı amaçlarla kullanılabilir:

1) Miktar tayininde organik flüorofor veya radyoaktif işaretlemeyi elimine etmek için nanopartiküller tercih edilebilir. Bu amaçla en çok kuantum noktalar (quantum dots) ve metal nanopartiküller kullanılır. Kuantum noktalar 10-100 Å çaplı, elektron tutucu etkiye sahip sferik yapılardır, bu nedenle optik ve elektronik özelliklere sahiptirler. Parlak floresan, floresan sinyalin ayarlanabilir olması, dar emisyon spektrumu, geniş UV eksitasyon ve fotostabilitesinin daha fazla olması geleneksel boya moleküllerine göre en büyük avantajlarıdır.

Kuantum noktalar; a) Biyomoleküler yüzey kaplamaların geliştirilmesinde kullanılabilir (5,6). b) Floresan prob olarak kullanılabilir: meme kanseri belirleyicisi Her-2'nin hücre yüzeyinde belirlenmesinde IgG ve streptavidin bağlı kuantum noktaların kullanımı (7) ve invazif ve invazif olmayan kanser hücrelerinin ayırımında kuantum noktalar ile hücre motilitesinin belirlenmesi (8) gibi. c) Elektronik özelliklerinden yararlanılarak DNA hibridizasyon tayini yapılabilir (9) d) Kuantum noktalar ayrıca floresan rezonans enerji transferi (FRET) için organik fluoroforlardan daha iyi bir vericidir (10).

Metal nanopartiküller kolorimetrik, elektrokimyasal ve kütle spektrometresi metodlarında işaretleyici olarak kullanılır a) Elektrokimyasal ölçümlerde koloidal altın tercih edilir. Bir elektrodun üzerine bağlı oligonükleotid ile hibridize olmuş koloidal altınla işaretli DNA, differansiyel akım voltmetresi ile tayin edilebilir (11) veya oligonükleotidler altın nanopartiküller ile işaretlendikten sonra gümüşle çöktürülüp

“stripping“ potansiyometre ile saptanabilir (12). Bu elektriksel ölçümlerde duyarlılık metal işaretleyicinin büyüklüğüne bağlıdır. b) Koloidal altın veya gümüş tayininde ışık saçılımı ve Raman saçılımı gibi optik yöntemler kullanılabilir. Farklı büyüklükteki altın nanopartiküller farklı dalga boyunda ışık saçılımına neden olurlar ve mikrodizilimde (microarray) iki renk tayinine izin verir (13). Alkol dehidrogenaz varlığında NADH bağımlı Cu^{+2} 'nin indirgenerek altın nanopartiküller üzerinde birikimi ve nanopartikül hacminin genişlemesi ile artan sinyal amplifikasyonu etanol ölçümünde kullanılabilir (14). Glukoz oksidaz varlığında hidrojen peokside bağlı altın nanopartikül hacminin genişlemesi ile artan sinyal amplifikasyonu glukoz tayininde kullanılabilir (15). Kantitatif glukoz tayini için başka bir metod Raman saçılımıdır (Surface-Enhanced Raman Scattering_SERS). Bu metotta oligonükleotid hem Raman aktif boyası (şyanin 5) hem de altın nanopartikülle kaplanır, hibridize edilir. Hibridizasyondan sonra mikrodizilim (microarray) gümüşle ve bir indirgeyici ile reaksiyona girer ve SERS ortaya çıkar (16). Yeni jenerasyon işaretleyicilerden biri ince silika tabakası ile kaplı Rutenyum kompleksleridir, bunlar lösemi hücrelerinin tanınmasında fotostabil luminofor biyobelirteç olarak kullanılabilir (17).

2) Nanopartiküller solüsyondaki biyolojik ölçümlerde substrat olarak kullanılabilir. Mikrodizilim (microarray) bazlı ölçümler ile karşılaştırıldığında bu süspansiyon-bazlı ölçümler daha hızlı, daha esnek, daha yüksek tekrarlanabilirliğe sahiptir ve daha az örnek ve reaktif kullanır. Analit tayini organik işaretleyiciler ile yapılır. Solüsyon bazlı ölçümde, kuantum nokta karışımı mikron boyutundaki polimer partiküllerinin içine yerleştirilir, partiküllerin yüzeyi spesifik oligonükleotid problemler ile kaplanır ve organik boya molekülü hedef DNA'yı direkt işaretlemek için kullanılır. Bu metotta, organik boyanın sinyali baz alınır, her bir boncuğun floresan spektrumunu orjinal örnekteki hedef dizinin varlığını veya yokluğunu gösterir, analitin ne olduğu yerleştirilen kuantum noktalara ait floresan parmak izi (fluorescence fingerprint) ile saptanır (18). Biyobarkodlar (biobarcodes) en önemli substratlardan biridir (19). Biyobarkodlar farklı DNA dizilerine sahip altın nanopartiküller içerir, böylece farklı DNA dizilerinin farklı erime sıcaklıkları avantaj sağlar. Ölçüm agregasyon ile yürütülür, enzimatik hedef veya sinyal amplifikasyonu gerekmez. Antikorla kaplı manyetik boncuk antijenle kompleks oluşturur, buna tek zincirli DNA (barkod) içeren altın nanopartikül bağlanır. Komplementer zincir mikrodizilimde (microarray) hibridizasyonla tayin edilir. Her bir nanopartikül çok sayıda oligonükleotid taşıdığı için, her bir proteinin bağlanmasıyla çok sayıda amplifikasyon gerçekleşir. Çok düşük düzeylerdeki PSA bu metotta saptanabilir (20). Nanobarkodlar (nanobarcodes) önemli bir

diğer substrattır. 20-500 nm çapında, silindirik yapıda, altın ve gümüş çubuklar içeren metal nanopartiküllerdir (21). Kuantum noktaların tersine analiti kantite etmek için floresan ölçümler gereklidir. DNA bazlı nanobarkodlar, uçları boya ile işaretli birbirine komplementer üç tek zincirli DNA'nın oluşturduğu Y-DNA yapılarıdır. Y-DNA'lar biraraya gelerek dallı bir yapı (dendrimer) oluşturabilirler. Boya moleküllerinin farklı kombinasyonlarında ortaya çıkan farklı floresan yoğunlukları bilgisayar tarayıcı veya flurosans ışık mikroskobu ile saptanır (22).

- 3) Sinyal iletici olarak etki gösteren nanopartiküller biyolojik örneğin işaretlenmesini elimine ettikleri için çoğunlukla tanısal ölçümlerde kullanılırlar. Sinyal iletiminde nanopartikülün bir diğerine göre lokalizasyonu değişir ya da ölçümün biyolojik bileşenlerinde bir düzensizlik meydana gelir; sonuçta ölçülebilen sinyalde bir değişim ortaya çıkar. Sistemdeki en önemli değişiklik altın nanopartiküllerinin agregasyonu. Antijen kaplı altın-partiküllerinin agregasyonunun bir fonksiyonu olarak antikor konsantrasyonu tayin edilebilir (23). Agregasyon metodu ile tam kanda immunoglobulin ölçümü için altın nanokabuklar kullanılabilir (24). Nanokabuklar (nanoshells), küresel nanopartiküllerdir; genellikle silika içeren bir dielektrik çekirdek ve etrafını saran ince metal bir kabuktan oluşurlar. Yakın infrared (IR) bölgede güçlü absorban özelliğe sahiptirler, çevre hücrelerin fazla ısınmasına ve hücre hasarına yol açabilirler. Bu nedenle nanokabuklar kanser hücrelerinin sıcaklık ile yok edilmesinde kullanılabilir (25). Canlı hücreleri izlemek için oksijen duyarlı PEBBLE (Probes Encapsulated By Biologically Localized Embedding) sensörler kullanılabilir (26).
- 4) Fonksiyonel nanopartiküller (nanomateryaller) biyolojik reaksiyonların katalizi gibi işlevleri yürütmek için partiküllerin spesifik fiziksel ve kimyasal özelliklerini kullanırlar. DNA çift zincirine bağlanmış altın nanopatikül radyo-frekans manyetik alan kullanılarak ısıtılır ve dehidridizasyon sağlanır. Sıcaklığın 10-20°C yükselmesi denaturasyon için yeterlidir (27). TiO₂-DNA nanobileşenleri ışıkla indüklenebilen endonükleaz aktivitesi gösterirler (28). Çekirdek hedeflemede çok fonksiyonlu altın nanopartikül-peptid kompleksleri oluşturulabilir (29). Bunlar DNA tamir dizileri taşıyan sıgır serum albümini ile kaplı 20 nm çapındaki nanopartiküllerdir. Bu partiküller hücre ve çekirdek membranını geçebilecek kadar küçük, endozomal ve lizozomal işlemlere dayanıklı ve nükleer lokalizasyon için hedef peptidleri içerir. Nanomateryallerin manyetik özellikleri de vardır. Silika kaplı paramanyetik nanopartiküller kanser hücrelerinin manyetik parçalanmasında kullanılabilir (30).

Nanoteknolojinin tıp ve biyoloji ile iyi entegrasyonu moleküler tanı ve tedavi alanlarındaki beklentileri de beraberinde getirmiştir. Nanopartiküller in vivo man-

yetik rezonans incelemelerinde kontrast ajanlarının, ilaç dağıtımı ve salınımında taşıyıcıların ve doku mühendisliğinde yapısal iskelelerin yerini alabilir. Bu amaçla boş nanopartiküller sentezlenmiştir (31). Boş nanopartiküller eş zamanlı biyoölçüm ve ilaç dağılım sistemlerinde kullanılabilir. Bu alanda karbon-nanotüpler (carbon-nanotubes) de önemli rol oynayabilir (32,33). 0.8 nm çaplı şimdiki dek geliştirilmiş en küçük işaretleyici olan ve suda çözünebilen nanonokta (nanodots) işaretleyiciler tek-molekül tayin yöntemlerinde kullanılabilir (34). Nanopartiküller günümüzün en son teknolojisini oluşturmaktadır. Ancak nanopartiküller şu anda var olan teknolojilere göre daha iyi ölçüm performansı, kullanım kolaylığı ve daha ucuz fiyat olanakları sağladığı zaman biyoölçümler için geçerli olacaktır. Nanopartiküller daha geniş üretim hacmi ve dağıtım kapasitesine ulaşabildiğinde ve geniş kitleler tarafından ticari olarak eldesi mümkün olduğunda biyoölçümler için rutin olarak kullanılabilir hale gelecektir.

Kaynaklar

- [1] Lyon AL, Musick MD, Natan MJ. (1998) Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance immunosensing. *Anal Chem.* 70: 5177-5183.
- [2] Elghanian R, Storhoff JJ, Mucic RC, Letsinger RL, Mirkin CA. (1997) Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science.* 277: 1078-1080.
- [3] Bruchez M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. (1998) Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science.* 281: 2013-2016.
- [4] Hayatt MA: (Ed) Colloidal Gold, Principles, Methods and Applications. San Diego: Academic Press; 1989.
- [5] Parak WJ, Gerion D, Zanchet D, Woerz AS, Pellegrino T, Micheel C, Williams SC, Seitz M, Bruehl RE, Bryant Z. (2002) Conjugation of DNA to silanized colloidal semiconductor nanocrystalline quantum dots. *Chem Mater.* 14: 2113-2119.
- [6] Goldman ER, Balighain ED, Mattoussi H, Kuno MK, Mauro JM, Tran PT, Anderson GP. (2002) Avidin: a natural bridge for quantum dot antibody conjugates. *J Am Chem Soc.* 124: 6378-6382.
- [7] Wu X, Liu H, Liu J, Haley KN, Treadway JA, Larson PJ, Ge N, Peale F, Bruchez MP. (2003) Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol.* 21: 41-46.
- [8] Parak WJ, Boudreau R, Le Grod M, Gerion D, Zanchet D, Micheel CM, Williams SC, Alivisatos AP, Larabell C. (2002) Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks. *Adv Mater.* 14: 882-885.
- [9] Wang J, Liu G, Merkoci A. (2003) Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets. *J Am Chem Soc.* 125: 3214-3215.
- [10] Medintz IL, Clapp AR, Mattoussi H, Goldman ER, Fisher B, Mauro JM. (2003) Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors. *Nat Matter.* 2: 630-638.
- [11] Ozsoz M, Erdem A, Kerman K, Ozkan D, Tugrul B, Topcuoglu N, Ekren H, Talyan M. (2003) Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of factor V Leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes. *Anal Chem.* 75: 2181-2187.

- [12] Wang J, Polsky R, Xu D. (2001) Silver-enhanced colloidal gold electrochemical stripping detection of DNA hybridization. *Langmuir*. 17: 5739-5741.
- [13] Taton TA, Lu G, Mirkin CA (2001) Two color labeling of oligonucleotides arrays via size-selective scattering of nanoparticle probes. *J Am Chem Soc*. 123: 5164-5165.
- [14] Shlyahovsky B, Katz E, Xiao Y, Pavlov V, Willner I. (2005). Optical and electrochemical detection of NADH and NAD⁺ dependent biocatalyzed processes by the catalytic deposition of copper on gold nanoparticles. *Small*. 1: 213-16.
- [15] Zayats M, Baron R, Popov I, Willner I. (2005) Biocatalytic Growth of Au Nanoparticles: From Mechanistic Aspects to Biosensors Design. *Nano Lett*. 5 (1): 21-25.
- [16] Cao YC, Jin R, Mirkin CA. (2002) Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*. 297: 1536-1540.
- [17] Santra S, Zhang P, Wang K, Tapeç R, Tan W. (2001) Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers. *Anal Chem*. 73: 4988-4993.
- [18] Battersby BJ, Lawrie GA, Johnston APR, Trau M. (2002) Optical barcoding of colloidal suspensions: applications in genomics, proteomics and drug discovery. *Chem Commun (Camb)*. 14: 1435-1441.
- [19] Nam J, Park S, Mirkin CA. (2002) Bio-barcodes based on oligonucleotide-modified nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 124: 3820-3821.
- [20] Nam J M, Thaxton CS, Mirkin CA. (2003) Nanoparticle-based bio-barcodes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science*. 301: 1884-1886.
- [21] Nicewarner-Pena SR, Freeman RG, Resiss BD, He L, Pena DJ, Walton IA, Cromer R, Keating CD, Natan MJ (2001) Submicrometer metallic barcodes. *Science*. 294: 137-141.
- [22] Li Y, Hong Ju YT, Luo D. (2005) Multiplex detection of pathogen DNA with DNA-based fluorescence nanobarcodes. *Nature Biotech*. 23 (7): 885-889.
- [23] Thanh NTK, Rosenzweig Z. (2002) Development of an aggregation based immunoassay for anti-protein A using gold nanoparticles. *Anal Chem*. 74: 1624-1628.
- [24] Hirsch LR, Jackson JB, Lee A, Halas NJ, West JL. (2003) A whole blood immunoassay using gold nanoshells. *Anal Chem*. 75: 2377-2381.
- [25] Hirsch, L.R. (2003) Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 13549-13554.
- [26] Brasuel M, Kopelman R, Aylott JW, Clark H, Xu H, Hoyer M, Miller TJ, Tjalkens R, Philbert MA. (2002) Production, characteristics and applications of fluorescent PEBBLE nanosensors: potassium, oxygen, calcium and pH imaging inside live cells. *Sensors and Materials*. 14: 309-338.
- [27] Hamad-Schifferil K, Schwartz JJ, Santos AT, Zhang S, Jacobson JM. (2002) Remote electronic control of DNA hybridization through inductive coupling of an attached metal nanocrystal antenna. *Nature*. 415: 152-155.
- [28] Paunesku T, Rajh T, Wiederrecht G, Maser J, Vogt S, Stojicevic N, Protic M, Lai B, Oryhon J, Thurnauer M, Woloshak G. (2003) Biology of TiO₂-oligonucleotide nanocomposites. *Nat Mater* 2: 343-346.
- [29] Tkachenko A, Coleman D, Xie H, Ryan J, Andersen M, Glomm WR, Franzen S, Feldheim D. (2003) Multifunctional nanoparticle-peptide complexes for nuclear targeting. *J Am Chem Soc*. 125: 4700-4701.
- [30] Bergey EJ, Levy L, Wang X, Krebs LJ, Lal M, Kim K, Pakatchi S, Liebow C, Prasad PN. (2002) DC magnetic field induced magnetocytolysis of cancer cells targeted by LH-RH magnetic nanoparticles in vitro. *Biomedical Microdevices*. 4: 293-299.
- [31] Sun Y, Mayers BT, Xia Y. (2002) Template-engaged replacement reaction: a one step approach to the large scale synthesis of metal nanostructures with hollow interiors. *Nano Lett*. 2: 481-485.
- [32] Cai H, Cao XN, Jiang Y, He PG, Fang YZ. (2003) Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection. *Anal Bioanal Chem*. 375: 287-293.
- [33] Chen RJ, Zhan YG, Wang DW, Dai HJ. (2001) Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. *J Am Chem Soc*. 123: 3838-3839.
- [34] Zheng J, Dickson RM. (2002) Individual water-soluble dendrimer encapsulated silver nanodot fluorescence. *J Am Chem Soc*. 124: 13982-13983.