Biokonjugation und Selbstorganisation von Gold- und Halbleiter-Nanokristallen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

> vorgelegt von Andrea Schroedter aus Neumünster

November 2002

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physikalische Chemie der Universität Hamburg in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H. Weller angefertigt.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. H. Weller
- 2. Gutachter: Prof. Dr. K. Nagorny
- Disputation: 10. Dezember 2002

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Methodischer Teil	6
2.	1 Chemikalien	6
2.2	2 Instrumentelle Methoden	6
2 Pa	3 Spektrofluorimetrische Bestimmung der Aminogruppenkonzentration auf artikeloberflächen	10
3.	Experimentelle Durchführung	12
3.	1 Funktionalisierung von Nanopartikeln	12
3.2	2 Funktionalisierung von Nanopartikeln mit Biomolekülen	15
3.	3 Verknüpfung von Nanopartikeln über Amidbindung	20
3.4	4 Asymmetrische Funktionalisierung	21
4.	Ergebnisse und Diskussion	24
4.	1 Funktionalisierung von Nanokristallen	24
4.2	2 Funktionalisierung von Nanopartikeln mit Biomolekülen	38
4.	3 Verknüpfung von Nanopartikeln über Amidbindung	73
4.4	4 Asymmetrische Funktionalisierung	80
5.	Zusammenfassung	95
6.	Summary	97
Literatur		
Anhang		
A	Abkürzungsverzeichnis	A
B	Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge	B
С	Stukturformeln verwendeter Silane	H
D	Ergänzende Informationen zum Text	I
Ε	Danksagung	M
F	Lebenslauf	N
G	Erklärung	P

1. Einleitung

Die Nanowissenschaften haben während der letzten drei Jahrzehnte mit den zugehörigen Meßmethoden eine rasante Entwicklung erfahren. In der Molekularbiologie, Biochemie, Anorganik, Mikroelektronik Biotechnologie, Festkörperphysik, und in der Kolloidwissenschaft werden die nanometergroßen Strukturen aus unterschiedlichen Perspektiven betrachtet. Der Trend in diesem Gebiet geht zur Zeit dahin, Expertisen aus den die unterschiedlichen Disziplinen zusammenzuführen und verschiedenen Materialeigenschaften in neuen Anwendungen zu verbinden.

Die Kolloidwissenschaft im Speziellen beschäftigt sich mit der Präparation und Charakterisierung von Materialien, die aus Partikeln in der Größenordnung von wenigen Nanometern bestehen^[1-3]. Das Interesse gilt im besonderen Maße den Eigenschaften, die sich stark von denen der makrokristallinen Substanzen unterscheiden. Es kann beobachtet werden, daß die Lichtabsorption und –emission kolloidaler Halbleitermaterialien bei Unterschreitung eines bestimmten Größenbereichs, der bei ca. zehn Nanometern liegt, von der Partikelgröße abhängen. So können zum Beispiel kolloidale Cadmiumtelluridlösungen in verschiedenen Farben, die das gesamte sichtbare Spektrum überspannen, hergestellt werden. Der einzige Unterschied dieser Lösungen liegt in der Partikelgröße^[4, 5]. Das Phänomen wird als Größenquantisierungseffekt bezeichnet^[6-9].

Ein Erklärungsmodell des Größenquantisierungseffektes geht von den elektronischen Zuständen in einem makrokristallinen Halbleiter aus. Wird ein Elektron durch Lichtabsorption vom Valenzband in das leere Leitungsband angeregt, verbleibt im Valenzband eine positive Ladung, ein sogenanntes Loch. Dieses Elektron-Loch-Paar bildet bei Temperaturen nahe dem absoluten Nullpunkt aufgrund von Coulomb-Anziehung einen dem Wasserstoffatom ähnlichen Zustand, ist aber bei Raumtemperatur im Halbleiter frei beweglich. In einem nur wenige Nanometer großen Halbleiterkristallit wird die Ausdehnung des Elektron-Loch-Paares auf eine dem Exiton ähnliche Dimension begrenzt, was zusätzlich zur kinetischen und potentiellen Energie der Ladungsträger beiträgt. Der begrenzungsbedingte Energieanstieg der ersten exitonischen Anregung wird mit dem 'Teilchen-im-Kasten'-Modell verständlich.

$$E = E_G + \frac{h^2}{8m_e r^2} \left(\frac{1}{m^*(e^-)} + \frac{1}{m^*(h^+)} \right) - \frac{1.8 \cdot e^2}{4\pi \epsilon \epsilon_0 r}$$
(1)

Hierin ist *E* die Energie der Bandlücke des Halbleiterpartikels und E_G die Energie der Bandlücke im makrokristallinen Feststoff. Diese wird korrigiert durch den Term der kinetischen Energie von Elektron und Loch, in dem *h* das Plancksche Wirkungsquantum, m_e die Ruhemasse des Elektrons, *r* der Partikelradius und $m^*(e^-)$ die effektive Masse des Elektrons bzw. $m^*(h^+)$ die des Lochs ist. Im dritten, die Coulomb-Energie berücksichtigenden Term ist *e* die Elementarladung, ε die Hochfrequenz-Dielektrizitätskonstate, ε_0 die Dielektrizitätskonstante des Vakuums und *r* wiederum der Partikelradius.

Die kontinuierlichen Energiebänder gehen so in diskrete Energieniveaus über. Aufgrund der kinetischen Elektron-Loch-Paare höheren Energie der in einer quantisierten Halbleiterstruktur, dargestellt im zweiten Term von Gleichung (1), ist die niedrigste elektronische Anregung gegenüber der des makrokristallinen Halbleiters (E_G) zu höheren Energien verschoben. Demnach ist die Bandlücke des größenquantisierten Nanokristalls größer als die des Festkörpers. Entsprechend den Kehrwerten der effektiven Massen von Elektron und Loch ist im Allgemeinen der Einfluß der räumlichen Begrenzung auf die energetische Lage des Leitungsbandes stärker als auf die des Valenzbandes. Die Coulomb-Wechselwirkung ist im dritten Term berücksichtigt. Sie erzeugt eine Verringerung der so berechneten Übergangsenergie, ist aber dem Betrag nach kleiner als der kinetische Term.



Abbildung 1 Schematische Darstellung der energetischen Zustände beim Übergang vom aus wenigen Atomen bestehenden Molekül zum Festkörper.

Die durch Verringerung der Partikelgröße auftretenden energetischen Veränderungen an den Grenzen der Bandkante sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Diesem Schema liegt ein anderer Erklärungsansatz zugrunde, bei dem die Linearkombinationen von Atomorbitalen unter Aufspaltung zu Molekülorbitalen letztendlich zu kontinuierlichen Bändern führt (tight-binding-Modell)^[10, 11]. Die Bandlücke wird durch das energetisch höchste besetzte Molekülorbital (HOMO) und das niedrigste unbesetzte Molekülorbital (LUMO) begrenzt. Die Darstellung veranschaulicht die Aufweitung der Bandlücke mit Verringerung der Atomanzahl, bzw. Molekülorbitalanzahl eines Halbleiternanopartikels, das im Grenzbereich zwischen molekularen und Festkörpereigenschaften liegt.

Metallnanopartikel besitzen ebenfalls größenabhängige optische Eigenschaften, die auf der Anregung der Plasmonenresonanz beruht. Das freie Elektronengas (Plasmon) von Metallen mit ihrer hohen Dichte freier Leitungselektronen kann zu longitudinalen Schwingungen angeregt werden, die sich im Absorptionsspektrum als Plasmonenabsorptionsbande zeigen. Ist die Partikelgröße kleiner als die freie Weglänge der Leitungselektronen im ausgedehnten Material, beeinflußt sie in erster Linie die Halbwertsbreite der Plasmonenabsorption. Einen Einfluß auf die energetische Lage der Plasmonenabsorption hat neben der Anzahl an freien Elektronen auch die dielektrische Umgebung der Partikel. Das Reflektionsvermögen von Metallen hängt von der Lage der Resonanzschwingung des freien Elektronengases ab. Auch angereicherte durch Dotierung mit Leitungselektronen Halbleiter zeigen eine Plasmonenresonanz. Aus diesem Effekt resultieren eine Vielzahl von Anwendungen, wie elektrochrome Gläser^[12], Wärmeschutzfenster^[13], die mit nanokristallinem Antimondotierten Zinndioxid beschichtet sind, das im Infrarotbereich reflektiert, oder Biacor-Geräte, mit denen über den Einfluß von Liganden auf die Plasmonenresonanz deren Bindungskinetiken untersucht werden. Die komplexe dielektrische Funktion und die Plasmonenresonanzfrequenz können über die Mie-Theorie berechnet werden^[14-17].

Nanometergroße Kristallite werden mit Hilfe lithographischer Verfahren, in Gasphase durch Laservaporisation oder in Lösung präpariert^[18].

Bei den naßchemischen Methoden erfolgt die Kolloidsynthese in zwei Schritten. Zunächst findet die Nukleation der Edukte zu Kristallisationskeimen statt. An diese schließt sich die Wachstumsphase an. Nach Verbrauch der Edukte können die Kolloide durch Ostwald Reifung oder Aggregation weiterwachsen^[19]. Liganden, die an der Partikeloberfläche adsorbieren, kommt hier eine doppelte Rolle zu. Sie schirmen die Oberfläche ab, was das weitere Partikelwachstum hemmt und halten die Partikel durch sterische Hinderung oder elektrostatische Abstoßung in Lösung. Das Partikelwachstum kann auch über die

Einschränkung des Reaktionsraumes, z.B. in Mizellen^[20, 21], reguliert werden. Die Liganden haben einen großen Einfluß auf die optischen und elektronischen Eigenschaften von Nanopartikeln, da sich abhängig von der Partikelgröße ein wesentlicher Anteil der Atome an der Oberfläche befindet.

Die Herstellung nanostrukturierter Bauteile durch Verkleinerung von Mikrosystemen mit photolithographischen oder Rastersondentechniken erfordert einen großen finanziellen und technischen Aufwand. Deshalb wächst neben diesen sogenannten 'Top-down'-Methoden das Interesse an biomimetischen, also biologische Strategien nachahmenden, 'Bottom-up'-Ansätzen, bei denen sich molekulare Bausteine zu nanodimensionierten und größeren Einheiten durch Selbstorganisation zusammenfügen. Bereits Anfang der 80er Jahre wurde vorgeschlagen, biologische Makromoleküle, wie Proteine und Nukleinsäuren, als Bausteine in einer molekularen Biotechnologie zu verwenden. Mitte der 90er Jahre wurden die Ideen auch für die Nanotechnologie entdeckt. DNA ist für diesen Einsatz geradezu prädestiniert. Dieses hochspezifische, nach einfachen Regeln Biopolymer besitzt programmierbare Erkennungseigenschaften und zusätzlich eine hohe physikalisch-chemische Stabiliät und mechanische Steifheit^[22]. Die enorme Spezifität, mit der sich zwei komplementäre Oligonukleotidstränge zu einer Doppelhelix zusammenfinden, kann zur präzisen räumlichen Anordnung von Bausteinen im Nanometermaßstab genutzt werden. 'I have always said and I still maintain today, that DNA is the quintessential building block for material synthesis' (Zitat Chad A. Mirkin)^[23].

Der Nanobiotechnologie^[24], welche die Herstellung biokompatibler Materialien und Bauelemente zum Gegenstand hat, kommt wegen ihrer Interdisziplinarität und ihrer industriellen Relevanz schon zum gegenwärtigen Zeitpunkt eine erhebliche Bedeutung zu. Dementsprechend gibt es derzeit eine weltweit rasante Entwicklung des noch jungen Forschungsgebietes an der Schnittstelle von Nano- und Biotechnologie. Die Nanotechnologie wird als eine der Basis- und Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts angesehen.

Zielsetzung

Diese Arbeit zielt auf die Entwicklung biokompatibler Nanopartikel, die genau an der Schnittstelle zwischen der Nanotechnologie und den Biowissenschaften Verwendung finden sollen. Der Partikelkern dient als funktionelle Einheit und kann aufgrund seiner materialabhängigen optischen und elektronischen Eigenschaften in verschiedenen Anwendungen, wie Markierung oder als Einelektronentransistor (single-electron-transistor SET) in elektronischen Schaltkreisen, eingesetzt werden. Die wesentliche Voraussetzung ist, die Partikel anordnen und gezielt positionieren zu können. Dies kann mit Hilfe von molekularen Erkennungsstrukturen erreicht werden, die an die Partikeloberfläche gebunden sein müssen oder durch templatartige Strukturen, an die die Partikel gebunden werden können. Entscheidend für die Herstellung solcher Konjugate ist die Entwicklung einer Oberflächenchemie der Nanopartikel, bei der die stabilisierenden Liganden fest mit der Partikeloberfläche verankert sind und funktionelle Gruppen besitzen, die selektiv für biochemische Kupplungen zur Verfügung stehen. Es sollen Strategien zur Biokonjugation von Nanopartikeln mit Oligonukleotiden und anderen Biopolymeren entwickelt werden. Die so dargestellten Nanopartikel und Konjugate sollen in Lösung organisiert werden.

2. Methodischer Teil

2.1 Chemikalien

Alle benutzten Chemikalien waren vom höchsten verfügbaren Reinheitsgrad und wurden von Merck, Sigma, Aldrich, Fluka, Pharmacia, Molecular Probes, Roche und ABCR bezogen. Silane und andere feuchtigkeitsempfindliche Substanzen wurden unter Stickstoff in einer Glovebox gelagert. Kleine Arbeitsmengen wurden in mit Septen verschlossene Fläschchen

umgefüllt und die Substanz mit Spritzen entnommen.

FITC-markiertes Avidin wurde über Gelfiltration mit einer Sephadex G-50-Säule von ungebundenem FITC gereinigt.

Das verwendete destillierte Wasser war zusätzlich über eine Millipore-Anlage gereinigt und wies einen spezifischen Widerstand von 18,2 MΩcm auf.

2.2 Instrumentelle Methoden

2.2.1 Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsspektren von kolloidalen Lösungen wurden mit einem Cary 50 conc Einstrahlspektrometer der Firma Varian aufgenommen. Die Messungen erfolgten in Quarzküvetten mit einer optischen Weglänge von 1 cm jeweils gegen das entsprechende Lösungsmittel als Referenz.

Die Absorptionsspektren von Zinkoxidschichten wurden bei zentraler Position in einer Ulbrichtkugel mit einem Cary 500 Zweistrahlspektrometer der Firma Varian vermessen.

2.2.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Aufnahme von Fluoreszenzspektren wurde mit einem FluoroMax-2 ISA Instruments Inc. durchgeführt. Die Emissionsspektren wurden im Allgemeinen ohne optische Filter in einer Fluoreszenz-Quarzglasküvette von 1 cm Schichtdicke gemessen.

Für quantitative Bestimmungen von Fluorescamin oder FITC-Avidin wurden Eichreihen im entsprechenden Konzentrationsbereich angefertigt.

2.2.3 Infrarotspektroskopie

Fouriertransformierte Infrarotspektren wurden mit einem Brucker FT-Infrarotspektrometer Typ Equinox 55 gemessen, das mit einer Meßgeometrie für abgeschwächte Totalreflektion (atr) ausgestattet ist. Die Kolloide wurden nach intensiver Reinigung gefällt und abhängig vom Material bei 40-60°C getrocknet. Die festen Proben wurden auf der Kristalloberfläche der atr-Einheit angepreßt. Mit der atr-Einheit können auch sehr kleine Mengen (~0,5 mg) auch farbigen Niederschlags vermessen werden. Ein beheizbarer Probenteller erlaubt temperaturabhängige Messungen bis 200°C.

2.2.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Gerät der Firma Phillips, Modell CM 300 UT mit einer LaB₆-Kathode, bei 300 kV Beschleunigungsspannung angefertigt. Die Bilder wurden mit einer gekühlten CCD-Kamera vom Typ Gatan 694 aufgenommen. Über einen eingebauten EDX-Detektor der Firma EDAX wurden durch ein SUTW (super ultra thin window) Röntgenfluoreszenzanalysen von kleinen Bereichen der Probe gemacht. Als Probenträger dienten 400 Mesh-Kupfernetzchen der Firma Plano, die mit Kohlenstoffilm belegt wurden. Für die Belegung der Grids mit alkoholischen Proben wurden 20 µl der Kolloidlösung auf das Netzchen aufgetragen, das überschüssige Lösungsmittel mit einem Filterpapier abgezogen und das Lösungsmittel abgedampft. Im Falle von wäßrigen Kolloidlösungen wurde aufgrund der geringeren Benetzung das Grid für fünf Minuten auf einem Tropfen Lösung abgelegt. Anschließend wurde das Grid abgehoben und die überschüssige Lösung mit einem Filterpapier abgezogen.

2.2.5 Raster Kraft Mikroskopie (AFM)

Die Struktur von Partikel-DNA-Konjugaten wurden durch rasterkraftmikroskopische Messungen im Tapping-Mode charakterisiert. Dazu wurden 7 µl Probenlösung auf ein mit 50 mM Magnesiumchloridlösung behandeltes Glimmerplättchen (Mica) getropft. Das belegte Substrat wurde einmal mit Wasser gespült. Aufnahmen wurden mit einem digitalalen Instrument Dimension 3100 SPM System, das mit einem NanoScope IV Controller und Olympus "OMCL-AC160TS Micro Cantilever" ausgestattet ist, angefertigt.

2.2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden mit einem Zeiss Axioplan 2 Imaging Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, das mit einer Zeiss AxioCam HRC Kamera ausgestattet ist. Die Anregung erfolgte mit einer Xenon-Lampe HBO 100.

2.2.7 Pulver-Röntgendiffraktometrie (XRD)

Die Pulver-XRD-Messungen wurden mit einem Brucker AXS D8 advanced und einem Phillips X'Pert PRO Diffraktometer durchgeführt, die mit Kupferkathoden ausgestattet sind. Als Meßstrahlung wurde die Cu-K_{α}-Linie mit einer Wellenlänge von $\lambda = 0,154$ nm verwendet.

Zur Probenpräparation wurden die konzentrierten Kolloidlösungen auf einem einkristallinen Siliziumträger eingetrocknet oder die gemörserten Pulver auf einen Pulverträger gegeben.

Die Reflexhalbwertsbreite $\beta_{1/2}$ ist über die Debye-Scherrer-Formel mit dem Kristallitdurchmesser d_p verknüpft:

$$d_p = \frac{57.3 \,\lambda \,K}{\beta_{1/2} \,\cos\theta} \tag{3}$$

Hierin stellt λ die Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung, *K* den Formfaktor (0,89 für sphärische Partikel), $\beta_{1/2}$ die Reflexgesamtbreite auf halber Höhe in Grad (20) und θ die Reflexlage in Grad dar.

Nahordnungsreflexe im Kleinwinkelbereich können Informationen über periodische Distanzen *d* innerhalb einer Überstruktur liefern. Diese können über die Bragg-Bedingung berechnet werden,

$$d = \frac{n \cdot \lambda}{2 \cdot \sin \theta} \tag{4}$$

wobei *n* für die Reflexordnung steht, die im Allgemeinen '1' ist, λ die Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung und θ die Lage des Reflexes in Grad beschreibt.

2.2.8 Photokatalytische Reduktion

UV-Bestrahlungen wurden unter Stickstoffschutzgas mit einer 450 W HgXe-Lampe durchgeführt. Die Infrarotstrahlung wurde durch eine vorgeschaltete Wasserküvette mit 15 cm Schichtdicke absorbiert.

2.2.9 Chromatographische Methoden

Gelelektrophorese^[25, 26]

Der Ausdruck Elektrophorese wird gebraucht, um die Wanderung von geladenen Partikeln unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes zu beschreiben. Übliche Anwendungen der Elektrophorese sind qualitative Charakterisierungen von Substanzgemischen in Hinblick auf Reinheitskontrollen, qualitative Bestimmungen der Nettoladung und präparative Zwecke. Hierfür existieren eine Vielzahl verschiedener Elektrophoreseanordnungen (in freier Lösung: Kapillarelektrophorese, micellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC); in fester Matrix: horizontale und vertikale Gelelektrophorese).

In einer Gelelektrophorese hängt die Mobilität, die als gewanderte Distanz pro Zeit definiert ist, von der Ladung und der Größe der Partikel ab. Durch Einstellung des Vernetzungsgrads bzw. der Dichte des Gels und des pH-Wertes der mobilen Phase können für die jeweilige Anwendung geeignete Auftrennungsbedingungen gefunden werden.

Es wurde eine horizontale Elektrophoresekammer mit Kühlung verwendet. Diese kann sowohl analytisch als auch präparativ genutzt werden und die sich entwickelnde Wärme kann abgeführt werden. Agaroseelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung und Reinigung von DNA- und RNA-Fragmenten und wird auch für die Analyse von Proteinen verwendet. Da Agarosegele als geliertes Polysaccharid keinen definierten Vernetzungsgrad besitzen, ist der Einfluß der Nettoladung auf die Trennleistung größer als der der Partikelgröße.

Für die Gelelektrophorese von silikatbeschichteten Gold- und CdTe-Kolloiden sowie von Biomolekülkonjugaten haben sich Agarosegele mit einer 0,7-1%igen Dichte in 10 mM Pufferlösungen bewährt. Es wurden 1,75-2,5 g Agarose in 250 ml 10 mM Pufferlösung (pH 7) eingerührt, unter Rückfluß aufgekocht und bei einer Temperatur von 50°C auf den Träger gegossen.

Die kolloidalen Lösungen wurden ohne Beladungspuffer in die $60 \mu l$ großen Taschen gegeben. Es wurde bei einer Spannung von 100 V und einem Stromfluß von 35-40 mA gearbeitet.

Die DNA wurde mit Ethidiumbromid visualisiert, das nach Interkalation in die DNA eine rote Fluoreszenz zeigt. Dafür wurde eine Lösung aus 50 µl 1%iger Ethidiumbromidlösung und 50 ml Wasser auf das Gel gegeben und 15 min auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden das Gel mit Wasser gespült.

Die Ergebnisse wurden mit einer Digitalkamera dokumentiert. Lumineszenzbilder wurden unter Anregung bei 254 nm mit einem Grünglas 475-Filter aufgenommen.

Isolation von Banden:

Das Gel wurde in Laufrichtung vor der zu isolierenden Bande über die Breite der Bande bis auf den Grund eingeschnitten. Ein entsprechend breites, trockenes Stück Glasmikrofaserfilter (Whatman GF/C, #1822021) wurde in den Schlitz gesteckt und dahinter ein entsprechend geschnittenes, einlagiges Stück trockene Dialysemembran geschoben. Das Filter und die Dialysemembran wurden mit 50 μ l des Laufpuffers befeuchtet und die Spannung wieder angelegt.

Sobald die Bande in das Filter gelaufen war, wurde erst das Filter und obenauf der Dialyseschlauch in ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß ohne Deckel gesteckt, das zuvor am Boden mit einer Kanüle durchstochen wurde. Dieses wurde in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß ohne Deckel gestellt und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Im größeren Eppendorf-Reaktionsgefäß befand sich anschließend die isolierte Fraktion mit einem Volumen von ca. 50 μ l.

Gelpermeationschromatographie (GPC)/Größenausschlußchromatographie (SEC)

Die Gelpermeationschromatographie ist eine 'High Performance Liquid Chromatography' (HPLC) Methode unter Verwendung einer Säule, die eine poröse Polymermatrix enthält. Die Substanzen können entsprechend ihrer Größe und Form in die Poren des Säulenmaterials mehr oder weniger gut eindringen und haben dadurch unterschiedliche Verweilzeiten auf der Säule.

Es wurden Nucleogel GFC 1000 und Nucleogel GFC 4000-Säulen von Macherey-Nagel verwendet, die eine gekörnte hydrophile Gelmatrix mit einem Porendurchmesser von 100 nm bzw. 400 nm enthalten. Dieses Säulenmaterial wird für analytische und präparative Aufreinigung von Proteinen, DNA, Polysacchariden und anderen hydrophilen Polymeren eingesetzt.

Die Chromatogramme wurden mit einem UV-Detektor bei 254 nm aufgenommen.

2.3 Spektrofluorimetrische Bestimmung der Aminogruppenkonzentration auf Partikeloberflächen

Fluorescamin ist ein sehr spezifisches Reagenz zur Bestimmung von primären Aminen im picomolaren Konzentrationsbereich. Die Spiroverbindung bildet mit primären Aminen ein analoges Fluorophor wie Ninhydrin-Phenylacetat, zeigt aber im Gegensatz zum Ninhydrin-Nachweis eine vergleichsweise geringe Fluoreszenz mit Ammoniak. Seine Reaktion mit Aminen, in Abbildung 2 dargestellt, findet bei Raumtemperatur in wäßrigem Medium nahezu instantan statt. Das Produkt ist intensiv fluoreszierend ($\lambda_{ex,max} = 390$ nm, $\lambda_{em,max} = 475$ nm), wohingegen die Hydrolyseprodukte nicht fluoreszieren[27, 28].



Abbildung 2 Schema der Reaktion von Fluorescamin mit primären Aminen und Hydrolyse des Reagenz bei pH 9. Die Halbwertszeiten sind angegeben^[27].

Zu jeweils 600 μ L der intensiv gereinigten Kolloidlösungen wurden 400 μ L H₂O, 1 mL 50 mM Boratpuffer (pH 9) und 100 μ L einer Fluorescaminlösung (2,8 mg in 1 ml Aceton) gegeben und 30 min gerührt. Absorptionsspektren und Emissionsspektren (λ ex = 390 nm) wurden von den auf 1/5 verdünnten Lösungen aufgenommen. Der Vergleich der Intensitäten mit denen von Eichkurven lieferte Informationen über die Aminkonzentrationen auf der Partikeloberfläche.

3. Experimentelle Durchführung

3.1 Funktionalisierung von Nanopartikeln

3.1.1 Präparation von silikatbeschichteten Gold-Nanopartikeln

Für die Synthese der mit 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan (Ligand 1, siehe Abbildung I im Anhang) stabilisierten Gold-Nanopartikel wurde KAuCl₄ in Gegenwart von Verbindung 1 mit NaBH₄ reduziert. Dafür wurde 1,5 mg (4 μ mol) KAuCl₄ zuvor in 80 μ l H₂O und dann in 20 ml iso-Propanol gelöst, unter Rühren 0,58 μ l (3 μ mol) Ligand 1 und 0,5 mg (14 μ mol) NaBH₄ (in 140 μ l H₂O gelöst) zugegeben.

Im nächsten Schritt wurde die Oberfläche der entstandenen 2,2 nm großen Gold-Kolloide in Anwesenheit verschiedener Alkoxysilane kondensiert.

Für die Aminofunktionalisierung wurden jeweils zu einem 20 ml Reaktionsansatz x µl 3-Aminopropyldimethylethoxysilan (Verbindung 3) (x µl (entspricht c(3)im Reaktionsansatz); $0,01 \ \mu l \ (2,7 \ \mu M)$; $0,1 \ \mu l \ (27 \ \mu M)$; $1 \ \mu l \ (270 \ \mu M)$; $10 \ \mu l \ (2,7 \ m M)$) mit tockenem N,N-Dimethylformamid (DMF) jeweils auf ein Volumen von 10 µl verdünnt, 40 µl (46 µmol) 50%ige methanolische Lösung von N-Trimethoxysilylpropyl-N,N,Ntrimethylammoniumchlorid (Verbindung 4) und 1,5 ml (20 mmol) 25% ige Ammoniaklösung zugegeben und 16 Stunden gerührt. Der resultierende kolloidale Niederschlag wurde jeweils dreimal in Propanol gewaschen und in 10 ml H₂O gelöst. Von den gereinigten kolloidalen Lösungen wurde die Anzahl der Aminogruppen bestimmt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Oberfläche der Goldpartikel vor dem Kondensationsschritt mit 2-Mercaptoethanol geschützt. Direkt nach dem Reduktionsschritt wurde zu je 20 ml Kolloidlösung x μ l 2-Mercaptoethanol (x μ l (entspricht c im Reaktionsansatz); 0,14 μ l (100 μ M); 0,42 μ l (300 μ M); 0,84 μ l (600 μ M); 1,26 μ l (900 μ M)) zugefügt und dann mit 10 μ l (54 μ mol) Verbindung **3** und 1,5 ml (20 mmol) 25% iger Ammoniaklösung kondensiert. Die dargestellten Kolloide wurden wie oben gereinigt und in 10 ml H₂O gelöst.

In einem Vergleichsexperiment wurde den fertigen Kolloidlösungen nach Präparation der Hülle entsprechende Mengen 2-Mercaptoethanol zugesetzt und die Anzahl der Amminogruppen bestimmt. Es wurde keine Erhöhung festgestellt.

Die Synthese der negativ geladenen, aminofunktionalisierten Gold-Nanokristalle wurde in Methanol durchgeführt. Die Reduktion erfolgte mit gleichen Mengen wie oben beschrieben. Danach wurde nacheinander unter Rühren 45 μ l (100 μ mol) 42% ige wäßrige Lösung von 3-Trihydroxysilylpropylmethylphosphonat (Verbindung 5), 10 μ l (54 μ mol) Silan 3, 500 μ l H₂O und 500 μ l (1,1 mmol) 25% ige methanolische Lösung von Tetramethylammoniumhydroxid zugegeben und 25 min unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurden 26 μ l (200 μ mol) Trimethylchlorosilan zugegeben und erneut 10 min unter Rückfluß gekocht. 5 ml der resultierenden klaren Lösung wurden mit 1,5 ml H₂O am Rotationsverdampfer auf 1 ml eingeengt und über eine Sephadex G-25-Säule gereinigt.

3.1.2 Präparation von silikatbeschichteten CdTe-Nanopartikeln

Die Darstellung von cysteaminstabilisierten CdTe-Nanokristallen erfolgte nach einer von K. Hoppe^[29] modifizierten Präparationsvorschrift für thioglykolsäurestabilisierte CdTe-Nanokristalle von Gao et al ^[30].

Synthese von cysteaminstabilisierten CdTe Nanokristallen

1,97 g (4,7 mmol) Cd(ClO₄)₂*6 H₂O wurden in einem 500 ml Zweihalskolben mit Hahn in 250 ml bidestilliertem Wasser gelöst. 0,88 g (11,5 mmol) Cysteamin wurden zugegeben. Die Lösung wurde bei ihrem pH-Wert von 5,5 belassen. Anschließend wurde die Lösung 30 min mit Argon gespült. Alle weiteren Präperationsschritte wurden unter Argon-Atmosphäre durchgeführt. Langsam und unter starkem Rühren wurden 44 ml einer frisch präparierten NaHTe-Lösung bei Raumtemperatur durch ein Septum injiziert. Nach Zugabe wurde die Lösung ca. 45 min weitergerührt. Die CdTe-Nanokristalle wurden ca. 1 h unter Rückfluß gekocht, je nach gewünschter Größe wurde die Zeit variiert. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung am Rotationsverdampfer auf die Hälfte eingeengt und in einem Dialyseschlauch (Servapor, regenerierte Cellulose, MWCO 12000-14000) gegen 51 bidestilliertes Wasser dialysiert. Diese Lösung wurde mit Perchlorsäure auf pH 5,5 eingestellt und im Dunkeln bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Silikatbeschichtung der CdTe Nanokristalle

5 ml der intensiv dialysierten CdTe-Kolloidlösung (analytische CdTe-Konzentration ca. 10 mM) wurden durch Zugabe von 50 mg NaCl, 2 ml 2-Propanol und 50 μ l 1 M NaOH gefällt und 2 min bei 2700 rpm (660 g) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 500 μ l einer 10 mM methanolischen Lösung von Silan 1 suspendiert, durch Zugabe von 16 μ l (80 μ mol) und 10 μ l Tetramethylammoniumhydroxid (25% ig in Methanol) im Ultraschallbad gelöst und

zügig mit 4,5 ml Methanol verdünnt. Nach Zugabe von 40 ml Methanol wurde der Ansatz 10 min unter Rückfluß in einem 100 ml Zweihalskolben, der mit einem Septum versehen war, gekocht. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, wurden unter starkem Rühren 100 µl (0,45 mmol)Tetraethoxysilan (TEOS), 2 mlWasser und 1 ml(2,2 mmol)Tetramethylammoniumhydroxid (25% ig in Methanol) ins Septum injiziert und für 10 min unter Rückfluß gekocht. Jeweils zur abgekühlten Lösung und erneuten 10 min Sieden wurden in zwei Schritten 100 µl (0,45 mmol) und 50 µl (0,22 mmol) TEOS injiziert. Dann wurden 225 µl (500 µmol) Silan 5 (42%ig in Wasser) und 50 µl (270 µmol) Silan 3 zugegeben und für 30 min unter Rückfluß gekocht. Nach 20 min wurden weitere 50 µl (270 µmol) Silan 3 in die kochende Lösung injeziert. Nach dem Abkühlen wurden 26 µl (200 µmol) Trimethylsilylchlorid zugegeben und für 2 min unter Rückfluß gekocht. Nach 16 h Rühren unter Lichtausschluß wurde die Lösung aufgearbeitet. Dafür wurden 38 ml kolloidale Lösung mit 7 ml Wasser auf 5 ml am Rotationsverdampfer (40°C, 150 mbar) eingeengt und über Gelfiltration mit Sephadex G-25-Säulen (NAP-10, Pharmacia) gereinigt. Die Eluation wurde mit verschiedenen wäßrigen Lösungen vorgenommen.

Die Beschichtung von CdTe-Kolloiden wurde auch ohne den Beschichtungsschritt mit TEOS, aber in allen anderen Schritten identisch, durchgeführt.

3.1.3 Präparation von wasserlöslichen CdSe-Nanopartikeln

Eine der meist etabliertesten Synthesekonzepte für kristalline, kolloidale II-VI-Halbleiter-Nanopartikel ist die Dekomposition organometallischer Ausgangsverbindungen in einer Mischung aus hochsiedendem, koordinierend wirkenden Trioktylphosphin und Trioktylphosphinoxid (TOP/TOPO)^[31].

Die CdSe-Nanokristalle wurden entsprechend der Literatur^[32, 33] über eine Organometall-Synthese in einem hochsiedenden Lösungsmittelgemisch aus Hexadecylamin und Trioktylphosphin präpariert.

Die CdSe-Nanokristalle aus 1 ml frisch präparierter Lösung wurden mit Methanol gefällt und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde unter Ultraschallbehandlung in 5 ml 20 mM *N*,*N*-Dimethyl-mercaptoethylammoniumchlorid-Lösung in Wasser gelöst.

3.1.4 Präparation von carboxylfunktionalisierten Gold-Nanopartikeln

Carboxylfunktionalisierte Gold-Nanopartikel wurden durch Stabilisierung der Oberfläche mit dem bifunktionellen Liganden 11-Mercaptoundecansäure präpariert. Es wurden Kolloidlösungen mit verschiedenen Gold/Stabilisator-Verhältnissen dargestellt, wobei nur die Stabilisatorkonzentration im Reaktionsansatz variiert wurde.

Zu jeweils 19 ml Propanol wurden unter Rühren sukzessiv x μ l 10 mM 11-Mercaptoundecansäure-Lösung in Propanol (x μ l (Gold/Stabilisator-Verhältnis); 200 μ l (2,0); 300 μ l (1,5); 400 μ l (1,0); 800 μ l (0,5); 1600 μ l (0,25)), 80 μ l 50 mM wäßrige K[AuCl₄]-Lösung (4 μ mol) und 280 μ l 100 mM NaBH₄-Lösung (28 μ mol) gegeben und für weitere 3 min gerührt. Der sich bildende Niederschlag wurde über Nacht abgesetzt, mit 10 ml 2-Propanol gewaschen und in 10 ml Wasser gelöst.

3.2 Funktionalisierung von Nanopartikeln mit Biomolekülen

3.2.1 Biotinylierung von silikatbeschichteten Gold Nanopartikeln

Die positiv geladenen, aminofunktionalisierten Goldkolloide aus einem 20-mL-Ansatz, die mit einer Mischung aus 10 μ L Verbindung **3** und 40 μ L Verbindung **4** kondensiert wurden, wurden in 3 mL H₂O gelöst und intensiv gegen einen 5 mM K₂HPO₄-Puffer pH 7 dialysiert. 0,7 mg (1,5 μ mol) Succinimidyl 6-[biotinamido]hexanoat wurden unter Schutzgas in 140 μ L trockenem DMF gelöst und unter Rühren zur kolloidalen Lösung gegeben. Nach 14 Stunden wurde die klare Lösung mittels Dialyse gereinigt.

Die quantitative Bestimmung der Aminogruppen vor und nach der Biotinylierung diente als Hinweis für die Biotinylierung und ergab eine Belegung von durchschnittlich 2 Biotingruppen pro Partikel.

Nachweis der Biotinylierung über die Konjugation mit Avidin

Die Biotinylierung der Goldkolloide wurde durch die Konjugation der Partikel mit Avidin nachgewiesen.

Für eine Experimentserie mit unterschiedlichen Partikel/Avidin-Verhältnissen wurden x μ L der gereinigten Lösung biotinylierter Kolloide (x μ l (Partikel/Avidin-Verhältnis); 7,5 μ l (0,25), 15 μ l (0,5); 30 μ l (1); 75 μ l (2,5); 150 μ l (5); 300 μ l (10)) mit H₂O auf 300 μ l

aufgefüllt und 15 µl einer FITC-Avidin-Lösung (0,15 mg Protein/ml) zugegeben und für 20 min geschüttelt.

Die Mischungen wurden jeweils mit H_2O auf 3 ml aufgefüllt und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Von den Überständen wurden Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm aufgenommen.

Eine identische Experimentreihe wurde mit den gleichen jedoch unbiotinylierten Partikeln durchgeführt.

3.2.2 Biotinylierung von silikatbeschichteten CdTe Nanopartikeln

6 ml kolloidale CdTe-Lösung wurden 16 h nach der Silikatbeschichtung mit 1,5 ml Wasser am Rotationsverdampfer auf 1 ml eingeengt und über eine NAP-10 Sephadex G-25-Säule mit Wasser, das zuvor mit Tetramethylammoniumhydroxid auf pH 8 eingestellt wurde, eluiert. Zu 800 μl der gereinigten Kollidlösung wurden 200 μl 100 mM Phosphatpuffer (pH 7) und 1 mg (2,2 μmol) Succinimidyl 6-[biotinamido]hexanoat, das frisch unter Schutzgas in 50 μL trockenem DMF gelöst wurde, gegeben. Der Reaktionsansatz wurde im Dunkeln über Nacht gerührt und anschließend wie oben über eine Sephadex G-25-Säule vom ungebundenen Biotin gereinigt.

Nachweis der Biotinylierung über die Konjugation mit Avidin

Der Nachweis der Spezifität der Konjugation von biotinylierten CdTe-Nanopartikeln mit Avidin im Vergleich zu den unbiotinylierten Ausgangpartikeln erfolgte über eine gelelektrophoretische Charakterisierung.

80 μl FITC-Avidin-Lösung (1,5 mg Protein/ml) wurden über eine Sephadex G-50 Quick-Spin-Säule (Roche) von ungebundenem Fluorescein gereinigt. 30 μl Lösung der biotinylierten und 30 μl der unbiotinylierten CdTe-Kolloide wurden jeweils mit 15 μl FITC-Avidin-Lösung 30 min inkubiert. Anschließend wurden die beiden Mischungen und die reinen Komponenten auf ein 0,7% Agarosegel gegeben.

Lösliche Biokonjugate aus biotinylierten CdTe-Kolloiden und FITC-Avidin wurden präpariert, indem die CdTe-Kolloide bei der Konjugationsreaktion im großen Überschuß vorgelegt wurden. Dafür wurden jeweils $15 \,\mu$ l unterschiedlich konzentrierte FITC-Avidinlösung (1,5 mg Protein/ml; 0,75 mg/ml; 0,3 mg/ml und 0,06 mg/ml) zu jeweils $30 \,\mu$ l

biotinylierter CdTe-Kolloidlösung gegeben und sofort im Vortexer gerührt. Nach 1 h Inkubationszeit wurden die Konjugatlösungen neben den biotinylierten Kolloiden und dem FITC-Avidin als Referenz über Gelelektrophorese charakterisiert.

3.2.3 Konjugation von Nanopartikeln und thiolierter DNA

Die Aminogruppen auf den negativ geladenen silkatbeschichteten Kolloiden wurden mit einem heterofunktionellen Linker derivatisiert^[34]. Es wurde Succinimidyl-Bromoacetat verwendet, das auf der einen Seite einen mit Succinimid aktivierten Carbonsäureester trägt und auf der anderen Seite eine reaktive Bromoacetatgruppe, die selektiv Thiole bindet. Die Partikel wurden auf diese Weise mit thiolderivatisierten einsträngigen Oligonukleotiden unterschiedlicher Länge (20 Basen und 100 Basen) verknüpft.

Präparation von Konjugaten aus Goldpartikeln und DNA

1 ml der zuvor beschriebenen negativ geladenen, silikatbeschichteten Goldkolloide wurden über eine NAP-10 Sephadex G-25-Säule mit 5 mM K₂HPO₄-Puffer (pH 7) gereinigt.

Zu 1 ml auf 8°C gekühltem Eluat wurden 2 mg (8,5 µmol) Succinimidyl-Bromoacetat gegeben, das zuvor frisch unter Schutzgasatmosphäre in 200 µl trockenem DMF gelöst wurde. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die klare, dunkelbraune Lösung über eine NAP-10-Säule erneut gereinigt. 7 nmol thiolierte einsträngige (100b)DNA wurden über eine NAP-10-Säule gereinigt, zum modifizierten Kolloid gegeben und über Nacht gerührt.

Die Bildung der Konjugate wurde mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. $300 \ \mu$ l der Konjugat-Lösung wurden auf $30 \ \mu$ l eingeengt und im Vergleich mit den unkonjugierten Partikeln auf ein 1% iges Agarosegel gegeben (5 mM K₂HPO₄-Puffer als Laufmittel, Glycerin als Beladungspuffer, 100V). Die isolierten Fraktionen wurden mit dem AFM charakterisiert.

Präparation von Konjugaten aus CdTe-Partikeln und DNA

800 μ l negativ geladener, silikatbeschichteter CdTe-Kolloidlösung, die zuvor über eine NAP-10 Sephadex G-25-Säule gereinigt worden waren, wurden mit 50 μ l 100 mM K₂HPO₄-Puffer auf pH 7 eingestellt. Unter Rühren wurden 1,85 mg (10 μ mol) 2-Iodacetamid, das zuvor frisch in 50 μ l DMF gelöst wurde, zugegeben und 5 min inkubiert. Dann wurden 3,8 mg Succinimidyl-Bromoacetat (16 μ mol) unter Stickstoffatmosphäre frisch in 50 μ l trockenem DMF gelöst, zur Kolloidlösung gegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Unterdessen wurden 57 nmol eines thiolierten (20b)Oligonukleotids in 1 ml Wasser gelöst und zeitgleich mit der Kolloidlösung wurden beide Lösungen über NAP-10 Sephadex G-25-Säulen mit Wasser eluiert und sofort gemischt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht gerührt.

Die Charakterisierung erfolgte über Gelelektrophorese auf einem 0,5% igen Agarosegel in 10 mM K₂HPO₄-Puffer (pH7). Dafür wurden 500 μ l der Konjugatlösung am Rotationsverdampfer bei 40°C und 65 mbar auf 50 μ l eingeengt. Die Oligonucleotide wurden auf dem Gel nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid visualisiert.

Es wurden auf die gleiche Weise CdTe-Kolloide mit einem thiolierten (100b)Oligonukleotid (6 nmol) gekoppelt. Diese wurden ebenfalls über Gelelektrophorese unter gleichen Bedingungen charakterisiert und die isolierten Fraktionen im AFM untersucht.

Alle Partikel-DNA-Konjugatlösungen wurden dunkel und im Kühlschrank bei 2-8°C gelagert.

3.2.4 Konjugation von Nanopartikeln und DNA über Phosphoramidbindung

Die Konjugation von silikatbeschichteten CdTe-Kolloiden mit doppelsträgiger DNA über Phosphoramidbindung wurde nach einer für die Anwendung auf Kolloide modifierten Reaktionsvorschrift durchgeführt. Diese beschreibt die Umsetzung der 5'-Phosphatgruppe an der DNA mit Aminen ^[35].

20 µl doppelsträngige DNA (5 µg, 250bp DNA-Leiter von Roche), 1,25 mg (6 µmol) *N*-(3-Dimethylamino-propyl)-*N'*-ethyl-carbodiimid (EDC) und 2,5 µl (0,5 µmol) einer 0,2 M Imidazollösung pH6 (13,6 mg Imidazol, 200 µl 1 Salzsäure, 800 µl Wasser) wurden im Vortexer gemischt und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach der Zugabe von 10 µl (2 µmol) der gleichen Imidazollösung wurde die Lösung erneut im Vortexer gemischt und in einer Mikrodialysezelle 15 min gegen Wasser mit einem pH-Wert von 6,2 und 15 min gegen einen 1 mM Phosphatpuffer (pH 7) dialysiert. Anschließend wurden 20 µl der gereinigten silikatbeschichteten CdTe-Kolloidlösung (pH 8) zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt.

Die Konjugate wurden über Elektrophorese auf einem 0,7%igen Agarosegel in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7) gereinigt und die isolierten Fraktionen über AFM charakterisiert.

3.2.5 Ausrichtung von DNA im externen elektrischen Feld

DNA-Moleküle und DNA-Nanopartikel-Konjugate wurden in einer Mikroelektrodenstruktur im elektrischen Feld ausgerichtet. Die Manipulation der DNA in Lösung wurde in situ fluoreszenzmikroskopisch verfolgt. Für diesen Zweck wurde die DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert.

Die Elektrodenstrukturen mit 20 µm Elektrodenabstand wurden mit zwei verschiedenen Verfahren vorbehandelt. Sie wurden im Sauerstoffplasma 5 min gereinigt und entweder sofort für die Ausrichtung weiterverwendet oder nach der Plasmabehandlung mit einer 3%igen Polystyrollösung in Toluol beschichtet. Dafür wurde die gesamte Elektrodenstruktur mit der Polystyrollösung betropft, bis sie mit einem gleichmäßigen Flüssigkeitsfilm überzogen war. Die überschüssige Lösung wurde abgeschleudert (2 s bei 1000 rpm und 50 s bei 4000 rpm). Danach wurden die Elektroden auf einen Objektträger geklebt und kontaktiert.

Als Fluoreszenzfarbstoff wurde YoPro®-1 (4-[(3-Methyl-2(3H)-benzoxazolyliden)methyl]-1-[3-(trimethylammonium)propyl]diiodid, Molecular Probes) verwendet. YoPro®-1 bildet mit DNA eine fluoreszierende Interkalationsverbindung, deren Emissionsmaximum bei 505 nm liegt. Es wurde eine Stammlösung aus 0,5 μ l 1 mM YoPro®-1-Lösung im DMSO, 20 μ l 2-Mercaptoethanol und 480 μ l Millipore-Wasser hergestellt, die im Kühlschrank etwa eine Woche haltbar ist.

250bp DNA-Leiter (Roche) wurden mit Millipore-Wasser auf einen DNA-Gehalt von 5 mg/ml verdünnt. Die Konjugate aus silikatbeschichteten Gold-Nanopartikeln und thiolierten (100b)Oligonukleotiden (beschrieben in Kapitel 3.2.3) wurden gelelektrophoretisch gereinigt und nach der Isolation unverdünnt verwendet.

2 µl der DNA- bzw. Konjugat-Lösungen und 4 µl der YoPro®-1-Lösung wurden auf die vorbehandelten Elektrodenstrukturen getropft und mit einem Deckglas bedeckt.

Die fluoreszierende DNA wurde im Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung beobachtet. Es wurden sinusförmige Wechselspannungen angelegt, wobei die Frequenzen (100 kHz – 2 MHz) und die Peakspannungen (0 –100 V) variiert wurden.

3.2.6 Anordnung von wasserlöslichen CdSe-Nanopartikeln auf S-Schichten[36]

Die SbpA-S-Schicht wurde auf hydrophilisierten Siliziumträgern und mit einem Siliziumdioxidfilm belegten Kupfergrids rekristallisiert. Die geträgerten S-Schichten wurden unter Wasser bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die S-Schichten wurden für eine Stunde in der wäßrigen CdSe-Kolloidlösung (beschrieben in Kapitel 3.1.3) inkubiert und mit Wasser gewaschen.

Für die kovalente Anbindung von aminofunktionalisierten, silikatbeschichteten Gold-Nanopartikeln wurden die freien Carboxylgruppen der S-Schicht mit 1-Ethyl-3,3'-dimethylaminopropyl-carbodiimid (EDC) modifiziert (15 mg/ml in Wasser, pH 4,6, RT, 1 h). Die vorbehandelte S-Schicht wurde 1 h mit 100 µl der gereinigten Goldkolloidlösung (siehe Kapitel 3.1.1) inkubiert und anschließend vorsichtig mit Wasser gewaschen.

3.3 Verknüpfung von Nanopartikeln über Amidbindung

Die Amidbindung zwischen amino- und carboxylfunktionalisierten Nanopartikeln wurde mit Hilfe des wasserlöslichen Carbodiimids *N*-Cyclohexyl-*N'*-[2-(*N* methylmorpholino)ethyl]carbodiimid-4 (MMCDI) gebildet^[37, 38]. Für die interpartikuläre Verknüpfung wurden als carbonsäuretragende Komponente die 11-mercaptoundecansäurestabilisierten Gold-Nanopartikel mit einem Gold/Stabilisator-Verhältnis von zwei (beschrieben in Kapitel 3.1.4) und als amintragende Komponente die negativ geladenen, aminofunktionalisierten, silikatbeschichteten Gold-Nanopartikel (beschrieben in Kapitel 3.1.1) verwendet.

10 mg (24 µmol) MMCDI wurden frisch in 1 ml 10 mM Phosphatpuffer pH 5 Puffer gelöst und 2 ml Kolloidlösung der carboxylfunktionalisierten Goldpartikel zugegeben. Nach 5 min Rühren wurde die Lösung zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 2 ml 10 mM Boratpuffer (pH 9) gelöst. 1 ml Lösung der aminofunktionalisierten Komponente wurde zugegeben und der Reaktionsansatz für 90 min gerührt.

Ein Vergleichsexperiment wurde mit identischen Reaktionsschritten durchgeführt, jedoch wurde kein MMCDI zugefügt.

3.4 Asymmetrische Funktionalisierung

3.4.1 Präparation der ZnO-Carrier-Kolloide

Das ZnO-Kolloid wurde nach einer modifizierten Bahnemann-Synthese^[39, 40] in 2-Propanol dargestellt.

Präparation von Zinkoxid-Kolloide mit Lithiumhydroxid als Hydrolyseagens

80 ml 2-Propanol wurden 5 min unter Rückfluß gekocht. In das siedende Lösungsmittel wurden 219,5 mg ZnAc₂ · 2 H₂O (1 mmol) gegeben und weitere 2 min unter Rückfluß gekocht. Nachdem die Lösung bei RT etwas abgekühlt wurde, wurde sie für 10 min im Wasserbad und für ca. 2,5 h im Eisbad temperiert.

Zeitgleich wurden 67,1 mg LiOH \cdot H₂O (1,6 mmol) in 20 ml 2-Propanol suspendiert und durch 3 h Ultraschallbehandlung fast vollständig gelöst. (LiOH löst sich besser in kaltem Lösungsmittel!) Die im Eisbad abgekühlte LiOH-Suspension wurde langsam zur ZnAc₂-Lösung gegeben und für 1,5 h im Eisbad gerührt. Der Reaktionsansatz wurde dann für einige Tage bei Raumtemperatur gerührt.

Die ZnO-Partikel wurden im nächsten Syntheseschritt, der photokatalytischen Reduktion von Platin auf ZnO als kolloidale Lösung, nanokristalline Schicht oder getemperter Niederschag weiter verwendet.

Präparation von nanokristallinen ZnO-Schichten

Die ZnO-Schichten wurden auf Glas (Objektträger) oder für UV/vis-Spektren auf Korund abgeschieden.

Das Trägermaterial wurde vorbehandelt, indem es 5 min in 20%igem Extran gekocht, mit Millipore-Wasser gespült und mit Stickstoff gespattert wurde.

50 ml kolloidale ZnO-Lösung wurde am Rotationsverdampfer auf 10 ml eingeengt. In diese Lösung wurden die Träger jeweils 16x mit einer Hubgeschwindigkeit von 2,6 mm/s eingetaucht, getrocknet, 10 min bei 65°C und 5 min bei 200°C getempert.

Präparation von getempertem nanokristallinem Zinkoxidpulver

Zur ZnO-Lösung wurde soviel Wasser gegeben (> 5 Vol.%), bis eine Trübung einsetzte. In einem Scheidetrichter wurde über Schwerkraftfällung der Niederschlag von der Lösung abgetrennt, getrocknet und 5 min bei 200°C getempert.

Präparation von Zinkoxid-Kolloide mit Tetramethylguanidin als Hydrolyseagens^[41]

Um den Einfluß unterschiedlicher Basen auf die photokatalytische Reduktion von Platin auf Zinkoxid zu untersuchen, wurden auch Schichten aus Zinkoxid-Kolloiden präpariert, die mit einer organischen Base synthetisiert wurden.

1,1 g ZnAc₂ · 2 H₂O (5 mmol) wurden in 45 ml 2-Propanol suspendiert. Nach Zugabe von 6,25 ml Tetramethylguanidin (60 mmol) wurde der Reaktionsansatz 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Kolloidlösung wurde wie präpariert für Beschichtungen eingesetzt.

3.4.2 Photokatalytische Reduktion von Platin auf nanokristallinem ZnO

Die Photoplatinisierung von Zinkoxidkolloiden erfolgte in Anlehnung an eine für Titandioxid beschriebene Methode^[42].

Photoplatinisierung von kolloidalen Zinkoxidlösungen

20 µl (4 µmol) 0,2 M Hexachloroplatinsäure wurden in 4 ml Methanol gelöst. Es wurden 32 ml *tert*-Butanol und 4 ml Zinkoxidkolloidlösung zugegeben. Der Ansatz wurde in einer 40 ml-Quarzglasküvette mit Schutzgasanschluß 10 min entgast und anschließend 7 h mit einer 450 W HgXe-Lampe durch einen Weißglas 305-Kantenfilter bestrahlt.

Photoplatinisierung von nanokristallinen Zinkoxidschichten

12 μl (2,4 μmol) einer 0,2 M Hexachloroplatinsäure und 50 μl (50 μmol) 1 M Natronlauge wurden mit 12,5 ml Wasser und 12,5 ml *tert*-Butanol gemischt und in einer 25 ml-Bestrahlungsküvette durch 10 min Stickstoffdurchlüftung von gelöstem Sauerstoff und Kohlendioxid befreit. Die Zinkoxidschicht wurde in die Lösung in den Strahlengang der Bestrahlungsküvette gehängt und im kontinuierlicher Stickstoffstrom für 45 min mit einer 450 W HgXe-Lampe durch einen Weißglas 305-Kantenfilter bestrahlt.

Um den Einfluß von Lösungsmittel und Base auf die Effektivität des Abscheidungsprozesses von Platin auf dem Zinkoxid zu untersuchen, wurde die Präparation hinsichtlich dieser Faktoren variiert.

Photoplatinisierung von nanokristallinem Zinkoxidpulver

50 mg nanokristallines Zinkoxidpulver wurden in einer Lösung aus 120 μ l (24 μ mol) 0,2 M Hexachloroplatinsäure, 2,5 ml Methanol, 22 ml *tert*-Butanol und 200 μ l (200 μ mol) 1 M Natronlauge dispergiert und unter kontinuierlicher Stickstoffdurchlüftung für 2 h mit einer 450 W HgXe-Lampe durch einen Weißglas 305-Kantenfilter bestrahlt. Nach Absetzen des Platin-Zinkoxidpulvers wurde dieses bis zur weiteren Verwendung unter 2-Propanol gelagert.

3.4.3 Funktionalisierung

Die asymmetrische Funktionalisierung der Platinnanopartikel wurde in zwei von Reinigungsprozeduren unterbrochenen Schritten vorgenommen. Erst wurde die freie Hemisphäre mit einer festen Ligandenhülle versehen und anschließend das Zinkoxid in Anwesenheit von Stabilisatoren aufgelöst.

25 mg platinisiertes Zinkoxidpulver (halber Bestrahlungsansatz) wurden mit 20 ml 2-Propanol und 3,8 μ l (20 μ mol) Silan 1 20 min gerührt und 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 18 ml 2-Propanol aufgeschlemmt und mit 10 μ l (12 μ mol) 50%iger methanolischer Silan 4-Lösung, 25 μ l (135 μ mol) Silan 3 und 2 ml 25%iger Ammoniaklösung gerührt.

Zur Reinigung von überschüssigen Silanen wurde der Ansatz 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und der Niederschlag in 20 ml 2-Propanol suspendiert. Unter Rühren wurden sukzessiv 4 ml (40 μ mol) 10 mM propanolische 11-Mercaptoundecansäure und 450 μ l 1 M Salzsäure zugegeben. Der Niederschlag wurde bei 2000 rpm pelletiert, mit 20 ml 2-Propanol gewaschen und in 20 ml Wasser peptisiert. Bei Zugabe von 160 μ l 1 M Natronlauge lösten sich die Platinpartikel.

Es wurden Löslichkeitsexperimente im Lösungsmittel DMF, bei unterschiedlichen pH-Werten und Ionenstärken vorgenommen.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Funktionalisierung von Nanokristallen

Die Verknüpfung von anorganischen Nanopartikeln mit biologischen Molekülen hat in jüngster Zeit ein rasch expandierendes Forschungsgebiet geschaffen, in dem zahlreiche Aspekte der Biosensorik, der medizinischen Diagnostik und Wirkstoff-Freisetzung bis hin zu grundlegenden Untersuchungen im Bereich der sich selbst organisierenden Nanoelektronik behandelt werden.^[24] Als ein prominentes Beispiel sei hier die Markierung biologischer Substrate mit Edelmetall-Nanopartikeln oder fluoreszierenden Halbleiterteilchen genannt^[43, 44]. Entscheidend für die Herstellung solcher Nano-Bio-Konjugate ist die Entwicklung einer Oberflächenchemie der Nanopartikel, bei der die stabilisierenden Liganden fest mit dem Nanopartikel verankert sind und endständige funktionelle Gruppen besitzen, die selektiv für biochemische Kopplungsreaktionen zur Verfügung stehen. Häufig geschieht die Anbindung an die Partikeloberfläche über Thiolgruppen^[45-47].

In den meisten Fällen reicht aber eine einfache Ligandenbindung an der Teilchenoberfläche nicht aus, um eine dauerhafte Verknüpfung zu bewerkstelligen. Die Bindungen zwischen den Liganden und den Oberflächenatomen sind häufig zu schwach. Vielmehr stellt sich ein Gleichgewicht ein, bei dem ein stetiger Ligandenaustausch erfolgt. Aus z. B. Antigen-Antikörper-Reaktionen oder der Komplexchemie ist bekannt, daß selbst schwach bindende Liganden mittels mehrerer Bindungsstellen, wie ein mehrzähniger Ligand, relativ stabile Bindungen erreichen. Hierbei multiplizieren sich die Bindungskonstanten der einzelnen Bindungen zu einer Gesamtbindungskonstante für den gesamten Liganden. Der Effekt kann auf der Partikeloberfläche ebenfalls bewirkt werden, indem einfach gebundene Liganden nachträglich untereinander vernetzt werden und so ihre Bindung zur Partikeloberfläche durch mehrere Bindungsstellen stabilisiert wird. Um dies zu realisieren, kann eine Schale aus Siliziumdioxid über Sol-Gel-Technik auf das eigentliche Teilchen aufgewachsen werden^[48-51]. Die Siliziumdioxidschale bietet zusätzlich die Möglichkeit der Funktionalisierung, indem nach außen zeigenden Verknüpfungsgruppen als funktionalisierte Alkoxysilane während des Polykondensationsprozesses eingebracht werden^[52, 53]

4.1.1 Charakterisierung von silikatbeschichteten Gold-Nanopartikeln

In einer ideal gestalteten Oberfläche sollte die Zahl der Verknüpfungsgruppen einstellbar sein, und man sollte zusätzliche inerte funktionelle Gruppen einbauen, die die Löslichkeit und das Oberflächenpotential der Teilchen bestimmen. Die Ankergruppen der Liganden sollten auf der Kristallitoberfläche möglichst fest haften, und die Liganden sollten untereinander kovalent vernetzt sein, um dadurch eine Austauschdynamik gänzlich zu unterdrücken. Die Kristallitoberfläche sollte zudem dicht belegt sein, damit alle freien Valenzen terminiert sind. Schließlich ist es wünschenswert, daß die Dicke der gesamten, in sich vernetzten Ligandenhülle gering ist, um den Masseanteil des eigentlichen Nanopartikels möglichst hoch halten zu können.



Abbildung 3 Schematischer Aufbau der Ligandenhülle der silikatbeschichteten Gold-Nanopartikel.

Der schematische Aufbau der Ligandenhülle ist in Abbildung 3 gezeigt. Zunächst wurden Gold-Nanopartikel durch Reduktion von KAuCl₄ mit NaBH₄ in Propanol in Gegenwart des Liganden 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan (Silan 1, siehe Anhang) hergestellt. Die Thiolgruppe des Liganden 1 bindet sehr fest an die Teilchenoberfläche, und die Trimethoxysilyl-Gruppe erlaubt weitere Funktionalisierung und Quervernetzung der Liganden. Wurde die dazu nötige Polykondensation in Gegenwart überschüssigen 3-Aminopropyltrimethoxysilans (Silan 2) durchgeführt, so erfolgte relativ rasche Koagulation. Dies läßt darauf schließen, daß die drei Alkoxysilyl-Gruppen von Ligand 1 und 2 ausgedehnte interpartikuläre Netzwerke gebildet haben. Die Vernetzung konnte vermieden werden, indem die Polykondensation in Gegenwart von 3-Aminopropyldimethylethoxysilan (Silan 3) durchgeführt wurde. Ligand 3 hat nur eine kondensierbare Alkoxy-Gruppe und wirkt somit im Polykondensationsprozeß terminierend. Als Ergebnis erhält man hydrophile Kolloide, die sich in Wasser klar lösen. Die Partikel können mit Propanol gewaschen und wieder in Wasser gelöst werden.



Abbildung 4 HRTEM-Bild von silikatbeschichteten Gold-Nanopartikeln mit dem zugehörigen Histogramm.

Abbildung 4 zeigt eine Transmissionselektronenmikroskopieaufnahme und das dazugehörige Histogramm. Man erhält hierbei Partikel mit einem mittleren Durchmesser von etwa 2,2 nm bei einer Standardabweichung von 21 %. Man erkennt kristalline gut voneinander getrennte Partikel, der Mindestabstand zwischen den Teilchen beträgt etwa 1,5 nm, was recht gut der Länge von zweimal der Summe aus Ligand 1 und 3 entspricht. Das bei Gold häufig auftretende Phänomen, daß außenständige Aminliganden an die Oberfläche eines zweiten Teilchens binden und so zur Koagulation führen,^[54] wird offenbar durch die vernetzten Ligandhüllen verhindert. Hierfür spricht auch das Absorptionsspektrum (Abbildung 5), in

dem sich eine interpartikuläre Bindung durch eine zusätzliche Bande bei $\lambda > 600$ nm zeigen würde.



Abbildung 5 Absorptionsspektrum einer wäßrigen Lösung der silikatbeschichteten Gold-Kolloide.

Das Absorptionsspektrum der klaren, braunen Kolloidlösung zeigt eine schwache Plasmonenbande bei einem Absorptionsmaximum von 530 nm und eine intensive Interbandabsorption. Aufgrund der Bandstruktur von Metallen, deren Bänder sich am Ferminiveau überlappen und eine relativ kontinuierliche Zustandsdichte aufweisen, absorbieren die Goldkolloide über den ganzen Energiebereich des Spektrums. Die Plasmonenabsorption ist bei Goldpartikeln mit einem Durchmesser unter 5 nm stark gedämpft^[55, 56]. In den 2,2 nm großen Goldpartikeln ist die freie Weglänge der Leitungselektronen durch die geringe Ausdehnung des Partikels eingeschränkt, was die Dämpfung der Schwingung der Leitungselektronen bewirkt.

Das IR-Spektrum der gereinigten Partikel in Abbildung 6 zeigt alle erwarteten Schwingungen der gekoppelten Ligandenhülle.



Abbildung 6 atrIR-Spektrum von silikatbeschichteten, aminofunktionalisierten Gold-Nanopartikeln.

	Wellenzahl [cm ⁻¹]	Zuordnung	Referenz
(a)	3392 (m)/3340 (m)	sym. und asym. ν (N-H) von -NH ₂	3500-3300 (m) [57, 58]
(b)	2920 (s)	ν(C-H)	2960-2850 (s) [57]
	2851 (s)		
	1738 (m)	C=O von Estern	1750-1735 (s) [57]
(c)	1580 (m)	δ (N-H) von –NH ₂	1650-1560 (m) [57]
	1414 (m)	δ(C-H) von Propyl	1470-1430 (m) [57]
	1237 (m)	Si-CH ₃	1250 [58]
(d)	1096(sh)/1032(s)	Si-O-Si Formationen	1110-1000 [58]
	872/796/714	Si-CH ₃	910-715 [58]

Tabelle 1Zuordnungen der Banden des IR-Spektrum der silikatbeschichteten,
aminofunktionalisierten Gold-Nanopartikel in Abbildung 6.

Die jeweiligen Zuordnungen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Silan **3** besitzt eine primäre Aminogruppe, deren symmetrische und asymmetrische Valenzschwingungen zwischen 3500 und 3300 cm⁻¹ zu finden sind. Sie sind überlagert von einer breiten OH-Schwingung. Mit ihnen erscheint eine mittlere N-H-Deformationsbande bei 1580 cm⁻¹. Auch die nur in Silan **3** zu findende Si-CH₃-Gruppe zeigt sich in der Schwingung bei 1237 cm⁻¹. Sie wird begleitet von mehreren Banden zwischen 910 und 715 cm⁻¹.

Die aus mehreren Schwingungen bestehende Bande zwischen 1110 und 1000 cm⁻¹ wird durch verschiedene Siloxankonformationen verursacht. Das charakteristische Maximum und die Schulter bei 1032 und 1096 cm⁻¹ können den asymmetrischen Streckschwingungen von dreidimensionalen Siliziumdioxidnetzwerken zugeordnet werden^[59].

Buining et al. beobachteten in einem Spektrum von silikatbeschichteten Goldpartikeln ebenfalls eine fragwürdige Bande nahe 1738 cm⁻¹, die nur der Carbonyl-Streckschwingung einer Esterverbindung zugeordnet werden kann. Dies könnte über einen katalytischen Effekt der Goldoberfläche erklärt werden, der eine Oxidation von Alkoholen zu Säuren bewirken könnte[52].

Das atr-IR-Spektrum zeigt deutlich, daß die Goldpartikel mit primären Aminen funktionalisiert sind. Um die chemische Funktionalität der Aminogruppen im Hinblick auf ihre Kopplungsfähigkeit zu untersuchen, wurden die Aminogruppen mit Fluorescamin markiert. Fluorescamin ist ein Reagenz für die fluorimetrische Bestimmung von primären Aminen im picomolaren Bereich. Es ist in der Peptidanalyse von besonderer Bedeutung^[27, 28].

Mit Hilfe des Fluoreszenzindikator wurde die Zahl der frei zugänglichen Aminogruppen an der Oberfläche der Partikel bestimmt. In Abbildung 7a ist die Menge des bestimmten Amins, umgerechnet in Zahl pro Goldpartikel, als Funktion der bei der Polykondensation zugegebenen Menge des Silan 3 gezeigt. Man erkennt, daß schon bei relativ geringen Konzentrationen von Silan 3 bereits drei bis vier Aminogruppen pro Teilchen nachweisbar sind und daß die Erhöhung der Konzentrationen von Silan 3 nur zu einer geringen Zunahme der detektierbaren Aminogruppen führt.



Abbildung 7 Anzahl der mit Fluorescamin bestimmten Aminogruppen pro Partikel a) in Abhängigkeit der während des Kondensationsschrittes vorhandenen Konzentration von Silan 3 und b) in Abhängigkeit von der 2-Mercaptoethanol-Konzentration.
2-Mercaptoethanol wurde als zusätzlicher Ligand vor dem Kondensationsschritt mit Silan 3 zugesetzt.

Aufgrund des relativ geringen Raumbedarfs der gewählten Liganden ist eine derartig kleine Zahl von Aminogruppen pro Teilchen schwer verständlich, vielmehr drängt sich der Verdacht auf, daß die Aminopropylgruppe bei der Polykondensation nicht nur so eingebaut wird, daß die Aminogruppen nach außen zeigen, sondern auch derart, daß eine Rückbindung an die Teilchenoberfläche erfolgt. Dies ist leicht verständlich, da die voluminösen Trimethoxysilyl-Endgruppen der ursprünglich eingesetzten Liganden 1 eine vollständige Bedeckung der Goldpartikel mit Thiolatgruppen verhindern. Aminogruppen, die rückgebunden an der Teilchenoberfläche fixiert sind, lassen sich natürlich nicht mit Fluorescamin nachweisen, da dieses Molekül nur mit freien primären Aminen reagiert und kaum bis an die Teilchenoberfläche gelangen kann. Diese Aminogruppen stünden einer Kopplungsreaktion natürlich ebenfalls nicht mehr zur Verfügung.

Um den Aminorückbindungsprozeß zu untermauern und gegebenenfalls zu verhindern, wurde vor der Polykondensation zusätzlich der kurzkettige, kleine Ligand 2-Mercaptoethanol zugegeben. Ziel war es, die vom Liganden 1 an der Partikeloberfläche freigelassenen Koordinationsstellen zu blockieren und somit die Aminorückbindung zu verhindern. In Abbildung 7b ist wiederum die Zahl der mit Fluorescamin detektierbaren Aminogruppen, diesmal als Funktion der 2-Mercaptoethanol-Konzentrationen gezeigt. Man erkennt hier sehr
deutlich, daß die 2-Mercaptoethanol-Moleküle die Aminogruppen sozusagen nach außen zwingen.

Für eine mögliche Ankopplung negativ geladener Biomoleküle wie DNA läßt sich während der Präparation Ligand **4** gegen **5** austauschen, wodurch die Oberflächenladung der Partikel insgesamt negativ wird und eine Koagulation verhindert wird.

Mit der bisher beschriebenen Synthese erhält man wasserlösliche Nanopartikel mit einer fest gebundenen Ligandenhülle und nach außen zeigenden Aminogruppen, welche sich hervorragend für Kopplungsreaktionen mit biologischen Molekülen eignen.

4.1.2 Charakterisierung von silikatbeschichteten CdTe-Nanopartikeln

Im Bereich der Bionanowissenschaften sind Halbleiter-Nanopartikel aufgrund ihrer elektronischen und optischen Eigenschaften von großem Interesse in Hinblick auf Immunoreagenzien Applikationen wie Biolabeling, oder selbstorganisierende Nanoelektronik.^[24, 43, 44, 60] Hierbei können heterofunktionelle Liganden auf der Partikeloberfläche als "Ankergruppen" für biochemische Kopplungsreaktionen dienen. Da thiolische Liganden auf Halbleitermaterialien im Vergleich zu Gold eine starke Austauschdynamik besitzen^[61], ist eine Vernetzung der Liganden hier unerläßlich, um eine dauerhafte Konjugation sicherzustellen. Partikel mit einer fest gebundenen Ligandenhülle sollten auch stabiler gegenüber notwendigen Reinigungsschritten sein. Darüber hinaus kann diese Hülle mit einer Mischung von funktionellen Gruppen so funktionalisiert werden, daß einerseits 'Ankergruppen' vorhanden und andererseits die Löslichkeit und die kolloidale Stabilität während der Oberflächenreaktionen gewährleistet sind. Gerion et al. haben für CdSe/ZnS-Partikel eine ähnliche 'core-shell'-Struktur gezeigt^[53].

Da die direkte Darstellung von 3-mercaptopropyltrimethoxysilanstabilisierten CdTe-Partikeln zu nichtfluoreszierenden Partikeln führt, werden vorgefertigte cysteaminstabilisierte CdTe-Nanokristalle durch Ligandenaustausch mit Silan 1 beschichtet. Auf der derart modifizierten Partikeloberfläche kann durch Kondensation eine Silikathülle abgeschieden werden.

Die resultierenden Core-Shell-Partikel weisen eine Oberflächenfunktionalisierung mit Phosphonat- und primären Aminogruppen auf. Das atrIr-Spektrum der intensiv gereinigten Partikel in Abbildung 8 und die Bandenzuordnung in Tabelle 2 zeigen einerseits die P=O-Schwingungen bei 1305 cm⁻¹ und 1178 cm⁻¹ des Phosphonats und andererseits die N-H-Deformationschwingung von primären Aminen bei 1593 cm⁻¹. Besonders charakteristisch ist die N-H-Deformationsschwingung von Ammonium bei 1490 cm⁻¹.



Abbildung 8 atrIR-Spektrum von silikatbeschichteten CdTe-Partikeln.

	Wellenzahl [cm ⁻¹]	Zuordnung	Referenz
	3257	-OH in inter- und intramolekulare	3600-3200
		H-Brücken	3200-2500[57]
(a)	2920/2851	vC-H(s)	2960-2850 (2-3 Banden)[57]
	2654	assoziiertes OH am Phosphonat	2700-2560[57]
(b)	1645/1593	δ N-H von -NH ₂	1650-1560[57]
(c)	1490	δ N-H von -NH ₃ ⁺	1500[57]
	1415	δО-Н	1410-1260
(d)	1305	Р=О	1300-1250[57]
	1245	Si-CH3	1250[58]
	1178	vP=O	1240-1180[57]
(e)	1100	Si-O-Si	1100-1000[58]
	1015	P-O-CH ₃	1050-1030[57]
	834	Si-CH ₃	910-715 mehrere Banden ^[58]
	784	Si-CH ₃	

Tabelle 2Zuordnung der Banden des IR-Spektrums von silikatbeschichteten
CdTe-Nanopartikeln.

Sie sind in Wasser von pH 6 bis 11 löslich und bleiben zwischen pH 8 und 11 über Monate stabil in Lösung. Im Aufbauprozeß der Hülle werden während des letzten Syntheseschrittes

die aktiven Silanolgruppen mit Hilfe eines hochreaktiven Chlorosilans silyliert^[62]. Dieser Schritt ist unerläßlich, um langfristig eine interpartikuläre Vernetzung durch Kondensation zu vermeiden. So zeigten in der Gelelektrophorese nur derart behandelte Partikel eine Mobilität im Gel. Die unsilylierten Partikel hingegen verblieben in der Tasche. Dies ist dadurch zu erklären, daß sich die Partikel vor dem Eindringen in das Gel an der Taschengrenze stark aufkonzentrieren, was bei Partikeln mit kondensierbaren Silanolgruppen zur interpartikulären Vernetzung geführt haben kann.

Die Aufarbeitung, das heißt der Phasentransfer von Methanol in Wasser und die Reinigung von Base und überschüssigem Monomer, muß nach ca. 16 Stunden erfolgen. Wurden die Kolloidlösungen wesentlich früher oder später aufgearbeitet, fielen die Partikel schon nach wenigen Stunden bis Tagen aus. Die Ursachen für diese zeitliche Abhängigkeit sind nicht geklärt, wie auch immer, es gibt einen idealen Zeitpunkt für die Reinigung. Die Varianten, die ohne eine zusätzliche Schicht TEOS präpariert wurden, fielen auch bei idealem Reinigungszeitpunkt nach wenigen Tagen bis Wochen aus, was sich durch einen geringeren Vernetzungsgrad innerhalb der Silikathülle und dem damit verbundenen Ligandenverlust erklären läßt.

Nicht nur die kolloidalen Eigenschaften, sondern auch die optischen Eigenschaften, genauer die Fluoreszenz, hängen mit der Beschaffenheit der Ligandenhülle zusammen. Oberflächen-Haftstellen, die häufig durch nichtabgesättigte Bindungen verursacht werden, beeinflussen die Fluoreszenzeigenschaften eines Halbleiterpartikels^[8, 9]. Werden durch eine dichte Belegung mit organischen Liganden oder durch eine anorganische Hülle mit größerer Bandlücke die Störstellen an der Partikeloberfläche koordiniert, so können die Haftstellenfluoreszenz und die strahlungslosen Rekombinationsprozesse zugunsten der Bandkantenfluoreszenz unterdrückt werden. Eine kompakte SiO₂-Hülle mit einer zusätzlichen Schicht TEOS könnte einen solchen passivierenden Effekt bewirken. Es zeigte sich tatsächlich ein bemerkenswerter Einfluß auf die Fluoreszenzquantenausbeute, die durch die zusätzliche Beschichtung mit TEOS auf das sechsfache anstieg.



Abbildung 9 Fluoreszenzspektren (normiert) von CdTe-Kolloiden mit einer dünnen, ohne TEOS präparierten Silikathülle (- - - -), nach Zugabe von Thioglykolsäure (- - - -) und einer kompakten, mit zusätzlichem TEOS präparierten Silikathülle (-----), nach Zugabe von Thioglykolsäure (-----).

Abbildung 9 zeigt die normierten Fluoreszenzspektren von silikatbeschichteten CdTe-Kolloiden, die ohne zusätzlichem TEOS und die mit zusätzlichem TEOS präpariert wurden. Die Fluoreszenzintesität ist bei der kompakteren Hülle zehnmal höher. Eine Zugabe von Thioglykolsäure hat einen deutlich verstärkenden Einfluß auf die Fluoreszenz der dünn beschichteten CdTe-Kolloide. Es zeigt sich aber nahezu keine Veränderung der Fluoreszenzintensität bei den CdTe-Kolloiden mit der kompakten Silikathülle. Dieser Unterschied ist dadurch zu erklären, daß bei den dünn beschichteten Partikeln freie Valenzen vom Thiol koordiniert werden und so die Fluoreszintensität steigt. Bei den kompakter beschichteten Partikeln sind die oberflächlichen Bindungen jedoch schon gut abgesättigt. Hinzu kommt, daß die kompaktere Silikathülle weniger durchlässig ist. Die Quantenausbeute der beschichteten CdTe-Kolloide liegt je nach Probe zwischen 3 und 4,5%.



Abbildung 10 HRTEM-Bild und Pulverröntgendiffraktogramm von silikatbeschichteten CdTe-Nanokristallen; das Balkendiagramm zeigt die Lage und relativen Intensitäten der Reflexe von kubischem, makrokristallinem CdTe.

In Abbildung 10 ist das Pulverröntgendiffraktogramm von silikatbeschichteten CdTe-Nanokristallen dargestellt. Aufgrund der Lage und der relativen Intensitäten kann die Kristallstruktur einer kubischen CdTe-Modifikation zugeordnet werden. Die einzelnen Röntgenreflexe sind gegenüber makrokristallinem CdTe stark verbreitert. Aus der Reflexhalbwertsbreite der (111)-Gitterebene wurde nach der Debye-Scherrer-Gleichung ein gemittelter Teilchendurchmesser von 2,4 nm berechnet. Im hochaufgelösten TEM-Bild weisen die Partikel eine durchschnittliche Größe von 3,2 nm auf. Diese Differenz ist durch Fehlstellen und Versetzungen von Kristalldomänen zu erklären, die zu einer Signalverbreiterung im Pulverröntgendiffraktogramm führen. Diese Methode bestimmt also eher die Größe der einkristallinen Domänen, weshalb sie in Hinblick auf die Partikelgrößenbestimmung nur als Näherungsverfahren Verwendung finden sollte, auch wenn sie im Gegensatz zur Transmissionselektronenmikroskopie repräsentativ über die gesamte Probe mittelt.

Element	Cd	Te	S	Si	0	Р
% (molar)	10,9	7,25	8,5	22,25	48,25	2,5

Tabelle 3

Analytische %uale Verteilung der Elemente in den silikatbeschichteten CdTe-Nanokristallen, ermittelt aus EDX-Daten.

Die Röntgenfluoreszenzanalyse (EDX) liefert ein molares Verhältnis von Tellur zu Cadmium von 0,7 bei einem theoretischen Wert von eins in einem CdTe-Kristall. Diese Differenz läßt sich durch einen oberflächlichen Austausch von Tellurid durch Thiolat der Liganden erklären. Zusätzlich konnte eine durch Kochen von nanokristallinem CdTe mit thiolischen Liganden unter alkalischen Bedingungen bewirkte Mischkristallbildung aus CdTe und CdS beobachtet werden^[5]. In der gereinigten Probe ist durchschnittlich doppelt soviel Silizium wie Cadmium zu finden, was auf eine relativ kompakte, mehrlagige Silikathülle hindeutet, wobei berücksichtigt werden sollte, daß eine äußere Lage einen wesentlich höheren Anteil am Gesamtvolumen bzw. -stoffmenge eines Partikels ausmacht als eine innere. Nach den EDX-Daten tragen 11% der an der Hülle beteiligten Silane eine Phosphonatgruppe. Da die quantitativen Auswertungen der Röntgenfluoreszenzanalysedaten einen Fehler von ~ 5% enthalten, sollten die Angaben eher als tendenzielle Hinweise bewertet werden. Stickstoff ist als leichtes Element neben Sauerststoff und Kohlenstoff quantitativ nur schwer zu detektieren, da die leichten Elemente im EDX nicht exakt aufgelöst werden können.

Zusammenfassung

Es wurden Synthesen für funktionalisierte Gold-Nanopartikel entwickelt, die es erlauben, die Ligandenhülle bei minimaler Dicke kovalent zu verknüpfen und somit statisch an die Teilchenoberfläche zu binden. Darüber hinaus wurde die Ligandenhülle endständig zur Lösung mit einer frei wählbaren Anzahl von funktionellen Kopplungsgruppen versehen. Gleichzeitig konnte die Löslichkeit und die Oberflächenladung durch zusätzliche kovalent gebundene Hilfsliganden eingestellt werden. CdTe-Nanokristalle wurden in ähnlicher Weise beschichtet und funktionalisiert. Ihre Langzeitstabilität und Fluoreszenzintensität ist abhängig von der Dicke der Silikathülle. Die resultierenden Kolloide waren über Monate stabil und zeigten keine Koagulation. Die biokompatiblen Nanopartikel besitzen eine fest gebundene Ligandenhülle mit nach außen zeigenden Aminogruppen, welche sich hervorragend für Kopplungsreaktionen mit biologischen Molekülen eignen.

4.2 Funktionalisierung von Nanopartikeln mit Biomolekülen

Biokonjugation von Nanopartikeln^[24, 43, 60, 63-66], das heißt die Ankopplung von biospezifischen Liganden an sie, verkörpert die Verbindung von Biotechnologie und Nanotechnologie und erzielt Hybridmaterialien, Prozesse und Strukturen, die einerseits die optischen und elektronischen Eigenschaften der Nanopartikel und andererseits die hochselektive Bindung von Oligonukleotiden oder Proteinen in sich vereinigen. Die Kombination dieser Merkmale birgt ein großes Potential für die derzeitige biomedizinische Technologie und möglicherweise auch für die Nanoelektronik, Mikrophotonik und zugehörenden Bereichen.

Im Folgenden werden verschiedene Strategien für die Funktionalisierung von Nanopartikeln mit Biomolekülen vorgestellt. Diese werden von Seiten der anorganischen Kolloidkomponente anhand der eigens dafür entwickelten und in dieser Arbeit bereits beschriebenen Gold- und exemplarisch für die Halbleitermaterialien CdTe-Partikel gezeigt, die im Sinne der Funktionalisierung eine ideal gestaltete Oberfläche besitzen.

4.2.1 Charakterisierung der Biotinylierung von Gold-Nanopartikeln

Die aminofunktionalisierten, silikatbeschichteten Gold-Kolloide lassen sich mit dem aktivierten Ester des Biotins umsetzen, [67-69] einem Molekül, das mit herausragender Selektivität und Spezifität mit Avidinproteinen konjugiert. Das Biotinylierungsreagenz ist mit einer Aminocaproyl-Gruppe derivatisiert. Die Verlängerung reduziert die sterische Hinderung der Bindung der biotinylierten Partikel an Avidin. Die Biotin-Avidin-Kopplung stellt ein lehrbuchhaftes Beispiel für das molekulare Schlüssel-Schloß-System bei Lebensprozessen dar [70]. Das Avidin/Biotin-System besitzt eine der größten bisher beobachteten freien Bindungsenergien für nichtkovalente Bindungen von Proteinen und Substratmolekülen in wäßriger Lösung (K_a~10¹⁵ mol⁻¹ 1)[67, 71].



N-Hydroxysuccinimid (NHS)

Abbildung 11 Reaktionsschema der Biotinylierung von aminofunktionalisierten, silikatbeschichten Gold-Nanopartikeln.

Das Reaktionsschema für die Biotinylierung der Partikel ist in Abbildung 11 illustriert. Die Reaktion findet unter neutralen pH-Bedingungen statt, bei denen die Aminogruppen protoniert vorliegen. Diese Oberflächenladung bewirkt im Wesentlichen die kolloidale Stabilität von aminofunktionalisierten Partikeln. Im Zuge einer Biotinylierung geht diese Ladung verloren, denn das sich bildende Amid ist ungeladen. Mit zunehmendem Grad der Biotinylierung verändert sich so die Oberflächenladung der durch die protonierten Aminogruppen geladene Partikel, was aufgrund der verminderten elektrostatischen Abstoßung die kolloidale Stabilität der Partikel herabsetzt. Ist die Silikathülle allerdings neben dem Silan **3** noch mit dem Silan **4** versehen, das eine guartäre Ammoniumgruppe trägt, wird die Stabilität der Partikel erheblich verbessert. Quartäre Ammoniumgruppen lassen sich nicht mit Biotin verknüpfen, sondern bewirken nur im gesamten verfügbaren pH-Bereich eine positive Oberflächenladung und sorgen so auch bei der Biotinylierung der primären Aminoliganden für die gewünschte Wasserlöslichkeit der Teilchen. Über das Verhältnis von Ligand 3 und 4 kann die Zahl der Kopplungsgruppen an der Oberfläche eingestellt werden. Der Biotinylierungsgrad liegt je nach Präparation zwischen zwei und acht Biotingruppen pro Partikel. Er kann über die quantitative Bestimmung der Aminogruppen mit Fluorescamin vor und nach der Biotinylierung bestimmt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die fluorimetrische Titration. Dabei wird die Fluoreszenz von Tryptophan in den Bindungsstellen von Streptavidin bei der Bindung von Biotin gequencht. Biotinzugabe zum Tryptophan-Streptavidin-Gemisch führt also zu Fluoreszenzabnahme, bis der Endpunkt erreicht ist. Zu einer bekannten Menge Streptavidin werden verschiedene Volumina an biotinylierten Partikeln gegeben, und dann mit D-Biotin bis zum Endpunkt titriert.

Biotin und das Protein Avidin sind ein ideales Modell für Verknüpfungssysteme. Um die Konjugatbildung der biotinylierten Partikel nachzuweisen, wurde fluoreszenzmarkiertes Avidin mit unterschiedlichen Mengen der biotinylierten Partikeln versetzt. Die sich bildenden Konjugate haben eine so große Molmasse, daß sie leicht durch Zentrifugation aus der Lösung abgetrennt werden können.



Abbildung 12 Abnahme der Fluoreszenz von FITC-Avidin im Überstand nach der Zentrifugation der Mischungen von FITC-Avidin mit biotinylierten und unbiotinylierten Gold-Nanopartikeln als Funktion vom molaren Partikel/Avidin-Verhältnis.

Die Fluoreszenzintensität im Überstand ist in Abbildung 12 als Funktion der zugegebenen Menge biotinylierter Partikel dargestellt. Angegeben ist auf der x-Achse das Verhältnis von biotinylierten Partikeln zu vorgelegtem Avidin. Man erkennt, daß bereits ab etwa 2 Goldpartikel pro Avidin die Fluoreszenzintensität im Überstand auf etwa 20 % des ursprünglichen Wertes abgesunken ist, was auf eine spezifische Ankopplung schließen läßt. Daß die Fluoreszenzintensität nicht gänzlich zurückgeht, läßt vermuten, daß entweder ein Teil des Avidins nicht kopplungsfähig ist, ein gewisser Prozentsatz der Konjugate durch die Zentrifugation nicht abgetrennt werden konnte oder daß eine kleine Menge der Fluoreszenzsondenmoleküle als Monomere vorliegen und nicht an Avidin gebunden sind. Als Blindexperiment wurden einer identischen Avidinvorlage die entsprechenden Mengen der nicht biotinylierten, aber ansonsten identischen Goldpartikel zugesetzt. Man beobachtet eine schwache Abnahme der Fluoreszenz nach der Zentrifugation, was durch einen geringen Anteil unspezifischer Adsorption erklärt werden kann.

4.2.2 Charakterisierung der Biotinylierung von CdTe-Nanopartikeln

Die aminofunktionalisierten, silikatbeschichteten CdTe-Kolloide wurden mit der im vorherigen Kapitel beschriebenen Methode biotinyliert. Die Konjugation von biotinmodifizierten CdTe-Kolloiden und Avidin wurde mittels Gelelektrophorese verifiziert. Da die beschichteten CdTe-Partikel und das FITC-Avidin fluoreszieren, sind sie leicht auf dem Gel im UV-Licht zu detektieren. Hierbei ist zu erwarten, daß bei erfolgreicher Biotinylierung die Partikel-Avidin-Konjugate aufgrund der höheren Masse und Größe eine stärkere Retention als die freien Partikel zeigen. Falls die Konjugate ausgedehnte Netzwerke bilden sollten, würden sie in der Tasche verbleiben.

Das Lumineszenzbild der Gelelektrophorese (Abbildung 13 a)) liefert detaillierte Informationen über die Produkte der Konjugation. Wurde Avidin mit unbiotinylierten CdTe-Kolloiden inkubiert (Tasche 3), zeigte sich neben der Bande des Avidins deutlich die charakteristische Bande der durch Phosphonatgruppen negativ geladenen CdTe-Kolloide. Hingegen wurden die biotinmodifizierten CdTe-Kolloide mit Avidin in einem äquimolaren Verhältnis inkubiert (Tasche2), liegt keine Bande in diesem Bereich vor. Da sowohl das Avidin als auch die biotinylierten Partikel mehrere Bindungsstellen besitzen, bilden die Konjugate vermutlich ausgedehnte Netzwerke, die keine Mobilität in der Gelelektrophorese zeigen. Die Bande der Konjugate beschränkt sich nahezu ausschließlich auf die Tasche. Die Gelelektrophorese demonstriert deutlich die Spezifität der Bindung zwischen den biotinmodifizierten CdTe-Kolloiden und dem Avidin.

Einen weiteren Hinweis auf den Erfolg der Biotinylierungsreaktion kann aus der leichten Verschiebung der Bande der biotinmodifizierten CdTe-Kolloide (Tasche1) gegenüber der Bande der unmodifizierten CdTe-Kolloide (Tasche 4) entnommen werden, die sowohl im Abbildungsteil (a) und (b) zu beobachten ist. Die höhere Wanderungsgeschwindigkeit in Richtung Anode deutet entweder auf eine geringere Masse oder auf eine etwas stärker negative Oberflächenladung der Partikel hin. Durch die Anknüpfung von Biotingruppen an die bei neutralem pH-Wert protonierten Aminogruppen wird unter Bildung von ladungsneutralen Amiden die Gesamtoberflächenladung negativer.

Genau diese Veränderung der Oberflächenladung und damit des Oberflächenpotentials durch Ankopplungsreaktionen an die stabilisierenden Liganden ist die Ursache dafür, daß Kolloide, deren Oberflächen dicht mit Ankergruppen belegt sind, während solcher Kopplungsreaktionen agglomerieren und irreversibel ausfallen, was sich für die Biotinylierung von cysteaminstabilisierten CdTe-Kolloiden im Experiment gezeigt hat.

Die von Sigma bezogene Lösung des Fluorescein markierte Avidins mußte jedoch vor ihrer Verwendung aufgearbeitet werden. Das ursprüngliche FITC-Avidin zeigt auf dem Gel in Abbildung 13 b) (Tasche 5) zwei Banden, eine mit einer geringen Mobilität in Richtung Kathode, die vom bei pH 7 leicht positiv geladenen Avidin (isoelektrischer Punkt bei pH 10 [71]) herrührt und eine zweite in Richtung Anode. Diese weist eine ähnliche Mobilität wie die silikatbeschichteten CdTe-Kolloide auf, die für die Konjugation eingesetzt wurden. Die Banden der Partikel und des Fluoresceins lassen sich bei Überlagerung nicht unterscheiden, da die Emissionsmaxima der beiden fluoreszierenden Komponenten nur um 5 nm differieren. Die Vermutung liegt nahe, daß die eine der Banden von ungebundenem Fluoreszenzfarbstoff herrührt, der als niedermolekulare Substanz vom 66 kD schweren Avidin über Gelfiltration getrennt werden könnte.

Im Lumineszenzbild (Abbildung 13 c)) der Gelelektrophorese der Avidinlösung vor und nach der Gelfiltration weist die gereingte Avidinlösung nur noch eine Bande auf, die störende, zum Fluorescein gehörende zeigt sich nicht mehr.

Die biotinylierten Partikel waren bei dunkler Lagerung über Monate stabil. So waren die für die Gelelektrophorese im Abbildungsteil (a) verwendeten Partikel bereits zwei Monate alt, wohingegen die im Abbildungsteil (b) frisch nach der Präparation eingesetzt wurden.



Abbildung 13 (a) und (b) Lumineszenzbilder der Gelelektrophorese von CdTe-FITC-Avidin-Konjugaten (a) mit gereinigtem, (b) mit ungereinigtem FITC-Avidin: (1) biotinylierte CdTe NPs, (2) biotinylierte CdTe NPs + FITC-Avidin, (3) CdTe NPs + FITC-Avidin, (4) CdTe NPs, (5) FITC-Avidin; (c) Lumineszenzbild der GE von FITC-Avidin (1) nach und (2) vor der Gelfiltration (0,7% Agarose, 10 mM Phosphatpuffer pH7, 100V, 38 mA).

Im Hinblick auf eine programmierte Anordnung von Nanostrukturen mit Nanokolloiden als Bausteine^[65, 66, 72] begrenzt die Ähnlichkeit der Größe von Nanopartikeln und Proteinen die Gesamtanzahl an Partikeln, die ein Protein umgeben können. Solche Biokonjugate, die einen einstellbaren Grad an Komplexität aufweisen, können als Einheiten für räumlich organisierte Partikelüberstrukturen dienen. Avidin ist ein geradezu ideales Protein für den Aufbau von komplexartigen Biokonjugaten, da es nur vier Bindungsstellen besitzt, die sehr spezifisch Biotin als Substrat binden.

Wird Avidin in einem etwa äquimolaren Verhältnis mit biotinmodifizierten Partikeln konjugiert, die mehr als eine Biotingruppe aufweisen, werden ausgedehnte, unlösliche Netzwerke aus den beiden Komponenten aufgebaut. Wird aber eine Komponente im großen Überschuß eingesetzt, so ist es denkbar, ähnlich wie es schon für Systeme mit elektrostatischer Wechselwirkung gezeigt wurde ^[73], daß die im Überschuß eingesetzte Komponente die im Unterschuß eingesetzte Komponente in einer komplexartigen Struktur verpackt. Derartige Komplexe sollten untereinander nicht vernetzen und löslich sein. Die kolloidalen Eigenschaften sollten von der einhüllenden Komponente dominiert werden.



Abbildung 14 Lumineszenzbild der GE von Konjugaten aus biotinylierten CdTe NPs und FITC-Avidin: (1) FITC-Avidin, (2-5) FITC-Avidin-CdTe-Konjugate in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen, (2) 1:3, (3) 1:6, (4) 1:15, (5) 1:75, (6) biotinylierte CdTe NPs (0,7% Agarose, 10 mM Phosphatpuffer pH7, 100V, 35 mA).

Wurden biotinylierte CdTe-Kolloide im Überschuß mit FITC-Avidin konjugiert, so zeigt das Lumineszenzbild der nativen Gelelektrophorese in Abbildung 14 für alle Konjugate eine Fraktion (Tasche 2 bis 5), die den freien biotinylierten CdTe-Kolloiden (Tasche 6) zugeordnet werden kann. Diese Fraktionen bestehen aus den überschüssigen biotinylierten CdTe-

Kolloiden, die vom Avidin nicht gebunden werden konnten. Die Konjugatproben zeigen keine Bande von freiem Avidin (Tasche 1). Offensichtlich ist das Avidin in den Konjugaten vollständig gebunden. Allerdings weisen alle Konjugatproben mit Partikelüberschuß jeweils eine diffuse Fraktion mit einer Mobilität in Richtung Anode auf. Mit zunehmendem Partikelüberschuß steigt deren Mobilität. Anscheinend bilden sich in Gegenwart eines größeren Überschusses an Partikeln kleine lösliche Konjugate aus Avidin und den biotinylierten Partikeln, die im Gel wandern können. Sie besitzen eine deutlich negative Nettoladung, die ihre Wanderung in Richtung Anode bewirkt. Avidin an sich ist unter neutralen pH-Bedingungen leicht positiv geladen und wandert in Richtung Kathode. Offensichtlich werden die kolloidalen Eigenschaften von den einhüllenden, negativ geladenen CdTe-Kolloiden dominiert.

Die Banden der komplexartigen Konjugate sind etwas verschmiert im Vergleich zu den Banden der reinen Komponenten, was durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der Konjugate und der daraus resultierenden unterschiedlichen Ladung und Masse erklärt werden kann. Der Vergleich der Bandenlage der Konjugate aus 6-, 15- und 75-fachem Überschuß zeigt, daß die mit höherem Überschuß eine höhere Mobilität besitzen, was auf eine wesentlich effektivere Abschirmung während der Konjugation zurückzuführen ist.

Zusammenfassung

Aminofunktionalisierte, silikatbeschichtete Gold-Nanopartikel wurden über eine Amidverknüpfungsreaktion zwischen den Aminogruppen an der Partikeloberfläche und einem N-Hydroxysuccinimid aktivierten Biotinderivat modifiziert. Durch an die Partikeloberfläche kovalent gebundene Hilfsliganden können Löslichkeit und Oberflächenladung so eingestellt werden, daß die derart oberflächenmodifizierten Partikel sowohl vor wie nach der Biotinylierung über Monate stabil sind und keine Anzeichen von Koagulation zeigen. Der Biotinylierungsanteil beträgt je nach Präparation zwei bis acht Biotingruppen pro Partikel. Die entsprechenden silikatbeschichte CdTe-Kolloide konnten in gleicher Weise biotinyliert werden. Diese bilden mit Avidin in einer sehr spezifischen Schlüssel-Schloß-Reaktion fluoreszierende Biokonjugate, die, wenn sie mit einem hohen Überschuß an CdTe-Kolloiden präpariert werden, eine kolloidale komplexartige Struktur besitzen. Die außergewöhnliche Spezifität der Immunokomplexreaktion bietet eine einmalige Möglichkeit, selbstorganisierende Heterostrukturen aufzubauen.

4.2.3 Konjugation von Nanopartikeln und thiolierter DNA

Die Präparation von kolloidalen Heterokonjugaten ist eine Gradwanderung, bei der die kolloidalen Ansprüche und die Materialeigenschaften der beteiligten Komponenten, sowie die Reaktionsbedingungen berücksichtigt werden müssen. Die bisher bekannten Kolloidsysteme können den weitreichenden Ansprüchen im Hinblick auf diese Anwendung nicht gerecht werden, so daß Kolloide mit neuen Oberflächen entwickelt worden sind. Die speziellen Ansprüche an die Partikeloberfläche sollen im Folgenden kurz diskutiert werden.

Sollen Kolloide mit DNA kovalent verknüpft werden, so werden auf der Partikeloberfläche funktionelle Gruppen benötigt, die durch gängige Kopplungsreaktionen im aquatischen Medium derivatisiert werden können. In Frage kommen Thiol-, Carboxyl- und Aminofunktionen ^[35]. Für Gold-Nanopartikel sind bereits Synthesen bekannt^[74], die zu wasserlöslichen, carboxylfunktionalisierten Partikeln führen. Auch Halbleitermaterialien wie CdTe- oder CdS-Kolloide wurden schon mit Mercaptopropionsäure, Thioglykol oder Cysteamin stabilisiert^[5, 75, 76]. Jedoch fallen alle diese Partikel während einer intensiven chemischen Modifikation aus, weil die funktionellen Gruppen die kolloidale Stabilität im Lösungsmittel bedingen und bei der Reaktion das Oberflächenpotential verändert wird. Bei einer Modifikation nur weniger Gruppen bleibt immer noch die Problematik des Ligandenaustauschs, was die genannten Kolloide für feste kovalente Bindungen von größeren Molekülen ungeeignet erscheinen läßt. Es werden also Oberflächen benötigt, die einerseits Ankergruppen und andererseits inerte stabilisierende Gruppen besitzen.

Darüber hinaus muß die Oberfläche eine negative Nettoladung aufweisen, um elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen DNA zu vermeiden. Die zuvor beschriebenen silikatbeschichteten Gold- und CdTe-Kolloide vereinigen alle diese Eigenschaften in sich, wodurch sie geradezu prädestiniert für die Konjugation sind.

Oligonukleotide sind mit Thiolfunktionen erhältlich, die über verschiedene Vernetzungsmoleküle an Aminogruppen gebunden werden können^[35, 77]. Hier seien N-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetat 3-Sulfo-N-Hydroxysuccinimidyl-4-(Nund maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (sulfo-SMCC) genannt. Da die Bromoacetylgruppe eine wesentlich höhere Spezifität in ihrer Reaktion mit Thiolen aufweist als die Maleimidogruppe^[34], wurde das zudem noch finanziell günstigere Succinimidyl-Bromoacetat verwendet. Ein Reaktionsschema ist in Abbildung 15 dargestellt.



Abbildung 15 Reaktionsschema der Konjugation von thiolierter DNA mit aminofunktionalisierten, silikatbeschichteten Partikeln mit dem bifunktionellen Linker Succinimidyl-Bromoacetat.

Succinimidyl-Bromoacetat ist ein heterobifunktionelles Vernetzungsreagenz, das die Bromoacetylierung von primären Aminogruppen ermöglicht, gefolgt von einer Kopplungsreaktion mit einer Thiolfunktionen enthaltenden Substanz. Typischer Weise findet die initiale Reaktion des aktivierten Esters mit primären Aminen, bei der eine Amidbindung gebildet wird, in einem pH-Bereich von 6,5-8,5 statt. Die zweite Reaktion bewirkt in einem pH-Bereich von 7,0-8,0 eine Thioetherbindung.

Die Kolloidlösungen müssen vor der Kopplung sehr intensiv gereinigt werden, um freies Thiol und Amin von überschüssigem Monomer ausschließen zu können. Diese würden durch eine Konkurrenzreaktion die Ausbeute an Konjugaten mindern. Darüber hinaus ist zu bedenken, daß thiolierte DNA trotz eines Zusatzes des Schutzreagenzes DTT (1,4-Dithiothreit^[78]) anfällig für oxidative Dimerisierung ist und deshalb frisch in Wasser gelöst werden muß. Das DTT wird erst direkt vor dem Gebrauch durch Gelfiltration von der DNA abgetrennt.

Charakteriserung von Konjugaten aus Goldpartikeln und thiolierten Oligonukleotiden

Mit der beschriebene Methode wurden die negativ geladenen, silikatbeschichteten Goldkolloide und (20b) bzw. (100b)Oligonukleotide gekoppelt. Die resultierende Konjugatlösung ist auch sehr konzentriert über Monate im Kühlschrank stabil und zeigt keine Anzeichen von Koagulation. Auch eingetrocknete Konjugate lassen sich durch Zugabe von Wasser wieder lösen.

Zur Trennung der Konjugate von den ungekoppelten Oligonukleotiden und Nanopartikeln wird die Reaktionslösung auf 1/10 eingeengt und mit einem Beladungspuffer (30% Glycerin) auf ein 1% iges Agarosegel gegeben, wobei die Trennung durch die unterschiedliche Mobilität im elektrischen Feld bewirkt wird. Agarosegele haben sich für diese Anwendung gegenüber Polyacrylamidgelen durchgesetzt, da sowohl die Partikel als auch die Konjugate und DNA eine höhere Mobilität in Agarosegelen besitzen und die Trennleistung höher ist. Zudem sind Agarosegele wesentlich stabiler in der Handhabung, was sich als wesentlicher Vorteil während Färbungen, notwendigen Waschungen oder bei der Isolation von Fraktionen herausstellte.

Die Konjugatprobe besitzt im Vergleich zu den unkonjugierten Partikeln eine leichte Retention und Verschmierung der Bande. Nach Behandlung des Gels mit Ethidiumbromid, einem Interkalatorfarbstoff für DNA, zeigt die Konjugatbande eine deutliche Färbung, die belegt, daß Oligonukleotide in dieser Bande enthalten sein müssen. Durch die Färbung wird eine weitere Bande von erheblich höherer Mobiltät sichtbar, die ungebundenen Oligonukleotiden zugeordnet werden kann. Offensichtlich ist es möglich, den Überschuß an DNA von den Konjugaten zu trennen, freie Partikel und Konjugate zeigen jedoch kein deutlich unterschiedliches Laufverhalten Die Zunahme der Größe durch die Konjugation wird durch die Zunahme der negativen Gesamtladung des Konjugats kompensiert.

Abbildung 16 zeigt AFM-Aufnahmen der vom Gel isolierten Konjugatbande. Abbildungsteil a zeigt ein Netzwerk, das aus aggregierten (100b)Oligonucleotid-Partikel-Konjugaten besteht. Ist die DNA-Konzentration in der Lösung hoch, so lagert sie sich beim Eintrocknen auf dem Substrat in diesen netzartigen Strukturen zusammen. Wird diese Probe vor der Präparation auf das Glimmerplättchen um den Faktor zehn verdünnt (Abbildungsteile b und c), so liegen die Konjugate einzeln vor. Die Konjugatstruktur, bestehend aus jeweils einem Goldpartikel und einem bis drei 30 nm langen Oligonukleotidsträngen, ist an vielen Stellen zu erkennen. In der Probe existiert auch ein gewisser Anteil unkonjugierter Partikel, die, wie die Elektrophoreseergebnisse bereits zeigten, durch dieses chromatographische Verfahren nicht separiert werden können.



Abbildung 16 AFM-Aufnahmen von Konjugaten aus silikatbeschichteten Goldpartikeln und thiolierten (100b) Oligonukleotiden, die Konjgate wurden über Gelelektrophorese gereinigt, (a) wie vom Gel isoliert, (b) und (c) 1/10 verdünnt, (d) Aufnahme einzelner Konjugate.

Abbildungsteil d zeigt zwei einzeln liegende Konjugate. Sie besitzen einen sphärischen Bereich, der zum Goldpartikel gehört, und einen länglichen flacheren Bereich, der mit einer Höhe von 0,7 nm der typischen Höhe von Oligonukleotiden im AFM entspricht. Die Höhe der Goldpartikel erscheint mit 1,4 bzw. 1,8 nm im Vergleich mit TEM- und XRD-Daten um ~1,5 nm zu niedrig. In den folgenden AFM-Aufnahmen von anderen Konjugaten wird deutlich, daß alle silikatbeschichteten Partikel unabhängig von Kernmaterial niedriger erscheinen als über die anderen Größencharakterisierungsmethoden. Dieser Effekt kann durch eine attraktive Wechselwirkung zwischen der Silikathülle und der Siliziumspitze des AFM-Cantilevers erklärt werden. Gerade im nichtberührenden Modus ('non-contact', 'tappingmode') tritt die Spitze nicht in direkten Kontakt mit dem Substrat, sondern langreichende Wechselwirkungen zwischen Probe und Spitze werden ausgenutzt, so daß die Oberflächenbeschaffenheit einen wesentlichen Einfluß auf die gemessene Höhe hat. Die AFM-Aufnahmen sind also eher als virtuelle Darstellungen eines Wechselwirkungsprofils

aufzufassen (siehe auch: Rasterkraftmikroskopie unter den instrumentellen Methoden in Kapitel 2)^[79].

Unter den Biokonjugaten sind die aus Oligonukleotiden aufgebauten aufgrund der ihnen innewohnenden Programmierbarkeit von besonderem Interesse. Die Watson-Crick-Basenpaarung von Oligonukleotiden ist ab einer Anzahl von zwölf Basen bei Raumtemperatur thermisch stabil. Zwölf Nukleotide entsprechen einer Länge von etwa 4 nm oder etwa der Größe eines Nanokristalls. Sie reichen aus, um eine detaillierte Information für die Anordnung in einer programmierten DNA-Überstruktur zu tragen. Diese bemerkenswerte Eigenschaft wurde ausgenutzt, um dreidimensionale Aggregate von Nanopartikeln zu präparieren^[80] oder Nanokristalle an Oberflächen zu binden^[81]. Um das volle Potential von Partikel-DNA-Konjugaten in Hinblick auf ihre Verwendung als Bausteine in geordneten, komplexen Strukturen nutzen zu können, wäre es sinnvoll, Konjugate mit einer definierten Anzahl an DNA-Strängen zu präparieren.

Konjugate aus 5 nm großen, citratstabilisierten Goldpartikeln thiolierten und (100b)Oligonukleotiden konnten gelelektophoretisch in diskrete Konjugate getrennt werden^[82]. Die oben dargestellten Konjugate konnten durch Gelelektrophorese nicht separiert werden, da die Größenzunahme durch die Ladungszunahme in einer für eine Auftrennung ungünstigen Weise kompensiert wird. Eine chromatographische Methode, die im wesentlichen nach der Größe trennt, ist die Gelfiltrationschromatographie GFC (auch Größen-Ausschluß-Chromatographie, SEC genannt). Diese Methode erlaubt die Trennung von Molekülen im Größenbereich von Oligomeren und Polymeren. Sie unterscheidet sich grundsätzlich von allen anderen Methoden der Chromatographie. Hier bewirken nicht elektrostatische Wechselwirkungen die Trennung, sondern die Substanzen können entsprechend ihrer Größe und Form in die Poren des Säulenmaterials mehr oder weniger gut eindringen und haben dadurch eine unterschiedliche Verweilzeit auf der Säule.

Abbildung 17 zeigt die Chromatogramme einer Konjugatprobe aus silikatbeschichteten Goldpartikeln und (20b)DNA. Die Probe wurde über eine Säule mit 100 nm großen Poren und einem Arbeitsbereich von 20.000-2.000.000 Dalton eluiert. Das Chromatogramm der Konjugate besitzt eine deutliche Modulation mit 3 Maxima (bzw. Schultern) im Gegensatz zu den reinen Partikeln, die ein breites Signal zeigen. Die drei Maxima könnten von Fraktionen unterschiedlich aufgebauter Konjugate sein.



Abbildung 17 Separation von Gold-(20b)DNA-Konjugaten über GPC mit einer GFC 1000-8-Säule (Porengröße 100 nm), oben: Chromatogramm, unten: Absorptionsspektren der markierten Fraktionen von der aufgetrennten Konjugatlösung.

Das Chromatogramm wurde mit einem UV-Detektor bei 256 nm Wellenlänge aufgenommen, so daß sowohl der Durchfluß der Goldpartikel und der bei 260 nm absorbierenden DNA detektiert wird. Die von den auffälligen Fraktionen der Konjugatprobe aufgenommenen Absorptionsspektren geben Informationen über das Verhältnis von Goldpartikeln zu DNA. Erwartungsgemäß sollten die größeren Konjugate, also die mit mehr DNA-Strängen, eine geringere Retention (zeitlich früher) aufweisen. Der Vergleich der Absorptionsspektren zeigt jedoch, daß der DNA-Anteil mit steigender Eluationszeit zunimmt. Dieser Widerspruch ist dadurch zu erklären, daß die Konjugate aufgrund ihrer Form länger in den Poren des Säulenmaterials verbleiben. Andererseits kann das Verhältnis durch unkonjugierte Goldpartikel, die etwa zeitgleich mit den Konjugaten kommen, verfälscht sein.

Die drei Peaks der Konjugatprobe sind überlagert, so daß eine effektive Trennung nicht möglich ist. Unter Berücksichtungung der Peaklage wird deutlich, daß die untersuchten Konjugate schon dicht an der Ausschlußgrenze liegen, wo keine optimale Trennleistung erreicht werden kann. Das Säulentotvolumen ist mit einem Pfeil markiert. Abbildung 18 zeigt das Chromatogramm der gleichen Konjugatprobe, das aber mit einer Säule von höherer Ausschlußgrenze (Arbeitsbereich 100.000-20.000.000 Dalton) mit 400 nm großen Poren erstellt wurde. Hier zeigt das Chromatogramm der Konjugatprobe ebenfalls drei Peaks, die besser, aber nicht vollständig getrennt sind. Der Peak der unmodifizierten Goldpartikel kommt zeitgleich mit dem der ersten Fraktion der Konjugate. Das zugehörige Absorptionsspektrum zeigt, daß die Fraktion viele Goldkolloide mit einem geringen DNA-Anteil enthält. In den nachfolgenden Fraktionen steigt der DNA-Anteil. Das bestätigt die Vermutung, daß die Konjugate aufgrund ihrer Form länger in den Poren verweilen. Ein eindeutiges Abbild der Konjugatstruktur der getrennten Fraktionen kann ein AFM hier nicht liefern, da es die (20b)DNA nicht auflösen kann. Die Konjugate aus (100b)DNA, die zuvor im AFM abgebildet sind, lassen sich durch die GFC jedoch nicht trennen. Das Chromatogramm ist im Anhang dargestellt. Da die chromatographischen Trennmethoden nicht auf der Basis nur eines Kriteriums trennen, ist für ein gutes Trennergebnis sowohl in der Gelelektrophorese^[82] als auch in der GFC immer ein ganz bestimmtes Verhältnis zwischen den Komponenten notwendig.



Abbildung 18 Separation von Gold-(20b)DNA-Konjugaten über GPC mit einer GFC 4000-8-Säule (Porengröße 400 nm), oben: Chromatogramm, unten: Absorptionsspektren der markierten Fraktionen von der aufgetrennten Konjugatlösung.

Charakterisierung von Konjugaten aus CdTe-Partikeln und thiolierten Oligonukleotiden

Die silikatbeschichteten, aminofunktionalisierten CdTe-Partikel wurden analog zu den Goldpartikeln mit thiolierten Oligonukleotiden konjugiert. Die Silikathülle der CdTe-Partikel besitzt im Gegensatz zu den entsprechenden Goldpartikeln neben den Amino- und Phosphonatgruppen auch nach außen präsentierte Thiolgruppen. Die Ursache liegt in der Beschichtungstechnik. unterschiedlichen Die CdTe-Partikel benötigen für den Ligandenaustausch einen deutlichen Überschuß an 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan (Ligand 1). Dieser Überschuß wird während des Kondensationsschrittes in die Hülle eingebaut. Bei der Zugabe des bifunktionellen Linkers N-Succinimidyl-Bromoacetat, der einerseits mit Thiolfunktionen und andererseits mit Aminofunktionen reagiert, würden die Partikel instantan vernetzen, was sich in Vorexperimenten bestätigte. Deshalb beinhaltet die Konjugationsvorschrift hier vor der Bromoacetylierung einen zusätzlichen Schritt, die Carboxyamidomethylierung der zugänglichen Thiolgruppen in der Silikathülle^[34]. Dabei wird mit Iodoacetamid ein inaktiver Thioether gebildet. So reagiert der bifunktionelle Linker auf der Partikeloberfläche nur mit den Aminofunktionen und nicht mit den geschützten Thiolfunktionen. Die Bromoacetatgruppe des Linkers bleibt unberührt und steht zur Verknüpfung mit der thiolierten DNA zur Verfügung.

Aus der Konjugation von CdTe-Partikeln und thiolierten Oligonukleotiden resultieren lösliche, fluoreszierende Produkte, die eine gute Mobilität in Agarosegelen besitzen. Abbildung 19 zeigt das Lumineszenzbild eines nativen Agarosegels, auf dem Konjugate aus CdTe-Kolloiden und thiolierten (20b)Oligonukleotiden neben den einzelnen Komponenten als Referenz eine Stunde bei 100 Volt gelaufen waren. Die Konjugate (Tasche 1) weisen eine wesentlich höhere Mobilität in Richtung der Anode auf als die unkonjugierten, aber ansonsten gleichen CdTe-Partikel. Dieser Effekt ist auf eine Steigerung der negativen Nettoladung der konjugierten gegenüber den unkonjugierten Partikeln zurückzuführen. Die Steigerung der negativen Nettoladung kann durch die Verknüpfung mit einem negativ geladenen Liganden, z.B. einem DNA-Strang, bewirkt werden. In diesem Fall hätte die Zunahme der negativen Ladung den bremsenden Effekt der gesteigerten Größe kompensiert bzw. sogar überkompensiert. Das Konjugat hat demnach eine höhere Ladungsdichte als ein unkonjugiertes Partikel. Andererseits kann die Steigerung der negativen Nettoladung aber auch durch eine Abnahme der positiven Oberflächenladungen verursacht werden, wie sie bei der Reaktion von oberflächengebundenen Aminogruppen, die im neutralen pH-Bereich als Ammonium vorliegen, mit negativ oder ungeladenen Molekülen stattfindet.

In die dritte Tasche wurde eine Mischung aus den thiolierten Oligonukleotiden und den CdTe-Partikeln ohne den Linker gegeben. Die Bande der CdTe-Partikel aus der Mischung ist gegenüber der Bande der reinen CdTe-Partikel (Tasche 2) nicht verschoben. Offensichtlich findet keine unspezifische Wechselwirkung zwischen der DNA und den Partikeln statt. Auch eine Bindung zwischen der Thiolgruppe der DNA und der CdTe-Oberfläche, wie sie bei unbeschichteten CdTe-Partikeln vorkommt^[29], kann ausgeschlossen werden.



Abbildung 19 Lumineszenzbild der nativen Gelelektrophorese von Konjugaten aus silikatbeschichteten CdTe NPs und thiolierten (20b) Oligonukleotiden: (1) CdTe-DNA-Konjugat, (2) CdTe, (3) CdTe + DNA (ohne Linker).

Die Konjugate von silikatbeschichteten CdTe mit thiolierten (100b)Oligonukleotiden besitzen vergleichbare Eigenschaften in der Gelelektrophorese (Abbildung 20 links). Die Mobilität der CdTe-Partikel wird durch die Konjugation erhöht (Tasche 3).Es existiert ebenfalls keine unspezifische Wechselwirkung zwischen den thiolierten (100b)Oligonukleotiden und den silikatbeschichteten CdTe-Partikeln.

Im Vergleich der Konjugate (Tasche 3) mit den bromoacetylierten CdTe-Partikeln (Tasche 2, sehr schwach zu erkennen) laufen die nur bromacetylierten Partikel etwas schneller. Der Unterschied in der Bandenlage weist auf ein verändertes Ladungs/Größen-Verhältnis hin, das durch die Anbindung der Oligonucleotide verursacht sein kann.

Auf den AFM-Bildern (Abbildung 20 rechts) konnten keine Konjugate nachgewiesen werden, wobei berücksichtigt werden sollte, daß die Belegung sehr gering und damit nicht unbedingt repräsentativ ist.



Abbildung 20 links: Lumineszenzbild der Gelelektrophorese von Konjugaten aus silikatbeschichteten CdTe-NPs und thiolierten (100b)Oligonukleotiden (mit Ethidiumbromid behandelt): (1) DNA, (2) CdTe mit Linker, (3) CdTe-DNA-Konjugat, (4) CdTe, (5) CdTe + DNA (ohne Linker); die markierten Banden wurden isoliert, rechts: AFM-Aufnahmen der isolierten Fraktionen. Die Skalierung des Höhenbalkens entspricht 4 nm, die der AFM-Ausschnitte 0,25 μm.

4.2.4 Konjugation von Nanopartikeln und DNA über Phosphoramidbindung

Biokonjugate aus Nanopartikeln und DNA wurden bisher durchgängig mit thiolmodifizierten Oligonukleotiden dargestellt, wobei die Thiolgruppe direkt an die Partikeloberfläche bindet[22-24, 63, 64, 82, 83]. Nur mit Goldpartikeln und anderen Metallclustern wird auf diese Weise eine relativ feste Bindung gebildet^[84], die Bindung zwischen Halbleitermaterialien und Thiolen ist einer starken Austauschdynamik unterworfen^[61]. Kürzlich wurde die Konjugation von silanisierten CdSe/ZnS-Partikeln mit thiolierter DNA über einen bifunktionellen Crosslinker gezeigt^[85].

Ein direkterer Weg ist die Bindung zwischen dem terminalen Phosphatrest der DNA und Aminogruppen auf der Partikeloberfläche. Um die Phosphatgruppe zu modifizieren, sind Methoden entwickelt worden, die eine Derivatisierung mit funktionellen Gruppen ermöglichen^[35]. Diese Methode wurde für die Anwendung auf die silikatbeschichteten CdTe-Kolloide abgewandelt.

Das wasserlösliche Carbodiimid EDC bildet mit dem 5'-Phosphatende des Oligonukleotids intermediär einen aktivierten Ester. Die eingesetzten Kolloide tragen auf der Oberfläche neben den Amino-'Ankergruppen' auch ladungsstabilisierende Phosphonatgruppen, die auch mit EDC reagieren können. Dadurch würde einerseits die kolloidale Stabilität herabgesetzt werden und anderseits würden die Partikel untereinander vernetzen. Deshalb wird in einem zweiten Schritt das Carbodiimidderivat mit Imidazol zu einem reaktiven, aber in Wasser etwas stabileren Phosphorimidazolid umgesetzt. Das überschüssige EDC kann aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. Dann können die Kolloide zugegeben werden, deren Oberflächenamine das Imidazol unter Bildung einer Phosphoramidbindung ersetzen. Ein Reaktionsschema ist in Abbildung 21 dargestellt. Der pH-Wert wird während der Kopplungsprozedur schrittweise von 5 auf 7 verändert, denn EDC wirkt effektiv bei pH 4-6, die Umsetzung mit Imidazol funktioniert bei pH 6-7 und die endgültige Reaktion mit Aminen bei pH 7-8. Für den notwendigen Reinigungsschritt hat sich die Dialyse in einer Mikrodialysezelle als Methode bewährt. Die Dialyse kann schon während der Aktivierungsreaktion, die eine halbe Stunde dauert, begonnen werden. Der pH-Wert kann durch den Wechsel des Dialysemediums zu jeder Zeit unkompliziert dem entsprechenden Optimum angepaßt werden. Informationen zur Mikrodialysezelle sind im Anhang zu finden.



Phosphoramidkonjugat

Abbildung 21 Reaktionsschema der Konjugation von silikatbeschichteten CdTe-Kolloiden mit DNA über Phosphoramidbindung.

Auf diese Weise wurden die in dieser Arbeit zuvor beschriebenen silikatbeschichteten CdTe-Kolloide mit doppelsträngiger DNA einer 250bp-Leiter (Roche) konjugiert, die durch Zerlegung nativer DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen gewonnen ist und Fragmente von 250 bis 3000 Basenpaaren enthält. Zur gelelektrophoretischen Trennung der Konjugate von ungekoppelten Oligonukleotiden und Kolloiden wurden die Reaktionsprodukte zusammen mit den unkonjugierten Referenzsubstanzen auf ein 0,7%iges Agarosegel in 10 mM

Phosphatpuffer bei pH 7 aufgetragen. Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Mobilität der Substanzen im elektrischen Feld. Das native Gel zeigte für die Konjugatprobe eine fluoreszierende Fraktion von wesentlich höherer Mobilität als die reinen CdTe-Kolloide. Die Bande wurde mit dem im methodischen Teil beschriebenen Verfahren isoliert und mittels AFM charakterisiert.



Abbildung 22 AFM-Aufnahmen der über Phosphoramidbindung gebildeten Konjugate aus silikatbeschichteten CdTe-Kolloiden und doppelsträngiger DNA, die vom Agarosegel isoliert wurden.

Die AFM-Aufnahmen in Abbildung 22 zeigen mehrere Konjugate aus sphärischen Partikeln, an die jeweils ein Oligonukleotiddoppelstrang gebunden ist. Im rechten Abbildungsteil ist ein einzelnes Konjugat dargestellt. Die Länge der DNA beträgt ca. 100 nm. Da doppelsträngige DNA in diesem Längenbereich relativ starr und gestreckt ist, entspricht diese Länge der eines 250-Basenstranges. Die Fraktion mit 250 Basenpaaren liegt in der DNA-Probe in der höchsten Konzentration vor, so daß die Wahrscheinlichkeit einer Konjugation für diese am größten ist.

Die AFM-Aufnahmen zeigen neben den Konjugaten auch freie Partikel, jedoch keine ungebundene DNA, was im Einklang mit den Gelelektophoreseergebnissen steht, die Banden für die ungebundene DNA, aber keine zusätzliche für freie Partikel zeigten.



Abbildung 23 Höhenprofil eines Konjugates gemessen durch AFM und AFM-Aufnahme des entsprechenden Konjugats.

Im Höhenprofil eines Konjugats, dargestellt in Abbildung 23, weist die DNA eine Höhe von 1 nm auf. Das ist eine für doppelsträngige DNA typische, regelmäßig gemessene Höhe. Die Höhe des Partikels ist mit knapp 3 nm etwas zu niedrig. Inklusive Hülle liegt sie eher bei 5 nm. Da im AFM im 'tapping'-mode aber die Wechselwirkung zwischen Spitze und Material gemessen wird und nicht ausschließlich das Höhenprofil, können attraktive und repulsive Wechselwirkung zwischen der jeweiligen Oberfläche und der Spitze die virtuelle Höhe beeinflussen.

Zusammenfassung

Es wurden verschiedene Konzepte zur Konjugation von Nanopartikeln und DNA entwickelt und diskutiert. Voraussetzung für eine dauerhafte Anbindung von DNA ist, daß die Ankergruppen auf der Partikeloberfläche fest gebunden sind, wie es in der quervernetzten Hülle der silikatbeschichteten Gold- und CdTe-Nanopartikel der Fall ist. Kovalente Bindungen zwischen DNA und funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche wurden über verschiedene Bindungsstrategien durchgeführt. Diese waren einerseits die über einen heterobifunktionellen Linker vermittelte Verknüpfung der oberflächengebundenen Aminogruppen mit den Thiolgruppen an entsprechend modifizierten Oligonukleotiden und andererseits die Phosphoramidbindung zwischen den Aminogruppen auf der Partikeloberfläche und dem 5'-terminierten Phosphatrest der DNA. Die resultierenden Konjugate sind im Kühlschrank für Monate stabil und können über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt werden. Die gereinigten Konjugate, die aus Partikeln mit einer unterschiedlichen Anzahl an DNA-Strängen bestehen, wurden über AFM visualisiert.

4.2.5 Ausrichtung von DNA im externen elektrischen Feld*

Die Manipulation einzelner molekularer Strukturen ist ein ambitioniertes Ziel der Nanotechnologie. Die Entwicklung entsprechender Methoden ist eine notwendige Voraussetzung für den gezielte Aufbau nanostrukturierter Bauteile. Aufgrund der schon in vorherigen Kapiteln diskutierten Eigenschaften von DNA-Molekülen bezüglich ihrer hochselektiven resultierenden Bindungsfähigkeit und der immanenten Selbstorganisationsfähigkeit wird ihnen ein besonderes Interesse als Nanodraht bzw. Templat für Nanodrähte in der 'bottom-up'-Fabrikation von nanoelektronischen Schaltkreisen entgegengebracht^[86]. So sind zwar schon einzelne Atome, Latex-Nanopartikel und auch DNA-Moleküle mit einer Rastertunnelspitze 'aufgegriffen' und positioniert worden^[87-89], das Verfahren ist aber vergleichsweise aufwendig und kostenintensiv. Die Methode der Ausrichtung von DNA im elektrischen Feld kann die Manipulation von DNA auf molekularer Ebene mit einer örtlichen Auflösung ermöglichen, die mit chemischen Methoden nicht erreicht werden kann^[90]

Ein DNA-Molekül ist eine doppelhelikale Struktur mit zwei Zucker-Phosphat-Ketten, die alternierend aus Zucker (2-Desoxyribose) und Phosphat, in 3'- und 5'-Position verknüpft, aufgebaut sind. Die Ketten sind wie die Handläufe einer Strickleiter durch komplementäre Basenpaare verbrückt. Die Sequenz der vier unterschiedlichen DNA-Basen beinhaltet eine Information, die im Organismus physiologisch oder für den gezielten Aufbau komplexer Molekülstrukturen aus komplementären DNA-Strängen^[23] genutzt werden kann. DNA ist ein typisches Polyelektrolyt, das über seine gesamte Länge ionisierbare Phosphatgruppen trägt. In Lösung dissoziieren die ionisierbaren Gruppen und bilden ein geladenes, von Ionen umgebenes Makromolekül. Die Ionen sind elektrostatisch gebunden, sind aber relativ beweglich entlang des Makromoleküls.

Es existieren diverse Publikationen, sowohl theoretische als auch experimentelle, über die Wechselwirkung zwischen Polyelektrolyten und einem externen elektrischen Feld [91-93]. An dieser Stelle sollen keine theoretischen Modelle diskutiert werden, sondern im Hinblick auf die experimentellen Ergebnisse das Phänomen und dessen Ursprung erläutert werden. Die Wechselwirkung zwischen einem externen Feld und Polyelektrolyten basiert auf einer induzierten Polarisation, vergleichbar mit der wohlbekannten Orientierung elongierter

^{*} Die Untersuchungen zur Ausrichtung von DNA im externen elektrischen Feld sind in Kooperation mit Dr. Oliver Harnack von der Sony International (Europe) GmbH erstellt worden.

Partikel^[94, 95], die von einer Wechselwirkung zwischen dem externen Feld und dem induzierten Dipol herrührt. Die induzierte positive Ladung am einen Ende des Partikels zieht dieses in Richtung des angelegten Feldes und die negative Ladung am anderen Ende in die entgegengesetzte Richtung. Als Ergebnis rotiert das Partikel bis der Gleichgewichtswinkel erreicht ist und es sich parallel der Feldlinien ausgerichtet hat. Liegt ein inhomogenes Feld an, setzt eine Translationsbewegung in die Richtung höherer Feldstärken ein, was als Dielektrophoreseeffekt (DEP) bezeichnet wird^[96]. Ist die Polarisierbarkeit des Mediums höher als die des Partikels, hebt sich die Polarität der induzierten Ladungstrennung auf, und das Partikel richtet sich senkrecht der Feldlinien aus und wird in Richtung geringerer Feldstärken geschoben.

Nun ist ein DNA-Molekül jedoch flexibel und existiert in Lösung in einer zufällig verknäulten Form. Wird ein externes Feld angelegt, so bewirkt es eine Ausrichtung des fadenförmigen Moleküls entlang des Feldes, bis es gestreckt vorliegt. Ein Modell beschreibt das Molekül als eine Kette vieler Dipole, die sich ausrichten. Da die einzelnen Dipole nicht unabhängig voneinander vorliegen, ist eine gefaltete Konformation (Abbildung 24 b)) gegenüber einer gestreckten Form (Abbildung 24 a)) aufgrund der repulsiven Kräfte zwischen den Polarisationsladungen an den Enden energetisch weniger stabil. Erst wenn das Molekül sehr lang ist und die Enden weit voneinander entfernt sind, sind beide Konformationen ähnlich stabil^[96].



Abbildung 24 Polarisation möglicher Konformationen flexibler DNA-Moleküle^[96].

Washizu et al. haben DNA in einem elektrischen Feld mit einer sinusförmigen Wechselspannung von ca. 1 MHz und Feldstärken größer 10^6 V/m manipulieren können^[97]. Die Frequenz der Wechselspannung ist von entscheidender Bedeutung für den Ausrichtungsprozeß. Da die Polarisierbarkeit von der Frequenz abhängt, existieren Frequenzbereiche, in denen das umgebende Medium oder die auszurichtende Struktur stärker polarsiert ist. So beobachteten Washizu et al. bei 400 kHz eine Ausrichtung entlang der Feldlinien, hingegen bei 40 kHz senkrecht zur Feldrichtung^[96]. Zusätzlich schützt die Wechselspannung die Mikroelektrodenstrukturen vor der Elektrolyse, denn trotz weniger µm weiten Elektrodenabständen sind für derartig hohe Feldstärken Spannungen bis zu 100 V notwendig, die bei Gleichstrombedingungen bzw. sehr niedrigen Frequenzen und Elektrolytkontakt die Zersetzung der Elektroden und ein Aufheizen des Elektrolyten bewirken würden.

Die Beschichtung der Elektrodenstruktur mit Polystyrol erscheint im Hinblick auf die Korrosionsbeständigkeit der Elektroden sinnvoll. Zeigen die unbeschichteten Elektroden im optischen Mikroskop auch keine Korrosionanzeichen, so sind auf AFM-Aufnahmen in der Elektrodenlücke nach den Experimenten Massen kleiner Kristallite zu erkennen, die möglicherweise auf Korrosionsprozesse zurückzuführen sind. Die polystyrolbeschichteten Elektroden Elektroden, die keinen direkten Kontakt zum Elektrolyten besitzen, sind auch nach den Experimenten frei von diesen Kristalliten.

DNA-Moleküle sind mit einer Dicke von 2 nm im optischen Mikroskop natürlich nicht sichtbar, mit Hilfe einer Fluoreszenzmarkierung kann DNA jedoch in einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. 4-[(3-Methyl-2(3H)-benzoxazolyliden)methyl]-1-[3-(trimethylammonium)propyl]diiodid (YoPro®-1) bildet mit DNA eine fluoreszierende Interkalationsverbindung, deren Emissionsmaximum bei 505 nm liegt. Ein Zusatz von 2-Mercaptoethanol schützt die Verbindung vor Photooxidation, was ein Ausbleichen der Fluoreszenz im bestrahlten Sichtfeld verzögert und längere Beobachtungszeiten während der Manipulation im elektrischen Feld ermöglicht.

Der Aufbau der Versuchsanordnung für die Ausrichtung von DNA im elektrischen Feld unter fluoreszenzmikroskopischer Detektion ist in Abbildung 25 dargestellt. Die auf einem Glassubstrat geträgerte Aluminium-Mikroelektrodenstruktur ist auf einem Objektträger fixiert und mit einem Funktionsgenerator kontaktiert. Die Elektrodenabstände der Teststruktur betragen 20 µm. In diesen Bereich wird die DNA- und die YoPro®-1-Lösung gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Bei einer 400-fachen Vergrößerung kann sowohl die Emission

der markierten DNA schon deutlich wahrgenommen werden, als auch die Elektrodenlücke noch im Ganzen beobachtet werden.



Abbildung 25 Aufbau der Versuchsanordnung für die Ausrichtung von DNA im elektrischen Feld unter fluoreszenzmikroskopischer Detektion.

(250bp)DNA-Leiter, die aus doppelsträngiger DNA mit Fraktionen von 100 nm bis 1 μ m Länge besteht, wurde in unterschiedlichen Konzentrationen für die Manipulation im elektrischen Feld benutzt. Ein Gehalt von 5 μ g/ml ist im Hinblick auf die Visualisierung der Ausrichtung im Fluoreszenzmikroskop ideal. Um eine exzessive Wärmeentwicklung und Konvektion im elektrischen Feld zu vermeiden, sollte die Verdünnung der DNA-Proben eine möglichst geringe Ionenkonzentration aufweisen.

Die Elektrodenlücke wurde mit UV-Licht bestrahlt und die Fluoreszenz der mit YoPro®-1 markierten DNA im Mikroskop beobachtet. Wenn keine Spannung zwischen den Elektroden anliegt, ist im Bereich der Elektrodenlücke eine einheitliche Lumineszenz zu beobachten (Abbildung 26 a)).

Wird eine sinusförmige Spannung von 30 V_{Peak} bei einer Frequenz von 500 kHz angelegt, was einer Feldstärke von $1,5 \cdot 10^6$ V/m entspricht, sammelt sich bereits nach wenigen Sekunden DNA entlang der Feldlinien (Abbildung 26 b)). Die Fluoreszenz entlang der Feldlinien ist besonders deutlich auf den reflektierenden Elektroden zu erkennen. Nach ca. 30 Sekunden bilden sich bandförmige, die Elektrodenlücke überbrückende Strukturen, wie sie in Abbildung 26 c) dargestellt sind. Ihr Aufbau dauert nur wenige Sekunden. Mit zunehmender Einwirkzeit des Feldes verstärkt sich die Lumineszenz. Offensichtlich wird die DNA förmlich in der Elektrodenlücke eingefangen und durch Polarisierung entlang der Feldlinien ausgerichtet.



Abbildung 26 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Anordnung von DNA (250bp-Leiter) im elektrischen Feld (500 kHz / 30 V; 20 μm Elektrodenabstand), Abbildungen in chronologischer Reihenfolge: a) vor Anlegen des Feldes; b), c), d) unter Einfluß des externen Feldes, b) nach 10 s, c) nach 30 s, d) nach 60 s; e) und f) nach Abschalten der Spannung.

Die Ausbildung von 'schwarmartigen' Ansammlungen läßt sich durch attraktive Wechselwirkung zwischen den induzierten Dipolen erklären. Wird die Spannung abgeschaltet, verteilt sich die Ansammlung langsam und die DNA-Moleküle diffundieren aus dem Bereich der Elektrodenlücke hinaus (Abbildung 26 e) und f)). Dieser Prozeß wird durch die Konvektion im Lösungsmittel beschleunigt. Die Abbildungen sind einem digitalen Videofilm entnommen, der im Anhang auf einer CD gespeichert zu finden ist.

Der Manipulationseffekt kann im Frequenzbereich von 200-1000 kHz beobachtet werden, wobei der optimale Bereich bei 500 kHz liegt. Oberhalb von 1 MHz nimmt die Polarisierbarkeit der Ladungsträger in der DNA ab.

Die Konjugate aus Gold-Nanopartikeln und DNA können unter identischen Bedingungen manipuliert werden. Auch hierzu ist ein digitaler Film auf der CD im Anhang gespeichert. Die Konzentration der Konjugate ist wesentlich geringer als die der DNA-Leiter, so daß keine Ansammlungen zu erkennen sind, die die gesamte Elektrodenlücke überbrücken. Jedoch werden einzelne Konjugate, die als kleine Fluoreszenzpunkte zu erkennen sind, in die Elektrodenlücke, also in Richtung der höheren Feldstärke, gezogen. Diese setzen sich vorwiegend an den Elektrodenkanten ab, an denen sie sich heftig entlang bewegen. Mit zunehmender Einwirkzeit des Feldes werden immer mehr Konjugate in die Elektrodenlücke gezogen, die mit den bereits an den Elektrodenkanten vorhandenen Konjugaten aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den induzierten Dipolen zu koagulieren scheinen. Die Streckung dieser größeren Aggregate ist gelegentlich zu beobachten.

Die elektrostatische Ausrichtung von DNA kann für eine molekulare Manipulation eingesetzt werden, in der die kontrollierte Bewegung individueller DNA-Moleküle benötigt wird. Diese Methode realisiert Manipulationen, die mit mechanischen Methoden undenkbar sind.

Sollen einzelne DNA-Stränge oder Konjugate eine Elektrodenstruktur als sogenannte 'Nanodrähte' überbrücken, müssen diese aus der Lösung heraus auf der Struktur immobilisiert werden. Erste Versuche sind gemacht worden, das Lösungsmittel unter Feldeinwirkung verdampfen zu lassen oder die DNA unter Feldeinwirkung durch Zusatz von Ethanol zu fällen. Da die Ausrichtung aber sehr empfindlich auf Konvektionen im Lösungsmittel reagiert, ist eine Immobilisierung unter Beibehaltung der Ausrichtung mit den genannten Methoden nur unbefriedigend realisiert worden. In der Literatur^[97] ist eine Elektrodengeometrie beschrieben worden, die zwischen den Elektroden, an denen die Spannung anliegt, weitere senkrecht zu den Feldlinien liegende Elektrodenfinger besitzt.
Diese sind während der Ausrichtung nicht kontaktiert. Es wurde beobachtet, daß zwischen ihnen die Konvektion wesentlich geringer ist, als an den kontaktierten Elektroden. Die Abscheidung der ausgerichteten DNA-Moleküle im konvektionarmen Bereich ist gezeigt worden.

Zusammenfassung

Die elektrostatische Orientierung von DNA in einem externen elektrischen Feld ist mit Hilfe einer fluoreszenzmikroskopischen Methode beobachtet worden. Die DNA-Moleküle richten sich durch induzierte Polarisation entlang der Feldlinien aus und konzentrieren sich im inhomogenen Feld in den Bereichen höherer Feldstärken. Als optimale Feldparameter wurden bei Elektrodenabstand von 20 μ m und einer sinusförmigen Wechselspannung eine Frequenz von 500 kHz und eine Spannung von 30 V (V_{Peak}) ermittlet. Die elektrostatische Manipulation individueller Moleküle im externen elektrischen Feld könnte einen wertvollen Beitrag zur Fabrikationstechnik molekularer Bauteile leisten.

4.2.5 Anordnung von wasserlöslichen CdSe-Nanopartikeln auf S-Schichten*

Die Entwicklung von nanoskalierten elektronischen Schaltkreisen benötigt eine perfekt kontrollierbare Positionierung von funktionellen Partikeln auf molekularer Ebene. Geordnete zwei- und dreidimensionale Überstrukturen können mit Hilfe von oberflächenaktiven Molekülen^[45, 98-101], lithographischen Verfahren^[102], Kristallisation^[103, 104] oder komplementären biologischen Materialien^[24, 64, 65, 80] aufgebaut werden. Goldpartikel wurden auch auf selbstorganisierenden biologischen Templaten, sogenannten S-Schichten, angeordnet^[105].

Die Zelloberflächenschichten (surface layer, s-layer) von prokaryotischen Organismen stellen ein einmaliges System dar, das auf verschiedenen Oberflächen kristalline Schichten bildet. Prokaryotische Organismen aus den Gruppen *Archae* und *Bacteria* besitzen eine Schicht aus Proteinen und Glycoproteinen als äußere Hülle des Zellwandmaterials. Die isolierten Proteinbausteine sind einheitlich aufgebaut und lagern sich in Suspension an flüssig-fest- und flüssig-gas-Grenzflächen und an Lipidfilmen in hochgeordneten monomolekularen Schichten zusammen. Die so rekristallisierten Schichten weisen Poren von regelmäßiger Größe und Morphologie auf. Sie besitzen funktionelle Gruppen, die auf dem Proteingitter in definierten Positionen und Orientierungen ausgerichtet sind^[106]. Diese einmaligen Merkmale ermöglichen eine Immobilisierung von Makromolekülen auf fest geträgerten S-Schichten mit hoher Bindungsdichte.

Abbildung 27 zeigt eine AFM-Aufnahme von einer S-Schicht. Sie wurde auf einem mittels Sauerstoffplasma-Behandlung hydrophilisierten Siliziumträger rekristallisiert. Die regelmäßig geformten Proteinuntereinheiten stammen von *Bacillus sphaericus* (SbpA). Sie ordnen sich in einer quadratischen Gittersymmetrie mit einer Kantenlänge von 13,1 nm an.

^{*} Die Experimente zur Anordnung von Nanopartikeln auf S-Schichten sind in Kooperation mit Dr. Erika Gyoervary der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. B. Sleytr am Zentrum für Ultrastrukturforschung der Universität für Bodenkultur Wien durchgeführt worden.



Abbildung 27 AFM-Bild von SbpA-Proteinen, die auf einer hydrophilen Siliziumoberfläche rekristallisiert sind.

Auf dieser Matrix wurden Halbleiter-Nanopartikel in Lösung abgeschieden. Dafür wurden Hexadecylamin/Trioctylphosphin-stabilisierte CdSe-Nanopartikel mittels des koordinativen Liganden *N*,*N*-Dimethyl-mercaptoethylammoniumchlorid (DMAET) von Toluol in Wasser überführt. Die Wasserlöslichkeit der Partikel ist notwendige Voraussetzung für deren Kompatibilität mit den S-Schichten. Die Partikel sind in einer wäßrigen 20 mM DMAET-Lösung löslich. Abbildung 28 zeigt die Absorptions- und Fluoreszenzspekten der CdSe-Nanopartikel vor dem Lösungsmitteltransfer in Toluol und hinterher in Wasser. Auch nach dem Transfer ist die Kolloidlösung optisch transparent. Die wasserlöslichen Partikel zeigen eine unveränderte Bandkantenabsorption. Die Fluoreszenzintensität hingegen ist in Wasser stark vermindert. Für die Anwendung auf den S-Schichten sind die Fluoreszenzeigenschaften aber kein entscheidendes Merkmal. Von großer Bedeutung für die Anordnung auf der S-Schicht ist die Oberflächenladung der Partikel. Gelelektrophoretische Untersuchungen ergaben, daß die wasserlöslichen CdSe-Partikel positiv geladen sind.



Abbildung 28 Absorptions- und Fluoreszenzspektren von CdSe-Nanopartikeln vor und nach dem Transfer in Wasser.



Abbildung 29 Photo der nativen Gelelektrophorese von wasserlöslichen CdSe-Nanopartikeln auf 0,7% Agarosegel (10 mM Phosphatpuffer, 3 mM DMAET).

Um eine Anordnung von Partikeln im TEM visualisieren zu können, wurde die S-Schicht auf einem mit einem Siliziumdioxidfilm belegten Kupfergrid präpariert. Eine derart geträgerte S-Schicht wurde mit den positiv geladenen CdSe-Nanopartikeln in wäßriger Lösung inkubiert. Die TEM-Aufnahme der resultierenden Anordnung ist in Abbildung 30 dargestellt. Die 4 nm großen CdSe-Partikel liegen in einer regelmäßigen quadratischen Fernordnung mit

einem Partikelabstand von 13 nm, der exakt der Seitenlänge und dem Winkel der Einheitszelle der SbpA-Schicht entspricht. Diese Anordnungscharakteristik kann nur durch den Templateffekt der S-Schicht erklärt werden. Die Abscheidung von CdSe-Nanopartikeln auf einem TEM-Grid ohne S-Schicht bewirkt eine dichte, hexagonale Anordnung der Partikel mit einem Partikelabstand, der der doppelten Dicke der Ligandenhülle entspricht^[104]. Die dirigierende Wechselwirkung zwischen den Partikeln und der S-Schicht ist elektrostatische Anziehung zwischen der positiv geladenen Partikeloberfläche und den regelmäßig angeordneten, negativ geladenen Carboxylgruppen auf der S-Schicht.



Abbildung 30 TEM-Aufnahme von positiv geladenen CdSe-Nanopartikeln, die elektrostatisch an eine SbpA-S-Schicht gebunden sind. Die S-Schicht ist nicht markiert und deshalb im TEM nicht zu sehen.

Der Vergleich von elektrostatischen Bindungsexperimenten, in denen jedoch 5 und 10 nm große, citratstabilisierte Goldkolloiden (von Sigma) eingesetzt worden sind, zeigt, daß eine Partikelgröße von ca. 5 nm ideal im Hinblick auf den Templateffekt der S-Schicht ist. Die 5 nm Goldkolloide bilden wie die CdSe-Nanopartikel regelmäßige Anordnungen, wohingegen bei den 10 nm großen Partikeln nur eine geringe und zufällige Belegung zu beobachten ist[36].

Für Studien zur kovalenten Bindung von Nanopartikeln an S-Schichten wurden die Carboxylgruppen auf einer SbpA-S-Schicht mit dem wasserlöslichen Carbodiimid EDC aktiviert und mit aminofunktionalisierten, silikatbeschichten Gold-Nanopartikeln (siehe Kapitel 4.1.1) zur Reaktion gebracht. Die TEM-Untersuchung zeigt ein dichte Monolage der 2 nm großen Partikel auf der S-Schicht. Da die kristalline S-Schicht eine Belegung von $1,6 \cdot 10^6$ Carboxylgruppen pro μ m² aufweist^[36], binden die Nanopartikel nicht entsprechend der Periodizität der regelmäßigen Anordnung, sondern eher in einer zufälligen und dichten Anordnung.

Zusammenfassung

S-Schichten wurden als Templat für die regelmäßige Anordnung von Nanopartikeln verwendet. Erstmalig konnte eine derartige Anordnung von Halbleiter-Nanopartikeln gezeigt werden. Wasserlösliche, positiv geladene CdSe-Nanopartikel binden auf der S-Schicht aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen in einem rechtwinkligen Gitter, das exakt der Periodizität der S-Schicht entspricht. Die selbstorganisierten Anordnungen von Partikeln mit Halbleitereigenschaften besitzen ein einmaliges Potential im Hinblick auf die Fabrikation von integrierten elektronischen Bauteilen im Nanometermaßstab.

4.3 Verknüpfung von Nanopartikeln über Amidbindung

Geordnete Überstrukturen aus nanokristallinen Materialien haben in den letzten Jahren ein steigendes Interesse erfahren. Nanopartikel, häufig als 'künstliche Atome' bezeichnet, werden benutzt, um synthetische Moleküle und Feststoffe aufzubauen. In zwei- und dreidimensionalen Strukturen wurden Nanopartikel in verschiedenen optoelektronischen Bauteilen, wie LEDs (light-emitting-device) und photonischen Kristallen, integriert^[5, 107]. Von Interesse sind sowohl Halbleiter-Nanopartikel als auch metallische Nanopartikel oder Kompositstrukturen. Es wurden verschiedene Verfahren zur Anordnung von Nanopartikeln gezeigt. Sie reichen von der Selbstorganisation relativ monodisperser Partikel in regelmäßige zwei- und dreidimensionale Überstrukturen^[108], ionische Wechselwirkungen^[73], über Kristallisation^[104, 109] bis hin zu kovalenten Verknüpfungsstrategien unter Verwendung verschiedener verbrückender Moleküle^[24].

Die direkte Verknüpfung über Amidbindung erscheint besonders geeignet für die Vernetzung der im Allgemeinen wasserlöslichen, funktionalisierten Nanopartikel, da die Peptidsynthesen in Wasser verglichen mit einer Esterbindung unter besonders milden Reaktionsbedingungen abläuft. Die Reaktion wird durch wasserlösliche Carbodiimide vermittelt und findet in einem pH-Bereich zwischen 5 und 9 statt.

Charakterisierung der säurefunktionalisierten Gold-Nanopartikel

Doremus^[110] hat gezeigt, daß die Interbandabsorption von kolloidalen Goldlösungen bei 436 nm proportional zur analytischen Goldkonzentration ist und die optischen Eigenschaften in Bereich diesem unabhängig von der Partikelgröße sind. Die Oberflächenplasmonenabsorption einige nm großer Goldpartikel ist hingegen durch verstärkte Oberflächenstreuung von Leitungselektronen gedämpft. Unter einem Partikelradius von 8,5 nm ist die Höhe des Maximum der Plasmonenabsorption proportional zum Partikeldurchmesser. Die optische Dichte am Maximum der Plasmonenabsorption als größenabhängiges optisches Merkmal in Relation zum konzentrationsabhängigen Merkmal, der optischen Dichte bei 436 nm, ist in diesem Größenbereich linear abhängig vom Partikeldurchmesser^[15, 111]. Oberhalb von 9 nm Partikeldurchmesser schiebt die energetische Lage der Plasmonenbande mit zunehmender Größe zu geringeren Energien^{[17,} 112]

Abbildung 31 zeigt die Absorptionsspektren verschiedener wäßriger Goldkolloidlösungen. Die Partikel sind alle mit 11-Mercaptoundecansäure stabilisiert, wurden aber in Anwesenheit unterschiedlicher Stabilisatormengen präpariert. Mit steigendem Gold/Stabilisator-Verhältnis nimmt die Überhöhung der Plasmonenbande zu. Vom Wachstumsprozeß aus betrachtet, läßt eine geringere Stabilisatormenge eine größere Aggregationszahl bzw. Partikelgröße erwarten. Dies steht in Übereinstimmung mit der Entwicklung der Plasmonenabsorption.

Das Verhältnis aus der optischen Dichte am Maximum der Plasmonenbande (513 nm) und bei 436 nm, sowie die entsprechend der Literatur kalkulierten Partikelgrößen sind in Tabelle 4 dargestellt. Durch Variation des Gold/Stabilisator-Verhältnisses von 2 bis 0,25 konnten säurefunktionalisierte Gold-Nanopartikel im Größenbereich von 6,5 nm bis 3,2 nm dargestellt werden.



Abbildung 31 Absorptionspektren von 11-Mercaptoundecansäure stabilisierten Gold-Nanopartikeln in Wasser mit unterschiedlichen molaren Gold/11-Mercaptoundecansäure-Verhältnissen: 2 (----), 1,5 (----), 0,5 (------) und 0,25 (-----).

Au/MUS	OD _{max} (Plasmon)	OD _{436 nm}	OD _{max} (Plasmon)/ OD _{436 nm}	Ø [nm]
2	1,17629	0,95917	1,22636	6,5
1,5	0,91544	0,90345	1,01327	4,3
1	0,84949	0,8644	0,98275	4,0
0,5	0,61242	0,63616	0,96268	3,6
0,25	0,38997	0,43689	0,8926	3,2

Tabelle 4Auswertung der Absorptionsspektren in Abbildung 31: aus dem Verhältnis der
optischen Dichten am Maximum der Plasmonenabsorption und bei 436 nm kalkulierte
Durchmesser von Goldpartikeln, die mit unterschiedlichen molaren
Gold/11-Mercaptoundecansäure-Verhältnissen präpariert wurden.

Die 6,5 nm großen Goldkolloide wurden für die Verknüpfung von Partikeln über Amidbindung als carboxylfunktionalisierte Komponente verwendet. Gelektrophoretische Experimente bestätigten eine negative Oberflächenladung. Die Goldkolloide sind in 10 mM Phosphatpuffer bei pH 5 und in 10 mM Boratpuffer bei pH 9 stabil in Lösung. Dies ist eine notwendige Voraussetzung für die Amidbindung, da die Aktivierung der Carboxylgruppen mit einem Carbodiimid am effektivsten bei pH 5 und die letztendliche Bindung bei pH 9 funktioniert.

In Kopplungsversuchen mit thiolstabilisierten CdTe-Nanokristallen konnte eine Verknüpfung von amino- und carboxylfunktionalisierten Partikeln durch Amidbindung nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die amino- und die carboxylfunktionalisierten Partikel aggregieren in einer Mischung schon aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen und fallen aus, ob mit oder ohne aktivierendes Carbodiimid. Aufgrund der Ligandendynamik auf CdTe-Oberflächen kann es nicht als gesichert betrachtet werden, daß die Partikel auch wirklich untereinander über die Amidbindung verknüpft sind und die verküpften Liganden nicht von der Partikeloberfläche desorbiert sind[29, 113].

Hingegen binden thiolische Liganden auf Gold hinreichend fest, wie quantenchemische Untersuchungen belegen^[84]. Allerdings können Goldkolloide auf einfachem Wege über einen bifunktionellen thiolischen Liganden nicht aminofunktionalisiert werden, da die Aminofunktionen stark an die Goldoberflächen binden und die Partikel so quervernetzen. Die aminofunktionalisierten, silikatbeschichteten Gold-Nanopartikel sind für die Verknüpfung von Partikeln geradezu ideal geeignet, zumal diese durch zusätzlich kovalent gebundene Phosphonatgruppen mit einer negativen Oberflächenladung verfügbar sind (vgl. Kapitel 4.1.1). Dadurch kann die Aggregation der Komponenten aufgrund elektrostatischer

Wechselwirkung vermieden werden. Das Reaktionsschema der Amidbindung ist in Abbildung 32 dargestellt.



Abbildung 32 Reaktionsschema der interpartikulären Amidbindung zwischen unterschiedlich funktionalisierten Gold-Nanopartikeln. Übersichtshalber ist die Verknüpfung nur an einem Liganden dargestellt.

Die Mischung der beiden Kolloidlösungen war über Wochen stabil, die mit dem wasserlöslichen *N*-Cyclohexyl-*N'*-[2-(*N*-methylmorpholino)-ethyl]carbodiimid-4 (MMCDI) aktivierte Mischung war innerhalb weniger Stunden größtenteils ausgefallen, was als deutlicher Hinweis auf die Wirksamkeit der Aktivierung bewertet werden kann.

Die atrIR-Spektren des Niederschlags der verknüpften Partikel und des Niederschlags aus der gefällten unaktivierten Mischung sind in Abbildung 33 dargestellt. Die unteren atrIR-Spektren sind von den ungemischten funktionalisierten Gold-Partikeln aufgenommen. Die jeweiligen Zuordnungen der IR-Banden sind in Tabelle 5, Tabelle 6 und Tabelle 7 zusammengefaßt.



Abbildung 33 atrIR-Asorptionsspektren der aminofunktionalisierten, silikatbeschichteten Gold-Nanopartikel (----), der 11-mercaptoundecansäure-stabilisierten Gold-Nanopartikel (-----), der verknüpften Partikel (-----) und der unaktivierten Mischung (------).

Wellenzahl [cm ⁻¹]		Zuordnung
Blindprobe	verknüpft	
3257	3252	-OH in inter- und intramolekulare H-Brücken
3021	3035	v(N-H) von -NH3 ⁺
2926	2917	vC-H(s)
2851	2851	vC-H(s)
1669	1651	v(C=O)/ Amid I
1580	1575	ν (C=O) / Amid II / δ (N-H)
1490	1490	δ (N-H) von -NH ₃ ⁺
1405	1410	δ(C-H) von Propyl
1348	1348	δ(O-H) aus COOH
1305	1305	-C-N
1253	1235	Si-CH3
1201		P=O
1065	1026	Si-O-Si
781	781	-CH2

Tabelle 5Zuordnung der IR-Banden der Kolloidmischung und der verknüpften Partikel.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Zuordnung	Referenz
3374	-OH in inter- und intramolekulare H-	3600-3200
	Brücken	3200-2500[57]
2917/2848	vC-H(s)	2960-2850 (2-3 Banden)[57]
1655/1575	vC=O	1620-1550[57]
1399	δ (C-H) von CH ₂ / δ (OH)	nahe 1430[58]
1343	δ(O-H) aus COOH	1410-1260[57]
1181	v(C-O) aus COOH	1150-1040[57]

Tabelle 6Zuordnung der IR-Banden der säurefunktionalisierten Gold-Nanopartikel.

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Zuordnung	Referenz
3257	-OH in inter- und intramolekulare H-	3600-3200
	Brücken	3200-2500[57]
3035	$v(N-H)$ von $-NH3^+$	3130-3030[57]
2920/2851	vC-H(s)	2960-2850 (2-3 Banden)[57]
2654	assoziiertes OH am Phosphonat	2700-2560[57]
1643	δ (N-H) von -NH ₂	1650-1560[57]
1595		
1490	δ N-H von -NH ₃ ⁺	1500[57]
1415	δΟ-Н	1410-1260
1305	vC-N	1300-1250[57]
1245	Si-CH3	1250[58]
1178	vP=O	1240-1180[57]
1100	Si-O-Si	1100-1000[58]
1015	P-O-CH ₃	1050-1030[57]
834	Si-CH ₃	910-715 mehrere
		Banden ^[58]
784	Si-CH ₃	

Tabelle 7Zuordnung der negativ geladenen, aminofunktionalisierten, silikatbeschichten Gold-
Nanopartikel.

Der wesentliche Unterschied der IR-Spektren der Mischung und der verknüpften Partikel zeigt sich in den charakteristischen N-H-Schwingungen von Ammonium. Die Deformationsschwingung absorbiert bei 3035 cm⁻¹ und die Valenzschwingung bei 1490 cm⁻¹. Beide Banden besitzen im Spektrum der verknüpften Partikel eine wesentlich geringere Intensität, was auf ihre Verknüpfung hinweist. Die monosubstituierten Amide zeigen im

Fingerprintbereich charakteristische Banden. Die Amid I-Bande befindet sich im festen Zustand bei 1680-1630 cm⁻¹ und die Amid II-Bande bei 1570-1515 cm⁻¹. Aufgrund der Überlagerung mit der Carbonyl-Valenzschwingung sind die beiden Banden im Spektrum der verknüpften Partikel nicht zweifelsfrei zu detektieren, obwohl ihre Intensitäten gegenüber der unverknüpften Mischung etwas zugenommen haben. Es ist anzunehmen, daß aus sterischen Gründen nur ein kleiner Anteil der funktionellen Gruppen verknüpft wurde, so daß die Intensität der Amidbanden sehr gering ist.

Aufgrund der IR-Spektren ist anzunehmen, daß eine teilweise Verknüpfung der Ligandenhüllen durch Amidbindungen stattgefunden hat. In Anbetracht der Tatsache, daß nur die verknüpften Partikel ausfallen, kann die interpartikuläre Verknüpfung als gesichert gelten.

Zusammenfassung

Carboxyl- und aminofunktionalisierte Gold-Nanopartikel wurden über Amidbindung verknüpft. Die Amidbindung wurde über das wasserlösliche Carbodiimid MMCDI vermittelt. Die eingesetzten aminofunktionalisierten Gold-Nanopartikel besitzen eine durch Phosphonatgruppen negativ geladene Silikathülle. Da auf diese Weise beide Partikelspezies eine negative Oberflächenladung besitzen, konnte eine Vernetzung aufgrund von attraktiven elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlich funktionalisierten Partikeln ausgeschlossen werden. Der Vergleich der IR-Spektren von verknüpften und unter gleichen Bedingungen gemischten Gold-Nanopartikeln zeigt vor allem die Ähnlichkeit der Proben. Aus sterischen Gründen kann nur ein geringer Anteil der Liganden eine Verknüpfungsreaktion eingehen.

4.4 Asymmetrische Funktionalisierung

Eine der derzeitig größten Herausforderungen der Materialwissenschaften ist die Synthese von komplexen nanoskaligen Strukturen, deren Eigenschaften durch Manipulation der Anordnung ihrer Bestandteile eingestellt werden können. So wie auf molekularer Ebene aus beispielsweise Aminosäuren höchst definierte langkettige Peptide aufgebaut werden können, stellt in der Kolloidwissenschaft ein asymmetrisch funktionalisiertes Teilchen einen Baustein dar, aus dem gerichtete zwei- und drei-dimensionale Überstrukturen aufgebaut werden könnten. Die asymmetrische Funktionalisierung eines Teilchens erfordert ein 'Werkzeug', das die Oberfläche eines Teilchens organisiert. So sind Phasengrenzen wie gas-flüssig oder flüssig-fest geeignet, um auf der ursprünglich homogenen Oberfläche Bereiche mit veränderten Eigenschaften zu schaffen. Siliziumdioxidpartikel konnten an einer gas-flüssig Phasengrenze einseitig mit Goldpartikeln belegt werden[114].

Ein Platinnanopartikel, das einseitig andere funktionelle Gruppen auf der Oberfläche tragen soll, müßte während der Funktionalisierung auf einer Seite geschützt werden und anschließend wieder demaskiert/freigegeben werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte diese Aufgabe durch Zinkoxid erfüllt werden, dem dabei eine doppelte Rolle zuteil wird. Es dient einerseits als Träger-Kolloid, auf dem Platin-Inseln abgeschieden werden können, wobei das Platin an der Grenzfläche geschützt ist (für Liganden unzugänglich), und andererseits sorgt es für die photokatalytische Reduktion des Platins an seiner Oberfläche. Darüber hinaus kann Zinkoxid nach der Funktionalisierung in saurem Medium leicht wieder aufgelöst werden. Ein Syntheseschema der asymmetrischen Funktionalisierung ist in Abbildung 34 dargestellt.



Abbildung 34 Syntheseschema der asymmetrischen Funktionalisierung von Platinnanopartikeln.

4.4.1 Charakterisierung des ZnO-Carrier-Kolloids

Es sind Synthesen in unpolaren Lösungsmitteln, wie TOP/TOPO^[115], bekannt, wobei hier die Kolloide durch einen zusätzlichen organischen Liganden stabilisiert werden müssen oder in Alkoholen^[39, 116-118], in denen die Kolloide Ladungs- bzw. ionisch stabilisiert sind. Da eine relativ kompakte Hülle organischer Liganden den Abscheidungsprozeß von Platin auf der Zinkoxidoberfläche behindern würde, ist die Verwendung von ionisch stabilisierten Zinkoxidkolloiden im Hinblick auf ihren Einsatz als Träger-Kolloid zweckmäßiger. Ihre Synthese verläuft prinzipiell nach folgendem Muster:

- Lösung bzw. Suspension der Edukte in organischen Lösungsmitteln
- Hydrolyse und Kristallisation durch Polykondensation
- Wachstum der Zinkoxidpartikel

Im ersten Schritt wird Zinkacetat in 2-Propanol durch Erhitzen gelöst. Das in Alkoholen schwerlösliche Lithiumhydroxid kann unter intensiver Ultraschallbehandlung suspendiert werden. Um ein möglichst langsames und gleichmäßiges Teilchenwachstum zu bewirken, findet die Hydrolyse bei einer Temperatur von 0°C statt. Nach Zugabe der suspendierten Base klärt sich während der Hydrolyse der zunächst leicht trübe Ansatz in den ersten Minuten, und es entsteht eine farblose, transparente Lösung.



Abbildung 35 Absorptionsspektren eines mit LiOH synthetisierten Zinkoxidkolloids im Verlauf der Präparation.

In Abbildung 35 sind Absorptionsspektren von Zinkoxidkolloiden zu verschiedenen Zeitpunkten der Wachstumsphase gezeigt. Sie zeigen alle eine für Halbleitermaterialien typische Bandkantenabsorption, die für Zinkoxide im UV-Bereich liegt. Das Spektrum, das nach einer Stunde Raumtemperatur aufgenommen wurde, weist eine Bandkantenlage von 320 nm auf, was einer Partikelgröße von 2,5 nm entspricht [118]. Die Bandkantenlage wird bei Zinkoxid traditionell bedingt durch die Wellenlänge am halben Absorptionsmaximum $(\lambda_{max/2})$ bestimmt und nicht wie ansonsten üblich durch die Wellenlänge am Absorptionsmaximums. Während des Wachstums bei Raumtemperatur verschiebt sich die Absorptionskante kontinuierlich zu größeren Wellenlängen hin. So befindet sich nach 18 Stunden $\lambda_{max/2}$ bei 333 nm und nach vier Tagen bei 345 nm. Am Spektrum, das nach sechsstündiger Temperierung auf 60°C gemessen wurde, erkennt man deutlich den Einfluß der Temperatur auf die Geschwindigkeit des auf Ostwald-Reifung beruhenden Wachstumsprozesses von Zinkoxid^[119]. Die Bandkante liegt hier mit 356 nm wesentlich weiter rotverschoben als nach vier Tagen Raumtemperaturlagerung und liegt schon nahe an der Grenze des größenquantisierten Bereiches von Zinkoxid (Festkörperbandkante bei 368 nm). Das Wachstum der Zinkoxidkolloide ist bei höheren Temperaturen schneller, bei niedrigeren Temperaturen verlangsamt, so daß die Zinkoxidlösungen im Kühlschrank monatelang ohne nennenswertes Wachstum gelagert werden können.

Nanokristalline Zinkoxidschichten wurden aus Zinkoxidlösungen, die auf ein Fünftel ihres Ausgangsvolumens eingeengt wurden, durch wiederholtes Eintauchen eines Glasträgers bei einer konstanten Hubgeschwindigkeit präpariert. Das Glassubstrat wies durch die Vorbehandlung mit einer stark basischen Lösung eine mit Hydroxylgruppen gesättigte Oberfläche auf. Die Zinkoxid-Kolloide zeigten auf der hydrophilisierten Oberfläche eine bessere Haftung. Die Hubgeschwindigkeit hat einen wesentlichen Einfluß auf die Beschaffenheit und Homogenität der Schichten. Sie muß so langsam sein, daß das Substrat gut benetzt wird und beim Herausziehen der Lösungsüberschuß gleichmäßig abfließen kann. Damit weist der eintrocknende Lösungsfilm über die ganze Schicht eine möglichst gleiche Dicke auf. Sie darf jedoch nicht so langsam sein, daß die schon eingetrockneten Schichten beim Eintauchen wieder angelöst werden, was in den zuerst eintauchenden Schichtbereichen, die eine längere Verweildauer in der Lösung aufweisen, eine Verminderung der Schichtdicke bewirken würde. Die ideale Hubgeschwindigkeit hängt demnach von der Viskosotät der Kolloidlösung, dem Dampfdruck des Lösungsmittels, der Löslichkeit der Kolloide im Lösungsmittel und der Benetzbarkeit der Schicht ab und muß empirisch ermittelt werden. Sie lag für die 50 mM (analytische Konzentration) propanolische Zinkoxidlösung bei 2,6 mm/s. Bei dieser Geschwindigkeit ist der strukturelle Aufbauprozeß der nanokristallinen Zinkoxidschichten additiv.

Abbildung 36 zeigt die Absorptionsspektren, die jeweils nach acht sukzessiven Beschichtungen gemessen wurden. Die optische Dichte der Bandkantenabsorption nimmt mit jeder Beschichtung um einen relativ konstanten Betrag zu. $\lambda_{max/2}$ liegt bei 352 nm, was einer Partikelgröße von 4 nm entspricht. Die resultierenden Schichten sind optisch transparent und erscheinen relativ homogen.



Abbildung 36 Absorptionspektren einer Zinkoxidschicht während acht sukzessiven Tauchbeschichtungen.

Nach der letzten Beschichtung wurde die Schicht bei 200°C getempert, was kein auffälliges Teilchenwachstum bewirkte. Ein anderes Verhalten zeigte nanokristallines Zinkoxidpulver beim Tempern. Hier wurde die mittlere Partikelgröße röntgendiffraktometrisch bestimmt. Nach Anwendung der Debye-Scherrer-Formel auf die drei intensivsten Reflexe der (100), (002) und (101) Gitterebenen des hexagonalen Zinkoxidgitters beträgt der mittlere Partikeldurchmesser ~ 23 nm (Abbildung 37). Offensichtlich findet beim Trocknen und Tempern von Zinkoxidpulver ein stärkeres Wachstum als bei den entsprechenden Schichten statt. Der aus dem (002)-Reflex berechnete Partikeldurchmesser ist etwas größer. Die Partikel sind in die betrachtete Raumrichtung elongiert, was in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Noack^[120] steht, der ein überproportionales Wachstum entlang der kristallographischen c-Achse beim Sintern von Zinkoxidkolloiden beobachtete. Im Sinne der Funktion als Trägerkolloid ist die Partikelgröße des Zinkoxids aber von geringem Einfluß.



Abbildung 37 Pulverröntgendiffraktogramm von Zinkoxidteilchen, die bei 200°C getempert wurden, Die angegebenen Partikeldurchmesser wurden nach Debye-Scherrer bestimmt, die Teilchen sind entlang der kristallographischen c-Achse ((002)-Reflex) etwas elongiert.

4.4.2 Photokatalytische Reduktion von Platin auf Zinkoxid

Die Methode der photokatalytischen Reduktion von Platin auf Zinkoxid wurde auf der Basis einer von Grätzel und Mitarbeitern für Titandioxid beschriebenen Methode^[42] entwickelt. Die Reaktion ist schematisch in Abbildung 38 dargestellt. Die Reduktion des in der alkoholischen Reaktionslösung gelösten Platin(IV)-Komplexes geschieht an der Zinkoxidoberfläche durch Leitungsbandelektronen, die durch Absorption von UV-Photonen angeregt wurden. Die im Valenzband verbleibenden Löcher oxidieren 2-Propanol zunächst zu 2-Propanolradikalen, die entweder weiter zu Aceton oxidiert werden können oder durch Dimerisierung Pinakol bilden. Um ein Auflösen des Zinkoxids während der Katalyse zu verhindern, ist es ist notwendig, die dabei freiwerdenden Protonen zu neutralisieren.



Abbildung 38 Schema der photokatalytischen Reduktion von Platin auf Zinkoxid.

In Abbildung 39 sind Absorptionsspekten dargestellt, die während der Photokatalyse gemessen wurden. Man erkennt im Spektrum, das vor der Bestrahlung aufgenommen wurde, die Bandkantenabsorption des Zinkoxids und die Absorption des gelben Hexachloroplatinat-Komplexes zwischen 350-400 nm, der sich bereits nach wenigen Minuten Bestrahlung zersetzt. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer weisen die Spektren neben der Bandkantenabsortion des Zinkoxids die Interbandabsorption von Platin auf. Nach 25 min setzt eine Sättigung der Platinreduktion ein.



Abbildung 39 Absorptionspektren der Photoplatinisierung von Zinkoxid im Verlauf der Bestrahlung.

Da Platin im Sinne der asymmetrischen Funktionalisierung möglichst quantitativ auf Zinkoxid abgeschieden werden soll, soll die Reduktion von freiem Platin in Lösung unterdrückt werden. Deshalb wurden die Bestrahlungen mit einem Weißglas 305-Filter durchgeführt, der den höherenergetischen UV-Anteil des Lichtes < 300 nm rausfiltert. In diesem Bereich, genauer bei 280 nm, absorbiert das sich bei der Reaktion bildende Aceton aufgrund eines n,π^* -Übergangs. Es findet eine Autophotokatalyse statt, bei der angeregte Acetontripletts 2-Propanol zu 2-Propanolradikalen oxidiert, die wiederum Platin als Nebenprodukt frei in Lösung reduzieren können.

$$2 (H_{3}C)_{2}C=0 \xrightarrow{h \nu} 2 (H_{3}C)_{2}C=0 \xrightarrow{4 (H_{3}C)_{2}C=0} 4 (H_{3}C)_{2}C=0 + 2 H^{2}$$

Abbildung 40 Reaktionsschema der autophotokatalytischen Reduktion von Platin, die als Nebenreaktion durch Anregung von Aceton bei 280 nm abläuft.

Da jedoch die Lochfänger 2-Propanol bei der Photokatalyse am Zinkoxid ebenfalls intermediär Radikale bilden, die Platin frei in Lösung reduzieren, wurde der Einfluß des Lösungsmittels auf die Platinausbeute in Hinblick auf das Verhältnis von abgeschiedenem und frei in Lösung reduziertem Platin untersucht.



Abbildung 41 Verhältnis zwischen auf Zinkoxid abgeschiedenem Platin und frei in Lösung reduziertem Platin (→→) in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen (Lösungsmittel und Base) und relative Konzentrationen des auf der Zinkoxidschicht abgeschiedenen Platins (··· ▲ ···).

In Abbildung 41 sind die relativen Konzentrationen des abgeschiedenen Platins bei unterschiedlichen Zusammensetzungen der Reaktionslösung dargestellt ($\dots \land \dots$), wobei der Ansatz mit der höchsten Platinkonzentration als Maßstab bzw. auf 'l' gesetzt wurde. Deutlich ist zu erkennen, daß ein Zusatz von Wasser zur alkoholischen Reaktionslösung die Reduktion von Platin fördert. Es ist ebenfalls das Verhältnis der Konzentrationen von abgeschiedenem und frei in Lösung reduziertem Platin dargestellt. Es ist bekannt, daß tert-Butanolradikale Platin(IV) nicht reduzieren können, 2-Propanolradikale hingegen schon. Entsprechend liegt das Verhältnis für alle propanolischen Ansätze unter 1, was bedeutet, daß mehr freies Platin als abgeschiedenes gebildet wurde. Für das tert-Butanol/Wasser-Gemisch liegt es bei 3, das heißt 75% Ausbeute an gebundenem Platin in Bezug auf die Gesamtplatinreduktion. Abbildung 42 zeigt die Absorptionsspektren von zwei verschiedenen Zinkoxidschichten vor und nach der Photoplatinisierung in einem solchen optimalen *tert*-Butanol/Wasser-Gemisch. Die Zinkoxidschichten sind aus unterschiedlichem Zinkoxid präpariert. In a) wurde mit Lithiumhydroxid synthetisiertes Zinkoxid, in b) wurde mit Tetramethylguanidin synthetisiertes Zinkoxid verwendet. Die Zinkoxidschicht in a) zeigt eine deutliche Belegung mit Platin, bei einer geringen Reduktion von Platin in Lösung, was im Sinne einer möglichst quantitativ asymmetrischen Funktionalisierung ideal ist. Die Schicht in b) weist sowohl in Lösung als auch auf der Schicht nur eine minimale Platinausbeute auf. In Verbindung mit den relativ geringen Ausbeuten, die bei einem Zusatz von Tetrabutylammoniumhydroxid (TBA) im Reaktionsmedium resultieren (siehe Abbildung 41), ist anzunehmen, daß organische Basen die photokatalytische Aktivität von Zinkoxid reduzieren.



Abbildung 42 Absorptionspektren zur photokatalytischen Reduktion von Platin auf Zinkoxidschichten jeweils im Lösungsmittel *tert*-Butanol/Wasser: (a) Schicht aus Lithiumhydroxid hydrolysiertem Zinkoxid, (b) Schicht aus Tetramethylguanidin hydrolysiertem Zinkoxid; Zinkoxidschicht vor der Bestrahlung (-----), nach 45 min Bestrahlung (-----) und die Reaktionslösung nach 45 min Bestrahlung (-----).

Das TEM-Bild in Abbildung 43 zeigt auf Zinkoxid-Kolloiden abgeschiedene Platininseln in Hochauflösung. Die Partikel sind so orientiert, daß sowohl die Netzebenen vom Zinkoxid als auch vom Platin zu erkennen sind. Im linken Bild schaut der Betrachter entlang der (200)-Fläche der kubisch-flächenzentrierten Kristallstruktur des Platins mit einem Netzebenenabstand von 196,2 pm und der (100)-Fläche des hexagonalen Zinkoxids mit einem Netzebenenabstand von 281,4 pm, die sich in einem Winkel von 135° treffen. Die Verkippung entsteht durch das epitaktische Aufwachsen von Platin, denn unter diesem Winkel stimmen die Abstände der Netzebenen an der Berührungsfläche überein.



Abbildung 43 HRTEM-Aufnahme von Platininseln auf Zinkoxid-Kolloiden.

4.4.3 Funktionalisierung

Die asymmetrische Funktionalisierung von Kolloiden im Nanometermaßstab vereinigt Erkenntnisse aus der Halbleiter-Kolloidsynthese, Photokatalyse, Sol-Gel-Chemie und Oberflächenstabilisierung bzw. -funktionalisierung in einem komplexen Syntheseweg zu einem Ganzen. Im ersten Teil der Funktionalisierung der Platinpartikel soll die freie Platinoberfläche mit Aminogruppen funktionalisiert werden. Die Liganden müssen fest auf der Partikeloberfläche gebunden sein, da durch einen Ligandenaustausch die Asymmetrie nachträglich durchmischt würde. Die Stabilität der Ligandenbindung soll wieder durch das Konzept der vernetzten Ligandenhülle umgesetzt werden. Das Syntheseschema in Abbildung 34 verdeutlicht den sukzessiven Aufbau der Ligandenhülle. Auf der ungeschützten Oberfläche der einseitig von Zinkoxid geschützten Platinpartikel wurde eine Silikathülle in mehreren Schritten aufgebaut. Die Beschichtung findet selektiv nur auf der Platinoberfläche statt, da diese mit Alkoxysilanen vorbehandelt wird, die dann als Ausgangspunkt für die Polykondensation weiterer Silane wirkt. Diese erste Lage an Silanen besitzt Thiolfunktionen (Ligand 1), die spezifisch an die Metalloberfläche binden, aber an Zinkoxid nicht binden. Dies konnte in vergleichenden Vernetzungsexperimenten von Zinkoxid- und Platinkolloiden mit dithiolierten Linkern verifiziert werden. Platin vernetzte zu großen Aggregaten, während die Zinkoxidpartikel unverändert einzeln vorlagen.

Durch die Wahl der Silane im Polykondensationsschritt können verschiedene funktionelle Gruppen auf der Silkathülle vorliegen, so wie auch auf den homogen beschichteten Gold- und CdTe-Partikeln.

Nach der Belegung der ersten freien Partikelseite ist ein Reinigungsschritt notwendig, um eine Mischung der Liganden bei der Belegung der zweiten Seite zu vermeiden. Im Falle des homogenen, in Lösung ablaufenden Synthesewegs bieten sich aufgrund der alkoholischen Lösungsmittel nur die Ultrafiltration mit einer 30 kD Polyethersulfonmembran (Millipore) oder die Gelfiltration mit lipophilem Sephadex LH20 an. Diese Methoden stellten sich als unpraktikabel heraus, da sich die Zinkoxid-Trägerkolloide während der Ultrafiltration auflösten und so die Platinpartikel vorzeitig freisetzten. Bei der Gelfiltration verblieben die Zinkoxide auf der Säule. Da in einem heterophasigen System notwendige Reinigungschritte wesentlich unkomplizierter sind, wurde die Funktionalisierung auf Platin, das auf Zinkoxidschichten oder getempertem nanokristallinem Zinkoxidpulver abgeschieden wurde, beschränkt. Darüber hinaus garantiert die heterophasige Vorgehensweise, daß die Endprodukte quantitativ asymmetrisch funktionalisiert sind, da freie Platinkolloide ausgeschlossen werden können.



Abbildung 44 HRTEM-Aufnahme von asymmetrisch beschichteten Platinpartikeln nach dem Auflösen von Zinkoxid.

Das TEM-Bild in Abbildung 44 zeigt Platinpartikel, die bei einer hohen Silankonzentration beschichtet worden sind, nach Auflösen des Zinkoxids. Sie sind durch heterogene Photokatalyse auf einer Zinkoxidschicht synthetisiert worden. Da die Silikathülle eine Dicke von 4-5 nm aufweist, ist sie im TEM sichtbar, und man erkennt die Asymmetrie der Beschichtung auf den 2 nm großen Platinpartikeln.

Zwecks Charakterisieung der Ligandenhülle wurden atrIR-Spektren der intensiv gereinigten asymmetrisch funktionalisierten Platinnanopartikel aufgenommen. Die Partikel wurden hierfür unter wiederholtem Fällen und Lösen mehrfach gewaschen und der Niederschlag getrocknet. Dem Syntheseweg entsprechend sind im IR-Spektrum Hinweise auf die aminofunktionalisierte Silikathülle und die 11-Mercaptoundecansäure zu erwarten. Das IR-Spektrum ist in Abbildung 45 dargestellt.



Abbildung 45 atrIR-Spektrum asymmetrisch funktionalisierter Platin-Nanopartikel.

Es zeigt die charakteristischen Banden eines IR-Spektrums von Aminosäuren im festen Zustand^[57]. Im Prinzip stellt das asymmetrisch funktionalisierte Nanopartikel eine Art multifunktionelle Aminosäure dar. In Tabelle 8 sind die IR-Banden mit ihren jeweiligen Zuordnungen zusammengefaßt. Da das Spektrum sowohl die Progressionsbanden langer Kohlenstoffketten bei 1350 bis 1200 cm⁻¹ und die starke Carbonylvalenzschwingung (Aminosäure I) bei 1694 cm⁻¹ als Charakteristikum der 11-Mercaptoundecansäure aufweist, als auch die Absorption der N-H-Valenzschwingungen von Ammoniumgruppen in

Aminosäuren bei 3036 cm⁻¹ zeigt, ist davon auszugehen, daß beide Funktionalitäten vorhanden sind. Die Banden zwischen 1110 cm⁻¹ und 1000 cm⁻¹ können Schwingungen verschiedener Siloxanformationen zugeschrieben werden^[58].

	\widetilde{v} [cm ⁻¹]	Zuordnung	Referenzen
(a)	3099	v(N-H) von Ammonium in	3130-3030 (m) [57]
	3036	Aminosäuren	
(b)	2918 (s) 2847 (s)	sym., asym. v(C-H)	2960-2850 (s) [57]
(c)	2700-2500 (sh)	v(N-H) aus Ammonium	2700-2250 (m), breit
			infolge von
			Oberschwingungen [57]
(d)	1694 (s)	v(C=O) (Aminosäure I)	1725-1695 [57, 58]
(e)	1585 (sh)	asym. ν (C=O) des Carboxylat-Ions von	1585 [57]
		(Aminosäure II)	
(f)	1466 (m) 1436 (m)	δ(C-H)	1470-1430 (m) [57]
(g)	1350-1200	Progressionbanden langer C-Ketten	1350-1200 [57]
(h)	1095(sh)/1037(m)	Si-O-Si Formationen	1110-1000 [58]

Tabelle 8Zuordnung der IR-Banden der asymmetrisch funktionalisierten Platin-Nanopartikel.

Die bifunktionalisierten Platinnanopartikel lösen sich in DMF und bei pH 10 in Wasser. Durch Zugabe von Salzsäure lassen sie sich schon im leicht sauren Medium fällen. Durch Wechsel von saurem und alkalischem pH-Bereich lassen sich die Kolloide wiederholt reversibel lösen und fällen. Ein derartig gelagertes pH-abhängiges Löslichkeitsverhalten wird auch bei säurestabilisierten Kolloiden beobachtet. Es kann mit einem dominierenden Einfluß der Carboxylfunktion auf die kolloidalen Eigenschaften der asymmetrischen Partikel erklärt werden.

Da die bifunktionalen Partikel um pH 5 schon schlagartig ausfallen, sind diese aber für eine interpartikuläre Verknüpfung über Peptidbindung ungeeignet, da die zwingend notwendige Aktivierung der Carboxylgruppen zwischen pH 4 und pH 6 effektiv ist. Eine Erhöhung der Ionenstärke könnte ionische Wechselwirkungen zwischen den Partikeln abschirmen. Eine sukzessive Zugabe von Natriumchlorid bis zu einer 1 M Konzentration im Ansatz bewirkte keine Lösung der Partikel.

Während der Gridpräparation für eine TEM-Untersuchung formten die kolloidalen Partikel 'schneeballartige', dendritische Strukturen. Diese können als Hinweis auf die Existenz von gerichteten interpartikulären Kräften diskutiert werden. Sie könnten den Aufbau von linearen oder dendritischen Überstrukturen ausgehend von einem Teilchen bewirken. Ein derartiges Wachstumsverhalten konnte im Experiment aber nicht nachgewiesen werden. Der Syntheseweg für asymmetrisch funktionalisierten Platin-Nanopartikel wurde gezeigt, jedoch sind weitere Experimente nötig im Hinblick auf die gerichtete Organisation der Partikel in Lösung.

Zusammenfassung

Platin scheidet sich durch photokatalytische Reduktion in 2 nm großen Inseln auf nanokristallinem Zinkoxid ab. Mit einem *tert*-Butanol/Wasser-Gemisch als Reaktionslösung während der Photokatalyse kann Platin mit einer 75% igen Ausbeute, bezogen auf das Verhältnis des abgeschiedenen und frei in Lösung reduzierten Platins, auf Zinkoxid abgeschieden werden. Die Platinpartikel können durch die Anwendung eines heterophasigen Systems in Form von platinisierten nanokristallinen Zinkoxidschichten und –pulvern rein asymmetrisch funktionalisiert werden. Die Quervernetzung der Liganden in einer Silikathülle verhindert einen nachträglichen Austausch der Liganden. Die Bifunktionalisierung der Platinpartikel wurde über TEM- und IR-Charakterisierung nachgewiesen.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung verschiedener Konzepte zur Funktionalisierung von Nanopartikeln und ihre Konjugation mit Biomolekülen im Hinblick auf nanotechnologische Anwendungen.

Es wurden Synthesen für Gold-Nanopartikel entwickelt, die es erlauben, die Ligandenhülle bei minimaler Dicke kovalent zu verknüpfen und somit statisch an die Teilchenoberfläche zu binden. Dies wurde über Sol-Gel-Technik in Form einer Silikathülle realisiert. Darüber hinaus wurde die Ligandenhülle mit einer frei wählbaren Anzahl von funktionellen Kopplungsgruppen versehen. Gleichzeitig konnte die Löslichkeit und die Oberflächenladung durch zusätzliche kovalent gebundene Hilfsliganden eingestellt werden. CdTe-Nanokristalle wurden in ähnlicher Weise beschichtet und funktionalisiert. Ihre bis zu Monaten reichende Stabilität und Fluoreszenzintensität ist abhängig von der Dicke der Silikathülle. Die resultierenden Kolloide waren über Monate stabil. Die biokompatiblen Nanopartikel besitzen fest gebundene Ligandenhüllen und nach außen zeigenden Aminogruppen, welche sich hervorragend für Kopplungsreaktionen mit biologischen Molekülen eignen.

Derartig aminofunktionalisierte Gold-Nanopartikel wurden über eine Amidverknüpfungsreaktion mit einem *N*-hydroxysuccinimid-aktivierten Biotinderivat modifiziert. Mittels der an die Partikeloberfläche kovalent gebundenen Hilfsliganden können Löslichkeit und Oberflächenladung so eingestellt werden, daß sowohl vor als auch nach der Biotinylierung derart oberflächenmodifizierte Partikel über Monate in Lösung stabil sind. Die Biotinylierungsrate beträgt je nach Präparation zwei bis acht Biotingruppen pro Partikel. Die entsprechenden silikatbeschichten CdTe-Kolloide konnten in gleicher Weise biotinyliert werden. Diese bilden mit Avidin in einer sehr spezifischen Schlüssel-Schloß-Reaktion fluoreszierende Biokonjugate, die, wenn sie mit einem hohen Überschuß an CdTe-Kolloiden präpariert werden, eine komplexartige Struktur besitzen.

Es wurden verschiedene Konzepte zur Konjugation von Nanopartikeln und DNA entwickelt. Voraussetzung für eine dauerhafte Anbindung von DNA ist, daß die Ankergruppen auf der Partikeloberfläche fest gebunden sind, wie es in der quervernetzten Hülle der silikatbeschichteten Gold- und CdTe-Nanopartikel der Fall ist. Kovalente Bindungen zwischen DNA und funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche wurden über verschiedene Bindungsstrategien durchgeführt. Diese waren einerseits die über einen heterobifunktionellen Linker vermittelte Verknüpfung der oberflächengebundenen Aminogruppen mit den Thiolgruppen an entsprechend modifizierten Oligonukleotiden und andererseits die Phosphoramidbindung zwischen den Aminogruppen auf der Partikeloberfläche und dem 5'-terminierten Phosphatrest der DNA. Die resultierenden Konjugate können über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt werden. Die gereinigten Konjugate wurden über AFM visualisiert.

Die elektrostatische Orientierung von DNA und DNA-Konjugaten in einem externen elektrischen Feld wurde mit Hilfe einer fluoreszenzmikroskopischen Methode beobachtet. Die DNA-Moleküle richten sich durch induzierte Polarisation entlang den Feldlinien aus und konzentrieren sich im inhomogenen Feld in den Bereichen höherer Feldstärken. Als optimale Feldparameter wurden bei einer sinusförmigen Wechselspannung eine Frequenz von 500 kHz und eine Spannung von 30 V (V_{Peak}) bei einem Elektrodenabstand von 20 µm bestimmt. Die Methode der elektrostatischen Manipulation individueller Moleküle im externen elektrischen Feld könnte einen wertvollen Beitrag zur Fabrikationstechnik molekularer Bauteile leisten.

S-Schichten wurden als Templat für die regelmäßige Anordnung von Nanopartikeln verwendet. Erstmalig konnte eine derartige Anordnung von Halbleiter-Nanopartikeln gezeigt werden. Wasserlösliche, positiv geladene CdSe-Nanopartikel binden auf der S-Schicht aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen in einem rechtwinkligen Gitter, das exakt der Periodizität der S-Schicht entspricht. Die selbstorganisierte Anordnung von Partikeln mit Halbleitereigenschaften besitzt ein einmaliges Potential im Hinblick auf die Fabrikation von integrierten elektronischen Bauteilen im Nanometermaßstab.

Die asymmetrische Funktionalisierung von Nanokristallen stellt eine große Herausforderungen an das Oberflächendesign von Partikeln dar. Erkenntnisse aus der Halbleiter-Kolloidsynthese, Photokatalyse, Sol-Gel-Chemie und Oberflächenstabilisierung bzw. -funktionalisierung vereinigen sich hier in einem komplexen Syntheseweg. Die asymmetrische Funktionalisierung eines Teilchens erfordert ein 'Werkzeug', das die Oberfläche eines Teilchens organisiert. Dieses wurde in Form eines heterophasigen Systems von platinisierten nanokristallinen Zinkoxidschichten und -pulvern realisiert. Die einseitig von Zinkoxid geschützten Platinpartikel wurden in mehreren Schritten asymmetrisch funktionalisiert. Die Bifunktionalisierung der Platinpartikel wurde über TEM- und IR-Charakterisierung nachgewiesen.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Synthesen und Selbstorganisationsverfahren nanoskaliger Materialien stellen einen vielfältigen Methodensatz zum Aufbau komplexer Hybridstrukturen dar.

6. Summary

The present work deals with the development of various conceptions for the functionalisation of nanoparticles and their conjugation with biomolecules in terms of nanotechnological applications.

Syntheses of gold nanoparticles were developed that allow to link the ligand-shell covalently at a minimum thickness, thus binding it statically to the particle surface. This was realised by means of sol-gel-technique in terms of a silica-shell. Furthermore, the ligand-shell was provided with an adjustable number of functional coupling groups. At the same time the solubility and the surface charge can be adjusted by additional covalently bound auxiliary ligands. CdTe nanocrystals were coated and functionalised in an analogous proceeding. Their up to months reaching stability and fluorescence intensity depend on the thickness of the silica-shell. The resulting colloids remained stable for months. The biocompatible nanoparticles possess a tightly bonded ligand-shell with outward pointing amine groups and an outstanding suitability for coupling reactions with biomolecules.

Such amino-functionalised gold nanoparticles were modified by amide linkage with a *N*-hydroxysuccinimide activated biotin derivative. By means of surface bound auxiliary ligands solubility and surface charge can be adjusted in such a way that before and after biotinylation the surface-modified particles remained stable in solution for months. The rate of biotinylation amounts according to the preparation two to eight biotin groups per particle. The corresponding silica-coated CdTe colloids could be biotinylated in the same manner. In a very specific key-lock reaction they form fluorescent bio-conjugates with avidin that have a complex-like structure, if they are prepared with a high excess of CdTe colloids.

Diverse conceptions for the conjugation of nanoparticles and DNA have been developed. The precondition for a permanent linkage of DNA is the tight bonding of the anchor-groups to the particle surface, as in the cross-linked shell of the silica-coated gold and CdTe nanoparticles. Covalent bonds between DNA and the functional groups on the particle surface were carried out via different coupling strategies. These were first the heterobifunctional linker mediated linkage of the surface amine groups and the thiol groups of appropriately modified oligonucleotides and second the phosphoramidate bond between the amine groups on the particle surface and the 5'-phosphate of the DNA. The resulting conjugates can be purified by agarose gel electrophoresis. The purified conjugates were visualised by AFM.

The electrostatic orientation of DNA and DNA-conjugates in an external electric field was observed employing a fluorescence microscopic method. The DNA molecules align themselves along the electric field lines by means of induced polarisation. In the inhomogeneous field they concentrate in the areas of increased electric field strength. The optimal field parameters at an electrode distance of $20 \,\mu\text{m}$ were a sinusoidal voltage with a frequency of 500 kHz and a peak voltage of 30 V. The method of the electrostatic manipulation of individual molecules in an external electric field could accomplish a valuable contribution to the fabrication technique of molecular devices.

S-layers were used as a template for the regular assembly of nanoparticles. For the first time such formations of semiconductor nanoparticles could be shown. Due to electrostatic interactions water soluble, positively charged CdSe nanoparticles bind on the s-layer in a rectangular array that conforms exactly to the periodicity of the s-layer. The self-assembled array of particles with semiconductor properties possesses a unique potential with respect to the fabrication of integrated electronic devices in the nanometer scale.

The asymmetrically functionalisation of nanocrystals repesents one of the major challenges to the surface design of nanoparticles. Here the knowledge of the synthesis of semiconductor colloids, photocatalysis, sol-gel-chemistry and surface-stabilisation respectively -functionalisation combine to a complex synthesis. The asymmetrically functionalisation requires a 'tool', that organises the surface of a particle. That was realised in terms of a heterophasic system of platinised nanocrystalline zincoxide films and powders. Successively, the platinum particles, one-side protected by zincoxide, were asymmetrically functionalised. The bifunctionalisation of the platinum particles was verified by TEM and IR characterisation.

The within the scope of this work developed syntheses and self-assembly-methods of nanoscaled materials represent a set of techniques for the formation of complex hybrid structures.

Literatur

- [1] A. I. Ekimov, A. A. Onushchenko, Sov. Phys.-Semiconductors 1982, 16; 775.
- [2] A. Henglein, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 1982, 86; 301.
- [3] T. Trindade, *Chemistry of Materials* **2001**, 13; 3843.
- [4] T. Rajh, O. I. Micic, A. J. Nozik, *Journal of Physical Chemistry* **1993**, 97; 11999.
- [5] A. Rogach, *Materials Science and Engeneering B* **2000**, 69-70; 435.
- [6] L. E. Brus, Lournal of Chemical Physics 1984, 80; 4403.
- [7] L. Brus, Journal of Physical Chemistry 1986, 90; 2555.
- [8] H. Weller, Angewandte Chemie **1993**, 105; 43.
- [9] A. P. Alivisatos, *Journal of Physical Chemistry* **1996**, 100; 13226.
- [10] P. E. Lippens, M. Lannoo, *Physical Review B* 1989, 39; 10935.
- [11] P. E. Lippens, M. Lannoo, *Physical Review B* **1990**, 41; 6079.
- [12] U. zum Felde, *Dissertation*, Universität Hamburg, Institut für Physikalische Chemie 1999, p. 143.
- [13] G. Frank, E. Kauer, H. Köstlin, Phys. Blätter 1978, 34; 106.
- [14] J. A. Creighton, D. Eadon, G., J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1991, 87; 3881.
- [15] U. Kreibig, M. Gartz, A. Hilger, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 1997, 101; 1593.
- [16] H. Ibach, H. Lüth, Festkörperphysik, Springer, Berlin 1990.
- [17] S. Link, M. A. El-Sayed, Journal of Physical Chemistry B 1999, 103; 4212.
- [18] M. A. Reed, Spektrum der Wissenschaft März 1993, 52.
- [19] A. Henglein, M. Giersig, J. Phys. Chem. B 1999, 103; 9533.
- [20] J. K. Thomas, P. Lianos, Chem. Phys. Lett. 1985, 125; 299.
- [21] M. Li, H. Schnablegger, *Nature* **1999**, 402; 393.
- [22] C. Niemeyer, Nachrichten aus der Chemie 2000, 48; 1466.
- [23] C. A. Mirkin, *MRS Bulletin* **2000**, 43.
- [24] C. M. Niemeyer, Angewandte Chemie 2001, 113; 4254.
- [25] A. T. Andrews, *Electrophoresis. Theory, Technics, and Biochemical and Clinical Applications*, New York 1986.
- [26] R. Westermeier, *Electrophoresis in Practice. A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*, Weinheim 1997.
- [27] S. Udenfriend, S. Stein, P. Böhlen, W. Dairman, W. Leimgruber, M. Weigele, *Science* **1972**, 178; 871.
- [28] M. Weigele, S. L. DeBernard, J. P. Tengi, W. Leimgruber, J. Am. Chem. Soc. 1972, 94; 5927.
- [29] K. Hoppe, *Dissertation*, Universität Hamburg, Institut für Physikalische Chemie 2001.
- [30] M. Gao, S. Kirstein, H. Möhwald, A. L. Rogach, A. Kornowski, A. Eychmüller, H. Weller, *Journal of Physical Chemisty B* **1998**, 102; 8360.
- [31] C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi, *Journal of the American Chemical Society* **1993**, 115; 8706.
- [32] D. V. Talapin, A. L. Rogach, A. Kornowski, M. Haase, H. Weller, *Nano Letters* 2001, 1; 207.
- [33] D. V. Talapin, A. L. Rogach, I. Mekis, S. Haubold, A. Kornowski, M. Haase, H. Weller, *Colloids and Surfaces A* **2002**, 202; 145.
- [34] M. S. Bernatowicz, R. M. Gary, Analytical Biochemistry 1986, 155; 95.
- [35] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego 1996.
- [36] E. Györvary, A. Schroedter, D. V. Talapin, H. Weller, D. Pum, U. B. Sleytr, *Journal* of Nanoscience and Nanotechnology Spezialnummer "Bionanodevices" 2002, eingereicht; .
- [37] J. C. Sheehan, Journal of Organic Chemistry 1956, 21; 439.
- [38] H. Kunz, Angewandte Chemie 1978, 90; 63.

- [39] D. Bahnemann, C. Kormann, M. R. Hoffman, J. Phys. Chem. 1987, 91; 3789.
- [40] K. Feddern, *Dissertation*, Universität Hamburg, Institut für Physikalische Chemie 2002.
- [41] M. Pflughoeft, *Dissertation*, Universität Hamburg, Institut für Physikalische Chemie 2001.
- [42] E. Borgarello, J. Kiwi, E. Pelizetti, M. Visca, M. Grätzel, J. Am. Chem. Soc. 1981, 6324.
- [43] M. Bruchez Jr, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* 1998, 281; 2013.
- [44] W. C. W. Chan, S. Nie, Science 1998, 281; 2016.
- [45] M. Giersig, P. Mulvaney, *Langmuir* **1993**, 9; 3408.
- [46] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D. J. Schiffrin, C. Kiely, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1995, 1655.
- [47] T. H. Galow, A. K. Boal, V. M. Rotello, Adv. Mater. 2000, 12; 576.
- [48] W. Stöber, A. Fink, j. Bohn, J. Colloid Interface Sci. 1968, 26; 62.
- [49] L. M. Liz-Marzán, M. Giersig, P. Mulvaney, Langmuir 1996, 12; 4329.
- [50] T. Ung, L. M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, *Langmuir* **1998**, 14; 3740.
- [51] F. Caruso, Adv. Mater. 2001, 13; 11.
- [52] P. A. Buining, B. M. Humbel, A. P. Philipse, A. J. Verkleij, *Langmuir* 1997, 13; 3921.
- [53] D. Gerion, F. Pinaud, S. C. Williams, W. J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105; 8861.
- [54] S. L. Westcott, S. J. Oldenburg, T. R. Lee, N. J. Halas, Chem. Phys. Lett. 1999, 300; 651.
- [55] A. Henglein, D. Meisel, *Langmuir* **1998**, 14; 7392.
- [56] P. V. Kamat, Journal of Physical Chemistry B 2002, 106; 7729.
- [57] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1991.
- [58] C. J. Pouchert, *The Aldrich Library of Infrared Spectra* 1981.
- [59] C. M. Parler, J. A. Ritter, M. D. Amiridis, *Journal of Non-Crystalline Solids* **2001**, 279; 119.
- [60] N. N. Mamedova, N. A. Kotov, A. L. Rogach, J. Studer, Nanoletters 2001, 1; 281.
- [61] H. Döllefeld, A. Eychmüller, *Phys. Chem. Chem. Phys* **2002**, 4; 4747.
- [62] B. Arkles, in B. Arkles (Ed.): ABCR Gelest2000, Gelest Inc., Tullytown 2000, p. 16.
- [63] R. C. Mucic, J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, J. Am. Chem. Soc. 1998, 12674.
- [64] C. J. Loweth, W. B. Caldwell, X. Peng, A. P. Alivisatos, P. G. Schultz, Angew. Chem. 1999, 111; 1925.
- [65] S. Mann, W. Shenton, M. Li, S. Connolly, D. Fitzmaurice, Adv. Mater. 2000, 12; 147.
- [66] S. Wang, N. Mamedova, N. A. Kotov, W. Chen, J. Studer, Nanoletters 2002, in press;
- [67] K. Hofmann, G. Titus, J. A. Montibeller, F. M. Finn, *Biochemistry* **1982**, 21; 978.
- [68] J. J. Leary, D. J. Brigati, D. C. Ward, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983, 80; 4045.
- [69] M. Li, K. K. W. Wong, S. Mann, Chem. Mater. 1999, 11; 23.
- [70] M. Wilchek, E. A. Bayer, Analytical Biochemistry 1988, 171; 1.
- [71] N. M. Green, Advances in Protein Chemistry 1975, 29; 85.
- [72] Alivisatos, *Science* **1996**, 271; 933.
- [73] J. Kolny, A. Kornowski, H. Weller, *Nanoletters* 2002, 2; 361.
- [74] S. Chen, K. Kimura, *Langmuir* **1999**, 15; 1075.
- [75] U. Winkler, D. Eich, Z. H. Chen, R. Fink, S. K. Kulkarni, E. Umbach, *Chemical Physics Letters* **1999**, 306; 95.

- [76] A. Eychmüller, Journal of Physical Chemistry B 2000, 104; 6514.
- [77] Sigma-Aldrich, in Sigma-Aldrich (Ed.): *Biochemikalien und Reagenzien für Life Science Forschung*, Sigma 2002-2003, p. 551.
- [78] Römpp, 1995.
- [79] F. Saurenbach, Vorlesungsmanuskripte, 25. FF-Ferienkurs, Forschungszentrum Jülich GmbH 1994.
- [80] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* 1996, 382; 607.
- [81] T. A. Taton, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Science* 2000, 289; 1757.
- [82] D. Zanchet, C. M. Micheel, W. J. Parak, D. Gerion, A. P. Alivisatos, *Nano Letters* 2001, 1; 32.
- [83] G. P. Mitchell, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121; 8122.
- [84] A. Johansson, S. Stafstöm, Chem. Phys. Lett. 2000, 322; 301.
- [85] W. J. Parak, D. Gerion, D. Zanchet, A. S. Woerz, T. Pellegrino, C. Micheel, S. C. Williams, M. Seitz, R. E. Bruehl, Z. Bryant, C. Bustamente, C. R. Bertozzi, A. P. Alivisatos, *Chemistry of Materials* 2002, 14; 2113.
- [86] O. Harnack, W. E. Ford, A. Yasuda, J. Wessels, *Nano Letters* 2002, 2; 919.
- [87] P. S. Weiss, D. M. Eigler, *NATO Advanced Science Institutes Series, Series E, Applied Sciences ed. by V. T. Binh, N. Garcia and K. Dransfeld* **1993**, 235; .
- [88] C. Ritter, M. Heyde, U. D. Schwarz, K. Rademann, *Langmuir* 2002, 18; 7798.
- [89] H. Tanaka, T. Kawai, Journal of Vacuum Science Technology B 1997, 15; 602.
- [90] M. Washizu, O. Kurosawa, *IEEE Transactions on Industry Applcations* **1990**, 26; 1165.
- [91] M. Eigen, G. Schwartz, *Journal of Colloidal Science* **1957**, 12; 181.
- [92] J. G. Elias, D. Eden, *Macromol.* **1981**, 14; 410.
- [93] S. Diekmann, D. Porschke, *Biophys. Chem.* 1982, 16; 261.
- [94] G. Schwartz, M. Saito, H. P. Schwan, J. Chem. Phys. 1965, 43; 3562.
- [95] C. Pacholski, *Dissertation*, Universität Hamburg, Institut für Physikalische Chemie 2002.
- [96] M. Washizu, O. Kurosawa, *IEEE Transactions on Industry Applcations* **1989**, 25; 1978.
- [97] M. Washizu, O. Kurosawa, I. Arai, S. Suzuki, N. Shimamoto, *IEEE Transactions on Industry Applcations* **1993**, 29; 1629.
- [98] M. Brust, D. Bethell, D. J. Schiffrin, C. Kiely, Adv. Mater. 1995, 7; 795.
- [99] X. Peng, T. E. Wilson, A. P. Alivisatos, P. G. Schultz, Angew. Chem. 1997, 109; 113.
- [100] J. R. Heath, C. M. Knobler, D. V. Leff, *Journal of Physical Chemistry B* 1997, 101; 189.
- [101] J. E. Martin, J. P. Wilcoxon, J. Odinek, P. Provencio, *Journal of Physical Chemistry B* **2000**, 104; 9475.
- [102] J. R. Heath, R. S. Williams, J. J. Shiang, S. R. Wind, J. Chu, C. D'Emic, W. Chen, C. L. Stanis, J. J. Bucchignano, *Journal of Physical Chemistry* **1996**, 100; 3144.
- [103] C. B. Murray, Kagan, M. G. Bawendi, Science 1995, 270; 1335.
- [104] D. V. Talapin, E. V. Shevchenko, A. Kornowski, N. Gaponik, M. Haase, A. L. Rogach, H. Weller, *Advanced Materials* 2001, 13; 1868.
- [105] S. R. Hall, W. Shanton, H. Engelhardt, S. Mann, ChemPhysChem 2001, 184.
- [106] U. B. Sleytr, P. Messner, D. Pum, M. Sára, *Angewandte Chemie Int. Ed.* **1999**, 38; 1034.
- [107] H. Mathoussi, L. H. Radzilowski, B. O. Dabbousi, D. E. Fogg, R. R. Schrock, E. L. Thomas, M. F. Rubner, M. G. Bawendi, *Journal of Applied Physics* 1999, 86; 4390.
- [108] C. B. Murray, C. R. Kagan, M. G. Bawendi, Science 1995, 270; 1335.
- [109] T. Vossmeyer, G. Reck, B. Schulz, L. Katzikas, H. Weller, Science 1995, 267; 1476.

- [110] R. Doremus, J. Chem. Phys. 1964, 40; 2389.
- [111] T. Siebrands, M. Giersig, P. Mulvaney, C.-H. Fischer, Langmuir 1993, 9; 2297.
- [112] S. Link, M. A. El-Sayed, Journal of Physical Chemistry B 1999, 103; 8410.
- [113] K. Hoppe, E. Geidel, H. Weller, A. Eychmüller, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2002, 4; 1704.
- [114] L. Petit, E. Sellier, E. Duguet, S. Ravaine, C. Mingotaud, J. Mater. Chem. 2000, 10; 253.
- [115] M. Shim, P. Guyot-Sionnest, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123; 11651.
- [116] U. Koch, A. Fojtik, H. Weller, A. Henglein, Chem. Phys. Lett. 1985, 122; 507.
- [117] L. Spanhel, M. A. Andreson, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, 113; 2826.
- [118] E. A. Meulenkamp, J. Phys. Chem. 1998, 5566.
- [119] E. M. Wong, J. E. Bonevich, P. C. Searson, *Journal of Physikal Chemistry B* 1998, 102; 7770.
- [120] V. Noack, Dissertation, Universität Hamburg, Institut für Physikalische Chemie 2001.
Anhang

A Abkürzungsverzeichnis

ε	Hochfrequenz-Dielektrizitätskonstante
\mathcal{E}_0	Dielektrizitätskonstante des Vakuums
AFM	Raster Kraft Mikroskopie
DMAET	N,N-Dimethyl-mercaptoethylammoniumchlorid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
е	Elementarladung
EDC	N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethyl-carbodiimid
EDX	Röntgenfluoreszenzanalyse
E_G	Energie der Bandlücke (gap)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GE	Gelelektrophorese
h	Plancksches Wirkungsquantum
<i>m</i> *	effektive Masse
m _e	Ruhemasse des Elektrons
NHS	N-Hydroxysuccinimid
RT	Raumtemperatur
TBA	Tetrabutylammoniumhydroxid
TEM	Transmissions Elektronenmikroskopie
TEOS	Tetraethoxysilan
TMA	Tetramethylammoniumhydroxid
YoPro®-1	4-[(3-Methyl-2(3H)-benzoxazolyliden)methyl]-1-[3-
	(trimethylammonium)propyl]diiodid

B Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge

-symbol -symbol 11-Mercaptoundecansäure C $36/37/38-43$ $22-36/37$ 2-lodacetamid Xi $36/37/38-43$ $22-36/37$ 2-Mercaptocethanol F, Xi $11-36-67$ $7-16-24/25-26$ 3-Aminopropyldimethylethoxysilan Xi $36/37/38$ $26-36/37/39-45-61$ 3-Mercaptopropionsature T $23/24/25-34$ $26-45$ 3-Mercaptopropionsature T $23/24/25-34$ $26-45$ 3-Mercaptopropionsature T $23/24/25-34$ $26-45$ 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan Xn, N $22-43-51/53$ $24/25-37-61$ 3-Trihydroxysilylpropylmethylphos - - - Aceton F, Xi $11-36-66-67$ $9-16-26$ Ammoniak 25% C, N $34-50$ $26-37/39-45-61$ DMF T $61-E20/21.1-36$ $53.1-45$ DMSO Xi $36/37/38-46$ $26-36/37/39-45$ Indiazol C $22-442/54$ $26-36/37/39-45$ Indiazol C $35/7/38-43$ $22-36$	Chemikalien	Gefahren	R-Sätze	S-Sätze
11-Mercaptoundecansäure C $36/37/38$ $26/36$ 2-lodacetamid Xi $36/37/38-43$ $22-36/37$ 2-Mercaptoethanol F, Xi $11-36-67$ $7-16-24/25-26$ 3-Aminopropyldimethylethoxysilan Xi $36/37/38$ $26-36/37/39-45-61$ 2-Propanol F, Xi $11-36-67$ $7-16-24/25-26$ 3-Aminopropyldimethylethoxysilan Xn, N $22/24/25-34$ $26-45$ 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan Xn, N $22/42-51/35$ $24/25-37-61$ 3-Trihydroxysilylpropylmethylphos - - - phonat, 42% in Wasser - - - Aceton F, Xi $11-36-66-67$ $9-16-26$ Ammoniak 25% C, N $34-50$ $26-36/37/39-45-61$ DMF T $61-E20/21.1-36$ $53.1-45$ DMSO Xi $36/38$ 26 Ethanol F 11 $7-16$ Ethidiumbromidlsg. 1%ig T $36/37/38-46$ $26-36/37/39-45$ Inidazol C $22-34$ $26-36/37/39-45$ Iodoacetamid Xi $36/37/38-$		-symbol	K Suize	5 Suize
2-lodacetamid Xi $36/37/38-43$ 22- $36/37$ 2-Mercaptoethanol T, N 22- $3/24$ - 34 - $51/53$ 26- $36/37/39$ - 45 -61 2-Propanol F, Xi 11 - 36 - 67 7- 16 - $24/25$ - 26 3-Aminopropyldimethylethoxysilan Xi $36/37/38$ 26- $36/37/39$ 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan Xn, N 22- 43 - $51/53$ 24/ 25 - 37 - 61 3-Trihydroxysilylpropylmethylphos - phonat, 42% in Wasser Aceton F, Xi 11 - 36 - 66 - 67 9- 16 - 26 Ammoniak 25% C, N 34 - 50 26- $36/37/39$ - 45 - 61 DMF T 61 - $E20/21$. 1 - 36 53 . 1 - 45 DMSO Xi $36/38$ 26 Ethanol F 11 7- 16 Ethidiumbromidlsg. 1% ig T $36/37/38$ - 46 26- $36/45$ - 53 Fuorescamin - 22- $22/425$ Imidazol C 22 - 34 26- $36/37/39$ - 45 Idoacetamid Xi $36/37/38$ - 46 26- $36/37/39$ - 45 Idoacetamid Xi $36/37/38$ - 46 26- $36/37/39$ - 45 Indiazol C 22 - 34 26- $36/37/39$ - 45 Idoacetamid Xi $36/37/38$ - 43 22- $26-36/37/39-45Idoacetamid Xi 36/37/38-42-36/37/39-45Idoacetamid Xi 36/37/38-42-36/37/39-45Idoacetamid Xi 36/37/38 22-36/37K[AuCL4] Xn 36/37/38 22-36/37Methanol F, T 11-23/24/25-39/23/24/25 7-16-36/37/45N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethyl-Xi 36/37/38 22-36/37mercaptoethylaminon-propyl)-N'-ethyl-Xi 36/37/38 22-36/37mercaptoethylaminon-propyl)-N'-ethyl-Xi 36/37/38 22-36/37mercaptoethylaminon-propyl-Xi 5, T 15-25-34 14.2-26-36/37/39-45Natriumborhydrid F, T 15-25-34 14.2-26-36/37/39-45Natriumborhydrid F, T 15-25-34 14.2-26-36/37/39-45Natriumborhydrid F, T 15-25-34 14.2-26-36/37/39-45Natriumborhydrid F, T 15-25-34 14.2-26-36/37/39-45N-Cyclohexyl-N'-[2-(N$	11-Mercaptoundecansäure	С	36/37/38	26/36
2-Mercaptoethanol T, N 22-23/24-34-51/53 26-36/37/39-45-61 2-Propanol T, N 22-23/24-34-51/53 26-36/37/39 3-Aminopropyldimethylethoxysilan Xi 36/37/38 26-36/37/39 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan Xn, N 22-43-51/53 24/25-37-61 3-Trihydroxysilylpropylmethylphos	2-Iodacetamid	Xi	36/37/38-43	22-36/37
$\begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	2-Mercaptoethanol	T, N	22-23/24-34-51/53	26-36/37/39-45-61
$\begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	2-Propanol	F, Xi	11-36-67	7-16-24/25-26
$\begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	3-Aminopropyldimethylethoxysilan	Xi	36/37/38	26-36/37/39
$\begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	3-Mercaptopropionsäure	Т	23/24/25-34	26-45
$\begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	3-Mercaptopropyltrimethoxysilan	Xn, N	22-43-51/53	24/25-37-61
$\begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	3-Trihydroxysilylpropylmethylphos	-	-	-
AcetonF, Xi11-36-66-679-16-26Ammoniak 25%C, N34-5026-36/37/39-45-61DMFT $61-E20/21.1-36$ 53.1-45DMSOXi $36/38$ 26EthanolF117-16Ethidiumbromidlsg. 1%igT $36/37/38-46$ 26-36-45-53Fuorescamin $22-24/25$ H2[PtCl ₆]C $34-42/43$ $22-36/37/39-45$ IndiazolC $22-34$ $26-36/37/39-45$ IodoacetamidXi $36/37/38-43$ $22-36/37$ K[AuCL ₄]Xn $36/37/38-43$ $22-36/37$ LithiumhydroxidC 35 $26-36/37/39-45$ MethanolF, T $11-23/24/25-39/23/24/25$ $7-16-36/37-45$ N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethyl-Xi $36/37/38$ $22-36/37$ wethylomydroxidC 34 $26-36/37/39-45$ NaOH (1M)C 34 $26-36/37/39-45$ NatriumborhydridF, T $15-25-34$ $14.2-26-36/37/39-45$ NatriumborhydridF, T $15-25-34$ $14.2-26-36/37/39-45$ N-Cyclohexyl-N'-[2-(Nmethylmorpholino)-ethyl]carbodiimid- 45 -N-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetatXiNN-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N-Xn, F $11-23/25$ $7-16-24-36/37/39-45$ N-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetatXiNN-TrimethoxysilphromiumchloridI10 $23.3-24/25$ TetraethoxysilanI0 $23.3-24/25$ 7-16-26-36/37/39-45<	phonat, 42% in Wasser			
Ammoniak 25%C, N $34-50$ $26-36/37/39-45-61$ DMFT $61-E20/21.1-36$ $53.1-45$ DMSOXi $36/37/38$ 26 EthanolF 11 $7-16$ Ethidiumbromidlsg. 1%igT $36/37/38-46$ $26\cdot36-45\cdot53$ Fuorescamin $22\cdot24/25$ H2[PtCl ₆]C $34\cdot42/43$ $22\cdot26\cdot36/37/39-45$ IodoacetamidC $22\cdot34$ $26\cdot36/37/39-45$ IodoacetamidXi $36/37/38-43$ $22\cdot36/37$ K[AuCL ₄]Xn $36/37/38-43$ $22\cdot36/37$ LithiumhydroxidC 35 $26\cdot36/37/39-45$ MethanolF, T $11\cdot23/24/25\cdot39/23/24/25$ $7-16\cdot36/37.45$ N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethyl- arbodiimid (EDC)Xi $10-36/37/38$ $22\cdot36/37$ N-MoH (1M)C 34 $26\cdot36/37/39-45$ NatriumborhydridF, T $15\cdot25\cdot34$ $14.2\cdot26\cdot36/37/39-45$ NatriumborhydridF, T $15\cdot25\cdot34$ 45 N-Cyclohexyl-N'-[2-(N- methylmorpholino)-ethyl]carbodiimid- tert/ButanolN-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetatXiN-N-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetatXi $11\cdot23/25$ $7-16\cdot24\cdot36/37/39-45$ V-Tirimethoxysilylpropyl-N,N,N-Xn, F $11-23/25$ $7-16\cdot24\cdot36/37/39-45$ TetraethoxysilanI0 $23.3\cdot24/25$ $7-16\cdot26\cdot36/37/39-45$	Aceton	F, Xi	11-36-66-67	9-16-26
$\begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	Ammoniak 25%	Ć, N	34-50	26-36/37/39-45-61
$\begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	DMF	T	61-E20/21.1-36	53.1-45
EthanolF117-16Ethidiumbromidlsg. 1%igT $36/37/38-46$ $26-36-45-53$ Fuorescamin $22-24/25$ H2[PtCl6]C $34-42/43$ $22-26-36/37/39-45$ IodoacetamidC $22-34$ $26-36/37/39-45$ IodoacetamidXi $36/37/38-43$ $22-36/37$ K[AuCL4]Xn $36/37/38-43$ $26-37/39$ LithiumhydroxidC 35 $26-36/37/39-45$ MethanolF, T $11-23/24/25-39/23/24/25$ $7-16-36/37-45$ N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethyl-Xi $36/37/38$ $22-36/37$ carbodiimid (EDC)Xi $36/37/38$ $22-36/37$ N-N-Dimethyl-Xi $10-36/37/38$ $22-36/37$ mercaptoethylammoniumchloridF, T $15-25-34$ $42-26-36/37/39-45$ N-Cyclohexyl-N'-[2-(N- methylmorpholino)-ethyl]carbodiimidM-Cyclohexyl-N'-[2-(N- methylmorpholino)-ethyl]carbodiimidN-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N-Xn, F $11-23/25$ $7-16-24-36/37/39-45$ N-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N-Xn, F $11-23/25$ $7-16-24-36/37/39-45$ trimethylammoniumchloridT 10 $23.3-24/25$ Tetraethoxysilan10 $23.3-24/25$ $7-16-26-36/37/39-45$	DMSO	Xi	36/38	26
Ethidiumbromidlsg. 1%igT $36/37/38-46$ $26-36-45-53$ Fuorescamin $22-24/25$ H ₂ [PtCl ₆]C $34-42/43$ $22-26-36/37/39-45$ ImidazolC $22-34$ $26-36/37/39-45$ IodoacetamidXi $36/37/38-43$ $22-36/37$ K[AuCL ₄]Xn $36/37/38-43$ $22-36/37$ LithiumhydroxidC 35 $26-36/37/39-45$ MethanolF, T $11-23/24/25-39/23/24/25$ $7-16-36/37.45$ N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethyl-Xi $36/37/38$ $22-36/37$ carbodiimid (EDC)Xi $36/37/38$ $22-36/37$ N-Dimethyl-Xi $10-36/37/38$ $22-36/37$ metraptoethylammoniumchloridF, T $15-25-34$ $42-36/37/39-45$ N-Cyclohexyl-N'-[2-(Nmethylmorpholino)-ethyl]carbodiimid-Yin, F $11-23/25$ $7-16-24-36/37/39-45$ N-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N-Xn, F $11-23/25$ $7-16-24-36/37/39-45$ V-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N-Xn, F $11-23/25$ $7-16-24-36/37/39-45$ terr-ButanolF, Xn $11-20$ $9-16$ Tetraethoxysilan10 $23.3-24/25$ $7-16-26-36/37/39-45$	Ethanol	F	11	7-16
Fuorescamin22-24/25H2[PtCl_6]C34-42/4322-26-36/37/39-45ImidazolC22-3426-36/37/39-45IodoacetamidXi36/37/38-4322-36/37K[AuCL_4]Xn36/37/3826-36/37/39-45LithiumhydroxidC3526-36/37/39-45MethanolF, T11-23/24/25-39/23/24/257-16-36/37-45N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethyl-Xi36/37/3822-36/37carbodimid (EDC)Xi10-36/37/3822-36/37N-N-DimethylammoniumchloridXi10-36/37/3822-36/37NaOH (1M)C3426-36/37/39-45NatriumborhydridF, T15-25-3414.2-26-36/37/39-45NatriumborhydridF, T15-25-3414.2-26-36/37/39-45.N-Cyclohexyl-N'-[2-(N- methylmorpholino)-ethyl]carbodiimid- 4 (MMCDI)N-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetatXiN-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N-Xn, F11-23/257-16-24-36/37/39-45trimethylammoniumchloridtitert-ButanolF, Xn11-209-16Tetraethoxysilan1023.3-24/257-16-26-36/37/39-45	Ethidiumbromidlsg, 1%ig	Т	36/37/38-46	26-36-45-53
H_2[PtCl_6]C $34-42/43$ $22-26-36/37/39-45$ ImidazolC $22-34$ $26-36/37/39-45$ IodoacetamidXi $36/37/38-43$ $22-36/37$ K[AuCL_4]Xn $36/37/38-43$ $22-36/37$ LithiumhydroxidC 35 $26-36/37/39-45$ MethanolF, T $11-23/24/25-39/23/24/25$ $7-16-36/37-45$ N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethyl-Xi $36/37/38$ $22-36/37$ carbodiimid (EDC)Xi $36/37/38$ $22-36/37$ N-N-Dimethyl-Xi $10-36/37/38$ $22-36/37$ mercaptoethylammoniumchloridXi $10-36/37/38$ $22-36/37$ NaOH (1M)C 34 $26-36/37/39-45$ NatriumborhydridF, T $15-25-34$ $14.2-26-36/37/39-45$ N-Cyclohexyl-N'-[2-(N- methylmorpholino)-ethyl]carbodiimid- 4 (MMCDI)N-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetat MCDIXi $11-23/25$ $7-16-24-36/37/39-45$ trimethylammoniumchloridErt-ButanolF, Xn $11-20$ $9-16$ Tetraethoxysilan10 $23.3-24/25$ Tetraethoxysilan	Fuorescamin	-	-	22-24/25
InitiazolC22-3426-36/37/39-45IodoacetamidXi $36/37/38-43$ $22-36/37$ IodoacetamidXi $36/37/38-43$ $22-36/37$ K[AuCL_4]Xn $36/37/38$ $26-37/39$ LithiumhydroxidC 35 $26-36/37/39-45$ MethanolF, T $11-23/24/25-39/23/24/25$ $7-16-36/37-45$ N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethyl-Xi $36/37/38$ $22-36/37$ carbodiimid (EDC)Xi $36/37/38$ $22-36/37$ N-N-Dimethyl-Xi $10-36/37/38$ $22-36/37$ mercaptoethylammoniumchloridKi $10-36/37/38$ $22-36/37$ NaOH (1M)C 34 $26-36/37/39-45$ NatriumborhydridF, T $15-25-34$ $14.2-26-36/37/39-45$ N-Cyclohexyl-N'-[2-(N- methylmorpholino)-ethyl]carbodiimid- 4 (MMCDI)N-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N - N-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N - Xn, F $11-23/25$ $7-16-24-36/37/39-45$ trimethylammoniumchlorid 10 $23.3-24/25$ tert-ButanolF, Xn $11-20$ $9-16$ Tetraethoxysilan10 $23.3-24/25$	H ₂ [PtC] ₆]	С	34-42/43	22-26-36/37/39-45
Initial of lodoacetamidXi $36/37/38-43$ $22-36/37$ IodoacetamidXi $36/37/38-43$ $22-36/37$ K[AuCL4]Xn $36/37/38$ $26-37/39$ LithiumhydroxidC 35 $26-36/37/39-45$ MethanolF, T $11-23/24/25-39/23/24/25$ $7-16-36/37-45$ N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethyl-Xi $36/37/38$ $22-36/37$ carbodiimid (EDC)Xi $10-36/37/38$ $22-36/37$ N,N-Dimethyl-Xi $10-36/37/38$ $22-36/37$ mercaptoethylammoniumchloridNaOH (1M)C 34 $26-36/37/39-45$ NatriumborhydridF, T $15-25-34$ $14.2-26-36/37/39-45$ NatriumborhydridF, T $15-25-34$ $14.2-26-36/37/39-45$ N-Cyclohexyl-N'-[2-(N- methylmorpholino)-ethyl]carbodiimid- 4 (MMCDI)N-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetat More thylammoniumchloridXi-N-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N- Mn, F $11-23/25$ $7-16-24-36/37/39-45$ trimethylammoniumchloridf, Xn $11-20$ 9-16tert-ButanolF, Xn $11-20$ 9-16Tetraethoxysilan10 $23.3-24/25$ Tetramethylammoniumhydroxid,T, C $10-23/24/25 7-16-26-36/37/39-45$	Imidazol	C	22-34	26-36/37/39-45
Notice in the solution of the solution in the	Iodoacetamid	Xi	36/37/38-43	22-36/37
InitJoin SolutionJoin SolutionLithiumhydroxidC 35 $26\cdot36/37/39\cdot45$ MethanolF, T $11\cdot23/24/25\cdot39/23/24/25$ $7\cdot16\cdot36/37\cdot45$ N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethyl-Xi $36/37/38$ $22\cdot36/37$ carbodiimid (EDC)Xi $10\cdot36/37/38$ $22\cdot36/37$ N,N- Dimethyl-Xi $10\cdot36/37/38$ $22\cdot36/37$ mercaptoethylammoniumchloridKi $10\cdot36/37/38$ $22\cdot36/37$ NaOH (1M)C 34 $26\cdot36/37/39\cdot45$ NatriumborhydridF, T $15\cdot25\cdot34$ $14\cdot2\cdot26\cdot36/37/39\cdot45$ N-Cyclohexyl-N'-[2-(Nmethylmorpholino)-ethyl]carbodiimid-4(MMCDI)N-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetatXiXiN-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N-Xn, F $11\cdot23/25$ $7\cdot16\cdot24\cdot36/37/39\cdot45$ trimethylammoniumchloridF, Xn $11\cdot20$ $9\cdot16$ tert-ButanolF, Xn 10 $23\cdot3\cdot24/25$ Tetramethylammoniumhydroxid,T, C $10\cdot23/24/25 7\cdot16\cdot26\cdot36/37/39\cdot45$	K[AuCL]	Xn	36/37/38	26-37/39
InitialityC3320-30/37/35/45MethanolF, T $11-23/24/25-39/23/24/25$ $7-16-36/37-45$ N-(3-Dimethylamino-propyl)-N'-ethyl-Xi $36/37/38$ $22-36/37$ carbodiimid (EDC)Xi $10-36/37/38$ $22-36/37$ NAOH (1M)C 34 $26-36/37/39-45$ NatriumborhydridF, T $15-25-34$ $14.2-26-36/37/39-45$ NatriumborhydridF, T $15-25-34$ $14.2-26-36/37/39-43.6-45$ N-Cyclohexyl-N'-[2-(Nmethylmorpholino)-ethyl]carbodiimid-4(MMCDI)N-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetatXiXiN-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N-Xn, F $11-23/25$ $7-16-24-36/37/39-45$ trimethylammoniumchloridF, Xn $11-20$ $9-16$ tert-ButanolF, Xn 10 $23.3-24/25$ Tetramethylammoniumhydroxid,T, C $10-23/24/25 7-16-26-36/37/39-45$	Lithiumhydroxid	C	35	26-36/37/39-45
IncludionI, IInclusionInclusionInclusionInclusionInclusionInclusion $N-(3-Dimethyllamino-propyl)-N'-ethyl-Xi36/37/3822-36/37carbodiimid (EDC)Xi10-36/37/3822-36/37N,N-Dimethyl-Xi10-36/37/3822-36/37mercaptoethylammoniumchloridNaOH (1M)C3426-36/37/39-45NatriumborhydridF, T15-25-3414.2-26-36/37/39-43.6-45N-Cyclohexyl-N^-[2-(N-methylmorpholino)-ethyl]carbodiimid-44 (MMCDI)N-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetatXiXiN-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N-Xn, F11-23/257-16-24-36/37/39-45trimethylammoniumchloridF, Xn11-209-16tert-ButanolF, Xn1023.3-24/25Tetramethylammoniumhydroxid,T, C10-23/24/25 7-16-26-36/37/39-45$	Methanol	БТ	11_73/24/25_39/23/24/25	7_16_36/37_45
N-(3-D) incluying induction of the poly is a solution	$N_{-}(3-\text{Dimethylamino-propyl}) - N'_{-}ethyl_{-}$	I', I Xi	36/37/38	22_36/37
N,N-Dimethyl- mercaptoethylammoniumchloridXi10-36/37/3822-36/37NaOH (1M)C3426-36/37/39-45NatriumborhydridF, T15-25-3414.2-26-36/37/39-43.6- 45 N -Cyclohexyl- N '-[2-(N - methylmorpholino)-ethyl]carbodiimid- 4 (MMCDI) N -Hydroxysuccinimidyl-bromoacetat N -Trimethoxysilylpropyl- N,N,N - trimethylammoniumchloridXi- N -Trimethoxysilylpropyl- N,N,N - trimethylammoniumchloridXi, F11-23/257-16-24-36/37/39-45 $tert$ -ButanolF, Xn11-209-16Tetraethoxysilan1023.3-24/257-16-26-36/37/39-45	carbodiimid (EDC)	Λι	50/57/50	22-30/37
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	<i>N</i> , <i>N</i> -Dimethyl-	Xi	10-36/37/38	22-36/37
NaOH (1M)C34 $26-36/37/39-45$ NatriumborhydridF, T $15-25-34$ $14.2-26-36/37/39-43.6-45$ N-Cyclohexyl-N`-[2-(Nmethylmorpholino)-ethyl]carbodiimid4 (MMCDI)N-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetatXiNN-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N-Xn, F $11-23/25$ $7-16-24-36/37/39-45$ trimethylammoniumchloridF, Xn $11-20$ $9-16$ tert-ButanolF, Xn $11-20$ $9-16$ Tetraethoxysilan10 $23.3-24/25$ Tetramethylammoniumhydroxid,T, C $10-23/24/25 7-16-26-36/37/39-45$	mercaptoethylammoniumchlorid			
NatriumborhydridF, T15-25-3414.2-26-36/37/39-43.6- 45N-Cyclohexyl-N'-[2-(N- methylmorpholino)-ethyl]carbodiimid- 4 (MMCDI)N-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetat N-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N- trimethylammoniumchlorid tert-ButanolXi-F, Xn11-23/257-16-24-36/37/39-45Tetraethoxysilan1023.3-24/25Tetramethylammoniumhydroxid,T, C10-23/24/25-7-16-26-36/37/39-45	NaOH (1M)	С	34	26-36/37/39-45
N-Cyclohexyl-N`-[2-(N- methylmorpholino)-ethyl]carbodiimid- 4 (MMCDI)N-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetat N-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N- trimethylammoniumchloridXi-tert-Butanol TetraethoxysilanF, Xn11-23/257-16-24-36/37/39-45Tetraethoxysilan1023.3-24/25Tetramethylammoniumhydroxid,T, C10-23/24/25-7-16-26-36/37/39-45	Natriumborhydrid	F, T	15-25-34	14.2-26-36/37/39-43.6- 45
methylmorpholino)-ethyl]carbodiimid- 4 (MMCDI) N-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetat Xi N-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N- Xn, F 11-23/25 7-16-24-36/37/39-45 trimethylammoniumchlorid tert-Butanol F, Xn 11-20 9-16 Tetraethoxysilan 10 23.3-24/25 Tetramethylammoniumhydroxid, T, C 10-23/24/25- 7-16-26-36/37/39-45	N-Cyclohexyl-N`-[2-(N-	-	-	-
N-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetatXi N -Trimethoxysilylpropyl- N, N, N -Xn, F11-23/257-16-24-36/37/39-45trimethylammoniumchlorid F, Xn 11-209-16tert-ButanolF, Xn11-209-16Tetraethoxysilan1023.3-24/25Tetramethylammoniumhydroxid,T, C10-23/24/25-7-16-26-36/37/39-45	methylmorpholino)-ethyl]carbodiimid- 4 (MMCDI)			
N-Trimethoxysilecininity i-formodecutXIN-Trimethoxysily propyl- N, N, N -Xn, F11-23/25trimethy lammoniumchloridF, Xn11-20tert-ButanolF, Xn11-20Tetraethoxysilan1023.3-24/25Tetramethy lammonium hydroxid,T, C10-23/24/25-Tetramethy lammonium hydroxid,T, C10-23/24/25-	N-Hydroxysuccinimidyl-bromoacetat	Xi		
In The intervention of the interven	N-Trimethoxysilvlpropyl-N N N-	Xn F	11-23/25	7-16-24-36/37/39-45
tert-Butanol F, Xn 11-20 9-16 Tetraethoxysilan 10 23.3-24/25 Tetramethylammoniumhydroxid, T, C 10-23/24/25- 7-16-26-36/37/39-45	trimethylammoniumchlorid	7 1 1, 1	11 25/25	102130/3//3913
Tetraethoxysilan 10 23.3-24/25 Tetramethylammoniumhydroxid, T, C 10-23/24/25- 7-16-26-36/37/39-45	tert-Butanol	F Xn	11-20	9-16
Tetramethylammoniumhydroxid, T, C 10-23/24/25- 7-16-26-36/37/39-45	Tetraethoxysilan	1,111	10	23 3-24/25
	Tetramethylammoniumhydroxid	ТС	10-23/24/25-	7-16-26-36/37/39-45
25% ig in Methanol $39/23/24/25-34$	25% ig in Methanol	1, 0	39/23/24/25-34	10 20 30/37/39 13
Thioglycolsäure $T C = \frac{23}{24/25-34} = \frac{25-27-28}{25-27-28} = 1.45$	Thioglycolsäure	ТС	23/24/25-34	25-27-28 1-45
TMTA F T $11-23/24/25$ 7-16-24-36/37/39-45	TMTA	F T	11-23/24/25	7-16-24-36/37/39-45
Toluol F Xn $11-20$ $16-25-29-33$	Toluol	F Xn	11-20	16-25-29-33
Trimethylchlorosilan $F(C) = 11-14-35-37 = 16-26-20-36/37/30-45$	Trimethylchlorosilan	F C	11-14-35-37	16-26-29-36/37/39-45
VoPro \mathbb{R}_{-1} 1 mM in DMSO nicht	VoPro®-1 1 mM in DMSO	nicht	11 17-33-31	10 20-27-30/37/37 - 73
genrüffl		genrüft!		
Zinkacetat X_n 22 25	Zinkacetat	Xn	22	25

R- und S-Sätze

Bezeichnungen der besonderen Gefahren (R-Sätze):

- R1 In trockenem Zustand explosionsgefährlich.
- R2 Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen explosionsgefährlich.
- R3 Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen besonders explosionsgefährlich.
- R4 Bildet hochempfindliche explosionsgefährliche Metallverbindungen.
- R5 Beim Erwärmen explosionsfähig.
- R6 Mit und ohne Luft explosionsfähig.
- R7 Kann Brand verursachen.
- R8 Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen.
- R9 Explosionsgefahr bei Mischung mit brennbaren Stoffen.
- R11 Leichtentzündlich.
- R12 Hochentzündlich.
- R14 Reagiert heftig mit Wasser.
- R15 Reagiert mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase.
- R15.1Reagiert mit Säure unter Bildung hochentzündlicher Gase.
- R16 Explosionsgefährlich in Mischung mit brandfördernden Stoffen.
- R17 Selbstentzündlich an Luft.
- R18 Bei Gebrauch Bildung explosiver/ leicht entzündlicher Dampf - Luftgemische möglich.
- R19 Kann explosionsfähige Peroxide bilden.
- R20 Gesundheitsschädlich beim Einatmen.
- R21 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut.
- R22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
- R23 Giftig beim Einatmen.
- R24 Giftig bei Berührung mit der Haut.
- R25 Giftig beim Verschlucken.
- R26 Sehr giftig beim Einatmen.
- R27 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut.
- R28 Sehr giftig beim Verschlucken.
- R29 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.
- R30 Kann bei Gebrauch leicht entzündlich werden.
- R31 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.
- R32 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
- R33 Gefahr kumulativer Wirkung.
- R34 Verursacht Verätzungen.
- R35 Verursacht schwere Verätzungen.
- R36 Reizt die Augen.
- R37 Reizt die Atmungsorgane.
- R38 Reizt die Haut.
- R39 Ernste Gefahr irreversiblen Schadens.
- R40 Irreversibler Schaden möglich.
- R41 Gefahr ernster Augenschäden.
- R42 Sensibilisierung durch Einatmen möglich.
- R43 Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.
- R44 Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluß.
- R45 Kann Krebs erzeugen.
- R46 Kann vererbbare Schäden verursachen.
- R48 Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition.
- R49 Kann Krebs erzeugen beim Einatmen.
- R50 Sehr giftig für Wasserorganismen.
- R51 Giftig für Wasserorganismen.
- R52 Schädlich für Wasserorganismen.

- R53 Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
- R54 Giftig für Pflanzen.
- R55 Giftig für Tiere.
- R56 Giftig für Bodenorganismen.
- R57 Giftig für Bienen.
- R58 Kann längerfristig schädliche Wirkungen auf die Umwelt haben.
- R59 Gefährlich für die Ozonschicht.
- R60 Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
- R61 Kann das Kind im Mutterleib schädigen.R62 Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
- R63 Kann möglicherweise das Kind im Mutterleib schädigen.
- R64 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
- R65 Gesundheitsschädlich: Kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen.

Kombinationen der R-Sätze

- R14/15 Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase.
- R15/29 Reagiert mit Wasser unter Bildung giftiger und hochentzündlicher Gase.
- R20/21 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R20/21/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R21/22 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
- R23/24 Giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R23/25 Giftig beim Einatmen und Verschlucken.
- R23/24/25 Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R24/25 Giftig bei Berührung mit der Haut und Verschlucken.
- R26/27 Sehr giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R26/28 Sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken.
- R26/27/28 Sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R27/28 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
- R36/37 Reizt die Augen und die Atmungsorgane.
- R36/38 Reizt die Augen und die Haut.
- R36/37/38 Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut.
- R37/38 Reizt die Atmungsorgane und die Haut.
- R39/23 Giftig ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen.
- R39/24 Giftig ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut.
- R39/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken.
- R39/23/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R39/23/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken.
- R39/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

ANHANG

R39/23/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

R39/26 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen.

R39/27 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut.

R39/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken.

R39/26/27 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut.

R39/26/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken.

R39/27/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

R39/26/27/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

R39/23 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen.

R39/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut.

- R39/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken.
- R39/23/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R39/23/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken.

R39/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

R40/20 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen.

R40/21 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Verschlucken.

R40/20/21Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und Berührung mit der Haut.

R40/20/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und Verschlucken.

R40/21/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

- R40/20/21/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und Verschlucken.
- R42/43 Sensibilisierung durch Einatmen möglich.

R48/20 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster

Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen.

R48/21 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut.

R48/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken.

R48/20/21 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und Berührung mit der Haut.

R48/20/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und Verschlucken.

R48/21/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut und Verschlucken.

- R48/20/21/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R48/23 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen.
- R48/24 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut.

R48/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken.

R48/23/24 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und Berührung mit der Haut.

R48/23/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und Verschlucken.

R48/24/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut und Verschlucken.

R48/23/24/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

R50/53 Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkung haben.

R51/53 Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkung haben.

R52/53 Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkung haben.

R E20 Auch gesundheitsschädlich beim Einatmen.

R E21 Auch gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut.

- R E22 Auch gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
- R E23 Auch giftig beim Einatmen.
- R E24 Auch giftig bei Berührung mit der Haut.
- R E25 Auch giftig beim Verschlucken.
- R E26 Auch sehr giftig beim Einatmen.
- R E27 Auch sehr giftig bei Berührung mit der Haut.
- R E28 Auch sehr giftig beim Verschlucken.
- R E20/21 Auch gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R E20/21/22 Auch gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R E21/22 Auch gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
- R E23/24 Auch giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R E23/25 Auch giftig beim Einatmen und Verschlucken.
- R E23/24/25 Auch giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R E24/25 Auch giftig bei Berührung mit der Haut und Verschlucken.
- R E26/27 Auch sehr giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R E26/28 Auch sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken.
- R E26/27/28 Auch sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R E27/28 Auch sehr giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.

R E39/27/28 Auch sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

R E39/26/27/28 Auch sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

R E39/23 Auch giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen.

- R E39/25 Auch giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken.
- R E39/23/24 Auch giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R E39/23/25 Auch giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken.
- R E39/24/25 Auch giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R E40/20 Auch gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen.
- R E40/21 Auch gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Verschlucken.
- R E40/20/21 Auch gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und Berührung mit der Haut.
- R E40/20/22 Auch gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und Verschlucken.
- R E40/21/22 Auch gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R E40/20/21/22 Auch gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und Verschlucken.
- R E42/43 Auch Sensibilisierung durch Einatmen möglich.
- R E48/20 Auch gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen.

Sicherheitsratschläge (S-Sätze):

- S1 Unter Verschluß aufbewahren.
- S2 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- S3 Kühl aufbewahren.
- S4 Von Wohnplätzen fern halten.
- S5 Unter ... aufbewahren (geeignete Flüssigkeit vom Hersteller anzugeben).
- S5.1 Unter Wasser aufbewahren.
- S5.2 Unter Petroleum aufbewahren.
- S5.3 Unter Paraffinöl aufbewahren.
- S6 Unter ... aufbewahren (inertes Gas vom Hersteller anzugeben).
- S6.1 Unter Stickstoff aufbewahren.
- S6.2 Unter Argon aufbewahren.
- S6.3 Unter Kohlendioxid aufbewahren.
- S7 Behälter dicht geschlossen halten.
- S8 Behälter trocken halten.
- S9 Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren.
- S12 Behälter nicht gasdicht verschließen.
- S13 Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermittel fernhalten.
- S14 Von ... fernhalten (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben).
- S14.1 Von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säure und Alkalien fernhalten.
- S14.2 Von oxidierenden und sauren Stoffen sowie Schwermatallverbindungen fernhalten.
- S14.3 Von Eisen fernhalten.
- S14.4 Von Wasser und Laugen fernhalten.
- S14.5 Von Säuren fernhalten.
- S14.6 Von Laugen fernhalten.
- S14.7 Von Metallen fernhalten.
- S14.8 Von oxidierenden und brennbaren Stoffen fernhalten.

- R E48/21 Auch gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut.
- R E48/22 Auch gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken.
- R E48/20/21 Auch gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und Berührung mit der Haut.
- R E48/20/22 Auch gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und Verschlucken.
- R E48/21/22 Auch gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut und Verschlucken.
- R E48/20/21/22 Auch gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R E48/23 Auch giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen.
- R E48/24 Auch giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut.
- R E48/25 Auch giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken.
- S14.9 Von brennbaren organischen Substanzen fernhalten.
- S14.10 Von Säuren, Reduktionsmitteln und brennbaren Materialien fernhalten.
- S14.11 Von brennbaren Stoffen fernhalten.
- S15 Vor Hitze schützen.
- S16 Von Zündquellen fernhalten Nicht rauchen.
- S17 Von brennbaren Stoffen fernhalten.
- S18 Behälter mit Vorsicht öffnen und handhaben.
- S20 Bei der Arbeit nicht essen und trinken.
- S21 Bei der Arbeit nicht rauchen.
- S22 Staub nicht einatmen.
- S23 Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen (Bezeichnung ist vom Hersteller anzugeben).
- S23.1 Gas nicht einatmen.
- S23.2 Dampf nicht einatmen.
- S23.3 Aerosol nicht einatmen.
- S23.4 Rauch nicht einatmen.
- S23.5 Dampf/Aerosol nicht einatmen.
- S24 Berührung mit der Haut vermeiden.
- S25 Berührung mit den Augen vermeiden.
- S26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser spülen und Arzt konsultieren.
- S27 Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen.
- S28 Bei Berührung mit der Haut sofort waschen mit viel ... (vom Hersteller anzugeben).
- S28.1 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser.
- S28.2 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife.
- S28.3 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife, möglichst auch mit Polyethylenglycol 400 (807485).
- S28.4 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 300 und Ethanol (2:1) und anschließend mit viel Wasser und Seife.
- S28.5 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 400.

- S28.6 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 400 und anschließend Reinigung mit viel Wasser.
- S28.7 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und saurer Seife.
- S29 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen.
- S30 Niemals Wasser hinzugießen.
- S33 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladung treffen.
- S35 Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden.
- S35.1 Abfälle und Behälter müssen durch Behandlung mit 2 %iger Natronlauge beseitigt werden.
- S36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.
- S37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe tragen.
 S38 Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät tragen.
- S39 Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S40 Fußboden und verunreinigte Geräte mit ... reinigen (Material vom Hersteller anzugeben).
- S40.1 Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit viel Wasser reinigen.
- S41 Explosions- und Brandgase nicht einatmen.
- S42 Beim Räuchern/Versprühen geeignetes Atemschutzgerät anlegen (Bezeichnung vom Hersteller anzugeben).
- S43 Zum Löschen ... verwenden (vom Hersteller anzugeben).
- S43.1 Zum Löschen Wasser verwenden.
- S43.2 Zum Löschen Wasser oder Pulverlöschmittel verwenden.
- S43.3 Zum Löschen Pulverlöschmittel, kein Wasser verwenden.
- S43.4 Zum Löschen Kohlendioxid, kein Wasser verwenden.
- S43.6 Zum Löschen Sand, kein Wasser verwenden.
- S43.7 Zum Löschen Metallbrandpulver, kein Wasser verwenden.
- S43.8 Zum Löschen Sand, Kohlendioxid oder Pulverlöschmittel, kein Wasser verwenden.
- S45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).
- S46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.
- S47 Nicht bei Temperaturen über ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben).
- S48 Feucht halten mit ... (vom Hersteller anzugeben).
- S48.1 Feucht halten mit Wasser.
- S49 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- S50 Nicht mischen mit ... (vom Hersteller anzugeben).
- S50.1 Nicht mischen mit Säuren.
- S50.2 Nicht mischen mit Laugen.
- S51 Nur in gut belüfteten Bereichen verwenden.
- S52 Nicht großflächig für Wohn- und Aufenthaltsräume zu verwenden.
- S53 Exposition vermeiden vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. - Nur für den berufsmäßigen Verwender -
- S56 Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.
- S57 Zur Vermeidung einer Kontamination der Umwelt geeigneten Behälter verwenden.
- S59 Informationen zur Wiederverwendung/Wiederverwertung beim Hersteller/Lieferanten erfragen.
- S60 Dieser Stoff und/oder sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.

- S61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
- S62 Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.

Kombinationen der S-Sätze:

- S1/2 Unter Verschluß und für Kinder unzugänglich aufbewahren.
- S3/7 Behälter dicht geschlossen halten und an einem kühlen Ort aufbewahren.
- S3/9 Behälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort aufbewahren.
- S3/9/14 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von ... aufbewahren (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben).
- S3/9/14.1 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säuren und Alkalien aufbewahren.
- S3/9/14.2 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von oxidierenden und sauren Stoffen sowie Schwermetalloxidverbindungen aufbewahren.
- S3/9/14.3 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Eisen aufbewahren.
- S3/9/14.4 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Wasser und Laugen aufbewahren.
- S3/9/14.5 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Säuren aufbewahren.
- S3/9/14.6 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Laugen aufbewahren.
- S3/9/14.7 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Metallen aufbewahren.
- S3/9/14.8 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von oxidierenden und sauren Stoffen aufbewahren.
- S3/9/14/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen gut gelüfteten Ort, entfernt von ... aufbewahren (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben).
- S3/9/14.1/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säuren und Alkalien aufbewahren.
- S3/9/14.2/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von oxidierenden und sauren Stoffen sowie
- Schwermetalloxidverbindungen aufbewahren. S3/9/14.3/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Eisen aufbewahren.
- S3/9/14.4/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Wasser und Laugen aufbewahren.
- S3/9/14.5/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Säuren aufbewahren.
- S3/9/14.6/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Laugen aufbewahren.
- S3/9/14.7/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Metallen aufbewahren.
- S3/9/14.8/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von oxidierenden und sauren Stoffen aufbewahren.
- S7/8 Behälter trocken und dicht geschlossen halten.
- S7/9 Behälter dicht geschlossen an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren.

- S7/47 Behälter dicht geschlossen halten und nicht bei Temperaturen über ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben).
- S20/21 Bei der Arbeit nicht essen, trinken und rauchen.
- S24/25 Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden.
- S29/56 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen und diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.
- S36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und Schutzhandschuhe tragen.
- S36/37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Gesichtsschutz/Schutzbrille tragen.
- S36/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S47/49 Nur im Originalbehälter bei einer Temperatur von nicht über ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben).

C Stukturformeln verwendeter Silane



Abbildung I Strukturformeln der für die Silikatbeschichtungen verwendeten Silane.

D Ergänzende Informationen zum Text



Abbildung II Separation von Gold-(100b)DNA-Konjugaten über GPC mit einer GFC 1000-8-Säule (Porengröße 100 nm), oben: Chromatogramm, unten: Absorptionsspektren der markierten Fraktionen von der aufgetrennten Konjugatlösung.

Aufbau der Mikrodialysezelle

Die Mikrodialysezelle ist für die Dialyse extrem kleiner Probenmengen von 50-200 μ l geeignet. Sie besteht aus einem Eppendorf-Reaktionsgefäß, das im unteren Teil aufgeschnitten wurde. Für Probenvolumina von 50-100 μ l wird ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß verwendet, von 100-200 μ l ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß. Die Mulde im Deckel wird mit der Probe gefüllt und ein eingeweichtes Stück Dialyseschlauch mit Hilfe des aufgeschnittenen Gefäßteils, das nun als Fixierring dient, darüber gespannt. Die Dialysezelle wird so in das Dialysemedium getaucht, daß Probe und Dialysemedium über die Membran im Kontakt stehen und dieser nicht durch eingeschlossene Luftblasen unterbunden wird. Auch kleinste Probenmengen sind nach Durchstechen der Dialysemembran mit einer Pipette wieder leicht aufzunehmen.



Abbildung III Aufbau der Mikrodialysezelle.

Filme zur Ausrichtung von DNA im elektrischen Feld

Auf der CD sind zwei Filme als wmv-Datei gespeichert. Beide Filme können mit dem Windows Media Player geöffnet werden. Die Filme können auch über das PowerPoint-Dokument 'Anhang_Filme_dis' als Animation betrachtet werden.

DNA-Leiter (1:47): (250bp)DNA-Leiter (5 μ g/ml) mit YoPro-1® auf mit Polystyrol beschichter Elektrodenstruktur 500 kHz / 30 V

Konjugate (3:52): (100b)DNA-Gold-Konjugate mit YoPro-1® auf mit Sauerstoffplasma behandelter Elektrodenstruktur 500 kHz / 30 V

Das Programm 'Windows Media Player' ist ebenfalls auf der CD gespeichert.

E Danksagung

Herrn Prof. Dr. Horst Weller danke ich für das interessante Thema, die idealen Arbeitsbedingungen und das fortwährende Vertrauen in meine Arbeit, das er mir entgegen gebracht hat.

Ich danke meinen lieben Kollegen der gesamten Arbeitsgruppe Weller für die fröhliche und kooperative Arbeitsatmosphäre und besonders meinen Gefährten aus Raum 414, Christoph, Herwig, Kathrin, Olaf und Volker, die mir meinen Arbeitstag versüßt haben. (Birne? - Aber nur mit Pommes!, Forschen für Deutschland,...)

Herrn Priv.-Doz. Dr. Alexander Eychmüller danke ich für sein offenes Ohr in fachlichen und anderen Angelegenheiten und die leckeren Fischvariationen.

Dr. Joanna Kolny und Dr. Karsten Kömpe danke ich für so manche XRD-Messung und Herrn Dipl. Ing. Andreas Kornowski und Frau Sylvia Bartholdi-Nawrath für die TEM-Aufnahmen.

Frau Pakula möchte ich für ihre Unterstützung und unendliche Geduld in bürokratischen Angelegenheiten und ihren 'heißen Draht' zum Hapag-Lloyd Reisebüro danken.

Frau Dipl. Chemikerin Jutta Tost aus der Arbeitsgruppe Meyer (Universität Hamburg) gilt mein Dank für die Benutzung ihrer 'Beckie' (HPLC-Anlage).

Meinen Praktikanten Stefan Schiebeler, Daniel Grohs, Nastaran Behzadnia, Nadine Meyer und Ulf Görbig danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz im Labor und ihren damit geleisteten Beitrag zu dieser Arbeit.

Ich danke den BIOAND-Projektpartnern für die hervorragende Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt Dr. Ramon Eritja (CSIC, Barcelona), Dr. Erika Györvary (BOKU, Wien) sowie Dr. William Ford, Dr. Oliver Harnack und Dr. Jurina Wessels (Sony International Europe GmbH, Stuttgart) für die fruchtbaren Kooperationen. Meinen Kolleginnen Dr. Claudia Pacholski und Dipl. Chemikerin Elena Schewtschenko danke ich für die Unterstützung im Kampf mit den administrativen Aufgaben rund um das BIOAND-Projekt.

Abschließend sei meiner Familie gedankt, insbesondere meiner Schwiegermutter für den letzten Schliff und meinem Ehegatten Jan für seine Bereitschaft, in den letzten drei Jahren auf viele gemeinsame Stunden sowie manche erträumte Reise zu verzichten und seine liebevolle Zuwendung, wenn abends mal die Füße schmerzten.

F Lebenslauf

Andrea Schroedter

Persönliche Angaben	
geboren:	10.04.1972 in Neumünster
Familienstand:	verheiratet seit 15.05.1998
Ausbildung	
1978 – 1982	Grundschule Lauenburg
1982 – 1992	Otto-Hahn-Gymnasium GeesthachtAbschluß: Allgemeine Hochschulreife
10.1992 - 03.1993	Studium an der Technischen Universität BraunschweigFachrichtung Biotechnologie
10.1993 - 06.1999	 Studium an der Universität Hamburg Fachrichtungen Biologie, Chemie, Erziehungswissenschaft für das Lehramt an der Oberstufe – Allgemeinbildende Schulen -, Abschluß: 1. Staatsexamen
08.1999 - 03.2000	Vorbereitungsdienst für das Lehramt an Gymnasien, Behörde für Schule Jugend und Berufsbildung, Freie und Hansestadt Hamburg
seit 04.2000	Promotion bei Prof. Dr. H. Weller am Institut für Physikalische Chemie der Universität Hamburg
weitere Lehrerfahrung	
04.1997 – 07.1999	 Katholische Grund-, Haupt- und Realschule, Hamburg Unterrichtsauftrag mit 5 Wochenstunden, Vertretungsunterricht im Elementar- und VR-Breich, integrative Sprachförderung
04.2000 - 07.2000	Immanuel-Kant-Gymnasium, HamburgUnterrichtsauftrag f ür die Unterrichtsf ächer Biologie und Chemie
seit 04.2000	 Institut für Physikalische Chemie der Universität Hamburg Leitung von Übungsgruppen im Fach Physikalische Chemie I,II und III (Thermodynamik, Elektrochemie, Kinetik, Quantenmechanik) Anleitung von Studenten in Forschungspraktika im Rahmen ihres Hauptstudiums

Praktika

01.06.1992 - 31.08.1992	GKSS Forschungszentrum	Geesthacht	GmbH
01.00.1772 01.00.1772	Gitob i orsenangszena am	Geestinuent	Onion

• Mitarbeit in einem wissenschaftlichen Projekt (SEDEX) des F&E-Programms

Auszeichnungen

07.11.1991	Förderpreis 1991 des Vereins der Freunde und Förderer des GKSS-Forschungszentrums
	Geesthacht e.V.

Publikationen

I) Artikel

- Andrea Schroedter, Horst Weller, *Ligand Design and Bioconjugation of Colloidal Gold Nanoparticles*, Angewandte Chemie Int. Ed. **2002**, 41, 3218-3221.
- Andrea Schroedter, Horst Weller, Ramon Eritja, Bill Ford, Jurina Wessels, *Biofunctionalization of silica-coated CdTe and Gold Nanocrystals*, zur Veröffentlichung angenommen bei Nanoletters.
- Erika Györvary, Andrea Schroedter, Dmitri V. Talapin, Horst Weller, Dietmar Pum and Uwe B. Sleytr, *Formation of Nanoparticle Arrays on Solid Supported S-Layer Protein Lattices*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology - Spezialnummer "Bionanodevices", eingereicht.

II) Poster und Vorträge

- Characterisation of acidic properties of mesoporous molecular sieves of MCM-41 using titration method Poster
 11. Deutschen Zeolithtagung in Stuttgart (03.-05.3.1999).
- Synthesis and characterization of water soluble semiconductor nanoclusters Poster und Vortrag 6th MELARI/NID Workshop and Nanolink Meeting in Twente (25.-28.6.2000).
- Overview of nanoparticle synthesis, characterization and applications Vortrag Joint Workshop (DNA-based electronics/BIOAND) in Stuttgart (8.-9.10.2001).
- Molekulare Nanoelektronik Poster
 "Nanotechnologie – Aufbruch in neue Welten" Dauerausstellung in Hamburg (seit 03.2002).

G Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel als solche gekennzeichnet habe.

Diese Arbeit ist zuvor in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt worden.

Hamburg, den 14. November 2002

Andrea Schroedter