
Molekulare Erkennung mit einzelnen Gold-Nanopartikeln

Gunnar Raschke



München 2005



Molekulare Erkennung mit einzelnen Gold–Nanopartikeln

Gunnar Raschke

Dissertation
an der Fakultät für Physik
der Ludwig–Maximilians–Universität
München

vorgelegt von
Gunnar Raschke
aus Langenhagen

München
im Mai 2005

Erstgutachter: Prof. Dr. Jochen Feldmann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Bianca Hermann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.2005

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	ix
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	5
2.1 Optische Eigenschaften einzelner Gold-Nanopartikel	5
2.1.1 Partikelplasmonen	5
2.1.2 Dämpfungsmechanismen in Partikelplasmonen	7
2.1.3 Dielektrische Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln	8
2.1.4 Mie-Theorie	12
2.1.5 Quasistatische Näherung	14
2.2 Aspekte aus der Biochemie	16
2.2.1 Aminosäuren und Proteine	16
2.2.2 Die dreidimensionale Struktur von Antikörpern	21
2.3 Biomolekulare Erkennung	23
2.3.1 Affinitätsreaktionen	23
2.3.2 Massentransport	26
2.3.3 Diffusionslimit	28
2.3.4 Immunoassays	29
3 Modellrechnungen: Sensorik mit Gold-Nanopartikeln	33
3.1 Resonanzverschiebung durch Brechungsindexänderungen der Umgebung	35
3.2 Resonanzverschiebung durch molekulare Bindungsereignisse	38
3.3 Erhöhung der Sensitivität	39
3.3.1 Partikelgröße	40
3.3.2 Partikelzusammensetzung	41
4 Stand der Technik	45
4.1 Roche Cardiac-T Teststreifen	45

4.2	SPR-Immunoassays	47
4.3	Elektro-Chemilumineszenzassay (ECL)- Roche Elecsys	49
5	Experimentelle Methoden	53
5.1	Synthese von kolloidalem Gold	53
5.2	Funktionalisierung von Gold Nanopartikeln	55
5.3	Darstellung von Gold-Nanoschalen	57
5.4	Streuspektroskopie an einzelnen metallischen Nanopartikeln	59
5.4.1	Dunkelfeldmikroskopie	60
5.4.2	Dunkelfeld-Mikroskopie in Flüssigkeiten	63
5.4.3	Aufnahme von Einzelpartikel-Streuspektren	65
5.5	Probenpräparation	68
6	Molekulare Erkennung mit Einzelpartikel-Immunoassays	71
6.1	Spezifischer Nachweis von Streptavidin	71
6.2	Spezifischer Nachweis von Antikörpern	78
6.3	Nachweis niedermolekularer Analyte	80
6.4	Messungen in Blutserum	84
7	Optische Eigenschaften einzelner Gold-Nanoschalen	89
7.1	Homogene Linienbreite	91
7.2	Molekulare Erkennung	94
8	Zusammenfassung und Ausblick	99
A	Erweiterung der Mie-Theorie auf Schalenpartikel	103
B	Mathematica Skript zur Berechnung der Mie-Streuung	105
C	Säure-Basen Eigenschaften der Aminosäuren	113
D	Spotttest	115
	Literaturverzeichnis	117
	Publikationen und Vorträge	130
	Danksagung	133

Abbildungsverzeichnis

2.1	Modell für die Entstehung von Partikelplasmonen.	6
2.2	Dämpfungsmechanismen in Gold-Nanopartikeln	7
2.3	Die dielektrische Funktion von Gold	10
2.4	Allgemeine Strukturformel der Aminosäuren und Peptidbindung.	17
2.5	Sekundärstrukturen von Proteinen: Die α -Helix und β -Faltblattstruktur.	20
2.6	Die Struktur von Immunglobulin G	21
2.7	Bindungskinetik	25
2.8	Massentransport	27
2.9	Immunoassays – verschiedene Formate	31
3.1	Idee des Einzelpartikel-Immunoassays	34
3.2	Abhängigkeit der Plasmonresonanz vom Brechungsindex der Umgebung	36
3.3	Abhängigkeit der Plasmonresonanz vom Brechungsindex der <i>lokalen</i> Umgebung	38
3.4	Resonanzverschiebung in Abhängigkeit von der Partikelgröße	40
3.5	Berechnete Streuspektren von Gold-Nanoschalen	42
3.6	Sensitivität von Gold-Nanoschalen	43
4.1	Roche Cardiac-T Teststreifen	46
4.2	SPR-Immunoassays	48
4.3	Roche Elecsys	50
5.1	TEM-Aufnahmen von Frens- und Seed-Goldkolloiden	55
5.2	Extinktionsspektren einer kolloidalen Goldlösung vor und nach der Funktionalisierung	56
5.3	Ensemble-Extinktionsspektren von Gold-Nanoschalen	58
5.4	TEM-Aufnahmen von Kern/Schale Nanopartikeln	59
5.5	Durchlicht Dunkelfeldmikroskopie	61
5.6	Polarisation bei Dunkelfeldanregung	62
5.7	Auflicht-Dunkelfeldmikroskopie	62

5.8	Mikroskopie in Flüssigkeiten	64
5.9	Flußzellen aus Kunststoff und Glas	65
5.10	Dunkelfeldmikroskop zur Aufnahme von Einzelpartikel-Streuspektren	66
5.11	Aufnahme von Streuspektren	67
6.1	Das Biotin-Streptavidin Modellsystem	72
6.2	Erkennung von Streptavidin mit der Einzelpartikel-Lichtstreutechnik	74
6.3	Biotin/Streptavidin: Resonanzverschiebung gegen Inkubationszeit . .	75
6.4	Molekulare Erkennung mit SAM-bi Gold-Nanopartikeln	78
6.5	MAK<SA> Standardkurve	79
6.6	Kompetitiver Test zum Nachweis von Digoxigenin-Lysin	81
6.7	Kinetik der DigLys/MAK<Dig> Reaktion	82
6.8	Kalibrierkurve DigLys/MAK<Dig>	83
6.9	Unspezifische Adsorption	85
6.10	Einzelpartikel-Spektroskopie in Blutserum	86
7.1	Polarisationsabhängige Messungen des Streuspektrums einer einzelnen Nanoschale	90
7.2	Resonanz-Linienbreiten von Gold-Nanokugeln und Nano-Schalen . . .	92
7.3	Resonanz-Linienbreiten von Gold-Nanoschalen	93
7.4	Resonanzverschiebung bei Gold-Nanoschalen	95
7.5	Bindung von MHA an Gold-Nanoschalen	96
8.1	Parallelisierung von Einzelpartikel-Immunoassays	101
A.1	Aufbau von Schalenpartikeln	103
C.1	Titrationsskurve von Glycin	114
D.1	Spot-Test	115

Kurzfassung

In dieser Arbeit wird ein neuartiger Immunoassay beschrieben, der auf der Spektroskopie eines *einzelnen*, funktionalisierten Gold-Nanopartikels beruht. Das Streuspektrum eines Gold-Nanopartikels zeigt eine ausgeprägte Resonanz im Sichtbaren, deren spektrale Position äußerst sensitiv vom Brechungsindex der Partikelumgebung abhängt. Es wird gezeigt, daß genau dieser Effekt genutzt werden kann, um Biomoleküle spezifisch nachzuweisen. Dazu wird ein einzelnes, mit einem „Fänger“-Protein beschichtetes Gold-Nanopartikel in einer wäßrigen Lösung spektroskopiert und die exakte Resonanzposition des Streuspektrums bestimmt. Anschließend werden der Lösung Proteine zugegeben, die nach dem „Schlüssel-Schloß-Prinzip“ spezifisch an das beschichtete Nanopartikel binden und dadurch den Brechungsindex in der Partikelumgebung ändern. Infolgedessen verschiebt sich die Resonanzposition des kontinuierlich gemessenen Streuspektrums deutlich. Die Größe der beobachteten Resonanzverschiebung stimmt gut mit theoretischen Vorhersagen der Mie-Theorie überein.

Durch die Spektroskopie eines einzelnen Nanopartikels reduziert sich die Zahl der zur Detektion nötigen Bindungsereignisse gegenüber herkömmlichen Tests dramatisch auf weniger als 100. Die Messung des *homogenen* Streuspektrums unter physiologischen Bedingungen erlaubt es darüber hinaus, die Bindungskinetik direkt zu beobachten.

Mit der Mie-Theorie durchgeführte Modell-Rechnungen sagen voraus, daß sich die Sensitivität des Assays durch die Verwendung einzelner Kern/Schale Nanopartikel gegenüber der solider Gold-Kolloide in dreierlei Hinsicht erhöht. Erstmals konnten diese Vorhersagen durch Messungen an einzelnen Kern/Schale Nanopartikeln bestätigt werden: Die Resonanzenergie liegt innerhalb des „biologischen Fensters“, in dem die Absorption von Blut und Wasser gering ist; man beobachtet schmalere homogene Linienbreiten, die die exakte Bestimmung der Resonanzenergie vereinfachen, und eine größere Verschiebung der Resonanzenergie bei gegebenen Brechungsindexänderungen der Partikelumgebung.

1 Einleitung

Nachweisverfahren für biologische Makromoleküle sind seit mehr als 35 Jahren ein unverzichtbares Werkzeug in der klinischen Diagnostik, bei der Suche nach neuen Medikamenten und in der Umweltanalytik [1]. So gut wie alle relevanten Tests beruhen auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen zwei Biomolekülen. Solche immunochemischen Analyseverfahren – oder kurz *Immunoassays* – imitieren die von der Natur zur Erkennung von Krankheitserregern entwickelten Mechanismen. So werden in den menschlichen Körper eindringende Fremdstoffe, die *Antigene*, von körpereigenen Proteinen, den *Antikörpern*, gebunden und können anschließend vom Immunsystem bekämpft werden.

Anders als in der Natur, muß in Immunoassays die auf molekularer Ebene stattfindende Bindung zwischen einem Antikörper und seinem entsprechenden Antigen in ein makroskopisch meßbares Signal umgewandelt werden. In den ersten funktionstüchtigen Assays wurde dazu einer der Bindungspartner (Insulin), mit radioaktiven Isotopen markiert [2]. Für die Entwicklung dieses Radio-Immunoassays (RIA) wurde Rosalyn Yalow im Jahr 1977 der Nobelpreis für Medizin verliehen [3]. Weitere wichtige Meilensteine, die Immunoassays schließlich zum meist verwendeten Analyseverfahren in der Diagnostik werden ließen, waren die Entschlüsselung der chemischen Struktur von Antikörpern, sowie Verfahren zur Gewinnung von Antikörpern (G. Edelman und R. Porter Nobelpreis 1972 [4]; N. Jerne, G. Köhler und C. Milstein Nobelpreis 1984 [5]).

Seit diesen Anfängen wurde die Empfindlichkeit von Immunoassays immer weiter gesteigert, neue Techniken der Signalumwandlung und Detektion gefunden und die Anzahl detektierbarer Stoffe enorm vergrößert. Einen entscheidenden Beitrag dazu lieferte die Einführung optischer Detektionsverfahren, häufig in Kombination mit fluoreszierenden Markern [1, 6]. Zunehmend spielen auch metallische Nanopartikel als Marker eine wichtige Rolle [7, 8]. Ein Beispiel dafür ist der in der Vor-Ort Diagnostik (Point-of-Care-Diagnostic) weit verbreitete Cardiac T[®] Schnelltest von

Roche Diagnostics, der zum Nachweis eines Herzinfarkts verwendet wird.

Heute stellen die Fortschritte in der Genomik und Proteomik – den Wissenschaften von Form, Funktion und Interaktion der Gene bzw. der Proteine eines Organismus – die Forscher und Entwickler von Immunoassays vor neue Herausforderungen. So erwartet man, daß bereits in naher Zukunft eine Fülle neuer Markermoleküle entdeckt wird, aus deren Existenz im Blut oder Urin eines Patienten viel präziser als heutzutage auf den Auslöser einer Krankheit geschlossen werden kann. Insbesondere werden es die neuen Marker gestatten, zwischen verschiedenen Ursachen die zum selben Krankheitsbild führen zu differenzieren. Hierdurch würde eine wichtige Voraussetzung für eine individuellere Medikation mit verringerten Nebenwirkungen und entsprechend besserem Behandlungserfolg geschaffen.

Die vorausgesagte große Anzahl neuer Krankheitsmarker wird Nachweisverfahren erforderlich machen, die viele verschiedene Marker gleichzeitig oder parallel in einem einzigen Test schnell detektieren können. Außerdem wird vermutlich ein beträchtlicher Teil der Markermoleküle nur in sehr geringen Mengen vorliegen. Um diese seltenen Marker verlässlich detektieren zu können, muß man bereits heute über geeignete Sensoren nachdenken.

In dieser Arbeit, die am Lehrstuhl für Photonik und Optoelektronik (PhoG) in enger Kooperation mit der Roche Diagnostics GmbH im Rahmen des Forschungsverbunds ForNano¹ entstand, ist es gelungen, mit Hilfe der Streuspektroskopie an *einzelnen* Gold-Nanopartikeln einen Immunoassay zu entwickeln, mit dem man weniger als 100 Bindungsereignisse zwischen Antigenen und Antikörpern nachweisen kann. Die geringe Größe der eingesetzten Nanopartikel in Kombination mit dem verwendeten optischen Ausleseverfahren, ermöglicht es prinzipiell Einzelpartikel-Immunoassays stark zu parallelisieren und auf Immuno-Chips zu integrieren.

Das Funktionsprinzip beruht auf den besonderen optischen Eigenschaften von Edelmetall-Nanopartikeln, die durch eine ausgeprägte Resonanz im sichtbaren Spektralbereich dominiert werden. Die Ursache der Resonanz sind Partikelplasmonen, kollektive Schwingungen der Leitungsbandelektronen des Metalls. Die spektrale Lage der Resonanz hängt von intrinsischen Größen, wie dem Partikelmaterial und seiner Form ab. Für die Anwendung als Sensor ist ausschlaggebend, daß auch externe Parameter, insbesondere der Brechungsindex der Umgebung, die Resonanzposition beeinflus-

¹Informationen über den Forschungsverbund ForNano der Bayerischen Forschungstiftung findet man unter <http://www.abayfor.de/fornano>.

sen [9–11]. Genau diesen Effekt nutzt der hier vorgestellte Einzelpartikel-Immunoassay. Dieser besteht aus einem *einzelnen*, nur 40 nm großen Gold-Nanopartikel, dessen Oberfläche mit Rezeptormolekülen beschichtet ist. Antigene die an die Rezeptoren auf der Partikeloberfläche binden bewirken eine Brechungsindexänderung nahe der Partikeloberfläche. Infolgedessen verschiebt sich das Streuspektrum des Nanopartikels ins Rote. Mit Hilfe der Einzelpartikel-Streuspektroskopie kann die Resonanzverschiebung äußerst genau gemessen und somit geringste Mengen von Molekülen nachgewiesen werden.

Das einführende Grundlagenkapitel geht zunächst auf die optischen Eigenschaften metallischer Nanopartikel ein. Die wichtigsten Festkörpereigenschaften und die elektrodynamische Theorie zur Beschreibung von Partikelplasmonen – die Mie-Theorie – werden zusammenfassend dargestellt. Der interdisziplinäre Charakter dieser Arbeit kommt anschließend in dem Kapitel „Proteine und Antikörper“ sowie im Abschnitt „Biomolekulare Erkennung“ zum Ausdruck, die sich mit dem Aufbau von Proteinen und mit Affinitätsreaktionen zwischen Biomolekülen beschäftigen.

Das Kapitel „Modellrechnungen: Sensorik mit Gold-Nanopartikeln“ stellt den Einzelpartikel-Immunosensor im Detail vor. Anschließend werden am Markt etablierte Verfahren vorgestellt und ihre Stärken und Schwächen mit der Einzelpartikel-Methode verglichen.

Eine der größten Herausforderungen bei dieser Arbeit war die Spektroskopie einzelner Gold-Nanopartikel mit hoher Signalstabilität über Zeiträume bis zu 90 min. Der experimentelle Teil geht deshalb ausführlich auf die Dunkelfeldmikroskopie unter physiologischen Bedingungen ein. Weitere Abschnitte beschäftigen sich mit der Herstellung und Funktionalisierung von Gold-Nanopartikeln, die zum ganz überwiegenden Teil von Roche Diagnostics in Penzberg durchgeführt wurde.

Im Ergebnisteil wird mit Messungen an dem „Modellsystem“ Biotin-Streptavidin die Realisierbarkeit eines Einzelpartikel-Immunoassays gezeigt. Anschließend folgen weitere Beispiele für Bindungspartner unterschiedlichen Molekulargewichts.

Eine Strategie zur weiteren Erhöhung der Sensitivität wird im Kapitel „Optische Eigenschaften einzelner Gold-Nanoschalen“ vorgestellt. Darin wird gezeigt, daß sich durch die Verwendung von Kern/Schale Nanopartikeln, die aus einem dielektrischen Kern umhüllt von einer dünnen Goldschicht bestehen, die Sensitivität von Einzelpartikel-Immunoassays weiter steigern läßt.

2 Grundlagen

Wie bereits in der Einleitung zum Ausdruck gebracht, basiert der in dieser Arbeit vorgestellte Einzelpartikel-Immunsensor auf den besonderen optischen Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln. Dementsprechend wird zu Beginn dieses Grundlagenkapitels auf die Wechselwirkung von Licht mit metallischen Nanopartikeln eingegangen. Besonders ausführliche und weitergehende Darstellungen findet man z.B. in den Monographien von Kreibig/Vollmer [11] und Bohren/Huffmann [10]. Die nachfolgenden Abschnitte beschäftigen sich mit dem nötigen biochemischen bzw. für die Diagnostik essentiellen Know-how.

2.1 Optische Eigenschaften einzelner Gold-Nanopartikel

2.1.1 Partikelplasmonen

Viele optische Eigenschaften von Edelmetall-Nanopartikeln lassen sich anhand des in Abb. 2.1a dargestellten einfachen Modells für die Wechselwirkung einer elektromagnetischen Welle mit einem metallischen Nanopartikel verstehen. Da die Eindringtiefe einer elektromagnetischen Welle im sichtbaren Spektralbereich in derselben Größenordnung wie der Partikeldurchmesser liegt, kann die Welle das Nanopartikel annähernd komplett durchdringen. Das elektrische Wechselfeld lenkt die freien Leitungsbandelektronen des Metalls relativ zu den ortsfesten, positiv geladenen Atomrümpfen kollektiv aus, so daß Polarisationsladungen auf der Partikeloberfläche entstehen. Die Coulomb-Anziehung zwischen den entgegengesetzten Ladungen bildet eine Rückstellkraft in dem oszillierenden System. Das System läßt sich also klassisch als getriebener harmonischer Oszillator betrachten, bei dem die Leitungsbandelektronen mit der Frequenz des anregenden Lichts oszillieren. Das der kollektiven Schwingung

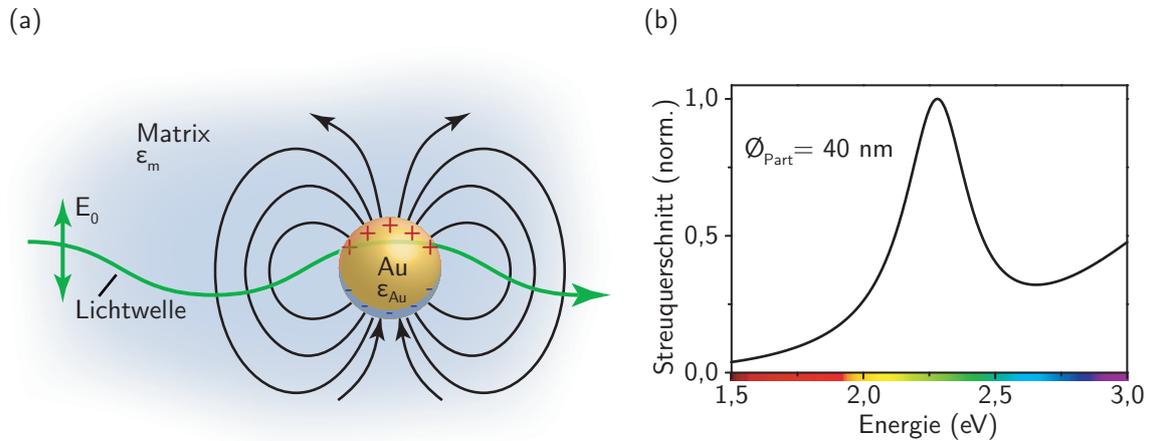


Abbildung 2.1: (a) Einfaches Modell für die Entstehung von Partikelplasmonen. Eine auf das Nanopartikel einfallende elektromagnetische Welle durchdringt dieses vollständig und regt die Leitungsbandelektronen des Metalls zu einer kollektiven Schwingung an. (b) Berechnetes Streuspektrum eines Gold-Nanopartikels mit 40 nm Durchmesser in wässriger Umgebung. Die Plasmonresonanz liegt bei etwa 2,28 eV.

der Leitungsbandelektronen zugeordnete Quasi-Teilchen wird als *Partikelplasmon*¹ bezeichnet. Analog zu einem hertzischen Dipol, werden die Elektronen permanent aus ihrer Gleichgewichtslage heraus beschleunigt und strahlen Energie in Form einer elektromagnetischen Welle ab. Diese Welle ist im Fernfeld des Dipols als Streulicht zu beobachten. Die Intensität des gestreuten Lichts hängt von der natürlichen Frequenz des Oszillators ab, so daß sowohl das Absorptions- als auch das Streuspektrum vieler metallischer Nanopartikel eine ausgeprägte Resonanz zeigen, die für Partikel aus Gold oder Silber im Sichtbaren liegt. Als Beispiel zeigt Abb. 2.1b die Streuintensität eines Gold-Nanopartikels mit 40 nm Durchmesser in Abhängigkeit von der Energie der einfallenden Lichtwelle.

Die exakte spektrale Lage des Resonanzmaximums hängt zum einen von intrinsischen Eigenschaften des Nanopartikels ab, zum Beispiel von seiner geometrischen Form, seiner Größe und von dem Material aus dem er besteht. Zum anderen wird bereits anhand der skizzierten Feldlinien in Abb. 2.1a deutlich, daß die Rückstellkraft des oszillierenden Systems und damit die spektrale Lage der Plasmonresonanz außerdem von der Polarisierbarkeit der das Partikel umgebenden Matrix abhängt.

¹In der Literatur wird auch der Begriff „lokalisiertes Oberflächenplasmon“ verwendet.

2.1.2 Dämpfungsmechanismen in Partikelplasmonen

Außer dem in den letzten Abschnitten skizzierten strahlenden Zerfall des Partikelplasmons gibt es eine Reihe weiterer Dämpfungsmechanismen, die zu einem nicht-strahlenden Zerfall des Partikelplasmons führen. In Abb. 2.2 sind die bedeutsamsten Prozesse in einem Quasi-Teilchenbild dargestellt. Man differenziert zwischen Intra-band Elektron-Loch-Paar Anregungen, die innerhalb des sp-Leitungsbands von Gold stattfinden, und Interband-Anregungen von Elektronen aus energetisch tiefer liegenden d-Bändern in das Leitungsband (Landaudämpfung). Gold besitzt im Sichtbaren Interbandübergänge bei Energien von $\approx 1,8\text{ eV}$ und $\approx 2,4\text{ eV}$.

Weitere Dämpfungsmechanismen umfassen die Streuung der oszillierenden Elektronen untereinander, mit Verunreinigungen, mit Phononen und der Partikeloberfläche. Der letztgenannte Prozeß wird erst für Nanopartikel mit einem sehr geringen Durchmesser (bei Gold-Nanopartikeln ca. 10 nm) relevant und wird in Abschnitt 2.1.3 genauer betrachtet.

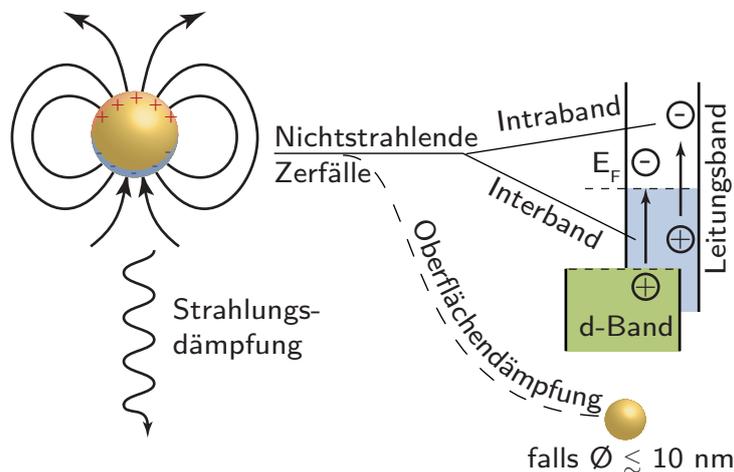


Abbildung 2.2: In einem Teilchenbild zerfallen Plasmonen entweder strahlend und senden ein Photon aus, oder sie zerfallen nichtstrahlend. Die bedeutendsten nichtstrahlenden Prozesse sind die Intra- und die Interbanddämpfung. Die Dämpfung durch Streuung von Elektronen an der Partikeloberfläche spielt nur für Gold-Nanopartikel mit einem kleineren Durchmesser als 10 nm eine Rolle. Darstellung nach [12].

In den nächsten Kapiteln werden die bisher eher qualitativ eingeführten Eigenschaften von Partikelplasmonen genauer dargestellt und schließlich mit der Mie-Theorie ein Instrument vorgestellt, mit dem sich Resonanzspektren von Nanopartikeln und die Wirkung äußerer Einflüsse exakt berechnen lassen.

2.1.3 Dielektrische Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln

Die dielektrische Funktion $\epsilon = \epsilon' + i\epsilon''$ eines Materials beschreibt seine Antwort auf ein externes Elektrisches Feld. Der Realteil ϵ' stellt darin ein Maß für die Polarisation des Materials durch das externe Feld dar, während der Imaginärteil ϵ'' die relative Phase der Antwort bezüglich des externen Felds ausdrückt. Entsprechend tragen alle intrinsischen Dämpfungsmechanismen, wie z.B. die Streuung von Elektronen, zu ϵ'' bei. Liegt die Frequenz des anregenden Elektrischen Felds im optischen Bereich, wird die dielektrische Funktion von Edelmetallen üblicherweise über die elektrische Suszeptibilität ausgedrückt:

$$\epsilon(\omega) = 1 + \chi_D(\omega) + \chi_B(\omega). \quad (2.1)$$

Darin enthalten ist der komplexe Beitrag χ_D der quasi-freien Elektronen des Leitungsbands und ein zusätzlicher, ebenfalls komplexer Anteil $\chi_B(\omega) = \chi'_B + i\chi''_B$, der von gebundenen Elektronen in energetisch tieferen Bändern des Metalls stammt. Der Realteil beinhaltet die Polarisierbarkeit aller Rumpfelektronen des Metalls und muß in allen Frequenzbereichen berücksichtigt werden. Im sichtbaren Spektralbereich hängt er nur in geringem Umfang von der Frequenz ab, so daß es gängige Praxis ist $1 + \chi'_B$ in Gl. 2.1 durch ein mittleres, frequenzunabhängiges ϵ_∞ zu ersetzen.

Der Imaginärteil χ''_B spielt dagegen nur für Anregeenergien eine Rolle, bei denen Interbandübergänge von energetisch tiefer liegenden Bändern in das Leitungsband stattfinden können. Für Gold ist die Anregung von Elektronen aus dem d-Band in das sp-Leitungsband ab Energien von 1,8 eV möglich und muß daher im allgemeinen berücksichtigt werden. Zusammenfassend läßt sich Gl. 2.1 dann als

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_\infty + \chi_D(\omega) + i\chi''_B(\omega) \quad (2.2)$$

schreiben.

Drude-Sommerfeld Modell für Metalle

Der Beitrag $\chi_D(\omega)$ der Leitungsbandelektronen eines Metalls, oder genauer der Elektronen mit Energien nahe des Fermi-Niveaus, zur dielektrischen Funktion läßt sich mit dem um 1900 von Drude entwickelten und später von Sommerfeld ergänzten *Drude-Sommerfeld Modell* für Metalle gut beschreiben. Es geht davon aus, daß sich die Elektronen² eines Metalls geradlinig bewegen, bis sie nach einer mittleren Streu- oder Relaxationszeit $\tau = 1/\Gamma_0$ durch Stöße mit Ionen des Metallgitters abgebremst werden. Dabei geht jede Information über Geschwindigkeit oder Richtung des Elektrons vor dem Stoß verloren.

Ein externes elektromagnetisches Feld $\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 e^{-i\omega t}$ führt in diesem Bild zu einer Drift der Elektronen, welche deren ursprüngliche Bewegung überlagert. Die Drift eines einzelnen Elektrons mit der Masse m_e und der Ladung q wird im Drude-Modell mit der Bewegungsgleichung

$$m_e \frac{\partial^2 \mathbf{r}}{\partial t^2} + m_e \Gamma \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial t} = q \mathbf{E}_0 e^{-i\omega t} \quad (2.3)$$

beschrieben.³ Aus der stationären Lösung erhält man die Abweichung \mathbf{r}_0 des Elektrons von seiner Ruheposition, bzw. das pro Elektron induzierte Dipolmoment $\mathbf{p} = e \mathbf{r}_0$. Durch Multiplikation mit der Dichte n freier Elektronen ergibt sich dann die makroskopische Polarisierung P . Unter der Voraussetzung eines isotropen Materials erhält man über die Beziehung $\chi_D(\omega) = P/(\epsilon_0 E)$ die dielektrische Funktion des Elektronengases:

$$\epsilon_D(\omega) = 1 + \chi_D(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\Gamma_0 \omega}. \quad (2.4)$$

Darin ist $\omega_p = \sqrt{ne^2/\epsilon_0 m^*}$ die Drude-Plasmafrequenz mit der Elektronendichte n , der Elementarladung e und der Dielektrizitätskonstante des Vakuums ϵ_0 . Die Elektronenmasse m_e wurde durch die effektive Elektronenmasse m^* , die den Einfluß des Kristallgitters auf die Elektronen berücksichtigt, ersetzt.

A priori sind in der dielektrischen Funktion nach Gl. 2.4 weder Streuprozesse der Elektronen untereinander, noch die Streuung von Elektronen mit Phononen oder

²Mit Elektronen sind hier stets die freien Elektronen des Metalls gemeint. Die Rumpfelektronen verhalten sich in der Drude-Theorie passiv.

³Dies entspricht der Bewegungsgleichung im Oszillator-Modell für Festkörper nach Lorentz mit einer verschwindenden Federkonstante.

anderen Verunreinigungen berücksichtigt. Unter Zuhilfenahme der Matthiesen Regel lassen sich diese Effekte einfach in die dielektrische Funktion nach Drude einbauen, indem Γ_0 durch die Summe aller voneinander unabhängigen Relaxationsprozesse $\Gamma_\infty = \sum_i \Gamma_i$ substituiert wird. Experimentell ist Γ_∞ über den elektrischen Widerstand ρ gemäß $\Gamma_\infty = \rho n e^2 / m^*$ zugänglich.

Setzt man die Drude-Suszeptibilität in die allgemeine dielektrische Funktion Gl. 2.2 für Metalle unter Vernachlässigung der Intradbanddämpfung ein, ergibt sich schließlich

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\Gamma_\infty\omega} = \epsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \Gamma_\infty^2} + i \frac{\omega_p^2 \Gamma_\infty}{\omega(\omega^2 + \Gamma_\infty^2)}. \quad (2.5)$$

In der Praxis und auch im Rahmen dieser Arbeit werden häufig experimentell gemessene dielektrische Funktionen verwendet, da sich insbesondere χ_B über Modellrechnungen nur schwer quantifizieren läßt. Abb. 2.3 zeigt die dielektrische Funktion von (Volumen-) Gold nach Johnson und Christy [13]. Für Energien unterhalb von $\approx 1,8$ eV lassen sich die Meßpunkte gut mit der dielektrischen Funktion 2.5 annähern.

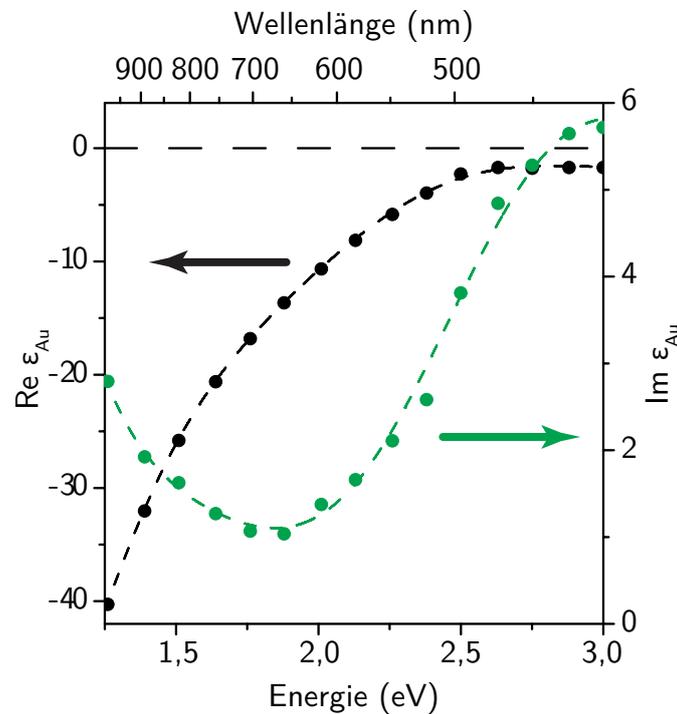


Abbildung 2.3: Real- und Imaginärteil der dielektrischen Funktion von Gold im Sichtbaren nach Johnson und Christy [13]. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Rechnungen nach der Mie-Theorie wurden die Meßpunkte interpoliert (gestrichelte Kurven).

Die sich dabei ergebenden Drude-Parameter weichen allerdings von den im Limit niedriger Frequenzen ermittelten und in Tab. 2.1 angegebenen Werten ab. So findet z.B. Sönnichsen [12] für den Energiebereich $1,4 \text{ eV} < E < 1,75 \text{ eV}$ eine Elektronen-Relaxationszeit von $\tau_\infty = 10 \text{ fs}$ und eine Plasmafrequenz $\hbar\omega_p = 9,0 \text{ eV}$.

Größenabhängigkeit der dielektrischen Funktion

Bisher ist stillschweigend davon ausgegangen worden, daß die dielektrische Funktion nicht von der Größe des betrachteten Körpers abhängt. Tatsächlich beobachtet man aber in Ensemblespektren von Edelmetall-Nanopartikeln mit Durchmessern unter 10 nm eine Zunahme der Linienbreiten, die sich nicht allein auf inhomogene Verbreiterungen zurückführen lassen.

Rein klassisch betrachtet, liegt die Ursache in einer zusätzlichen Streuung der Elektronen an der Partikeloberfläche [11]. Diese Oberflächendämpfung trägt erst dann nennenswert zur gesamten Dämpfung bei, wenn der Durchmesser des Nanopartikels deutlich kleiner als die mittlere freie Weglänge $l_\infty = v_F/\Gamma_\infty$ der Elektronen im Metall ist. Für Gold beträgt die Fermi-Geschwindigkeit $v_F = 1,4 \text{ nm/fs}$ und die mittlere Relaxationszeit $\tau = 29 \text{ fs}$. Daraus ergibt sich eine mittlere freie Weglänge von $l_\infty = 42 \text{ nm}$. Für Partikel mit Durchmessern die größer als 20 nm sind ist der Größeneffekt noch zu vernachlässigen, für kleinere Durchmesser nimmt er jedoch sehr rasch zu und macht sich in einer ausgeprägten Zunahme der homogenen Linienbreite bemerkbar. Formal läßt sich die Oberflächendämpfung durch einen zusätzlichen, größenabhängigen Dämpfungsbeitrag $\Gamma_S(r) = Av_F/r$ berücksichtigen. Darin ist r eine charakteristische Länge, die für sphärische Gold-Nanopartikel dem Partikelradius entspricht. Die $1/r$ -Abhängigkeit des Dämpfungsterms drückt dann das Verhältnis der oberflächennahen Elektronen ($\propto r^2$) zu allen Elektronen innerhalb des Nanopartikels ($\propto r^3$) aus. Der zunächst phänomenologisch eingeführte Parameter A beschreibt den Kohärenzverlust durch Streuprozesse an der Oberfläche. Je nach verwendetem Modell ergibt sich für sphärische Nanopartikel ein A -Parameter

Tabelle 2.1: Materialparameter von Gold, die für die Berechnung der dielektrischen Funktion nach Gl. 2.4 benötigt werden.

ρ	($\mu\Omega \cdot \text{cm}$)	$2,04^a$
n	($10^{22}/\text{cm}^3$)	$5,90^b$
$\frac{m^*}{m_e}$		$0,99^c$
τ_∞	(fs)	29
v_F	(10^8 cm/s)	1,39
l_∞	(nm)	42
$\hbar\omega_p$	(eV)	9,1
a bei $T = 273 \text{ K}$; nach [14]		
b bei $T = 300 \text{ K}$; nach [14]		
c nach [13]		

zwischen 0,55 bis 1,16 [11]. Für stäbchenförmige Nanopartikel wurde in der Arbeit von Sönnichsen et al. [15] experimentell ein Wert von $A < 0,5$ gefunden.

Berücksichtigt man die Oberflächendämpfung in Gl. 2.5, indem man Γ_∞ durch $\Gamma(r) = \Gamma_\infty + \Gamma_S(r)$ ersetzt, ergibt sich für die größenabhängige dielektrische Funktion

$$\epsilon(\omega, r) = \epsilon(\omega) + \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\Gamma_\infty} + \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega(\Gamma_\infty + \Gamma_S(r))}. \quad (2.6)$$

Gl. 2.6 erlaubt es, eine experimentell bestimmte dielektrische Funktion $\epsilon(\omega)$ um einen vom Partikeldurchmesser abhängigen Anteil zu ergänzen.

Der oben dargelegte *Effekt der mittleren freien Weglänge (mean free path effect)* stellt nur eine Beschreibungsmöglichkeit der $1/r$ -Abhängigkeit der Oberflächendämpfung in Metall-Kolloiden dar. Eine andere klassische Erklärung fußt auf dem Impulsverlust bei Stößen an der Partikeloberfläche (*wall dissipation process*)[16]. Außer der klassischen Beschreibungsweise der Oberflächendämpfung existieren aber auch mehrere quantenmechanische Beschreibungsweisen (*quantum size effect*) [17–20]. Während die physikalischen Ursachen für die Größenabhängigkeit der dielektrischen Funktion von den Vertretern der verschiedenen Modellen heftig diskutiert werden, scheint die $1/r$ -Abhängigkeit eine fundamentale Eigenschaft zu sein [11].

2.1.4 Mie-Theorie

Mit Hilfe der Mie-Theorie [21] lassen sich sowohl die Streu- und Absorptionsquerschnitte, als auch die Verteilung des elektromagnetischen Feldes innerhalb und außerhalb eines *sphärischen* Partikels *exakt* berechnen. Dazu werden die Maxwellgleichungen in sphärischen Koordinaten, in deren Ursprung sich das Partikel mit komplexem Brechungsindex befindet, für eine auf das Partikel einfallende monochromatische ebene Welle gelöst. Als Parameter gehen lediglich die dielektrischen Funktionen von Partikel und Umgebung, sowie der Partikelradius ein. In Anlehnung an [10] und [11] wird der Lösungsweg hier kurz skizziert.

Die elektromagnetischen Felder innerhalb und außerhalb des Partikels werden in Kugelflächenfunktionen, d.h. nach Multipolen entwickelt. Dabei treten vier Entwicklungskoeffizienten a_L , b_L , c_L und d_L auf, wobei der Index L die Multipolordnung bezeichnet. Die Koeffizienten lassen sich aus Randbedingungen, die die Stetigkeit der tangentialen Feldkomponenten von \mathbf{E} und \mathbf{H} an der Partikeloberfläche fordern,

berechnen. Im folgenden werden nur die Koeffizienten für das Feld außerhalb des Partikels betrachtet [11]:

$$a_L = \frac{m\psi_L(mx)\psi'_L(x) - \psi_L(x)\psi'_L(mx)}{m\psi_L(mx)\xi'_L(x) - \xi_L(x)\psi'_L(mx)}, \quad (2.7a)$$

$$b_L = \frac{\psi_L(mx)\psi'_L(x) - m\psi_L(x)\psi'_L(mx)}{\psi_L(mx)\xi'_L(x) - m\xi_L(x)\psi'_L(mx)}, \quad (2.7b)$$

wobei $m = n_{Part}/n_{mat}$ das Verhältnis der Brechungsindizes des Partikelmaterials und seiner umgebenden Matrix ist. \mathbf{k} bezeichnet den Wellenvektor der einfallenden Welle und der Größenparameter $x = |\mathbf{k}|R = 2\pi R/\lambda$ das Verhältnis von Partikelradius R zur Wellenlänge. Die Funktionen $\psi_L(z)$ und $\xi_L(z)$ sind die Ricatti-Bessel Funktionen, $\psi'_L(z)$ und $\xi'_L(z)$ deren Ableitungen nach den Argumenten in den Klammern [10].

Der für optische Experimente wichtige Streuquerschnitt ergibt sich aus dem Quotienten von Bestrahlungsstärke I_{in} und der gestreuten Leistung W_{sca} [10]:

$$\sigma_{sca} = \frac{W_{sca}}{I_{in}} = \frac{2\pi}{|\mathbf{k}|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) \cdot (|a_L|^2 + |b_L|^2). \quad (2.8a)$$

Entsprechend ergibt sich der Extinktionsquerschnitt und daraus dann auch der Absorptionsquerschnitt:

$$\sigma_{ext} = \frac{W_{ext}}{I_{in}} = \frac{2\pi}{|\mathbf{k}|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) \cdot \text{Re}(a_L + b_L), \quad (2.8b)$$

$$\sigma_{abs} = \sigma_{ext} - \sigma_{sca}. \quad (2.8c)$$

Die Gleichungen (2.8) gestatten prinzipiell die exakte Berechnung der Querschnitte. In der Praxis muß eine geeignete Abbruchbedingung für die unendlichen Summen in Gl. (2.8) gewählt werden, die einen guten Kompromiß zwischen Genauigkeit auf der einen und Rechenkosten auf der anderen Seite gewährleistet. Anhang B zeigt, wie sich die Mie-Theorie im Computer-Algebra-System MATHEMATICA[®] implementieren läßt. In Anhang A wird eine Erweiterung der Mie-Theorie vorgestellt, mit denen sich die Resonanzspektren von sphärischen Nanopartikeln berechnen lassen, die aus mehreren

konzentrischen Lagen unterschiedlicher Materialien aufgebaut sind.

2.1.5 Quasistatische Näherung

Die Berechnung von Streuspektren mit der Mie-Theorie ist durch die stark gestiegene Rechenleistung moderner Computer mit relativ geringem Zeitaufwand durchführbar. Die in den folgenden Absätzen vorgestellte quasistatische oder Rayleigh Näherung hat, nicht nur weil sich damit die optischen Spektren von Nanopartikeln bis etwa 50 nm Durchmesser noch gut beschreiben lassen, dennoch ihre Berechtigung nicht verloren. Zum einen läßt sich die Wechselwirkung zwischen Licht und *nicht* sphärischen Partikeln oft nicht exakt berechnen und zum anderen erlaubt sie eine sehr anschauliche Darstellung.

Ausgangspunkt für die Näherung ist die Annahme, daß der Partikelradius klein gegenüber den Wellenlängen des sichtbaren Lichts ist. Entsprechend ist die Amplitude und Phase des elektrischen Felds *räumlich* über das gesamte Nanopartikel hinweg konstant – also statisch. Für die Querschnitte nach Gl. 2.8 ist dann nur noch der Dipolterm $L = 1$ von Bedeutung. Da in der quasistatischen Näherung der Größenparameter $x = 2\pi r/\lambda \ll 1$ ist, entwickelt man die Koeffizienten a_1 und b_1 (bzw. die darin enthaltenen Funktionen) bis zur Ordnung x^3 in eine Potenzreihe. Die Streukoeffizienten vereinfachen sich dadurch gravierend und es ergibt sich letzten Endes für den Streuquerschnitt [10]:

$$\sigma_{sca} = \frac{8\pi R^2}{3} x^4 \left| \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right|^2 = \frac{k^4}{6\pi} (3V)^2 \left| \frac{\epsilon_{Part} - \epsilon_{Matrix}}{\epsilon_{Part} + 2\epsilon_{Matrix}} \right|^2, \quad (2.9)$$

wobei V das Partikelvolumen ist. Bei geringer Wellenlängenabhängigkeit von $|(m^2 - 1)/(m^2 + 2)|^2$ folgt daraus, daß der Streuquerschnitt kleiner Partikel mit $1/\lambda^4$ von der Wellenlänge abhängt. Dies entspricht genau dem von Rayleigh 1871 mit einer anderen Herleitung gefundenen Rayleigh-Gesetz.⁴ Aus Gl. 2.9 läßt sich außerdem direkt die Resonanzbedingung im quasistatischen Fall ablesen:

$$|\epsilon_{Part} + 2\epsilon_{Matrix}| = \min \iff [\epsilon'_{Part}(\omega) + 2\epsilon_{Matrix}]^2 + [\epsilon''_{Part}(\omega)]^2 = \min. \quad (2.10)$$

⁴Es hat sich daher eingebürgert, im Zusammenhang mit der quasistatischen Näherung auch von Rayleigh-Streuung oder Rayleigh-Limit zu sprechen.

Eine Resonanz tritt daher nur für Materialien mit negativem Realteil ϵ' in der dielektrischen Funktion auf. Falls ϵ'' , also der Imaginärteil der dielektrischen Funktion, klein oder die Frequenzabhängigkeit $\partial\epsilon''/\partial\omega$ gering ist,⁵ erhält man

$$\epsilon'_{Part}(\omega_{res}) = -2\epsilon_{Matrix}. \quad (2.11)$$

Unter der Voraussetzung, daß $\omega \gg \Gamma_\infty$ ist, ergibt sich mit der dielektrischen Funktion nach Gl. 2.5 für die Resonanzfrequenz

$$\omega_{res} = \frac{\omega_p}{\sqrt{\epsilon_\infty + 2\epsilon_{Matrix}}}. \quad (2.12)$$

Für Gold-Nanopartikel in einer wäßrigen Umgebung ($\epsilon_{Matrix} = 1,77$) ergibt sich daraus beispielsweise eine Resonanzenergie von 2,49 eV, ein Wert, der für ein Nanopartikel mit $r = 20$ nm um weniger als 10 % von dem tatsächlichen, mit der Mie-Theorie bestimmten Wert abweicht.

Die Resonanzbedingung 2.11 folgt auch direkt aus einem häufig in der Elektrostatik angeführten Beispiel, bei dem die Polarisierbarkeit eines kugelförmigen Partikels mit dem Volumen V und einer Dielektrizitätskonstante ϵ_{Part} in einem homogenen Medium mit der Dielektrizitätskonstante ϵ_{Matrix} untersucht wird. Für den Zusammenhang zwischen der mikroskopischen Polarisierbarkeit α und den Dielektrizitätskonstanten erhält man die Clausius-Mossotti-Beziehung [9, 22]

$$\alpha = 3V\epsilon_0 \frac{\epsilon_{Part} - \epsilon_{Matrix}}{\epsilon_{Part} + 2\epsilon_{Matrix}}. \quad (2.13)$$

Da der Streuquerschnitt nach Bohren and Huffmann [10] über

$$\sigma_{sca} = \frac{k^4}{6\pi} \left| \frac{\alpha}{\epsilon_0} \right|^2 \quad (2.14)$$

mit der Polarisierbarkeit verknüpft ist, ergibt sich genau die Resonanzbedingung nach Gl. 2.11.

⁵Für Gold ist dies nicht in allen Wellenlängenbereichen der Fall.

2.2 Aspekte aus der Biochemie

Das menschliche Immunsystem ist hochgradig darauf spezialisiert körperfremde Stoffe zu erkennen und anschließend zu neutralisieren. Ein substanzieller Schritt der Immunantwort besteht in der spezifischen Erkennung des fremden Stoffes. Dieses Antigen kann z.B. ein Virus oder ein einzelnes Protein oder Lipid sein. Der Körper bildet für jedes Antigen maßgeschneiderte Antikörper, an die das Antigen mit hoher Affinität bindet. Die so markierten Fremdstoffe können nun von Freßzellen (Makrophagen) erkannt und vernichtet werden.

Dieses von der Natur entwickelte *Schlüssel-Schloß-Prinzip* macht man sich überall dort zu Nutze, wo der spezifische Nachweis chemisch-biologischer Stoffe erforderlich ist (siehe Kapitel 2.3).

Im folgenden Unterkapitel wird die Struktur von Antikörpern, ihre wichtigsten Eigenschaften und ihre Herstellung genauer beschrieben. Die Darstellung orientiert sich dabei im Wesentlichen an klassischen Lehrbüchern der Biochemie [23, 24], ohne den Anspruch zu erheben, dieses komplexe Gebiet auch nur annähernd vollständig zu beschreiben.

2.2.1 Aminosäuren und Proteine

Proteine sind die vielseitigste Stoffklasse im menschlichen Körper und spielen eine Schlüsselrolle in der Biochemie des Menschen. Sie stellen etwa 15% der Körpermasse und übernehmen Aufgaben als Aufbaustoffe, Strukturelemente, Betriebsstoffe, Katalysatoren, Hormone und Antikörper [23, 25].

Aminosäuren

Alle Proteine sind aus denselben Grundbausteinen, den Aminosäuren aufgebaut. Es existiert zwar eine große Anzahl verschiedener Aminosäuren, aber nur 20 von ihnen kommen tatsächlich in Proteinen vor. Die chemische Struktur dieser Standardamino-säuren ist bis auf eine Restgruppe (R) identisch⁶ und in Abbildung 2.4 dargestellt. Sie besitzen zwei charakteristische funktionale Gruppen, eine Carboxyl- und eine Aminogruppe, die jeweils an dasselbe Kohlenstoffatom gebunden sind. Beginnend mit

⁶Die zyklische Aminosäure Prolin bildet die einzige Ausnahme.

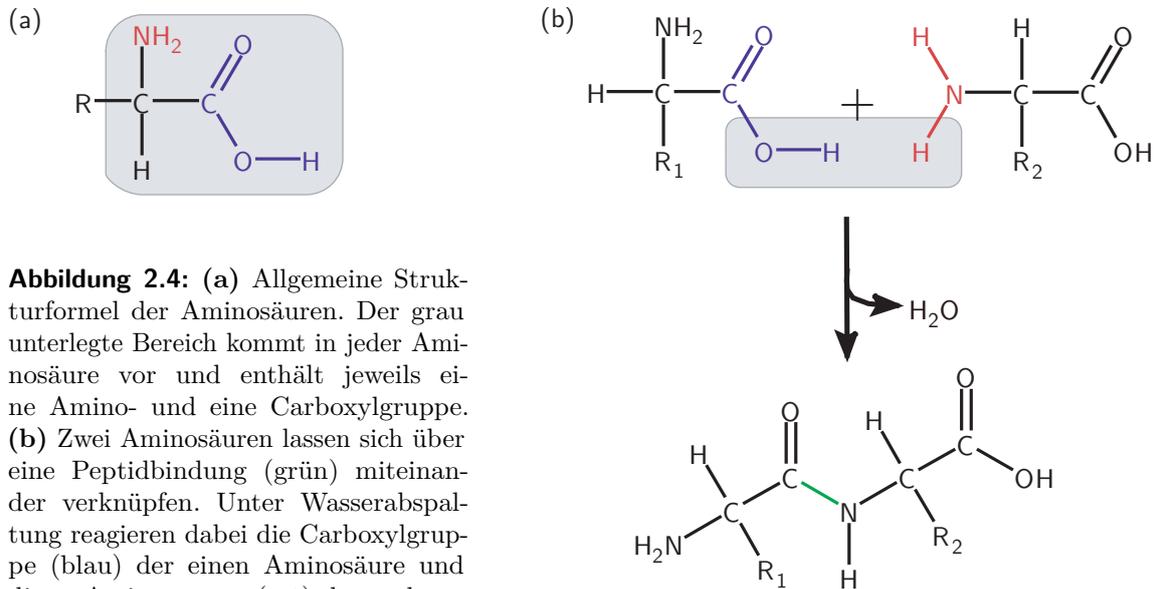


Abbildung 2.4: (a) Allgemeine Strukturformel der Aminosäuren. Der grau unterlegte Bereich kommt in jeder Aminosäure vor und enthält jeweils eine Amino- und eine Carboxylgruppe. (b) Zwei Aminosäuren lassen sich über eine Peptidbindung (grün) miteinander verknüpfen. Unter Wasserabspaltung reagieren dabei die Carboxylgruppe (blau) der einen Aminosäure und die α -Aminogruppe (rot) der anderen Aminosäure zu einem Dipeptid. Analog können drei Aminosäuren zu einem Tripeptid, oder mehrere Aminosäuren zu Polypeptiden reagieren.

diesem Kohlenstoffatom werden alle in der Aminosäure vorhandenen Kohlenstoffatome, also auch diejenigen in der Seitenkette, mit α , β , γ , δ usw. numeriert.⁷

Eine charakteristische Eigenschaft von Aminosäuren ist es, daß sie in einer Polykondensationsreaktion untereinander reagieren und sich unter Wasserabspaltung zu Aminosäureketten verbinden können. Die einzelnen Aminosäuren werden dabei über Peptidbindungen miteinander verknüpft. Abbildung 2.4 zeigt die Ausbildung einer Peptidbindung (grün), bei der die Carboxylgruppe (blau) einer Aminosäure unter Wasserabspaltung mit der Aminogruppe (rot) einer anderen Aminosäure reagiert. An dieser Stelle muß jedoch betont werden, daß bei normalem physiologischen pH-Wert (ca. pH 7) die gezeigte Kondensationsreaktion nicht oder nur in geringem Umfang auftritt. Tatsächlich setzt sie eine chemische Aktivierung der Carboxylgruppe voraus, z.B. durch Anheften der Aminosäure an eine geeignete Transfer-Ribonukleinsäure (t-RNA) [23].

Erwähnenswert im Bezug auf diese Arbeit sind die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein, die eine unpolare Thioethergruppe bzw. eine Thiolgruppe in

⁷Entsprechend sind alle 20 Standardamino­säuren α -Aminosäuren. Die Nomenklatur ist für heterozyklische Aminosäuren nicht eindeutig.

ihrer Seitenkette tragen. In Proteinen können sich zwischen diesen Gruppen (kovalente) Disulfidbrücken ausbilden und so die Proteinstruktur maßgeblich stabilisieren. Des Weiteren spielen sie für die hohe Affinität vieler Proteine zu Goldoberflächen eine Rolle, da sich Schwefelatome gut an Gold binden lassen. Für weitere Eigenschaften einzelner Aminosäuren und ihre Klassifizierung nach der Polarität ihrer Restgruppen sei an dieser Stelle auf Grundlagenbücher der Biochemie verwiesen [23, 24].

Viele Eigenschaften von Proteinen, insbesondere auch ihre Stabilität, beruhen auf den Säure-Base Eigenschaften der Aminosäuren, auf die deshalb kurz in Anhang C eingegangen wird. Sie bestimmen, welche Nettoladung ein Protein in einer Lösung mit festem pH-Wert besitzt. Der isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins ist der pH-Wert, bei dem seine Nettoladung gleich Null ist. Aus experimenteller Sicht ist die Kenntnis des pI eines Proteins bedeutsam, da die Struktur und damit auch die Funktion von Proteinen durch elektrostatische Ladungen stabilisiert wird. Des Weiteren aggregieren Proteine in der Nähe des pI besonders leicht, da dann zwischen ihnen keine elektrostatischen Abstoßungskräfte mehr wirken. Um dies im Experiment sicher zu verhindern, müssen alle Messungen in einem Puffer stattfinden, dessen pH-Wert oberhalb (oder unterhalb) des pI aller beteiligten Proteine liegt.

Proteine

Je nach ihrer Länge werden Aminosäureketten als Oligopeptid (ca. 2-20 Aminosäuren), Polypeptid (ca. 20-100 Aminosäuren), oder als Protein (über 100 Aminosäuren) bezeichnet. Die Grenzen sind jedoch nicht scharf definiert, und oft werden die Begriffe Polypeptid und Protein synonym verwendet. Viele größere Proteine sind aus mehreren, nicht kovalent aneinander gebundenen Polypeptiden aufgebaut. Ein Beispiel für ein solches multimeres Protein ist das (menschliche) Hämoglobin, das aus 4 Polypeptiden besteht, die insgesamt aus 574 Aminosäuren aufgebaut sind. Serumalbumin, ebenfalls ein in hoher Konzentration im Blut vorkommendes Protein, besteht dagegen nur aus einer einzigen Kette, die sich aus 609 Aminosäuren zusammensetzt [23]. Neben Aminosäuren enthalten einige Proteine weitere Bestandteile, wie z.B. ein bestimmtes Metall (Metalloproteine) oder Eisen-Porphyrin in den Hämproteinen. Allgemein läßt sich die Struktur von Proteinen in vier Hierarchiestufen beschreiben:

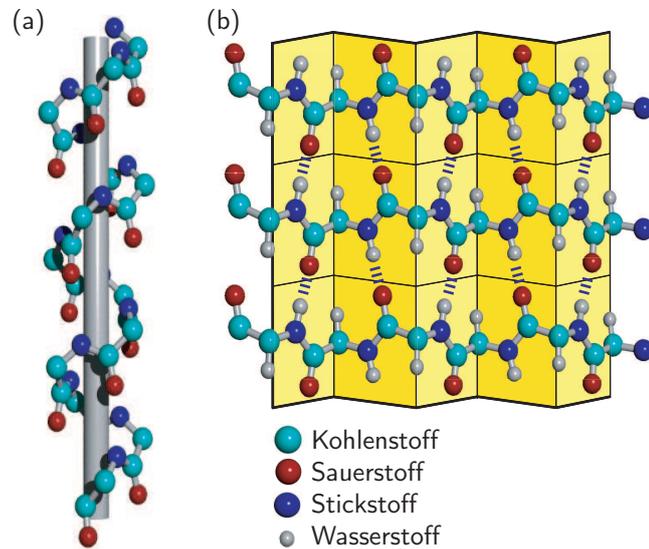
- i) Unter der *Primärstruktur* eines Peptids oder Proteins versteht man die Sequenz der verschiedenen, kovalent gebundenen Aminosäuren in der Kette.

- ii) Regelmäßige Faltungsmuster innerhalb eines Polypeptids werden als *Sekundärstruktur* bezeichnet. Besonders häufig kommen die in Abb. 2.5 gezeigte α -Helix und die plane β -Faltblattstruktur vor, die beide durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäureresten in der Polypeptidkette entstehen. Die β -Faltblattstruktur untergliedert sich in zwei verschiedene Konformationen in denen die benachbarten Ketten entweder parallel oder antiparallel zueinander verlaufen.
- iii) Ein einzelnes Polypeptid kann sowohl Abschnitte, die sich als α -Helix, als auch Abschnitte, die sich in der β -Faltblattstruktur organisieren, enthalten. Unterschiedliche Bereiche werden durch Schleifen oder Biegungen der Polypeptidkette verbunden. So sind z.B. die Enden zweier benachbarter Polypeptidketten in antiparallelen β -Faltblattstrukturen über β -Schleifen aus vier Aminosäureresten miteinander verknüpft. Eine hohe Anzahl an Biegungen und Schleifen ist die Ursache für die kompakte, globuläre Struktur vieler Proteine. Die räumliche Anordnung der α -Helices und β -Faltblattstrukturen wird als *Tertiärstruktur* bezeichnet und bestimmt die dreidimensionale Gestalt der Proteine.
- iv) Komplexe Proteine, wie zum Beispiel Antikörper, können aus mehreren aggregierten Polypeptidketten bestehen, deren räumliche Anordnung als *Quartärstruktur* bezeichnet wird.

Die Faltung der Polypeptidketten in ihre native, dreidimensionale Gestalt beginnt direkt nach ihrer Synthese in der Zelle [23, 24].⁸ Diese Faltung kann aus Zeitgründen nicht rein zufällig geschehen: Für ein Protein aus 100 Aminosäuren und jeweils 4 Möglichkeiten für die Raumwinkel an einer Peptidbindung ergäben sich $4^{100} \approx 10^{60}$ mögliche Konformationen. Selbst bei einer Faltungsgeschwindigkeit von 10^{-13} s würde es über 10^{39} Jahre dauern, alle Möglichkeiten auszuprobieren, um die energetisch günstigste Konformation zu finden. Tatsächlich dauert die Faltung aber nur einige Sekunden. Zur Lösung dieses von C. Levinthal aufgeworfenen Problems gibt es zur Zeit zwei, sich nicht unbedingt gegenseitig ausschließende Modelle [23, 26–29]. Im Modell der hierarchischen Faltung geht man davon aus, daß sich zunächst die Sekundärstrukturen bilden. Dabei müssen nicht alle Konformationen überprüft werden,

⁸Bei einer Vielzahl von Proteinen wird die Faltung in die Tertiärstruktur durch spezielle Proteine, z.B. durch Chaperone unterstützt bzw. erst ermöglicht.

Abbildung 2.5: Durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäureresten einer Polypeptidkette entsteht die Sekundärstruktur. (a) Struktur der α -Helix. Um die Übersichtlichkeit zu erhöhen wurde auf die Darstellung der Seitenketten und der Wasserstoffatome verzichtet. (b) Die plane β -Faltblattstruktur wird ebenfalls durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen parallelen (oder antiparallelen) Abschnitten einer Polypeptidkette stabilisiert. Wie in (a) sind die nach außen herausstehenden Seitenketten der Aminosäurereste nicht eingezeichnet.



da die Sequenz der Aminosäurereste bereits die Anzahl möglicher Sekundärstrukturen limitiert. Die unterschiedlich starken Wechselwirkungen zwischen den bereits in ihrer Sekundärstruktur gefalteten Abschnitten treiben die Faltung weiter voran, so daß sich Domänen und schließlich das komplette Molekül falten.

Das zweite Modell geht von einem spontanen Kollaps des Polypeptids aus, der durch die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen unpolaren Aminosäureresten ausgelöst wird. Das kollabierte Polypeptid (molten globule) enthält bereits einen großen Anteil an Sekundärstruktur. Dennoch sind viele der Aminosäurereste in diesem kollabierten Zustand noch nicht endgültig fixiert. Das Protein nimmt nun solange verschiedene Konformationen an, bis der thermodynamisch günstigste Zustand, also der Zustand der geringsten freien Enthalpie erreicht ist. Bemerkenswert ist jedoch, daß eine große Anzahl an Proteinen existiert, deren nativer Zustand *nicht* mit dem Zustand der minimalen freien Enthalpie korrespondiert [23, 26–28].⁹ Heute geht man davon aus, daß der Faltungsprozeß der meisten Proteine Elemente beider Modellvorstellung enthält [23, 29]. Daher sind insbesondere die Zwischenschritte bei der Faltung eines Proteins aus seiner Primärstruktur in seine dreidimensionale Gestalt Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten [29, 30].

⁹Dies gilt insbesondere für Proteine mit einem hohen Molekulargewicht.

2.2.2 Die dreidimensionale Struktur von Antikörpern

Abb. 2.6a zeigt die schematische Darstellung eines Immunoglobulin G Proteins. Sie bilden die größte Klasse von Antikörpern und gehören zu den dominierenden Proteinen im menschlichen Blutserum. Immunoglobulin G (IgG) ist aus insgesamt zwei schweren und zwei leichten Polypeptidketten aufgebaut. Interchenare Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten verbinden die einzelnen Ketten miteinander. Die schweren Ketten enthalten jeweils drei konstante Domänen C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} , die in allen Immunoglobulin G Molekülen identisch sind, sowie eine variable Kette V_H . Die leichten Ketten sind aus einer variablen Kette V_L und einer konstanten Domäne C_L aufgebaut. Der Durchmesser dieser globulären Antikörper beträgt etwa 7 nm

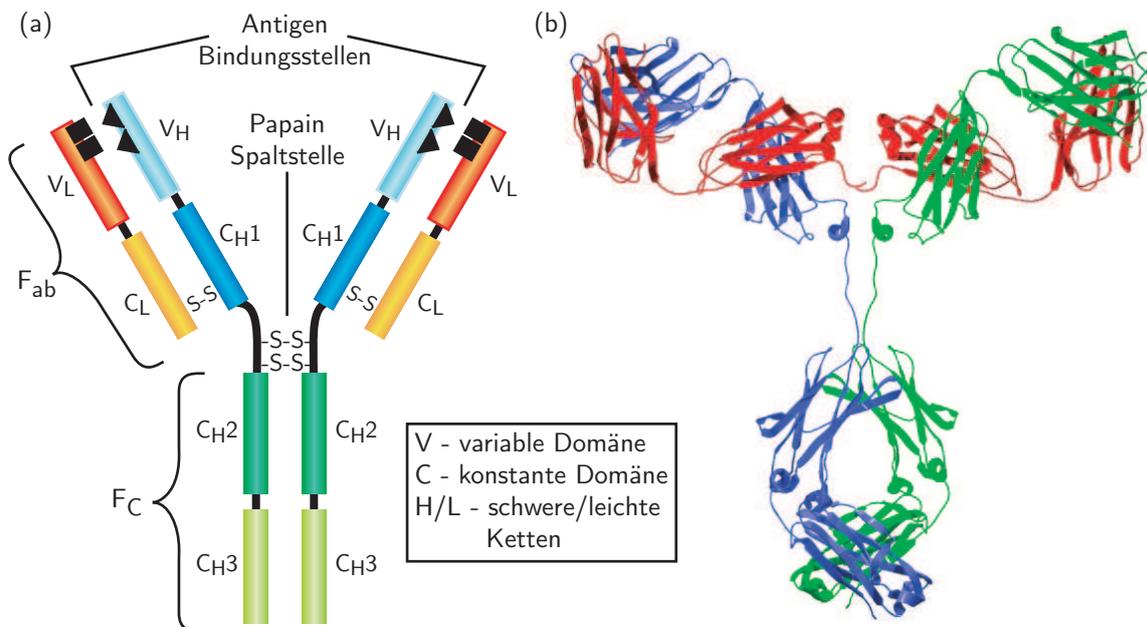


Abbildung 2.6: (a) Die Struktur von Immunoglobulin Molekülen (IgG). Immunoglobuline bestehen aus jeweils zwei schweren und leichten Ketten die über Disulfidbrücken (S-S) zwischen Cysteinresten kovalent miteinander verknüpft sind. Die beiden schweren Ketten sind aus jeweils drei konstanten Domänen (C_{H1} , C_{H2} und C_{H3}), einer flexiblen Gelenkregion, die die C_{H1} und C_{H2} Domänen miteinander verbindet und einer variablen Domäne V_H aufgebaut. Die leichten Ketten enthalten ebenfalls eine variable, aber nur eine konstante Domäne (V_L bzw. C_L). Die variablen Domänen V_L und V_H bilden zwei Antigen-Bindungsstellen. Die F_{ab} und F_c Regionen lassen sich durch proteolytische Spaltung mit Papain in der Gelenkregion voneinander trennen. (b) Bändermodell eines IgG Moleküls. Die beiden schweren Ketten sind in blau und grün gezeichnet, die beiden leichten Ketten in rot. Die Atomkoordinaten des Modells sind von Padlan [31] aus den Dateien 2IG2.PDB und 1FC2.PDB der „RCSB Protein Data Bank“ zusammengesetzt worden (IGG1-ALL.PDB).

und ihr Molekulargewicht beträgt typischerweise 150,000 D.¹⁰ Die dreidimensionale Gestalt von Antikörpern, wie sie in Abb. 2.6b für Immunglobulin G gezeigt ist, läßt sich aus Röntgenstrukturaufnahmen ableiten. Ein prinzipbedingter Nachteil dieser Methode ist, daß die Proteine zunächst kristallisiert werden müssen. Dies bedeutet nicht nur einen hohen Materialeinsatz, sondern ändert evtl. auch die natürliche Umgebung und die Konformation der Proteine. Man gleicht daher die Röntgenstruktur mit zusätzlichen Informationen, z.B. mit der chemisch bestimmten Sequenz der Aminosäurereste, ab. Für kleinere Proteine kommt auch eine Strukturaufklärung in Lösung mittels Kernspinresonanz in Frage. Dabei zeigt sich im Allgemeinen eine gute Übereinstimmung mit Daten aus Röntgenstrukturaufklärungen.

Besondere Bedeutung für die Funktion des Antikörpers kommt den variablen Domänen zu. Jeweils eine variable Domäne einer schweren und einer leichten Kette bilden die Antigenbindungsstelle, das Paratop des Antikörpers. Das Paratop ist für die Spezifität des Antikörpers gegenüber einem bestimmten Antigen verantwortlich. Ursache für die Spezifität sind Wechselwirkungen zwischen geladenen, unpolaren und wasserstoffbindenden Gruppen des Antigens mit komplementären Gruppen des Paratops. Der Kontakt von Ligand und Antikörper kann zusätzlich Konformationsänderungen induzieren, die anschließend eine vollständige Reaktion komplementärer Gruppen ermöglicht. Sofern das Antigen größer als das Paratop des Antikörpers ist, können auch zwei Antikörper an unterschiedliche Bindungsstellen des Antigens (Epitope) binden (siehe auch Kapitel 4).

Gewinnung von Antikörpern

Eine Möglichkeit Antikörper (AK) zu gewinnen besteht darin, Labortiere zu immunisieren und anschließend die vom Tier gebildeten Antikörper aus dessen Blut aufzureinigen. Da im Tier eine große Anzahl verschiedener Zellen Antikörper gegen den injizierten Fremdstoff bilden, entsteht ein Gemisch unterschiedlicher oder *polyklonaler* Antikörper (PAK). Die Herstellung größerer Mengen von Antikörpern mit gleichbleibenden Eigenschaften ist auf diese Weise also nicht möglich. Für technische Anwendungen stellt man Antikörper daher in Bioreaktoren in großem Maßstab her. Diese haben den entscheidenden Vorteil, von klonierten und daher identischen Im-

¹⁰1 D = 1 u, atomare Masseneinheit

munzellen zu stammen. Solche *monoklonalen* Antikörper (MAK) weisen daher auch identische Eigenschaften auf, insbesondere die gleiche Affinität zu ihrem Antigen.

2.3 Biomolekulare Erkennung

Molekulare Erkennung ist eine Schlüsseltechnologie in der heutigen Analytik. Insbesondere beruhen viele Analyseverfahren in der Toxikologie, bei der Suche nach neuen medizinischen Wirkstoffen (Screening), in der Umweltanalytik und der medizinischen Diagnostik auf einer spezifischen biologischen Wechselwirkung zwischen zwei Biomolekülen. In diesem Kapitel werden zunächst die Grundlagen der Affinitätsreaktion zwischen Antikörpern und Antigenen erläutert. Im anschließenden Kapitel „Immunoassays“ werden einige der in der modernen Diagnostik üblichen Testformate vorgestellt.

2.3.1 Affinitätsreaktionen

Die Wechselwirkung zwischen einem Antikörper und einem Antigen, oder allgemeiner zwischen einem Rezeptor R und einem Liganden L in einer Lösung wird durch eine Gleichgewichtsreaktion beschrieben [23, 32–35]:



wobei RL die aus Rezeptoren und Liganden gebildeten Komplexe und k_a bzw. k_d die Assoziations- und Dissoziationskonstanten sind. Der Zeitverlauf der Reaktion läßt sich mit der Differentialgleichung für das Massenwirkungsgesetz beschreiben:

$$\frac{dC_{RL}}{dt} = k_a C_R(t) C_L(t) - k_d C_{RL}(t). \quad (2.16)$$

Darin sind C_{RL} , C_R und C_L die Konzentrationen der geformten Komplexe RL , der Rezeptoren R und der Liganden L . Im stationären Zustand, bei dem sich C_R und C_L mit C_{RL} im Gleichgewicht befinden, gilt das Massenwirkungsgesetz

$$\frac{dC_{RL}}{dt} = 0 \implies K = \frac{k_a}{k_d} = \frac{C_{RL}}{C_R \cdot C_L}. \quad (2.17)$$

Das Verhältnis K der Assoziations- und Dissoziationskonstante im Gleichgewicht wird als Bindungs- oder Affinitätskonstante bezeichnet. Die Affinitätskonstante ist mit der Änderung der freien Enthalpie ΔG der Reaktion über die Beziehung $\Delta G = -RT \ln(K \cdot 55,6 \text{ mol/l})$ verknüpft,¹¹ wobei $R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ die allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur sind [23, 36, 37]. Die Affinitätskonstante K stellt daher ein Maß für die Stärke der Bindung zwischen dem Rezeptor und dem Liganden dar. Typische Werte für k_a liegen in einem Bereich zwischen $10^5 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und $10^8 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, während die Dissoziationskonstante k_d in einem wesentlich größeren Bereich von 10^4 s^{-1} bis 10^{-7} s^{-1} liegt [1, 6]. Demnach überspannen die Werte der Affinitätskonstante mehr als 10 Größenordnungen von niedrig- bis zu hochaffinen Bindungspartnern.

Bezeichnet man die absolute Rezeptorkonzentration mit C_R^{tot} und die absolute Konzentration der Liganden mit C_L^{tot} gilt aufgrund der Erhaltung der Gesamtmasse:

$$C_R^{tot} = C_R(t) + C_{RL}(t), \quad C_L^{tot} = C_L(t) + C_{RL}(t). \quad (2.18)$$

Setzt man Gl. 2.18 in Gl. 2.16 ein, erhält man eine gewöhnliche Differentialgleichung, die den Zeitverlauf, mit dem sich der Komplex aus Rezeptor und Ligand bildet, beschreibt.

In vielen Biosensoren wird einer der beiden Bindungspartner, z.B. der Rezeptor R auf einer Oberfläche immobilisiert (siehe Kap. 2.3.4). Der andere Bindungspartner bzw. das Analytmolekül welches nachgewiesen werden soll (hier der Ligand L), befindet sich frei in der zu untersuchenden Lösung. Falls die Lösung permanent erneuert wird, oder die Anzahl an Liganden viel größer ist als die Anzahl der immobilisierten Rezeptoren, bleibt die ursprüngliche Konzentration C_L^i der Liganden während der Reaktion konstant ($C_L(t) = C_L^i = \text{const.}$). Aus Gl. 2.16 und 2.18 ergibt sich unter dieser Annahme:

$$\frac{dC_{RL}}{dt} = k_a C_L^i [C_R^{tot} - C_{RL}(t)] - k_d C_{RL}(t). \quad (2.19)$$

¹¹Die Beziehung gilt in dieser Form, wenn die Affinitätskonstante, wie in der Biochemie üblich, in $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1}$ gemessen wird. Der Faktor $55,6 \text{ mol/l}$ ergibt sich dann aus der Tatsache, daß in einem Liter Wasser $55,6 \text{ mol H}_2\text{O}$ Moleküle enthalten sind. Für eine Affinitätskonstante $K = 1 \cdot 10^6 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ ergibt sich zum Beispiel eine freie Bindungsenthalpie $\Delta G = -44 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (bei $T = 298 \text{ K}$) [36, 37].

Besteht ferner eine direkte Proportionalität zwischen dem Sensorsignal und der Konzentration C_{RL} des Komplexes, ergibt sich als Lösung von Gl. 2.19

$$R(t) = R_{eq} [1 - \exp [-k_d (K C_L^i + 1) t]] , \quad (2.20)$$

wobei

$$R_{eq} = R_{max} \frac{K C_L^i}{K C_L^i + 1} \quad \text{und} \quad K = \frac{k_a}{k_d} \quad (2.21)$$

ist. R_{max} ist das maximale Sensorsignal, wenn alle Rezeptoren mit Ligand-Molekülen abgesättigt sind. Abb. 2.7 veranschaulicht Gl. 2.20 und Gl. 2.21 graphisch. Für den zeitlichen Verlauf des Sensorsignals nach Gl. 2.20, wurden eine für Antikörper-Antigen Bindungen typische Bindungskonstante $K = 10^7 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ und eine Dissoziationskonstante $k_d = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ angenommen. Für eine Ligandkonzentration von $C_L^i = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$ wird das Gleichgewicht bereits innerhalb von 5 min erreicht, während es sich für die niedrigste gezeigte Konzentration $C_L^i = 5 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l}$ erst nach über 50 min einstellt. Ebenfalls deutlich zu erkennen ist, daß das Sensorsignal R_{eq} mit abnehmender

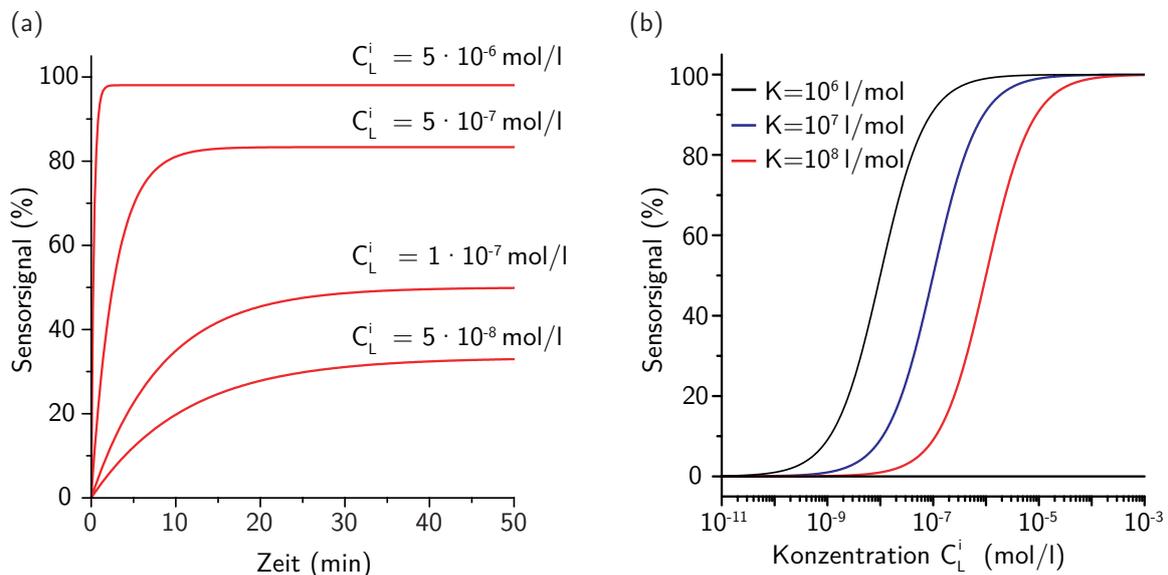


Abbildung 2.7: (a) Zeitlicher Verlauf des Sensorsignals nach Gl. 2.20. Für die Rechnung wurde eine Bindungskonstante $K = 10^7 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ und eine Dissoziationskonstante $k_d = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ angenommen. Mit abnehmender Konzentration C_L^i wird die Gleichgewichtskonzentration zu immer späteren Zeitpunkten erreicht. Gleichzeitig nimmt das maximale Sensorsignal im Gleichgewichtszustand ab. (b) Hier ist das Sensorsignal im Gleichgewichtszustand R_{eq} gegen die Ligandkonzentration C_L^i für verschiedene Gleichgewichtskonstanten aufgetragen. Je größer K ist, desto mehr verschiebt sich die Kurve zu niedrigeren Konzentrationen, d.h. der Assay wird empfindlicher.

Konzentration stark zurückgeht.

Abb. 2.7b zeigt das Sensorsignal R_{eq} in Abhängigkeit von der Ligandkonzentration C_L^i . Diese sogenannten Standardkurven eines Assays geben Aufschluß über dessen Empfindlichkeit und dessen dynamischen Bereich. Je größer die Bindungsaffinität zwischen Rezeptor und Ligand ist, desto weiter verschiebt sich die Standardkurve zu niedrigeren Konzentrationen.

Tatsächlich wird die Bindungskinetik in realen Sensoren außer von der Bindungskonstanten und der Ligandkonzentration noch durch weitere, im Allgemeinen nicht zu vernachlässigende Faktoren bestimmt, von denen die wichtigsten im folgenden diskutiert werden.

2.3.2 Massentransport

In der Regel wird die Bindungskinetik nicht nur von der Affinität der Bindungspartner zueinander, sondern auch vom Transport der Analytmoleküle zur Sensoroberfläche beeinflusst. Nur wenn die Geschwindigkeit der Rezeptor-Ligand Bindung klein gegenüber der Diffusionsgeschwindigkeit des Analyten in der Lösung ist, spielen Transportprozesse eine untergeordnete Rolle. Andernfalls können sie maßgeblich zur Bindungskinetik beitragen oder diese sogar dominieren.

Sobald ein Analytmolekül an die Sensoroberfläche anbindet, ist die Analytkonzentration nicht mehr homogen und variiert räumlich und zeitlich. Prinzipiell läßt sich dieser Prozeß mit einer partiellen Differentialgleichung beschreiben. Oft genügt jedoch eine Approximation, wie sie Abbildung 2.8 veranschaulicht. Die feste Phase des Sensors – hier die Oberfläche einer Kugel mit dem Radius r – ist von einer Diffusionsschicht der Dicke δ umgeben. In der Näherung wird angenommen, daß im Gleichgewicht sowohl die Analytkonzentration C_L^{in} innerhalb, als auch die Konzentration C_L außerhalb der Diffusionsschicht zeitlich konstant ist. Zum Zeitpunkt $t = 0$ ist der Analyt im äußeren Raum zwar homogen verteilt, innerhalb der Diffusionsschicht aber Null ($C_L^{in}|_{t=0} = 0$). Zu Beginn diffundieren die Analytmoleküle daher schnell in die Diffusionsschicht und binden anschließend an die Sensoroberfläche, wobei aufgrund der radialen Symmetrie des Systems der Nettofluß in radialer Richtung stattfindet. Wenn man das Volumen der Diffusionsschicht mit V_d , die Sensoroberfläche mit A und die Anzahl freier Bindungsstellen pro Fläche mit C_R bezeichnet, beträgt die Gesamtzahl der Analyte innerhalb der Diffusionsschicht $V_d C_L^{in}$, die Anzahl freier Bindungsstellen AC_R und die Anzahl

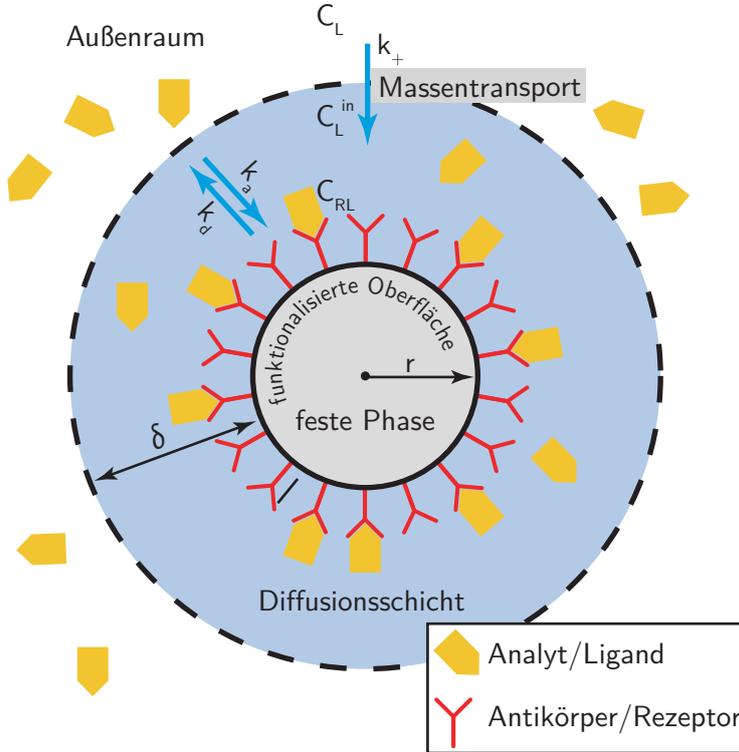


Abbildung 2.8: Kompartiment-Modell für den Massentransport zu einer funktionalisierten Sensoroberfläche. Nach einer kurzen Zeitspanne stellt sich ein Quasi-Gleichgewicht zwischen der Konzentration C_L der Liganden außerhalb des Kompartiments und der Konzentration C_L^{in} innerhalb des Kompartiments ein. C_L und C_L^{in} sind dann konstant, aber nicht notwendigerweise gleich groß. Wenn die Bindungskinetik schnell ist, d.h. $k_a - k_d \gg k_+$, wird sie maßgeblich vom Transport des Analyten zur Sensoroberfläche beeinflusst.

gebundener Analyte AC_{RL} . Die Anzahl freier Analyte in der Diffusionsschicht und die Konzentration der geformten Komplexe lassen sich mit den folgenden Gleichungen beschreiben [38, 39]:

$$V_d \frac{dC_L^{in}}{dt} = -k_a AC_R C_L^{in} + k_d AC_{RL} + k_+(C_L - C_L^{in}), \quad (2.22)$$

$$\frac{dC_{RL}}{dt} = k_a C_R C_L^{in} - k_d C_{RL}. \quad (2.23)$$

Dabei beschreibt k_+ die Diffusion von Analytmolekülen zwischen dem Außenraum und der Diffusionsschicht. Nachdem anfänglich die Konzentration in der Diffusionsschicht stark angestiegen ist, ändert sie sich mit zunehmender Zeit nur noch langsam. In diesem Quasi-Gleichgewichtszustand kann man daher näherungsweise $dC_L^{in}/dt = 0$ setzen [38, 39]. Wird Gl. 2.22 nach C_L^{in} aufgelöst und in Gl. 2.23 eingesetzt, ergibt sich folgende Beziehung für die Konzentration der Komplexe:

$$\frac{dC_{RL}}{dt} = k_a^{eff} C_L C_R - k_d^{eff} C_{RL} \quad (2.24)$$

mit den *effektiven* Ratenkonstanten

$$k_a^{eff} = \frac{k_a}{1 + k_a C_{RA}/k_+} \quad \text{und} \quad k_d^{eff} = \frac{k_d}{1 + k_a C_{RA}/k_+}. \quad (2.25)$$

2.3.3 Diffusionslimit

Im Diffusionslimit ist die Kinetik der Affinitätsreaktion vollständig vom Massentransport zur Sensoroberfläche, sprich allein von der Diffusion des Analyten bestimmt ($k_a \gg k_+$). Die Sensoroberfläche bindet dann alle auf sie treffenden Analyte instantan und Gl. 2.24 vereinfacht sich zu:

$$\frac{dC_{RL}}{dt} = k_+ \frac{C_L}{A}, \quad \text{für } k_a \gg k_+. \quad (2.26)$$

Die Zahl der pro Zeiteinheit auf dem Sensor mit der Fläche A gebundenen Analyte ist entsprechend $dN/dt = A \cdot dC_{RL}/dt = k_+ C_L$. Die Rate dN/dt läßt sich durch Lösen der Diffusionsgleichung (2. Ficksches Gesetz) unter den Randbedingungen einer verschwindenden Analytkonzentration an der Sensoroberfläche und einer konstanten Konzentration C_L in unendlicher Entfernung bestimmen [39–41]. Aus dem (Smoluchowski-) Ergebnis im Gleichgewichtszustand ergibt sich durch Vergleich

$$k_+ = 4\pi D a. \quad (2.27)$$

Dabei ist D die Diffusionskonstante des Analyten und a die Summe des Sensor- und des Analytradius. Da der Analyt im Normalfall wesentlich kleiner als die sphärische Sensoroberfläche – die zum Beispiel eine Zelle oder ein Goldpartikel sein kann – ist, läßt sich in guter Näherung $a = r$ setzen.

Die Ergebnisse der vorigen Abschnitte zeigen, daß Transportprozesse eine entscheidende Rolle spielen, wann immer sich die effektiven Ratenkonstanten nach Gl. 2.25 von den eigentlichen Raten k_a und k_d unterscheiden. Auf die Gleichgewichtskonstante K haben Transportprozesse dagegen keinen Einfluß, da $K = k_a/k_d = k_a^{eff}/k_d^{eff}$.

Außer dem Massentransport existieren eine Reihe weiterer Prozesse in Immunoassays, die die Reaktionskinetik beeinflussen können. Dazu zählen Affinitätsreaktionen, bei denen ein Rezeptor mehr als nur einen Liganden binden kann oder mehrstufige Reaktionen wie sie in kompetitiven Assays (siehe Kap. 2.3.4) stattfinden [32]. Vielfach lassen sich niedermolekulare Biomoleküle auch nicht *direkt* ohne Funktionsverlust an

eine Festphase binden, sondern müssen vorher an ein größeres Protein, z.B. an RSA (*Rinder-Serum-Albumin*) gebunden werden [1]. Die Sensoroberfläche trägt dann eine Proteinschicht, in die der eigentliche Bindungspartner statistisch verteilt eingebettet und dadurch schlechter zugänglich ist [32, 33, 42, 43].

2.3.4 Immunoassays

Ganz allgemein versteht man unter einem Immunoassay ein immunanalytisches Nachweis- oder Testverfahren zur Detektion von Biomolekülen. Alle Immunoassays beruhen auf einer *spezifischen* Reaktion eines Antigens (Ligand) mit einem korrespondierenden Antikörper (Rezeptor). Üblicherweise wird das gesuchte Molekül, das je nach Testaufbau das Antigen oder der Antikörper sein kann, als *Analyt* bezeichnet. Profunde Betrachtungen zu Immunoassays finden sich in zahlreichen Monographien [1, 6, 44].

Grundsätzlich lassen sich Immunoassays entsprechend ihrem Detektionsprinzip in zwei verschiedene Kategorien einteilen.¹² Bei direkten Immunoassays wird die Antigen-Antikörperbindung unmittelbar, z.B. über eine Brechungsindexänderung oder eine Eigenfluoreszenz des Analyten „direkt“ detektiert. Indirekte Nachweisverfahren verwenden dagegen Markierungs- oder Markermoleküle, die vor dem Test an einen der Bindungspartner chemisch gebunden wurden. In den ersten Immunoassays wurden radioaktive Marker (Radioimmunoassay - RIA) eingesetzt, heute sind Fluorophore, Gold-Nanopartikel und Enzyme (Enzymimmunoassay - EIA) gebräuchlich [2, 6]. Mit indirekten Immunoassays lassen sich im allgemeinen sehr niedrige Analytkonzentrationen quantitativ nachweisen (siehe Kap. 4.3). Hohe Spezifitäten werden oft dadurch erreicht, daß der Analyt von zwei Bindungspartnern erkannt werden muß bevor der Test anspricht (Sandwich-Technik - siehe Kap. 4.1).

Eine der Stärken der direkten Verfahren, zu denen auch der Einzelpartikel-Immunoassay zählt, ist es, daß sich die Kinetik der biomolekularen Bindungen unmittelbar beobachten läßt. Dazu wird einer der Bindungspartner auf einer Oberfläche eines Substrats¹³ immobilisiert. Der zweite Bindungspartner wird anschließend z.B. mit einem Flußkanal über die funktionalisierte Oberfläche geleitet. Da keinerlei Markierung

¹²In der Literatur existieren eine Vielzahl von Klassifizierungsschemata, von denen hier nur auf einige wenige eingegangen wird.

¹³In der Biochemie wird der Begriff „Substrat“ für gewöhnlich als Synonym für ein Nährmedium verwendet. In dieser Arbeit ist stets, wie in der Physik üblich, Unterlage bzw. Grundlage gemeint.

eingesetzt wird, entfällt nicht nur der Aufwand für die Markierung, sondern es ist auch ausgeschlossen, daß bei den Untersuchungen die Bindungskinetik durch den Marker beeinflusst wird.

Abgesehen vom Detektionsprinzip differenziert man verschiedene Assaytypen nach ihrer technischen Durchführung. So unterscheidet man zwischen homogenen und heterogenen Assays. Bei letzteren findet vor der Detektion ein Waschschriff statt, in dem ungebundene und eventuell störende Stoffe weggespült werden. Bei homogener Testführung wird darauf verzichtet.¹⁴ Homogene Tests sind deshalb in der Regel schneller, kostengünstiger und einfacher automatisierbar. Andererseits sind sie aber auch anfälliger für falsch positive Testergebnisse: Während der Waschschriff in heterogenen Assays unspezifische und damit schwache Bindungen löst, verursachen diese in homogenen Tests einen Anstieg des Sensorsignals. Dies ist vor allem in der klinischen Diagnostik problematisch, da hier die Proben – oft Blut oder Blutserum – eine Vielzahl an anderen, nicht gesuchten Stoffen enthalten. In der Umweltanalytik ist dieses Problem weniger ausgeprägt, da zum Beispiel Wasserproben eine wesentlich geringere Anzahl nicht gesuchter Stoffe als Blutserum enthalten [45].

Außer der Unterscheidung in heterogene und homogene Tests grenzt man kompetitive und nicht-kompetitive Assays voneinander ab. Die Unterschiede sind in Abb. 2.9 für Festphasen-Immunoassays, bei denen ein Bindungspartner auf einer Oberfläche immobilisiert ist, illustriert. In nicht-kompetitiven Tests wird die Probe, die den Analyten enthält, zusammen mit einem markierten Antikörper in Kontakt mit der funktionalisierten Oberfläche gebracht. Da der primäre Antikörper MAK 1 auf dem Substrat und der markierte Antikörper MAK 2 an unterschiedliche Epitope des Analyten A binden, bildet sich eine Sandwich-Struktur. In heterogenen Tests findet nun ein Wasch- oder Trennschriff statt, in dem ungebundene Substanzen abgespült werden. Da die Anzahl belegter Antikörper auf der Oberfläche im Gleichgewichtszustand von der Konzentration des Analyten abhängt, kann über die Markierung die Menge des gebundenen Analyten bestimmt werden.

In kompetitiven-Tests *kompetiert* der Analyt mit einem markierten Analytderivat um die Bindungsstellen auf der funktionalisierten Oberfläche: Die Bindungsstellen werden

¹⁴In der Literatur wird oft – und weniger allgemein – nur bei indirekten Assays zwischen homogener und heterogener Testführung unterschieden. Der Waschschriff trennt in diesem Fall den ungebundenen, markierten Bindungspartner ab. Dadurch ist sichergestellt, daß das gemessene Signal nur von gebundenen Markern stammt.

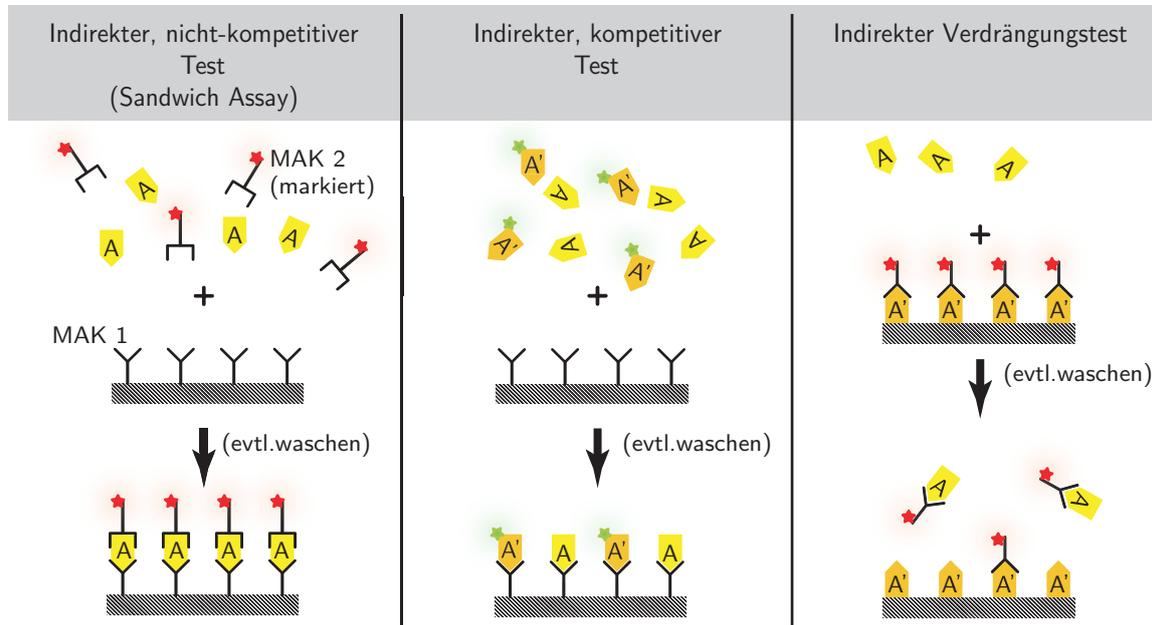


Abbildung 2.9: Immunoassays lassen sich in unterschiedlichen Formaten durchführen.

Links: Beispiel für einen nicht-kompetitiven Festphasen-Immunoassay. Ein Bindungspartner, hier der primäre Antikörper MAK 1, ist auf einem Substrat immobilisiert. Der Analyt A wird zusammen mit einem markierten, zweiten Antikörper MAK 2 hinzugefügt. Da der primäre und der markierte Antikörper an unterschiedliche Epitope des Analyten binden, entsteht auf dem Substrat eine Sandwich-Struktur: *MAK 1 – Analyt – markierter Antikörper*. Falls vor der Detektion ein Waschschritt stattfindet, der ungebundene Analyte und markierte Antikörper abtrennt, ist die Testausführung heterogen. Wird darauf verzichtet, spricht man von einem homogenen Assay.

Mitte: Kompetitiver-Immunoassay. Die Probe wird zusammen mit einem markierten Analytderivat A' auf die Sensoroberfläche gegeben. Analyt und Derivat konkurrieren nun um die Bindung an den immobilisierten Antikörper. Je höher die Analytkonzentration ist, desto weniger markierte Derivate binden im Gleichgewichtszustand an die Oberfläche. In kompetitiven Tests ist das Sensorsignal dementsprechend groß, wenn der Analyt in *geringer* Konzentration vorliegt und klein bei hoher Konzentration. In der Praxis ist es besonders interessant, daß sich über die Affinität zwischen dem Markermolekül und dem Antikörper der Gleichgewichtszustand und damit der dynamische Bereich des Sensors einstellen läßt. Auch hier ist wieder eine heterogene oder homogene Testausführung möglich.

Rechts: Prinzip des Verdrängungstests. Die Festphase des Assays ist mit dem Analytderivat A' funktionalisiert. An nahezu alle Analytmoleküle wurde vor dem eigentlichen Test ein markierter Antikörper gebunden, so daß das Sensorsignal zu Testbeginn maximal ist. Werden freie Analytmoleküle zugegeben, konkurrieren diese um die Bindung an die markierten Antikörper. Je mehr Antikörper vom Substrat abgelöst werden, desto geringer wird das Meßsignal.

In allen hier gezeigten Testformaten werden zur Verdeutlichung Marker eingesetzt – es handelt sich also um indirekte Immunoassays. Die Konzepte lassen sich aber Eins zu Eins auf direkte Assays übertragen.

teilweise vom Analyt und teilweise vom markierten Derivat, dem Kompetitor, besetzt. Je höher die Analytkonzentration in der Probe ist, desto weniger markierte Derivate binden im Gleichgewichtszustand an die Oberfläche. Das Sensorsignal in kompetitiven Tests ist dementsprechend umgekehrt proportional zur Analytkonzentration. Es ist ebenfalls möglich, das Substrat mit einem Analytderivat, welches dann nicht markiert ist, zu funktionalisieren. Zum Kompetieren wird dann ein markierter Antikörper verwendet. Statt der direkten Konkurrenz auf dem Assay, wird in der Praxis häufig die Probe zusammen mit dem Kompetitor vorinkubiert.

Eine weitere Variante des kompetitiven Assays ist der Verdrängungstest. Hier wird das um die Bindungsstellen konkurrierende Biomolekül zunächst an die funktionalisierte Oberfläche gebunden. Die später mit der Probe zugegebenen Analytmoleküle „verdrängen“ diese, bis sich ein Gleichgewicht einstellt. Bei kleinen Dissoziationsraten, kann die Testdauer erheblich sein, so daß der Verdrängungstest sich nur bei einer begrenzten Anzahl von Analyten sinnvoll einsetzen läßt.

Die Beispiele in Abb. 2.9 zeigen ausschließlich indirekte Assays, da sich die verschiedenen Testformate dann besonders anschaulich darstellen lassen. Die Konzepte für den kompetitiven Assay und den Verdrängungstest können aber ohne Änderung auf direkte Assays übertragen werden. Dabei ändert sich lediglich das Verfahren für die Detektion gebundener und ungebundener Bindungspartner.

Nach der allgemeinen Beschreibung von Immunoassays wird im nächsten Abschnitt die Funktionsweise des Einzelpartikel-Immunosensors behandelt.

3 Modellrechnungen: Sensorik mit Gold-Nanopartikeln

Die Idee für einen Einzelpartikel-Immunoassay besteht darin, die optischen Eigenschaften von Edelmetall-Nanopartikeln mit den von der Natur entwickelten biochemischen Erkennungsmechanismen zu kombinieren. Das Gold-Nanopartikel dient dabei als Signalwandler, der eine Brechungsindexänderung in seiner Umgebung in eine meßbare Verschiebung der Plasmonresonanz umsetzt. Biomolekulare Bindungsereignisse nahe der Partikeloberfläche könnten lokal den Brechungsindex der Umgebung erhöhen und infolgedessen die Plasmonresonanz zu größeren Wellenlängen verschieben. Zweckmäßigerweise muß dazu einer der beiden Bindungspartner fest an die Partikeloberfläche gebunden werden.

Die prinzipielle Abfolge eines solchen Tests zeigt Abb. 3.1. Ein Gold-Nanopartikel wird zunächst mit einem Antikörper funktionalisiert. Dadurch entsteht um das Partikel herum eine Proteinhülle, deren Dicke dem Durchmesser des (globulären) Antikörpers, das sind etwa 7 nm, entspricht. Der Brechungsindex von Proteinen ist typischerweise $n_{Prot} = 1,5$. Geht man von einer natürlichen, also einer wäßrigen Umgebung mit $n_{Matrix} = 1,33$ aus, erhöht sich durch die Funktionalisierung der Brechungsindex um das Nanopartikel (siehe Kap. 5.2). Bei Zugabe eines geeigneten Antigens bindet dieses an die Antikörper auf der Goldoberfläche, so daß sich die Dicke der Proteinhülle um den Durchmesser des Antigens vergrößert. Dadurch ändert sich ein weiteres Mal der Brechungsindex um das Nanopartikel und analog dazu die Resonanzposition des Partikelplasmons. Die Resonanzverschiebung kann daher als Reportersignal für eine erfolgte Rezeptor-Ligand Bindung dienen.

Immunoassays, die auf der Resonanzverschiebung von Partikelplasmonen durch Brechungsindexänderungen beruhen, lassen sich auf unterschiedliche Arten realisieren. Die einfachste Möglichkeit besteht darin, die Plasmonresonanz an einer wäßrigen Lösung funktionalisierter Nanopartikel mit einem herkömmlichen Absorptionsspektrometer vor und nach der Zugabe des Analyten zu messen [46, 47]. Alternativ zur Ensemble-

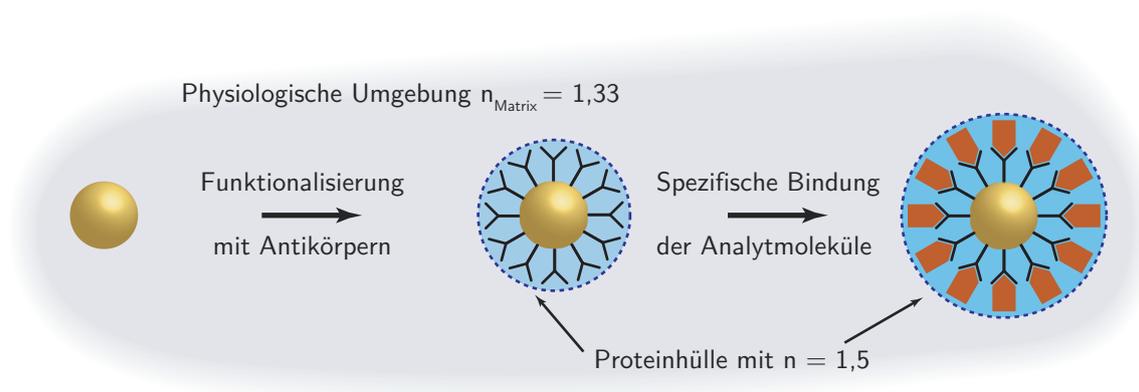


Abbildung 3.1: Funktionsprinzip des Einzelpartikel-Immunoassays. Bei der Funktionalisierung eines Gold-Nanopartikels bildet sich eine dünne Schale aus Proteinen. Der Brechungsindex dieser organischen Schicht ist mit $n_s = 1,5$ größer als der Brechungsindex der wässrigen Umgebung mit $n_{\text{Matrix}} = 1,33$. Entsprechend verschiebt die Plasmonresonanz zu größeren Wellenlängen. Geeignete Analytmoleküle können in einem weiteren Schritt spezifisch an das funktionalisierte Gold-Nanopartikel binden. Ausschlaggebend für die Funktion des Einzelpartikel-Immunoassays ist, daß sich dadurch die Dicke der Proteinhülle um das Partikel vergrößert, wodurch sich die Resonanzposition des Streuspektrums abermals verschiebt.

Messung in Lösung läßt sich auch die Extinktion einer Monolage von Nanopartikeln auf einem Glaträger bestimmen [48–50]. Eine *dramatische* Reduktion benötigter Analytmoleküle läßt sich erreichen, wenn statt eines Ensembles an Partikeln ein *einziges* Nanopartikel als Sensor verwendet wird. Genau dieser Ansatz wird hier verfolgt. In Kap. 6 wird gezeigt, daß sich so weniger als 100 molekulare Bindungsereignisse nachweisen lassen. Die Messung an einzelnen Partikeln hat fraglos weitere Vorzüge. Dazu zählt insbesondere, daß Messungen an einzelnen Nanopartikeln nicht unter der zwangsläufig in Ensemble-Messungen auftretenden inhomogenen Verbreiterung der optischen Spektren leiden. Mit Hilfe der Einzelpartikel-Streuspektroskopie ermittelte homogene Linienbreiten [15, 51–54], vereinfachen die exakte Bestimmung der Resonanzposition und ermöglichen es, Resonanzverschiebungen von wenigen meV zu erkennen.¹ Aufgrund ihrer geringen Größe bieten sich Assays auf Einzelpartikel-Basis für die Integration auf Mikrochips an. Durch starke Parallelisierung könnten sie dort zur gleichzeitigen Detektion zahlreicher Analyte eingesetzt werden. Wie in Kap. 3.2 gezeigt wird, wären für einen solchen Test prinzipiell nur wenige Nanoliter Probenflüs-

¹Für Gold-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 40 nm ist die Genauigkeit besser als 1 % der homogenen Linienbreite.

sigkeit nötig. Die hohe Empfindlichkeit gestattet es weiterhin, alle Messungen unter physiologischen Bedingungen in Echtzeit durchzuführen, so daß Aussagen über die Bindungskinetik getroffen werden können. Indes sind Ensemble-Messungen an Partikeln derzeit darauf beschränkt, Proteine mit hohem Molekulargewicht nachzuweisen [55], oder die Absorptionsspektren vor und nach der biochemischen Reaktion in einer Stickstoff-Atmosphäre zu messen [48].

Im folgenden soll der Einzelpartikel-Immunsensor mit den Methoden aus den Grundlagenkapiteln modelliert werden. Vor dem Hintergrund, daß alle Experimente in Pufferlösungen stattfinden, wird zunächst quantitativ untersucht, wie sich Brechungsindexänderungen in der gesamten Umgebung auf die Streuspektren von Gold-Nanopartikeln auswirken. Anschließend wird das Anbinden von Analytmolekülen durch lokale Brechungsindexänderungen an der Oberfläche eines Nanopartikels simuliert. Zum direkten Vergleich mit der Einzelpartikel-Lichtstreutechnik folgt die Beschreibung einiger am Markt etablierter Techniken.

3.1 Resonanzverschiebung durch Brechungsindexänderungen der Umgebung

Abb. 3.2a zeigt die nach der Mie-Theorie berechneten Streuspektren eines Gold-Nanopartikels mit 40 nm Durchmesser. Im Hinblick auf die Anwendung als Immunoassay wird der Brechungsindex der Nanopartikelumgebung von $n_{\text{Matrix}} = 1,33$ schrittweise um 0,1 erhöht. Mit zunehmendem Brechungsindex verschiebt sich die Resonanz zu niedrigeren Energien. Auffällig ist auch, daß zugleich die Linienbreite der Resonanz abnimmt. Der Grund ist eine geringere Interbanddämpfung bei niedrigeren Energien² [15].

In Abb. 3.2b ist die Resonanzverschiebung gegen den Brechungsindex der Umgebung aufgetragen. Die mit der Mie-Theorie berechneten Werte sind als schwarze Punkte dargestellt. Nähert man diese mit einer Geraden an, erhält man eine Resonanzverschiebung von 2,7 meV pro $\Delta n = 0,01$ ($1 \leq n \leq 1,5$).

Konkret ergeben sich aus den vorbezeichneten Modellrechnungen für die Realisierung eines Einzelpartikel-Immunoassays folgende Konsequenzen: Eine einprozentige

²Bleibt man in einem rein klassischen Bild, ist die Ursache in einer größeren Steigung $d\epsilon_{Au}/d\omega$ der dielektrischen Funktion bei niedrigeren Energien zu sehen (siehe Abb. 2.3) [11].

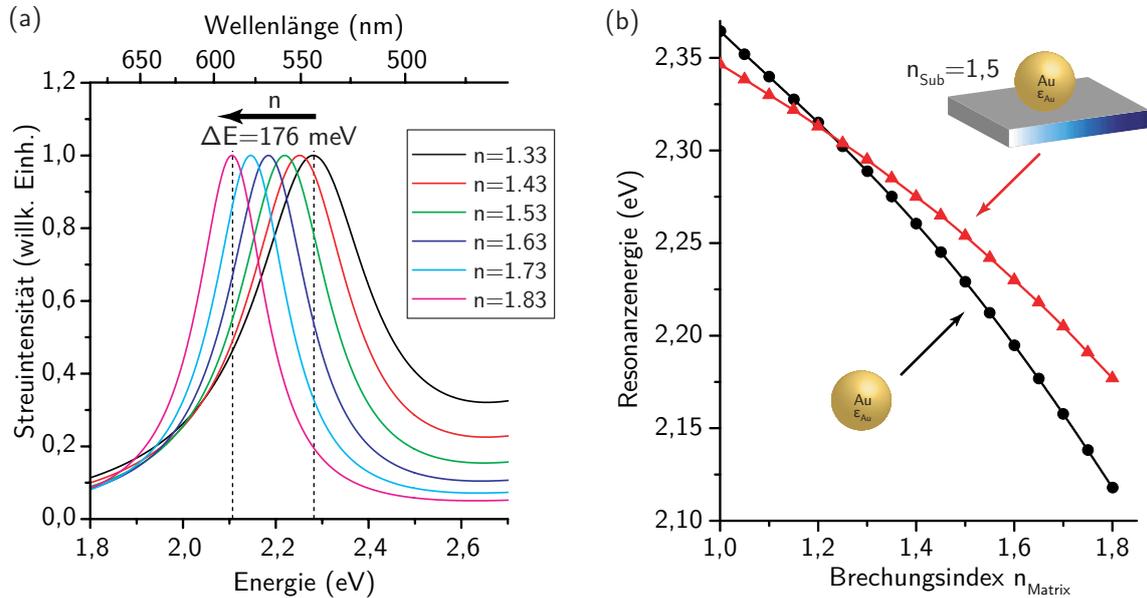


Abbildung 3.2: (a) Mit MATHEMATICA[®] (siehe Anhang B) nach der Mie-Theorie berechnete Streuspektren eines Gold-Nanopartikels in Umgebungen mit unterschiedlichem Brechungsindex. Der Partikeldurchmesser beträgt 40 nm; der Brechungsindex wird von $n = 1,33$ schrittweise auf $n = 1,83$ erhöht. Dabei verschiebt sich die Resonanzposition um 176 meV ins Rote. (b) Die schwarze Kurve zeigt die Resonanzposition des Partikelplasmons in Abhängigkeit des Brechungsindex n_{Matrix} des umgebenden Mediums. Befindet sich das Nanopartikel auf einem Glassubstrat, reduziert sich die Empfindlichkeit auf Brechungsindexänderungen um $\approx 30\%$ (rote Kurve).

Erhöhung des Brechungsindex von $n = 1,33$ auf $n = 1,34$ bewirkt eine Resonanzverschiebung von etwa $\Delta E = 1,5 \text{ meV}$. In Anbetracht der hohen Meßgenauigkeit, die in der Einzelpartikel-Spektroskopie erreicht wird, ist dieser Unterschied im allgemeinen *nicht* zu vernachlässigen. So können Brechungsindexänderungen in der genannten Größenordnung z.B. durch die Zugabe der Analytlösung auf den Assay ausgelöst werden. Brechungsindexänderungen aufgrund von Temperaturschwankungen, wie sie bei den in Kap. 4.2 vorgestellten Assays auf Basis von Oberflächenplasmonen zu berücksichtigen sind, können dagegen vernachlässigt werden.³

³Bei einer Wellenlänge von 589 nm verringert sich der Brechungsindex von Wasser bei einer Temperaturänderung von 20 °C auf 30 °C nur um $\Delta n = 1,9 \cdot 10^{-3}$.

Substrat-Einflüsse

Die berechnete Abhängigkeit der Resonanzverschiebung vom Brechungsindex gilt für freie Gold-Nanopartikel in einer homogenen Umgebung. Bei Einzelpartikelmessungen ist das Nanopartikel auf einem Glassubstrat ($n_{Sub} = 1,5$) immobilisiert, so daß es nicht mehr möglich ist den Brechungsindex der *kompletten* Partikelumgebung zu ändern. Entsprechend reduziert sich die Sensitivität auf Brechungsindexänderungen. Es existieren zwar Modelle um die Resonanzspektren von Nanopartikeln auf metallischen und dielektrischen Substraten zu beschreiben, diese gehen aber von experimentell nur schwer zu realisierenden Voraussetzungen aus, oder erfordern sehr großen Rechenaufwand [56–58]. Ein anderer Ansatz besteht deshalb darin, in der Mie-Theorie einen effektiven Brechungsindex für das Substrat und die Umgebung zu verwenden [11, 52, 59, 60]. Die Mittelung geschieht über einen geeigneten Gewichtungsfaktor g :

$$n_{eff} = g \cdot n_{Matrix} + (1 - g)n_{Sub}. \quad (3.1)$$

Im allgemeinen wird man den Gewichtungsfaktor experimentell ermitteln müssen, da er z.B. sehr empfindlich vom Abstand zwischen Partikel und Substrat abhängt.⁴ Der Gewichtungsfaktor kann jedoch abgeschätzt werden, indem man eine von der Partikeloberfläche exponentiell abfallende Empfindlichkeit auf den Brechungsindex annimmt (siehe Kap. 3.2), so daß das Partikel nur auf ein begrenztes Volumen sensitiv ist. Ein Teil dieses Volumens ist vom Substrat mit n_{Sub} ausgefüllt, der andere Teil von dem Medium mit n_{Matrix} . Setzt man diese Volumina ins Verhältnis, erhält man einen Gewichtungsfaktor von $g \approx 0,7$ [61]. Abb. 3.2b zeigt den Einfluß des Gewichtungsfaktors auf die Sensitivität bei Brechungsindexänderungen der Umgebung ($g = 0,7$; rot gezeichnete Kurve). Gegenüber einem freien Nanopartikel reduziert sich die Empfindlichkeit um $\approx 30\%$.

⁴Auf der Partikeloberfläche befinden sich i.d.R. adsorbierte Moleküle, so daß das Partikel nicht unmittelbar in Kontakt mit dem Substrat ist.

3.2 Resonanzverschiebung durch molekulare Bindungsereignisse

Während die Verwendung physiologischer Puffer und darin gelöster Proteine den Brechungsindex der gesamten Partikelumgebung ändern können, modifizieren biomolekulare Bindungsereignisse an der Oberfläche eines Gold-Nanopartikels den Brechungsindex lediglich lokal in einer Hülle um das Partikel. Mit der in Anhang A vorgestellten, auf Schalenpartikel erweiterten Mie-Theorie kann diese Situation modelliert werden. Abb. 3.3 zeigt die Resonanzposition eines Gold-Nanopartikels, aufgetragen gegen die Dicke d_S einer das Partikel umgebenden Schale. Die Parameter der Rechnung wurden wieder mit Bezug auf die Anwendung des Nanopartikels als Immunoassay gewählt: Der Partikeldurchmesser beträgt 40 nm, der Brechungsindex $n_{Schale} = 1,5$ der Hülle entspricht demjenigen der meisten Proteine und der Brechungsindex der Umgebung $n_{Matrix} = 1,33$ gilt für die meisten in dieser Arbeit verwendeten physiologischen

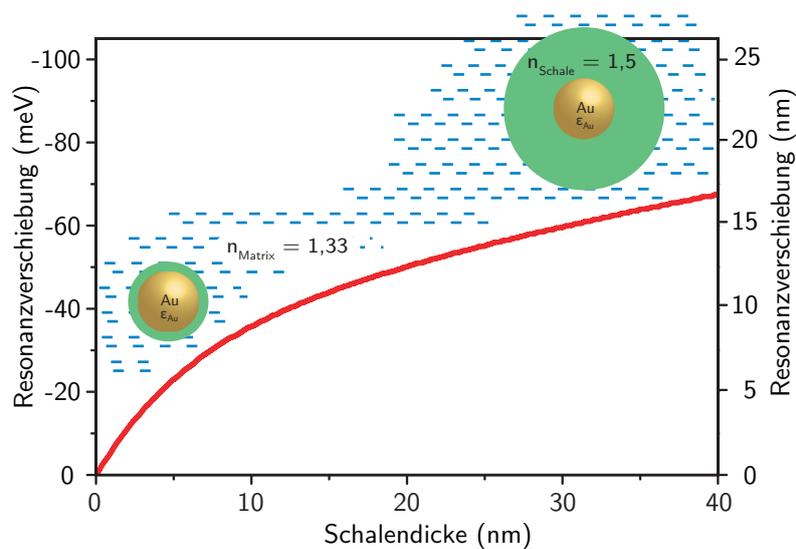


Abbildung 3.3: Berechnete Änderung der Resonanzposition im Streuspektrum eines Gold-Nanopartikels, in Abhängigkeit von der Dicke einer das Partikel umgebenden dielektrischen Hülle. Der Partikeldurchmesser ist wieder 40 nm, der Brechungsindex der Schale um das Partikel beträgt $n_{Schale} = 1,5$ und derjenige der Matrix $n_{Matrix} = 1,33$. Beide Werte sind im Hinblick auf den typischen Brechungsindex für Proteine $n_{Protein} = 1,5$ in einer wässrigen Umgebung gewählt. Die Schalendicke wird in der Rechnung in 0,2 nm Schritten von 0 nm auf 40 nm erhöht. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Resonanzposition vor allem von Brechungsindexänderungen in der allernächsten „Nano-Umgebung“ beeinflusst wird.

Puffer. Mit zunehmender Schalendicke verschiebt sich die Resonanzposition des Partikelplasmons folgerichtig zu größeren Wellenlängen. Augenfällig ist, daß der Einfluß der Umgebung mit zunehmendem Abstand drastisch abnimmt. Die Ursache dafür ist, daß das mit der Plamonenschwingung einhergehende elektromagnetische Nahfeld exponentiell mit dem Abstand zum Partikel abfällt. Ein Nanopartikel läßt sich daher in erster Linie als Sensor seiner allernächsten Umgebung - seiner „Nano-Umgebung“ einsetzen. Die Vorteile bei der Verwendung als Immunoassay liegen auf der Hand, da biomolekulare Bindungsereignisse an das funktionalisierte Nanopartikel genau in seiner Nano-Umgebung stattfinden. Bei einer angenommenen Schalendicke von $d_s = 20$ nm ist das sensitive Volumen bereits kleiner als $1 \cdot 10^{-18}$ l. Für Schalen die weniger als ≈ 15 nm dick sind, läßt sich die Kurve in 3.3 hinreichend genau durch

$$\Delta E_{Res} = a (1 - e^{-d_s/l}) \quad (3.2)$$

mit $a = 55$ meV und $l = 9,4$ nm beschreiben. Formal gibt der Parameter a die Resonanzverschiebung im Limit großer Schalendicke an, und l ist die charakteristische Länge, mit der das elektromagnetische Feld außerhalb des Partikels abfällt. Gl. 3.2 erlaubt es, die von molekularen Bindungsereignissen ausgelöste Resonanzverschiebung überschlagsweise zu bestimmen, ohne eine komplette Berechnung mit der Mie-Theorie durchzuführen.

3.3 Erhöhung der Sensitivität

Die Sensitivität des Einzelpartikel-Immunoassays hängt maßgeblich von biochemischen Faktoren, genauer gesagt von der Affinität der Bindungspartner zueinander ab. Aber auch von physikalischer bzw. experimenteller Seite wird das Detektionslimit durch zwei Faktoren bestimmt. Zum einen hängt es von der Meßgenauigkeit und zum anderen von der Größe der Resonanzverschiebung, die durch biomolekulare Bindungen ausgelöst wird, ab.

Nachstehend werden zwei Strategien zur Steigerung der Resonanzverschiebung vorgestellt: Die Wahl des optimalen Durchmessers bei Gold-Nanokugeln und die Verwendung alternativer Partikelformen. Auf einige andere Aspekte, die die Sensitivität des Assays beeinflussen, wie z.B. die spektrale Lage der Resonanz, wird ebenfalls kurz eingegangen.

3.3.1 Partikelgröße

Rechnungen nach der Mie-Theorie zeigen, daß die Resonanzverschiebung durch die Bindung von Analytmolekülen auf einem funktionalisierten Nanopartikel vom Durchmesser des Partikels abhängt. Um die Größe dieses Effekts bei der Bindung von Antigenen an ein funktionalisiertes Gold-Nanopartikel abzuschätzen, zeigt Abb. 3.4 Modellrechnungen für zwei verschieden große Antigene. Im Fall des kleinen Antigens wird angenommen, daß die Bindung an die funktionalisierte Oberfläche die Dicke der Proteinhülle um das Nanopartikel von 3 nm auf 5 nm erhöht. Die rote Kurve zeigt die daraus resultierende Resonanzverschiebung in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers. Entsprechend ergibt sich die schwarze Kurve, wenn die Proteinhülle durch das Anbinden von größeren Analytmolekülen von 3 nm auf 10 nm anwächst.

Während die Resonanzverschiebung, die das kleine Antigen bewirkt, keine ausgeprägte Abhängigkeit von der Partikelgröße zeigt, erhält man für das große Antigen eine maximale Resonanzverschiebung bei einem Partikeldurchmesser von 170 nm. Aus

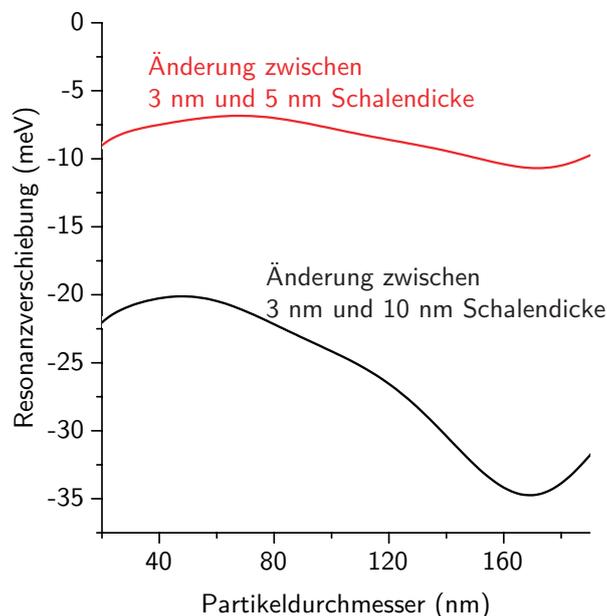


Abbildung 3.4: Berechnete Resonanzverschiebung bei Vergrößerung der Proteinschale mit $n_{Prot} = 1, 5$ in einer wäßrigen Umgebung mit $n_{Matrix} = 1, 33$. Bei der Vergrößerung der Schalendicke von 3 nm auf 5 nm, zeigt sich nur eine geringe Abhängigkeit von der Partikelgröße. Wird die Schalendicke dagegen von 3 nm auf 10 nm erhöht, nimmt die Resonanzverschiebung mit zunehmendem Partikeldurchmesser deutlich zu.

dem Graphen läßt sich ablesen, daß sich theoretisch die Sensitivität des Assays bei großen Analyten nahezu verdoppelt, wenn man ihn statt mit einem 40 nm großen Gold-Nanopartikel, mit einem Nanopartikel mit 170 nm Durchmesser aufbaut.

Es ist allerdings zu bedenken, daß sich die homogene Linienbreite der Plasmonresonanz für so große Partikel deutlich verbreitert und dadurch eine exakte Bestimmung der Resonanzbreite erschwert wird. Außerdem nimmt der Absorptionsquerschnitt linear mit dem Partikelvolumen zu [10, 11]. Es ist daher nicht auszuschließen, daß die Temperatur an der Partikeloberfläche Werte erreicht, die zu einer Zerstörung oder Denaturierung der Proteine auf der Partikeloberfläche führen [62].

3.3.2 Partikelzusammensetzung

Nicht nur der Partikeldurchmesser, sondern auch die geometrische Form des Nanopartikels hat Einfluß auf die Größe der Resonanzverschiebung. So konnte von Sönnichsen [12] gezeigt werden, daß sich bei der Verwendung von stäbchenförmigen Gold-Nanopartikeln ($20 \text{ nm} \times 20 \text{ nm} \times 60 \text{ nm}$) die Resonanzverschiebung im Vergleich zu einem sphärischen Nanopartikel ($\varnothing = 40 \text{ nm}$) nahezu verdoppelt. Bedauerlicherweise ist die Synthese von Gold-Nanostäbchen sehr aufwendig [63], so daß sich größere Mengen, wie sie für die Funktionalisierung mit Proteinen benötigt werden, nicht mit vertretbarem Aufwand herstellen lassen (siehe Kap. 5.2).

Eine Alternative könnten Gold-Nanoschalen sein, die aus einem sphärischen, dielektrischen Kern bestehen, auf dem eine nur wenige Nanometer dicke Goldschicht aufgewachsen ist [64, 65]. Auch diese Partikel zeigen, ähnlich wie solide Gold-Nanokugeln,⁵ eine deutliche Resonanz in ihrem Streuspektrum, die sich ebenfalls mit der Mie-Theorie berechnen läßt.

Abb. 3.5 zeigt berechnete Streuspektren für Gold-Nanoschalen mit einem Kerndurchmesser von 30 nm und Schalendicken d_s von 5 nm, 10 nm und 15 nm. Da die Schalendicke sehr dünn im Vergleich zur mittleren freien Weglänge von Elektronen in Gold ist, wurde die dielektrische Funktion entsprechend Kap. 2.1.3 um einen größenabhängigen Term erweitert. Der Parameter A wurde für die Rechnung im Hinblick auf die experimentellen Ergebnisse in Kap. 7 gleich 0,5 gesetzt; der Brechungsindex

⁵Der Begriff „Nanopartikel“ und „solide Gold-Nanokugel“ wird in dieser Arbeit durchgehend synonym verwendet. Für Kern/Schale Nanopartikel wird dagegen stets der Begriff (Gold-) Nanoschale verwendet.

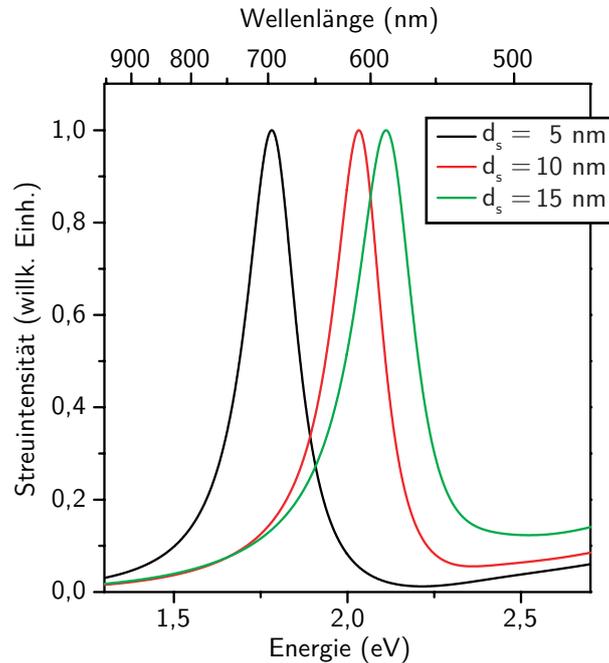


Abbildung 3.5: Berechnete Streuspektren für Gold-Nanoschalen mit einem Kerndurchmesser von 30 nm und Schalendicken von $d_s = 5$ nm, $d_s = 10$ nm und $d_s = 15$ nm. Für den Partikelkern und die Partikelumgebung ist ein Brechungsindex von $n_c = 2,32$, bzw. $n_{Matrix} = 1,33$ angenommen. Die Oberflächendämpfung ist durch einen größenabhängigen Term in der dielektrischen Funktion von Gold berücksichtigt. Die Rechnungen zeigen deutlich, daß die Spektren mit abnehmender Schalendicke zu niedrigeren Energien verschieben. Die Halbwertsbreite der Resonanz beträgt für alle drei Spektren etwa 180 meV.

des Kerns beträgt $n = 2,32$. Die Ergebnisse zeigen, daß es prinzipiell möglich ist, die Resonanz der Nanoschalen durch Variation des Verhältnisses von Kerndurchmesser zu Schalendicke über einen großen Spektralbereich einzustellen. Insbesondere ließen sich dadurch Nanoschalen konstruieren, deren Resonanz in einem Energiebereich liegt, in dem die Absorption von Blutserum und Wasser minimal ist. Dieser Bereich, der häufig als „biologisches optisches Fenster“ bezeichnet wird, liegt etwa zwischen Energien von 1,1 eV und 1,8 eV [66]. Für Einzelpartikel-Immunoassays sind Partikel mit einer Resonanzenergie in diesem Spektralbereich deshalb besonders interessant, weil das von ihnen gestreute Licht nicht von der Analytlösung absorbiert werden kann, bevor es in den Detektor gelangt.

Ein zweiter Vorteil von Gold-Nanoschalen im Vergleich zu Nanokugeln ist der Abb. 3.5 zu entnehmen: Trotz der angenommenen Oberflächendämpfung ergibt die Rechnung schmale homogene Linienbreiten von ≈ 180 meV. Diese theoretische

Vorhersage wird in Kap. 7 experimentell bestätigt und begründet.

Die in Abb. 3.6 dargestellten Rechnungen nach der Mie-Theorie zeigen einen dritten Vorteil von Gold-Nanoschalen für die Sensorik. Die rote Kurve zeigt die Änderung der Resonanzposition im Streuspektrum einer Gold-Nanoschale, in Abhängigkeit von der Dicke einer das Partikel umgebenden dielektrischen Hülle. Der Vergleich mit der korrespondierenden Rechnung für solide Gold-Nanopartikel (schwarze Kurve; Daten aus Abb. 3.3) zeigt eine höhere Empfindlichkeit von Gold-Nanoschalen auf lokale Brechungsindexänderungen.

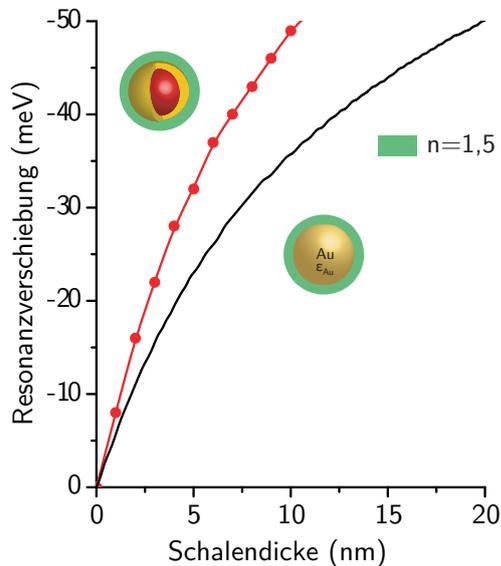


Abbildung 3.6: Berechnete Änderung der Resonanzposition im Streuspektrum einer Gold-Nanoschale, in Abhängigkeit von der Dicke einer das Partikel umgebenden dielektrischen Hülle (rote Kurve). Der Gesamtdurchmesser der Nanoschale beträgt 40 nm, die Goldschale hat eine Dicke von 5 nm. Der Brechungsindex der Schale um das Partikel beträgt wieder $n_{Schale} = 1,5$ und derjenige der Matrix $n_{Matrix} = 1,33$. Zum Vergleich zeigt die schwarze Kurve nochmals die Daten aus Abb. 3.3 für ein solides Gold-Nanopartikel.

4 Stand der Technik

Im folgenden werden drei etablierte Verfahren vorgestellt und ihre spezifischen Stärken und Schwächen im Vergleich zu dem hier vorgestellten Einzelpartikel-Immunoassay erläutert.

4.1 Roche Cardiac-T Teststreifen

Ein in der Anwendung gut zu handhabender und zugleich hochsensitiver¹ Assay auf Basis von Gold-Nanopartikeln ist der Cardiac-T Schnelltest der Roche Teststreifen. Das Prinzip ist in Abb. 4.1 gezeigt. Der Test verläuft in drei Phasen:

1. **Applikation:** Vollblut eines Patienten, welches das zu detektierende Antigen (Ag) enthält, wird auf zwei übereinanderliegende Konjugatvliese im Applikationsbereich des Teststreifens aufgebracht.
2. **Reaktion:** Das obere Vlies ist mit einem mit Biotin markierten Antikörper (MAK 1), der gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist, getränkt. Antikörper und Antigen binden aneinander und bilden im applizierten Blut Antigen-Antikörper Komplexe. Das zweite Konjugatvlies enthält Gold-Nanopartikel, die mit einem zweiten Antikörper (MAK 2) funktionalisiert sind. Da dieser an ein anderes Epitop des Antigens bindet, bildet sich eine Sandwich-Struktur aus MAK 1 – Antigen (Ag) – MAK 2. Das Blut durchläuft nun ein Blutzellenabtrennvlies, so daß nur das Blutserum zum Detektionsbereich gelangt.
3. **Detektionsbereich:** Der Detektionsbereich besteht aus einem aufgedruckten Streifen aus Streptavidin-Proteinen und einer Kontrollregion aus immobilisierten Antigenen. Da die Biotin-Moleküle auf MAK 1 und Streptavidin eine sehr hohe

¹Die untere Nachweisgrenze für den Herzinfarktmarker Troponin-T beträgt 0,05 ng/ml oder $1,4 \cdot 10^{-12}$ mol/l [67].

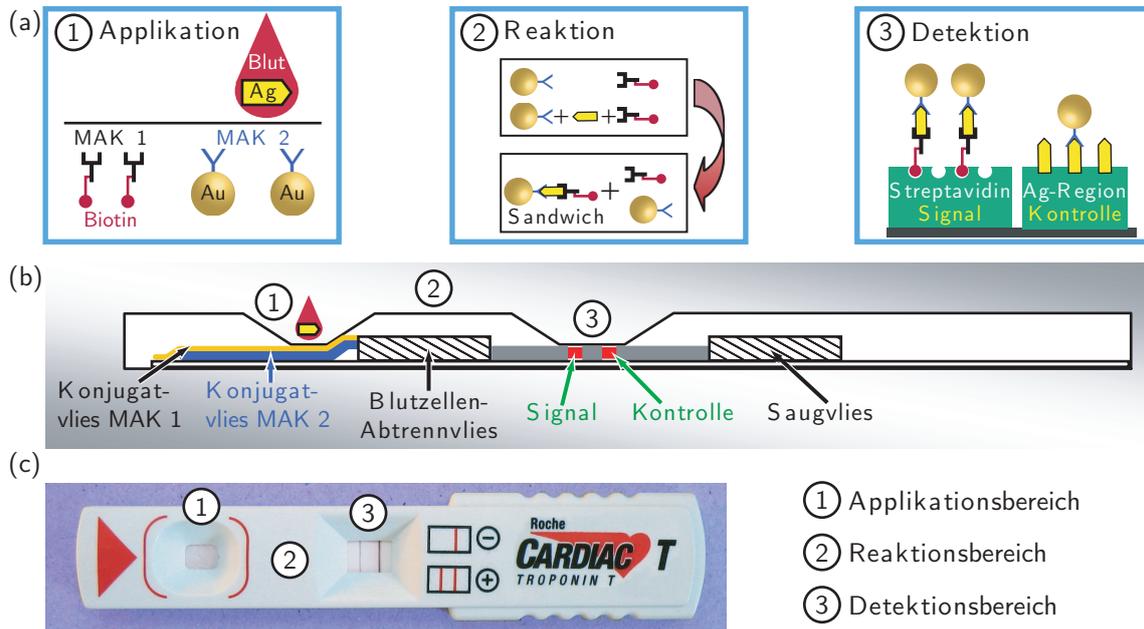


Abbildung 4.1: Prinzip des Roche Cardiac-T Teststreifens. (a) Der Test ist in drei Schritte – Applikation, Reaktion und Detektion aufgeteilt. Im Applikationsschritt wird das zu untersuchende Blut aufgetragen, anschließend bilden sich im Reaktionsschritt Sandwichstrukturen aus dem biotinylierten Antikörper MAK 1, dem Antigen Ag und einem mit MAK 2 funktionalisierten Gold-Nanopartikel. An einem Streptavidinstreifen binden die biotinylierten MAK 1 Antikörper, so daß die Sandwichstrukturen abgefangen werden. (b) Schnitt durch den Teststreifen. (c) Fotografie eines Teststreifens zur quantitativen Bestimmung des Herzinfarktmarkers Troponin-T (CARDIAC T Quantitative)[68–70]. Für ein Anwendungsbeispiel siehe z.B. Frey et al. [7].

Affinität zueinander haben, werden die Sandwichkomplexe am Streptavidinstreifen abgefangen. Im Testverlauf lagert sich dort eine immer größer werdende Anzahl an Goldpartikeln an, so daß es schließlich zu einer deutlichen, dunkelroten Färbung des Streifens kommt. Funktionalisierte Nanopartikel, die keine Sandwich-Struktur gebildet haben, werden erst in der Kontrollregion abgefangen. Findet keine Färbung des Kontrollstreifens statt, deutet dies auf eine Funktionsstörung des Teststreifens hin (z.B. könnte der Test bei zu hohen Temperaturen gelagert worden sein).

Der bequemen Handhabung und den günstigen Herstellungskosten des Teststreifens steht der Nachteil gegenüber, daß für einen Test ein relativ großes Blutvolumen benötigt wird. Dieses läßt sich auch nicht beliebig verkleinern, da immer eine große Anzahl an Gold-Nanopartikeln in der Detektionsregion anbinden muß, um ein makroskopisch

sichtbares Signal zu erzeugen. Prinzipiell müßte es aber möglich sein, den Teststreifen mit einer Einzelpartikeltechnik zu kombinieren und die gebundenen Nanopartikel, wie in Veröffentlichungen von Schultz et al. und Yguerabide et al. [54, 71] einzeln abzuzählen.

4.2 SPR-Immunoassays

Die Detektion von Antigenen mit der *Surface Plasmon Resonance* – oder kurz SPR-Methode, hat sich in den letzten Jahren zu einer Standardtechnik in der Diagnostik und Forschung entwickelt [43, 72–77]. Sie fußt, ebenso wie der Einzelpartikel-Immunoassay, auf der Änderung des Brechungsindex, die bei der Bindung zwischen Antigenen und Antikörpern in der Nähe einer Goldoberfläche induziert wird. Detektiert wird die Brechungsindexänderung über die Eigenschaften von Oberflächenplasmonen. Dabei handelt es sich um kollektive Oszillationen der Elektronendichte, die entlang der Grenzschicht zwischen einem Metall und einer dielektrischen Umgebung propagieren. Begleitet wird die Dichtewelle von einer elektromagnetischen Welle, deren Feldvektoren an der Grenzschicht maximal sind und die in den beiden angrenzenden Medien exponentiell abfallen. Die Dispersionsrelation zwischen dem Wellenvektor entlang der Grenzschicht und der Frequenz lautet [78, 79]:

$$k_{Plasmon}^x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_M \cdot \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}} \quad (4.1)$$

mit den dielektrischen Funktionen des Metalls ϵ_M und des angrenzenden Dielektrikums ϵ_D .

Der Wellenvektor $k_{Plasmon}^x$ von Oberflächenplasmonen ist stets größer als der Wellenvektor k_{Photon} von ebenen Lichtwellen im Vakuum, da die dielektrische Funktion von Gold stark negativ ist. Es ist deshalb nicht möglich, Oberflächenplasmonen direkt optisch anzuregen, ohne den einfallenden Photonen einen zusätzlichen Impuls zu verleihen. Wie dies experimentell erreicht werden kann, ist in Abb. 4.2 dargestellt. Das Anregelicht wird zunächst durch ein Glasprisma mit hohem Brechungsindex n_{Prisma} geführt, bevor es unter dem Winkel α auf den Goldfilm trifft (Kretschmann Konfiguration [80]). Falls der Goldfilm dünn genug ist, kann die evaneszente Welle die Metallschicht durchdringen und an der folgenden Grenzschicht zwischen Gold und

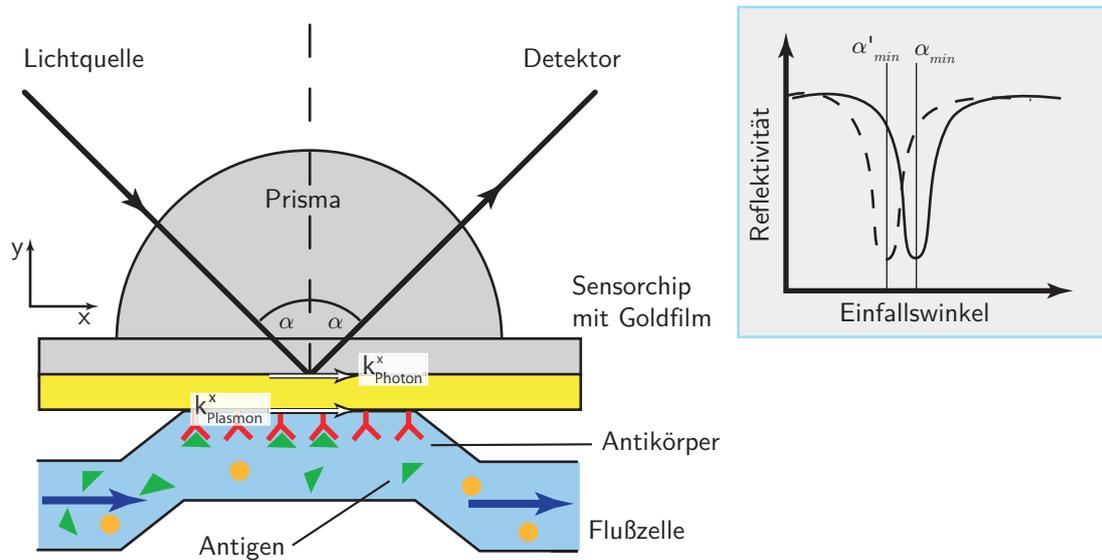


Abbildung 4.2: Prinzip von SPR-Immunoassays. Ein Lichtstrahl wird durch ein Prisma auf einen funktionalisierten Goldfilm gelenkt und dort reflektiert. Bei einem bestimmten Einfallswinkel werden Oberflächenplasmonen an der Grenzschicht zwischen dem Goldfilm und der Flüssigkeit im Flußkanal angeregt. Dabei wird Energie des einfallenden Lichts in das Plasmon transferiert, so daß die Intensität des reflektierten Strahls deutlich abnimmt. Der Winkel bei dem das Intensitätsminimum auftritt ändert sich, sobald Antigene an die Rezeptoren auf dem Goldfilm binden und den Brechungsindex an der Goldoberfläche ändern.

dem Dielektrikum ein Oberflächenplasmon anregen. Dazu muß der Einfallswinkel des Anregellichts so gewählt werden, daß die Bedingung

$$k_{Photon}^x = \frac{\omega}{c} \cdot n_{Prisma} \cdot \sin \alpha = k_{Plasmon}^x \quad (4.2)$$

erfüllt ist.

Wie bereits erwähnt, wird bei SPR-Immunoassays die Goldschicht auf dem Prisma mit Antikörpern (oder anderen Biomolekülen) funktionalisiert [74]. Die Intensität des reflektierten Strahls wird abhängig vom Einfallswinkel mit einer Photodiode gemessen. Bei dem Winkel, bei dem die Bedingung zum Anregen von Oberflächenplasmonen erfüllt ist, wird Energie von der einfallenden Welle in das Oberflächenplasmon übertragen. Dementsprechend bricht die Intensität des reflektierten Strahls genau bei diesem Winkel stark ein. Die Analytlösung wird in einem Mikrofluidik-System zur Sensoroberfläche geleitet und strömt in einem Flußkanal über die funktionalisierte Sensoroberfläche. Ändert sich dort der Brechungsindex durch das Binden von Analyten,

ändert sich auch der Winkel unter dem das Oberflächenplasmon angeregt werden kann. Aus der Winkeländerung läßt sich auf die Stoffmenge des gebundenen Analyten schließen.

Da Winkelmessungen mit hoher Präzision möglich sind, lassen sich mit SPR-Sensoren Brechungsindexänderungen im Promillebereich sicher detektieren [81]. Dies ist gleichbedeutend mit einer sehr niedrigen Nachweisgrenze des Sensors, führt aber auch zu Stabilitätsproblemen. Zum einen variiert der Brechungsindex von Blutplasma von Patient zu Patient und zum anderen hängt er auch von der Temperatur ab. Falsche positive Testergebnisse können daher nur durch eine aufwendige Kalibrierung des SPR-Geräts und durch eine parallele Referenzmessung in einem zweiten Flußkanal auf demselben Sensorchip ausgeschlossen werden [81]. Weitere charakteristische Eigenschaften von SPR-Assays sind eine hohe Meßgeschwindigkeit und die bereits erwähnte Möglichkeit die Bindungskinetik direkt zu verfolgen. Auch in dieser Hinsicht ähneln sich folglich SPR- und Einzelpartikel-Immunoassays. Deutliche Unterschiede gibt es aber bei der möglichen Integrationsdichte beider Sensoren. SPR-Sensoren benötigen eine relativ große Goldfläche, so daß die Anzahl gleichzeitig nutzbarer Flußkanäle pro Sensorchip limitiert ist. Bei einem der am weitesten verbreiteten Systeme, dem Biacore 3000 der Firma Biacore, befinden sich z.B. nur vier gleichzeitig nutzbare Kanäle [82] auf einem Sensor. Pro Kanal läßt sich außerdem auch nur gezielt nach einem Analyten suchen. Dies führt bei klinischen Proben zu langen Meßdauern, da für eine zuverlässige Diagnose vieler Krankheiten mehrere unterschiedliche Markermoleküle nachgewiesen werden müssen. Einzelpartikel-Immunoassays unterliegen dieser Einschränkung nicht, da sich innerhalb eines Flußkanals mit unterschiedlichen Rezeptoren funktionalisierte Gold-Nanopartikel einsetzen ließen (siehe Kap. 8).

4.3 Elektro-Chemilumineszenzassay (ECL)- Roche Elecsys

Die Basistechnologie, des ebenfalls von Roche Diagnostics vertriebenen, Elecsys[®] Systems ist eine Elektro-Chemilumineszenz-Reaktion (ECL). Die Biochemische Reaktion verläuft ähnlich wie bei dem bereits vorgestellten Teststreifen. In einem ersten Reaktionsschritt binden zwei unterschiedliche Antikörper an den Analyten und

bilden eine Sandwich-Struktur. Einer der Antikörper ist biotiniert, der andere ist, statt mit einem Goldpartikel, mit einem Ruthenium-Komplex markiert. Während des zweiten Reaktionsschritts werden mit Streptavidin beschichtete, paramagnetische Mikropartikel der Analytlösung zugegeben. Aufgrund der hohen Affinität zwischen Biotin und Streptavidin werden die Sandwich-Strukturen an das Mikropartikel gebunden. Dieses Gemisch wird, wie in Abb. 4.3 gezeigt, in die eigentliche Meßzelle eingebracht. Dort werden die Mikropartikel magnetisch gefangen und auf einer Platinelektrode fixiert. Nun erfolgt ein Waschschrift mit einer Pufferlösung, bei dem ungebundene Substanzen entfernt werden. Durch Anlegen einer Spannung an die Platinelektrode werden die Ruthenium-Komplexe anschließend oxidiert. Gleichzeitig geben der Meßlösung zugesetzte Tripropylamin (TPA) Moleküle ein Elektron ab, so daß sich TPA Kation-Radikale bilden. Durch spontanen Verlust eines Protons entstehen jetzt TPA-Radikale, die ihre ungepaarten Elektronen auf den oxidierten Ruthenium-Komplex übertragen und den Komplex in einem angeregten Zustand überführen. Unter Aussendung eines Photons geht der Ruthenium Komplex wieder in den Grundzustand über. Dieser Prozeß wiederholt sich fortwährend, so daß pro erkanntem Analytmolekül eine große Anzahl an Photonen emittiert werden. Diese werden schließlich mit einem Photomultiplier detektiert.

Durch die Sandwich-Struktur werden, wie beim Cardiac-T Teststreifen, wieder sehr hohe Spezifitäten erreicht. Die untere Nachweisgrenze ist mit dem Cardiac-T

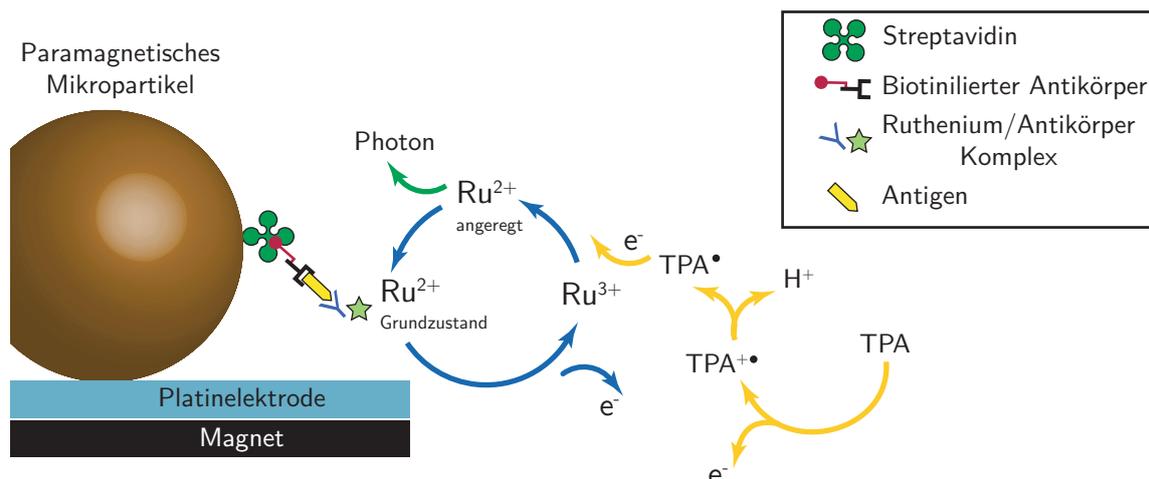


Abbildung 4.3: Funktionsprinzip des Elektro-Chemilumineszenzassays (ECL) – Roche Elecsys. Darstellung nach [83].

Teststreifen vergleichbar, wobei die Fehler bei quantitativen Messungen im Elecsys-Systems kleiner sind. Diesen Vorteil muß man sich allerdings mit einer wesentlich aufwendigeren Testführung – zwei Reaktionsschritte, ein Waschschrift, dann die Detektion – erkaufen. Genauso wie beim Cardiac-T Teststreifen ist die direkte Messung der Reaktionskinetik nicht möglich, da die Antikörper-Antigen-Bindung vor dem Detektionsschritt stattfindet. Auch eine Parallelisierung des Assays ist nur in einem begrenzten Umfang realisierbar, wobei mehrere bei verschiedenen Wellenlängen emittierende Marker eingesetzt werden. Eine Literaturzusammenstellung zur Elektro-Chemilumineszenz findet man z.B. in [84].

5 Experimentelle Methoden

Das eigentliche Sensorelement in Einzelpartikel-Immunoassays ist ein isoliertes, mit Proteinen funktionalisiertes Gold-Nanopartikel. Die folgenden Abschnitte gehen aus diesem Grund auf die chemische Darstellung kolloidaler Goldpartikel, sowie auf die Funktionalisierung oder Konjugation ihrer Oberflächen mit Proteinen bei Roche Diagnostics in Penzberg ein. Von physikalischer Seite aus betrachtet, liegt die experimentelle Schwierigkeit primär in der Spektroskopie einzelner Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen. Insbesondere die Detektion kleiner spektraler Resonanzverschiebungen von wenigen Millielektronenvolt eines über 200 meV breiten Resonanzspektrums in Stundenzeiträumen stellt hohe Anforderungen an den Versuchsaufbau. In dieser Arbeit wird für die Spektroskopie einzelner Nanopartikel eine Fernfeldtechnik, die Dunkelfeldmikroskopie eingesetzt. Das Unterkapitel 5.4 stellt diese Methode vor und beschreibt ferner die Erfassung von Streuspektren einzelner Nanopartikel.

5.1 Synthese von kolloidalem Gold

Die erste wissenschaftliche Auseinandersetzung mit der Synthese von kolloidalem Gold wird Michael Faraday zugeschrieben. Mitte des 19. Jahrhunderts benutzte er Phosphor, um gelöste Goldsalze zu Gold-Nanopartikel zu reduzieren [85]. Seitdem wurde eine große Anzahl an unterschiedlichen Reduktionsmitteln untersucht und die Synthese immer weiter verfeinert, so daß sich heute Gold-Nanopartikel in nahezu jeder beliebigen Größe in unterschiedlichen Lösungsmitteln chemisch herstellen lassen. Gold-Nanopartikel werden üblicherweise nach der Syntheseroute von Turkevich [86] und Frens [87] hergestellt, die zu den am weitesten verbreiteten Herstellungsmethoden zählt. Eine wäßrige Lösung von Tetrachlorgold(III)säure (HAuCl_4) wird unter stetigem Rühren zum Sieden gebracht. Durch die anschließende Zugabe von Natriumcitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) werden die $[\text{AuCl}_4]^-$ Ionen zu Gold reduziert. Zunächst bilden sich in

der Lösung Cluster aus elementarem Gold, die im weiteren Verlauf der Reaktion zu größeren Nanopartikeln anwachsen.

Das Natriumcitrat dient aber nicht nur als autokatalytisches Reduktionsmittel sondern wirkt ebenfalls als Stabilisator und verhindert eine Agglomeration der Nanopartikel: Die in der Lösung verbliebenen negativen Citratanionen ($C_6H_5O_7^{3-}$) lagern sich an die Oberflächen der Gold-Nanopartikel an und sorgen für eine elektrostatische Abstoßung zwischen den Nanopartikeln. Diese Oberflächenladung wird durch Gegenionen in der Lösung abgeschirmt, so daß die Abstoßungskraft über die Ionenkonzentration eingestellt werden kann.

Die Größe der Nanopartikel läßt sich über die Reaktionsbedingungen, also z.B. die Mengen der eingesetzten Edukte, bestimmen und in einem Bereich von ca. 10 nm - 100 nm einstellen. Je größer der Durchmesser wird, desto unregelmäßigere Formen weisen die Kolloide auf. Für viele Anwendungen im Ensemble, wie z.B. dem Teststreifen der Roche Diagnostics GmbH (siehe Kap. 4.1), ist dies kein entscheidender Nachteil. Bei Einzelpartikelsensoren auf Basis der Lichtstreutechnik erschwert es jedoch quantitative Messungen, da die Größe der Plasmonresonanzverschiebung bei gegebener Brechungsindexänderung der Umgebung auch von der geometrischen Form der Partikel abhängt. Dies bedeutet, daß gleiche Analytkonzentrationen bei verschiedenen Partikeln zu streuenden Sensorsignalen führen.

Die überwiegende Anzahl an Gold-Nanopartikeln, die in dieser Arbeit zum Einsatz kommen, wurden daher mit einer modifizierten Synthese gewonnen. Diese beruht auf einem zweistufigen Reduktionsprozess. Während des ersten Schritts entstehen sphärische Keime, die im anschließenden zweiten Reduktionsschritt zu sphärischen Nanopartikeln wachsen. Durch die Trennung von Nukleations- und Wachstumsphase lassen sich jeweils optimale Reaktionsbedingungen einstellen. Abb. 5.1 zeigt Transmissions-Elektronenmikroskopieaufnahmen (TEM-Aufnahmen) von 40 nm großen Gold-Nanopartikeln, die nach der Frens- und nach der Seed-Gold Methode synthetisiert wurden. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Seed-Kolloide nicht nur eine gleichmäßigere Form, sondern auch eine engere Größenverteilung aufweisen.

Goldkolloide mit Partikeldurchmessern über 40 nm wurden von der Firma BBI [88] bezogen. Sie zeichnen sich zwar durch eine geringe Größenverteilung aus, die genaue Zusammensetzung der verwendeten Stabilisatoren ist jedoch nicht bekannt und erfordert evtl. stärkere Modifikationen der Protokolle zur Funktionalisierung der Nanopartikel mit Proteinen.

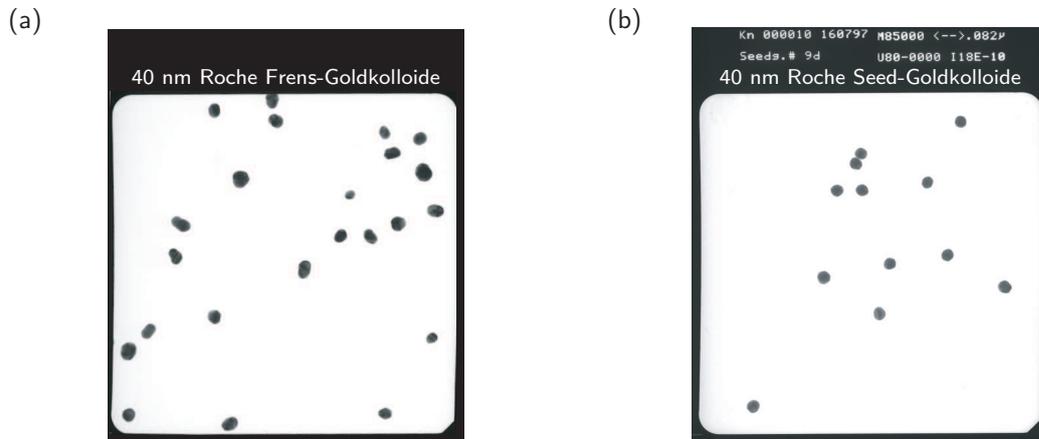


Abbildung 5.1: (a) Transmissions-Elektronenmikroskopisches Bild von Frens-Goldkolloiden mit einem mittleren Durchmesser von 40 nm. Die unregelmäßige Form der Partikel ist deutlich zu erkennen. (b) Goldkolloide, die nach der Seed-Methode hergestellt worden sind, zeigen dagegen eine wesentlich geringere Exzentrizität.

5.2 Funktionalisierung von Gold Nanopartikeln

Der überwiegende Teil der hier eingesetzten Proteine und monoklonalen Antikörper wird von Roche Diagnostics hergestellt und aufgereinigt. Je nach Proteinen und verwendeten Goldkolloiden wird bei der Konjugation nach unterschiedlichen Protokollen, in denen die optimalen Reaktionsbedingungen, wie etwa der pH-Wert, beschrieben sind, vorgegangen. Im folgenden wird das Vorgehen kurz skizziert: Zu Anfang wird mit einem geeigneten Puffer die Kolloidlösung bei Raumtemperatur auf den erforderlichen pH-Wert eingestellt und die Proteine unter stetigem Rühren zugegeben. Durch hydrophobe (van-der Waals) Wechselwirkungen und Verbrückung der Sulfidgruppen in den Aminosäureresten der Proteine mit der Goldoberfläche binden diese irreversibel an die Partikel. Die nur schwach mit der Goldoberfläche wechselwirkenden Citratanionen werden dabei vollständig von der Goldoberfläche verdrängt. Eventuell vorhandene Lücken in der Proteinhülle werden im nächsten Schritt durch Zugabe von Rinderserum-Albumin (RSA, engl. BSA) abgesättigt. Dadurch wird die Partikellösung gegenüber Aggregatbildung stabilisiert und gewährleistet, daß die Bindungsstellen des Proteins frei zugänglich bleiben und sich nicht zum Gold hin falten. Typischerweise wird während der Funktionalisierung eine höhere Anzahl an Rezeptoren angeboten, als auf der Gesamtoberfläche der Nanopartikel überhaupt Platz finden. Daher enthält die Goldkonjugatlösung nach Abschluß der Konjugation auch eine

nicht unerhebliche Konzentration an ungebundene Rezeptoren. Dieser unerwünschte Überstand wird durch Ultrafiltration von den funktionalisierten Goldkolloiden abgetrennt. Aus der Konzentration der freien Rezeptoren im Filtrat läßt sich außerdem auf die Anzahl der pro Nanopartikel gebundenen Rezeptoren zurückschließen. Für Nanopartikel mit einem Durchmesser von 40 nm und IgG-Antikörpern als Rezeptoren ergibt sich eine Anzahl von nur ≈ 70 IgG-Molekülen pro Nanopartikel. Eine gelungene Funktionalisierung läßt sich auf verschiedene Weise belegen. So läßt sich mit einem Photonen-Korrelations-Spektrometer (Zetasizer; Marvel Instruments Ltd.) der Größenzuwachs der Kolloide durch die Konjugation bestimmen. Dieser muß etwa dem doppelten Proteindurchmesser entsprechen, der als Dicke der ersten Hülle in die erweiterte Mie-Theorie für Schalenpartikel (siehe Kap. A) eingeht. Ergänzend werden die Ensemble-Extinktionsspektren vor und nach der Funktionalisierung gemessen. Wie zu erwarten, zeigt Abb. 5.2, daß sich die Position der Plasmonresonanz deutlich zu niedrigeren Energien verschiebt. Allein aus der Tatsache, daß die Proteinen erfolgreich an die Partikeloberfläche gebunden sind, läßt sich aber keinesfalls auf die biologische Aktivität des Gold-Protein-Konjugats schließen. Diese muß daher in weiteren Tests verifiziert werden, z.B. mit einem Spotttest (siehe Anhang D) oder einem speziell präparierten Roche Teststreifen. Beide Techniken gestatten eine grobe Abschätzung der Bindungsaffinität zu entsprechenden Liganden und der Spezifität des Konjugats.

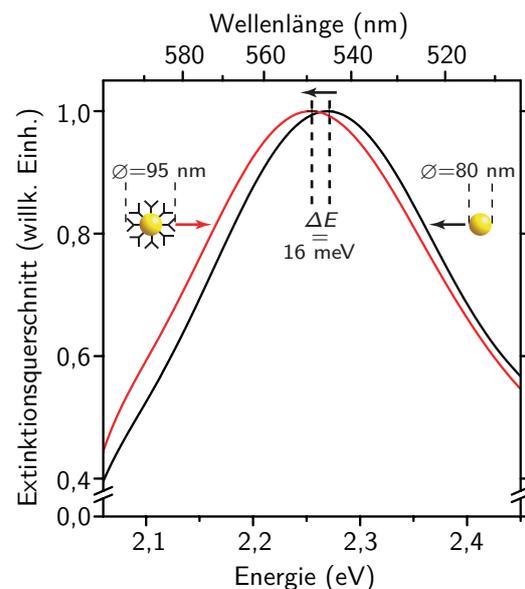


Abbildung 5.2: Extinktionsspektren einer kolloidalen Goldlösung vor und nach der Funktionalisierung mit Antikörpern (hier Anti-Troponin-T). Die Plasmonresonanz der 80 nm großen Gold-Nanopartikel verschiebt sich bei der Funktionalisierung um 16 meV zu niedrigeren Energien. Messungen des Partikeldurchmessers mit einem Photonen-Korrelations-Spektrometer ergeben einen Zuwachs von 15 nm. Dies entspricht in etwa der doppelten Antikörpergröße (hier Anti-Troponin-T).

5.3 Darstellung von Gold-Nanoschalen

Au₂S/Au Kern/Schale-Nanopartikel wurden erstmals Mitte der neunziger Jahre von Zhou et al. synthetisiert [64]. In den darauffolgenden Jahren wurde die Synthese von Halas et al. verfeinert und die optischen Eigenschaften der Nanopartikel in zeitintegrierten und zeitaufgelösten Ensemble-Messungen eingehend untersucht [65, 89–93]. Die genauen chemischen Mechanismen während der Synthese sind dennoch bis heute nicht vollständig verstanden und zum Teil auch umstritten [94].¹

Die Ausgangsstoffe für die Synthese sind Tetrachlorgold(III)säure und Natriumsulfid (Na₂S) als schwefelhaltiges Reduktionsmittel. Die gängigste Hypothese geht von einem zweistufigen Reaktionsprozeß aus:

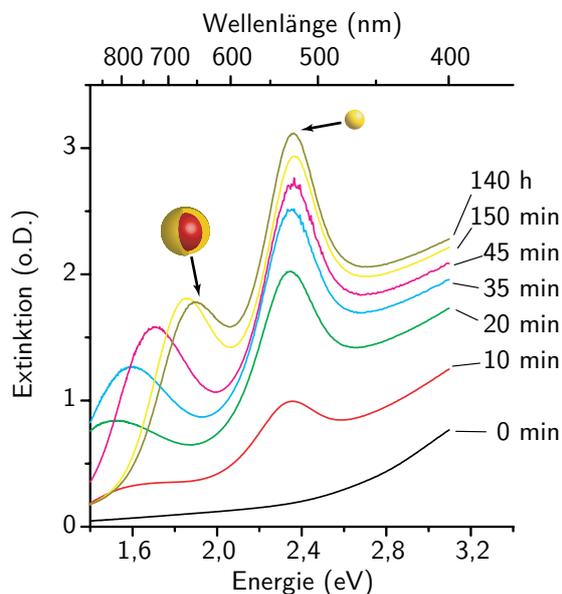


Typischerweise werden im ersten Schritt 10 ml einer 1 mM Natriumsulfidlösung in 10 ml Tetrachlorgold(III)säure mit einer Konzentration von 2 mM eingerührt. Die Goldionen werden reduziert und es bilden sich zunächst Goldsulfidpartikel (Au₂S). Etwa 5 min nach dem ersten Schritt werden weitere 5 ml der 1 mM Natriumsulfidlösung zugegeben. Dies führt zu einer weiteren Reduktion von Goldionen, bei der sich elementares Gold auf der Oberfläche der Goldsulfidpartikel abscheidet. Zusätzlich entstehen neue Nukleationskeime in der Lösung, die im Verlauf der weiteren Reaktion zu reinen Gold-Nanopartikeln mit einem Durchmesser von etwa 5 nm anwachsen. Abb. 5.3 zeigt Extinktionsspektren, die während der Reaktion mit einem Cary Eclipse 50 Absorptionsspektrometer gemessen wurden. Das erste Spektrum zum Zeitpunkt $t = 0$ ist unmittelbar nach der Zugabe des zweiten Aliquots Na₂S aufgenommen worden. Zu diesem Zeitpunkt sollten sich nur Goldsulfid, also Halbleiternanopartikel in der Lösung befinden. Damit konsistent, weist das Extinktionsspektrum zu diesem Zeitpunkt keine Plasmonresonanz auf, deren Maximum man für Gold-Nanopartikel bei einer Energie von etwa 2,3 eV erwarten würde. Hochaufgelöste Transmissions-Elektronenmikroskop-(TEM) Aufnahmen von eingetrockneter Reaktionslösung zum selben Zeitpunkt der Reaktion sind in Abb. 5.4a dargestellt.² Es sind deutlich einzelne

¹Siehe die Diskussion in Kap. 7.

²Die TEM-Aufnahmen wurden in Kooperation mit N. Petkov und B. Fieries am Lehrstuhl von Prof. T. Bein (Department für Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität) aufgenommen.

Abbildung 5.3: Zu verschiedenen Zeitpunkten während der Synthese aufgenommene Ensemble-Extinktionsspektren: Bei 2,3 eV ist eine deutliche Resonanz sichtbar, die auf die Absorption von massiven Gold-Nanopartikeln zurückzuführen ist. Die Plasmonresonanz der Au₂S/Au Nanoschalen tritt etwa 30 min nach dem zweiten Syntheseschritt in Erscheinung und hat nach Abschluß der Reaktion ihr Maximum bei 1,75 eV.



Partikel mit kristalliner Struktur zu erkennen, deren Gitterkonstante mit derjenigen von Au₂S gut übereinstimmt. Da die Gitterkonstanten von Gold und Goldsulfid sich aber stark ähneln, läßt sich nur durch die Betrachtung der optischen *und* der TEM-Aufnahmen auf das Vorhandensein von Au₂S Partikeln schließen.

Mit fortschreitender Reaktionszeit weisen die Extinktionsspektren eine anwachsende Plasmonresonanz bei einer Energie von etwa 2,3 eV auf. Ursache dafür sind die langsam zu 5 nm anwachsenden Gold-Nukleationskeime, die im zweiten Reaktionsschritt (siehe Gl. 5.1b) entstehen. Ab dem Zeitpunkt $t = 30$ min wird im nah-infraroten Bereich eine zweite Resonanz sichtbar, die sich durch das Wachsen einer Goldhülle um Goldsulfidpartikel erklären läßt. Zunächst verschiebt diese Resonanz zu niedrigeren Wellenlängen, im weiteren Verlauf der Reaktion tritt eine Blauverschiebung ein, die nach etwa 140 h bei einer Energie von 1,75 eV zum Stillstand kommt. Sowohl die Rot- als auch die Blauverschiebung lassen sich mit der auf Schalenpartikel erweiterten Mie-Theorie (siehe Kap. A) reproduzieren [65]. Wie die TEM-Aufnahmen in Abb. 5.4b, c bestätigen, befinden sich nach Abschluß der Reaktion kleine Goldkolloide mit etwa 5 nm, sowie größere Partikel mit etwa 40 nm Durchmesser in der Reaktionslösung. Die Schalenstruktur der größeren Partikel ist in diesen Bildern vermutlich aufgrund des geringen Kontrastunterschieds zwischen Gold und Goldsulfid nicht auflösbar, wurde aber sowohl von Halas et al. [91] als auch von Zhou et al. gezeigt [95].

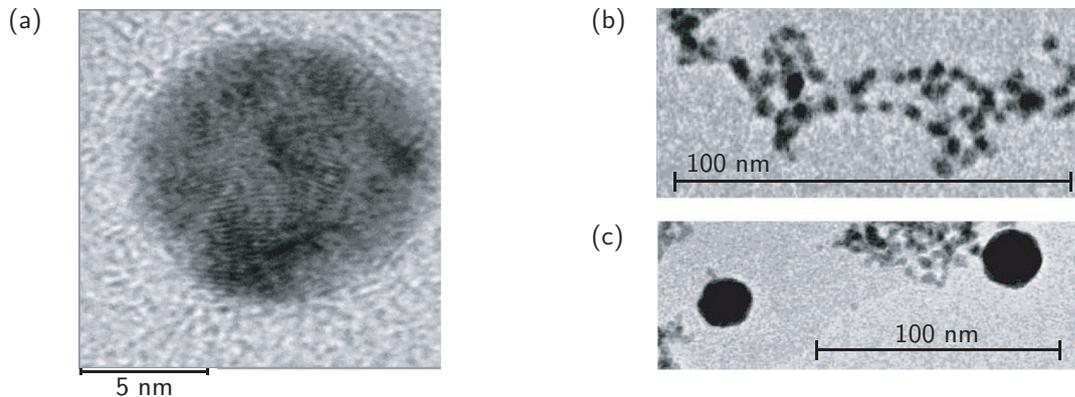


Abbildung 5.4: (a) Das Bild zeigt eine Transmissions-Elektronenmikroskopie-Aufnahme der Reaktionslösung zum Zeitpunkt $t = 0$. Direkt nach der zweiten Zugabe des Reduktionsmittels wurden etwa $5 \mu\text{m}$ der Lösung entnommen und auf einem TEM-Gitter getrocknet. Die kristalline Struktur der Partikel ist gut zu erkennen. (b) TEM-Aufnahmen der Partikellösung nach abgeschlossener Reaktion zeigen Goldkolloide mit Durchmessern von 5 nm und (c) wesentlich größere $\text{Au}_2\text{S}/\text{Au}$ Nanopartikel mit 40 nm Durchmesser. Alle TEM-Bilder wurden in Kooperation mit N. Petkov und B. Fieres am Lehrstuhl von Prof. T. Bein (Department für Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität) aufgenommen.

5.4 Streuspektroskopie an einzelnen metallischen Nanopartikeln

Die Spektroskopie einzelner metallischer Nanopartikel mit hohem Signal-zu-Hintergrund Verhältnis ist eine Voraussetzung für Einzelpartikel-Immunoassays. Die experimentelle Herausforderung liegt in dem geringen Streuquerschnitt einzelner Nanopartikel, der bei Goldpartikeln mit einem Durchmesser von 40 nm im Resonanzmaximum bei 2,36 eV nur $3,3 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^2$ beträgt.³ Edelmetall-Nanopartikel streuen das Anregelicht größtenteils elastisch. Daher lässt sich, im Gegensatz zur Fluoreszenzmikroskopie, die in der Einzelmolekülspektroskopie weit verbreitet ist, Anrege- und Emissionslicht nicht *spektral* mit Filtern voneinander separieren. Die Vermessung der Plasmonresonanz individueller Goldkolloide mit ausreichendem Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis war daher anfangs nur mit der experimentell aufwendigen Nahfeldmikroskopie möglich [51].

Ähnlich wie in der Fluoreszenzmikroskopie lässt sich aber auch für die Streuspektroskopie eine quasi hintergrundfreie Detektion mit Fernfeldmethoden realisieren. Grundlage ist eine *räumliche* Diskriminierung des Anregelichts vom Streulicht eines

³für $n_{\text{Matrix}} = 1$

Partikels. Eine Option ist es, die Nanopartikel im evaneszenten Feld einer totalreflektierten Lichtwelle anzuregen [52]. Da das Feld über dem Substrat exponentiell abfällt, kann es einerseits Plasmonen in direkt auf dem Glassubstrat liegenden Nanopartikeln anregen. Andererseits kann das von Partikeln gestreute Licht in einen mehrere Millimeter von der Substratoberfläche entfernten Detektor einfallen. Ein weiteres Mikroskopieverfahren, das Anrege- und Streulicht räumlich voneinander zu trennen vermag, ist die Dunkelfeldmikroskopie [15, 54, 96].

Die Dunkelfeldmikroskopie läßt sich mit verschiedenen Methoden realisieren, von denen zwei in den nächsten Abschnitten vorgestellt werden. Anschließend wird gezeigt, wie sich einzelne Nanopartikel in physiologischer, also wäßriger Umgebung, spektroskopieren lassen und wie die Streuspektren in dieser Arbeit letztlich gemessen werden.

5.4.1 Dunkelfeldmikroskopie

Abb. 5.5a zeigt das Prinzip der Dunkelfeldmikroskopie. Typischerweise dient eine 100 W Halogenlampe als Anregequelle. Ein Wärmeschutzfilter am Lampenausgang blockt den Infrarotanteil des Anregelichts ($\lambda \gtrsim 800$ nm) und minimiert die Erwärmung der Probe. Anschließend wird das Licht in einen Dunkelfeldkondensator (Zeiss Ultrakondensator) eingekoppelt. Eine Optik aus Kugel- und Hohlspiegel fokussiert das Licht auf die Probe und erzeugt einen hohlen Lichtkegel mit einer numerischen Apertur ($N.A.$) zwischen 1,2 und 1,4. Die $N.A.$ des verwendeten Aufsammelobjektivs muß daher kleiner als 1,2 sein, um kein Anregelicht aufzusammeln. Gewöhnlich stellt dies keine Einschränkung dar, da lediglich Ölimmersionsobjektive eine so hohe $N.A.$ besitzen können.

Sofern sich kein Objekt im Fokus des Dunkelfeldkondensators befindet, sieht ein Beobachter durch das Okular des Mikroskops nur ein schwarzes Bild, d.h. die Dunkelfeldmikroskopie erlaubt eine hintergrundfreie Detektion. Streuende Objekte, wie zum Beispiel metallische Nanopartikel oder Zellmembranen von Hämoglobin-Zellen, sind dagegen kontrastreich vor dem dunklen Hintergrund sichtbar. Dies verdeutlicht Abb. 5.5b, die eine Echtfarbenfotografie einer Probe mit metallischen Nanopartikeln unterschiedlicher Größe und Materials zeigt. Die Dunkelfeldmikroskopie stellt hohe Anforderungen an die Sauberkeit der verwendeten Proben, da selbst kleine Verschmutzungen als starke Streuzentren wirken.

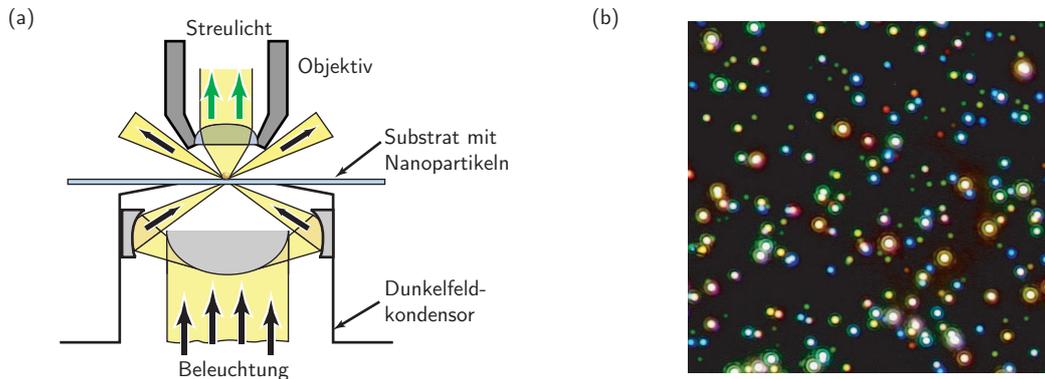
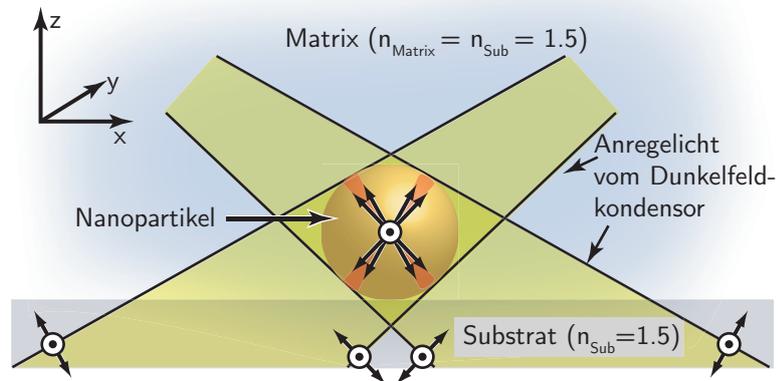


Abbildung 5.5: (a) Prinzip des Zeiss Dunkelfeld Ultrakondensors. Das Anregelicht durchdringt die Probe unter so flachen Winkeln,^a daß es nicht vom Objektiv aufgesammelt wird. Dabei verhindert Immersionsöl zwischen dem Kondensator und der Probe Reflexionsverluste und eine Brechung des Lichts. Streulicht, welches eine andere Abstrahlrichtung als das Anregelicht aufweist wird detektiert. (b) Echtfarbenfotografie einer Probe mit metallischen Nanopartikeln. Jeder beugungsbegrenzte Lichtpunkt stammt von einzelnen oder sehr dicht zusammenliegenden metallischen Nanopartikeln. Die verschiedenen Farben sind auf unterschiedliche Partikelgrößen und Materialien (Gold und Silber) zurückzuführen.

^aTatsächlich wird ein nicht unerheblicher Teil des Anregelichts an der Grenzschicht zwischen Substrat und Umgebung totalreflektiert.

Abb. 5.6 zeigt, daß im Dunkelfeld nicht nur ein Schwingungsdipol, sondern Elektronoszillationen sowohl längs der z -Achse, als auch in der x - y -Ebene des Nanopartikels angeregt werden. Da das Streulicht von Gold-Nanopartikeln bevorzugt senkrecht zur jeweiligen Dipolachse abgestrahlt wird, sammelt das Objektiv einen relativ hohen Streulichtanteil aus der x - y -Ebene ein. Mit einem Polarisationsfilter läßt sich dieses orientierungsabhängig detektieren und die gemessenen Spektren den verschiedenen Dipolachsen zuordnen. Absolut sphärische Nanopartikel zeigen keine Polarisationsabhängigkeit, während unregelmäßig geformte oder stäbchenförmige Nanopartikel je nach Stellung des Polarisationsfilters deutlich unterscheidbare Resonanzen aufweisen.

Abbildung 5.6: Die Anregung mit einem Dunkelfeldkondensator führt zu kollektiven Elektronenschwingungen in allen drei Raumrichtungen. Die möglichen Schwingungsebenen befinden sich in den in rot gezeichneten Bereichen. Die verschiedenen Polarisationsrichtungen sind durch Pfeile bzw. Kreise für Richtungen vertikal zur Zeichenebene dargestellt.

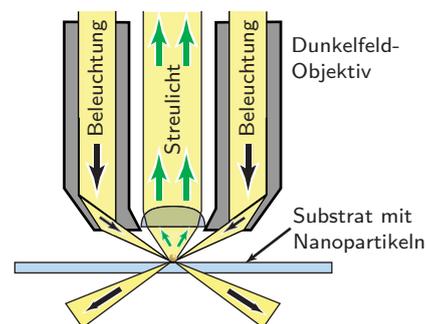


Auflicht-Dunkelfeldmikroskopie

Eine zwingende Voraussetzung für die im letzten Abschnitt beschriebene Durchlicht-Dunkelfeldmikroskopie sind optisch transparente Probensubstrate. Grundsätzlich läßt sich die Dunkelfeldmikroskopie aber auch in einer Auflichtgeometrie realisieren, die vor allem in den Materialwissenschaften und der Halbleiterindustrie eingesetzt wird.

Das Funktionsprinzip der Auflicht-Dunkelfeldmikroskopie entspricht demjenigen des Durchlichtverfahrens. Das Licht wird unter flachen Winkeln auf die Probe fokussiert, so daß kein Anregelicht in das Objektiv gelangen kann. Abb. 5.7 zeigt eine technische Realisierung, bei der ein spezielles Dunkelfeld-Objektiv eingesetzt wird (Carl Zeiss AG). Dieses besitzt in seiner Außenwand eine zweite konzentrische Strahlführung für die Beleuchtung.

Abbildung 5.7: Prinzip der Auflicht-Dunkelfeldmikroskopie. Es wird ein spezielles Objektiv benötigt, das außen eine zweite Strahlführung für die Beleuchtung besitzt. Sowohl die Anregintensität, als auch die Aufsammeleffizienz ($N.A. = 0,75$) ist deutlich geringer als bei der Durchlicht-Dunkelfeldmikroskopie. Der Vorteil liegt darin, daß kein Immersionsöl benötigt wird und auch lichtundurchlässige Substrate verwendet werden können.



Das Auflichtverfahren bietet im Vergleich zur Durchlicht-Dunkelfeldmikroskopie aufgrund der weniger effizienten Lichteinkopplung und der schwächeren Fokussierung

des Anregelichts eine wesentlich geringere Anregeintensität. Demgegenüber stehen die bereits erwähnte Möglichkeit, lichtundurchlässige Proben zu untersuchen und Vorteile bei der Handhabung. So ist weder Immersionsöl nötig, noch muß der Fokus des Dunkelfeldkondensors räumlich exakt in Überlapp mit dem Fokus des Aufsammeobjektivs gebracht werden. Das Auflichtverfahren eignet sich daher besonders für schnelle Charakterisierungen, z.B. um die Dichte der Nanopartikel auf der Probe zu bestimmen.

5.4.2 Dunkelfeld–Mikroskopie in Flüssigkeiten

Die Bindung eines Analytmoleküls an einen entsprechenden Rezeptor muß im allgemeinen unter physiologischen Bedingungen stattfinden. Dies bedeutet, daß auch die Plasmonresonanz eines einzelnen Gold-Nanopartikels in wäßriger Umgebung bestimmt werden muß. Die naheliegendste Möglichkeit, dies zu realisieren, ist die Verwendung von Wasserimmersionsobjektiven. Wie Abb. 5.8 zeigt, läßt sich der Immersionstropfen zwischen der Frontlinse des Objektivs und der Probe als Reaktionsgefäß verwenden. Abhängig vom verwendeten Objektiv (Zeiss Achroplan, $100\times W$, $N.A. = 1,0$; Zeiss Achroplan, $63\times W$, $N.A. = 0,95$) beträgt das minimale Flüssigkeitsvolumen zwischen $180\mu\text{l}$ und $220\mu\text{l}$. Mit einer Pipette lassen sich Flüssigkeiten problemlos hinzufügen oder entnehmen. Nachteile durch den offenen Flüssigkeitstropfen, wie z.B. Verdunstung, Eindringen von Staub und eine mangelnde Durchmischung des Immersionstropfens lassen sich durch technische Maßnahmen weitgehend eliminieren.

Eine weitere Möglichkeit, Nanopartikel in Lösungen zu vermessen, bieten optisch transparente Flußzellen, in denen die Nanopartikel immobilisiert werden. Gegenüber der Immersionsmethode läßt sich das Volumen der Meßflüssigkeit deutlich reduzieren. Des weiteren wird ein Verdunsten und die Kontamination der Lösung durch Staub aus der Umgebung vermieden, so daß lange Meßzeiten von über 15 Stunden problemlos möglich sind. Da die Lösung außerdem nicht mit dem Objektiv in Berührung kommt, lassen sich z.B. auch Messungen mit frei in der Lösung umherschwimmenden Nanopartikeln verwirklichen. Würden solche Messungen mit Wasserimmersionsobjektiven vorgenommen, würden die Nanopartikel sich auf der Frontlinse des Objektivs anlagern und nur noch schwer zu entfernen sein.

Abb. 5.9a zeigt eine Kreuzkanal Flußzelle der Firma ibidi aus Kunststoff. Die optische Qualität ist ausreichend, um das Streuspektrum einzelner Nanopartikel mit

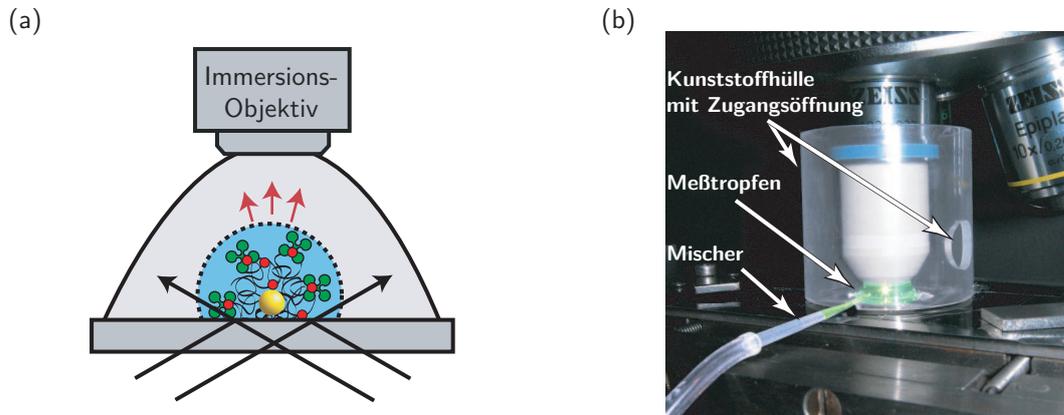


Abbildung 5.8: (a) Immersionsobjektive, deren Numerische Apertur kleiner als die des Dunkelfeldkondensors ist, ermöglichen es, funktionalisierte Gold-Nanopartikel in Flüssigkeiten unter physiologischen Bedingungen zu vermessen. (b) Fotografie des verwendeten Immersionsobjektivs nebst Probe. Eine transparente Kunststoffhülle mit kleiner Zugangsöffnung schützt den Meßtropfen vor Umwelteinflüssen und reduziert die Verdunstung signifikant. Über den Mischerschlauch wird periodisch eine kleine Flüssigkeitsmenge (ca. $10\ \mu\text{l}$) aus dem Meßtropfen heraus- und anschließend wieder hereingepumpt, um für eine gute Durchmischung zu sorgen. Der Meßtropfen ist grün eingefärbt, um die Sichtbarkeit zu erhöhen.

einem Durchmesser von 80 nm zu vermessen. Bemerkenswert ist außerdem das geringe, nur wenige Nanoliter große Flüssigkeitsvolumen, das zum Füllen der kompletten Zelle nötig ist. Größere Zellen mit einem Volumen von etwa $10\ \mu\text{l}$ lassen sich durch Verkleben zweier Glasscheiben oder Aufkleben eines modifizierten HybriSlips (Sigma-Aldrich) auf einem Objektträger herstellen (siehe Abb. 5.9b). Die optische Qualität ist derjenigen von Kunststoffflußzellen weit überlegen. Ebenfalls in der Abbildung zu sehen sind dünne Silikonschläuche für die Befüllung der Flußzelle. Mit Hilfe einer Einwegspritze, deren Kolben von einer motorisierten Mikrometerschraube hineingedrückt wird, läßt sich eine Analytlösung mit geringer Geschwindigkeit ($0,1\ \text{ml/h}$) gleichmäßig durch den Kanal pumpen.⁴ Dies stellt auch bei sehr niedrigen Analytkonzentrationen, also bei diffusionslimitierten Reaktionen, eine gleichbleibende Konzentration während der kompletten Messung sicher.

Den Vorteilen von Flußzellen steht insbesondere bei Eigenbau ein wesentlich höherer experimenteller Aufwand gegenüber, zumal eine Wiederverwendung der Zellen nicht möglich ist. Messungen in Flußzellen wurden daher in erster Linie zur Untersuchung der technischen Machbarkeit eines Einzelpartikelimmunosensors für diagnostische Anwendungen durchgeführt. Dort sollten sie Tests in günstigen Wegwerfzellen aus

⁴In der Medizin ist der Begriff Perfusor® (Braun) für solche Spritzenpumpen geläufig.

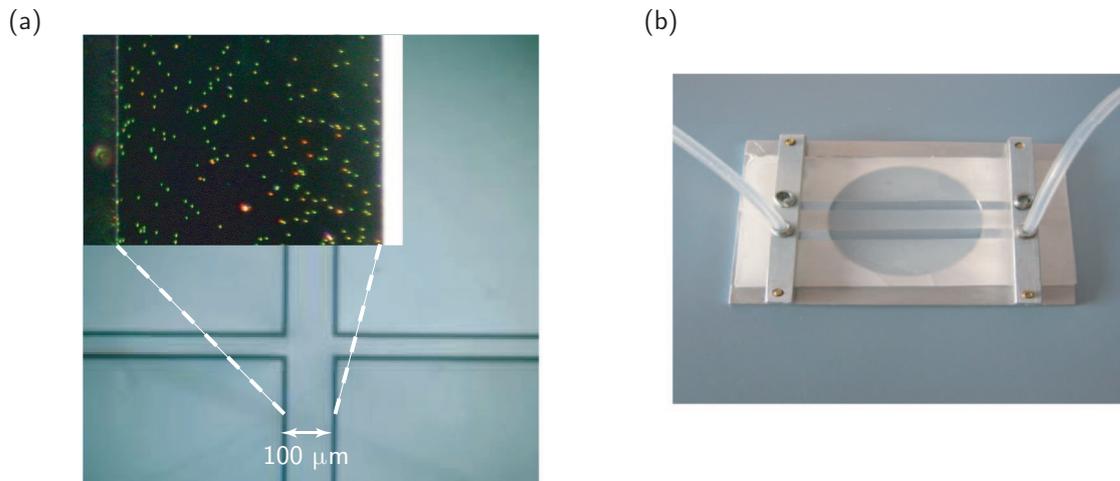


Abbildung 5.9: (a) Kunststoff-Kreuzkanalflußzelle der Firma ibidi. Die im rechten Winkel zueinander angeordneten Kanäle haben eine Breite von $100\ \mu\text{m}$ bzw. $25\ \mu\text{m}$. Die Kanalhöhe beträgt $10\ \mu\text{m}$. Die optische Qualität der Plastikflußzellen ist ausreichend für die Spektroskopie von Nanopartikeln mit $80\ \text{nm}$ Durchmesser (siehe Inset). (b) Selbsthergestellte Flußzelle aus zwei übereinander geklebten Deckgläsern. Die bessere optische Qualität erlaubt das Vermessen von Nanopartikeln mit kleineren Durchmessern.

Kunststoff bei kleinsten Probenvolumina erlauben.

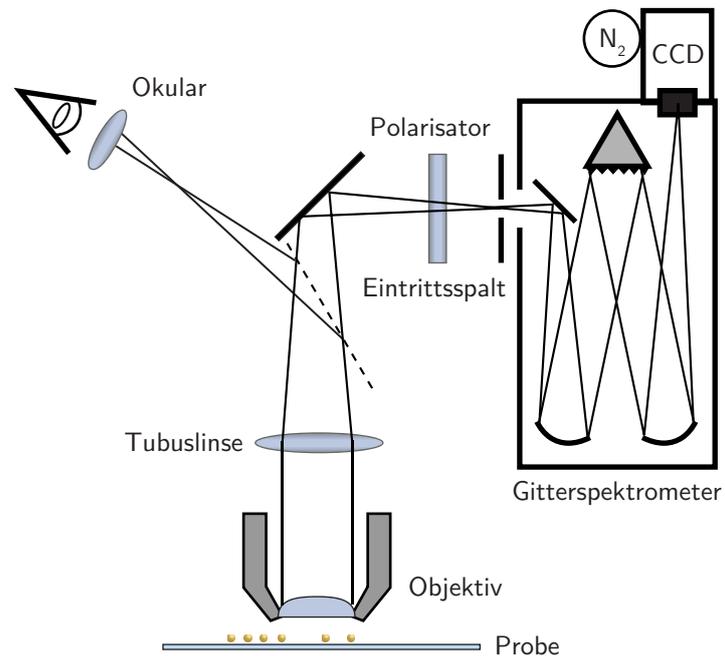
Die Anregung der Gold-Nanopartikel in der Zelle ist sowohl in Aufsicht-, als auch in Durchlicht-Geometrie (siehe Kap. 5.4.1) durchführbar. Zum Aufsammeln des Streulichts wird ein Objektiv mit Deckglaskorrektur (Zeiss Achroplan, $63\times$, $N.A. = 0,75$) verwendet, wobei die Deckglaskorrektur an die Dicke der Flußzelle angepaßt wird.

5.4.3 Aufnahme von Einzelartikel–Streuspektren

In den letzten Unterkapiteln wurden Methoden vorgestellt, mit denen metallische Nanopartikel effizient angeregt werden können. Der komplette Detektionszweig des verwendeten Versuchsaufbaus ist schematisch in Abb. 5.10 gezeigt. Dieser besteht aus einem aufrechten Mikroskop (Zeiss AxioTech), das einen unkomplizierten Objektivwechsel und eine präzise Positionierung der Probe in der x-y-Ebene mit einem kreuzrollengelagerten Tisch erlaubt.

Das Streulicht einzelner Nanopartikel wird von einem Mikroskopobjektiv aufgesammelt. Ein Strahlteiler (Verhältnis 50:50) leitet einen Teil des Streulichts zum Okular, durch das es sich direkt mit dem Auge beobachten läßt. Der andere Teil

Abbildung 5.10: Experimenteller Aufbau zur Aufnahme von Einzelpartikel-Streuspektren. Das Streulicht einzelner metallischer Nanopartikel wird von einem Objektiv aufgesammelt und von einem Umlenkspiegel auf den Eintrittsspalt eines Gitterspektrometers gelenkt. Dieses fächert das einfallende Licht spektral auf und lenkt es auf den CCD-Chip einer stickstoffgekühlten Kamera. Mit Hilfe eines Polarisators vor dem Eintrittsspalt des Spektrometers lassen sich die polarisationsabhängigen Komponenten des Streulichts eines Nanopartikels in der Probenebene (x-y-Ebene) untersuchen.



des Streulichts wird zu einem der beiden Kameraausgänge des Mikroskops geführt. Um eine spektrale Analyse des Streulichts zu ermöglichen, wird es anschließend über einen Umlenkspiegel direkt auf den variablen Eintrittsspalt eines Gitterspektrometers (Acton Research; Typ SpectraPro 300i) fokussiert.

Das Spektrometer ist mit einem Gitterwechsler ausgestattet, der die bequeme Auswahl zwischen zwei verschiedenen Gittern (300 und 1800 Rillen pro mm) und einem Spiegel ermöglicht. Wählt man den Spiegel, wird der Eintrittsspalt des Spektrometers 1 : 1 auf den Spektrometerausgang abgebildet. Bei Wahl eines der beiden Gitter wird das Licht in horizontaler Richtung aufgefächert. Als Detektor dient eine Kamera von Princeton Instruments, die direkt an das Spektrometer angekoppelt ist. Sie besitzt einen rückseitig beleuchteten Full-Frame CCD-Chip mit 400×1340 Pixeln, die jeweils $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ groß sind. Zur Verminderung thermischen Rauschens wird der CCD-Chip der Kamera stickstoffgekühlt. Die optimale Betriebstemperatur liegt bei etwa -110°C und wird elektronisch auf diesen Wert stabilisiert. Bei dieser Temperatur erreicht die Kamera eine Quanteneffizienz von über 80%. Zwischen Eintrittsspalt und Spektrometer ist ein elektromechanischer Shutter angebracht, der sich nur während der Messungen öffnet. Der geschlossene Shutter verhindert nicht nur die Beschädigung des empfindlichen CCD-Chips durch (Tages-) Licht. Er verhindert außerdem, daß während des Ausleseprozesses Licht

auf den Chip fällt und die dabei registrierten Photonen falschen Pixeln zugeordnet werden (Smear-Effekt). Die Steuerung des Spektrometers und der CCD Kamera erfolgt mit der kommerziellen Software WinSpec32 (Princeton Instruments). Neben den Steuerfunktionen für die Hardware bietet sie u.a. die Möglichkeit, Bildkontrast und Helligkeit anzupassen, zweidimensionale Intensitätsprofile zu erstellen, sowie verschiedene Filter- und Exportfunktionen. Die einzige während der hier beschriebenen Experimente verwendete Filterfunktion ist die automatische Unterdrückung von Zählereignissen durch kosmische Höhenstrahlung.

Im folgenden ist die Messung des Streuspektrums eines einzelnen Nanopartikels kurz beschrieben: Zunächst wird die Probe mit dem Spiegel im Spektrometer auf den CCD-Chip abgebildet. Anschließend wird ein einzelnes Nanopartikel mit Hilfe des x-y-Verschiebetischs in die Mitte des Spektrometer-Eintrittspalts justiert und der Spalt auf etwa $400\ \mu\text{m}$ geschlossen. Abb. 5.11a zeigt das korrespondierende CCD-Bild in einer Falschfarbendarstellung. Nun wird statt des Spiegels das Gitter mit der Gitterkonstanten $g = 300\ \text{nm}^{-1}$ gewählt und mit der Software werden zwei gleich große Meßfenster (*Region Of Interest: ROI*) definiert, die in Abb. 5.11b als grün bzw. rot umrandete Bereiche zu sehen sind. Eines der Meßfenster schließt das nun spektral aufgefächerte Streulicht des Nanopartikels ein, das zweite einen Bereich knapp darunter. Innerhalb der ROIs werden die Zählraten der einzelnen Pixel des Chips in vertikaler Richtung von der Software aufaddiert. Auf diese Weise erhält man in nur einer Messung zeitgleich das (unkorrigierte) Streuspektrum des Partikels

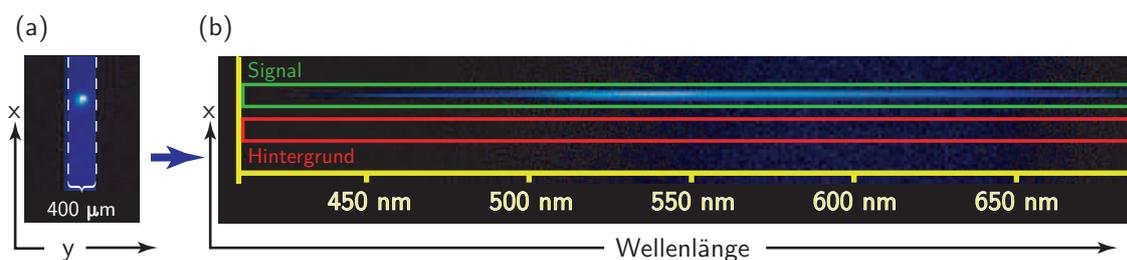


Abbildung 5.11: (a) Streulicht eines einzelnen Nanopartikels in der Mitte des etwa $400\ \mu\text{m}$ geöffneten Eintrittspalts des Gitterspektrometers. (b) Statt des Spiegels ist nun ein Gitter in den Strahlengang geklappt. Das Streulicht des Nanopartikels wird daher durch die Gitterdispersion in horizontale Richtung aufgefächert. Die 1340 Pixel des CCD-Chips in horizontaler Richtung entsprechen etwa einem Wellenlängenbereich von $280\ \text{nm}$; die genaue Umrechnung von Pixeln in Wellenlänge wird abhängig vom Gitterwinkel von der (kalibrierten) Software vorgenommen. Der grün umrandete Bereich ist das Meßfenster für das vom Nanopartikel gestreute Licht, das gleich große rote Rechteck dient zur Aufnahme des Hintergrundspektrums.

und ein Spektrum des Hintergrundlichts. In der Datenauswertung wird zunächst das Hintergrundspektrum vom unkorrigierten Streuspektrum abgezogen. Um auf die spektralen Eigenschaften des Versuchsaufbaus, insbesondere der Anregequelle zu korrigieren, kann hinterher durch das Spektrum des Anregelichts dividiert werden. Dieses wird in der Regel mit einer isotrop- und wellenlängenunabhängig streuenden Milchglasscheibe als Probe gemessen. Alternativ hat es sich bei Messungen mit relativ hohem Hintergrund bewährt, statt dessen direkt durch das Hintergrundspektrum zu teilen.⁵ Solange nur kleine Resonanzverschiebungen (≈ 10 meV) desselben Spektrums bestimmt werden sollen, wird in der Regel auf die Weißlichtkorrektur verzichtet. (Das Anregelicht kann in diesem kleinen Intervall als konstant angesehen werden.) Da die Lichtintensität im Fokus des Dunkelfeldkondensors nur sehr grob zu bestimmen ist, kann aus der Intensität des gestreuten Lichts kein absoluter Streuquerschnitt für das jeweils vermessene Nanopartikel angegeben werden. Die Spektren werden daher grundsätzlich normiert. Für den Einzelpartikelimmunoassay stellt dies keinerlei Einschränkung dar, da hier nur die genaue Lage der Plasmonresonanz relevant ist. Um diese möglichst präzise zu bestimmen, werden die Spektren leicht geglättet⁶ und in der Nähe des Resonanzmaximums durch eine Lorentzkurve gefittet. Die Resonanzlage ergibt sich dann aus den Fitparametern.

5.5 Probenpräparation

Die Probenpräparation umfaßt im wesentlichen die Reinigung und das Passivieren der Substrate, das Aufbringen der Gold-Nanopartikel und die Herstellung geeigneter Pufferlösungen. Die Probensubstrate bestehen aus Mikroskopdeckgläschen mit einer Stärke von $0,12\text{ mm}$ ⁷ Auf diese werden ca. $0,2\text{ }\mu\text{l}$ einer verdünnten Goldkonjugatlösung aufgebracht, die anschließend im Stickstoffstrom getrocknet wird. Die Goldpartikel liegen dann etwa in einem Abstand von $10\text{ }\mu\text{m}$ bis $20\text{ }\mu\text{m}$ auf dem Substrat und können problemlos einzeln spektroskopiert werden.

Ein generelles Problem beim Umgang mit Proteinen ist ihre Neigung, unspezifisch an Oberflächen zu adsorbieren [97]. In Immunoassays bedeutet dies vornehmlich einen Verlust von Analytmolekülen, die nach der Adsorption nicht mehr für eine

⁵Hintergrund- und Anregespektrum zeigen durchweg sehr gute Übereinstimmung.

⁶20 Pixel gleitender Durchschnitt oder Sawatzki-Golay Algorithmus zweiter Ordnung.

⁷Auch die in Kap. 5.4.2 vorgestellten Flußzellen bestehen aus Mikroskopdeckgläschen.

Bindung an die Rezeptoren zur Verfügung stehen. Um dies zu unterbinden, werden die Glassubstrate vor dem Aufbringen der Gold-Nanopartikel mit Hexamethyldisilazan silanisiert. Dadurch werden ihre Oberflächen hydrophob, und die unspezifische Adsorption von Proteinen verringert sich. Als weitere Maßnahme wird den Meß-Puffern Rinderserumalbumin als Stütz- oder Blockungsprotein in einer Konzentration von 0,5 mg/ml – 1 mg/ml zugegeben. Durch die im Vergleich zum Analyten hohe Konzentration werden freie Oberflächen primär vom Stützprotein und nicht vom Analyten abgesättigt. Die Hauptfunktion der Puffer ist es aber, den pH-Wert konstant oberhalb des isoelektrischen Punktes aller an der Reaktion beteiligten Proteine zu halten. Dies stellt sicher, daß sie in ihrer nativen Form vorliegen und biologisch aktiv sind. Ergänzend wirkt sich die Wahl der Puffer und darin enthaltener Zusatzstoffe, wie Salze und Detergenzien, auch auf die Bindungsaffinität der Bindungspartner aus. Für alle Messungen wurde wahlweise ein Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer oder ein Phosphatpuffer jeweils mit oder ohne Natriumchlorid (Tris- bzw. PBS-Puffer) im Konzentrationsbereich von 10 mM – 50 mM benutzt.

6 Molekulare Erkennung mit Einzelpartikel-Immunoassays

Im ersten Abschnitt der experimentellen Ergebnisse wird gezeigt, daß es tatsächlich möglich ist, ein einzelnes Gold-Nanopartikel als Biosensor zu verwenden. Dazu wird die Bindung von Streptavidin an ein biotinbeschichtetes Nanopartikel untersucht. Im Abschnitt „Nachweis niedermolekularer Analyte“ wird ein kompetitiver Test vorgestellt, mit dem sich auch kleine Analyte sicher nachweisen lassen. Schließlich wird auf die besondere Problematik beim Messen in Blutserum eingegangen.

6.1 Spezifischer Nachweis von Streptavidin

Aufgrund der hohen Affinität zwischen Biotin¹ und Streptavidin, sowie der Robustheit beider Proteine gegenüber Temperatureinflüssen und pH-Wert wird die *Biotin-Streptavidin* Bindung häufig als Modellsystem für Antikörper-Antigen-Bindungen verwendet. Auch der erste Funktionstest des Einzelpartikel-Immunsensors wird an diesem System durchgeführt.

Biotin-Proteine haben nur ein geringes Molekulargewicht² (MW: 244 D) und lassen sich deshalb nicht ohne Funktionsverlust direkt auf die Oberfläche eines Gold-Nanopartikels binden. Daher wird vor der Funktionalisierung ein Biotinderivat an größere Rinder-Serum-Albumin Proteine (RSA; MW: 67 000 D) gekoppelt. Das Verhältnis beider Moleküle wird so gewählt, daß im Mittel ein RSA Protein sechs Biotin-Moleküle trägt. Anschließend werden Gold-Nanopartikel mit 40 nm Durchmesser mit den biotinierten RSA Proteinen (RSA-bi) beschichtet. Als Analyt wird Streptavidin (MW: 52 000 D) verwendet, ein tetrameres Protein, das bis zu vier Biotin-Moleküle mit hoher Affinität binden kann.

¹Vitamin B-7 bzw. Vitamin H

²1 D = 1 u, atomare Masseneinheit

Mit der Mie-Theorie läßt sich die Resonanzverschiebung abschätzen, die durch die Funktionalisierung und das anschließende Binden von Streptavidin an das Gold-Nanopartikel mit 40 nm Durchmesser auftritt. Der in Abb. 6.1 orange gezeichnete Teil der Resonanzkurve ergibt sich für ein unbedecktes Nanopartikel in einer wäßrigen Lösung ($n_{Matrix} = 1,33$). Nimmt man für die RSA-bi Schicht eine Dicke von 3 nm und einen Brechungsindex von $n_{Prot} = 1,5$ an, verschiebt sich dieses Spektrum um 16 meV zu niedrigeren Energien (rote Kurve). Das Spektrum verschiebt sich nochmals um 7,5 meV, wenn Streptavidin-Moleküle an das funktionalisierte Nanopartikel anbinden und sich dadurch die Proteinhülle um das Partikel auf 5 nm vergrößert (grüne Kurve). Es sollte betont werden, daß die hier gewählten Dicken und Brechungsindizes der Proteinhülle typische, *effektive* Größen sind, die z.B. mit Wasser gefüllte Zwischenräume benachbarter Proteine berücksichtigen. Sie unterscheiden sich deshalb zwangsläufig von dem wahren Proteindurchmesser in Lösung bzw. dem Brechungsindex einer kristallisierten Proteinschicht [98–100].

Für den Test des Sensors werden als erstes funktionalisierte Nanopartikel auf einem silanisierten Glassubstrat immobilisiert. Für die Messung wird ein Immersionsobjektiv verwendet, wobei als Immersionsflüssigkeit eine 10 mM Tris/RSA Pufferlösung mit pH 8,0 und einem RSA Anteil von 0,5 %³ verwendet wird. Der pH-Wert liegt damit

³Massenprozent

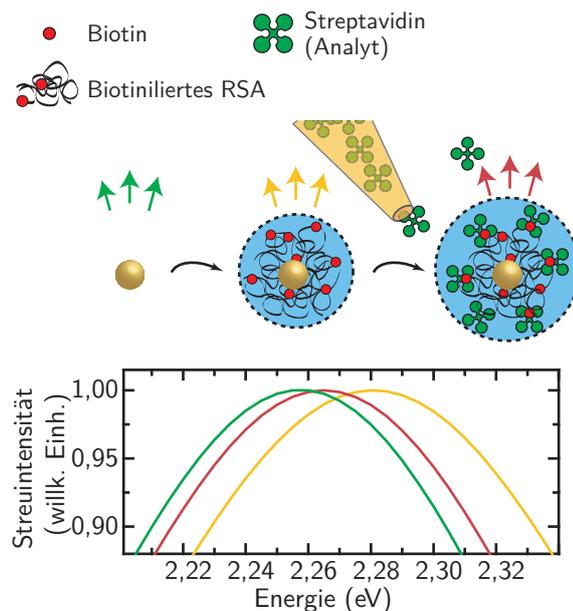


Abbildung 6.1: Rechnungen nach der Mie-Theorie ergeben, daß bei der Funktionalisierung eines 40 nm großen Gold-Nanopartikels sein Streuspektrum (orange Kurve) um 16 meV ins Rote schiebt (rote Kurve). Nach der Zugabe von Streptavidin erhöht sich die Dicke der Proteinschicht durch bindende Streptavidin-Proteine. Infolgedessen verschiebt sich die Resonanz nochmals um 7,5 nm (grüne Kurve).

zuverlässig über den isoelektrischen Punkten von Biotin ($pI = 3,5$), Streptavidin ($pI = 5-6$) und RSA ($pI = 4,7$) [101]. Wie bereits in Kap. 5.5 erwähnt, sollen sowohl die Silanisierung, als auch die RSA Proteine im Puffer die unspezifische Adsorption von Streptavidin an das Glassubstrat und das Mikroskopobjektiv verhindern.

Nun wird das Streuspektrum eines einzelnen funktionalisierten Nanopartikels gemessen. Dabei ergibt sich die in Abb. 6.2a,b als durchgehende Linie gezeigte Resonanzkurve. Nach der Messung werden $10\ \mu\text{l}$ eines Phosphatpuffers, der $6 \cdot 10^{-5}\ \text{mol/l}$ Streptavidin enthält, zu der Pufferlösung unter dem Objektiv hinzugefügt. Die Streptavidinkonzentration, also die Konzentration der Analytmoleküle in der Meßlösung, beträgt nun $2 \cdot 10^{-6}\ \text{mol/l}$. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wird das Streuspektrum desselben Gold-Nanopartikels erneut gemessen (gestrichelte Kurve in Abb. 6.2a,b). Dabei zeigt sich, daß die Resonanz um 5 meV gegenüber dem ursprünglichen Spektrum ins Rote verschoben ist. Besonders deutlich ist das im Differenzspektrum in Abb. 6.2c zu sehen, dessen symmetrische Form auf eine gleichmäßige Verschiebung des Streuspektrums schließen läßt.

Der experimentell für die Resonanzverschiebung gefundene Wert von 5 meV stimmt gut mit dem für ein freies Partikel berechneten Wert von 7,5 meV überein. Der Unterschied ist nicht nur auf Unsicherheiten bei der Wahl der Parameter für die Rechnung (Dicke der Proteinhülle und deren Brechungsindex) zurückzuführen, sondern insbesondere darauf, daß das funktionalisierte Gold-Nanopartikel im Experiment auf einem Substrat liegt, so daß ein Teil der Partikeloberfläche nicht für die Analytmoleküle zugänglich ist und dort keine Brechungsindexänderung stattfindet.

Um sicherzustellen, daß die beobachtete Resonanzverschiebung nicht durch den hinzugefügten Phosphat-Lagerpuffer des Streptavidins oder durch unspezifische Bindungen von RSA an das Gold-Nanopartikel hervorgerufen wird, werden zwei Kontrollexperimente durchgeführt.

Als erstes wird die Resonanzposition eines einzelnen mit RSA-bi funktionalisierten Nanopartikels in Tris/RSA-Puffer 15 min lang durch fortwährende Messungen des Streuspektrums bestimmt (Abb. 6.3, grüne Punkte). Zum Zeitpunkt $t = 0\ \text{min}$ werden $10\ \mu\text{l}$ eines Phosphatpuffers, der dem Lagerpuffer des Streptavidins entspricht, zugegeben. Die weitere Beobachtung des Streuspektrums zeigt keine signifikante Änderung der Resonanzposition, woraus sich schließen läßt, daß die Zugabe des Puffers allein keine Modifikationen in der unmittelbaren Umgebung des Nanopartikels bewirken.

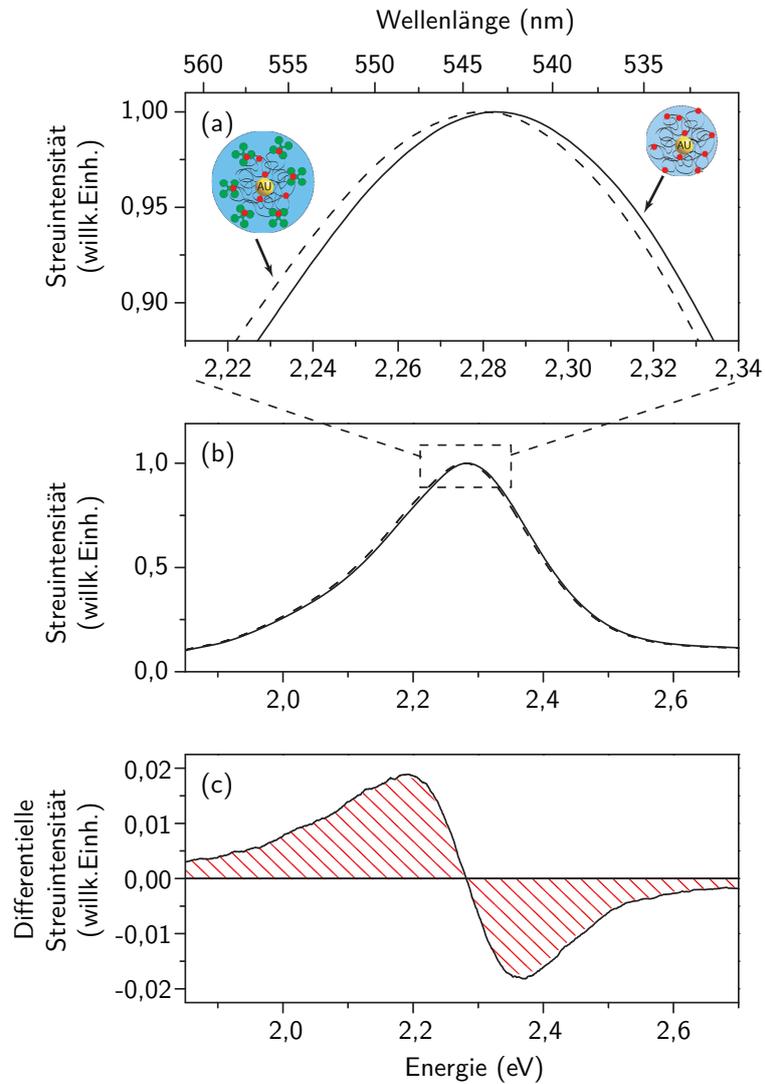


Abbildung 6.2: (a,b) Gemessene Streuspektren eines einzelnen, mit RSA-bi funktionalisierten Gold-Nanopartikels vor (durchgehende Kurve) und nach der Bindung von Streptavidin (gestrichelte Kurve). (c) Differenz der beiden in (b) gezeigten Spektren.

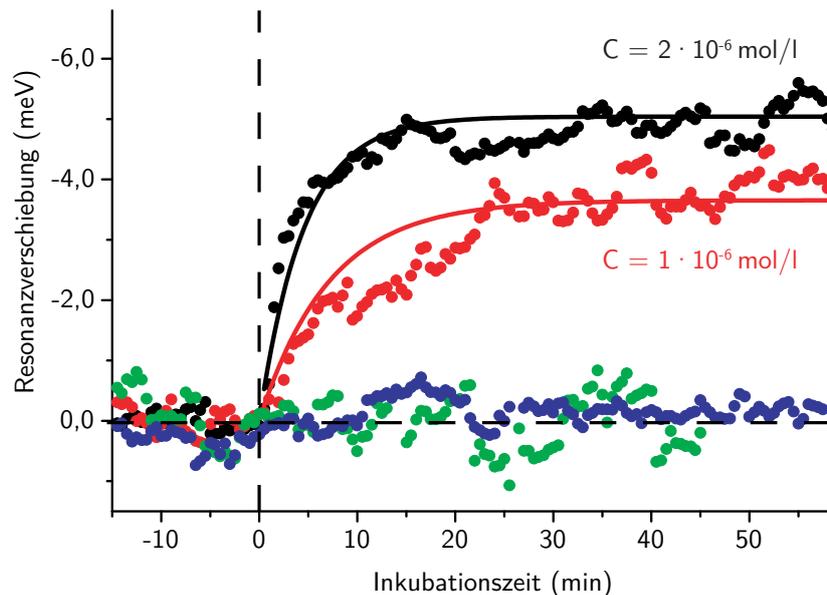


Abbildung 6.3: Resonanzverschiebung, aufgetragen gegen die Inkubationszeit für verschiedene Streptavidin-Konzentrationen und für zwei Kontrollexperimente. Bei der Zugabe von Streptavidin zum Zeitpunkt $t = 0$ beginnt die Resonanzposition ins Rote zu verschieben (schwarze und rote Punkte). Die Beimischung von Phosphatpuffer hat dagegen genauso wenig einen Einfluß auf die Resonanzposition (grüne Punkte), wie die Zugabe von Streptavidin zu einem Nanopartikel, das nicht mit Biotin beschichtet ist (blaue Punkte).

In einem zweiten Kontrollexperiment werden Gold-Nanopartikel untersucht, deren funktionalisierte Oberfläche keine Biotin-Moleküle, also keine Rezeptoren für Streptavidin, trägt. Diesmal wird zum Zeitpunkt $t = 0$ min statt des puren Phosphatpuffers Streptavidin zugegeben, so daß sich in der Meßlösung eine Analytkonzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l einstellt. Wie die blauen Symbole in Abb. 6.3 zeigen, tritt keine spektrale Verschiebung der Resonanz auf. Aus den beiden Kontrollexperimenten läßt sich schlußfolgern, daß die oben beobachtete Rotverschiebung von 5 meV eine direkte Folge von Bindungsereignissen zwischen Streptavidin und Biotin ist.

Betrachtet man die Anzahl von Streptavidin-Molekülen, die auf einem einzelnen Nanopartikel Platz finden, folgt eine bemerkenswerte Beobachtung: Für Streptavidin-Monolagen auf planen, mit Biotin funktionalisierten Oberflächen findet man unter optimalen Bedingungen eine maximale Flächendichte von ≈ 230 ng/cm² (entsprechend $2,66 \cdot 10^{12}$ Moleküle pro cm²) [102]. Auf der Oberfläche eines funktionalisierten Nanopartikels mit einem Durchmesser von 46 nm haben demnach maximal 180 Streptavidin-Moleküle Platz. Geht man davon aus, daß im Experiment nur zwei Drittel

der Oberfläche zugänglich sind, reduziert sich dieser Wert auf 120. Berücksichtigt man die Meßgenauigkeit sind daher deutlich weniger als 100 Bindungsereignisse zur Detektion ausreichend. Zum Vergleich: Würde man die Messung nicht an einem einzelnen Nanopartikel durchführen, sondern an einem Mikroliter einer Goldkonjugat-Lösung aus 46 nm großen Nanopartikeln mit einer optischen Dichte von $O.D. = 1$, benötigte man bereits über $1 \cdot 10^9$ Analytmoleküle.

Als nächstes wird untersucht, welchen Einfluß die Streptavidin-Konzentration auf die Größe der Resonanzverschiebung hat. Zum Zeitpunkt $t = 0$ min, wird dem Meßpuffer soviel Streptavidin hinzugefügt, daß sich eine Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ ($2 \cdot 10^{-6}$ mol/l) einstellt. Nach einer Minute weist die Resonanzenergie des Streuspektrums eine deutliche Verschiebung auf (Abb. 6.3, schwarze Symbole). Mit zunehmender Inkubationszeit sättigt sich die Verschiebung und strebt einem konstanten Wert von -5 meV zu, der nach etwa 15 min Reaktionszeit erreicht ist.

Die roten Symbole stellen eine äquivalente Messung für eine Streptavidinkonzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ ($1 \cdot 10^{-6}$ mol/l) dar. Im Vergleich zur höheren Konzentration findet die Rotverschiebung auf einer längeren Zeitskala statt und die maximale Verschiebung ist geringer.

Die folgende Abschätzung zeigt, daß die beobachtete Bindungskinetik nicht durch Massentransport oder Diffusion an das funktionalisierte Partikel bestimmt ist. Für die Rate von Streptavidin-Proteinen, die aufgrund von Diffusion bei einer Konzentration von $C = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/l auf ein funktionalisiertes Nanopartikel mit einem Radius $r = 23$ nm treffen, ergibt sich aus Gl. 2.26 und Gl. 2.27 ein Wert von $1,0 \cdot 10^4$ 1/s. Da die Literaturangaben für die Diffusionskonstante von Streptavidin zwischen $4 \cdot 10^{-7}$ cm²/s und $7,4 \cdot 10^{-7}$ cm²/s variieren, wurde ein mittlerer Wert von $D_S = 6 \cdot 10^{-7}$ cm²/s angenommen [98, 99]. Da, wie bereits erwähnt, auf einem einzelnen Gold-Nanopartikel nur etwa 120 Streptavidin-Moleküle Platz finden, würde sich bei einer rein diffusionslimitierten Bindungskinetik innerhalb von weniger als einer Sekunde eine komplette Streptavidinhülle um das Nanopartikel bilden. Da die beobachtete Reaktion aber auf einer Zeitskala von Minuten abläuft, kann davon ausgegangen werden, daß die Kinetik weitgehend unabhängig von der Diffusion des Analyten in der Meßlösung ist.

Setzt man für die Bindungskinetik die sich aus dem Massenwirkungsgesetz ergebende Gl. 2.20 an, ergibt sich eine Affinitätskonstante von $K \approx 10^6$ l/mol. Diese ist wesentlich geringer, als für die Bindung von freiem Biotin und Streptavidin in Lösung, für die eine

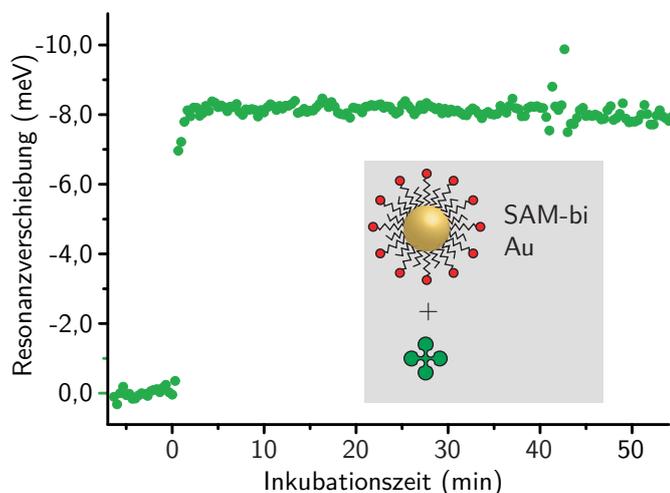
Affinitätskonstante von $K \approx (1 \cdot 10^{11} - 1 \cdot 10^{15})$ l/mol beobachtet wird [1, 101, 103]. Der große Unterschied ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen: Die Biotin-Moleküle auf den Nanopartikeln sind für den Analyten nicht frei zugänglich, sondern befinden sich selbst *in* einer Schicht aus RSA Proteinen. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit einer Bindung und damit die Affinitätskonstante dramatisch reduziert [104].⁴ Da die Größe der Resonanzverschiebung pro andockendes Protein von seinem Abstand zur Partikeloberfläche abhängt, werden gerade Bindungen an weit innerhalb der RSA-Hülle liegende Biotin-Moleküle überproportional zum Sensorsignal beitragen. Bereits kurz nach Zugabe des Analyten wird aber speziell der Zugang zu den inneren Bindungsstellen durch weiter außen an die RSA-Hülle anbindende Analytmoleküle zusätzlich erschwert.

Um die molare Nachweisgrenze zu senken, muß der Weg der Analytmoleküle zu den Bindungsstellen auf dem Nanopartikel erleichtert werden. Dies kann entweder durch Optimieren der Biotin-Dichte auf dem RSA geschehen,⁵ oder indem man die Biotin-Moleküle direkt über kurze, auf einer Seite thiolterminierte, Kohlenstoffketten an das Nanopartikel heftet. Unter geeigneten Reaktionsbedingungen binden die Kohlenstoffketten über ihre Thiolgruppe an die Goldoberfläche und bilden dort eine selbstorganisierende Monolage (engl: self assembled monolayer, SAM), in der die Kohlenstoffketten gleichmäßig nach außen abstehen („Nano-Rasen“). Eine genaue Beschreibung der Synthese findet man z.B. bei Weisbecker et al. [106]. Wie in Abb. 6.4 schematisch gezeigt, sind die Biotin-Bindungsstellen nun außen an der organischen Hülle um das Partikel angebracht und sollten daher wesentlich besser zugänglich sein. Da die Monolage außerdem dünner ist als die RSA-bi Hülle, sollte sich zugleich auch die Resonanzverschiebung vergrößern. Abb. 6.4 zeigt eine Messung an SAM-bi Gold-Nanopartikeln mit 40 nm Durchmesser. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wird dem Assay wieder Streptavidin zugegeben, so daß sich in der Meßlösung eine Analytkonzentration von $C = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/l einstellt. Offenkundig verläuft die Assoziation bei gleicher Analytkonzentration wesentlich schneller als bei RSA-bi beschichteten Nanopartikeln. Zusätzlich beobachtet man eine höhere

⁴Die Affinität zwischen freiem Biotin und Streptavidin wird gelegentlich *intrinsische Affinität* genannt; die Affinität zwischen einem biotinierten Protein und Streptavidin dagegen als *funktionale Affinität* bezeichnet [104, 105].

⁵Dabei führt eine hohe Anzahl von Biotin-Molekülen pro RSA nicht zwangsläufig zu einer höheren Affinität gegenüber Streptavidin: Für Oberflächen, die mit einer hohen Biotin-Dichte funktionalisiert sind, beobachtet man gerade einen gegenteiligen Effekt (sterische Hinderung) [99, 102].

Abbildung 6.4: Messung an Gold-Nanopartikeln, die mit einer selbstorganisierenden Monolage funktionalisiert sind. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wird der Meßlösung wieder Streptavidin zugegeben, so daß sich eine Analytkonzentration von $C = 1 \cdot 10^{-6}$ mol/l einstellt. Die Assoziationsrate und die maximale Resonanzverschiebung sind größer als für RSA-bi funktionalisierte Gold-Nanopartikel des gleichen Durchmessers. Die „Ausreißer“ bei $t \approx 45$ min sind auf das Durchschwimmen kleiner streuender Schmutzpartikel (Feinstaub) durch den Fokus des Mikroskopobjektivs zurückzuführen.



Resonanzverschiebung von 8 meV im Gleichgewichtszustand.

Die bessere Zugänglichkeit der Bindungsstellen und ihr geringerer Abstand zur Partikeloberfläche im Vergleich zu RSA-bi funktionalisierten Nanopartikeln führen also tatsächlich zu einer höheren funktionalen Affinitätskonstante. Es ist auch nicht auszuschließen, daß die Kinetik bereits durch Massentransport beeinflusst ist. Um diese Frage zu klären, bedarf es in der Zukunft noch weiterer Untersuchungen.

6.2 Spezifischer Nachweis von Antikörpern

Die Ergebnisse des letzten Kapitels haben gezeigt, daß sich mit einem einzelnen Gold-Nanopartikel eine sehr geringe Anzahl von Streptavidin-Molekülen nachweisen läßt. Auch wenn Biotin/Streptavidin in vielen Assays eingesetzt wird und insofern mehr als nur ein Modellsystem für Antikörper-Antigen Bindungen darstellt, ist es im Hinblick auf die Anwendung als Immunoassay wichtig zu zeigen, daß auch Antikörper sicher nachweisbar sind.

Da die Funktionalisierung von Gold-Nanopartikeln mit Streptavidin eine Routineprozedur bei Roche-Diagnostics ist, wird aus der immensen Auswahl an Antigen-Antikörper Systemen wieder Streptavidin als einer der beiden Bindungspartner ausgewählt. Als Analyt, der an das mit Streptavidin beschichtete Nanopartikel binden soll, wird ein monoklonaler anti-Streptavidin Antikörper (MAK<SA>; MW: 150 000 D)

verwendet. Die Messungen verlaufen analog zu den im vorigen Kapitel beschriebenen,⁶ sollten jedoch bei hohen $\text{MAK}_{\langle \text{SA} \rangle}$ Konzentrationen zu einer höheren Resonanzverschiebung führen, da die Antikörper ein höheres Molekulargewicht als Streptavidin besitzen. Außerdem erwartet man, daß die Bindungsstellen auf der Partikeloberfläche besser zugänglich sind, als bei den mit RSA-bi funktionalisierten Nanopartikeln.

Abb. 6.5 zeigt die Resonanzverschiebung im Gleichgewichtszustand, der spätestens 100 min nach der Zugabe des Analyten auf den Assay erreicht ist, in Abhängigkeit von der Analytkonzentration. Die einzelnen Werte ergeben sich durch Mittelung über bis zu 3 Einzelmessungen (s.u.). Bei Konzentrationen um die $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l ist das maximale Sensorsignal (≈ 10 meV) erreicht; eine weitere Konzentrationserhöhung führt nicht zu einem größeren Sensorsignal. Die rote Kurve ist eine Approximation der Daten mit dem Modell nach Gl. 2.21 und ergibt eine Affinitätskonstante von $K = (1 \pm 0,8) \cdot 10^7$ l/mol.

Wiederholte Messungen bei gleicher Analytkonzentration zeigen, daß die Reso-

⁶Die Messungen finden in einem 20 mM Tris-Puffer bei pH 7,5 statt. Dem Puffer ist 1 mg/ml RSA beigemischt.

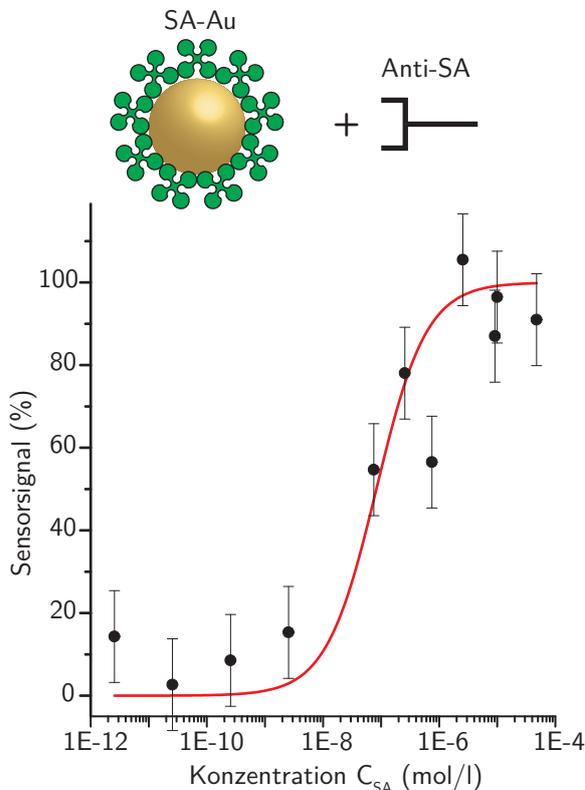


Abbildung 6.5: Experimentell im Gleichgewichtszustand gemessene Resonanzverschiebung gegen die Analyt-Konzentration. Die rote Linie ist die nach Gl. 2.21 angepaßte Standardkurve des Assays, aus der sich eine Affinitätskonstante von $K = 1 \cdot 10^7$ l/mol ergibt. Die Fehlerbalken geben die Unsicherheit der einzelnen Messungen an.

nanzverschiebung im Gleichgewicht von Nanopartikel zu Nanopartikel unterschiedlich ist. Es kann ausgeschlossen werden, daß diese Schwankungen von Meßunsicherheiten stammen: Erst bei niedrigen Analytkonzentrationen ($< 5 \cdot 10^{-8}$ mol/l) läßt sich unter Umständen eine Drift im experimentellen Aufbau nicht mehr von der langsam ablaufenden Reaktionskinetik unterscheiden. Die Ursache der beobachteten Unterschiede von Nanopartikel zu Nanopartikel muß vielmehr an der Individualität jedes einzelnen Nanopartikels liegen. Dies betrifft sowohl seine geometrische Form, als auch die Funktionalisierung, die nicht für jedes Partikel exakt gleich ist. Es ist daher sinnvoll, im Experiment Nanopartikel auszuwählen, deren Streuspektren weitgehend die gleiche Resonanzposition besitzen. Berücksichtigt man, daß die hier verwendeten Nanopartikel nicht für die Verwendung als Einzelpartikel-Immunoassay optimiert wurden, ist es erstaunlich, daß sich bereits bei einer Mittelung über zwei bis drei Nanopartikel eine so aussagekräftige Standardkurve wie in Abb. 6.5 ergibt.

6.3 Nachweis niedermolekularer Analyte

Die Verschiebung der Plasmonresonanz hängt direkt vom Molekulargewicht des verwendeten Analyten ab, so daß mit dem in den letzten Unterkapiteln verwendeten Assayformat nur Analyte mit einem Molekulargewicht von über $\approx 50\,000$ D nachgewiesen werden können. Moleküle mit geringerem Molekulargewicht ändern bei der Bindung an das Nanopartikel den Brechungsindex der Umgebung nicht ausreichend.

Um wesentlich kleinere, diagnostisch aber relevante Analytmoleküle nachzuweisen, wurde daher ein kompetitives Testformat zum Nachweis von Digoxigenin-Lysin⁷ (Dig, MW: 440 D) aufgebaut und getestet.

Die molekulare Erkennung von Digoxigenin ist von besonderer medizinischer Bedeutung, da es dem in der Therapie von Herzinsuffizienz vielfach eingesetzten Digoxin stark ähnelt. Seit Anfang der neunziger Jahre wird Digoxigenin darüber hinaus zum Markieren von DNA verwendet [107].

Für den kompetitiven Test werden Gold-Nanopartikel mit Digoxigenin, also mit dem eigentlichen Analyten, funktionalisiert. Da Digoxigenin ein ähnlich geringes Molekulargewicht wie Biotin hat, kann es ebenfalls nicht direkt ohne „Abstandshalter“ auf die Oberfläche von Nanopartikeln gebunden werden. Analog zum Vorgehen bei

⁷Die einzige natürliche Quelle für Digoxigenin sind Digitalis Pflanzen („Fingerhut“, *Digitalis purpurea* und *Digitalis lanata*).

Biotin wird auch hier das Digoxigenin daher zunächst kovalent an RSA gebunden und erst anschließend zusammen mit dem RSA an das Gold-Nanopartikel geheftet.

Der Nachweis von Digoxigenin-Lysin läuft in zwei voneinander getrennten Schritten ab, die in Abb. 6.6 skizziert sind: Vor der eigentlichen Messung wird die Analyseflüssigkeit mit monoklonalen Antikörpern, die gegen Digoxigenin (Dig) gerichtet sind (MAK<Dig>), für mindestens 30 min inkubiert. Dieses Gemisch wird anschließend mit dem Einzelpartikel-Immunoassay vermessen. Befindet sich in der Probe kein Digoxigenin, binden die Antikörper an die funktionalisierte Partikeloberfläche und bewirken eine Resonanzverschiebung. Bei hohen Dig Konzentrationen werden dagegen im Vorinkubationsschritt bereits alle Bindungsstellen der Antikörper besetzt, so daß keine Bindung der MAK<Dig> an den Nanopartikelsensor mehr stattfinden kann.

Sowohl der Vorinkubationsschritt, als auch die Messungen finden in einem Phosphatpuffer gleicher Zusammensetzung (20 mM KPO₄; 70 mM NaCl; 1 mg/ml RSA; pH 7,4) statt. Dadurch ist ausgeschlossen, daß durch das bloße Mischen unterschiedlicher Puffer bei der Zugabe der Analytlösung ein Sensorsignal ausgelöst wird. Die roten Symbole in Abb. 6.7 zeigen das Ergebnis einer Messung, bei der zum Zeitpunkt $t = 0$ dem Assay nur MAK<Dig> Antikörper hinzugefügt wurden. Die Antikörper, deren Konzentration in der Meßlösung $C_{MAK} = 5,5 \cdot 10^{-7}$ mol/l beträgt, binden innerhalb weniger Minuten

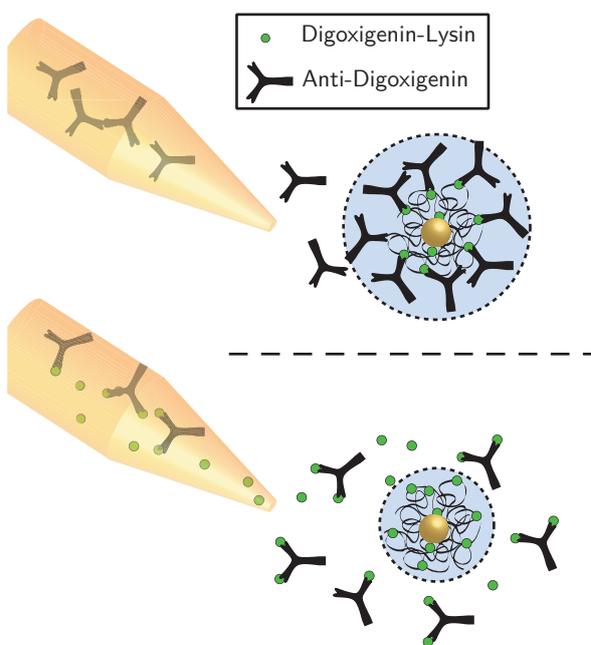


Abbildung 6.6: Prinzip des kompetitiven Tests zum Nachweis von Digoxigenin-Lysin. Die Analyseflüssigkeit wird mit einem MAK<Dig> Antikörper bekannter Konzentration vorinkubiert und anschließend vermessen. Befindet sich kein Digoxigenin in der Probe, binden die MAK<Dig> Antikörper an das Nanopartikel und bewirken eine Resonanzverschiebung. Bei einer hohen Digoxigenin-Lysin Konzentration werden die MAK<Dig> Bindungsstellen während der Inkubation belegt, so daß keine Bindung der Antikörper an das Partikel mehr stattfinden kann.

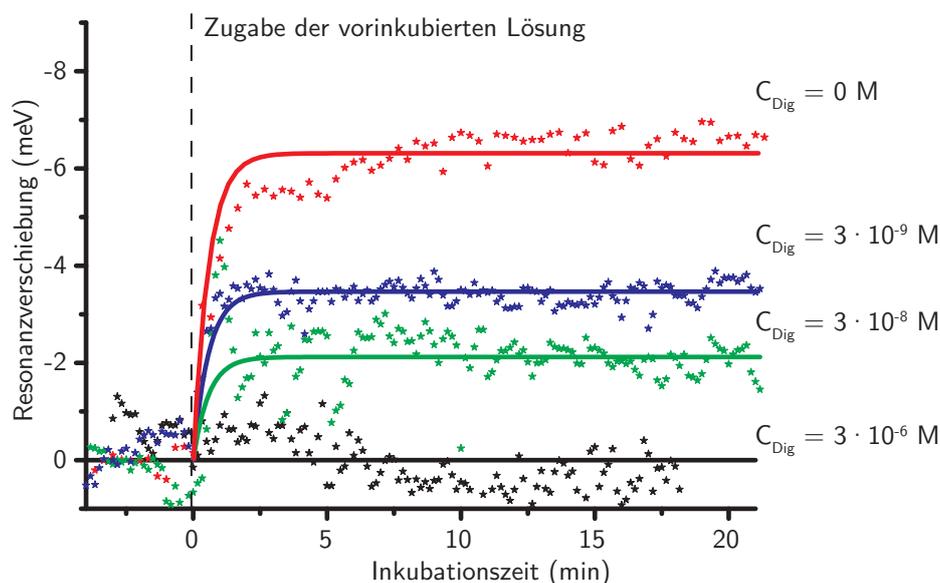


Abbildung 6.7: Resonanzverschiebung aufgetragen gegen die Meßzeit. Vor der Messung wurde die Analytlösung mit MAK<Dig> Antikörpern inkubiert. In der Meßlösung ist die MAK<Dig> Konzentration bei allen Messungen $C_{MAK} = 5,5 \cdot 10^{-7}$ mol/l, die Digoxigenin-Lysin Konzentration C_{Dig} liegt im Bereich zwischen 0 mol/l (maximales Sensorsignal) und $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l (die Bindung der Antikörper an das Partikel wird vollständig inhibiert). Die durchgezogenen Linien dienen der Verdeutlichung.

an das Nanopartikel und bewirken eine Resonanzverschiebung von $-6,3$ meV. Bei allen anderen Messungen wird jeweils eine MAK<Dig> mit einer Digoxigenin Lösung vor Zugabe zum Assay gemischt. Die Konzentrationen C_{MAK} des Antikörpers und C_{Dig} des Digoxigenins sind so gewählt, daß die Antikörperkonzentration in allen Messungen unverändert $C_{MAK} = 5,5 \cdot 10^{-7}$ mol/l beträgt. Die Konzentration des Analyten, C_{Dig} wird dagegen zwischen $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l und $3 \cdot 10^{-9}$ mol/l variiert.

Im Fall der höchsten C_{Dig} Konzentration ist keine Resonanzverschiebung bei der Zugabe mehr auszumachen (schwarze Symbole in Abb. 6.7). Das Verhältnis zwischen Antikörper und Digoxigenin beträgt in der Analyseflüssigkeit etwa 1:6, so daß alle Bindungsstellen der MAK<Dig> Moleküle belegt sind und nicht mehr an das funktionalisierte Gold-Nanopartikel binden können.

Bei niedrigeren Digoxigenin Konzentrationen beobachtet man dagegen eine zunehmende Resonanzverschiebung im Gleichgewichtszustand, die darauf zurückzuführen ist, daß nicht mehr beide Paratope des MAK<Dig> während der Vorinkubation belegt

werden.

Wie bereits diskutiert, unterliegen auch hier die im Gleichgewicht gemessenen Sensorsignale gewissen Schwankungen von Nanopartikel zu Nanopartikel. Um letztere zu kompensieren, wird in Abb. 6.8 wieder jeweils über die Resonanzverschiebungen mehrerer Nanopartikel gemittelt.

Um aus den Meßwerten eine Kalibrierkurve zu erstellen, die es erlaubt eine unbekannte Menge des Analyten quantitativ nachzuweisen, müssen die Daten mit einem geeigneten Modell interpoliert werden. Dies kann, wie im letzten Abschnitt gezeigt, prinzipiell mit einem theoretischen Modell geschehen. Der Vorteil gegenüber einer einfachen Approximation (z.B. mit einem Polynom) ist, daß die Kurvenform durch das verwendete Modell strikt vorgegeben ist. Dadurch lassen sich Meßunsicherheiten zumindest teilweise kompensieren. Gerade bei komplexeren Reaktionen ist es aber oft nicht möglich ein theoretisches Modell zu finden, das die Reaktion angemessen beschreibt [1]. Dies gilt insbesondere auch für das hier untersuchte System, da die Wechselwirkungen bei kompetitiven Tests äußerst vielschichtig sind. Eine Regression der Daten mit dem in Kap. 2.3 vorgestellten, aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleiteten, Modell ist daher nicht sinnvoll.

Ein Kompromiß ist, eine *empirisch* gefundene Kurvenform vorzugeben. Weit

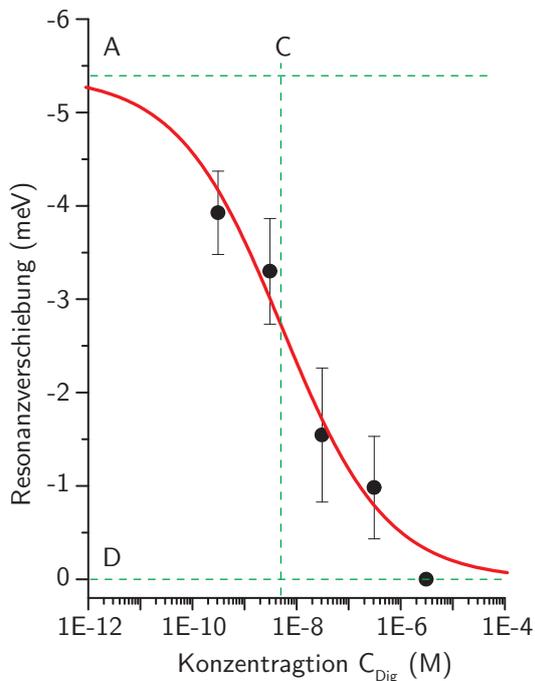


Abbildung 6.8: Kalibrierkurve des kompetitiven Dig-Tests. Wie in der Praxis häufig üblich, ist die Kalibrierkurve mit einem vier Parameter Log-Logistik Modell gefittet. Die Meßpunkte sind aus mehreren Einzelmessungen gemittelt, die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Für die vier Kalibrierparameter ergeben sich:

$$\begin{aligned}
 A &= -5,4 \text{ meV} \\
 B &= 0,43 \\
 C &= 5,3 \cdot 10^{-9} \text{ mol/l} \\
 D &= 0 \text{ meV}
 \end{aligned}$$

verbreitet zum Annähern einer Kalibrierkurve von kompetitiven Assays ist das „Vier-Parameter Log-Logistik Modell“ [1, 108, 109]:

$$y = D + \frac{A - D}{(1 + x/C)^B} \quad (6.1)$$

wobei A , B , C , und D die Kalibrierparameter sind, die aus den Kalibrationsdaten bestimmt werden müssen; y ist das Sensorsignal und x die Konzentration des Analyten. Die Bedeutung der einzelnen Parameter wird aus Abb. 6.7 deutlich: A ist das maximal erreichbare Sensorsignal; $D = 0$ ist das Sensorsignal, wenn die Bindung der MAK<Dig> Antikörper an das Gold-Nanopartikel durch eine hohe C_{Dig} Konzentration komplett inhibiert wird. Der Parameter C ist die Konzentration bei der $y = (A + D)/2$ gilt und $B(A - D)/4$ die Steigung im Punkt C . Für die Meßdaten in Abb. 6.8 ergeben sich aus der Kurven-Approximation die in der Bildunterschrift angegebenen Kalibrierparameter. Durch Umstellen der Gl. 6.1 nach x könnte nun die Konzentration von Digoxigenin in Analyselösungen unbekannter Zusammensetzung mit dem Einzelpartikel-Assay bestimmt werden.

6.4 Messungen in Blutserum

Absolute Spezifität gegenüber nur einem bestimmten Analyten kann normalerweise in keinem Immunoassay erreicht werden. Stets muß man damit rechnen, daß in den zu untersuchenden Proben außer dem Analyten noch weitere Moleküle enthalten sind, die zumindest eine geringe Affinität zu dem „Fänger-Protein“ des Assays haben [1]. Dadurch kann es in komplexen Analyselösungen, wie z.B. in Blutserum, das eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine enthält, zu falsch-positiven Testergebnissen kommen. Probate Mittel dieses zumindest teilweise zu verhindern, sind die bereits erwähnten, indirekten Sandwich-Testformate, mit denen sich aber nur Analyte mit mindestens zwei, räumlich weit genug getrennten Epitopen nachweisen lassen. Sollen Moleküle in komplexen Lösungen mit direkten Assays, wie mit dem hier vorgestellten Einzelpartikel-Immunoassay, nachgewiesen werden, muß sorgfältig untersucht werden, ob das Sensorsignal wirklich durch den Analyten ausgelöst wurde. Prinzipiell können mehrere Prozesse zu einem falsch-positiven (oder falsch-negativen) Test führen:

- Nicht ausreichende Spezifität der Antikörper, d.h. auch andere, dem Analyten ähnliche Proteine können an die Paratope der Antikörper binden (Kreuzreaktionen).
- In der Probe enthaltene Proteine adsorbieren unspezifisch z.B. an die F_C Region eines Fänger-Antikörpers.
- Falls die Sensoroberfläche nicht vollständig mit Proteinen abgesättigt ist, können dort insbesondere niedermolekulare Proteine direkt adsorbieren.

Abb. 6.9a zeigt ein falsch positives Testergebnis. Die spektroskopierten Gold-Nanopartikel sind mit einem Antikörper, der gegen den Herzinfarkt-Marker Troponin-T (Tn-T) [68, 110, 111] gerichtet ist, beschichtet (MAK<Tn-T>). Die Analytlösung besteht aus Blutserum, das Troponin-T enthält. Direkt nach Zugabe zum Assay ($t = 0$) beginnt sich die Resonanz langsam zu größeren Wellenlängen zu verschieben (blaue Symbole). Ein Kontrollexperiment, in dem ein Nanopartikel in einem Puffer mit hoher RSA Konzentration vermessen wird, zeigt kein Sensorsignal (grüne Symbole). Erst

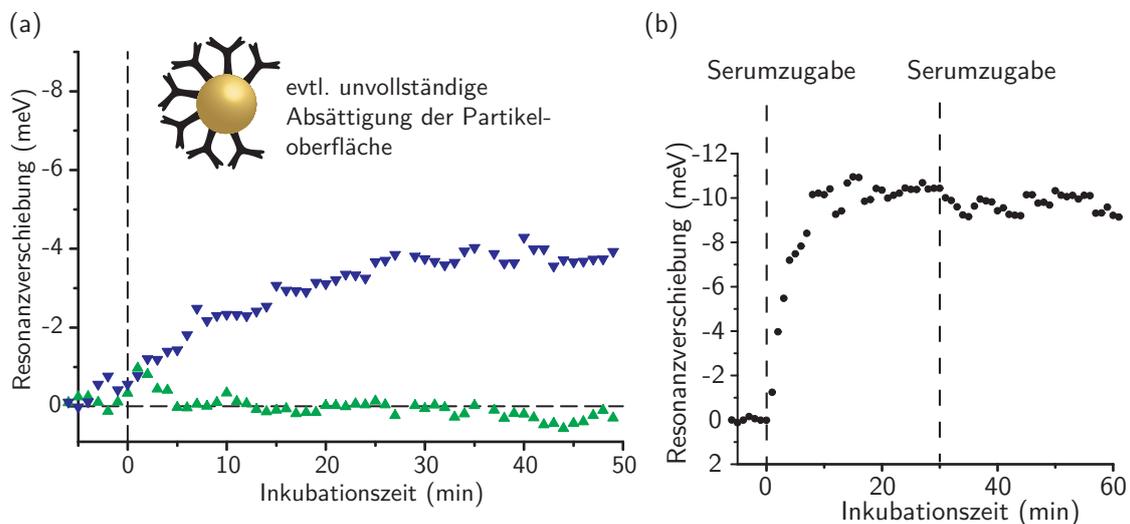


Abbildung 6.9: (a) Resonanzverschiebung nach der Zugabe von Tn-T in Humanserum zum Zeitpunkt $t = 0$ (blaue Symbole). Die Messung in einem RSA-Puffer zeigt dagegen keinerlei Signal (grüne Symbole). (b) Weitere Kontrollexperimente zeigen, daß das Sensorsignal zu einem großen Teil auf unspezifische Adsorption von Proteinen aus dem Blutserum, die vermutlich an nicht komplett mit Proteinen abgedeckte Stellen der Partikeloberfläche binden, zurückzuführen ist. Eine zweite Zugabe von Serum zum Zeitpunkt $t = 30$ min zeigt dagegen keinen Einfluß auf die Resonanzposition.

weitere, in Abb. 6.9b dargestellte, Versuche, bei denen als Analytlösung Tn-T freies Blutserum zugegeben wird, offenbaren, daß die beobachtete Verschiebung größtenteils Teil auf unspezifische Adsorptionen zurückzuführen ist. Eine Möglichkeit, dieser Komplikation aus dem Weg zu gehen, könnte es sein, die Gold-Nanopartikel von vornherein ($t < 0$), statt in einem Meßpuffer, in Blutserum zu vermessen. So zeigt Abb. 6.9b, daß eine weitere Zugabe von Blutserum zu einem späteren Zeitpunkt die Resonanzposition nicht weiter verändert.

Messungen in Humanserum stellen aber auch aus einem weiteren Grund eine besondere Herausforderung dar: Die optische Detektion von Partikelplasmonen wird durch streuende Schwebeteilchen (Verklumpungen aufgrund der Blutgerinnung) im Serum überlagert. Eine einfache Methode, dennoch ein stabiles Meßsignal zu erhalten, wäre es, auf die kontinuierliche Bestimmung der Resonanzlage des Partikelplasmons zu verzichten und Waschschritte mit Pufferlösung vor der Detektion durchzuführen. Abb. 6.10 zeigt aber, daß es durch Optimieren der Anregung und eine unkomplizierte Probenaufbereitung möglich ist, Nanopartikel direkt im Serum zu vermessen. Alle Fotografien zeigen Gold-Nanopartikel mit 80 nm Durchmesser in Blutserum. Das linke Bild

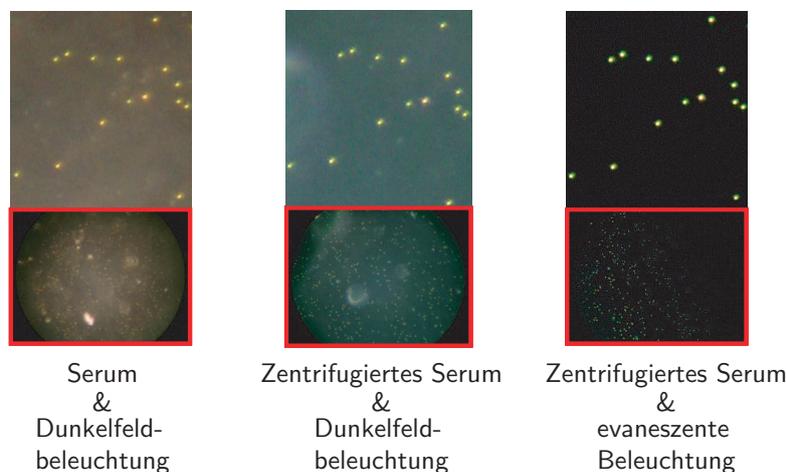


Abbildung 6.10: Einzelpartikel-Spektroskopie in Blutserum. Die unteren Fotografien zeigen jeweils ein Übersichtsbild, oberhalb ist eine Ausschnittsvergrößerung gezeigt. **Links:** Gold-Nanopartikel in Blutserum. Durch die Blutgerinnung entstehen im Serum bereits nach kurzer Aufbewahrungszeit kleine Klümpchen, oder Glots. Diese streuen das bei der Anregung mit einem Dunkelfeldkondensator die Probe durchdringende Licht so stark, daß eine zuverlässige Messung nicht möglich ist. **Mitte:** Werden die Glots abzentrifugiert, ist der Hintergrund bereits wesentlich gleichmäßiger. **Rechts:** Durch eine Modifikation am Dunkelfeldkondensator ist es möglich, die Nanopartikel sehr effizient mit einer evaneszenten Welle anzuregen.

zeigt die Ausgangssituation: Das Streulicht größerer, sich bewegender Schwebeteilchen überlagert das Signal einzelner Nanopartikel und verhindert dadurch eine zuverlässige Messung des Resonanzspektrums. Durch zentrifugieren des Blutserums lassen sich die größeren Schwebeteilchen entfernen, so daß das Hintergrundsignal zwar immer noch hoch, aber bereits wesentlich gleichmäßiger ist (mittlere Fotografie). Optimale Meßbedingungen zeigt die rechte Fotografie, bei der der Dunkelfeldkondensor durch Anbringen einer zusätzlichen Blende so modifiziert wurde, daß die Nanopartikel nur noch durch eine evaneszente Welle beleuchtet werden. Die Probenlösung wird daher nicht mehr durchleuchtet und kann dementsprechend auch kein Anregelicht mehr streuen. Eine weitere Verbesserung ließe sich durch die Verwendung von Nanopartikeln erzielen, deren Plasmonresonanz im roten Spektralbereich liegt. Auf diesen Punkt wird unter anderem im folgenden Kapitel genauer eingegangen.

7 Optische Eigenschaften einzelner Gold-Nanoschalen

Ein entscheidender Faktor für die Verwendbarkeit von Immunoassays in kommerziellen Produkten ist die Sensitivität. In Kap. 3.3.2 wurde bereits auf die Vorteile eingegangen, die die Verwendung einer Gold-Nanoschale statt einer soliden Gold-Nanokugel als Einzelpartikel-Sensor haben könnte.

Um dies experimentell an einzelnen Nanoschalen zu verifizieren, werden Gold-Nanoschalen, wie in Kap. 5.3 beschrieben, im institutseigenen Labor von A. Sussha synthetisiert. Mit der dabei verwendeten $\text{HAuCl}_4 - \text{Na}_2\text{S}$ Reaktion ist es prinzipiell möglich, größere Mengen von Nanopartikeln herzustellen, wie sie für die Funktionalisierung mit Proteinen benötigt werden. Allerdings sind die genauen Reaktionsmechanismen bisher nicht bekannt und zum Teil auch umstritten. So berichtet Norman et al. [94], daß nicht Gold-Nanoschalen das Endprodukt der Reaktion und die Ursache der optischen Spektren seien, sondern Aggregate aus Nanopartikeln. Tatsächlich zeigen auch die in dieser Arbeit aufgenommenen TEM Aufnahmen einzelne kleine Kolloide (5 nm - 10 nm) und aus diesen bestehende Cluster (siehe Abb. 5.4). In den TEM-Bildern ist aber zugleich ein substantieller Anteil größerer (35 nm - 40 nm) sphärischer Nanopartikel mit kristalliner Oberfläche zu sehen, bei denen davon ausgegangen wird, daß sie $\text{Au}_2\text{S}/\text{Au}$ Kern/Schale-Strukturen sind [64, 65, 89–93, 112–114].

Die Untersuchungen in dieser Arbeit können einen wichtigen Beitrag zur Diskussion um die $\text{HAuCl}_4 - \text{Na}_2\text{S}$ Reaktion leisten: Da in Ensemblemessungen stets inhomogen verbreiterte Spektren gemessen werden, lassen sich hieraus keine belastbaren Aussagen über die individuellen Partikelformen machen. In Einzelpartikel-Messungen entfällt dagegen jegliche Mittelung über die Eigenschaften mehrerer Nanopartikel [15, 51, 52], so daß sich aus dem Streuspektrum eines einzelnen Partikels auf die Partikelform zurückschließen läßt: So beobachtet man z.B. für ellipsoidale Nanopartikel zwei Resonanzmaxima (entsprechend der kollektiven Elektronenschwingung entlang der kurzen und der langen Partikelachse) [15, 115], und vor kurzem gelang sogar die

dreidimensionale optische „Tomographie“ eines einzelnen Gold-Nanopartikels [116]. Das Streuspektrum sphärisch symmetrischer Nanopartikel zeigt dagegen nur ein (entartetes) Resonanzmaximum und keine Polarisationsabhängigkeit.

In den folgenden Untersuchungen werden daher nur Nanopartikel berücksichtigt, deren Resonanzposition und Linienbreite nahezu polarisationsunabhängig ist (siehe Abb. 7.1). Man kann deshalb davon ausgehen, daß das jeweils beobachtete Nanopartikel sphärisch symmetrisch aufgebaut ist. Zusätzlich läßt sich eine schmale Linienbreite beobachten, die unterhalb von 200 meV liegt. Sicherlich sind weitergehende chemische und physikalische Untersuchungen nötig und wünschenswert, um die $\text{HAuCl}_4 - \text{Na}_2\text{S}$ Reaktion vollständig zu verstehen. Die beiden genannten Argumente, die Polarisationsunabhängigkeit der Streuspektren und die geringe Linienbreite, machen es zusammengenommen aber sehr unwahrscheinlich, daß die gemessenen Spektren von Aggregaten aus Nanopartikeln stammen, zumal sich alle beobachteten Eigenschaften hervorragend mit der Mie-Theorie reproduzieren lassen.

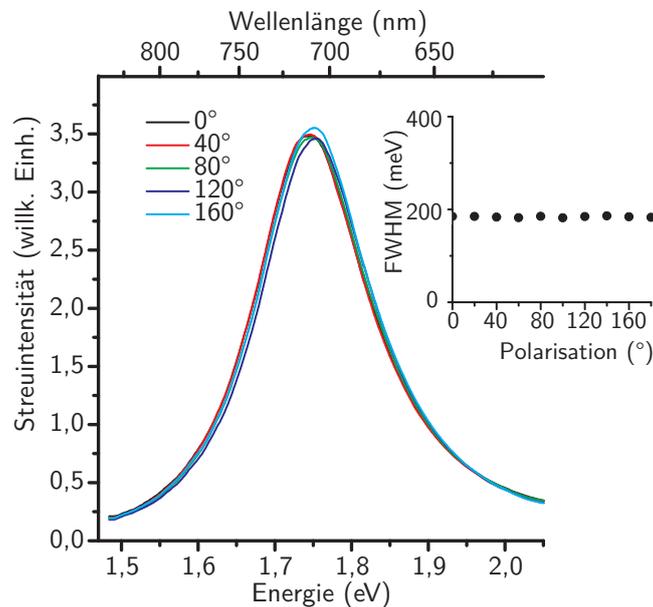


Abbildung 7.1: Polarisationsabhängige Messungen des Streuspektrums einer einzelnen Nanoschale zeigen nur geringe Abhängigkeit vom Polarisationswinkel. Daraus läßt sich schließen, daß das untersuchte Partikel eine symmetrische Form besitzt. Das kleine Bild zeigt die Linienbreite einer Gold-Nanoschale in Abhängigkeit des Polarisationswinkels. Die Linienbreite beträgt konstant 185 meV.

7.1 Homogene Linienbreite

Die homogene Linienbreite der Plasmonresonanz von Gold-Nanoschalen wurde bisher ausschließlich aus Ensemble-Messungen abgeschätzt [91]. Dabei tritt zwangsläufig die Schwierigkeit auf, daß sich die an einem Ensemble gemessene Linienbreite nicht nur aus (i) intrinsischen Dämpfungsprozessen, wie der Strahlungsdämpfung und der Intra- bzw. Interband-Dämpfung, sowie der (ii) Oberflächendämpfung¹ zusammensetzt, sondern auch von (iii) inhomogenen Verbreiterungen aufgrund verschiedener Partikelgrößen und Formen herrührt.

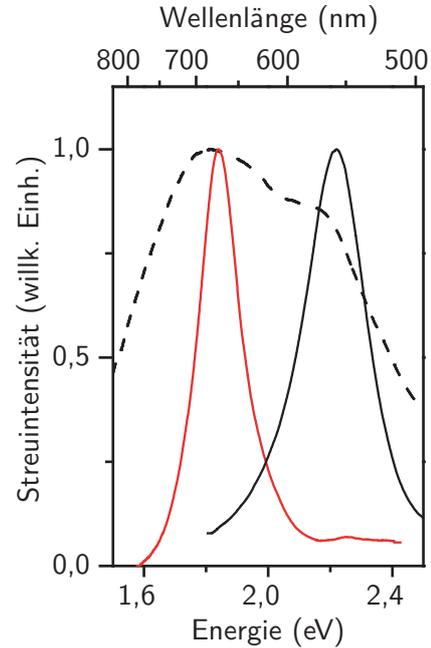
Während Rechnungen nach der Mie-Theorie intrinsische Dämpfungsprozesse (i) vollständig berücksichtigen, sofern darin experimentell ermittelte dielektrische Funktionen verwendet werden [15, 117], sind die Effekte (ii) und (iii) in Ensemble-Messungen kaum zu quantifizieren. Die einzige Möglichkeit besteht darin, die inhomogene Verbreiterung durch Messen der Größenverteilung der Nanopartikel abzuschätzen. So findet Averitt et al. eine homogene Linienbreite von 420 meV und bestimmt anschließend daraus den Beitrag der Oberflächendämpfung (ii) [91].

In Einzelpartikelmessungen entfällt dagegen jede Ensemble-Mittlung, so daß es möglich ist, den Anteil der Oberflächendämpfung zur gesamten Linienbreite von Gold-Nanopartikeln wesentlich präziser zu bestimmen [15]. Dazu werden die Nanopartikel auf Deckgläschen aufgebracht und im Dunkelfeldmikroskop einzeln vermessen. Um einen einheitlichen Brechungsindex in der Partikelumgebung sicherzustellen, bettet man die Partikel in eine Schicht Immersionsöl ($n = 1,518$) ein.

Abb. 7.2 zeigt zum Vergleich gemessene, auf die gleiche Intensität normierte Streuspektren von drei unterschiedlichen Nanopartikeln: Das Streuspektrum von zwei soliden Gold-Nanopartikeln mit 40 nm bzw. 150 nm Durchmesser (durchgehende bzw. gestrichelte schwarze Kurve) und das einer Au₂S/Au Nanoschale mit einem Außendurchmesser von etwa 35 nm - 40 nm (rote Kurve). Die Linienbreite (FWHM) des kleineren soliden Gold-Nanopartikels beträgt 250 meV und das Maximum der Streuintensität liegt bei 2,22 eV, also weit außerhalb des biologischen Fensters, in dem die Absorption von Blut und Wasser minimal ist (siehe Kap. 3.3.2). Mit zunehmendem Partikelradius verschiebt sich das Streuspektrum zu größeren Wellenlängen, zugleich vergrößert sich aber auch die homogene Linienbreite dramatisch. Dies ist zum

¹Unter dem Begriff „Oberflächendämpfung“ sind hier alle Prozesse, die von der Partikelgröße abhängen, subsumiert.

Abbildung 7.2: Gemessene Streuspektren von drei einzelnen Nanopartikeln. Das Plasmon des Kern/Schale Partikels besitzt eine Resonanzenergie von 1,84 eV und eine homogene Linienbreite von 180 meV (rote Kurve). Die schwarze Meßkurve zeigt das Streuspektrum einer soliden Gold-Nanokugel mit 40 nm Durchmesser. Die Resonanzposition liegt bei 2,22 eV und damit deutlich außerhalb des „biologischen Fensters“. Das gestrichelte Spektrum stammt von einer Nanokugel mit 150 nm Durchmesser. Das Resonanzmaximum liegt zwar im Roten, die Linienbreite ist aber mit 880 meV so groß, daß die exakte Resonanzposition nur schwer zu bestimmen ist.



einen auf die wachsende Strahlungsdämpfung und zum anderen auf den stark wachsenden Quadrupolbeitrag zum Streuspektrum zurückzuführen. Konkret ergibt sich für das Streuspektrum des 150 nm großen Nanopartikels eine homogene Linienbreite von 880 meV bei einer Resonanzenergie von 1,82 eV. Letztere ist vergleichbar mit der Resonanzposition des Au₂S/Au Nanopartikels, die bei 1,84 eV liegt. Deutlich unterschiedlich ist dagegen die Linienbreite, die für die gezeigte Nanoschale nur $\Gamma_{Shell} = 180$ meV beträgt. Sie ist damit sogar geringer als die FWHM der soliden Nanokugel mit 40 nm Durchmesser. Die Ursache ist, genauso wie bei stäbchenförmigen Nanopartikeln, eine reduzierte Interband- und Strahlungsdämpfung [15]. Letztere resultiert aus dem geringeren Goldvolumen der Nanoschale; die verminderte Interbanddämpfung ist darauf zurückzuführen, daß die Resonanzenergie kleiner ist, als die Energie, die zur Anregung des Interbandübergangs bei $\approx 2,4$ eV [11] in Gold nötig wäre.

Die gemessene Linienbreite $\Gamma_{Shell} = 180$ meV ist wesentlich kleiner als die aus Ensemblemessungen bestimmte homogene Linienbreite von $\Gamma_{Ens} \approx 420$ meV [91]. Dies spricht dafür, daß die inhomogene Verbreiterung bisher deutlich unterschätzt, die Oberflächendämpfung dagegen überschätzt wurde. Dieser Umstand soll nun detailliert betrachtet werden.

Die dreieckigen Symbole in Abb. 7.3 zeigen die experimentell bestimmten homogenen Linienbreiten Γ_{hom} einzelner Gold-Nanoschalen, aufgetragen gegen die Resonanzenergie

E_{Res} . Die verschiedenen Resonanzpositionen können sowohl durch unterschiedliche Partikeldurchmesser, als auch durch andere Dickenverhältnisse von Kern und Schale verursacht werden. Um den Anteil der Oberflächendämpfung an der homogenen Linienbreite zu bestimmen, werden die Meßdaten mit Rechnungen nach der Mie-Theorie verglichen. Die Nanoschale wird dazu mit dem Kerndurchmesser D_C , der von einer Goldhülle mit der Dicke d_S umgeben ist modelliert. Die Dielektrizitätskonstante des Kerns beträgt $\epsilon_{Core} = 5,4$ [65]. Für Gold wird wieder ein Kurvenfit der dielektrischen Funktion nach Johnson und Christy verwendet [13] und für das Öl in der Partikelumgebung gilt $\epsilon_{Host} = 2,3$. Die Größenabhängigkeit der dielektrischen Funktion wird, wie in Kap. 2.1.3 beschrieben, durch einen zusätzlichen Dämpfungsterm der Form $\Gamma_S(r) = Av_F/r$ berücksichtigt. Als charakteristische Länge r wird dabei die Schalendicke d_S eingesetzt. Dies entspricht dem Vorgehen bei dünnen Metallfilmen, für die ebenfalls eine reziproke Abhängigkeit der Oberflächendämpfung von der Filmdicke und ein ähnlicher Oberflächendämpfungs-Parameter A wie für Gold-Nanokugeln beobachtet wird [118–120].

In Abb. 7.3 sind die Ergebnisse der Mie-Rechnungen für drei verschiedene Oberflächendämpfungs-Parameter A gezeigt ($A = 0$ bedeutet keine Oberflächendämpfung). Die schwarzen Kurven sind nach dem von Averitt et al. [65] veröffentlichten Wachstumsmodell für $\text{Au}_2\text{S}/\text{Au}$ Nanoschalen berechnet, in dem von einem fixen Kerndurchmesser von 15 nm mit wachsender Dicke der Goldschicht ausgegangen wird. Die

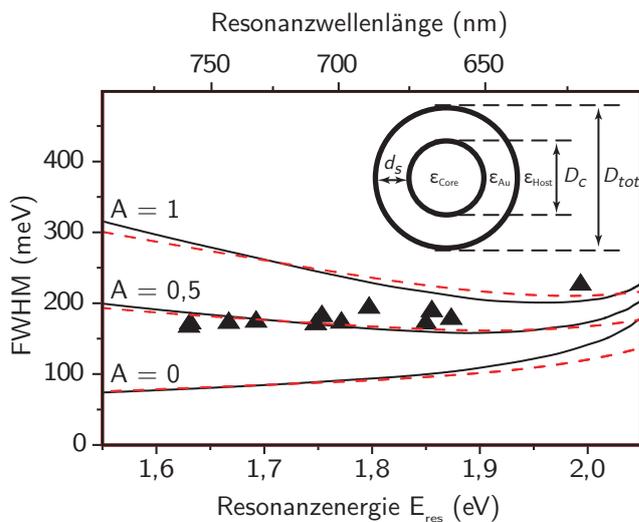


Abbildung 7.3: Gemessene Resonanzlinienbreiten einzelner Gold-Nanoschalen, aufgetragen gegen die Resonanzenergie (dreieckige Symbole). Die schwarzen und roten Linien sind Rechnungen nach der Mie-Theorie (Anhang A) für einen konstanten Kerndurchmesser D_C mit wachsender Golddicke d_S bzw. für einen konstanten Außendurchmesser D_{tot} und veränderlichem Aspektverhältnis $(\frac{1}{2} D_C)/d_S$. Die Rechnungen wurden für drei verschiedene Oberflächenstreuparameter ($A = 0$; $A = 0,5$; $A = 1,0$) durchgeführt. Das kleine Bild zeigt schematisch den Aufbau einer Gold-Nanoschale mit dem Außendurchmesser D_{tot} , dem Kerndurchmesser D_C und der Schalendicke d_S .

roten Kurven ergeben sich dagegen unter der Annahme, daß der Außendurchmesser der Nanoschale $D_{tot} = (D_C + 2d_S) = 40$ nm konstant bleibt und sich nur das Verhältnis $(\frac{1}{2} D_C) / d_S$ ändert.

Die beste Übereinstimmung mit den Meßdaten ergibt sich für $A = 0,5$. Dieser Wert ist wesentlich kleiner als die bisher aus Ensemble-Messungen bestimmten Werte für Gold-Nanoschalen, die zwischen $A = 1$ [65, 65] und $A = 2 - 3$ [93] liegen. Dies bestätigt die obige Vermutung, daß die in Ensemble-Messungen auftretende inhomogene Verbreiterung bisher unterschätzt wurde: Zwar läßt sich die Größenverteilung des Außendurchmessers der Partikel mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie bestimmen, das Dickenverhältnis von Kern und Schale ist aber nicht zugänglich.

7.2 Molekulare Erkennung

Die schmale homogene Linienbreite von Gold-Nanoschalen ist ein großer Pluspunkt in Sensoranwendungen. Ein weiterer Vorzug von Gold-Nanoschalen ist die höhere Sensitivität auf Brechungsindexänderungen, die in Ensemble-Messungen an hohlen Gold-Nanoschalen [121] und jüngst auch an Filmen aus SiO_2/Au Nanoschalen gezeigt wurde [122].

Um die Sensitivität einzelner Gold-Nanoschalen bei Brechungsindexänderungen der Partikelumgebung zu untersuchen, wird die Resonanzenergie von einzelnen Nanoschalen und soliden Nanokugeln in Lösungen mit unterschiedlichem Brechungsindex bestimmt.

Zunächst wird jeweils eine Nanokugel und eine Nanoschale an Luft ($n = 1,0$) spektroskopiert. Anschließend werden die Streuspektren derselben Partikel nochmals in Immersionsöl ($n = 1,5$) gemessen. In Abb. 7.4a sind die entsprechenden Streuspektren für eine 40 nm große solide Nanokugel [88] (schwarze und rote Kurve) und eine Nanoschale (grüne und blaue Kurve) dargestellt. Die Resonanzposition der Nanoschale verschiebt sich durch die Erhöhung des Brechungsindex ($\Delta n = 0,5$) um 173 meV; für das solide Nanopartikel ergibt sich eine Verschiebung von nur 87 meV. Bezieht man die Verschiebung auf die Halbwertsbreite der Streuspektren an Luft, um der einfacheren Bestimmung der Resonanzenergie bei schmalen Linienbreiten Rechnung zu tragen, ergibt sich für die Nanoschale eine Verschiebung um 76 %. Die Sensitivität ist damit

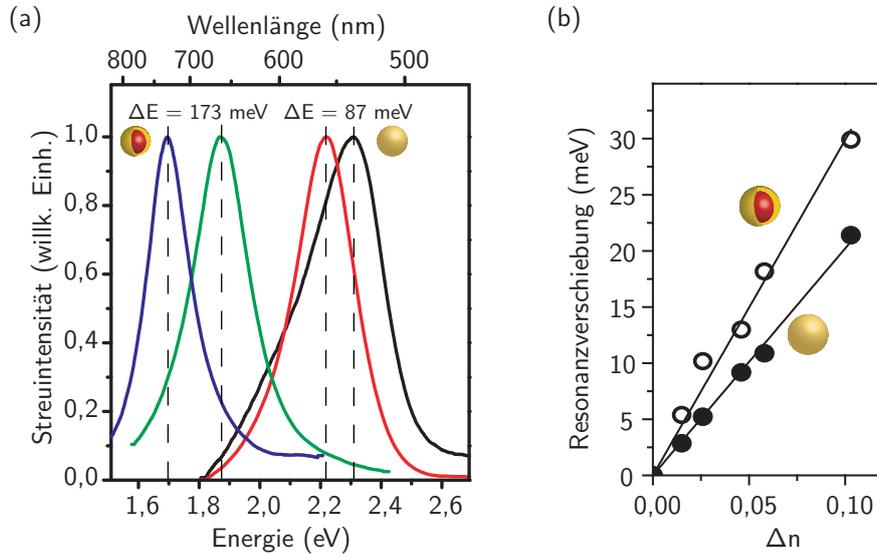


Abbildung 7.4: (a) Eine Brechungsindexänderung um $\Delta n = 0,5$ verschiebt das Resonanzmaximum einer Gold-Nanoschale um 76 % der homogenen Linienbreite (grüne und blaue Linie). Bei einer soliden Nanokugel, die in etwa den gleichen Außendurchmesser hat, beobachtet man nur eine Verschiebung um 28 % (schwarze und rote Linie). (b) Absolutwert der Resonanzverschiebung der Streuspektren von Gold-Nanokugeln und Nanoschalen, aufgetragen gegen die Brechungsindexänderung der Umgebung. Die Linien sind Regressionsgeraden an die Meßwerte.

fast dreimal höher als bei dem soliden Nanopartikel, für das sich eine Verschiebung von nur 28 % ergibt.

Um die Sensitivitäten von Nanoschalen und Nanokugeln bei kleineren Brechungsindexänderungen zu vergleichen, werden die Partikel in einer wässrigen Umgebung vermessen. Zur graduellen Variation des Brechungsindex wässriger Lösungen hat sich die Zugabe von Zucker (Saccharose) bewährt [12]. Der Brechungsindex der verwendeten Zuckerlösungen liegt im Bereich von 1,33 (Zuckeranteil 0 %) und 1,44 (Zuckeranteil 58 %) und wird vor den Messungen mit einem Abbe-Refraktometer bestimmt. Abb. 7.4b zeigt die Rotverschiebung des Partikelplasmons, aufgetragen gegen die Brechungsindexänderung der Umgebung. Die ungefüllten Kreise sind die Absolutwerte der Resonanzverschiebung für Gold-Nanoschalen, die gefüllten Kreise sind die Daten für solide Gold-Nanokugeln. Jeder Datenpunkt ist über mehrere Einzelpartikel-Messungen gemittelt. Für die Steigungen der Regressionsgeraden erhält man 3,3 meV pro Änderung des Brechungsindex um $\Delta n = 0,01$ für Nanoschalen, bzw. 2,0 meV/0,01 für Nanokugeln. Rechnungen nach der Mie-Theorie sagen etwa 25 % höhere Verschiebungen voraus, die sich daraus erklären lassen, daß in den Rechnungen das Glassubstrat

($n = 1, 5$) auf dem die Partikel liegen nicht berücksichtigt wird [122, 123].

Die bisherigen Ausführungen beziehen sich auf Brechungsindexänderungen der gesamten Partikelumgebung. Im folgenden wird gezeigt, daß sich Gold-Nanoschalen auch zur Detektion von Molekülen eignen, die nur lokal an der Partikeloberfläche den Brechungsindex ändern. Abb. 7.5 zeigt den Absolutwert der Resonanzverschiebung, gegen die Zeit aufgetragen. Zum Zeitpunkt $t = 100$ s wird der wäßrigen Lösung $50 \mu\text{l}$ 16-Mercaptohexadecansäure (MHA; $\text{HS} - (\text{CH})_{15} - \text{COOH}$) zugegeben, so daß sich in der Lösung eine MHA Konzentration von $2,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$ einstellt. Direkt nach der Zugabe beginnen die Kohlenstoffketten an die Goldoberfläche zu binden und dort eine Monolage zu bilden. Durch die damit verbundene Brechungsindexänderung verschiebt sich die Resonanzposition. Nach ≈ 800 s wird eine maximale Verschiebung von 19 meV erreicht. Zum Vergleich wird die Resonanzverschiebung wieder mit der Mie-Theorie berechnet. Dabei werden der Kerndurchmesser und die Schalendicke so gewählt, daß das Resonanzmaximum der berechneten Spektren gut mit dem der vermessenen Nanoschale übereinstimmt ($D_C = 15 \text{ nm}$, $d_S = 4,7 \text{ nm}$, $E_{Res} = 1,75 \text{ eV}$). Für MHA wird eine, mit einem SPR-Sensor bestimmte, Länge von $2,75 \text{ nm}$ und ein Brechungsindex von $n = 1,463$ angenommen [100]. Man erhält dann eine Verschiebung der Resonanz um 16 meV , also weniger als experimentell beobachtet. Ähnliche Abweichungen werden auch in Ensemble-Messungen an Gold-Nanoschalen beobachtet,

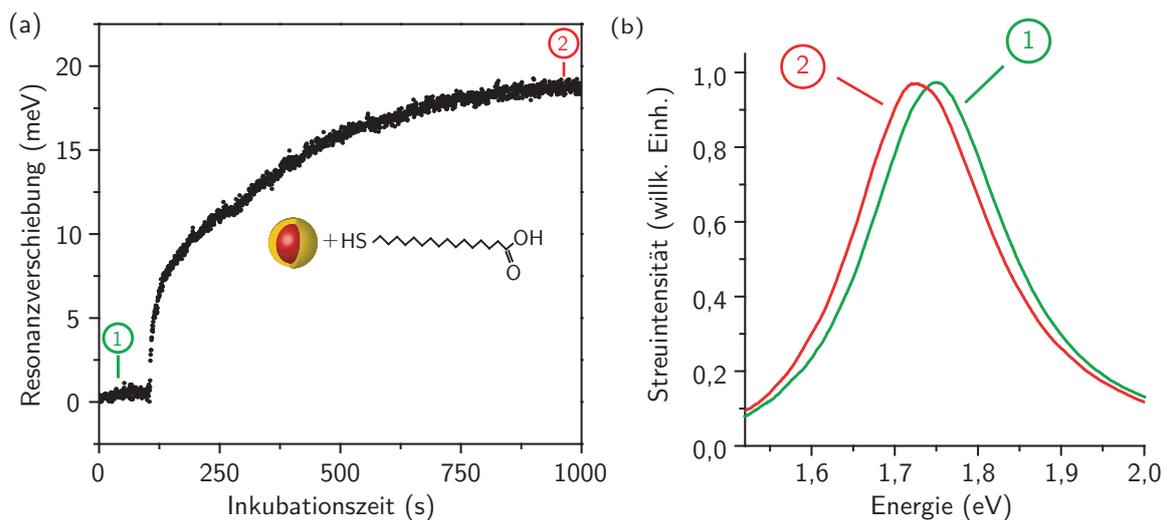


Abbildung 7.5: (a) Bindung von MHA an Gold-Nanoschalen. (b) Streuspektren der Gold-Nanoschale aus (a), die zu den markierten Zeiten gemessen wurden.

in denen sich die Extinktionsspektren bei einer Erhöhung des Brechungsindex der Partikelumgebung ebenfalls stärker ins Rote verschieben, als man es nach der Mie-Theorie erwartet [121]. Ohne die genaue Morphologie an der Partikeloberfläche nach dem Binden der Kohlenstoffketten zu kennen, läßt sich über die Gründe für die Abweichung nur spekulieren. So spielt eventuell die Elektronendichte, die auch einen Einfluß auf die Resonanzposition hat,² in der Goldhülle eine Rolle. Es gibt allerdings experimentelle Hinweise darauf, daß bei der Bindung einer Thiolgruppe an Gold Elektronen auf das Partikel übertragen und nicht entfernt werden [124]. Eine Erhöhung der Elektronendichte führt aber zu einer Blau- und nicht zu einer Rotverschiebung der Resonanzenergie [125].

Eine mögliche Erklärung wäre dagegen, daß durch das Anbinden der Schwefel- an die Gold-Nanopartikel eine atomar dünne Goldschicht ($\approx 0,25$ nm, die Gitterkonstante von Gold) ihren metallischen Charakter verliert. Die Dicke d_G der Goldhülle würde sich verringern und zu einer zusätzlichen Resonanzverschiebung ins Rote führen [121, 124].

Zusammenfassend kann man feststellen, daß Gold-Nanoschalen in Sensoranwendungen soliden Nanokugeln in dreierlei Hinsicht überlegen sind:

- Die Resonanzenergie liegt im „biologischen Fenster“.
- Die Resonanzverschiebung bei Brechungsindexänderungen vergrößert sich.
- Die Halbwertsbreite des Streuspektrums ist kleiner, wodurch sich die Resonanzenergie leichter bestimmen läßt.

²Die Elektronendichte geht direkt in die Plasmafrequenz ein.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuartiges Nachweisverfahren für Biomoleküle entwickelt, das auf der Spektroskopie einzelner Gold-Nanopartikel basiert. Das Streuspektrum von Edelmetall-Nanopartikeln weist eine ausgeprägte Resonanz im sichtbaren Spektralbereich auf, die ausgesprochen sensitiv von den dielektrischen Eigenschaften der Partikelumgebung abhängt. Molekulare Bindungsereignisse in der Nähe der Partikeloberfläche ändern diese Umgebung und können deswegen über eine Verschiebung der Resonanzlage des Streuspektrums detektiert werden. Die Spektroskopie *einzelner* Nanopartikel hat wesentliche Vorteile gegenüber Messungen an einem Ensemble von Partikeln. So wird durch die Messung der homogenen Linienbreite die Detektion kleiner Resonanzverschiebungen wesentlich erleichtert. Die geringen Abmessungen eines einzelnen Nanopartikels erlauben prinzipiell eine Miniaturisierung und damit eine hohe Integrationsdichte auf Biochips.

Für die Spektroskopie einzelner Gold-Nanopartikel wird ein Dunkelfeld-Aufbau verwendet, der ähnlich wie in der Einzelmolekülspektroskopie eine nahezu hintergrundfreie Detektion des Streulichts ermöglicht. Die Probe wird dabei von der Rückseite mit einem Dunkelfeldkondensor unter so flachen Winkeln mit Weißlicht beleuchtet, daß ein gegenüber angeordnetes Objektiv nur das Streulicht einzelner Nanopartikel aufsammelt. Anschließend wird das Streulicht mit einem Gitterspektrometer, an das eine CCD-Kamera angekoppelt ist, spektral aufgelöst. Dies erlaubt eine präzise Bestimmung der Resonanzenergie eines einzelnen Nanopartikels innerhalb weniger Sekunden Meßdauer.

Modellrechnungen mit der auf Schalenpartikel erweiterten Mie-Theorie lassen bei der Bindung von Proteinen an ein funktionalisiertes Gold-Nanopartikel eine Rotverschiebung des Partikelplasmons in der Größenordnung von 10 meV erwarten. Dies konnte zunächst am Beispiel von Streptavidin-Proteinen, die an ein mit Biotin funktionalisiertes Gold-Nanopartikel binden, verifiziert werden. Dabei konnte gezeigt werden, daß Einzelpartikel-Assays äußerst sensitiv sind und sich mit ihnen weniger

als 100 molekulare Bindungsereignisse nachweisen lassen.

Ebenso gelang es, mit einem Einzelpartikel-Immunoassay Streptavidin Antikörper zu detektieren und einen kompetitiven Test aufzubauen, der es ermöglicht niedermolekulare Analyte zu detektieren. So konnte erfolgreich das Protein Digoxigenin-Lysin, das ein Molekulargewicht von nur 440 D hat, erkannt werden.

In der klinischen Diagnostik ist es wünschenswert Analytmoleküle direkt im Blutserum nachzuweisen, damit auf eine aufwendige Probenpräparation verzichtet werden kann. Trotz der großen Anzahl an Streuzentren die im Blutserum vorhanden sind, konnte gezeigt werden, daß sich einzelne Gold-Nanopartikel zuverlässig im Serum spektroskopieren lassen. Dazu wurden die Nanopartikel mit einer evaneszenten Welle, statt mit der Dunkelfeld-Methode anregt. Wie bei anderen direkten Immunoassays auch, besteht bei der Messung im Serum jedoch die Gefahr, daß unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen aus dem Serum ein falsch-positives Sensorsignal auslösen.

Ferner wurden die optischen Eigenschaften von Gold-Nanoschalen hinsichtlich ihrer Eignung als Sensoren untersucht. Insbesondere konnte dabei durch die Spektroskopie einzelner Gold-Nanoschalen erstmals die homogene Linienbreite der Plasmonresonanz direkt gemessen werden. Dabei zeigte sich, daß die homogene Linienbreite wesentlich schmaler ist, als bisher in der Literatur angenommen wurde und statt über 400 meV nur 180 meV beträgt. Damit ist sie deutlich kleiner, als die Linienbreite einer soliden Gold-Nanokugel mit vergleichbarer Resonanzwellenlänge (≈ 880 meV). Untersuchungen in wäßrigen Umgebungen mit unterschiedlichem Brechungsindex bestätigen ferner die theoretische Vorhersage, daß die spektrale Position der Plasmonresonanz von Gold-Nanoschalen empfindlicher vom Brechungsindex abhängt, als diejenige solider Gold-Nanokugeln mit gleichem Partikeldurchmesser. Als weiterer Vorteil von Gold-Nanoschalen ist zu sehen, daß die Resonanzenergie innerhalb des „biologischen Fensters“ liegt, in dem die Absorption von Blut und Wasser gering ist.

Abb. 8.1 zeigt zwei Perspektiven für zukünftige Entwicklungen. So sollte es möglich sein, Nanopartikel mit unterschiedlicher spektraler Charakteristik gleichzeitig zu vermessen. Falls diese Nanopartikel unterschiedlich funktionalisiert sind, ließe sich mit einer einzigen Messung eine Analyseflüssigkeit auf das Vorhandensein mehrerer Analyte testen. Ein besonders interessanter Aspekt ist, daß der Partikelabstand dabei kleiner sein kann als die beugungsbegrenzte Auflösung des Detektors. Eine andere Möglichkeit, die sich für die Integration auf Biochips besonders eignet, ist es,

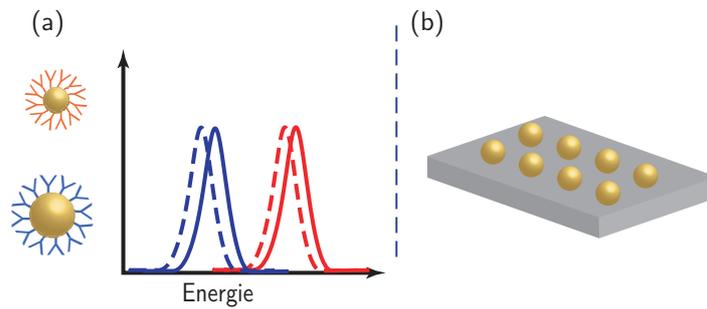


Abbildung 8.1: Parallelisierung von Einzelpartikel-Immunoassays. **(a)** Durch die Verwendung von Nanopartikeln mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften und verschiedener Funktionalisierung ließe sich eine Lösung gleichzeitig auf das Vorhandensein mehrerer Analyte testen. **(b)** Eine Parallelisierung ist auch denkbar, wenn der Assay lithographisch hergestellt wird.

Nanopartikel lithographisch auf einem Substrat herzustellen. Dies würde es erlauben Strukturen mit idealen spektralen Eigenschaften, wie z.B. schmalen Linienbreiten und Resonanzpositionen im biologischen Fenster, zu verwirklichen. Da Einzelpartikel-Assays nur geringe Mengen eines Analyten benötigen, bieten sie sich ferner nicht nur als Sensoren zum Nachweis von Proteinen, sondern auch zur Detektion von DNA-Sequenzen ohne vorherigen Amplifizierungsschritt an.

A Erweiterung der Mie-Theorie auf Schalenpartikel

Die in Kap. 2.1.4 vorgestellte Mie-Theorie läßt sich auf konzentrische, sphärische Schalenstrukturen, wie sie in Abb. A.1 skizziert sind, erweitern. Dazu werden die Streukoeffizienten iterativ für den Lichtdurchtritt von Schale zu Schale ermittelt. In den Veröffentlichungen von Sinzig et al. [126, 127] wird eine Rekursionsformel für eine beliebige Anzahl an Schalen um einen Kern mit beliebiger dielektrischer Funktion entwickelt. Für ein Partikel, das aus r Schalen besteht, werden die Mie-Koeffizienten aus Gl. (2.7) durch folgende Ausdrücke ersetzt:¹

¹Um eine einheitliche Definition des Extinktionsquerschnitts innerhalb dieser Arbeit zu gewährleisten, wurden die Vorzeichen der Streukoeffizienten angepaßt.

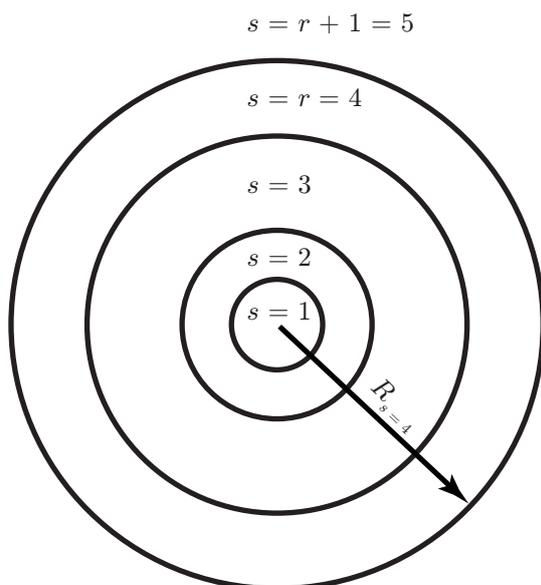


Abbildung A.1: Schalenpartikel aus einem Kern mit Radius R_1 (erste Schale) und drei weiteren konzentrischen Schalen mit den Radien R_2 bis R_4 . Jede Schale besteht entweder aus einem Metall oder aus einem Dielektrikum mit den dielektrischen Funktionen ϵ_1 bis ϵ_4 . Umgeben ist die Nanoschale von einer Matrix mit der dielektrischen Funktion ϵ_5 .

$$a_L = \frac{\tilde{m}_r \psi_L(\tilde{m}_r \tilde{x}_r) [\psi'_L(\tilde{x}_r) + T_L^{r-1} \chi'_L(\tilde{x}_r)] - \psi'_L(\tilde{m}_r \tilde{x}_r) [\psi_L(\tilde{x}_r) + T_L^{r-1} \chi_L(\tilde{x}_r)]}{\tilde{m}_r \xi_L(\tilde{m}_r \tilde{x}_r) [\psi'(\tilde{x}_r) + T_L^{r-1} \chi'_L(\tilde{x}_r)] - \xi'_L(\tilde{m}_r \tilde{x}_r) [\psi_L(\tilde{x}_r) + T_L^{r-1} \chi_L(\tilde{x}_r)]}, \quad (\text{A.1a})$$

$$b_L = \frac{\psi_L(\tilde{m}_r \tilde{x}_r) [\psi'_L(\tilde{x}_r) + S_L^{r-1} \chi'_L(\tilde{x}_r)] - \tilde{m}_r \psi'_L(\tilde{m}_r \tilde{x}_r) [\psi_L(\tilde{x}_r) + S_L^{r-1} \chi_L(\tilde{x}_r)]}{\xi_L(\tilde{m}_r \tilde{x}_r) [\psi'(\tilde{x}_r) + S_L^{r-1} \chi'_L(\tilde{x}_r)] - \tilde{m}_r \xi'_L(\tilde{m}_r \tilde{x}_r) [\psi_L(\tilde{x}_r) + S_L^{r-1} \chi_L(\tilde{x}_r)]}, \quad (\text{A.1b})$$

wobei die Funktionen T_L^s und S_L^s sich aus den folgenden Rekursionsformeln ergeben:

$$T_L^s = -\frac{\tilde{m}_s \psi_L(\tilde{m}_s \tilde{x}_s) [\psi'_L(\tilde{x}_s) + T_L^{s-1} \chi'_L(\tilde{x}_s)] - \psi'_L(\tilde{m}_s \tilde{x}_s) [\psi_L(\tilde{x}_s) + T_L^{s-1} \chi_L(\tilde{x}_s)]}{\tilde{m}_s \chi_L(\tilde{m}_s \tilde{x}_s) [\psi'_L(\tilde{x}_s) + T_L^{s-1} \chi'_L(\tilde{x}_s)] - \chi'_L(\tilde{m}_s \tilde{x}_s) [\psi_L(\tilde{x}_s) + T_L^{s-1} \chi_L(\tilde{x}_s)]},$$

$$T_L^0 = 0, \quad (\text{A.2a})$$

$$S_L^s = -\frac{\psi_L(\tilde{m}_s \tilde{x}_s) [\psi'_L(\tilde{x}_s) + S_L^{s-1} \chi'_L(\tilde{x}_s)] - \tilde{m}_s \psi'_L(\tilde{m}_s \tilde{x}_s) [\psi_L(\tilde{x}_s) + S_L^{s-1} \chi_L(\tilde{x}_s)]}{\chi_L(\tilde{m}_s \tilde{x}_s) [\psi'_L(\tilde{x}_s) + S_L^{s-1} \chi'_L(\tilde{x}_s)] - \tilde{m}_s \chi'_L(\tilde{m}_s \tilde{x}_s) [\psi_L(\tilde{x}_s) + S_L^{s-1} \chi_L(\tilde{x}_s)]},$$

$$S_L^0 = 0. \quad (\text{A.2b})$$

Analog zu den Gleichungen 2.7 bezeichnen $\psi_L(z) = z j_L(z)$, $\chi_L(z) = y_L(z)$ und $\xi_L(z) = z h_L^{(1)}(z)$ die Ricatti-Bessel Funktionen der Ordnung L . Das Verhältnis der Brechungsindizes benachbarter Schalen ist $\tilde{m}_s = n_{s+1}/n_s$ und $\tilde{x}_s = k_s R_s$ bezeichnet den Größenparameter, wobei R_s der Radius des Partikels mit s Schalen ist. Unter Beachtung der Definitionen für \tilde{m} und \tilde{x} folgen mit $s = r = 1$ aus A.1 wieder die allgemeinen Mie-Koeffizienten 2.7.²

² $\tilde{m}_1 = 1/m$ und $x_1 = k_1 x/k_2$.

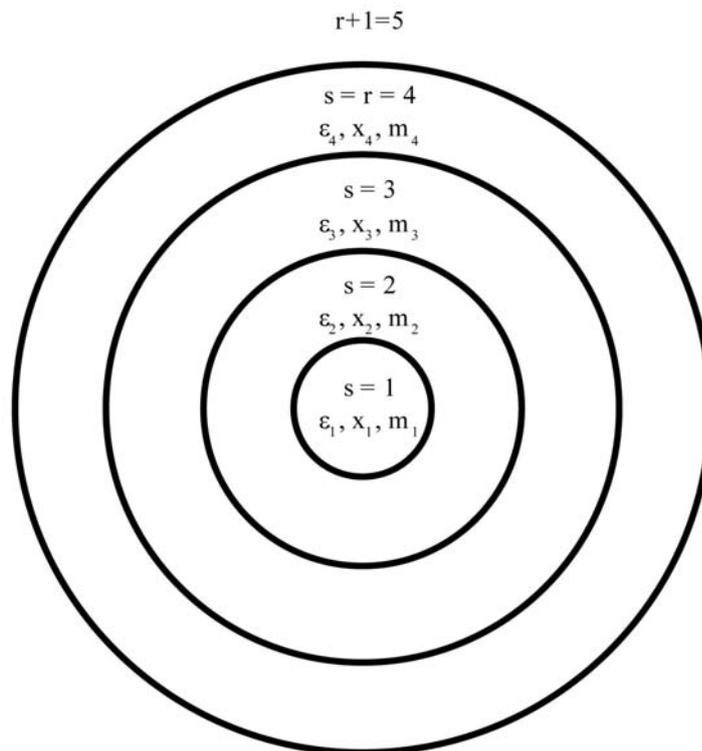
B Mathematica Skript zur Berechnung der Mie-Streuung

User Input

```
In[1]:= (* ε1 dielectric function of the core *)
(* ε2 dielectric function of the 1st shell *)
(* ε3 dielectric function of the 2nd shell *)
(* ε4 dielectric function of the host *)
(* r number of shells *)
(* RCore core radius *)
(* d1 thickness of the first shell *)
(* d2 thickness of the second shell*)
(* Δω energy resolution (eV) *)
```

```
In[2]:= Off[General::spell];
Off[General::spell1];
ClearAll["Global`*"];
RCore := 20 * 10^-9;
d0 = RCore;
d1 = 0 * 10^-9;
d2 = 0 * 10^-9;
ω = 1;
Δω = 0.001;
ωmin = 1;
ωmax = 3;
ε2 := (1.33)^2;
ε1 := 5222.89361 - 21709.67407 * ω + 38087.00036 * ω^2 -
37588.35430 * ω^3 + 23121.14990 * ω^4 - 9216.91166 * ω^5 +
2385.83431 * ω^6 - 387.42356 * ω^7 + 35.87699 * ω^8 -
1.44609 * ω^9 +
i
(
-558.27355 + 2888.04152 ω - 6122.57020 ω^2 +
7155.78252 ω^3 - 5131.09093 ω^4 + 2352.05993 ω^5 -
691.32786 ω^6 + 125.98511 ω^7 - 12.95343 ω^8 +
0.57414 ω^9);
ε3 := (1.33)^2;
ε4 := (1.33)^2;
r = 1;
```

Function definitions



Zur Berechnung der Mie Koeffizienten werden die Ricatti-Bessel Funktionen erster, zweiter und dritter Art, sowie deren Ableitungen benötigt (Ricatti-Bessel, Ricatti-Neumann and Ricatti-Hankel Funktion; Vorzeichen wie bei Kreibig et al.!). Außerdem wird das Verhältnis $m_s = \tilde{N}_{s+1} / N_s$ der imaginären Brechungsindizes der benachbarten Schalen s und $s+1$, der Wellenvektor k_s in der s -ten Schale und der Größen-Parameter $x_s = k_s R_s$ (size parameter) bestimmt.

LastTerm ist die höchste in der Berechnung der Mie-Koeffizienten berücksichtigte Multipolordnung. Sie kann a priori mit einer *empirischen* Formel aus dem Größen-Parameter bestimmt werden. Da bei der Berechnung von Multi-Layer-Partikeln mehr Größen-Parameter auftreten, wird LastTerm hier zunächst für jeden der Größen-Parameter berechnet. Für die weiteren Berechnungen wird das Maximum dieser Werte in LastTerm gespeichert.

```

In[17]:=  $\psi_{n\_}[y\_]$  =  $\sqrt{\frac{\pi y}{2}}$  BesselJ[ $\left(n + \frac{1}{2}\right)$ , y] ;  $\chi_{n\_}[y\_]$  = :
D $\psi_{n\_}[y\_]$  =  $\partial_y (\psi_n[y])$  ; D $\chi_{n\_}[y\_]$  =  $\partial_y (\chi_n[y])$  ; D $\xi_{n\_}[y]$ 
N $s\_ := \sqrt{\epsilon_s}$  ;
R $_0 = 0$  ; R $s\_ := d_{s-1} + R_{s-1}$  ;
m $s\_ := N_{s+1} / N_s$  ;
k $s\_ := N_s * \omega * 5.064 * 10^6$  ;
x $s\_ := k_s R_s$  ;
LastTerm = Ceiling[Max[Table[Abs[x $_i + 4.05 (x_i)^{1/3}$ 
Print["Die Rechnung berücksichtigt Multipole

```

Die Rechnung berücksichtigt Multipole bis 6.ter Ordnung.]]]]

Calculation of the Mie-coefficients and Cross sections

Nun sind alle Daten bekannt, die zur Berechnung der Mie Koeffizienten a_n und b_n benötigt werden. Da sowohl in a_n und b_n , als auch in den Rekursionsformeln T_n^S und S_n^S immer wieder die selben Ricatti-Bessel Funktionen auftauchen, werden diese jeweils gemeinsam berechnet.

$$T_n^S = - \left(m_s \psi_n [m_s \mathbf{x}_s] (D\psi_n [\mathbf{x}_s] + T_n^{S-1} D\chi_n [\mathbf{x}_s]) - D\psi_n [m_s \mathbf{x}_s] (\psi_n [\mathbf{x}_s] + T_n^{S-1} \chi_n [\mathbf{x}_s]) \right) / \left(m_s \chi_n [m_s \mathbf{x}_s] (D\psi_n [\mathbf{x}_s] + T_n^{S-1} D\chi_n [\mathbf{x}_s]) - D\chi_n [m_s \mathbf{x}_s] (\psi_n [\mathbf{x}_s] + T_n^{S-1} \chi_n [\mathbf{x}_s]) \right), T_n^0 = 0$$

$$S_n^S = - \left(\psi_n [m_s \mathbf{x}_s] (D\psi_n [\mathbf{x}_s] + S_n^{S-1} D\chi_n [\mathbf{x}_s]) - m_s D\psi_n [m_s \mathbf{x}_s] (\psi_n [\mathbf{x}_s] + S_n^{S-1} \chi_n [\mathbf{x}_s]) \right) / \left(\chi_n [m_s \mathbf{x}_s] (D\psi_n [\mathbf{x}_s] + S_n^{S-1} D\chi_n [\mathbf{x}_s]) - m_s D\chi_n [m_s \mathbf{x}_s] (\psi_n [\mathbf{x}_s] + S_n^{S-1} \chi_n [\mathbf{x}_s]) \right), S_n^0 = 0$$

$$a_n = - \frac{m_r \psi_n [m_r \mathbf{x}_r] (D\psi_n [\mathbf{x}_r] + T_n^{r-1} D\chi_n [\mathbf{x}_r]) - D\psi_n [m_r \mathbf{x}_r] (\psi_n [\mathbf{x}_r] + T_n^{r-1} \chi_n [\mathbf{x}_r])}{m_r \xi_n [m_r \mathbf{x}_r] (D\psi_n [\mathbf{x}_r] + T_n^{r-1} D\chi_n [\mathbf{x}_r]) - D\xi_n [m_r \mathbf{x}_r] (\psi_n [\mathbf{x}_r] + T_n^{r-1} \chi_n [\mathbf{x}_r])}$$

$$b_n = - \frac{\psi_n [m_r \mathbf{x}_r] (D\psi_n [\mathbf{x}_r] + S_n^{r-1} D\chi_n [\mathbf{x}_r]) - m_r D\psi_n [m_r \mathbf{x}_r] (\psi_n [\mathbf{x}_r] + S_n^{r-1} \chi_n [\mathbf{x}_r])}{\xi_n [m_r \mathbf{x}_r] (D\psi_n [\mathbf{x}_r] + S_n^{r-1} D\chi_n [\mathbf{x}_r]) - m_r D\xi_n [m_r \mathbf{x}_r] (\psi_n [\mathbf{x}_r] + S_n^{r-1} \chi_n [\mathbf{x}_r])}$$

Absorptions-, Streu- und Extinktionskoeffizient können nun bestimmt werden. Um eine mehrfache Berechnung der selben Mie Koeffizienten zu verhindern, geschieht auch dies gemeinsam:

$$Q_{Scat} = \frac{2 \pi}{(k_{r+1})^2} \sum_{n=1}^{LastTerm} (2 n + 1) (| a_n |^2 + | b_n |^2)$$

$$Q_{Ext} = - \frac{2 \pi}{(k_{r+1})^2} \sum_{n=1}^{LastTerm} (2 n + 1) \text{Re} (a_n + b_n) ;$$

$$Q_{Abs} = Q_{Ext} - Q_{Scat}$$

LastTerm: s.o.

```

In[26]:= TS_n_[0] = {0, 0};
TS_n_[s_] := Module[
  {ψnmx, Dψnmx, χnmx, Dχnmx, ψnx, Dψnx, χnx, Dχnx,
   Ttemp, Stemp},
  ψnmx = ψ_n[m_s x_s];   χnmx = χ_n[m_s x_s];   ψnx = ψ_n[x_s];
  χnx = χ_n[x_s];
  Dψnmx = Dψ_n[m_s x_s]; Dχnmx = Dχ_n[m_s x_s]; Dψnx = Dψ_n[x_s];
  Dχnx = Dχ_n[x_s];
  {Ttemp, Stemp} = TS_n[s - 1];
  {
    - (m_s ψnmx (Dψnx + Ttemp Dχnx) - Dψnmx (ψnx + Ttemp χnx)) /
    (m_s χnmx (Dψnx + Ttemp Dχnx) - Dχnmx (ψnx + Ttemp χnx)) ,
    - (ψnmx (Dψnx + Stemp Dχnx) - m_s Dψnmx (ψnx + Stemp χnx)) /
    (χnmx (Dψnx + Stemp Dχnx) - m_s Dχnmx (ψnx + Stemp χnx))
  }
];

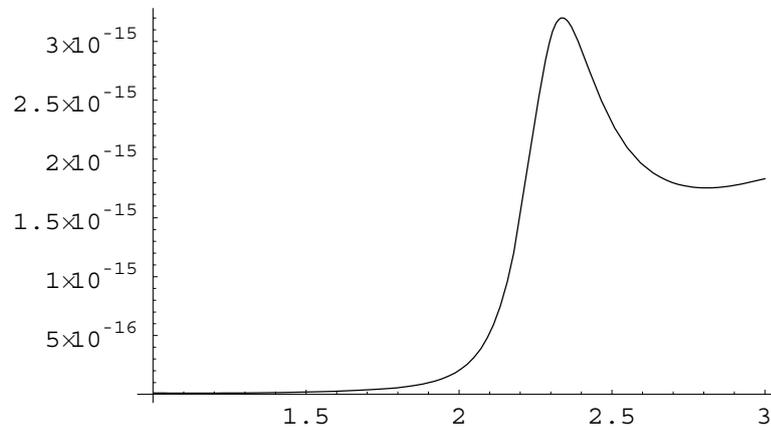
AB_n_ := Module[
  {s, ψnmx, Dψnmx, ψnx, Dψnx, ξnmx, Dξnmx, χnx, Dχnx,
   Ttemp, Stemp},
  ψnmx = ψ_n[m_r x_r];   ψnx = ψ_n[x_r];   ξnmx = ξ_n[m_r x_r];
  χnx = χ_n[x_r];
  Dψnmx = Dψ_n[m_r x_r]; Dψnx = Dψ_n[x_r]; Dξnmx = Dξ_n[m_r x_r];
  Dχnx = Dχ_n[x_r];
  {Ttemp, Stemp} = TS_n[r - 1];
  {
    - (m_r ψnmx (Dψnx + Ttemp Dχnx) -
      Dψnmx (ψnx + Ttemp χnx)) /
    (m_r ξnmx (Dψnx + Ttemp Dχnx) -
      Dξnmx (ψnx + Ttemp χnx)) ,
    - (ψnmx (Dψnx + Stemp Dχnx) - m_r Dψnmx (ψnx + Stemp χnx)) /
    (ξnmx (Dψnx + Stemp Dχnx) - m_r Dξnmx (ψnx + Stemp χnx))
  }
];

Q[w_] := Module[
  {QScat, ABTemp},
  ω = w; QScat = 0; QExt = 0; ABTemp = 0;
  For[n = 1, n ≤ LastTerm, n++,
    ABTemp = AB_n;
  ]
];

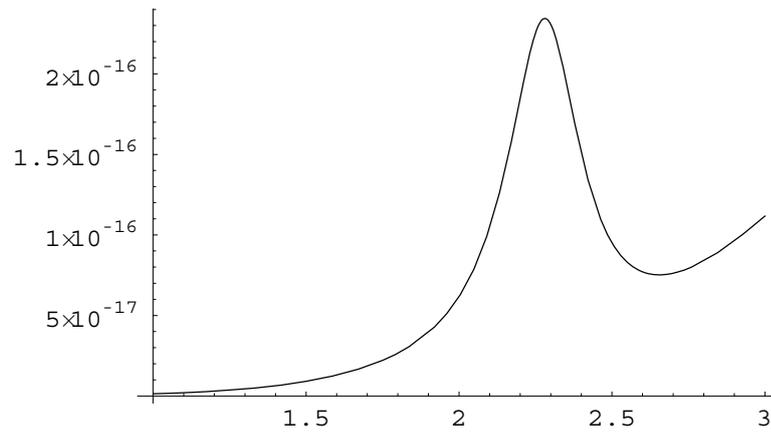
```

```
QExt = QExt -  $\frac{2 \pi}{(k_{r+1})^2} (2 n + 1) \text{Re}[\text{Total}[\text{ABTemp}]]$  ;  
QScat =  
QScat +  $\frac{2 \pi}{(k_{r+1})^2} (2 n + 1) \text{Total}[\text{Abs}[\text{ABTemp}]^2]$  ;  
];  
{QExt - QScat, QScat, QExt}  
];
```

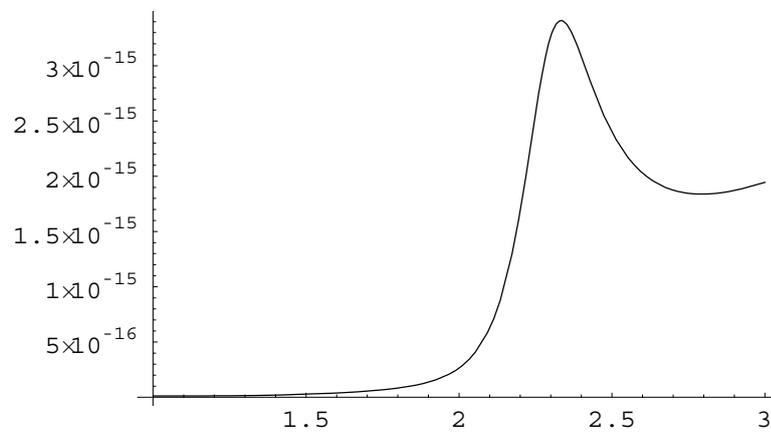
```
In[30]:= Plot[Q[t][[1]], {t, 1, 3}, PlotRange -> All];  
(* Absorption *)
```



```
In[31]:= Plot[Q[t][[2]], {t, 1, 3}, PlotRange -> All];  
(* Streuung *)
```

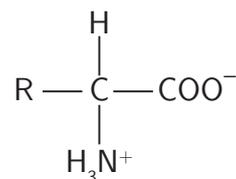


```
In[32]:= Plot[Q[t][[3]], {t, 1, 3}, PlotRange -> All];  
(* Extinktion *)
```

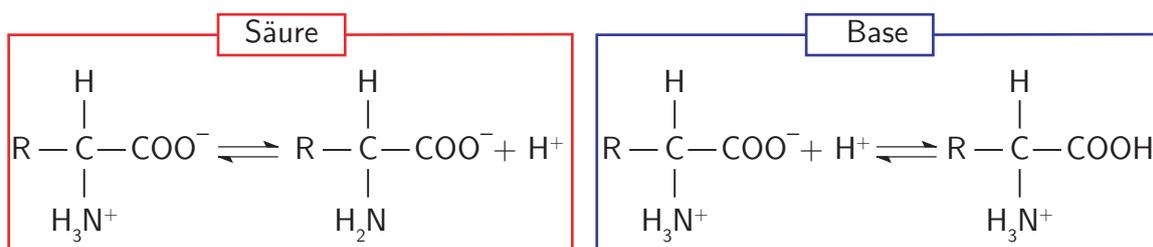


C Säure-Basen Eigenschaften der Aminosäuren

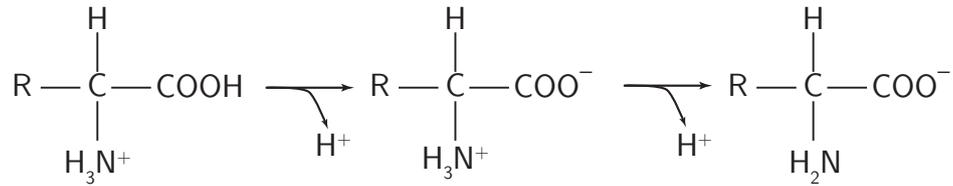
Viele Eigenschaften von Proteinen, insbesondere auch ihre Stabilität, beruhen auf den Säure-Basen Eigenschaften der Aminosäuren, auf die deshalb im folgenden kurz eingegangen wird. In wäßrigen Lösungen können Aminosäuren vollständig ionisiert, d.h. als Zwitterionen in der Form



vorliegen und sowohl als Protonendonator (Säure) als auch als Protonenakzeptor (Base) reagieren:



Solche, als Ampholyte bezeichnete Substanzen lassen sich in der Brönsted-Lowry Theorie für Säuren und Basen als zweibasige Säure verstehen. Dabei faßt man die vollständig protonierte Aminosäure, bei der die Carboxyl- und die Aminogruppe je ein Proton akzeptiert hat, als zweibasige Säure auf. Wird diese Säure mit einer Base titriert gibt sie in zwei Schritten nacheinander beide Protonen ab:



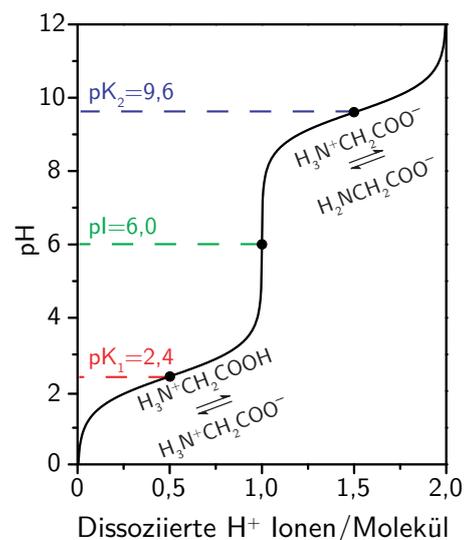
Der pH-Wert bei dem die Nettoladung gleich Null ist, wird isoelektrischer pH oder isoelektrischer Punkt (pI) genannt. In Abb. C.1 ist als Beispiel die Titrationskurve der Aminosäure Glycin dargestellt. Bei einem äußeren pH-Wert $\text{pK}_1 = 2,4$ hat die Hälfte der Carboxylgruppen ein Proton abgegeben und liegt als Zwitterion vor. Entsprechend ist die Aminogruppe bei $\text{pK}_2 = 9,6$ zur Hälfte neutralisiert. Aus der (Näherungs-) Formel $\text{pI} = 0,5(\text{pK}_1 + \text{pK}_2)$ erhält man den isoelektrische Punkt $\text{pI} = 6,0$.

Auch Proteine besitzen einen isoelektrischen Punkt an dem die Nettoladung des gesamten Proteins gleich Null ist. Aus experimenteller Sicht ist die Kenntnis des pI eines Proteins bedeutsam, da die Struktur und damit auch die Funktion von Proteinen durch elektrostatische Ladungen stabilisiert wird.

Abbildung C.1: Berechnete Titrationskurve der Aminosäure Glycin. Die Kurve wurde mit den pK-Werten aus [128] mit der Henderson-Hasselbalch Gleichung

$$\text{pH} = \text{pK} - \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

abschnittsweise berechnet [128]. $[\text{HA}] / [\text{A}^-]$ ist das Konzentrationsverhältnis der Säure HA und der dazu konjugierten Base A^- die bei der Titration verwendet werden. Anhand der Kurve ist deutlich zu sehen, daß die Pufferkapazität in der Nähe der pK-Werte am größten ist.



D Spotttest

Mit einem Spot-Test kann ohne großen Aufwand die Affinität zwischen funktionalisierten Gold-Nanopartikeln und einem Analytmolekül geprüft werden. Dazu wird ein ca. 1 μl kleiner Tropfen, der das Analytmolekül enthält, auf einen Streifen speziellen Spot-Papiers aufgetragen bzw. „gespottet“. Die Tropfstellen werden anschließend mit einem Fön bei geringer Temperatur getrocknet. Nun wird der Streifen in einer einprozentigen RSA-Lösung für 30 min unter ständiger, rollender Bewegung eingelegt. Die Albumin Proteine sättigen dabei den bisher unbenetzten Papierbereich außerhalb der Spot-Stellen ab und passivieren ihn dadurch. Hierauf wird der Papierstreifen in die zu testende Goldkonjugat-Lösung (optische Dichte ≥ 2 ; 1 % RSA) für weitere 30 min inkubiert. Dabei binden die funktionalisierten Partikel auf den gespotteten Punkten und färben diese rot. Abb. D.1 zeigt ein Beispiel, bei dem 40 nm große Gold-Kolloide auf die Affinität zu Humanserum und den Herzinfarktmarker Troponin-T getestet wurden.

Spot-Tests sind nur für Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als 30 000 D geeignet und erlauben keine quantitativen Aussagen über die Analytkonzentration.

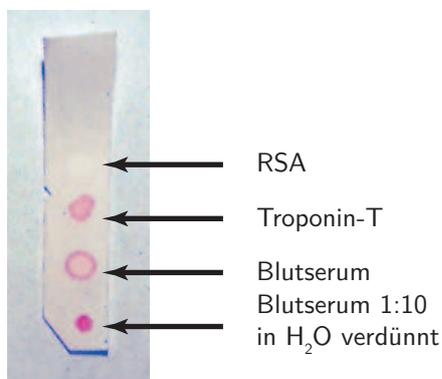


Abbildung D.1: Fotografie eines abgeschlossenen Spot-Test. Die von Gold-Kolloiden eingefärbten Flecken sind deutlich zu erkennen. Spot-Papier: Protan BA 85,10401180, 0,45 μm (Schleicher & Schuell BioScience).

Literaturverzeichnis

- [1] J. P. Gosling. *Immunoassays - A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, 2000. [→ Seite [1](#), [24](#), [29](#), [77](#), [83](#) und [84](#)]
- [2] R. S. Yalow and S. A. Berson. Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man. *Journal of Clinical Investigation*, 39(7):1157–1175, 1960. [→ Seite [1](#) und [29](#)]
- [3] R. S. Yalow. Radioimmunoassay: A Probe For Fine Structure Of Biologic Systems. *Nobel Lecture*, 1977. [→ Seite [1](#)]
- [4] G. M. Edelman and R. R. Porter. „For their discoveries concerning the chemical structure of antibodies“. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine*, 1972. [→ Seite [1](#)]
- [5] N. K. Jerne, G. J. F. Köhler, and C Milstein. „For theories concerning the specificity in development and control of the immune system and the discovery of the principle for production of monoclonal antibodies“. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine*, 1984. [→ Seite [1](#)]
- [6] D. Wild. *The Immunoassay Handbook*. Nature Publishing Group, 2001. [→ Seite [1](#), [24](#) und [29](#)]
- [7] N. Frey, M. Müller-Bardorff, and H. A. Katus. The value of biochemical methods for detection of myocardial damage and risk assessment in chest pain patients. *Zeitschrift für Kardiologie*, 87(Supplement 2):s100–s105, 1998. [→ Seite [1](#) und [46](#)]
- [8] T. A. Taton, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science*, 289(5485):1757–1760, 2000. [→ Seite [1](#)]
- [9] H. C. van de Hulst. *Light Scattering by Small Particles*. Dover Publications Inc., Mineola, N.Y., 1957. [→ Seite [3](#) und [15](#)]

-
- [10] C. Bohren and D. Huffmann. *Absorption and scattering of light by small particles*. John Wiley and Sons, New York, 1983. [→ Seite [3](#), [5](#), [12](#), [13](#), [14](#), [15](#) und [41](#)]
- [11] U. Kreibig and M. Vollmer. *Optical Properties of Metal Clusters*. Springer, Berlin, 1995. [→ Seite [3](#), [5](#), [11](#), [12](#), [13](#), [35](#), [37](#), [41](#) und [92](#)]
- [12] C. Sönnichsen. *Plasmons in metal nanostructures*. Cuviller Verlag, Goettingen, 2001. [→ Seite [7](#), [11](#), [41](#) und [95](#)]
- [13] P. B. Johnson and R. W. Christy. Optical Constants of the Noble Metals. *Physical Review B*, 6(12):4370–4379, 1972. [→ Seite [10](#), [11](#) und [93](#)]
- [14] N. W. Ashcroft and N. D. Mermin. *Solid State Physics*. Saunders College Publishing, 1976. [→ Seite [11](#)]
- [15] C. Sönnichsen, T. Franzl, T. Wilk, G. von Plessen, J. Feldmann, O. Wilson, and P. Mulvaney. Drastic reduction of plasmon damping in gold nanorods. *Physical Review Letters*, 88(7):0774021–0774024, 2002. [→ Seite [12](#), [34](#), [35](#), [60](#), [89](#), [91](#) und [92](#)]
- [16] C. Yannouleas and R. A. Broglia. Landau Damping and Wall Dissipation in Large Metal-Clusters. *Annals of Physics*, 217(1):105–141, 1992. [→ Seite [12](#)]
- [17] A. Kawabata and R. Kubo. Electronic Properties of Fine Metallic Particles .2. Plasma Resonance Absorption. *Journal of the Physical Society of Japan*, 21(9):1765–1772, 1966. [→ Seite [12](#)]
- [18] L. Sander. Quantum Theory of Perpendicular Electrical Conductivity in A Thin Metallic Film. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 29(2):291–294, 1968. [→ Seite [12](#)]
- [19] L. Genzel and U. Kreibig. Dielectric Function and Infrared-Absorption of Small Metal Particles. *Zeitschrift fur Physik B-Condensed Matter*, 37(2):93–101, 1980. [→ Seite [12](#)]
- [20] F. Hache, D. Ricard, and C. Flytzanis. Optical Nonlinearities of Small Metal Particles - Surface-Mediated Resonance and Quantum Size Effects. *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics*, 3(12):1647–1655, 1986. [→ Seite [12](#)]

- [21] G. Mie. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annals of Physics*, 25(3):377–445, 2004. [→ Seite [12](#)]
- [22] W. Nolting. *Theoretische Physik 3, Elektrodynamik*. Zimmermann-Neufang., Ulmen, 1993. [→ Seite [15](#)]
- [23] M. Cox and D. L. Nelson. *Lehninger Biochemie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2001. [→ Seite [16](#), [17](#), [18](#), [19](#), [20](#), [23](#) und [24](#)]
- [24] L. Stryer, J. M. Berg, and J. L. Tymoczko. *Biochemistry*. W.H. Freeman, 2002. [→ Seite [16](#), [18](#) und [19](#)]
- [25] Z. M. Wang, W. Shen, D. P. Kotler, S. Heshka, L. Wielopolski, J. F. Aloia, M. E. Nelson, R. N. Pierson, and S. B. Heymsfield. Total body protein: a new cellular level mass and distribution prediction model. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78(5):979–984, 2003. [→ Seite [16](#)]
- [26] K. A. Dill. Polymer principles and protein folding. *Protein Science*, 8(6): 1166–1180, 1999. [→ Seite [19](#) und [20](#)]
- [27] J. Durup. On Levinthal paradox and the theory of protein folding. *Journal of Molecular Structure-Theochem*, 424(1-2):157–169, 1998. [→ Seite [19](#) und [20](#)]
- [28] J. M. Yon. Protein folding: concepts and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53(7):557–567, 1997. [→ Seite [19](#) und [20](#)]
- [29] A. V. Finkelstein and O. V. Galzitskaya. Physics of protein folding. *Physics of Life reviews*, 1(1):23–56, 2004. [→ Seite [19](#) und [20](#)]
- [30] S. Sporlein, H. Carstens, H. Satzger, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, P. Tavan, W. Zinth, and J. Wachtveitl. Ultrafast spectroscopy reveals subnanosecond peptide conformational dynamics and validates molecular dynamics simulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12):7998–8002, 2002. [→ Seite [20](#)]
- [31] E. A. Padlan. Anatomy of the Antibody Molecule. *Molecular Immunology*, 31 (3):169–217, 1994. [→ Seite [21](#)]

- [32] D. J. O'Shannessy and D. J. Winzor. Interpretation of deviations from pseudo-first-order kinetic behavior in the characterization of ligand binding by biosensor technology. *Analytical Biochemistry*, 236(2):275–283, 1996. [→ Seite 23, 28 und 29]
- [33] D. Hall. Use of optical biosensors for the study of mechanistically concerted surface adsorption processes. *Analytical Biochemistry*, 288(2):109–125, 2001. [→ Seite 23 und 29]
- [34] G. Gauglitz and M. Reichert. Affinitätsreaktionen: Beschreibung von Immunoassays, Testformaten, Massentransport, Bindungskinetik. <http://www.vsc.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/13/vlu/kinetik/affinitaet/affinitaetsreaktionen.vlu.html>, 2005. [→ Seite 23]
- [35] J. Piehler. *Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern*. Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1997. [→ Seite 23]
- [36] C. J. Van Oss. Hydrophobic, hydrophilic and other interactions in epitope-paratope binding. *Molecular Immunology*, 32(3):199–211, 1995. [→ Seite 24]
- [37] C. J. Van Oss. Kinetics and energetics of specific intermolecular interactions. *Journal of Molecular Recognition*, 10(5):203–216, 1997. [→ Seite 24]
- [38] B. Goldstein, D. Coombs, X. Y. He, A. R. Pineda, and C. Wofsy. The influence of transport on the kinetics of binding to surface receptors: application to cells and BIAcore. *Journal of Molecular Recognition*, 12(5):293–299, 1999. [→ Seite 27]
- [39] T. Mason, A. R. Pineda, C. Wofsy, and B. Goldstein. Effective rate models for the analysis of transport-dependent biosensor data. *Mathematical Biosciences*, 159(2):123–144, 1999. [→ Seite 27 und 28]
- [40] M. von Smoluchowski. Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloider Lösungen. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 92(2):129–168, 1917. [→ Seite 28]
- [41] A. R. Tzafriri and E. R. Edelman. On the validity of the quasi-steady state approximation of bimolecular reactions in solution. *Journal of Theoretical Biology*, 233(3):343–350, 2005. [→ Seite 28]

- [42] Byron Goldstein and Carla Wofsy. Why is it so hard to dissociate multivalent antigens from cell-surface antibodies? *Immunology Today*, 17(2):77–80, 1996. [→ Seite 29]
- [43] G. Canziani, W. T. Zhang, D. Cines, A. Rux, S. Willis, G. Cohen, R. Eisenberg, and I. Chaiken. Exploring biomolecular recognition using optical biosensors. *Methods-A Companion to Methods in Enzymology*, 19(2):253–269, 1999. [→ Seite 29 und 47]
- [44] C. P. Price and D. J. Newman. *Principles and Practice of Immunoassay*. Macmillan, London, 1997. [→ Seite 29]
- [45] E. G. Matveeva, M. P. AguilarCaballos, S. A. Eremin, A. GomezHens, and D. PerezBendito. Use of stopped-flow fluoroimmunoassay in pesticide determination. *Analyst*, 122(8):863–866, 1997. [→ Seite 30]
- [46] P. Englebienne. Use of colloidal gold surface plasmon resonance peak shift to infer affinity constants from the interactions between protein antigens and antibodies specific for single or multiple epitopes. *Analyst*, 123(7):1599–1603, 1998. [→ Seite 33]
- [47] P. Englebienne, A. Van Hoonacker, and M. Verhas. High-throughput screening using the plasmon resonance effect of colloidal gold nanoparticles. *The Analyst*, 126:1645–1651, 2001. [→ Seite 33]
- [48] A. J. Haes and R. P. Van Duyne. A nanoscale optical biosensor: Sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 124(35):10596–10604, 2002. [→ Seite 34 und 35]
- [49] T. Okamoto, I. Yamaguchi, and T. Kobayashi. Local plasmon sensor with gold colloid monolayers deposited upon glass substrates. *Optics Letters*, 25(6):372–374, 2000. [→ Seite 34]
- [50] N. Nath and A. Chilkoti. A colorimetric gold nanoparticle sensor to interrogate biomolecular interactions in real time on a surface. *Analytical Chemistry*, 74(3):504–509, 2002. [→ Seite 34]

- [51] T. Klar, M. Perner, S. Grosse, G. von Plessen, W. Spirkl, and J. Feldmann. Surface-plasmon resonances in single metallic nanoparticles. *Physical Review Letters*, 80(19):4249–4252, 1998. [→ Seite [34](#), [59](#) und [89](#)]
- [52] C. Sönnichsen, S. Geier, N. E. Hecker, G. von Plessen, J. Feldmann, H. Ditlbacher, B. Lamprecht, J. R. Krenn, F. R. Aussenegg, V. Z. H. Chan, J. P. Spatz, and M. Möller. Spectroscopy of single metallic nanoparticles using total internal reflection microscopy. *Applied Physics Letters*, 77(19):2949–2951, 2000. [→ Seite [34](#), [37](#), [60](#) und [89](#)]
- [53] C. Sönnichsen, T. Franzl, T. Wilk, G. von Plessen, and J. Feldmann. Plasmon resonances in large noble-metal clusters. *New Journal of Physics*, 4:93.1–93.8, 2002. [→ Seite [34](#)]
- [54] S. Schultz, D. R. Smith, J. J. Mock, and D. A. Schultz. Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3):996–1001, 2000. [→ Seite [34](#), [47](#) und [60](#)]
- [55] J. C. Riboh, A. J. Haes, A. D. McFarland, C. R. Yonzon, and R. P. Van Duyne. A Nanoscale Optical Biosensor: Real-Time Immunoassay in Physiological Buffer Enabled by Improved Nanoparticle Adhesion. *Journal of Physical Chemistry B*, 107:1772–1780, 2003. [→ Seite [35](#)]
- [56] P. A. Bobbert and J. Vlieger. Light-Scattering by A Sphere on A Substrate. *Physica A*, 137(1-2):209–242, 1986. [→ Seite [37](#)]
- [57] B. R. Johnson. Calculation of light scattering from a spherical particle on a surface by the multipole expansion method. *Journal of the Optical Society of America A-Optics Image Science and Vision*, 13(2):326–337, 1996. [→ Seite [37](#)]
- [58] T. R. Jensen, M. L. Duval, K. L. Kelly, A. A. Lazarides, G. C. Schatz, and R. P. Van Duyne. Nanosphere lithography: Effect of the external dielectric medium on the surface plasmon resonance spectrum of a periodic array of silver nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, 103(45):9846–9853, 1999. [→ Seite [37](#)]

- [59] A. Hilger, M. Tenfelde, and U. Kreibig. Silver nanoparticles deposited on dielectric surfaces. *Applied Physics B-Lasers and Optics*, 73(4):361–372, 2001. [→ Seite 37]
- [60] H. Tamaru, H. Kuwata, H. T. Miyazaki, and K. Miyano. Resonant light scattering from individual Ag nanoparticles and particle pairs. *Applied Physics Letters*, 80(10):1826–1828, 2002. [→ Seite 37]
- [61] A. Curry, G. Nusz, A. Chilkoti, and A. Wax. Substrate effect on refractive index dependence of plasmon resonance for individual silver nanoparticles observed using darkfield microspectroscopy. *Optics Letters*, 13(7):2668–2677, 2005. [→ Seite 37]
- [62] B Radt. *Inaktivierung von Proteinen und Zellen durch Laserbestrahlung von Mikropartikeln*. Dissertation an der Technisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der der Universität zu Lübeck, 2002. [→ Seite 41]
- [63] S. S. Chang, C. W. Shih, C. D. Chen, W. C. Lai, and C. R. C. Wang. The shape transition of gold nanorods. *Langmuir*, 15(3):701–709, 1999. [→ Seite 41]
- [64] H. S. Zhou, I. Honma, H. Komiyama, and J. W. Haus. Controlled Synthesis and Quantum-Size Effect in Gold-Coated Nanoparticles. *Physical Review B*, 50(16):12052–12056, 1994. [→ Seite 41, 57 und 89]
- [65] R. D. Averitt, D. Sarkar, and N. J. Halas. Plasmon resonance shifts of Au-coated Au₂S nanoshells: Insight into multicomponent nanoparticle growth. *Physical Review Letters*, 78(22):4217–4220, 1997. [→ Seite 41, 57, 58, 89, 93 und 94]
- [66] L. R. Hirsch, J. B. Jackson, A. Lee, N. J. Halas, and J. L. West. A whole blood immunoassay using gold nanoshells. *Analytical Chemistry*, 75(10):2377–2381, 2003. [→ Seite 42]
- [67] Roche Diagnostics GmbH. Cardiac T Troponin Quantitative. *Packungsbeilage*, 2000. [→ Seite 45]
- [68] H. A. Katus, A. Remppis, S. Looser, K. Hallermeier, T. Scheffold, and W. Kubler. Enzyme linked immuno assay of cardiac troponin T for the detection of acute

- myocardial infarction in patients. *J.Mol.Cell Cardiol.*, 21(12):1349–1353, 1989. [→ Seite [46](#) und [85](#)]
- [69] K. Hallermayer, D. Klenner, and R. Vogel. Use of recombinant human cardiac Troponin T for standardization of third generation Troponin T methods. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 59:128–131, 1999. [→ Seite [46](#)]
- [70] B. U. Goldmann, R. H. Christenson, C. W. Hamm, T. Meinertz, and E. M. Ohman. Implications of troponin testing in clinical medicine. *Current Controlled Trials in Cardiovascular Medicine*, 2(2):75–84, 2001. [→ Seite [46](#)]
- [71] J. Yguerabide and E. E. Yguerabide. Resonance Light Scattering Particles as Ultrasensitive Labels for Detection of Analytes in a Wide Range of Applications. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement*, 37(S37):71–81, 2001. [→ Seite [47](#)]
- [72] J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B (Chemical)*, 54:3–15, 1999. [→ Seite [47](#)]
- [73] J. Homola. Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(3):528–539, 2003. [→ Seite [47](#)]
- [74] W. M. Mullett, E. P. C. Lai, and J. M. Yeung. Surface plasmon resonance-based immunoassays. *Methods-A Companion to Methods in Enzymology*, 22(1):77–91, 2000. [→ Seite [47](#) und [48](#)]
- [75] R. L. Rich and D. G. Myszka. Survey of the 1999 surface plasmon resonance biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition*, 13(6):388–407, 2000. [→ Seite [47](#)]
- [76] R. L. Rich and D. G. Myszka. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(1):54–61, 2000. [→ Seite [47](#)]
- [77] A. V. Kabashin, V. E. Kochergin, and P. I. Nikitin. Surface plasmon resonance bio- and chemical sensors with phase-polarisation contrast. *Sensors and Actuators B (Chemical)*, 54:51–65, 1999. [→ Seite [47](#)]
- [78] H Raether. *Surface Plasmons. On Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*. Springer, Heidelberg, 1988. [→ Seite [47](#)]

- [79] D. Güntzer. *Optische Messungen an Oberflächenplasmonen*. Zulassungsarbeit zum Staatsexamen Ludwig-Maximilians-Universität München, 1999. [→ Seite 47]
- [80] Erwin Kretschmann. Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. *The European Physical Journal A - Hadrons and Nuclei (Historical Archive)*, 241(4):313–324, 1971. [→ Seite 47]
- [81] J. H. Grassi and R. M. Georgiadis. Temperature-dependent refractive index determination from critical angle measurements: Implications for quantitative SPR sensing. *Analytical Chemistry*, 71(19):4392–4396, 1999. [→ Seite 49]
- [82] Biacore 3000 Product Brochure, 2003. [→ Seite 49]
- [83] Roche Diagnostics GmbH. ECL Reaktionsmechanismus in Elecsys 1010 und Elecsys 2010. <http://www.lerncenter.roche.de>, 2005. [→ Seite 50]
- [84] L. J. Kricka and P. E. Stanley. Electrochemiluminescence: 1996–1998. *Luminescence*, 14(2):113–118, 1999. [→ Seite 51]
- [85] M. Faraday. Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 147:145–181, 1857. [→ Seite 53]
- [86] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hillier. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11:55–75, 1951. [→ Seite 53]
- [87] G. Frens. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature*, 241:20–22, 1973. [→ Seite 53]
- [88] BBInternational, Golden Gate, TY Glas Ave., Cardiff CF4 5DX, United Kingdom, 2002. [→ Seite 54 und 94]
- [89] R. D. Averitt, S. L. Westcott, and N. J. Halas. Ultrafast electron dynamics in gold nanoshells. *Physical Review B*, 58(16):10203–10206, 1998. [→ Seite 57 und 89]
- [90] R. D. Averitt, S. L. Westcott, and N. J. Halas. Ultrafast optical properties of gold nanoshells. *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics*, 16(10):1814–1823, 1999. [→ Seite 57 und 89]

- [91] R. D. Averitt, S. L. Westcott, and N. J. Halas. Linear optical properties of gold nanoshells. *Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics*, 16(10):1824–1832, 1999. [→ Seite [57](#), [58](#), [89](#), [91](#) und [92](#)]
- [92] S. L. Westcott, R. D. Averitt, J. A. Wolfgang, P. Nordlander, and N. J. Halas. Adsorbate-induced quenching of hot electrons in gold core-shell nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, 105(41):9913–9917, 2001. [→ Seite [57](#) und [89](#)]
- [93] S. L. Westcott, J. B. Jackson, C. Radloff, and N. J. Halas. Relative contributions to the plasmon line shape of metal nanoshells. *Physical Review B*, 66(15):1554311–1554315, 2002. [→ Seite [57](#), [89](#) und [94](#)]
- [94] T. J. Norman, C. D. Grant, D. Magana, J. Z. Zhang, J. Liu, D. L. Cao, F. Bridges, and A. Van Buuren. Near infrared optical absorption of gold nanoparticle aggregates. *Journal of Physical Chemistry B*, 106(28):7005–7012, 2002. [→ Seite [57](#) und [89](#)]
- [95] H. S. Zhou, T. Wada, H. Sasabe, and H. Komiyama. Synthesis and optical properties of nanocomposite silver-polydiacetylene. *Synthetic Metals*, 81(2-3):129–132, 1996. [→ Seite [58](#)]
- [96] J. Yguerabide and E. E. Yguerabide. Light-Scattering Submicroscopic Particles as Highly Fluorescent Analogs and Their Use as Tracer Labels in Clinical and Biological Applications. *Analytical Biochemistry*, 262:157–176, 1998. [→ Seite [60](#)]
- [97] C. H. Suelter and M. DeLuca. How to prevent losses of protein by adsorption to glass and plastic. *Analytical Biochemistry*, 135(1):112–19, 1983. [→ Seite [68](#)]
- [98] L. Haussling, H. Ringsdorf, F. J. Schmitt, and W. Knoll. Biotin-Functionalized Self-Assembled Monolayers on Gold - Surface-Plasmon Optical Studies of Specific Recognition Reactions. *Langmuir*, 7(9):1837–1840, 1991. [→ Seite [72](#) und [76](#)]
- [99] J. Spinke, M. Liley, F. J. Schmitt, H. J. Guder, L. Angermaier, and W. Knoll. Molecular recognition at a self-assembled monolayers: optimization of surface functionalization. *Journal of Chemical Physics*, 99(9):7012–19, 1993. [→ Seite [72](#), [76](#) und [77](#)]

- [100] L. S. Jung, C. T. Campbell, T. M. Chinowsky, M. N. Mar, and S. S. Yee. Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films. *Langmuir*, 14(19):5636–5648, 1998. [→ Seite [72](#) und [96](#)]
- [101] D. Savage, G. Mattson, S. Desai, G. Nielander, S. Morgensen, and E. Conklin. *Avidin–biotin chemistry: a handbook*. Pierce Chemical Company, Rockford, 1994. [→ Seite [73](#) und [77](#)]
- [102] L. S. Jung, K. E. Nelson, P. S. Stayton, and C. T. Campbell. Binding and dissociation kinetics of wild-type and mutant streptavidins on mixed biotin-containing alkylthiolate monolayers. *Langmuir*, 16(24):9421–9432, 2000. [→ Seite [75](#) und [77](#)]
- [103] B. P. Chan, A. Chilkoti, W. M. Reichert, and G. A. Truskey. Effect of streptavidin affinity mutants on the integrin-independent adhesion of biotinylated endothelial cells. *Biomaterials*, 24(4):559–570, 2003. [→ Seite [77](#)]
- [104] P. Vincent and D. Samuel. A Comparison of the Binding of Biotin and Biotinylated Macromolecular Ligands to An Anti-Biotin Monoclonal-Antibody and to Streptavidin. *Journal of Immunological Methods*, 165(2):177–182, 1993. [→ Seite [77](#)]
- [105] C. L. Hornick and F. Karush. Antibody Affinity. III: Role of Multivalence. *Immunochemistry*, 9(3):325, 1972. [→ Seite [77](#)]
- [106] C. S. Weisbecker, M. V. Merritt, and G. M. Whitesides. Molecular self-assembly of aliphatic thiols on gold colloids. *Langmuir*, 12(16):3763–3772, 1996. [→ Seite [77](#)]
- [107] Christoph Kessler. The digoxigenin:anti-digoxigenin (DIG) technology—a survey on the concept and realization of a novel bioanalytical indicator system. *Molecular and Cellular Probes*, 5(3):161–205, 1991. [→ Seite [80](#)]
- [108] D. A. Kurtz, J. H. Skerritt, and L. Stanker. *New frontiers in agrochemical immunoassay*. AOAC International, Arlington, USA, 1995. [→ Seite [84](#)]
- [109] D. S. Aga and E. M. Thurman. *Immunochemical Technology for Environmental Applications*. American Chemical Society, ACS Symposium Series, No. 657, 1997. [→ Seite [84](#)]

-
- [110] K. Kohrer, H. R. M. Lang, and M. Ecker. Experience with cardiac troponin T in difficult cases. *European Heart Journal*, 19:38–41, 1998. [→ Seite 85]
- [111] R. T. Van Domburg, C. Cobbaert, M. Muller-Bardorff, M. Kampmann, G. P. Kimman, T. Rauscher, S. Schoolmann, R. Zerback, H. A. Katus, and M. L. Simoons. Time-dependent diagnostic performance of a rapid troponin T version 2 bedside test in patients with acute coronary syndromes. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 60(8):665–675, 2000. [→ Seite 85]
- [112] H. S. Zhou, I. Honma, J. W. Haus, H. Sasabe, and H. Komiyama. Synthesis and optical properties of coated nanoparticle composites. *Journal of Luminescence*, 70:21–34, 1996. [→ Seite 89]
- [113] E. Prodan, P. Nordlander, and N. J. Halas. Electronic structure and optical properties of gold nanoshells. *Nano Letters*, 3(10):1411–1415, 2003. [→ Seite 89]
- [114] L. Ren and G. M. Chow. Synthesis of nir-sensitive Au-Au₂S nanocolloids for drug delivery. *Materials Science and Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 23(1-2):113–116, 2003. [→ Seite 89]
- [115] J. J. Mock, S. J. Oldenburg, D. R. Smith, D. A. Schultz, and S. Schultz. Composite plasmon resonant nanowires. *Nano Letters*, 2(5):465–469, 2002. [→ Seite 89]
- [116] T. Kalkbrenner, U. Hakanson, and V. Sandoghdar. Tomographic plasmon spectroscopy of a single gold nanoparticle. *Nano Letters*, 4(12):2309–2314, 2004. [→ Seite 90]
- [117] B. J. Messinger, K. U. von Raben, R. K. Chang, and P. W. Barber. Local-Fields at the Surface of Noble-Metal Microspheres. *Physical Review B*, 24(2):649–657, 1981. [→ Seite 91]
- [118] U. Kreibig and C. V. Fragstein. The limitation of electron mean free path in small silver particles. *Zeitschrift fuer Physik A: Hadrons and Nuclei*, 224(4):307–323, 1969. [→ Seite 93]
- [119] R. Ruppin and H. Yatom. Size and Shape Effects on the Broadening of the Plasma Resonance Absorption in Metals. *Phys.Status Solidi B*, 74:647–654, 1976. [→ Seite 93]

- [120] M. Barma and V. Subrahmanyam. Optical-Absorption in Small Metal Particles. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 1(41):7681–7688, 1989. [→ Seite [93](#)]
- [121] Y. Sun and Y. Xia. Increased sensitivity of surface plasmon resonance of gold nanoshells compared to that of gold solid colloids in response to environmental changes. *Analytical Chemistry*, 74(20):5297–5305, 2002. [→ Seite [94](#) und [97](#)]
- [122] F. Tam, C. Moran, and N. Halas. Geometrical parameters controlling sensitivity of nanoshell plasmon resonances to changes in dielectric environment. *Journal of Physical Chemistry B*, 108(45):17290–17294, 2004. [→ Seite [94](#) und [96](#)]
- [123] J. J. Mock, D. R. Smith, and S. Schultz. Local refractive index dependence of plasmon resonance spectra from individual nanoparticles. *Nano Letters*, 3(4):485–491, 2003. [→ Seite [96](#)]
- [124] M. M. Alvarez, J. T. Khoury, T. G. Schaaff, M. N. Shafigullin, I. Vezmar, and R. L. Whetten. Optical absorption spectra of nanocrystal gold molecules. *Journal of Physical Chemistry B*, 101(19):3706–3712, 1997. [→ Seite [97](#)]
- [125] A. C. Templeton, J. J. Pietron, R. W. Murray, and P. Mulvaney. Solvent refractive index and core charge influences on the surface plasmon absorbance of alkanethiolate monolayer-protected gold clusters. *Journal of Physical Chemistry B*, 104(3):564–570, 2000. [→ Seite [97](#)]
- [126] J. Sinzig, U. Radtke, M. Quinten, and U. Kreibig. Binary Clusters - Homogeneous Alloys and Nucleus-Shell Structures. *Zeitschrift fur Physik D-Atoms Molecules and Clusters*, 26(1-4):242–245, 1993. [→ Seite [103](#)]
- [127] J. Sinzig and M. Quinten. Scattering and Absorption by Spherical Multilayer Particles. *Applied Physics A-Materials Science and Processing*, 58(2):157–162, 1994. [→ Seite [103](#)]
- [128] D. J. Burton and J. I. Routh. *Essentials of Organic and Biochemistry*. W. B. Saunders, Philadelphia, 1974. [→ Seite [114](#)]

Publikationen

G. Raschke, S. Kowarik, T. Franzl, C. Sönnichsen, T. A. Klar, J. Feldmann, A. Nichtl, and K. Kürzinger. Biomolecular recognition based on single gold nanoparticle light scattering. *Nano Letters*, 3(7):935–938, 2003.

J. G. Müller, U. Lemmer, G. Raschke, M. Anni, U. Scherf, J. M. Lupton, and J. Feldmann. Linewidth-limited energy transfer in single conjugated polymer molecules. *Physical Review Letters*, 91(26):267403 1-267403 4, 2003.

J. Feldmann, T. Franzl, T. Klar, G. Raschke, C. Sönnichsen, S. Kowarik, A. Nichtl, and K. Kürzinger. Methods, Device and Instrument for Detection of Analytes. WO2004042403 A, 2004.

G. Raschke, S. Brogl, A. S. Susha, A. L. Rogach, T. A. Klar, J. Feldmann, B. Fieres, N. Petkov, T. Bein, A. Nichtl, and K. Kürzinger. Gold nanoshells improve single nanoparticle molecular sensors. *Nano Letters*, 4(10):1853–1857, 2004.

G. Raschke, S. Brogl, A. S. Susha, A. L. Rogach, T. A. Klar, J. Feldmann, B. Fieres, N. Petkov, T. Bein, A. Nichtl, and K. Kürzinger. Reply to Comment on 'Gold Nanoshells Improve Single Nanoparticle Molecular Sensors. *Nano Letters*, Web release date 18-Feb-2005, DOI: 10.1021/nl050130b.

J. Stehr, J. M. Lupton, M. Reufer, G. Raschke, T. A. Klar, and J. Feldmann. Sub-microsecond molecular thermometry using thermal spin flips. *Advanced Materials*, 16(23-24):2170-2174, 2004.

G. Raschke, T. A. Klar, J. Feldmann, A. Nichtl, and K. Kürzinger. Detection of low molecular weight analytes with Single Nanoparticle Light Scattering. *Manuskript in Vorbereitung*.

Vorträge

Molecular Recognition based on optical spectroscopy of single gold nanoparticles.

G. Raschke, S. Brogl, S. Kowarik, T. Franzl, C. Sönnichsen, A. S. Susa, A. L. Rogach, T. A. Klar, J. Feldmann, A. Nichtl und K. Kürzinger. 5th International Conference on Biological Physics (ICBP), Göteborg (Schweden), August 2004.

A single-nanoparticle biosensor based on light scattering spectroscopy.

G. Raschke, S. Brogl, S. Kowarik, T. Franzl, C. Sönnichsen, T. A. Klar, J. Feldmann, A. Nichtl und K. Kürzinger. DPG Frühjahrstagung, München (Deutschland), März 2004.

Single-nanoparticle light scattering spectroscopy used for biomolecular recognition.

G. Raschke, S. Kowarik, T. Franzl, C. Sönnichsen, T. A. Klar, J. Feldmann, A. Nichtl und K. Kürzinger. Photonics West (BiOS), San Jose (USA), Januar 2004.

Single-nanoparticle light scattering spectroscopy used for biomolecular recognition & Linewidth-limited energy transfer in single conjugated polymer molecules.

Seminarvortrag, Alivisatos Group, UC Berkeley and Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley (USA), Januar 2004.

A Single Gold Nanoparticle Sensor for Biomolecular Recognition.

G. Raschke, S. Brogl, S. Kowarik, T. Franzl, C. Sönnichsen, T. A. Klar, J. Feldmann, A. Nichtl und K. Kürzinger. CeNS-Workshop Keynote Topic: Transport in Nanosystems, Seon (Deutschland), September 2003.

Reduzierte Plasmonendämpfung in Gold-Nanostäbchen.

G. Raschke, C. Sönnichsen, T. Franzl, T. Wilk, O. Wilson, P. Mulvaney, G. von Plessen und J. Feldmann. DPG Frühjahrstagung, Regensburg (Deutschland), März 2002.

Drastic Reduction of Plasmon Damping in Gold Nanorods.

G. Raschke, C. Sönnichsen, T. Franzl, T. Wilk, G. von Plessen, J. Feldmann, O. Wilson und P. Mulvaney. Quantum electronics and laser science (QELS), Long Beach (USA), Mai 2002.

Metal Nanoparticles for Sensor Applications.

G. Raschke, C. Sönnichsen, T. Franzl, T. Wilk, G. von Plessen, J. Feldmann, O. Wilson und P. Mulvaney. SFB486 Workshop (Manipulation of Matter on the Nanometer Scale), Ringberg (Deutschland), April 2001

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand am Lehrstuhl für *Photonik und Optoelektronik* der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Bei allen, die mich in den letzten Jahren dabei unterstützt haben, möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jochen Feldmann, der dieses spannende und anwendungsnahe Promotionsthema an der Schnittstelle zwischen „Life-“ und „Nanoscience“ initiiert hat. Sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit, seine vielen wertvollen Anregungen und seine mitreißende Begeisterung für alles Neue habe ich sehr zu schätzen gelernt. Profitiert habe ich auch von exzellenten Forschungsbedingungen und den vielen Workshops und Konferenzen an denen ich teilnehmen und meine Arbeit präsentieren konnte.

Mein ausdrücklicher Dank gilt auch Herrn Dr. Thomas Klar, dessen Tür bei allen meinen Fragen stets offen stand. Seine guten Ideen haben viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besonders sein Know-how in der Mikroskopie und der Spektroskopie einzelner Nanopartikel haben mir oft weitergeholfen.

Hervorheben möchte ich auch die hervorragende Zusammenarbeit mit unseren Projektpartnern bei der Roche Diagnostics GmbH. Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Konrad Kürzinger und Herrn Dr. Alfons Nichtl bedanken, die während der gesamten Projektzeit als äußerst kompetente Ansprechpartner zur Verfügung standen und geduldig auf alle meine Fragen eingegangen sind. Die zahlreichen konstruktiven Diskussionen und Anregungen auf unseren Projektreffen und auch die vielen Telefonate „auf dem kleinen Dienstweg“ haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Natürlich gilt mein Dank dem kompletten Team bei Roche, insbesondere auch Frau Dr. Yvonne Markert und Herrn Dieter Spahn.

Darüber hinaus möchte ich Herrn Dr. Andrei Susha danken, der nicht nur die Gold-Nanoschalen synthetisiert hat, sondern genauso wie Dr. Andrey Rogach auch bei allen chemischen Belangen immer hilfsbereit war.

Danken möchte ich auch Thomas „Tom“ Franzl mit dem ich abwechselnd ins Mikroskopokular starrte um die Frage „Schiebt es oder schiebt es nicht?“ zu klären (es schob). Besonderen Dank haben auch Stefan Kowarik und Sandra Brogl für ihre zahlreichen Experimente mit verschiedenen Antikörpern, Antigenen und Puffern verdient.

Josef Müller hat den Extreme-Fun-Analyser programmiert, mit dem die Datenaus-

wertung wirklich „Fun“ war (die Zahl der Abstürze ist dramatisch geringer als bei handelsüblichen Tabellenkalkulationsprogrammen).

Nicht unerwähnt bleiben dürfen die vielen weiteren Personen des Lehrstuhls, mit denen ich eine tolle und besondere Zeit verbringen durfte. Namentlich möchte ich Jürgen Müller, Eric Dulkeith, Martin Reufer, Andreas Biebersdorf, John Lupton, Pavlos Lagoudakis („was über Kürbis morgen spielen, übliche Zeit, üblicher Platz?“), Carsten Sönnichsen, Moritz Ringler, Joachim Stehr und Florian Schindler erwähnen.

Für die erstklassige Unterstützung im Präparationslabor (und natürlich für die Kekse zum gemeinsamen Lehrstuhl-Kaffeetrinken) danke ich Anna Helfrich. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Werner Stadler, der mir nicht nur den einen und anderen Kniff an der Drehbank gezeigt hat, sondern der auch stets zur Stelle war, wenn irgendwo Not am Mann war. Bei Irmgard Beier, Gerlinde Adam, Stefan Niedermeier, Franz Meier und bei meinem „EDV-Administrator-Kollegen“ Christian Holopirek möchte ich mich ebenfalls für ihre Hilfe bei organisatorischen und technischen Belangen herzlich bedanken.

Schließlich danke ich der Bayerischen Forschungsstiftung, die im Rahmen des Forschungsverbundes ForNano diese Arbeit finanziell unterstützt und gefördert hat.

Last but not least, möchte ich mich bei meiner ganzen Familie, besonders aber bei meiner Frau Angelika, für ihre Unterstützung während der letzten Jahre bedanken.

