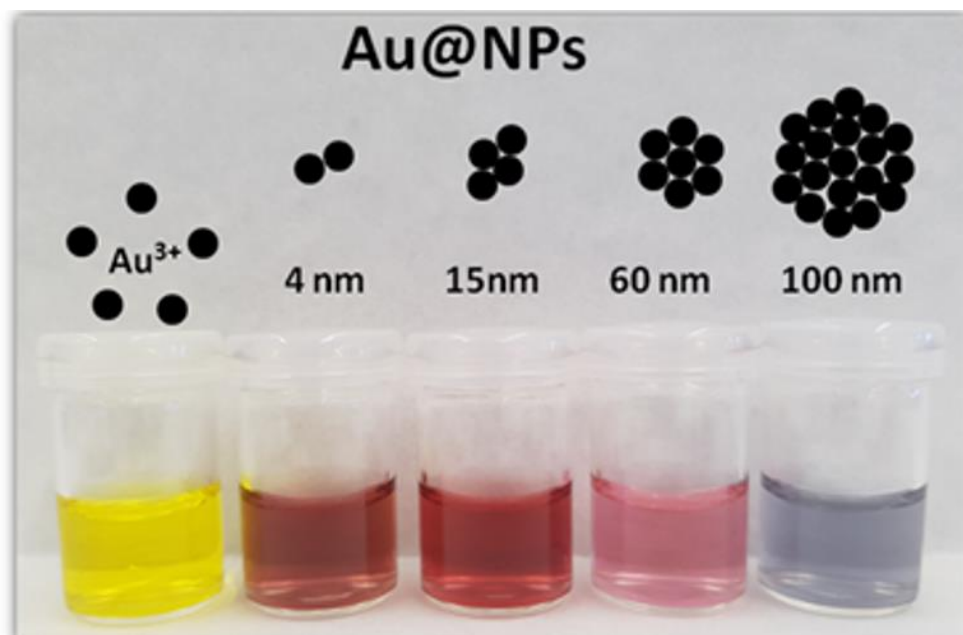


## Nanoguld Biosensor Øvelse

## Introduktion til nanoguld

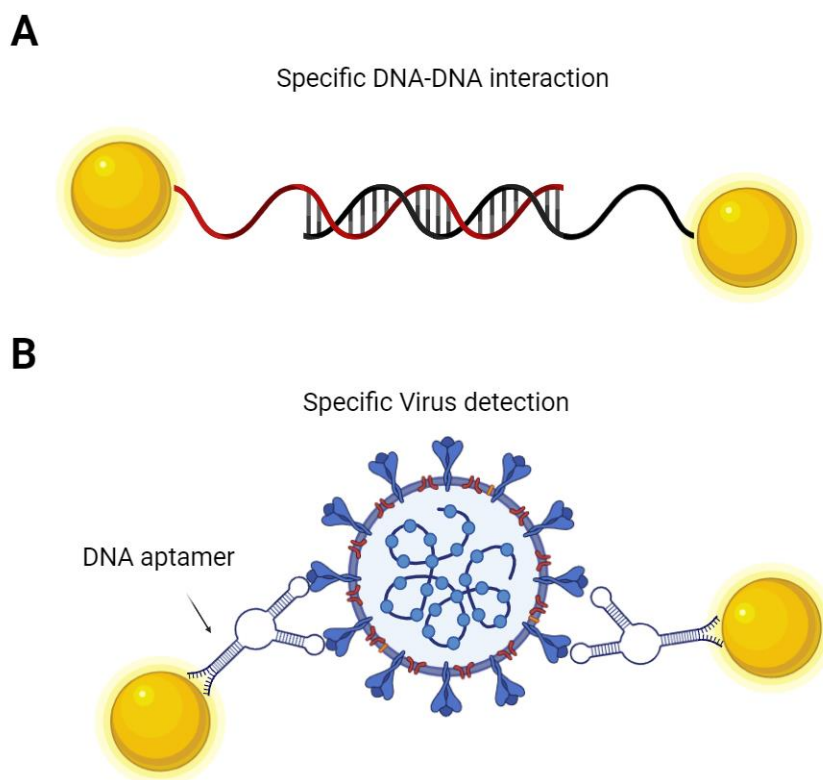
De fleste kender til farven og nogle af de egenskaber som grundstoffet guld har på makroskala, men de færreste har kendskab til hvordan dette metal opfører sig på nanoskala. Ser vi på guld ioner i en opløsning har væsken en gullig farve, hvorimod guld nanopartikler udviser en række af forskellige farver fra lilla-rød til blålige baseret på størrelsen af partiklerne (Figur 1). Dette skyldes et fænomen kaldet Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR), der opstår når lys rammer små partikler og interagerer med deres overflade. Når lyset rammer en guld-nanopartikel, begynder elektronerne i guldets overflade at bevæge sig. På en stor metalplade ville elektronerne kunne bevæge sig frit langs overfladen og vi vil ikke se nogen effekt, men i små guldpartikler vil vi have en lille lokal overflade der kan give ophav til specifikke svingninger af elektronerne. Ved særlige bølgelængder vil lyset forstærke disse elektroniske bevægelser / svingninger og få dem til at svinge kraftigere, hvilket kaldes plasmonresonans. Det interessante er, at denne plasmonresonans ændrer hvordan lyset opfører sig når det rammer partiklen. Det kan ændre farven af lyset der reflekteres eller absorberes af partiklen og dermed give os et indblik ind i partiklernes størrelse, form og omgivende miljø.



**Figur 1.** Farveskift observeret ved forskellige størrelser af guldpartikler

## Nanoguld biosensorer

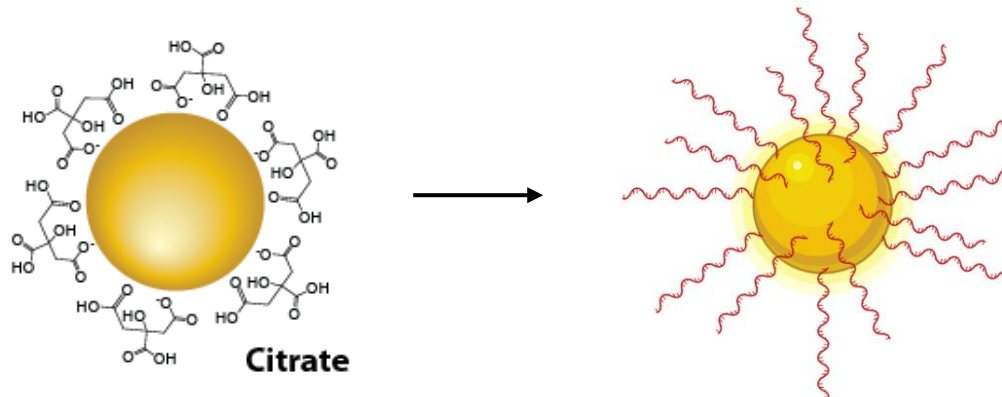
Formålet for dette forsøg er at udnytte nanogulds evne til at skifte farve, som følge af fænomenet LSPR, til at observere ændringer på nanoskala med det blotte øje. Det menneskelige øje kan se objekter ned til omkring 0,1 millimeter hvorimod ved hjælp af guld-nanopartikler kan vi se ændringer helt ned til få nanometer, en forbedring på 100.000 – 1.000.000 gange. Ved at binde DNA-sekvenser til nanoguldpartiklerne kan vi undersøge specifikke interaktioner mellem DNA-molekyler og observere et markant farveskift i tilfælde af guldpartiklerne bliver bundet tættere sammen og dermed ændrer plasmonresonans (Figur 2.A). Dette kan bl.a. også bruges som en virus test i stil med Covid19 selvtests, hvor specifikke DNA-motiver kaldet "aptamerer" kan binde til en virus og medføre et farveskift der indikerer tilstedeværelsen af den pågældende virus (Figur 2.B). Udover DNA-sensoren tester vi også effekten af at tilføje salt, sukker og protein til gulddopløsningerne. Dette gøres for at øge forståelsen for nanoguldpartiklernes kolloide opløsning og hvilken effekt det har at DNA-funktionalisere dem, frem for at have dem koordineret af citrat-molekyler i opløsningen.



**Figur 2.** Detektion af henholdsvis DNA (A) og virus (B) ved hjælp af DNA-funktionaliserede nanoguldpartikler.

# Nanoguld Biosensor Øvelsesvejledning

## 1. DNA-funktionalisering af nanoguldpartikler



Hver gruppe får udleveret følgende reagenser:

- Fire 200  $\mu\text{L}$  rør:
  - Rør 1 indeholder 5  $\mu\text{L}$  DNA streng 1 (100 mM)
  - Rør 2 indeholder 5  $\mu\text{L}$  DNA streng 2 (100 mM) (komplementær til streng 1)
  - Rør 3 og 4 indeholder begge 1  $\mu\text{L}$  TCEP (100 mM) (reduceringsmiddel)
- To 1,5 mL rør med 200  $\mu\text{L}$  guldopløsning (40 nm guldpartikler)
- Et 200  $\mu\text{L}$  rør der indeholder 4  $\mu\text{L}$  1% SDS (Sodium dodecyl sulfat)

- a) Reducer disulfid-bindingerne i DNA-strengene ved at blande 5  $\mu\text{L}$  af hver DNA-streng med 1  $\mu\text{L}$  TCEP. Dette gøres ved at overføre 5  $\mu\text{L}$  DNA fra rør 1 til rør 3 og tilsvarende for rør 2 og 4.
- b) Bland opløsningen ved at knipse til siden af eppendorf-røret 5-6 gange
- c) Lad blandingen stå ved stuetemperatur i 3 minutter før næste trin.

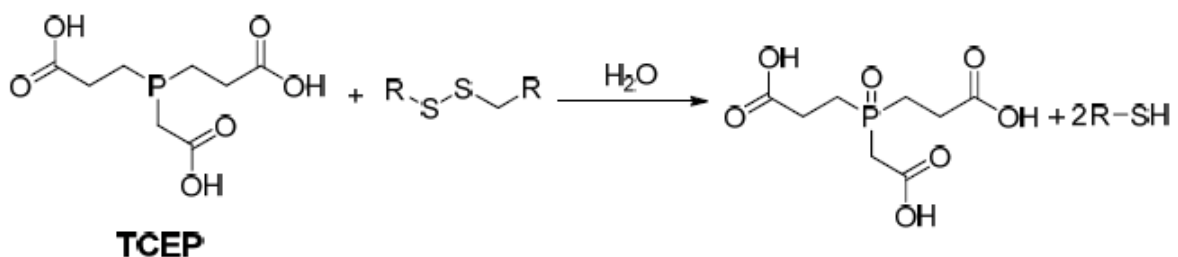


Figure 1. Reduction of organic disulfide bonds with TCEP.

- d) Tilsæt de reducerede DNA strengene til hver deres 1,5 mL rør med guldopløsning og navngiv rørene henholdsvis "S1" og "S2".
  - Skyl 200  $\mu\text{L}$  rørene for rester af DNA ved at overføre 20  $\mu\text{L}$  af DNA/guldopløsningen til 200  $\mu\text{L}$  røret og derefter tilbage i 1,5 mL røret.
- e) Bland DNA/guldopløsningerne ved at knipse til siden af eppendorf-røret 5-6 gange
- f) Tilsæt herefter 2  $\mu\text{L}$  SDS (1%) til hvert af de to rør (S1 og S2)
- g) Spin indholdet ned i en bordcentrifuge i 10 sekunder

- h) Placer rørene på tøris og dæk dem godt til så de fryser hurtigt (undgå at røre tørisen i for lang tid, da dette kan føre til frostskeer i fingrene)

Hvilken farve har den frosne guldopløsning?

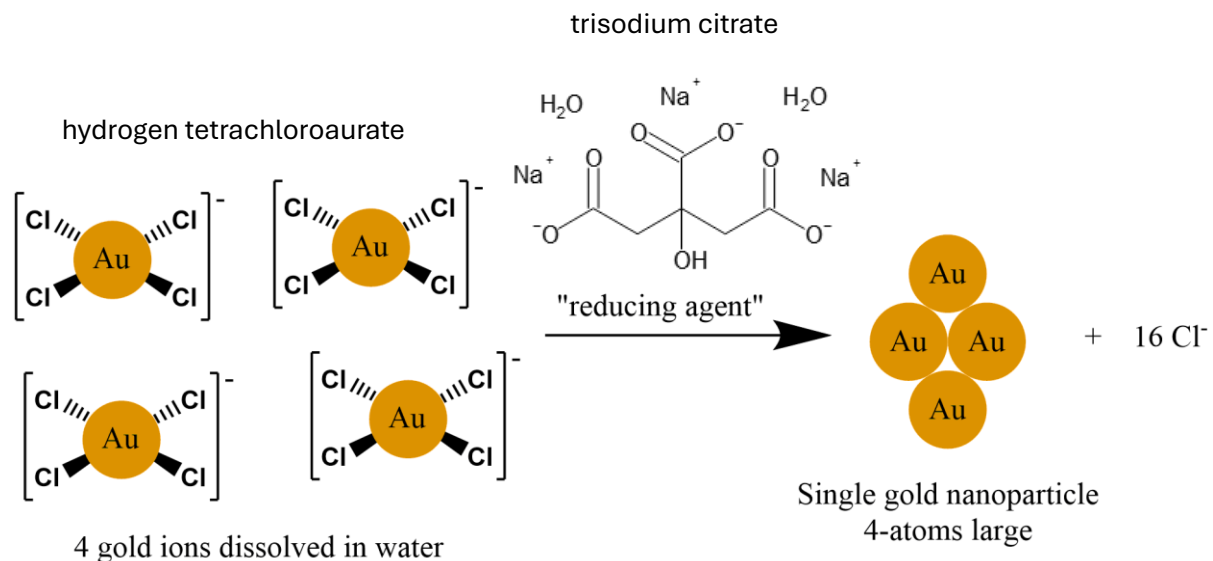
Vil farven af guldopløsningen ændre sig efter optøning? Hvorfor/hvorfor ikke?

- i) Efter rørene er blevet helt frosne, skal de tøs op ved at gnubbe dem i håndfladen  
j) Gentag fryse/tø processen for at øge effektiviteten af DNA-funktionaliseringen (punkt g-h).

Prøverne skal nu centrifugeres ved 16.000 g i 2 minutter hvorved guldpartiklerne bundfæles. Den tilbageværende væske fjernes og bundfaldet resuspenderes i en 1x TAE, 1% SDS-buffer. Dette gentages 5 gange for at fjerne alle ubundne DNA-strenger fra guldpartiklerne.

- k) Noter gruppenummer på prøverne og aflever dem oppe ved Frederik.  
l) Kort fællesdiskussion om resultaterne – vi mødes ved PowerPoint præsentationen

## 2. Syntese af nanoguld-partikler



To grupper går sammen og får udleveret følgende reagenser:

- Et 50 mL falcon tube med 20 mL 1.0 mM hydrogen tetrachloroaurate
  - Et 15 mL falcon tube med 2 mL 1 % trisodium citrate
- a) Overfør 20 mL 1.0 mM hydrogen tetrachloroaurate til en kolbe og sæt det til at koge på en hot-plate  
b) Ved kogepunktet tilsættes 2 mL 1 % trisodium citrate

- c) Man vil se opløsningen først blive farveløs og langsomt tage mere og mere farve. Efter ca. 6 minutter sker der ikke længere farveændringer og opløsningen kan tages af varmen og sættes til afkøling.
- d) Del herefter guldopløsningen op i 2 tomme 15 mL falconrør så hver gruppe får 10 mL hver.

Vi har nu lavet de ønskede nanoguldpartikler med en størrelse på omkring 20-25 nanometer i diameter. Fortsæt nu til **salt eller sukker sensor** og **protein sensor** øvelserne nedenfor. Disse udføres med jeres hjemmelavede guldopløsning.

### 3. Nanoguld biosensorer

#### Salt eller sukker sensor

- a) Tilføj 2 mL af den hjemmelavede guldopløsning til 3 glasrør og lav følgende opløsninger
  1. I den første gør vi ikke noget – dette er vores kontrol
  2. I den anden tilsættes 100  $\mu$ L 1 M NaCl opløsning
  3. I den tredje tilsættes 100  $\mu$ L 1 M flormelis (sucrose) opløsning

*Hvilken forskel ser vi på de 3 guldopløsninger?*

*Hvorfor ser vi en forskel på opløsningerne med salt og sukker?*

#### Protein sensor

- a) Tilføj 2 mL af den hjemmelavede guldopløsning til 2 glasrør
- b) Tilsæt 150  $\mu$ L æggehvideopløsning til et af rørene
- c) Prøv nu at tilsætte 100  $\mu$ L 1 M NaCl til hvert rør

*Hvilken forskel ser vi på de to opløsninger?*

*Hvilken effekt har tilsætningen af æggehvide på guldopløsningen?*

#### DNA sensor

- a) Oppe ved Frederik henter i jeres guldpartikler med DNA-streng 1 og 2 (S1 og S2) som nu er blevet oprenset via centrifugering og to 200  $\mu$ L rør der indeholder 1  $\mu$ L blocking DNA-streng ("B") (100  $\mu$ M) og 1  $\mu$ L kontrol DNA-streng ("K") (100  $\mu$ M)
- b) Tag fem 200  $\mu$ L rør og nummerer dem fra 1- 5
- c) I skal nu lave følgende guldopløsninger:
  1. Bland 20  $\mu$ L af "S1" og "S2"
  2. Bland 20  $\mu$ L af "S1" i røret med 1  $\mu$ L blocking DNA streng 100  $\mu$ M og tilføj 20  $\mu$ L af blandingen til rør 2
  3. Bland 20  $\mu$ L af "S1" i røret med 1  $\mu$ L kontrol DNA streng 100  $\mu$ M og tilføj 20  $\mu$ L af blandingen til rør 3
  4. Tilføj 20  $\mu$ L af "S1"
  5. Tilføj 20  $\mu$ L af "S2"

- d) Efter 3 minutter tilføjes 20  $\mu\text{L}$  af "S2" til rør 2 og 3
- e) Frys nu alle 5 rør ved at dække dem med tøris

*I hvilke rør forventer I at se et farveskift?*

*Hvad forventes der at ske med rørene efter opvarmning?*

- f) Tø herefter rørene op i håndfladen efter prøverne er blevet fuldstændigt frosne
- g) Gentag fryse/tø processen en gang til for at øge bindingseffektiviteten mellem de to forskellige DNA-streng

Smeltetemperaturen for de to DNA-streng (S1 og S2) er omkring 35 grader

*Hvad forventer i at se ved opvarmning af guldpartiklerne til DNA-strengenes smeltetemperatur?*

*Hvorfor vælger vi også at teste vandbade med højere temperaturer end smeltetemperaturen?'*

- g) Tag nu de 5 rør og varm dem op i følgende vandbade fra koldest til varmest
  1. 35 grader
  2. 40 grader
  3. 60 grader (eller varmere)

*Hvilken effekt observeres der imellem de forskellige vandbade? Hvorfor?*

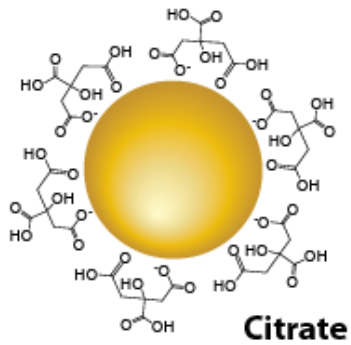
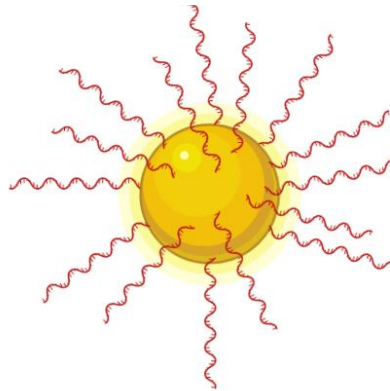
- h) Fælles diskussion om resultaterne – vi mødes ved PowerPoint præsentationen

#### **4. DNA-funktionalisering af hjemmelavede guldpartikler**

- a) Oppe ved Frederik hentes 5  $\mu\text{L}$  af en Poly(T) DNA-streng ("T") og 1  $\mu\text{L}$  TCEP
- b) Reducer disulfid-bindingerne i DNA-strengene ved at blande 5  $\mu\text{L}$  poly(T) DNA i røret med 1  $\mu\text{L}$  TCEP og lad blandingen stå i 3 minutter
- c) Overfør 200  $\mu\text{L}$  af den hjemmelavede gulddopløsning til 2 tomme 1,5 mL eppendorf rør og navngiv dem henholdsvis "DNA" og "kontrol". (tag gulddopløsningen fra kontrollen i salt/sukker sensoren)
- d) Tilsæt nu 6  $\mu\text{L}$  reduceret DNA til røret navngivet "DNA" og bland opløsningen ved at knipse på siden af røret 5-6 gange
- e) Herefter tilsættes 2  $\mu\text{L}$  SDS (1%) til begge rør
- f) Spin rørene ned i en bordcentrifuge i 10 sekunder

Vi har nu en kontrol opløsning med guldpartikler der er koordineret af citrate molekyler og en DNA-opløsning med guldpartikler der er funktionaliseret med DNA-streng

*Hvad forventes der at ske med kontrollen når vi fryser den?*

**Kontrol****DNA-funktionaliseret**

- g) For at teste DNA-funktionaliseringen puttes de to rør nu på tøris og dækkes til indtil opløsningen er frosset til fuldstændigt.
- h) Tø nu begge rør op i håndfladen og lig mærke til et eventuelt farveskift
- i) Tilsæt nu 10  $\mu\text{L}$  NaCl til begge rør

*Hvilken forskel er der mellem kontrollen og de DNA-funktionaliserede partikler?*