



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 37 598 T2** 2007.12.27

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 918 885 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 37 598.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/12783**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 938 010.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/004740**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.07.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **05.02.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.06.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **11.04.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.12.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

31809 P **29.07.1996** **US**

(73) Patentinhaber:

Nanosphere Inc., Skokie, Ill., US

(74) Vertreter:

**Hoefer & Partner, Partnerschaftsgesellschaft,
81543 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI, SE

(72) Erfinder:

**MIRKIN, Chad A., Skokie, IL 60076, US;
LETSINGER, Robert L., Wilmette, IL 60091, US;
MUCIC, Robert C., Evanston, IL 60201, US;
STORHOFF, James J., Evanston, IL 60201, US;
ELGHANIAN, Robert, Chicago, IL 60656, US**

(54) Bezeichnung: **NANOPARTIKEL MIT DARAN ANGEHEFTETEN OLIGONUKLEOTIDEN SOWIE DEREN VERWENDUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, natürlichen oder synthetischen, modifizierten oder unmodifizierten. Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Nanoherstellung. Schließlich betrifft die Erfindung Verfahren zur Trennung einer ausgewählten Nukleinsäure von anderen Nukleinsäuren.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Entwicklung von Verfahren zum Nachweis und Sequenzieren von Nukleinsäuren ist kritisch in Bezug auf die Diagnose von genetischen, bakteriellen und viralen Krankheiten. Siehe Mansfield, E.S. et al. *Molecular and Cellular Sondas*, 9, 145-156 (1995). Derzeit wird eine Vielfalt an Verfahren zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen verwendet. Diese Verfahren sind jedoch kompliziert, zeitintensiv und/oder erfordern die Verwendung von speziellen und teuren Geräten. Ein einfaches, schnelles Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, das die Verwendung solcher Geräte nicht erfordert, wäre wünschenswert.

[0003] Eine Vielfalt an Verfahren wurde entwickelt, um Metall- und Halbleiterkolloide zu Nanomaterialien zusammenzufügen. Diese Verfahren waren gerichtet auf die Verwendung kovalenter Linkermoleküle, die an den gegenüberliegenden Enden Funktionalitäten aufweisen, mit chemischen Affinitäten für die Kolloide von Interesse. Einen der erfolgreichsten Ansätze zeigen Brust et al., *Adv. Mater.*, 7, 795-797 (1995), und dieser umfasst die Verwendung von Goldkolloiden und gängiger Thiol-Adsorptionschemie, Bain & Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed. engl.*, 28, 506-512 (1989) und Dubois & Nuzzo, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 43, 437-464 (1992). Bei diesem Ansatz werden lineare Alkandithiole als Partikellinkermoleküle verwendet. Die Thiolgruppen an jedem Ende des Linkermoleküls heften sich selber kovalent an die kolloidalen Partikel, um aggregierte Strukturen zu bilden. Die Nachteile an diesem Verfahren sind, dass der Prozess schwierig zu kontrollieren ist und die Zusammenfügungen irreversibel gebildet werden. Verfahren zur systematischen Kontrolle des Zusammenfügungsprozesses werden benötigt, wenn die Materialeigenschaften dieser Strukturen vollständig ausgeschöpft werden sollen.

[0004] Der potentielle Nutzen von DNA zur Herstellung von Biomaterialien und in Nanoherstellungsverfahren wurde anerkannt. In dieser Arbeit haben sich die Forscher auf die Verwendung der sequenzspezifischen molekularen Wiedererkennungseigenschaften von Oligonucleotiden konzentriert, um eindrucksvolle Strukturen mit wohl definierter geometrischen Formen und Größen zu erstellen. Shekhtman et al., *New J. Chem.*, 17, 757-763 (1993); Shaw & Wang, *Science*, 260, 533-536 (1993); Chen et al., *J. Am Chem. Soc.*, 111, 6402-6407 (1989); Chen & Seeman, *Nature*, 350, 631-633 (1991); Smith and Feigon, *Nature*, 356, 164-168 (1992); Wang et al., *Biochem.*, 32, 1899-1904 (1993); Chen et al., *Biochem.*, 33, 13540-13546 (1994); Marsh et al., *Nucleic Acids Res.*, 23, 696-700 (1995); Mirkin, *Annu. Review Biophys. Biomol. Struct.*, 23, 541-576 (1994); Wells, *J. Biol. Chem.*, 263, 1095-1098 (1988); Wang et al., *Biochem.*, 30, 5667-5674 (1991). Die Theorie zur Herstellung von DNA-Strukturen ist dem experimentellen Nachweis weit voraus. Seeman et al., *New J. Chem.*, 17, 739-755 (1993).

[0005] US 5384265 (Geo-Centers, Inc.) offenbart der Nachweis von Nukleinsäuretargets unter Zuhilfenahme von DNA-Molekülen, die mit kolloidalen Metallpartikeln markiert sind. Der Nachweis wird ausgeführt über die katalytische Aktivität der Partikel.

[0006] US 5521289 (NanoSondes, Inc.) offenbart die Verwendung von kleinen Nanopartikeln, die z.B. aus Gold gemacht sind, als Markierung z.B. beim Nachweis von Nukleinsäuren.

[0007] EP 0526912 A2 (Enzo Biochem, Inc.) offenbart ein Verfahren zur Erfassung von targetgenetischem Material, basierend auf zwei markierten Einzelstrangpolynucleodidsegmenten. Mikro- und Makropartikel werden verwendet.

[0008] US 5508164 (Dekalb Genetic Corporation) offenbart ein Verfahren zum magnetischen Markieren eines Chromosoms. Die magnetischen Partikel können kolloidales Gold enthalten.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Die Erfindung stellt ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren bereit. In einer Ausführungsform umfasst das Verfahren dass eine Nukleinsäure mit einem oder mehreren Typen von Nanopartikeln, die Oligo-

nucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind (Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate) in Kontakt gebracht wird. Die Nukleinsäure hat mindestens zwei Bereiche, und die Oligonucleotide auf jedem der Typen von Nanopartikeln haben eine Sequenz, die komplementär zu der Sequenz von einem der Bereiche der Nukleinsäure ist. Der Kontakt wird unter Bedingungen ausgeführt, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln mit der Nukleinsäure zu erlauben. Die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln mit der Nukleinsäure führt zu einer nachweisbaren Änderung.

[0010] In einer weiteren Ausführungsform umfasst das Verfahren, dass eine Nukleinsäure mit mindestens zwei Typen von Nanopartikeln, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind in Kontakt gebracht wird. Die Oligonucleotide auf dem ersten Typ von Nanopartikeln haben eine Sequenz, die zu einem ersten Bereich der Sequenz der Nukleinsäure komplementär ist. Die Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln haben eine Sequenz, die komplementär ist zu einem zweiten Bereich der Sequenz der Nukleinsäure. Der Kontakt findet statt unter Bedingungen ausgeführt, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln mit der Nukleinsäure zu erlauben, und es wird eine nachweisbare Änderung beobachtet, die durch diese Hybridisierung bewirkt wird.

[0011] In einer weiteren Ausführungsform umfasst das Verfahren die Bereitstellung eines Substrats, das einen ersten Typ von Nanopartikeln umfasst, die daran angeheftet sind. Der erste Typ von Nanopartikeln weist Oligonucleotide auf, die daran angeheftet sind, und die Oligonucleotide haben eine Sequenz, die zu einem ersten Bereich der Sequenz der Nukleinsäure komplementär sind. Das Substrat wird mit der Nukleinsäure unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln mit der Nukleinsäure zu erlauben. Dann wird ein zweiter Typ von Nanopartikeln, der Oligonucleotide aufweist, die daran angeheftet sind, bereitgestellt. Die Oligonucleotide haben eine Sequenz, die zu einem oder mehreren anderen Bereichen der Sequenz der Nukleinsäure komplementär ist und die Nukleinsäure, die an das Substrat gebunden ist, wird mit dem zweiten Typ von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln mit der Nukleinsäure zu erlauben. An diesem Punkt kann eine nachweisbare Änderung beobachtbar sein. Das Verfahren kann ferner umfassen, dass ein bindendes Oligonucleotid, das eine ausgewählte Sequenz hat, die mindestens zwei Bereiche umfasst, wobei der erste Bereich komplementär ist zu mindestens einem Bereich der Sequenz der Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln, bereitgestellt wird. Das bindende Oligonucleotid wird unter Bedingungen mit dem zweiten Typ von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten, die an das Substrat gebunden sind, in Kontakt gebracht, die wirksam sind, die Hybridisierung des bindenden Oligonucleotids an die Oligonucleotide auf den Nanopartikeln zu erlauben. Ein dritter Typ von Nanopartikeln, der Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, wobei die Oligonucleotide eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz des zweiten Bereichs des bindenden Oligonucleotids, wird dann unter Bedingungen mit dem bindenden Oligonucleotid, das an das Substrat gebunden ist in Kontakt gebracht, die wirksam sind, die Hybridisierung des bindenden Oligonucleotids an die Oligonucleotide auf den Nanopartikeln zu erlauben. Schließlich wird die nachweisbare Änderung, die durch diese Hybridisierung erzeugt wird, beobachtet.

[0012] In einer weiteren Ausführungsform umfasst das Verfahren, dass eine Nukleinsäure mit einem Substrat, das Oligonucleotide aufweist, die daran angeheftet sind in Kontakt gebracht wird, wobei die Oligonucleotide eine Sequenz haben, die zu einem ersten Bereich der Sequenz der Nukleinsäure komplementär ist. Der Kontakt wird unter Bedingungen ausgeführt, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf dem Substrat mit der Nukleinsäure zu erlauben. Dann wird die Nukleinsäure, die an das Substrat gebunden ist, in Kontakt gebracht mit dem ersten Typ von Nanopartikeln, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, wobei die Oligonucleotide eine Sequenz haben, die komplementär ist zu einem zweiten Bereich der Sequenz der Nukleinsäure. Der Kontakt wird unter Bedingungen ausgeführt, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln mit der Nukleinsäure zu erlauben. Als Nächstes wird der erste Typ von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten, der an das Substrat gebunden ist, mit einem zweiten Typ von Nanopartikeln, der Oligonucleotide aufweist, die daran angeheftet sind in Kontakt gebracht, wobei die Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln eine Sequenz haben, die zu mindestens einem Bereich der Sequenz der Oligonucleotide auf dem ersten Typ von Nanopartikeln komplementär ist, wobei der Kontakt unter Bedingungen ausgeführt wird, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf dem ersten und zweiten Typ von Nanopartikeln zu erlauben. Schließlich wird eine nachweisbare Änderung beobachtet, die durch diese Hybridisierungen erzeugt wird.

[0013] In einer weiteren Ausführungsform umfasst das Verfahren, dass eine Nukleinsäure mit einem Substrat, das Oligonucleotide aufweist, die daran angeheftet sind in Kontakt gebracht wird, wobei die Oligonucleotide eine Sequenz haben, die komplementär ist zu einem ersten Bereich der Sequenz der Nukleinsäure. Der Kon-

takt wird unter Bedingungen ausgeführt, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf dem Substrat mit der Nukleinsäure zu erlauben. Die Nukleinsäure, die an das Substrat gebunden ist, wird dann mit Liposomen in Kontakt gebracht, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, wobei die Oligonucleotide eine Sequenz haben, die komplementär ist zu einem Bereich der Sequenz der Nukleinsäure. Dieser Kontakt wird unter Bedingungen ausgeführt, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Liposomen mit der Nukleinsäure zu erlauben. Als Nächstes werden die Liposom-Oligonucleotidkonjugate, die an das Substrat gebunden sind, mit einem ersten Typ von Nanopartikeln in Kontakt gebracht, der mindestens einen ersten Typ von Oligonucleotiden aufweist, die daran angeheftet sind. Der erste Typ von Oligonucleotiden weist eine hydrophobe Gruppe auf, die an das Ende angeheftet ist, und das nicht an die Nanopartikel gebunden ist, und der Kontakt wird unter Bedingungen ausgeführt, die wirksam sind, das Anhaften der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln an die Liposomen als ein Ergebnis von hydrophoben Wechselwirkungen zu erlauben. An diesem Punkt kann eine nachweisbare Änderung beobachtbar sein. Das Verfahren kann ferner einen Kontakt des ersten Typs von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten, die an die Liposomen gebunden sind, mit einem zweiten Typ von Nanopartikeln, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, umfassen. Der erste Typ von Nanopartikeln, weist einen zweiten Typ von Oligonucleotiden auf, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu mindestens einem Bereich der Sequenz der Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln, und die Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln haben eine Sequenz, die komplementär ist zu mindestens einem Bereich der Sequenz des zweiten Typs von Oligonucleotiden auf dem ersten Typ von Nanopartikeln. Der Kontakt wird unter Bedingungen ausgeführt, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den ersten und zweiten Typen von Nanopartikeln zu erlauben. Dann wird eine nachweisbare Änderung beobachtet.

[0014] In noch einer weiteren Ausführungsform umfasst das Verfahren die Bereitstellung von Nanopartikeln, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind und das Bereitstellen von einer oder mehreren Typen von bindenden Oligonucleotiden. Jedes der bindenden Oligonucleotide hat zwei Bereiche. Die Sequenz von einem Bereich ist komplementär zu der Sequenz von einem der Bereiche der Nukleinsäure, und die Sequenz von dem anderen Bereich ist komplementär zu der Sequenz der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln. Die Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate und die bindenden Oligonucleotide werden unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln mit den bindenden Oligonucleotiden zu erlauben. Die Nukleinsäure und die bindenden Oligonucleotide werden unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die wirksam sind, die Hybridisierung der bindenden Oligonucleotide mit der Nukleinsäure zu erlauben. Dann wird eine nachweisbare Änderung beobachtet. Die Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate können mit den bindenden Oligonucleotiden in Kontakt gebracht werden bevor sie mit der Nukleinsäure in Kontakt gebracht werden, oder alle drei können simultan miteinander in Kontakt gebracht werden.

[0015] In einer weiteren Ausführungsform umfasst das Verfahren, dass eine Nukleinsäure mit mindestens zwei Typen von Partikeln, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind in Kontakt gebracht wird. Die Oligonucleotide auf dem ersten Typ von Partikeln haben eine Sequenz, die komplementär ist zu einem ersten Bereich der Sequenz der Nukleinsäure und haben Energiedonormoleküle an den Enden, die nicht an die Partikel angeheftet sind. Die Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Partikeln haben eine Sequenz, die komplementär ist zu einem zweiten Bereich der Sequenz der Nukleinsäure und haben Energieakzeptormoleküle an den Enden, die nicht an die Partikel angeheftet sind. Der Kontakt wird unter Bedingungen ausgeführt, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Partikeln mit der Nukleinsäure zu erlauben, und eine nachweisbare Änderung wird beobachtet, die durch diese Hybridisierung bewirkt wird. Die Energiedonor- und Akzeptormoleküle können fluoreszierende Moleküle sein.

[0016] Die Erfindung stellt ferner Kits zum Nachweis von Erfassung von Nukleinsäuren bereit. In einer Ausführungsform umfasst der Kit mindestens einen Behälter, wobei der Behälter mindestens zwei Typen von Nanopartikeln beinhaltet, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind. Die Oligonucleotide auf dem ersten Typ von Nanopartikeln haben eine Sequenz, die komplementär ist zu der Sequenz des ersten Bereichs einer Nukleinsäure. Die Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln haben eine Sequenz, die zu der Sequenz des zweiten Bereichs der Nukleinsäure komplementär ist.

[0017] Alternativ kann der Kit mindestens zwei Behälter umfassen. Der erste Behälter enthält Nanopartikel, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines ersten Bereichs einer Nukleinsäure. Der zweite Behälter enthält Nanopartikel, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz aufweisen, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereichs der Nukleinsäure.

[0018] In einer weiteren Ausführungsform umfasst der Kit mindestens einen Behälter. Der Behälter enthält

metallische oder halbleitende Nanopartikel, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind. Die Oligonucleotide haben eine Sequenz, die komplementär ist zu einem Bereich einer Nukleinsäure und weisen fluoreszierende Moleküle auf, die an den Enden der Oligonucleotide angeheftet sind, die nicht an die Nanopartikel angeheftet sind.

[0019] In einer weiteren Ausführungsform umfasst der Kit ein Substrat, wobei das Substrat Nanopartikel aufweist, die daran angeheftet sind, wobei die Nanopartikel Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines ersten Bereichs einer Nukleinsäure. Der Kit umfasst ferner einen ersten Behälter, der Nanopartikel enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereichs der Nukleinsäure. Der Kit umfasst ferner einen zweiten Behälter, der ein bindendes Oligonucleotid enthält, das eine ausgewählte Sequenz hat, die mindestens zwei Bereiche aufweist, wobei der erste Bereich komplementär ist zu mindestens einem Bereich der Sequenz der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln in dem ersten Behälter. Das Kit enthält auch einen dritten Behälter, der Nanopartikel enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, wobei die Oligonucleotide eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereichs von dem bindenden Oligonucleotid.

[0020] In einer weiteren Ausführungsform umfasst der Kit ein Substrat, das Oligonucleotide aufweist, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines ersten Bereichs einer Nukleinsäure, wobei ein erster Behälter Nanopartikel enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereichs der Nukleinsäure, und einen zweiten Behälter, der Nanopartikel enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu mindestens einem Bereich der Oligonucleotide, die an die Nanopartikel in dem ersten Behälter angeheftet sind.

[0021] In einer weiteren Ausführungsform umfasst der Kit ein Substrat, einen ersten Behälter, der Nanopartikel enthält, einen zweiten Behälter, der einen ersten Typ von Oligonucleotiden enthält, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines ersten Bereichs einer Nukleinsäure, einen dritten Behälter, der einen zweiten Typ von Oligonucleotiden enthält, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereichs auf der Nukleinsäure, und einen vierten Behälter, der einen dritten Typ von Oligonucleotiden enthält, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu mindestens einem Bereich der Sequenz auf dem zweiten Typ von Oligonucleotiden.

[0022] In einer weiteren Ausführungsform umfasst der Kit ein Substrat, das Oligonucleotide aufweist, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines ersten Bereichs einer Nukleinsäure. Das Kit enthält auch einen ersten Behälter, der Liposomen enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereichs der Nukleinsäure und einen zweiten Behälter, der Nanopartikel enthält, der mindestens einen ersten Typ von Oligonucleotiden aufweist, die daran angeheftet sind, wobei der erste Typ von Oligonucleotiden eine hydrophobe Gruppe aufweist, die an das Ende angeheftet ist, das nicht an die Nanopartikel angeheftet ist, so dass die Nanopartikel an die Liposomen durch hydrophobe Wechselwirkungen angeheftet sein können. Das Kit kann ferner einen dritten Behälter umfassen, der einen zweiten Typ von Nanopartikeln enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, wobei die Oligonucleotide eine Sequenz haben, die komplementär ist zu mindestens einem Bereich der Sequenz von einem zweiten Typ an Oligonucleotiden, der angeheftet ist an den ersten Typ von Nanopartikeln. Der zweite Typ von Oligonucleotiden, der an den ersten Typ von Nanopartikeln angeheftet ist, hat eine Sequenz, die komplementär ist zu der Sequenz der Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln.

[0023] In einer weiteren Ausführungsform umfasst der Kit einen ersten Behälter, der Nanopartikel enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind. Der Kit enthält auch einen oder mehrere zusätzliche Behälter, wobei jeder Behälter ein bindendes Oligonucleotid enthält. Jedes bindende Oligonucleotid hat einen ersten Bereich, der eine Sequenz hat, die komplementär ist zu mindestens einem Bereich der Sequenz der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln und einen zweiten Bereich, der eine Sequenz hat, die komplementär ist zu der Sequenz eines Bereichs einer Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll. Die Sequenzen der zweiten Bereiche der bindenden Oligonucleotide können unterschiedlich sein, solange jede Sequenz komplementär ist zu einem Bereich der Sequenz der Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll.

[0024] In einer weiteren Ausführungsform umfasst der Kit einen Behälter, der einen Typ von Nanopartikeln enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind und einen oder mehrere Typen von bindenden Oligonucleotiden. Jeder der Typen von bindenden Oligonucleotiden hat eine Sequenz, die mindestens

zwei Bereiche umfasst. Der erste Bereich ist komplementär zu der Sequenz der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln, wobei die bindenden Oligonucleotide hybridisiert sind mit den Oligonucleotiden auf den Nanopartikeln in dem Behälter/den Behältern. Der zweite Bereich ist komplementär zu der Sequenz eines Bereiches der Nukleinsäure.

[0025] In einer weiteren Ausführungsform umfasst der Kit mindestens drei Behälter. Der erste Behälter enthält Nanopartikel. Der zweite Behälter enthält ein erstes Oligonucleotid, das eine Sequenz hat, die komplementär ist zu der Sequenz eines ersten Bereiches einer Nukleinsäure. Der dritte Behälter enthält ein zweites Oligonucleotid, das eine Sequenz aufweist, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereiches der Nukleinsäure. Der Kit kann ferner einen vierten Behälter umfassen, der ein bindendes Oligonucleotid enthält, das eine ausgewählte Sequenz hat, die mindestens zwei Bereiche aufweist, wobei der erste Bereich komplementär ist zu mindestens einem Bereich der Sequenz des zweiten Oligonucleotids, und einen fünften Behälter, der ein Oligonucleotid enthält, das eine Sequenz hat, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereiches des bindenden Oligonucleotids.

[0026] In einer weiteren Ausführungsform umfasst der Kit einen oder zwei Behälter, wobei der/die Behälter zwei Typen von Partikeln enthalten. Der erste Typ von Partikeln weist Oligonucleotide auf, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu einem ersten Bereich der Sequenz einer Nukleinsäure und weist Energiedonormoleküle auf, die an die Enden angeheftet sind, die nicht an die Nanopartikel angeheftet sind. Der zweite Typ von Partikeln weist Oligonucleotide auf, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu einem zweiten Bereich der Sequenz einer Nukleinsäure und weist Energieakzeptormoleküle auf, die an die Enden angeheftet sind, die nicht an die Nanopartikel angeheftet sind. Die Energiedonoren und Akzeptoren können fluoreszierende Moleküle sein.

[0027] Die Erfindung stellt auch ein Substrat bereit, das Nanopartikel aufweist, die daran angeheftet sind. Die Nanopartikel können Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines ersten Bereiches einer Nukleinsäure.

[0028] Die Erfindung stellt ferner ein Verfahren zur Nanoherstellung bereit. Das Verfahren umfasst die Bereitstellung von mindestens einem Typ von Bindeoligonucleotid bzw. Linkeroligonucleotid, das eine ausgewählte Sequenz hat, wobei die Sequenz jedes Typs von Bindeoligonucleotid mindestens zwei Bereiche aufweist. Das Verfahren umfasst ferner die Bereitstellung von einem oder mehreren Typen von Nanopartikeln, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, wobei die Oligonucleotide von jedem Typ von Nanopartikeln eine Sequenz haben, die komplementär ist zu einem Bereich der Sequenz eines Bindeoligonucleotids. Die Bindeoligonucleotide und Nanopartikel werden unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln mit den Bindeoligonucleotiden zu erlauben, so dass ein gewünschtes Nanomaterial oder eine Nanostruktur gebildet wird.

[0029] Die Erfindung stellt ferner ein weiteres Verfahren zur Nanoherstellung bereit. Dieses Verfahren umfasst die Bereitstellung von mindestens zwei Typen von Nanopartikeln, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind. Die Oligonucleotide auf dem ersten Typ von Nanopartikeln haben eine Sequenz, die komplementär ist zu der Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln. Die Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln haben eine Sequenz, die komplementär ist zu der auf den Oligonucleotiden auf dem ersten Typ von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten. Die ersten und zweiten Typen von Nanopartikeln werden unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln miteinander zu erlauben, so dass das gewünschte Nanomaterial oder die Nanostruktur gebildet wird.

[0030] Die Erfindung stellt ferner Nanomaterialien oder Nanostrukturen bereit, die aus Nanopartikeln zusammengesetzt sind, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, wobei die Nanopartikel durch Oligonucleotidverbinder zusammengehalten werden.

[0031] Die Erfindung stellt ferner eine Zusammensetzung bereit, die mindestens zwei Typen von Nanopartikeln enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind. Die Oligonucleotide auf dem ersten Typ von Nanopartikeln haben eine Sequenz, die komplementär ist zu der Sequenz eines ersten Bereiches einer Nukleinsäure oder eines Bindeoligonucleotids. Die Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln haben eine Sequenz, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereiches der Nukleinsäure oder des Bindeoligonucleotids.

[0032] Die Erfindung stellt ferner eine Zusammenstellung von Behältern bereit, die einen ersten Behälter um-

fasst, der Nanopartikel enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, und einen zweiten Behälter, der Nanopartikel enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind. Die Oligonucleotide, die an die Nanopartikel in dem ersten Behälter angeheftet sind, haben eine Sequenz, die komplementär ist zu der Oligonucleotide, die an die Nanopartikel in dem zweiten Behälter angeheftet sind. Die Oligonucleotide, die an die Nanopartikel in dem zweiten Behälter angeheftet sind, haben eine Sequenz, die komplementär ist zu derjenigen der Oligonucleotide, die an die Nanopartikel in dem ersten Behälter angeheftet sind.

[0033] Die Erfindung stellt ferner einen Nanopartikel bereit, der eine Vielzahl an unterschiedlichen Oligonucleotiden aufweist, die daran angeheftet sind.

[0034] Schließlich stellt die Erfindung ein Verfahren zum Abtrennen einer ausgewählten Nukleinsäure bereit, die mindestens zwei Bereiche von anderen Nukleinsäuren aufweist. Das Verfahren umfasst die Bereitstellung von einem oder mehreren Typen von Nanopartikeln, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, wobei die Oligonucleotide auf jedem der Typen von Nanopartikeln eine Sequenz aufweisen, die komplementär ist zu der Sequenz von einem der Bereiche auf der ausgewählten Nukleinsäure. Die ausgewählten und anderen Nukleinsäuren werden unter Bedingungen mit den Nanopartikeln in Kontakt gebracht, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln mit der ausgewählten Nukleinsäure zu erlauben, so dass die Nanopartikel, die mit der ausgewählten Nukleinsäure hybridisiert sind, aggregieren und ausfallen.

[0035] Wie hier verwendet, bezeichnet "ein Typ von Oligonucleotiden" eine Vielzahl an Oligonucleotidmolekülen, die dieselbe Sequenz aufweisen. Ein "Typ von Nanopartikeln, der Oligonucleotide aufweist, die daran angeheftet sind", bezeichnet eine Vielzahl an Nanopartikeln, die denselben Typ/dieselben Typen an Oligonucleotiden aufweisen, die daran angeheftet sind. "Nanopartikel, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind" werden manchmal auch bezeichnet als "Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate" oder in dem Fall des Nachweisverfahrens der Erfindung, als "Nanopartikel-Oligonucleotidesonden", "Nanopartikelsonden" oder einfach "Sonden".

Kurzbeschreibung der Figuren

[0036] **Fig. 1:** Schematische Darstellung, die die Bildung der Nanopartikelaggregate durch Kombinieren von Nanopartikeln, die komplementäre Oligonucleotide aufweisen, die an ihnen angeheftet sind, zeigt, wobei die Nanopartikel in den Aggregaten als Ergebnis der Hybridisierung der komplementären Oligonucleotide zusammengehalten werden. X repräsentiert jeden kovalenten Anker (wie $-(\text{CH}_2)_3\text{OP}(\text{O})(\text{O}^-)-$, wobei S mit einem Goldnanopartikel verbunden ist. Zur Vereinfachung ist in **Fig. 1** und einigen nachfolgenden Figuren nur ein Oligonucleotid gezeigt, das an jeden Partikel angeheftet ist, wobei aber in Wirklichkeit jeder Partikel einige Oligonucleotide aufweist, die an ihm angeheftet sind. Ferner ist es wichtig anzumerken, dass in **Fig. 1** und den folgenden Figuren die relativen Größen der Goldnanopartikel und der Oligonucleotide nicht maßstabgetreu wiedergegeben sind.

[0037] **Fig. 2:** Schematische Darstellung, die ein System zum Nachweis von Nukleinsäure unter Verwendung von Nanopartikeln zeigt, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind. Die Oligonucleotide auf den zwei Nanopartikeln haben Sequenzen, die komplementär sind zu zwei unterschiedlichen Bereichen der gezeigten Einzelstrang-DNA. Demzufolge hybridisieren sie mit der DNA, was eine nachweisbare Änderung (Bildung von Aggregaten und Erzeugung einer Farbänderung) erzeugt.

[0038] **Fig. 3:** Schematische Darstellung einer Variation des Systems aus **Fig. 2**. Die Oligonucleotide auf den zwei Nanopartikeln haben Sequenzen, die komplementär sind zu zwei unterschiedlichen Bereichen der gezeigten Einzelstrang-DNA, die durch einen dritten Bereich getrennt sind, der nicht komplementär ist zu den Oligonucleotiden auf den Nanopartikeln. Auch gezeigt ist ein optionales Füllstoffoligonucleotid, das dazu verwendet werden kann, mit dem nicht komplementären Bereich der Einzelstrang-DNA zu hybridisieren. Wenn die DNA, Nanopartikel und Füllstoffoligonucleotide vereint werden, aggregieren die Nanopartikel unter Bildung von eingeschnittenen, doppelsträngigen Oligonucleotidverbindern.

[0039] **Fig. 4:** Schematische Darstellung, die die reversible Aggregation von Nanopartikeln zeigt, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, als ein Ergebnis der Hybridisierung und Dehybridisierung mit einem Bindeoligonucleotid. Das dargestellte Bindeoligonucleotid ist eine doppelsträngige DNA, die überhängende Enden (klebende Enden) aufweist, die komplementär sind zu den Oligonucleotiden, die an die Nanopartikel angeheftet sind.

[0040] **Fig. 5:** Schematische Darstellung, die die Bildung von Nanopartikelaggregaten durch Verbinden von

Nanopartikeln darstellt, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, darstellen, mit Bindeoligonucleotiden, die Sequenzen haben, die komplementär sind zu den Oligonucleotiden, die an die Nanopartikel angeheftet sind.

[0041] Fig. 6: Küvetten, die zwei Typen von Goldkolloiden enthalten, wobei jede ein unterschiedliches Oligonucleotid aufweist, das daran angeheftet ist, und ein verbindendes doppelsträngiges Oligonucleotid mit klebenden Enden, das komplementär ist zu den Oligonucleotiden, die an die Nanopartikel (siehe [Fig. 4](#)) angeheftet sind. Küvette A – bei 80°C, was oberhalb der T_m der Binde-DNA liegt; dehybridisiert (thermisch denaturiert). Die Farbe ist Dunkelrot. Küvette B – nach Kühlen auf Raumtemperatur, was unterhalb der T_m der Binde-DNA liegt; Die Hybridisierung hat stattgefunden und die Nanopartikel sind aggregiert, aber die Aggregate sind nicht ausgefallen. Die Farbe ist violett. Küvette C – nach einigen Stunden bei Raumtemperatur haben sich die aggregierten Nanopartikel auf dem Boden der Küvette abgesetzt. Die Lösung ist klar und der Bodensatz ist blass-Rosagrau. Das Erhitzen von B oder C führt zu A.

[0042] Fig. 7: Kurve der Extinktion gegen die Wellenlänge in nm, die die Änderungen in der Extinktion zeigt, wenn Goldnanopartikel, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, aufgrund der Hybridisierung mit Bindeoligonucleotiden bei Verringerung der Temperatur, wie in [Fig. 4](#) gezeigt, aggregieren.

[0043] Fig. 8A–B: Fig. 8A ist eine Kurve, die die Änderung in der Extinktion gegen die Temperatur/Zeit für das System darstellt, wie es in [Fig. 4](#) gezeigt ist. Bei niedrigen Temperaturen aggregieren Goldnanopartikel, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, aufgrund der Hybridisierung mit Bindeoligonucleotiden (siehe [Fig. 4](#)). Bei hoher Temperatur (80°C) sind die Nanopartikel dehybridisiert. Ein Ändern der Temperatur mit der Zeit zeigt, dass dies ein reversibler Prozess ist. [Fig. 8B](#) ist eine Kurve, die die Änderung der Extinktion gegen die Temperatur/Zeit in derselben Weise zeigt, unter Verwendung einer wässrigen Lösung von unmodifizierten Goldnanopartikeln. Die reversiblen Änderungen, wie sie in [Fig. 8A](#) gezeigt ist, werden nicht beobachtet.

[0044] Fig. 9A–B: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Bilder. [Fig. 9A](#) ist ein TEM-Bild von aggregierten Goldnanopartikeln, die durch Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Goldnanopartikeln mit Bindeoligonucleotiden zusammengehalten werden. [Fig. 9B](#) ist ein TEM-Bild eines zweidimensionalen Aggregates, das die Anordnung der verbundenen Nanopartikel zeigt.

[0045] Fig. 10: Schematische Darstellung, die die Bildung von thermisch stabilen dreisträngigen Oligonucleotidverbindern zwischen Nanopartikeln zeigt, die Pyrimidin: Purin: Pyrimidin-Motive aufweisen. Solche dreisträngigen Verbinder sind steifer als doppelsträngige Verbinder. In [Fig. 10](#) weist ein Nanopartikel ein Oligonucleotid auf, das an ihm angeheftet ist, das aus allen Purinen aufgebaut ist, und der andere Nanopartikel weist ein Oligonucleotid auf, das an ihm angeheftet ist, das aus allen Pyrimidinen besteht. Das dritte Oligonucleotid zur Bildung des Tripelstrangverbinders (der nicht an einen Nanopartikel angeheftet ist) besteht aus Pyrimidinen.

[0046] Fig. 11: Schematische Darstellung, die die Bildung von Nanopartikelaggregaten durch Kombination von Nanopartikeln, die komplementäre Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, zeigt, wobei die Nanopartikel in den Aggregaten als Ergebnis der Hybridisierung der komplementären Oligonucleotide zusammengehalten werden. In [Fig. 11](#) repräsentieren die Kreise die Nanopartikel, die Formeln sind Oligonucleotidsequenzen, s ist der Thioalkyllinker und die Kringel auf den Kreisen repräsentieren andere Oligonucleotidmoleküle derselben Sequenz wie gezeigt, die die Oberfläche der Nanopartikel bedecken. Die vielfachen Oligonucleotide auf den zwei Typen von Nanopartikeln können miteinander hybridisieren, was zur Bildung einer Aggregatstruktur führt.

[0047] Fig. 12: Schematische Darstellung, die Systeme zum Nachweis von Nukleinsäure unter Verwendung von Nanopartikeln zeigt, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind. Oligonucleotid-Nanopartikelkonjugate 1 und 2 und Einzelstrangoligonucleotidtargets 3, 4, 5, 6 und 7 sind gezeigt. In [Fig. 12](#) repräsentieren die Kreise die Nanopartikel, die Formeln sind Oligonucleotidsequenzen und die gepunkteten Linien repräsentieren verbindende Bindungen des Nucleotids.

[0048] Fig. 13A–B: Schematische Darstellungen, die Systeme zum Nachweis von DNA (Analyt-DNA) unter Verwendung von Nanopartikeln und transparentem Substrat zeigen.

[0049] Fig. 14A–B: Fig. 14A ist eine Kurve der Extinktion gegen die Wellenlänge in nm, die die Änderungen in der Extinktion zeigt, wenn Goldnanopartikel, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind (eine

Population davon ist in Lösung und eine Population davon ist an ein transparentes Substrat angeheftet, wie in [Fig. 13B](#) gezeigt) aufgrund der Hybridisierung mit Bindeoligonucleotiden aggregieren. [Fig. 14B](#) ist eine Kurve der Änderung in der Extinktion für das hybridisierte System aus [Fig. 14A](#), wenn die Temperatur erhöht wird (geschmolzen).

[0050] [Fig. 15](#): Schematische Darstellungen, die Systeme zum Nachweis von Nukleinsäure unter Verwendung von Nanopartikeln zeigt, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind. Die Oligonucleotid-Nanopartikelkonjugate 1 und 2 und Einzelstrangoligonucleotidtargets 3, 4, 5, 6, 7 und 8 sind gezeigt. In [Fig. 15](#) repräsentieren die Kreise die Nanopartikel, die Formeln sind Oligonucleotidsequenzen und S repräsentiert den Thio-Alkyllinker.

[0051] [Fig. 16](#): Schematische Darstellung, die Systeme zum Nachweis von Nukleinsäure unter Verwendung von Nanopartikeln zeigt, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind. Oligonucleotidnanopartikelkonjugate 1 und 2, Einzelstrangoligonucleotidtargets unterschiedlicher Länge, und Füllstoffoligonucleotide von unterschiedlicher Länge sind gezeigt. In [Fig. 16](#) repräsentieren die Kreise die Nanopartikel, die Formeln die Oligonucleotidsequenzen und S repräsentiert den Thioalkyllinker.

[0052] [Fig. 17](#): Schematische Darstellungen, die Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate und Systeme zum Nachweis von Nukleinsäure unter Verwendung von Nanopartikeln zeigen, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind. In [Fig. 17](#) repräsentieren die Kreise die Nanopartikel, die geraden Linien repräsentieren Oligonucleotidketten (Basen nicht gezeigt), zwei eng beabstandete parallele Linien repräsentieren Duplex-Segmente und die kleinen Buchstaben bezeichnen spezifische Nukleotidsequenzen (a ist komplementär zu a', b ist komplementär zu b', etc.).

[0053] [Fig. 18](#): Schematische Darstellung, die ein System zum Nachweis von Nukleinsäure unter Verwendung von Liposomen (große Doppelkreise), Nanopartikeln (kleine dunkle Kreise) und einem transparenten Substrat zeigt. In [Fig. 18](#) repräsentieren die ausgefüllten Quadrate Cholesterylgruppen, die Kringel repräsentieren Oligonucleotide und die Leitern repräsentieren doppelsträngige (hybridisierte) Oligonucleotide.

[0054] [Fig. 19A–B](#): [Fig. 19A](#) ist eine Kurve der Extinktion gegen die Wellenlänge in nm, die Änderungen in der Extinktion zeigt, wenn Goldnanopartikel-Oligonucleotidkonjugate sich in vielfachen Schichten auf einem transparenten Substrat, wie in [Fig. 13A](#) gezeigt, zusammenfügen. [Fig. 19B](#) ist eine Kurve der Änderungen in der Extinktion für das hybridisierte System aus [Fig. 19A](#), wenn die Temperatur erhöht wird (geschmolzen).

[0055] [Fig. 20A–B](#): Darstellung von Schemata, unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Oligonucleotiden, die an metallische oder Halbleiterquench-Nanopartikel ([Fig. 20A](#)) angeheftet sind, oder an Nichtmetalle, Nichtalbleiterpartikel ([Fig. 20B](#)).

Ausführliche Beschreibung der derzeit bevorzugten Ausführungsformen

[0056] Nanopartikel, die für die Erfindung geeignet sind, umfassen Metall (z.B. Gold, Silber, Kupfer und Platin), Halbleiter (z.B. CdSe und CdS) und magnetische (z.B. Ferromagnetite) kolloidale Materialien. Andere Nanopartikel, die für die Durchführung der Erfindung geeignet sind, umfassen ZnS, ZnO, TiO₂, AgI, AgBr, HgI₂, PbS, PbSe, ZnTe, CdTe, In₂S₃, In₂Se₃, Cd₃P₂, Cd₃As₂, InAs, und GaAs. Die Größe der Nanopartikel liegt bevorzugt zwischen etwa 5 nm und etwa 150 nm (mittlerer Durchmesser), bevorzugter zwischen etwa 5 und etwa 50 nm, und am meisten bevorzugt zwischen etwa 10 und etwa 30 nm.

[0057] Verfahren zur Herstellung von Metall-, Halbleiter- und magnetischen Nanopartikeln sind aus dem Stand der Technik wohl bekannt. Siehe z.B. Schmid, G. (ed.) Clusters and Colloids (VCH, Weinheim, 1994); Hayat, M.A. (ed.) Colloidal Gold: Principles, Methods and Applications (Academic Press, San Diego, 1991); Massart, R., IEEE Transactions on Magnetics, 17, 1247 (1981); Ahmadi, T.S. et al., Science, 272, 1924 (1996); Henglein, A. et al., J. Phys. Chem., 99, 14129 (1995); Curtis, A.C., et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 27, 1530 (1988).

[0058] Verfahren zur Herstellung von ZnS, ZnO, TiO₂, AgI, AgBr, HgI₂, PbS, PbSe, ZnTe, CdTe, In₂S₃, In₂Se₃, Cd₃P₂, Cd₃As₂, InAs, und GaAs-Nanopartikel sind ebenfalls aus dem Stand der Technik bekannt. Siehe z.B. Weller, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 32, 41 (1993); Henglein, Top. Curr. Chem., 143, 113 (1988); Henglein, Chem. Rev., 89, 1861 (1989); Brus, Appl. Phys. A., 53, 465 (1991); Bahncmann, in Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy (eds. Pelizzetti und Schiavello 1991), Seite 251; Wang und Herron, J. Phys. Chem., 95, 525 (1991); Olshavsky et al., J. Am. Chem. Soc., 112, 9438 (1990); Ushida et al., J. Phys. Chem., 95, 5382

(1992).

[0059] Geeignete Nanopartikel sind ebenfalls handelsüblich erhältlich von z.B. Ted Pella, Inc. (Gold), Amersham Corporation (Gold) und NanoSondes, Inc. (Gold).

[0060] Derzeit bevorzugt für die Verwendung zum Nachweis von Nukleinsäuren sind Goldnanopartikel. Goldkolloidpartikel haben hohe Extinktionskoeffizienten für die Banden, die ihre schönen Farben zur Folge haben. Diese intensiven Farben ändern sich mit der Partikelgröße, Konzentration, dem Interpartikelabstand, dem Maß an Aggregation und der Form (Geometrie) der Aggregate, was diese Materialien besonders attraktiv für die kolorimetrischen Untersuchungen macht. Z.B. führen Hybridisierungen von Oligonucleotiden, die an Goldnanopartikel angeheftet sind, mit Oligonucleotiden und Nukleinsäuren zu einer sofortigen Farbänderung, die mit dem bloßen Auge wahrnehmbar ist (siehe z.B. die Beispiele).

[0061] Goldnanopartikel sind derzeit ebenso bevorzugt für die Verwendung in der Nanoherstellung, aus denselben Gründen wie oben genannt und aufgrund ihrer Stabilität, ihrer leichten Abbildung durch Elektronenmikroskopie und gut charakterisierten Modifikation mit Thiofunktionalitäten (siehe unten).

[0062] Die Nanopartikel, die Oligonucleotide oder beide sind funktionalisiert, um die Oligonucleotide an die Nanopartikel anzuheften. Solche Verfahren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Zum Beispiel lassen sich Oligonucleotide, die mit Alkanthiolen an ihren 3'-Termini oder 5'-Termini funktionalisiert sind, leicht an Goldnanopartikel anheften. Siehe Whitesides, Proceedings of the Robert A. Welch Foundation 39th Conference On Chemical Research Nanophase Chemistry, Houston, TX, Seiten 109-121 (1995). Siehe auch Mucic et al. Chem. Commun. 555-557 (1996) (beschreibt ein Verfahren zum Anheften von 3'-Thiol-DNA an flache Goldoberflächen; dieses Verfahren kann verwendet werden, um Oligonucleotide an Nanopartikel anzuheften). Das Alkanthiolverfahren kann auch verwendet werden, um Oligonucleotide an andere Metalle, Halbleiter und magnetische Kolloide und an die anderen Nanopartikel, wie oben aufgeführt, anzuheften. Andere funktionelle Gruppen zum Anheften von Oligonucleotiden an feste Oberflächen umfassen Phosphorthioatgruppen (siehe z.B. U.S.-Patent 5,472,881 zum Binden von Oligonucleotid-Phosphorthioaten an Goldoberflächen), substituierte Alkylsiloxane (siehe z.B. Burwell, Chemical Technology, 4, 370-377 (1974) und Matteucci und Caruthers, J. Am. Chem. Soc., 103, 3185-3191 (1981) zum Binden von Oligonucleotiden an Silica und Glasoberflächen, und Grabar et al., Anal. Chem., 67, 735-743 zum Binden von Aminoalkylsiloxanen und für die gleiche Bindung von Mercaptoalkylsiloxanen). Oligonucleotide, die mit einem 5'-Thionucleosid oder einem 3'-Thionucleosid enden, können auch verwendet werden, um Oligonucleotide an feste Oberflächen anzuheften. Gold-Nanopartikel können an Oligonucleotide unter Verwendung von Biotin-markierten Oligonucleotiden und Streptavidin-Goldkonjugatkolloiden angeheftet werden; die Biotin-Streptavidininteraktion heftet die Kolloide an das Oligonucleotid. Shaiu et al., Nuc. Acids Res., 21, 99 (1993). Die folgenden Referenzen beschreiben andere Verfahren, die angewendet werden können, um Oligonucleotide an Nanopartikel anzuheften: Nuzzo et al., J. Am. Chem. Soc., 109, 2358 (1987) (Disulfide auf Gold); Allara und Nuzzo, Langmuir, 1, 45 (1985) (Carbonsäuren auf Aluminium); Allara und Tompkins, J. Colloid Interface Sci., 49, 410-421 (1974) (Carbonsäuren auf Kupfer); Iler, The Chemistry of Silica, Kapitel 6, (Wiley 1979) (Carbonsäuren auf Silica); Timmons und Zisman, J. Phys. Chem., 69, 984-990 (1965) (Carbonsäuren auf Platin); Soriaga und Hubbard, J. Am. Chem. Soc., 104, 3937 (1982) (aromatische Ringverbindungen auf Platin); Hubbard, Acc. Chem. Res., 13, 177 (1980) (Sulfolane, Sulfoxide und andere funktionalisierte Lösungsmittel auf Platin); Hickman et al., J. Am. Chem. Soc., 111, 7271 (1989) (Isonitrile auf Platin); Maoz und Sagiv, Langmuir, 3, 1045 (1987) (Silane auf Silica); Maoz und Sagiv, Langmuir, 3, 1034 (1987) (Silane auf Silica); Wasserman et al., Langmuir, 5, 1074 (1989) (Silane auf Silica); Eltekova und Eltekov, Langmuir, 3, 951 (1987) (aromatische Carbonsäuren, Aldehyde, Alkohole und Methoxygruppen auf Titandioxid und Silica); Lec et al., J. Phys. Chem., 92, 2597 (1988) (starre Phosphate auf Metallen).

[0063] Jeder Nanopartikel wird eine Vielzahl von Oligonucleotiden aufweisen, die an ihm angeheftet sind. Als Ergebnis kann jedes Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugat an eine Vielzahl von Oligonucleotiden oder Nukleinsäuren binden, die eine komplementäre Sequenz haben.

[0064] Oligonucleotide von definierter Sequenz werden verwendet für eine Vielzahl an Anwendungen in dieser Erfindung. Verfahren zum Herstellen von Oligonucleotiden einer vorbestimmten Sequenz sind gut bekannt. Siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. Ausg. 1989) und F. Eckstein (ed.) Oligonucleotides and Analogues, 1. Ausg. (Oxford University Press, New York, 1991). Festphasensyntheseverfahren sind bevorzugt sowohl für Oligoribonucleotide als auch für Oligodesoxyribonucleotide (die gut bekannten Verfahren für die Synthese von DNA sind auch geeignet für die Synthese von RNA). Oligoribonucleotide und Oligodesoxyribonucleotide können auch enzymatisch hergestellt werden.

[0065] Die Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren. Jeder Typ von Nukleinsäure kann nachgewiesen werden und die Verfahren können verwendet werden für z.B. die Diagnose von Krankheit und Sequenzieren von Nukleinsäuren. Beispiele für Nukleinsäuren, die durch die Verfahren der Erfindung nachgewiesen werden können, umfassen Gene (z.B. ein Gen, das mit einer bestimmten Krankheit verknüpft ist), virale RNA und DNA, bakterielle DNA, Pilz- DNA, cDNA, mRNA, RNA und DNA-Fragmente, Oligonucleotide, synthetische Oligonucleotide, modifizierte Oligonucleotide, Einzelstrang- und Doppelstrang-Nukleinsäuren, natürliche und synthetische Nukleinsäuren, usw. Beispiele für die Verwendung der Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren umfassen: Die Diagnose und/oder das Monitoring von viralen Krankheiten (z.B. menschliche Immunschwächeviren, Hepatitisviren, Herpesviren, Cytomegaloviren und Epstein-Barr-Virus), bakterielle Krankheiten (z.B. Tuberkulose, Lyme-Krankheit, H. pylori, Escherichia coli-Infektionen, Legionelleninfektionen, Mycoplasma-Infektionen, Salmonellen-Infektionen), sexuell übertragbare Krankheiten (z.B. Gonorrhöe), Erbkrankheiten (z.B. Mukoviscidose, Duchene muskelDystrophie, Phenylketonurie, Sichelzellenanämie) und Krebs (z.B. Gene, die mit der Entwicklung von Krebs verknüpft sind); in Forensis; in der DANN-Sequenzierung; für Vaterschaftstests für Zelllinienauthentizität, zum Monitoring der Genthherapie; und für viele andere Zwecke.

[0066] Die Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, die auf dem Beobachten einer Farbänderung basieren, die mit dem bloßen Auge feststellbar ist, sind billig, schnell, einfach und robust (die Reagenzien sind stabil), erfordern keine speziellen oder teureren Apparaturen und erfordern keine Messtechnik. Dies macht sie besonders geeignet für die Verwendung z.B. in Forschungs- und analytischen Laboratorien, zum DNA-Sequenzieren, auf dem Gebiet des Nachweises der Anwesenheit von spezifischen Pathogenen, in der Arztpraxis für die Schnellidentifikation einer Infektion zur Unterstützung bei der Medikamentenverordnung und in Heimen und Gesundheitszentren für das erste günstige Screening.

[0067] Die Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll, kann durch bekannte Verfahren isoliert werden, oder kann direkt in Zellen, GewebeSonden, biologischen Flüssigkeiten (z.B. Speichel, Urin, Blut, Serum), Lösungen die PCR-Komponenten enthalten, Lösungen die einen großen Überschuss an Oligonucleotiden und hochmolekulargewichtige DNA enthalten, und andere Sonden nachgewiesen werden, wie im Stand der Technik bekannt. Siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. Ausg. 1989) und B.D. Hames und S.J. Higgins, Eds., Gene Sonden 1 (IRL Press, New York, 1995). Verfahren zur Herstellung von Nukleinsäuren zum Nachweis mit hybridisierenden Sonden sind im Stand der Technik bekannt. Siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. Ausg. 1989) und B.D. Hames und S.J. Higgins, Eds., Gene Sonden 1 (IRL Press, New York, 1995).

[0068] Wenn eine Nukleinsäure in einer geringen Menge vorhanden ist, kann sie amphifiziert werden mit Verfahren, wie sie aus dem Stand der Technik bekannt sind. Siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. Ausg. 1989) und B.D. Hames und S.J. Higgins, Eds., Gene Sonden 1 (IRL Press, New York, 1995). Bevorzugt ist die Amphifizierung mit Polymerasekettenreaktion (PCR).

[0069] Ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäure entsprechend der Erfindung umfasst, dass eine Nukleinsäure mit einem oder mehreren Typen von Nanopartikeln, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind in Kontakt gebracht wird. Die Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll, hat mindestens zwei Bereiche. Die Länge dieser Bereiche und des Abstandes/der Abstände, wenn überhaupt, zwischen ihnen, sind so gewählt, dass dann wenn die Oligonucleotide auf den Nanopartikeln mit den Nukleinsäuren hybridisieren, eine nachweisbare Änderung auftritt. Diese Längen und Abstände können empirisch bestimmt werden und hängen ab von dem Typ von Partikel, der verwendet wird, und seiner Größe und des Typs von Elektrolyt, die in der Lösung die in der Untersuchung verwendet wird (bestimmte Elektrolyte beeinflussen die Konformation von Nukleinsäuren) vorliegen wird.

[0070] Auch wenn eine Nukleinsäure in Anwesenheit anderer Nukleinsäuren nachgewiesen werden soll, müssen die Bereiche der Nukleinsäure, an die die Oligonucleotide auf den Nanopartikeln gebunden werden sollen, so ausgewählt werden, dass sie eine ausreichende, einzigartige Sequenz enthalten, so dass der Nachweis der Nukleinsäure spezifisch sein wird. Anleitungen dazu sind aus dem Stand der Technik bekannt.

[0071] Obwohl Nukleinsäuren sich wiederholende Sequenzen nahe genug zueinander enthalten können, so dass nur ein Typ von Oligonucleotid-Nanopartikelkonjugat verwendet werden muss, tritt dies nur selten auf. Im Allgemeinen werden die ausgewählten Bereiche der Nukleinsäure unterschiedliche Sequenzen aufweisen und werden in Kontakt gebracht mit Nanopartikeln, die zwei oder mehrere unterschiedliche Oligonucleotide tragen, die bevorzugt an den unterschiedlichen Nanopartikeln anhaften. Ein Beispiel eines Systems zum Nachweis von Nukleinsäure ist in [Fig. 2](#) gezeigt. Wie zu sehen ist, hat ein erstes Oligonucleotid, das an einen ersten Nanopartikel angeheftet ist, eine Sequenz, die zu einem ersten Bereich der Zielsequenz in der einsträngigen DNA

komplementär ist. Ein zweites Oligonucleotid, das an einem zweiten Nanopartikel angeheftet ist, hat eine Sequenz, die zu einem zweiten Bereich der Zielsequenz in der DNA komplementär ist. Zusätzliche Bereiche der DNA können auf die korrespondierenden Nanopartikel ausgerichtet sein. Siehe **Fig. 17**. Das gezielte Ansteuern mehrerer Bereiche einer Nukleinsäure vergrößert das Ausmaß der nachweisbaren Änderung.

[0072] Der Kontakt der Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate mit der Nukleinsäure wird unter Bedingungen ausgeführt, die wirksam sind für die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln mit der Zielsequenz/den Zielsequenzen der Nukleinsäure. Diese Hybridisierungsbedingungen sind aus dem Stand der Technik bekannt und können leicht optimiert werden für das jeweils angewendete System. Siehe z.B. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2. Ausg. 1989). Bevorzugt werden stringente Hybridisierungsbedingungen angewendet.

[0073] Eine schnellere Hybridisierung kann erhalten werden durch Einfrieren und Auftauen einer Lösung, die die Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll und die Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate enthält. Die Lösung kann auf jede konventionelle Weise eingefroren werden, wie z.B. das Einbringen in ein Trockeneis-Alkoholbad für eine ausreichende Zeit, um die Lösung einzufrieren (im Allgemeinen etwa 1 Minute für 100 µL Lösung). Die Lösung muss aufgetaut werden bei einer Temperatur unterhalb der thermischen Denaturierungstemperatur, die geeigneterweise für die meisten Kombinationen von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten und Nukleinsäuren Raumtemperatur sein kann. Die Hybridisierung ist abgeschlossen und die nachweisbare Änderung kann nach dem Auftauen der Lösung beobachtet werden.

[0074] Die Hybridisierungsrate kann ebenfalls erhöht werden durch Erwärmen der Lösung, die die Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll, und die Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate enthält, auf eine Temperatur unterhalb der Zersetzungstemperatur (T_m) für den Komplex, der zwischen Oligonucleotiden auf den Nanopartikeln und der Zielnukleinsäure gebildet ist. Alternativ kann eine schnelle Hybridisierung durch Erhitzen über die Zersetzungstemperatur (T_m) und Abkühlen der Lösung erzielt werden.

[0075] Die Hybridisierungsrate kann auch durch Erhöhung der Salzkonzentration (z.B. von 0,1 M auf 0,3 M NaCl) erhöht werden.

[0076] Die nachweisbare Änderung, die bei der Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln mit der Nukleinsäure auftritt, kann ein Farbwechsel sein, die Bildung von Aggregaten der Nanopartikel, oder die Ausfällung der aggregierten Nanopartikel. Die Farbänderung kann mit dem bloßen Auge oder spektroskopisch beobachtet werden. Die Bildung von Aggregaten der Nanopartikel kann durch Elektronenmikroskopie oder Nephelometrie beobachtet werden. Die Ausfällung der aggregierten Nanopartikel kann mit dem bloßen Auge oder mikroskopisch beobachtet werden. Bevorzugt sind Änderungen, die mit dem bloßen Auge beobachtbar sind. Besonders bevorzugt ist eine Farbänderung, die mit dem bloßen Auge beobachtbar ist.

[0077] Die Beobachtung einer Farbänderung mit dem bloßen Auge kann leichter ausgeführt werden gegen einen Hintergrund aus Kontrastfarbe. Z.B. ist, wenn Goldnanopartikel verwendet werden, die Beobachtung einer Farbänderung erleichtert durch Betupfen einer Sonde der Hybridisierungslösung auf eine feste, weiße Oberfläche (wie Silika- oder Aluminiumoxid DC-Platten, Filterpapier, Cellulosenitratmembranen, und Nylonmembranen, bevorzugt eine C-18 Silica DC-Platte) und Trockenlassen des Tupfens. Zunächst behält der Tupfen die Farbe der Hybridisierungslösung (die sich im Bereich von Pink/Rot bewegt, ohne Hybridisierung, bis Violett-Rot/Violett, wenn Hybridisierung stattfand). Beim Trocknen bei Raumtemperatur oder 80°C (Temperatur ist nicht kritisch), entwickelt sich ein blauer Tupfen, wenn die Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate vor dem Betupfen mit der Zielnukleinsäure durch Hybridisierung verbunden wurden. Ohne Hybridisierung (z.B. wenn keine Zielnukleinsäure anwesend ist), ist der Tupfen pink. Die blauen und pinkfarbigen Tupfen sind stabil und verändern sich nicht beim anschließenden Kühlen oder Erhitzen über die Zeit. Sie stellen einen geeigneten, dauerhaften Beleg des Tests dar. Keine anderen Schritte (wie eine Trennung der hybridisierten und unhybridisierten Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate) sind notwendig, um die Farbänderung zu beobachten.

[0078] Ein weiteres Verfahren, um die Untersuchungsergebnisse leicht zu visualisieren, könnte sein, eine Sonde von Nanopartikelsonde, die an eine Zielnukleinsäure hybridisiert sind auf ein Glasfaserfilter (z.B. Borsilikatmikrofaserfilter, 0,7 µm Porengröße, Grad FG75, zur Verwendung mit Goldnanopartikeln 13 nm in Größe), zu tupfen, während die Flüssigkeit durch den Filter gezogen wird. Nachfolgendes Spülen mit Wasser wäscht den Überschuss an nicht hybridisierter Sonde durch den Filter, während er den zu beobachtenden Tupfen zurücklässt, der die Aggregate, die durch die Hybridisierung der Nanopartikelsonden mit der Zielnukleinsäure entstanden sind (die zurückgehalten werden, weil diese Aggregate größer als die Poren des Filters sind), enthält. Diese Technik kann größere Empfindlichkeit bereitstellen, da ein Überschuss an Nanopartikelsonden ver-

wendet werden kann. Bedauerlicherweise kleben die Nanopartikelsonden auch an allen anderen festen Oberflächen, die versucht wurden (Silikatträger, Umkehrphasenplatten, und Nylon-, Nitrocellulose-, Cellulose- und andere Membranen), so dass die Glasfaserfilter die einzigen festen Oberflächen bisher sind, die bei solch einem Waschvorgang angewendet werden können.

[0079] Ein wichtiger Aspekt des Nachweissystems, das in [Fig. 2](#) dargestellt ist, ist, dass das Erhalten einer nachweisbaren Änderung von der kooperativen Hybridisierung von zwei unterschiedlichen Oligonucleotiden, mit einer gegebenen Zielsequenz in der Nukleinsäure abhängt. Fehlpaarungen bei einem der beiden Oligonucleotide destabilisieren die Zwischenpartikelverbindung. Es ist wohlbekannt, dass eine Fehlpaarung in der Basenpaarung einen größeren destabilisierenden Effekt auf die Bindung einer kurzen Oligonucleotidsonde hat, als auf die Bindung einer langen Oligonucleotidsonde. Der Vorteil des Systems, wie er in [Fig. 2](#) dargestellt ist, ist, dass dieses die Basendiskriminierung verwendet, die mit einer langen Zielsequenz und Sonde (18 Basenpaare in dem Beispiel, wie es in [Fig. 2](#) gezeigt ist) verknüpft ist, und trotzdem die Empfindlichkeitscharakteristik einer kurzen Oligonucleotidsonde (neun Basenpaare in dem Beispiel, wie es in [Fig. 2](#) gezeigt ist) hat.

[0080] Die Zielsequenz der Nukleinsäure kann durchgehend sein, wie in [Fig. 2](#), oder zwei Bereiche der Zielsequenz können durch einen dritten Bereich, der nicht komplementär ist zu den Oligonucleotiden auf den Nanopartikeln, getrennt sein, wie in [Fig. 3](#) gezeigt. Im letzteren Fall besteht die Option zur Verwendung eines Füllstoffoligonucleotids, das frei in Lösung ist und welches eine Sequenz aufweist, die komplementär ist zu der des dritten Bereiches (siehe [Fig. 3](#)). Wenn das Füllstoffoligonucleotid mit dem dritten Bereich der Nukleinsäure hybridisiert, wird ein doppelsträngiges Segment erzeugt, wobei sich der durchschnittliche Abstand zwischen den Nanopartikeln und folglich die Farbe ändert. Das System, das in [Fig. 3](#) gezeigt ist, kann die Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens erhöhen.

[0081] Einige Ausführungsformen des Verfahrens zum Nachweis von Nukleinsäure verwenden ein Substrat. Beim Verwenden eines Substrates kann die nachweisbare Änderung (das Signal) amphifiziert werden und die Empfindlichkeit der Untersuchung erhöht.

[0082] Jedes Substrat kann verwendet werden, das die Beobachtung der nachweisbaren Änderung erlaubt. Geeignete Substrate umfassen transparente feste Oberflächen (z.B. Glas, Quarz, Plastik und andere Polymere), opake feste Oberflächen (z.B. weiße feste Oberflächen, wie DC-Silikaplaten, Filterpapier, Glasfaserfilter, Cellulosenitratmembranen, Nylonmembranen), und leitende feste Oberflächen (z.B. Indium-Zinn-Oxid (ITO)). Das Substrat kann von jeglicher Form und Dicke sein, aber im Allgemeinen wird es flach und dünn sein. Bevorzugt sind transparente Substrate wie Glas (z.B. Glasträger) oder Plastik (z.B. Vertiefungen von Mikrotiterplatten).

[0083] In einer Ausführungsform sind Oligonucleotide an das Substrat angeheftet. Die Oligonucleotide können an die Substrate angeheftet werden, wie z.B. beschrieben in Chrisey et al., *Nucleic Acids Res.*, 24, 3031-3039 (1996); Crisey et al., *Nucleic Acids Res.*, 24, 3040-3047 (1996); Mucic et al., *Chem. Commun.*, 555 (1996); Zimmermann und Cox, *Nucleic Acids Res.*, 22, 492 (1994); Bottomley et al., *J. Vac. Sci. Technol. A*, 10, 591 (1992); und Hegner et al., *FEBS Lett.*, 336, 452 (1993).

[0084] Die Oligonucleotide, die an das Substrat angeheftet sind, haben eine Sequenz, die komplementär ist zu einem ersten Bereich der Sequenz der Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll. Die Nukleinsäure wird mit dem Substrat unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf dem Substrat mit der Nukleinsäure zu erlauben. Auf diese Weise wird die Nukleinsäure an das Substrat gebunden. Bevorzugt wird ungebundene Nukleinsäure von dem Substrat abgewaschen, bevor Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate zugegeben werden.

[0085] Als Nächstes wird die Nukleinsäure, die an das Substrat gebunden ist, mit einem ersten Typ von Nanopartikel, der Oligonucleotide aufweist, die daran angeheftet sind, in Kontakt gebracht. Die Oligonucleotide haben eine Sequenz, die komplementär ist zu einem zweiten Bereich der Sequenz der Nukleinsäure und der Kontakt wird unter Bedingungen ausgeführt, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln mit der Nukleinsäure zu erlauben. Auf diese Weise wird der erste Typ von Nanopartikeln an das Substrat gebunden. Nachdem die Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate an das Substrat gebunden sind, wird das Substrat gewaschen, um jedes ungebundene Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugat und Nukleinsäure zu entfernen.

[0086] Die Oligonucleotide auf dem ersten Typ von Nanopartikeln können alle dieselbe Sequenz haben oder können unterschiedliche Sequenzen haben, die mit unterschiedlichen Bereichen der Nukleinsäure, die nach-

gewiesen werden soll, hybridisieren. Wenn Oligonucleotide verwendet werden, die unterschiedliche Sequenzen haben, kann jeder Nanopartikel jedes der unterschiedlichen Oligonucleotide daran angeheftet haben oder bevorzugt, sind die unterschiedlichen Oligonucleotide an unterschiedliche Nanopartikel angeheftet. **Fig. 17** zeigt die Verwendung von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten, die erstellt wurden, um mit vielfachen Bereichen einer Nukleinsäure zu hybridisieren.

[0087] Schließlich wird der erste Typ von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten, die an das Substrat gebunden ist, mit einem zweiten Typ von Nanopartikeln in Kontakt gebracht, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind. Diese Oligonucleotide haben eine Sequenz, die komplementär ist zu mindestens einem Bereich der Sequenz/der Sequenzen der Oligonucleotide, die an den ersten Typ von Nanopartikeln angeheftet sind, und der Kontakt wird unter Bedingungen ausgeführt, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf dem ersten Typ von Nanopartikeln mit solchen auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln zu erlauben. Nachdem die Nanopartikel gebunden sind, wird das Substrat vorzugsweise gewaschen, um jedes ungebundene Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugat zu entfernen.

[0088] Die Kombination von Hybridisierungen erzeugt eine nachweisbare Änderung. Die nachweisbaren Änderungen sind dieselben wie jene weiter oben beschriebenen, mit der Ausnahme, dass die vielfachen Hybridisierungsergebnisse zu einer Amplifikation der nachweisbaren Änderung führen. Insbesondere kann, da jeder der ersten Typen von Nanopartikeln vielfache Oligonucleotide aufweist (die dieselbe oder unterschiedliche Sequenzen haben), die daran angeheftet sind, jede der ersten Typen von Nanopartikel-Oligonucleotide mit einer Vielzahl von zweitem Typ von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten hybridisieren. Auch kann der erste Typ von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten mit mehr als einem Bereich der Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll, hybridisieren. Die Amplifikation, die durch die vielfache Hybridisierung geschaffen wird, kann die Änderung zum ersten Mal erfassbar machen oder kann das Ausmaß an nachweisbarer Änderung erhöhen. Diese Amplifikation erhöht die Empfindlichkeit der Untersuchung, was den Nachweis von kleinen Mengen an Nukleinsäure erlaubt.

[0089] Wenn gewünscht, können zusätzliche Schichten von Nanopartikeln aufgebaut werden, durch sukzessive Addition der ersten und zweiten Typen von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten. Auf diese Weise kann die Anzahl an Nanopartikeln, die pro Mol Zielnukleinsäure immobilisiert ist, weiter erhöht werden, mit einer entsprechenden Erhöhung der Intensität des Signals.

[0090] Auch können an Stelle der Verwendung eines ersten und zweiten Typs von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten, die dazu erzeugt wurden, direkt miteinander zu hybridisieren, Nanopartikel, die Oligonucleotide tragen, die dazu dienen, die Nanopartikel zusammen als eine Folge der Hybridisierung mit bindenden Oligonucleotiden zu binden, verwendet werden.

[0091] Verfahren zur Herstellung der Nanopartikel und der Oligonucleotide und zum Anheften der Oligonucleotide an die Nanopartikel sind oben beschrieben. Die Hybridisierungsbedingungen sind aus dem Stand der Technik bekannt und können leicht für das einzelne angewendete System optimiert werden (siehe oben).

[0092] Ein Beispiel für dieses Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäure (Analyt-DNA) ist in [Fig. 13A](#) gezeigt. Die Kombination von Hybridisierungen erzeugt dunkle Bereiche, wo Nanopartikelaggregate mit dem Substrat durch Analyt-DNA verbunden sind. Diese dunklen Bereiche können leicht mit dem bloßen Auge beobachtet werden, unter Verwendung von Raumlicht, bevorzugt durch Betrachten des Substrats gegen einen weißen Hintergrund. Wie aus [Fig. 13A](#) leicht zu entnehmen ist, stellt dieses Verfahren Mittel zur Amplifikation einer nachweisbaren Änderung bereit.

[0093] In einer weiteren Ausführungsform werden die Nanopartikel an das Substrat angeheftet. Nanopartikel können an Substrate angeheftet werden, wie z.B. beschrieben in Grabar et al., *Analyt. Chem.*, 67, 73-743 (1995); Bethell et al., *J. Electroanal. Chem.*, 409, 137 (1996); Bar et al., *Langmuir*, 12, 1172 (1996); Colvin et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 5221 (1992).

[0094] Nachdem die Nanopartikel an das Substrat angeheftet sind, werden die Oligonucleotide an die Nanopartikel angeheftet. Dies kann auf dieselbe Weise ausgeführt werden, wie oben für das Anheften der Oligonucleotide an Nanopartikel in Lösung beschrieben. Die Oligonucleotide, die an die Nanopartikel angeheftet sind, haben eine Sequenz, die komplementär ist zu einem ersten Bereich der Sequenz einer Nukleinsäure.

[0095] Das Substrat wird unter Bedingungen mit der Nukleinsäure in Kontakt gebracht, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln mit der Nukleinsäure zu erlauben. Auf diese Weise

wird die Nukleinsäure an das Substrat gebunden. Ungebundene Nukleinsäure wird bevorzugt von dem Substrat abgewaschen, bevor weitere Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate zugefügt werden.

[0096] Dann wird ein zweiter Typ von Nanopartikeln, der Oligonucleotide aufweist, die daran angeheftet sind, bereitgestellt. Diese Oligonucleotide haben eine Sequenz, die komplementär ist zu einem zweiten Bereich der Sequenz der Nukleinsäure und die Nukleinsäure, die an das Substrat gebunden ist, wird unter Bedingungen mit dem zweiten Typ von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten in Kontakt gebracht, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugat mit der Nukleinsäure zu erlauben. Auf diese Weise wird der zweite Typ von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten an das Substrat gebunden. Nachdem die Nanopartikel gebunden sind, wird jedes ungebundene Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugat und jede Nukleinsäure von dem Substrat abgewaschen. Eine Änderung (z.B. Farbänderung) kann an diesem Punkt nachweisbar sein.

[0097] Die Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln können alle dieselbe Sequenz aufweisen oder können unterschiedliche Sequenzen aufweisen, die mit unterschiedlichen Bereichen der Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll, hybridisieren. Wenn Oligonucleotide verwendet werden, die unterschiedliche Sequenzen aufweisen, kann jeder Nanopartikel alle unterschiedlichen Oligonucleotide daran angeheftet haben oder, bevorzugt, können die unterschiedlichen Oligonucleotide an unterschiedliche Nanopartikel angeheftet sein. Siehe **Fig. 17**.

[0098] Als Nächstes wird ein bindendes Oligonucleotid, das eine ausgewählte Sequenz hat, die mindestens zwei Bereiche umfasst, wobei der erste Bereich komplementär ist zu mindestens einem Bereich der Sequenz der Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln, in Kontakt gebracht mit dem zweiten Typ von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten, die an das Substrat unter Bedingungen gebunden sind, die wirksam sind, um die Hybridisierung des bindenden Oligonucleotids mit den Oligonucleotiden auf den Nanopartikeln zu erlauben. Auf diese Weise, wird das bindende Oligonucleotid an das Substrat gebunden. Nachdem die bindenden Oligonucleotide gebunden sind, werden die ungebundenen Bindeoligonucleotide von dem Substrat abgewaschen.

[0099] Schließlich wird ein dritter Typ von Nanopartikeln, der Oligonucleotide aufweist, die daran angeheftet sind, bereitgestellt. Die Oligonucleotide haben eine Sequenz, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereichs des bindenden Oligonucleotids. Die Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate werden unter Bedingungen mit dem bindenden Oligonucleotid, das an das Substrat gebunden ist, in Kontakt gebracht, die wirksam sind, die Hybridisierung des bindenden Oligonucleotids mit den Oligonucleotiden auf den Nanopartikeln zu erlauben. Nachdem die Nanopartikel gebunden sind, werden ungebundene Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate von dem Substrat abgewaschen.

[0100] Die Kombination von Hybridisierungen erzeugt eine nachweisbare Änderung. Die nachweisbaren Änderungen sind dieselben wie jene, die oben beschrieben sind, mit der Ausnahme, dass die vielfachen Hybridisierungen zu einer Amplifikation der nachweisbaren Änderung führen. Insbesondere, da jeder des zweiten Typs von Nanopartikeln vielfache Oligonucleotide (die dieselben oder unterschiedliche Sequenzen aufweisen) aufweisen, die daran angeheftet sind, wobei jedes des zweiten Typs von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten mit einer Vielzahl eines dritten Typs von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten (durch das Bindungsoligonucleotid) hybridisiert werden kann. Auch kann der zweite Typ von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten mit mehr als einem Bereich der Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll, hybridisiert werden. Die Amplifikation, die durch die vielfache Hybridisierung bereitgestellt wird, kann die Änderung zum ersten Mal erfassbar machen oder kann das Ausmaß der nachweisbaren Änderung erhöhen. Die Amplifikation erhöht die Empfindlichkeit der Untersuchung, wodurch kleine Mengen an Nukleinsäure nachgewiesen werden können.

[0101] Wenn gewünscht, können zusätzliche Schichten von Nanopartikeln durch sukzessive Addition der bindenden Oligonucleotide und zweiter und dritter Typen von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten aufgebaut werden. Auf diese Weise können die Nanopartikel, die pro Molekül an Zielnukleinsäure immobilisiert sind, weiter erhöht werden mit einer entsprechenden Erhöhung der Intensität des Signals.

[0102] Auch kann die Verwendung des Bindeoligonucleotids eliminiert werden, und die zweiten und dritten Typen von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten können so erstellt werden, dass sie direkt miteinander hybridisieren.

[0103] Verfahren zum Herstellen von Nanopartikeln und der Oligonucleotide und zum Anheften der Oligonucleotide an die Nanopartikel sind oben beschrieben. Die Hybridisierungsbedingungen sind aus dem Stand der

Technik bekannt und können leicht für das jeweils angewendete System (siehe oben) optimiert werden.

[0104] Ein Beispiel für dieses Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäure (Analyt-DNA) ist in [Fig. 13B](#) gezeigt. Die Kombination von Hybridisierungen erzeugt dunkle Bereiche, wo Nanopartikelaggregate an das Substrat über Analyt-DNA gebunden sind. Diese dunklen Bereiche können leicht mit dem bloßen Auge wie oben beschrieben beobachtet werden. Wie aus [Fig. 13B](#) ersichtlich ist, stellt diese Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung ein weiteres Mittel zur Amplifikation der nachweisbaren Änderung bereit.

[0105] Ein weiteres Amplifikationsschema wendet Liposomen an. In diesem Schema, sind Oligonucleotide an ein Substrat angeheftet. Geeignete Substrate sind jene wie oben beschrieben, und die Oligonucleotide können an die Substrate wie oben beschrieben angeheftet werden. Z.B. kann, wenn das Substrat Glas ist, dies erreicht werden durch Kondensieren der Oligonucleotide über Phosphoryl- oder Carbonsäuregruppen an Aminoalkylgruppen auf der Substratoberfläche (zur dazugehörigen Chemie siehe Grabar et al., Anal. Chem., 67, 735-743 (1995)).

[0106] Die Oligonucleotide, die an das Substrat angeheftet sind, haben eine Sequenz, die komplementär ist zu einem ersten Bereich der Sequenz der Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll. Die Nukleinsäure wird unter Bedingungen mit dem Substrat in Kontakt gebracht, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf dem Substrat mit der Nukleinsäure zu erlauben. Auf diese Weise wird die Nukleinsäure an das Substrat gebunden. Jede ungebundene Nukleinsäure wird vorzugsweise von dem Substrat abgewaschen, bevor zusätzliche Komponenten dem System zugeführt werden.

[0107] Als Nächstes wird die Nukleinsäure, die an das Substrat gebunden ist, mit den Liposomen, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, in Kontakt gebracht. Die Oligonucleotide weisen eine Sequenz auf, die komplementär ist zu einem zweiten Bereich der Sequenz der Nukleinsäure und der Kontakt wird durchgeführt unter Bedingungen, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Liposomen mit der Nukleinsäure zu erlauben. Auf diese Weise werden die Liposomen an das Substrat gebunden. Nachdem die Liposomen an das Substrat gebunden sind, wird das Substrat gewaschen, um alle ungebundenen Liposomen und Nukleinsäuren zu entfernen.

[0108] Die Oligonucleotide auf den Liposomen können alle dieselbe Sequenz haben oder können unterschiedliche Sequenzen haben, die mit unterschiedlichen Bereichen der Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll, hybridisieren. Wenn Oligonucleotide verwendet werden, die unterschiedliche Sequenzen haben, können an jedes Liposom alle unterschiedlichen Oligonucleotide gebunden sein oder die unterschiedlichen Oligonucleotide können an unterschiedliche Liposomen angeheftet sein.

[0109] Um Oligonucleotid-Liposomkonjugate herzustellen, sind die Oligonucleotide an eine hydrophobe Gruppe, wie Cholesteryl (siehe Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc., 115, 7535-7536 (1993)) gebunden, und die hydrophoben Oligonucleotidkonjugate werden mit einer Lösung von Liposomen gemischt, um Liposomen, bei denen hydrophobe Oligonucleotidkonjugate in der Membran verankert sind (siehe Zhang et al., Tetrahedron Lett., 37, 6243-6246 (1996)), zu bilden. Die Beladung der hydrophoben Oligonucleotidkonjugate auf der Oberfläche der Liposomen kann kontrolliert werden indem das Verhältnis an hydrophoben Oligonucleotidkonjugaten zu Liposomen in der Mischung kontrolliert wird. Es wurde beobachtet, dass Liposomen, die Oligonucleotide tragen, die durch hydrophobe Wechselwirkung der angehängten Cholesterylgruppen angeheftet sind, wirksam sind, um Polynucleotide, die auf einer Nitrocellulosemembran (Id.) immobilisiert sind gezielt anzusteuern. Fluoreszierende Gruppen, die mit der Membran der Liposomen verankert sind, wurden als Reportergruppe verwendet. Sie waren wirksam, aber ihre Empfindlichkeit war durch die Tatsache beschränkt, dass das Signal von Fluorescein im Bereich hoher lokaler Konzentration (z.B. auf die Liposomoberfläche) durch Selbstlöschung abgeschwächt wurde.

[0110] Die Liposomen werden hergestellt durch Verfahren, wie sie aus dem Stand der Technik bekannt sind. Siehe Zhang et al., Tetrahedron Lett., 37, 6243 (1996). Die Liposomen haben im Allgemeinen eine Größe, die 5-50 Mal der Größe (Durchmesser) der Nanopartikel entspricht, die in nachfolgenden Schritten verwendet werden. Z.B. werden, für Nanopartikel mit etwa 13 nm im Durchmesser, Liposomen mit etwa 100 nm im Durchmesser bevorzugt verwendet.

[0111] Die Liposomen, die an das Substrat gebunden werden, werden mit einem ersten Typ an Nanopartikeln in Kontakt gebracht, der mindestens einen ersten Typ an Oligonucleotiden aufweist, die daran angeheftet sind. Der erste Typ an Oligonucleotiden hat eine hydrophobe Gruppe, die an das Ende angeheftet ist, das nicht an die Nanopartikel angeheftet ist, und der Kontakt wird unter Bedingungen ausgeführt, die wirksam sind, das An-

heften der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln an die Liposomen als Ergebnis hydrophober Wechselwirkungen, zu erlauben. Eine nachweisbare Änderung kann an diesem Punkt beobachtbar sein.

[0112] Das Verfahren kann ferner den Kontakt des ersten Typs von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten, die an Liposomen gebunden sind, mit einem zweiten Typ von Nanopartikeln, der Oligonucleotide aufweist, die daran angeheftet sind, umfassen. Der erste Typ an Nanopartikeln weist einen zweiten Typ an Oligonucleotiden auf, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu mindestens einem Bereich der Sequenz der Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln, und die Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln haben eine Sequenz, die komplementär ist mit mindestens einem Bereich der Sequenz des zweiten Typs von Oligonucleotiden auf dem ersten Typ von Nanopartikeln. Der Kontakt wird unter Bedingungen ausgeführt, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf dem ersten und zweiten Typ von Nanopartikeln zu erlauben. Die Hybridisierung wird im Allgemeinen bei milden Temperaturen (z.B. 5°C bis 60°C) ausgeführt, so werden Bedingungen angewendet (z.B. 0,3-1,0 M NaCl), die direkt zur Hybridisierung bei Raumtemperatur führen. Im Anschluss an die Hybridisierung werden ungebundene Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate von dem Substrat abgewaschen.

[0113] Die Kombination von Hybridisierungen erzeugt eine nachweisbare Änderung. Die nachweisbaren Änderungen sind dieselben wie jene, die oben beschrieben sind, mit Ausnahme dass die vielfachen Hybridisierungen zu einer Amplifikation der nachweisbaren Änderung führen. Insbesondere kann, da jedes der Liposomen vielfache Oligonucleotide (die dieselben oder unterschiedliche Sequenzen haben) daran angeheftet aufweist, jedes der Liposomen mit einer Vielzahl des ersten Typs von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten hybridisieren. Ebenso kann, da jeder des ersten Typs von Nanopartikeln eine Vielzahl von Oligonucleotiden aufweist, die daran angeheftet sind, jeder erste Typ an Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten mit einer Vielzahl des zweiten Typs von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten hybridisieren. Auch können die Liposomen mit mehr als einem Bereich der Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll, hybridisieren. Die Amplifikation, die durch die vielfachen Hybridisierungen bereitgestellt wird, kann Änderungen zum ersten Mal erfassbar machen, oder kann das Ausmaß der nachweisbaren Änderung erhöhen. Die Amplifikation erhöht die Empfindlichkeit der Untersuchung, was den Nachweis von kleinen Mengen an Nukleinsäure erlaubt.

[0114] Wenn gewünscht, können zusätzliche Schichten von Nanopartikeln durch sukzessive Addition der ersten und zweiten Typen von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten aufgebaut werden. Auf diese Weise wird die Anzahl der Nanopartikel, die pro Mol Zielnukleinsäure immobilisiert ist, weiter erhöht, mit einer entsprechenden Erhöhung der Intensität des Signals. Eine weitere Verbesserung kann auch durch Anwendung von Silberanfärbung von Goldnanopartikeln (Bassell, et al., J. Cell Biol., 126, 863-876 (1994); Braun-Howland et al., Biotechniques, 13, 928-931 (1992)) erhalten werden.

[0115] Anstatt der Verwendung von zweiten und dritten Typen von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten, die vorgegeben sind, um direkt miteinander zu hybridisieren, können auch Nanopartikel, die Oligonucleotide tragen, die dazu dienen würden, die Nanopartikel als Konsequenz der Hybridisierung mit Bindeoligonucleotiden zusammenzubringen, verwendet werden.

[0116] Verfahren zum Herstellen der Nanopartikel und der Oligonucleotide und zum Anheften der Oligonucleotide an die Nanopartikel sind oben beschrieben. Eine Mischung von Oligonucleotiden, die an einem Ende zur Bindung an die Nanopartikel funktionalisiert sind, und mit oder ohne eine hydrophobe Gruppe an dem anderen Ende kann auf dem ersten Typ von Nanopartikeln verwendet werden. Das Relativverhältnis dieser Oligonucleotide, die an das Durchschnittsnanopartikel gebunden sind, kann kontrolliert werden durch das Verhältnis der Konzentrationen der zwei Oligonucleotide in der Mischung. Die Hybridisierungsbedingungen sind aus dem Stand der Technik bekannt und können leicht für das jeweils angewendete System (siehe oben) optimiert werden.

[0117] Ein Beispiel für dieses Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäure ist in [Fig. 18](#) gezeigt. Die Hybridisierung des ersten Typs von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten an die Liposomen kann eine nachweisbare Änderung erzeugen. In dem Fall von Goldnanopartikeln kann eine Rosa/rote Farbe beobachtet werden, oder eine violette/blauere Farbe, wenn die Nanopartikel nahe genug beisammen liegen. Die Hybridisierung des zweiten Typs von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten mit dem ersten Typ von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten erzeugt eine nachweisbare Änderung. Im Fall von Goldnanopartikeln wird eine violette/blauere Farbe beobachtet. All diese Farbänderungen können mit dem bloßen Auge beobachtet werden.

[0118] Wenn ein Substrat verwendet wird, kann eine Vielzahl von Grundtypen von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten oder Oligonucleotiden an das Substrat in einer Matrix zum Nachweis vielfacher Bereiche einer

Zielnukleinsäure angeheftet werden, um viele unterschiedliche Nukleinsäuren nachzuweisen, oder beides. Z.B. kann ein Substrat bereitgestellt werden mit Reihen von Tupfen, wobei jeder Tupfen einen anderen Typ von Oligonucleotid oder Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugat enthält, der das an einem Bereich einer Zielnukleinsäure binden soll. Eine Sonde, die eine oder mehrere Nukleinsäuren enthält, wird auf jeden Tupfen aufgebracht, und die übrige Untersuchung wird nach einem der Wege, wie oben beschrieben, unter Verwendung von entsprechenden Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten, Oligonucleotid-Liposomkonjugaten und Bindeoligonucleotiden, ausgeführt.

[0119] In **Fig. 17**, Teil IV und V ist ein Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugat dargestellt, das in einer Untersuchung für jede Nukleinsäure verwendet werden kann. Diese "Universalsonde" hat Oligonucleotide einer einzelnen Sequenz, die daran angeheftet sind. Diese Oligonucleotide können hybridisieren mit einem bindenden Oligonucleotid, das eine Sequenz aufweist, die mindestens zwei Bereiche umfasst. Der erste Bereich ist komplementär zu mindestens einem Bereich der Sequenz der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln. Der zweite Bereich ist komplementär zu einem Bereich der Sequenz der Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll. Eine Vielzahl an bindenden Oligonucleotiden, die denselben ersten Bereich und unterschiedliche zweite Bereiche aufweisen, kann verwendet werden, wobei in jedem Fall die "Universalsonde", nach Hybridisierung mit den bindenden Oligonucleotiden, an viele Bereiche der Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll oder an unterschiedliche Nukleinsäuretargets binden kann.

[0120] In einer weiteren Ausführungsform können Oligonucleotide, die an Metall- und Halbleiternanopartikel angeheftet sind, ein fluoreszierendes Molekül aufweisen, das an das Ende angeheftet ist das nicht an die Nanopartikel angeheftet ist. Metall und Halbleiternanopartikel sind als Fluoreszenzlöscher bekannt, wobei das Ausmaß des Löscheffekts von dem Abstand zwischen den Nanopartikeln und dem Fluoreszenzmolekül abhängt. In dem unhybridisierten Zustand, Wechselwirken die Oligonucleotide, die an die Nanopartikel angeheftet sind, mit den Nanopartikeln, so dass eine signifikante Auslöschung beobachtet werden kann. Siehe **Fig. 20A**. Während der Hybridisierung mit einer Zielnukleinsäure wird das Fluoreszenzmolekül von den Nanopartikeln entfernt, was die Auslöschung der Fluoreszenz verringert. Siehe **Fig. 20A**. Längere Oligonucleotide führen zu größeren Änderungen in der Fluoreszenz, zumindest so lange, bis die Fluoreszenzgruppe weit genug von den Nanopartikeloberflächen entfernt ist, so dass eine Amplifikation der Änderung nicht länger beobachtet werden kann. Geeignete Längen der Oligonucleotide können empirisch bestimmt werden. Metallische und Halbleiternanopartikel, die Fluoreszenz-markierte Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, können in jedem Testformat verwendet werden, wie oben beschrieben, was auch solche umfasst, die in Lösung oder auf Substraten ausgeführt werden.

[0121] Verfahren zum Markieren von Oligonucleotiden mit Fluoreszenzmolekülen und Messen der Fluoreszenz sind im Stand der Technik bekannt. Geeignete Fluoreszenzmoleküle sind ebenfalls aus dem Stand der Technik bekannt und umfassen Fluoresceine, Rhodamine und Texasrot. Die Oligonucleotide werden an die Nanopartikel wie oben beschrieben angeheftet.

[0122] In einer weiteren Ausführungsform können zwei Typen von Fluoreszenz-markierten Oligonucleotiden, die an zwei unterschiedliche Partikel angeheftet sind, verwendet werden. Geeignete Partikel umfassen polymere Partikel, wie Polystyrolpartikel, Polyvinylpartikel, Acrylat- und Methacrylatpartikel, Glaspartikel, Latexpartikel, Sepharose-Kugeln und andere, wie Partikel die aus dem Stand der Technik bekannt sind. Verfahren zum Anheften von Oligonucleotiden an solche Partikel sind aus dem Stand der Technik bekannt. Insbesondere ist eine große Vielzahl an funktionellen Gruppen auf den Partikeln erhältlich, oder kann in solche Partikel eingebracht werden. Funktionelle Gruppen umfassen Carbonsäure, Aldehyde, Aminogruppen, Cyanogruppen, Ethylengruppen, Hydroxylgruppen, Mercaptogruppen und der gleichen. Nanopartikel, einschließlich metallische und Halbleiternanopartikel, können ebenso verwendet werden.

[0123] Die zwei Fluorophore werden als d und a für Donor und Akzeptor bezeichnet. Eine Vielzahl an Fluoreszenzmolekülen, die in solchen Kombinationen geeignet ist, ist aus dem Stand der Technik bekannt und erhältlich z.B. von Molecular Sondas. Eine attraktive Kombination ist Fluorescein als Donor und Texasrot als Akzeptor. Die zwei Typen von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten mit d und a daran angeheftet, werden mit der Zielnukleinsäure gemischt, und die Fluoreszenz in einem Fluorimeter gemessen. Die Mischung wird mit einem Licht derjenigen Wellenlänge angeregt, die d anregt, und die Mischung wird nach Fluoreszenz von a hin untersucht. Während der Hybridisierung, werden d und a angenähert (siehe **Fig. 20B**).

[0124] Im Fall von nichtmetallischen, Nichthalbleiterpartikeln, zeigt sich die Hybridisierung durch eine Verschiebung der Fluoreszenz für diejenige von d hin zu derjenigen von a oder durch das Auftreten von Fluoreszenz von a zusätzlich zu derjenigen von d. Ohne Hybridisierung liegen die Fluorophore zu weit auseinander

für die Energieübertragung, um signifikant zu sein und es wird nur die Fluoreszenz von d beobachtet.

[0125] Im Fall von metallischen und Halbleiternanopartikeln, zeigt ein Fehlen der Fluoreszenz das Fehlen der Hybridisierung an, da d oder a gelöscht sind (siehe oben). Die Hybridisierung zeigt sich durch eine Erhöhung der Fluoreszenz aufgrund von a.

[0126] Wie zu erkennen, können die oben beschriebenen Partikel und Nanopartikel, die Oligonucleotide aufweisen, die mit Akzeptor und Donor-Fluoreszenzmolekülen markiert sind und daran angeheftet sind, in den oben beschriebenen Testformaten verwendet werden, was auch diejenigen umfasst, die in Lösung und auf Substraten ausgeführt werden. Für Lösungsformate, werden die Oligonucleotidsequenzen bevorzugt so ausgewählt, dass sie an die Zielnukleinsäure binden, wie in **Fig. 15** gezeigt. In den Formaten, wie sie bereits in **Fig. 13A–B** und **Fig. 18** gezeigt sind, können die bindenden Oligonucleotide verwendet werden, um die Akzeptor- und Donorfluoreszenzmoleküle auf den zwei Nanopartikeln in unmittelbare Nähe zu bringen. Auch in dem in **Fig. 13A** gezeigten Format können die Oligonucleotide, die an Substrate angeheftet sind, mit d markiert werden. Ferner können im Allgemeinen andere Markierungen neben Fluoreszenzmolekülen verwendet werden, wie Chemilumineszenzmoleküle, die ein nachweisbares Signal ergeben oder eine Änderung eines nachweisbaren Signals bei Hybridisierung.

[0127] Die Erfindung stellt auch Kits für den Nachweis von Nukleinsäuren bereit. In einer Ausführungsform umfasst der Kit mindestens einen Behälter, wobei der Behälter mindestens zwei Typen von Nanopartikeln enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind. Die Oligonucleotide auf dem ersten Typ von Nanopartikeln haben eine Sequenz, die komplementär ist zu der Sequenz eines ersten Bereichs einer Nukleinsäure. Die Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln haben eine Sequenz, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereichs der Nukleinsäure. Der Behälter kann ferner Füllstoffoligonucleotide enthalten, die eine Sequenz aufweisen, die komplementär ist zu einem dritten Bereich der Nukleinsäure, wobei der dritte Bereich zwischen den ersten und zweiten Bereichen angeordnet ist. Das Füllstoffoligonucleotid kann auch in einem separaten Behälter bereitgestellt werden.

[0128] In einer zweiten Ausführungsform umfasst der Kit mindestens zwei Behälter. Der erste Behälter enthält Nanopartikel, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines ersten Bereichs einer Nukleinsäure. Der zweite Behälter enthält Nanopartikel, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereichs der Nukleinsäure. Der Kit kann ferner einen dritten Behälter umfassen, der ein Füllstoffoligonucleotid enthält, das eine Sequenz hat, die komplementär ist zu einem dritten Bereich der Nukleinsäure, wobei der dritte Bereich zwischen dem ersten und dem zweiten Bereich angeordnet ist.

[0129] In einer weiteren alternativen Ausführungsform können die Kits Oligonucleotide und Nanopartikel in unterschiedlichen Behältern aufweisen, und die Oligonucleotide sollten an die Nanopartikel angeheftet werden, bevor der Test zum Nachweis der Nukleinsäure ausgeführt wird. Die Oligonucleotide und/oder die Nanopartikel können funktionalisiert sein, so dass die Oligonucleotide an die Nanopartikel angeheftet werden können. Alternativ können die Oligonucleotide und/oder Nanopartikel in dem Kit ohne funktionelle Gruppen bereitgestellt werden, wobei diese in diesem Fall vor der Ausführung der Untersuchung funktionalisiert werden müssen.

[0130] In einer weiteren Ausführungsform umfasst der Kit mindestens einen Behälter. Der Behälter enthält metallische oder halbleitende Nanopartikel, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind. Die Oligonucleotide haben eine Sequenz, die komplementär ist zu einem Bereich einer Nukleinsäure und haben Fluoreszenzmoleküle, die an den Enden der Oligonucleotide angeheftet sind, die nicht an die Nanopartikeln angeheftet sind.

[0131] In einer weiteren Ausführungsform umfasst der Kit ein Substrat, wobei das Substrat Nanopartikel aufweist, die daran angeheftet sind. Die Nanopartikel weisen Oligonucleotide auf, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines ersten Bereichs einer Nukleinsäure. Der Kit enthält ferner einen ersten Behälter, der Nanopartikel enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereichs der Nukleinsäure. Die Oligonucleotide können dieselbe oder unterschiedliche Sequenzen haben, aber jedes der Oligonucleotide hat eine Sequenz, die komplementär ist zu einem Bereich der Nukleinsäure. Der Kit enthält ferner einen zweiten Behälter, der ein bindendes Oligonucleotid enthält, das eine ausgewählte Sequenz enthält, die mindestens zwei Bereiche umfasst, wobei der erste Bereich komplementär ist zu mindestens einem Bereich der Sequenz der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln in dem ersten Behälter. Der Kit umfasst ferner einen

dritten Behälter, der Nanopartikel enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, wobei die Oligonucleotide eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereichs des bindenden Oligonucleotids.

[0132] In einer weiteren Ausführungsform umfasst der Kit ein Substrat, das Oligonucleotide aufweist, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines ersten Bereichs einer Nukleinsäure. Der Kit enthält ferner einen ersten Behälter, der Nanopartikel enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereichs der Nukleinsäure. Die Oligonucleotide können dieselbe oder unterschiedliche Sequenzen haben, aber jedes der Oligonucleotide weist eine Sequenz auf, die komplementär ist zu einem Bereich der Nukleinsäure. Der Kit umfasst ferner einen zweiten Behälter, der Nanopartikel enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu mindestens einem Bereich der Oligonucleotide, die an die Nanopartikel in dem ersten Behälter angeheftet sind.

[0133] Bei einer weiteren Ausführungsform können die Kits Substrat, Oligonucleotide und Nanopartikel in getrennten Behältern enthalten. Das Substrat, die Oligonucleotide und Nanopartikel müssen entsprechend aneinander angeheftet werden, bevor die Untersuchung zum Nachweis einer Nukleinsäure ausgeführt wird. Das Substrat, die Oligonucleotide und/oder Nanopartikel können funktionalisiert sein, um das Anhaften zu ermöglichen. Alternativ kann das Substrat, die Oligonucleotide und/oder Nanopartikel ohne funktionelle Gruppen in einem Kit bereitgestellt werden, wobei sie in diesem Fall vor der Ausführung der Untersuchung funktionalisiert werden müssen.

[0134] In einer weiteren Ausführungsform kann der Kit ein Substrat enthalten, das Oligonucleotide aufweist, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines ersten Bereichs einer Nukleinsäure. Der Kit kann ferner einen ersten Behälter umfassen, der Liposomen enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind, und die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereichs der Nukleinsäure und einen zweiten Behälter, der Nanopartikel enthält, die mindestens einen ersten Typ von Oligonucleotiden aufweisen, die daran angeheftet sind, wobei der erste Typ von Oligonucleotiden eine Cholesterylgruppe aufweist, die an das Ende angeheftet ist das nicht an die Nanopartikel angeheftet ist, so dass die Nanopartikel an die Liposomen durch hydrophobe Interaktion angeheftet werden können. Der Kit kann ferner einen dritten Behälter umfassen, der einen zweiten Typ von Nanopartikeln enthält, der Oligonucleotide aufweist, die daran angeheftet sind, wobei die Oligonucleotide eine Sequenz haben, die komplementär ist zu mindestens einem Bereich der Sequenz eines zweiten Typs von Oligonucleotiden, die an den ersten Typ von Nanopartikeln angeheftet sind. Der zweite Typ von Oligonucleotiden, der an den ersten Typ von Nanopartikeln angeheftet ist, hat eine Sequenz, die komplementär ist zu der Sequenz der Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln.

[0135] In einer weiteren Ausführungsform kann der Kit einen ersten Behälter umfassen, der Nanopartikel enthält, die Oligonucleotide aufweisen, die daran angeheftet sind. Der Kit kann ferner einen oder mehrere zusätzliche Behälter umfassen, wobei jeder Behälter ein bindendes Oligonucleotid enthält. Jedes bindende Oligonucleotid weist einen ersten Bereich auf, der eine Sequenz hat, die komplementär zu mindestens einem Bereich der Sequenz der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln ist und einen zweiten Bereich, der eine Sequenz hat, die komplementär ist zu einer Sequenz eines Bereiches der Nukleinsäure, die nachgewiesen werden soll. Die Sequenzen des zweiten Bereichs der bindenden Oligonucleotide können unterschiedlich sein, solange jede Sequenz komplementär ist zu einem Bereich der Sequenz der Nukleinsäure, nicht nachgewiesen werden soll.

[0136] In einer weiteren Ausführungsform können die Kits einen oder zwei Behälter umfassen, die zwei Typen von Partikeln enthalten. Der erste Typ von Partikeln weist Oligonucleotide auf, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines ersten Bereichs einer Nukleinsäure. Die Oligonucleotide sind markiert mit einem Energiedonor an den Enden, die nicht an die Partikel angeheftet sind. Der zweite Typ von Partikeln weist Oligonucleotide auf, die daran angeheftet sind, die eine Sequenz haben, die komplementär ist zu der Sequenz eines zweiten Bereiches einer Nukleinsäure. Die Oligonucleotide sind markiert mit einem Energieakzeptor an den Enden, die nicht an die Partikel angeheftet sind. Die Energiedonoren und -Akzeptoren können fluoreszierende Moleküle sein.

[0137] Die Kits können auch andere Reagenzien enthalten und Mittel, die geeignet sind zum Nachweis von Nukleinsäure. Die Reagenzien können PCR-Reagenzien umfassen, Hybridisierungsreagenzien, Puffer, usw. Andere Mittel, die als Teil des Kits bereitgestellt werden, umfassen eine feste Oberfläche (zum Visualisieren der Hybridisierung), wie eine DC-Silicaplatte, Spritzen, Pipetten, Küvetten, Behälter und einen Durchlauferhitzer (zum Kontrollieren der Hybridisierungs- und Dehybridisierungstemperaturen).

[0138] Reagenzien für die Funktionalisierung der Nukleotide oder Nanopartikel können ebenfalls in dem Kit enthalten sein.

[0139] Die Ausfällung von aggregierten Nanopartikeln stellt ein Mittel zum Separieren einer ausgewählten Nukleinsäure von anderen Nukleinsäuren bereit. Diese Abtrennung kann als ein Schritt in der Aufreinigung der Nukleinsäure verwendet werden. Hybridisierungsbedingungen sind solche, wie oben beschrieben zum Nachweis einer Nukleinsäure. Wenn die Temperatur unter der T_m (der Temperatur bei der die Hälfte der Oligonucleotide an den komplementären Strang gebunden ist) für das Binden der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln an die Nukleinsäure liegt, so wird ausreichend Zeit benötigt, damit sich die Aggregate absetzen. Die Temperatur der Hybridisierung (z.B. gemessen durch T_m) variiert mit dem Typ von Salz (NaCl oder MgCl_2) und dessen Konzentration. Salzzusammensetzungen und Konzentrationen werden so ausgewählt, dass die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln mit der Nukleinsäure bei geeigneten Arbeitstemperaturen gefördert wird, ohne Aggregation der Kolloide in Abwesenheit der Nukleinsäure zu herbeizuführen.

[0140] Die Erfindung stellt ebenfalls ein Verfahren zur Nanoherstellung bereit. Das Verfahren umfasst, das Bereitstellen von mindestens einem Typ von Bindeoligonucleotid, das eine ausgewählte Sequenz hat. Ein Bindeoligonucleotid, das für die Nanoherstellung verwendet wird, kann jede gewünschte Sequenz haben und kann einsträngig oder doppelsträngig sein. Es kann ferner chemische Modifikationen in der Base, dem Zucker oder dem Rückgratabschnitt enthalten. Die Sequenzen, die für die Bindeoligonucleotide ausgewählt sind, und ihre Längen und Strängigkeit, tragen zur Steifigkeit oder Flexibilität des resultierenden Nanomaterials oder der Nanostruktur, oder eines Bereichs des Nanomaterials oder der Nanostruktur bei. Die Verwendung eines einzelnen Typs von Bindeoligonucleotid, sowie die Mischung von zwei oder mehreren unterschiedlichen Typen von Bindeoligonucleotiden ist in Erwägung zu ziehen. Die Anzahl von unterschiedlichen Bindeoligonucleotiden, die verwendet werden und ihre Längen tragen zu der Form, Porengrößen und anderen Struktureigenschaften der resultierenden Nanomaterialien oder Nanostrukturen bei.

[0141] Die Sequenz eines Bindeoligonucleotids wird mindestens einen ersten Bereich und einen zweiten Bereich zum Binden an die Oligonucleotide auf Nanopartikeln umfassen. Der erste, zweite oder weitere bindende Bereich des Bindeoligonucleotids kann die gleichen oder unterschiedlichen Sequenzen aufweisen.

[0142] Wenn alle Bindungsbereiche eines Bindeoligonucleotids dieselbe Sequenz aufweisen, braucht nur ein einzelner Typ von Nanopartikel mit Oligonucleotiden, die eine komplementäre Sequenz haben, die daran angeheftet ist, verwendet werden, um ein Nanomaterial oder eine Nanostruktur zu bilden. Wenn zwei oder mehr Bindungsbereiche eines Bindeoligonucleotids unterschiedliche Sequenzen aufweisen, dann müssen zwei oder mehr Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate verwendet werden. Siehe z.B. **Fig. 17**. Die Oligonucleotide auf jedem der Nanopartikel werden eine Sequenz haben, die komplementär ist zu einem der zwei oder mehrbindenden Bereiche der Sequenz des Bindeoligonucleotids. Die Anzahl, Sequenz/Sequenzen und Länge(n) der bindenden Bereiche und der Abstand/die Abstände, wenn überhaupt, zwischen ihnen, tragen zu den strukturellen und physikalischen Eigenschaften der resultierenden Nanomaterialien und Nanostrukturen bei. Natürlich müssen, wenn das Bindeoligonucleotid zwei oder mehr Bereiche umfasst, die Sequenzen der bindenden Bereiche so gewählt werden, dass sie nicht komplementär zueinander sind, um zu vermeiden, dass ein Bereich des Bindeoligonucleotids an den anderen Bereich bindet.

[0143] Die Bindeoligonucleotide und Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate werden miteinander unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide, die an die Nanopartikel angeheftet sind, mit den Bindeoligonucleotiden zu erlauben, so dass ein gewünschtes Nanomaterial oder eine Nanostruktur gebildet wird, wobei die Nanopartikel durch Oligonucleotidverbinder zusammengehalten werden. Diese Hybridisierungsbedingungen sind aus dem Stand der Technik bekannt und können für ein einzelnes Nanoherstellungsschema (siehe oben) optimiert werden. Stringente Hybridisierungsbedingungen sind bevorzugt.

[0144] Die Erfindung stellt ein weiteres Verfahren zur Nanoherstellung bereit. Dieses Verfahren umfasst die Bereitstellung von mindestens zwei Typen von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten. Die Oligonucleotide auf dem ersten Typ von Nanopartikeln haben eine Sequenz, die komplementär ist zu den Oligonucleotiden auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln. Die Oligonucleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln haben eine Sequenz, die komplementär ist zu derjenigen der Oligonucleotide auf dem ersten Typ von Nanopartikeln. Die Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate werden miteinander unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die wirksam sind, die Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln zueinander zu erlauben, so dass das gewünschte Nanomaterial oder die Nanostruktur gebildet wird, wobei die Nanopartikel durch Oligonucleotidverbinder zusammengehalten werden. Erneut sind diese Hybridisierungsbedingungen aus dem Stand der

Technik bekannt und können für die einzelnen Nanoherstellschemata optimiert werden.

[0145] In beiden Nanoherstellverfahren der Erfindung wird die Verwendung von Nanopartikeln, die einen oder mehrere unterschiedliche Typen von Oligonucleotiden aufweisen, die daran angeheftet sind, in Erwägung gezogen. Die Anzahl von unterschiedlichen Oligonucleotiden, die auf den Nanopartikeln angeheftet ist und die Längen und Sequenzen der einen oder mehreren Oligonucleotide, tragen zu der Steifigkeit und den strukturellen Eigenschaften der resultierenden Nanomaterialien und Nanostrukturen bei.

[0146] Auch die Größe, Form und chemische Zusammensetzung der Nanopartikel trägt zu den Eigenschaften der resultierenden Nanomaterialien und Nanostrukturen bei. Diese Eigenschaften umfassen optische Eigenschaften, optoelektronische Eigenschaften, Stabilität in unterschiedlichen Lösungen, Poren- und Kanalgrößenverteilung, die Fähigkeit bioaktive Moleküle zu trennen, während sie als Filter fungieren, etc. Die Verwendung von Mischungen von Nanopartikeln, die unterschiedliche Größen, Formen und/oder chemische Zusammensetzungen aufweisen, sowie die Verwendung von Nanopartikeln, die gleichförmige Größen, Formen und chemische Eigenschaften haben, wird in Erwägung gezogen.

[0147] In jedem Herstellungsverfahren werden die Nanopartikel in dem resultierenden Nanomaterial oder der Nanostruktur durch Oligonucleotidverbinder zusammengehalten. Die Sequenzen, Längen und Strängigkeit der Oligonucleotidverbinder, und die Anzahl von unterschiedlichen anwesenden Oligonucleotidbindern, trägt zu der Steifigkeit und den strukturellen Eigenschaften des Nanomaterials oder der Nanostruktur bei. Wenn ein Oligonucleotidverbinder teilweise doppelsträngig ist, kann seine Steifigkeit durch die Verwendung eines Füllstoffoligonucleotids wie oben, in Verbindung mit dem Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäure beschrieben erhöht werden. Die Steifigkeit eines komplett doppelsträngigen Oligonucleotidbinders kann durch die Verwendung von einem oder mehreren Amplifikationsoligonucleotiden erhöht werden, die komplementäre Sequenzen haben, so dass sie an die doppelsträngigen Oligonucleotidverbinder binden, um dreisträngige Oligonucleotidverbinder zu bilden. Die Verwendung von viersträngigen Oligonucleotidbindern, basierend auf Desoxyguanosin- oder Desoxycytidinquartetten, wird ebenfalls in Erwägung gezogen.

[0148] Mehrere von einer Vielzahl von Systemen zum Organisieren von Nanopartikeln, basierend auf Oligonucleotidhybridisierung, sind in den Figuren gezeigt. In einem einfachen System ([Fig. 1](#)) trägt ein Satz von Nanopartikeln Oligonucleotide mit einer definierten Sequenz und ein weiterer Satz von Nanopartikeln trägt Oligonucleotide mit einer komplementären Sequenz. Beim Mischen der zwei Sätze von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten unter Hybridisierungsbedingungen, werden die zwei Typen von Partikeln durch doppelsträngige Oligonucleotidverbinder verbunden, die als Abstandshalter dienen, um die Nanopartikel in ausgewählten Abständen zu halten.

[0149] Ein attraktives System zum Beabstanden von Nanopartikeln umfasst die Addition von einem frei bindenden Oligonucleotid, wie in [Fig. 2](#) gezeigt. Die Sequenz des Bindeoligonucleotids wird mindestens einen ersten Bereich und einen zweiten Bereich zur Bindung an Oligonucleotide auf Nanopartikeln aufweisen. Dieses System ist im Grunde dasselbe, wie es bei dem Nukleinsäureerfassungverfahren verwendet wird, mit der Ausnahme, dass die Länge der addierten Bindeoligonucleotide so ausgewählt werden kann, dass sie gleich der kombinierten Längen der Oligonucleotide ist, die an die Nanopartikel angeheftet sind. Das dazugehörige System, das in [Fig. 3](#) gezeigt ist, stellt geeignete Mittel bereit, um den Abstand zwischen Nanopartikeln zuzuschneiden, ohne die Sätze der Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate, die verwendet werden, ändern zu müssen.

[0150] Eine weitere Ausarbeitung des Schemas zum Herstellen definierter Abstände zwischen Nanopartikeln ist in [Fig. 4](#) gezeigt. In diesem Fall wird ein doppelsträngiges Segment von DNA oder RNA verwendet, das überhängende Enden als Bindeoligonucleotid enthält. Die Hybridisierung der einzelsträngigen, Überhangsegmente des Bindeoligonucleotids mit den Oligonucleotiden, die an die Nanopartikel angeheftet sind, liefert vielfache doppelsträngige Oligonucleotidquerverbindungen zwischen den Nanopartikeln.

[0151] Steifere Nanomaterialien und Nanostrukturen oder Bereiche davon können erzeugt werden durch Anwendung von dreisträngigen Oligonucleotidbindern zwischen den Nanopartikeln. Beim Bilden des Tripelstrangs, kann das Pyrimidin:Purin:Pyrimidin-Motiv (Moser, H.E. und Dervan, P.B. Science, 238, 645-650 (1987) oder das Purin:Purin:Pyrimidin-Motiv (Pilch, D.S. et al. Biochemistry, 30, 6081-6087 (1991) ausgenutzt werden. Ein Beispiel für die Organisation von Nanopartikeln durch Erzeugung von Tripelstrangverbindern durch das Pyrimidin:Purin:Pyrimidin-Motiv ist in [Fig. 10](#) gezeigt. In dem in [Fig. 10](#) gezeigten System ist ein Satz von Nanopartikeln mit einem definierten Strang konjugiert, der Pyrimidin-Nucleoside enthält, und die anderen Sätze sind mit einem komplementären Oligonucleotid konjugiert, das Purin-Nucleoside enthält. Das An-

heften der Oligonucleotide wird so erstellt, dass die Nanopartikel durch doppelsträngige Oligonucleotide, die durch Hybridisierung gebildet werden, getrennt werden. Dann wird ein freies Pyrimidin-Oligonucleotid mit einer zu dem Pyrimidinstrang, der an das Nanopartikel gebunden ist, entgegengesetzten Orientierung, zu dem System zugegeben, bevor, oder während oder direkt anschließend an das Mischen der Nanopartikel. Da der dritte Strang in diesem System durch Hoogsteen Basenpaarung gehalten wird, ist der Tripelstrang thermisch relativ instabil. Kovalente Brücken, die die Breite des Duplex überspannen, sind dafür bekannt, tripelsträngige Komplexe zu stabilisieren (Salunke, M., Wu, T., Letsinger, R.L., J. Am. Chem. Soc. 114, 8768-8772, (1992). Letsinger, R.L. und Wu, T. J. Am. Chem. Soc., 117, 7323-7328 (1995). Prakash, G. und Kool, J. Am. Chem. Soc., 114, 3523-3527 (1992).

[0152] Für das Erstellen von Nanomaterialien und Nanostrukturen kann es in einigen Fällen gewünscht sein, das Zusammenfügen an Ort und Stelle durch kovalente Querverbindungen nach Bildung des Nanomaterials oder der Nanostruktur durch Hybridisierung der Oligonucleotidkomponenten "zu verschließen". Dies kann erreicht werden durch das Einbringen von funktionellen Gruppen, die einer gesteuerten irreversiblen Reaktion in die Oligonucleotide unterzogen werden. Ein Beispiel für eine funktionelle Gruppe, für diesen Zweck, ist eine Stilbendicarboxamidgruppe. Es wurde gezeigt, dass zwei Stilbendicarboxamidgruppen, die innerhalb der hybridisierten Oligonucleotide ausgerichtet sind, leicht eine Querverbindung durch Belichtung mit ultravioletter Strahlung (340 nm) (Lewis, F.D. et al. (1995) J Am. Chem. Soc. 117, 8785-8792) eingehen.

[0153] Alternativ kann das Ersetzen einer 5'-O-Tosylgruppe von einem Oligonucleotid, die an der 3'-Position an ein Nanopartikel durch eine Mercaptoalkylgruppe gebunden ist, durch eine Thiophosphorylgruppe am 3'-Ende eines Oligonucleotids, das an einem Nanopartikel durch eine Mercaptoalkylgruppe gebunden ist, verwendet werden. In Anwesenheit eines Oligonucleotids, das zu beiden Oligonucleotiden hybridisiert und dabei die Thiophosphorylgruppe in die Nähe der Tosylgruppe bringt, wird die Tosylgruppe durch die Thiophosphorylgruppe ersetzt, was dazu führt, dass ein Oligonucleotid erzeugt wird, das an den Enden an zwei unterschiedliche Nanopartikel gebunden ist. Zu den Austauschreaktionen dieses Typs, siehe Herrlein et al., J. Am. Chem. Soc., 177, 10151-10152 (1995). Die Tatsache, dass Thiophosphoryloligonucleotide nicht mit Goldnanopartikeln unter Bedingungen reagieren, die beim Anheften von Mercaptoalkyl-Oligonucleotiden an Goldnanopartikel angewendet werden, ermöglicht es, Goldnanopartikel-Oligonucleotidkonjugate zu erzeugen, die durch die Mercaptogruppe in die Nanopartikel verankert sind, und eine endständige Thiophosphorylgruppe enthalten, die frei für die Kupplungsreaktion ist.

[0154] Eine entsprechende Kupplungsreaktion zum Verschließen des an Ort und Stelle zusammengefügteten Nanopartikelsystems, verwendet den Austausch von Bromid aus einem endständigen Bromacetylaminonucleosid durch ein endständiges Thiophosphoryl-Oligonucleotid, wie in Gryaznov und Letsinger, J. Am. Chem. Soc., 115, 3808, beschrieben. Diese Reaktion wird fortgeführt ähnlich dem Austausch von Tosylat, wie oben beschrieben, mit der Ausnahme, dass die Reaktion schneller verläuft. Nanopartikel, die Oligonucleotide tragen, die mit Thiophosphorylgruppen terminiert sind, werden wie oben beschrieben hergestellt. Für die Herstellung von Nanopartikeln, die Oligonucleotide tragen, die mit Bromacetylaminogruppen terminiert sind, wird erst ein Oligonucleotid vorbereitet, das an einem Ende durch ein Aminonucleosid (z.B. entweder 5'-Amino-5'-desoxythymidin oder 3'-Amino-3'-desoxythymidin) und am anderen Ende durch eine Mercaptoalkylgruppe terminiert ist. Moleküle dieses Oligonucleotids werden dann in den Nanopartikeln durch die Mercaptogruppen verankert und das Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugat wird dann zu N-Bromacetylaminoderivat durch Reaktion mit einem Bromacetylacylierungsmittel umgesetzt.

[0155] Ein viertes Kopplungsschema zum Verschließen der Zusammenfügungen an Ort und Stelle verwendet die Oxidation von Nanopartikeln, die Oligonucleotide tragen, die durch Thiophosphorylgruppen terminiert sind. Milde Oxidationsmittel, wie Kaliumtrijodid, Kaliumferricyanid (siehe Gryaznov und Letsinger, Nucleic Acids Research, 21, 1403) oder Sauerstoff, sind bevorzugt.

[0156] Zusätzlich können die Eigenschaften der Nanomaterialien und Nanostrukturen abgeändert werden durch das Einbringen von organischen und anorganischen Funktionalitäten in die zwischenverbindenden Oligonucleotidketten, die durch kovalentes Anheften an die Oligonucleotidketten an Ort und Stelle gehalten werden. Eine weite Vielfalt von Rückgrat-, Basen- und Zuckermodifikationen ist bekannt (siehe z.B. Uhlmann, E., und Peyman, A. Chemical Reviews, 90, 544-584 (1990). Auch können die Oligonucleotidketten ausgetauscht werden durch "Peptide Nucleic Acid"-Ketten (PNA), bei denen die Nucleotidbasen durch ein Polypeptidrückgrat (siehe Wittung, P. et al., Nature, 368, 561-563 (1994) ausgetauscht werden.

[0157] Wie aus dem Vorherigen ersichtlich ist, ist das Nanoherstellverfahren der Erfindung extrem vielseitig. Durch die Variation der Länge, Sequenz und Strängigkeit der Bindeoligonucleotide, die Anzahl, Länge und Se-

quenz der Bindungsbereiche der Bindeoligonucleotide, die Länge, Sequenz und Anzahl der Oligonucleotide, die an die Nanopartikel angeheftet sind, die Größe, Form und chemische Zusammensetzung der Nanopartikel, die Anzahl und Typen von unterschiedlichen Bindeoligonucleotiden und Nanopartikeln, die verwendet werden, und die Strängigkeit der Oligonucleotidverbinder, können Nanomaterialien und Nanostrukturen, die einen großen Bereich von Strukturen und Eigenschaften aufweisen, hergestellt werden. Diese Strukturen und Eigenschaften können ferner variiert werden durch Querverbindung von Oligonucleotidverbindern, durch Funktionalisierung der Oligonucleotide, durch Rückgrat-, Basen- oder Zuckermodifikationen der Oligonucleotide oder durch die Verwendung von Peptid-Nukleinsäuren.

[0158] Die Nanomaterialien und Nanostrukturen, die durch das Nanoherstellverfahren der Erfindung hergestellt werden können, umfassen nanoskalige mechanische Vorrichtungen, Trennmembranen, Biofilter und Biochips. Es ist in Erwägung zu ziehen, dass die Nanomaterialien und Nanostrukturen der Erfindung als chemische Sensoren, in Computern, für den Wirkstofftransport, für das Protein-Engineering und als Matrizen für die Biosynthese/Nanostrukturherstellung/direktes Zusammenfügen von anderen Strukturen verwendet werden können. Siehe allgemein Seeman et al., *New J. Chem.*, 17, 739 (1993) für weitere mögliche Anwendungen.

[0159] Es ist anzumerken, dass der Begriff "ein" sich auf eine oder mehrere Einheiten bezieht. Zum Beispiel bezieht sich "eine Eigenschaft" auf eine oder mehrere Eigenschaften oder auf mindestens eine Eigenschaft. Daraus folgend werden die Begriffe "ein", "ein oder mehrere" und "mindestens ein" untereinander austauschbar verwendet. Es ist ebenfalls anzumerken, dass die Begriffe "umfassend", "enthaltend", und "aufweisend" austauschbar verwendet wurden.

BEISPIELE

Beispiel 1: Herstellung von Oligonucleotid-modifizierten Goldnanopartikeln

A. Herstellung von Goldnanopartikeln

[0160] Goldkolloide (Durchmesser: 13 nm) wurden hergestellt durch Reduktion von HAuCl_4 mit Citrat, wie in Frens, *Nature Phys. Sci.*, 241, 20 (1973) und Grabar, *Anal. Chem.*, 67, 735 (1995) beschrieben. Es wurden kurz alle Glasgeräte in Königswasser gereinigt (3 Teile HCl, 1 Teil HNO_3), mit Nanopure H_2O gespült, und dann vor der Verwendung im Ofen getrocknet. HAuCl_4 und Natriumcitrat wurden von Aldrich Chemical Company erworben. Wässrige HAuCl_4 (1 mM, 500 mL) wurde unter Rühren zum Rückfließen gebracht. Dann wurden schnell 38,8 mM Natriumcitrat (50 mL) zugegeben. Die Farbe der Lösung veränderte sich von Fahlgelb nach Burgunderrot und das Rückfließen wurde für 15 Minuten fortgesetzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die rote Lösung durch einen 1 μm Filter von Micron Separations Inc. gefiltert. Au-Kolloide wurden durch UV-vis-Spektroskopie unter Verwendung eines Hewlett Packard 8452A-Diodenarrayspektrometers und durch Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) unter Verwendung eines Hitachi 8100-Transmissionselektronenmikroskops charakterisiert. Goldpartikel mit einem Durchmesser von 13 nm erzeugen einen sichtbaren Farbwechsel, wenn sie mit einem Target- und Sondenoligonucleotidsequenzproben im Bereich von 10-35 Nucleotiden aggregiert werden.

B. Synthese von Oligonucleotiden

[0161] Oligonucleotide wurden im 1 Micromolmaßstab unter Verwendung eines Milligene Expedite DNA-Syntheseautomaten im Einzelsäulenmodus, unter Verwendung von Phosphoramiditchemie synthetisiert. Eckstein, F. (ed.) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991). Alle Lösungen wurden von Milligene (DNA-Synthesequalität) erworben. Die durchschnittliche Kopplungseffizienz variierte von 98 bis 99,8%, und die letzte Dimethoxytrityl-(DMT)-Schutzgruppe wurde, um die Reinigung zu fördern, nicht von den Oligonucleotiden abgespalten.

[0162] Für 3'-Thiol-Oligonucleotide wurde ein Thiol-Modifizierer C3 S-S CPG-Träger von Glen Research erworben und in einem Syntheseautomaten verwendet. Während der normalen Spaltung von dem festen Träger (16 Stunden bei 55°C), wurden 0,05 M Dithiothreitol (DTT) zu der NH_4OH -Lösung zugegeben, um das 3'-Disulfid zum Thiol zu reduzieren. Vor der Reinigung durch Umkehrphasenhochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde der Überschuss von DTT durch Extraktion mit Ethylacetat entfernt.

[0163] Für die 5'-Thiololigonucleotide wurde ein 5'-Thiol-Modifizierer- C_6 -Phosphoramiditreagenz von Glen Research, 44901 Falcon Place, Sterling, Va 20166 erworben. Die Oligonucleotide wurden synthetisiert und die endständige DMT-Schutzgruppe wurde entfernt. Dann wurde 1 mL trockenes Acetonitril zu 100 μMol 5'-Thi-

ol-Modifizierer- C₆-Phosphoramidit zugegeben. 200 µL der Amiditlösung und 200 µL Aktivator (frisch aus dem Synthetisierer) wurden gemischt und mit einer prite auf eine Säule aufgebracht, die die synthetisierten Oligonucleotide immer noch auf dem festen Träger enthielt, und 10 Minuten lang vorwärts- und rückwärts durch die Säule gepumpt. Dann wurde der Träger (2 × 1 mL) mit trockenem Acetonitril für 30 Sekunden gewaschen. 700 µL einer 0,016 M I₂/H₂O/Pyridinmischung (Oxidierlösung) wurden in die Säule eingebracht und vorwärts und rückwärts durch die Säule gepumpt mit zwei Spritzen für 30 Sekunden. Dann wurde der Träger mit einer 1:1-Mischung von CH₃CN/Pyridin (2 × 1 mL) für 1 Minute gewaschen, gefolgt von einem letzten Waschgang mit trockenem Acetonitril (2 × 1 mL) und anschließender Trocknung der Säule mit einem Stickstoffstrom. Die Tritylschutzgruppe wurde nicht entfernt, was die Reinigung erleichterte.

[0164] Umkehrphasen-HPLC wurde ausgeführt mit einem Dionex DX500-System, das ausgestattet war mit einer Hewlett Packard ODS Hypersilsäule (4,6 × 200 mm, 5 mm Partikelgröße), unter Verwendung von 0,03 M Et₃NH⁺ OAc⁻-Puffer (TEAA), pH 7, mit einem 1%/min.-Gradienten von 95% CH₃CN/5% TEAA. Die Flussrate war 1 mL/min. mit UV-Detektion bei 260 nm. Präparative HPLC wurde verwendet, um die DMT-geschützten, unmodifizierten Oligonucleotide (Elution bei 27 min.) zu reinigen. Nach dem Sammeln und Verdampfen des Puffers, wurde die DMT von den Oligonucleotiden durch Behandlung mit 80%-iger Essigsäure für 30 Minuten bei Raumtemperatur gespalten. Die Lösung wurde dann bis fast zur Trockenheit eingedampft, Wasser wurde zugefügt und die gespaltene DMT wurde aus der wässrigen Oligonucleotidlösung unter Verwendung von Ethylacetat extrahiert. Die Menge an Oligonucleotid wurde durch die Extinktion bei 260 nm bestimmt und die endgültige Reinheit wurde durch Umkehrphasen-HPLC (Elutionszeit 14,5 Minuten) bestimmt.

[0165] Dieselbe Vorgehensweise wurde für die Reinigung der 3'-Thiol-Oligonucleotide verwendet, mit der Ausnahme, dass DTT nach der Extraktion von DMT zugefügt wurde, um die Menge an Disulfid, die gebildet wurde, zu reduzieren. Nach sechs Stunden bei 40°C, wurde DTT unter Verwendung von Ethylacetat extrahiert und die Oligonucleotide wurden durch HPLC (Elutionszeit 15 Minuten) erneut gereinigt.

[0166] Für die Reinigung der 5'-Thiol-modifizierten Oligonucleotide wurde die präparative HPLC angewendet, unter denselben Bedingungen, wie für die unmodifizierten Oligonucleotide. Nach Reinigung wurde die Tritylschutzgruppe durch Zugabe von 150 µL einer 50 mM AgNO₃-Lösung zu der trockenen Oligonucleotidsonde entfernt. Dieselbe veränderte ihre Farbe nach milchig weiß als die Spaltung auftrat. Nach 20 Minuten wurden 200 µL einer 10 mg/mL-Lösung von DTT zugegeben, um das Silber (fünf Minuten Reaktionszeit) zu komplexieren, und die Sonde wurde zentrifugiert, um den gelben Komplex auszufällen. Die Oligonucleotidlösung (< 50 OD) wurde dann auf eine Entsalzersäule NAP-5 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) zur Reinigung (enthält DNA Grade Sephadex G-25 Medium zum Entsalzen und Pufferaustausch für Oligonucleotide größer als 10 Basen) übertragen. Die Menge an 5'-Thiol-modifiziertem Oligonucleotid wurde durch UV-vis-Spektroskopie durch Messung der Größenordnung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die endgültige Reinheit wurde durch Durchführen einer Ionenaustausch-HPLC mit einer Dionex Nucleopac PA-100 (4 × 250)-Säule, unter Verwendung von 10 mM NaOH-Lösung (pH 12) mit einem 2%/min.-Gradienten von 10 mM NaOH-, 1 M NaCl-Lösung bestimmt. Typischerweise wurden zwei Peaks erzeugt mit Elutionszeiten von näherungsweise 19 Minuten und 25 Minuten (Elutionszeit ist abhängig von der Länge der Oligonucleotidstränge). Die Peaks entsprachen den Thiol- bzw. Disulfid-Oligonucleotiden.

C. Bindung von Oligonucleotiden an Goldnanopartikeln

[0167] Eine wässrige Lösung von 17 nM (150 µL) Au-Kolloiden, die wie in Abschnitt A oben beschrieben zubereitet wurde, wurde mit 3,75 µM (46 µL) 3'-Thiol-TTTGCTGA gemischt, die wie in Abschnitt B zubereitet wurde, gemischt und sie für 24 Stunden bei Raumtemperatur in 1 ml Eppendorf-gedeckelten Hütchen zu stehen gelassen. Eine zweite Lösung von Kolloiden wurde mit 3,75 µM (46 µL) 3'-Thiol-TACCGTTG reagiert. Es ist anzumerken, dass diese Oligonucleotide nicht komplementär sind. Kurz vor der Verwendung, wurde eine gleiche Menge der zwei Nanopartikellösungen vereint. Da die Oligonucleotide nicht komplementär sind, fand keine Reaktion statt.

[0168] Die Oligonucleotid-modifizierten Nanopartikel sind bei erhöhten Temperaturen (80°C) und hohen Salzkonzentrationen (1 M NaCl) für Tage stabil und es wurde nicht beobachtet, dass sie einem Partikelwachstum unterliegen. Die Stabilität in hohen Salzkonzentrationen ist wichtig, da solche Bedingungen für die Hybridisierungsreaktionen benötigt werden, die die Basis der Verfahren zum Nachweis und zur Nanoherstellung der Erfindung darstellen.

Beispiel 2: Bildung von Nanopartikelaggregaten

A. Herstellung von Bindeoligonucleotid

[0169] Zwei (nichtthiolierte) Oligonucleotide wurden wie in Abschnitt B von Beispiel 1 beschrieben synthetisiert. Sie wiesen die folgenden Sequenzen auf:

3' ATATGCGCGA TCTCAGCAA [SEQ ID NR:1]; und

3' GATCGGCGCAT ATCAACGGTA [SEQ ID NR:2].

[0170] Die Mischung dieser zwei Oligonucleotide in einer 1 M NaCl, die mit 10 mM Phosphatpufferlösung (pH 7,0) gepuffert wurde, führte zur Hybridisierung unter Bildung eines Doppelstranges, der eine 12-Basenpaarüberlappung und zwei klebende Enden mit 8-Basenpaaren aufwies. Jedes der klebenden Enden hatte eine Sequenz, die komplementär war zu einem der Oligonucleotide, die an die Au-Kolloide wie in Abschnitt C von Beispiel 1 hergestellt angeheftet waren.

B. Bildung von Nanopartikelaggregaten

[0171] Die Bindeoligonucleotide, die in Abschnitt A dieses Beispiels hergestellt wurden (Endkonzentration nach Verdünnung mit NaCl: 0,17 μ M), wurden zu Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten, wie sie in Abschnitt C von Beispiel 1 hergestellt wurden (Endkonzentration nach Verdünnung mit NaCl: 5,1 nM) bei Raumtemperatur zugegeben. Die Lösung wurde dann mit wässriger NaCl (auf eine Endkonzentration von 1 M) verdünnt und bei pH 7 mit 10 mM Phosphat gepuffert, Bedingungen, wie sie für die Hybridisierung der Oligonucleotide geeignet sind. Eine unmittelbare Farbänderung von Rot nach Violett wurde beobachtet und eine Fällungsreaktion folgte. Siehe **Fig. 6**. Über einen Zeitraum von mehreren Stunden, wurde die Lösung klar und ein hellrosagrauer Bodensatz setzte sich auf dem Boden des Reaktionskessels ab. Siehe **Fig. 6**.

[0172] Um zu bestätigen, dass an diesem Prozess zwei der Oligonucleotide und Kolloide teilnahmen, wurde der Bodensatz gesammelt und in 1 M wässriger NaCl, gepuffert bei pH 7, resuspendiert (durch Schütteln). Jedes der Oligonucleotide, das nicht mit den Nanopartikeln hybridisiert war, wurde auf diese Weise entfernt. Dann wurde ein Temperatur/Zeit-Dissoziationsexperiment durchgeführt, durch Beobachten der charakteristischen Extinktion der hybridisierten Oligodesoxyribonucleotide (260 nm) und für die aggregierten Kolloide, was sich in dem Goldinterpartikelabstand (700 nm) widerspiegelte. Siehe **Fig. 7**. Änderungen in der Extinktion bei 260 und 700 nm wurden durch ein Perkin-Elmer Lambda 2 UV-vis-Spektralphotometer, unter Verwendung eines Peltier PTP-1-Temperatur-kontrollierten Zellhalters während eines periodischen Durchlaufes der Temperaturwechsels mit einer Rate von 1°C/Minute zwischen 0°C und 80°C aufgenommen. Die DNA-Lösungen waren näherungsweise 1 Extinktionseinheit/Einheiten (CD), gepuffert bei pH 7, unter Verwendung von 10 mM Phosphatpuffer und bei 1 M NaCl-Konzentration.

[0173] Die Ergebnisse sind in **Fig. 8A** gezeigt. Da die Temperatur periodisch zwischen 0°C und 80°C durchlaufen wurde (was 38°C über der Dissoziationstemperatur (T_m) für der Doppelstrang ($T_m = 42^\circ\text{C}$) lag), wurde eine exzellente Korrelation zwischen den optischen Signalen für beide, Kolloide und Oligonucleotide, erhalten. Das UV-vis-Spektrum für nackte Au-Kolloide war wesentlich weniger temperaturabhängig, **Fig. 8B**.

[0174] Es gab eine beachtliche, sichtbare optische Änderung, wenn die polymeren Oligonucleotid-Kolloidfällungen über ihren Schmelzpunkt erhitzt wurden. Die klaren Lösungen wurden dunkelrot, wenn das polymere Biomaterial dehybridisierte, um ungebundene Kolloide zu erzeugen, die in der wässrigen Lösung löslich sind. Der Prozess war reversibel, was durch die Temperaturspuren in **Fig. 8A** bewiesen wurde.

[0175] In einem Kontrollexperiment wurde gezeigt, dass einem 14-T:14-A Doppelstrang keine reversible Au-Kolloidpartikelaggregation erzeugen konnte. In einem weiteren Kontrollexperiment wurde gefunden, dass ein Bindeoligonucleotid-Doppelstrang mit vier Basenpaar-Fehlpaarungen an den klebrigen Enden keine reversible Partikelaggregation der Oligonucleotid-modifizierten Nanopartikel (hergestellt wie in Abschnitt C von Beispiel 1 beschrieben und wie oben beschrieben reagiert) erzeugen konnte. In einem dritten Kontrollexperiment erzeugten nichtthiolierte Oligonucleotide, die Sequenzen aufwiesen, die komplementär waren zu den klebrigen Enden des Bindeoligonucleotids, und die mit Nanopartikeln umgesetzt wurden, keine reversible Aggregation, wenn die Nanopartikel mit dem Bindungsoligonucleotid kombiniert wurden.

[0176] Ein weiterer Beweis für den Polymerisations/Zusammenfügungsprozess wurde durch die Transmissionselektronenmikroskopie-(TEM)Studien der Bodensätze belegt. TEM wurde ausgeführt auf einem Hitachi 8100 Transmissionselektronenmikroskop. Eine typische Sonde wurde zubereitet durch Zutropfen von 100 μ L

Kolloidlösung auf ein poröses Kohlenstoffraster. Das Raster wurde dann unter Vakuum getrocknet und abgebildet. TEM-Abbildungen von Au-Kolloiden, die durch hybridisierte Oligonucleotide gebunden waren, zeigten große zusammengefügte Netzwerke der Au-Kolloide, [Fig. 9A](#). Nackte Au-Kolloide aggregierten unter vergleichbaren Bedingungen nicht, sondern dispergierten eher oder unterlagen Partikelwachstumsreaktionen. Hayat, Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications (Academic Press, San Diego, 1991). Es ist anzumerken, dass es keinen Beweis für Kolloidpartikelwachstum in den Experimenten, die bis zum heutigen Tag durchgeführt wurden, gibt. Die hybridisierten Kolloide scheinen eine bemerkenswert regelmäßige Größe mit einem mittleren Durchmesser von 13 nm aufzuweisen.

[0177] Mit TEM wurde eine Überlagerung von Schichten beobachtet, die es schwierig machte, den Ordnungsgrad für dreidimensionale Aggregate zu bestimmen. Abbildungen von maßstablich kleineren einzelnen Schichten, zweidimensionalen Aggregaten, erzeugte mehr Beweis für den Selbstzusammenfügungsprozess, [Fig. 9B](#). Dichtgepackte Zusammenfügungen der Aggregate mit gleichförmigen Partikelseparationen von näherungsweise 60 Å können erkannt werden. Der Abstand war kürzer als der geschätzte Abstand von 95 Å, der für Kolloide, die an starre Oligonucleotidhybride mit den Sequenzen, die verwendet wurden, gebunden waren, erwartet wurde. Aufgrund der Nicks im Doppelstrang, die nach Hybridisierung der Oligonucleotide auf den Nanopartikeln mit den Bindeoligonucleotiden beobachtet wurden, gab es keine starren Hybride sondern ziemlich flexible. Es sollte angemerkt werden, dass dies eine Variable ist, die kontrolliert werden kann durch Reduzierung des Systems von vier Überlappungssträngen auf drei (wobei die Anzahl von Nicks reduziert wird) oder durch Verwendung von Dreifachsträngen anstatt Doppelsträngen.

Beispiel 3: Herstellung von Oligonucleotid-modifizierten Goldnanopartikeln

[0178] Goldkolloide (Durchmesser: 13 nm) wurden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt. Thiol-Oligonucleotide [$\text{HS}(\text{CH}_2)_6\text{OP}(\text{O})(\text{O}^-)\text{-oligonucleotid}$] wurden ebenso wie in Beispiel 1 beschrieben, hergestellt.

[0179] Es wurde gefunden, dass das Verfahren zum Anheften von Thiol-Oligonucleotiden an Goldnanopartikel, wie in Beispiel 1 beschrieben, in einigen Fällen keine befriedigenden Ergebnisse lieferte. Insbesondere, wenn lange Oligonucleotide verwendet wurden, waren die Oligonucleotid-Kolloidkonjugate nicht stabil in Anwesenheit von großen Überschüssen hochmolekulargewichtiger Lachsspermium-DNA, die als Modell für die Hintergrund-DNA verwendet wurde, die normalerweise in diagnostischen Systemen anwesend ist. Ein längerer Kontakt der Kolloide mit den Thiol-Oligonucleotiden erzeugte Oligonucleotid-Kolloidkonjugate, die gegenüber Lachsspermium-DNA stabil waren, aber die resultierenden Konjugate konnten nicht zufriedenstellend hybridisieren. Weitere Experimente führten zu der folgenden Prozedur zum Anheften von Thiol-Oligonucleotiden jeglicher Länge an Goldkolloide, so dass die Konjugate gegenüber hochmolekulargewichtiger DNA stabil sind und zufriedenstellend hybridisieren.

[0180] Eine 1 mL-Lösung der Goldkolloide (17 nM) in Wasser wurde mit einem Überschuss (3,68 μM) Thiol-Oligonucleotid (28 Basen in der Länge) in Wasser gemischt, und der Mischung wurde 12-24 Stunden lang bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann wurden 100 μL eines 0,1 M Natriumhydrogenphosphatpuffers, pH 7,0 und 100 μL einer 1,0 M NaCl vorgemischt und zugegeben. Nach 10 Minuten wurden 10 μL von 1%-igen wässrigen NaN_3 zugegeben und die Mischung wurde weitere 40 Stunden stehengelassen. Dieser "Alterungs"-Schritt wurde erstellt, um die Oberflächenbedeckung durch die Thiol-Oligonucleotide zu erhöhen und die Oligonucleotid-Basen auf der Goldoberfläche zu ersetzen. Reinere, besser definierte rote Tupfen in den folgenden Tests wurden erhalten, wenn die Lösung in einem Trockeneisbad nach 40 Stunden Inkubation eingefroren wurde, und dann auf Raumtemperatur aufgetaut wurde. Danach wurde die Lösung in jedem Fall als Nächstes bei 14.000 U/min in einer Eppendorf-Zentrifuge 5414 für etwa 15 Minuten zentrifugiert, was einen sehr fahlen Rosa Überstand ergab, der das meiste an Oligonucleotiden (wie durch die Extinktion bei 260 nm belegt) enthielt, zusammen mit 7-10% des kolloidalen Golds (wie durch die Extinktion bei 520 nm belegt) und einen kompakten, dunklen, gelatineartigen Rückstand am Boden des Röhrchens. Der Überstand wurde entfernt und der Rückstand wurde in etwa 200 μL Puffer (10 mM Phosphat, 0,1 M NaCl) resuspendiert und zentrifugiert. Nach dem Entfernen der überstehenden Lösung, wurde der Rückstand in 1,0 mL Puffer (10 mM Phosphat, 0,1 M NaCl) und 10 μL einer 1%-igen wässrigen Lösung von NaN_3 aufgenommen. Das Auflösen wurde unterstützt durch mehrmaliges Aufziehen der Lösungen und Ausdrücken aus einer Pipette. Die resultierende rote Hauptlösung war stabil (z.B. blieb sie rot und aggregierte nicht) beim Stehen über Monate bei Raumtemperatur, beim Auftupfen auf Silika Dünnschicht-Chromatographieplatten (DC) (siehe Beispiel 4), und bei Zugabe von 2 M NaCl, 10 mM MgCl_2 oder Lösungen, die hohe Konzentrationen an Lachsspermium-DNA enthielten.

Beispiel 4: Beschleunigung der Hybridisierung von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten

[0181] Die Oligonucleotid-Goldkolloidkonjugate I und II, wie in [Fig. 11](#) gezeigt, wurden wie in Beispiel 3 beschrieben hergestellt. Die Hybridisierung dieser zwei Konjugate war extrem langsam. Insbesondere erzeugte das Mischen der Sonden der Konjugate I und II in wässriger 0,1 M NaCl oder in 10 mM MgCl₂ plus 0,1 M NaCl und dem Stehen der Mischung bei Raumtemperatur für einen Tag, kleine oder keine Farbänderungen.

[0182] Es wurden zwei Wege gefunden, um die Hybridisierung zu verbessern. Erstens wurden schnellere Ergebnisse beobachtet durch Einfrieren der Mischung von Konjugaten I und II (jeweils 15 nM, enthalten in einer Lösung von 0,1 M NaCl) in einem Trockeneis-Isopropylalkoholbad für 5 Minuten und dann Auftauen der Mischung auf Raumtemperatur. Die aufgetaute Lösung wies eine bläuliche Farbe auf. Wenn 1 µL der Lösung auf eine Standard C-18 DC-Silikaplatte (Alltech Associates) getupft wurde, zeigte sich sofort eine starke blaue Farbe. Die Hybridisierung und die daraus folgende Farbänderung durch die Gefrier-Tau-Prozedur waren reversibel. Beim Erhitzen der hybridisierten Lösung auf 80°C wurde die Lösung rot und erzeugte Rosa Tupfen auf einer DC-Platte. Ein darauf folgendes Einfrieren und Auftauen führte das System wieder zurück zu dem (blauen) hybridisierten Status (sowohl Lösung als auch Tupfen auf einer C-18 DC-Platte). In einem ähnlichen Experiment, in dem die Lösung nicht wieder eingefroren wurde, wurden Tupfen auf der C-18 DC-Platte erhalten, die pinkfarben waren.

[0183] Ein zweiter Weg, um schnellere Ergebnisse zu beobachten, war, die Konjugate und das Target zu erwärmen. Zum Beispiel wurden in einem weiteren Experiment Oligonucleotid-Goldkolloidkonjugate und eine Oligonucleotid-Zielsequenz in einer 0,1 M NaCl-Lösung schnell auf 65°C erwärmt und es wurde ihr erlaubt, sich über einen Zeitraum von 20 Minuten auf Raumtemperatur abzukühlen. Beim Auftupfen auf eine C-18-Silikaplatte und Trocknen, wurde ein blauer Tupfen, der auf die Hybridisierung hinwies, beobachtet. Im Gegensatz dazu erzeugte die Inkubation der Konjugate und des Targets bei Raumtemperatur für 1 Stunde in 0,1 M NaCl-Lösung keine blaue Farbe, die auf Hybridisierung hinwies. Die Hybridisierung war in 0,3 M NaCl schneller.

Beispiel 5: Untersuchungen unter Verwendung von Nanopartikel-Oligonucleotid-Konjugaten

[0184] Die Oligonucleotid-Goldkolloidkonjugate 1 und 2, wie sie in [Fig. 12](#) gezeigt sind, wurden wie in Beispiel 3 beschrieben hergestellt und das Oligonucleotid-Target 3, wie es in [Fig. 12](#) gezeigt ist, wurde wie in Beispiel 2 beschrieben hergestellt. Targets mit Fehlpaarung und Deletion 4, 5, 6 und 7 wurden von der Northwestern University Biotechnology Facility, Chicago, IL, erworben. Diese Oligonucleotide wurden im 40 nmol Maßstab synthetisiert und auf einer Umkehrphasen C18-Kartusche (OPC) gereinigt. Ihre Reinheit wurde bestimmt durch das Durchführen von Ionenaustausch-HPLC.

[0185] Selektive Hybridisierung wurde erzielt durch das schnelle Erhitzen und dann schnelle Abkühlen auf die stringente Temperatur. Zum Beispiel wurde die Hybridisierung ausgeführt in 100 µL einer 0,1 M NaCl plus 5 mM MgCl₂, die 15 nM von jedem Oligonucleotid-Kolloidkonjugat 1 und 2 enthielt und 3 nanomol der Oligonucleotidtargets 3, 4, 5, 6, oder 7, Erhitzen auf 74°C, Abkühlen auf Temperaturen, wie in der Tabelle 1 weiter unten ausgewiesen, und Inkubieren der Mischung bei dieser Temperatur für 10 Minuten. Eine 3 µL-Sonde von jeder Reaktionsmischung wurde dann auf eine C-18 DC-Silikaplatte getupft. Während des Trocknens (5 Minuten) trat eine starke blaue Farbe auf, wenn die Hybridisierung stattgefunden hatte.

[0186] Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 weiter unten gezeigt. Rosafarbene Tupfen weisen auf einen negativen Test hin (z.B. wenn die Nanopartikel nicht miteinander zur Hybridisierung gebracht wurden), und blaue Tupfen weisen auf einen positiven Test hin (z.B., wenn die Nanopartikel aufgrund der Hybridisierung nahe zusammengebracht wurden, wobei beide der Oligonucleotidkonjugate mit einbezogen wurden).

Tabelle 1

REAKTANTEN	ERGEBNISSE (FARBE)			
	45 °C	50 °C	60 °C	74 °C
1+2	ROSA	ROSA	ROSA	ROSA
1+2+3 (Übereinstimmung)	BLAU	BLAU	BLAU	BLAU
1+2+4 (halbkomplemen- täre Fehlpaarung)	ROSA	ROSA	ROSA	ROSA
1+2+5 (-6 bp)	BLAU	ROSA	ROSA	ROSA
1+2+6 (1 bp Fehlpaarung)	BLAU	BLAU	ROSA	ROSA
1+2+7 (2 bp Fehlpaarung)	ROSA	ROSA	ROSA	ROSA

[0187] Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, ergab eine Hybridisierung bei 60°C nur für die komplett übereinstimmenden Targets 3 blaue Tupfen. Die Hybridisierung bei 50°C führte zu blauen Tupfen mit beiden Targets 3 und 6. Die Hybridisierung bei 45°C ergab blaue Tupfen mit Targets 3, 5 und 6.

[0188] In einer verwandten Serie wurde für ein Target, das ein einzelnes fehlgepaartes T-Nukleotid enthielt, gefunden, dass es positive Tests bei 58°C (blaue Farbe) und einen negativen Test (rote Farbe) bei 64°C mit Konjugaten 1 und 2 zeigte. Unter denselben Bedingungen ergab das komplett übereinstimmende Target (3) einen positiven Test bei beiden Temperaturen, was zeigt, dass der Test zwischen einem Target, das komplett übereinstimmend ist und einem, das eine einzige Fehlpaarung aufweist, unterscheiden kann.

[0189] Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt bei Verwendung eines anderen Hybridisierungsverfahrens. Insbesondere wurde eine selektive Hybridisierung durch Einfrieren, Auftauen und dann schnelles Erwärmen auf steigende Temperaturen erzielt. Zum Beispiel wurde die Hybridisierung in 100 µL einer 0,1 M NaCl, die 15 nM von jedem der Oligonucleotid-Kolloidkonjugate 1 und 2 und 10 Picomol des Targetoligonucleotids 3, 4, 5, 6, oder 7 enthielt, ausgeführt, Einfrieren in einem Trockeneis-Isopropylalkoholbad für 5 Minuten, Auftauen auf Raumtemperatur und dann schnelles Erwärmen auf Temperaturen, wie sie in Tabelle 2 weiter unten angegeben sind, und Inkubieren der Mischung bei dieser Temperatur für 10 Minuten. Eine 3 µL-Sonde jeder Reaktionsmischung wurde dann auf eine C-18 DC-Silikaplatte aufgetupft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

Reaktanten (Sonden) + Target	Ergebnisse (Farbe)				
	RT	35°C	40°C	54°C	64°C
(1+2)+3	blau	blau	blau	blau	pink
(1+2)	pink	pink	pink	pink	pink
(1+2)+4	pink	pink	pink	pink	pink
(1+2)+5	blau	blau	pink	pink	pink
(1+2)+6	blau	blau	blau	pink	pink
(1+2)+7	blau	pink	pink	pink	pink

[0190] Ein wichtiges Merkmal dieser Systeme war, dass die Farbänderung, die mit der Temperaturänderung einherging, sehr scharf war und über einen Temperaturbereich von etwa 1°C auftrat. Dies lässt eine hohe Kooperation in den Schmelz- und Anlagerungsprozessen vermuten, die die Kolloidkonjugate aufweisen und ermöglicht es, leicht zwischen Oligonucleotidtargets, die eine komplett übereinstimmende Sequenz aufweisen, und einer einzelnen Fehlpaarung zu unterscheiden.

[0191] Der hohe Grad an Unterscheidung kann zwei Merkmalen zugeordnet werden. Das erste ist, dass eine Ausrichtung von zwei relativ kurzen Sonden-Oligonucleotidsegmenten (15 Nukleotide) an dem Target für ein positives Signal erforderlich ist. Eine Fehlpaarung in einem Segment ist mehr destabilisierend als eine Fehlpaarung in einer längeren Sonde (z.B. ein Oligonucleotid, das 30 Basen lang ist) in einem vergleichbaren Zweikomponentennachweissystem. Das zweite ist das Signal bei 260 nm, das bei der Hybridisierung der Targetoligonucleotide mit den Nanopartikelkonjugaten in Lösung erhalten wird, das auf den Nanopartikeln basiert, nicht auf der DNA. Dies hängt von der Dissoziation einer Aneinanderreihung von Nanopartikeln ab, die in einem polymeren Netzwerk durch vielfache Oligonucleotidduplexe organisiert sind. Dies führt im Vergleich zur thermischen Standard-Denaturierung einer DNA zu einer Verengung des Temperaturbereiches, der für die Aggregatdissoziation zur Verfügung steht. Kurz gesagt, können einige Doppelstränge in den quervernetzten Aggregaten dissoziieren, ohne die Nanopartikel in die Lösung zu verteilen. Deshalb ist der Temperaturbereich für das Schmelzen der Aggregate sehr klein (4°C) im Vergleich zu dem Temperaturbereich, der mit dem Schmelzen eines vergleichbaren Systems ohne Nanopartikel (12°C) in Verbindung gebracht wird. Noch bemerkenswert und vorteilhaft für diese Nachweisannäherung ist der Temperaturbereich für die kolorimetrische Antwort (<1°C), die auf den C-18 Silikaplaten beobachtet wird. Im Allgemeinen wird diese Drei-Komponenten Nanopartikel-basierte Strategie selektiver sein als jedes Zweikomponentenerfassungssystem, das auf einer Einzelstrangsonde, die mit einer Targetnucleinsäure hybridisiert, basiert.

[0192] Eine Masterlösung, die 1 nMol Target 3 enthält, wurde in 100 µL eines Hybridisierungspuffers (0,3 M NaCl, 10 mM Phosphat, pH 7) zubereitet. Ein µL dieser Lösung entsprach 10 Picomol des Targetoligonucleotids. Lösungsreihen wurden durch das Entnehmen eines Aliquots aus der Masterlösung und dessen Verdünnung auf die gewünschte Konzentration mit Hybridisierungspuffer ausgeführt. Tabelle 3 zeigt die Empfindlichkeit, die erhalten wird, unter Verwendung einer Mischung von µL der Sonden 1 und 2 mit unterschiedlichen Mengen an Target 3. Nach dem Ausführen der Hybridisierung unter Anwendung von Gefrier-Tau-Bedingungen, wurden 3 µL Aliquots dieser Lösungen auf C-18 DC-Platten aufgetupft und die Farbe bestimmt. In Tabelle 3 weiter unten weist Rosa auf einen negativen Test und Blau auf einen positiven Test hin.

Tabelle 3

Targetmenge	Ergebnisse
1 Picomol	blau (positiv)
200 Femtomol	blau (positiv)
100 Femtomol	blau (positiv)
20 Femtomol	blau (positiv)
10 Femtomol	violett (nicht eindeutig)

[0193] Dieses Experiment weist darauf hin, dass 10 Femtomol die untere Nachweisgrenze für dieses spezielle System sind.

Beispiel 6: Untersuchungen unter Verwendung von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten

[0194] DNA-modifizierte Nanopartikel wurden auf modifizierte transparente Substrate adsorbiert, wie in [Fig. 13B](#), Felder 1-6, gezeigt. Dieses Verfahren umfasst das Verbinden von DNA-modifizierten Nanopartikeln an Nanopartikel, die auf Glassubstrat angeheftet sind, unter Verwendung von DNA-Hybridisierungsinteraktionen.

[0195] Glasmikroskopträger wurden von Fisher scientific erworben. Die Träger wurden zugeschnitten in näherungsweise 5 × 15 mm-Stücke, unter Verwendung von Ritzstiften mit Diamantspitze. Die Platten wurden für 20 Minuten in einer Lösung mit 4:1 H₂SO₄:H₂O₂ bei 50°C gereinigt. Die Träger wurden dann mit reichlicher Menge an Wasser, dann Ethanol gespült, und dann unter einem Strom trockenem Stickstoff getrocknet. Um

die Trägeroberfläche mit einem Thiol-terminierten Silan zu funktionalisieren, wurden die Träger in einer entgas-ten ethanolischen 1%-igen (Volumen-%) Mercaptopropyltrimethoxysilan-Lösung für 12 Stunden eingeweicht. Die Träger wurden aus der Ethanolösung entfernt und mit Ethanol und dann Wasser gewaschen. Die Nanopartikel wurden auf der Thiol-terminierten Oberfläche der Träger adsorbiert, durch Einweichen in Lösungen, die Goldnanopartikel (Herstellung beschrieben in Beispiel 1) mit einem Durchmesser von 13 nm enthielten. Nach 12 Stunden in den kolloidalen Lösungen, wurden die Träger entfernt und mit Wasser gespült. Die erhaltenen Träger hatten aufgrund der adsorbierten Nanopartikel ein Rosafarbenes Aussehen, und zeigten ähnliche UV-vis-Extinktionsprofile (Oberflächenplasmonextinktionspeak bei 520 nm) wie die wässrige Goldnanopartikelkolloidallösung. Siehe [Fig. 14A](#).

[0196] DNA wurde an die Nanopartikel-modifizierte Oberfläche angeheftet, durch Einweichen der Glaträger in 0,2 OD (1,7 μM)-Lösung, die frisch gereinigtes 3'-Thiololigonucleotid (3'-Thiol-ATGCTCAACTCT [SEQ ID NR:33]) enthielt (synthetisiert, wie beschrieben in Beispielen 1 und 3). Nach 12 Stunden Einwirkzeit wurden die Träger entfernt und mit Wasser gespült.

[0197] Um die Fähigkeit eines Analyt-DNA-Stranges zum Binden von Nanopartikeln an modifizierte Substrate darzustellen, wurde ein Bindeoligonucleotid vorbereitet. Das Bindeoligonucleotid (zubereitet wie beschrieben in Beispiel 2) war 24 bp lang (5' TACGAGTTGAGAATCCTGAATGCG [SEQ ID NR:34]) mit einer Sequenz, die ein 12 bp-Ende enthielt, das komplementär war zu der DNA, die bereits auf der Substratoberfläche (SEQ ID NR:33) adsorbiert worden war. Das Substrat wurde dann für 12 Stunden in einer Hybridisierungspufferlösung (0,5 M NaCl, 10 mM Phosphatpuffer pH 7) eingeweicht, die das Bindeoligonucleotid (0,4 CD, 1,7 μM) enthielt. Nach dem Entfernen und Spülen mit gleichem Puffer, wurde das Substrat in einer Lösung eingeweicht, die Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 13 nm enthielt, die mit einem Oligonucleotid (TAGGACTTACGC 5'-Thiol [SEQ ID NR:35]) modifiziert worden waren (zubereitet wie in Beispiel 3 beschrieben), das komplementär war zu dem unhybridisierten Bereich des Bindeoligonucleotids, das an das Substrat angeheftet war. Nach 12 Stunden Einweichen, wurde das Substrat entfernt und mit Hybridisierungspuffer gespült. Die Substratfarbe hatte sich nach Violett verdunkelt und die UV-vis Extinktion bei 520 nm hatte sich annähernd verdoppelt ([Fig. 14A](#)).

[0198] Um zu überprüfen, ob die Oligonucleotid-modifizierten Goldnanopartikel an die Oligonucleotid/Nanopartikel-modifizierten Oberflächen durch DNA-Hybridisierungsreaktionen mit dem Bindeoligonucleotid modifiziert wurden, wurde eine Schmelzkurve aufgenommen. Für das Schmelzexperiment wurde das Substrat in eine Kuvette, die 1 mL Hybridisierungspuffer enthielt, eingebracht und derselbe Apparat, wie er in Beispiel 2, Abschnitt B, verwendet wurde, verwendet. Das Extinktionssignal aufgrund der Nanopartikel (520 nm) wurde beobachtet, als die Temperatur des Substrats mit einer Rate von 0,5°C pro Minute erhöht wurde. Das Nanopartikelsignal fiel dramatisch, wenn die Temperatur 60°C passierte. Siehe [Fig. 14B](#). Ein erstes Derivat des Signals zeigte eine Schmelztemperatur von 62°C, was der Temperatur entspricht, die für die drei DNA-Sequenzen, die in Lösung ohne Nanopartikel hybridisierten gefunden wurde. Siehe [Fig. 14B](#).

Beispiel 7: Untersuchungen unter Verwendung von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten

[0199] Das Erfassungssystem, das in [Fig. 15](#) gezeigt ist, wurde so erstellt, dass die zwei Sonden 1 und 2 in einer Schwanz-zu-Schwanz-Anordnung auf dem komplementären Target 4 zu liegen kamen (siehe [Fig. 15](#)). Dies unterschied sich von dem System, wie es in Beispiel 5 beschrieben ist, wo die zwei Sonden aneinander angrenzend auf dem Targetstrang angeordnet waren (siehe [Fig. 12](#)).

[0200] Die Oligonucleotid-Goldnanopartikelkonjugate 1 und 2, wie sie in [Fig. 15](#) gezeigt sind, wurden wie in Beispiel 3 beschrieben zubereitet, mit der Ausnahme, dass die Nanopartikel in Hybridisierungspuffer (0,3 M NaCl, 10 mM Phosphat, pH 7) redispergiert wurden. Die Endkonzentration des Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugats wurde auf 13 nM geschätzt, durch Messen der Reduktion der Intensität auf dem Oberflächenplasmonband bei 522 nm, was zu der roten Farbe der Nanopartikel führte. Die Oligonucleotidtargets, wie sie in [Fig. 15](#) gezeigt sind, wurden von der Northwestern University Biotechnology Facility, Evanston, IL, erworben.

[0201] Wenn 150 μL an Hybridisierungspuffer, der 13 nM Oligonucleotid-Nanopartikelkonjugate 1 und 2 enthielt, mit 60 Picomol (6 μL) von Target 4 gemischt wurden, änderte sich die Farbe der Lösung unmittelbar von Rot nach Violett. Diese Farbänderung trat als ein Ergebnis der Bildung der langen Oligonucleotid-verbundenen polymeren Netzwerke von Goldnanopartikeln auf, was zu einer Rotverschiebung in der Oberflächenplasmonresonanz der Nanopartikel führte. Wenn die Lösung über 2 Stunden lange stehen konnte, wurden Ausfällungen von großen makroskopischen Aggregaten beobachtet. Eine "Schmelzanalyse" der Lösung mit den suspendierten Aggregaten wurde durchgeführt. Um die "Schmelzanalyse" durchzuführen, wurde die Lösung auf 1 mL mit

Hybridisierungspuffer verdünnt, und das optische Signal der Aggregate bei 260 nm wurde in Einminutenintervallen aufgezeichnet, wenn die Temperatur von 25°C bis 75°C mit einer Haltezeit von 1 Minute/Grad erhöht wurde. Gleichbedeutend mit einer Charakterisierung des Aggregats als Oligonucleotid-Nanopartikelpolymer wurde ein charakteristisch scharfer Übergang (komplette Breite bei halbem Maximum, $FW_{1/2}$ des ersten Derivats = 3,5°C) mit einer "Schmelztemperatur" (T_m) von 53,5°C beobachtet. Dies war gut vergleichbar mit der T_m , das mit dem breiteren Übergang, der für Oligonucleotide ohne Nanopartikel ($T_m = 54^\circ\text{C}$, $FW_{1/2} = \sim 13,5^\circ\text{C}$) beobachtet wurde. Die "Schmelzanalyse" der Oligonucleotidlösung ohne Nanopartikel wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Analyse mit Nanopartikeln ausgeführt, mit der Ausnahme, dass die Temperatur von 10-80°C erhöht wurde. Auch war die Lösung in jeder Oligonucleotidkomponente 1,04 μM .

[0202] Um die Selektivität des Systems zu testen, wurde die T_m für das Aggregat, das aus dem perfekten Komplement 4 der Sonden 1 und 2 gebildet wurde, mit der T_m für Aggregate, die aus Targets gebildet wurden, die keine Basenfehlpaarung, Deletion oder Insertion (**Fig. 15**) enthielten, verglichen.

[0203] Signifikant war, dass alle Goldnanopartikel-Oligonucleotidaggregate, die keine perfekten Targets enthielten, signifikante, messbare Destabilisierungen aufwiesen, im Vergleich zu Aggregaten, die aus perfekten Komplementen gebildet wurden, wie es durch die T_m -Werte für die unterschiedlichen Aggregate (siehe **Fig. 15**) belegt wurde. Die Lösungen, die die nicht perfekten Targets enthielten, konnten leicht durch ihre Farbe, wenn sie in ein Wasserbad eingebracht wurden, das auf 52,5°C gehalten wurde unterschieden werden von der Lösung, die die perfekten Komplemente enthielten. Diese Temperatur lag über der T_m der Polynucleotide mit Fehlpaarungen, so dass nur die Lösung mit den perfekten Targets eine violette Farbe bei dieser Temperatur aufwies. Eine "Schmelzanalyse" wurde auch an den Sondenlösungen ausgeführt, die die halbkomplementären Targets enthielten. Es wurde nur eine einminütige Erhöhung der Extinktion bei 260 nm beobachtet.

[0204] Als Nächstes wurden 2 μL (20 Picomol) jedes Oligonucleotidtargets (**Fig. 15**) zu einer Lösung, die 50 μL jeder Sonde (13 nM) in Hybridisierungspuffer enthielt zugegeben. Nach Stehen für 15 Minuten bei Raumtemperatur, wurden die Lösungen in ein temperaturkontrolliertes Wasserbad eingebracht und bei Temperaturen, wie in Tabelle 4 weiter unten angeführt, für fünf Minuten inkubiert. Eine 3 μL -Sonde jeder Reaktionsmischung wurde dann auf eine C-18 Silikaplatte aufgetupft. Zwei Kontrollexperimente wurden durchgeführt, um zu zeigen, dass die Ausrichtung der beiden Sonden auf dem Target notwendig war, um die Aggregation und damit die Farbänderung auszulösen. Das erste Kontrollexperiment bestand aus beiden Sonden 1 und 2 ohne Target. Das zweite Kontrollexperiment enthielt beide Sonden 1 und 2 mit einem Target 3, das komplementär war zu nur einer der Sondensequenzen (**Fig. 15**). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 weiter unten gezeigt. Rosafarbene Tupfen stellten einen negativen Test dar und blaue Tupfen einen positiven Test.

[0205] Es ist anzumerken, dass der kolorimetrische Übergang der über weniger als 1°C auftrat mit dem bloßen Auge nachgewiesen werden konnte, wodurch es leicht ist zwischen dem perfekten Target 4 und den Targets mit Fehlpaarungen (5 und 6) und Enddeletionen (7) und einer Einbaseninsertion an dem Punkt in dem Target, wo die zwei Oligonucleotidsonden sich trafen (8) zu unterscheiden (siehe Tabelle 4). Es ist anzumerken, dass der kolorimetrische Übergang T_c nahe an der Temperatur lag, aber nicht identisch war mit T_m . In beiden Kontrollen gab es keine Hinweise auf Partikelaggregation oder Instabilität in den Lösungen, was durch die Rosarote Farbe bewiesen wurde, die über alle Temperaturen beobachtet wurden, und sie zeigten negative Tupfen (Rosa) bei allen Temperaturen (Tabelle 4) in den Plattentests.

[0206] Die Beobachtung, dass die Einbaseninsertion Target 8 unterschieden werden konnte von dem vollständig komplementären Target 4, ist bemerkenswert, wegen der vollständigen Komplementarität des Insertionsstranges mit den beiden Sondensequenzen. Die Destabilisierung des Aggregats, das aus 8 und den Nanopartikelsonden gebildet wurde, scheint auf der Verwendung von zwei kurzen Sonden und dem Verlust der Base, die zwischen den zwei Thymidin-Basen gestapelt war, wo die Sondenschwänze sich treffen, wenn sie zu dem vollständig komplementären Target hybridisierten, zu beruhen. Ein ähnlicher Effekt wurde beobachtet, wenn das Target, das drei Basenpaar-Insertionen (CCC) enthielt, mit den Sonden unter vergleichbaren Bedingungen ($T_m = 51^\circ\text{C}$) hybridisiert wurde. In dem System, wie oben in Beispiel 5 beschrieben, konnten Baseninsertionen nicht von vollständig komplementären Targets unterschieden werden. Deshalb ist das System, wie es in diesem Beispiel beschrieben wurde, vorteilhaft für die Selektivität. Das System wies auch dieselbe Empfindlichkeit auf, wie die des Systems im beschriebenen Beispiel 5, die näherungsweise 10 Femtomol ohne Amplifikationstechniken betrug.

[0207] Die Ergebnisse zeigen, dass jede Basenfehlpaarung entlang des Targetstrangs zusammen mit jeder Insertion in den Targetstrang nachgewiesen werden kann. Wichtig ist, dass der Temperaturbereich, über den eine Farbänderung nachgewiesen werden kann, extrem scharf ist, und die Änderung über einen sehr engen

Temperaturbereich auftritt. Dieser scharfe Übergang lässt vermuten, dass hier ein hoher Grad an Kooperation in dem Schmelzprozess vorliegt, der das große Netzwerk der Kolloide umfasst, die durch die Targetoligonucleotidstränge gebunden sind. Das führt zu einer bemerkenswerten Selektivität, wie es die Daten zeigen.

Tabelle 4

Reaktanten (Sonden) + Target	Ergebnisse (Farbe)					
	RT	47,6°C	50,5°C	51,4°C	52,7°C	54,5°C
(1+2)	pink	pink	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa
(1+2)+3	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa
(1+2)+4	blau	blau	blau	blau	blau	Rosa
(1+2)+5	blau	blau	blau	Rosa	Rosa	Rosa
(1+2)+6	blau	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa
(1+2)+7	blau	blau	blau	blau	Rosa	Rosa
(1+2)+8	blau	blau	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa

Beispiel 8: Untersuchungen, unter Verwendung von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten

[0208] Ein Satz an Experimenten wurde durchgeführt, umfassend Hybridisierung mit "Füllstoff"-Duplexoligonucleotiden. Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate 1 und 2, wie in **Fig. 16** gezeigt, wurden mit Targets von unterschiedlicher Länge (24, 48 und 72 Basen in der Länge) und komplementären Füllstoffoligonucleotiden, wie in **Fig. 16** gezeigt, inkubiert. Die Bedingungen waren diejenigen, wie für Beispiel 7 beschrieben. Auch wurden die Oligonucleotide und Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugate zubereitet, wie in Beispiel 7 beschrieben.

[0209] Wie erwartet, wiesen die unterschiedlichen Reaktionslösungen nach der Hybridisierung unterschiedliche optische Eigenschaften auf, aufgrund der Abstandsabhängigkeit der optischen Eigenschaften der Goldnanopartikel. Siehe Tabelle 5 weiter unten. Wenn diese Lösungen jedoch auf eine C-18 DC-Platte aufgetupft wurden, entwickelte sich eine blaue Farbe während des Trocknens bei Raumtemperatur oder 80°C, ungeachtet der Länge des Targetoligonucleotids und des Abstandes zwischen den Goldnanopartikeln. Siehe Tabelle 5. Dies trat vermutlich auf, da der feste Träger die Aggregation der hybridisierten Oligonucleotid-Nanopartikelkonjugate amphifiziert. Dies zeigt, dass durch Betupfen von Lösungen auf die DC-Platte der Abstand zwischen den Goldnanopartikeln wesentlich sein kann (mindestens 72 Basen) und der kolorimetrische Nachweis immer noch möglich ist.

Tabelle 5

Targetlänge	Ergebnisse (Farbe)	
	Lösung	DC-Platte
24 Basen	blau	blau
48 Basen	Rosa	blau
72 Basen	Rosa	blau
Nur Sonden 1+2	Rosa	Rosa

[0210] Die Farbänderungen, die in diesem und anderen Beispielen beobachtet wurden, traten auf, wenn der Abstand zwischen den Goldnanopartikeln (Interpartikelabstand) näherungsweise derselbe oder weniger war, als der Durchmesser der Nanopartikel. So wird die Größe der Nanopartikel, die Größe der Oligonucleotide, die an sie angeheftet sind, und die Beabstandung der Nanopartikel, wenn sie mit Targetnucleinsäuren hybridisiert sind, bestimmen, ob eine Farbänderung beobachtet werden kann, wenn die Oligonucleotid-Nanopartikelkonjugate mit den Nucleinsäuretargets hybridisieren, um Aggregate zu bilden. Zum Beispiel werden Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 13 nm eine Farbänderung erzeugen, wenn sie unter Verwendung von Oli-

gonucleotiden, die an Nanopartikel angeheftet sind, aggregiert sind, die erstellt sind, um mit Zielsequenzen von 10-35 Nukleotiden in der Länge zu hybridisieren. Die Beabstandung der Nanopartikel, wenn sie mit einer Ziel-nukleinsäure hybridisiert sind, reicht aus, eine Farbänderung zu ergeben, die, wie die Ergebnisse zeigen, mit dem Ausmaß an Aggregation variieren wird. Die Ergebnisse lassen auch vermuten, dass die feste Oberfläche die weitere Aggregation von bereits aggregierten Sonden erhöht, was die Goldnanopartikel näher zueinander bringt.

[0211] Die Farbänderung, die mit Goldnanopartikeln beobachtet wird, resultiert aus einer Verschiebung und Vergrößerung der Oberflächenplasmonresonanz von Gold. Diese Farbänderung ist für Goldnanopartikel bei weniger als etwa 4 nm im Durchmesser unwahrscheinlich, denn die Längen der Oligonucleotide, die für den spezifischen Nachweis der Nukleinsäure notwendig sind, würde den Nanopartikeldurchmesser vergrößern.

Beispiel 9: Untersuchungen, unter Verwendung von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten

[0212] Fünf Mikroliter jeder Sonde 1 und 2 (**Fig. 12**) wurden mit einer Endkonzentration von 0,1 M NaCl mit Puffer (10 mM Phosphat, pH 7) zusammengefügt und 1 Mikroliter menschlicher Urin wurde zu der Lösung zugegeben. Wenn diese Lösung eingefroren, aufgetaut und dann auf eine C-18 DC-Platte aufgetupft wurde, entwickelte sich keine blaue Farbe. Zur selben Lösung, die 12,5 Mikroliter einer jeden Sonde und 2,5 Mikroliter von menschlichem Urin enthielt wurden 0,25 Mikroliter (10 Picomol) von Target 3 (**Fig. 12**), zugegeben. Die Lösung wurde gefroren, aufgetaut und dann auf eine C-18 DC-Platte aufgetupft und ein blauer Tupfen wurde erhalten.

[0213] Ähnliche Experimente wurden mit menschlichem Speichel durchgeführt. Eine Lösung, die 12,5 Mikroliter der Sonden 1 und 2 und 0,25 Mikroliter von Target 3 enthielt, wurde auf 70°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 2,5 Mikroliter einer Speichellösung (menschlicher Speichel 1:10 verdünnt mit Wasser) wurde zugegeben. Nachdem die erhaltene Lösung gefroren, aufgetaut und auf eine C-18 DC-Platte aufgetupft worden war, wurde ein blauer Tupfen erhalten, der die Hybridisierung der Sonden mit dem Target zeigte. In Kontrollexperimenten ohne Targetzugabe wurden keine blauen Tupfen beobachtet.

Beispiel 10: Untersuchungen unter Verwendung von Nanopartikel-Oligonucleotidkonjugaten

[0214] Eine Untersuchung wurde ausgeführt, wie in **Fig. 13A** gezeigt. Als erstes wurden Glasmikroskopträger, erworben von Fisher scientific, in näherungsweise 5 × 15 mm-Stücke geschnitten, unter Verwendung eines Ritzstiftes mit Diamantspitze. Die Träger wurden gereinigt durch Einweichen für 20 Minuten in einer Lösung von 4:1 H₂SO₄:H₂O₂ bei 50°C. Die Träger wurden dann mit ausgiebigen Mengen an Wasser, dann Ethanol gespült und im trockenen Stickstoffstrom getrocknet. Thiol-modifizierte DNA wurde auf die Träger unter Verwendung eines modifizierten Verfahrens adsorbiert, das in der Literatur beschrieben ist (Chrisey et al., *Nucleic Acids Res.*, 24, 3031-3039 (1996) und Chrisey et al., *Nucleic Acids Res.*, 24, 3040-3047 (1996)). Als erstes wurden die Träger in eine 1%-ige Lösung von Trimethoxysilylpropyldiethyltriämin (DETA, erworben von United Chemical Technologies, Bristol, PA) in 1 mM Essigsäure in Nanopure Wasser für 20 Minuten bei Raumtemperatur eingeweicht. Die Träger wurden mit Wasser und dann mit Ethanol gespült. Nach dem Trocknen im trockenen Stickstoffstrom wurden die Träger bei 120°C für 5 Minuten unter Verwendung eines temperaturkontrollierten Heizblocks gebacken. Die Träger wurden abkühlen gelassen, dann wurden sie in eine 1 mM Succinimidyl-4-(maleimidophenyl)-butyrat (SMPB, erworben von Sigma Chemicals)-Lösung in 80:20 Methanol:Dimethoxysulfoxid für 2 Stunden bei Raumtemperatur eingebracht. Nach dem Entfernen der SMPB-Lösung und Spülen mit Ethanol, wurden Aminstellen, die nicht an den SMPB-Querverbinder gekoppelt waren, wie folgt gedeckelt. Als erstes wurden die Träger für 5 Minuten in einer 8:1 THF:Pyridinlösung, die 10% 1-Methylimidazol enthielt, eingeweicht. Dann wurden die Träger in eine 9:1 THF:Essigsäureanhydridlösung für fünf Minuten eingeweicht. Diese Lösungen wurden von Glen Research, Sterling, VA, erworben. Die Träger wurden mit THF, dann Ethanol und schließlich Wasser gespült.

[0215] DNA wurde an die Oberflächen angeheftet, durch Einweichen der modifizierten Glasträger in einer 0,2 OD (1,7 µM)-Lösung, die frisch gereinigtes Oligonucleotid (3' Thiol ATGCTCAACTCT [SEQ ID NR:33]) enthielt. Nach 12 Stunden Einbringungszeit wurden die Platten entfernt und mit Wasser gespült.

[0216] Um die Fähigkeit eines Analyt-DNA-Stranges, Nanopartikel an modifiziertes Substrat zu binden, zu darzustellen, wurde ein Bindeoligonucleotid zubereitet. Das Bindeoligonucleotid war 24 bp lang (5' TAC-GAGTTGA GAATCCTGAATGCG [SEQ ID NR:34]) mit einer Sequenz, die ein 12 bp-Ende enthielt, das komplementär war zu der DNA, die bereits auf der Substratoberfläche adsorbiert war. Das Substrat wurde dann in einer Hybridisierungspufferlösung (0,5 M NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7), die das Bindeoligonucleotid (0,4

OD, 1,7 μM) enthielt für 12 Stunden eingeweicht. Nach dem Entfernen und Spülen mit dem gleichen Puffer, wurde das Substrat in einer Lösung eingeweicht, die Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 13 nm enthielt, die mit einem Oligonucleotid (TAGGACTTACGC 5' Thiol [SEQ ID NR:35]), das komplementär war zu dem unhybridisierten Bereich des Bindeoligonucleotids, das an das Substrat angeheftet war, modifiziert waren. Nach 12 Stunden Einweichen wurde das Substrat entfernt und mit Hybridisierungspuffer gespült. Die Farbe des Glassubstrats hatte sich von klar und farblos zu einer transparenten Rosa Farbe verändert. Siehe [Fig. 19A](#).

[0217] Zusätzliche Lagen von Nanopartikeln wurden zu den Trägern, durch Einweichen der Träger in einer Lösung von Bindeoligonucleotid, wie oben beschrieben, zugegeben und dann Einweichen in einer Lösung, die Goldnanopartikel von 13 nm enthielt, die Oligonucleotide aufwies (3' Thiol ATGCTCAACTCT [SEQ ID NR:33]), die daran angeheftet waren. Nach Einweichen für 12 Stunden wurden die Träger aus der Nanopartikelösung entfernt und gespült und in einem Hybridisierungspuffer wie oben beschrieben eingeweicht. Die Farbe der Träger war bemerkbar mehr rot geworden. Siehe [Fig. 19A](#). Eine letzte Nanopartikelschicht wurde zugegeben durch Wiederholen der Bindungsoligonucleotid und Nanoartikelquellprozedur, unter Verwendung von 13 nm Goldpartikeln, die mit einem Oligonucleotid (TAGGACTTACGC 5' Thiol [SEQ ID NR:35]) als letzte Nanopartikelschicht modifiziert worden waren. Wieder hatte sich die Farbe verdunkelt und die UV-vis-Extinktion bei 520 nm war erhöht. Siehe [Fig. 19A](#).

[0218] Um sicherzustellen, dass die Oligonucleotid-modifizierten Goldnanopartikel an die Oligonucleotid-modifizierte Oberfläche durch DNA-Hybridisierungsinteraktion mit dem Bindungsoligonucleotid angeheftet wurden, wurden Schmelzkurven aufgenommen. Für das Schmelzexperiment wurde ein Träger in einer Küvette, die 1,5 mL Hybridisierungspuffer enthielt, eingelegt und ein ähnlicher Apparat, wie derjenige, der in Beispiel 2, Abschnitt D, verwendet wurde, wurde verwendet. Das Extinktionssignal aufgrund der Nanopartikel (520 nm) wurde bei jedem Grad aufgenommen, als die Temperatur des Substrats von 20°C bis 80°C mit einer Haltezeit von 1 Minute bei jedem ganzzahligen Grad erhöht wurde. Das Extinktionssignal der Nanopartikel fiel dramatisch, wenn die Temperatur 52°C überstieg. Siehe [Fig. 19B](#). Ein erstes Derivat des Signals zeigte eine Schmelztemperatur von 55°C, was der Temperatur entspricht, wie sie für die Oligonucleotid-Nanopartikelkonjugate und Bindeoligonucleotide, die in Lösung hybridisiert wurden, erhalten wurde. Siehe [Fig. 19B](#).

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER: Mirkin, Chad A.
Letsinger, Robert L.
Mucic, Robert C.
Storhoff, James J.
Elghanian, Robert

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Nanopartikel mit angehängten
Oligonucleotiden und Methoden zu ihrer Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 35

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) NAME: Sheridan Ross P.C.
(B) STRASSE: 1700 Lincoln Street, Suite 3500
(C) ORT: Denver
(D) LAND: Colorado
(E) STAAT: USA
(F) ZIP: 08203

(v) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi) ANGABEN ZUR ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER:
(B) ANMELEDEDATUM:
(C) KLASSIFIKATION:

(viii) ANGABEN ZUM ANWALT:

(A) NAME: Crook, Wannell M.
(B) REGISTRERNUR: 31,071
(C) REFERENZ/LISTENNR: 3501-14-PCT

(ix) TELEKOMMUNIKATIONS DATEN:

(A) TELEFON: (303) 863-9700
(B) TELEFAX: (303) 863-0223

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nucleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: Linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AAACGACTCT AGCGCGTATA

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

ATGGCAACTA TACGCGCTAG

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 16 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CCTTGAGATT TCCCTC

16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 16 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GAGGGAAATC TCAAGG

16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

AACTTGCGCT AATGCCGA

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AAGTTGCGCT TTACGGCTAA TGCCGA

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

TCTCCTTCCC TTTC

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GAAAAGGGAA GGAGA

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CTTTTCCCTT CCTCT

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

AAACGACTCT AGCGCGTATA GTTGCCAT

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

ATGGCAACTA TACGCGCTAG AGTCGTTT

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

CCTATCGACC ATGCT

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

AGCATGGTCC ATAGGAAACG ACTCTAGCGC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

GCGCTAGAGT CGTTT

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

AGCATGGTCC ATAGGATGGC AACTATACGC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

GTCGATAGGA AACGACTCTA GCGC

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

AGCATGGTTG ATAGGAAACG ACTCTAGCGC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

AGCATGTTTG ATAGGAAACG ACTCTAGCGC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 12 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

TCTCAACTCG TA

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 12 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

CGCATTGAGG AT

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

TACGAGTTGA GAGAGTCCCC ACAT

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

TACGAGTTGA GAATCCTGAA TGCG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

TACGAGTTGA GAATCCTGAA TGCT

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

TACGAGTTGA GACTCCTGAA TGCG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

TACGAGTTGA GAATCCTGAA TGC

23

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

TACGAGTTGA GACATCCTGA ATGCG

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

TACGAGTTGA GAATCCTGAA TGCG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

CGCATTGAGG AT

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

TACGAGTTGA GACCGTTAAG ACGAGGCAAT CATGCAATCC TGAATGCG**48**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

TGCATGATTG CCTCGTCTTA ACGG**24**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 72 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

TACGAGTTGA GACCGTTAAG ACGAGGCAAT CATGCATATA TTGGACGCTT TACGGACAAC**60****ATCCTGAATG CG****72**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

GTTGTCCGTA AAGCGTCCAA TATATGCATG ATTGCCTCGT CTTAACGG**48**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 12 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

TCTCAACTCG TA**12**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

TACGAGTTGA GAATCCTGAA TGCG**24**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 12 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Andere Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "hypothetisch"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

CGCATTGAGG AT**12****Patentansprüche**

1. Verfahren zum Erfassen eines Nucleinsäure-Targets mit zumindest zwei Bereichen, umfassend:

Vorsehen eines oder mehrerer Typen von Goldnanopartikeln mit daran angehefteten Oligonukleotiden, wobei die Oligonukleotide eine Sequenz aufweisen, die komplementär zu den Sequenzen von zwei oder mehr Bereichen des Nukleinsäure-Targets sind, und die Nanopartikel eine Größe von 5 bis 150 nm aufweisen; Kontaktaufnahme des Nukleinsäure-Targets und der Nanopartikel unter Bedingungen, die wirksam sind, eine Hybridisierung der Oligonukleotide auf den Nanopartikeln mit dem Nukleinsäure-Target zu ermöglichen; und Beobachten einer erfassbaren Farbänderung aufgrund der Interaktion zwischen den Nanopartikeln, die durch Hybridisierung der Oligonukleotide auf den Nanopartikeln mit dem Nukleinsäure-Target angenähert wurden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, umfassend:

Vorsehen von zumindest zwei Typen von Nanopartikeln mit daran angehefteten Oligonukleotiden, wobei die Oligonukleotide auf dem ersten Typ von Nanopartikeln eine Sequenz aufweisen, die komplementär zu einem ersten Bereich der Sequenz des Nukleinsäure-Targets ist, wobei die Oligonukleotide auf dem zweiten Typ von Nanopartikeln eine Sequenz aufweisen, die komplementär zu einem zweiten Bereich der Sequenz des Nukleinsäure-Targets ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, umfassend:

Vorsehen zumindest eines Typs von Nanopartikeln mit daran angehefteten Oligonukleotiden, wobei die Oligonukleotide Sequenzen aufweisen, die zu verschiedenen Bereichen des Nukleinsäure-Targets komplementär sind.

4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Kontaktbedingungen Einfrieren und Auftauen beinhalten, oder wobei die Kontaktbedingungen Erwärmen beinhalten.

5. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die erfassbare Änderung auf einer festen Oberfläche beobachtet wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, wobei die erfassbare Änderung eine Farbveränderung ist, die mit bloßem Auge beobachtbar ist.

7. Verfahren nach Anspruch 2, wobei:

das Nukleinsäure-Target einen dritten Bereich aufweist, der zwischen dem ersten und dem zweiten Bereich liegt, und die Sequenzen der Oligonukleotide auf den Nanopartikeln keine Sequenzen umfassen, die komplementär zu diesem dritten Bereich des Nukleinsäure-Targets sind; und

das Nukleinsäure-Target ferner mit einem Füll-Oligonukleotid in Kontakt gelangt, das eine Sequenz aufweist, die komplementär zu diesem dritten Bereich des Nukleinsäure-Targets ist, wobei die Kontaktierung unter Bedingungen stattfindet, die wirksam sind, eine Hybridisierung des Füll-Oligonukleotids mit dem Nukleinsäure-Target zu ermöglichen.

8. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Nukleinsäure-Target eine Virus-RNA oder Virus-DNA, ein mit einer Krankheit verbundenes Gen, eine bakterielle DNA, eine Pilz-DNA, eine synthetische DNA, eine synthetische RNA, eine strukturmodifizierte natürliche oder synthetische RNA oder eine strukturmodifizierte natürliche oder synthetische DNA ist.

9. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Nukleinsäure-Target aus einer biologischen Quelle stammt.

10. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Nukleinsäure-Target ein Produkt einer Polymerase-Kettenreaktion-Verstärkung ist.

11. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Nukleinsäure-Target ein Fragment ist, das durch Spaltung der DNA mit einem Restriktionsenzym erhalten wurde.

12. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Nukleinsäure-Target gleichzeitig mit dem ersten und dem zweiten Typ der Nanopartikel in Kontakt gelangt.

13. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Nukleinsäure-Target mit den Oligonukleotiden auf dem ersten Typ der Nanopartikel in Kontakt gelangt und hybridisiert wird, bevor es mit dem zweiten Typ der Nanopartikel in Kontakt gelangt.

14. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der erste Typ der Nanopartikel an einem Substrat anhaftet.

15. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die unterschiedlichen Bereiche des Nukleinsäure-Targets eine sich wiederholende Sequenz aufweisen.

16. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die unterschiedlichen Bereiche des Nukleinsäure-Targets verschiedene Sequenzen aufweisen.

Es folgen 22 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

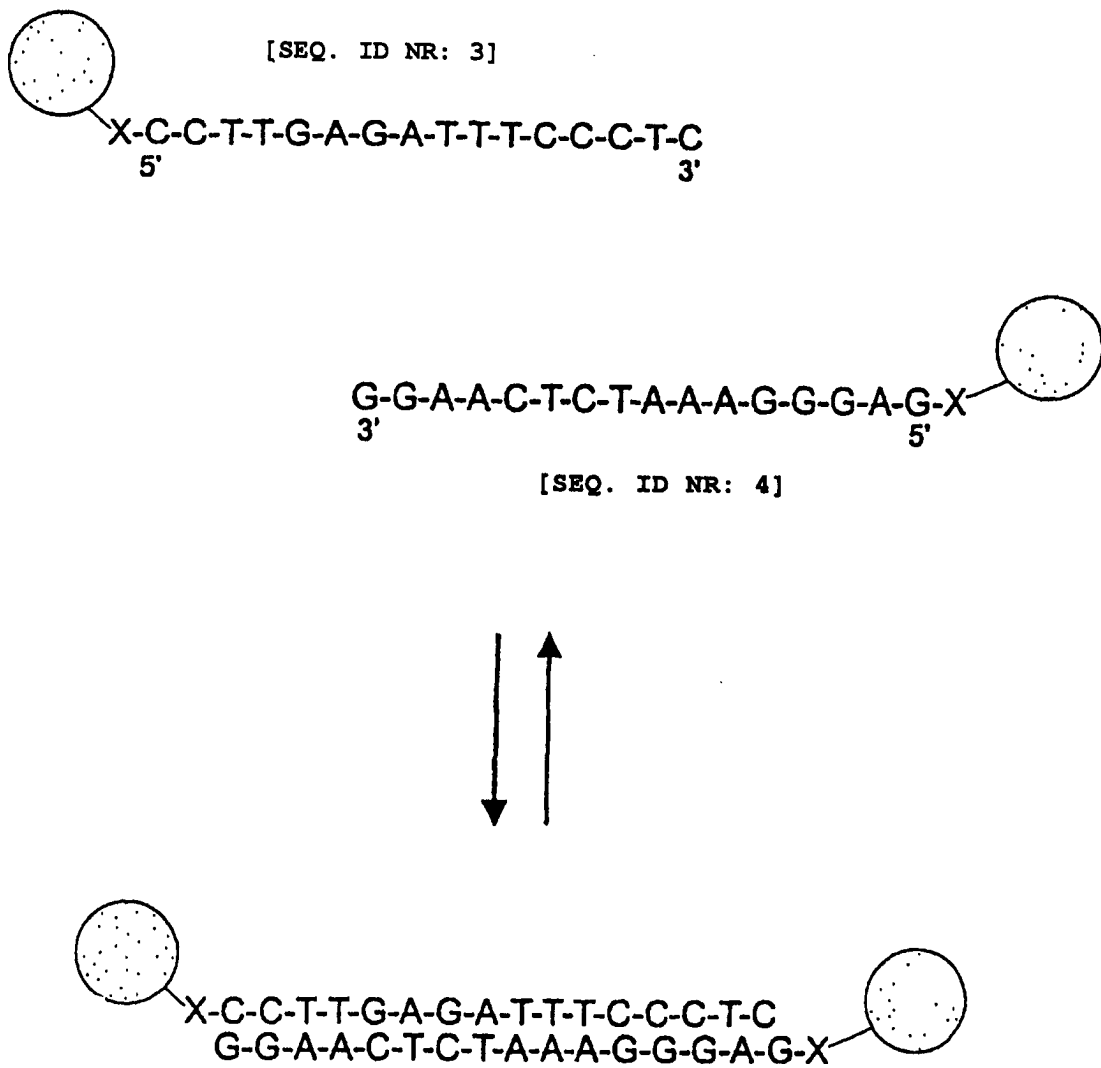


FIG.2

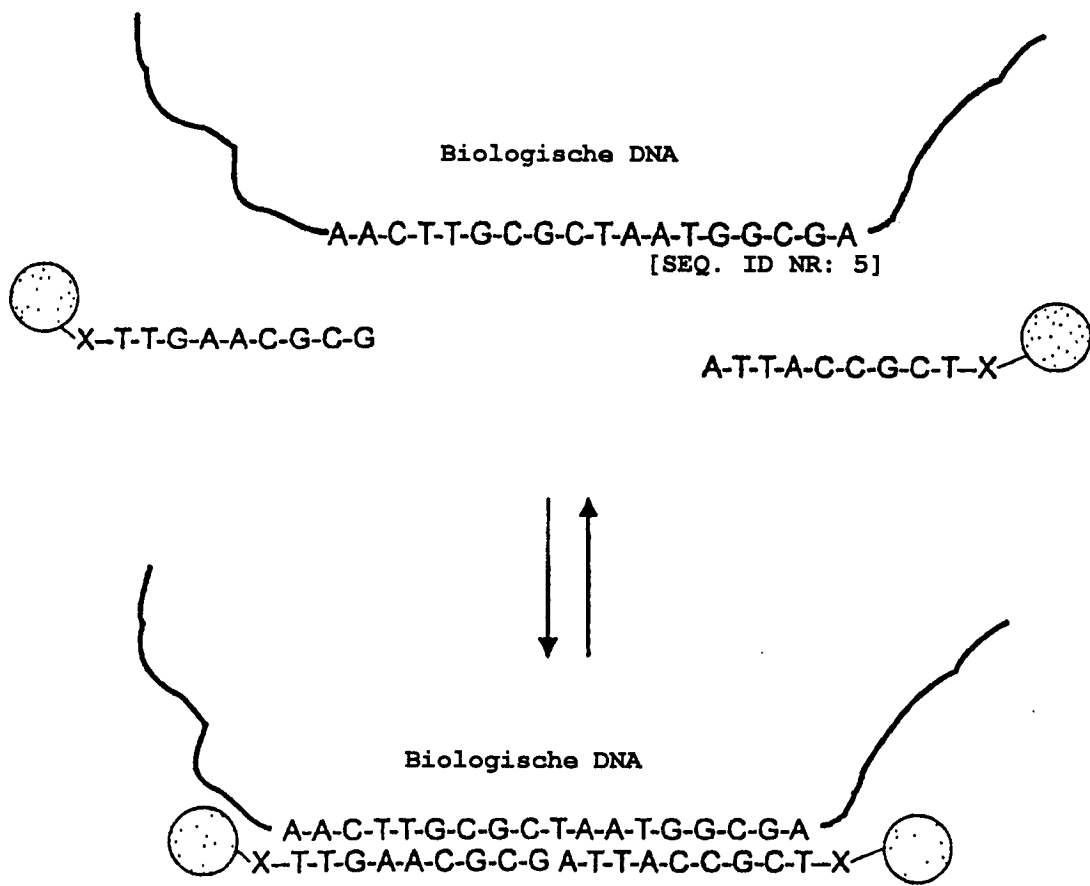


FIG.3

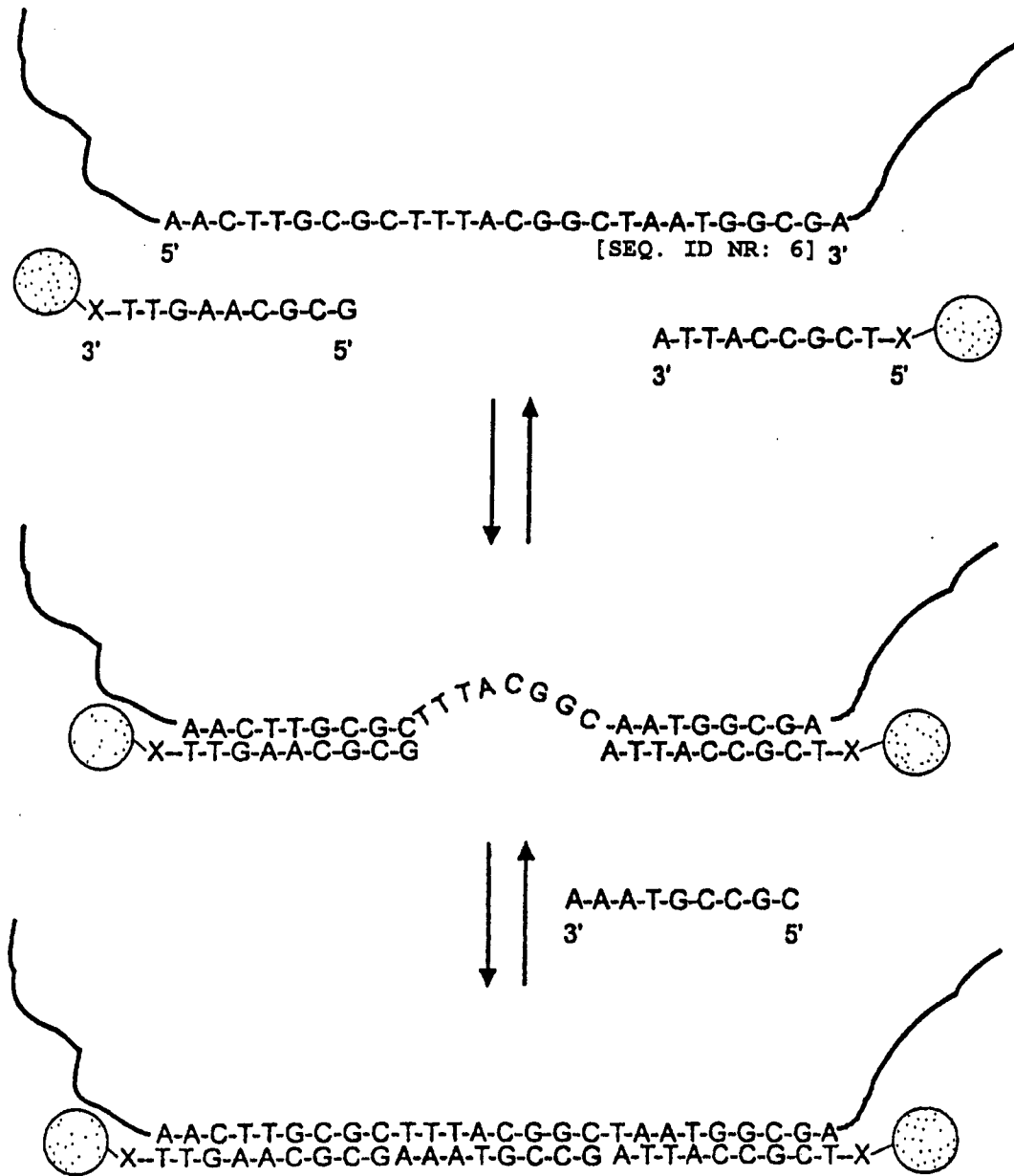
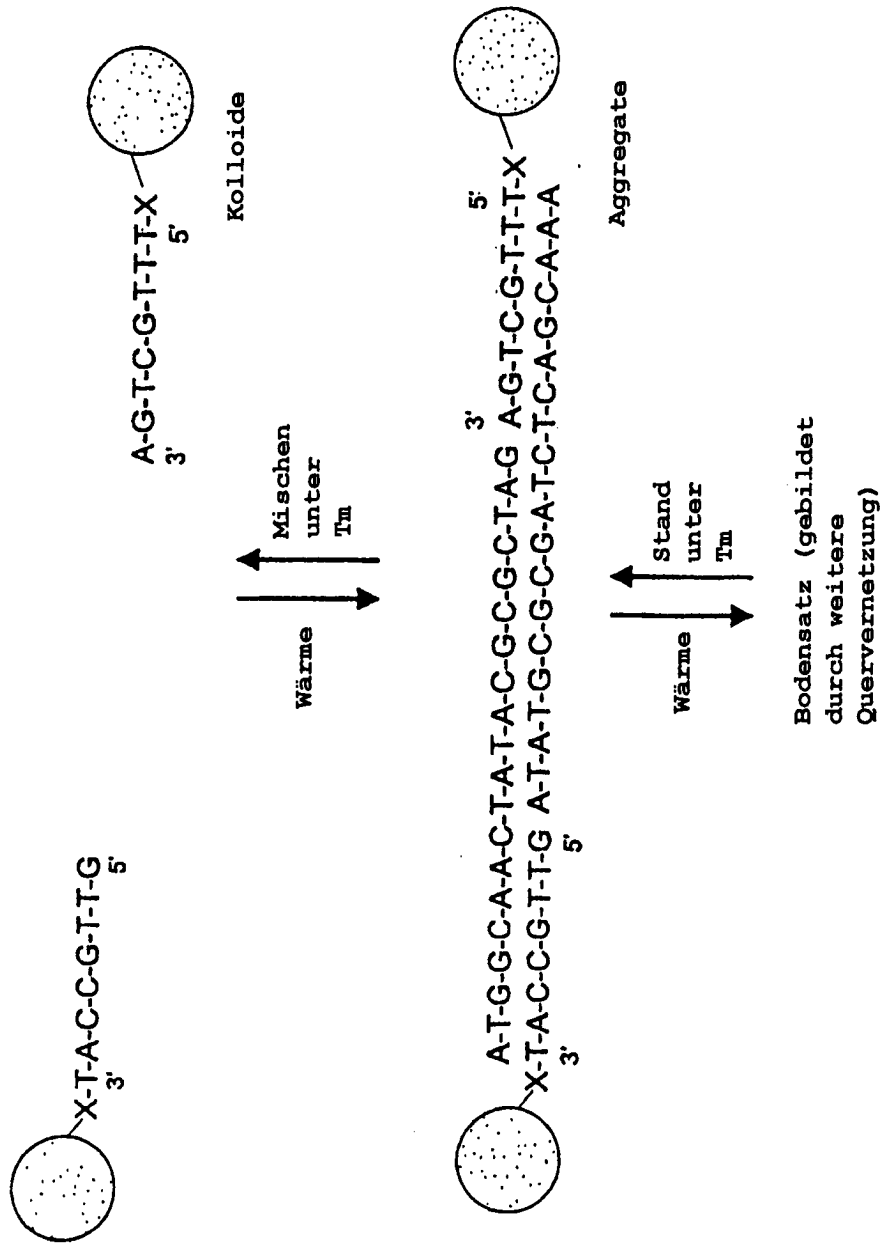
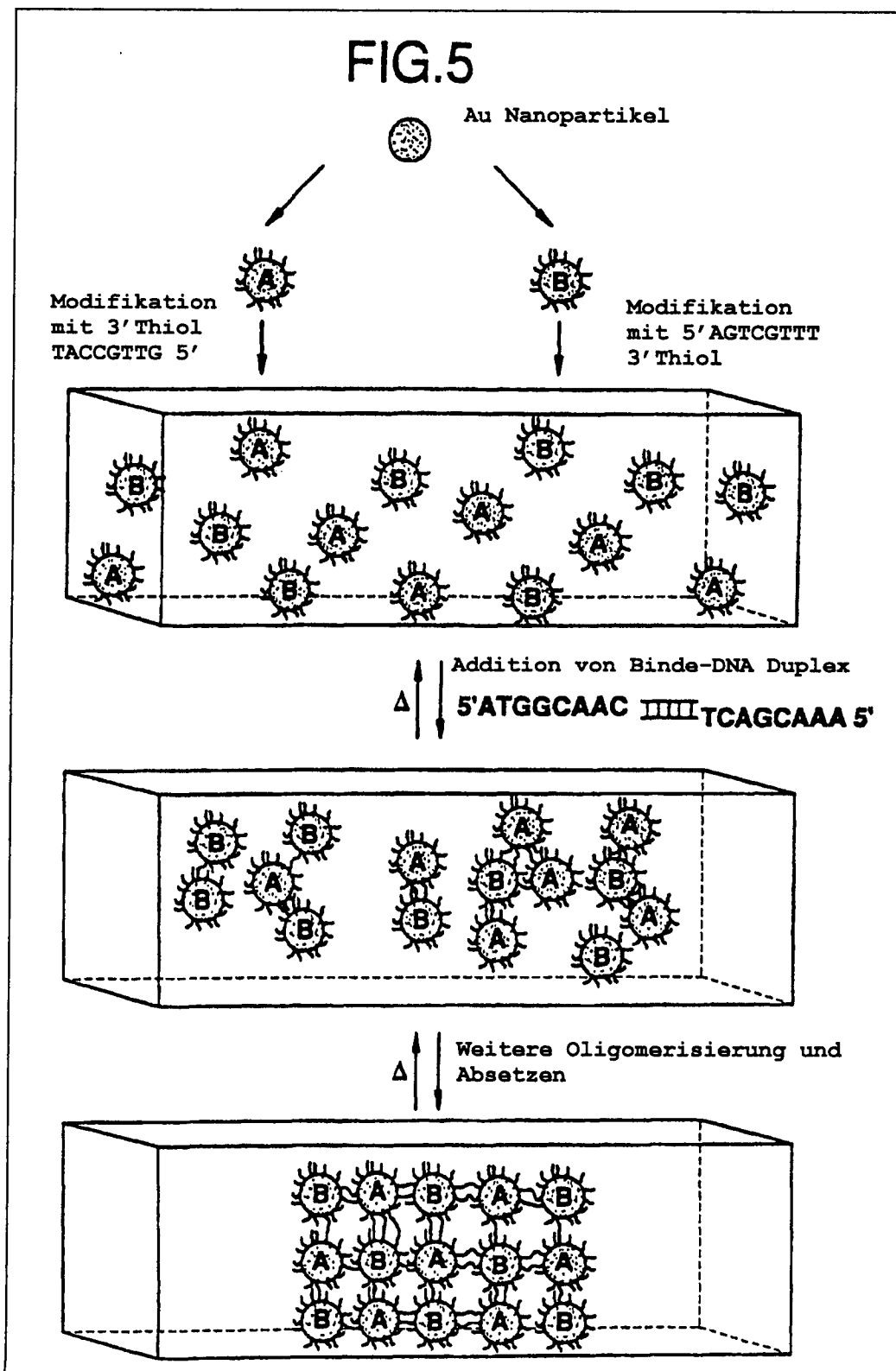


FIG.4 5' A-T-G-G-C-A-A-C-T-A-T-A-C-G-C-G-C-T-A-G 3' Bindeoligonucleotid
 A-T-A-T-G-C-G-C-G-A-T-C-T-C-A-G-C-A-A-A 3' 5'
 [SEQ. ID NR: 2] [SEQ. ID NR: 1]





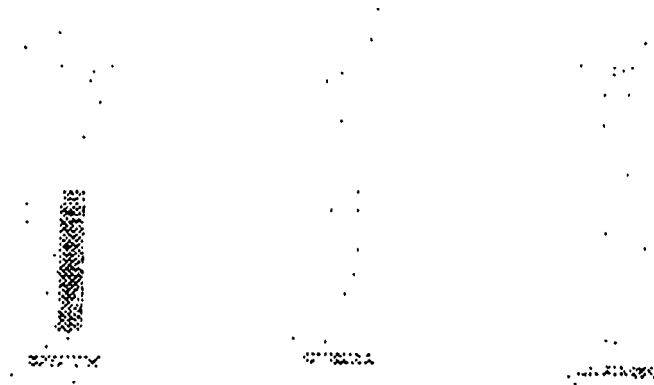
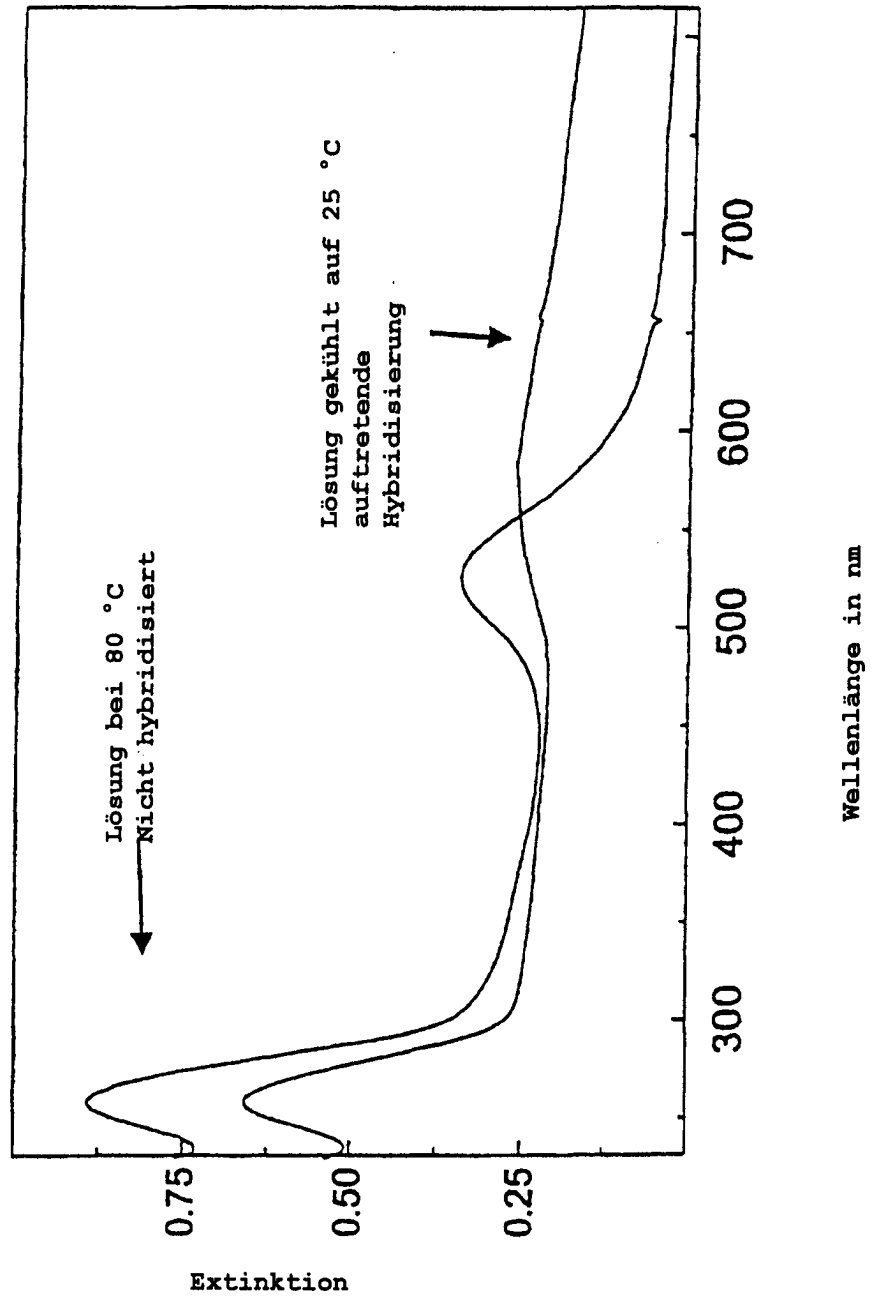
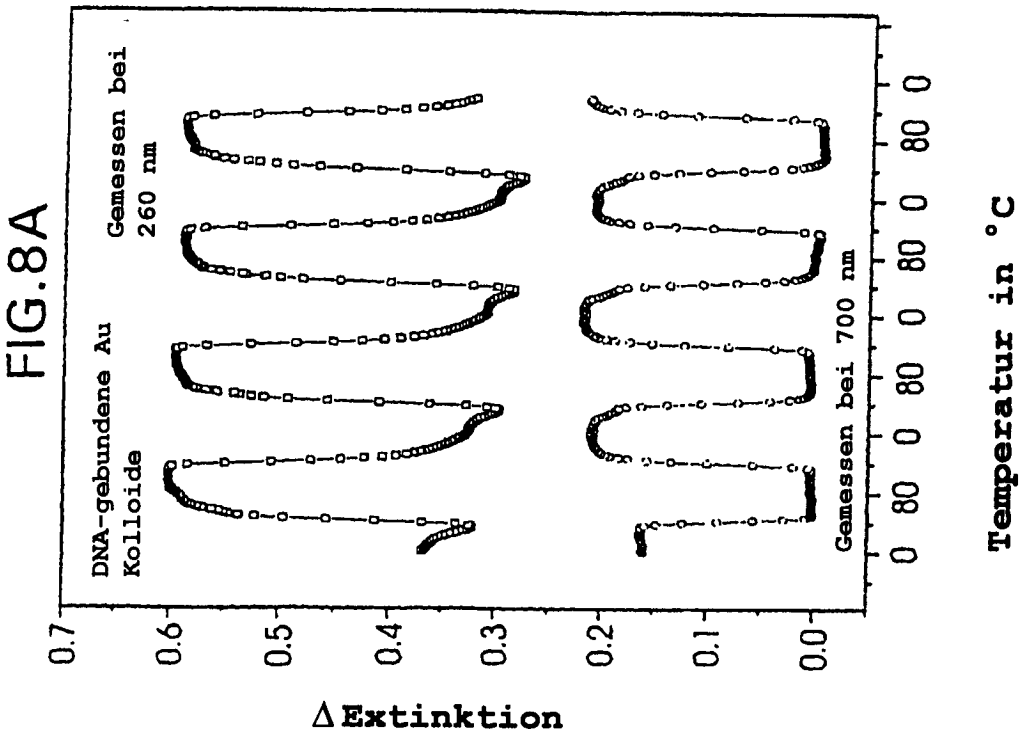
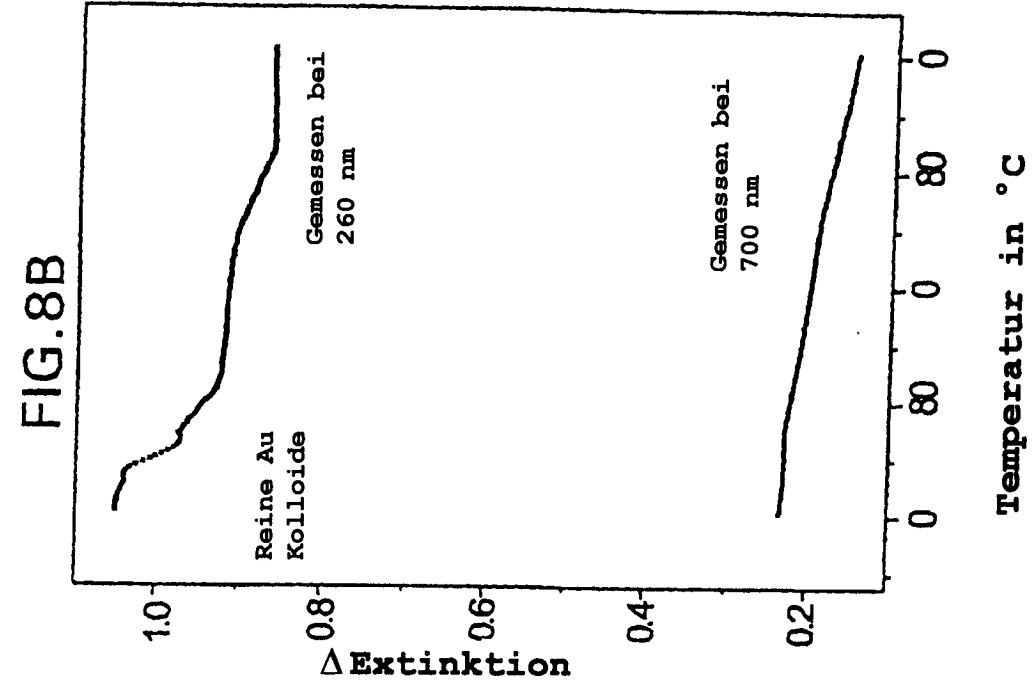


FIG. 6A FIG. 6B FIG. 6C

FIG.7





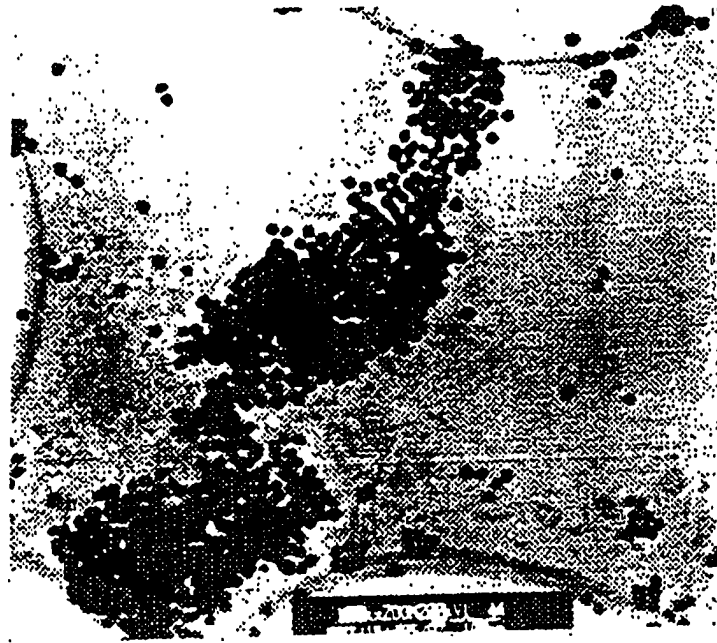


FIG.9A

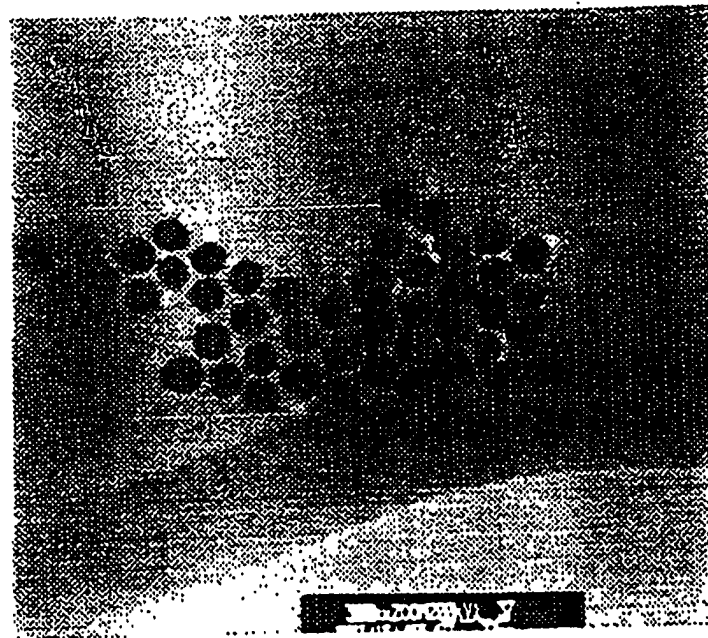


FIG.9B

FIG. 10

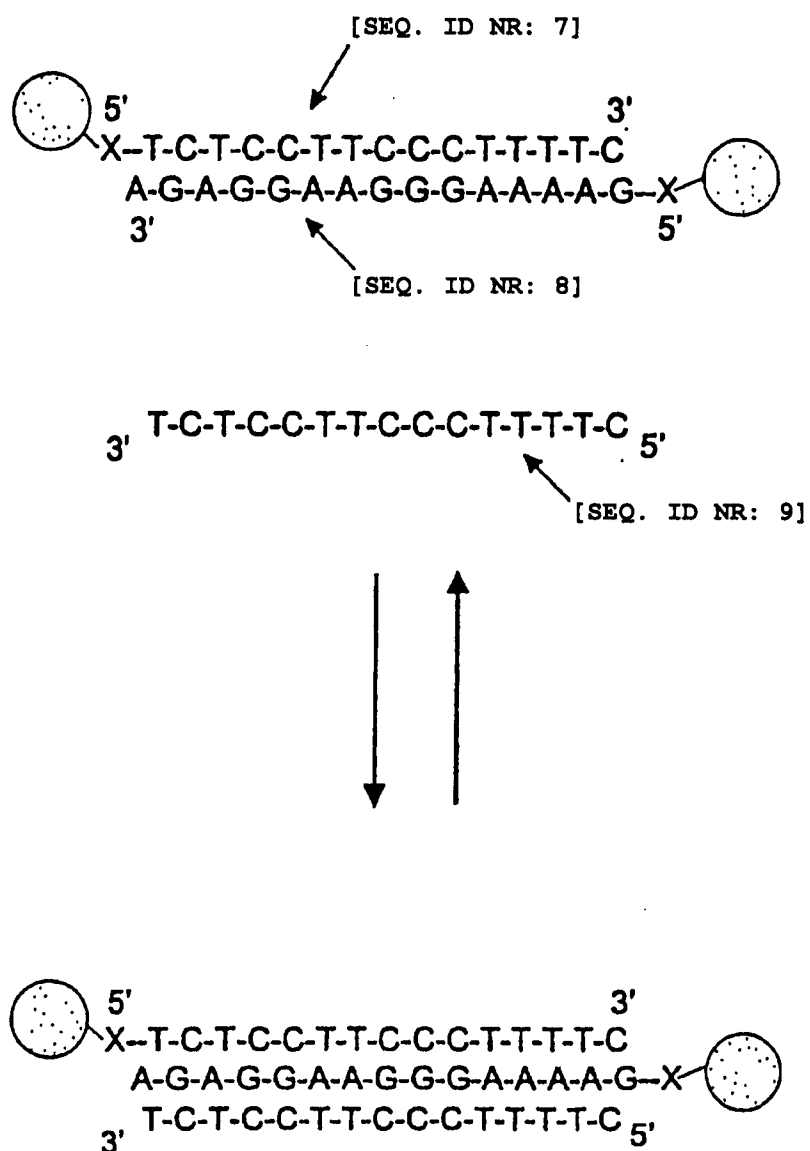


FIG. 11

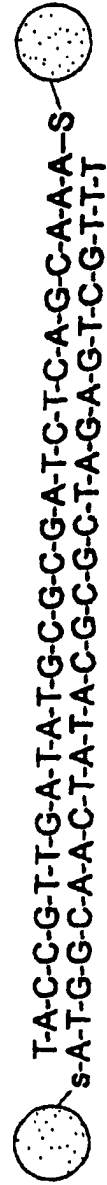
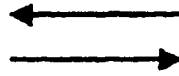
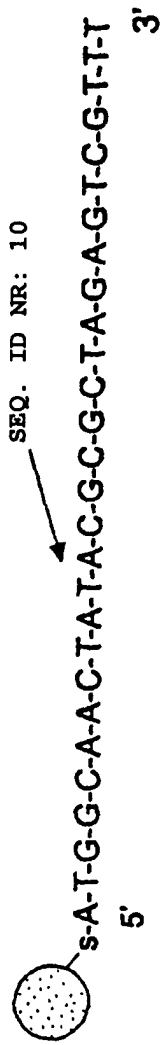


FIG. 12A

Komplementär-Target

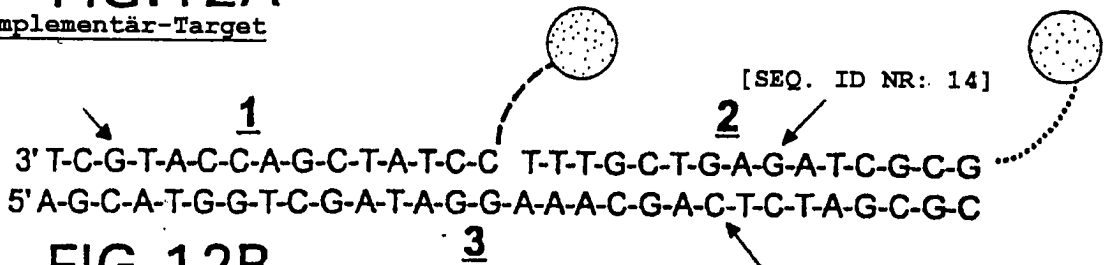


FIG. 12B

Sonden ohne Target



FIG. 12C

Halb-komplementäres Target

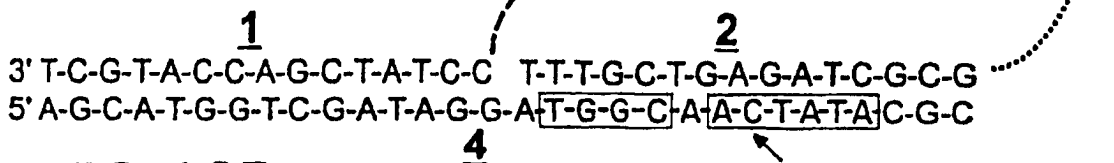


FIG. 12D

Target-6 bp

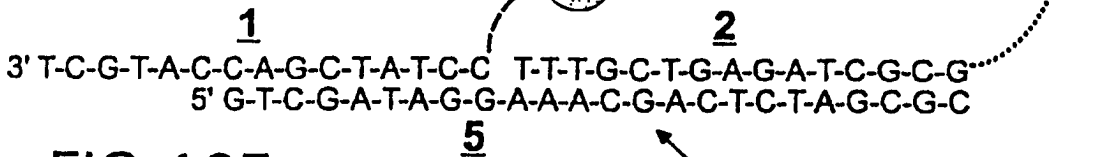


FIG. 12E

Ein-bp-Fehlpaarung

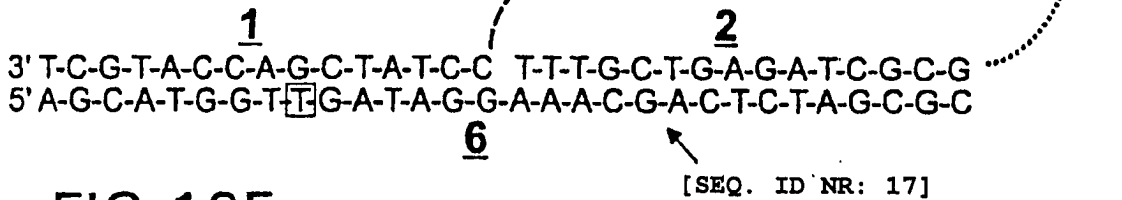


FIG. 12F

Zwei-bp-Fehlpaarung

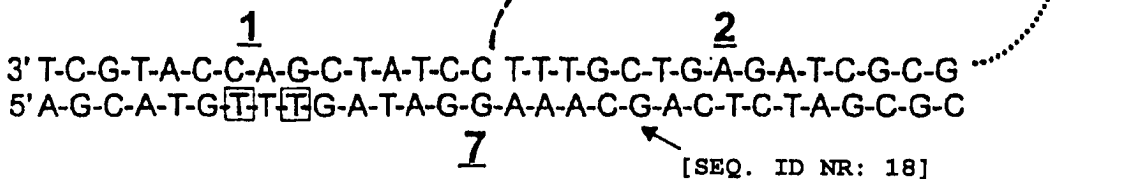


FIG.13A

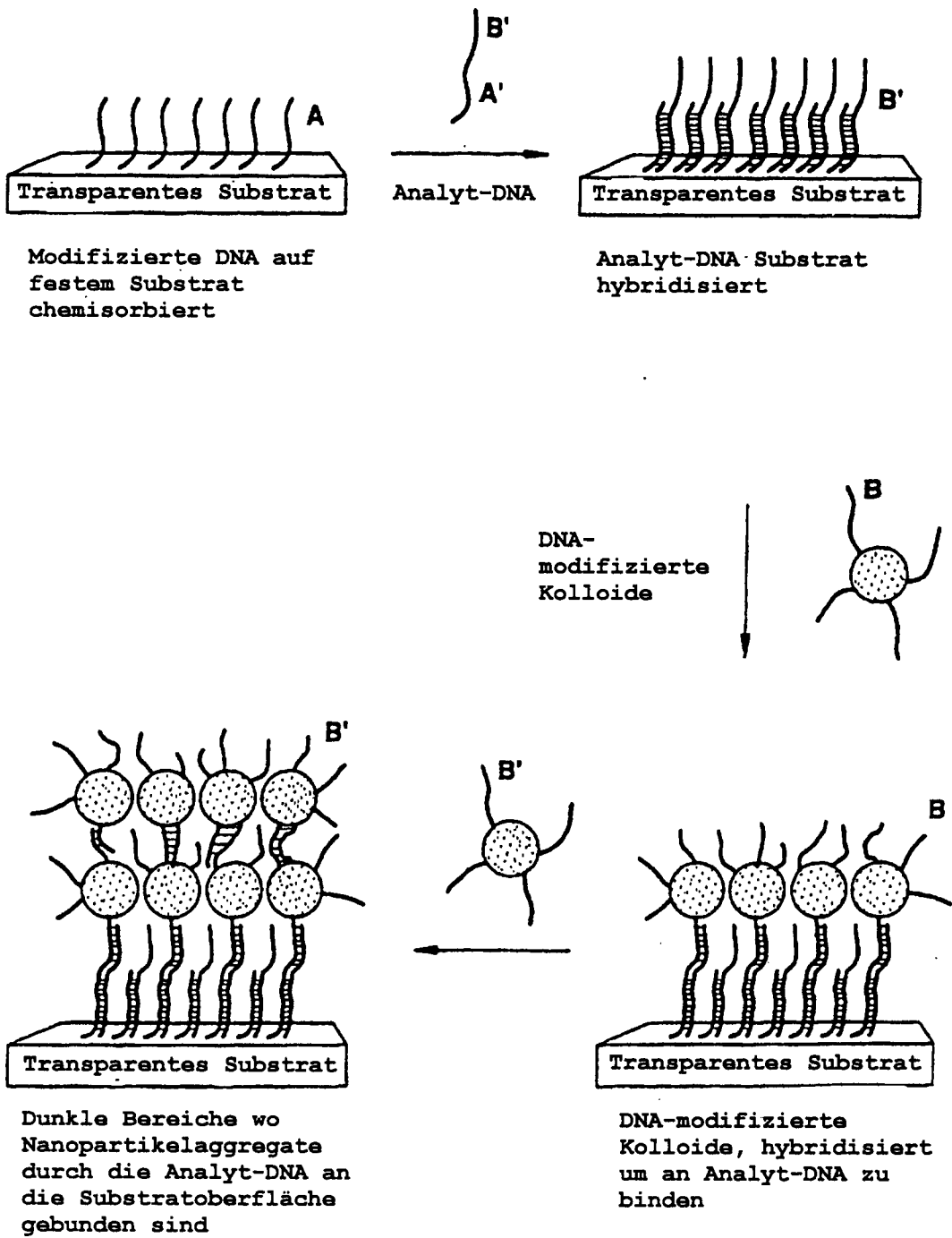


FIG.13B

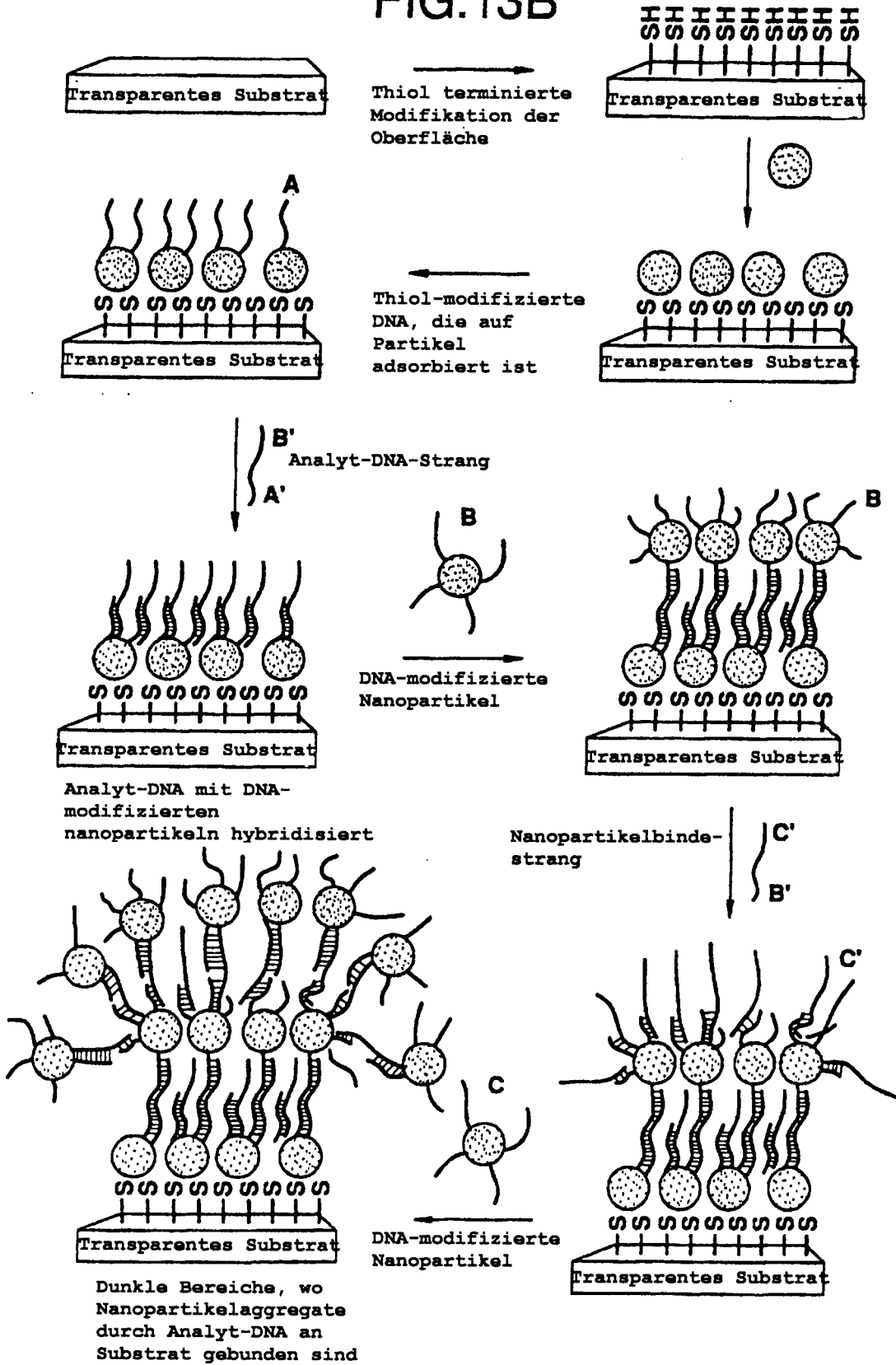


FIG.14A

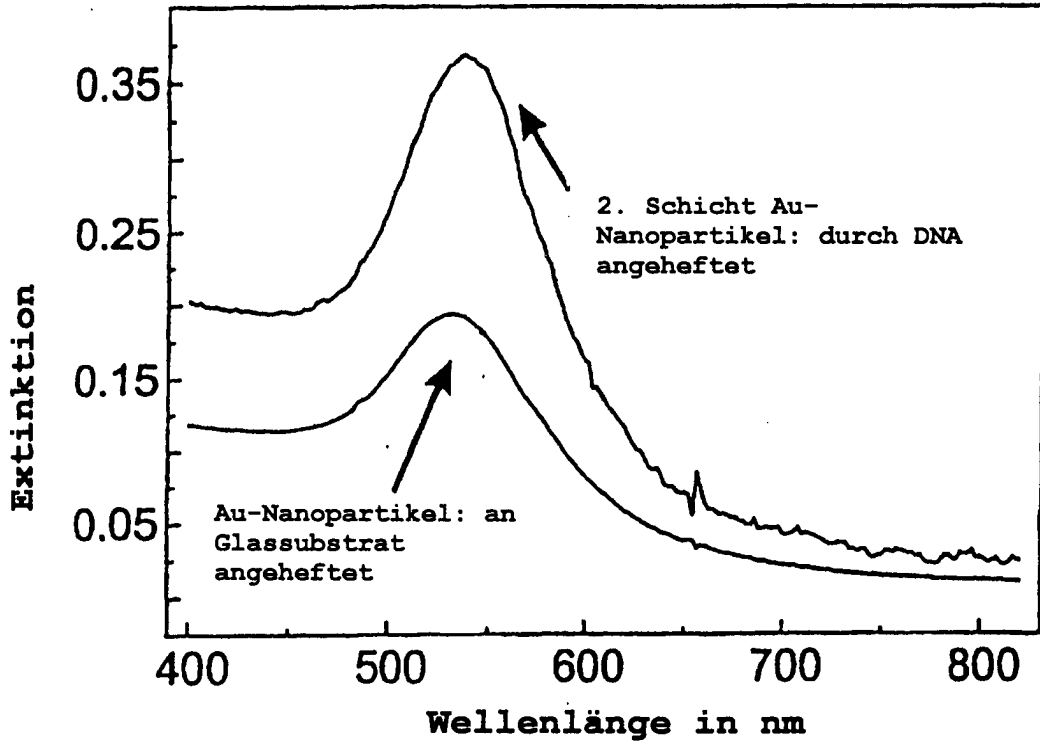


FIG.14B

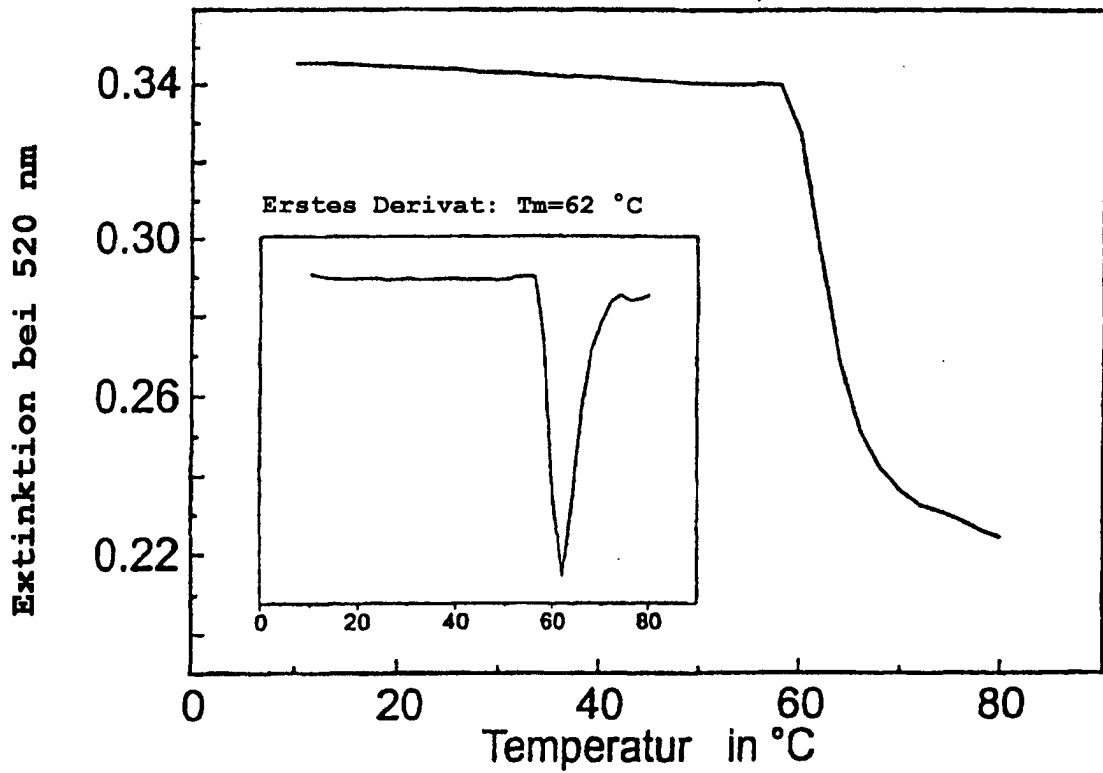


FIG.16A 24 Basen-Template

5' TAC-GAG-TTG-AGA-ATC-CTG-AAT-GCG 3'
 -S-ATG-CTC-AAC-TCT TAG-GAC-TTA-CGC-S -
 1 2

FIG.16B 48 Basen-Template mit komplementärem 24 Basen-Füller

5' TAC-GAG-TTG-AGA-CCG-TTA-AGA-CGA-GGC-AAT-CAT-GCA-ATC-CTG-AAT-GCG 3'
 -S-ATG-CTC-AAC-TCT GGC-AAT-TCT-GCT-CCG-TTA-GTA-CGT TAG-GAC-TTA-CGC-S -
 1 2

FIG.16C 72 Basen-Template mit komplementärem 48 Basen-Füller

5' TAC-GAG-TTG-AGA-CCG-TTA-AGA-CGA-GGC-AAT-CAT-GCA-TAT-ATT-GGA-CGC-TTT-ACG-GAC-AAC-ATC-CTG-AAT-GCG 3'
 -S-ATG-CTC-AAC-TCT GGC-AAT-TCT-GCT-CCG-TTA-GTA-CGT-ATA-TAA-CCT-GCG-AAA-TGC-CTG-TTG TAG-GAC-TTA-CGC-S -
 1 2

FIG.17A

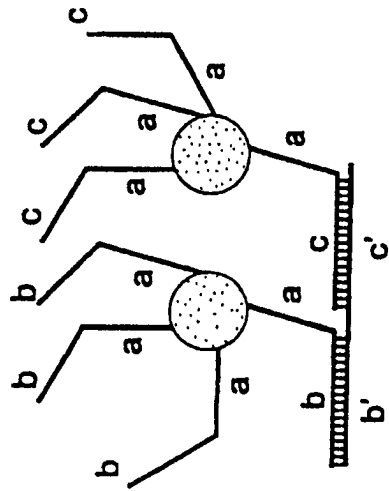


FIG.17B

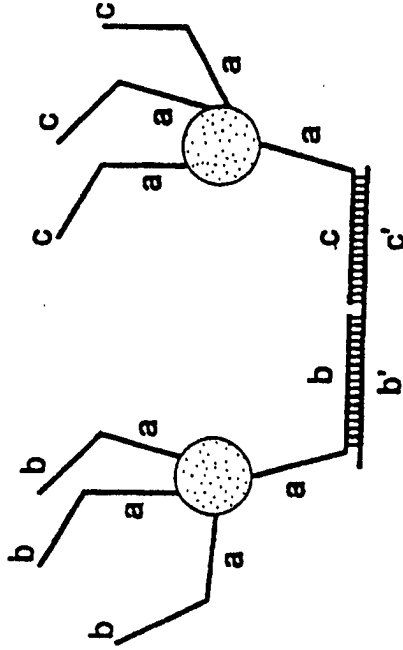


FIG.17C

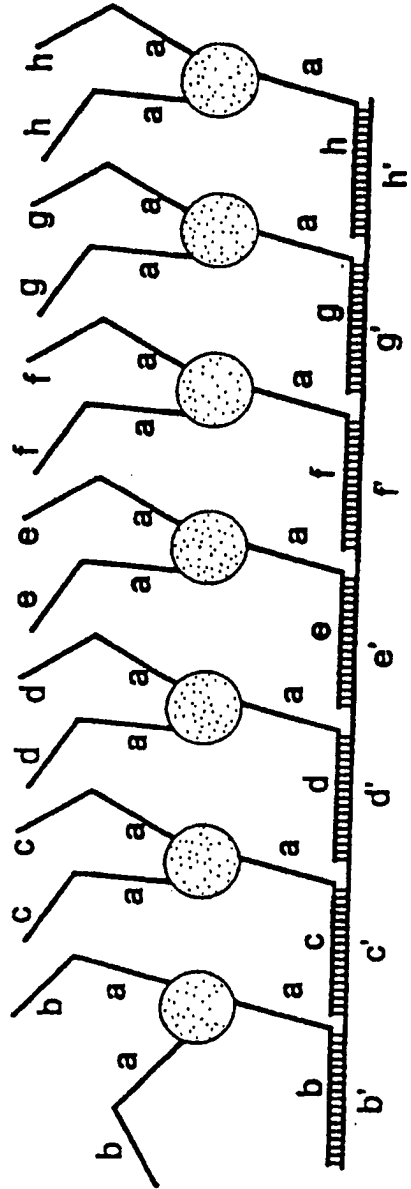


FIG.17D

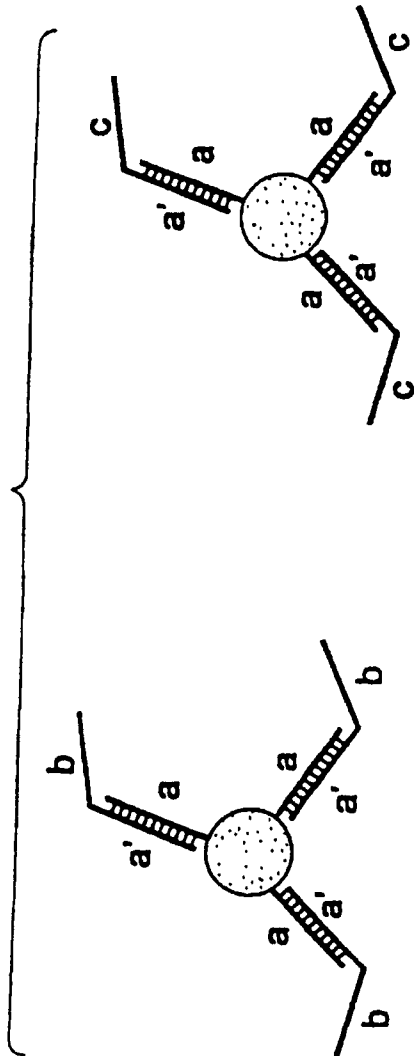


FIG.17E

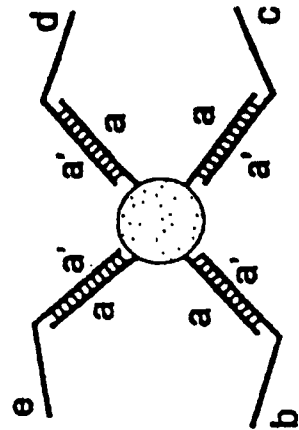


FIG.18

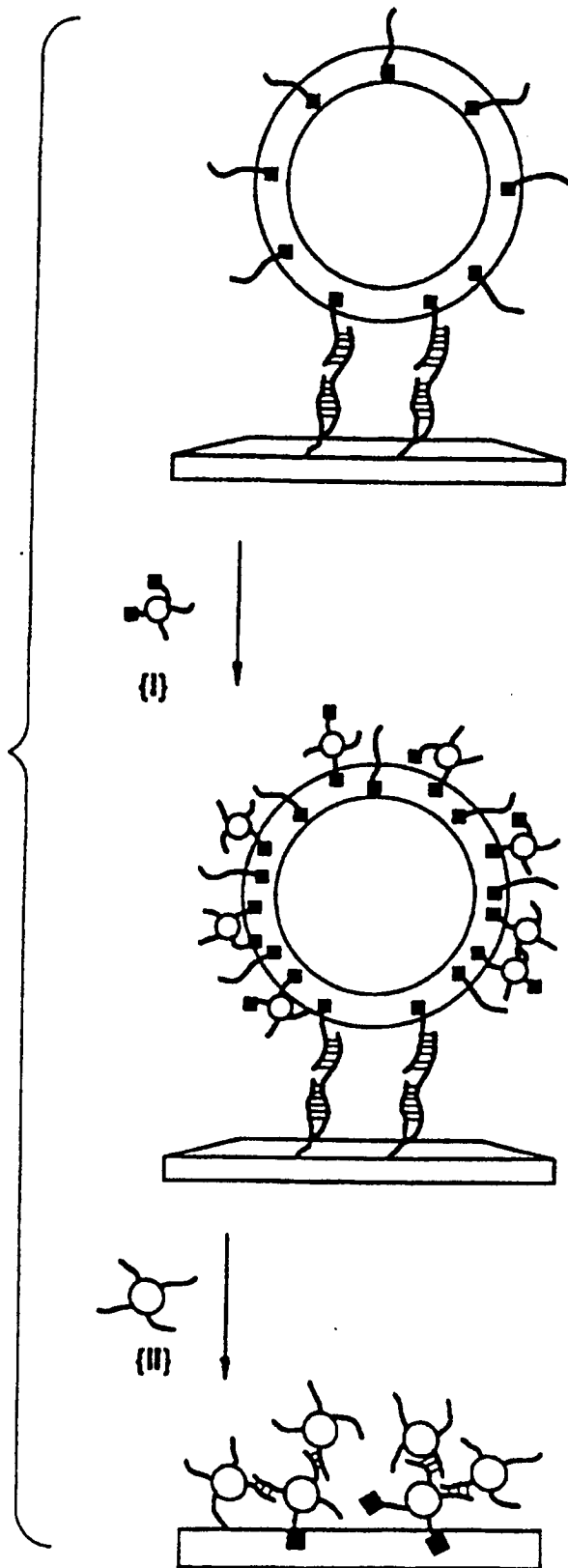


FIG. 19A

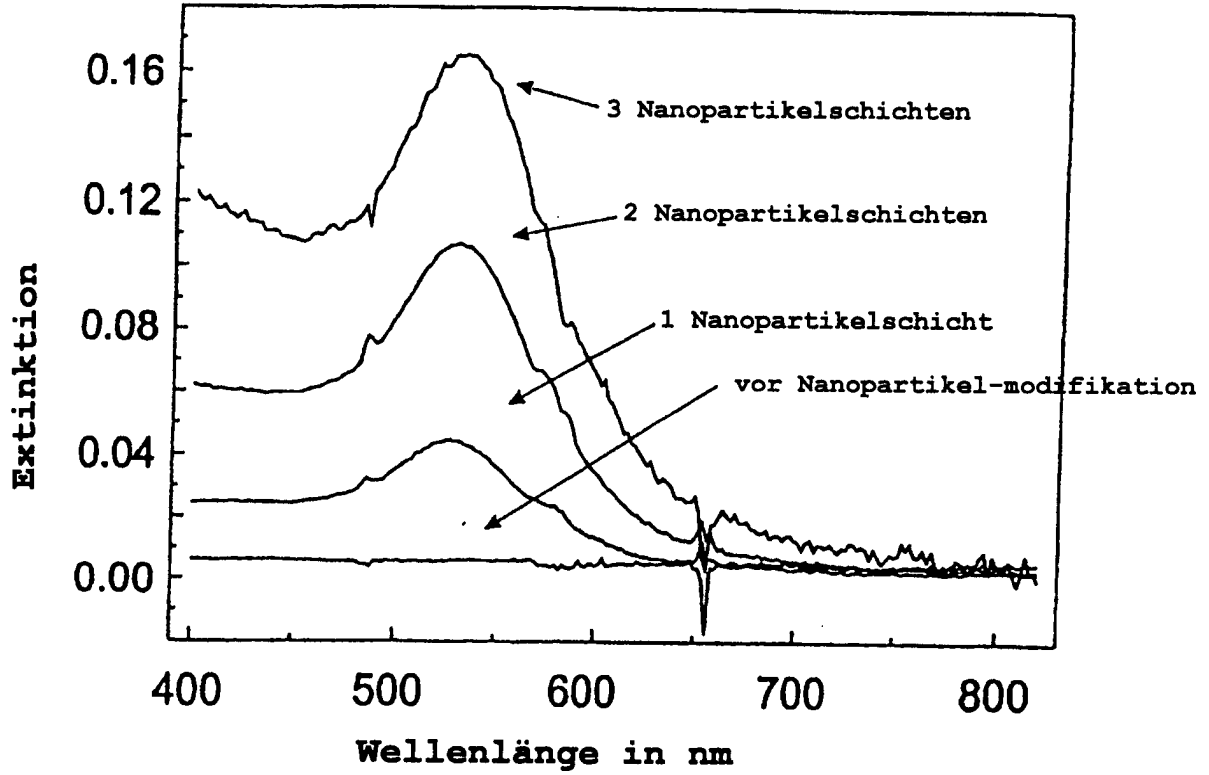


FIG. 19B

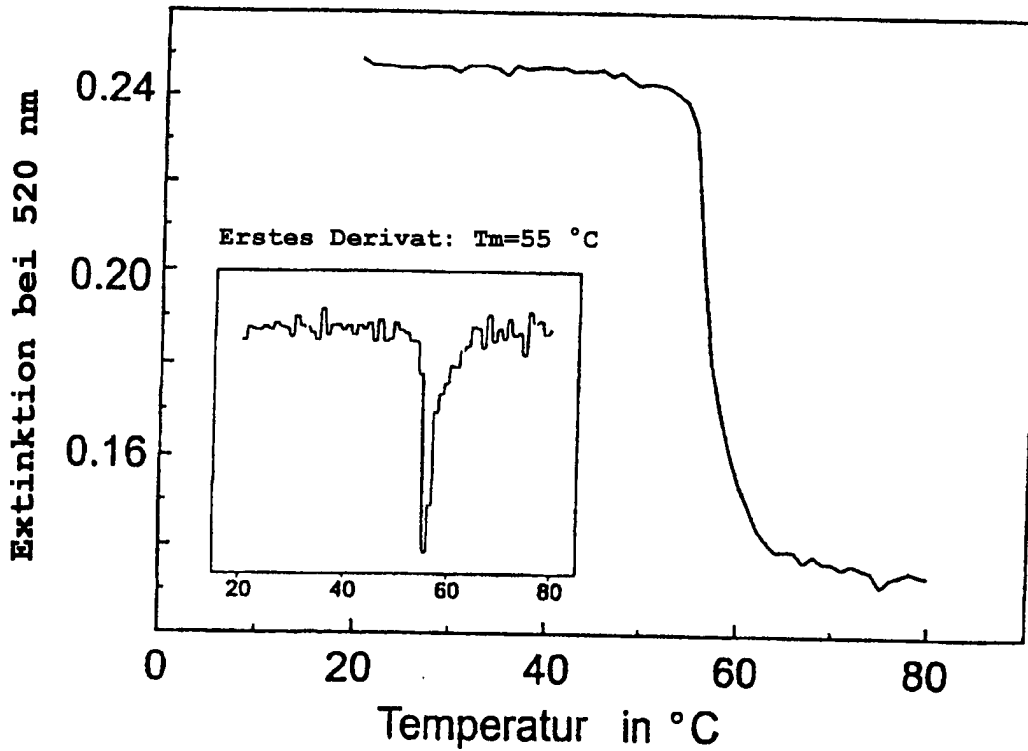


FIG.20A

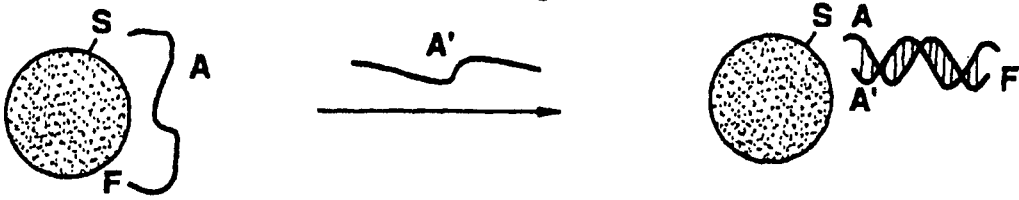


FIG.20B

