

# Kolorimetrischer Nachweis mittels S-Layer modifizierter Goldnanopartikel

Mathias Lakatos<sup>1</sup>, Sabine Matys<sup>2</sup>, Wolfgang Pompe<sup>1</sup>, Michael Mertig<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Technische Universität Dresden, Dresden, [Mathias.Lakatos@tu-dresden.de](mailto:Mathias.Lakatos@tu-dresden.de)

<sup>2</sup> Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Dresden und Helmholtz-Institut Freiberg für Ressourcentechnologie

<sup>3</sup> Kurt-Schwabe-Institut für Mess- und Sensortechnik e.V. Meinsberg, Waldheim

## Abstract:

Vorgestellt wird eine einfache und schnelle kolorimetrische und UV/VIS spektroskopische Methode für den Nachweis metallischer Ionen bzw. Ionenkomplexe in wässriger Lösung. Dieses Verfahren basiert auf der Aggregation S-Layer funktionalisierter Goldnanopartikel in Gegenwart einer zu detektierenden Zielspezies. Dabei kommt es aufgrund der Kopplung der Plasmonen zu spektralen Verschiebungen im sichtbaren Bereich des optischen Spektrums. Diese Änderungen können mit dem bloßen Auge durch den Farbumschlag der Lösung von rot nach blau verfolgt werden. Am Beispiel von Arsen(V) und der Funktionalisierung sphärischer Goldnanopartikel mit Oligomerstrukturen des *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 soll das Potential dieses Nachweissystems aufgezeigt werden. In Kombination mit photometrischen Untersuchungen und einer nachfolgenden Signalauswertung lassen sich auf diese Weise Konzentrationswerte für Arsen(V) unterhalb der von der Europäischen Union geforderten Grenzwerte für Arsen im Trinkwasser (~10 ppb) nachweisen.

**Key words:** kolorimetrischer Nachweis, Arsen, Goldnanopartikel, S-Layer

## 1 Motivation

Bakterielle Zellhüllproteine (S-Layer) finden sich auf der äußeren Hülle einer großen Anzahl von Bakterien und Archaeen. Üblicherweise dienen diese (Glyco-)proteine der Formgebung, als Schutz vor Umwelteinflüssen, als Molekularsieb oder zur Anheftung an Oberflächen [1-3]. Die Vielzahl der zur Verfügung stehenden funktionellen Gruppen an deren Oberfläche machen S-layer als multifunktionelle molekulare Erkennungsstrukturen zur Anlagerung der unterschiedlichsten Ionen bzw. Ionenkomplexe interessant [4-6]. In Verbindung mit kolloidalen Lösungen metallischer Nanopartikel, wie zum Beispiel Gold- oder Silbernanopartikeln, die sich durch eine optische Aktivität im sichtbaren Bereich des optischen Spektrums auszeichnen, ergeben sich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten auf dem Gebiet der Analytik in wässrigen Medien. Zudem belegen vergleichbare kolorimetrische Assays Nachweisgrenzen bis in den Bereich weniger Femtomol [7].

## 2 Nachweisprinzip

Kolloidale Lösungen mit Edelmetallen wie Gold oder Silber zeichnen sich aufgrund der Wechselwirkung der freien Elektronen dieser Partikel mit dem einfallenden Licht (Plasmonenanregung) durch eine charakteristische Farbe aus [8]. So erscheinen wässrige kolloidale Lösungen sphärischer Goldnanopartikel durch die Absorption im grünen Wellenlängenbereich (~520 nm) rot, wohingegen sphärische Silbernanopartikel stärker im blauen Wellenlängenbereich absorbieren (~490 nm), was zu einer gelblichen Färbung führt. Ein wesentliches Merkmal einer solchen Nanopartikelsuspension ist die homogene Verteilung aller Nanopartikel in Lösung. Kommt es zu einer Agglomeration dieser Nanopartikel, können die Plasmonen der einzelnen Partikel miteinander wechselwirken und Änderungen der optischen Eigenschaften bewirken. Im Falle einer kolloidalen Lösung mit sphärischen Goldnanopartikeln kann dies beispielsweise einen Farbumschlag der Lösung von rot nach blau bedeuten oder eine Aufweitung sowie Verschiebung der in den UV/VIS-Spektren zu messenden Plasmonenbande [9, 10].

Mit einer analytspezifischen Funktionalisierung der Nanopartikeloberfläche kann dieses kolorimetrische Prinzip auch zum Nachweis verschiedener Elemente verwendet werden. Das Konzept für einen kolorimetrischen Nachweis mit S-Layer funktionalisierten Goldnanopartikeln ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

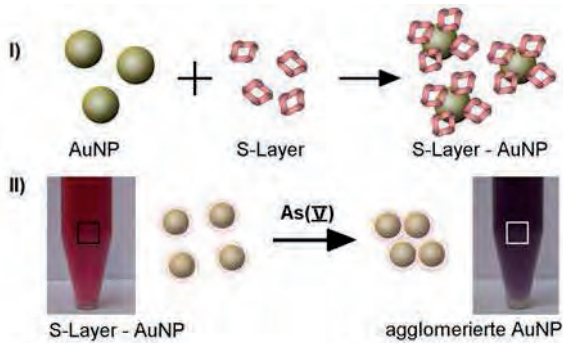


Abbildung 1: Kolorimetrische Nachweisführung mit S-Layer funktionalisierten Goldnanopartikeln

### 3 Anwendungsbeispiel Arsen(V)

Untersucht wurde die Wechselwirkung S-Layer funktionalisierter Goldnanopartikel mit unterschiedlichen Konzentrationen von Arsen(V). Für die Funktionalisierung der Nanopartikel wurden Oligomerstrukturen des *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 verwendet, von dem bekannt ist, dass er eine erhöhte Bindungsaffinität zu Arsen besitzt. In Abhängigkeit von der Arsenkonzentration konnten Änderungen der optischen Eigenschaften der funktionalisierten Goldnanopartikel in Lösung beobachtet und gemessen werden. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Abbildung 2 am Beispiel von Goldnanopartikeln (OD1) mit einem Durchmesser von 20 nm dargestellt.

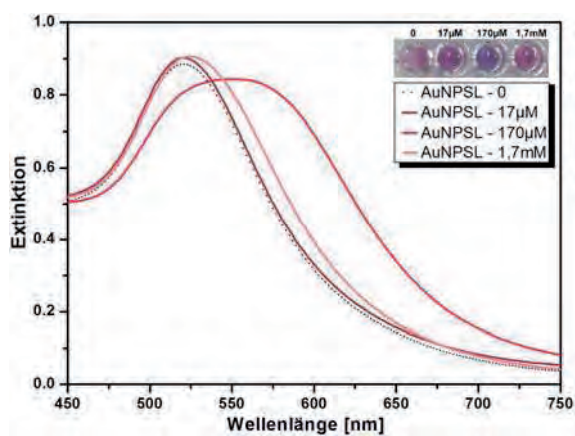


Abbildung 2: Nachweis von  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  mit S-Layer funktionalisierten AuNP, a) kolorimetrischer Nachweis, b) UV/VIS Messungen

Wie anhand von Abbildung 2 zu sehen ist, kommt es in Abhängigkeit von der Arsen(V)-Konzentration zu Änderungen des Plasmonensignals. Mit abnehmender Konzentration treten deutliche Signal- und Farbverschiebungen von rot nach blau auf. Diese Änderungen konnten bis zu einer Konzentration von 17  $\mu\text{M}$  beobachtet werden. Im Hinblick auf eine Erhöhung der Sensitivität und Verschiebung der Nachweisgrenze zu kleineren Analytkonzentrationen wurde auch der Einfluss der Nanopartikelgröße untersucht. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse zeigt die Abbildung 3. In dieser Darstellung wurde die relative Änderung der Intensität (Extinktion) der gemessenen UV-VIS-Spektren in Abhängigkeit von der Analytkonzentration bei festen Wellenlängen aufgetragen.

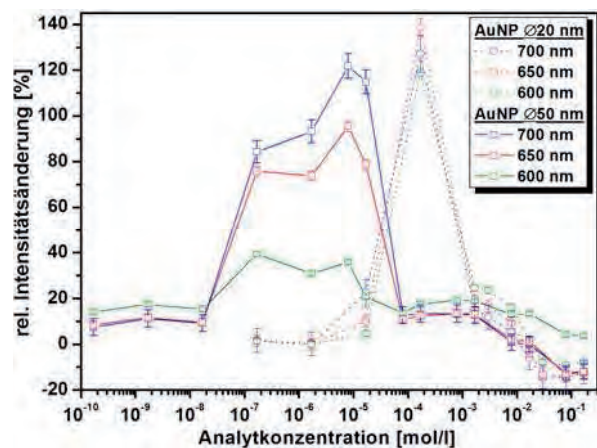


Abbildung 3: Relative Änderung der Intensität in Abhängigkeit von der Arsenkonzentration für S-Layer funktionalisierte AuNP mit Partikeldurchmessern von 20 und 50 nm

Wie diese Darstellung veranschaulicht, kommt es zu einer Abnahme der kritischen Analytkonzentration für den Nachweis von Arsen(V) mit wachsendem Teilchendurchmesser der Goldnanopartikel. Änderungen in den optischen Spektren treten bei Goldnanopartikeln mit einem Teilchendurchmesser von 20 nm über einen Konzentrationsbereich des Analyten von 8 mM bis 170  $\mu\text{M}$  auf und bei 50 nm großen Nanopartikeln von 17  $\mu\text{M}$  bis 0,17  $\mu\text{M}$ . Somit ergibt sich eine untere Nachweisgrenze von 7 ppb für Arsen(V) für 50 nm Goldnanopartikel. Die mit dieser Methode nachweisbaren Werte liegen damit unterhalb der von der Europäischen Union geforderten Grenzwerte für Arsen im Trinkwasser ( $\sim 10$  ppb) und im Bereich der Nachweisgrenze handelsüblicher kombinierter kolorimetrischer und spektrometrischer Nachweisverfahren von 1 ppb bis 30 ppb [11, 12].

#### 4 Ausblick

Vorgestellt wurde ein optischer Nachweis für Ionen bzw. Ionenkomplexe, basierend auf der Agglomeration S-Layer funktionalisierter Goldnanopartikel in Lösung in Anwesenheit der zu detektierenden Spezies. Der Prinzipnachweis konnte erfolgreich am Beispiel Arsen(V) gezeigt werden. Die weitere Entwicklung umfasst die Steigerung der Nachweisgrenze. Dies konnte bereits mit sphärischen 20 nm und 50 nm großen Goldnanopartikeln gezeigt werden. Weitere Möglichkeiten ergeben sich aus der nachfolgenden Signalaufbereitung oder einer Optimierung der Bindungsstellen auf der Nanopartikeloberfläche. Darüber hinaus bietet die große Anzahl der natürlich vorkommenden S-Layer sowie die nachträgliche bio-/chemischen Modifikation dieser S-Layer, die Möglichkeit zum Aufbau einer breiten modularen Plattform für eine Vielzahl weiterer Anwendungen.

#### Literatur

- [1] Beveridge T.J., Bacterial S-layers, *Curr.Op.Struct.Biol.*, 4, 204-212, (1994); doi: 10.1016/S0959-440X(94)90309-3
- [2] Beveridge T.J., Pouwels P.H., Sára M., *et al.*, V. Functions of S-layers, *FEMS Microbiol.Rev.*, 20, 99-149, (1997); doi: 10.1111/j.1574-6976.1997.tb00305.x
- [3] Sleytr U.B., I. Basic and applied S-layer research: an overview, *FEMS Microbiol.Rev.*, 20, 5-12, (1997); doi: 10.1111/j.1574-6976.1997.tb00301.x
- [4] Mertig M., Kirsch R., Pompe W., Engelhardt H., Fabrication of highly oriented nanocluster arrays by biomolecular templating, *Eur.Phys.J.D.*, 9, 45-48, (1999); doi: 10.1007/s100530050397
- [5] Pollmann K., Raff J., Schnorpfel M., *et al.*, Novel surface layer protein genes in *Bacillus sphaericus* associated with unusual insertion elements, *Microbiol.*, 151, 2961-2973, (2005); doi: 10.1099/mic.0.28201-0
- [6] Pollmann K., Matys S., Construction of an S-Layer protein exhibiting modified self-assembling properties and enhanced metal binding capacities, *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 75, 1079-1085, (2007); doi: 10.1007/s00253-007-0937-5
- [7] Elghanian R., Storhoff J.J., Mucic R.C., *et al.*, Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles, *Science*, 277, 1078-1081, (1997); doi: 10.1126/science.277.5329.1078
- [8] Faraday M., Experimental relations of gold (and other metals) to light, *Philos.Trans.R.Soc. London*, 147, 145-181, (1857);
- [9] Ghosh S.K., Pal T., Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: from theory to applications, *Chem.Rev.*, 107, 4797-4862, (2007); doi: 10.10217a0680282
- [10] Zhao W., Brook M.A., Li Y., Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays, *Chem.Bio.Chem.*, 9, 2363-2371, (2008); doi: 10.1002/cbic.200800282
- [11] Rahmann M.M., Mukherjee D., Sengupta M.K., *et al.*, Effectiveness and reliability of arsenic field testing kits: are the million dollar screening projects effective or not, *Environ.Sci.Technol.*, 36, 5385-5394, (2002); doi: 10.1021/es020591o
- [12] Kinniburgh D.G., Kosmos W., Arsenic contamination in groundwater: some analytical considerations, *Talanta*, 58, 165-180, (2002); doi: 10.1016/S0039-9140(02)00265-5