Synthese von Aptamer-modifizierten Nanopartikeln mittels Glutaraldehyd-Crosslinking und Thiol-basierten Click-Reaktionen.

von

Ragna Gehrke

Hochschule Bonn-Rhein-Sieg
Fachbereich Angewandte Naturwissenschaften

Zur Erlangung des akademischen Grades

Bachelor of Science

in

Naturwissenschaftlicher Forensik

2024

Prof. Dr. Ing. Marc Williams

Erstprüfer

Dr. Konrad Kosciow

Zweitprüfer

Prof. Dr. Dieter Reinscheid

Prüfungsausschussvorsitzender

13.08.2024

vorgelegt am

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Abschlussarbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Bonn, 13.08.2024 — H. Gehrke

Ort, Datum — Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während meiner praktischen Arbeit im Labor und des Schreibens meiner Bachelorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Mein Dank gebührt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Ing Marc Williams, Herrn Dr. Konrad Kosciow und Frau Dr. Rebecca Lück für die Möglichkeit der Durchführung der experimentellen Arbeit und für die Betreuung meiner Abschlussarbeit. Ich danke ihnen für die Anregungen und die konstruktive Kritik während meiner Praxisphase und dem Anfertigen meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich besonders bedanken bei Herrn M.Sc. Rene Breuch, der mir die Verwendung des Raman-Mikroskops ermöglicht und mich in allen theoretischen und praktischen Aspekten unterstützt hat. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn M.Sc. Axel Kretschmer für die Analyse meiner Proben mit der ICP-OES und den dazugehörigen theoretischen Erklärungen. Ich danke auch Herrn Dr. Jakoby für die Hilfe bei den theoretischen Hintergründen der Reaktionsmechanismen.

Außerdem geht ein Dank an alle Doktoranden und wissenschaftlichen Mitarbeiter der Laborhalle K für die Unterstützung und Betreuung im Labor.

Ich danke meinen Kommilitonen Minh Quan Nguyen und Adrian Zenner, sowie Jens Schneider-Fresenius und meinem Vater Stephan Gehrke für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

I. Kurzfassung 4

II. Abstract 5

III. Abbildungsverzeichnis 6

IV. Tabellenverzeichnis 7

V. Abkürzungsverzeichnis 8

1 Einleitung 9

2 Theoretischer Hintergrund 10

2.1 Aptamere und Molekulares Schaltersystem 10

2.2 Nanopartikel 11
2.2.1 Silica-Nanopartikel 12
2.2.2 Magnetisierbare Nanopartikel 13

2.3 Silylierung 14

2.4 Kopplung von Aptameren an Nanopartikel 15
2.4.1 Nukleophile Addition des Dialdehyds 15
2.4.2 Thiol-Basierte Click-Reaktionen 16

2.5 Analytische Methoden 19
2.5.1 Infrarot-Spektroskopie 19
2.5.2 Raman-Spektroskopie 21
2.5.3 ICP-OES 23
2.5.4 DLS 24

3 Methodenteil 25

3.1 Chemikalien 25

3.2 Synthese der Silica-Nanopartikel 25

3.3 Aktivierung der Silica-Nanopartikel 26

3.4 Silylierung 26

3.5 Nucleophile Addition mit Dialdehyd 27

3.6 Thiol-basierte Click-Reaktion 27
3.6.1 Thiol-ene Click-Reaktion 28
3.6.2 Michael-Addition 28

3.7 Magnetisierbare Nanopartikel 28

3.8 Fluoreszenz-Assay 29

3.9 Analytik 29

4 Auswertung und Diskussion 31

4.1 Silica-Nanopartikel 31

4.2 Amin-Modifizierung 33

4.3 Thiol-Basierte Click-Reaktionen 37
4.3.1 Silylierung der Nanopartikel 37
4.3.2 Thiol-ene-Click-Reaktion 39
4.3.3 Thiol-Michael-Addition 40
4.4 Gegenüberstellung der Kopplungsvarianten 42
4.5 Fe_3O_4-Nanopartikel 44
4.5.1 Synthese 44
4.5.2 Coating 45
4.5.3 Funktionalisierung 47
4.6 Fluoreszenz-Assay 48
5 Zusammenfassung 50
6 Ausblick 51
7 References 52
8 Anhang 61
8.1 IR- und Raman-Spektren 61
8.2 REM-Bilder 63
8.3 Auswertung TXRF 64
8.4 t-Test 65

I. Kurzfassung

Die einfache und sensitive Detektion pathogener Mikroorganismen ist eine Voraussetzung für die Gewährleistung einer sicheren Trinkwasserversorgung. Aptamere stellen dabei eine Alternative zu den üblicherweise genutzten Antikörpern dar mit dem Unterschied, dass sie kostengünstiger herzstellen und in der Anwendung stabiler sind. Sie bestehen aus einer Oligonukleotidsequenz, die spezifisch an eine Zielstruktur bindet, beispielsweise an Oberflächenproteine pathogener Erreger und können für molekulare Schaltersysteme genutzt werden. Um eine größere Sensitivität zu erreichen, besteht die Möglichkeit sie mithilfe von Nanopartikeln aufzukonzentrieren. In dieser Arbeit wurde das Problem der stabilen, reproduzierbaren Kopplung der Aptamere an Nanopartikel adressiert. Drei Methoden für Silica- bzw. mit Silica beschichtete Magnetit-Nanopartikel wurden untersucht: die Verknüpfung zweier Amingruppen mittels Glutaraldehyd, die radikalische Thiol-ene Click Reaktion und die Thiol-Michael-Addition, wobei sich letztere als am vielversprechendsten herausgestellt hat. Die erfolgreiche Kopplung wurde anhand der Thioether-Schwingung bei 733 cm^{-1} im Raman-Spektrum und der Detektion von Schwefel durch die ICP-OES festgestellt.

Parallel wurde für das im molekularen Schaltersystem geplante Signalmolekül Fluorescein ein Sensitivitätstest durchgeführt. Der Fluoreszenz-Assay ergab einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Fluoreszenzsignal bis zu 0,001 nmol/L, wo es also nicht nur nachweisbar, sondern auch quantifizierbar ist,.

II. Abstract

The simple and sensitive detection of pathogenic microorganisms is a prerequisite for ensuring safe drinking water. Aptamers represent an alternative to the commonly used antibodies, but are more cost-effective to produce and more stable in the application. They consist of an oligonucleotide sequence that specifically binds to a target structure, such as surface proteins of pathogenic bacteria, and can be used for molecular switches. To achieve greater sensitivity, there is the possibility to concentrate them by using nanoparticles. In this work, the problem to of a stable and reproducible coupling between aptamers and nanoparticles was addressed. Three methods for silica or silica-coated magnetite nanoparticles were investigated: the linking of two amino groups using glutaraldehyde, the radical thiol-ene click reaction and the thiol-Michael addition, with the latter proving to be the most promising. The successful coupling was confirmed by the thioether vibration at 733 cm^{-1} in the Raman spectrum and the detection of sulfur through ICP-OES.

At the same time, a sensitivity test was carried out for the fluorescein, the planned signalling molecule on the molecular switch system. As result, the fluorescence assay showed a linear relationship between concentration and fluorescence signal, which indicates not only the possibility of qualification but also of quantification, up to 0.001 nmol/L.

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulares Schaltersystem. 11

Abbildung 2: Silylierungsmittel, die in dieser Arbeit verwendet wurden. 15

Abbildung 3: Nucleophile Addition der Amin-funktionalisierten Nanopartikel an Glutaraldehyd. 15

Abbildung 4: Alternative Reaktionsprodukte der Reaktion des Amins mit Glutaraldehyd. 16

Abbildung 5: Reaktionsmechanismus der Thiol-ene-Click-Reaktion. 17

Abbildung 6: Thermische Zersetzung von 2,2′-Azo-bis(2-methylpropionamidin). 18

Abbildung 7: Reaktionsmechanismus der Thiol-Michael Addition. 19

Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines FT-IR-Spektrometers. 20

Abbildung 9: Jablonski-Diagramm zur Rayleigh- und Raman-Streuung sowie zur IR-Absorption. 22

Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines Raman-Mikroskops. 23

Abbildung 11: REM-Aufnahme der industriell hergestellten Silica-Nanopartikel. 32

Abbildung 12: Raman-Spektrum von den in Natronlauge aktivierten SiNP. 33

Abbildung 13: Raman-Spektren bei 532 nm für SiNP-NH_2, SiNP und APTES. 34

Abbildung 14: Raman-Spektren von SiNP, SiNP-MA, SiNP-Vinyl und γ-MAPS. 38

Abbildung 15: Raman-Spektren der SiNP-Vinyl und SiNP-C_{12}. 39

Abbildung 16: Raman-Spektren von SiNP-MA, SiNP-Cys und Cystein. 41

Abbildung 17: Emissionsspektrum der ICP-OES-Analyse. 43

Abbildung 18: ATR-IR-Spektrum der MNPs mit und ohne Beschichtung mit Silica. 46

Abbildung 19: Raman Spektrum von MNP und MNP@SiO_2-Cys - vergrößert im Bereich 300 - 1000 cm^{-1}. 47

Abbildung 20: Verdünnungsreihe von Fluorescein in Tris-Puffer. 48

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In der Arbeit verwendete Chemikalien. 25

Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen Kopplungsreaktionen. 42

Tabelle 3: Einseitiger t-Test für zwei unabhängige Stichproben zur Feststellung, ob die Schwefelkonzentrationen der Proben signifikant vom Blank abweichen. 65

V. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
APTES	3-(Triethoxysilyl)propylamin
-CHO	Glutaraldehyd-modifiziert
DLS	Dynamic light scattering
DTT	Dithiothreitol
FSP	Flame spray pyrolysis
FVS	Flame vapor synthesis
ICP-OES	Inductively coupled plasma optical emission spectrometry
IR-Spektroskopie	Infrarot-Spektroskopie
-MA	Methacrylat-modifiziert
MNP	Magnetisierbare Nanopartikel
$-NH_2$	Amin-modifiziert
PBS	Phosphatpuffer
SiNP	Silica-Nanopartikel
TEOS	Tetraethylorthosilikat
-Vinyl	Vinyl-modifiziert
γ-MAPS	3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat

1 Einleitung

Der Zugang zu sauberem Wasser gilt als eines der Grundvoraussetzungen für ein gesundes Leben. Um dies garantieren zu können, sind einfache und effiziente Analysemethoden erforderlich, die Verunreinigungen, pathogene Erreger oder toxische Stoffe zuverlässig und sensitiv erfassen können. Vor allem Mikroorganismen stellen hierbei ein Problem dar, denn die gängigen Analysemethoden wie Kultivierung von Bakterien, Antikörper-basierte Testsysteme oder quantitative Polymerase-Kettenreaktionen sind meist zeit- und kostenaufwendig und bringen aus diesem Grund für Routineuntersuchungen entsprechende Nachteile mit sich [1]. Als Alternative dazu rückten in den letzten Jahrzehnten Aptamere in der Vordergrund. Als solche werden kurze Oligonukleotidsequenzen bezeichnet, die spezifisch und mit einer hohen Affinität an bestimmte Zielstrukturen binden und einfach zu modifizieren sind. Dadurch bieten sie sich zur Konstruktion molekularer Schaltersysteme an, die durch die Wechselwirkung mit der Zielstruktur eine detektierbare Signaländerung hervorrufen [2]. Das angedachte, dieser Arbeit zugrunde liegende Prinzip bedient sich der Fluoreszenz von Fluorescein als Signal. Um einen ersten Eindruck von dessen Sensitivität zu erhalten, soll die Nachweisgrenze und lineare Abhängigkeit der detektierten Emission von der Konzentration untersucht werden.

Da zur Detektion von pathogenen Erregern eine möglichst hohe Sensitivität erwünscht ist, sollen die Aptamere nach der Interaktion mit den Zielstrukturen lokal aufkonzentriert werden, um ein stärkeres Signal zu erhalten. Dies kann durch die Kopplung mit Nanopartikeln realisiert werden, die z.B. aufgrund ihres Gewichts oder ihrer magnetischen Eigenschaften von der Lösung abgetrennt werden können. In dieser Arbeit werden verschiedene Möglichkeiten zur Kopplung von Aptameren und Nanopartikeln untersucht. Dabei liegt der Fokus auf der Verknüpfungsreaktion von Amin-modifizierten Nanopartikel und Amin-modifizierten Aptameren mittels Glutaraldehyd, sowie auch Thiol-basierter Click-Chemie zwischen Alkenen und Thiolen. Als Nanopartikel werden Silica- und mit Silica beschichtete Magnetit-Partikel eingesetzt, die durch Abzentrifugieren bzw. Abtrennen mittels eines starken Magnetes aufkonzentriert werden können.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Aptamere und Molekulares Schaltersystem

In ihrer Funktion sind Aptamere Antikörpern recht ähnlich – sind binden spezifisch und mit einer hohen Affinität an eine bestimmte Zielstruktur [3] und können sowohl zur Detektion als auch zur medizinischen Behandlung eingesetzt werden [4]. Allerdings handelt es sich bei Aptameren nicht um Polypeptide, sondern um einzelsträngige Oligonukleotide – mit meist weniger als 100 Basen [4]. Als solche haben sie den Vorteil, dass sie stabiler gegen extreme Umweltbedingungen wie hohe Temperaturen und stark saure bzw. basische pH-Werte sind [3,5]. Zudem sind sie in ihrer Herstellung schneller und kostengünstiger [4], zeigen eine geringere Batch-to-Batch Variation und sind einfach zu modifizieren [2].

Allerdings kann die Struktur natürlicher Antikörper aus 20 verschiedenen Aminosäuren rekombiniert werden, während für Aptamere nur vier unterschiedliche Nukleotide zur Verfügung stehen. Daher ist die Nukleotidsequenz entscheidend für die Selektivität und wird im SELEX-Prozess (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) identifiziert [4,6,7]. Zudem wurden Methoden entwickelt, chemisch modifizierte Nukleotide während des SELEX-Prozesses zu integrieren [4,8–10], um die Variabilität und somit die Bindungsaffinität zu erhöhen wie auch ihre Stabilität. Im späteren Verlauf der Arbeit sollen Aptamere eingesetzt werden, die mit Uracil-Basen versetzt sind, welche Alkin-Gruppen tragen. Die Alkine können über eine Cycloaddition mit organischen Aziden reagieren und somit zusätzliche funktionelle Gruppen einbringen [11]. Die Aptamere interagieren über Wasserstoffbrückenbindungen, Van der Waals oder elektrostatische Wechselwirkungen mit der Zielstruktur [5], welche kleine Moleküle [12,13], Ionen [14], Proteine [7,15] oder ganze Zellen [16–19] sein können.

In der Medizin werden Aptamere genutzt, um beispielsweise Wirkstoffe gezielt zu transportieren oder Krebszellen zu lokalisieren [20–22], aber auch in der Analytik finden sie ihre Anwendung [23]. Aptamere selbst absorbieren Licht der Wellenlänge 260 nm, allerdings gibt das keinen Aufschluss darüber, ob sie an etwas gebunden sind oder frei vorliegen. Um dem entgegenzuwirken, können sie mit Signalgruppen modifiziert werden [5]. Dabei kann das Signal elektrochemischer Natur sein, auf einer Farbänderung beruhen oder sich die Fluoreszenz zu Nutze machen [2,5]. Vor allem Letzteres kann für Bio-Assays verwendet werden, die schnell, einfach und sensitiv sind – mit Nachweisgrenzen bis in den nanomolaren Bereich [24].

Um die Bindung des Aptamers an seine Zielstruktur in eine Änderung des Signals umzuwandeln, gibt es verschiedene Möglichkeiten [4]. Häufig wird sich der dadurch induzierten Konformationsänderung bedient. Das somit aufgebaute molekulare Schaltersystem kann beispielsweise auf Interkalation bzw. Freisetzen eines interkalierten Stoffes [22] oder Änderung der räumlichen Distanz zwischen einem Fluorophor und einem Quencher beruhen [2,23]. Eine mögliche Anordnung ist in Abbildung 1 dargestellt. Das Aptamer ist am 3´-Ende mit einer fluorophoren Gruppe gekoppelt und es existiert ein komplementärer Strang mit einem Quencher am 5´-Ende. Da diese einen DNA-Doppelstrang bilden und somit die Endgruppen in räumliche Nähe gelangen, werden Fluorophor und Quencher miteinander wechselwirken und das Fluoreszenzsignal wird unterdrückt. Kommt dieses System allerdings in Kontakt mit der Zielstruktur, wird der komplementäre Strang von dieser verdrängt und durch die Distanzierung des Quenchers vom Fluorophor wird die Fluoreszenz wieder hergestellt [2,5,23,25,26].

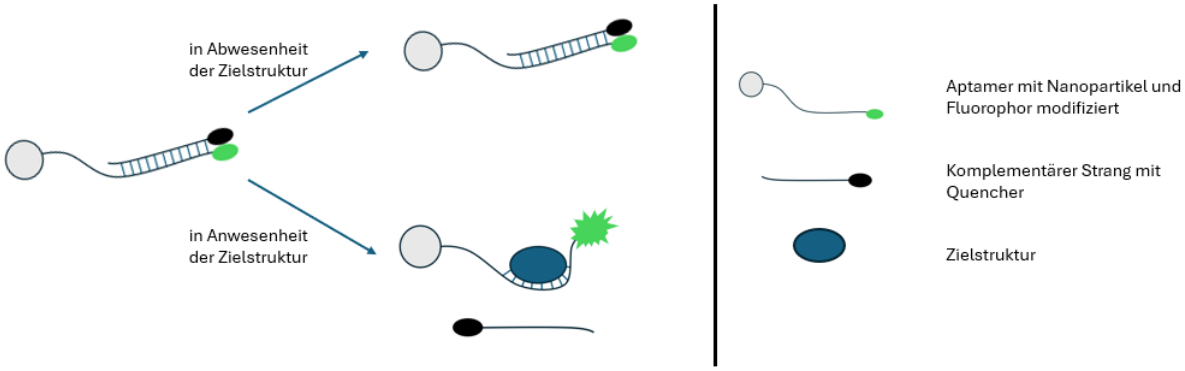


Abbildung 1: Molekulares Schaltersystem.
In Abwesenheit der Zielstruktur sind Aptamer und komplementärer Strang konjugiert und die Fluoreszenz somit unterdrückt. Ist die Zielstruktur präsent, verdrängt sie den Quencher, wodurch ein Fluoreszenzsignal detektierbar wird.

Da sich das Fluoreszenzsignal proportional zur Konzentration verhält, führt eine Aufkonzentration der Aptamere zu einer niedrigeren Nachweisgrenze. Dies kann unter anderem dadurch erreicht werden, dass das 5´-Ende des Aptamers an einen Nanopartikel gekoppelt ist, das aufgrund seiner Masse oder magnetisierbaren Eigenschaften von dem Rest der Probe abgetrennt werden kann.

2.2 Nanopartikel

Allgemein werden Nanopartikel als Partikel mit einer Größe von 1-100 nm definiert [27,28]. Dabei können sie in den verschiedensten Formen auftreten: sphärisch, konisch, zylindrisch, flach oder unregelmäßig – das beeinflusst auch ihre Eigenschaften [29–31]. Sie werden unterteilt in organische, anorganische und Kohlenstoff-basierte

Nanopartikel [27]. Die Herstellung erfolgt entweder im Bottom-up oder im Top-Down-Verfahren, d.h. sie werden entweder aus den Molekül- oder Atombausteinen aufgebaut oder ein Materialverband wird zerkleinert, bis die gewünschte Größe erreicht ist [27,31,32]. Aufgrund der geringen Größe und dem hohen Oberfläche-Volumen-Verhältnis unterscheiden sie sich in ihren Eigenschaften von denen des makroskopischen Zustands, z.B. betreffend des Schmelzpunktes, der Farbe und der Reaktivität [31]. Die große Oberfläche qualifiziert sie für den Einsatz als heterogene Katalysatoren, ermöglicht die Herstellung von superparamagnetischen Nanopartikeln und Quantum Dots, bringt aber auch eine hohe Oberflächenenergie mit sich [27,28]. Um diese zu minimieren und in einen energetisch günstigeren Zustand zu gelangen, tendieren Nanopartikel zum Agglomerieren bzw. Aggregieren [27,33]. Um dies zu verhindern, müssen die Partikel stabilisiert werden, wobei die Stabilisierung meist auf elektrostatischer Abstoßung oder sterischer Hinderung beruht [34]. Nanopartikel finden Anwendung in den verschiedensten Bereichen, z.B. in der Elektronik, Katalyse und Konstruktion, aber auch in der Kosmetik oder Medizin [27].

2.2.1 Silica-Nanopartikel

Häufig in der Medizin und Diagnostik eingesetzt werden Silica-Nanopartikel. Sie bestehen aus einer amorphen Struktur aus Silizium und Sauerstoff im Verhältnis 1:2 und zeichnen sich durch ihre einfache Handhabung, gute Biokompatibilität, einfache Oberflächenmodifizierung und ausgeprägte Hydrophilie aus [20]. Zudem hemmen sie die Aktivität von Nucleasen, was vorteilhaft für die Stabilität von Aptameren ist [35]. Ihre Herstellung ist kostengünstig [20] und die Eigenschaften wie Größe und Morphologie sind gut zu steuern. Dabei gibt es verschiedene Methoden zur Synthese: die Sol-Gel-Synthese, Reverse Mikroemulsion oder die Flammenpyrolyse [32]. Die Sol-Gel-Synthese aus Tetraalkoxysilanen basiert auf der Stöber-Methode [36]. Sie beruht auf der Hydrolyse und anschließenden Kondensation der Estergruppen im Alkalischen unter Abspaltung von Alkoholen, wobei sich ein Netz von Siloxanbindungen bildet (Gleichung 1 und 2) [32]. Dabei wird die Größe und Morphologie durch die Wahl der Estergruppen, des Lösemittels und des pH-Wertes bestimmt [36] und so die Synthese von monodispersen, sphärischen Partikeln ermöglicht [32].

$$Si(OR)_4 + H_2O \rightarrow HO - Si(OR)_3 + R - OH \qquad Gleichung\ 1$$

$$2\,HO - Si(OR)_3 \rightarrow (OR)_3Si - O - Si(OR)_3 + H_2O \qquad Gleichung\ 2$$

Eine andere verbreitete Möglichkeit der Gewinnung stellt die Flammenpyrolyse dar. Sie basiert auf der Reaktion der Ausgangsstoffe bei großer Hitze. Dabei wird unterteilt in die Pyrolyse von gasförmigen (FVS, engl.: flame vapor synthesis) und flüssigen (FSP, engl.: flame spray pyrolysis) Reaktanten. Erstere setzt voraus, dass die Ausgangstoffe volatil sind und ermöglicht gute Kontrolle der Größe und Reinheit [37]. Zur Synthese von Silica-Nanopartikeln wird meist Tetrachlorsilan [38], aber auch Tetraethylorthosilikat (TEOS) [39] genutzt. Für die FSP bietet sich TEOS in wässriger Lösung an [37]. Dabei wird die Flüssigkeit zu Beginn zu kleinen Tröpfchen zerstäubt. Anschließend verdampft das Lösungsmittel und es kommt zur Keimbildung und Partikelwachstum durch Oxidation. In beiden Fällen können Größe und Morphologie durch die Konzentration der Ausgangsstoffe, der Temperatur der Flamme und die Verweilzeit gesteuert werden [37,40].

Die Stabilität der Silica-Nanopartikel in wässrigen Medien beruht auf der mit Hydroxy-Gruppen übersäten Oberfläche, die in einem weiten pH-Bereich zumindest teilweise deprotoniert vorliegen und somit eine negative Ladung nach außen tragen. Werden die Partikel dagegen durch Pyrolyse erzeugt, sorgt die Hitze dafür, dass die Oberflächengruppen kondensieren und sie erst reaktiviert werden müssen. Ein klassischer Ansatz dazu ist die Behandlung mit Natronlauge [26]. Allerdings hat diese auch die Fähigkeit, die Silizium-Sauerstoff-Bindungen zu hydrolysieren und somit die Partikel aufzulösen [41]. Ab einer bestimmten Größe können die Silica-Nanopartikel durch Zentrifugieren aus der Suspension abgetrennt werden.

2.2.2 Magnetisierbare Nanopartikel

Neben den Silica-Nanopartikel ist auch der Einsatz von magnetisierbaren Nanopartikeln denkbar. Während Silica-Nanopartikel nur durch Abzentrifugieren aus der Lösung abzutrennen sind, können magnetisierbare mit einem starken Magneten vom Überstand separiert werden. Eine der am weitesten verbreiteten Materialien dafür ist Magnetit, ein Eisenoxid mit der Summenformel Fe_3O_4. Aufgrund der geringen Größe, ist die Magnetisierbarkeit daraus bestehender Nanopartikel sehr hoch, was auch als Superparamagnetismus bezeichnet wird. Wie Silica ist es gut biokompatibel und nicht giftig für den menschlichen Körper. Allerdings neigen die Partikel auch stark zur Bildung von Agglomeraten, da sie keine sich selbst stabilisierende Oberfläche wie Silica besitzen [30,42]. Das macht die Stabilisierung zu einem wichtigen Punkt bei der Synthese und Verarbeitung. Im Basischen sind Fe-O^--Gruppen auf der Oberfläche präsent, die eine elektrostatische Abstoßung bewirken. Dasselbe gilt im stark

Sauren, nur dass hier die Oberfläche protoniert ist [34]. Da aber die meisten Reaktionen nicht in diesen Milieus durchgeführt werden können, ist der Einsatz von Stabilisatoren wie z. B. Citrat oder Ölsäure notwendig [28,33].

Fe_3O_4-Nanopartikel werden durch Ko-Präzipitation von Eisen(II)- und Eisen(III)-Ionen im Verhältnis 1:2 in alkalischer Lösung synthetisiert. Während diese Ionen bei neutralem pH-Wert löslich sind, sind sie im Basischen nicht mehr stabil und bilden Oxide [30,34]. Die chemische Reaktionsgleichung dazu lautet:

$$Fe^{2+} + Fe^{3+} + 8\,OH^- \rightarrow Fe_3O_4 + 4\,H_2O \qquad \text{Gleichung 3}$$

Da die Keimbildung sehr rasch erfolgt, bilden sich viele kleine Partikel anstelle von wenigen großen. Allerdings besteht das Problem der Ostwald-Reifung, d.h. kleinere Partikel lösen sich mit der Zeit auf und ermöglichen somit das Wachstum der Größeren [34]. Deswegen und da Eisen(II)-Ionen zur Oxidation zu Eisen(III)-Ionen tendieren, ist es nötig die entstanden Partikel zu schützen. Unter anderem kann dies erreicht werden, indem eine dünne Schicht Silica auf die Oberfläche aufgebracht wird. Diese ist chemisch stabil, verhindert Agglomerationen, ist einfach zu modifizieren und senkt dabei die Magnetisierbarkeit nur leicht [42].

2.3 Silylierung

Ob beschichtete Magnetit-Nanopartikel oder reine Silica-Nanopartikel, Silica-Oberflächen lassen sich leicht mittels Silylierung modifizieren. Dazu benötigt werden Silylierungsmittel, häufig Trialkoxysilane mit der gewünschten funktionellen Gruppe am vierten Bindungsplatz. Die Reaktion ist analog zur Kondensation von TEOS. Die Ethergruppen reagieren mit den Hydroxy-Gruppen auf der Partikeloberfläche. Daraus resultieren neue Si-O-Bindungen zum Organosilan und Alkohole werden abgespalten [43]. Die dadurch kovalent gebundenen funktionellen Gruppen verändern die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Oberfläche wie die Reaktivität und das Verhalten in wässriger Lösung.

Die Funktionalisierung kann während der Synthese der Partikel, als Ko-Kondensation, oder in einem separaten Schritt, Grafting genannt, durchgeführt werden [28,44]. Da diese Reagenzien allerdings sehr reaktiv gegenüber Wasser sind, werden als Lösemittel reine Alkohole verwendet.

Die Auswahl an Organosilanen ist vielfältig. In dieser Arbeit wurden zur Modifizierung 3-Aminopropyltriethoxysilan, Vinyltriethoxysilan und γ-Methacryloxypropyltrimethoxysilan verwendet, um entsprechend ein primäres Amin, eine Vinyl-Gruppe oder eine

Methacrylatgruppe auf die Oberfläche zu bringen. Diese funktionellen Gruppen fungieren als Reaktionsstellen für die Kopplung mit den Aptameren (Abbildung 2).

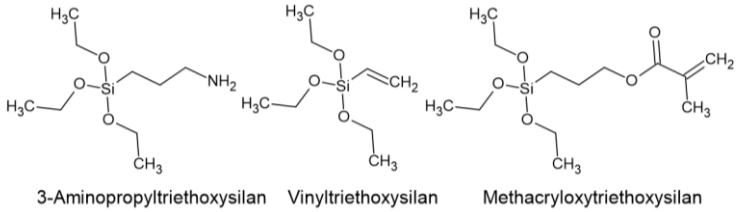


Abbildung 2: Silylierungsmittel, die in dieser Arbeit verwendet wurden.
Die jeweiligen funktionellen Gruppen Amin, Vinyl und Methacrylat stellen die Reaktionsstellen für die anschließende Kopplung mit dem Aptamer dar.

2.4 Kopplung von Aptameren an Nanopartikel

Es sind viele Versuche und Möglichkeiten bekannt, ein Aptamer an einen Silica-Nanopartikel zu koppeln. Dabei ist es wünschenswert, dass die Reaktion quantitativ und selektiv abläuft und in einer stabilen Bindung resultiert. Daher bietet sich die Azid-Alkin-Cycloaddition oder die Bildung von Disulfidbrücken an [44–47]. Auch die spezifische Kopplung von Avidin mit Biotin findet oftmals Anwendung [19,48,49]. In dieser These wurde die Kopplung über den Einsatz von Glutaraldehyd als Linker und über Thiol-basierte Click-Reaktionen untersucht.

2.4.1 Nukleophile Addition des Dialdehyds

Eine häufig genutzte Möglichkeit für die Kopplung von Aptamer und Nanopartikel ist das Silica mit einem primären Amin zu modifizieren [24,46,49,50]. Die Aminogruppe kann anschließend mit verschiedenen elektrophilen Verbindungen reagieren. Neben dem hier verwendeten Glutaraldehyd [24,51,52] sind auch die Reaktionen mit Bernsteinsäureanhydrid und N-Hydroxysulfosuccinimid [19,53] oder mit 2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazine [54] bekannt. In allen drei Fällen fungieren die Moleküle als Linker, die anschließend mit einem NH_2-modifizierten Aptamer reagieren.

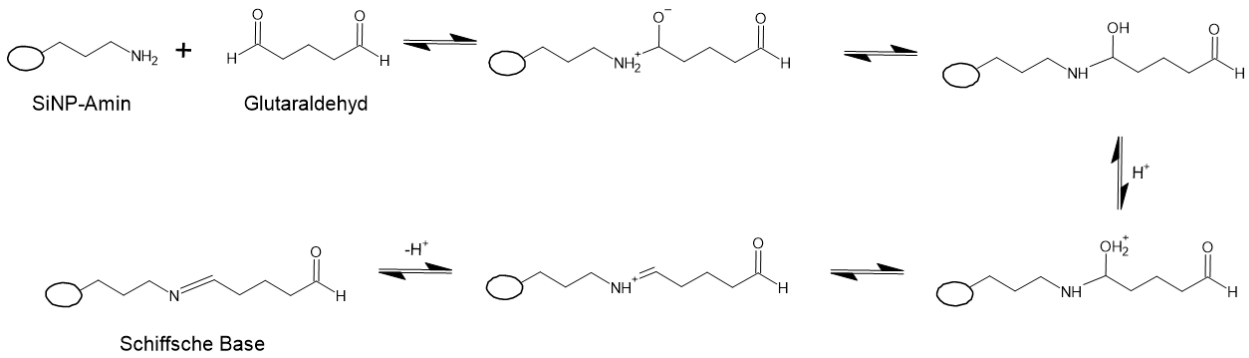


Abbildung 3: Nucleophile Addition der Amin-funktionalisierten Nanopartikel an Glutaraldehyd.
Das Amin greift mit dem freien Elektronenpaar den Carbonyl-Kohlenstoff an, bildet unter der Abspaltung von Wasser ein Immonium-Ion, welches durch Deprotonierung stabilisiert wird und eine Schiffsche Base formt.

Für den Reaktionsmechanismus eines Amins mit einem Aldehyd kann allgemein von einer nukleophilen Addition mit anschließender Kondensation ausgegangen werden. Dies würde in einer Aldiminstruktur, genauer gesagt einer Schiffschen Base resultieren (Abbildung 3) [55,56]. Allerdings zeigen Schiffsche Basen im Sauren die Tendenz zu hydrolysieren, während das Reaktionsprodukt dieser Kopplung in diesem Milieu stabil ist [57]. Zudem kommt, dass die Reaktivität des Glutaraldehyds von vielen Variablen beeinflusst wird und stark abhängig vom pH-Wert ist. So untergeht es im Basischen Aldol-Kondensationen und polymerisiert. Daraus entwickelte sich die Theorie, dass das Aldol-Produkt, die α,β-ungesättigte Carbonylverbindung (Abbildung 4a), Ziel des nukleophilen Angriffs des Stickstoffes ist, sodass eine Schiffsche Base entsteht, die mit einer C=C-Doppelbindung konjugiert und somit stabilisiert ist (Abbildung 4b) [57–60]. Denkbar ist auch eine Michael-artige Addition des Amin an den β-Kohlenstoff (Abbildung 4c) [61].

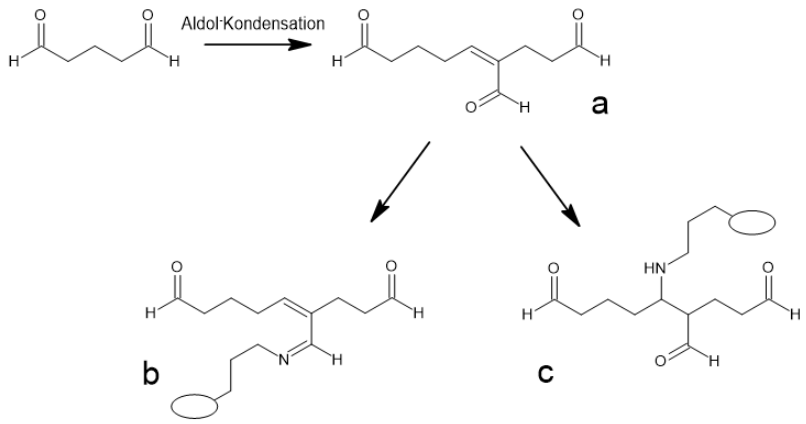


Abbildung 4: Alternative Reaktionsprodukte der Reaktion des Amins mit Glutaraldehyd.
Die α,β-ungesättigte Carnonyl-Verbindung als Produkt der Aldol-Konensation zweier Dialdehyde (a), welche mit dem Aminopropan unter der Bildung einer konjugierten Schiffschen Base (b) oder eines Produkt der Michael-Addition (c) reagiert.

Für den Mechanismus im sauren Milieu existieren weitere Vorschläge, die für diese Arbeit nicht weiter relevant und deshalb hier nicht weiter ausgeführt sind [58,59].

2.4.2 Thiol-Basierte Click-Reaktionen

Eine weitere Möglichkeit für die Kopplung von Aptameren an Nanopartikel ist die Addition eines Thiols an eine ungesättigte C=C-Doppelbindung. Diese Reaktionen sind schon seit über einem Jahrhundert bekannt [62] und werden heutzutage als Thiol-basierte Click-Reaktionen zusammengefasst.

Im Allgemeinen zeichnet sich Click-Chemie dadurch aus, dass ihre Reaktionen selektiv sind, sie hohe Ausbeuten mit unbedenklichen, einfach abzutrennenden Nebenprodukten erzielen, die Reaktionsführung und Aufreinigung einfach und die Aus-

gangsstoffe gut erhältlich sind [63–65]. Am bekanntesten ist die Azid-Alkin-Click-Reaktion [64,66], die allerdings für die Lösung dieses nicht genutzt werden kann, da schon die Aptamere selbst mithilfe dieses Reaktionsmechanismus modifiziert werden und es so zu unerwünschten Nebenreaktionen kommen kann.

Doch auch die Reaktion zwischen einem Thiol und einem Alken erfüllt diese Ansprüche. Sie läuft quantitativ und unter milden Bedingungen ab und resultiert in stabilen Thioether-Bindungen. Dabei gibt es zwei verschiedene Reaktionswege – der eine verläuft über eine radikalische Kettenreaktion während der andere den Prinzipien der Michael-Addition folgt [64].

2.4.2.1 Thiol-ene – Click-Reaktion

Die Verknüpfung des Aptamers mit dem Silica-Nanopartikel kommt hierbei durch die Addition des Thiyl-Radikals an das Alken zustande (Abbildung 5).

Die homolytische Spaltung der Schwefel-Wasserstoff-Bindung des Thiols kann photochemisch mittels UV-Licht (Optimum 254 nm) oder mithilfe von thermischen oder photochemischen Radikalstartern initiiert werden. Das entstandene Thiyl-Radikal addiert sich an den weniger substituierten Kohlenstoff des Alkens (anti-Markovnikow), sodass ein Kohlenstoffradikal entsteht. Dieses wiederrum kann von einem weiteren Thiol ein Wasserstoffatom abstrahieren und sich somit stabilisieren. Die somit hervorgerufene Kettenreaktion bricht ab, wenn zwei Radikale aufeinandertreffen [64,66,67].

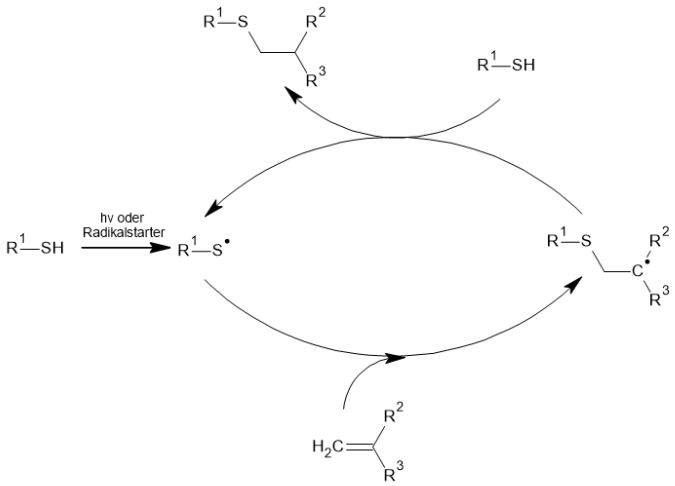


Abbildung 5: Reaktionsmechanismus der Thiol-ene-Click-Reaktion.
Die homolytische Bindungsspaltung der Thiol-Gruppe wird durch einen Radikalstarter oder UV-Strahlung initiiert. Das Thiyl-Radikal addiert sich an das Alken, welches sich durch Abstrahieren eines Wasserstoff stabilisiert und dadurch ein weiteres Thiyl-Radikal erzeugt. Die Kettenreaktion wird abgebrochen, wenn zwei Radikale aufeinandertreffen.

Da die Radikalbildung vergleichsweise langsam verläuft, sind die Reaktionsgeschwindigkeiten gering. Auch sinkt die Reaktivität der Olefine, wenn sie elektronenziehenden Effekten ausgesetzt sind, da das zwischendurch entstehende Kohlenstoff-Radikal dadurch destabilisiert wird [64,65].

Als thermischer Radikalstarter kann eine Azo-Verbindung wie beispielsweise 2,2′-Azo-bis(2-methylpropionamidin) eingesetzt werden. Dieses Molekül zersetzt sich bei 60 °C mit einer Halbwertszeit von 6 Stunden in zwei Radikale (Abbildung 6) [68].

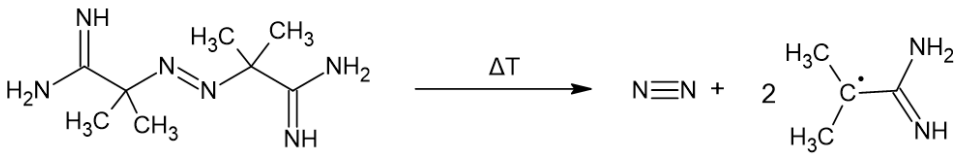


Abbildung 6: Thermische Zersetzung von 2,2′-Azo-bis(2-methylpropionamidin).
Die Azo-Verbindung ist instabil und zerfällt bei erhöhten Temperaturen in zwei Radikale, die zur Initiierung der Thiol-ene Click-Reaktion verwendet werden können.

2.4.2.2 Michael-Addition

Thiole sind nicht nur einfach homolytisch zu spalten, sondern stellen auch gute Nucleophile dar. Als solche können sie schnell und einfach mit Epoxiden, Isocyanaten und Alkenen reagieren [64].

Als Michael-Reaktion gilt die 1,4-Addition von Enolen oder Enolaten an eine α,β-ungesättigte Carbonylverbindung [56]. Da aber hierbei als Nucleophil ein Thiol oder Thiolat vorliegt, ist dies streng genommen eine Michael-artige Reaktion, was jedoch selten getrennt wird.

Die Reaktion wird meist mit einer schwachen Base oder einem anderen Nucleophil katalysiert, wobei jedoch die Voraussetzung besteht, dass das Olefin elektronenarm sein muss [64]. Bei einer basisch katalysierten Reaktion (Abbildung 7a) entsteht durch die Deprotonierung des Thiols ein Thiolat-Ion, welches ein stärkeres Nukleophil darstellt. Dabei genügt der Einsatz einer schwachen Base, da ein Thiol wesentlich saurer reagiert als ein analoger Alkohol (pK_s(Alkohol) ~ 15-16; pK_s(Thiol) ~ 10 [69]). Das Thiolat greift die C=C-Doppelbindung in anti-Markovnikow Position an, während das entstehende Carbanion durch die benachbarte Carbonylgruppe mesomeriestabilisiert wird. Es hat dennoch einen stark basischen Charakter und wird von einem weiteren Thiol oder einer protonierten Base ein Proton abstrahieren [64].

Für die nucleophile Katalyse (Abbildung 7b) bieten sich sowohl primäre und sekundäre Amine als auch Phosphine als Katalysatoren an. Diese addieren sich am

β-Kohlenstoff und erzeugen somit das mesomeriestabilisierte Carbanion, welches stark genug basisch ist, um das Thiol zu deprotonieren. Das Thiolat reagiert anschließend mit dem Olefin analog zu oben beschriebenen basischen Reaktion [64,66,70].

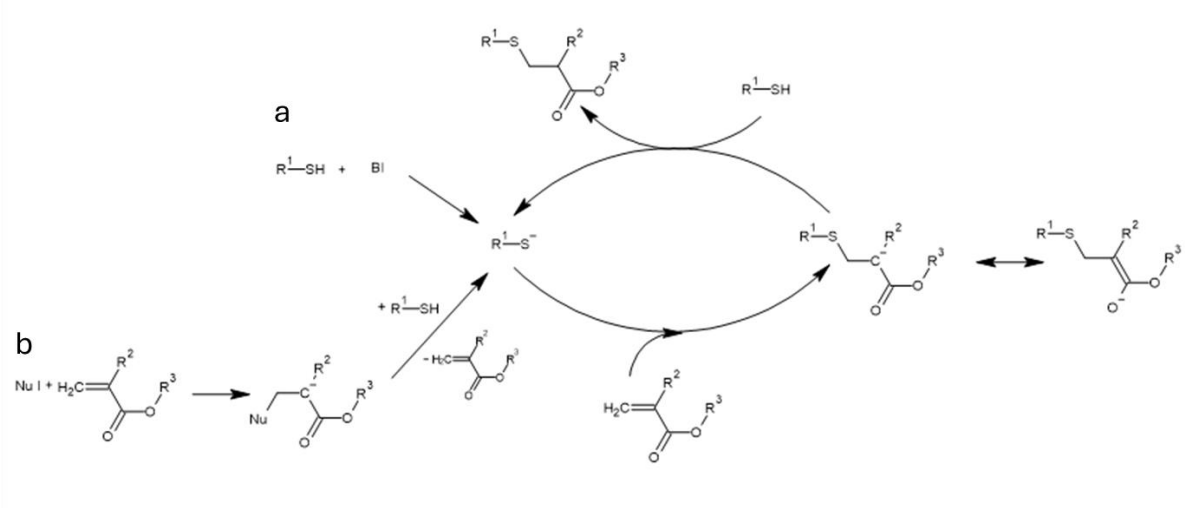


Abbildung 7: Reaktionsmechanismus der Thiol-Michael Addition.
Das Thiol stellt ein gutes Nukleophil dar, sodass es sich an die C=C-Doppelbindung eines Methacrylats addieren kann. Katalysiert wird die Reaktion meistens durch eine Base (a) oder ein anderes Nucleophil (b), die das Thiol deprotonieren, da das Thiolat-Ion ein noch stärkeres Nukleophil ist.

2.5 Analytische Methoden

Um zu beurteilen, ob die Modifizierungen funktioniert haben, ist es notwendig die Oberfläche zu charakterisieren und somit Veränderungen feststellen und zuordnen zu können. Allerdings führt die nur sehr dünne Oberflächenmodifikation zu sehr geringen Konzentrationen, die schnell unter die Nachweisgrenze fallen. In dieser Arbeit wurde die Charakterisierung hauptsächlich mithilfe der Infrarot-Spektroskopie, des Raman-Mikroskops und der ICP-OES vorgenommen. Der Durchmesser der Partikel wurde mithilfe der Dynamischen Lichtstreuung und des Rasterelektronenmikroskops (REM) bestimmt.

2.5.1 Infrarot-Spektroskopie

Die Infrarot-Spektroskopie, im Folgenden als IR-Spektroskopie abgekürzt, beruht auf den molekülspezifischen Schwingungsfrequenzen und deren Wechselwirkung mit langwelligem Licht (Wellenlänge 0,78 – 1000 µm). Dabei wird am häufigsten im mittleren Infrarotspektralbereich gemessen (Wellenlänge 2,5-15 µm). Mit der vergleichsweise energiearmen Strahlung können bestimmte, gequantelte Rotations- und Schwingungszustände angeregt werden, deren Energiedifferenzen im Vergleich zu elektronischen Zuständen gering sind [71].

Ein FT-IR-Spektrometer benötigt eine Strahlungsquelle, die langwelliges Licht aussendet, welches durch ein Michelson-Interferometer aufgetrennt und in der Phase zeitabhängig verschoben wird. Das dadurch entstandene Interferogramm enthält Informationen über die einzelnen Wellenlängen. Das so veränderte Licht passiert anschließend die Probe und regt spezifische Bindungen zum Schwingen an. Der nachfolgende Detektor misst die zeitabhängigen Intensitäten, welche durch die Fourier-Transformation in ein Infrarot-Spektrum umgewandelt werden (Abbildung 8) [72,73].

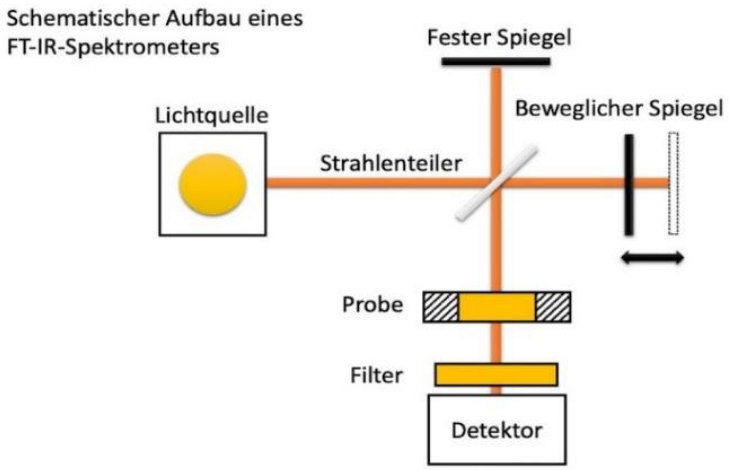


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines FT-IR-Spektrometers.
Ein FT-IR-Spektrometer besteht aus einer Strahlungsquelle, einem Michelson-Interferometer (Bestehend aus einem Strahlteiler und zwei Spiegeln) sowie einem Filter und Detektor. Die Abbildung wurde entnommen aus [74].

Dabei kann in Transmission oder Absorption gemessen werden. Für Ersteres werden die Partikel zusammen mit Kaliumbromid (KBr) zu einem Pressling verarbeitet, der im Strahlengang platziert werden kann. KBr hat den Vorteil, dass es selbst nicht IR-aktiv ist und somit die Messung nicht stört. Die andere Variante ist die Absorptionsmessung mittels abgeschwächter Totalreflexion (ATR, engl.: attenuated total reflection), bei der die Probe auf einen Kristall gelegt wird und die Intensität der Strahlung gemessen wird, nachdem sie mehrmals mit der Probe wechselgewirkt hat [72].

Damit eine Schwingung als IR-aktiv gilt, muss sich das Dipolmoment ändern, denn auch im nicht angeregten Zustand schwingen die Bindungen bei Raumtemperatur. Ändert sich dabei der Dipol, wird dadurch ein schwaches elektrisches Feld erzeugt, welches mit dem elektromagnetischen Feld der Strahlung wechselwirken kann [71,75]. Entspricht die Strahlungsfrequenz der natürlichen Schwingungsfrequenz der Bindung, kann eine Energieübertragung stattfinden, wodurch die Schwingungsamplitude stärker wird. Die Schwingung ist also „angeregt“. Die Frequenz korreliert mit der Wellenlänge bzw. Wellenzahl des eingestrahlten Lichtes. Die Anregungswel-

lenlänge fehlt demnach im detektierten Spektrum und wird als Absorptionsbande sichtbar [72].

Für die Charakterisierung von Verbindungen mithilfe der IR-Spektroskopie wird ausgenutzt, dass die natürliche Schwingungsfrequenz einer Bindung von den beteiligten Atomen, der Bindungsstärke und Kopplungen mit anderen Schwingungen abhängt. Dies erlaubt es nicht nur, funktionelle Gruppen zu identifizieren, sondern auch eine Aussage über die intramolekulare Umgebung zu treffen [71,72].

2.5.2 Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektroskopie beruht wie die IR-Spektroskopie auf der Anregung von Bindungs- und Molekülschwingungen, die Auskunft über die Verbindung geben.

Die Anregung findet mithilfe eines Lasers mit einer bekannten Wellenlänge im Bereich des sichtbaren Lichtes statt, wodurch Photonen mit bekannter Energie auf die Moleküle treffen und somit deren Gesamtenergie anheben. Die möglichen angeregten Zustände sind nicht gequantelt und können zwischen dem Grundzustand und dem ersten elektronisch angeregten Zustand liegen. Deshalb wird der angeregte Zustand auch als virtueller Zustand bezeichnet [71,76].

Ist der Stoß elastisch, fällt das Molekül auf denselben Schwingungszustand zurück, von dem aus es angeregt wurde. Demnach hat das emittierte Photon dieselbe Energie wie das Absorbierte und wird als Rayleigh-Streuung abgegeben (Abbildung 9a).

Fand dagegen ein inelastischer Stoß statt, weisen das absorbierte und emittierte Photon eine Energiedifferenz auf, die sich in einer Veränderung der Frequenz äußert. Dabei ergeben sich zwei Möglichkeiten: Zum einen kann das Molekül auf einen höheren Schwingungszustand zurückfallen als auf den, von dem es angeregt wurde. Daraus folgt, dass das inelastisch gestreute Photon weniger Energie besitzt als zu Beginn und als Stokes-Streuung bezeichnet wird (Abbildung 9b – links). Die Energiedifferenz entspricht der Energie, die zum Anregen der Molekülschwingung notwendig ist und gibt damit Aufschluss über die Struktur des Moleküls.

Die andere Möglichkeit besteht darin, dass sich die Bindung schon vor der Absorption des Photon in einem höheren Schwingungszustand befand, und nach einem inelastischen Stoß mit einem Photon auf einen tieferen Zustand zurückfällt. Dadurch besitzt das emittierte Photon eine höhere Frequenz als zuvor und wird als Anti-Stokes-Streuung bezeichnet (Abbildung 9b – rechts). Seine Frequenz ist um denselben Betrag gegen die Anregungsfrequenz verschoben wie die korrespondierende

Stokes-Streuung - nur in positive Richtung [71,72,76]. Da bei Raumtemperatur nur wenige Moleküle in einem höheren Schwingungszustand vorliegen, ist die Intensität der Anti-Stokes-Streuung meist viel geringer als die der Stokes-Streuung und wird meistens nicht ausgewertet [72].

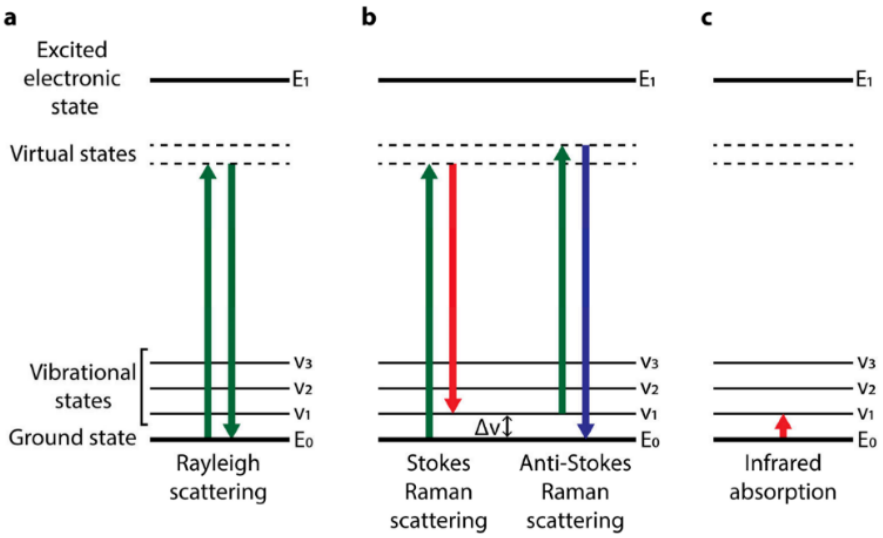


Abbildung 9: Jablonski-Diagramm zur Rayleigh- und Raman-Streuung sowie zur IR-Absorption.
Fällt das Licht des Lasers auf die Probe, kann es verschieden gestreut werden: die erste Variante ist die elastische Streuung, bekannt als Rayleigh-Streuung (a). Die zweite Möglichkeit ist die inealstische Streuung (b), wobei die emittierte Wellenlänge entweder länger (Stokes-Streuung) oder kürzer (Anti-Stokes-Streuung) als die Anregungswellenlänge sein kann. Der Unterschied in der Energie ist dabei vergleichbar mit der benötigten Energie, um eine Schwingung in der IR-Spektroskopie anzuregen. Die Abbildung wurde entnommen aus [77].

In dieser Arbeit wurde ein Raman-Mikroskop verwendet. Dieses ermöglicht Informationen über die chemische Struktur auf mikroskopischer Ebene mit räumlicher Auflösung zu verknüpfen. Es besteht aus einem Laser, der monochromatisches Licht aussendet, welches mithilfe der Mikroskop-Optik auf die Probe fokussiert wird. Das gestreute Licht fällt zurück ins Objektiv, wird dort gesammelt und passiert ein Filtersystem, das die Rayleigh-Streuung abblockt. Dadurch wird nur das inelastisch gestreute Licht durch ein optisches Gitter in die einzelnen Wellenlängen aufgespalten und trifft auf den Detektor. Der Detektor erfasst die Frequenz und die Intensität der Photonen, woraus ein Computersystem das Raman-Spektrum generiert [78].

Dabei wird die Frequenz immer als Verschiebung gegen die Anregungsfrequenz, den Raman-Shift, angegeben, sodass die Größe unabhängig von der Laserwellenlänge ist. Da die detektierte Frequenzverschiebung die Energie beschreibt, welche zum Anregen der Schwingung notwendig ist, ist sie vergleichbar mit der Frequenz in der IR-Spektroskopie. Zur besseren Vergleichbarkeit wird sie deshalb in cm^{-1} umgerechnet.

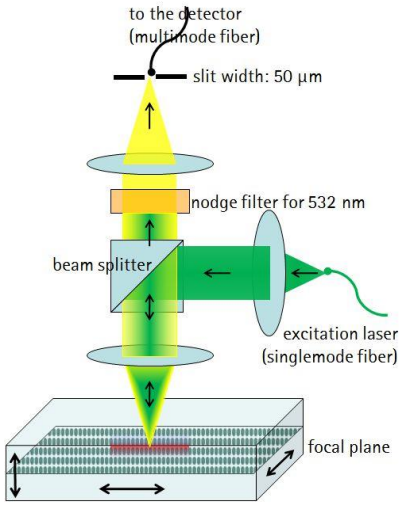


Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines Raman-Mikroskops.
Ein Raman-Mikroskop besteht aus einem Laser, der monochromatisches Licht aussendet, das durch die optischen Elemente auf die Probe fokussiert wird. Das gestreute Licht wird vom Objektiv gesammelt und über ein Filtersystem, das die Rayleigh-Streuung abblockt, zum Detektor geleitet. Die Abbildung wurde entnommen aus [79].

Die Banden der funktionellen Gruppen liegen in IR- und Raman-Spektren demnach an denselben Stellen, variieren allerdings in der Intensität. Denn während die Voraussetzung für IR-Aktivität eine Änderung des Dipolmomentes ist, muss sich für die Raman-Spektroskopie während der Schwingung die Polarisierbarkeit ändern. Die Peaks in Raman und IR-Spektren sind also komplementär und ergänzen sich [72,75].

2.5.3 ICP-OES

Die Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppelten Plasma (ICP-OES, engl.: inductively coupled plasma optical emission spectrometry)" ist eine Methode der Elementaranalytik. Durch eine Induktionsspule wird ein Inertgas, meist Argon, ionisiert, sodass ein Plasma entsteht, in dem Ionen und Elektronen nicht mehr vollständig miteinander assoziiert sind. Dabei werden Temperaturen bis zu 10 000 K erreicht. Eine flüssige Probe wird zu einem feinen Aerosol zerstäubt und in der Plasmafackel durch Kollisionen mit den geladenen Teilchen des Plasmas in seine atomaren Bestandteile zerlegt und gegebenenfalls anschließend ionisiert. Die hohen Temperaturen sorgen für die Anregung von elektronischen Übergängen, die bei Relaxation elektromagnetische Strahlung emittieren. Diese wird mithilfe einer wellenlängendispersiven Optik aufgetrennt und anschließend analysiert. Da die elektronischen Zustände diskret und elementspezifisch sind, trifft dies auch für die detektierten Emissionslinien zu. Dies ermöglicht eine Bestimmung, welche Elemente in der Probe vorhanden sind. Zudem besteht über einen weiten Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen der Intensität und Konzentration, sodass mithilfe einer Kalib-

rierung auch die Quantifizierung möglichst. Ein großer Vorteil der ICP-OES ist, dass die Bestimmung von verschiedenen Elementen zeitgleich möglich und der lineare Bereich für die Konzentrationen sehr weit ist [80].

2.5.4 DLS

Die dynamische Lichtstreuung (DLS, engl.: Dynamic Light Scattering) ist eine Methode, um den hydrodynamischen Durchmesser von Partikeln zu bestimmen. Dafür werden die Partikel in einer Flüssigkeit suspendiert und mit monochromatischen Licht durch einen Laser beleuchtet. An den Partikeln wird das Licht gestreut, genannt Rayleigh-Streuung, und erzeugt so ein Interferenzmuster aus hellen und dunklen Stellen. Verändern die Partikel aufgrund der Brown´schen Molekularbewegung ihre Position, ändert sich damit auch das Interferenzmuster. Dabei gilt, dass kleinere Partikel sich schneller bewegen und somit zu einer rascheren Veränderung des Musters führen. Die daraus ermittelte Zeitkonstante korreliert mit dem Diffusionskoeffizient der Partikel, welcher wiederrum über die Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 4) mit dem hydrodynamischen Durchmesser verknüpft ist.

$$D_T = \frac{kT}{3\pi\eta d_h}$$

$Gleichung\ 4$

D_T	$Diffusionskoeffizient\ der\ Partikel$
k	$Boltzmannkonstante$
T	$Temperatur$
η	$Viskosität\ der\ Flüssigkeit$
d_h	$hydrodynamischer\ Durchmesser$

Dabei beschreibt der hydrodynamische Durchmesser nicht den wahren Durchmesser der Partikel, sondern den einer hypothetischen Kugel, die dieselben Diffusionseigenschaften hat wie der Partikel inklusive der Solvathülle. Aus der Gleichung geht auch hervor, dass die Viskosität des Suspensionsmediums sowie die Temperatur eine Rolle spielen [81,82].

3 Methodenteil

3.1 Chemikalien

Tabelle 1: In der Arbeit verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Reinheit	CAS-Nummer	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Zur Synthese	3483-12-3	vwr-Chemicals
2,2'-Azo-bis(2-methylpropionamidin) Dihydrochlorid	98 %	2997-92-4	Thermo Scientific
2-Propanol	≥ 98 %	67-63-0	vwr-Chemicals
3-(Triethoxysilyl)propylamin (APTES)	Zur Synthese	919-30-2	Sigma-Aldrich
3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat (γ-MAPS)	98 %	2530-85-0	Sigma-Aldrich
Ammoniak (25%)	Zur Synthese	1336-31-6	Carl Roth
Anilin	99 %	62-53-3	Sigma-Aldrich
Cysteamin	≥ 98 %	60-23-1	Sigma-Aldrich
Dodecan-1-thiol	98 %	112-55-0	Thermo Scientific
Eisen(II)chlorid Tetrahydrat	≥ 99 %	13478-10-9	Carl Roth
Eisen(III)chlorid Hexahydrat	Zur Synthese	10025-77-1	Merck
Ethanol, rein	≥ 99 %	64-17-5	vwr-Chemicals
Fluorescein	≥ 99 %	518-47-8	Carl Roth
Glutardialdehyd, 50 %-Lösung in Wasser	Zur Synthese	111-30-8	Sigma-Aldrich
L-Cystein Hydrochlorid Monohydrat	≥ 99 %	7048-04-6	Carl Roth
Magnesiumchlorid	≥ 99 %	7786-30-3	Carl Roth
Natriumchlorid	≥ 99 %	7647-14-5	Carl Roth
Natriumhydroxid	p.a.	1310-73-2	Sigma-Aldrich
Phosphatpuffer (DPS, 1X)	-	-	Thermo Scientific
Salzsäure (1 M)	Zur Synthese	7647-01-0	Sigma-Aldrich
Silica-Nanopartikel, 10-20 nm	99,5 %	7631-86-9	Sigma-Aldrich
Taurin	≥ 99 %	107-35-7	Sigma-Aldrich
Tetraethylorthosilikat (TEOS)	98 %	78-10-4	Sigma-Aldrich
Triethoxyvinylsilan	Zur Synthese	78-08-0	Sigma-Aldrich
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	≥ 99 %, p.a.	6132-04-3	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	≥ 99 %	77-86-1	Carl Roth

Wenn im Folgenden nicht anders beschrieben, wurden alle Silylierungen in einem 2 mL-Mikroreaktionsgefäß durchgeführt, welches mithilfe eines Rührfisches und Magnetrührers durchmischt wurde. Zum Erwärmen wurde jeweils ein Wasserbad benutzt und die Temperatur mit einem Thermometer überprüft. Das Waschen erfolgte in der Regel durch Abzentrifugieren bei 14.000 RCF für 3 - 4 min.

3.2 Synthese der Silica-Nanopartikel

Die Synthese der Silica-Nanopartikel (SiNP) folgte dem Sol-Gel-Prozess nach Stöber et al. [36] und orientierte sich an der von Wang et al. etablierten Methode [83]. Da-

nach wurden 0,32 mL Ammoniak (25 %) mit 8,83 mL destilliertem Wasser und 5,67 mL Ethanol in einem Drei-Hals-Kolben gemischt und langsam zu einer Lösung aus 1,35 mL TEOS in 13,65 mL Ethanol hinzugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 14 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in mehreren Schritten abzentrifugiert (14 000 RCF; 10 min) sowie zweimal mit Ethanol gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurden die Partikel im Ultraschallbad dispergiert. Das Produkt wurde mittels DLS und Raman-Spektroskopie untersucht.

3.3 Aktivierung der Silica-Nanopartikel

Die Vorschrift zur Aktivierung der Oberfläche der Silica-Nanopartikel ist angelehnt an die Veröffentlichung von Wang et al. [84]. Hierzu wurden 0,5 g SiNP in einem Becherglas in 40 mL NaOH (1 mol/L) dispergiert und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Suspension schrittweise abzentrifugiert (2010 RCF, 7 min) und mit destilliertem bzw. Reinstwasser gewaschen bis der pH-Wert neutral war. Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte mittels pH-Indikatorpapier. Zwischen den Waschschritten wurde das Pellet aufgelockert und im Ultraschallbad dispergiert. Anschließend wurden die Partikel in 5 mL destilliertem bzw. Reinstwasser suspendiert.

Zur Bestimmung der Partikelgröße wurde die SiNP-Suspension 1:100 verdünnt und mit der DLS vermessen. Die Massenkonzentration wurde ermittelt, indem 100 µL in ein zuvor ausgewogenes Mikroreaktionsgefäß pipettiert und im Ofen bei 60 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet wurden. Die Massenkonzentration ergibt sich aus der folgenden Gleichung:

$$\beta_{SiNP-Suspension} = \frac{m_{Eppi+SiNP} - m_{Eppi\ leer}}{V_{SiNP-Suspension}} \qquad Gleichung\ 5$$

3.4 Silylierung

Die Silylierung erfolgte nach der Vorschrift von Wang et al. [83] mit geringen Abweichungen. Sie beschreibt die Modifizierung der Nanopartikel mit APTES, da sich aber die Silylierungsmittel untereinander stark ähneln und der Reaktionsmechanismus derselbe ist, wurde für die anderen Silylierungen analog angewandt.

100 µL der SiNP-Suspension wurden dreimal mit Ethanol gewaschen, sodass die Partikel als wasserfrei angesehen werden konnten. Anschließend wurden diese in 300 µL Ethanol resuspendiert und 200 µL des jeweiligen Organosilans (APTES, γ-MAPS oder Vinyl-Silan) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde zuerst für

2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, im Anschluss auf 50 °C erwärmt und eine weitere Stunde bei dieser Temperatur gehalten. Nachdem es wieder auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden die Partikel abzentrifugiert und dreimal mit Ethanol gewaschen. Die Aussage über eine erfolgreiche Reaktion wurde anhand der Raman- und IR-Spektren getätigt.

3.5 Nucleophile Addition mit Dialdehyd

Als Vorlage für die Reaktion mit Glutaraldehyd und dem Amin-modifizierten Aptamer wurde sich an der Vorschrift von Grechkin et al. [24] orientiert. Dazu wurden die mittels der Silylierung erhaltenen Amin-modifizierten Nanopartikel (SiNP-NH_2) mit 1 mL Glutaraldehyd-Lösung (8 %) in PBS versetzt, im Ultraschallbad suspendiert und 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung abzentrifugiert, einmal mit destilliertem Wasser und zweimal mit Ethanol oder Isopropanol gewaschen.

Um den Reaktionsmechanismus zu testen wurde anstelle des Aptamers Anilin, Taurin oder Cysteamin genutzt. Diese verfügen ebenfalls über eine primäre Amin-Gruppe und sollten durch ihre restliche Struktur analytisch nachgewiesen werden. Dazu wurde im ersten Schritt eine Stammlösung (100 µmol/L) und eine finale Verdünnung (10 µmol/L) in PBS angesetzt. Unabhängig davon welches Molekül benutzt wurde, wurde 1 mL der 10 µM-Lösung zu den Partikeln gegeben, dispergiert und 4 Stunden gerührt. Dann wurden die Partikel abzentrifugiert und einmal mit destilliertem Wasser, sowie zweimal mit Ethanol oder Isopropanol gewaschen. Das Reaktionsprodukt wurde mithilfe von Raman-, IR- und UV-Spektroskopie sowie der ICP-OES untersucht.

3.6 Thiol-basierte Click-Reaktion

Für die Thiol-ene Click-Reaktion wurden Methacrylat- und Vinyl-modifizierte Nanopartikel (SiNP-MA und SiNP-Vinyl) genutzt, für die Michael-Addition nur die mit Methacrylat. Als Ersatzstoff zum Thiol-modifizierten Aptamer wurde Cystein oder Dodecanthiol verwendet, wobei das Dodecanthiol nur für die radikalische Reaktion zum Einsatz kam. Von beiden wurde eine Stammlösung (100 µmol/L) und eine Verdünnung (10 µmol/L) in Tris-HCl vorbereitet. Dabei wurde die Stammlösung des Dodecanthiols aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit in Ethanol angesetzt.

Da das Alken mit der Thiol-Gruppe reagieren soll, aber Thiole die Tendenz haben zu oxidieren und Disulfid-Brücken auszubilden, wurde zu Beginn die Lösung der Rea-

genzien mit DTT versetzt, sodass auf 1 mL Lösung 1 mg DTT kommt, und bei 30 °C für 30 min inkubiert.

3.6.1 Thiol-ene Click-Reaktion

Um die radikalische Reaktion zu starten, wurde zum einen 2,2′-Azo-bis(2-methylpropionamidin) als thermischer Radikalstarter [84] und zum anderen UV-Licht der Wellenlängen 405, 355 und 275 nm verwendet.

Für die erste Variante, angelehnt an die Vorschrift von Wang et al. [84], wurde 1 mg der Azo-Verbindung zu 1 mL reduzierter Thiol-Lösung gegeben und mit den modifizierten Nanopartikeln vermischt. Anschließend wurde die Mischung bei 55-60 °C für 5 Stunden gerührt, bevor die Partikel abzentrifugiert und zweimal mit destilliertem Wasser sowie zweimal mit Ethanol gewaschen wurden.

Für die photochemische Aktivierung der Reaktion wurde 1 mL der reduzierten Thiol-Lösung mit den Partikeln vermengt und in einer Quarzglasküvette für 15 min möglichst nah vor einer UV-LED (275 nm, Eingangsleistung 1 W bzw. 405 nm, Eingangsleistung 10 W) gerührt. Ebenfalls wurden Versuche mit einer Anregungswellenlänge von 355 nm durchgeführt, wobei diese auf einem Laseraufbau basierten und dessen Leistung nicht bestimmt wurde. Die Mischung wurde anschließend für weitere 2 weitere Stunden ohne Bestrahlung gerührt, um sicherzustellen, dass die Reaktion vollständig ablaufen konnte. Das Waschen erfolgte analog zu 3.5.

3.6.2 Michael-Addition

Für die Michael-Addition wurden die Nanopartikel in 920 µL der reduzierten Thiol-Lösung dispergiert und für mindestens 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt, um eine vollständige Reaktion zu gewährleisten. Zusätzlich wurde die Auswirkung eines Katalysators getestet, wofür 0,92 µL Anilin (100 µmol/L) oder 0,5 µL Ammoniak (5 mol/L) hinzugegeben wurde. Nach vollendeter Reaktion wurde die Probe abzentrifugiert und wie in 3.5 beschrieben gewaschen.

Sowohl die erhaltenen Produkte der Michael-Reaktion als auch die Produkte der radikalischen Reaktion wurden mittels Raman-Spektroskopie und ICP-OES untersucht.

3.7 Magnetisierbare Nanopartikel

Die Synthese der magnetisierbaren Nanopartikel (MNP) erfolgte nach der Vorschrift von Zhou et al. [85]. Danach wurden 1,622 g $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ und 0,9941 g $FeCl_2 \cdot 4\ H_2O$ in 40 mL destilliertem Wasser gelöst, anschließend wurden 5 mL Ammoniak (25 %)

hinzugegeben. Nach 10 min Rühren bei Raumtemperatur wurde das Gemisch auf 90 °C erwärmt und für weitere 30 min gerührt. Nach dem Abkühlen wurden die Partikel mithilfe eines Neodym-Magneten abgetrennt und mit destilliertem Wasser bzw. einer 2 gew.-%-igen Citrat-Lösung gewaschen.

Um eine Modifizierung mit funktionellen Gruppen zu ermöglichen, wurden sie anschließend mit einer Schicht Silica überzogen. Dies geschah nach der Vorschrift von Mendonca et al. [42]. Dazu wurden die Citrat-stabilisierten Fe_3O_4-Nanopartikel mit destilliertem Wasser gewaschen, um das Citrat zu entfernen und anschließend in einer Lösung bestehend aus 20 mL destilliertem Wasser, 80 mL Ethanol und 2,2 mL Ammoniak (5 mol/L) dispergiert. 500 µL TEOS wurden langsam unter Rühren hinzugetropft. Nach 6 Stunden wurden die Partikel abgetrennt, zweimal mit Ethanol gewaschen und dann darin dispergiert.

Die weitere Modifikation erfolgte analog zu der in 3.4 beschriebenen Silylierung und den sich daran anschließenden weiteren Reaktionen. Die synthetisierten Partikel wurden vor und nach dem Coating mit Silica mittels DLS, Raman- und IR-Spektroskopie und extern mit einem REM untersucht.

3.8 Fluoreszenz-Assay

Um die Nachweisgrenze des Fluoreszenzmarkers zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe von Fluorescein in Tris-HCl-Puffer mit Konzentrationen von 10 nmol/L bis 0,001 nmol/L angesetzt. Die Zusammensetzung des Puffers orientierte sich an Li et al. [2]: 10 mM Tris, 50 mM $MgCl_2$ und 50 mM NaCl – eingestellt auf pH 7,5 mit HCl. Die Messung erfolgte in einer transparenten 96-Well-Mikrotiterplatte mit jeweils 100 µL Probenvolumen, wobei jede Konzentration in dreifacher Bestimmung getestet wurde. Die Fluoreszenz wurde mit einem Plattenlesegerät (SpectraMax® iD3 von Molecular Devices) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und Emissionswellenlänge von 528 nm gemessen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Dreifach-Messung abzüglich des Blanks gegen die Konzentration aufgetragen.

3.9 Analytik

Für die Untersuchung unter dem Raman-Mikroskop (Senterra R200L von Fa. Bruker) wurde eine kleine Probe des zu untersuchenden Stoffes in einen Stahl-Tiegel gegeben und so lange gewartet, bis alles an Lösungsmittel verdampft war. Anschließend wurde unter dem Mikroskop die Oberfläche mittels des 50x-Objektivs fokussiert und eine geeignete Stelle gesucht, um ein Spektrum aufzunehmen. Anhaltspunkte gaben

dafür die in 4.1 beschriebenen typischen Peaks für das Silica. Für die Silica-Nanopartikeln betrug die Anregungswellenlänge 532 nm mit einer Energie von 20 mV. Es wurde jeweils ein Raster von 5x5 Messpunkten über einen Bereich von 400 µm² aufgenommen, wobei jeder Punkt für 15 Sekunden belichtet und 15-fach vermessen wurde. Die Apertur wurde auf 50 µm und die Auflösung auf 9-15 cm^{-1} eingestellt, sodass der Raman-Shift im Bereich 60-4500 cm^{-1} detektiert werden konnte. Vor Beginn der Messung wurde das Mikroskop auf Dunkelfeld umgestellt, da dadurch die Intensität der Peaks verbessert wird. Für die Fe_3O_4-Partikel wurde die Laserenergie auf 0,2 mV herabgesetzt, aber dafür die Apertur auf 25*1000 µm und die Koaddition auf 50-fach erhöht. Zur Auswertung wurden die 25 Einzelspektren gemittelt, um ein möglichst repräsentatives Spektrum zu erhalten. Wenn verschiedene Spektren verglichen werden sollten, wurden die Intensitäten auf 0 und 1 normiert.

Die IR-Spektren wurden an einem Nicolet iS50 FT-IR-Spektrometer der Marke Thermo scientific in Transmission und mittels ATR gemessen. Für die Transmissionsmessung wurden KBr-Presslinge im Verhältnis 1:200 hergestellt und im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet. Vor der Messung wurde ein Hintergrundmessung durchgeführt und die Probe im Anschluss mit 16 Scans vermessen.

Für die Untersuchung in der ICP-OES (SPECTRO ARCOS ICP-OES der Firma SPECTRO AMETEK) wurden die Proben getrocknet, 6-8 mg eingewogen und in 10 mL Reinstwasser im Ultraschallbad dispergiert. An allen Messtagen wurde zusätzlich ein Blank mit analysiert. Um die Schwefelkonzentration zu ermitteln, wurde die Emissionslinie 182,034 ausgewertet, da die eigentlich intensivere Linie bei 180,731 gestört wurde. Ob die Änderung der Schwefelkonzentration der Proben signifikant höher war als die der Blanks, wurde durch einen einseitigen, ungepaarten Zweistichproben t-Test festgestellt.

Der hydrodynamische Durchmesser wurde mit der DLS (Zetasizer Ultra von Malvern) bestimmt. Dafür wurden die Proben im Verhältnis 1:100 (SiNP) bzw. 1:1000 (MNP) verdünnt und in die Küvette gefüllt. Gemessen wurde die Streuung bei 173 °, 90 ° und 17 °, allerdings wurde nur die Daten von 90 ° in dieser Arbeit berücksichtigt und das Peakmaxiumum der Intensität in Abhängigkeit des Durchmessers ausgewertet.

Für die UV-Spektroskopie wurde ein UV/VIS-Spektrometer Lambda 35 der Firma PerkinElmer genutzt.

4 Auswertung und Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Aptamere an Nanopartikel zu koppeln, um somit die Grundlage für ein molekulares Schaltersystem zu generieren, welches später zur unkomplizierten Trinkwasseranalyse eingesetzt werden kann. In diesem Zusammenhang war es zunächst wichtig, die angedachten Nanopartikel aus Silica und Magnetit zu synthetisieren und eine geeignete Kopplungsmöglichkeit zu identifizieren.

4.1 Silica-Nanopartikel

Die Silica-Nanopartikel wurden wie in 3.2 beschrieben nach der Stöber-Methode [36] synthetisiert. Nach dem Zutropfen der Ammoniak-Lösung trat eine Trübung der Lösung ein. Diese weist auf die Entstehung von SiO_2-Keimen hin, die im Laufe der weiteren Reaktionszeit wuchsen [32,36]. Am Ende der Reaktion wurde ein hydrodynamischer Durchmesser von ungefähr 60 nm ermittelt. Beim Abzentrifugieren ergab sich das Problem, dass der Überstand noch immer trüb war. Eine Messung der Partikelgröße mittels DLS zeigte, dass dieser weiterhin SiNPs im Bereich von 63 nm enthielt, während das resuspendierte Pellet eine breitere Partikelgrößenverteilung mit dem Peak bei 126 nm aufwies. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Drehzahl der Zentrifuge nicht hoch genug war, sodass die Zentrifugalkraft nicht ausreichte, um die kleineren, leichteren Partikel zu separieren.

Die Abtrennung der Partikel mittels Zentrifugieren war auch für die folgenden Modifikationen notwendig [24], weshalb im Anschluss nur die größeren Nanopartikel genutzt wurden. Dementsprechend war die Ausbeute vergleichsweise gering, sodass hauptsächlich industriell hergestellte und nach 3.3 aktivierte SiNP verwendet wurden. Diese wurden charakterisiert, indem die Oberfläche mittels Stickstoffabsorption/-desorption sowie der Durchmesser mittels DLS und REM untersucht wurde. Der ermittelte hydrodynamische Durchmesser war mit 197 nm um ein Zehnfaches größer als der Hersteller angab. Daran änderte auch das Dispergieren im Ultraschallbad oder ein Wechsel des Suspensionsmediums nichts. Die Messung der Oberfläche ergab einen Wert von ca. 111 m^2/g, während die Berechnung der theoretischen Oberfläche, basierend auf dem Partikeldurchmesser und unter Annahme einer perfekten Kugel nach Gleichung 6, für die Herstellerangabe von 20 nm einen Wert von 125 m^2/g ergab. Dagegen betrüge die Oberfläche von Partikeln mit einem Durchmesser von 197 nm ca. 13 m^2/g.

$$A = \frac{6}{d * \rho} * 1000$$

Gleichung 6

A $Oberfläche\ in\ {}^{m^2}/_{g}$

d $Partikeldurchmesser\ in\ nm$

ρ $Dichte\ des\ Silicas$: 2,4 ${}^{g}/_{cm^3}$ [86]

Diese Ergebnisse lassen zwei mögliche Schlüsse zu. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die Messergebnisse fehlerhaft sind. Da die Oberflächenergebnisse sich mit den Herstellerangaben ungefähr decken, würde der Fehler wahrscheinlich eher in der Ausführung der DLS-Messung liegen. Zudem ist im hydrodynamischen Durchmesser die Solvathülle mit inbegriffen und außer Acht gelassen, dass sich kleine, aber unregelmäßige Partikel langsamer bewegen und somit größer erscheinen. Dennoch ist die Abweichung des Durchmessers zu groß, um damit erklärt zu werden.

Die andere Option ist, dass die Partikel in Suspension Agglomerate bilden und dadurch der Durchmesser höher erscheint. Es ist allerdings verwunderlich, dass dadurch nicht mehrere Populationen an Partikelgrößen entstehen und das Ultraschallbad keinen Einfluss darauf zu nehmen scheint. Dennoch, die aufgenommenen Bilder des REM unterstützen diese Theorie, denn in Abbildung 11 sind größere Agglomerate zu sehen, die aus kleineren Primärpartikeln bestehen.

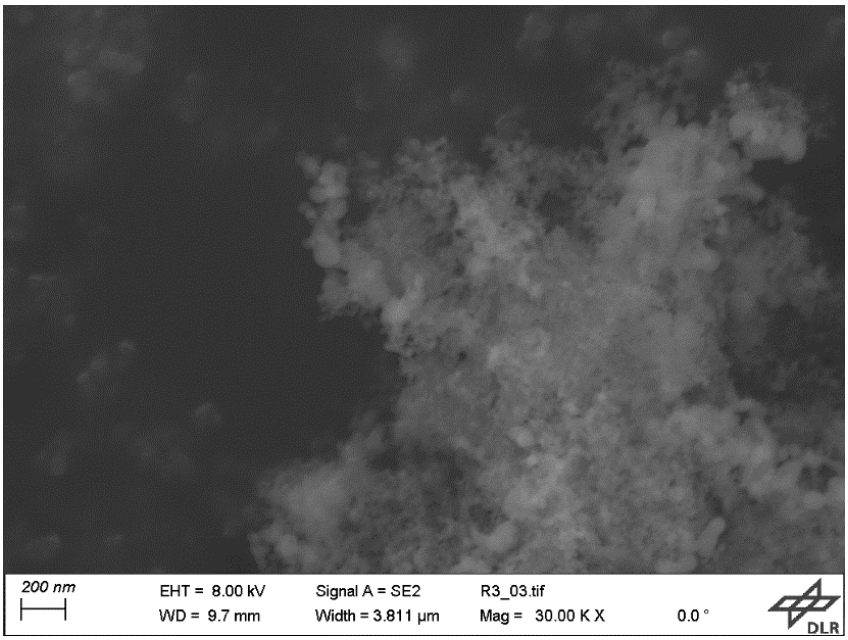


Abbildung 11: REM-Aufnahme der industriell hergestellten Silica-Nanopartikel.
Die kleinen Primärpartikel des Silicas tendieren dazu, größere Agglomerate zu formen, um die hohe Oberflächenenergie zu minimieren.

Um die Oberfläche zu charakterisieren, wurde ein Raman-Spektrum aufgenommen (vgl. Abbildung 12), in welchem die markanten Peaks und Banden zu sehen sind. Die schwache und sehr breite Bande im Bereich von 3720-3190 cm^{-1} liegt an der typischen Stelle der O-H-Streckschwingung von Silanol-Gruppen [72,87]. Da diese eine

stark polare Bindung ist, taucht sie im Raman nur sehr schwach auf (Erklärung in 2.5.22.5.2). Der Fakt, dass sie überhaupt zu sehen ist, ist der Tatsache geschuldet, dass auf der Silica-Oberfläche eine hohe Konzentration an Hydroxy-Gruppen vorhanden ist. Die schwache breitere Bande zwischen 2995-2834 cm^{-1} ist charakteristisch für die gesättigte C-H-Streckschwingung und im Raman stark ausgeprägt [72,87,88]. Für die unmodifizierten Nanopartikel ist diese Gruppe nicht zu erwarten, doch schon geringe Verschmutzungen mit Organik kann zu ihrer Anwesenheit führen.

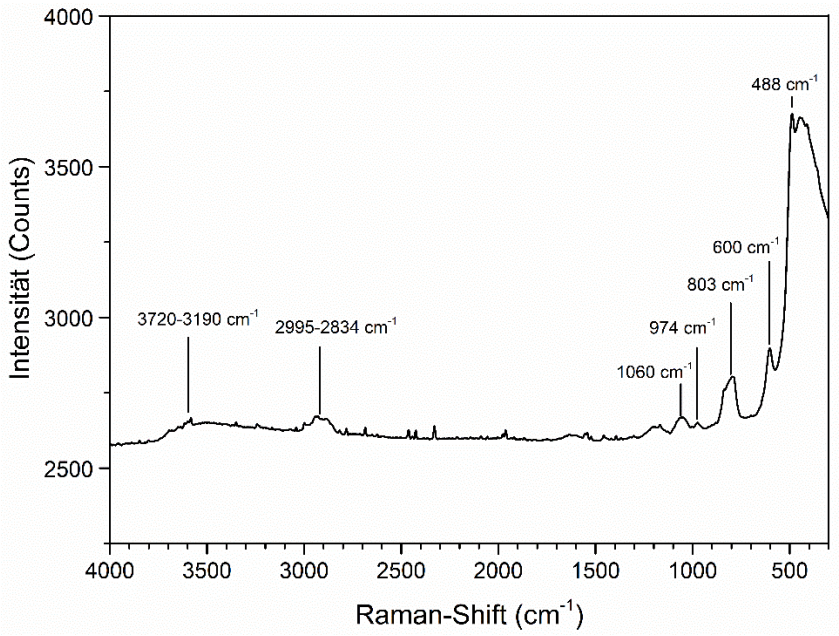


Abbildung 12: Raman-Spektrum von den in Natronlauge aktivierten SiNP.
Die Banden werden wie folgt zugeordnet: 3720-3190 cm^{-1}: SiO-H-Streckschwingung; 2995-2834 cm^{-1}: gesättigte C-H-Streckschwingung; 1060 cm^{-1}: Si-O-Si-Streckschwingung; 803 und 488 cm^{-1}: Si-O-Streckschwingung; 600 cm^{-1}: Si-O-Si-Deformationsschwingung. Die Bande bei 974 cm^{-1} ist nicht eindeutig zuordenbar, aber in Vergleichsspektren der Literatur zu finden [43].

Der Peak bei 1060 cm^{-1} kann der Si-O-Si-Streckschwingung, die Bande bei 600 cm^{-1} der dazugehörigen Biegeschwingung zugeordnet werden. Die Si-OH-Schwingung verursacht die Signale bei 803 und 488 cm^{-1} [43,51,72,87,88]. Auch der Peak bei 974 cm^{-1} ist charakteristisch für ein Silica-Spektrum [43]. Vor allem für die Auswertung und Interpretation der Spektren der funktionalisierten Nanopartikel ist ein solches Vergleichsspektrum bedeutsam.

4.2 Amin-Modifizierung

Die erfolgreiche Funktionalisierung des Silicas mit APTES konnte im Raman-Spektrum nachgewiesen werden, wenngleich die Signalintensitäten verhältnismäßig schwach waren (Abbildung 13). Aber vor allem im Vergleich mit den unmodifizierten Nanopartikeln wird ein schwacher Peak bei 3312 cm^{-1} sichtbar. Er korreliert mit dem

Doppelpeak im Spektrum von APTES, welcher aufgrund der Position und Erscheinung der N-H-Streckschwingung zugeordnet werden kann [88]. Die geringe Intensität ist bedingt durch die stark polare Bindung und somit schlechte Polarisierbarkeit. Ein weiteres Indiz für die Anwesenheit des Aminopropans auf der Oberfläche ist die nun intensivere gesättigte C-H-Streckschwingung um den Raman-Shift von 2890 cm^{-1} herum. Auch im Fingerprintbereich sind die markanten Banden des APTES im SiNP-NH_2-Spektrum wiederzufinden. Neben den schon im reinen Silica beobachteten Banden tauchten Peaks bei 1608, 1455 und 1408 cm^{-1} auf, die zu den N-H- und C-H-Deformationsschwingungen gehören, sowie die Bande bei 1306 cm^{-1}, die der C-N-Schwingung zugeordnet wird [88]. Die Peaks bei 1063, 957 und 803 cm^{-1} sind auch im Silica-Spektrum ersichtlich, wobei die erhöhte Intensität durch die Normierung bedingt ist. Im Allgemeinen zeigt der direkte Verglich der SiNP-NH_2- und APTES-Spektren, dass die Peaks in ihrer Lage übereinstimmen und eine gelungene Modifizierung belegen.

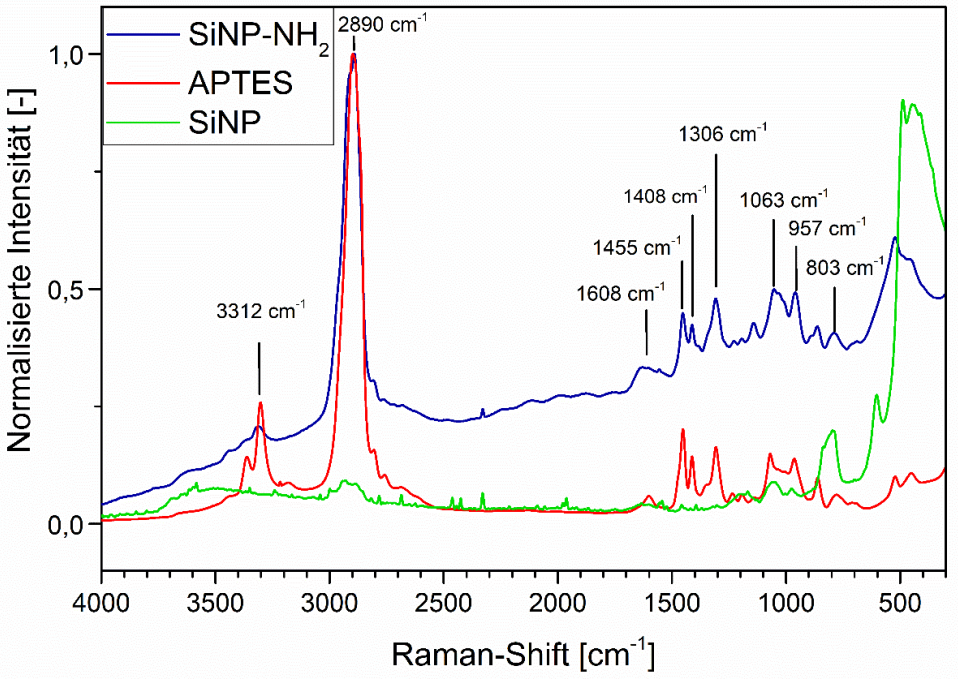


Abbildung 13: Raman-Spektren bei 532 nm für SiNP-NH_2, SiNP und APTES.
Die SiNP (grün) wurden mit APTES (rot) modifiziert, um eine primäre Amingruppe auf der Oberfläche (blau) zu erhalten. Die Banden wurden wie folgt zugeordnet: 3312 cm^{-1}: N-H-Streckschwingung; 2890 cm^{-1}: gesättigte C-H-Streckschwingung; 1608 cm^{-1}: N-H-Deformationsschwingungen; 1455 und 1400 cm^{-1}: C-H-Deformationsschwingungen; 1306 cm^{-1}: C-N-Streckschwingung. Die Banden 1063, 957 und 803 cm^{-1} sind ebenfalls für das Silica sichtbar und den Si-O-Schwingungen zuzuordnen.

Der Nachweis und die Quantifizierung der Amin-Gruppen auf der Oberfläche ist häufig in der Literatur als Fluoreszenz-Assay mit Fluorescamin beschrieben [24,50]. In dieser Arbeit wurde er jedoch nicht angewandt und somit ist keine quantitative Aussage über den Grad der Funktionalisierung möglich – nur dass an vielen Stellen der

Probe diese Banden beobachtet werden konnten.

Bei der Addition von Glutaraldehyd an SiNP-NH_2 konnte während der Reaktion eine Änderung der Farbe beobachtet werden. War die Suspension zu Beginn milchig-weiß, so schimmerte sie am Ende rötlich. Diese Veränderung wurde auch von Nazari et al. beobachtet [89]. Die Farbänderung ist möglicherweise auf die Reaktion zwischen dem Aldehyd und dem Amin zurückzuführen. Als Test wurden einige Tropfen APTES auf einem Aluminiumplättchen getrocknet und anschließend in die Glutaraldehyd-Lösung gegeben. Auch hierbei verfärbte sich der zuvor farblose Tropfen erst orange-gelb und dann tiefrot. Dabei ist die größere Intensität der Farbe durch die höhere Konzentration der reagierten Gruppen bedingt. Ein weiterer Test beruhte auf dem Lösen von Taurin bzw. Cysteamin in der Glutaraldehyd-Lösung, was zu einer Gelbfärbung führte, die mit der Zeit dunkler wurde. Im Gegensatz dazu zeigte eine Suspension von SiNP und dem Dialdehyd auch nach mehreren Tagen keine Veränderung. Daraus ist also zu schließen, dass der Kontakt einer Amin-Gruppe mit dem Dialdehyd zu der Verfärbung führt. Diese würde auch die Theorie der konjugierten Schiffschen Base (vgl. 2.4.1) unterstützen, denn delokalisierte Elektronen können bestimmte Wellenlänge absorbieren und somit eine Farbigkeit hervorrufen.

Auch änderte sich das Verhalten der Partikel in der Suspension. Zuvor waren sie recht stabil und fein dispergiert, doch während der Reaktionszeit begannen sie auszuflocken und ließen sich auch im Ultraschallbad nicht wieder vollständig dispergieren. Eine Möglichkeit ist, dass das Glutaraldehyd zu polymerisieren begann und somit die Partikel miteinander verknüpfte, was in einem großen Netzwerk resultierte. Dies ist durchaus nicht unwahrscheinlich in Anbetracht der Tatsache, dass Glutaraldehyd eine sehr komplexe Reaktivität aufweist (vgl. 2.4.1). Der Versuch mehr reaktive Amine zu erhalten, indem der pH-Wert des Puffers auf 8 wie bei Brothier et al. [52] eingestellt wurde, scheiterte, weil ein weißer Feststoff auszufallen begann. Dass der Niederschlag das polymerisierte Glutaraldehyd war, konnte gezeigt werden, indem die reine Glutaraldehyd-Lösung mit einer Base versetzt wurde und dasselbe Ergebnis eintrat. Dies ist auch in Übereinstimmung mit dem in der Literatur beschriebenen Reaktionsverhalten des Aldehyds [57].

Diese Erscheinung wurde allerdings in keiner der für diese Arbeit herangezogenen Veröffentlichungen erwähnt [24,50]. Jedoch berichtete Bagwe et al. [50], dass die Amin-modifizierten Partikel sehr instabil sind, da sich die $NH3^+$-Gruppen zur Oberfläche zurückfalten und somit die negative Ladung der deprotonierten Silanol-Gruppen

neutralisieren. Das führt zu einer hohen Neigung zur Agglomeration. Da der Partikeldurchmesser für die SiNP-NH_2 nicht bestimmt wurde, konnte dies an sich nicht bestätigt oder widerlegt werden. Im Experiment könnte die Instabilität der Nanopartikel aber dazu geführt haben, dass diese durch das Glutaraldehyd eher untereinander vernetzt wurden, als freie Aldehydgruppen nach außen zu tragen. Zudem ist nicht zu erwarten, dass die Aldehydgruppen zu einer elektrostatischen Abstoßung zwischen den Partikeln und somit einer guten Stabilität führen.

Eine Untersuchung der einzelnen Reaktionszwischenprodukte erwies sich als schwierig. Zwar konnte die Funktionalisierung mit dem Amin im Raman-Spektrum noch nachgewiesen werden, allerdings war nach der Reaktion mit dem Dialdehyd das Signal nicht mehr auswertbar. Grund dafür war die Fluoreszenz der Probe, die ein starkes Rauschen verursachte, dass die spezifischen Peaks überlagert (Anhang: Abbildung I). Dass das Reaktionsprodukt von Amin und Glutaraldehyd fluoresziert, beobachtete auch Zhang et al. [59]. Dafür verantwortlich wurde das konjugierte System der C=C-Doppelbindung mit der Schiffschen Base gemacht. Dies würde ebenfalls für den Vorschlag des Reaktionsproduktes in Abbildung 4b sprechen. Der Versuch, die Fluoreszenz zu umgehen, indem die Modifizierung im IR-Spektrometer analysiert wurde, blieb ohne Ergebnis. Denn die IR-Spektren des reinen Silicas und die nach jedem Reaktionsschritt waren nahezu identisch (Anhang: Abbildung II). Dies steht jedoch im Widerspruch mit den Ergebnissen von Bayramoglu et al., die eine Veränderung der IR-Absorption feststellten [51]. Der Grund könnte in der niedrigen Konzentration der funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche liegen. Denn auch die Modifizierung der SiNP-MA, die im Raman problemlos zu sehen war, führt im IR-Spektrum nicht zu den erwarteten Banden, obwohl Wang et al. von Signalen bei 1702 und 1637 cm^{-1} berichteten [84]. Allerdings erfolgten deren Messungen jeweils mittels ATR-IR, während sie in dieser These in Transmission durchgeführt wurden. Die ATR-Messung bietet sich im Allgemeinen für eine Oberflächencharakterisierung an [72,72,87], aber die zur Verfügung stehende Probenmenge reichte dafür nicht aus.

Eine weitere Idee war, vor und nach der Kopplung mit Anilin jeweils ein UV-Spektrum aufzunehmen, um sie miteinander zu vergleichen. Denn Anilin enthält einen aromatischen Ring und absorbiert die Wellenlängen 230 und 280 nm. Allerdings stellte sich auch diese Analysemethode als nicht geeignet heraus, da schon die mit Glutaraldehyd-modifizierten SiNPs (SiNP-CHO) eine Absorption in diesem Bereich zeigten, wodurch eine Detektion von Anilin nicht realisierbar war (Anhang: Abbildung III).

Es wurde daher als weitere Analytik zum Nachweis der erfolgreichen Kopplung die ICP-OES verwendet. Hierbei können allerdings nur schwerere Elemente zuverlässig detektiert werden, weshalb als Modell-Moleküle Taurin und Cysteamin benutzt wurden. Beide besitzen eine primäre Amin-Gruppe für die Reaktion mit Glutaraldehyd und ein Schwefelatom, welches ein auswertbares Signal ermöglicht. Da allerdings Cysteamin auch eine Thiol-Gruppe besitzt, die eventuell ebenfalls mit der Aldehydgruppe reagieren könnte, wurde hauptsächlich Taurin verwendet. Während der ICP-Analyse wird die Probe atomisiert, sodass die Konnektivität der Atome irrelevant ist. Deshalb musste darauf geachtet werden, dass alles ungebundene Edukt vollständig entfernt wurde, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Als Negativprobe wurden unmodifizierter SiNP mit einem schwefelhaltigem Molekül versetzt und anschließend analog zu den realen Proben gewaschen und aufbereitet. Zudem wurde eine Probe der aktivierten Nanopartikel in Suspension gemessen, um auszuschließen, dass etwaige Schwefelkontaminationen durch die Partikeln verursacht wurden. Um zu bestimmen, ob die Änderung der Schwefelkonzentration signifikant ist wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt (vgl. Anhang 8.4). Dieser zeigte, dass die Schwefelkonzentration der SiNP-Taurin Suspension im Vergleich zum Blank stark erhöht war (Blank: 0,009 mg/L; SiNP-Taurin: 0,087 mg/L). Im Gegensatz dazu konnte keine signifikante Abweichung zwischen dem Blank und den Negativproben (0,0075 mg/L) festgestellt werden. Daraus folgt, dass die Reaktion des Taurins mit den Nanopartikeln erfolgreich verlaufen ist. Allerdings waren die Konzentrationen nicht hoch genug, um eine belastbare Quantifizierung zu gewährleisten. Eine höhere Probeneinwaage ist hierbei nicht möglich gewesen, da somit auch wesentlich mehr Silica in die ICP-OES eingeführt würde und somit die Gefahr einer Überladung entstände. Demnach konnte keine Aussage über den Grad der Modifizierung getätigt werden.

4.3 Thiol-Basierte Click-Reaktionen

4.3.1 Silylierung der Nanopartikel

Die Modifizierung der SiNP mit γ-MAPS und dem Vinyl-Silan konnte mittels Raman-Spektroskopie nachgewiesen werden. In Abbildung 14 ist ein exemplarisches Spektrum der SiNP-MA und SiNP-Vinyl sowie ein Spektrum des γ-MAPS als Reinstoff und der unmodifizierten Nanopartikel zum Vergleich dargestellt. Die Ähnlichkeit der Spektren von γ-MAPS und den damit funktionalisierten SiNP weist auf eine erfolgreiche Reaktion hin. Das Alken verursacht durch die C-H- und C=C-Schwingungen die

Peaks bei 3107 und 1638 cm^{-1}, sowie mehrere der kleineren Banden zwischen 1000 und 900 cm^{-1} [88]. Die Streckschwingung der Carbonylgruppe bei 1714 cm^{-1} wurde auch von Wang et al. und Chen et al. beobachtet [84,90] und spricht für einen konjugierten Ester [88]. Die Bande bei 1294 cm^{-1} wird durch die C-O-Streckschwingung verursacht, während der Peak bei 2848 cm^{-1} die Folge der C-H-Schwingung neben der Estergruppe ist [88]. Die Banden bei 1455 und 1400 kommen durch die C-H-Deformationsschwingungen zustande. Der schwache Peak bei 2326 cm^{-1} taucht in allen Raman-Spektren von SiNP auf.

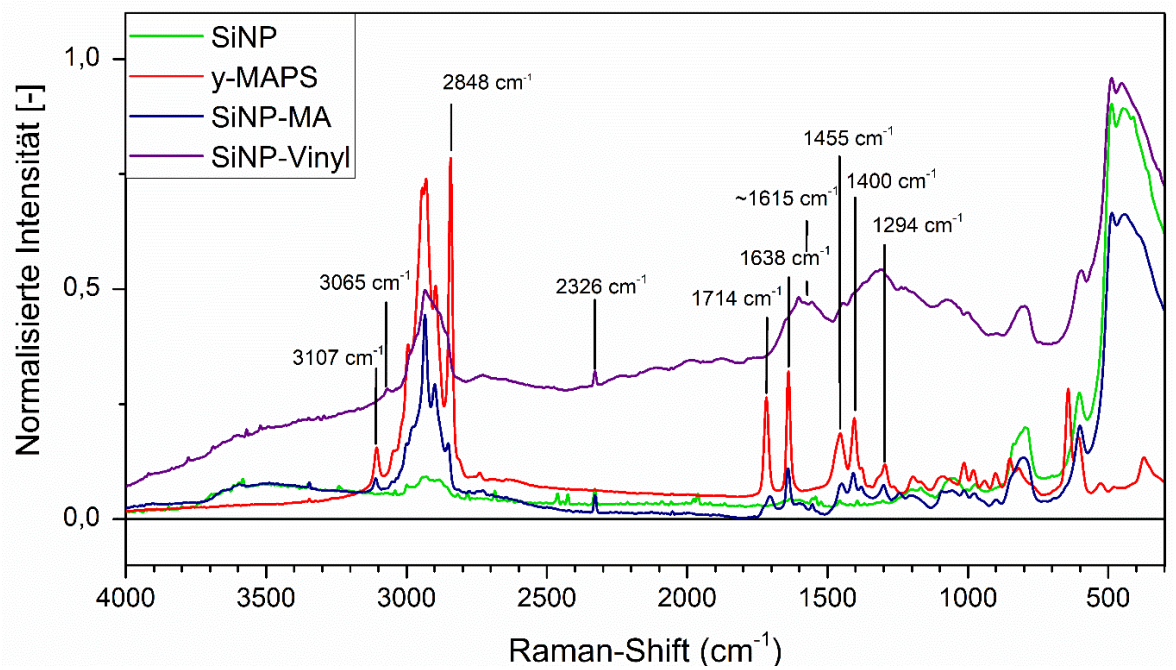


Abbildung 14: Raman-Spektren von SiNP, SiNP-MA, SiNP-Vinyl und γ-MAPS.
Die SiNP wurden mit γ-MAPS (rot) bzw. Vinyl-Silan (nicht dargestellt) modifiziert, um die jeweiligen funktionellen Gruppen Methacrylat (blau) und Vinyl (lila) auf die Partikeloberfläche zu bringen.
Bandenzuordnung des SiNP-MA-Spektrums: 3107 cm^{-1}: ungesättigte C-H-Streckschwingung; 2848 cm^{-1}: C-H-Streckschwingung in Nachbarschaft zu einer Estergruppe; 1714 cm^{-1}: C=O-Streckschwingung des Esters; 1638 cm^{-1}: ungesättigte C=C-Streckschwingung; 1455 und 1400 cm^{-1}: C-H-Deformationsschwingungen; 1294 cm^{-1}: C-O-Streckschwingung des Esters.
Banden im SiNP-Vinyl-Spektrum: 3065 cm^{-1}: Ungesättigte C-H-Streckschwingung; 1630-1600 cm^{-1}: C=C-Streckschwingung.

Das Spektrum der SiNP-Vinyl war schwieriger aufzunehmen und auszuwerten, das Fehlen eines Vergleichsspektrums erschwerte die Interpretation zusätzlich. Zu erwarten waren allerdings auch nur Banden für gesättigte und ungesättigte C-H- und C-C-Schwingungen. Der Peak für das Alken liegt bei 3065 cm^{-1}. Dies ist um ca. 40 cm^{-1} verschoben im Vergleich zu dem SiNP-MA-Spektrum, da hier keine Konjugation mit einem Ester vorliegt. Die Anwesenheit einer C=C-Schwingung um die 1600-1630 cm^{-1} lässt sich nur schwer erahnen, ebenso wie die C-H-Knickschwingung bei 1443 cm^{-1} [43,72,87,91]. Da der Alken-Peak aber sehr spezifisch ist, kann auch hier von einer erfolgreichen Silylierung gesprochen werden.

Die Modifizierung ist in beiden Fällen nicht durchgängig, aber an vielen Rasterpunkten zu finden, sodass die Schlussfolgerung zulässig ist, dass sie in einem signifikanten Maße erfolgreich war.

4.3.2 Thiol-ene-Click-Reaktion

Die radikalische Click-Reaktion war dagegen erst nach ausgiebiger Optimierung erfolgreich. Zu Beginn wurde der Fokus vor allem auf die Reaktion der SiNP-MA mit dem thermischen Radikalstarter gelegt. Doch sowohl die Änderung der Konzentration des Cysteins und der Azo-Verbindung, als auch die Variation der Temperatur veränderte das Raman-Spektrum nicht.

Auch die photochemisch induzierte Reaktion zwischen dem Methacrylat und Cystein führte unabhängig von der Wellenlänge zu keinen neuen oder verschobenen Banden. Erst als anstelle der SiNP-MA die SiNP-Vinyl eingesetzt und Cystein durch Dodecanthiol ersetzt wurde, zeigte sich im Raman-Spektrum eine Bande bei 732 cm^{-1} (Abbildung 15). Diese wird der C-S-Streckschwingung der neu entstanden Thioether-Bindung zugeordnet. Sie ist im Vergleich zu einer normalen C-S-Schwingung eines Thiols um ca. 40 cm^{-1} verschoben, da sie nun an beiden Seiten substituiert ist. Diese Verschiebung ist analog zu der Bandenverschiebung der C-O-Schwingung der Alkohole und Ether [88] und beweist somit, dass es sich bei dem Peak nicht um Rückstände nicht abreagierten Dodecanthiols handelt.

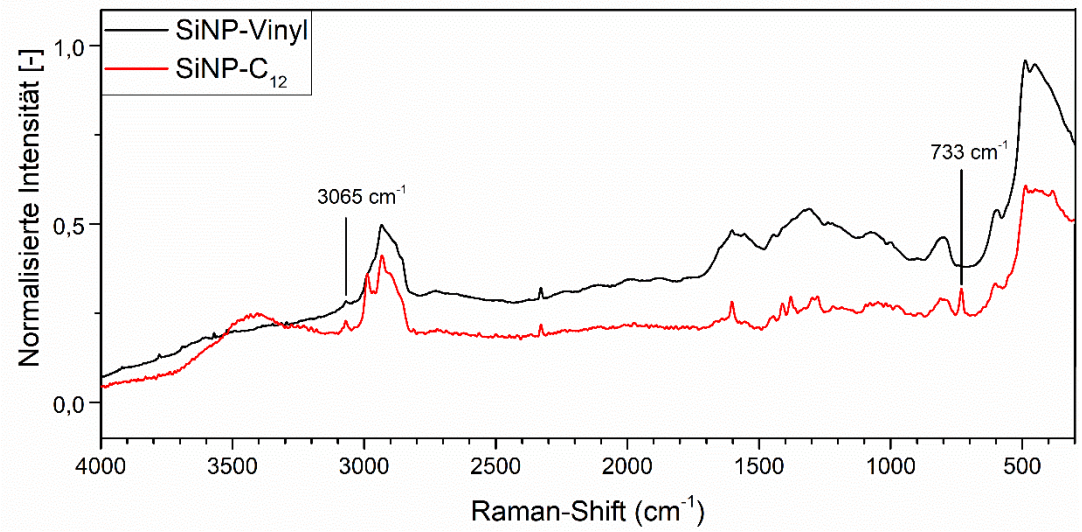


Abbildung 15: Raman-Spektren der SiNP-Vinyl und SiNP-C_{12}.
Die SiNP-Vinyl reagierten unter UV-Anregung mit 275 nm mit dem Thiol des Dodecanthiol unter Bildung eines Thioethers. Dessen C-S-Schwingung verursacht einen Peak bei 732 cm^{-1}, der den Erfolg der Reaktion kennzeichnet. Dennoch ist ein Peak bei 3065 cm^{-1} sichtbar, der der ungesättigten C-H-Streckschwingung zugeordnet wird und die Anwesenheit eines Alkens kennzeichnet.

Die Bande ist nur punktuell an einigen Stellen zu finden, allerdings immer über einige Rasterpunkte hinweg verteilt, sodass es als Geisterpeak ausgeschlossen werden

kann. Des Weiteren sind keine neuen Peaks zu erkennen, da das Dodecanthiol keine weiteren neuen funktionellen Gruppen einbringt. Auffällig ist, dass die C-H-Bande wider Erwarten nicht intensiver geworden und der Alken-Peak noch immer sichtbar ist. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Reaktion nur in einem sehr kleinen Maßstab stattgefunden hat und nur wenige der Alkene reagiert haben. So ist der Peak bei 3065 cm^{-1} noch präsent, während die wenigen Thioether die ihnen zugehörige, im Raman stark ausgeprägte Bande im Fingerprintbereich verursachen.

Der Erfolg der Reaktion wurde durch die Ergebnisse der ICP-OES-Messung bestätigt. Die Konzentration des Schwefels, der für die Thioetherbindung spezifisch ist, war signifikant höher als im Blank (Schwefelkonzentration SiNP-C_{12}: 0,070 mg/L).

Der Umstand, dass die radikalische Reaktion mit einem elektronenreicheren Alken zu besseren Ergebnissen führte, bestätigt die Aussage von Hoyle und Bowman und Bordoni et al. [65,66] und wurde in 2.4.2.1 bereits erörtert. Der Einsatz von Dodecanthiol anstelle von Cystein beruht darauf, dass es dem eigentlichen Aptamer ähnlicher ist. Denn zwischen der Nukleotidsequenz und der funktionellen Gruppe befindet sich in der Regel ein Alkan-Spacer, um die Flexibilität des Aptamers zu gewährleisten. Daher eignet sich das Dodecanthiol besser zur Simulation, ist aber aufgrund seiner schlechten Löslichkeit in Wasser schwerer zu handhaben. Die UV-initiierte Reaktion von einem Vinyl mit Dodecanthiol wurde ebenfalls von Hoyle und Bowman [66] erwähnt.

Die Aktivierung der Reaktion der SiNP-Vinyl mittels des thermischen Radikalstarters ergaben keine Ergebnisse. Dies könnte der langsamen Zersetzung der Azo-Verbindung geschuldet sein, die nach 6 Stunden nur zur Hälfte zerfallen ist [68].

4.3.3 Thiol-Michael-Addition

Als Alternative zur Thiol-ene Click-Reaktion wurde versucht, die Kopplung der Alken-modifizierten Partikel und Thiole über eine nukleophile Addition zu bewerkstelligen. Dabei zeigte die Michael-Addition nicht nur vielversprechendere Ergebnisse, sondern läuft dazu unter milderen Bedingungen ab. Sie benötigt weder Radikale noch erhöhte Temperaturen noch andere Faktoren, die der DNA der später einzusetzenden Aptamers potentiell schaden können.

Ausprobiert wurde die Reaktion ohne und mit Katalysatoren, wobei einmal das primäre Amin Anilin, und das andere Mal die Base Ammoniak eingesetzt wurde. Da das

Raman-Spektrum für die Anilin-katalysierte Reaktion die intensivsten Peaks für die Thioetherbindung zeigte, wurden die folgenden Versuche mit Anilin durchgeführt.

Um sicher zu gehen, dass die Reaktion vollständig ablief, wurde sie für mehrere Tage laufen gelassen. Der Versuch, die Kinetik und somit eine geeignete Reaktionszeit zu bestimmen, blieb ohne Ergebnis. Dafür hätte die Anzahl der entstandenen Thioether bestimmt werden müssen, doch eine Quantifizierung war weder mit dem Raman-Mikroskop noch mit der ICP-OES möglich. Letztere bietet sich zwar prinzipiell dafür an, allerdings waren die Signalintensitäten zu gering, als das zuverlässige Werte ermittelt werden konnten (vgl. 4.2).

Abbildung 16 zeigt ein exemplarisches Spektrum der erfolgreichen Modifizierung. Die C-H-Streckschwingung des Alkens ist auch nach der Reaktion noch schwach sichtbar, doch der intensive Peak bei 733 cm^{-1} belegt die Anwesenheit der Thioetherbindung. Der Vergleich mit dem Spektrum des Cysteins zeigt auch, dass es sich dabei nicht um Rückstände des Eduktes handeln kann, da das Thiol durch die S-H- bzw. C-S-Schwingungen Banden bei 2566 und 683 cm^{-1} verursacht [72,87].

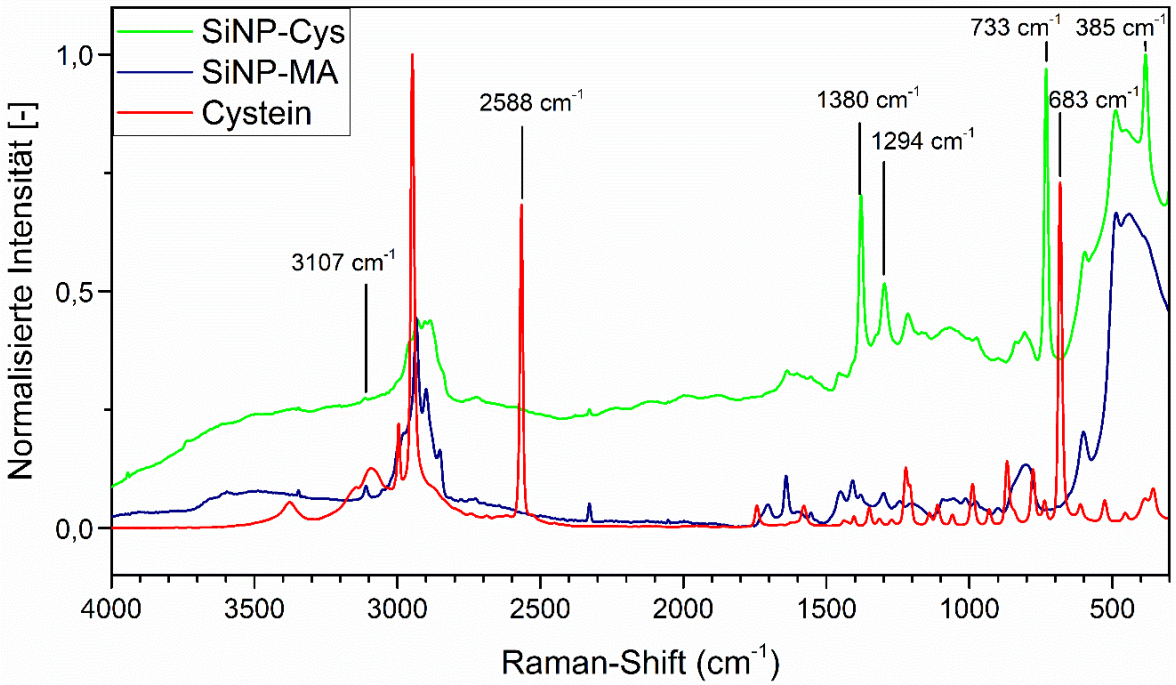


Abbildung 16: Raman-Spektren von SiNP-MA, SiNP-Cys und Cystein.
SiNP-MA reagierte mit dem Thiol des Cysteins für 3 Tage bei Raumtemperatur katalysiert durch Anilin unter Bildung eines Thioethers (Thiol-Michael-Addition). Spezifisch für den Thioether sind die Banden bei 733 und 385 cm^{-1} (C-S-Streck- und Deformationsschwingungen), während der Peak bei 3107 cm^{-1} für ein Alken spricht und kennzeichnet, dass die Reaktion nicht vollständig abgelaufen ist. Für die Thiolgruppe des Cysteins sind die Peaks bei 2588 cm^{-1} (S-H-Streckschwingung) und 683 cm^{-1} (C-S-Streckschwingung) charakteristisch.

Die zwei intensiven Peaks bei 1380 und 1297 cm^{-1} sind nicht auf das addierte Cystein zurückzuführen, da dieses keine Banden an dieser Stelle enthält. Im SiNP-MA-

Spektrum tauchen diese Peaks nur mit geringerer Intensität auf. Der Unterschied in der Ausprägung kann auf eine unterschiedliche lokale Konzentration, aber auch auf die Normierung zurückgeführt werden. Die Deformationsschwingung des Thioethers könnte für das Signal bei 385 cm^{-1} verantwortlich sein [72,87].

Es ist allerdings anzumerken, dass die markanten Peaks nicht an allen Stellen der Probe zu finden waren, selbst wenn diese den Alken-Peak zeigten. Demnach reagieren also nicht alle funktionellen Gruppen mit dem Thiol. Da das Thiol im Überschuss eingesetzt wurde, kann es nicht das limitierende Edukt sein. Es besteht die Möglichkeit, dass die Reaktion sehr langsam abläuft und somit auch nach mehreren Tagen nicht beendet ist. Dies wird unterstützt durch die Ergebnisse von Chan et al. [70], die für Methacrylate und den Einsatz primärer Amine als Katalysatoren eine geringe Reaktionsgeschwindigkeit feststellten.

Die erfolgreiche Kopplung wurde durch die Messung mit der ICP-OES bestätigt (Schwefelkonzentration SiNP-Cys: 0,090) .

Die Michael-Addition wurde nicht mit den SiNP-Vinyl untersucht, da diesen die elektronenziehende Estergruppe fehlt, welche das zwischendurch entstehende Carbanion stabilisiert. Damit ist eine wesentlich geringere Reaktivität und somit keine quantitative Umsetzung zu erwarten.

4.4 Gegenüberstellung der Kopplungsvarianten

Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen Kopplungsreaktionen.

	Silylierungsmittel	Kopplung mit Modellmolekül	Nachweis
Nukleophile Addition mit Dialdehyd	APTES	Reaktion mit Glutaraldehyd → Reaktion mit einer Amingruppe	Mit ICP-OES
Thiol-ene Click-Reaktion	Vinyl-Silan	Radikalische Reaktion mit einer Thiolgruppe	Mit ICP-OES und Raman-Spektroskopie
Thiol-Michael-Addition	γ-MAPS	Michael-Addition mit einer Thiolgruppe	Mit ICP-OES und Raman-Spektroskopie

Es wurden verschiedene Möglichkeiten zur Kopplung von Aptameren an funktionalisierte Silica-Nanopartikel untersucht. Dabei wurden anstelle der Aptamere Modell-Moleküle eingesetzt, die die entsprechenden funktionellen Gruppen tragen. Die ICP-OES-Analyse ergibt für die Verknüpfungsreaktion mit Glutaraldehyd, die UV-induzierte Thiol-ene Click-Reaktion und die Thiol-Michael-Reaktion deutlich erhöhte Schwefelwerte und deutet somit auf eine erfolgreiche Kopplung hin (vgl. Abbildung 17).

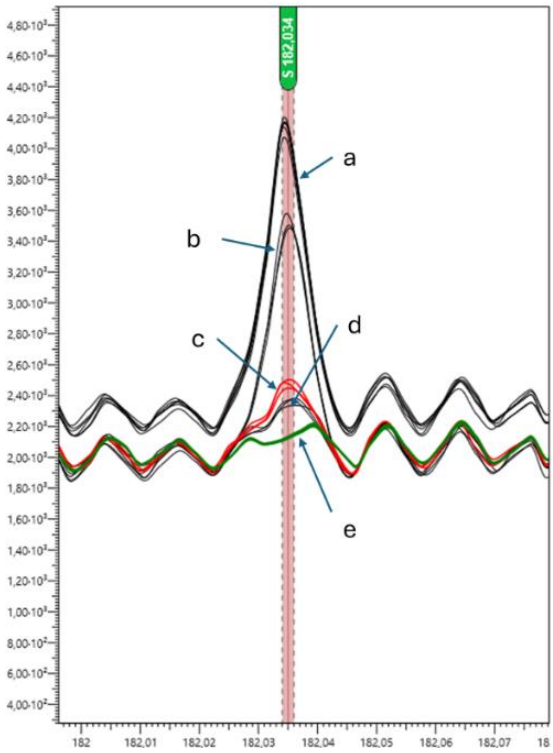


Abbildung 17: Emissionsspektrum der ICP-OES-Analyse.
Dargestellt sind die Intensitäten der emittierten Strahlung von den Produkten der Michael-Addition und UV-induzierten Thiol-ene Click-Reaktion (a) und der Reaktion mit Glutaraldehyd (b), die jeweils eine erhöhte Intensität zeigen, sowie der Negativproben: mit Schwefel versetzte und anschließend gewaschene SiNP (c) und reine SiNP (d), die nicht signifikant über dem Untergrund (e) sind. Die Emissionslinie bei 182,034 ist spezifisch für Schwefel.

Mittels Raman-Spektroskopie konnten die Reaktionsprodukte der Thiol-basierten Kopplungen nachgewiesen werden, wobei die Intensitäten der Thioetherschwingungen für die Michael-Addition höher sind. Das deutet möglicherweise auf eine größere Ausbeute hin, allerdings kann anhand der Raman-Spektren keine quantitative Aussage getroffen werden. Angemerkt sei hierbei, dass die Ergebnisse der ICP-OES-Analyse und die der Raman-Spektren nicht von denselben experimentellen Ansätzen stammen. Für die Reaktion mit Glutaraldehyd war ein Nachweis im Raman aufgrund der Fluoreszenz nicht möglich.

Da der Kopplungsmechanismus für Aptamere angedacht ist, sind für die Beurteilung der Effizienz neben der Ausbeute auch die potenziellen Schädlichkeit für die DNA in

Betracht zu ziehen. In Hinblick darauf eignet sich die Michael-Addition besser als die Thiol-ene Click-Reaktion, da sie unter milden Bedingungen abläuft und nicht auf Hitze, Radikalstarter oder UV-Strahlung angewiesen ist, die die DNA schädigen können.

Die Verknüpfung über ein Dialdehyd ist von den Reaktionsbedingungen her ebenfalls nicht schädlich für die Aptamere, aber die Tendenz zu Agglomerieren macht die Partikel für die Anwendung zur Aufkonzentration unbrauchbar. Zudem besitzen die Nukleotide noch weitere Amingruppen, die zwar weniger reaktiv sind als eine Aminogruppe an einem Alkan, aber dennoch zum Teil mit dem Aldehyd reagieren könnten.

4.5 Fe_3O_4-Nanopartikel

4.5.1 Synthese

Die Herstellung der Eisen(II,III)oxid-Partikel erfolgte durch die Ko-Präzipitation von Eisen(II)- und Eisen (III)-Ionen im Alkalischen. Die Farbe der Lösung der Eisen-Ionen war orange, sobald jedoch Ammoniak hinzugegeben wurde, verwandelte sie sich nahezu schlagartig in pechschwarz. Dieser Umschlag war bedingt durch die veränderte Stabilität und Löslichkeit der Ionen, sodass eine plötzliche Übersättigung der Lösung entstand. Die dabei entstanden Keime wuchsen während der restlichen Reaktionszeit weiter bis nahezu alle Edukte abreagiert waren.

Während der Reaktion war der basische pH-Wert nicht nur ausschlaggebend für die Keimbildung, sondern sorgte auch für eine gewisse Stabilität der synthetisierten Partikel [34]. Beim ersten Syntheseversuch wurde das Produkt mit destilliertem Wasser gewaschen. Infolge des daraufhin neutralen pH-Wertes fehlten die abstoßenden Kräfte zwischen den Partikel, sodass sie schon nach kurzer Zeit agglomerierten, was in der Veränderung des hydrodynamischen Durchmessers, aber auch in dem Verhalten der Suspension bemerkbar wurde. So erschien sie direkt nach der Synthese wie ein „schwarzes Fluid“ mit einer hohen Oberflächenspannung, was sich kaum von selbst separierte. Im Neutralen dagegen setzten sich die Partikel schon nach kurzer Zeit ab. Beim zweiten Ansatz wurde deshalb mit einer 2%-Citrat-Lösung gewaschen. Als Ergebnis war die Suspension über mehrere Wochen stabil, was an ihrem Verhalten sichtbar wurde. Von der Stabilisierung der Magnetit-Partikel durch die Carboxylgruppen des Citrats berichtete Cheraghipour et al. [33]. Allerdings berichteten sowohl Mandel et al. als auch Cheraghipour et al., dass sich eine stabile Suspension der MNPs nicht mithilfe eines Magneten separieren ließe [33,34], was im Gegensatz

zu dem in dieser Arbeit beobachteten Verhalten steht. Dies ist möglicherweise durch eine unterschiedliche Ausprägung der Stabilisierung oder durch verschiedene Stärken der verwendeten Magneten bedingt.

Das Problem, dass sich neben Magnetit auch noch andere, nicht magnetisierbare Eisenoxide wie Maghemit oder Goethit ausbilden können, war nicht weiter relevant. Da die Abtrennung durch einen Magneten erreicht wurde, blieben nur die gewünschten MNPs zurück.

Mittels DLS konnte einen hydrodynamischen Durchmesser von 146 nm ermittelt werden. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass dies die Citrat-Hülle mit einschließt. Unter dem REM wurde sichtbar, dass auch hier die Agglomerate von kleineren Primärpartikeln vorliegen (Anhang: Abbildung V).

Das Produkt wurde sowohl mittels IR- als auch im Raman-Spektroskopie vermessen, wobei sich ein für Metalloxide typisches Spektrum zeigte. Eine schwache, breite Bande im IR-Spektrum bei 3400 cm^{-1} ist charakteristisch für die Hydroxy-Gruppe auf der Oberfläche des Magnetits (Abbildung 18), während die Bande bei 662 cm^{-1} im Raman der Fe-O-Schwingung zuordnen lässt (Anhang: Abbildung IV) [51].

4.5.2 Coating

Um die Fe_3O_4-Partikel stabil zu halten und Funktionalisierungen zu ermöglichen, wurden sie mit einer dünnen Schicht Silica überzogen. Der Vergleich der IR-Spektren vor und nach dem Coating zeigt eine neue starke Bande bei 1054 cm^{-1}, die charakteristisch für die Si-O-Si-Streckschwingung ist (Abbildung 18). Zudem tauchen noch zwei kleinere Banden bei 948 und 782 cm^{-1} auf, die durch die Epoxy-Ringschwingungen und die Si-OH-Streckschwingung versursacht werden [51,72,87]. Auch hebt sich im oberen Wellenzahlenbereich zwischen 3500-3000 cm^{-1} die sehr breite Bande intensiver von der Basislinie ab. Diese kann den O-H-Streckschwingungen der Silanol-Gruppen auf der Oberfläche zugeordnet werden [72,87].

Mittels der TXRF konnte die Anwesenheit von Silizium an den Partikeln bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigen neben den Eisen-Peaks einen deutlichen Silizium-Peak, der für die reinen MNP nicht auftaucht (Anhang: Abbildung VII).

Dass das detektierte Silica von losen SiNP herrührt kann ausgeschlossen werden, da die Magnetit-Partikel mittels Magneten abgetrennt wurden.

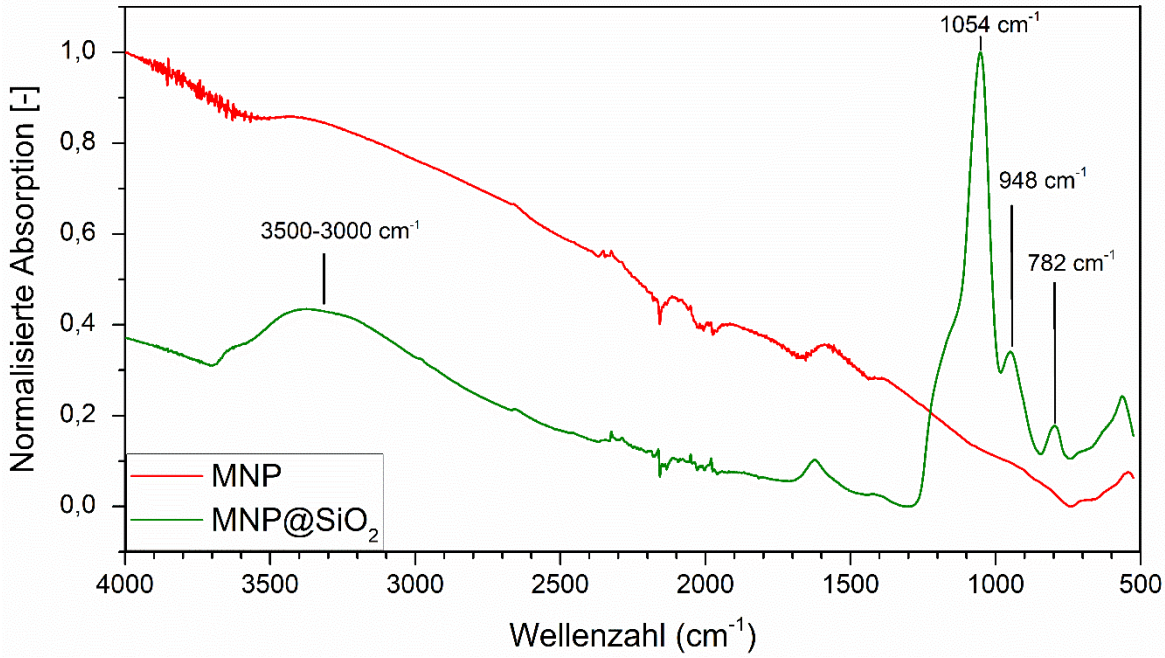


Abbildung 18: ATR-IR-Spektrum der MNPs mit und ohne Beschichtung mit Silica.
Die Beschichtung mit Silica ist deutlich an dem Peak bei 1054 cm^{-1}, der für die Si-O-Si-Schwingung markant ist, zu erkennen. Die Banden bei 948 und 782 cm^{-1} sind charakteristisch für die Epoxy-Ringschwingungen und die Si-OH-Schwingungen.

Der Nachweis im Raman gestaltete sich aus zwei Gründen schwierig. Zum einen wurden die Magnetit-Nanopartikel bei den sonst genutzten Einstellungen durch den Laser zerstört. Dies äußerte sich in einem Drift der Basislinie, wie auch in dem Aussehen der untersuchten Stelle. Die Partikel, die zuvor schwarz waren, leuchteten nach Bestrahlung mit dem Laser hellrot. Dieses Verhalten wurde ebenfalls von Levic dokumentiert [92]. Um dennoch ein auswertbares Spektrum zu erhalten, wurde die Laserleistung um ein 100-faches herabgesetzt und, um die damit schlechtere Intensität der Signale auszugleichen, die Koaddition von 15- auf 50-fach erhöht sowie die Apertur weiter geöffnet. Somit konnte ein besseres Spektrum generiert werden. Zum anderen sind die Silica-spezifischen Banden alle eher polar und damit IR-aktiv, weshalb sie im Raman nur sehr schwach und in Verbindung mit den neuen Einstellungen kaum zu sehen sind. Dennoch war das Spektrum wichtig für den Vergleich mit nachfolgenden Funktionalisierungen (Anhang: Abbildung IV).

Der mit der DLS bestimmte hydrodynamische Durchmesser betrug 186 nm und unterstützt damit die Annahme, dass eine zusätzliche Schicht auf den Partikeln entstanden ist (vgl. hydrodynamischer Durchmesser der MNP: 146 nm). Dabei legen wiederum die Aufnahmen des REM kleinere Partikel nahe, die agglomerieren (Anhang: Abbildung VI). Ob die beschichteten MNPs sich zu Agglomeraten zusammengelagert haben oder ob die Agglomerate im Gesamten mit Silica überzogen wurden lässt sich daraus nicht entnehmen. Ebenso wenig kann anhand der Analy-

seergebnisse eine Aussage über die Schichtdicke und die Durchgängigkeit getroffen werden.

4.5.3 Funktionalisierung

Die MNP@SiO_2-Partikel wurden wie die SiNPs funktionalisiert. Die Silylierung mit γ-MAPS konnte im Raman nicht nachgewiesen werden. Dies kann aber auch der Tatsache geschuldet sein, dass die generelle Intensität des Spektrum aufgrund der veränderten Einstellungen sehr gering ist und dadurch schwache Alken-Peak im Bereich von 3100 cm^{-1} nicht detektiert werden kann. Die anschließende Umsetzung mit Cystein konnte ebenfalls nicht mit Gewissheit bestätigt werden, aber in der Flanke des schon zuvor sichtbaren Peaks bei 669 cm^{-1} lässt sich nun eine Schulter bei 708 cm^{-1} erahnen (Abbildung 19), welche von dem C-S-Peak der Thioetherschwingung herrühren könnte, der durch den Einfluss von dem Eisenoxid verschoben sein kann. Die ICP-Analyse konnte die Anwesenheit von Schwefel nicht bestätigen – ob es daran lag, dass er nicht vorhanden war oder nur in zu geringen Mengen, lässt sich nicht sagen.

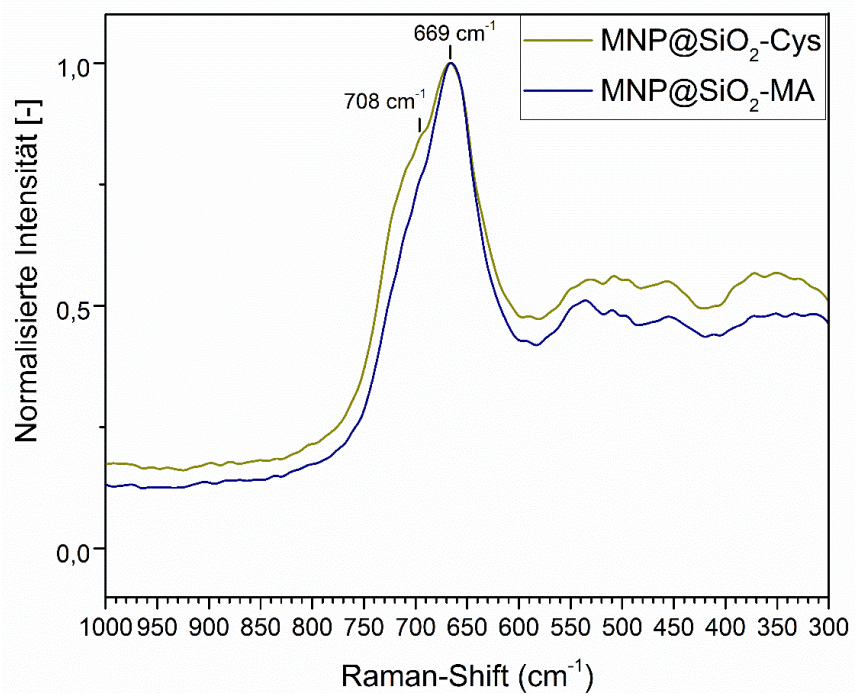


Abbildung 19: Raman Spektrum von MNP und MNP@SiO_2-Cys - vergrößert im Bereich 300 - 1000 cm^{-1}. Die mit dem Methacrylat funktionalisierten MNP haben mit Cystein für drei Tage bei Raumtemperatur unter Verwendung von Anilin als Katalysator reagiert (Michael-Addition). Nach der Reaktion ist eine leichte Schulter bei 708 cm^{-1} im Peak von 669 cm^{-1} zu sehen, die möglicherweise von der C-S-Streckschwingung des Thioethers herrühren könnte.

Der Nachweis der Amin-Modifizierung war mittels Raman-Spektroskopie ebenfalls nicht möglich, da die verschlechterte Signalintensität die generell schon schwachen Banden des Aminopropans nicht nachweisen kann.

4.6 Fluoreszenz-Assay

Das angedachte Schaltersystem beruht auf dem Unterdrücken der Fluoreszenz im ungebundenen und deren freien Emission im gebundenen Zustand. Dabei ist die Sensitivität maßgeblich von den Eigenschaften des Fluoresceins abhängig. Mittels einer Verdünnungsreihe wurde bestimmt, in welchem Bereich sich Konzentration und Fluoreszenz proportional zueinander verhalten und bis zu welchen Konzentrationen ein Signal detektiert werden kann.

Die Ergebnisse zeigen eine lineare Abhängigkeit bis zur niedrigsten Konzentration von 0,001 nmol/L, wobei die Signalintensitäten für Konzentrationen über 2 nmol/L stärker streuen und die Wertepaare mehr von dem linearen Verhalten abweichen. Da nur dieselben Verdünnungen dreimal gemessen und nicht für jede Konzentration drei unabhängige Verdünnungen angesetzt wurden, gibt die Standardabweichung nur die Streuung der gemessenen Signalintensität an.

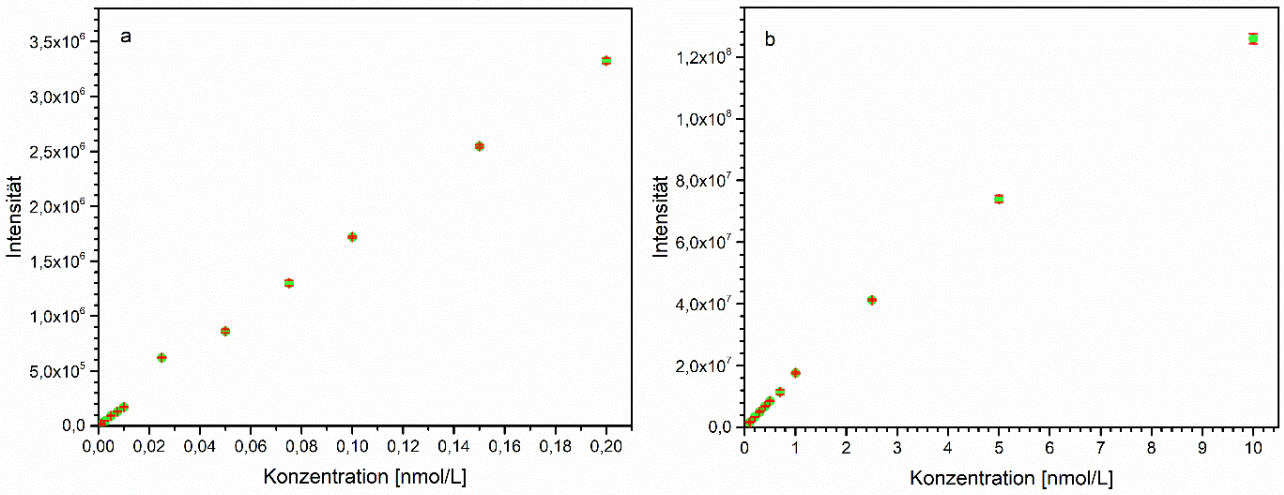


Abbildung 20: Verdünnungsreihe von Fluorescein in Tris-Puffer.
Die Messwerte zeigen eine lineare Abhängigkeit der emittierten Fluoreszenz von der Konzentration, wobei der Messpunkt bei 0,025 nmol/L als Ausreißer aufgrund eines Pipettierfehlers angenommen wird. Dies zeigt, dass bis 0,001 nmol/L die Probe sowohl qualifiziert, als auch quantifiziert werden kann.

Die Messwerte zeigen nicht nur, dass Fluorescein bis hin zu 0,001 nmol/L nachgewiesen, sondern auch quantifiziert werden kann. Das bringt für das Schaltersystem eine hohe Sensitivität mit sich, die erforderlich ist für die Trinkwasseranalyse. Denn schon geringe Keimzahlen pathogener Erreger sind Ausreichend, um eine Infektion auszulösen. Allerdings muss beachtet werden, dass sich die Nachweisgrenze aufgrund der Komplexität des Schaltersystems verschieben könnte. So müssen sowohl Effekte des Nanopartikels und des Aptamers berücksichtigt werden, als auch die Anwesenheit des Quenchers, der das Signal unterdrückt. Zudem sollte auch unter-

sucht werden, wie viel „Restfluoreszenz“ das gequenchte Fluorescein emittiert und ab welcher Signalintensität sich sicher sagen lässt, dass die Zielstruktur vorliegt. Diese Parameter können allerdings nur durch Tests mit dem Schaltersystem herausgefunden werden.

5 Zusammenfassung

In der Arbeit wurden drei verschiedene Möglichkeiten zur Kopplung von Aptameren an Nanopartikel identifiziert. Die Verknüpfung von einem Amin-modifizierten Silica-Nanopartikel mit einem ebenfalls Amin-modifizierten Aptamer unter Verwendung von Glutaraldehyd konnte erfolgreich durchgeführt und analytisch nachgewiesen werden. Allerdings tendieren die Nanopartikel aufgrund der Modifizierung zum Agglomerieren. Die zweite Variante basierte auf der Thiol-ene Click-Reaktion, die ein Vinyl-modifiziertes Nanopartikel mit dem Thiol eines funktionalisierten Aptamers über eine radikalische Kettenreaktion verknüpft. Auch diese Reaktion verlief erfolgreich und führte zu einer stabilen Bindung. Es muss jedoch in nachfolgenden Versuchen geklärt werden, ob die Aktivierung mit UV-Strahlung der DNA schadet. Die dritte Option beruhte auf der Thiol-Michael-Addition, bei der sich das Thiol, katalysiert durch Anilin, an das Alken eines Methacrylat-funktionalisierten Partikel addiert. Diese Reaktion liefert nicht nur die am vielversprechendsten Ergebnisse, sondern ist auch durch die milden Reaktionsbedingungen für die Kopplung von DNA-Strängen gut geeignet. Der einzige Nachteil ist die lange Reaktionszeit, die in weiteren Untersuchungen adressiert wird.

Die Untersuchung der konzentrationsabhängigen Fluoreszenz des Fluoresceins, welches als Fluorophor für den molekularen Schalter genutzt werden soll, ergab, dass es bis zu 0,001 nmol/L nicht nur detektiert, sondern voraussichtlich auch quantifiziert werden kann. Dies ermöglicht eine sensitive Detektion selbst geringer Konzentrationen der Mikroorganismen, was wichtig für die Trinkwasseranalyse ist.

6 Ausblick

Das größte Potential der in dieser Arbeit erörterten Varianten besitzt die Thiol-Michael Addition, weshalb es sich lohnt, auf die Optimierung dieser den Fokus zu legen. Dazu gehört, die Reaktionsgeschwindigkeit und die Konzentration auf der Oberfläche zu bestimmen und gegebenenfalls die Reaktionszeit zu verkürzen. Chan et al. stellten fest, dass die Struktur der Edukte sowie der Einsatz verschiedener Katalysatoren einen großen Einfluss auf die Geschwindigkeit und die Ausbeute der Reaktion haben, vor allem primäre Alkylamine und tertiäre Phosphine werden als geeignet beschrieben [70]. Um allerdings die Auswirkungen beurteilen zu können, muss zuvor eine Methode zur Quantifizierung entwickelt werden. Eine Möglichkeit wäre die Quantifizierung mittels Cysteamin, gekoppelt an Fluorescein, wobei die Intensität der Fluoreszenz ein Maß für die Produktkonzentration ist [90].

Um den schnellen Nachweis der Zwischen- und Endprodukte zu ermöglichen, sollten weitere Möglichkeiten ausgetestet werden, da sowohl die Messung im Raman als auch in der ICP-OES zeitaufwendig und für die Magnetit-Partikel nicht geeignet sind. In der Literatur werden die Qualifizierungen häufig mittels ATR-IR und Zeta-Potential beschrieben, da beide Methoden als oberflächensensibel gelten. Die Funktionsweise des ATR-IR wurde bereits beschrieben, das Zeta-Potential beruht auf den elektrochemischen Eigenschaften der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche des Partikels, welche sich durch die Modifizierungen ändern [93].

Bevor die Modellmoleküle durch die Aptamere ersetzt, sollten die Einflüsse der verschiedenen Kopplungsmethoden auf die DNA untersucht werden, um sicherzugehen, dass die Nukleotidsequenz durch diese nicht beschädigt wird. Hier ist die Anwendung molekularbiologischer Methoden wie der Polymerasen-Kettenreaktion mit anschließender Sequenzierung denkbar. Für den Nachweis der DNA auf der Partikeloberfläche bietet sich sowohl die UV- als auch die IR-Spektroskopie an [24,51].

Zudem muss getestet werden, wie sich das System aus Aptamer, Fluorophor und komplementären Strang mit Quencher auf das Fluoreszenzsignal auswirkt und welche Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sich dadurch ergeben. Die erfolgreiche Kombination der einzelnen Komponenten Aptamer, Nanopartikel und Fluorophor ist die Voraussetzung für die vollständige Funktionsfähigkeit des molekularen Schalters und somit für die einfache und sensitive Detektion pathogener Mikroorganismen.

7 References

[1] D. Li, L. Liu, Q. Huang, T. Tong, Y. Zhou, Z. Li, Q. Bai, H. Liang, L. Chen, Recent advances on aptamer-based biosensors for detection of pathogenic bacteria, World journal of microbiology & biotechnology 37 (2021) 45. https://doi.org/10.1007/s11274-021-03002-9.

[2] Y. Li, L. Sun, Q. Zhao, Development of aptamer fluorescent switch assay for aflatoxin B1 by using fluorescein-labeled aptamer and black hole quencher 1-labeled complementary DNA, Analytical and bioanalytical chemistry 410 (2018) 6269–6277. https://doi.org/10.1007/s00216-018-1237-x.

[3] V.J.B. Ruigrok, M. Levisson, M.H.M. Eppink, H. Smidt, J. van der Oost, Alternative affinity tools: more attractive than antibodies?, The Biochemical journal 436 (2011) 1–13. https://doi.org/10.1042/BJ20101860.

[4] F. Li, H. Zhang, Z. Wang, A.M. Newbigging, M.S. Reid, X.-F. Li, X.C. Le, Aptamers facilitating amplified detection of biomolecules, Analytical chemistry 87 (2015) 274–292. https://doi.org/10.1021/ac5037236.

[5] M. Citartan, S.C.B. Gopinath, J. Tominaga, S.-C. Tan, T.-H. Tang, Assays for aptamer-based platforms, Biosensors & bioelectronics 34 (2012) 1–11. https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.01.002.

[6] A.D. Ellington, J.W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, Nature 346 (1990) 818–822. https://doi.org/10.1038/346818a0.

[7] C. Tuerk, L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, Science (New York, N.Y.) 249 (1990) 505–510. https://doi.org/10.1126/science.2200121.

[8] Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery, 2010.

[9] A.D. Keefe, S.T. Cload, SELEX with modified nucleotides, Current opinion in chemical biology 12 (2008) 448–456. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.06.028.

[10] S. Shigdar, J. Macdonald, M. O'Connor, T. Wang, D. Xiang, H. Al Shamaileh, L. Qiao, M. Wei, S.-F. Zhou, Y. Zhu, L. Kong, S. Bhattacharya, C. Li, W. Duan, Aptamers as theranostic agents: modifications, serum stability and functionalisation, Sensors (Basel, Switzerland) 13 (2013) 13624–13637. https://doi.org/10.3390/s131013624.

[11] F. Tolle, G.M. Brändle, D. Matzner, G. Mayer, Ein universeller Zugang zu Nu-

cleobasen-modifizierten Aptameren, Angewandte Chemie 127 (2015) 11121–11125. https://doi.org/10.1002/ange.201503652.

[12] D. Mann, C. Reinemann, R. Stoltenburg, B. Strehlitz, In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine, Biochemical and biophysical research communications 338 (2005) 1928–1934. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.172.

[13] J.G. Bruno, M.P. Carrillo, T. Phillips, B. King, Development of DNA aptamers for cytochemical detection of acetylcholine, In vitro cellular & developmental biology. Animal 44 (2008) 63–72. https://doi.org/10.1007/s11626-008-9086-0.

[14] J. Ciesiolka, J. Gorski, M. Yarus, Selection of an RNA domain that binds Zn2+, RNA 1 (1995) 538–550.

[15] L.C. Bock, L.C. Griffin, J.A. Latham, E.H. Vermaas, J.J. Toole, Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin, Nature 355 (1992) 564–566. https://doi.org/10.1038/355564a0.

[16] X. Cao, S. Li, L. Chen, H. Ding, H. Xu, Y. Huang, J. Li, N. Liu, W. Cao, Y. Zhu, B. Shen, N. Shao, Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of Staphylococcus aureus, Nucleic acids research 37 (2009) 4621–4628. https://doi.org/10.1093/nar/gkp489.

[17] Q. Wu, Y. Wang, H. Wang, L. Wu, H. Zhang, Y. Song, Z. Zhu, D. Kang, C. Yang, DNA aptamers from whole-cell SELEX as new diagnostic agents against glioblastoma multiforme cells, The Analyst 143 (2018) 2267–2275. https://doi.org/10.1039/c8an00271a.

[18] D. Shangguan, Y. Li, Z. Tang, Z.C. Cao, H.W. Chen, P. Mallikaratchy, K. Sefah, C.J. Yang, W. Tan, Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103 (2006) 11838–11843. https://doi.org/10.1073/pnas.0602615103.

[19] Q.-Y. Wang, Y.-J. Kang, Bioprobes Based on Aptamer and Silica Fluorescent Nanoparticles for Bacteria Salmonella typhimurium Detection, Nanoscale research letters 11 (2016) 150. https://doi.org/10.1186/s11671-016-1359-z.

[20] H. Jo, C. Ban, Aptamer-nanoparticle complexes as powerful diagnostic and therapeutic tools, Experimental & molecular medicine 48 (2016) e230. https://doi.org/10.1038/emm.2016.44.

[21] S. Bamrungsap, T. Chen, M.I. Shukoor, Z. Chen, K. Sefah, Y. Chen, W. Tan, Pattern recognition of cancer cells using aptamer-conjugated magnetic nanoparticles, ACS nano 6 (2012) 3974–3981. https://doi.org/10.1021/nn3002328.

[22] V. Bagalkot, L. Zhang, E. Levy-Nissenbaum, S. Jon, P.W. Kantoff, R. Langer, O.C. Farokhzad, Quantum dot-aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer, Nano letters 7 (2007) 3065–3070. https://doi.org/10.1021/nl071546n.

[23] Z. Tang, P. Mallikaratchy, R. Yang, Y. Kim, Z. Zhu, H. Wang, W. Tan, Aptamer switch probe based on intramolecular displacement, Journal of the American Chemical Society 130 (2008) 11268–11269. https://doi.org/10.1021/ja804119s.

[24] Y.A. Grechkin, S.L. Grechkina, E.A. Zaripov, S.V. Fedorenko, A.R. Mustafina, M.V. Berezovski, Aptamer-Conjugated Tb(III)-Doped Silica Nanoparticles for Luminescent Detection of Leukemia Cells, Biomedicines 8 (2020). https://doi.org/10.3390/biomedicines8010014.

[25] R. Yamamoto, T. Baba, P.K. Kumar, Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of Tat protein of HIV-1, Genes to cells devoted to molecular & cellular mechanisms 5 (2000) 389–396. https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00331.x.

[26] R.E. Wang, Y. Zhang, J. Cai, W. Cai, T. Gao, Aptamer-based fluorescent biosensors, Current medicinal chemistry 18 (2011) 4175–4184. https://doi.org/10.2174/092986711797189637.

[27] I. Khan, K. Saeed, I. Khan, Nanoparticles: Properties, applications and toxicities, Arabian Journal of Chemistry 12 (2019) 908–931. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011.

[28] N. Li, W.H. Binder, Click-chemistry for nanoparticle-modification, J. Mater. Chem. 21 (2011) 16717. https://doi.org/10.1039/c1jm11558h.

[29] S. Anu Mary Ealia, M.P. Saravanakumar, A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application, IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 263 (2017) 32019. https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019.

[30] A.-G. Niculescu, C. Chircov, A.M. Grumezescu, Magnetite nanoparticles: Synthesis methods - A comparative review, Methods (San Diego, Calif.) 199 (2022) 16–27. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.04.018.

[31] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M.A. El-Sayed, Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes, Chemical reviews 105 (2005) 1025–1102. https://doi.org/10.1021/cr030063a.

[32] I.A. Rahman, V. Padavettan, Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-

Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites—A Review, Journal of Nanomaterials 2012 (2012) 1–15. https://doi.org/10.1155/2012/132424.

[33] E. Cheraghipour, S. Javadpour, A.R. Mehdizadeh, Citrate capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy, JBiSE 05 (2012) 715–719. https://doi.org/10.4236/jbise.2012.512089.

[34] K. Mandel, F. Hutter, C. Gellermann, G. Sextl, Synthesis and stabilisation of superparamagnetic iron oxide nanoparticle dispersions, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 390 (2011) 173–178. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.09.024.

[35] X. He, K. Wang, W. Tan, B. Liu, X. Lin, C. He, Du Li, S. Huang, J. Li, Bioconjugated nanoparticles for DNA protection from cleavage, Journal of the American Chemical Society 125 (2003) 7168–7169. https://doi.org/10.1021/ja034450d.

[36] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, Journal of Colloid and Interface Science 26 (1968) 62–69. https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5.

[37] H.D. Jang, H. Chang, Y. Suh, K. Okuyama, Synthesis of SiO2 nanoparticles from sprayed droplets of tetraethylorthosilicate by the flame spray pyrolysis, Current Applied Physics 6 (2006) e110-e113. https://doi.org/10.1016/j.cap.2006.01.021.

[38] G.D. ULRICH, Theory of Particle Formation and Growth in Oxide Synthesis Flames, Combustion Science and Technology 4 (1971) 47–57. https://doi.org/10.1080/00102207108952471.

[39] H.D. Jang, Generation of Silica Nanoparticles from Tetraethylorthosilicate (TEOS) Vapor in a Diffusion Flame, Aerosol Science and Technology 30 (1999) 477–488. https://doi.org/10.1080/027868299304516.

[40] W. Zhu, S.E. Pratsinis, Synthesis of SiO2 and SnO2 particles in diffusion flame reactors, AIChE J. 43 (1997) 2657–2664. https://doi.org/10.1002/aic.690431309.

[41] K. Möller, T. Bein, Degradable Drug Carriers: Vanishing Mesoporous Silica Nanoparticles, Chem. Mater. 31 (2019) 4364–4378. https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.9b00221.

[42] E.S.D.T. de Mendonça, A.C.B. de Faria, S.C.L. Dias, F.F. Aragón, J.C. Mantilla, J.A. Coaquira, J.A. Dias, Effects of silica coating on the magnetic properties of magnetite nanoparticles, Surfaces and Interfaces 14 (2019) 34–43.

https://doi.org/10.1016/j.surfin.2018.11.005.

[43] O. 1 Bounekta, R. Doufnoune, A. Ourari, F. Riahi, N. Haddaoui, Surface modification of silica nanoparticles by means of silanes: effect of various parameters on the grafting reactions, J. Fundam and Appl Sci. 11 (2019) 200–226.

[44] D.E. Achatz, F.J. Heiligtag, X. Li, M. Link, O.S. Wolfbeis, Colloidal silica nanoparticles for use in click chemistry-based conjugations and fluorescent affinity assays, Sensors and Actuators B: Chemical 150 (2010) 211–219. https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.07.014.

[45] N. Moitra, P. Trens, L. Raehm, J.-O. Durand, X. Cattoën, M.W. Chi Man, Facile route to functionalized mesoporous silica nanoparticles by click chemistry, J. Mater. Chem. 21 (2011) 13476. https://doi.org/10.1039/c1jm12066b.

[46] H. Mader, X. Li, S. Saleh, M. Link, P. Kele, O.S. Wolfbeis, Fluorescent silica nanoparticles, Annals of the New York Academy of Sciences 1130 (2008) 218–223. https://doi.org/10.1196/annals.1430.053.

[47] L.R. Hilliard, X. Zhao, W. Tan, Immobilization of oligonucleotides onto silica nanoparticles for DNA hybridization studies, Analytica Chimica Acta 470 (2002) 51–56. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00538-X.

[48] Z. Hu, J. Tan, Z. Lai, R. Zheng, J. Zhong, Y. Wang, X. Li, N. Yang, J. Li, W. Yang, Y. Huang, Y. Zhao, X. Lu, Aptamer Combined with Fluorescent Silica Nanoparticles for Detection of Hepatoma Cells, Nanoscale research letters 12 (2017) 96. https://doi.org/10.1186/s11671-017-1890-6.

[49] L. Cai, Z.-Z. Chen, M.-Y. Chen, H.-W. Tang, D.-W. Pang, MUC-1 aptamer-conjugated dye-doped silica nanoparticles for MCF-7 cells detection, Biomaterials 34 (2013) 371–381. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.084.

[50] R.P. Bagwe, L.R. Hilliard, W. Tan, Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and nonspecific binding, Langmuir 22 (2006) 4357–4362. https://doi.org/10.1021/la052797j.

[51] G. Bayramoglu, V.C. Ozalp, U. Dincbal, M.Y. Arica, Fast and Sensitive Detection of Salmonella in Milk Samples Using Aptamer-Functionalized Magnetic Silica Solid Phase and MCM-41-Aptamer Gate System, ACS biomaterials science & engineering 4 (2018) 1437–1444. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00018.

[52] F. Brothier, V. Pichon, Miniaturized DNA aptamer-based monolithic sorbent for selective extraction of a target analyte coupled on-line to nanoLC, Analytical and bioanalytical chemistry 406 (2014) 7875–7886.

https://doi.org/10.1007/s00216-014-8256-z.

[53] A. Aravind, S. Veeranarayanan, A.C. Poulose, R. Nair, Y. Nagaoka, Y. Yoshida, T. Maekawa, D.S. Kumar, Aptamer-Functionalized Silica Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy, BioNanoSci. 2 (2012) 1–8. https://doi.org/10.1007/s12668-011-0029-y.

[54] Y. Wang, K.-Y. Pu, B. Liu, Anionic Conjugated Polymer with Aptamer-Functionalized Silica Nanoparticle for Label-Free Naked-Eye Detection of Lysozyme in Protein Mixtures, Langmuir 26 (2010) 10025–10030. https://doi.org/10.1021/la100139p.

[55] F. Lee, W.H. Brown, T. Poon, Einführung in die Organische Chemie, Wiley-VCH, Weinheim, 2020.

[56] R. Brückner, Reaktionsmechanismen: Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden, 3rd ed., Spektrum, Akad. Verl., Berlin, Heidelberg, 2011.

[57] I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron, Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, BioTechniques 37 (2004) 790-6, 798-802. https://doi.org/10.2144/04375RV01.

[58] S. Farris, J. Song, Q. Huang, Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde, Journal of agricultural and food chemistry 58 (2010) 998–1003. https://doi.org/10.1021/jf9031603.

[59] T. Zhang, Z. Yu, Y. Ma, B.-S. Chiou, F. Liu, F. Zhong, Modulating physicochemical properties of collagen films by cross-linking with glutaraldehyde at varied pH values, Food Hydrocolloids 124 (2022) 107270. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107270.

[60] L.H.H. Olde Damink, P.J. Dijkstra, M.J.A. van Luyn, P.B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials, J Mater Sci: Mater Med 6 (1995) 460–472. https://doi.org/10.1007/BF00123371.

[61] Y. Wine, N. Cohen-Hadar, A. Freeman, F. Frolow, Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis, Biotechnology and bioengineering 98 (2007) 711–718. https://doi.org/10.1002/bit.21459.

[62] Theodor Posner, Beiträge zur Kenntniss der ungesättigten Verbindungen. II. Ueber die Addition von Mercaptanen an ungesättigte Kohlenwasserstoffe, in:

Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, pp. 646–657.

[63] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, Angew. Chem. Int. Ed. 40 (2001) 2004–2021. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004:AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.

[64] S. Chandrasekaran (Ed.), Click reactions in organic synthesis, 1st ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2016.

[65] A.V. Bordoni, M.V. Lombardo, A. Wolosiuk, Photochemical radical thiol–ene click-based methodologies for silica and transition metal oxides materials chemical modification: a mini-review, RSC Adv. 6 (2016) 77410–77426. https://doi.org/10.1039/c6ra10388j.

[66] C.E. Hoyle, C.N. Bowman, Thiol-ene click chemistry, Angew. Chem. Int. Ed. 49 (2010) 1540–1573. https://doi.org/10.1002/anie.200903924.

[67] N. Toncheva-Moncheva, M. Dangalov, N.G. Vassilev, C.P. Novakov, Thiol-ene coupling reaction achievement and monitoring by "in situ" UV irradiation NMR spectroscopy, RSC Adv. 10 (2020) 25214–25222. https://doi.org/10.1039/d0ra03902k.

[68] C. Costa, V.H.S. Santos, P.H.H. Araujo, C. Sayer, A.F. Santos, C. Dariva, M. Fortuny, Rapid decomposition of a cationic azo-initiator under microwave irradiation, J of Applied Polymer Sci 118 (2010) 1421–1429. https://doi.org/10.1002/app.32409.

[69] P.Y. Bruice, Organische Chemie: Studieren kompakt, 8th ed., Pearson Studium ein Imprint von Pearson Deutschland, München, 2021.

[70] J.W. Chan, C.E. Hoyle, A.B. Lowe, M. Bowman, Nucleophile-Initiated Thiol-Michael Reactions: Effect of Organocatalyst, Thiol, and Ene, Macromolecules 43 (2010) 6381–6388. https://doi.org/10.1021/ma101069c.

[71] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, Instrumentelle Analytik: Grundlagen - Geräte - Anwendungen. Kapitel 16: Einführung in die Infrarot-Spektroskopie, 6th ed., Springer Spektrum, Heidelberg/Berlin, 2013.

[72] J.B. Lambert, Spektroskopie: Strukturaufklärung in der Organischen Chemie. Kapitel 11: Einführung in die Infrarot- und Raman-Spektroskopie, 2nd ed., Pearson, Higher Education, München, 2012.

[73] H. Gunzler, H.-U. Gremlich, IR spectroscopy: An introduction, Wiley-VCH, Weinheim, op. 2002.

[74] Heidelberg Precious Metals Projects GmbH, Eine kurze Geschichte über IR-

Spektroskopie: Moderne IR-Spektrometer, 2023, https://www.h-pmp.com/infrarotspektroskopie-ir-spektroskopie.html, accessed 8 August 2024.

[75] J. Böcker, Spektroskopie: Instrumentelle Analytik mit Atom- und Molekülspektrometrie, 1st ed., Vogel Communications Group GmbH & Co. KG, Würzburg, 2014.

[76] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, Instrumentelle Analytik: Grundlagen - Geräte - Anwendungen. Kapitel 18: Raman-Spektroskopie, 6th ed., Springer Spektrum, Heidelberg/Berlin, 2013.

[77] O. Terrones, J. Olazar-Intxausti, I. Anso, M. Lorizate, J.A. Nieto-Garai, F.-X. Contreras, Raman Spectroscopy as a Tool to Study the Pathophysiology of Brain Diseases, International journal of molecular sciences 24 (2023). https://doi.org/10.3390/ijms24032384.

[78] T. Dieing, Confocal Raman Microscopy, 1st ed., Springer Berlin Heidelberg; Imprint: Springer, Berlin, Heidelberg, 2011.

[79] Leibniz Universität Hannover, Raman Mikroskopie – HOT – Hannoversches Zentrum für Optische Technologien – Leibniz Universität Hannover, 2024, https://www.hot.uni-hannover.de/de/arbeitsgruppen/angewandtephotonik/biophotonik-und-analytik/raman-mikroskopie, accessed 8 August 2024.

[80] J. Nölte, ICP Emissionsspektrometrie für Praktiker: Grundlagen, Methodenentwicklung, Anwendungsbeispiele, 2nd ed., Wiley-VCH GmbH, Weinheim, 2021.

[81] Malvern Instruments Ltd., Zetasizer Nano series User Manual, 5th ed., 2013.

[82] M. Williams, Solid State Analytics: Particle Size Measurement. Foliensatz, Rheinbach, 2023.

[83] Y. Wang, Y. Wang, B. Liu, Fluorescent detection of ATP based on signaling DNA aptamer attached silica nanoparticles, Nanotechnology 19 (2008) 415605. https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/41/415605.

[84] Z. Wang, J.-C. Zhao, H.-Z. Lian, H.-Y. Chen, Aptamer-based organic-silica hybrid affinity monolith prepared via "thiol-ene" click reaction for extraction of thrombin, Talanta 138 (2015) 52–58. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.02.009.

[85] H. Zhou, J. Lee, T.J. Park, S.J. Lee, J.Y. Park, J. Lee, Ultrasensitive DNA monitoring by Au–Fe3O4 nanocomplex, Sensors and Actuators B: Chemical 163 (2012) 224–232. https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.01.040.

[86] Siliciumdioxid nanopowder, 10-20 nm particle size (BET), 99.5% trace

metals basis | Sigma-Aldrich, 2024, https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/aldrich/637238, accessed 12 August 2024.

[87] J.B. Lambert, Spektroskopie: Strukturaufklärung in der Organischen Chemie. Kapitel 12: Infrarot- und Raman-Gruppenfrequenzen., 2nd ed., Pearson, Higher Education, München, 2012.

[88] E. Pretsch, M. Badertscher, P. Bühlmann, Spektroskopische Daten zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen, Springer Berlin Heidelberg, 2010.

[89] T. Nazari, M. Alijanianzadeh, A. Molaeirad, M. Khayati, Immobilization of Subtilisin Carlsberg on Modified Silica Gel by Cross-linking and Covalent Binding Methods, Biomacromolecular Journal 2 (2016) 53–58.

[90] Y. Chen, M. Wu, K. Wang, B. Chen, S. Yao, H. Zou, L. Nie, Vinyl functionalized silica hybrid monolith-based trypsin microreactor for on line digestion and separation via thiol-ene "click" strategy, Journal of chromatography. A 1218 (2011) 7982–7988. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.002.

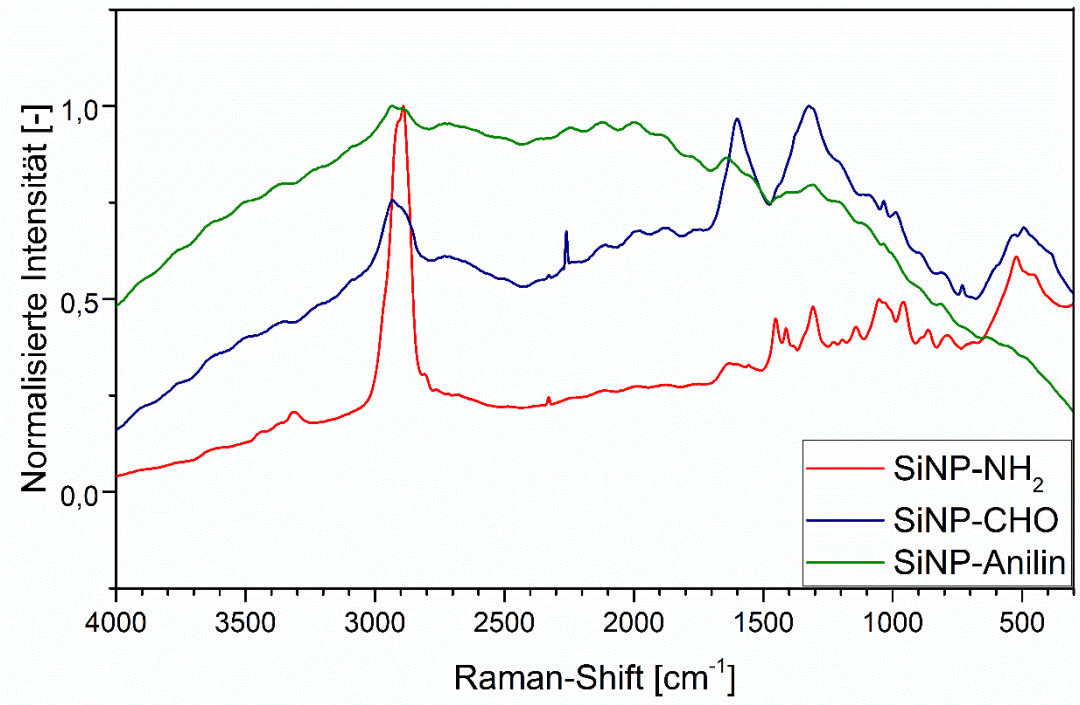
[91] J.J. Park, J.Y. Lee, Y.G. Hong, Effects of vinylsilane-modified nanosilica particles on electrical and mechanical properties of silicone rubber nanocomposites, Polymer 197 (2020) 122493. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122493.

[92] Application of Molecular Methods and Raman Microscopy/Spectroscopy in Agricultural Sciences and Food Technology, Ubiquity Press, London, 2019.

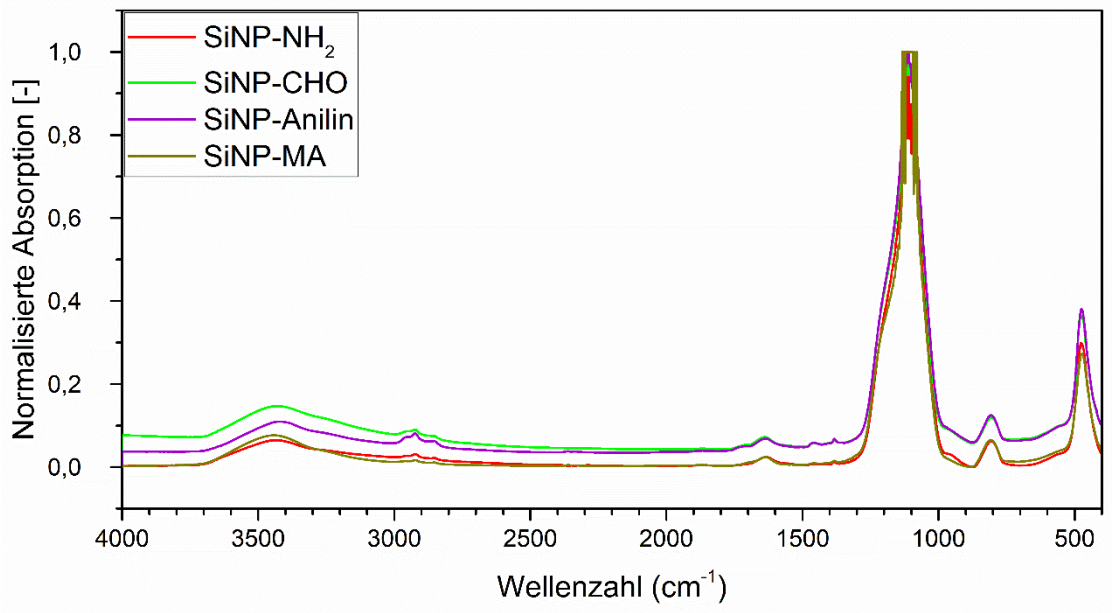
[93] S. Roy, C.K. Dixit, R. Woolley, B.D. MacCraith, R. O'Kennedy, C. McDonagh, Novel multiparametric approach to elucidate the surface amine-silanization reaction profile on fluorescent silica nanoparticles, Langmuir 26 (2010) 18125–18134. https://doi.org/10.1021/la103212d.

8 Anhang

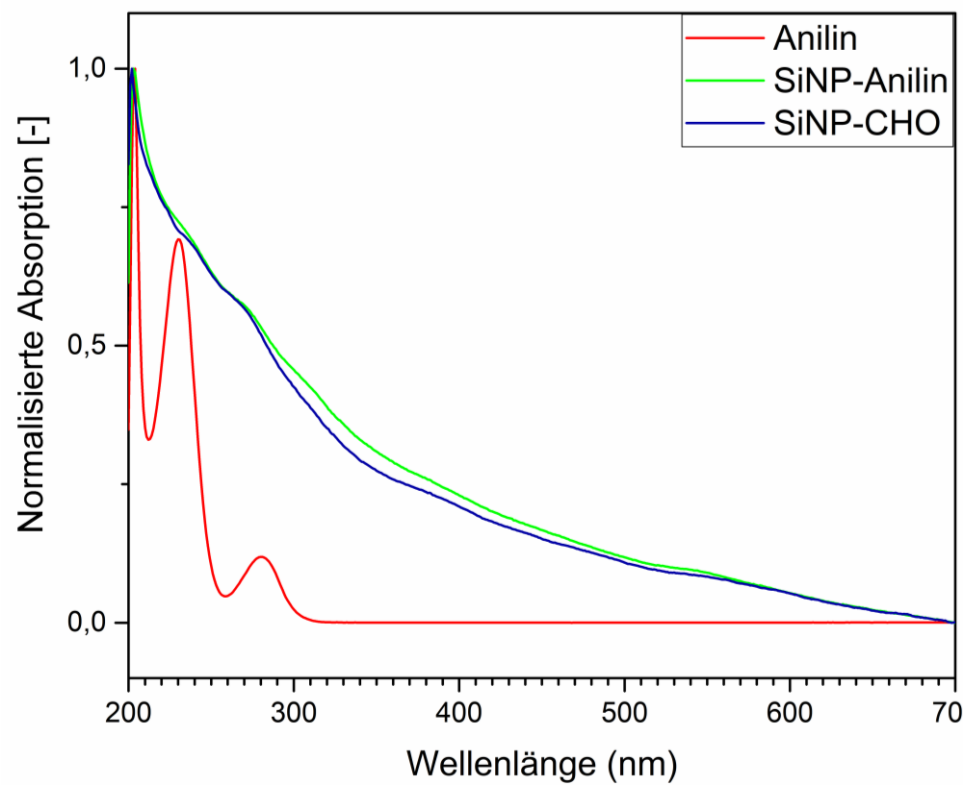
8.1 IR- und Raman-Spektren



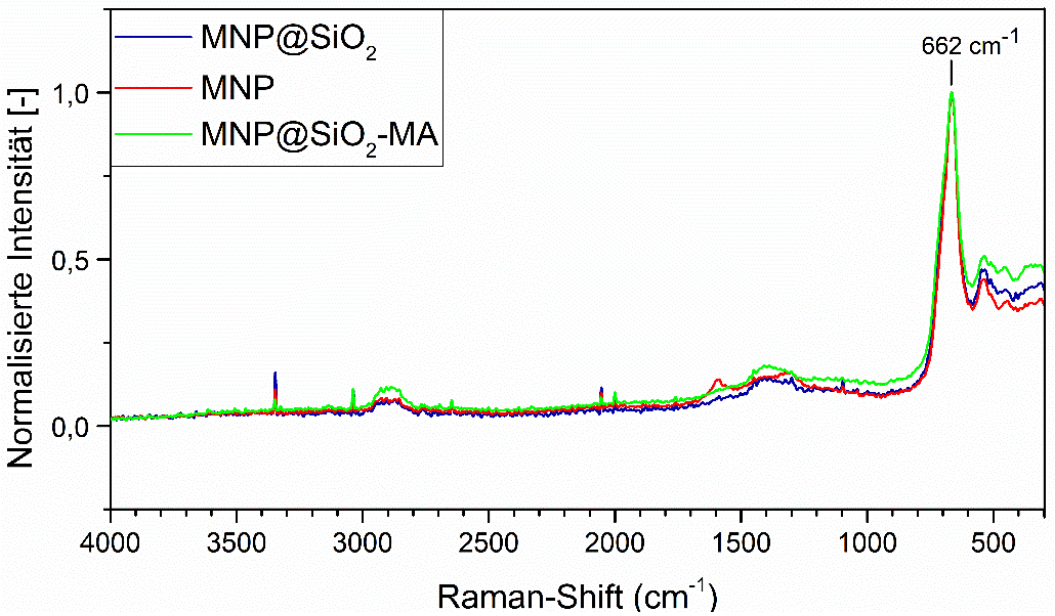
Anhang: Abbildung I: Raman-Spektrum von SiNP-NH2, SiNP-CHO und SiNP-Anilin.
Nach der Reaktion mit Glutaraldehyd nimmt das Rauschen aufgrund der Fluoreszenz stark zu, sodass eine Auswertung der Banden nicht mehr zuverlässig möglich ist. Nach der Kopplung mit Anilin lassen die Störungen überhaupt keine Aussage mehr über die Struktur zu.



Anhang: Abbildung II: IR-Spektren von den einzelnen Reaktionsschritten der Amin-Modifikation, Reaktion mit Glutaraldehyd und Anilin.
Aus dem Vergleich der Spektren ergibt sich, dass die Oberflächenmodifikation nicht sichtbar wird.

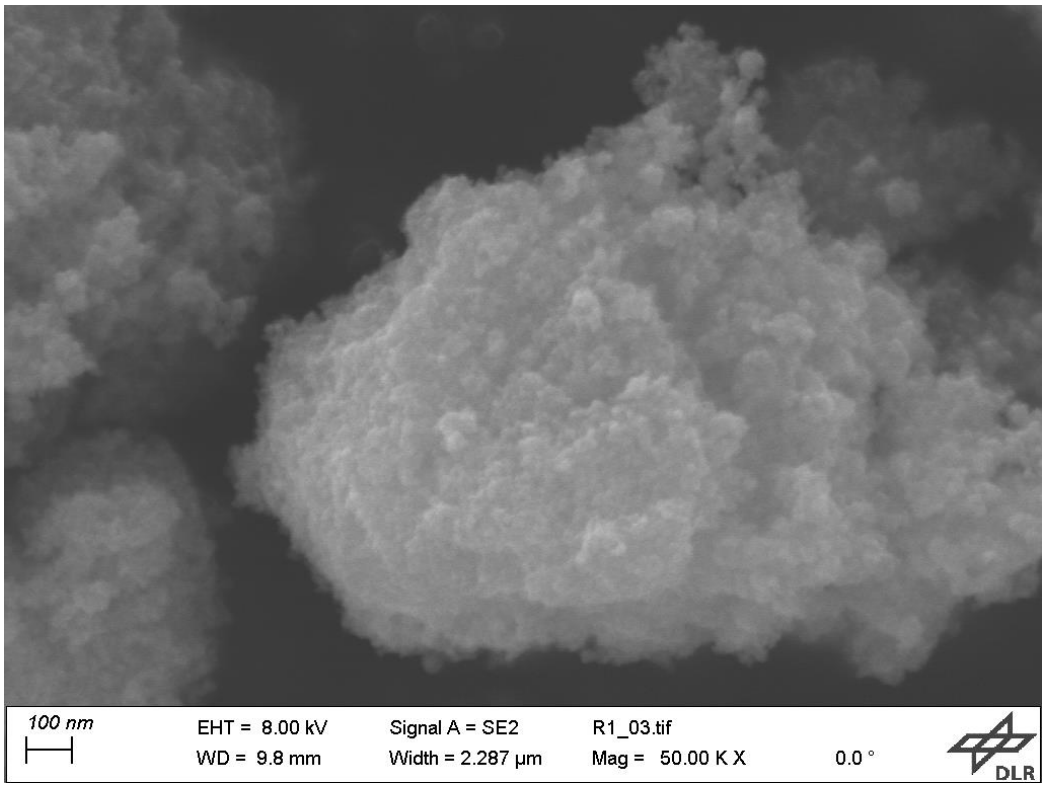


Anhang: Abbildung III: UV-Spektren von Anilin, SiNP-CHO und SiNP-Anilin.
Da die Partikeln mit Glutaraldehyd (SiNP-CHO) schon zwischen 200 und 500 nm das Licht teilweise absorbieren, ist die Absorption von Anilin anschießend nicht mehr sichtbar.

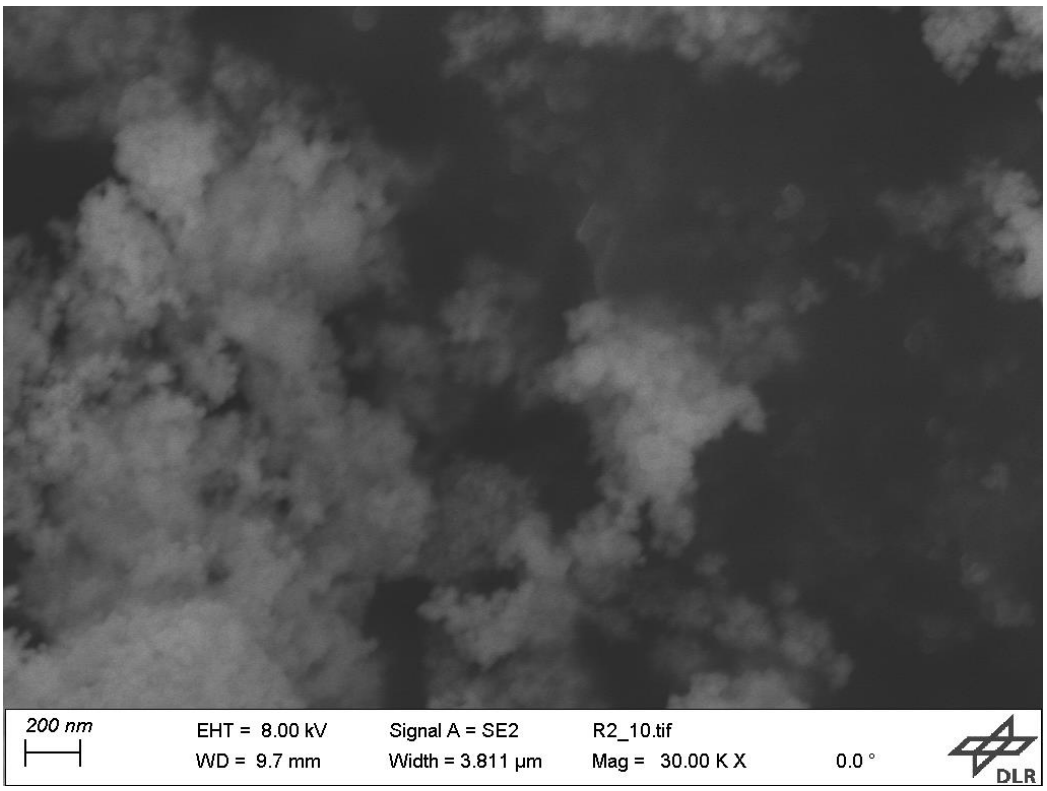


Anhang: Abbildung IV: Raman-Spektrum von MNP und MNP-SiO_2.
Die MNPs (rot) wurden erst mit Silica beschichtet (blau) und anschließend mit γ-MAPS modifiziert (grün). Dabei wird ersichtlich, dass die Spektren sich nicht signifikant voneinander unterscheiden, was aber auch der reduzierten Intensität des Spektrums geschuldet sein kann.

8.2 REM-Bilder

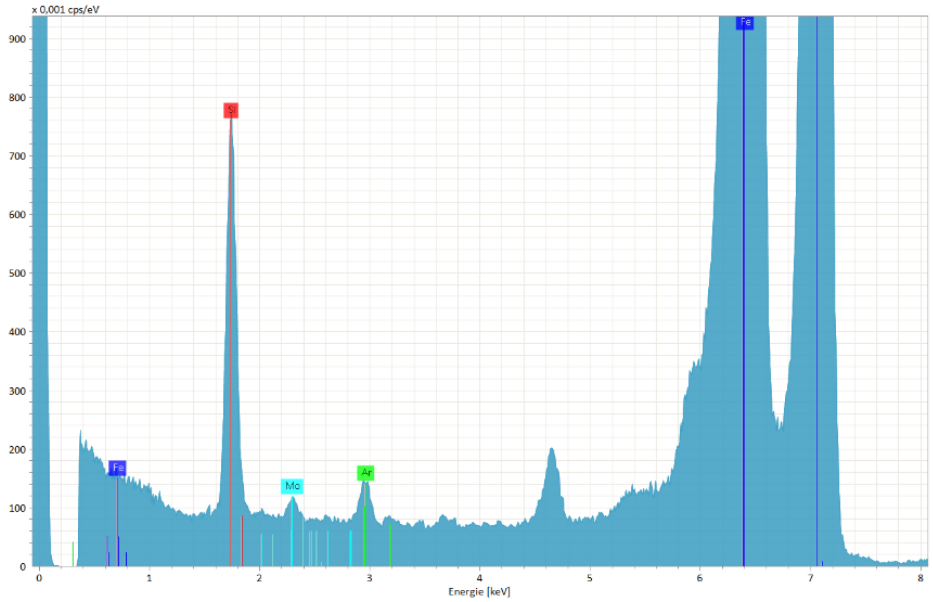


Anhang: Abbildung V: REM-Aufnahme der MNP.



Anhang: Abbildung VI: REM-Aufnahme von MNP-SiO_2.

8.3 Auswertung TXRF



Anhang: Abbildung VII: Elementspektrum der TXRF-Analyse.

Der rot gekennzeichnete Peak kennzeichnet Silizium, die blauen Peaks sind spezifisch für Eisen.

8.4 t-Test

Tabelle 3: Einseitiger t-Test für zwei unabhängige Stichproben zur Feststellung, ob die Schwefelkonzentrationen der Proben signifikant vom Blank abweichen.

	Blank	unmodfizierte SiNP	SiNP-Cys (Michael-Addition)	SiNP-Taurin (Glutaraldehyd)	SiNP-C12 (Thiol-ene)
Schwefelkonzentration [mg/L] bei Emissionslinie 182,034	0,01	0,004	0,09	0,08	0,07
	0,01	0,006	0,09	0,09	0,07
	0,01	0,006	0,09	0,09	0,07
	0,001	0,01	-	-	-
	0,001	0,01	-	-	-
	0,001	0,009	-	-	-
	0,02	-	-	-	-
	0,02	-	-	-	-
	0,02	-	-	-	-
	0,003	-	-	-	-
	0,004	-	-	-	-
		-	-	-	-
Anzahl	11	6	3	3	3
Mittelwert	0,0091	0,0075	0,0900	0,0867	0,07
Standardabweichung	0,0075	0,0023	0,0000	0,0047	0
Varianz	0,000056	0,000005	0,000000	0,000022	0,000000
Teststatistik für Varianzgleichheit		10,72	gegen unendlich	2,53	gegen unendlich
Kritischer Wert		4,03	8,76	8,76	8,76
Varianzvergleich		Varianzheterogenität	Varianzheterogenität	Varianzhomogenität	Varianzheterogenität
t -Wert		0,650030482	35,77	16,74493217	26,9315514
df		12,9	10	12	10
Kritischer t-Wert		1,771	1,812	1,782	1,812
		nicht signifikant	signifikant	signifikant	signifikant

Verwendete Formeln:

Zur Feststellung der Varianzgleichheit: $Teststatistik = \frac{\sigma^2_{Blank}}{\sigma^2_{Probe}}$

Kritischer Wert: Excel-Befehl für Varianzgleichheit: „$F.INV(0{,}95; 11; 6)$“

t-Wert bei Varianzhomogenität: $t = \frac{x_{Probe} - x_{Blank}}{\sqrt{\frac{(n_{Blank}-1)\sigma^2_{Blank}+(n_{Probe}-1)\sigma^2_{Probe}}{n_{Blank}+n_{Probe}-2}} * \sqrt{\frac{1}{n_{Blank}}+\frac{1}{n_{Probe}}}}$

t-Wert bei Varianzheterogenität: $t = \frac{x_{Probe} - x_{Blank}}{\sqrt{\frac{\sigma^2 Blank}{n_{Blank}} + \frac{\sigma^2 Probe}{n_{Probe}}}}$

Freiheitsgrade bei Varianzhomogenität: $df = n_{Blank} + n_{Probe} - 2$

Freiheitsgrade bei Varianzheterogenität: $df = \frac{(\frac{\sigma^2 Blank}{n_{Blank}} + \frac{\sigma^2 Probe}{n_{Probe}})^2}{\frac{1}{n_{Blank}-1} * \left(\frac{\sigma^2 Blank}{n_{Blank}}\right)^2 + \frac{1}{n_{Probe}-1}(\frac{\sigma^2 Probe}{n_{Probe}})^2}$