

Chip-basierter DNA-Nachweis mithilfe metallischer Nanostrukturen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Trophologin Grit Festag
geboren am 21.01.1975 in Jena

Gutachter:

Prof. Dr. Beatrice L. Pool-Zobel
Institut für Ernährungswissenschaften
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Dornburger Straße 24
07743 Jena

Dr. habil. Wolfgang Fritzsche
Institut für Photonische Technologien (IPHT)
Albert-Einstein-Straße 9
07745 Jena

Prof. Dr. Frank F. Bier
Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik
Institutsteil Potsdam
Am Mühlberg 13
14476 Potsdam-Golm

Tag der Doktorprüfung: 31. August 2007

Tag der Öffentlichen Verteidigung: 21. November 2007

*Genius is one per cent inspiration
and ninety-nine per cent perspiration.*

Thomas Alva Edison

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Motivation	1
1.2. Mikroarrays	2
1.2.1. Prinzip und Herstellung von DNA-Mikroarrays	2
1.2.2. Markierung und Detektion von DNA-Mikroarrays	3
1.3. Metallische Nanostrukturen und Signalverstärkung durch Metallabscheidung	4
1.3.1. Metallische Nanopartikel	4
1.3.2. Signalverstärkung durch Metallabscheidung	5
1.4. Biologisches Anwendungsbeispiel: Glutathion-S-Transferase (GST)	7
1.4.1. Funktion	7
1.4.2. GST-Superfamilie	8
1.4.3. Polymorphismen der GST	8
1.5. Problematik und Zielsetzung	9
2. Material und Methoden	11
2.1. Material	11
2.1.1. Geräte	11
2.1.2. Trägermaterialien	11
2.1.3. Chemikalien	11
2.1.4. Biologische Proben	12
2.2. Methoden	14
2.2.1. DNA-Amplifikation	14
2.2.2. Mikroarray-Herstellung	15
2.2.3. Untersuchungen zum Partikelwachstum	24
2.2.4. Charakterisierungsmethoden	24
3. Ergebnisse	29
3.1. Charakterisierung und Optimierung der Oberflächen für Mikroarrays	29
3.1.1. Reinigungs- und Aktivierungsmethoden	29
3.1.2. Einfluss der Silanisierung auf Signalintensitäten	30
3.1.3. Blockierung unspezifischer Bindungen	33
3.2. Charakterisierung des Partikelwachstums	36
3.2.1. Bedeckungsdichte der planaren Oberfläche	37
3.2.2. Einfluss der Verstärkungslösung	37
3.2.3. Spezifität der Verstärkung	41
3.2.4. Einfluss der Ausgangsgröße der Partikel	41
3.2.5. Wachstumslimitierung/Verarmung an Reagenzien	43

3.2.6. Partikelanzahl/Partikelablösung von der Oberfläche	44
3.3. Partikelwachstum im Elektrodenspalt – Leitfähigkeit	45
3.3.1. Metallkatalysierte Silberabscheidung an Goldnanopartikeln	46
3.3.2. Enzymkatalysierte Silberentwicklung	52
3.4. Anwendungsbeispiel: Chip-basierter Nachweis eines Enzym polymorphismus	59
3.4.1. Oligonukleotide als Modellsystem	60
3.4.2. PCR-Produkte aus genomischer DNA	66
3.5. Ergebnisübersicht	69
4. Diskussion	70
4.1. Charakterisierung und Optimierung der Oberflächen für Mikroarrays . .	70
4.1.1. Reinigungs- und Aktivierungsmethoden	70
4.1.2. Einfluss der Silanisierung auf Signalintensitäten	71
4.1.3. Blockierung unspezifischer Bindungen	72
4.2. Charakterisierung des Partikelwachstums	73
4.2.1. Bedeckungsdichte der planaren Oberfläche	73
4.2.2. Einfluss der Verstärkungslösung, Wachstumsverhalten	74
4.2.3. Einfluss der Ausgangsgröße der Partikel	75
4.2.4. Spezifität der Verstärkung	76
4.2.5. Wachstumslimitierung/Verarmung an Reagenzien	77
4.2.6. Partikelanzahl/Partikelablösung von der Oberfläche	78
4.3. Partikelwachstum im Elektrodenspalt – Leitfähigkeit	79
4.3.1. Metallkatalysierte Silberabscheidung an Goldnanopartikeln	79
4.3.2. Enzymkatalysierte Silberentwicklung	82
4.4. Anwendungsbeispiel: Chip-basierter Nachweis eines Enzym polymorphismus	84
4.4.1. Oligonukleotide als Modellsystem	84
4.4.2. PCR-Produkte aus genomischer DNA	87
5. Zusammenfassung und Ausblick	89
A. Verzeichnisse	94
Abkürzungsverzeichnis	94
Abbildungsverzeichnis	97
Tabellenverzeichnis	98
B. Tabellen	99
Literatur	106
Wissenschaftliche Beiträge	116
Danksagung	118
Lebenslauf	119
Selbstständigkeitserklärung	120

1. Einleitung

1.1. Motivation

“The need for effective, population-based screening programs is essential, if we want to make a difference in tackling cancer.” So Dr. Peter Boyle, Direktor der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) der Weltgesundheitsorganisation, in einem Kommentar zur aktuellen europäischen Krebsstatistik im Jahrbuch *Annals of Oncology*. Die WHO verzeichnete 2006 in Europa ca. 3,2 Millionen neue Krebserkrankungen und 1,7 Millionen Krebstote (Ferlay 2007). Trotz besserer Therapien und beginnender Präventionsmaßnahmen stieg die Inzidenz gegenüber 2004 weiter (Boyle and Ferlay 2005). Die Tumorentstehung ist ein langjähriger multifaktorieller Prozess, in dem sich normale Zellen über mehrere Stadien zu Krebszellen entwickeln. Er kann sowohl durch exogene Faktoren (Kanzerogene, Röntgenstrahlung, onkogene Viren, *Lifestyle*-Faktoren) als auch endogene Faktoren (reaktive Sauerstoffspezies, Mutationen) ausgelöst werden. Ein falscher Lebensstil mit Bewegungsmangel, unausgewogener Ernährung und Rauchen trägt als Hauptrisikofaktor stark zur hohen Belastung durch Tumorerkrankungen bei. Ein weiterer wichtiger Faktor sind genetische Dispositionen, die für etwa 5% aller Krebserkrankungen verantwortlich sein sollen (Becker and Wahrendorf 1998). Treten bei genetischen Merkmalen Abweichungen von der Norm bei $>1\%$ der Bevölkerung auf, bezeichnet man sie als Polymorphismen, seltenere Ereignisse abgrenzend dazu als genetische Defekte (Marquardt and Schäfer 1997). Die Identifizierung individueller, für die Krebsentstehung relevanter, genetischer Veränderungen könnte dabei helfen, die Suszeptibilität, d.h. die Empfänglichkeit eines Menschen für eine bestimmte Erkrankung zu bestimmen. Da es sich bei der Kanzerogenese um einen äußerst komplexen, multifaktoriellen Prozess handelt, können viele Regionen im Erbgut (z.B. Gene von DNA-Reparaturenzymen oder Entgiftungsenzymen wie der *Glutathion-S-Transferase*) von Bedeutung sein und die Erfassung mehrerer relevanter DNA-Abschnitte notwendig machen.

Neben der Bestimmung von Suszeptibilitätsmerkmalen sind sequenzspezifische DNA-Nachweismethoden von wachsendem Interesse für die Identifizierung von Organismen, in der Populationsgenetik, der Diagnose von infektiösen Erkrankungen sowie genetisch determinierter Medikamentenunverträglichkeit (*Pharmacogenetics*) (Southern 1996; Niemeyer and Blohm 1999). Die Bestimmung von mRNA-Niveaus in Zellen gilt als Standardmethode für Genexpressionsanalysen.

Darüber hinaus messen Spielbauer and Stahl (2005) neuen Anwendungsfeldern wie Ernährung und Lebensmittel-assoziierten Bereichen große Bedeutung bei. Sie bieten die Möglichkeit, genetisch determinierte, interindividuelle Unterschiede im Stoffwechsel mit nutritiven Faktoren zu korrelieren (*Nutrigenetics*) und nähren dabei die Hoffnung, dass eine individuelle Kost nahrungsabhängige Erkrankungen vermeiden hilft.

Für all diese Anwendungen werden einfache und kostengünstige Verfahren gesucht, die eine schnelle und hochparallele Analyse bestimmter, für die jeweilige Fragestellung relevanter DNA-Sequenzen in großen Teilen der Bevölkerung erlauben. Ein vielversprechender Ansatz, gerade auch für eine Vor-Ort-Analyse außerhalb von Forschungslabors, ist die sogenannte Mikroarray (Biochip) -Technologie.

1.2. Mikroarrays

Die Vorteile von Mikroarrays, d.h. Festphasen-basierten Detektionssystemen, gegenüber konventioneller DNA- (Bio-) Analytik sind dabei die Parallelisierung, Miniaturisierung und Automatisierung, mit denen die Nachweise durchgeführt werden können. Schena et al. (1998) beschreiben das Mikroarray als ein Array von mikroskopischen Elementen auf einem planaren Substrat, welches die spezifische Bindung von Genen oder Genprodukten erlaubt. Als immobilisierte Biomoleküle sind neben DNA (meist Oligonukleotide oder cDNA) auch Peptide (Fodor et al. 1991), Proteine (MacBeath and Schreiber 2000) oder ganze Zellen (Ziauddin and Sabatini 2001; Rozhok et al. 2005) möglich. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist der DNA-Mikroarray (DNA-Chip). Werden die Moleküle als sogenannte *Spots* in einem definierten geometrischen Raster auf der planaren, festen Oberfläche aufgebracht, kann der Chip automatisiert hergestellt und ausgelesen werden. Gleichzeitig bietet sich die Möglichkeit des *Multiplexing*, welches die Untersuchung mehrerer Aspekte in einem Ansatz erlaubt. Die Fängermoleküle sollten dabei auf kleinem Raum aufgebracht werden, um möglichst geringe Volumina an Probenlösung zu verbrauchen.

1.2.1. Prinzip und Herstellung von DNA-Mikroarrays

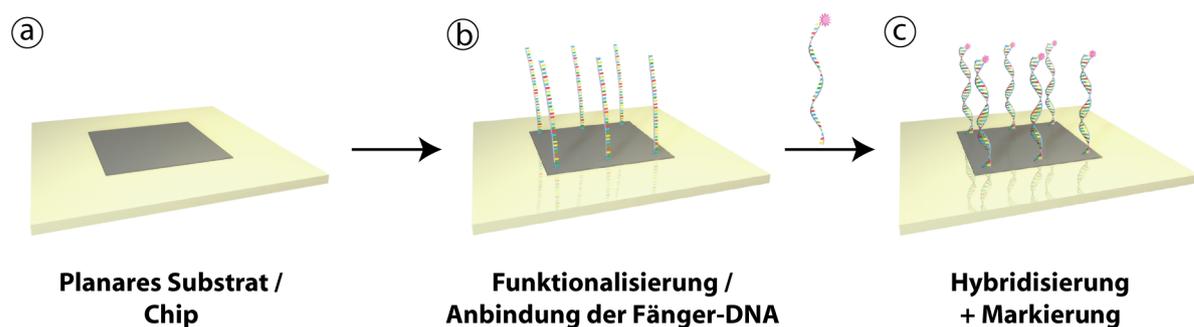


Abb. 1.1: Prinzip und Herstellung eines DNA-Mikroarrays. (a) Die Oberfläche des planaren Substrates wird chemisch modifiziert, um die (b) Immobilisierung verschiedener Fänger-Oligonukleotide bekannter Sequenz zu ermöglichen. Auf den so funktionalisierten Chip wird die zu analysierende Probenlösung (mit Proben- oder Ziel-DNA) aufgebracht und die (c) spezifische Bindung komplementärer Sequenzen (Hybridisierung) ermöglicht. Die zur Detektion notwendige Markierung erfolgt entweder vor der Hybridisierung direkt an der Ziel-DNA oder nach der Hybridisierung durch Markierung der gebildeten Doppelstränge.

Grundlage des Festphasen-basierten (DNA-) Mikroarrays (Schema in Abb. 1.1) ist die Immobilisierung bekannter Biomoleküle, auch Fänger-moleküle genannt. Im Falle des DNA-Chips sind dies meist kurze, einzelsträngige Oligonukleotide bekannter Sequenz. Die zu untersuchende Proben- oder Ziel-DNA enthält Nukleinsäuren (z.B. PCR-Fragment des nachzuweisenden Mikroorganismus oder Gens), welche bei vorhandener Komplementarität der Sequenzen hochspezifisch an die immobilisierten Fänger-moleküle binden (Hybridisierung). Eine eingefügte Markierung ermöglicht die Identifizierung gebundener Ziel-DNA. Bei bekannter Position der einzelnen Fänger-molekül-Sequenzen auf dem Chip kann der Nachweis der Hybridisierung orts aufgelöst erfolgen und daraus die Sequenz der Ziel-moleküle abgeleitet werden (Bier and Fürste 1997; Wang 2000).

DNA-Chips werden im Allgemeinen aus Glas- oder Siliziumträgern gefertigt, welche für die Anbindung der Fänger-DNA chemisch modifiziert werden müssen. Die Funktionalisierung mit den Fänger-molekülen kann dabei durch zwei verschiedene Strategien realisiert werden. Bei der On-Chip-Synthese (*in situ*) werden die Fänger-Oligonukleotide schrittweise aus einzelnen Nukleotiden auf der Oberfläche synthetisiert, wobei u.a. fotolithografische Verfahren wie zur Herstellung von Computerchips oder Siebdruckverfahren (*micro wet printing*) eingesetzt werden (Lipshutz et al. 1999; Ermantraut et al. 1998). Die Methode liefert eine hohe Ausbeute an Fänger-molekülen konsistent über die ganze Oberfläche des Trägers. Kombinatorische Verfahren erlauben die Herstellung hochintegrierter Oligonukleotid-Arrays. Nachteilig sind jedoch die hohen Kosten und die verminderte Flexibilität hinsichtlich wechselnder Sequenzen. Demgegenüber werden beim Offline-Ansatz (*ex situ*) vorsynthetisierte Oligonukleotid-Proben auf den Chip aufgebracht. Die räumlich definierte Anbindung der einzelnen Fänger-moleküle erfolgt mit sogenannten Spotttern, welche das automatisierte und kontrollierte Aufbringen kleinster Flüssigkeitsmengen ermöglichen. Man unterscheidet dabei kontaktfreie Spottverfahren (Piezoelektrisches Spotten, *bubblejet printing*) und Kontaktverfahren (*contact tip deposition printing, micro contact printing*) (Southern et al. 1999; Lorkowski et al. 2000). Die *Ex-situ*-Methode bietet den Vorteil, die Fängerproben vor der Ankopplung an die Oberfläche zu testen und ist darüber hinaus mit gängigen Labormethoden realisierbar. Sie ist außerdem die Methode der Wahl für lange Fänger-molekül-Sequenzen wie PCR-Produkte. Um zuverlässige und quantitative Signale zu erreichen, ist eine kontrollierte und reproduzierbare DNA-Immobilisierung notwendig. Für den postsynthetischen Ansatz der kovalenten Anbindung an die Oberfläche wurden in der Literatur verschiedene Kopplungsstrategien beschrieben, wie z.B. vergleichende Studien von Zammattéo et al. (2000) zeigen. Eine gängige Methode zur chemischen Oberflächenmodifikation ist die selbstorganisierende Anbindung funktioneller Moleküle (z.B. Organosilane).

1.2.2. Markierung und Detektion von DNA-Mikroarrays

Um nach der Hybridisierung die spezifische Bindung komplementärer Sequenzen detektieren zu können, ist das Vorhandensein signalgebender oder reaktiver Moleküle (auch Markierung oder Marker genannt) unbedingt erforderlich. Zum einen kann die Markierung direkt in der Proben-DNA erfolgen, d.h. im Allgemeinen vor der Hybridisierung (Bsp. Einbau von Fluorophoren oder Biotin-Gruppen). Zum anderen kann der gebildete

Komplex zwischen Fänger- und Ziel-DNA nach der Hybridisierung durch markierte Sondenmoleküle indirekt markiert werden (Sandwich-Verfahren) (Skena et al. 1998; Bier and Fürste 1997).

Zur Markierung von Mikroarrays stehen dem Anwender dabei eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Die Markierung mittels radioaktiver Isotope ist trotz ihrer Sensitivität aufgrund der Strahlenbelastung nur Speziallabors vorbehalten. Die Fluoreszenzmarkierung gilt heute als Standardmethode, hat aber neben ihrer hohen Spezifität und Sensitivität auch einige Nachteile. Einerseits können gebundene Fluoreszenzfarbstoffe durch *Bleaching* und *Quenching* an Intensität verlieren. Andererseits ist die Signalstärke abhängig von Umgebungsbedingungen (Boyer et al. 2002; Rosi and Mirkin 2005). Ferner erfordert die Analyse und Quantifizierung fluoreszenzmarkierter Mikroarrays komplexe Algorithmen und kostenintensive Detektionssysteme sowie geschultes Personal. Ihr Einsatz bleibt daher weitgehend auf die Forschung beschränkt. Für eine Vor-Ort-Analyse (*Point-of-care*-Analyse), wie sie z.B. für breit angelegte Screening-Programme oder Prozesskontrollen in der Lebensmittelindustrie benötigt wird, sind daher alternative Markierungs- und Detektionssysteme gefragt.

1.3. Metallische Nanostrukturen und Signalverstärkung durch Metallabscheidung

1.3.1. Metallische Nanopartikel

Goldnanopartikel und andere metallische Nanostrukturen stellen eine solche Alternative dar. Aufgrund ihrer interessanten physikalischen Eigenschaften sind metallische Nanopartikel in der Bioanalytik verbreitet. Ihre Größe ähnelt derjenigen biologischer Makromoleküle wie Proteine und Nukleinsäuren. Die Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen und Nanomaterialien bilden die Grundlage zahlreicher Anwendungen wie der Biosensorik, der Markierung intrazellulärer Prozesse (Bsp. *In-situ*-Hybridisierung), kinetische und Bindungsstudien sowie als Kontrastverstärker in der Bildgebung. Neben ihrer jahrzehntelangen Verwendung in Licht- und Elektronenmikroskopie sind insbesondere Goldnanopartikel von wachsendem Interesse als Marker für biomolekulare Untersuchungen mit optischer (Reichert et al. 2000; Taton et al. 2000, 2001), elektrischer (Möller et al. 2001; Park et al. 2002), elektrochemischer (Dequaire et al. 2000; Authier et al. 2001; Wang et al. 2001) oder gravimetrischer Detektion (Zhou et al. 2000; Patolsky et al. 2000; Weizmann et al. 2001). Die Demonstration von DNA-konjugierten Nanopartikeln war der Ausgangspunkt für eine neue Generation von Nachweistechiken (Mirkin et al. 1996; Alivisatos et al. 1996; Storhoff et al. 2004; Sonnichsen et al. 2005). Neben diesen kolorimetrischen Methoden ermöglichen die ungewöhnlichen, aus der Generierung von Oberflächenplasmonen resultierenden optischen Eigenschaften von Edelmetall-Nanopartikeln u.a. neuartige spektroskopische Verfahren (Stuart et al. 2005). Ferner können DNA-konjugierte metallische Nanopartikel als Komponenten für die Bildung nanostrukturierter Materialien eingesetzt werden (Reiss et al. 2001; Xiao et al. 2002; Niemeyer and Adler 2002; Ding and Seeman 2006; Sharma et al. 2006).

1.3.2. Signalverstärkung durch Metallabscheidung

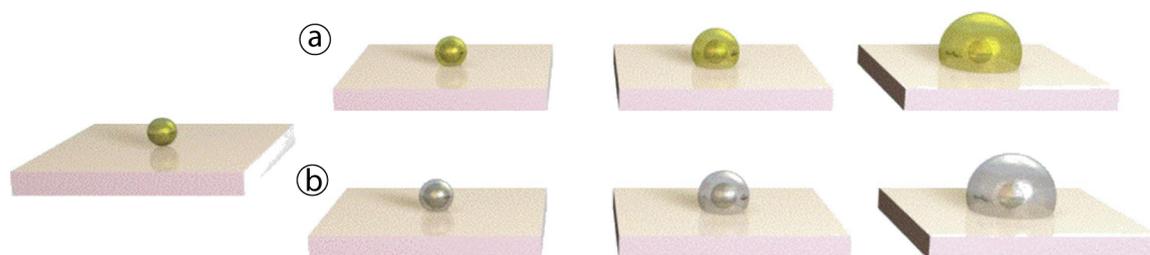


Abb. 1.2: Schema der Metallverstärkung von oberflächengebundenen Goldnanopartikeln. Die immobilisierten Ausgangskeime wachsen infolge einer spezifischen (a) Gold- und (b) Silberabscheidung.

Bedeutung

In vielen dieser Anwendungen führt eine zusätzliche Metallabscheidung (Schema in Abb. 1.2) auf den Nanopartikeln zu einer Signalverstärkung, was zum Begriff der “Metallverstärkung” geführt hat. Obwohl in der Literatur auch Goldnanopartikel-basierte Mikroarrays ohne Silberverstärkung beschrieben wurden (Blab et al. 2006), hat die spezifische Metallabscheidung auf partikulären Metallkeimen eine enorme Bedeutung für zahlreiche Prozesse in molekularer Konstruktion und verschiedenen bioanalytischen Anwendungen. So ist z.B. das Absorptionssignal Nanopartikel-basierter Mikroarrays mit simplen Flachbettscannern detektierbar (Taton et al. 2000). Das Vorhandensein einer metallischen Hülle beeinflusst neben Größe, Gestalt und Abstand von Nanopartikeln maßgeblich deren optische Eigenschaften (Halas 2002; Liz-Marzán 2004, 2006). Überdies kann die Abscheidung einer Silberhülle an Goldpartikeln außerordentlich effektiv zur Verstärkung des Streusignals adsorbierter, Raman-aktiver Moleküle beitragen (Cao et al. 2002). Andere Ansätze nutzen die elektrische Leitfähigkeit dieser Metallabscheidungen aus. Dabei wird auf immobilisierten Nanopartikeln so lange Metall abgeschieden, bis eine geschlossene Metallschicht entsteht, die dann entweder gestreckte Moleküle zu Nanodrähten metallisieren (Richter et al. 2000; Monson and Woolley 2003) oder einen Spalt zwischen zwei Elektroden überbrücken kann (Möller et al. 2001; Park et al. 2002). Da die letztere Methode Grundlage vorliegender Arbeit ist, wird sie nachfolgend näher erläutert.

Elektrische Detektion Die von Möller et al. (2001) beschriebene elektrische Detektion von Mikroarrays basiert auf der Immobilisierung von Fänger-Oligonukleotiden in einem Spalt zwischen zwei Elektroden. Die sich daran anschließende Hybridisierung führt im Fall komplementärer Sequenzen zu DNA-Doppelsträngen. Bei Verwendung direkt Goldnanopartikel-modifizierter Ziel-DNA ist damit gleichzeitig die Markierung der hybridisierten Doppelstränge verbunden. Andererseits kann Biotin-modifizierte Ziel-DNA auch nach erfolgreicher Hybridisierung mit Streptavidin-gekoppelten Goldnanopartikeln

markiert werden. Eine zusätzliche Silberabscheidung auf den im Elektrodenspalt gebundenen Goldnanopartikeln kann – bei genügender Dichte dieser Keime – zur Kontaktierung benachbarter Partikel führen und in der Überbrückung des Elektrodenspalt resultieren. Grundlage des Mikroarrays war ein mit Goldelektroden mikrostrukturierter Si-Chip (ACED, *affinity-based chip with electrical detection*). Die 42, 1 μm -breiten Elektrodenspalte dienten als Messpunkte, die unabhängig voneinander und semiparallel auslesbar waren (Urban et al. 2003). Als Signale wurden die Widerstände über den einzelnen Elektrodenspalten mit einem integrierten Messsystem aus DNA-Chipreader und eingebettetem PC detektiert.

Methoden

Die hier besprochene stromlose reduktive Metallabscheidung beruht auf der Reduktion von Metallionen zu atomarem Metall mithilfe eines Reduktionsmittels. Abhängig von der Art der Katalyse unterscheidet man die metallkatalysierte (autokatalytische) Metallabscheidung, welche direkt an den Nanopartikeln als Reduktionskeim abläuft, sowie die enzymkatalysierte Metallentwicklung.

Metallkatalysierte Metallabscheidung Bei der autokatalytischen Metallabscheidung werden die in der Verstärkungslösung enthaltenen Metallionen (Metallsalz) an Reduktionkeimen reduziert. Dies sind bevorzugt Gold- oder Silberstrukturen, können aber auch andere Metalle (Hg, Zn) oder reduzierende Keime sein (Hacker et al. 1988). Im 19. Jahrhundert wurde die physikalische Entwicklung metallischen Silbers als fotografische Technik etabliert und später zur Anfärbung histologischer Schnitte weiterentwickelt (Liesegang 1911). Dabei bewirkte die Zugabe von Silberionen (Nitrat, Laktat oder Acetat) und einem Reduktionsmittel (z.B. Hydrochinon) zu kolloidalen Goldpartikeln das Wachstum einer metallischen Silberhülle um die Partikel, was zur Signalverstärkung führte (Danscher 1981a,b,c; Skutelsky et al. 1987; Hayat 1989). Der Begriff der “Autometallografie” wurde durch Danscher (1984) eingeführt, der diese Technik zur licht- und elektronenmikroskopischen Visualisierung von Metallen in biologischem Gewebe verbesserte. In jüngerer Vergangenheit wurde die traditionelle Metallverstärkung durch die Nutzung von Gold- statt Silberionen erweitert. Brown et al. (2000a,b) beschrieben das Wachstum von Goldnanopartikeln durch reduktive, NH_2OH -katalysierte Abscheidung von Goldionen auf Goldpartikelkeimen sowohl auf Oberflächen als auch in Lösung.

Um einen optimalen Verstärkungseffekt zu erzielen (Vermeidung von Unter- bzw. Überentwicklung) sowie zur Synthese von Designer-Partikeln mit definierten optischen Eigenschaften ist das Wissen über das Wachstumsverhalten der Nanopartikel genauso notwendig wie die Kenntnis der Eigenschaften verschiedener Metallverstärkungslösungen. Es ist weithin bekannt, dass mit zunehmender Verstärkungszeit die Partikel stetig wachsen und dass höhere Temperaturen diesen Wachstumsprozess beschleunigen (Hacker et al. 1988). Zusätzlich beschrieben theoretische Ansätze das Wachstum von Partikeln auf Elektroden als Funktion experimenteller Parameter wie Zeit, Konzentration der Reaktanten und Größe ihrer Oberfläche sowohl für ein unabhängiges Wachstum benachbarter Partikel als auch für starke Wechselwirkungen zwischen ihnen (Marquez-Perez 2003; Scharifker 1983;

Fransaer and Penner 1999; Penner 2001). Ein breites Verständnis über den Einfluss von Verstärkungslösung, Inkubationsdauer und Größe der Ausgangspartikel fehlt jedoch.

Enzymkatalysierte Metallentwicklung Da die bisher besprochene metallkatalysierte Signalverstärkung auf der Metallabscheidung an vorhandenen Goldnanopartikeln als Reduktionskeimen beruht, können unspezifische Bindungen dieser Partikel – wie sie häufig bei Streptavidin-gekoppelten Goldpartikeln auf Oberflächen auftreten – mit erheblichen Nachteilen verbunden sein. Zudem führen auch vorhandene Elektrodenstrukturen zur unerwünschten Metallabscheidung. Deswegen ist die Entwicklung alternativer Silberabscheidungsmethoden von großem Interesse für oberflächengebundene Nachweissysteme. Hainfeld et al. (2002) entwickelten einen enzymbasierten Ansatz, wie er in der Immunhistochemie zur Bildung färbender, unlöslicher Reaktionsprodukte (Bsp. Diaminobenzidin) üblich ist. Die Autoren fanden heraus, dass Meerrettichperoxidase-konjugierte Sonden in Anwesenheit von Metallionen und aktivierenden Agenzien zu einer selektiven Abscheidung von Metallen am Enzym-Biomolekülkomplex führen. Der schwarze, scharf begrenzte metallische Niederschlag ermöglichte den hoch sensitiven Nachweis von Brustkrebs-Antigenen bei verbesserter Auflösung und sehr geringem Hintergrundsignal. Die Anwendung in der Lichtmikroskopie wurde um den Einsatz in der Elektronenmikroskopie und bei der *In-situ*-Hybridisierung erweitert (Furuya et al. 2004; Tubbs et al. 2004). Der hohe Grad an Sensitivität und Spezifität der enzymatischen Silberentwicklung wurde von Möller et al. (2005) auch für die Markierung von DNA-Chips und den Nachweis eines Einzelbasenaustausches (*single nucleotide polymorphism*) gezeigt. Dabei erfolgte nach Hybridisierung mit Biotin-modifizierten Ziel-Oligonukleotiden die Anbindung einer Meerrettichperoxidase mit nachfolgender enzymkatalysierter Silberentwicklung. Die spezifische Metallabscheidung fand nur an den Enzymmarkern statt und die Entwicklung eines – für die konventionelle Metallverstärkung an metallischen Nanopartikeln typischen – unerwünschten Hintergrundes blieb aus.

1.4. Biologisches Anwendungsbeispiel: Glutathion-S-Transferase (GST)

1.4.1. Funktion

Fremdstoffe können bei Interaktion mit dem Erbgut zu Mutationen führen (Genotoxizität). Mutierte Keimzellen können bei Weitergabe an die nächste Generation so die Ursache für vererbte Schäden, z.B. genetisch bedingte Krebserkrankungen sein. Um einmal in den Körper eingedrungene Schadstoffe aber unschädlich zu machen, existieren im menschlichen Körper zahlreiche Strategien. Die Ausscheidung von Fremdstoffen erfolgt hauptsächlich durch Nieren und Galle und wird durch physikochemische Eigenschaften der Stoffe, vor allem ihre molekulare Masse und ihre Lipophilie begrenzt. Lipophile Stoffe sind nicht oder schwer ausscheidbar, hydrophile Stoffe dagegen leichter eliminierbar. Eine Hauptaufgabe des Fremdstoffmetabolismus besteht darin, schwer ausscheidbare unpolare Stoffe zu leichter ausscheidbaren polaren Stoffen zu metabolisieren.

In der Phase I werden apolare, lipophile Substanzen in polare, hydrophilere Stoffe umgewandelt sowie funktionelle Gruppen eingeführt oder demaskiert. Hierdurch wird es Enzymen der Phase II ermöglicht, die Fremdstoffe mit sehr hydrophilen endogenen Molekülen (Glucuronsäure, Sulfat, Glutathion) zu konjugieren und dadurch in der Regel die Ausscheidung zu erleichtern (Marquardt and Schäfer 1997). *Glutathion-S-Transferasen* (*GSTs*) katalysieren als Phase II-Enzyme die Konjugation des Tripeptids Glutathion an elektrophile Substrate, wodurch in den meisten Fällen ein stabileres, weniger reaktives Intermediat entsteht. Somit wird deren Reaktion mit Nukleinsäuren der Erbsubstanz verhindert. Da die kovalente Bindung von Elektrophilen an die DNA als ein initiiender Schritt der Karzinogenese angesehen wird, kommt den *GSTs* eine krebsvorbeugende Wirkung zu (Treptow-van Lishaut 1998). Darüber hinaus haben einige Isoenzyme auch Glutathionperoxidase-Aktivität, sind am intrazellulären Transport hydrophober Moleküle beteiligt bzw. entfernen toxische Komponenten auch durch nichtkatalytische Bindung (Awasthi et al. 1993).

1.4.2. GST-Superfamilie

Neben membrangebundenen *GSTs* kommen zytosolische *Glutathion-S-Transferasen* vor, die aufgrund ihrer Primärstrukturen in vier Hauptfamilien (*GSTA*, *GSTM*, *GSTP*, *GSTT*) eingeteilt werden können. Eine Klasse kann aus mehreren Unterfamilien zusammengesetzt sein. Außerdem sind insgesamt mindestens 20 Isoenzyme der humanen *GST* bekannt.

1.4.3. Polymorphismen der GST

Häufig auftretende Veränderungen in der DNA-Sequenz bezeichnet man als genetische Polymorphismen, die abhängig von ihrer Lokalisation im Genom positive, neutrale oder negative Auswirkungen auf die Gesundheit haben können. Betreffen sie z.B. katalytisch relevante Regionen in der Sequenz von Enzymen, können solche Enzym polymorphismen die Enzymaktivität beeinflussen. Eine herabgesetzte enzymatische Aktivität der *GST* könnte so ihre Entgiftungskapazität beeinträchtigen. Im Falle kanzerogener Stoffe wird erwartet, dass daraus veränderte Anfälligkeiten für Krebs, im Falle toxischer Substanzen erhöhte Zellschädigungen resultieren.

Als Beispiel soll hier das Isoenzym *GSTM3* betrachtet werden. Ein *GSTM3*-Polymorphismus wurde bei 16% der Europiden gefunden. Für das Allel *GSTM3BB* ist eine 3-Basenpaardeletion (AGG-Deletion) im Intron 6 beschrieben worden. Sie wird assoziiert mit einem erhöhten Risiko für Basalzellkarzinome und Kehlkopfkrebs (Eaton and Bammler 1999; Inskip et al. 1995). Ferner identifizierten Loktionov et al. (2001) das Vorkommen von *GSTM3B* als Risikofaktor für kolorektale Karzinome, vor allem in Kombination mit einem *GSTM1*-Nullgenotyp. Umgekehrt verminderte ein vorhandenes *GSTM3A*- und *M1B*-Allel das Risiko, an Dickdarmkrebs zu erkranken. Durch die Identifizierung solcher Polymorphismen könnte das Risikopotenzial von Patienten für bestimmte, genetisch prädestinierte Krebsarten besser charakterisiert werden. Dies würde in der fernen Zukunft möglicherweise speziell auf das jeweilige Risiko zugeschnittene Vorsorgeuntersuchungen sowie Empfehlungen zu einer präventiven Ernährung erlauben.

1.5. Problematik und Zielsetzung

Um großen Teilen der Bevölkerung solche Tests zu ermöglichen, werden einfache und kostengünstige Verfahren wie DNA-Mikroarrays gesucht. Ihr gewünschter flächendeckender Einsatz als Vor-Ort-Analytik setzt dabei eine einfach zu bedienende, robuste und von Umwelteinflüssen weitgehend unabhängige Nachweismethode voraus. Aufgrund ihrer Vorteile gegenüber Fluoreszenz-basierten Systemen (stabile Signale, einfachere Auslesemöglichkeiten) bieten sich metallische Nanopartikel als alternative Marker an. Das neuartige Verfahren der Chip-basierten elektrischen Detektion mithilfe metallischer Nanostrukturen ist ein vielversprechender Ansatz, erfordert jedoch eine umfangreiche Optimierung, bis es als Standardverfahren auch außerhalb von Labors eingesetzt werden kann. Ziel vorliegender Arbeit ist es, einzelne Prozessschritte eines solchen Mikroarray-basierten Testsystems zu untersuchen, im Hinblick auf reproduzierbare und einfach zu detektierende Signale zu charakterisieren und zu optimieren sowie die Anwendbarkeit des Systems an einem biologisch relevanten Beispiel zu demonstrieren. Im Einzelnen werden dabei folgende Schwerpunkte bearbeitet:

Da der Erfolg Festphasen-basierter Nachweistechiken von der Effizienz der Fängermolekül-Immobilisierung abhängig ist, werden im ersten Teil der Arbeit Mikroarrayoberflächen hinsichtlich ihrer DNA-Bindungsfähigkeit und ihrer Neigung zu unspezifischen Bindungen untersucht. Aus diesem Grund werden

- verschiedene Reinigungs- und Aktivierungsstrategien als Voraussetzung zur Funktionalisierung der Probenträger getestet,
- die Oberflächenmodifizierung durch zwei verschiedene Silane hinsichtlich Signalhomogenität und -stärke charakterisiert,
- verschiedene Passivierungsstrategien untersucht, um die unspezifische Bindung Goldpartikel-markierter DNA-Moleküle zu vermindern.

Der zweite und dritte Teil der Arbeit charakterisiert Goldnanopartikel – insbesondere nach Signalverstärkung durch spezifische Metallabscheidung – als neuartige Marker für Mikroarrays. Um Unter- bzw. Überentwicklung zu vermeiden, d.h. um einen optimalen Verstärkungseffekt zu erzielen, werden im zweiten Teil neben dem Wachstumsverhalten der Nanopartikel die Eigenschaften verschiedener Metallverstärkungen untersucht. Dabei werden im Einzelnen

- verschiedene Metallverstärkungslösungen hinsichtlich ihres Verstärkungseffekts (Ausmaß und Geschwindigkeit, Spezifität) charakterisiert,
- der Einfluss der Partikelgröße zu Beginn der Verstärkung ermittelt sowie
- untersucht, ob verschiedene Inkubationsprozesse (mit oder ohne Zufuhr frischer Lösungen) das Nanopartikelwachstum beeinflussen.

Der dritte Teil der Arbeit adressiert das Wachstum metallischer Nanostrukturen *in situ* auf dem Mikroarray insbesondere im Hinblick auf die Ausbildung detektierbarer Leitfähigkeit. Nach Markierung gebundener Analytmoleküle mit metallischen Nanostrukturen in einem Elektrodenspalt wird

- sowohl das Wachstum von Goldnanopartikel-Markern infolge spezifischer Metallabscheidung als auch
- eine enzymkatalysierte Metallentwicklung als vielversprechende, neuartige Markierungstechnik im Hinblick auf die Ausbildung elektrisch leitfähiger Strukturen charakterisiert sowie
- begleitend zu den experimentellen Untersuchungen das Wachstum der metallischen Strukturen theoretisch simuliert.

Im vierten und letzten Teil der Arbeit wird das untersuchte, auf Markierung mit metallischen Nanostrukturen basierende Testsystem an einem biologisch relevanten Anwendungsbeispiel demonstriert. Am aus der molekularen Ernährungstoxikologie bekannten Entgiftungsenzym *Glutathion-S-Transferase* (*GST*) wird der Chip-basierte Nachweis eines genetischen Polymorphismus (3-Basenpaardeletion im Isoenzym *GSTM3*) mit optischer und elektrischer Detektion gezeigt. Dabei wird

- das Testsystem mit Oligonukleotiden als Modellsystem der zu bestimmenden Analytsequenz etabliert sowie
- in einem *Proof-of-principle*-Ansatz der *GSTM3*-Genotyp von PCR-Produkten aus genomischer Patienten-DNA bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Eine Liste der verwendeten Geräte befindet sich im Anhang B.1.

2.1.2. Trägermaterialien

Als Trägermaterialien (Substrate) für DNA-Mikroarrays wurden Glas oder Silizium genutzt.

Die elektrisch auswertbaren Chips (ACED, *affinity-based chip with electrical detection*, Abb. 2.1 a) wurden aus 4-Zoll-Siliziumwafern ($525 \pm 25 \mu\text{m}$ Dicke) mit einer $1 \mu\text{m}$ -dicken Siliziumoxidschicht gefertigt (SICO Wafer GmbH, Jena). Auf einer 3–5 nm-dicken Titanhaftschiicht wurde eine Schicht von 100 nm Gold mittels fotolithografischer Prozesse mikrostrukturiert. Die $12,7 \times 12,7$ mm-großen Chips verfügen über 42 Elektrodenspalte (Messpunkte) von jeweils $10 \mu\text{m}$ Spaltbreite, welche über am Rand befindliche Kontaktpunkte im sogenannten DNA-Chip-Reader resistiv ausgelesen werden können (Abb. 2.6). Um ein Kurzschließen der Leiterbahnen durch unspezifische Partikelbindung bzw. Metallabscheidung auf der Chipoberfläche zu verhindern, wurde über den Goldstrukturen eine Si_3N_4 -Schutzschicht aufgebracht, welche jedoch durch $200 \times 200 \mu\text{m}$ -große Öffnungen den Zugang zu den Elektrodenspalten weiterhin ermöglichte.

Zur Herstellung optisch auswertbarer Chips dienen Glasobjektträger (Kalk-Natronglas gemäß ISO 8037/1; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe bzw. Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) mit Standardmaß $75 \times 26 \times 1$ mm oder gesägt als $4 \times 26 \times 1$ mm-Streifen. Die mittels Siebdruckverfahren (*screen printing*) hergestellten optisch und elektrisch auslesbaren DNA-Chips (Heraeus Sensor Technology GmbH, Kleinostheim) wurden auf 5×5 cm große Glasstücke gedruckt und anschließend in $12,7 \times 12,7$ mm-große Chips gesägt. Sie waren damit vollständig kompatibel zu den Mikroarray-Herstellungs- und -Auslesetechniken der herkömmlichen mikrostrukturierten ACED. Das Siebdruckverfahren bedingte Elektroden von ca. $50 \mu\text{m}$ Spaltbreite und 200 nm (Platin-) bzw. $12 \mu\text{m}$ Höhe (Goldstrukturen) (Abb. 2.1 b,c).

2.1.3. Chemikalien

Eine Liste der verwendeten Chemikalien befindet sich im Anhang B.2.

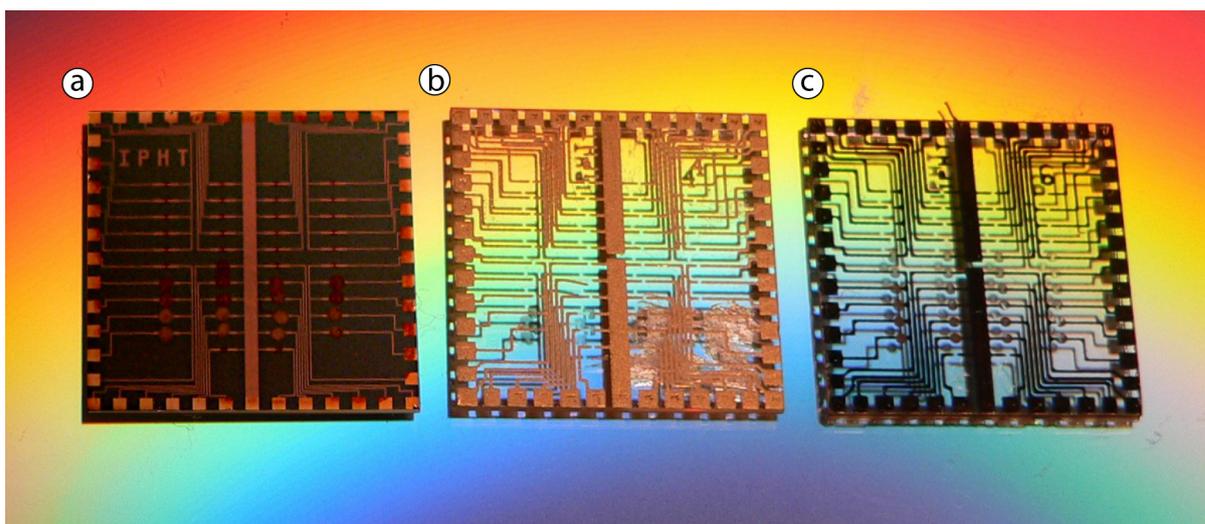


Abb. 2.1: Affinity-based chip with electrical detection (ACED). (a) Mikrostrukturierter Silizium-Chip; (b,c) Glas-Chips mit Siebdruck-Gold- bzw. Platinstrukturen

2.1.4. Biologische Proben

Die Trägermaterialien wurden mit Bindegruppen funktionalisiert, an welche entsprechend modifizierte Fänger-DNA-Moleküle kovalent gebunden wurden (Immobilisierung). Bei den Fängermolekülen handelte es sich um Oligonukleotide bekannter Sequenz. Als nachzuweisende Ziel- oder Proben-DNA dienten zunächst Oligonukleotide als Modellsystem. Anwendungsnah wurden aus genomischer DNA amplifizierte Polynukleotide verwendet.

DNA

In vorliegender Arbeit kamen zwei biologische Systeme zum Einsatz. Zu Beginn wurden bereits erprobte Sequenzen aus dem *Cytomegalie*-Virus verwendet (nachfolgend *NS150*-System genannt). Später dienten Sequenzen des Entgiftungsenzyms *Glutathion-S-Transferase*, Isoenzym M3, als Grundlage (nachfolgend *GSTM3* genannt). Als *Fänger-DNA* wurden dabei einzelsträngige, synthetisch hergestellte Oligonukleotide an die Oberfläche der Festphase gebunden. Als *Ziel-DNA* wurden sowohl Oligonukleotide als auch doppelsträngige PCR-Produkte eingesetzt.

Oligonukleotide Die Oligonukleotide wurden entweder von Jena Bioscience, Jena, oder BioTeZ, Berlin, bezogen. Die Fängersequenzen bestanden aus 23–30 Nukleotiden. Um die Zugänglichkeit der Fänger-DNA bei der Hybridisierung zu verbessern, erhöhten Spacer aus 6 Kohlenstoffatomen ihren Abstand zur Oberfläche. Die Auswahl der einzelnen Sequenzen erfolgte entsprechend ihrer Komplementarität zu den nachzuweisenden Zielmolekülen unter Vermeidung störender Strukturen (Dimere, Haarnadel-Strukturen) mithilfe des Programms *Vector NTI Suite 7.1* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Das Design der benötigten *GST*-Fänger-Sequenzen wurde mit dem Programm *PrimerSelect 5.07* (*Laser-gene*, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) durch Mitarbeiter des Hans-Knöll-Institutes Jena realisiert. Eine Liste aller verwendeten Oligonukleotide findet sich in Tab. 2.1.

PCR-Produkte Zur anwendungsnahen Bestimmung von Polymorphismen im Genom der *GST* wurde genomische DNA aus Patientengewebe durch Mitarbeiter der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Institut für Ernährungswissenschaften, Lehrstuhl Ernährungstoxikologie) isoliert. Als Anwendungsbeispiel wurde ein Polymorphismus des *GSTM3*-Isoenzym ausgewählt. Für das mutierte Allel *GSTM3B* ist eine 3-Basenpaardeletion (AGG-Deletion) im Intron 6 beschrieben worden, welches mit einem erhöhten Risiko für Basalzellkarzinome und Kehlkopfkrebs assoziiert wird (Inskip et al. 1995; Eaton and Bammler 1999). Die in Tab. 2.2 aufgeführten Primersequenzen liefern PCR-Produkte von 273 bp Länge (Wildtyp, *GSTM3*WT*) bzw. 270 bp (Mutante, *GSTM3*mut*) (für Details siehe Abschnitt 2.2.1).

Tab. 2.1: Verwendete DNA-Sequenzen, Anzahl der Nukleotide, Nukleotidsequenz und Modifizierung (*F*=Fluorescein, *B*=Biotin; Mismatches fett gedruckt, Deletionen unterstrichen).

NAME	LÄNGE	SEQUENZ IN 5'-3' RICHTUNG	MOD.
FÄNGER-DNA			
NS150	30 b	TTT TTT CAG CAT GTG CTC CTT GAT TCT ATG	5'-NH ₂
NS153	30 b	TTT TTT CAG CAT TAT CTC CTT GAT TCT ATG	5'-NH ₂
NS150F	30 b	TTT TTT CAG CAT GTG CTC CTT GAT TCT ATG	5'-NH ₂ , 3'-F
NS150B	30 b	TTT TTT CAG CAT GTG CTC CTT GAT TCT ATG	5'-NH ₂ , 3'-B
GSTM3a1	25 b	GGA AGA AGG GAA AAG AAG AGG ATA C	5'-NH ₂
GSTM3a2	28 b	AAG AAG AGG ATA CTT CTC TAT CTC TGC A	5'-NH ₂
GSTM3b	27 b	GGT AGG AAG AAG GGA AAA GAA <u>GAT</u> ACT	5'-NH ₂
GSTP1a	23 b	GCT GCA AAT ACA TCT CCC TCA TC	5'-NH ₂
GSTP1b	23 b	CTG CAA ATA CGT CTC CCT CAT CT	5'-NH ₂
ZIEL-DNA			
S150	30 b	CAT AGA ATC AAG GAG CAC ATG CTG AAA AAA	5'-SH
F150	24 b	CAT AGA ATC AAG GAG CAC ATG CTG	5'-F
B150	30 b	CAT AGA ATC AAG GAG CAC ATG CTG AAA AAA	5'-B
GSTM3A2	28 b	TGC AGA GAT AGA GAA GTA <u>TCC TCT</u> TCT T	5'-B
GSTM3B	27 b	AGT <u>ATC</u> TTC TTT TCC CTT CTT CCT ACC	5'-B
GSTM3A (M3*WT)	273 bp		B-dUTP
GSTM3B (M3*Mut)	270 bp		B-dUTP

PCR-Reagenzien

Die zur Amplifikation relevanter Abschnitte des *GST*-Gens benötigten Reagenzien wurden von den Firmen QIAGEN GmbH, Hilden (PCR-Puffer, dNTP-Mix, Q-Solution), MWG Biotech AG, Ebersberg (Primer) und Genaxxon BioScience, Biberach (Biotin-dUTP, Taq-Polymerase) bezogen.

Proteine

Die enzymatische Silberentwicklung wurde durch die Kopplung des Enzyms Streptavidin-Peroxidase-Polymer (SPP, Sigma-Aldrich, Taufkirchen; 1,1 mg Protein/ml in 0,01 M Natriumchlorid, 50% Glycerol) ermöglicht.

Zur biologischen Passivierung (Blockierung) der Oberflächen gegenüber unspezifischer DNA- und/oder Goldbindung wurde Rinderserumalbumin (BSA, *bovine serum albumin*; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. DNA-Amplifikation

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) dient der Vermehrung definierter DNA-Abschnitte. Nach initialer Trennung der Doppelstränge (Denaturierung) binden die für das gewünschte Amplifikat spezifischen Primer (Tab. 2.2) an ihre komplementären DNA-Sequenzen (Annealing) und werden durch die DNA-Polymerase zu Doppelsträngen vervollständigt (Polymerisation). Die Reaktionsschritte wurden entsprechend den Bedingungen in Tab. 2.3 30-mal wiederholt.

Tab. 2.2: Primersequenzen GSTM3

PRIMER	SEQUENZ 5'–3'
GSTM3F	cct cag tac ttg gaa gag ct
GSTM3R	cac atg aaa gcc ttc agg tt

Tab. 2.3: PCR-Parameter GSTM3

PCR-SCHRITT	TEMPERATUR [°C]	ZEIT [s]
Einmalige Denaturierung	94	180
Denaturierung	94	30
Annealing	58	30
Polymerisation	72	30
Abschließende Polymerisation	72	300
Anzahl der Zyklen	30	

Nach dem Protokoll in Tab. 2.4 wurde abhängig von der Anzahl der zu amplifizierenden Proben zunächst ein x-facher Ansatz eines sogenannten Master-Mixes hergestellt, der alle Reagenzien außer der genomischen DNA enthält. Davon wurden jeweils 49 μ l in ein PCR-Gefäß pipettiert und mit je 1 μ l genomischer DNA versetzt.

Zur Kontrolle wurden die amplifizierten DNA-Proben mittels Gelelektrophorese (100 V, 30 min) in einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt und die Banden nach Ethidiumbromid-Färbung in einem Gel-Dokumentationssystem (*Easy Win 32*, Herolab, Wiesloch) visualisiert.

Tab. 2.4: PCR-Ansatz GSTM3

REAGENZ	VOLUMEN [μL]
ddH ₂ O	21,0
PCR-Puffer [10-fach]	5,0
Q-Solution [5-fach]	10,0
BSA [10 μM]	5,0
dNTP-Mix [10 mM]	1,0
Biotin-16-dUTP [1 mM]	1,0
Primer forw. [10 pmol/ μl]	2,5
Primer rev. [10 pmol/ μl]	2,5
Taq-Polymerase [5 U/ μl]	1,0
Genomische DNA [ng/ μl]	1,0
Gesamtvolumen [μl]	50,0

2.2.2. Mikroarray-Herstellung

Funktionalisierung planarer Oberflächen

Die im Folgenden beschriebenen Reaktionsschritte dienen der Oberflächenmodifizierung von sowohl Silizium- als auch Glassubstraten.

Entlackung Die fotolitografisch aus Wafern gefertigten ACED wurden vor dem Sägen auf ihre Endgröße mit einem Schutzlack überzogen, welcher vor der Oberflächenbehandlung durch 15-minütiges Waschen in Removerlösung und anschließendem Spülen in dH₂O entfernt wurde.

Reinigung und Aktivierung Die Substrate wurden vor der Funktionalisierung einer gründlichen Reinigung unterzogen. Dazu wurden sie jeweils 10 min in Aceton, Ethanol und dH₂O im Ultraschallbad gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Kopplung funktioneller Gruppen war die sogenannte Aktivierung, welche die Anzahl bindungsfähiger OH-Gruppen auf der Chipoberfläche erhöht.

Unstrukturierte Trägermaterialien (Siliziumoxidchips, Glasobjektträger) wurden nasschemisch aktiviert. Dazu wurden die vorgereinigten Substrate 15 min in einer 1:1:1 (V/V/V) Mischung aus konz. HCl/H₂O₂/dH₂O im Ultraschall inkubiert. Nach gründlichem Spülen in dH₂O wurden die Proben zunächst mit Stickstoff und abschließend im Ofen bei 80–100°C für 5 min getrocknet. Strukturierte Substrate wurden durch reaktives O₂-Plasma (Plasma-Ätzen, 5 min bei 50 W und 5 Pa) aktiviert.

Die aktivierten Substrate wurden zügig der oberflächenchemischen Funktionalisierung zugeführt, weil die durch Aktivierung erzeugten freien Bindungsstellen schnell wieder abgesättigt werden (innerhalb einiger Minuten) und somit unter Umständen nicht für eine Kopplung zur Verfügung stehen.

Silanisierung Um eine Anbindung von Biomolekülen zu ermöglichen, wurden die Oberflächen der Substrate mit Organosilanen modifiziert (Silanisierung). Dabei kamen zwei

verschiedene Silane zur Anwendung: 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GOPS) und 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES), welche die Oberflächen mit Epoxy- bzw. Aminogruppen funktionalisierten. Die Aminogruppen der Fänger-DNA konnten direkt an die Epoxygruppen von GOPS binden. Im Gegensatz dazu war eine Kopplung an die Aminogruppen von APTES nur über einen bifunktionalen *cross linker* möglich: p-Phenylendiisothiocyanat (PDC). Die Reaktionsschemen finden sich in Abb. 2.2.

GOPS Die Silanisierung der gereinigten und aktivierten Trägermaterialien erfolgte unter ständigem Rühren für mindestens 6 h bei 70°C in 10 mM GOPS in wasserfreiem Toluol (Lamtüre et al. 1994). Anschließend wurden die Proben jeweils 2 × 5 min in Toluol, Ethanol und dH₂O gewaschen, im Stickstoffstrom getrocknet und konnten direkt für eine Anbindung aminomodifizierter Fänger-DNA verwendet werden.

APTES Die APTES-Silanisierung (Guo et al. 1994) wurde in einer 1%-igen Lösung in Aceton bei 37°C für 1 h (Fluoreszenzmarkierung) bzw. für 2 min in 95% Aceton/dH₂O bei 20°C (AFM-Untersuchungen) durchgeführt. Nach 3×5-minütigem Waschen in Aceton wurden die Substrate für 45 min bei 105°C getrocknet. Für die Kopplung des *cross linkers* wurden die silanisierten Proben 2 h in einer 0,2%-igen PDC-Lösung in 10% Pyridin/Dimethylformamid inkubiert. Die mit Methanol und Aceton jeweils 5 min gewaschenen Proben wurden unter Stickstoff getrocknet und konnten nun zur Anbindung der Fänger-DNA genutzt werden.

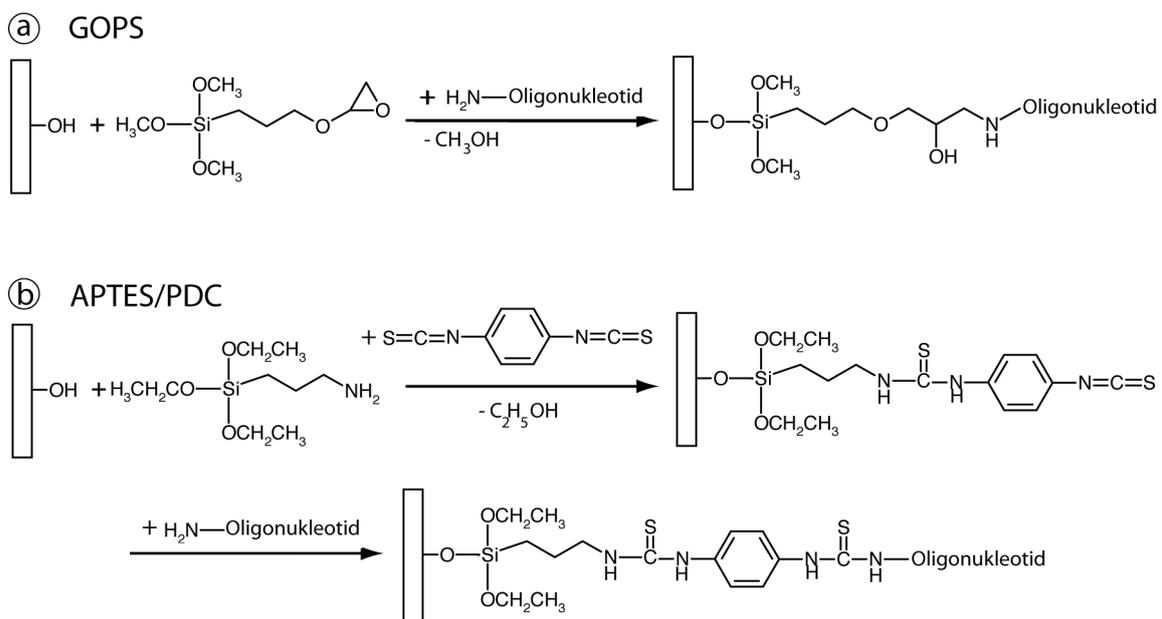


Abb. 2.2: Oberflächenmodifizierung mit Silanen für die Anbindung aminomodifizierter Fänger-DNA. (a) Direkte Kopplung aminomodifizierter DNA an Epoxygruppen von GOPS. (b) Indirekte Anbindung an Aminogruppen von APTES mittels *cross linker* PDC.

Immobilisierung der Fänger-DNA Durch Aufbringen der Fänger-DNA-Lösung in einem geeigneten Puffer konnte eine kovalente Bindung zwischen den Bindegruppen der Oberfläche (Epoxy- und Thiocyanatgruppen von GOPS bzw. APTES/PDC) sowie den endständigen Aminogruppen der Fänger-DNA stattfinden (Abb. 2.2). Die 5'-aminomodifizierten Oligonukleotide (Jena Bioscience, Jena) wurden in 0,1 M KOH pH 12,9 (für GOPS-Oberflächen) bzw. 0,1 M NaHCO₃ pH 8,5 (für APTES/PDC-funktionalisierte Substrate) verdünnt und als Tropfen (*Spots*) appliziert. Dieses sogenannte *Spotting* erfolgte entweder manuell mit einer Pipette oder automatisiert mithilfe eines Gerätes/Spotters. Die gespotteten Trägermaterialien wurden mindestens 3 h, aber meist über Nacht bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Zur Charakterisierung der beiden Silanoberflächen hinsichtlich ihrer DNA-Bindungsfähigkeit wurden verschiedene Konzentrationen (0,5 bis 100 µM) der Oligonukleotidlösungen aufgetragen. In allen weiteren Versuchen wurden 20 µmolare Fänger-DNA-Lösungen verwendet.

Spotting Die Fänger-Oligonukleotidlösungen wurden zunächst manuell gespottet, d.h. als 1 µl-Tropfen pipettiert (Signalintensität und Passivierungsversuche).

Um kleinste Flüssigkeitsmengen und/oder eine größere Anzahl von Trägermaterialien zu spotten bzw. die Spots genau und reproduzierbar zu platzieren, ist hingegen ein elektrisch steuerbarer Spotter unerlässlich. Besonders bei der elektrischen Signalerfassung ist es wichtig, dass die Fänger-DNA genau zwischen den beiden Elektroden immobilisiert wird, da ansonsten trotz guter (optisch sichtbarer) Signale kein Stromfluss gemessen werden kann. Die Platzierung erfolgt dabei nach vorher festgelegten Koordinaten, z.B. der Position der Elektrodenspalte auf dem Chip. Dafür wurden zwei Geräte verwendet: ein Nadelspotter (*SpotBot*TM, ArrayIt, Sunnyvale, CA, USA) sowie ein Piezospotter (*Nano-Plotter 2.2*TM, GeSiM, Großerkmannsdorf). Die Flüssigkeit wird dabei über den Kontakt einer Metallnadel mit der Oberfläche abgesetzt (Abb. 2.3) bzw. über eine feine Glaskapillare auf die Oberfläche "geschossen".

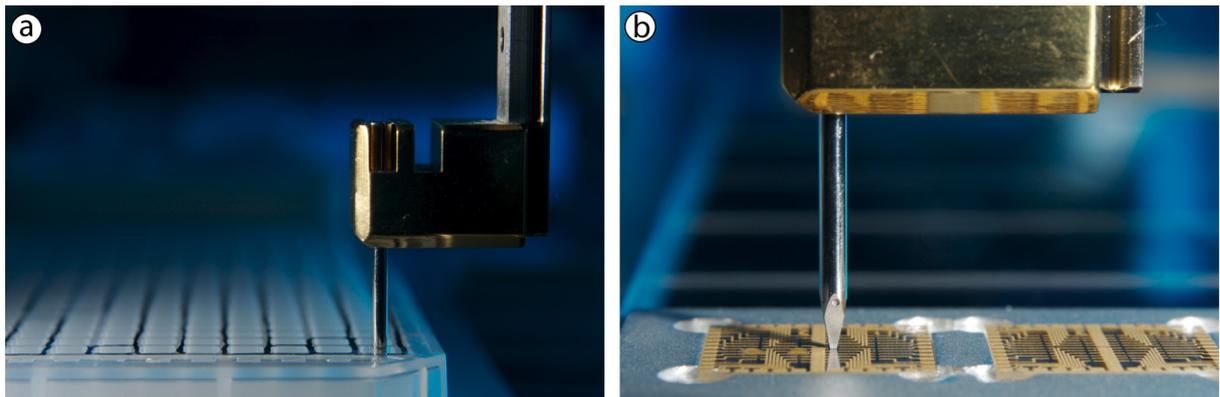


Abb. 2.3: Mikroarray-Spotter unter Nutzung einer Nadel (pin) beim (a) Aufnehmen der DNA-Proben und (b) Aufbringen der Spots auf dem Chip

Die verschiedenen Fänger-Oligonukleotidsequenzen (Tab. 2.1 auf Seite 13) wurden redundant immobilisiert. So konnten bei der Auswertung Mehrfachbestimmungen für statistische Aussagen durchgeführt werden und die Signale eventueller schadhafter Elektroden

bzw. deplatziertes Spots identifiziert werden. Für die ACED kamen zwei Spotschemen zur Anwendung (Abb. 2.4). Dabei wurde jede Probe im Allgemeinen in zwei Doppelreihen (4 Spots in 2 Zeilen) gespottet. Als Positivkontrolle (PK, untere zwei Zeilen in beiden Layouts) wurden direkt Biotin-markierte Oligonukleotide verwendet (*NS150B*), welche unabhängig von einer Hybridisierungsreaktion Signale liefern sollten. Damit konnte die Oberflächenfunktionalisierung der Chips, die Markierung (Anbindung der Streptavidin-Peroxidase) sowie die abschließende Silberentwicklung überprüft werden. Weiterhin wurden vier Doppelreihen nichtkomplementärer Sequenzen (GSTP1a und P1b) als Negativkontrolle (NK) gespottet. Für das Wildtyp-Allel *GSTM3A* wurden im Layout A mit je einer Spotreihe zunächst zwei verschiedene Fängersequenzen getestet (*GSTM3a1* und *a2* in Abb. 2.4 a), wobei sich die Sequenz *GSTM3a2* als die bessere Fängerprobe erwies, da sie spezifischer und sensitiver reagierte. Deswegen wurde sie später allein als Fängersequenz für das Wildtyp-Allel eingesetzt und als Doppelreihe immobilisiert (Layout B, Abb. 2.4 b). Die beiden untersten Elektrodenspalte in der Mitte des Chips blieben jeweils frei von Fänger-DNA und dienten der Charakterisierung des Hintergrundniveaus (unspezifische Signale).

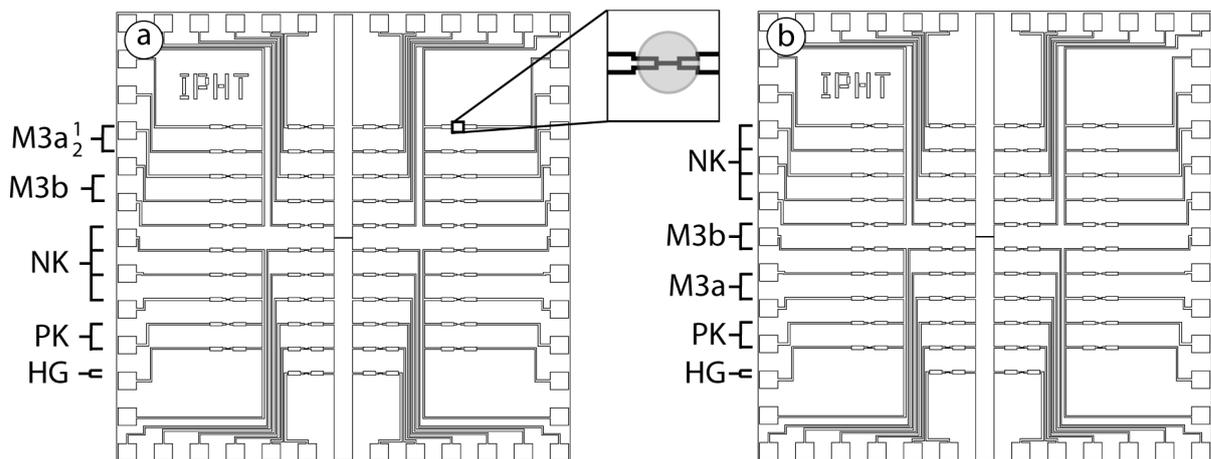


Abb. 2.4: Die verschiedenen Fänger-Oligonukleotidsequenzen wurden auf den ACED in zwei verschiedenen Layouts gespottet: (a) Layout A, (b) Layout B. PK–direkt Biotin-markierte Positivkontrolle; NK–nichtkomplementäre Negativkontrolle; M3a_{1/2}–*GSTM3A* (Wildtyp); M3b–*GSTM3B* (Mutante). Inset: Elektrodenspalte mit schematischem Spot/Signal.

Reinigung und Passivierung Um nicht kovalent gebundene Fänger-moleküle zu entfernen, wurden GOPS-silanisierte Chips nach der Inkubation 5 min in 0,1% Triton X-100, 2×2 min in HCl pH 4, 10 min in 0,1 M KCl und abschließend kurz in dH₂O gewaschen. Eine unerwünschte Anbindung weiterer Biomoleküle an noch vorhandene Bindegruppen der Oberflächen sollte durch Absättigung/Blocken reaktiver Oberflächengruppen verhindert oder zumindest signifikant reduziert werden.

Die für die Bindung von Aminogruppen (Fänger-DNA) modifizierten Substrate wurden entweder mit Ethanolamin (GOPS-Oberflächen) oder mit Ammoniumhydroxid (APTES/PDC-Oberflächen) passiviert. Dazu wurden die Substrate für 15 min in einer 50 mM Ethanolaminlösung mit 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS) in TRIS pH 9 bzw. für 5 min

in 0,1% NH_4OH inkubiert, anschließend kurz in dH_2O gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Zur Passivierung reaktiver Gruppen, die eine unspezifische Goldpartikelbindung hervorrufen könnten, wurden weitere Blockierungsmethoden getestet (Wirtz et al. 2003). Dazu wurden die Trägermaterialien für 1 h mit 10 mM 6-Mercapto-1-hexanol und/oder bis zu 2 h in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) pH 7,4 mit 0,1 bis 3% BSA behandelt. Die passivierten Substrate wurden anschließend jeweils 5 min in PBS + 0,05% Tween 20 und dH_2O gewaschen und unter Stickstoff getrocknet.

Funktionalisierung von Goldnanopartikeln

Goldpartikel können genau wie planare Oberflächen mit Biomolekülen funktionalisiert werden. Hierbei wird die Affinität von Thiolen zu Gold ausgenutzt und die kolloidale Goldlösung mit thiolmodifizierten Oligonukleotiden konjugiert. Die resultierenden DNA-Nanopartikel-Komplexe wurden als Sonden (bereits markierte Ziel-DNA) bei der Hybridisierung mit Fänger-DNA eingesetzt, die zuvor auf planaren Oberflächen immobilisiert worden waren.

Aufreinigung der Thiol-Oligonukleotide Für ihre Verwendung zur Nanopartikelfunktionalisierung mussten die 5'-thiolmodifizierten Oligonukleotidlösungen (Jena Bioscience, Jena) entsalzt und vom stabilisierenden Zusatz Dithiothreitol (DTT) befreit werden, da schon geringe Salzmengen zur Destabilisierung der kolloidalen Lösungen führen können bzw. DTT als Dithiol mit den thiolierten Oligonukleotiden um Bindungsplätze konkurrieren würde. Dazu wurden die Lösungen über NAP-10-Säulen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgetrennt. Da Thiole sehr leicht mit Sauerstoff reagieren, wurden die aufgereinigten Fraktionen mit Argon entgast und sofort weiterverwendet bzw. eingefroren.

Herstellung der DNA-Nanopartikel-Komplexe Die Konjugation von Goldnanopartikeln mit thiolmodifizierten Oligonukleotiden (*S150*, Sequenz siehe Tab. 2.1) erfolgte nach Protokollen aus der Literatur (Storhoff et al. 1998; Csaki et al. 2001). Dazu wurden die aufgereinigten Thiol-Oligonukleotide in 6-fachem Überschuss zur Goldkolloidlösung gegeben. Nach 18-stündiger Inkubation bei 20°C wurde die Lösung stufenweise und unter ständigem Mischen auf 0,1 M Natriumchlorid in 0,01 M Natriumphosphatpuffer eingestellt. Nach einer weiteren Inkubation für 48 h bei 20°C erfolgte eine Aufreinigung der ligandierten Komplexe durch mehrmaliges Waschen mit 0,1 M Natriumchlorid/0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 7. Dafür wurden die Lösungen zentrifugiert und das ölige Pellet schrittweise in frischem Puffer resuspendiert. Die zur Partikelseparation benötigten Zentrifugalbedingungen waren abhängig von der Nanopartikelgröße (Csaki 2003). 30 nm-große Goldpartikel wurden entsprechend 8 min bei ca. $6000\times g$ zentrifugiert. Bei erfolgreicher Modifizierung konnten die gereinigten DNA-Goldnanopartikel-Komplexe entweder mehrere Monate bei 20°C , einige Jahre bei 5°C (Letsinger et al. 2000) oder 1:1 (V/V) in Glycerol bei -20°C gelagert werden (Cai et al. 2002). Durch das nach dem Einfrieren notwendige zusätzliche Waschen (2-mal in 0,1 M Natriumchlorid in 0,01 M Natriumphosphatpuffer) wurde die Ausbeute an DNA-Nanopartikel-Komplexen jedoch weiter reduziert.

Hybridisierung

Die Auswahl der anzuwendenden Hybridisierungstemperatur erfolgte anhand der Schmelztemperatur (T_m) der zu hybridisierenden Sequenzabschnitte. Als Ausgangspunkt diente die vom Hersteller der Oligonukleotide mitgelieferte T_m für Hybridisierungen in Lösung. Diese T_m ist in erster Linie von der Länge der Sequenz sowie dem Gehalt an Guanin und Cytosin abhängig. Da sich die negativ geladenen DNA-Stränge abstoßen, begünstigen monovalente Kationen durch Ladungsabschirmung die DNA-Duplexbildung. Folglich müssen neben Länge und Basenzusammensetzung des Doppelstranges auch die im Hybridisierungspuffer vorherrschenden Salzkonzentrationen berücksichtigt werden. Die Einbeziehung dieser und der verwendeten DNA-Konzentrationen erfolgte mit dem Programm *Vector NTI Suite 7.1* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), welches darüber hinaus zusätzlich thermodynamische Aspekte berücksichtigte. Da bei Festphasen-basierter Hybridisierung die Duplexbildung sterisch behindert wird, wurde diese Temperatur für eine Hybridisierung auf dem Chip nach der empirischen Formel von Fotin et al. (1998) (Gl. 2.1) weiter angepasst. Durch Testversuche mit davon abweichenden Temperaturen wurde die Hybridisierungstemperatur hinsichtlich Spezifität und Selektivität für die spezielle Anwendung optimiert.

$$T_{\text{Chip}} [^{\circ}\text{C}] = 1,2 \times T_m [^{\circ}\text{C}] - 27,8^{\circ}\text{C} \quad (2.1)$$

Die Hybridisierung erfolgte im Hybridisierungs-ofen unter Bewegung entweder als Tropfeninkubation in einer Feuchtkammer (Petrischale mit feuchtem Tuch) oder in einer speziell für die verwendeten Chips entwickelten Hybridisierungskammer (Kretschmer 2002). Die Hybridisierungslösung mit der zu analysierenden DNA-Probe wurde als Tropfen von $80 \mu\text{l}$ (Feuchtkammer) bzw. $65 \mu\text{l}$ (Hybridisierungskammer) auf den jeweiligen Chip pipettiert. Die Petrischale wurde mittels Parafilm weitgehend abgedichtet, wobei es bei höherer Temperatur über längere Zeiträume (über Nacht) häufig dennoch zum Austrocknen der Feuchtkammer und damit zum Eintrocknen der Hybridisierungslösung auf dem Chip kam. Aus diesem Grund wurde die Inkubation in der Hybridisierungskammer bevorzugt, welche durch Verschließen des Deckels ein Eintrocknen der Lösung verhinderte. Die Kammer bot Platz für vier ACED, die gleichzeitig hybridisiert werden konnten. Nach einer Inkubation von 3–22 h (Oligonukleotide bzw. längere PCR-Produkte) wurden die Substrate in Puffern absteigender Salzkonzentration, d.h. steigender Stringenz gewaschen, um unspezifisch gebundene Ziel-DNA zu entfernen. Biotin- und fluoreszenzmarkierte Proben wurden dabei jeweils 5–10 min in $2 \times \text{SSC} + 0,2\% \text{SDS}$, $2 \times \text{SSC}$ sowie $0,2 \times \text{SSC}$ inkubiert. Aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber erhöhten Salzkonzentrationen wurden Goldnanopartikel-markierte Proben dreimal 5 min in $0,1 \text{M}$ Natriumchlorid/ $0,01 \text{M}$ Natriumphosphatpuffer pH 7 gewaschen. Nach dem mehrstufigen Waschprozess wurden die Substrate im Stickstoffstrom getrocknet und zügig weiterbehandelt.

Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide Die fluoreszenz- oder Biotinmarkierte Ziel-DNA wurde in $2\text{--}5 \times \text{SSC} + 0,1\% \text{SDS}$ aufgenommen und in verschiedenen Konzentrationen auf den Chip pipettiert: $0,002\text{--}2 \mu\text{M}$ fluoreszenzmarkierte Probe bzw. $0,5 \times 10^{-12}$ bis $1 \times 10^{-6} \text{M}$ Biotin-markierte Probe bei *GST*-Versuchen.

DNA-Nanopartikel-Komplexe Insbesondere Konjugate größerer Nanopartikel (Durchmesser >30 nm) reagieren sehr sensibel auf höhere Temperaturen, erhöhte Salzkonzentrationen und Puffer mit Thiol-haltigen Substanzen (Li et al. 2002). Deswegen wurde in einem Puffer mit 0,1 M Natriumchlorid/0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 7 hybridisiert.

Hybridisierung doppelsträngiger Polynukleotide Die biotinylierten PCR-Produkte wurden auf Konzentrationen von $0,5\text{--}2\ \mu\text{M}$ im Hybridisierungspuffer ($2,5\text{--}3 \times \text{SSC} + 0,1\%$ SDS) verdünnt. Um die beiden Doppelstränge zu trennen und damit eine Hybridisierung zu ermöglichen, wurden die Lösungen 5 min bei 95°C denaturiert, anschließend 2 min auf Eis gelagert und sofort auf den Chip pipettiert.

Markierung hybridisierter DNA-Komplexe

Während bei der Verwendung von fluoreszenzmarkierter Ziel-DNA bzw. von DNA-Goldnanopartikel-Komplexen die Markierung, also die Anbindung detektierbarer Signalgeber gleichzeitig mit der Hybridisierung erfolgte, war beim Einsatz biotinylierter Proben-DNA ein zusätzlicher Schritt zur Markierung der gebundenen DNA-Doppelstränge notwendig (Abb. 2.5). Grundlage hierfür war die spezifische Streptavidin-Biotin-Bindung, die mit einer Bindungskonstante von $K=10^{15}\ \text{M}^{-1}$ zu einer der stärksten Affinitätsbindungen zählt. Dabei wurden entweder direkt Streptavidin-modifizierte Goldnanopartikel (SGNP) gekoppelt oder ein Streptavidin-Peroxidase-Polymer angebunden (SPP), welches als Katalysator einer sich anschließenden Metallabscheidungsreaktion fungierte.

Anbindung von Streptavidin-Goldnanopartikeln In Abhängigkeit von der Nanopartikelgröße (und damit ihrer Konzentration in der Stammlösung) sowie ihrer gewünschten Dichte auf der Oberfläche wurde die SGNP-Stammlösung 1:10–1:100 in PBS pH 7,4 + 0,1% BSA verdünnt. Die Lösung wurde als Tropfen auf dem Chip für 1 h bei 20°C in einer Feuchtkammer inkubiert, anschließend 5 min in PBS pH 7,4 gewaschen und getrocknet. Für eine rasterkraftmikroskopische Auswertung wurde abschließend zusätzlich 1 min in ddH_2O gewaschen. Die markierten Substrate wurden staubfrei bei 20°C gelagert.

Anbindung von Streptavidin-Peroxidase-Polymer Die Anbindung der Streptavidin-modifizierten Meerrettichperoxidase fand als 1:1000-Verdünnung in PBS pH 7,4 + 0,02% Tween 20 (Endkonzentration $1\ \mu\text{g}$ Protein/ml) ebenfalls für 1 h bei 20°C in einer Feuchtkammer statt. Daran schloss sich ein intensiver Waschprozess über 6×5 min in PBS pH 7,4 + 0,02% Tween 20 an. Um bei der sich anschließenden Silberabscheidungsreaktion ein Ausfällen von Silberchlorid infolge der im PBS enthaltenen Chloridionen zu vermeiden, wurden die Substrate kurz mit ddH_2O gespült und 1 min darin gewaschen.

Metallverstärkung

Da durch eine (spezifische) zusätzliche Metallabscheidung eine Signalverstärkung erreicht werden kann, spricht man auch von "Metallverstärkung". Diese stromlose Abscheidungsreaktion erfolgt hier durch Reduktion von Metallionen aus einer Metallsalzlösung an vorhandenen Reduktionskeimen. Die Reduktion kann entweder durch Metalle (Au, Ag)

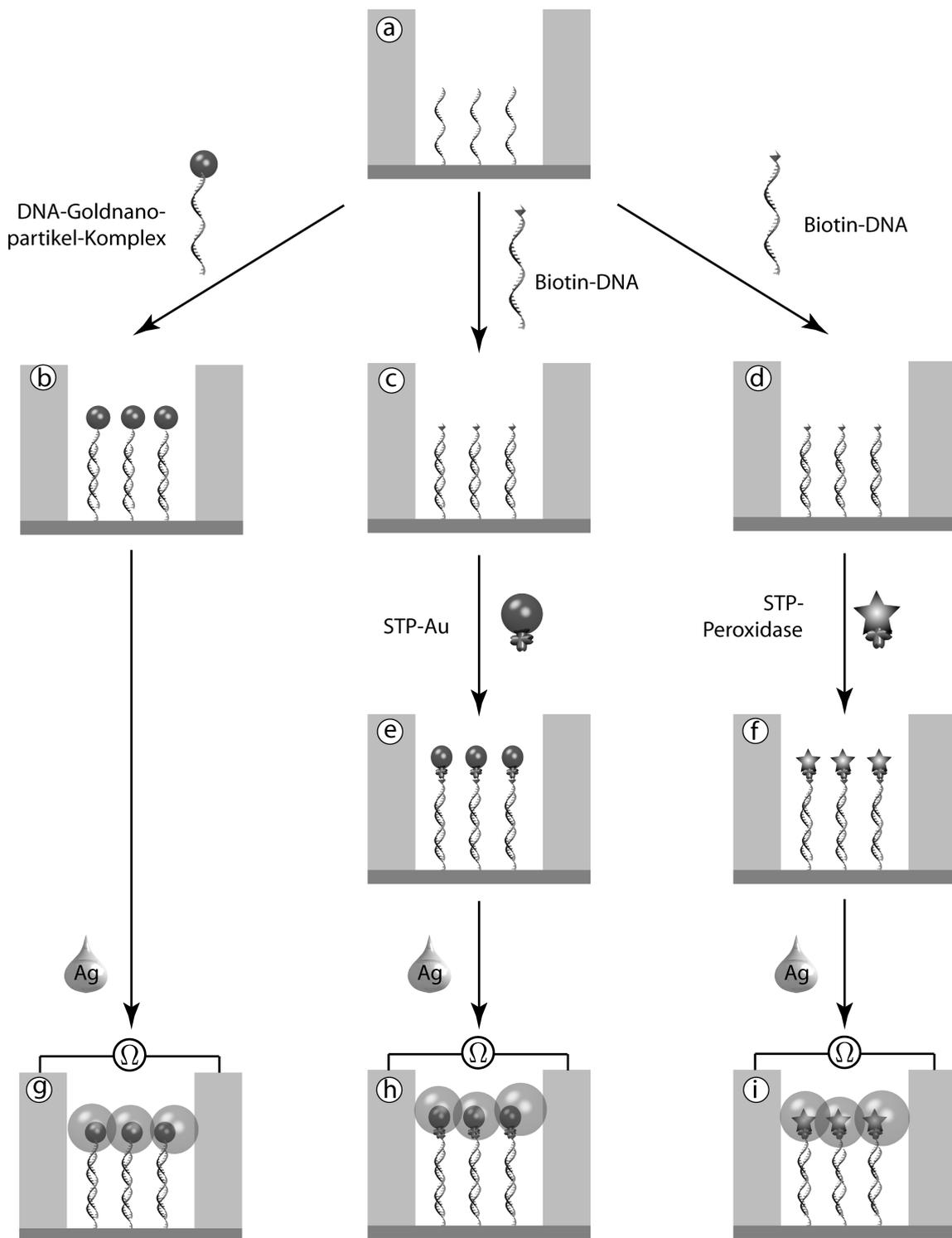


Abb. 2.5: Schema der Markierungsmöglichkeiten mit metallischen Nanostrukturen. (a) Immobilisierung der Fänger-DNA im Elektrodenspalt. (b) Direkte Hybridisierung mit DNA-Goldnanopartikel-Komplexen, (c, d) Hybridisierung mit biotinylierter DNA und nachfolgende Anbindung von (e) Streptavidin-Goldnanopartikeln bzw. (f) Streptavidin-Peroxidase-Polymer. (g) Abschließende Silberverstärkung der gebundenen Marker, die zu einer leitfähigen Brücke führt.

oder enzymatisch katalysiert werden. Da die Reaktion durch Halogenide gestört werden kann, mussten die Trägermaterialien vor der Behandlung gründlich mit dH_2O gespült werden.

Metallkatalysierte Metallabscheidung Zur Metallverstärkung werden zwei Komponenten benötigt: Metallsalz und Reduktionsmittel. Es wurden sowohl kommerzielle Silberverstärkungskits (Sigma-Aldrich, BBIInternational und Aurion) als auch selbst hergestellte Lösungen (Silberacetat/Hydrochinon, Silbernitrat/Hydrochinon, Tetrachlorogoldsäure/Hydroxylamin) verwendet, die im Folgenden als *Sigma*, *BBI*, *Aurion*, AgAc , AgNO_3 bzw. HAuCl_4 abgekürzt werden. Die angewandten Verstärkungen, ihre Zusammensetzung und Quelle finden sich im Anhang in Tab. B.3. Als Metallsalze waren Silberacetat und -nitrat, als Reduktionsmittel war Hydrochinon vorherrschend. Außer den Silberverstärkungen wurde Tetrachlorogoldsäure mit Hydroxylamin als Reduktionsmittel untersucht. Die fertigen Mischungen neigen zur Autonukleation und wurden deshalb direkt vor der jeweiligen Behandlung gemischt. Außerdem fand die Reaktion unter Lichtausschluss statt, um fotosensitive Autonukleation zu vermeiden. Die Verstärkung erfolgte als Tropfeninkubation auf dem Chip. Die Substrate (und damit die Flüssigkeit) wurden dabei kontinuierlich bewegt, um eine optimale Durchmischung zu erreichen und lokaler Depletion an Reagenzien vorzubeugen. Um eine quasi-kontinuierliche Reagenzzufuhr zu gewährleisten, wurde die Verstärkung im Allgemeinen in 2 min-Schritten durchgeführt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Substrate gründlich mit dH_2O gespült. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom war eine erneute Verstärkung mit frischen Lösungen möglich.

Enzymkatalysierte Silberabscheidung Weil der Nanopartikel-basierte Nachweis trotz Passivierung oft durch unspezifische Partikelabscheidung auf der Oberfläche bzw. nachfolgende unspezifische Metallabscheidung beeinträchtigt wird, kam auch ein neuartiger Enzym-basierter Ansatz zur Anwendung (Möller et al. 2005). Hierbei erfolgte die Metallabscheidung hochspezifisch an den gebundenen Enzymmolekülen (Streptavidin-Peroxidase-Polymer, SPP) ohne Entwicklung eines störenden Hintergrundsignals, das typisch für die konventionelle Verstärkung wachsender Nanopartikel ist. Die Metallabscheidung wird dabei durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase katalysiert (Hainfeld et al. 2002; Furuya et al. 2004). Zur Entwicklung metallischer Nanostrukturen wurden die mit SPP-markierten Substrate mit dem kommerziellen Verstärkungskit *EnzMetTM ultrasensitive* (Nanoprobes Inc., Yaphank, NY, USA) behandelt, wobei vom Hersteller keinerlei Angaben über die Inhaltsstoffe vorlagen. Alle drei Komponenten des Kits waren in gleichen Volumenanteilen aufzubringen. Nachdem die Trägermaterialien durch Waschen in dH_2O von Salzen befreit und kurz trocken geblasen worden waren, wurde Lösung A auf den Chip pipettiert und für 4 min vorinkubiert. Danach wurde eine Mischung aus Lösung B + C in gleichen Volumenverhältnissen dazugegeben und vorsichtig auf dem Chip gemischt. Nach ausreichender Silberabscheidung bzw. spätestens nach 5 min wurde die Reaktion durch gründliches Spülen in dH_2O gestoppt und die Proben getrocknet. Da Trocknung zur Verminderung der Enzymaktivität führt, war eine weitere Verstärkung der Signale nur durch metallkatalysierte Silberabscheidung auf den gebildeten Silberkeimen möglich.

2.2.3. Untersuchungen zum Partikelwachstum

Substratvorbereitung

Um das Wachstum metallischer Nanostrukturen auf Oberflächen zu untersuchen, wurden Goldnanopartikel unspezifisch auf planaren Siliziumoxid-Substraten immobilisiert. Eventuell vorhandene Verunreinigungen können zu unspezifischer Metallabscheidung auf der Oberfläche führen. Außerdem stören Rauigkeiten die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen z.T. empfindlich. Deswegen wurden die Chips zunächst je 10 min in Aceton, Ethanol und ddH₂O im Ultraschall vorgereinigt und verbleibende organische Verunreinigungen im O₂-Plasma (50 W, 5 Pa, 2×6 min) entfernt. Danach wurde ein Tropfen (35 µl) der kolloidalen Lösung auf einem 7×7 mm-Chip über Nacht bei 20°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einer Feuchtkammer, um ein Eintrocknen des Tropfens zu vermeiden. Zur Beendigung der Immobilisierung und zur Vermeidung von Salzresten auf der Oberfläche wurden die Chips 2×2 min unter Bewegung in ddH₂O gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

Metallverstärkung

Hier kamen die in Abschnitt *Metallkatalysierte Metallverstärkung* beschriebenen Methoden zum Einsatz. Die beiden Komponenten (Metallsalz/Reduktionsmittel) jedes Verstärkungskits (Tab. B.3) wurden direkt vor dem Aufbringen auf den Chip gemischt (35 µl-Tropfen je 7×7 mm-Chip). Für die quasi-kontinuierliche Verstärkung wurden kurze Intervalle von 2 min mit jeweiligem Austausch der Lösungen angewandt. Um eine drohende Verarmung an Metallsalz und/oder Reduktionsmittel nachzuweisen, wurden längere Verstärkungsintervalle von 5 min bis zu 20 min gewählt. Die Verstärkung wurde durch 2×2-minütiges Waschen in ddH₂O gestoppt und die Substrate im Stickstoffstrom trocken geblasen.

Quantitative Analyse der Silberablagerungen

Um die im AFM gemessene Partikelhöhe und -anzahl und den daraus errechneten theoretischen Verbrauch an Metallionen zu verifizieren, wurde die Menge an abgelagertem Silber am Beispiel von drei Chips mit immobilisierten Au₃₀-Partikeln nach Silberacetat/Hydrochinon-Verstärkung (5×2-min) mit Grafitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS; *PC 5100 ZL* Perkin Elmer, Wellesley, MA) quantifiziert. Um das abgeschiedene Silber zu extrahieren, wurden die Chips für 30 min in siedender Salpetersäure (65%) aufgeschlossen. Der resultierende Extrakt wurde mit ddH₂O auf 25 ml verdünnt und mittels GF-AAS analysiert.

2.2.4. Charakterisierungsmethoden

UV/VIS-Spektroskopie

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA- und Nanopartikellösungen wurde UV/VIS-Spektroskopie eingesetzt (*V-530*, Jasco, Maryland, MD, USA sowie *NanoDrop ND-1000*, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, NC, USA), wobei das jeweilige Lösungsmittel

als Referenz diene. Die Quantifizierung der DNA erfolgte durch Messung der Extinktion (optische Dichte) bei 260 nm (OD_{260}). Die Konzentration wurde nach dem *Lambert-Beerschen* Absorptionsgesetz (Gl. 2.2) mithilfe entsprechender sequenzabhängiger Faktoren (einzelsträngige Oligonukleotide ca. 20–35, doppelsträngige DNA 50) berechnet. Die Messung der kolloidalen Goldlösungen erfolgte im UV/VIS-Spektrum bei 525 nm. Anhand von Herstellerangaben war eine Umrechnung der Extinktionen in molare Konzentrationen möglich; in der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die optische Dichte bei 525 nm (OD_{525}) verwendet. Die Partikelkonzentrationen der verwendeten Stammlösungen sind im Anhang (B.3) aufgelistet.

$$c_{\text{DNA}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = OD_{260} \times \text{Faktor} \quad (2.2)$$

Kontaktwinkelmessung

Reinigung und Funktionalisierung von Trägermaterialien verändern die Benetzungseigenschaften ihrer Oberflächen. Eine Charakterisierung ihrer Hydrophilie/Hydrophobie erfolgte durch die Messung des Kontaktwinkels, mit welchem sich ein Wassertropfen auf der Oberfläche abkugelt (Randwinkelmessgerät *OCA 20*, DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt).

Optische Auswertung, Mikroskopie

Scanner Silberverstärkte Signale sind auf transparenten Trägermaterialien bereits mit bloßem Auge sichtbar und können mit einfachen Scannern ausgelesen werden. Die optische Auslese von Glasobjektträgern wurde mit einem herkömmlichen Flachbettscanner (*Agfa Duoscan T2500*, Agfa, Köln), die Auslese von transparenten ACED hingegen mit einem Diascanner durchgeführt (*Dimage Scan Dual II AF-2820U*, Konica Minolta, Langenhagen). Die mit 2820 dpi eingelesenen Bilder wurden einer Grauwertanalyse mittels *ImageJ* unterzogen.

Optische Mikroskopie Detaillierte optische Aufnahmen erfolgten mit einem Lichtmikroskop (*AxioImager.A1m*, Zeiss, Jena) und CCD-Kamera (*AxioCam MRC5*, Zeiss, Jena) im Auflicht- oder Durchlichtmodus. Es wurde mit einer Lampentemperatur von 3200 K gearbeitet.

Fluoreszenzmikroskopie Fluoreszenzsignale wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (*Axiotech 100*, Zeiss, Jena) und CCD-Kamera (*Sensicam*, PCO Computer Optics, Kehlheim) sowie einem Mikroarrayreader (*MicroArrayReader V1.20*, Jena-Optronik, Jena) detektiert.

Rasterelektronenmikroskopie (REM) Immobilisierte metallische Nanostrukturen wurden begleitend mit REM abgebildet (*Jeol JSM 6700F*, Jeol Europe B.V., Zaventem, Belgien). Dabei werden Sekundärelektronen detektiert, welche abhängig von Oberflächenstruktur, Ordnungszahl und Leitfähigkeit des untersuchten Objektes generiert werden. Unregelmäßige metallische Strukturen stellen sich besonders kontrastreich dar.

Rasterkraftmikroskopie Die Charakterisierung der Oberflächentextur planarer Oberflächen und darauf immobilisierter Strukturen wurde mittels Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM; Binnig et al. (1986)) realisiert. Die Messungen erfolgten mittels *Nanoscope III*-Controller, *Dimension 3100*-Messkopf (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) und *BudgetSensors™ BS-Tap300*-Spitzen aus Silizium (300 kHz Resonanzfrequenz, 40 N/m Kraftkonstante (Innovative Solutions Bulgaria Ltd., Sofia, Bulgarien) an trockenen Proben im Tapping-Modus an Luft.

Elektrische Auswertung

Die resistive Auslese der ACED erfolgte mit einem speziell dafür am IPHT entwickelten Auslesegerät, dem DNA-Chip-Reader (Abb. 2.6). Damit war eine semiparallele Messung der Widerstände aller 42 Messpunkte (Elektrodenpalte) möglich. Der Messbereich des Gerätes umfasste $1\ \Omega$ bis $9 \times 10^6\ \Omega$. Die gemessenen Widerstandswerte (R) wurden im Reader gespeichert und konnten für die weitere Bearbeitung auf einen Rechner übertragen werden. Die Leitfähigkeit wurde als elektrischer Leitwert (G) aus dem Kehrwert der gemessenen Widerstände abgeleitet ($G=1/R$). Aufgrund des Messbereiches betrug der minimale Leitwert $1,1 \times 10^{-7}\ \text{S}$. Der Schwellenwert für beginnende Leitfähigkeit wurde auf 10^{-5} , also zwei Größenordnungen darüber, festgelegt. Bei einem Anstieg um mehr als vier Größenordnungen, d.h. einem Leitwert größer 10^{-3} , wurde von deutlicher Leitfähigkeit gesprochen. Die Auswertung und grafische Darstellung wurden mithilfe des Tabellenkalkulationsprogramms *Microsoft Excel™* durchgeführt.

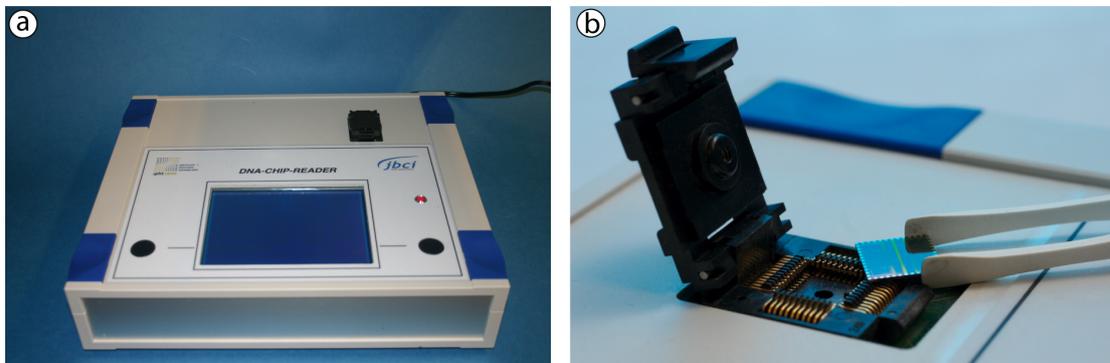


Abb. 2.6: Resistive Auslese der elektrischen Chips im (a) DNA-Chip-Reader. (b) Sockel zur Aufnahme und Kontaktierung des Chips

Bildanalyse

Fluoreszenz- bzw. Absorptionssignale Die Graustufen-Bilder wurden mit den *open source* Bildbearbeitungsprogrammen *Gimp* (www.gimp.org) bzw. *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) analysiert. Dabei wurde die Intensität der Signale als mittlerer Grauwert bestimmt.

AFM Die AFM-Aufnahmen wurden mithilfe der Mikroskopsoftware (*Nanoscope SPM 5.12r2*, Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) geglättet sowie mit dem *Open-*

source-Programm *ImageJ* prozessiert und analysiert. Dabei konnten die originalen Dateien über ein spezielles *Plugin* unter Beibehaltung aller Höhendaten sowie der lateralen Informationen des Scans importiert werden. Vor der weiteren Analyse wurde glatter, kontinuierlicher Hintergrund mittels *Subtract Background* aus den Bildern entfernt. Diese Funktion basiert auf einem *Rolling-Ball*-Algorithmus, den Sternberg (1983) für die biomedizinische Bildanalyse beschrieb.

Für die topographische Charakterisierung von Oberflächen wurden die Rauigkeiten als *Peak-to-peak*-Höhen angegeben. Weil die lateralen Dimensionen in der Rasterkraftmikroskopie durch die Geometrie der AFM-Spitze im nm-Bereich nicht exakt abgebildet werden und deswegen weniger aussagekräftig sind, wurden zur Untersuchung der Metallabscheidung und des daraus folgenden Partikelwachstums die Partikelhöhen vermessen. Nach Abzug des Hintergrundsignals im Bildbearbeitungsprogramm wurden die Partikelhöhen helligkeitskodiert aus den Topografie-Aufnahmen und scanspezifischen Parametern bestimmt (Gl. 2.3). Von den berechneten Daten wurde die mittlere Partikelhöhe bestimmt (jeweils Analyse von mindestens 50 Partikeln).

$$h [nm] = \text{Helligkeit} \times \frac{Z \text{ Scale } [V]}{65\,535} \times \text{Sens Z Scan } [nm/V] \quad (2.3)$$

Bei der Charakterisierung des Partikelwachstums im Elektrodenspalt sollten die Partikel im Hinblick auf die Ausbildung leitfähiger Brücken/Schichten in ihrer Gesamtheit betrachtet werden. Aufgrund ihrer großen Anzahl (bis zu 2000 Nanopartikel im Spalt) war die Analyse einzelner Partikel nicht mehr praktikabel. Deswegen kam bei diesen Untersuchungen die *ImageJ*-Funktion *Find Maxima* zur Anwendung. Damit wurden in den vom Hintergrund bereinigten Bildern vorhandene Partikel als lokale maximale Höhen (innerhalb einer festzulegenden Rauschtoleranz [*Noise Tolerance*]) identifiziert. Anschließend wurden die Höhen der so selektierten Partikelmaxima vermessen. Um "Ausreißer" auszuschließen, wurde die mittlere Partikelhöhe im Spalt durch den Medianwert der einzelnen Partikelhöhen ermittelt.

Partikelerkennung, Grafische Wachstumssimulation, Relative Metallbedeckung

Für die Erkennung der Partikelkonturen wurde die geglättete AFM-Aufnahme in ein binäres Bild umgewandelt (Abb. 2.7 a, b). Dabei wurde der Schwellenwert über Eingabe eines definierten Höhenwertes festgelegt. Die im Binärbild schwarz dargestellten Partikel wurden mithilfe der *ImageJ*-Funktion *Create Selection* selektiert und mittels *Enlarge* um jeweils 1 px (entspricht 24 nm) vergrößert. Neben dieser direkten Verstärkung vorhandener "Partikelmasken" konnten aus dem Binärbild über die *Analyze Particles*-Funktion die Koordinaten der Partikelmittelpunkte (*Center of mass*, Anhang B.5: Abb. B.1) gespeichert und anschließend als Startkeime verwendet werden. Diese Funktion ermöglichte es auch, nur Strukturen passender Größe als Partikel zu erkennen (Anhang B.5: Beispielablauf und Makro 1). Die relative partikuläre Metallbedeckung, d.h. die Metallabscheidung im Spalt, wurde über den Flächenanteil der schwarzen Bereiche im Binärbild ermittelt (*Area fraction*).

Grafische Prüfung der Durchgängigkeit/Leitfähigkeit In das binäre Bild (Partikel im Elektrodenspalt) wurden zwei Elektrodenäquivalente gezeichnet. Die Prüfung der

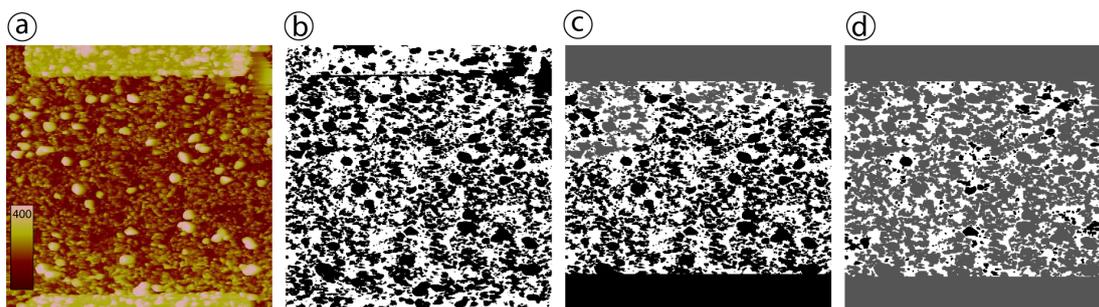


Abb. 2.7: Bildanalyse: Partikelerkennung und grafische Prüfung der Durchgängigkeit. (a) Das originale AFM-Bild wurde über einen höhenabhängigen Schwellenwert in ein (b) binäres Bild umgewandelt, auf dem die Partikel schwarz dargestellt sind. Nach Extraktion des Elektrodenspaltes wurden zwei Elektrodenäquivalente am Bildrand hinzugefügt und zur Prüfung der Durchgängigkeit die “Flood Fill”-Funktion des Bildanalyseprogramms ImageJ angewendet. Dabei werden zusammenhängende Bereiche (sich berührende Partikel) mit einer Farbe gefüllt (grau). Nach Einfärbung der oberen Elektrode wurde so sichtbar, wie weit perkolierende Partikelbrücken reichen. (c) Der grau eingefärbte Bereich weist auf eine unvollständig ausgebildete Partikelbrücke hin. (d) Die vollständige “Leitfähigkeit” ist an der Einfärbung der unteren Elektrode sichtbar.

Durchgängigkeit von einer Elektrode zur anderen – als grafisches Korrelat einer leitfähigen Brücke – wurde mithilfe der *ImageJ*-Funktion *Flood Fill* durchgeführt (Anhang B.5: Makro 2). Dieses Werkzeug ermöglichte die Identifizierung zusammenhängender Bereiche eines Bildes. Abb. 2.7 c, d zeigt als Beispiel eine nur teilweise und eine vollständig durchgängige Verbindung zwischen zwei Elektroden.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung und Optimierung der Oberflächenfunktionalisierung für Mikroarrays

Ziel der in diesem Abschnitt betrachteten Untersuchungen war die Optimierung eines Nanopartikel-basierten DNA-Nachweises. Der Erfolg Festphasen-basierter Nachweistechiken ist abhängig von der Effizienz der Fängermolekül-Immobilisierung. Dafür müssen die Probenträger mit entsprechenden Bindegruppen versehen, d.h. funktionalisiert werden. Saubere und aktive Oberflächen sind eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Funktionalisierung. Deswegen wurden zunächst verschiedene Reinigungs- und Aktivierungsmethoden untersucht. Ihr Einfluss auf die Benetzungseigenschaften und Oberflächenbeschaffenheit wurde durch Messungen des Kontaktwinkels eines Wassertropfens auf der Oberfläche sowie durch rasterkraftmikroskopische Untersuchungen beurteilt.

Für eine nachfolgende Anbindung von aminomodifizierter Fänger-DNA wurden zwei verschiedene Silanisierungen untersucht. Zur Charakterisierung der Bindefähigkeit der silanisierten Oberfläche für Fänger-Moleküle wurden zunächst fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide wegen ihrer etablierten Hybridisierungs- und Detektionsmethoden eingesetzt. Die resultierenden Signale wurden im Fluoreszenzmikroskop bzw. Mikroarrayreader detektiert und in ihrer Intensität und Morphologie auf beiden Silanoberflächen verglichen.

Um den unerwünschten Hintergrund durch Goldnanopartikel-markierte DNA-Moleküle zu vermindern, wurden verschiedene Blockierungsmethoden wie 6-Mercapto-1-hexanol (MCH), Ethanolamin und Rinderserumalbumin (BSA) getestet. Nach der Silberverstärkung der gebundenen Goldpartikel wurden die Probenträger im Flachbettscanner charakterisiert und individuelle Partikel im Rasterkraftmikroskop (AFM) visualisiert.

3.1.1. Vergleich verschiedener Reinigungs- und Aktivierungsmethoden hinsichtlich nachfolgender Silanisierung

Saubere und rückstandsfreie Oberflächen des Trägermaterials sind, genauso wie eine ausreichende Dichte an Bindegruppen, Voraussetzung für eine optimale Silanisierung. Deswegen wurden Glasträger verschiedenen Reinigungs- und Aktivierungsmethoden unterzogen und anschließend silanisiert. Für die spätere Anbindung aminomodifizierter Fänger-DNA wurden zwei verschiedene Silanisierungen getestet: 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GOPS) und 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES). NH_2 -Oligonukleotide können direkte kovalente Bindungen mit den Epoxygruppen von GOPS eingehen. Zur Kopplung

mit den Aminogruppen der APTES-Oberflächen ist hingegen ein *cross linker* (hier p-Phenylendiisothiocyanat, PDC) notwendig (Abb. 2.2).

Da sowohl Reinigung als auch Silanisierung die Benetzungseigenschaften der Oberfläche beeinflussen, wurden nach den einzelnen Prozessschritten Kontaktwinkelmessungen durchgeführt. Darüber hinaus wurden die behandelten Trägermaterialien rasterkraftmikroskopisch charakterisiert (Topografie). Durch die Entfernung möglicher organischer und anorganischer Kontaminanten werden die gereinigten Oberflächen sehr hydrophil (Kontaktwinkel $<30^\circ$). Eine Aktivierung, d.h. die Erhöhung der Bindegruppendichte (OH-Gruppen) auf der Oberfläche, erhöht die Hydrophilie weiter. Eine erfolgreiche Silanisierung zeichnet sich hingegen durch relativ hydrophobe Oberflächen aus. Die untersuchten Methoden und resultierenden Kontaktwinkel sind in Tab. 3.1 aufgelistet (Festag et al. 2005).

Obwohl alle getesteten Reinigungsprozesse hydrophile Oberflächen erzeugten, variierten die gemessenen Kontaktwinkel mit $7,2^\circ$ – $30,5^\circ$ beträchtlich. Die geringsten Randwinkel ($7,2^\circ \pm 0,6^\circ$) wurden durch 30-minütige Behandlung in *Piranha*-Lösung (3:1 (V/V) konz. $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$) erzielt. Eine zusätzliche Vorreinigung mit Aceton, Ethanol und Wasser hatte keinen signifikanten Effekt auf diese Werte. Vergleicht man die Kontaktwinkel nach erfolgter Silanisierung, fällt auf, dass die signifikanten Unterschiede durch die verschiedenen Reinigungsprotokolle aufgehoben wurden, d.h. die Oberflächen zeigten – unabhängig von der Vorbehandlung – ähnliche Benetzungseigenschaften. Die höchsten Kontaktwinkel ($60,9^\circ \pm 1,4^\circ$) wiesen dabei GOPS-silanisierte Träger nach Vorreinigung in Aceton, Ethanol und Wasser sowie Aktivierung in konz. $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{dH}_2\text{O}$ auf. Aus diesem Grund wurde dieses Protokoll für die Reinigung und Aktivierung unstrukturierter Proben-träger für alle weiteren Versuche ausgewählt. Auch eine Silanisierung mit APTES führte zu deutlich erhöhten Kontaktwinkeln von $53,8^\circ \pm 3,0^\circ$, welche ebenfalls auf eine erfolgreiche Oberflächenmodifikation hinwiesen.

Um die Oberflächenbeschaffenheit zu beurteilen, wurden die behandelten Substrate darüber hinaus rasterkraftmikroskopisch charakterisiert (Abb. 3.1). Die sehr glatten gereinigten Oberflächen wiesen Rauigkeiten von weniger als 1 nm auf. 6 h GOPS-Silanisierung bei 70°C in 10 mM GOPS/Toluol lieferte etwas rauere Oberflächen um 4 nm. Die glattesten APTES/PDC-Oberflächen wurden mit <2 nm durch Behandlung in 1% APTES in 95% Aceton/ dH_2O für 2 min bei 20°C erreicht.

3.1.2. Einfluss der DNA-Kopplungschemie auf Signalintensitäten und Morphologie

Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der verwendeten Silanoberflächen wurden Oligonukleotide eingesetzt, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff 3'-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) modifiziert waren (*F150* siehe Tab. 2.1, Seite 13). Diese sind kommerziell erhältlich und ihre Hybridisierungs- und Detektionstechniken sind etabliert.

Zunächst wurden aminomodifizierte Fänger-Oligonukleotide (30 b) in Konzentrationen von $0,5$ – $100 \mu\text{M}$ an die silanisierten Glassubstrate gebunden, um die Bindungskapazität der beiden Silane zu vergleichen. Um darüber hinaus auch die Neigung zu unspezifi-

Tab. 3.1: Vergleich verschiedener Reinigungs- und Aktivierungsprotokolle aus der Literatur hinsichtlich Kontaktwinkeln der gereinigten und silanisierten Glassubstrate

PROTOKOLL UND QUELLE	KONTAKTWINKEL [°]		
	GEREINIGT	GOPS	APTES
30 min in 1:1 (V/V) Methanol/HCl konz.; 30 min in H ₂ SO ₄ konz. (Cras et al. 1999)	10,3±0,6	59,0±3,2	–
30 min in 1:1 (V/V) Methanol/HCl konz.; 30 min in H ₂ SO ₄ konz.; 10 min in kochendem dH ₂ O (Li et al. 2001)	19,2±9,8	58,7±3,1	–
15 min in Piranha-Lösung (3:1 (V/V) H ₂ SO ₄ konz./H ₂ O ₂) (Jogikalmath 2002)	30,5±8,9	54,7±2,1	–
30 min in Piranha-Lösung (3:1 (V/V) H ₂ SO ₄ konz./H ₂ O ₂) (Dolan et al. 2001)	7,2±0,6	59,3±2,7	–
je 10 min in Aceton, Ethanol und dH ₂ O im Ultraschall; 15 min in Piranha-Lösung (mo- difiziert nach Jogikalmath (2002))	23,3±8,6	57,3±3,9	–
je 10 min in Aceton, Ethanol und dH ₂ O im Ultraschall; 30 min in Piranha-Lösung (mo- difiziert nach Dolan et al. (2001))	9,0±1,4	54,1±2,9	–
je 10 min in Aceton, Ethanol und dH ₂ O im Ultraschall; 10 min in 1:1:1 (V/V/V) HCl konz./H ₂ O ₂ /dH ₂ O (Fritzsche et al. 2002)	21,2±3,5	60,9±1,4	53,8±3,0

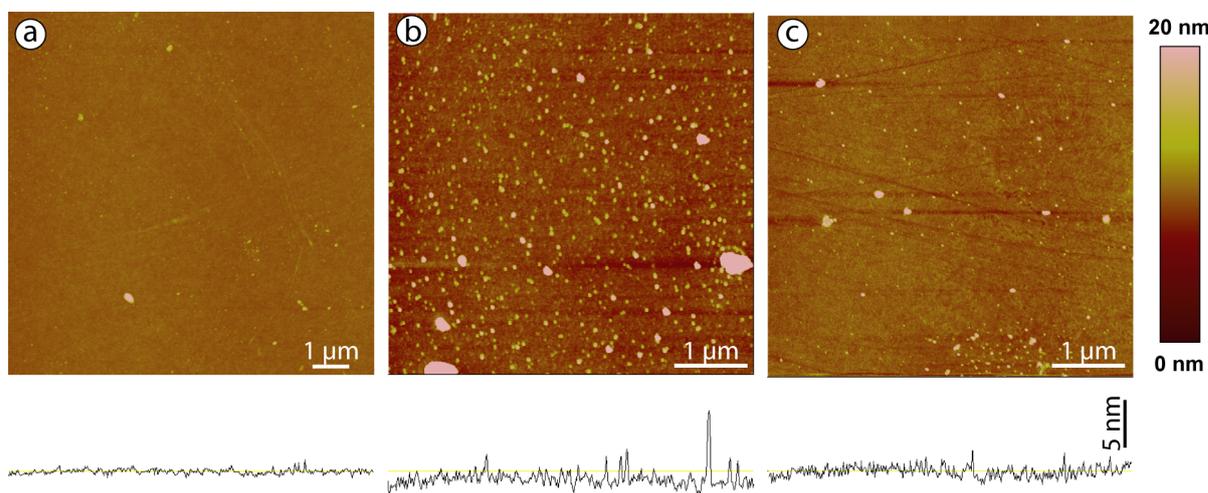


Abb. 3.1: Rasterkraftmikroskopische Charakterisierung von Reinigungs- und Silanisierungsmethoden. Die AFM-Bilder ((a) $5 \times 5 \mu\text{m}$ bzw. (b,c) $10 \times 10 \mu\text{m}$) zeigen Topografieaufnahmen der (a) vorgereinigten, (b) GOPS- und (c) APTES-silanisierten Glassubstrate. Die dazu gehörigen Schnitte lassen Rauigkeiten von 1; 4 bzw. 2 nm erkennen. (Festag et al. 2005)

schen Bindungen zu beurteilen, wurde neben der komplementären Sequenz (*NS150*) eine teil- und eine nichtkomplementäre Fängersequenz (*NS153* bzw. *N150*) immobilisiert. Die gebundenen Moleküle wurden anschließend mit fluoreszierenden Ziel-Oligonukleotiden in verschiedenen Konzentrationen ($0,002\text{--}2\ \mu\text{M}$) hybridisiert. Damit sollte die Sensitivität der silanisierten Oberflächen hinsichtlich des Hybridisierungssignals charakterisiert werden. Die hybridisierten Proben wurden in einem Mikroarrayreader (Jena-Optronik, Jena) gescannt. Die aufgenommenen orts aufgelösten Fluoreszenzsignale wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Gimp* (www.gimp.org) als Helligkeitswerte (weiß=255, schwarz=0) quantifiziert (Abb. 3.2).

Die größten Signalintensitäten wurden auf GOPS-Oberflächen ($71,7\pm 4,4$ AU für $100\ \mu\text{M}$ Fänger-Oligonukleotide und $0,2\ \mu\text{M}$ FITC-markierte Ziel-DNA, Abb. 3.2 a) gemessen. Unerwartet zeigten die gleichen Fänger-Konzentrationen, hybridisiert mit einer höheren Konzentration an FITC-markierter DNA ($2\ \mu\text{M}$), geringere Helligkeitswerte ($51,4\pm 11,1$ AU). APTES-beschichtete Oberflächen zeigten tendenziell geringere maximale Helligkeiten als GOPS-silanisierte Träger: $49,9\pm 6,5$ AU und $47,4\pm 9,1$ AU für $100\ \mu\text{M}$ Fänger-DNA und $0,2$ bzw. $2\ \mu\text{M}$ FITC-markierte Ziel-DNA (Abb. 3.2 b). Obwohl GOPS-Oberflächen höhere maximale Fluoreszenzsignale lieferten, konnten auf APTES-silanisierten Substraten noch Fänger-Oligonukleotide geringerer Konzentrationen nachgewiesen werden. So zeigte auf APTES $5\ \mu\text{M}$ Fänger-DNA auch noch mit $0,02\ \mu\text{M}$ FITC-markierter DNA Signale, wohingegen auf GOPS diese Fänger-DNA-Konzentrationen nur mit 100-fach höheren Konzentrationen des fluoreszierenden Oligonukleotids detektierbar waren.

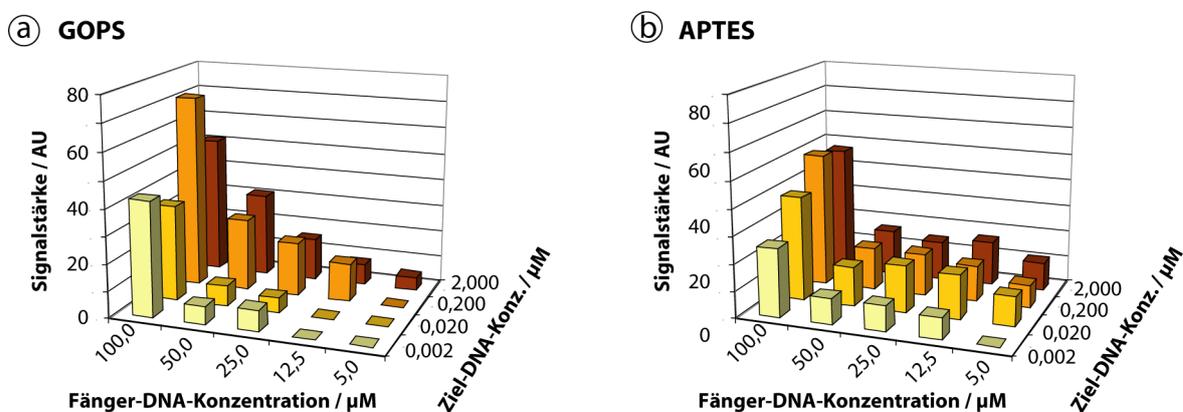


Abb. 3.2: Vergleich der Intensitäten von Fluoreszenzsignalen auf verschiedenen Silanoberflächen. Glasobjektträger (75×25 mm) wurden mit (a) GOPS und (b) APTES/PDC silanisiert, mit $0,5\text{--}100\ \mu\text{M}$ Fänger-Oligonukleotiden funktionalisiert, mit $0,002\text{--}2\ \mu\text{M}$ FITC-markierten komplementären Oligonukleotiden hybridisiert und im Mikroarrayreader ausgelesen. Die Signalintensität wurde als Helligkeit aufgetragen (weiß=255, schwarz=0). Obwohl GOPS höhere maximale Fluoreszenzsignale zeigte, waren auf APTES geringere Fänger-Oligonukleotidkonzentrationen nachweisbar. (Festag et al. 2005)

Ein näherer Blick auf die DNA-Spots enthüllte eine inhomogene Signalverteilung innerhalb des Spots (Abb. 3.3). Besonders auf GOPS-Oberflächen fanden sich inhomogen verteilte Signale mit den intensivsten Signalen am Spotrand (Abb. 3.3 c, e). Dieses Phä-

nomen wurde sowohl für hohe als auch für niedrigere Signale beobachtet. Auf APTES-Oberflächen zeigten sich inhomogene Signale nur für höhere Fänger-Konzentrationen ($100\ \mu\text{M}$, (Abb. 3.3 d)). Hier fanden sich die intensivsten Signale jedoch in der Spotmitte. Bei niedrigeren Konzentrationen waren die Spots uniform, was auf eine homogene Verteilung der DNA-Bindegruppen auf APTES/PDC hinweist.

Will man den Einfluss der Hybridisierung auf Signalstärke und -homogenität ausschließen, muss man direkt (Fluoreszenz-) markierte Fänger-DNA immobilisieren. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen (1; 10 und $50\ \mu\text{M}$ FITC-markierte Oligonukleotide (*NS150F*) auf GOPS- bzw. APTES-silanisierte Objektträger automatisch gespottet und die Objektträger im Fluoreszenzmikroskop ausgelesen. Die Signale der aufgenommenen Bilder wurden als Helligkeit gemessen. Die Fluoreszenzbilder (Bsp.: $10\ \mu\text{M}$ *NS150F* in Abb. 3.4 a) zeigten dabei ähnliche Tendenzen hinsichtlich der Signalhomogenität in den Spots. Auf GOPS-Oberflächen fanden sich höhere Signalstärken im Bereich der Tropfenränder, wohingegen die Spots auf APTES sehr homogen erschienen.

3.1.3. Blockierung unspezifischer DNA- und Goldpartikelbindung

Wegen dieser inhomogenen Signalverteilung und der aufwendigen Präparation des trockenenen Toluols für die GOPS-Silanisierung wurde für eine weitere Charakterisierung die APTES/PDC-Modifizierung näher betrachtet. In diesem Abschnitt soll ihre Eignung für ein Goldnanopartikel-basiertes Nachweissystem untersucht werden.

Dazu wurde die Oberfläche von Glasstreifen zunächst für die Anbindung von Fänger-DNA mit APTES/PDC modifiziert. Zur Beurteilung der Spezifität des Nachweises wurden komplementäre, teilkomplementäre (1–3 Fehlpaarungen [*Mismatches*]) und nicht-komplementäre Fänger-DNA-Sequenzen immobilisiert (Schema in Abb. 3.5 a). Danach wurden die Glasträger mit Goldnanopartikel-markierten Oligonukleotiden hybridisiert. Für eine einfache und schnelle Auswertung wurden die Signale verstärkt, indem die gebundenen Goldpartikel als Keime für eine metallkatalysierte Silberabscheidung dienten (Metallsalz: Silberacetat, Reduktionsmittel: Hydrochinon, Tab. B.3 im Anhang). Die so verstärkten Signale wurden mit einem handelsüblichen Flachbettscanner ausgelesen.

Zunächst sollte die Art der Anbindung an der silanisierten Oberfläche untersucht werden. Um zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung der aminomodifizierten Fänger-DNA zu unterscheiden, wurden die Thiocyanat-Bindegruppen der APTES/PDC-Oberfläche mit Ethanolamin teilweise abgesättigt/blockiert, bevor die Fänger-DNA gespottet und mit goldmarkierter Ziel-DNA hybridisiert wurde. Die Ethanolaminbehandlung behinderte dabei sowohl die Anbindung der Fänger-DNA als auch eine unspezifische Goldanlagerung (Abb. 3.5 b). Ein weiterer Hinweis auf eine spezifische Anbindung der Aminomodifizierung war das Ausbleiben einer Fänger-DNA-Anbindung bei Fehlen des *cross linkers* PDC (Abb. 3.5 c). Ohne die Vermittlung des Kopplungsreagenzes war keine kovalente Bindung der NH_2 -Gruppen der Fänger-DNA mit denen von APTES möglich.

Nachfolgende Experimente zeigten, wie in Abb. 3.5 d sichtbar, eine starke unspezifische Anlagerung von Goldnanopartikeln an den APTES/PDC-modifizierten Oberflächen. Da solche unspezifischen Reaktionen spezifische Signale überlagern, wurde versucht, die silanisierten Oberflächen gegenüber unspezifischer Goldbindung zu passivieren. Jedoch hatte weder das Blocken freier SCN-Gruppen durch 1% Ammoniumhydroxid, beschrieben für

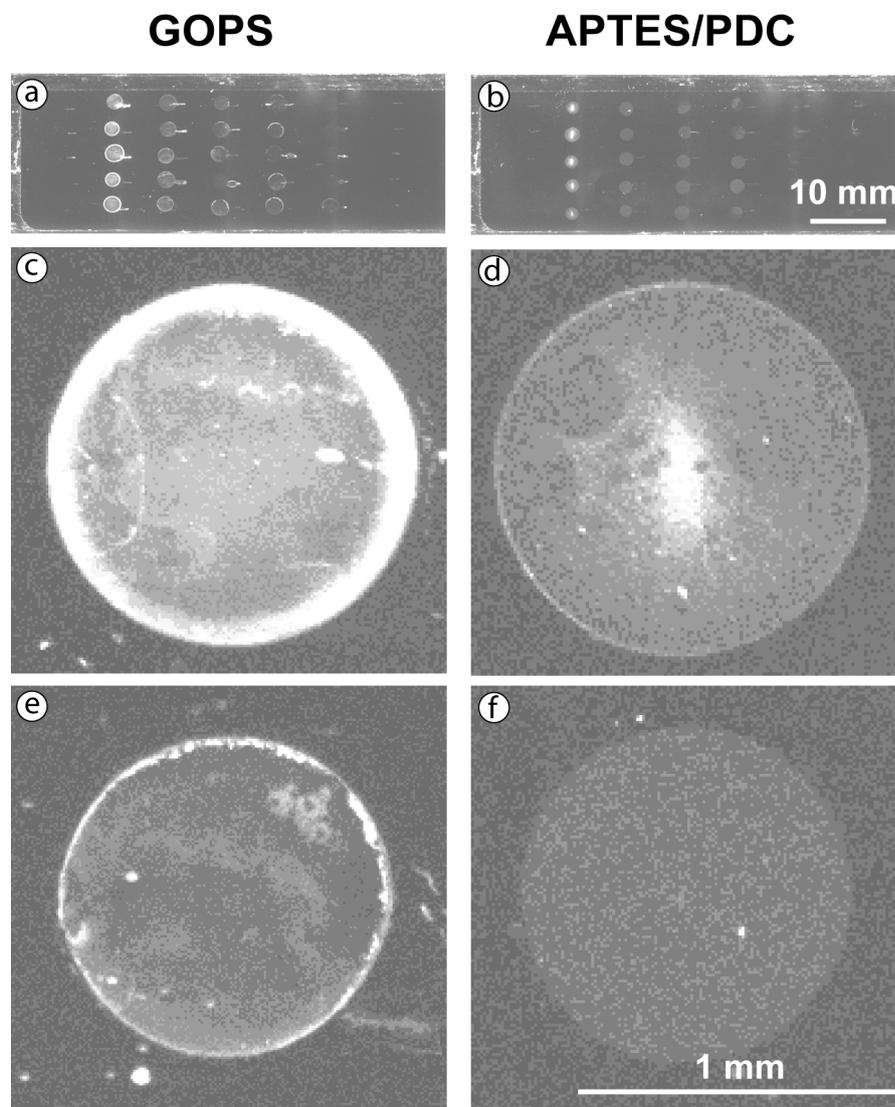


Abb. 3.3: Vergleich der Homogenität von Fluoreszenzsignalen hybridisierter Ziel-DNA auf verschiedenen Silanoberflächen. Überblick von (a) GOPS und (b) APTES/PDC-silanisierten Glasobjektträgern, hybridisiert mit $0,2\ \mu\text{M}$ FITC-markierten Oligonukleotiden. Individuelle Spots von $100\ \mu\text{M}$ (c, d) und $50\ \mu\text{M}$ (e, f) Fänger-Oligonukleotiden vergrößert dargestellt. Auf GOPS sind die intensivsten Signale am Tropfenrand zu sehen, auf APTES/PDC erscheinen die Signale relativ homogen, außer für hohe Fänger-Konzentrationen ($100\ \mu\text{M}$). (Festag et al. 2005)

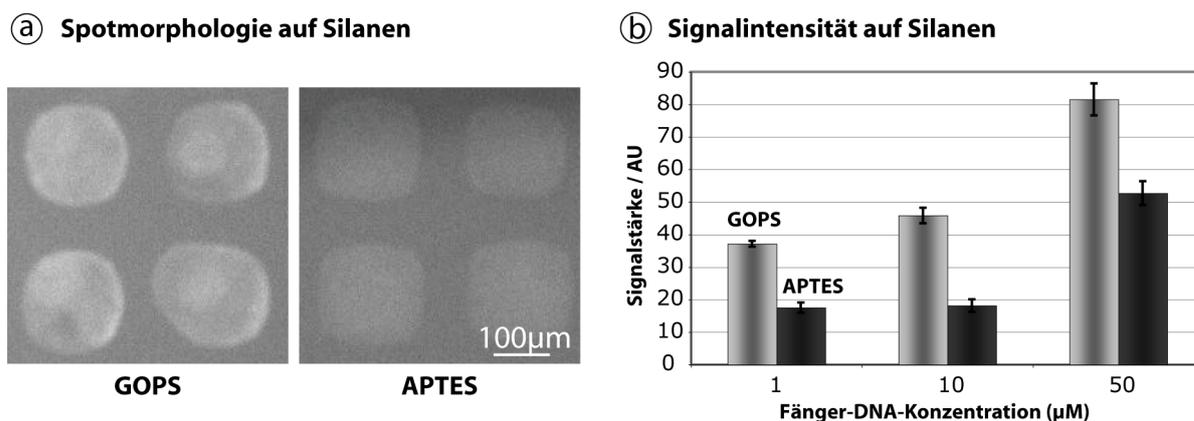


Abb. 3.4: Vergleich der Fluoreszenzsignale immobilisierter fluoreszenzmarkierter Fänger-DNA auf verschiedenen Silanoberflächen. (a) Spothomogenität bei $10\ \mu\text{M}$ FITC-markierten Fänger-Oligonukleotiden auf GOPS- und APTES-Oberflächen. (b) Vergleich der Signalintensitäten (weiß=255, schwarz=0) FITC-markierter Fänger-DNA in Abhängigkeit von ihrer Konzentration (1; 10 und $50\ \mu\text{M}$) auf GOPS bzw. APTES.

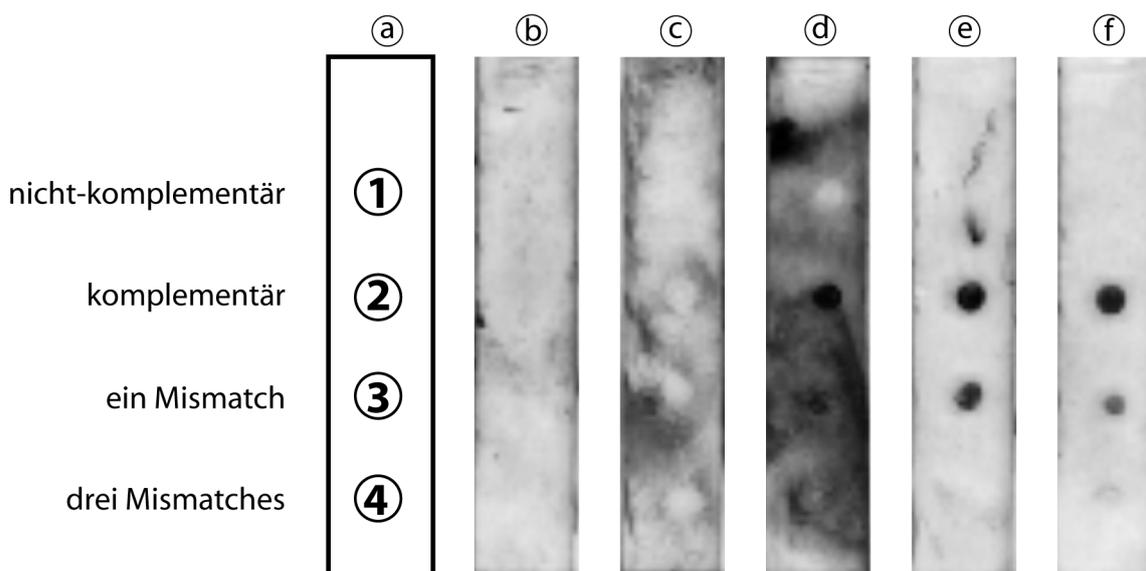


Abb. 3.5: Bindung von Goldnanopartikel-markierter DNA nach Silberverstärkung und der Effekt verschiedener Passivierungsstrategien gegenüber unspezifischer DNA- und Goldbindung. (a) Schema des Mikroarraysubstrates ($4 \times 25 \times 1\ \text{mm}$ Glasstreifen) mit (1-4) verschiedenen Fänger-DNA-Sequenzen ($20\ \mu\text{M}$). (b) Passivierung der APTES/ PDC-Oberfläche mit Ethanolamin verhindert DNA- und Goldanbindung. (c) Das Fehlen des cross linkers PDC hemmt die kovalente Anbindung der Fänger-DNA auf APTES. (d) Ohne Passivierung führt eine Behandlung mit kolloidaler Goldlösung zu starker unspezifischer Goldbindung auf APTES/PDC-Oberflächen. (e, f) Eine Behandlung der silanisierten, mit Fänger-DNA funktionalisierten Oberfläche mit BSA (1% bzw. 3% in PBS pH 7,4) vermindert eine unspezifische Goldbindung ohne die DNA-Hybridisierung zu beeinträchtigen.

Fluoreszenzmarkierung auf APTES/PDC (Guo et al. 1994), noch die Blockierungsstrategien für GOPS (50 mM Ethanolamin) einen passivierenden Effekt. Auch eine Behandlung mit 6-Mercapto-1-hexanol (Wirtz et al. 2003), welche die verbliebenen Aminogruppen von APTES blockieren sollte, verminderte eine unspezifische Goldbindung nicht. Aus diesem Grund wurde Rinderserumalbumin (BSA) als etabliertes Blockreagenz getestet. Nach der DNA-Immobilisierung und nachfolgenden Waschprozessen wurden die Glasträger mit verschiedenen Konzentrationen an BSA behandelt und mit Goldnanopartikel-modifizierter Ziel-DNA hybridisiert. Die nachfolgende Silberverstärkung offenbarte Blockierungseffekte für 1% und 3% BSA (Abb. 3.5 e, f). Als optimale BSA-Konzentration lieferten 3% BSA (2 h) dunkle Spots (Goldnanopartikel mit Silberabscheidung) auf hellem Hintergrund. Dabei waren – in Abhängigkeit von ihrer Komplementarität – die verschiedenen Fängersequenzen als Spots unterschiedlicher Grauwerte unterscheidbar. Einen detaillierteren Blick auf die spezifisch hybridisierten Nanopartikel gewährte die rasterkraftmikroskopische Analyse der verschiedenen Signale (Abb. 3.6). Dabei wurde die höchste Nanopartikeldichte bei der komplementären Sequenz gefunden (Abb. 3.6 a). Während die Einführung eines *Mismatches* kaum zu verminderter Nanopartikeldichte führte, war die Anzahl an goldmarkierter DNA durch 3 Fehlpaarungen deutlich reduziert (Abb. 3.6 b bzw. c). Die in Abb. 3.6 d nachweisbaren Partikel deuten auf dennoch vorhandene unspezifische Gold- und/oder Ziel-DNA-Bindung hin.

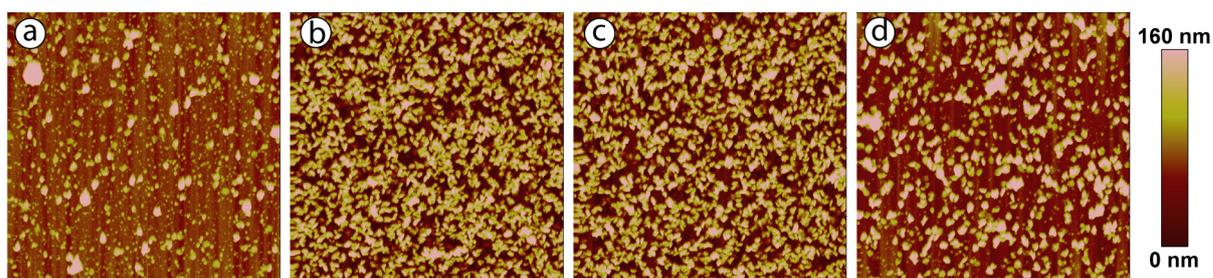


Abb. 3.6: Bindung Goldnanopartikel-markierter Ziel-DNA an verschiedene Fänger-DNA-Sequenzen. Die Glasträger wurden vor der Hybridisierung mit 3% BSA gegen unspezifische Goldbindung blockiert. Die AFM-Bilder ($10 \times 10 \mu\text{m}$; 160 nm Höhengskala) zeigen die unterschiedlichen Partikeldichten abhängig von der jeweiligen Fänger-DNA-Sequenz (a–nichtkomplementär, b–komplementär, c–ein *Mismatch*, d–drei *Mismatches*).

3.2. Charakterisierung des Partikelwachstums

Rasterkraftmikroskopische Messungen ermöglichen die hochauflösende Untersuchung von kleinsten Strukturen und helfen dadurch, Reaktionsmechanismen auf mikroskopischer Ebene aufzuklären. In vorliegender Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglichte, individuelle Nanopartikel über den Wachstumsprozess zu “begleiten” (Abb. 3.7). Dabei konnten Größenveränderungen auf Einzelpartikelebene erfasst werden, ohne die Nachteile von Ensemblemessungen (Miterfassung unspezifischer Metallabscheidungen, Mittelung der Wachstumseffekte und damit Verdeckung von Subpopulationen) in Kauf nehmen zu müssen.

Um die gemessenen Partikelhöhen einem Wachstumsmodell zuordnen zu können, wurden zwei extreme Wachstumsmodelle betrachtet (Abb. 3.8). Auf der einen Seite könnte die Reduktion der Metallionen auf der Partikeloberfläche katalytisch erfolgen, d.h. je größer die Oberfläche, desto mehr Metallionen würden reduziert und abgeschieden. Dieses lineare Wachstum würde im Wachstum konstanter Schichtdicken pro Zeiteinheit resultieren und ließe vermuten, dass der Transport der Reaktanten zum wachsenden Partikel nicht limitiert ist. Würde die Metallabscheidung auf der anderen Seite dagegen nichtkatalytisch erfolgen, bliebe die Rate der Metallbildung konstant. Für eine bestimmte Anzahl an Reaktionspartnern, deren Transport diffusionskontrolliert ist, könnte somit nur ein konstantes Volumenwachstum erzielt werden. In anderen Worten hieße das: Steigt die Abscheidungsfläche mit dem Partikelwachstum, verringert sich die Dicke der jeweils neuen Schicht und das Partikelwachstum wird verlangsamt.

3.2.1. Bedeckungsdichte der planaren Oberfläche

Die kolloidalen Lösungen wurden auf eine einheitliche Endkonzentration von 2×10^{11} Partikeln pro ml entsprechend Herstellerangaben durch Verdünnung bzw. Aufkonzentrierung (Zentrifugation) eingestellt und als Tropfen auf den Chip appliziert. Die resultierenden Partikeldichten auf der Chipoberfläche variierten von 7×10^7 (Au60) bis 4×10^8 (Au15) Partikel je cm^2 . Dabei waren die Partikel im Allgemeinen gut voneinander getrennt (durchschnittlich $0,25\text{--}1,5 \mu\text{m}$), was signifikante Wechselwirkungen zwischen benachbarten Partikeln vermeiden sollte.

3.2.2. Einfluss der Verstärkungslösung

Zur Signalverstärkung licht- und elektronenmikroskopischer Präparate werden kommerzielle Silberverstärkungskits angeboten. Darüber hinaus existieren zahlreiche Rezepte für selbst herzustellende Verstärkungslösungen. Um die Effizienz und Wachstumseigenschaften ausgewählter Lösungen (mit unterschiedlicher Zusammensetzung an Metallsalzen und/oder Reduktionsmitteln) zu charakterisieren, wurden neben drei kommerziellen Silberverstärkungskits (*Sigma*, *BBI*, *Aurion*) mehrere selbst hergestellte Lösungen (AgAc, AgNO₃ bzw. HAuCl₄) verwendet (Abschnitt *Metallkatalysierte Metallabscheidung* im Kapitel *Material und Methoden*, für detaillierte Rezepte siehe Tab. B.3). Diese wurden entsprechend Herstellerangaben jeweils als Tropfen auf einen thermisch oxidierten Siliziumchip mit immobilisierten Goldnanopartikeln (30 nm Durchmesser) gegeben.

Die meisten der Lösungen zeigten eine vergleichbare Verstärkungsintensität, welche nach 10 min Verstärkungszeit in Partikelhöhen von 61 nm (AgNO₃) bis 86 nm (HAuCl₄) resultierten (Tab. 3.2). Eine Ausnahme bildete dabei der *BBI*-Verstärkungskit, der zu deutlich größeren Endhöhen von 437 nm führte. Die dazugehörigen Wachstumskurven (Partikelhöhen im Verlauf der Verstärkungszeit) sind in Abb. 3.9 dargestellt. Für eine bessere Darstellbarkeit aller Wachstumskurven wurden die *BBI*-Daten im Diagramm (auf 1/6) angepasst. Um die verschiedenen Verstärkungsintensitäten miteinander vergleichen zu können, wurde die Wachstumsgeschwindigkeit aus den Höhendaten abgeleitet. Wie aus den Endhöhen zu erwarten war, wuchsen die durch *BBI* verstärkten Partikel mit etwa 8-fach höherer Geschwindigkeit (oberes linkes Inset).

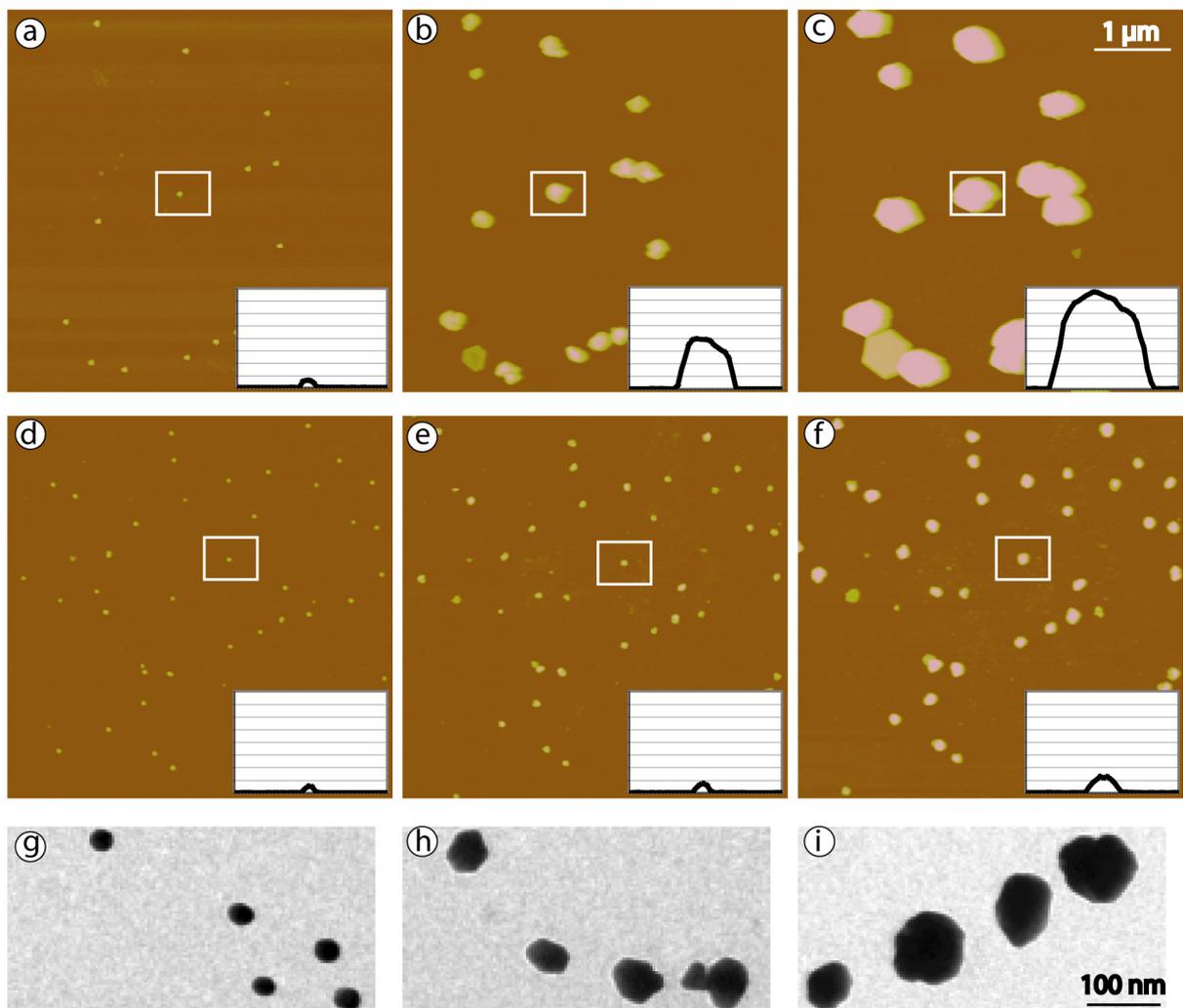


Abb. 3.7: Rasterkraftmikroskopische Analyse des Wachstums von Goldnanopartikeln durch Silberabscheidung (oben) bzw. Goldabscheidung (Mitte) auf Einzelpartikelebene. Die $5 \times 5 \mu\text{m}$ Topografiebilder zeigen ein und dieselben Au₃₀-Partikel vor (a, d), nach 4 min (b, e) und 8 min (c, f) Metallverstärkung. Die Insets zeigen Schnitte ausgewählter Partikel als Beispiel (800 nm Breite, 400 nm Höhe). Transmissionselektronenmikroskopische (TEM-) Aufnahmen (unten) ermöglichen die Unterscheidung von Kern/Hülle-Strukturen der wachsenden Partikel (Au₃₀ vor und nach 2 bzw. 4 min Silberverstärkung). Der kaum sichtbare Kontrastunterschied entspricht dem dichten Goldkern und der weniger dichten Silberhülle. (Zur Beachtung: In den TEM-Studien war es uns nicht möglich, ein und dieselben Partikel während der Verstärkung zu beobachten.)

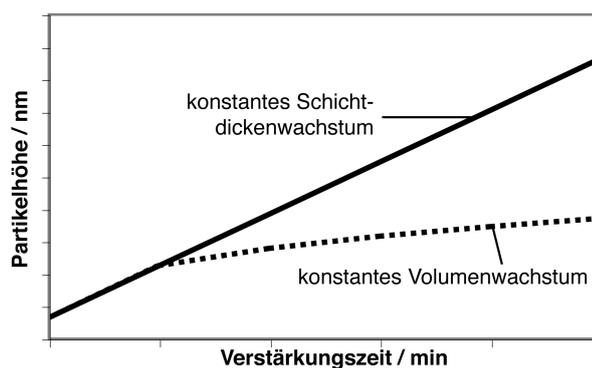


Abb. 3.8: Modelle zum Nanopartikelwachstum auf Oberflächen infolge Metallabscheidung. Im Verlaufe der Verstärkung steigen die Partikelhöhen mit konstantem Schichtdicken- (durchgezogen) bzw. Volumenwachstum (gepunktet).

Tab. 3.2: Daten verschiedener Wachstumskurven nach 10 min Verstärkung in Abhängigkeit vom verwendeten Metallverstärkungskit: Finale Partikelhöhe, Standardabweichung (SD) und Wachstumsrate (10 min-Wert)

KIT	HÖHE [NM]	ABS. SD [NM]	REL.SD [%]	RATE [NM/MIN]
<i>Sigma</i>	70	17	24	4
<i>BBI</i>	437	38	9	41
<i>Aurion</i>	85	10	12	5
AgAc	83	9	11	5
AgNO ₃	61	8	13	3
HAuCl ₄	86	21	24	6

Die Messungen offenbarten eine lineare Abhängigkeit der Partikelhöhe von der Verstärkungszeit (Abb. 3.9), was ein unlimitiertes Wachstum mit konstantem Schichtdickenzuwachs (Abb. 3.8) vermuten lässt.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurde der Verbrauch an Silberionen aus der Verstärkungslösung für die Silberacetat-Verstärkung von Au₃₀-Partikeln als Beispiel theoretisch kalkuliert. Aus den gemessenen experimentellen Werten wurde für eine gegebene Partikelkonzentration ($0,92 \times 10^7$ je cm²) auf einem 7×7 mm-Chip und einer Wachstumsrate von 5 nm pro min nach 5×2 min Verstärkung eine Abscheidung von durchschnittlich $0,036 \mu\text{g}$ Silber auf den Goldkeimen abgeleitet. Um diesen theoretischen Wert zu untermauern, wurde die Menge an abgeschiedenem Silber auf der Chipoberfläche quantitativ mittels Grafitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS) analysiert (Tab. 3.3). Von der gemessenen Silberionenkonzentration wurde der Leerwert von $0,3 \mu\text{g/l}$ (Chip mit immobilisierten Goldnanopartikeln ohne Silberabscheidung) subtrahiert (c_{Ag}) und die Menge an abgeschiedenem Silber berechnet (m_{Ag}), wobei eine durchschnittliche Silberablagerung von $0,06 \mu\text{g}$ pro Chip bestimmt wurde. Die Differenz zwischen diesem und dem theoretisch kalkulierten Wert von $0,036 \mu\text{g}$ ist wahrscheinlich auf unspezifische Silberabscheidungen auf dem Chip zurückzuführen.

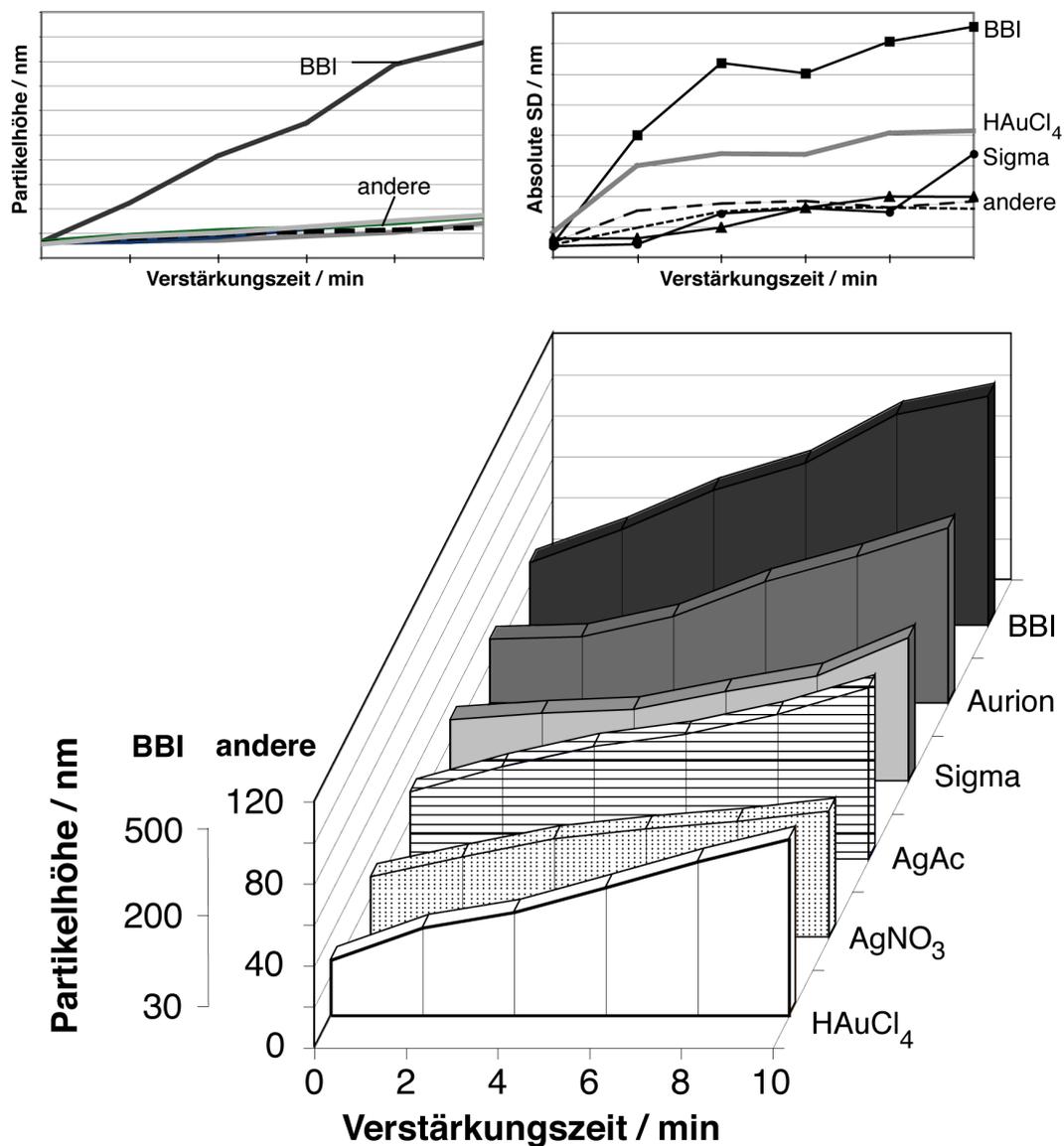


Abb. 3.9: Wachstum von Goldnanopartikeln (Au₃₀) in Abhängigkeit von der verwendeten Metallverstärkungslösung. Die Partikelhöhen wurden gegen die Verstärkungszeit (10 min) aufgetragen. Zur Beachtung: Die BBI-Daten wurden für bessere Lesbarkeit angepasst (1/6 der Originalhöhen). Insets: Diagramm mit originalen BBI-Höhendaten (oben links) bzw. den absoluten Standardabweichungen (SD; oben rechts).

Der so ermittelte Bedarf an Silber wurde anschließend mit der zur Verfügung gestellten Silbermenge verglichen. Der applizierte 35 μl -Tropfen einer Silberacetat/Hydrochinon-Mischung enthielt 1,29 $\mu\text{g Ag}^+ / \mu\text{l}$ Silberacetatösung, was einer Masse von 22,6 μg Silber entsprach. Dies korrespondiert mit einem offensichtlichen Überschuss von mindestens drei Größenordnungen im Vergleich zu den theoretisch und experimentell ermittelten Werten. Außerdem wurde die Verstärkungslösung alle zwei Minuten ausgetauscht.

Tab. 3.3: Quantitative Analyse der Silberablagerungen auf dem Chip bzw. den Goldpartikeln: experimentell ermittelte Silberkonzentration (c_{Ag}) mit absoluter und relativer Konfidenz (Konf.) und davon abgeleitete Silbermasse (m_{Ag}) auf dem Chip sowie theoretisch kalkulierte Masse der Silberhüllen ($m_{\text{Ag Hülle}}$) und dabei zugrunde gelegte Partikelkonzentration auf der Chipoberfläche (c_{Partikel}).

CHIP	EXPERIMENTELL			THEORETISCH		
	c_{Ag} [$\mu\text{G L}^{-1}$]	ABS. KONF. [$\mu\text{G L}^{-1}$]	REL. KONF. [%]	m_{Ag} [μG]	$m_{\text{Ag HÜLLE}}$ [μG]	c_{PARTIKEL} [Part. cm^{-2}]
1	3,265	0,210	5,9	0,082	0,049	$1,25 \times 10^7$
2	1,268	0,207	13,2	0,032	0,029	$0,75 \times 10^7$
3	2,686	0,201	6,7	0,067	0,030	$0,77 \times 10^7$
MW	2,406	0,206	8,6	0,060	0,036	$0,92 \times 10^7$

Neben reinen Partikelhöhen und abgeleiteter Wachstumsgeschwindigkeit erlaubt die Standardabweichung eine weitere Charakterisierung der Partikelverstärkung. Sie liefert Hinweise zur Verteilung der Partikelgrößen und variierte von 11% (*BBI*, *Aurion*, AgAc , AgNO_3) bis 24% (*Sigma*, HAuCl_4) (Tab. 3.2). Dies entspricht nach Brown et al. (2000b) einer hoch bzw. moderat monodispersen Partikelgrößenverteilung. Des Weiteren wurde eine steigende Standardabweichung mit zunehmender Verstärkungszeit beobachtet, d.h. die Partikel wuchsen divergent, wie im oberen rechten Inset in Abb. 3.9 sichtbar ist.

3.2.3. Spezifität der Verstärkung

Neben den Partikelhöhen offenbarten die AFM Bilder verschieden homogene Verstärkungseffekte der untersuchten Lösungen. *BBI* und HAuCl_4 stellten sich als sehr spezifisch heraus, d.h. nur die Metallpartikel wurden verstärkt, wohingegen der Hintergrund nahezu frei von zusätzlicher Metallabscheidung blieb (Abb. 3.10 a, c, e am Bsp. HAuCl_4). Demgegenüber führten besonders *Sigma* und AgNO_3 zu einem deutlichen Hintergrundniveau, was sich in den rasterkraftmikroskopischen Bildern als inhomogene Rauigkeiten darstellte (Abb. 3.10 b, d, f am Bsp. *Sigma*).

3.2.4. Einfluss der Ausgangsgröße der Partikel

Nachdem das Wachstumsverhalten der Partikel und die verschiedenen Verstärkungseffekte der Lösungen bekannt waren, sollte untersucht werden, ob die Ausgangsgröße der Nanopartikel, also der Reduktionskeime, einen Einfluss auf ihre Wachstumsgeschwindigkeit hat. Aus diesem Grund wurde eine schrittweise Silberabscheidung auf Goldnanopartikeln

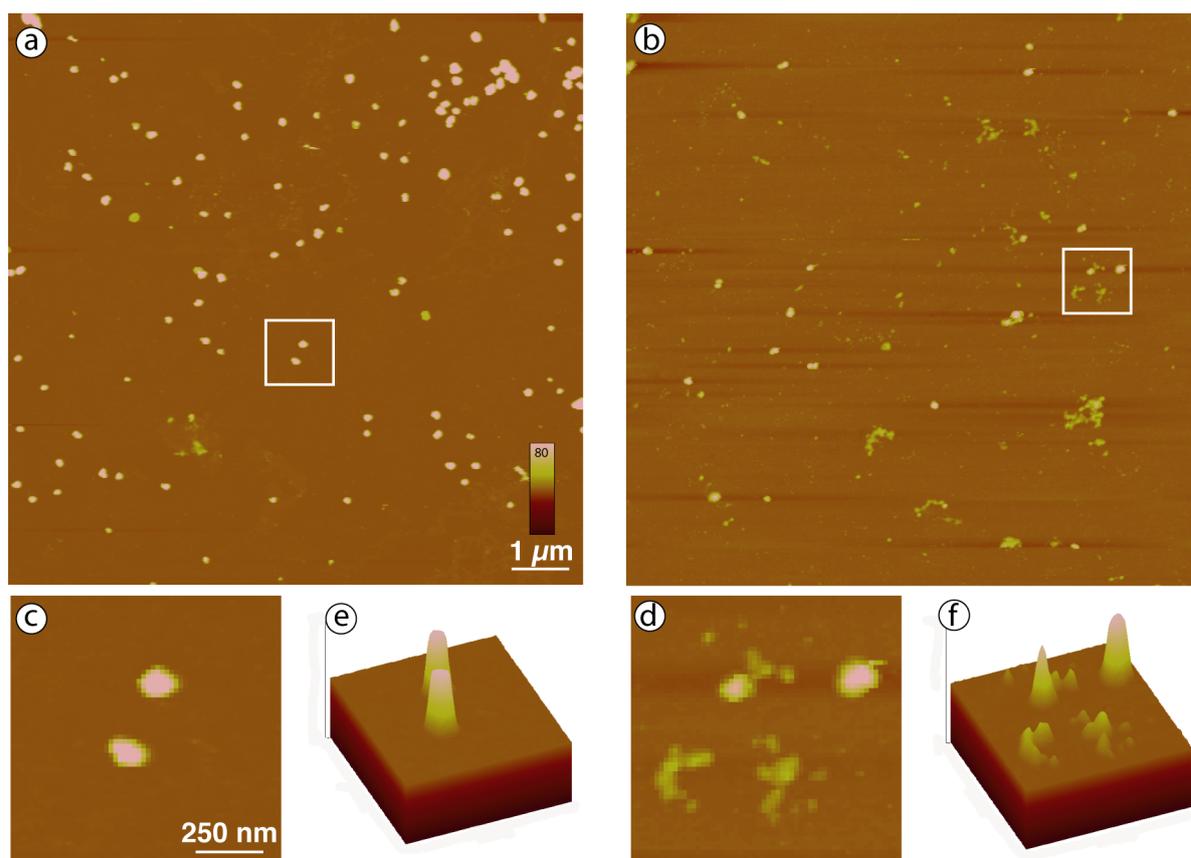


Abb. 3.10: Rasterkraftmikroskopische Analyse der Spezifität der Metallabscheidung verschiedener Verstärkungslösungen. Au30-Partikel wurden für 3×2 min mittels Gold- ($\text{HAuCl}_4/\text{NH}_2\text{OH}$, links) bzw. Silberverstärkung (Sigma, rechts) verstärkt. Die Aufnahmen zeigen $10 \times 10 \mu\text{m}$ Topografiebilder als Übersicht (a, b; 80 nm Höhengskala), $1 \times 1 \mu\text{m}$ -große Detailaufnahmen einzelner Partikel (c, d) und perspektivische Darstellungen dieser Partikel (e, f).

verschiedener Durchmesser (15, 30 und 60 nm) durchgeführt: Au15, Au30, Au60. Für diese Untersuchungen wurde mit *BBI* die effektivste Verstärkung bei hoher Spezifität ausgewählt. Wie erwartet, erreichten die größten Partikel (Au60) die höchsten Endgrößen von etwa 547 nm, wohingegen Au30 und Au15 nach 10 min Verstärkung auf 437 bzw. 258 nm anwuchsen (Tab. 3.4).

Alle Wachstumskurven zeigten im Verlauf der Verstärkungszeit ein lineares Wachstum mit konstantem Schichtdickenzuwachs (Abb. 3.11 a, Modelle in grau), was durch die gleichen experimentellen Bedingungen (geringe Partikelkonzentration auf der Oberfläche, Überschuss an Reagenzien sowie regelmäßiger Austausch) erklärbar ist.

Aus den Höhendaten wurden wiederum die entsprechenden Wachstumsraten (in nm/min) abgeleitet, welche interessanterweise mit der Partikelkeimgröße stiegen: Je größer die Ausgangspartikel, desto schneller das Wachstum. Dies ist in der Abbildung an den unterschiedlichen Steigungen der Wachstumsgerade sichtbar. Die Wachstumsraten der einzelnen Keimgrößen wurden im Inset noch einmal separat aufgetragen.

Tab. 3.4: Daten verschiedener Wachstumskurven nach 10 min Verstärkung in Abhängigkeit vom Durchmesser des Ausgangspartikels: Finale Partikelhöhe, Standardabweichung (SD) und Wachstumsrate (10 min-Wert)

GRÖSSE [NM]	HÖHE [NM]	ABS. SD [NM]	REL.SD [%]	RATE [NM/MIN]
15	258	38	15	24
30	437	38	9	41
60	547	76	14	49

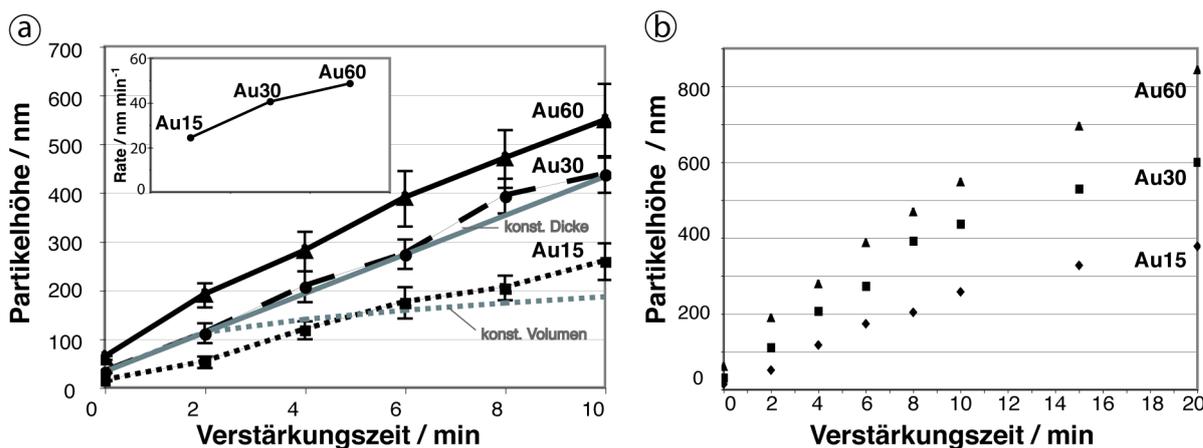


Abb. 3.11: Partikelwachstum durch Silberverstärkung in Abhängigkeit von der Größe der Ausgangspartikel (Au15, Au30 und Au60). Die absoluten Partikelhöhen wurden gegen die Verstärkungszeit aufgetragen. (a) Bei quasi-kontinuierlichem Austausch der Lösungen (Verstärkungsintervalle von 5×2 min) folgt das Wachstum einem linearen Verlauf, wie der Vergleich mit den integrierten Wachstumsmodellen (grau) zeigt: Lineares Wachstum mit konstanter Schichtdicke (durchgezogen) bzw. diffusionslimitiertes Wachstum mit konstantem Volumen (punktirt). Inset: Mit zunehmender Größe der Ausgangspartikel steigt die Wachstumsgeschwindigkeit [nm min^{-1}]. (b) Bei Verlängerung der Verstärkungsintervalle (2×5 min) wird das lineare Wachstum durch Verarmung der Lösungen an Reagenzien abgebremst.

3.2.5. Wachstumslimitierung/Verarmung an Reagenzien

Verlängerte Inkubationsintervalle

Eine andere interessante Frage ist ferner, ob bei längeren Verstärkungsperioden eine Limitierung in der Zufuhr des Silbersalzes und/oder Reduktionsmittels auftritt. Für die ersten 10 min Verstärkung schien die regelmäßige Zufuhr frischer Lösungen aller 2 min sicherzustellen, dass keine Verarmung (Depletion) an Reaktionspartnern auftrat. Diese Annahme wurde durch die beobachtete lineare (unlimitierte) Wachstumscharakteristik gestützt. Verlängerte man jedoch die Verstärkungsintervalle von 2 auf 5 min, wurde eine Verlangsamung des Wachstums beobachtet (Abb. 3.11 b), was auf eine beginnende Limitierung hinweist.

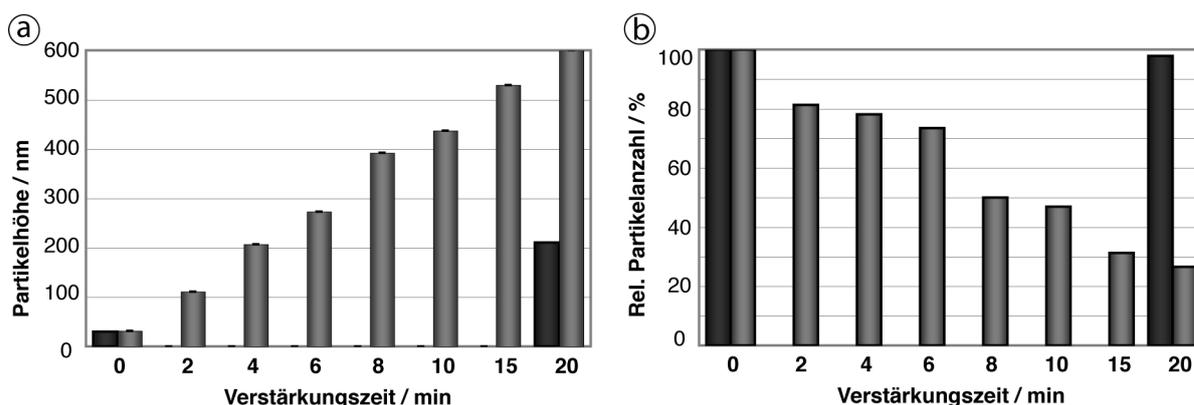


Abb. 3.12: Wachstum von Goldnanopartikeln und relative Anzahl an Partikeln bei Verstärkung in einem Schritt (schwarz) bzw. schrittweiser Silberverstärkung (grau). Die Partikelhöhen (a) und relative Partikelanzahl (b) wurden gegen die Verstärkungszeit aufgetragen.

Schrittweise Verstärkung im Vergleich zur Ein-Schritt-Verstärkung

Weiterführende Untersuchungen sollten klären, ob das Wachstum ohne einen konstanten Austausch der Verstärkerlösungen spürbar gehemmt wird. Dafür wurde die bisher durchgeführte schrittweise Silberverstärkung (5×2 min und 2×5 min) mit der Verstärkung in einem Schritt verglichen. Diese 20-minütige Verstärkung wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, d.h. unter Lichtausschluss (zur Vermeidung von Autonukleation) und konstanter Bewegung (zur Verringerung lokaler Depletion). Die Verstärkungslösung verblieb dabei ohne Zufuhr frischer Komponenten die gesamte Zeit auf dem Chip. Wie anhand der vorherigen Experimente erwartet, wurde bei der Ein-Schritt-Verstärkung im Vergleich zur schrittweisen eine deutlich geringere mittlere Partikelhöhe gemessen: 210 ± 23 nm versus 600 ± 76 nm nach 20 min Silberabscheidung auf Au₃₀-Partikeln mittels *BBI*-Verstärkungskit (Abb. 3.12 a). Das deutet darauf hin, dass Metallsalz und/oder Reduktionsmittel während des Verstärkungsprozesses verbraucht worden sind.

3.2.6. Partikelanzahl/Partikelablösung von der Oberfläche

Zusätzlich zu den gemessenen Partikelhöhen kann man die Anzahl der Partikel auswerten, die über die Verstärkungsschritte auf der Oberfläche verbleiben. Wie für eine unspezifische (im Gegensatz zur kovalenten) Partikelimmobilisierung erwartet, war ein gewisser Verlust an Partikeln über die Zeit und die wiederholten Verstärkungs-, Wasch- und Trocknungsschritte zu verzeichnen. Dabei waren weniger die absoluten Partikelzahlen interessant, sondern vielmehr die relative Partikelanzahl (Anteil), d.h. der Vergleich der am Ende verfügbaren Partikel mit derjenigen vom Ausgangszustand (Startbild). Interessanterweise variierte der Partikelverlust deutlich unter den verschiedenen Verstärkerlösungen. So waren nach 10 min bei der Verstärkung mit *Sigma* nur noch 17%, bei der Goldverstärkung mit H₂AuCl₄ jedoch noch 86% der ursprünglichen Partikel auf der Chipoberfläche präsent (Abb. 3.13 a).

Auch beim Vergleich der verschiedenen Ausgangspartikelgrößen waren unterschiedliche Raten abgelöster Partikel während der *BBI*-Silberverstärkung festzustellen. Dabei sank

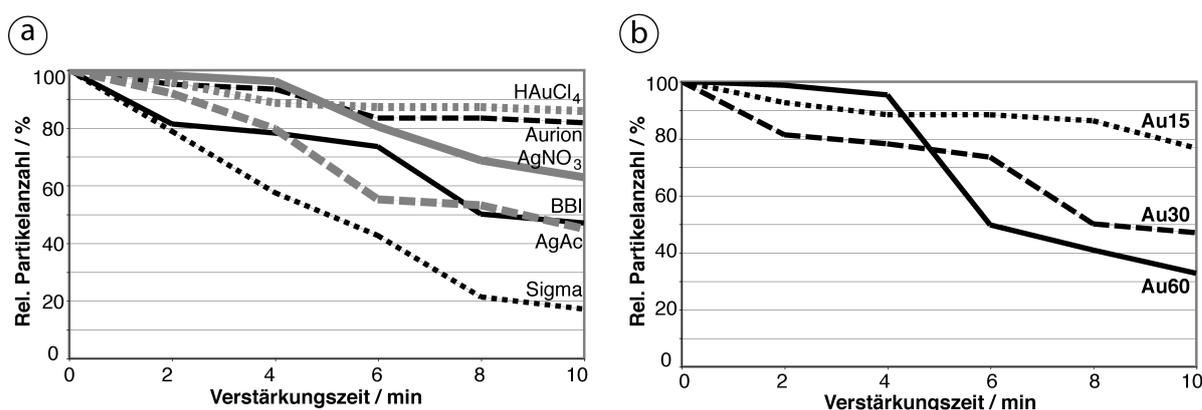


Abb. 3.13: Verfügbare Anzahl an Partikeln während des Verstärkungsprozesses. Die Anzahl der gemessenen Partikel, relativ zu ihrer Anzahl zu Beginn der Verstärkung, wurde gegen die Verstärkungszeit aufgetragen in Abhängigkeit von der verwendeten Verstärkungslösung (a) und der Ausgangsgröße der Partikel (b).

der Anteil der am Ende des Verstärkungsprozesses noch verfügbaren Partikel mit steigender Größe der Ausgangspartikel (77%, 47% und 33% für Au15, Au30 bzw. Au60 in Abb. 3.13 b).

Des Weiteren wurden die Ablösung der Partikel von der Chipoberfläche zwischen der schrittweisen Silberabscheidung und Verstärkung in einem Schritt verglichen. Dabei waren bei letzterer nach 20 min *BBI*-Silberverstärkung noch nahezu alle Partikel (98%) auf der Oberfläche präsent, wohingegen durch das wiederholte Chip-Handling der schrittweisen Verstärkung nur noch 27% der Partikel analysiert werden konnten (Abb. 3.12 b).

3.3. Partikelwachstum im Elektrodenspalt – Leitfähigkeit

Der elektrisch-resistive Nachweis beruht auf der Ausbildung leitfähiger Brücken zwischen einzelnen Elektroden. Nachdem die im Elektrodenspalt immobilisierte Fänger-DNA mit der zu analysierenden Biotin-markierten Ziel-DNA hybridisiert wurde, kann letztere direkt (Anbindung von Streptavidin-Goldnanopartikeln, Abb. 2.5 e, Seite 22) oder indirekt (Anbindung einer Streptavidin-Peroxidase und nachfolgende Metallentwicklung, Abb. 2.5 f, i) mit leitfähigen metallischen Strukturen versehen werden. Bei genügender Dichte dieser Metallstrukturen wird der Elektrodenspalt überbrückt und ein deutlicher Widerstandsabfall ist messbar. Werden in den Elektrodenspalten Fängerproben verschiedener Sequenz immobilisiert, kann über die Bedeckung mit Metallstrukturen und so über die gemessenen Widerstände auf die Komplementarität und damit die Sequenz der Ziel-DNA geschlossen werden.

3.3.1. Metallkatalysierte Silberabscheidung an Goldnanopartikeln

In Anlehnung an die Studien zum metallkatalysierten Nanopartikelwachstum im Abschnitt 3.2 *Charakterisierung des Partikelwachstums* ab Seite 36 sollte nun das Nanopartikelwachstum im Hinblick auf die Ausbildung leitfähiger Partikelbrücken im Elektrodenspalt untersucht werden. Um den Versuch anwendungsnah zu gestalten und eine Ablösung der Nanopartikel durch wiederholte Inkubationsprozesse zu verhindern, wurden die Goldnanopartikel hierbei nicht unspezifisch an den Siliziumträger, sondern spezifisch über die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung gebunden. Dafür wurden mikrostrukturierte, elektrisch auslesbare Si-Chips (ACED mit 10 μm Elektrodenspalt) mit GOPS silanisiert und anschließend mit verschiedenen Fänger-Oligonukleotiden des *GST*-Systems funktionalisiert: komplementäre Sequenz (Ko, *GSTM3a2*), Sequenz mit drei *Mismatches* (MM, 3-Basenpaardeletion in *GSTM3b*), nichtkomplementäre Negativkontrolle (NK, *GSTP1*) sowie eine direkt Biotin-markierte Positivkontrolle (PK, *NS150B*). Zur Beobachtung des Hintergrundes (HG, unspezifische Bindungen/Metallablagerungen) blieben zwei Elektrodenspalte frei, d.h. ohne Fänger-DNA. Nach der Funktionalisierung wurden die Chips mit biotinyliertem *GSTM3A2* als modellhaftes Ziel-Oligonukleotid hybridisiert. Durch stringente Waschprozesse wurden unspezifisch gebundene Moleküle weitgehend entfernt und die verbliebenen komplementären, Biotin-modifizierten Doppelstränge konnten nun mit Streptavidin-Goldnanopartikeln (15 nm Durchmesser, STP-Au15) markiert werden. Auch hieran schloss sich ein Waschprozess an, der unspezifisch abgelagerte Goldnanopartikel entfernen sollte. Die Chips wurden anschließend schrittweise (jeweils 2 min) mit *BBI* (*Silver Enhancement Kit*TM, BBInternational, Cardiff, UK) als demjenigen Silberverstärkungskit behandelt, welcher sich als spezifisch und besonders effektiv erwiesen hatte. Zwischen den einzelnen Verstärkungsschritten wurden die ACED jeweils elektrisch vermessen und im AFM untersucht.

Experimentelle Daten

AFM Basis der Charakterisierung des Nanopartikelwachstums waren rasterkraftmikroskopische Untersuchungen, wobei mehrere Elektrodenspalte (10 μm breit, Elektrodenkanten als helle Bereiche oben und unten) ausgewählter Fängersequenzen untersucht wurden. Abb 3.14 zeigt am Beispiel von komplementärer Fängersequenz (Ko, a–d) und Negativkontrolle (NK, e–h) das Nanopartikelwachstum im Verlauf der Silberverstärkung. Die unverstärkten 15 nm-großen Goldpartikel, zu Beginn (mit der verwendeten Höhenskala) kaum sichtbar, wuchsen bei den positiven Proben (Ko und PK) sichtbar in Abhängigkeit von der Verstärkungszeit, bis sie nahezu den gesamten Elektrodenspalt ausfüllten. Auch bei den negativen Proben (MM, NK, HG) waren zu Beginn um 10–20 nm große Strukturen erkennbar, wenn auch deutlich weniger. Einige dieser Strukturen wuchsen infolge der metallkatalytischen Silberabscheidung sichtbar heran (Abb. 3.14 f–h). Die Proben wurden schrittweise (jeweils 2 min) solange verstärkt, bis bei den positiven Proben in den untersuchten Elektrodenspalten Leitfähigkeit messbar war (10 min bei Ko, 12 min bei PK). Bei den negativen Proben war die Dichte der vereinzelter Partikel im Elektrodenspalt jedoch auch nach 12-minütiger Silberverstärkung noch nicht ausreichend, um messbare Leitfähigkeiten zu erzeugen.

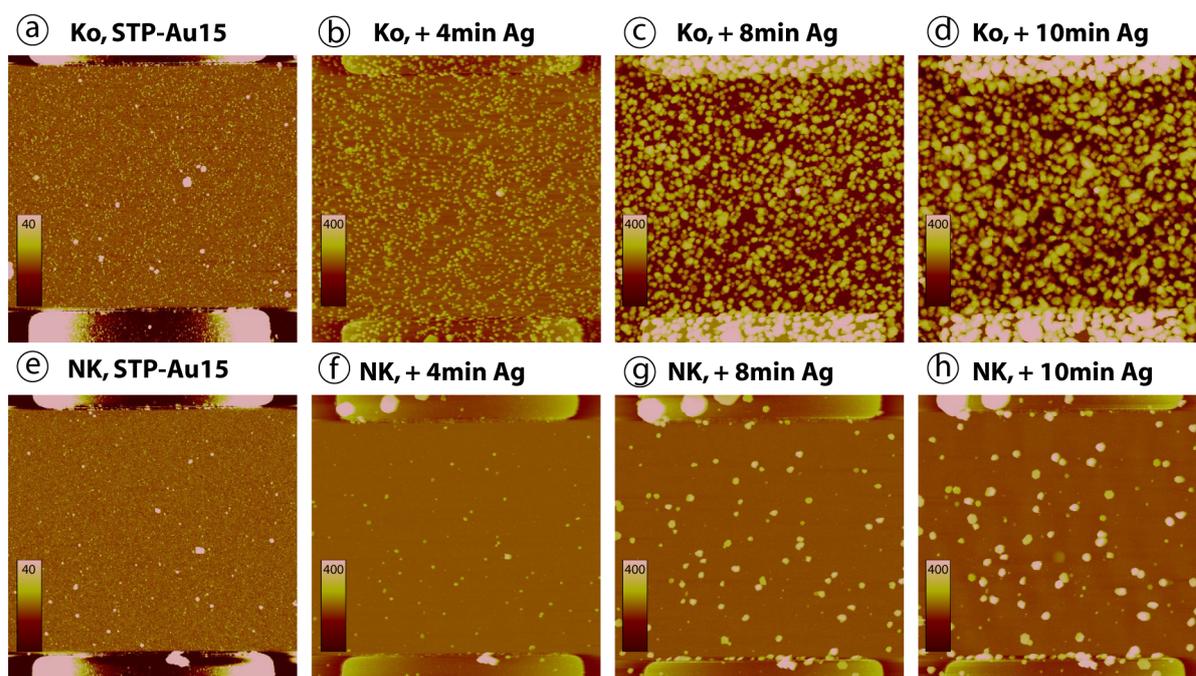


Abb. 3.14: Rasterkraftmikroskopische Untersuchung der metallkatalysierten Silberverstärkung im Elektrodenspalt. Die verschiedenen Fängerproben wurden mit dem biotinylierten Oligonukleotid GSTM3A2 hybridisiert. Nach Anbindung von Streptavidin-Goldnanopartikeln (STP-Au15) wurde der mikrostrukturierte Chip ($10\ \mu\text{m}$ Elektrodenspalt) schrittweise ($5 \times 2\ \text{min}$ BBI) bis zum Eintritt der Leitfähigkeit verstärkt: AFM-Aufnahmen (a, e) unverstärkter Proben sowie nach (b, f) 4 min; (c, g) 8 min; (d, h) 10 min Silberverstärkung. Die erfolgreiche Hybridisierung an (a–d) komplementärer Fänger-DNA (Ko) führte zu zahlreich gebundenen Goldpartikeln, welche durch wiederholte Silberabscheidungen zu einem leitfähigen Metallfilm verschmolzen. Bei der (e–h) nichtkomplementären Negativkontrolle (NK) kam es dagegen nur zu einer unspezifischen Metallabscheidung ohne leitende Brücken. ($12 \times 12\ \mu\text{m}$ Kantenlänge; 400 nm Höhenskala außer a, e: 40 nm Höhenskala)

Bei den vereinzelt sehr hellen Strukturen in den Anfangsbildern (Abb 3.14 a, e) handelte es sich um unspezifische Ablagerungen/Verunreinigungen, die wesentlich höher und größer als die applizierten Goldnanopartikel waren und auch in den Elektrodenspalten ohne Fänger-DNA gefunden wurden. Diese Strukturen wuchsen im Verlauf der Silberverstärkung meist nur unwesentlich.

Relative Metallbedeckung Die in den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen dargestellten metallischen Partikel sollten nun im Hinblick auf die Entstehung elektrischer Leitfähigkeit quantifiziert werden. Um die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung leitfähiger Brücken zu beschreiben, erschien die Bestimmung der metallbedeckten Fläche im Spalt sinnvoll. Ein Vergleich mit den elektrisch-resistiven Messungen sollte feststellen, welches Maß an “bildlicher” Metallabscheidung im Spalt mit einer real messbaren Leitfähigkeit einhergeht. Mit den im Kapitel 2 *Material und Methoden* beschriebenen Bildanalyseverfahren (Abschnitt *Partikelerkennung*) wurden die originalen AFM-Bilder mit einem Schwellenwert (festzulegende “Schnitthöhe”) in binäre Bilder umgewandelt. Anschließend konnte

der Flächenanteil der (metallischen) Partikel im Spalt bestimmt werden. Dabei erwies sich eine ‘‘Schnitthöhe’’ von 100 nm als Schwellenwert zur Umwandlung in binäre Bilder besonders geeignet, da hierbei gemessene elektrische Leitfähigkeit und grafische Durchgängigkeit am besten korrelierten. In Abb. 3.15 b wurde das grafisch ermittelte Ausmaß der Metallabscheidung beider positiven Proben (Ko, PK) sowie der Negativkontrolle (NK) in Abhängigkeit von der metallkatalytischen Verstärkungszeit dargestellt. Dabei zeigte sich ein linearer Anstieg des Anteils der metallbedeckten Fläche im Spalt mit zunehmender Silberverstärkungszeit. Die relative Metallbedeckung beider positiven Fängerproben übertraf mit 74% (10 min-Wert) die der Negativkontrolle (5%) deutlich. Zusammen mit den in Abb. 3.15 a dargestellten Ergebnissen der Widerstandsmessungen wurde ein metallischer Bedeckungsgrad von 50–70% als Schwelle zur Leitfähigkeit (im Diagramm mit ‘‘*’’ markiert) ermittelt.

Leitfähigkeit Parallel zur rasterkraftmikroskopischen Charakterisierung wurden die Proben elektrisch vermessen. In Abb. 3.15 a wurden die ermittelten Leitwerte in Abhängigkeit von der metallkatalytischen Verstärkungszeit für die verschiedenen Fängersequenzen dargestellt. Nach 10 min wurde beginnende Leitfähigkeit (Leitwert $> 1 \times 10^{-5}$ S) für die komplementäre Sequenz (Ko) gemessen. Nach 12 min war darüber hinaus auch die direkt Biotin-markierte Positivkontrolle (PK) deutlich leitfähig. Demgegenüber zeigten die Elektrodenspalte ohne passende Sequenzen (MM, NK und HG) keinen Widerstandsabfall.

Theoretische Daten/Simulation

Um anhand der Ausgangsbilder mögliche Vorhersagen über das Wachstum vorhandener Metallkeime durch eine Metallverstärkung machen zu können, sollten die experimentellen Daten um theoretische Simulationen des Wachstums vorhandener Partikel ergänzt werden (Abb. 3.16 am Beispiel der komplementären Fängerprobe [Ko, a–e] sowie der nichtkomplementären Negativkontrolle [NK, f–j]).

Grafische Wachstumssimulation und ‘‘Leitfähigkeit’’ Die dafür notwendigen binären Bilder wurden über zweierlei Ansätze aus den rasterkraftmikroskopischen Ausgangsbildern (unverstärkte Goldnanopartikel im Spalt als kleine, helle Punkte in Abb. 3.16 a, f) gewonnen. Nach Subtraktion des Hintergrundes im Bild wurde mit einem Schwellenwert von 7 nm (halbe Partikelhöhe bei 15 nm-großen Partikeln) ein binäres Bild erzeugt, in dem sich die Partikel als schwarze ‘‘Masken’’ auf weißem Hintergrund darstellten (siehe auch *Bildanalyse* im Abschnitt 2.2.4 *Charakterisierungsmethoden* mit Abb. 2.7 b, Seite 28). Eine weitere Methode ermöglichte den Ausschluss möglicherweise vorhandener unspezifischer und nichtmetallischer (und deswegen nicht zu verstärkender) Strukturen. Dazu wurden die Mittelpunktkoordinaten nur derjenigen Strukturen ermittelt, deren Größe der verwendeten Partikel entsprach. Diese dienten in der Wachstumssimulation anschließend als 1 px-große Startkeime. Zur Simulation des Partikelwachstums wurden die partikulären Keime schrittweise grafisch um jeweils 1 px vergrößert. Der Schichtdickenzuwachs war hierbei begrenzt durch die Auflösung der Bilder und betrug 24 nm pro Pixel. Die resultierenden grafisch ‘‘verstärkten’’ Elektrodenspalte wurden dabei jeweils einer

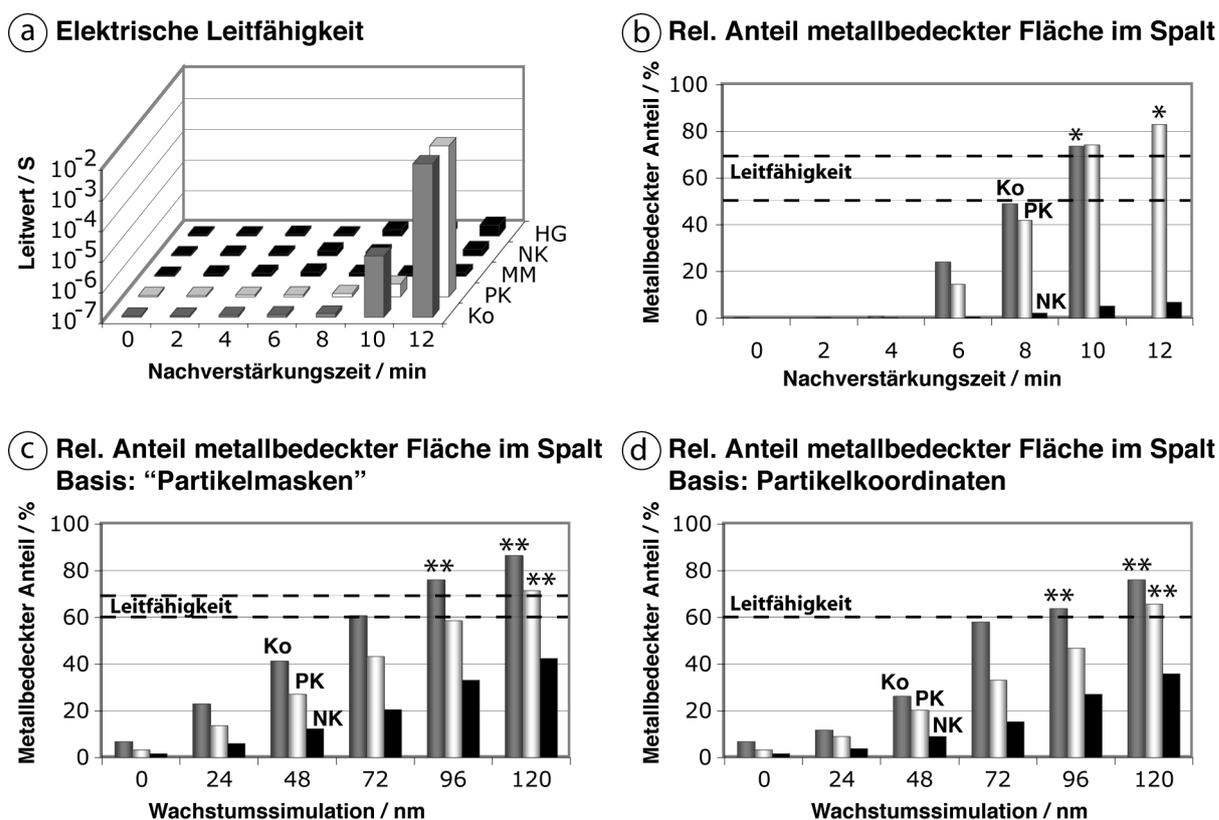


Abb. 3.15: Metallkatalysierte Silberverstärkung im Elektrodenspalt: Abhängigkeit der elektrischen Leitfähigkeit sowie der Metallbedeckung von der Verstärkungszeit. (a) Die elektrische Messung zeigte nach 10 bzw. 12 min Silberverstärkung eine Leitfähigkeit der beiden positiven Proben (Ko bzw. Ko und PK). (b) Die Analyse der AFM-Aufnahmen offenbarte eine lineare Abhängigkeit der Metallbedeckung (Schnitt in 100 nm Höhe) von der Verstärkungszeit, wobei eine 50–70% metallbedeckte Fläche im Elektrodenspalt leitfähige Brücken ermöglichte (*). (c, d) Exemplarisch wurde das Wachstum ausgewählter Proben (Ko, PK, NK) bis zur grafischen Durchgängigkeit (**) simuliert, wobei (c) reale, aus dem AFM-Bild in 7 nm-Schnitthöhe gewonnene "Partikelmasken" oder (d) deren 1 px-große Koordinaten als Startkeime dienten. Die Quantifizierung der grafischen "Metallbedeckung" offenbarte neben dem linearen Anstieg eine scheinbare Schwelle von 60–70 bzw. 60% zur Leitfähigkeit. (Ko–komplementär, PK–direkt biotinylierte Positivkontrolle, MM–Mismatches, NK–nichtkomplementäre Negativkontrolle, HG–Hintergrund ohne Fänger-DNA)

grafischen "Leitfähigkeitsprüfung" unterzogen. Im Elektrodenspalt wurden dafür zusammenhängende Bereiche (Partikelbrücken) identifiziert, welche obere und untere Elektrode miteinander verbanden. Der Wachstumsprozess wurde so lange wiederholt, bis die Partikel einander berührten und leitfähige Brücken zwischen den beiden Elektroden bildeten (bei den positiven Proben nach Wachstum um 4–5 px bzw. 96–120 nm Schichtdickenzuwachs erreicht; Tab. 3.5). Tendenziell mussten die Proben dabei mit der Koordinatenbasierten Methode länger verstärkt werden als mit derjenigen, welche "Partikelmasken" des Ausgangsbildes verwendete. Unabhängig von der Art der partikulären Keime konnte

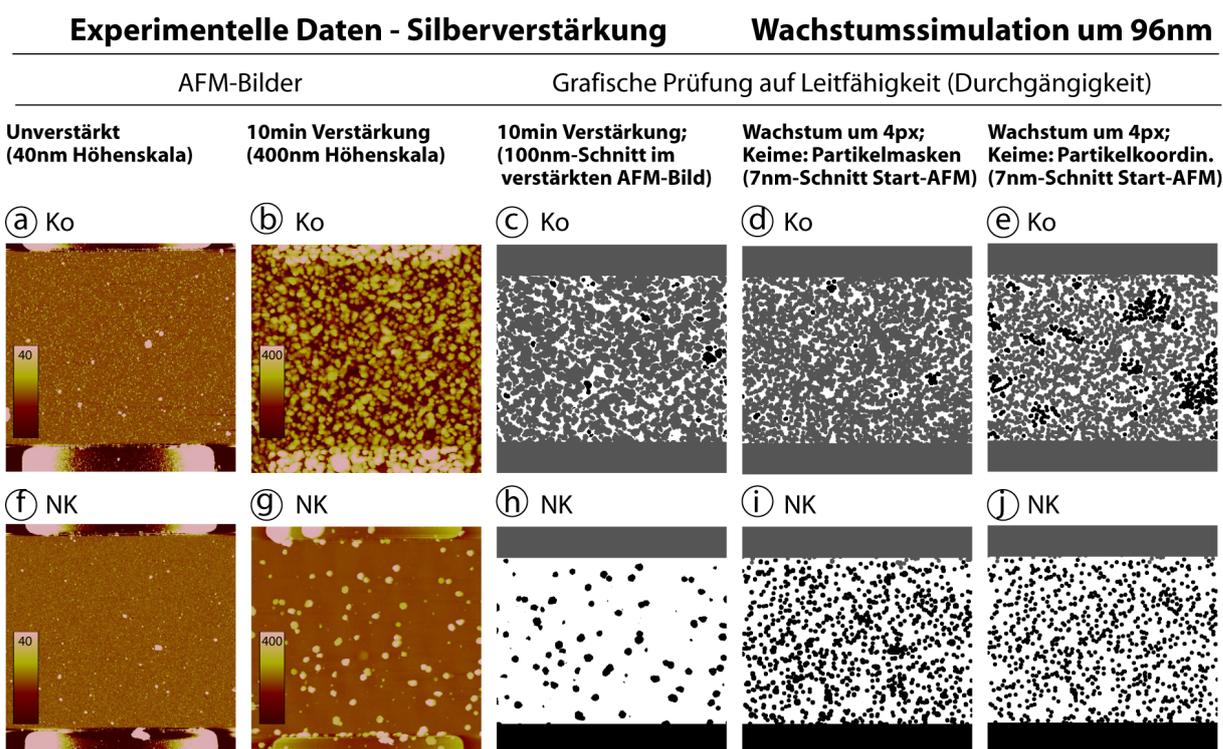


Abb. 3.16: Metallkatalysierte Silberabscheidung im Elektrodenspalt: Simulationen, basierend auf experimentell ermittelten Partikelkoordinaten. Dargestellt ist (a–e) die komplementäre Fängersequenz (Ko) und (f–j) die nichtkomplementäre Negativkontrolle (NK) in 10 μm -breiten Elektrodenspalten. Die AFM-Bilder zeigen (a, f) unverstärkte und (b, g) 10 min silberverstärkte Proben. Aus den AFM-Bildern der verstärkten Proben wurde in einer Höhe von 100 nm (Vernachlässigung des Hintergrundrauschens) eine Partikelerkennung und anschließend eine Prüfung auf grafische Leitfähigkeit durchgeführt. Während bei der (c) komplementären Probe die partikulären Bereiche zusammenhängend obere und untere Elektrode verbinden (graue Einfärbung beider Elektroden), bilden die Partikel der (h) NK keine leitfähige Verbindung (Einfärbung erreicht die untere Elektrode nicht). (d, i) Reale partikuläre Keime (7 nm-Schnitt im Ausgangs-Bild) bzw. (e, j) deren 1 px-große Mittelpunkte wurden grafisch solange vergrößert (4 px bzw. 96 nm), bis (d, e) bei der komplementären Probe eine grafische Verbindung beider Elektroden erzielt wurde. (i, j) Dieses simulierte Partikelwachstum reichte jedoch nicht, um bei der Negativkontrolle leitfähige Brücken zu erzeugen. (AFM-Bilder mit $12 \times 12 \mu\text{m}$ Kantenlänge, 40 bzw. 400 nm Höhengkala)

für die komplementäre Probe und Positivkontrolle, nicht aber für die Negativkontrolle Leitfähigkeit erreicht werden (Abb. 3.16 d, e und i, j für Ko bzw. NK).

Ergänzt wurden die theoretischen Wachstumssimulationen durch einen Vergleich mit real verstärkten Proben. Abb. 3.16 b, g zeigt die gleichen Elektrodenspalte nach 10-minütiger Silberverstärkung mit deutlich gewachsenen partikulären Strukturen. Diese AFM-Bilder der verstärkten Proben wurden in binäre Bilder (Schwellenwert 100 nm Höhe) umgewandelt und ebenfalls grafisch auf Leitfähigkeit geprüft (Abb. 3.16 c, h). Wie erwartet und elektrisch durch Widerstandsabfall gemessen, erwies sich auch hier die Probe mit der komplementären, nicht aber der nichtkomplementären Sequenz als leitfähig.

Relative Metallbedeckung Das nach 96 nm (Ko) bzw. 120 nm (PK) Schichtdickenzuwachs zur Leitfähigkeit (**) führende grafische Wachstum entsprach – abhängig von der Methode zur Erfassung der partikulären Wachstumskeime – einer metallbedeckten Fläche von 60–70% (Abb. 3.15 c, d) und lag damit im Bereich der experimentell ermittelten Grenze von 50–70%.

Vergleich experimenteller und theoretischer Ergebnisse

Tab. 3.5: Vergleich experimentell und grafisch ermittelter Schichtdickenzuwächse für eine elektrische Leitfähigkeit bzw. grafische Durchgängigkeit. Verschiedene Fängerproben (komplementäre Probe (Ko), Positiv- (PK) und Negativkontrolle (NK)) wurden nach Hybridisierung mit biotinyliertem Oligonukleotid mit Streptavidin-Goldnanopartikeln (STP-Au15) markiert und metallkatalytisch silberverstärkt (5 bzw. 6 × 2 min BBI). Verglichen wurde der experimentell ermittelte Höhenzuwachs Δh und der grafisch ermittelte Schichtdickenzuwachs Δd . Die Markierungen weisen auf real gemessene (*) bzw. grafisch ermittelte (**) Leitfähigkeit hin.

FÄNGER-DNA	ΔH EXPERIMENTELL [NM]	ΔD THEORETISCH [NM]
Ko	212*	$\leq 96^{**}$
PK	234*	$\leq 120^{**}$
NK	18	nicht leitfähig

Experimenteller Höhen- vs. theoretischer Schichtdickenzuwachs Interessant war nun, inwieweit der grafisch simulierte Schichtdickenzuwachs mit den experimentellen Daten korrelierte. Da in der Rasterkraftmikroskopie die laterale Ausdehnung von Strukturen stark abhängig von der Geometrie der AFM-Spitze ist, wurde der Höhenzuwachs der Partikel gemessen. Die Charakterisierung des Partikelwachstums auf Einzelpartikelebene war aufgrund der Vielzahl an Partikeln (ca. 2000 Partikel im Spalt) und deren Dichte auf der Oberfläche schwierig, da eine Verschmelzung benachbarter Partikel die Untersuchung einzelner Partikel z.T. unmöglich machte. Dennoch wurden beispielhaft aus der komplementären Fängerprobe einige vereinzelt liegende Partikel ausgewählt und deren Höhe entsprechend Abschnitt 2.2.4 *Charakterisierungsmethoden* analysiert. Dabei war wiederum ein lineares Wachstum der Partikel zu beobachten, welches von durchschnittlich $14,9 \pm 1,7$ nm zu $252 \pm 26,5$ nm anstieg und damit einen Höhenzuwachs von 237 nm erreichte. Die daraus resultierende Wachstumsrate stimmte mit derjenigen für unmodifizierte 15 nm-große Goldpartikel und gleicher Verstärkungslösung aus Abschnitt 3.2 (Tab. 3.4) überein und betrug 24 nm/min.

Um nicht nur eine Aussage über einzelne, ausgewählte Partikel treffen zu können, wurde der mittlere Höhenzuwachs der Partikel im gesamten Elektrodenspalt ermittelt, der aus der zur Ausbildung elektrischer Leitfähigkeit notwendigen Metallabscheidung resultierte (Tab. 3.5). Dafür wurden mithilfe der *Find Maxima*-Funktion des Bildanalyseprogramms ImageJ die Partikelhöhen vor und nach der experimentellen Silberverstärkung bestimmt und anschließend gemittelt. Für die beiden positiven Proben ergab sich ein mittlerer Höhenzuwachs von 212 und 234 nm (Ko bzw. PK), der sich bei Berücksichtigung unspezifischer Ablagerungen, annähernd widerspiegelt durch den Höhenzuwachs bei der nichtkomplementären Negativkontrolle, um jeweils 18 nm verringerte. Die experimentell

ermittelten Höhenzuwächse entsprachen damit in etwa dem Doppelten der simulierten Schichtdickenzuwächse von 96 bzw. 120 nm.

Elektrische Leitfähigkeit vs. grafische Durchgängigkeit Zur Verifizierung der grafischen Leitfähigkeitsprüfung wurden alle AFM-Bilder der rasterkraftmikroskopisch untersuchten Elektrodenspalte grafisch auf Durchgängigkeit geprüft und diese Ergebnisse mit den realen elektrisch-resistiven Messungen verglichen. Dabei konnte eine 100%-ige Übereinstimmung festgestellt werden. Alle Proben ohne Widerstandsabfall wiesen nur unvollständig zusammenhängende Bereiche auf und alle leitfähigen Proben zeigten grafisch durchgängige partikuläre Verbindungen zwischen beiden Elektroden.

3.3.2. Enzymkatalysierte Silberentwicklung

Da die Markierung mit Goldnanopartikeln z.T. mit unspezifischen Abscheidungen einherging (3.14 e–h), kam im Anwendungsbeispiel (Abschnitt 3.4) die relativ neue, enzymkatalysierte Metallentwicklung zum Einsatz, welche hier genauer untersucht wurde.

Experimentelle Daten

Die im Elektrodenspalt immobilisierten Fängerproben wurden mit biotinylierten Oligonukleotiden hybridisiert. Über die spezifische Biotin-Streptavidin-Bindung wurde anschließend ein Streptavidin-Peroxidase-Polymer gebunden (1 h bei 20°C). Nach Entfernung ungebundener Enzym-Komplexe wurden die Proben mit dem Silberentwicklungskit *EnzMet*TM (Nanoprobes Inc., Yaphank, NY, USA) über 15–300 s inkubiert. Da die Eintrocknung des Enzyms zu dessen Inaktivität führt, wurde diese enzymatische Metallentwicklung nicht schrittweise auf einem Träger, sondern auf verschiedenen Chips durchgeführt. Elektrodenspalte verschiedener Fängersequenzen und unterschiedlicher Silberentwicklungszeit wurden rasterkraftmikroskopisch untersucht. Die aufgenommenen Bilder wurden hinsichtlich der partikulären Bedeckungsdichte, d.h. der Metallabscheidung im Spalt, analysiert und zu den durchgeführten Widerstandsmessungen in Beziehung gesetzt.

AFM Abb. 3.17 zeigt eine Auswahl der aufgenommenen AFM-Bilder, in denen ein Elektrodenspalt (10 µm breit, Elektrodenkanten als helle Bereiche oben und unten) mit komplementärer Fängersequenz über verschiedene Zeiten der *EnzMet*TM-Silberentwicklung dargestellt wurde (Abb. 3.17 a–e). Dabei war deutlich eine Zunahme in Ausdehnung und Höhe (kodiert in Helligkeit) der partikulären Strukturen mit steigender Entwicklungszeit zu erkennen. Die hohe Spezifität der Metallabscheidung zeigte sich bei den teil- und nichtkomplementären Sequenzen (Abb. 3.17 f, g), welche zu keiner sichtbaren Metallabscheidung führten. Da eine Inkubation von 300 s bei der komplementären Sequenz zu ähnlich starker Metallablagerung wie bei der Positivkontrolle führte (Abb. 3.17 e, h), wurde die Inkubationsdauer von 5 min für alle nachfolgenden enzymatischen Silberentwicklungen des Anwendungsbeispiels gewählt.

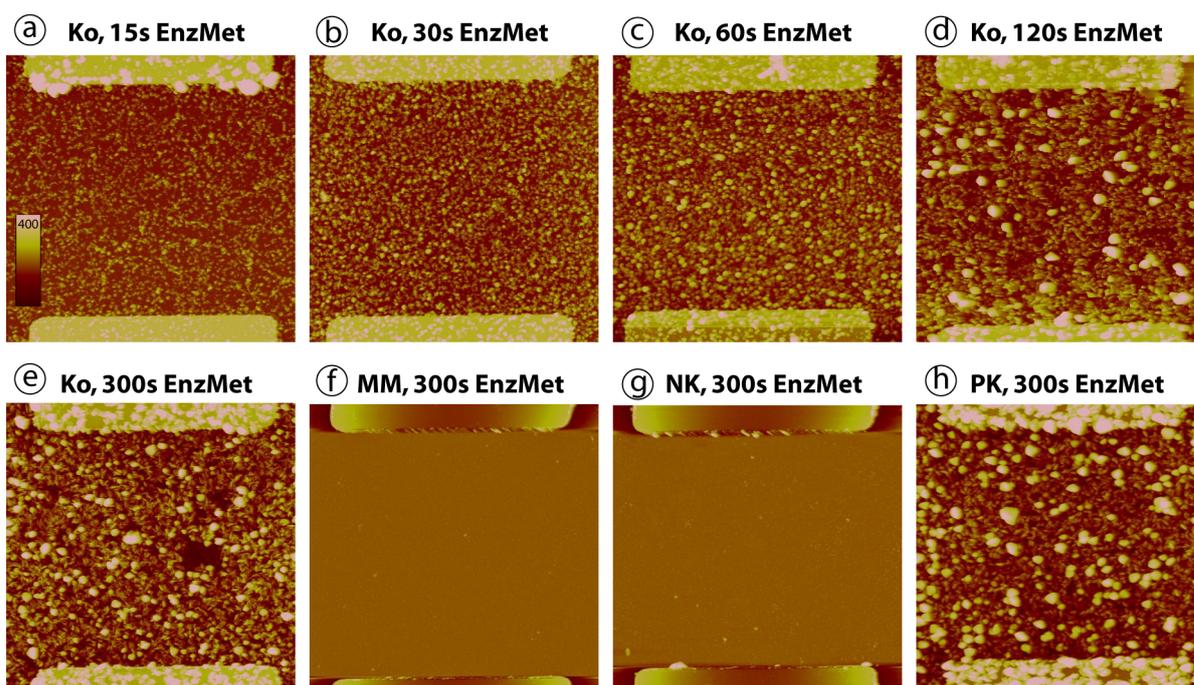


Abb. 3.17: Rasterkraftmikroskopische Untersuchung der enzymkatalysierten Silberentwicklung im Elektrodenspalt. Die verschiedenen Fängerproben wurden mit dem biotinylierten Oligonucleotid GSTM3A2 hybridisiert. Nach Anbindung des Enzyms Streptavidin-Peroxidase wurde der mikrostrukturierte Chip ($10\mu\text{m}$ Elektrodenspalt) (a) 15 s, (b) 30 s, (c) 60 s, (d) 120 s und (e) 300 s mit dem Silberentwicklungskit EnzMetTM inkubiert. Die AFM-Aufnahmen zeigen die (a–e) komplementäre Sequenz (Ko) in Abhängigkeit von der Entwicklungszeit sowie (f) eine Sequenz mit einem Mismatch (MM), (g) die nichtkomplementäre Negativkontrolle (NK) und (h) eine direkt Biotin-markierte Positivkontrolle (PK). Deutlich sichtbar nehmen bei Ko die Strukturen im Spalt mit steigender Entwicklungszeit zu. Die Spezifität der Metallentwicklung zeigen die Spalten von MM und NK, die nahezu frei von Abscheidungen sind ($12 \times 12\mu\text{m}$ Kantenlänge, 400 nm Höhenskala).

REM Da durch rasterkraftmikroskopische Untersuchungen nur Höhen-, aber keine Materialinformationen gewonnen werden können, wurde zusätzlich eine rasterelektronenmikroskopische (REM) Charakterisierung durchgeführt, bei der sich unregelmäßige metallische Strukturen besonders kontrastreich darstellten. In Abb. 3.18 wurden die zuvor im AFM untersuchten Elektrodenspalte (Abb. 3.17) rasterelektronenmikroskopisch abgebildet. Die deutlich zu erkennenden Ablagerungen im Spalt lassen klar auf metallische Strukturen schließen. Auch auf den REM-Aufnahmen war bei der komplementären Fängersequenz eine Zunahme dieser Metallabscheidung mit steigender Metallentwicklungszeit sichtbar (Abb. 3.18 a–e), wohingegen fehlende Metallstrukturen bei teil- bzw. nichtkomplementärer Sequenz (Abb. 3.18 f, g) die Spezifität des Nachweises unterstrichen.

Relative Metallbedeckung Die in den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen dargestellten partikulären Strukturen sollten wiederum im Hinblick auf die Ausbildung leitfähiger Brücken quantifiziert werden. Die originalen AFM-Bilder wurden dafür mit ei-

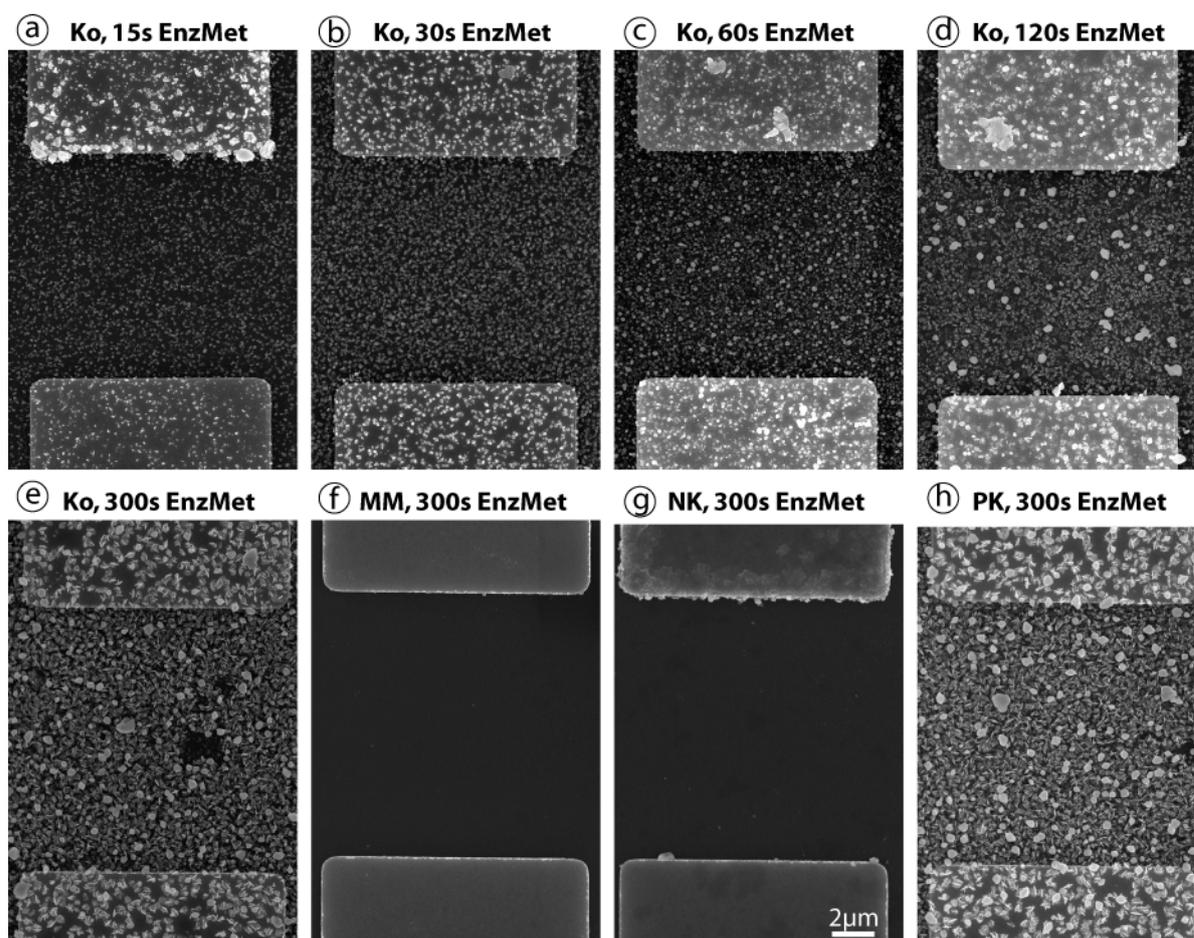


Abb. 3.18: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der enzymkatalysierten Silberentwicklung im Elektrodenspalt. Die verschiedenen Fängerproben wurden mit dem biotinylierten Oligonukleotid GSTM3A2 hybridisiert. Nach Anbindung des Enzyms Streptavidin-Peroxidase wurde der mikrostrukturierte Chip ($10\mu\text{m}$ Elektrodenspalt) (a) 15 s, (b) 30 s, (c) 60 s, (d) 120 s und (e) 300 s mit dem Silberentwicklungskit EnzMetTM inkubiert. Die REM-Aufnahmen zeigen die (a–e) komplementäre Sequenz (Ko), die in Abhängigkeit von der Entwicklungszeit eine deutliche Zunahme metallischer Abscheidungen im Elektrodenspalt aufweist. Fehlende Metallabscheidung bei (f) einer Sequenz mit einem Mismatch (MM) und (g) der nichtkomplementären Negativkontrolle (NK) unterstreichen die Spezifität der Metallentwicklung. (h) Die direkt Biotin-markierte Positivkontrolle (PK) zeigt äußerst dicht liegende metallische Strukturen.

nem Schwellenwert von 60 nm in binäre Bilder umgewandelt (Bsp.: 30 s EnzMetTM in Abb. 3.20 a, b und e, f), der Flächenanteil der metallischen Partikel im Spalt bestimmt und so eine Quantifizierung des Ausmaßes der Metallabscheidung ermöglicht. In Abb. 3.19 a wurden der grafisch ermittelte Grad der Metallbedeckung der beiden positiven Proben in Abhängigkeit von der enzymatischen Entwicklungszeit dargestellt. Der Anteil der metallbedeckten Fläche im Spalt stieg dabei mit zunehmender Silberentwicklungszeit linear an. Nach 300 s enzymkatalysierter Silberentwicklung waren bei komplementärer und direkt Biotin-markierter Fängerprobe 82% des Elektrodenspaltmetalles metallbedeckt. Dagegen

war mit 0,002 bzw. 0,03% der Elektrodenpalt der teil- und nichtkomplementären Proben praktisch frei von metallischen Strukturen.

Zusammen mit den in Abb. 3.19 b dargestellten Ergebnissen der Widerstandsmessungen wurde ein metallischer Bedeckungsgrad von 55–60% als Schwelle zur Leitfähigkeit (*) ermittelt. Um zu überprüfen, ob auf den bisher noch nicht leitfähigen Proben durch eine zusätzliche metallkatalysierte Nachverstärkung leitfähige Brücken erzeugt werden können, wurden beispielhaft zwei Chips (30 bzw. 120 s *EnzMet*TM) ausgewählt und mit Silberacetat/Hydrochinon metallkatalytisch nachverstärkt. Nach Erreichen messbarer Leitfähigkeit (10 bzw. 8 min AgAc-Behandlung) zeigten die Proben einen relativen Anteil von 70 und 75% bzw. 76 und 80% (jeweils Ko und PK) metallbedeckter Fläche im Elektrodenpalt. In Abb. 3.19 c wurden diese Werte (fett umrandet) zum Vergleich mit den Ausgangswerten der enzymatischen Silberentwicklung nebeneinander dargestellt. Der Anteil der metallbedeckten Fläche im Spalt lag damit deutlich über der ermittelten 60%-Grenze zur Leitfähigkeit (*) (Abb. 3.19 d).

Leitfähigkeit Die einzelnen Proben wurden wiederum parallel zur rasterkraft- und elektronenmikroskopischen Charakterisierung elektrisch vermessen. In Abb. 3.19 b sind die gemessenen Leitwerte in Abhängigkeit von der enzymatischen Silberentwicklungszeit für die verschiedenen Fängersequenzen dargestellt. Während bei der längsten Entwicklungszeit (300 s) beide positiven Proben (Positivkontrolle [PK] und komplementäre Sequenz [Ko]) zur Leitfähigkeit führten, war bei 120 s *EnzMet*TM zumindest noch die Positivkontrolle (PK) leitfähig. Alle anderen, kürzer enzymatisch entwickelten Chips, zeigten keinen Widerstandsabfall. Die exemplarisch bis zur Leitfähigkeit metallkatalytisch nachverstärkten Chips (30 bzw. 120 s *EnzMet*TM) zeigten nach 10 bzw. 8 min Silberacetat/Hydrochinon-Behandlung ebenfalls leitfähige positive Fängerproben (Abb. 3.19 d).

Theoretische Daten/Simulation

In diesem Abschnitt wurde wie bei der Goldnanopartikelmarkierung überprüft, ob die experimentellen Ergebnisse durch theoretische Simulationen modelliert werden können.

Grafische Wachstumssimulation Für Vorhersagen zum Wachstum vorhandener Metallkeime durch eine zusätzliche Nachverstärkung wurde die experimentelle Verstärkung wiederum um ein grafisch simuliertes Wachstum vorhandener Partikel ergänzt. Die schon zur Bestimmung der Metallbedeckung aus den originalen AFM-Bildern erzeugten binären Bilder wurden dazu einer theoretischen Wachstumssimulation unterzogen (Abb. 3.20 a–d am Bsp. 30 s *EnzMet*TM). Dabei wurden die partikulären Strukturen selektiert und schrittweise grafisch vergrößert. Nach Anpassung der Auflösung der Bilder entsprach dies einer Schichtdicke von ca. 12 nm pro Pixel. Die resultierenden, grafisch “verstärkten” Elektrodenpalt wurden mit den experimentell verstärkten AFM-Bildern verglichen. Das in Abb. 3.20 e, f nach 10-minütiger Silberverstärkung erhaltene Bild war im Grad der partikulären Bedeckungsdichte dabei vergleichbar mit einem theoretischen Schichtdickenzuwachs von ca. 24 nm.

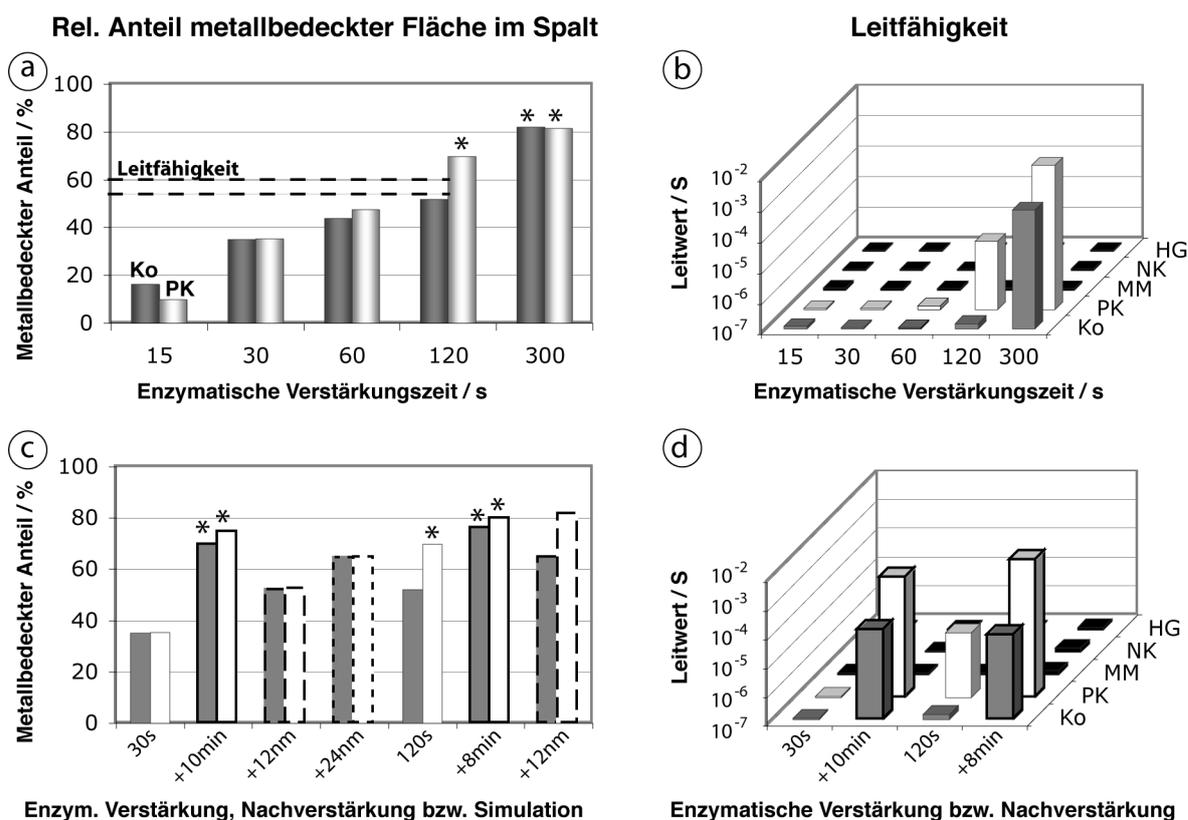


Abb. 3.19: Enzymkatalysierte Silberentwicklung im Elektrodenspalt: Abhängigkeit der Metallbedeckung sowie der Leitfähigkeit von der Entwicklungszeit. (a) Die Analyse der AFM-Aufnahmen offenbarte eine lineare Abhängigkeit der Metallbedeckung (Schnitt in 60 nm Höhe) von der enzymatischen Entwicklungszeit, wobei eine ca. 60% metallbedeckte Fläche im Elektrodenspalt leitfähige Brücken ermöglichte (*). (b) Die elektrische Messung zeigte Leitfähigkeit bei den über 120 und 300 s mit EnzMetTM entwickelten Chips (PK bzw. Ko und PK). Exemplarisch wurden zwei Chips (30 und 120 s EnzMetTM) metallkatalytisch bis zu messbarer Leitfähigkeit nachverstärkt. (c) Die experimentell ermittelte Metallbedeckung (nachverstärkte fett umrandet) wurde durch eine grafische Simulation des Wachstums der Metallkeime um 1 und 2 px (12 bzw. 24 nm; gestrichelt umrandet) ergänzt. (d) Die elektrische Messung zeigte bei den beiden Chips nun Leitfähigkeit aller positiven Proben (nachverstärkte fett umrandet). (Ko–komplementär, PK–direkt biotinylierte Positivkontrolle, MM–Mismatches, NK–nichtkomplementäre Negativkontrolle, HG–Hintergrund ohne Fänger-DNA)

Relative Metallbedeckung Zur genaueren Quantifizierung der Metallabscheidung wurde in den “grafisch verstärkten” Elektrodenspalten erneut der Flächenanteil der (metallischen) Partikel bestimmt. Die Ergebnisse (gestrichelt umrandet) wurden den experimentellen Daten in Abb. 3.19 c gegenübergestellt und in Tab. 3.6 zusammengefasst. Beim 120 s mit EnzMetTM behandelten Chip führte bereits ein Wachstum um 1 px (12 nm) zu einer relativen Metallbedeckung von über 60% (65 und 82% für Ko bzw. PK) und damit zur theoretisch erwarteten Leitfähigkeit. Der kürzer entwickelte Chip (30 s EnzMetTM) benötigte hingegen zwei grafische Verstärkungen um jeweils ein Pixel (24 nm Schichtdickenzuwachs) bis zur Überschreitung der theoretischen Leitfähigkeitsgrenze (64 und 65%

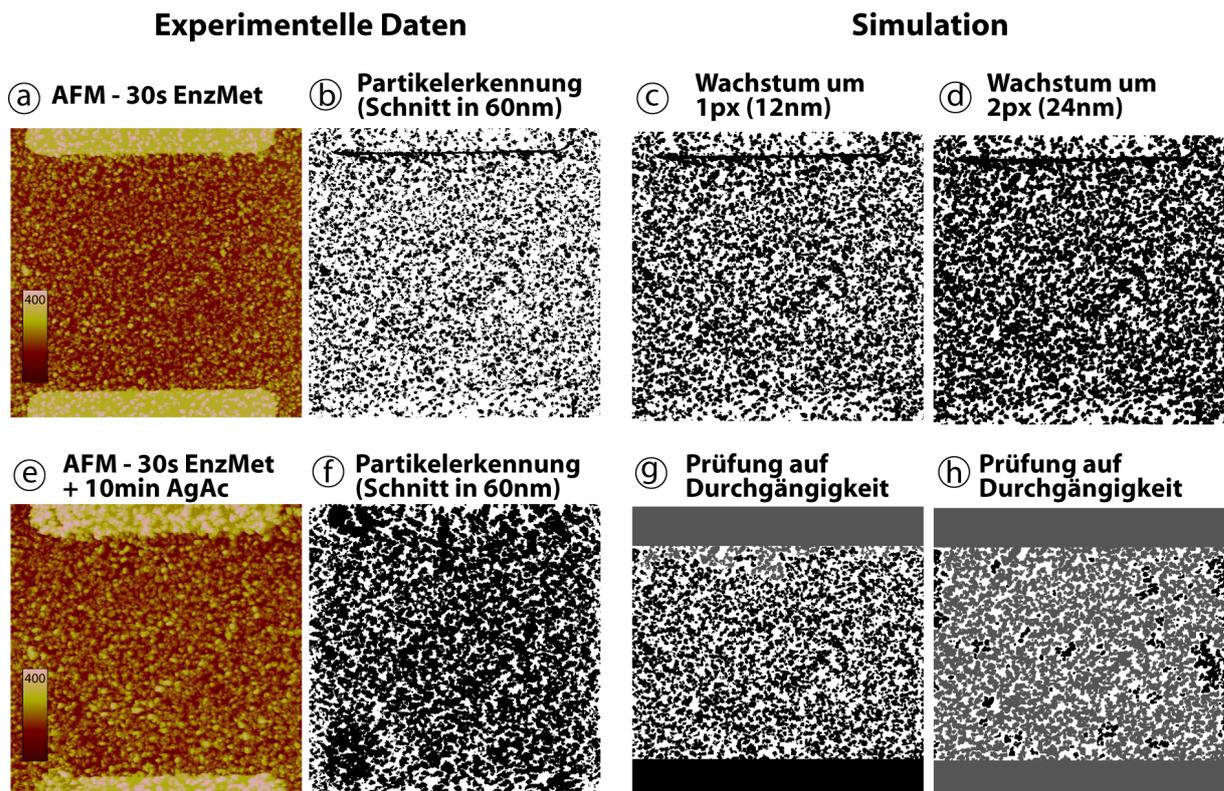


Abb. 3.20: Enzymkatalysierte Silberentwicklung im Elektrodenspalt: Simulationen, basierend auf experimentell ermittelten Partikelkoordinaten. Dargestellt ist die zum Ziel-Moleküle komplementäre Fängersequenz eines 30 s mit EnzMetTM entwickelten Chips. Im (a) AFM-Bild wurde grafisch in einer Höhe von 60 nm (Vernachlässigung des Hintergrundrauschens) eine (b) Partikelerkennung durchgeführt. Die somit als schwarze Bereiche dargestellten partikulären Keime wurden grafisch um (c) 1 px und (d) 2 px vergrößert (Schichtdickenzuwachs 12 bzw. 24 nm), bis eine grafische Verbindung beider Elektroden erzielt wurde. Neben der grafischen Wachstumssimulation wurde die Probe experimentell metallkatalytisch nachverstärkt (5 × 2 min AgAc), bis Leitfähigkeit messbar war. Im (e) AFM-Bild der nachverstärkten Probe wurde wiederum grafisch eine (f) Partikelerkennung durchgeführt. Die aus der Wachstumssimulation resultierenden Bilder wurden grafisch auf Leitfähigkeit geprüft. Die um (g) 1 px/12 nm vergrößerten Partikel bildeten keine leitfähige Brücke. (h) Ein Wachstum um 2 px/24 nm führte dagegen zu einer leitfähigen Verbindung zwischen oberer und unterer Elektrode. (AFM-Bilder mit 12 × 12 μm Kantenlänge, 400 nm Höhenskala)

für Ko bzw. PK). Die experimentell ermittelten Anteile metallischer Fläche im Spalt lagen bei beiden Chips mit 70 und 75% (30 s EnzMetTM + 10 min AgAc) bzw. 76 und 80% (120 s EnzMetTM + 8 min AgAc) etwas über den theoretisch ermittelten Werten (jeweils für Ko und PK).

“Grafische Leitfähigkeit” Der ermittelte Grad der Metallabscheidung sollte nun auch grafisch mit der Ausbildung durchgängiger Partikelbrücken in den Elektrodenspalten korreliert werden. Wie im Abschnitt *Partikelerkennung* (Abb. 2.7 auf Seite 28) beschrieben, wurden die binären Partikelbilder dabei mit der *Flood Fill*-Funktion des Bildanalyse-

Tab. 3.6: Vergleich experimentell (AgAc) und grafisch ermittelter (Simulation) Metallabscheidung auf durch enzymkatalysierte Silberentwicklung (30 bzw. 120 s *EnzMet*TM) entstandenen Partikeln. Die Proben wurden ohne und nach metallkatalytischer Nachverstärkung (0 und 10 bzw. 8 min AgAc) sowie nach Wachstumssimulation (12 und 24 nm) analysiert. Verglichen wurde der relative Flächenanteil der partikulären Strukturen an der Gesamtfläche des Elektrodenspaltens [%] für die komplementäre Fängersequenz (Ko) sowie die Positivkontrolle (PK). Die Markierungen zeigen real gemessene (*) bzw. grafisch ermittelte (**) Leitfähigkeit.

<i>EnzMet</i> TM [s]	30	30	30	30	120	120	120
AGAC BZW. SIMULATION	0 min	10 min	12 nm	24 nm	0 min	8 min	12 nm
Ko [%]	35	70 *	52	64 **	52	76 *	65 **
PK [%]	35	75 *	52	65 **	70	80 *	82 **

programms *ImageJ* auf zusammenhängende Bereiche überprüft. Durch Einfärbung der oberen Elektrode konnte somit überprüft werden, ob eine grafische Verbindung zur unteren Elektrode bestand. Vollständige ‐Leitfähigkeit‐ zeigte sich dabei in einer gleichermaßen eingefärbten unteren Elektrode. In Abb. 3.20 wurde als Beispiel das AFM-Bild einer komplementären Probe des 30 s mit *EnzMet*TM entwickelten Chips prozessiert und nach grafisch simuliertem Wachstum um ein bzw. zwei Pixel auf Durchgängigkeit geprüft (Abb. 3.20 c, g bzw. d, h). Während ein (theoretisches) Wachstum um 1 px (12 nm) noch zu keiner durchgängigen Partikelbrücke führte, resultierte ein Schichtdickenzuwachs um 2 px (24 nm) in einer partikulären Verbindung beider Elektroden.

Vergleich experimenteller und theoretischer Ergebnisse

Experimenteller Höhen- vs. theoretischer Schichtdickenzuwachs Wie bei der Markierung mit Goldnanopartikeln sollte überprüft werden, ob der grafisch simulierte Schichtdickenzuwachs als Annäherung an die experimentellen Daten verwendet werden kann (Tab. 3.7). Zum Vergleich diente der mittlere Höhenzuwachs der Partikel, welcher mithilfe der *Find Maxima*-Funktion des Bildanalyseprogramms *ImageJ* ermittelt wurde. Für die 30 s mit *EnzMet*TM behandelten Proben ergaben sich durch die 10-minütige Nachverstärkung Höhenzuwächse von 29 und 37 nm (Ko bzw. PK) bis zu messbarer elektrischer Leitfähigkeit. Diese befanden sich in guter Übereinstimmung mit den simulierten Schichtdickenzuwächsen von 24 nm. Bei der 120 s mit *EnzMet*TM inkubierten komplementären Fängerprobe (Ko) waren die mittleren Partikelhöhen nach 8 min Nachverstärkung um 9 nm angestiegen. Der Höhenzuwachs lag damit im Bereich des theoretisch ermittelten Schichtdickenzuwachses von 12 nm. Der Grad unspezifischer Abscheidungen wurde vom gemessenen Höhenzuwachs der nichtkomplementären Negativkontrolle abgeleitet und betrug ca. 4 nm. Die Subtraktion dieses Wertes von den Höhenzuwächsen führte bei den 30 s mit *EnzMet*TM behandelten Proben zu weiterer Annäherung von gemessenen und simulierten Werten.

Elektrische Leitfähigkeit vs. grafische Durchgängigkeit Zur Verifizierung der grafischen Leitfähigkeitsprüfung wurden wiederum alle AFM-Bilder der 15 bis 300 s mit *EnzMet*TM entwickelten Proben grafisch auf Durchgängigkeit geprüft und diese Ergeb-

Tab. 3.7: Vergleich experimentell und grafisch ermittelter Schichtdickenzuwächse durch metallkatalysierte Silberabscheidung (10 bzw. 8 min) auf durch enzymkatalysierte Silberentwicklung (30 bzw. 120 s *EnzMet*TM) entstandenen Partikeln. Verglichen wurde der experimentell ermittelte Höhenzuwachs Δh und der grafisch ermittelte Schichtdickenzuwachs Δd für die komplementäre Probe (Ko) sowie Positiv- (PK) und Negativkontrolle (NK).

FÄNGER-DNA	ΔH EXPER. [NM]	ΔD THEORET. [NM]
30 s <i>EnzMet</i> TM		
Ko	29*	$\leq 24^{**}$
PK	37*	$\leq 24^{**}$
120 s <i>EnzMet</i> TM		
Ko	9*	$\leq 12^{**}$
NK	4	nicht leitfähig

nisse mit den realen Widerstandsmessungen verglichen, wobei auch hier eine 100%-ige Übereinstimmung festgestellt werden konnte. Die elektrisch nicht leitenden Proben wiesen nur unvollständig zusammenhängende Bereiche auf, wohingegen die leitfähigen Proben grafisch durchgängige partikuläre Verbindungen zwischen beiden Elektroden zeigten.

3.4. Anwendungsbeispiel: Chip-basierter Nachweis eines Enzypolymorphismus

Nach Charakterisierung und Optimierung einzelner Prozesse des Chip-basierten Testsystems mithilfe metallischer Nanostrukturen sollte die Zweckmäßigkeit dieses DNA-Nachweissystems an einem Anwendungsbeispiel aus der molekularen Ernährungstoxikologie demonstriert werden. Der Nachweis von Mutationen im Erbgut erfolgte anhand des Entgiftungsenzyms *Glutathion-S-Transferase* (*GST*). Dafür wurde ein Polymorphismus im Isoenzym *GSTM3* ausgewählt. Das mutierte Allel (*GSTM3B*) unterschied sich vom Wildtyp-Allel (*GSTM3A2*) durch eine 3-Basenpaar-Deletion.

Um sowohl optische als auch elektrische Detektion zu ermöglichen, wurden die Versuche mit ACED (*affinity-based chip with electrical detection*) verschiedener Trägermaterialien durchgeführt: thermisch oxidierte Si-Chips mit mikrostrukturierten Goldelektroden (und Si_3N_4 -Schutzschicht) und optisch transparente Glaschips mit Siebdruckstrukturen aus Platin. Aufgrund von Voruntersuchungen und verwandten Arbeiten (Schüler 2005; Möller 2006) wurden die Träger mit Epoxygruppen funktionalisiert (GOPS). Die verschiedenen Fänger-DNA-Sequenzen wurden in den Elektrodenspalten der Chips als Spots aufgebracht, wobei die aminomodifizierten Oligonukleotide kovalent immobilisiert wurden. Die biotinylierte Ziel-DNA wurde in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, wobei Hybridisierungsdauer und -temperatur empirisch optimiert wurden. Nach Anbindung eines Enzypolymers (Streptavidin-Peroxidase-Polymer, SPP) erfolgte die enzymatische Silberentwicklung mit dem kommerziellen Kit *EnzMet*TM *ultrasensitive*.

Zur Demonstration des Chip-basierten, sequenzspezifischen Nachweises des ausgewählten *GST*-Polymorphismus wurden zwei verschiedene DNA-Systeme als sogenannte Ziel-

DNA benutzt: Oligonukleotide als Modellsystem und PCR-Produkte aus genomischer DNA als anwendungsnahe System.

3.4.1. Oligonukleotide als Modellsystem

Um das Testsystem zu etablieren, wurden synthetische einzelsträngige Oligonukleotide modellhaft als nachzuweisende Zielmoleküle verwendet. *GSTM3A2* und *GSTM3B* umfassten dabei den relevanten Sequenzbereich, welcher die nachzuweisende Mutation enthält. Zunächst wurden die Festphasen-gebundenen Fängersequenzen auf ihre Bindungsfähigkeit getestet. Außerdem konnten Hybridisierungsparameter wie Pufferbedingungen, Hybridisierungszeit und -temperatur optimiert werden.

Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur

Da die Hybridisierungstemperatur abhängig von der Schmelztemperatur (T_m) und daher bei jedem zu untersuchenden DNA-Abschnitt verschieden ist, sollte sie für die neue Anwendung optimiert werden.

Wie im Kapitel *Material und Methoden*, Abschnitt *Hybridisierung* auf Seite 20 bereits umrissen, wurde die Hybridisierungstemperatur zunächst auf der Grundlage der vom Hersteller der Oligonukleotide angegebenen Schmelztemperatur abgeschätzt. Da beide Sequenzen annähernd gleich lang sind (28 bzw. 27 b) und ähnliche GC-Gehalte aufweisen (39,3 bzw. 40,7%), besitzen *GSTM3A2* und *GSTM3B* mit 65,7 bzw. 65,2°C sehr ähnliche Schmelztemperaturen, was für eine gleichzeitige Hybridisierung unter gleichen Bedingungen äußerst vorteilhaft ist. Unter Berücksichtigung thermodynamischer Aspekte sowie vorherrschender Bedingungen wurde für eine DNA-Konzentration von 1 μ M und 0,825 mM Na⁺ (entspricht 5 \times SSC-Puffer) eine Schmelztemperatur von 84,8°C ermittelt. Diese, für Hybridisierungen in Lösung geltende T_m wurde für die Festphasen-basierte Hybridisierung weiter angepasst und betrug für die oben genannten Bedingungen 74°C. Eine hochstringente Hybridisierung sollte bei einer Temperatur von 5–15°C unterhalb der Schmelztemperatur stattfinden (Lottspeich and Zorbas 1998), weswegen 60°C als Obergrenze für die experimentellen Versuche gewählt wurden. Die empirische Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur erfolgte entsprechend mit 1 μ M *GSTM3A2* und *M3B* in 5 \times SSC + 0,1% SDS bei 45; 50; 55 und 60°C. Die Chips wurden nachfolgend in gleicher Weise gewaschen, mit SPP markiert und silberverstärkt (4 \times 2 min). Der Vergleich ihrer Signale erfolgte sowohl optisch als auch elektrisch.

Optische Auswertung Zum optischen Nachweis wurden die Probenträger mithilfe eines Diascanners im Durchlicht ausgelesen. Dabei erschienen die Signale als dunkle Spots auf hellem Hintergrund (Abb. 3.21). Alle Chips wurden mit den gleichen Fänger-Oligonukleotidsequenzen im Spotlayout A (Abb. 2.4 a auf Seite 18) funktionalisiert, welches neben den beiden Kontrollen (Positivkontrolle PK, Negativkontrolle NK) und der Fängersequenz für das mutierte Allel (*GSTM3b*) zwei verschiedene Fängerproben für das Wildtyp-Allel (*GSTM3a1*, *GSTM3a2*) bereitstellte.

Die beispielhafte Betrachtung der mit dem mutierten Allel *GSTM3B* hybridisierten Chips (Abb. 3.21) zeigte zunächst, dass die komplementären Proben *GSTM3b* (Ko, Elek-

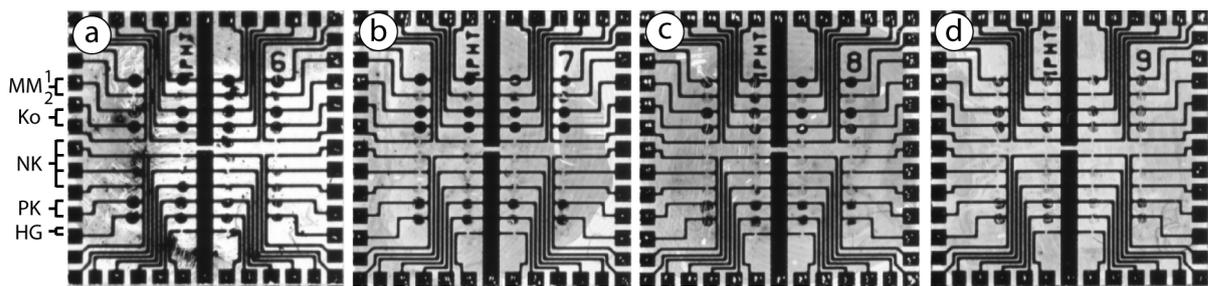


Abb. 3.21: ACED im Durchlicht in Abhängigkeit von der Hybridisierungstemperatur. Die eingescannten Durchlichtaufnahmen (Signale als dunkle Spots sichtbar) zeigen verschiedene Fänger-DNA-Sequenzen (Ko-komplementär, MM-Mismatches, NK-nichtkomplementäre Negativkontrolle, PK-direkt biotinylierte Positivkontrolle, HG-Hintergrund ohne Fänger-DNA), die mit dem biotinylierten Ziel-Oligonukleotid GSTM3B bei (a) 45°C; (b) 50°C; (c) 55°C bzw. (d) 60°C für jeweils 3 h hybridisiert und anschließend enzymatisch silberverstärkt wurden (5 min). Die Aufnahmen zeigen die Chips nach zusätzlicher metallkatalytischer Nachverstärkung (4 × 2 min).

trodenzeile 3+4) dunkle Spots, also deutliche Signale zeigten. Jedoch unterschieden sich die beiden Fängermoleküle des Wildtyp-Allels *GSTM3a1* und *a2* (MM1 und MM2, Elektrodenzeile 1 bzw. 2) z.T. beträchtlich in ihrer Spezifität hinsichtlich des mutierten Allels *GSTM3B*. Darüber hinaus ließ sich erkennen, dass die Signale von links nach rechts, also mit zunehmender Temperatur (45–60°C), in ihrer Intensität abnahmen. Die Betrachtung der Stärke der Hybridisierungssignale musste jedoch immer im Verhältnis zu den Signalen der Positivkontrolle (PK, Elektrodenzeile 9 und 10) geschehen, da diese Aufschluss über den Erfolg von Immobilisierung, Enzym-Anbindung und Silberverstärkung gaben und deren Einfluss bei der isolierten Beurteilung der Hybridisierung ausgeschlossen werden sollte.

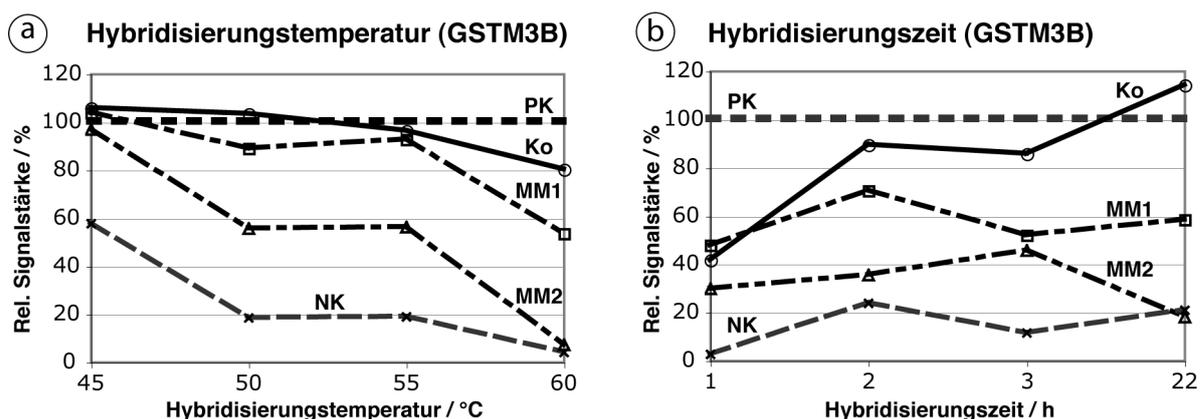


Abb. 3.22: Stärke optischer Signale in Abhängigkeit von (a) Hybridisierungstemperatur und (b) Hybridisierungszeit für das Ziel-Oligonukleotid GSTM3B. Die Signalintensität wurde als Grauwert (schwarz=255, weiß=0) gemessen und relativ zur Positivkontrolle aufgetragen. (Fängersequenzen: Ko-komplementär, MM-Mismatches, NK-nichtkomplementäre Negativkontrolle, PK-direkt biotinylierte Positivkontrolle). Die Chips wurden enzymatisch silberverstärkt (5 min) sowie zusätzlich metallkatalytisch nachverstärkt (4 × 2 min).

Die Signalstärken der eingescannten Bilder wurden als Graustufen (schwarz=255, weiß=0) gemessen und in Abhängigkeit von der Hybridisierungstemperatur grafisch gegenübergestellt (Abb. 3.22 a). Auf allen Chips wurden die untersten beiden Elektroden-spalte ohne immobilisierte Fänger-DNA als Hintergrund (HG) vermessen und von den Messwerten der Spots subtrahiert. Um die Hybridisierungseffizienz isoliert betrachten zu können, wurden die Signale der Fängersequenzen auf diejenigen der direkt Biotinmarkierten Positivkontrolle bezogen (relative Signalstärke). Dabei wurde deutlich, dass die Signalintensitäten mit zunehmender Hybridisierungstemperatur sanken und die Signale der verschiedenen Fängersequenzen gleichzeitig besser zu differenzieren waren. Die Fänger-moleküle des Wildtyp-Allels reagierten dabei sehr unterschiedlich. Während *GSTM3a1* (MM1) relativ unspezifisch auch das mutierte Allel *GSTM3B* gebunden hatte, war die Bindungsspezifität von *GSTM3a2* (MM2) sehr hoch.

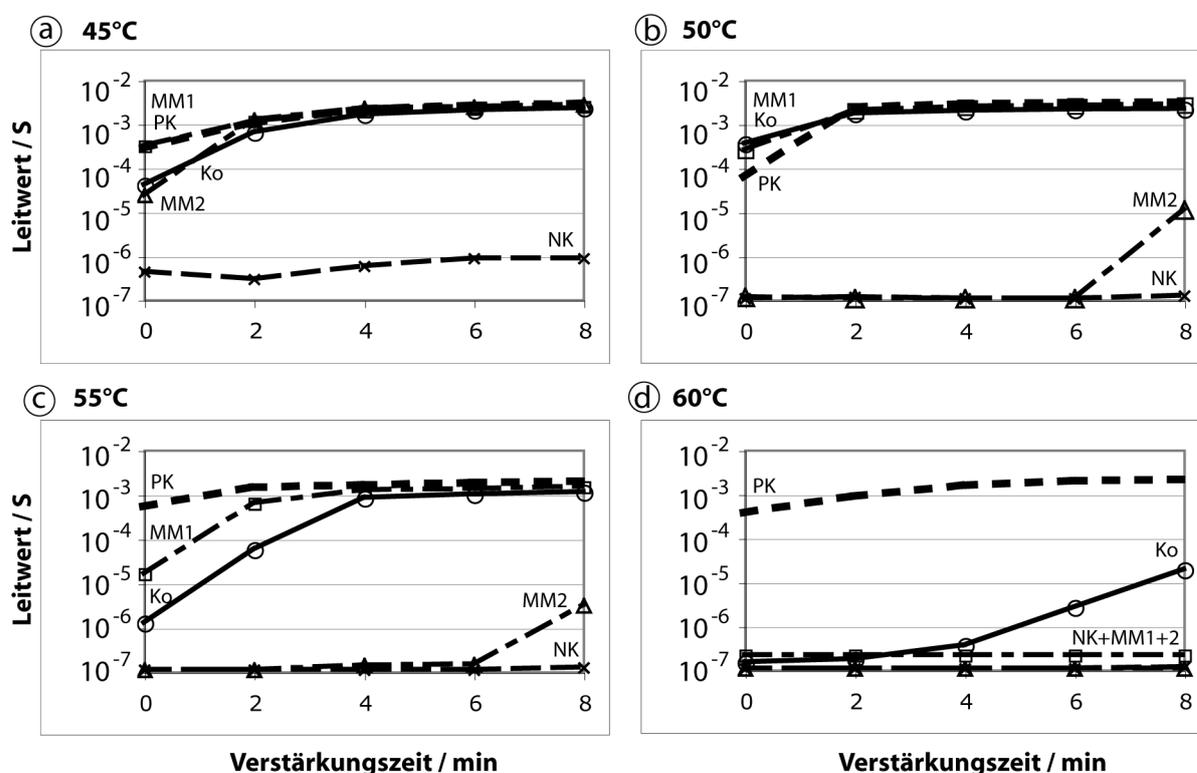


Abb. 3.23: Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der Hybridisierungstemperatur. Die verschiedenen Fängersequenzen (Ko-komplementär, MM-Mismatches, PK-direkt biotinylierte Positivkontrolle, NK-nichtkomplementäre Negativkontrolle) wurden mit biotinyliertem Oligonukleotid *GSTM3B* bei (a) 45°C, (b) 50°C, (c) 55°C bzw. (d) 60°C hybridisiert, mit Streptavidin-Peroxidase markiert, enzymatisch silberverstärkt (5 min) sowie zusätzlich metallkatalytisch nachverstärkt (4×2 min).

Elektrische Auswertung Ähnlich wie bei der optischen zeigte sich auch bei der elektrischen Detektion mit steigender Hybridisierungstemperatur eine Abnahme der Signalstärke (hier Leitfähigkeit) bei zunehmender Signalauftrennung. In Abb. 3.23 wurden die

Leitwerte nach Hybridisierung mit *GSTM3B* zusätzlich im Verlauf der metallkatalytischen Nachverstärkungszeit dargestellt, deren Endpunkt Gegenstand der optischen Auswertung war. Während bei 45°C (Abb. 3.23 a) nahezu alle Fängersequenzen eine Leitfähigkeit zeigten, führte bei 60°C (Abb. 3.23 d) außer der Positivkontrolle nur die komplementäre Sequenz zur Leitfähigkeit. Im mittleren Temperaturbereich waren weiterhin wieder die unterschiedlichen Bindungscharakteristika der beiden Fängersequenzen des Wildtyp-Allels zu erkennen (50 und 55°C in Abb. 3.23 b, c). Während die Fängersequenz *GSTM3a1* (MM1) relativ unspezifisch wie das mutierte Allel *GSTM3b* (Ko) reagierte, war die Fängersequenz *GSTM3a2* (MM2) gut abzugrenzen.

Als optimale Temperatur wurde für die vorliegenden Hybridisierungsbedingungen 55°C ausgewählt, da hier ausreichende Signalstärken bei zufriedenstellender Spezifität möglich waren.

Bestimmung der optimalen Hybridisierungszeit

Um die optimale Inkubationsdauer zu ermitteln, wurden zwei mit den Ziel-Oligonukleotiden *GSTM3A2* und *M3B* hybridisierte Versuchsserien bei 40°C für 1 h; 2 h und 3 h sowie über Nacht (22 h) inkubiert.

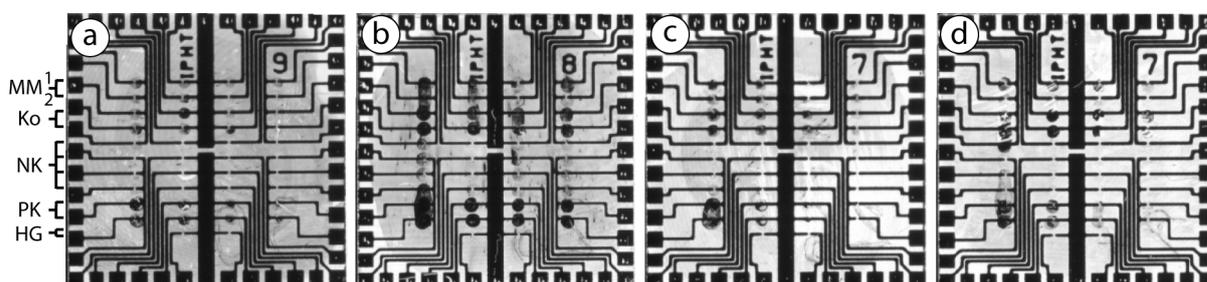


Abb. 3.24: ACED im Durchlicht in Abhängigkeit von der Hybridisierungszeit. Die eingescannten Durchlichtaufnahmen (Signale als dunkle Spots sichtbar) zeigen verschiedene Fänger-DNA-Sequenzen (Ko–komplementär, MM–Mismatches, NK–nichtkomplementäre Negativkontrolle, PK–direkt biotinylierte Positivkontrolle, HG–Hintergrund ohne Fänger-DNA), die mit dem biotinylierten Ziel-Oligonukleotid *GSTM3B* für (a) 1 h; (b) 2 h; (c) 3 h bzw. (d) 22 h bei jeweils 40°C hybridisiert und anschließend enzymatisch silberverstärkt wurden (5 min). Die Aufnahmen zeigen die Chips nach zusätzlicher metallkatalysierter Nachverstärkung (4 × 2 min).

Optische Auswertung Die markierten und silberverstärkten Proben wurden wiederum im Diascanner ausgelesen. Die Beispielbilder der mit *GSTM3B* hybridisierten Chips (Abb. 3.24) zeigen die erfolgreiche Hybridisierung der komplementären Proben (Ko, Elektrodenzeile 3+4). Dabei reagierte die Fängersequenz *GSTM3a1* (MM1, Elektrodenzeile 1) wiederum unspezifischer als *GSTM3a2* (MM2, Elektrodenzeile 2). Insgesamt stellten sich die Signale recht inhomogen dar. Zum einen variierte die von der Hybridisierung unabhängige Positivkontrolle zwischen den Chips, zum anderen schwankten die Signale schon innerhalb der gleichen Fängerprobe.

Die Signale der eingescannten Bilder wurden deswegen gemittelt und in Abb. 3.22 b als Graustufen (schwarz=255, weiß=0) in Abhängigkeit von der Hybridisierungszeit grafisch gegenübergestellt. Dabei wurde eine Zunahme der Signalstärke – relativ zur Positivkontrolle – beobachtet. Weiterhin bestätigte sich, dass die erste Fängersequenz für das Wildtyp-Allel (*GSTM3a1* als MM1) weniger spezifisch als *M3a2* bzw. MM2) reagierte.

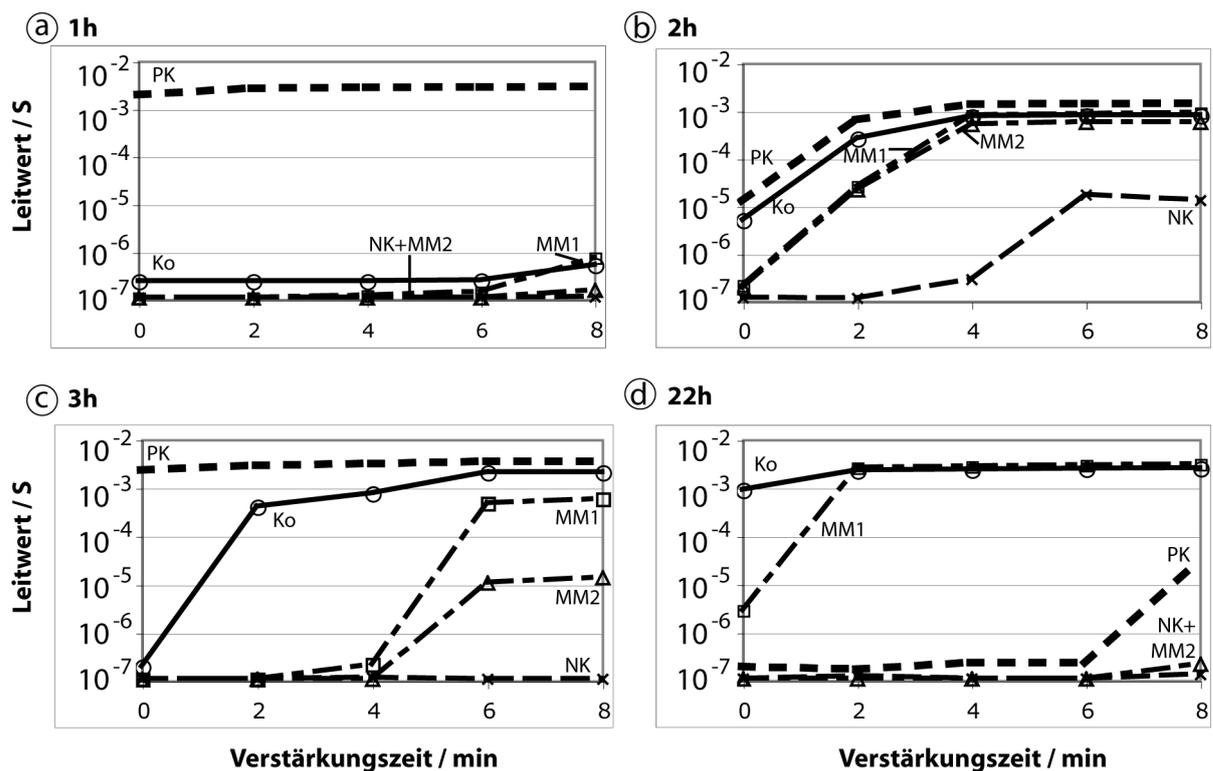


Abb. 3.25: Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der Hybridisierungszeit. Die verschiedenen Fängersequenzen (Ko–komplementär, MM–Mismatches, NK–nichtkomplementäre Negativkontrolle, PK–direkt biotinylierte Positivkontrolle) wurden mit biotinyliertem Oligonukleotid *GSTM3B* für (a) 1h, (b) 2h, (c) 3h bzw. (d) 22h bei 40°C hybridisiert, mit Streptavidin-Peroxidase markiert, enzymatisch silberverstärkt (5 min) sowie zusätzlich metallkatalytisch nachverstärkt (4×2 min).

Elektrische Auswertung Abb. 3.25 zeigt die Leitwerte nach Hybridisierung mit *GSTM3B*, die im Verlauf der metallkatalytischen Nachverstärkung aufgetragen wurden. Die Messung der Widerstände der mit *GSTM3B* hybridisierten ACED offenbarte nach einer Stunde Hybridisierung außer der Positivkontrolle kaum elektrische Leitfähigkeit (Abb. 3.25 a). Nach 2–3 h (Abb. 3.25 b, c) waren hingegen Signale bei der komplementären (Ko) sowie den teilkomplementären (MM1+2) Sequenzen messbar. Dabei reagierte die Fängersequenz *GSTM3a1* tendenziell unspezifischer als *M3a2*. Letztere ermöglichte es, bei entsprechender Nachverstärkungszeit (Bsp.: 6 min bei 3 h Hybridisierung, Abb. 3.25 c) zwischen den verschiedenen Allelen zu differenzieren.

3 h Hybridisierungsdauer ermöglichten detektierbare Signale bei ausreichender Differenzierbarkeit der verschiedenen Allele. Nachfolgenden Hybridisierungen mit Oligonukleotiden als Zielmolekülen wurden deshalb über diese Zeit durchgeführt.

Bestimmung der Nachweisgrenze

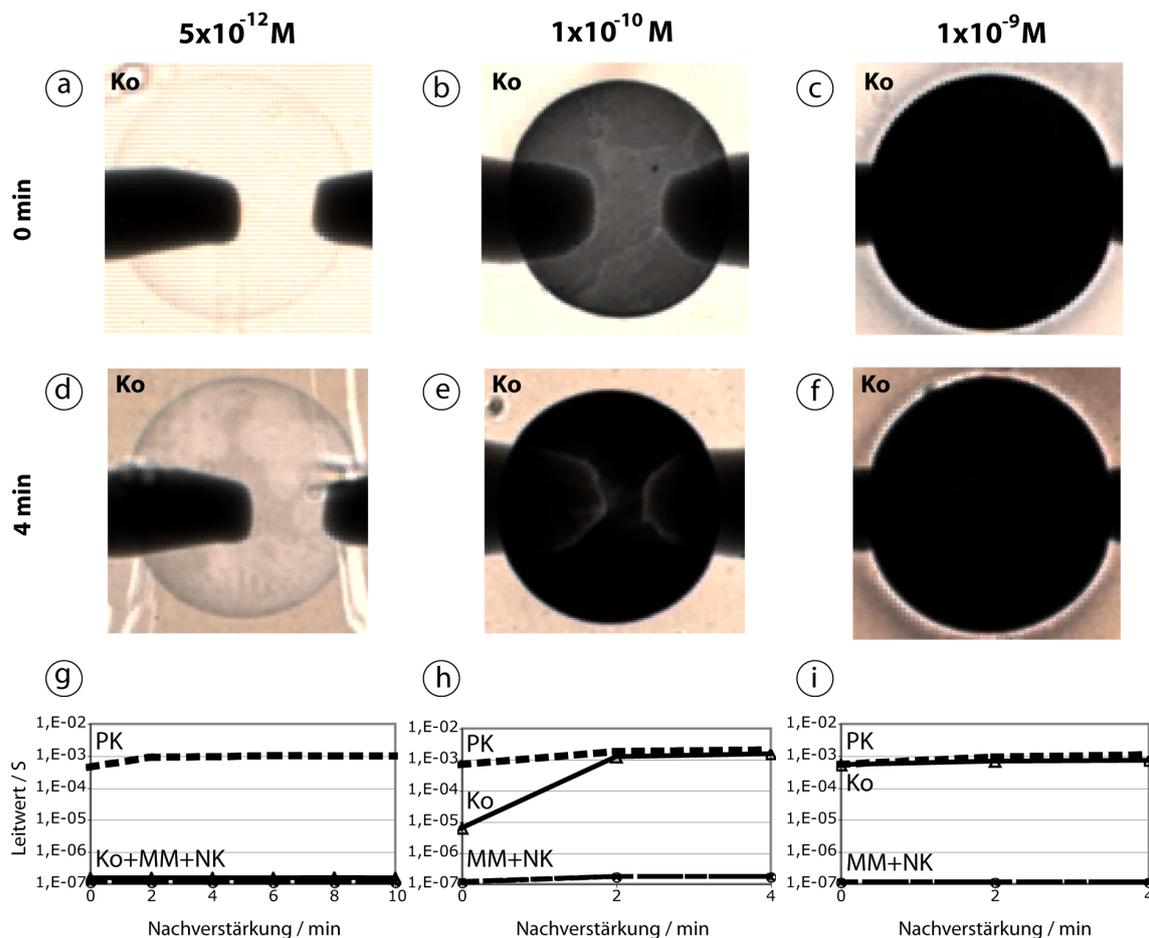


Abb. 3.26: Nachweisgrenze bei optischer (lichtmikroskopischer) und elektrischer Detektion. Die Fängerproben (Ko-komplementär, MM-Mismatches, NK-nichtkomplementäre Negativkontrolle, PK-direkt biotinylierte Positivkontrolle) wurden mit dem biotinylierten Oligonukleotid GSTM3A2 der Konzentration (a, d, g) $5 \times 10^{-12} \text{ M}$; (b, e, h) $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ bzw. (c, f, i) $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ in $2,5 \times \text{SSC} + 0,1\% \text{ SDS}$ bei 55° C hybridisiert, mit Streptavidin-Peroxidase markiert, enzymatisch silberverstärkt (5 min) sowie metallkatalytisch nachverstärkt (AgAc). Die Durchlicht-Aufnahmen zeigen die komplementäre Fängersequenz GSTM3a2 (a-c) unmittelbar nach der enzymatischen Verstärkung bzw. (d-f) nach 4-minütiger Nachverstärkung (50-fache Vergrößerung, 28 ms Belichtung). (g-i) dazugehörige Leitfähigkeitsmessung im Verlauf der metallkatalytischen Nachverstärkung.

Die Nachweisgrenze beschreibt die geringste Menge/Konzentration an Zielmolekülen, ab welcher ein Signal zuverlässig detektierbar ist. Sie ist somit Ausdruck der Sensitivität eines Nachweissystems. Die funktionalisierten ACED (Fänger-Konzentration $20 \mu\text{M}$)

wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ziel-Oligonukleotiden ($0,5 \times 10^{-12}$ – 1×10^{-6} M) in $2,5 \times \text{SSC} + 0,1\%$ SDS für 3 h bei 55°C hybridisiert.

Mit dem Lichtmikroskop (Transmission, 50-fache Vergrößerung, 28 ms Belichtungszeit) waren unmittelbar nach der enzymatischen Silberentwicklung noch Konzentrationen von 5×10^{-12} M, also 5 pM ($0,05 \text{ ng}/\mu\text{l}$) erkennbar (Abb. 3.26 a). Makroskopisch waren dagegen erst Konzentrationen von 1×10^{-10} M (100 pM oder $0,9 \text{ ng}/\mu\text{l}$) sichtbar, welche ab 1×10^{-9} M (1 nM oder $9 \text{ ng}/\mu\text{l}$) in ihrer Intensität denen der Positivkontrolle entsprachen (Abb. 3.26 b bzw. 3.26 c). Die metallkatalysierte Nachverstärkung führte zu intensiveren optischen Signalen, wobei auch am Hintergrund unspezifische Metallabscheidung sichtbar wurde (Abb. 3.26 d–f). Elektrische Leitfähigkeit war zunächst nur bei 1×10^{-9} M kompletärer Probe detektierbar, wobei nach 2 min Nachverstärkung auch eine Konzentration von 1×10^{-10} M zu elektrisch leitenden Verbindungen führte. Für die geringste optisch noch nachweisbare Konzentration von 5×10^{-12} M Ziel-Oligonukleotid war dagegen auch nach 10-minütiger Nachverstärkung keine Leitfähigkeit messbar.

3.4.2. PCR-Produkte aus genomischer DNA

Nach Bestimmung der für die *GST*-Fragmente optimalen Hybridisierungsparameter sollte als anwendungsnahes System nun längere doppelsträngige DNA untersucht werden, die durch Amplifizierung aus genomischer DNA gewonnen und gleichzeitig mit Biotin markiert wurde (Polmerase-Kettenreaktion (PCR) mit biotinylierten dUTPs). Die dafür zur Verfügung gestellten Patientenproben umfassten einen *GST*-Wildtyp (*GSTM3*WT* (*M3A*)) bzw. eine heterozygot mutierte Probe (*GSTM3*mut* (*M3AB*)). Da in den ersten Versuchen keine Signale detektierbar waren, wurden die Proben durch Vakuumtrocknung weiter aufkonzentriert. Die PCR-Proben enthielten neben den amplifizierten DNA-Fragmenten noch Bestandteile des Mastermixes (Nukleotide, Primer, Polymerase), welche teilweise ebenfalls bei 260 nm absorbieren. Eine aussagekräftige spektroskopische Konzentrationsbestimmung konnte deshalb nur nach Aufreinigung der Probe (Entfernung der absorbierenden PCR-Komponenten) stattfinden. Die PCR-Proben enthielten ca. $0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bzw. $0,1 \mu\text{M}$ DNA.

Der Nachweis erfolgte entsprechend dem für die Oligonukleotide optimierten Protokoll, wobei zur Auftrennung der DNA-Doppelstränge der Hybridisierung eine Denaturierung (5 min bei 95°C) vorgeschaltet wurde. Da die DNA-Fragmente aufgrund ihrer sterischen Eigenschaften (Länge von 273 bp vs. 28 b bei Oligonukleotiden) eine niedrigere Diffusionsgeschwindigkeit aufweisen, wurde die Hybridisierung über einen längeren Zeitraum (17–22 h) durchgeführt. Nach Entfernung ungebundener Moleküle durch Waschen in Lösungen steigender Stringenz wurden die Chips mit Streptavidin-Peroxidase-Polymer (SPP) inkubiert. Nach Anbindung des Enzyms an die Biotingruppen der gebundenen Ziel-DNA (und erneutem Waschen) erfolgte die enzymatische Silberentwicklung über 5 min. Die Chips wurden anschließend optisch (Lichtmikroskop, Scanner) und elektrisch-resistiv charakterisiert und gegebenenfalls metallkatalytisch nachverstärkt.

In einigen Versuchen konnte dabei gezeigt werden, dass eine Chip-basierte Differenzierung zwischen den *GST*-Genotypen prinzipiell möglich ist. Jedoch war dieser Nachweis noch nicht ausreichend reproduzierbar, so dass es sich bei den nachfolgend gezeigten Ergebnissen um eine beispielhafte Demonstration handelt.

Optische Auswertung

Zur genauen Charakterisierung – insbesondere der schwachen Signale – wurden die Substrate im Auflicht (Si-Chips) bzw. Durchlicht (Glas/Pt-Chips) mikroskopiert. Die transparenten Glaschips ermöglichten darüber hinaus die Auswertung mittels Transmission im Diascanner, an die eine Grauwertanalyse angeschlossen werden konnte. Abb. 3.27 zeigt dabei verschiedene Fänger-DNA-Sequenzen auf Glas/Pt-Chips, die mit amplifizierten *GSTM3*-Fragmenten hybridisiert wurden. Direkt nach der enzymatischen Silberentwicklung (a, d) waren makroskopisch zunächst nur die direkt Biotin-markierten positiven Fängerproben (PK) erkennbar, welche zur Signalgebung keine Hybridisierung erforderten. Nach 4-minütiger Nachverstärkung mit Silberacetat/Hydrochinon wurden erste Signale der komplementären Sequenzen erkennbar (b, e). Diese wurden nach 8-minütiger Verstärkung zwar deutlicher, jedoch zeigten zunehmend auch Hintergrund und nichtkomplementäre Sequenzen unspezifische Signale (c, f).

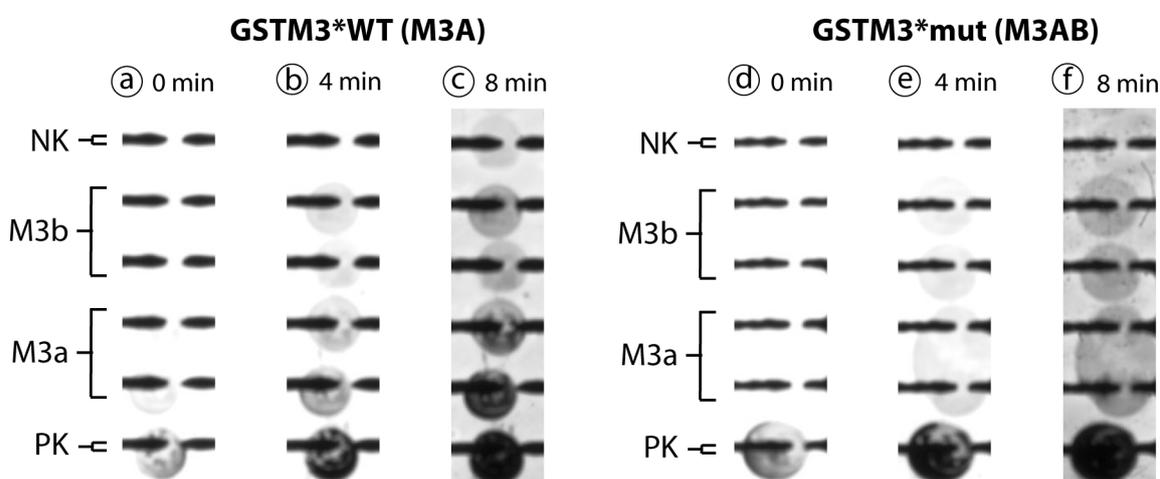


Abb. 3.27: Optische Signale im Verlauf der Nachverstärkung. Beispiel für den erfolgreichen Nachweis des *GSTM3*-Polymorphismus in amplifizierter genomischer DNA. Die eingescannten Durchlichtaufnahmen zeigen verschiedene Fängersequenzen (M3a–Wildtyp-Allel, M3b–mutiertes Allel, NK–nichtkomplementäre Negativkontrolle, PK–direkt biotinylierte Positivkontrolle), die mit den biotinylierten PCR-Fragmenten (a–c) *GSTM3**WT (M3A) und (d–f) *GSTM3**mut (M3AB) hybridisiert wurden. Die Chips wurden (a, d) enzymatisch silberverstärkt (5 min) sowie zusätzlich (b, e) 4 min bzw. (c, f) 8 min metallkatalytisch nachverstärkt.

Durch Mittelung der Messwerte und Normierung auf die Positivkontrolle ließen sich die Genotypen durch eine Grauwertanalyse nach 2–4 (*GSTM3**WT) bzw. 6–8 min (*GSTM3**mut) zusätzlicher metallkatalytischer Silberabscheidung differenzieren (Abb. 3.28). Dabei zeigte der homozygote Wildtyp insgesamt stärkere Signale als die heterozygot mutierte Probe.

Elektrische Auswertung

Parallel zur optischen Auswertung wurden die Chips zwischen den einzelnen Verstärkungsschritten elektrisch ausgelesen. Die bereinigten Widerstandswerte wurden gemittelt.

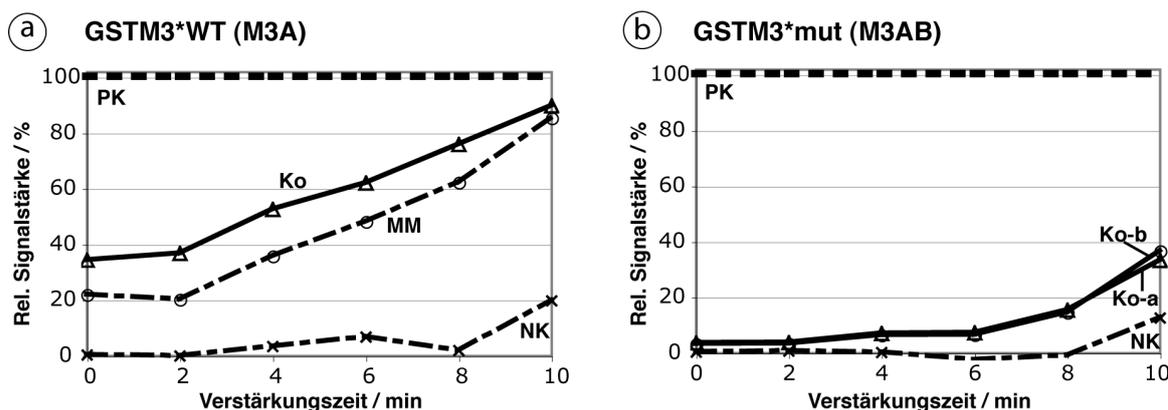


Abb. 3.28: Stärke optischer Signale im Verlauf der Nachverstärkung. Beispiel für den erfolgreichen Nachweis des GSTM3-Polymorphismus in amplifizierter genomischer DNA: (a) GSTM3*WT (M3A) und (b) GSTM3*mut (M3AB). Die Signalintensität wurde als Grauwert (schwarz=255, weiß=0) gemessen und relativ zur Positivkontrolle aufgetragen. (Fängersequenzen: Ko–komplementär, MM–Mismatches, NK–nichtkomplementäre Negativkontrolle, PK–direkt biotinylierte Positivkontrolle). Die Chips wurden enzymatisch silberverstärkt (5 min) sowie zusätzlich metallkatalytisch nachverstärkt (5×2 min).

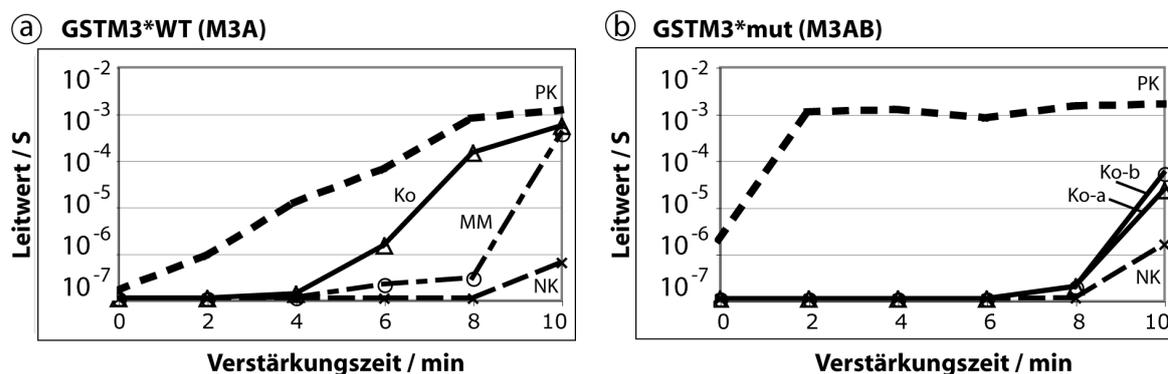


Abb. 3.29: Leitfähigkeit im Verlauf der Nachverstärkung. Beispiele für erfolgreichen Nachweis der Polymorphismen (a) GSTM3*WT (M3A) und (b) GSTM3*mut (M3AB) in amplifizierter genomischer DNA. Die Leitfähigkeit wurde in Abhängigkeit von der metallkatalytischen Nachverstärkungszeit aufgetragen. (Fängersequenzen: Ko–komplementär, MM–Mismatches, PK–direkt biotinylierte Positivkontrolle, NK–nichtkomplementäre Negativkontrolle). Die Chips wurden enzymatisch silberverstärkt (5 min) sowie zusätzlich metallkatalytisch nachverstärkt (5×2 min).

telt und nach Umrechnung als elektrischer Leitwert gegen die Verstärkungszeit aufgetragen (Abb. 3.29). Dabei stieg die Leitfähigkeit der einzelnen Fängersequenzen im Verlauf der metallkatalytischen Nachverstärkung an. Nach 8 min (*GSTM3*WT*) bzw. 10 min (*GSTM3*mut*) Nachverstärkung konnte gut zwischen den beiden *GST*-Genotypen differenziert werden. Ein weitere Metallabscheidung erwies sich als nicht sinnvoll, da mit zunehmender Verstärkung auch vermehrt unspezifische Signale auftraten.

3.5. Ergebnisübersicht

Das Flussdiagramm (Abb.3.30) stellt die notwendigen Prozessschritte Chip-basierter DNA-Nachweissysteme dar. Die in dieser Arbeit untersuchten Schritte sowie die dabei erzielten Ergebnisse sind grau hinterlegt.

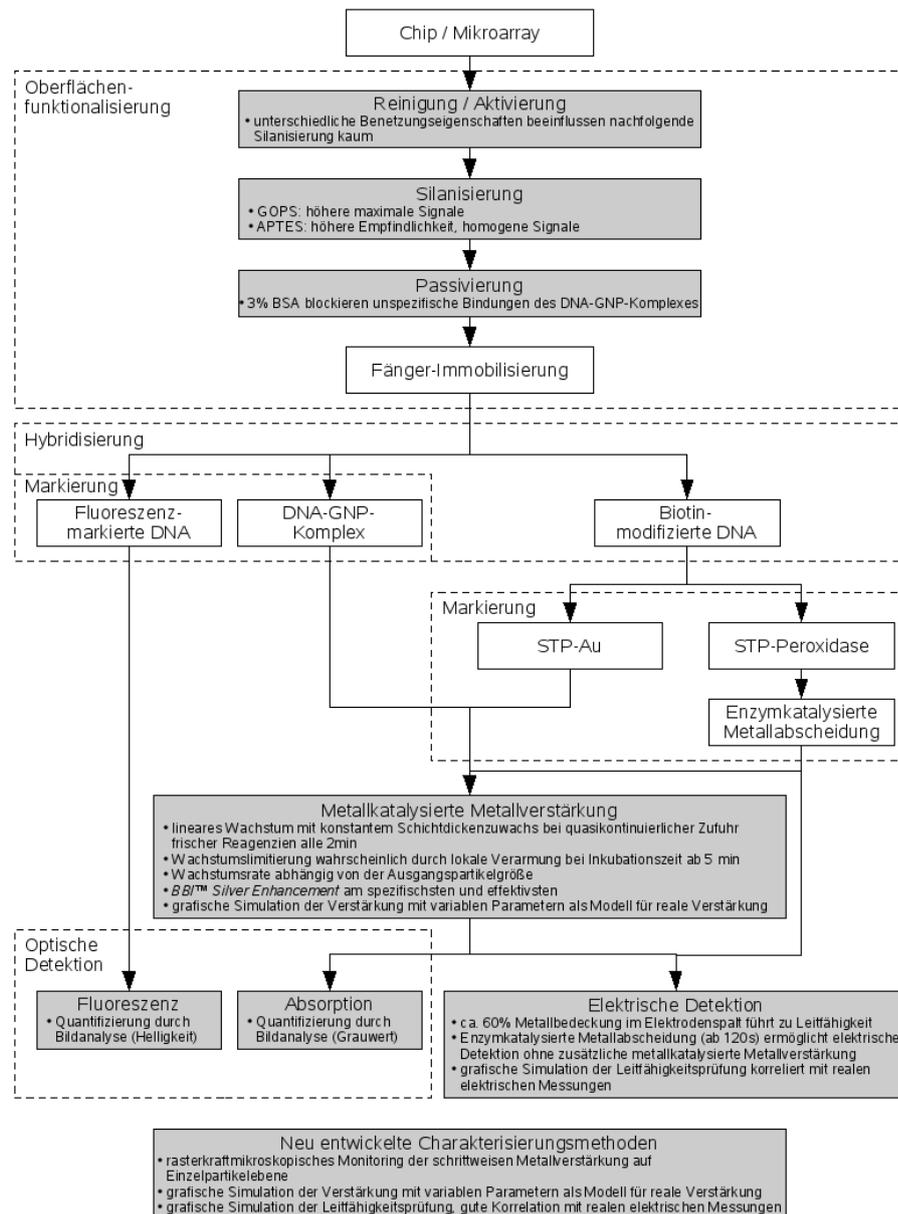


Abb. 3.30: Untersuchte Techniken und erzielte Ergebnisse (grau) zur Mikroarrayherstellung.

4. Diskussion

4.1. Charakterisierung und Optimierung der Oberflächenfunktionalisierung für Mikroarrays

Mikroarray-basierte DNA-Detektionssysteme sind vielversprechende Werkzeuge für einen schnellen und hoch parallelen DNA-Nachweis. Sie basieren auf Fängerproben verschiedener, aber bekannter Sequenz, welche auf einem Probenträger effektiv und reproduzierbar immobilisiert werden müssen. Homogen funktionalisierte Oberflächen sind dabei notwendige Voraussetzung für eine reproduzierbare Kopplungschemie, welche ausreichend Bindegruppen zur Verfügung stellt und somit gleichmäßige Bindungsraten ermöglicht (Taylor et al. 2003). Oft jedoch führen inhomogene Oberflächen zu wenig reproduzierbaren Signalen und unspezifische Bindungen beeinträchtigen die gewonnenen Ergebnisse. Deswegen wurden in vorliegender Arbeit zwei Methoden zur Oberflächenmodifikation hinsichtlich ihrer DNA-Bindungs- und Hybridisierungsfähigkeiten untersucht. Um für einen *Point-of-care*-Einsatz der Mikroarrays die Markierung durch neuartige metallische Marker zu ermöglichen, wurde darüber hinaus die Passivierung der funktionalisierten Oberflächen gegenüber der unspezifischen Anlagerung von Goldnanopartikel-markierten Ziel-Molekülen optimiert.

4.1.1. Vergleich verschiedener Reinigungs- und Aktivierungsmethoden hinsichtlich nachfolgender Silanisierung

Glas und Silizium sind geeignete und etablierte Trägermaterialien für Mikroarrays. Ihre glatte Oberfläche und die verfügbaren reaktiven Gruppen bieten ideale Bedingungen für die DNA-Kopplungschemie. Für eine ungehinderte Reaktion muss die Oberfläche frei von jeglichen organischen und anorganischen Kontaminanten sein. Die verschiedenen Reinigungsstrategien mit organischen Lösungsmitteln und starken Säuren führten zu hydrophilen Oberflächen, erkennbar an Kontaktwinkeln von 20° und weniger. Die entsprechenden AFM-Bilder zeigten sehr glatte Oberflächen ohne Kontamination. Die Modifikation der Träger mit Organosilanen führte zu deutlich hydrophoberen Oberflächen und erhöhten Kontaktwinkeln. Die gemessenen Oberflächenrauigkeiten von 2–4 nm deuteten auf eine homogene Beschichtung mit Silan, wobei die etwas höhere Rauigkeit bei der (wassersensitiven) GOPS-Silanisierung wahrscheinlich durch hydroxylierte Silane bedingt war. Möller et al. (2000) ermittelten für die APTES-Silanisierung bei vergleichbaren Reaktionsparametern und Oberflächenrauigkeiten rasterkraftmikroskopisch eine Schichtdicke von 1,8 nm.

4.1.2. Einfluss der DNA-Kopplungschemie auf Signalintensitäten und Morphologie

Da sowohl die Benetzungsfähigkeit als auch die Rauigkeitsanalyse nur Hinweise einer erfolgreichen Silanisierung sein können, wurden die modifizierten Oberflächen hinsichtlich ihrer Hybridisierungseffizienz untersucht. Dafür wurden aufsteigende Konzentrationen an Fänger-DNA mit verschiedenen Konzentrationen an fluoreszierender Ziel-DNA hybridisiert. Die höheren maximalen Signalintensitäten auf GOPS könnten durch eine höhere Dichte an Bindegruppen der Epoxy-Oberfläche zurückzuführen sein. Unterstützt wurde dieser Effekt durch die leicht rauere Oberfläche, welche wahrscheinlich zu erhöhter Bindungskapazität der Oberfläche führt. Interessanterweise lieferte die höchste Konzentration an fluoreszenzmarkierter Ziel-DNA ($2\ \mu\text{M}$) nicht die stärksten Signale. Es wird vermutet, dass die zweithöchste Zielkonzentration ($0,2\ \mu\text{M}$) bereits ausreichend war, alle verfügbaren Fängerproben auf der Oberfläche zu sättigen. Eine weitere Erhöhung steigerte die Anzahl hybridisierter Zielmoleküle nicht (APTES) bzw. schien die Hybridisierung sogar zu beeinträchtigen (GOPS), möglicherweise durch sterische Behinderung. Ein genauerer Blick auf die DNA-Spots offenbarte eine inhomogene Signalverteilung innerhalb der Spots. Auf GOPS-Oberflächen befand sich das intensivste Signal am Tropfenrand. Dieser Effekt wurde bei allen Fänger-DNA-Konzentrationen beobachtet. Im Gegensatz dazu – außer für hohe Fänger-Konzentrationen ($100\ \mu\text{M}$) – erschien das Signal auf APTES/PDC homogener verteilt. Das gleiche Phänomen wurde mit direkt fluoreszenzmarkierter Fänger-DNA beobachtet, wo der Einfluss der Hybridisierung ausgeschlossen werden konnte. Der sogenannte *Doughnut*-Effekt auf GOPS ist aus der Literatur bekannt und spiegelt unterschiedliche DNA-Konzentrationen innerhalb des Spots wider (Diehl et al. 2001). Aufgrund der erhöhten Verdunstung am Tropfenrand diffundieren die Moleküle wahrscheinlich zum äußeren Tropfenrand, wo sie dann in höherer Konzentration binden können. Auf APTES/PDC-Oberflächen vermeidet das Immobilisierungsprotokoll die Austrocknung der Tropfen, was für das Ausbleiben dieses Effektes verantwortlich sein könnte. Darüber hinaus wird eine homogene Signalverteilung sicherlich durch die glattere Oberfläche begünstigt. Der entgegengesetzte Effekt bei hohen Fänger-DNA-Konzentrationen ist unklar. Ein mögliche Erklärung ist eine schnellere Anbindungsreaktion, welche eine Moleküldiffusion zum Tropfenrand vermeiden könnte. Andere Ursachen inhomogener Signalverteilung schließen sowohl den Spotvorgang selbst als auch nachfolgende Prozessschritte, wie z.B. eine ungenügende Rehydrationszeit, ein (Yang et al. 2001). Des Weiteren beschrieben Fare et al. (2003) negative Einflüsse von atmosphärischem Ozon auf die Mikroarrayqualität. Neben standardisierten und klimatisierten Bedingungen bei der Herstellung können Bildverarbeitungsprogramme helfen, diese Nachteile zu kompensieren (Yang et al. 2001; Kooperberg et al. 2002). Darüber hinaus kann die Zirkulation innerhalb des Tropfens und damit die Diffusion der DNA-Moleküle zum Tropfenrand durch eine erhöhte Viskosität der DNA-Lösung bzw. eine Hemmung der Verdunstung erreicht werden, wie z.B. durch Zusatz von Betain bzw. Dimethylsulfoxid (Diehl et al. 2001; Tran et al. 2002; Mukhopadhyay 2006).

4.1.3. Blockierung unspezifischer DNA- und Goldpartikelbindung

Während Schemata wie Abb. 2.2 auf Seite 16 oft präsentiert werden, sind neben dieser kovalenten Anbindung auch unspezifische Bindungen zur Oberfläche vorstellbar, welche jedoch – da nicht zwangsläufig endständig – die Zugänglichkeit der Fängerproben für eine nachfolgende Hybridisierung beeinträchtigen würden. Deswegen wurde am Beispiel der APTES/PDC-Modifizierung versucht, die kovalente Kopplung über Silangruppen des Glases durch chemische Kontrollen zu bestätigen. Die Silanisierung mit APTES liefert Aminogruppen auf der Oberfläche, welche für die Anbindung von aminomodifizierter DNA mit einem sogenannten *cross linker* versehen werden müssen. Diese Quervernetzung kann durch p-Phenylendiisothiocyanat (PDC) als homobifunktionaler *cross linker* mit Thiocyanat-Gruppen auf beiden Seiten realisiert werden. Durch Auslassen dieses Linkers können die beiden Aminogruppen nicht miteinander reagieren, was durch fehlende Fänger-DNA-Spots in Abb. 3.5 c auf Seite 35 demonstriert wurde. Eine andere Strategie verfolgte die Passivierung der APTES/PDC-Oberfläche durch Ethanolamin vor der Zugabe der Oligonukleotide. Die Aminogruppen dieses Blockreagenzes führten anscheinend zur Absättigung der Thiocyanat-Bindgruppen und verhinderten damit die Anbindung aminomodifizierter DNA. Fehlende Spots in Abb. 3.5 b stützen diese Vermutung.

Neben diesen Hinweisen auf eine spezifische DNA-Anbindung über die Aminomodifizierung wurde auf APTES/PDC-Oberflächen eine ausgeprägte unspezifische Bindung von Goldnanopartikel-markierter Ziel-DNA beobachtet (Abb. 3.5 d). Einerseits können die positiv geladenen Aminogruppen der Silanoberfläche für elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Goldpartikeln bzw. DNA-Molekülen verantwortlich sein, sofern sie nicht vollständig mit Thiocyanat-Gruppen von PDC reagiert haben. Andererseits ist eine Interaktion über die Gold-Thiol-Bindung (in dieser Arbeit für die Funktionalisierung von Goldnanopartikeln mit thiolmodifizierter DNA genutzt) möglich und wahrscheinlich. Um diese hier unerwünschten Reaktionen zu vermindern wurden verschiedene Blockierungsmethoden nach der Fänger-DNA-Immobilisierung getestet. Noch verfügbare Aminogruppen der APTES-Oberfläche sollten durch Thiolgruppen von Mercaptohexanol blockiert werden, wobei kein solcher Passivierungseffekt sichtbar wurde. Ein zweiter Ansatz zielt darauf ab, noch freie Cyanatgruppen von PDC abzusättigen. Aber weder eine Behandlung mit Ammoniumhydroxyd noch Ethanolamin hemmte die unspezifische Anlagerung von Gold. Die Ursache könnte sowohl eine ungenügende Reaktion der Blockreagenzien mit den Oberflächengruppen als auch die Einführung neu verfügbarer funktioneller Gruppen sein. Im Gegensatz dazu konnte eine Behandlung mit Rinderserumalbumin (BSA) als bekanntes und häufig verwendetes Blockreagenz die Oberfläche vor unspezifischer Goldbindung schützen. Deutlich wurde dies in Form dunkler Spots (silberverstärkte Goldpartikel-markierte DNA-Spots) auf hellem Hintergrund wie in Abb. 3.5 e, f sichtbar. Es wird vermutet, dass BSA reaktive Gruppen oder Ladungen der Oberfläche gegenüber den DNA-Gold-Konjugaten abschirmen kann. Der Mechanismus dieses Passivierungseffekts ist jedoch unbekannt und es bleibt unklar, warum die zahlreichen Funktionalitäten und Ladungen des großen Proteins BSA nicht selbst anziehend auf DNA oder Gold wirken. Die passivierende Wirkung von BSA auf aminomodifizierte Mikroarrays wurde jedoch auch in der Literatur bestätigt (Taylor et al. 2003).

Für einen detaillierteren Blick auf die Menge der gebundenen Nanopartikel wurden die Spots mit den verschiedenen Fängersequenzen rasterkraftmikroskopisch untersucht (Abb. 3.6, Seite 36). Wie erwartet wurde die höchste Partikeldichte bei der komplementären Probe gefunden, wobei man aber kaum zwischen dieser vollständig komplementären Sequenz und derjenigen mit einem Basenaustausch unterscheiden konnte, obwohl die verschiedenen Signalintensitäten mit bloßem Auge sichtbar waren. Wahrscheinliche Ursache dafür war eine inhomogene Partikelverteilung im μm -Maßstab. Eine schärfere Differenzierung zwischen teilkomplementären Sequenzen könnte durch stringenteren Hybridisierungsbedingungen erreicht werden. Drei *Mismatches* führten dagegen zu einer deutlich geringeren Anzahl an gebundenen Partikeln, ähnlich wie die nichtkomplementäre Sequenz. Letztere repräsentiert außerdem das noch vorhandene Hintergrundsignal. Dabei behindert die hohe Oberflächenrauigkeit (infolge BSA-Behandlung) die Detektion individueller Partikel, was andere Auslesetechniken neben dem AFM jedoch nicht beeinträchtigen dürfte.

4.2. Charakterisierung des Partikelwachstums

Metallische Nanopartikel werden zur Signalverstärkung oder zur Einstellung definierter optischer Eigenschaften oftmals mit einer zusätzlichen Metallhülle überzogen. Um einen optimalen Verstärkungseffekt bzw. definierte Kern-Hülle-Verhältnisse zu erreichen, wurde das Wachstum von oberflächengebundenen Goldnanopartikeln infolge spezifischer Metallabscheidung untersucht.

4.2.1. Bedeckungsdichte der planaren Oberfläche

Eine Oberflächendeckung von 7×10^7 (Au60) bis 4×10^8 (Au15) Partikel je cm^2 ließ im Allgemeinen genügend Raum, um signifikante Interaktionen zwischen benachbarten Partikeln auszuschließen. Dies korrespondiert mit einer geringen Bedeckungsdichte nach einer Definition von Fransaer and Penner (1999), welche bei ihren theoretischen Simulationen 9×10^9 als geringe und 2×10^{11} Partikel je cm^2 als hohe Oberflächendichte definierten. Die entsprechenden *Nächster-Nachbar-Distanzen* (*nearest neighbor distance*, NND) betragen 80 bzw. 11 nm als Funktion der Nukleationskeimdichte auf der Oberfläche. Die Autoren vermuteten, dass dicht bedeckte Areale langsamer als Regionen mit weniger Partikeln wuchsen, weil die wachsenden Partikel jeweils denselben Fluss an Reagenzien teilten. Dies ist auf die sogenannte interpartikuläre diffusive Kopplung (*interparticle diffusion coupling*, IDC) zurückzuführen, welche auftritt, wenn sich Zonen sogenannter Depletion (Verarmung an Reagenzien) um benachbarte Partikel beginnen zu überlappen (Penner 2001). Daraus resultiert eine Wachstumshemmung benachbarter Partikel verglichen mit isoliert wachsenden Partikeln. Dabei wurde eine erkennbare Korrelation zwischen den mittleren Wachstumsraten und dem Abstand zum nächst gelegenen Partikel (NND) modelliert. Die in dieser Arbeit betrachteten Partikel lagen im Allgemeinen so weit entfernt voneinander (durchschnittlich 0,25 bis $1,5 \mu\text{m}$), dass Interaktionen zwischen benachbarten Partikeln für den Wachstumsprozess keine Rolle spielten.

4.2.2. Einfluss der Verstärkungslösung und Wachstumsverhalten metallverstärkter Partikel

Die untersuchten Metallverstärkungen zeigten im Allgemeinen vergleichbare Wachstumsintensitäten. Eine Ausnahme bildete jedoch der Silberverstärkungskit von *BBI*, welcher eine deutlich erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit aufwies. Da die Zusammensetzung der kommerziellen Lösungen nicht bekannt ist, kann nur vermutet werden, dass die *BBI*-Verstärkung höhere Konzentrationen an Metallsalz und/oder Reduktionsmittel enthält bzw. durch Reaktionsbeschleuniger eine weitere Verbesserung der Verstärkungswirkung erzielt wird. Unabhängig von ihrer Wachstumsgeschwindigkeit offenbarten die Messungen jedoch bei allen untersuchten Verstärkungen eine lineare Abhängigkeit der Partikelhöhe von der Verstärkungszeit. Dieses lineare Wachstumsverhalten deutet darauf hin, dass der Reagenzientransport zur Substratoberfläche ausreichend und weiteres Wachstum nicht limitiert war, was durch die experimentellen Bedingungen (geringe Nanopartikelkonzentration auf der Oberfläche und Überschuss an Verstärkungslösungen bei regelmäßigem Austausch und konstanter Bewegung) zu erklären ist. Im Gegensatz dazu würde man ein logarithmisches Wachstum erwarten, wenn die Reaktion diffusionskontrolliert verläuft und die Zufuhr neuer Reagenzien dadurch limitiert ist. Den theoretischen Hintergrund dazu lieferte Fletcher (1983). Er entwickelte ein physikalisches Modell, welches unter Massentransport aus einer flüssigen Elektrolytphase das Wachstum hemisphärischer Nukleationskeime auf einer Elektrodenoberfläche modellierte. Dabei beschrieb er radiale Diffusionszonen um isoliert wachsende Keime. Scharifker (1983) diskutierte das diffusionskontrollierte Wachstum für Partikelensembles. Beginnen sich die Diffusionszonen um die wachsenden Keime zu überlappen, geht der hemisphärische in einen linearen Massentransport Richtung planarer Elektroden-Oberfläche über. Die eigenen Messungen schließen eine Diffusionslimitierung beim Reagenzientransport zu den wachsenden Partikeln eher aus, da eine quasi-kontinuierliche Zufuhr frischer Lösungen zu gut separierten Partikeln stattfand.

Die Standardabweichungen, Ausdruck der Partikelgrößenverteilung, stiegen mit laufender Verstärkungszeit. Allgemein wird angenommen, dass eine breite Verteilung der Nanopartikelgrößen auf eine progressive Nukleation zurückzuführen ist, was z.B. für das elektrochemische Wachstum von Silbernanokristallen auf Silizium beschrieben wurde (Stiger et al. 1999). Für ähnliche Wachstumsexperimente auf Grafitoberflächen wurde darüber hinaus jedoch auch gezeigt, dass größere Partikel auf Kosten kleinerer wachsen, was zu Mikrokristalliten anstelle von Nanokristalliten führte (Zoval et al. 1996). Fransaer and Penner (1999) erweiterten diese ultramikroskopischen Ergebnisse durch theoretische Simulationen, bei denen sie lösungsvermittelte elektrochemische Nukleation und diffusionskontrolliertes Wachstum metallischer Nanokristalle auf Oberflächen modellierten. Um eine breite Partikelgrößenverteilung zu vermeiden, setzten sie instantane Nukleation voraus. Nichtsdestotrotz stieg bei zufälliger Partikelverteilung auf der Oberfläche die Standardabweichung der initial monodispersen kleinen Nanopartikel mit steigender Abscheidungszeit an. Dieser Effekt war auf interpartikuläre diffusionale Kopplung (IDC) zwischen benachbarten Partikeln zurückzuführen, welche diffusionskontrolliert wuchsen. Dabei zeigten zufällig verteilte Partikelkeime verschiedene interpartikuläre Abstände, was zu Inhomogenitäten im diffusionslimitierten Zufluss der einzelnen Partikel führte. Das

wurde anschaulich anhand der Größenunterschiede benachbarter Partikel verdeutlicht. D.h. voneinander weit entfernt liegende Partikel waren annähernd gleich groß, wohingegen dicht zusammenliegende Partikel eher unterschiedlich groß waren. Dabei sanken die Unterschiede zwischen den Partikelradien benachbarter Partikel z.B. von 0,26 auf 0,1 nm bei steigendem Abstand zum nächsten Nachbarn (NND) von 2 bzw. 31 nm. Die NND entsprachen dabei einem zwei- bzw. 30-fachen Partikelradius.

In vorliegender Arbeit wurden gut voneinander separierte Partikel (30- bis 50-facher Partikelradius) untersucht (Abschnitt 3.2.1 auf Seite 37). Obwohl deshalb angenommen wird, dass IDC in den durchgeführten Experimenten vernachlässigt werden kann und die Reagenzien darüber hinaus in deutlichem Überschuss vorlagen, könnte lokale Depletion eine Rolle spielen. Eine lokale Verarmung an Ausgangsstoffen könnte so – auch bei Verstärkung mit ein und derselben Verstärkungslösung – leicht unterschiedliche Wachstumsraten der einzelnen Partikel zur Folge haben. Eine weitere Ursache für die beobachteten steigenden Standardabweichungen, d.h. zunehmenden Höhendifferenzen, könnte in einer Verstärkung dieser initial geringen Unterschiede durch das katalytische Wachstumsverhalten liegen. Partikel mit überdurchschnittlichem Durchmesser zeigten demnach eine größere reaktive Oberfläche, auf welcher mehr Metall reduziert würde. Ein beschleunigtes Partikelwachstum und eine Verstärkung des Effektes wäre die Folge.

4.2.3. Einfluss der Ausgangsgröße der Partikel

Die unterschiedlich großen Ausgangskeime (Au₁₅, Au₃₀, Au₆₀) zeigten jeweils lineares Wachstumsverhalten mit konstantem Schichtdickenzuwachs. Dies lässt auf unlimitierte Abscheidung der Silberatome auf den Reduktionskeimen schließen und steht in guter Übereinstimmung mit den angewandten Reaktionsbedingungen einer niedrigen Partikelkonzentration auf der Oberfläche sowie einem Überschuss an Reaktionspartnern. Unerwartet war jedoch die Größenabhängigkeit der jeweiligen Wachstumsraten (Abschnitt 3.2.4 auf Seite 41): Je größer die Ausgangspartikel, desto schneller das Wachstum. Eine mögliche Erklärung könnte der erhöhte Transport von Reagenzien zu den größeren Partikeloberflächen sein. Sofern die Partikel geladen sind (Nanopartikel aus nasschemischer Citratsynthese tragen im Allgemeinen negative Ladungen), könnten verstärkte Ladungen auf ihrer Oberfläche mehr entgegengesetzt geladene Metallionen (Ag⁺) anziehen. Dabei schien dieser Effekt auch durch die nacheinander abgelagerten Silberschichten des “neuen” Kern-Hülle-Partikels zu wirken, d.h. die Partikel schienen sich an ihre Ausgangsgröße oder Struktur zu “erinnern”, z.B. durch Beibehaltung ihrer Gesamtladung. Das beobachtete Verhalten wies auf den Einfluss des Goldkerns (Ausgangskeim) als möglichen katalytisch aktiven Teil hin.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten Lackie et al. (1985), dass die Endgröße von Partikeln nach Silberentwicklung weniger abhängig von der Ausgangsgröße der Goldkolloide war, sondern vielmehr von der Anzahl an Nukleationskeimen. Sie begründeten das damit, dass die Oberfläche des auf jeden Keim abgelagerten Silbers sehr bald die ursprüngliche Größe der Goldkeime übersteigt. Ähnliche Effekte beschrieben auch Lange et al. (2006), welche die Größe präzipitierter Silberpartikel rasterkraftmikroskopisch untersuchten und keine signifikante Abhängigkeit von der Größe der Ausgangspartikel fanden. Zwar beobachteten sie zunächst, dass größere Ausgangskeime ein schnelleres

Wachstum initiierten und vorantrieben. Von einer bestimmten Größe der Silberstrukturen an wurde die Ausgangsgröße jedoch zunehmend vernachlässigbar.

Die Diskrepanz dieser und eigener Arbeiten ist am ehesten in einem unterschiedlichen Verhältnis der Einflussfaktoren zu vermuten. Das sind zum einen die Reagenzkonzentrationen (sowohl von Silberionen als auch Reduktionsmittel) sowie die Partikeldichte auf der Oberfläche, d.h. die Größe der autokatalytischen Partikeloberfläche. So könnte man aus den Ergebnissen von Lange et al. (2006) schlussfolgern, dass zu Beginn des Reaktionsprozesses ein Überschuss an Reagenzien für eine relativ geringe Partikeloberfläche zur Verfügung steht. Mit zunehmender Metallabscheidung und zunehmendem Partikelwachstum vergrößert sich gleichzeitig auch die reaktive Partikeloberfläche, was relativ zu einer Verarmung an Ausgangsstoffen führen und besonders die größeren Partikel in ihrem Wachstum verlangsamen könnte. So könnte eine limitierte Zufuhr an Reagenzien ausreichend für kleine, aber unzureichend für größere Oberflächenareale sein. Sollte diese Verarmung an Reagenzien besonders das Wachstum großer Partikel beeinträchtigen, würden die Unterschiede in der Partikelgrößen-abhängigen Wachstumsrate zunehmend egalisiert und schließlich vernachlässigbar werden. In Abschnitt 4.2.5 werden Depletions-effekte weiter diskutiert werden.

4.2.4. Spezifität der Verstärkung

Spezifität und Sensitivität eines DNA-Nachweises sind neben der Hybridisierung auch von der Markierung der Doppelstränge z.B. mit metallischen Nanostrukturen abhängig. Eine sich anschließende Signalverstärkung, in diesem Fall durch zusätzliche Metallabscheidung auf den gebundenen Metallmarkern, sollte ebenfalls möglichst spezifisch sein. Bei der rasterkraftmikroskopischen Betrachtung der verschiedenen Silber- und Goldverstärkungslösungen offenbarte sich ein unterschiedliches Ausmaß an unspezifischen Metallabscheidungen. So erwiesen sich *BBI* und HAuCl_4 als sehr spezifisch wirkende Verstärkungsreagenzien, wohingegen bei *Sigma* und AgNO_3 viele unspezifische Abscheidungen auf der Oberfläche zu finden waren.

Eine Ursache dafür könnten unterschiedliche Lichtempfindlichkeiten der Verstärkungslösungen sein. Schon Liesegang (1911) beschrieb für Silbernitrat als Ionenquelle die gleichzeitige Ausbildung submikroskopisch kleiner metallischer Silberkeime in der Lösung. Diese Bildung freien Silbers wird durch elektromagnetische Strahlung (Licht) gefördert und trägt zum Hintergrund bei. Dies könnte die Ursache für die beobachteten unspezifischen Abscheidungen bei AgNO_3 als Metallsalz sowie als wahrscheinlicher Bestandteil des *Sigma*-Verstärkungskits sein. In der Literatur wurde die Einführung von Silberlaktat (statt Silbernitrat) als wichtiger Schritt zu einer verbesserten Selektivität der Verstärkung beschrieben (Danscher 1981c). Eine weitere Verminderung der Lichtempfindlichkeit konnte durch die Verwendung von Silberacetat erreicht werden, welches bei vergleichbarem Verstärkungseffekt geringeren Hintergrund entwickelte (Hacker et al. 1988). Das erklärt die relativ gute Spezifität der Silberacetat- sowie der *BBI*-Verstärkung mit Silberacetat als vermutetem Metallsalz. Darüber hinaus wird angenommen, dass diesem kommerziellen Kit Stabilisatoren zugesetzt wurden, welche die Lichtempfindlichkeit weiter verminderten. Hayat (1989) beschrieb z.B. *Gummi arabicum* als protektiven Zusatz, der die Toleranz gegenüber Tageslicht erhöhen kann. Andererseits ist denkbar, dass unterschiedliche

Redoxpotenziale der Reagenzien neben der gewünschten Reduktion an Gold- bzw. Silberstrukturen auch eine Metallabscheidung an anderen reduzierenden Keimen förderten. So ist bekannt, dass durch Autometallografie neben Gold und Silber auch andere Gewebemetalle (Hg, Zn) angefärbt werden können (Hacker et al. 1988).

4.2.5. Wachstumslimitierung/Verarmung an Reagenzien

Quantitative Analyse

Aus den berechneten und experimentellen Daten zum Verbrauch an Silberionen durch die Abscheidung an Metallkeimen konnten folgende Grenzbedingungen definiert werden: Um ein lineares Partikelwachstum ohne Limitierung sicherzustellen, sollten die Ausgangsstoffe (Silberionen und Reduktionsmittel) mindestens im Überschuss von drei bis vier Größenordnungen vorliegen. Jedoch muss betont werden, dass die Zufuhr dieser Reaktionspartner – auch wenn sie im starken Überschuss vorliegen – gewährleistet sein muss. Mögliche, besonders lokale Depletionseffekte, werden später detaillierter diskutiert werden.

Die quantitative Analyse des gesamten Chips offenbarte daneben aber auch deutlich die Nachteile von Ensemble-Messungen zur Charakterisierung des Wachstums metallverstärkter Partikel. Diese Messungen beinhalten dabei immer das gesamte abgeschiedene Silber; unabhängig davon, ob dieses die Nanopartikelkeime umhüllt oder sich unspezifisch auf dem Chip ablagert hat. Dagegen erlauben die durchgeführten rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen eine definierte, orts aufgelöste Charakterisierung des Partikelwachstumsprozesses.

Verlängerung der Verstärkungsintervalle

Wie sich bei der Verlängerung des Verstärkungsintervalles von 2 auf 5 min bereits andeutete, wurde das Partikelwachstum durch die deutlich verlängerte 20-minütige Inkubation ohne Zufuhr frischer Lösungen beträchtlich gehemmt. Die Partikel erreichten in der Ein-Schritt-Verstärkung nur ca. ein Drittel der Endhöhe im Vergleich zur schrittweisen Silberverstärkung. Dieser Effekt ist vermutlich auf einen zunehmenden Verbrauch an Ausgangsstoffen (Silbersalz und/oder Reduktionsmittel) zurückzuführen.

Im Gegensatz dazu beobachteten Lange et al. (2006) jedoch größere Partikel, wenn diese ohne Austausch von Verstärkerlösungen wuchsen im Vergleich zu denjenigen, die einen kontinuierlichen Reagenzienaustausch erfuhren. Sie vermuteten im kontinuierlichen Fluss zwei Ursachen, die glattere Nukleationskeime und damit ein vermindertes Wachstum bedingten. Einerseits würden Scherkräfte größere raue Nukleationskeime zerreißen. Andererseits gewährleiste ein kontinuierlicher Austausch ein gleichbleibend hohes elektrochemisches Potenzial, welches ein stetiges und gleichmäßiges Wachstum glatter Oberflächen ermögliche. Ohne Austausch fiel das elektrochemische Potenzial im Laufe der Verstärkungszeit hingegen kontinuierlich ab, was ein Wachstum kleiner rauer Strukturen befördere.

Was sind also die entscheidenden Parameter, die Partikelgröße und -form beeinflussen? Zum einen werden strukturabhängige Parameter als die wichtigsten Ursachen für anisotropes Wachstum angesehen. Brown et al. (2000a,b) entwickelten eine Methode zur

Synthese größerer Goldnanopartikel mit hoher Monodispersität, indem sie Au^{+3} Ionen an präformierten kleinen Goldpartikelkeimen reduzierten. Obwohl der überwiegende Teil der Partikel hoch uniform in Größe und Gestalt war, existierte eine kleine, sehr abgegrenzte Subpopulation stäbchenförmiger Strukturen. Die Autoren schlugen zwei Ursachen für dieses anisotrope Wachstum vor: starke elektromagnetische Felder an den Enden länglicher Gold- oder Silbersphäroide sowie kristallfacetten-selektive Oberflächenreaktionen. Ihre AFM-Aufnahmen zeigten dabei, dass das Wachstum oberflächengebundener Goldpartikel eine völlig andere Verteilung der Partikelgröße und -gestalt hervorrief als ein Wachstum in Lösung. Der Festphasen-bezogene Prozess war dabei stark abhängig von der Bedeckungsdichte der Partikel auf der Oberfläche. Geringe Partikeldichten lieferten elliptisch geformte isolierte Partikel, wobei erhöhte Abstände zwischen den Partikeln ein lösungsähnliches Wachstum beförderten. Im Gegensatz dazu führte eine hohe Partikeldichte sowohl zu extensiver Partikelfusion als auch zu verschiedenen Wachstumsraten an verschiedenen Bereichen der fusionierten Partikel, was in sehr komplexen dreidimensionalen Objekten resultierte. Wei and Zamborini (2004) nutzten ebenfalls das AFM, um immobilisierte Goldnanopartikel vor und nach deren partikelbasiertem Wachstum zu Stäbchen und anderen Formen zu untersuchen. Obwohl sie eine Korrelation zwischen Keimgröße und Stäbchendurchmesser fanden, spielte im Wachstumsprozess die initiale Struktur des partikulären Keimes eine größere Rolle als dessen Größe und bestimmte somit die resultierende Gestalt. Der Einfluss verstärkter elektrischer Felder an den Enden nichtsphärischer Strukturen könnte ebenfalls eine Rolle spielen, erklärte jedoch nicht das z.T. beobachtete Stäbchenwachstum in nur eine Richtung. Ein weiterer diskutierter Punkt war die räumliche Beziehung benachbarter Partikel und die damit verbundene interpartikuläre diffusive Kopplung (IDC), welche zu breiterer Streuung in Größe und Form führen könnte.

4.2.6. Partikelanzahl/Partikelablösung von der Oberfläche

Im Verlauf des Verstärkungsprozesses war eine gewisse Ablösung der Partikel von der Chipoberfläche zu beobachten. Dabei variierte der Anteil an abgelösten Partikeln sowohl zwischen den verschiedenen Verstärkerlösungen als auch zwischen den verschiedenen Partikelgrößen bzw. Inkubationstypen beträchtlich. Vorausgesetzt, dass alle Partikel vergleichbar an die Oberfläche gebunden sind – was bei gleichem Immobilisierungsprotokoll angenommen werden kann – werden zwei mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Ablösungsraten vermutet. Auf der einen Seite könnten sowohl verschiedene Ionenstärken der Verstärkerlösungen (bedingt durch deren unterschiedliche Zusammensetzung) als auch möglicherweise vorhandene Detergenzien die unspezifische Bindung der Partikel an die Oberfläche signifikant beeinflussen. Auf der anderen Seite könnte der Partikelverlust durch Scherkräfte der wachsenden Partikel bei Inkubations- und Trocknungsprozessen bedingt sein.

Dabei sollte man vermuten, dass die Scherkräfte mit zunehmender Partikelgröße ebenfalls zunehmen, was beim Vergleich der verschiedenen Ausgangspartikelgrößen während der BBI-Silberverstärkung beobachtet werden konnte: Je größer die Partikelkeime, desto geringer die verfügbare Partikelanzahl am Ende der Verstärkung. Beim Vergleich der verschiedenen Verstärkungslösungen konnte jedoch keine Korrelation zwischen den erziel-

ten Partikelendhöhen und der entsprechenden relativen Partikelanzahl gefunden werden. Mögliche Gründe dafür könnten zusätzliche ionische Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Komponenten der Lösungen bzw. unspezifische Wechselwirkungen sein, welche mit zunehmender Partikelgröße im Verlauf der Metallabscheidung steigen und so den Scherkräften verstärkt entgegenwirken könnten.

Ein Einfluss mechanischer Kräfte in der Partikelablösung wurde darüber hinaus durch den Vergleich der schrittweisen Silberverstärkung mit dem Ein-Schritt-Prozess bekräftigt. Bei Letzterem verblieben fast alle Partikel auf der Oberfläche, wohingegen bei der schrittweisen Inkubation nur etwa ein Drittel der Ausgangspartikel präsent waren. Dies war vermutlich sowohl das Ergebnis des wiederholten Chip-Handlings als auch der zahlreichen Inkubations- und Trocknungsprozesse.

4.3. Partikelwachstum im Elektrodenspalt – Leitfähigkeit

Nach der isolierten Betrachtung der Metallabscheidung auf Goldnanopartikeln sollte das Nanopartikelwachstum im Hinblick auf die Ausbildung leitfähiger Partikelbrücken/Metallfilme im Elektrodenspalt näher untersucht werden. Anwendungsnah wurden die mit Fänger-DNA verschiedener Sequenzen funktionalisierten Chips dabei mit Ziel-Oligonukleotiden hybridisiert, die endständig ein Biotinmolekül aufwiesen. Die Markierung der entstandenen biotinylierten DNA-Doppelstränge erfolgte anschließend direkt mit Streptavidin-Goldnanopartikeln oder indirekt über die Kopplung einer Streptavidin-Peroxidase und nachfolgender enzymatischer Silberentwicklung. Das Wachstum der metallischen Strukturen wurde rasterkraftmikroskopisch untersucht und sowohl mit Messungen der elektrischen Leitfähigkeit als auch mit theoretischen Simulationen verglichen.

4.3.1. Metallkatalysierte Silberabscheidung an Goldnanopartikeln

Im Unterschied zur isolierten Betrachtung des Wachstums unmodifizierter Goldnanopartikel auf gereinigten SiO₂-Oberflächen wurden die hier untersuchten Goldpartikel (15 nm Durchmesser) über ihre Streptavidin-Modifizierung an die Biotinmoleküle der hybridisierten DNA-Doppelstränge gebunden. Diese spezifische und hochaffine Verbindung sorgte für eine hohe partikuläre Bedeckungsdichte der Oberfläche als Voraussetzung für eine spätere Leitfähigkeit und verhinderte ein Ablösen der Partikel von der Oberfläche. Nachteilig war allerdings, dass die erhöhte Rauigkeit der Substratoberfläche (5–10 nm im Vergleich zu 1–2 nm) infolge Silanisierung, Fängermolekül-Bindung und/oder Waschprozessen in Salzlösungen die rasterkraftmikroskopische Untersuchung erschwerte.

Experimentelle Daten

In den Elektrodenspalten mit komplementärer Fängersequenz (Ko) und denen der Positivkontrolle (PK) waren rasterkraftmikroskopisch zahlreiche ca. 15 nm-große Strukturen nachweisbar, die durch anschließende schrittweise Silberverstärkung in ihrer Höhe und lateralen Ausdehnung zunahmen. Dies war ein starker Hinweis darauf, dass es sich bei diesen

Strukturen wirklich um die verwendeten 15 nm-Partikel handelte. Auch bei den teil- und nichtkomplementären Proben bzw. Spalten ohne Fänger-DNA (MM, NK, HG) wurden zu Beginn Strukturen im Höhenbereich von 10–20 nm nachgewiesen, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß. Im Gegensatz dazu wurden jedoch nur einige dieser Strukturen infolge metallkatalytischer Silberabscheidung spezifisch verstärkt. Es wird angenommen, dass die Rauigkeiten größtenteils aus der Funktionalisierung/Prozessierung der Proben resultierten.

Die zahlreichen Nanopartikel der positiven Proben (Ko, PK) wuchsen im Verlaufe der Silberverstärkung deutlich und verschmolzen z.T. sichtbar miteinander. Diese Beobachtungen wurden unterstützt durch parallel durchgeführte Leitfähigkeitsmessungen, bei welchen nach 10- bzw. 12-minütiger Silberverstärkung (Ko bzw. PK) ein Widerstandsabfall messbar war. Die vereinzelt metallischen Partikel der negativen Proben waren nicht ausreichend, um eine leitfähige Verbindung beider Elektroden herbeizuführen.

Da neben der Verteilung der metallischen Strukturen deren Menge bzw. flächenhafte Ausdehnung im Spalt eine entscheidende Rolle spielt, sollte die metallbedeckte Fläche im Spalt quantifiziert und eine Mindestgrenze für das Eintreten von Leitfähigkeit bestimmt werden. Für die Ermittlung des partikulären Flächenanteils mussten die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen zunächst in Binärbilder (schwarze Partikel auf weißem Hintergrund) umgewandelt werden, wofür als Schwellenwert eine Höhe festzulegen war. Dieser Höhenwert unterteilt das Bild in relevante Strukturen und zu vernachlässigenden Hintergrund (oberhalb bzw. unterhalb des Schwellenwertes). Je größer dieser Wert ist, desto mehr Strukturen werden dem Hintergrund zugeordnet und nicht erfasst. Infolgedessen fallen die partikulären Flächen geringer aus, jedoch vermindert sich auch der Einfluss hintergrundnaher unspezifischer Strukturen. Im Vergleich der tatsächlich gemessenen Leitfähigkeit mit der grafischen Durchgängigkeit der resultierenden partikulären Strukturen erwiesen sich 100 nm für die Charakterisierung der nachverstärkten Partikel als günstiger Schwellenwert. Das bedeutet: Die durch helligkeitskodierte Höheninformationen dreidimensionalen Partikelstrukturen im AFM-Bild wurden in einer Höhe von 100 nm "geschnitten". Höhere Strukturen wurden dabei erfasst und in binäre partikuläre Schnittbilder umgewandelt. Die Analyse der AFM-Aufnahmen offenbarte einen linearen Anstieg des Anteils der metallbedeckten Fläche im Spalt in Abhängigkeit von der Zeit der Metallverstärkung, d.h. der Metallabscheidung auf vorhandenen Keimen. Mit 74% übertraf die Metallabscheidung der positiven Proben nach 10 min Verstärkung die der negativen mit 5% deutlich. Unter Berücksichtigung der elektrischen Messwerte zeigte sich weiterhin, dass mindestens 60-70% der Fläche im Spalt durch Metallabscheidungen bedeckt sein sollten, um leitfähige Verbindungen wahrscheinlich zu machen.

Theoretische Daten/Simulation

Die Ausbildung leitfähiger Schichten/Brücken im Elektrodenspalt ist Voraussetzung für einen Widerstandsabfall über dem Spalt. Um Vorhersagen über eine eintretende Leitfähigkeit machen zu können, wurde überprüft, ob die theoretische Simulation einer Verstärkung, d.h. des Partikelwachstums, den Zeitpunkt des Eintritts von Leitfähigkeit vorher sagen kann. Dazu wurde aus den rasterkraftmikroskopischen Ausgangsbildern die Ausgangsverteilung der partikulären Keime ("Schnitthöhe" in 7 nm, entspricht halber Par-

tikellhöhe bei 15 nm-großen Partikeln) als Binärbild gewonnen. Diese “Partikelmasken” wurden anschließend schrittweise grafisch verstärkt. Um mögliche unspezifische nicht-metallische und damit nicht verstärkungsfähige Strukturen von einem Wachstum auszuschließen, wurden in einem zweiten Ansatz nur die Mittelpunktkoordinaten von definiert großen Partikeln verwendet und deren Wachstum ausgehend von 1 px-großen Keimen grafisch simuliert. Der simulierte Schichtdickenzuwachs pro Verstärkungsschritt betrug 24 nm. Dieser Wert erlaubte nur eine relativ grobe Abstufung der Wachstumsschritte, war jedoch durch die Auflösung der Bilder vorgegeben. Nach jedem Verstärkungsschritt wurden die Bilder/Proben auf grafische Durchgängigkeit geprüft. Die Simulation des Partikelwachstums ergab nach 96 nm Schichtdickenzuwachs grafisch leitfähige komplementäre Proben sowie nach 120 nm leitfähige Positivkontrollen. Damit wurden die Ergebnisse der realen Verstärkung bestätigt, bei welcher die komplementäre Probe – verglichen mit der Positivkontrolle – zur Ausbildung der Leitfähigkeit eine geringere Verstärkungszeit benötigte.

Doch inwieweit stimmten die zur Ausbildung einer Leitfähigkeit notwendigen gemessenen und simulierten Zuwächse überein? Da die laterale Ausdehnung von Strukturen in der Rasterkraftmikroskopie aufgrund des Einflusses der Spitzengeometrie weniger aussagekräftig ist, wurde die Höhendifferenz infolge der Metallabscheidung bestimmt. Die Messung der mittleren Höhen experimentell im Spalt verstärkter Partikel ergab mit 212 bzw. 234 nm (Ko bzw. PK) einen etwa doppelt so hohen Höhenzuwachs wie der simulierte laterale Zuwachs. Auch die Analyse ausgewählter Partikel auf Einzelpartikelebene zeigte einen ähnlichen Höhenzuwachs von 237 nm. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die experimentelle Metallabscheidung vorrangig in z- und weniger in x, y-Richtung erfolgte. Dies könnte durch eine bessere Zugänglichkeit der der Verstärkungslösung zugewandten Partikeloberflächen verursacht sein. Des Weiteren könnten bei hohen Partikeldichten auf der Substratoberfläche benachbarte Partikel möglicherweise um Reagenzien konkurrieren, was bei ungenügendem Stofftransport zur diffusionskontrollierten Limitierung des Wachstums führen würde. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die scheinbare Berührung benachbarter Partikel nicht immer zu einem wirklich leitfähigen Kontakt zwischen ihnen führte. Auch können schon geringe Unterschiede in der Lokalisation der Kontaktflächen für die Ausbildung leitfähiger Verbindungen entscheidend sein.

Darüber hinaus zeigte ein Vergleich mit den Studien zum Partikelwachstum (Abschnitt 3.2.4 mit Tab. 3.4 auf Seite 43) eine hervorragende Übereinstimmung der ermittelten experimentellen Wachstumsraten (gemessen als Höhenzuwachs pro Zeiteinheit) von ca. 24 nm pro min für 15 nm-große Goldpartikel bei Verstärkung mit dem *BBITM-Silver Enhancement Kit*. Dies spricht für eine reproduzierbare Metallabscheidungsrate auf den Partikeln und eröffnet damit die Möglichkeit, aus gewonnenen Daten mögliche Vorhersagen für das Verhalten metallverstärkter Partikel zu treffen.

Beide Strategien zur Erzeugung der Ausgangskeime für eine Wachstumssimulation (Partikelmasken oder Mittelpunktkoordinaten) lieferten die gleichen Schichtdicken, die zur Ausbildung von Leitfähigkeit im Spalt notwendig waren. Wahrscheinliche Ursache dafür war die relativ geringe Menge unspezifischer Strukturen, verglichen mit der großen Anzahl an Ausgangspartikeln (ca. 2000 Partikel im Spalt). Die scheinbaren Unterschiede beim für eine Leitfähigkeit notwendigen Metallisierungsgrad (60–70% vs. 60%) lagen innerhalb der Schwankungsbreite der nur grob aufgelösten Wachstumsstufen und befanden

sich in guter Übereinstimmung mit der experimentell ermittelten Mindestbedeckung von 50–70% der Fläche im Spalt.

Für das simulierte Partikelwachstum im Spalt erwies sich die Methode der grafischen Prüfung auf zusammenhängende, die beiden Elektroden verbindende Bereiche als geeignetes Korrelat zu einer elektrischen Leitfähigkeitsmessung realer Proben.

4.3.2. Enzymkatalysierte Silberentwicklung

Nach Funktionalisierung der mikrostrukturierten Probenträger (Silanisierung und Immobilisierung von Fänger-DNA des *GST*-Systems) wurden diese mit dem biotinylierten Oligonukleotid *GSTM3A2* als modellhafte Ziel-DNA hybridisiert. Neben der klassischen Kopplung Streptavidin-modifizierter Goldnanopartikel an die biotinylierten DNA-Doppelstränge kam in vorliegender Arbeit eine neue Methode zur Anbindung metallischer Nanostrukturen zum Einsatz. Die Anbindung einer Streptavidin-modifizierten Meerrettich-Peroxidase ermöglichte mithilfe des kommerziellen Kits *EnzMet*TM die enzymkatalysierte Entwicklung von Silberstrukturen.

Experimentelle Daten

Die rasterkraftmikroskopische Untersuchung offenbarte in den Elektrodenspalten mit komplementärer Fängersequenz (Ko) und Positivkontrolle (PK) zahlreiche, dicht gepackte Strukturen um 100–200 nm Höhe, die im Verlauf der enzymkatalysierten Silberentwicklung (15–300 s *EnzMet*TM) zunahmen. Bei den teil- und nichtkomplementären Sequenzen (MM, NK) sowie Elektrodenspalten ohne Fänger-DNA (HG) konnten dagegen nahezu keine partikulären Strukturen detektiert werden, was die Spezifität des Nachweises verdeutlicht.

Ergänzende rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der gleichen Elektrodenspalten bestätigten die Abscheidung metallischer Strukturen im Spalt, welche spezifisch nur an Fängerproben mit komplementärer Sequenz sowie an der direkt Biotin-markierten Positivkontrolle beobachtet werden konnten. Im Gegensatz zu den gut abgrenzbaren Goldnanopartikeln waren diese Strukturen jedoch von unregelmäßiger Gestalt und Größe und ließen sich sowohl im AFM als auch im REM nur schwer voneinander abgrenzen (Abb. 4.1).

Eine Quantifizierung der Metallabscheidung erfolgte anhand der AFM-Aufnahmen durch Bestimmung des metallbedeckten Flächenanteils im Spalt und wurde zusammen mit einer Widerstandsmessung betrachtet. Anders als bei den mit Streptavidin-Goldnanopartikeln markierten Chips wurde der Schwellenwert zur Binarisierung der AFM-Bilder auf 60 nm (statt 100 nm) festgelegt. Die daraus resultierenden “Partikelmasken” korrelierten in ihrer grafischen Durchgängigkeit am besten mit der real messbaren Leitfähigkeit. Durch Herabsetzung dieses Schwellenwertes wurden mehr oberflächennahe Strukturen erfasst, welche anscheinend einen relevanten Beitrag zur Ausbildung einer Leitfähigkeit leisteten. Die Analyse der metallisierten Fläche im Spalt zeigte einen linearen Anstieg mit zunehmender Silberentwicklungszeit (Ko und PK). Die Metallabscheidung bei den negativen Proben (MM, NK, HG) konnte mit einem Anteil von unter 0,03% vernachlässigt werden. Im Zusammenhang mit der parallel durchgeführten elektrischen

Messung erwiesen sich 55–60% metallbedeckte Fläche als scheinbare Grenze zur Leitfähigkeit. Dies befand sich in guter Übereinstimmung mit derjenigen Mindestbedeckung, die aus den Streptavidin-Goldnanopartikelversuchen resultierte (50–70%).

Für eine messbare elektrische Leitfähigkeit mussten die Positivkontrollen 120 s, die komplementären Proben mindestens 300 s enzymkatalysiert entwickelt werden. Durch metallkatalytische Nachverstärkung konnten allerdings auch bisher nicht leitende Proben zur Leitfähigkeit gebracht werden, was am Beispiel der 30 bzw. 120 s mit *EnzMet*TM entwickelten Chips erfolgreich gelang. Die korrespondierenden Metallisierungsgrade im Spalt übertrafen dabei deutlich die 60%-Grenze.

Theoretische Daten/Simulation

Anhand der gleichen Proben wurde versucht, die metallkatalytische Nachverstärkung der enzymatisch entwickelten partikulären Keime grafisch zu simulieren. Um den Wachstumsprozess abgestufter betrachten zu können, wurde die Auflösung der Ausgangsbilder erhöht. Damit entsprach ein Wachstum um 1 px einer Schichtdicke von ca. 12 nm. Nach jedem Verstärkungsschritt wurden die resultierenden “gewachsenen” Strukturen auf zusammenhängende, die beiden Elektroden verbindende Bereiche untersucht (grafische Leitfähigkeitsprüfung). Die 30 s mit *EnzMet*TM entwickelten Chips benötigten zwei grafische Verstärkungsschritte. D.h. ein Schichtdickenzuwachs von bis zu 24 nm führte zur Verschmelzung der partikulären Strukturen und Ausbildung leitfähiger Brücken. Beim 120 s mit *EnzMet*TM behandelten Chip waren die Ausgangsstrukturen größer, weswegen bereits eine zusätzliche Schichtdicke von 12 nm in grafisch leitfähigen Verbindungen beider Elektroden resultierte. Ergänzend durchgeführte Bestimmungen der partikulären Fläche im Spalt ergaben Bedeckungsgrade um 60%, was wiederum im Einklang mit der vorher bestimmten Mindestbedeckung stand.

Zur Verifizierung der simulierten Schichtdicken wurden diese mit dem mittleren Höhenzuwachs der partikulären Strukturen vor und nach der metallkatalytischen Nachverstärkung verglichen. Eine 10-minütige Nachverstärkung des 30 s mit *EnzMet*TM entwickelten Chips führte mit 29–37 nm zu einer vergleichbaren, zusätzlichen Schichtdicke. Dies galt besonders dann, wenn diese Werte um den Anteil unspezifischer Abscheidungen (ca. 4 nm; abgeleitet von der Negativkontrolle) vermindert wurden. Die gegenüber der simulierten Schichtdicke von maximal 24 nm geringfügig erhöhten Werte sprechen dennoch für ein leicht verstärktes Wachstum in z-Richtung. Der für den 120 s mit *EnzMet*TM behandelten Chip gemessene Höhenzuwachs von 9 nm lag dagegen genau im Bereich des maximal 12 nm-großen simulierten Schichtdickenzuwachses. Beim Vergleich der experimentellen und theoretischen Messwerte muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich hierbei um Einzelmessungen handelte und ebenfalls Messungenauigkeiten zu den Unterschieden beigetragen haben könnten. Eine weitere Ursache für ein im Vergleich zu den Streptavidin-Goldnanopartikeln weniger stark ausgeprägtes Wachstum in z-Richtung liefert die unregelmäßige Gestalt der metallischen Nanostrukturen, welche durch enzymkatalysierte Silberentwicklung ohne sphärischen Nanopartikel als Startkeim gewachsen waren (Abb. 4.1). Die plättchen- bis stäbchenförmigen Strukturen boten eine große unregelmäßige Oberfläche, an welcher Silber abgeschieden werden konnte, ohne ein verstärktes Wachstum in z-Richtung zu bedingen.

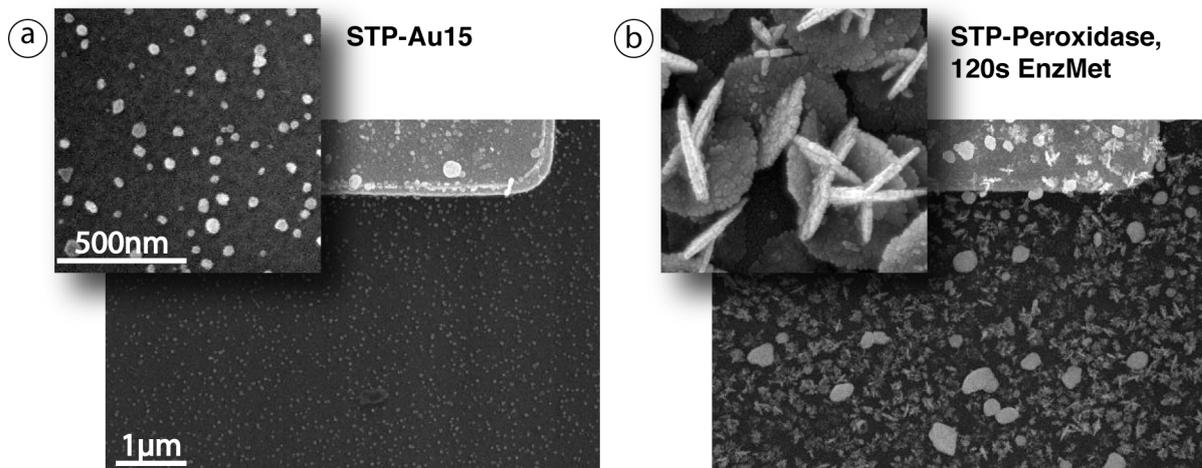


Abb. 4.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Streptavidin-Goldnanopartikeln (a) und enzymkatalysiert gewachsenen Silberstrukturen (b). Mikrostrukturierte Si-Chips wurden mit Fänger-DNA funktionalisiert und mit biotinylierten Oligonukleotiden hybridisiert. Zu sehen sind Elektrodenrillen nach (a) Anbindung von Streptavidin-Goldnanopartikeln (Durchmesser 15 nm; STP-Au15) und (b) Anbindung eines Streptavidin-Peroxidasepolymers (STP-Peroxidase) und nachfolgender enzymkatalysierter Silberentwicklung mit dem EnzMetTM-Kit (120 s). Inset: Die Detailaufnahmen einzelner (a) Goldnanopartikel bzw. (b) enzymkatalysiert gewachsener Silberstrukturen zeigen deutliche Unterschiede in Größe und Gestalt der metallischen Nanostrukturen.

4.4. Anwendungsbeispiel: Chip-basierter Nachweis eines Enzym polymorphismus

Genetische Polymorphismen können, wenn sie katalytisch relevante Bereiche von Enzymen betreffen, deren Enzymaktivität beeinflussen. Im Falle des Engiftungsenzyms *Glutathion-S-Transferase (GST)* kann das zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber bestimmten Krebsarten führen. Solche genetisch determinierten Risiken sollten deswegen rechtzeitig erkannt werden, um wirksame Maßnahmen zur Vorsorge einleiten zu können.

4.4.1. Oligonukleotide als Modellsystem

Zur Etablierung des Testsystems wurden zunächst synthetische, einzelsträngige Modell-Oligonukleotide als nachzuweisende Zielmoleküle verwendet. Die geringe Länge der Moleküle (*GSTM3A2* mit 28 bzw. *GSTM3B* mit 27 Nukleotiden) sowie deren Einzelsträngigkeit erleichterte die Hybridisierung beträchtlich. Damit konnten sowohl die Festphasengebundenen Fängersequenzen auf ihre Bindungsfähigkeit getestet als auch Hybridisierungsparameter wie Pufferbedingungen, Hybridisierungszeit und -temperatur optimiert werden.

Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur

Die Spezifität der Hybridisierung ist abhängig von der Stabilität des gebildeten Doppelstranges, welche direkt mit dessen Schmelztemperatur (T_m) korreliert, also abhängig ist von Länge und Basenzusammensetzung des Sequenzabschnittes, Helix-destabilisierenden Zusätzen sowie der Art der zu hybridisierenden Nukleinsäurestränge (Marmur and Doty 1961). Sie musste daher für die neue Anwendung optimiert werden.

Sowohl in der optischen als auch der elektrischen Auswertung nahm die Intensität der Signale mit zunehmender Hybridisierungstemperatur ab, da bei zunehmender Annäherung an die Schmelztemperatur die Stabilität der Doppelstränge sinkt. Gleichzeitig wurde deutlich, dass sich die Signale der verschiedenen Fängersequenzen zunehmend unterschieden, d.h. eine Differenzierung zwischen den einzelnen Sequenzen mit steigender Hybridisierungstemperatur – also Stringenz – erleichtert wurde. Außerdem fiel auf, dass die Fängersequenz *GSTM3a1* (*MM1*) relativ unspezifisch reagierte und sich in ihrer Bindungscharakteristik nur wenig von *GSTM3b* (*Ko*) als Fängersequenz des mutierten Allels unterschied. Demgegenüber war die Bindungsspezifität der Fängersequenz *GSTM3a2* (*MM2*) hoch und eine Differenzierung zwischen Wildtyp- und mutiertem Allel gut möglich.

Bei beiden Detektionsmethoden erwiesen sich 55°C für die vorliegenden Hybridisierungsbedingungen dabei als optimale Temperatur, da hier ausreichende Signalstärken bei zufriedenstellender Spezifität erreicht wurden.

Bestimmung der optimalen Hybridisierungszeit

Neben der Stringenz (Pufferbedingungen und Hybridisierungstemperatur) hat außerdem die Dauer der Hybridisierung einen Einfluss auf deren Ergebnis. Dabei wird angenommen, dass mit zunehmender Zeit mehr Zielmoleküle die Oberfläche mit den Fängermolekülen erreichen, gleichzeitig aber auch unspezifische Bindungen zunehmen können. Die Verteilung der Zielmoleküle in der Hybridisierungslösung ist dabei stark abhängig von der Art der Inkubation. Bei der hier durchgeführten statischen Hybridisierung (Inkubation als Tropfen bzw. in der Hybridisierungskammer) bewegen sich die Moleküle in der "stehenden" Flüssigkeit nur infolge Diffusion und eventueller, thermisch induzierter Konvektion.

Die generell recht inhomogenen Signale, z.T. auch innerhalb der gleichen Fängerprobe, erlaubten nur nach Mittelung mehrerer Messwerte eine Quantifizierung der Signale. Diese musste außerdem unter Berücksichtigung der Positivkontrollen erfolgen, welche das Ergebnis von Oberflächenfunktionalisierung, Enzymanbindung und Silberverstärkung war und hier z.T. beträchtlich variierte. Fehlende optische und elektrische Signale nach einer Stunde Hybridisierung deuteten darauf hin, dass diese Zeit nicht ausreichte, eine nachweisbare Menge an Zielmolekülen an den Fängerproben zu hybridisieren. In der optischen Auswertung erwiesen sich 2 h als günstige Hybridisierungszeit, nach der ausreichende Signale bei guter Differenzierung der verschiedenen Genotypen detektiert werden konnten. Für die elektrische Auswertung offenbarten sich dagegen 3 h als optimale Hybridisierungsdauer. Dort konnte nach 6-minütiger Nachverstärkung die gewünschte Differenzierung zwischen mutiertem und Wildtyp-Allel vorgenommen werden. Allerdings dürfen die elektrischen Messwerte des 2 h hybridisierten Chips aufgrund der inhomogenen Signale

innerhalb der komplementären Fängersequenzen nur eingeschränkt betrachtet werden. Der zu erwartende Anstieg der Signalstärke mit zunehmender Hybridisierungszeit war aufgrund der unterschiedlich erfolgreichen Signalentwicklung auf den Chips (siehe Positivkontrolle [PK]) kaum auszumachen. Besonders auf dem über Nacht hybridisierten Chip waren die Signale aufgrund der schwachen Positivkontrolle nur bedingt aussagekräftig.

Da nach 3 h Hybridisierung ausreichend starke Signale detektierbar waren und zu erwarten war, dass mit zunehmender Zeit tendenziell auch die nichtkomplementären Signale ansteigen, wurde diese Inkubationsdauer für alle nachfolgenden Hybridisierungen mit Oligonukleotiden als Zielmoleküle gewählt.

Bestimmung der Nachweisgrenze

Bei der Markierung von Signalen auf Biochips ermöglichen metallische Nanostrukturen aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften eine Vielzahl von Detektionsmethoden mit großer Sensitivität. So beschrieben Taton und Mitarbeiter für Absorptions- und Streuungsmessungen Empfindlichkeiten von 50 fM bzw. 1 pM DNA (Taton et al. 2000, 2001). Unter Ausnutzung ihrer hohen spezifischen Masse wurde Goldnanopartikel-markierte DNA darüber hinaus gravimetrisch mittels Mikrowaagen (*quartz crystal microbalance*, QCM) und Microcantilevern mit einer Sensitivität von 300 aM bzw. 50 pM nachgewiesen (Willner et al. 2002; Su et al. 2003). Sehr große Empfindlichkeiten wurden mit 0,78 bzw. 13 fmol DNA-Molekülen außerdem durch elektrochemische Methoden erreicht, bei denen das Redoxpotenzial metallischer Partikel ausgenutzt wird (Ozsoz et al. 2003; Wang et al. 2003). Des Weiteren ermöglicht ihre elektrische Leitfähigkeit auf Kapazitätsmessungen beruhende Nachweissysteme, wie sie mit einer Empfindlichkeit von 200 pM von Moreno-Hagelsieb (2004) demonstriert wurden. Neben diesen aufwendigen Detektionsmethoden ist jedoch auch die einfache elektrisch-resistive Auslese gebundener metallischer Nanostrukturen möglich, welche in vorliegender Arbeit zur Anwendung kam. Nach Anbindung metallischer Strukturen an hybridisierte DNA-Doppelstränge im Elektrodenpalt und zusätzlicher Metallabscheidung auf den gebundenen Metallkeimen wurde mit dieser Methode eine Nachweisgrenze von 500 fM DNA beschrieben (Park et al. 2002; Möller et al. 2005).

Bei eigenen Untersuchungen konnte die aus kurzen einzelsträngigen Oligonukleotiden bestehende Ziel-DNA in Konzentrationen von 5 pM mit optischen (Absorption) bzw. 100 pM mit elektrisch-resistiven Messungen nachgewiesen werden. Die Empfindlichkeit lag damit 10 bzw. 200-fach unter den in der Literatur beschriebenen Nachweisgrenzen (Park et al. 2002; Möller et al. 2005). Generelle Ursachen dafür könnten Unterschiede in der Chipfunktionalisierung und Probenaufbereitung sowie suboptimale Hybridisierungs- und/oder Markierungseffizienzen sein. Für den elektrisch-resistiven Nachweis kommen darüber hinaus noch andere Faktoren in Frage. Ob die Größe des Elektrodenpalt eine Rolle bei der Sensitivität des Systems spielt, kann nur vermutet werden. Die hier verwendeten Elektrodenstrukturen waren mit 50 μm -Spaltbreite im Gegensatz zu den 20- und 10 μm -breiten Elektrodenpalt der zitierten Arbeiten zwar größer, aufgrund der Spotgröße der immobilisierten Fänger-DNA wurde dennoch im gesamten Spalt Metall abgeschieden. Andererseits ist der elektrische Widerstand auch abhängig von der Messstrecke, wobei für längere Wegstrecken höhere Widerstände erwartet werden. Auch die

erhöhten Grundwiderstände der verwendeten Siebdruckelektroden (Bsp. $23,0 \pm 6,7 \Omega$ für die Mittelelektrode auf *screen-printed*-Platin- im Vergleich zu $0,8 \pm 0,1 \Omega$ auf fotolithografischen Si-Chips) scheinen angesichts des Widerstandabfalls um drei bis vier Größenordnungen ($10 \text{ M}\Omega$ auf $1\text{--}10 \text{ k}\Omega$) kaum relevant zu sein. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die unregelmäßige Beschaffenheit, auftretende Mikrorisse und vor allem die unregelmäßig begrenzten Elektrodenkanten zu verminderter Empfindlichkeit des Systems führen (Schüler 2005). Darüber hinaus sind Unterschiede in der nachzuweisenden Sequenz (Hybridisierungseffizienz, Ausbildung störender DNA-Strukturen [Dimere, Haarnadel-Strukturen]) als Ursache denkbar.

Abschließend soll jedoch betont werden, dass die Anwendbarkeit des untersuchten, *Point-of-care*-tauglichen Systems demonstriert werden sollte und vorliegende Arbeit weniger auf die Entwicklung eines hochsensitiven Nachweissystems für diese Anwendung abzielte.

4.4.2. PCR-Produkte aus genomischer DNA

Nachdem die Funktionsfähigkeit des untersuchten Nachweissystems mit Oligonukleotiden als Ziel-DNA-Modell zuverlässig und reproduzierbar gezeigt werden konnte, wurde in einem *Proof-of-principle* die Anwendbarkeit des Systems anhand eines konkreten Beispiels demonstriert. Im ernährungstoxikologisch relevanten Entgiftungsenzym *Glutathion-S-Transferase* (*GST*) wurde ein bekannter genetischer Polymorphismus (3-Basenpaardeletion) im Isoenzym *GSTM3* nachgewiesen. Die unter Einbau biotinylierter Nukleotide amplifizierte *GST*-Genfragmente aus Patienten-DNA (Friedrich-Schiller-Universität Jena) wurden nach anfänglich fehlenden Signalen nochmals aufkonzentriert (ca. $20 \mu\text{g DNA/ml}$). Nach Hybridisierung dieser Proben an funktionalisierte, elektrisch auswertbare Glaschips mit Pt-Siebdruckelektroden wurden die Biotin-markierten DNA-Doppelstränge mit einem Streptavidin-Peroxidasepolymer markiert und daran enzymkatalysiert Silber abgeschieden. Nach zusätzlicher metallkatalysierter Nachverstärkung konnte sowohl optisch als auch elektrisch zwischen den beiden Genotypen *GSTM3*WT* und *GSTM3*mut* unterschieden werden. Der homozygote Wildtyp lieferte dabei deutlich stärkere Signale als die mutierte Probe, was durch deren Heterozygotie zu erklären ist. Da sich hier die gesamte DNA-Menge aus den beiden Allelen *M3A* und *M3B* zusammensetzte, stand jeweils nur die Hälfte der DNA-Moleküle für eine Hybridisierung mit der jeweiligen *GSTM3*-Fängersequenz zur Verfügung.

Nach dieser ersten Demonstration sollte die Optimierung des Testsystems für die spezielle Anwendung fortgeführt werden. Der Nachweis mit dafür selbst amplifizierte und Biotin-markierte PCR-Proben war jedoch nicht reproduzierbar. Deswegen wurde versucht, die dafür infrage kommenden Fehlerquellen zu identifizieren. Zunächst wurde ausgeschlossen, dass noch in der Probe enthaltene Bestandteile des PCR-Mixes (Nukleotide, Primer, Polymerase) die Hybridisierung behinderten. Zum einen wurde durch den Zusatz dieser Komponenten zur Hybridisierungslösung der Nachweis von Oligonukleotiden als Ziel-DNA nicht gestört. Zum anderen lieferten auch aufgereinigte PCR-Proben keine detektierbaren Signale. Der Erfolg der Amplifizierung mittels PCR war gelelektrophoretisch anhand der entsprechenden *GST*-Fragmente nachweisbar. Die Überprüfung eines effektiven Biotineinbaus in die amplifizierte Produkte steht jedoch noch aus. Eine un-

genügende Trennung der Doppelstränge ist aufgrund der angewandten etablierten thermischen Denaturierung (5 min bei 95°C) eher unwahrscheinlich. Die bisher notwendige zusätzliche Aufkonzentrierung der PCR-Proben legt jedoch nahe, dass die vorhandene effektive DNA-Konzentration in den Proben für die angewendeten Bedingungen noch zu gering war, obwohl mit dem gleichen Chip-basierten Testsystem der Nachweis eines anderen biologischen Systems mit 10 µg DNA pro ml gezeigt werden konnte (Möller 2006). Trotz dieser unterschiedlichen Nachweisgrenzen, welche wiederum durch Unterschiede in den experimentellen Bedingungen sowie der nachzuweisenden Sequenz bedingt sein können, lag die Empfindlichkeit des demonstrierten *GST*-Nachweises in einem vergleichbaren Größenbereich zum zitierten Beispiel.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung

Einleitung DNA-Mikroarrays sind vielversprechende Werkzeuge für einen schnellen und hochparallelen sequenzspezifischen DNA-Nachweis. Die Modifikation der planaren Trägermaterialien, welche die Anbindung von Fängermolekülen ermöglicht, führt jedoch oft zu inhomogenen Oberflächen und/oder unspezifischer Bindung der markierten DNA-Sonden. Neben der bisher etablierten Fluoreszenzmarkierung, welche mit Nachteilen wie instabilen Signalen (*Bleaching*, *Quenching*) bzw. aufwendiger Auslesetechnik verbunden ist, gewinnen metallische Nanopartikel als neuartige Marker zunehmend an Bedeutung. So ermöglichen sie aufgrund ihrer interessanten physikalischen Eigenschaften einfache optische oder elektrische Ausleseverfahren, was sie insbesondere für eine Vor-Ort-Analytik geeignet erscheinen lässt. Eine spezifische Metallabscheidung auf den gebundenen Nanopartikel-Markern ist dabei von herausragender Bedeutung für eine Signalverstärkung. Dabei erfolgt die Auswahl der entsprechenden Verstärkungsparameter bisher jedoch weitgehend empirisch und ein breites Verständnis über den Einfluss der Verstärkungslösung, der Inkubationszeit bzw. der Größe der metallischen Ausgangspartikel fehlt. Bei der – infolge des zunehmenden Wachstums – auftretenden Verschmelzung der Metallstrukturen ist insbesondere die Ausbildung leitender Brücken im Hinblick auf eine elektrische Detektion interessant. Ein solches robustes, auf einfach zu bedienender Auslesetechnik basierendes Nachweissystem bietet großes Potenzial für *Point-of-care*-Anwendungen, wie z.B. der Identifizierung von Suszeptibilitätsmerkmalen gegenüber bestimmten Krebserkrankungen. Als mögliches Anwendungsbeispiel bietet sich dabei das zelluläre Entgiftungsenzym *Glutathion-S-Transferase* an, welches in der Bevölkerung polymorph vorliegt und dabei mit einem erhöhten Risiko für verschiedene Tumoren einhergehen kann.

Zielstellung Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, ausgewählte Prozesse eines Chip-basierten, auf der Markierung mit metallischen Nanostrukturen beruhenden DNA-Nachweissystems besonders im Hinblick auf eine *Point-of-care*-taugliche elektrische Detektion zu charakterisieren und zu optimieren.

Methoden Neben Kontaktwinkelmessungen wurden verschiedene mikroskopische Techniken (Licht-, Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie [AFM]) sowie ein Flachbettscanner eingesetzt, um den Mehrschrittprozess der Oberflächenfunktionalisierung zu analysieren. Zur Charakterisierung der Verstärkung von metallischen Markern wurde das Wachstum immobilisierter Goldnanopartikel bzw. Silbernanostrukturen infolge spezifischer Metallabscheidung mittels AFM untersucht. Die rasterkraftmikroskopische Charakterisierung des Wachstumsprozesses im Elektrodenspalt wurde besonders im Hinblick auf die

Ausbildung leitfähiger Verbindungen durch grafische Simulationen ergänzt. Die Auswertung des Mikroarray-basierten Nachweissystems erfolgte sowohl optisch durch Absorption mittels Diascanner als auch elektrisch durch Widerstandsmessungen.

Ergebnisse Die zur Optimierung der Oberflächenfunktionalisierung untersuchten Reinigungs- und Aktivierungsprotokolle resultierten in sehr unterschiedlichen Kontaktwinkeln, also Benetzungseigenschaften der Oberflächen. Die nachfolgende Silanisierung führte jedoch zu vergleichbar hydrophoben Oberflächen, welche sich mit 2-4 nm Rauigkeit auch als sehr glatt erwiesen. Die zwei untersuchten Silane unterschieden sich in ihrer maximalen Signalintensität und Sensitivität sowie in der Homogenität ihrer Signale. Während auf GOPS die stärkeren maximalen Signale gemessen wurden, konnten auf APTES noch geringere Fänger- und Ziel-DNA-Konzentrationen nachgewiesen werden. Auf GOPS-Oberflächen waren besonders die Randbereiche der Signale intensiv (sogener *Doughnut*-Effekt), wohingegen APTES gleichmäßigere Signale lieferte. Aufgrund dieser vorteilhaften Eigenschaften wurden die APTES/PDC-Oberflächen hinsichtlich der Passivierung gegenüber unspezifischer Bindung von DNA- und/oder Markermolekülen näher untersucht. Die Thiocyanat-funktionalisierten Oberflächen (PDC) zeigten insbesondere bei der Markierung mit Goldnanopartikeln jedoch eine starke Neigung zu unspezifischen Signalen. Diese konnte durch eine Behandlung mit 3%igem Rinderserumalbumin deutlich vermindert werden. Die für die rasterkraftmikroskopische Charakterisierung des Nanopartikelwachstums entwickelte Methode erlaubte das Monitoring ein und derselben Partikel über mehrere Verstärkungsschritte und ermöglichte damit die Analyse ihres Wachstumsverhalten auf Einzelpartikelniveau. So konnten störende Effekte von Ensemble-Messungen (fehlende Erfassung von Subpopulationen bei Miterfassung unspezifischer Abscheidungen) vermieden werden. Die Goldnanopartikel zeigten im Verlauf der spezifischen Metallverstärkung ein lineares Wachstum mit konstantem Schichtdickenzuwachs. Die Geschwindigkeit des Wachstums war dabei abhängig von der verwendeten Verstärkungslösung (Metallsalz und Reduktionsmittel) und der Größe der metallischen Ausgangskeime. Die untersuchten Lösungen unterschieden sich z.T. deutlich in Verstärkungseffizienz und -spezifität, wobei die *BBITM*-Silberverstärkung sich als am effektivsten und spezifischsten erwies. Das unter den gegebenen experimentellen Bedingungen (geringe Nanopartikelkonzentration bei quasi-kontinuierlicher Zufuhr neuer Reagenzien) beobachtete lineare Wachstum wurde bei Verlängerung der Inkubationsdauer, d.h. verminderter Zufuhr neuer Reagenzien, abgebremst. Es wird vermutet, dass diese Wachstumslimitierung auf eine lokale Verarmung an Reagenzien zurückzuführen ist. Bei der Untersuchung des Wachstums metallischer Nanostrukturen *in situ*, d.h. auf funktionalisierter Mikroarrayoberfläche im Elektrodenspalt kam neben der bekannten Methode mit Streptavidin-Goldnanopartikeln als Markermolekül eine neuartige Markierungstechnik zum Einsatz, bei welcher an einer Streptavidin-Meerrettichperoxidase Silber enzymkatalysiert abgeschieden wurde (*EnzMetTM*). Beide Methoden führten in Abhängigkeit von der metall- und/oder enzymkatalysierten Silberabscheidung zu einem zunehmenden Wachstum der metallischen Nanostrukturen im Elektrodenspalt, welches in einem linearen Anstieg des Anteils der metallbedeckten Fläche im Spalt resultierte. Gleichzeitig durchgeführte elektrische Messungen zeigten, dass ein Metallbedeckungsgrad von ca. 60% mit elektrischer

Leitfähigkeit einherging. Bei beiden Markierungstechniken führten nur die positiven Proben (komplementäre Fängersequenz und direkt Biotin-markierte Positivkontrolle) in akzeptabler Zeit zu messbarer Leitfähigkeit (5–12 min). Dennoch erwies sich die neuartige, enzymbasierte Metallentwicklung als deutlich spezifischer. Um bei gegebener Verteilung metallischer Nanostrukturen im Elektrodenspalt sowie bekannter Metallabscheidungsrate Vorhersagen über das Eintreten leitfähiger Verbindungen treffen zu können, wurden die experimentellen Untersuchungen um theoretische Simulationen ergänzt. Dabei war es möglich, sowohl das schrittweise Wachstum der metallischen Keime als auch die Prüfung auf Leitfähigkeit grafisch zu simulieren. Im letzten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass das untersuchte Chip-basierte Verfahren auch auf den Nachweis genetischer Polymorphismen des Entgiftungsenzyms *Glutathion-S-Transferase (GST)* angepasst werden kann. Obwohl die Untersuchungen amplifizierter *GST*-Fragmente aus genomischer DNA noch nicht hinreichend reproduzierbar waren, konnte mit Oligonukleotiden als modellhaften Zielmolekülen der Nachweis einer 3-Basenpaardeletion im Isoenzym *GSTM3* mithilfe metallischer Nanostrukturen demonstriert werden (*Proof-of-principle*).

Schlussfolgerung Metallische Nanostrukturen ermöglichen als neuartige Marker einfache optische bzw. elektrische Auslesetechniken, die großes Potenzial für Vor-Ort-Anwendungen haben. Dabei könnten vorallem die Erkenntnisse über den zugrunde liegenden Wachstumsmechanismus der metallischen Strukturen beim Design und der Optimierung eines elektrisch auswertbaren Testsystems helfen.

Ausblick

Daraus folgt, dass die Anwendung metallischer Nanostrukturen als neuartige Markierungstechnik die Möglichkeit einer einfachen, robusten und kostengünstigen elektrisch-resistiven Detektion von Mikroarrays eröffnet. Im Hinblick auf eine angestrebte Vor-Ort-Analytik sollte jedoch eine weitergehende Automatisierung des Nachweissystems verfolgt werden. Wünschenswert wäre ein System, welches alle Prozesse (von der Probenaufbereitung, Zielmolekül-Anreicherung, Hybridisierung, Markierung und Detektion) in sich vereint, wie es z.B. von Liu et al. (2004) für eine elektrochemische Detektion beschrieben wurde. Damit würden Fehler durch den Benutzer vermieden, die Anwendung auch durch nicht-geschultes Personal ermöglicht sowie die Vergleichbarkeit der Ergebnisse durch eine Standardisierung der Prozesse verbessert. Die Nutzung eines dafür geeigneten Durchflusssystems könnte darüber hinaus die Effektivität nicht nur der Waschprozesse, sondern vor allem der Hybridisierung deutlich steigern und damit die Nachweisempfindlichkeit erhöhen (Borden et al. 2005). Bei der hier durchgeführten statischen Hybridisierung bewegten sich die Moleküle in der "stehenden" Flüssigkeit nur infolge Diffusion, wobei weniger als 0,3% der Zielmoleküle entsprechende oberflächengebundene Fängermoleküle erreichen (Adey et al. 2002). Bei der dynamischen Hybridisierung wird dagegen die Hybridisierungslösung über den Chip bewegt, was die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens von Fänger- und Zielmolekülen deutlich erhöht und im Vergleich zur konventionellen statischen Methode zu sensitiveren, akkurateren und reproduzierbareren Ergebnissen führt (Adey et al. 2002; Liu et al. 2003; McQuain et al. 2004; Schaupp et al. 2005). Eine weitere

Steigerung der Sensitivität könnte außerdem über eine Anreicherung der nachzuweisenden Biomoleküle durch u.a. Magnetbeads erfolgen (Uhlen 1989; Olsvik et al. 1994; Wang et al. 2002), wie sie z.B. bei sogenannten *Bio-Barcode-Assays* beschrieben wurde (Nam et al. 2003, 2004). Eine ebenfalls wünschenswerte Online-Detektion mit kontinuierlicher Widerstandsmessung wurde bei einem ähnlichen Nachweissystem bereits demonstriert (Diessel et al. 2004).

Dabei kann das Wissen um das Wachstumsverhalten metallischer Keime durch spezifische Metallabscheidung besonders im Hinblick auf die Ausbildung leitender Verbindungen einen wichtigen Beitrag zum Design und zur Optimierung von Testsystemen liefern, die auf der Basis leitfähiger metallischer Nanostrukturen arbeiten. Die hier demonstrierte Charakterisierung und Simulation des Partikelwachstums im Elektrodenspalt ermöglicht so einerseits Vorhersagen über den Eintritt elektrischer Leitfähigkeit und kann damit zur Vermeidung von Unter- oder Überverstärkung beitragen. Andererseits könnte im Umkehrschluss aus bekannter Verstärkungszeit und Wachstumsrate auf die Anfangsdichte metallischer Keime und damit vorhandener Zielmoleküle geschlossen werden. So könnten auf der Basis von Simulationen für einen konkreten Anwendungsfall vorab Binde- und Verstärkungscharakteristika sowie der Eintritt elektrischer Leitfähigkeit charakterisiert werden. Bei späteren Vor-Ort-Analysen mit definierter Metallverstärkung wären auf der Grundlage dieser Untersuchungen dann einfach und schnell quantitative Aussagen zur Analytkonzentration realisierbar.

Abstract

Introduction DNA microarrays are promising tools for fast and highly parallel DNA detection. However, the substrate modification (as a prerequisite for capture DNA binding) often leads to inhomogeneous surfaces and/or nonspecific binding of the labeled DNA. Due to their interesting physical properties gold nanoparticles are of growing interest as labels in biomolecular detection. Especially for point-of-care analyses they may overcome some of the drawbacks of fluorescence detection based on their simple optical or electrical readout. Thereby, specific metal deposition on the nanoparticles is of outstanding importance for signal enhancement. However, a broad understanding of the influence of enhancement solution, incubation time, and seed size is still lacking as well as the growth characteristics of conductive metal labels in electrode gaps, especially with regard to electrical detection schemes.

Aim The aim of this work was to characterize and optimize some of the processes in the chip-based DNA detection by means of metal nanostructures for point-of-care analyses.

Methods Contact angle measurements as well as fluorescence microscopy, atomic force microscopy (AFM), and a flatbed scanner were used to analyze the multiple-step process of microarray surface functionalization with silanes. To characterize the growth mechanism of metal labels we studied the enhancement process of immobilized gold nanoparticle ensembles and silver nanostructures by AFM. The microarray-based detection system was readout optically by absorption as well as electrically by resistivity measurements.

Results Although the examined different cleaning and activating protocols resulted in considerably different substrate wettability, silanization led to similar hydrophobic surfaces which could be revealed as smooth surfaces. The two examined silanes differed in their DNA binding homogeneity, maximum signal intensities, and sensitivity. GOPS-surfaces yielded higher maximum fluorescence signals and on APTES-silanized substrates the capture oligonucleotides could be detected for lower concentrations. Nonspecific gold binding on APTES/PDC surfaces could be blocked by treatment in bovine serum albumin. Monitoring the very same particle arrangements after each enhancement step enabled the characterization of the particle growth at single particle level. The particles grew linearly and a dependence of the growth rate on the seed diameter was found. The applied enhancement solutions differed strongly in their enhancement intensity and specificity, revealing the *BBI*TMsilver enhancement as the most effective one. In electrode gaps on electrically readable microarrays, the growth of metal nanostructures (gold nanoparticles as well as enzymatically grown silver labels) led to the creation of conduction paths, which could also be followed by theoretical simulations. The feasibility of the examined detection system was demonstrated on the genotype detection of the detoxification enzyme *glutathione-S-transferase GSTM3*.

Conclusions The use of metal nanostructures as a new labeling technique enables the simple optical and electrical readout of chip-based DNA detection systems with great potential for point-of-care analysis. Especially the findings of the underlying growth mechanism of the nanostructure labels may assist in assay design and optimization.

A. Verzeichnisse

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ACED	Elektrisch auswertbarer DNA-Chip (<i>affinity chip with electrical detection</i>)
AFM	Rasterkraftmikroskopie (<i>atomic force microscopy</i>)
AgAc	Silberacetat
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
AU	willkürliche Einheiten (<i>arbitrary units</i>)
Au15, Au30, Au60	Goldnanopartikel mit Durchmesser 15, 30 bzw. 60 nm
b	Basen
Aurion	<i>R-Gent</i> TM SE-LM von Aurion
BBI	<i>Silver Enhancement Kit</i> TM von BBIInternational
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	<i>complementary</i> DNA
d.h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dUTP	Mononukleotid der Nukleobase Uracil
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
FITC	3'-Fluoresceinisothiocyanat
forw.	vorwärts (<i>forward</i>)
G	Guanin
G	Elektrischer Leitwert, SI-Einheit Siemens (S)
Gl.	Gleichung
GOPS	3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan

GF-AAS	Grafitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (<i>graphite furnace</i> GF-AAS)
GST	Glutathion-S-Transferase
Ko	komplementär
konz.	konzentriert
Lsg.	Lösung
M	molar (Mol/l)
MM	<i>Mismatch</i> , Fehlpaarung bei DNA-Hybridisierung
mut	heterozygot mutiert
NK	Negativkontrolle
OD	Optische Dichte
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polmerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDC	p-Phenylendiisothiocyanat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PK	Positivkontrolle
px	Pixel, Bildpunkt
R	Elektrischer Widerstand, SI-Einheit Ohm (Ω)
rel.	relativ
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
rev.	rückwärts (<i>reverse</i>)
SAM	Selbstorganisierende Monoschicht (<i>self assembeled monolayer</i>)
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylphosphat (<i>sodium dodecylphosphate</i>)
SGNP	Streptavidin-Goldnanopartikel
Sigma	<i>Silver Enhancer Kit</i> TM von Sigma-Aldrich
SPP	Streptavidin-Peroxidase-Polymer
STP	Streptavidin
SNP	Punktmutation (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SSC	Natriumcitratpuffer (<i>sodium salt citrate</i>)
Tab.	Tabelle
T _m	Schmelztemperatur
T	Thymin
TRIS	HCl-gepufferte Base Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Triton X	Polyethylenglycol-tert-octylphenylether
U	Uracil
UV/VIS	ultravioletter und sichtbarer Spektralbereich (<i>ultraviolet/visible</i>)
vs.	versus (gegenüber)
V/V	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
WT	Wildtyp (natürliche Form eines Allels)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

1.1. Prinzip und Herstellung eines DNA-Mikroarrays	2
1.2. Schema Metallverstärkung	5
2.1. Elektrisch auslesbare DNA-Chips (ACED)	12
2.2. Oberflächenmodifizierung mit Silanen für DNA-Anbindung	16
2.3. Mikroarray-Spotter	17
2.4. Spotschemen	18
2.5. Mikroarray-Markierung	22
2.6. DNA-Chip-Reader	26
2.7. Bildanalyse: Partikelerkennung und grafische Prüfung der Durchgängigkeit	28
3.1. Rauigkeiten nach Reinigung bzw. Silanisierung	31
3.2. DNA-Spotintensität verschiedener Silane	32
3.3. Spothomogenität der Ziel-DNA auf verschiedenen Silanen	34
3.4. Signale der Fänger-DNA auf verschiedenen Silanen	35
3.5. Effekt verschiedener Passivierungen auf DNA- und Goldpartikelbindung .	35
3.6. Nanopartikelbindung in Abhängigkeit von der Fänger-DNA-Sequenz . . .	36
3.7. Schrittweise Metallabscheidung im AFM und TEM	38
3.8. Modelle zum Partikelwachstum	39
3.9. Partikelwachstum in Abhängigkeit von der Metallverstärkungslösung . .	40
3.10. Spezifität der Metallverstärkung	42
3.11. Partikelwachstum in Abhängigkeit von der Größe der Ausgangspartikel .	43
3.12. Vergleich Einschnitt- und schrittweiser Verstärkung	44
3.13. Verfügbare Anzahl an Partikeln im Verlauf der Verstärkung	45
3.14. Metallkatalysierte Silberverstärkung im Elektrodenspalt: AFM	47
3.15. Metallkatalysierte Silberverstärkung im Elektrodenspalt: Leitfähigkeit und Metallbedeckung	49
3.16. Metallkatalysierte Silberabscheidung im Elektrodenspalt: Simulationen .	50
3.17. Enzymkatalysierte Silberentwicklung im Elektrodenspalt: AFM	53
3.18. Enzymkatalysierte Silberentwicklung im Elektrodenspalt: REM	54
3.19. Enzymkatalysierte Silberentwicklung im Elektrodenspalt: Leitfähigkeit und Metallbedeckung	56
3.20. Enzymkatalysierte Silberentwicklung im Elektrodenspalt: Simulationen .	57
3.21. ACED im Durchlicht in Abhängigkeit von der Hybridisierungstemperatur	61
3.22. Optische Signale in Abhängigkeit von Hybridisierungstemperatur und -zeit	61
3.23. Elektrische Signale in Abhängigkeit von der Hybridisierungstemperatur .	62
3.24. ACED im Durchlicht in Abhängigkeit von der Hybridisierungszeit	63

3.25. Elektrische Signale in Abhängigkeit von der Hybridisierungszeit	64
3.26. Nachweisgrenze bei optischer und elektrischer Detektion	65
3.27. Optischer Nachweis von <i>GST</i> -PCR-Produkten – Durchlichtaufnahmen .	67
3.28. Optischer Nachweis von <i>GST</i> -PCR-Produkten – Relative Signalstärken .	68
3.29. Elektrischer Nachweis von <i>GST</i> -PCR-Produkten – Leitfähigkeit	68
3.30. Untersuchte Techniken und erzielte Ergebnisse (grau) zur Mikroarrayherstellung.	69
4.1. Morphologie von STP-Goldnanopartikeln und enzymkatalysiert gewachsenen Silberstrukturen im REM	84
B.1. <i>ImageJ</i> : Messparameter-Dialoge	103

Tabellenverzeichnis

2.1. Verwendete DNA-Proben mit Nukleotidsequenz und Modifizierung	13
2.2. Primersequenzen <i>GSTM3</i>	14
2.3. PCR-Parameter <i>GSTM3</i>	14
2.4. PCR-Ansatz <i>GSTM3</i>	15
3.1. Vergleich verschiedener Reinigungs- und Aktivierungsprotokolle hinsichtlich Kontaktwinkeln der gereinigten und silanisierten Substrate	31
3.2. Partikelwachstum in Abhängigkeit von der Metallverstärkungslösung: Finale Partikelhöhe, Standardabweichung und Wachstumsrate	39
3.3. Quantitative Analyse der Silberablagerungen auf dem Chip bzw. den Goldpartikeln: Vergleich experimenteller und theoretischer Abscheidung	41
3.4. Partikelwachstum in Abhängigkeit von der Ausgangsgröße: Finale Partikelhöhe, Standardabweichung und Wachstumsrate	43
3.5. Metallkatalysierte Schichtdickenzuwächse im Elektrodenspalt: Vergleich experimenteller und grafisch ermittelter Zuwächse für eine Leitfähigkeit .	51
3.6. Enzymkatalysierte Metallisierung im Elektrodenspalt: Vergleich der relativen Metallbedeckung infolge experimenteller und grafisch simulierter Metallabscheidung auf enzymkatalysiert entstandenen Partikeln im Spalt . .	58
3.7. Enzymkatalysierte Schichtdickenzuwächse im Elektrodenspalt: Vergleich experimenteller und grafisch ermittelter Zuwächse für eine Leitfähigkeit .	59
B.1. Geräte	99
B.2. Chemikalien	100
B.3. Kolloidale Lösungen und Lösungen zur spezifischen Metallabscheidung (Metallverstärkungen)	101
B.4. Mehrkomponentige Lösungen und Puffer	102
B.5. Bildanalyse mittels <i>ImageJ</i>	103

B. Tabellen

Tab. B.1: Geräte

GERÄT	FIRMA
PROBENVORBEREITUNG	
Plasmaätzen <i>RIE 488-2M</i>	Semtech Instruments GmbH, Berlin
Spektrophotometer <i>NanoDrop ND-1000</i>	NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, NC, USA
Spektrophotometer <i>V-530</i>	Jasco, Maryland, MD, USA
Thermocycler <i>Mastercycler gradient</i>	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Horizontale Gelelektrophoresekammer	OWL Scientific, Woburn, MA, USA
Nadelspotter <i>SpotBot</i>	ArrayIt, Sunnyvale, CA, USA
Piezospotter <i>Nano-Plotter 2.2</i>	GeSiM, Großerkmannsdorf
Thermomixer <i>Comfort</i>	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Hybridisierungs-ofen <i>HB-1000</i>	UVP Inc., Upland, CA, USA
Zentrifuge <i>Biofuge pico</i>	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge <i>UniCen 15CR</i>	Herolab GmbH, Wiesloch
CHARAKTERISIERUNG	
AFM-Spitzen <i>Silizium-BudgetSensors™ BS-Tap300</i> -Spitzen	Innovative Solutions Bulgaria Ltd., Sofia, Bulgarien
DNA-Chip-Reader	IPHT, Jena
Diascanner <i>Dimage Scan Dual II AF-282OU</i>	Konica Minolta, Langenhagen
Gel-Dokumentationssystem	Herolab GmbH, Wiesloch
Gafitrohr-Atomabsorptionsspektrometer <i>PC 5100 ZL</i>	Perkin Elmer, Wellesley, MA
Flachbettscanner <i>Agfa Duoscan T2500</i>	Agfa Vertriebsgesellschaft, Köln
Fluoreszenzmikroskop <i>Axiotech 100</i> mit CCD-Kamera <i>Sensicam</i>	Carl Zeiss GmbH, Jena; PCO Computer Optics, Kehlheim
Lichtmikroskop <i>AxioImager. A1m</i> mit CCD-Kamera <i>AxioCamMRC5</i>	Carl Zeiss GmbH, Jena
Mikroarrayreader <i>MicroArrayReader V 1.20</i>	Jena-Optronik, Jena
Randwinkelmessgerät <i>OCA 20</i>	DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt
Rasterelektronenmikroskop <i>Jeol JSM 6700F</i>	Jeol Europe B.V., Zaventem, Belgien

wird fortgesetzt

Fortsetzung	
GERÄT	FIRMA
Rasterkraftmikroskop <i>Nanoscope III</i> Controller, <i>Dimension 3100</i> Messkopf	Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA
DATENAUSWERTUNG	
Bildbearbeitungsprogramm <i>Gimp</i>	www.gimp.org
Bildbearbeitungs- und -analyseprogramm <i>ImageJ 1.39</i> , Simulationen	http://rsb.info.nih.gov/ij/
Gel-Dokumentationssoftware <i>EasyWin 32</i>	Herolab GmbH, Wiesloch
Oligo Primer Design <i>PrimerSelect 5.07</i> des Pakets <i>Lasergene</i>	DNASTAR Inc., Madison, WI, USA
Sequenzanalyse <i>Vector NTI Suite 7.1</i> for Mac OS X	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Steuerung, Datenverwaltung Diascanner Minolta <i>DS Dual2</i>	Konica Minolta, Langenhagen
Steuerung, Datenverwaltung Flachbettscanner <i>Agfa FotoLook 3.60</i>	Agfa Vertriebsgesellschaft, Köln
Steuerung, Datenverwaltung Lichtmikroskop <i>Axio Vision 4.5</i>	Carl Zeiss GmbH, Jena
Steuerung, Datenverwaltung <i>NanoScope Version 5.12r2</i>	Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA
Steuerung, Datenverwaltung <i>NanoDrop: OOI-Base 32</i> und <i>NanoScript</i>	Ocean Optics, Duiven, Niederlande

Tab. B.2: Chemikalien

NAME	REINHEITSGRAD	HERSTELLER
1,4-Dithiothreitol	für Molekularbiologie	Roth
Remover (1-Aminopropan-2-ol, Dipropylenglycolmonomethylether Isomerengemisch)	keine Angabe	Clariant
1-Mercaptohexanol	reinst, >97%	Merck
3-Aminopropyltriethoxysilan	reinst, >97%	Fluka
3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan	reinst, >97%	Fluka
Aceton	zur Analyse	Merck
Ammoniak	zur Analyse, 25%	Sigma
Biotin-11-dUTP	für Molekularbiologie, 1 mM	Genaxxon
Citronensäure-Monohydrat	zur Analyse	Roth
Dikaliumhydrogenphosphat	wasserfrei, zur Analyse	Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	zur Synthese, reinst	Merck
Essigsäure	reinst, 100% (Eisessig)	Sigma

wird fortgesetzt

<i>Fortsetzung</i>			
	NAME	REINHEITSGRAD	HERSTELLER
	Ethanol	zur Synthese, >99%	Merck
	Ethanolamin	zur Synthese, 99%	Merck
	Glycerin	zur Analyse	Merck
	Hydrochinon	reinst, 99%	Fluka
	Hydroxylaminlösung	>50% in Wasser	Fluka
	Kaliumchlorid	zur Synthese, reinst	Roth
	Kaliumdihydrogenphosphat	für Molekularbiologie	Fluka
	Kaliumhydroxid	zur Analyse, >85%	Roth
	Methanol	zur Analyse	Merck
	N,N-Dimethylformamid	reinst, >99%	Aldrich
	Natriumdihydrogenphosphat	zur Analyse	Merck
	Natrium	reinst	Fluka
	Natriumacetat-Trihydrat	reinst	Merck
	Natriumchlorid	für Molekularbiologie	Merck
	Natriumdodecylsulfat	ultrapur, 99%	Roth
	Natriumhydrogencarbonat	zur Synthese, reinst	Merck
	p-Phenylendiisothiocyanat	reinst, >98%	Fluka
	Pyridin	reinst, >98%	Aldrich
	Salpetersäure	zur Analyse, >65%	Merck
	Salzsäure	zur Analyse, >37%	Merck
	Silberacetat	zur Synthese, 98%	Merck
	Silbernitrat	zur Analyse, 99,8%	Merck
	Streptavidin-Peroxidase Polymer	1,1 mg Protein/ml	Sigma- Aldrich
	Taq-DNA-Polymerase S	5 U/ μ l	Genaxxon
	Tetrachlorogoldsäuretrihydrat	zur Analyse, 99,3%	Sigma
	Toluol	zur Analyse	Roth
	Trinatriumcitrat-Dihydrat	zur Analyse, >99%	Roth
	Tris-hydroxymethyl-aminomethan	zur Analyse, >99,5%	Merck
	Triton X-100	zur Analyse	Fluka
	Tween 20	zur Analyse	Fluka
	Wasserstoffperoxid	zur Analyse, 30%	Merck

Tab. B.3: Kolloidale Lösungen und Lösungen zur spezifischen Metallabscheidung (Metallverstärkungen)

REAGENZ	ZUSAMMENSETZUNG	QUELLE
METALLKOLLOIDE	C FÜR $OD_{525}=1,0$	
Au 15nm, 0,9 OD_{525}	$1,4 \times 10^{12}$ Partikel/ml	Plano
Au 30nm, 1,1 OD_{525}	$2,0 \times 10^{11}$ Partikel/ml	Plano
Au 60nm, 1,3 OD_{525}	$2,6 \times 10^{10}$ Partikel/ml	Plano

wird fortgesetzt

Fortsetzung

REAGENZ	ZUSAMMENSETZUNG	QUELLE
Streptavidin: Au 20nm, 4,1 OD ₅₂₀	$2,0 \times 10^{12}$ Partikel/ml	BBinternational
METALLVERSTÄRKUNGEN		
Silver Enhancer Kit TM	Solution A:B 1:1 (V/V)	Sigma-Aldrich
Silver Enhancement Kit TM	Enhancer: Initiator 1:1 (V/V)	BBInternational
R-Gent TM SE-LM	Enhancer: Developer 1:1 (V/V)	Aurion
Silberacetat/Hydrochinon	12 mM Silberacetat : 45 mM Hydrochinon/Citratpuffer pH 3,8 1:1 (V/V)	Hacker et al. (1988); Zhang et al. (2004)
Silbernitrat/Hydrochinon	294 mM Silbernitrat : 27 mM Hydrochinon + 14 mM Citronensäuremonohydrat 1:10 (V/V)	Heidrich (2004)
Tetrachloroaurat/Hydroxylamin	3 mM HAuCl ₄ : 3 mM NH ₂ OH; 1:1 (V/V)	Weizmann et al. (2004)
EnzMet TM ultrasensitive	Solution A:B:C; 1:1:1 (V/V/V)	Nanoprobes Inc., Yaphank, NY, USA

Tab. B.4: Mehrkomponentige Lösungen und Puffer

PUFFER	ZUSAMMENSETZUNG	REFERENZ
0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0	57,7 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ / 42,3 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ pro 1000 ml	Sambrook et al. (1989)
0,1 M Natriumchlorid/ 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0	1 M Natriumchlorid/ 0,1 M Natriumphosphatpuffer 1:10 verdünnen	Storhoff et al. (1998)
20 × SSC-Puffer pH 7	3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumcitrat, NaOH für pH-Einstellung	Sambrook et al. (1989)
TRIS-Hydrochlorid pH 8	1 M TRIS, Salzsäure für pH-Einstellung	Sambrook et al. (1989)
10 × PBS pH 7,4	8 g Natriumchlorid; 0,2 g Kaliumchlorid; 1,44 g Di-Natriumhydrogenphosphat; 0,24 g Kaliumhydrogenphosphat pro 1000 ml, HCl für pH-Einstellung	Sambrook et al. (1989)
Citratpuffer pH 3,8	23,5 g Trinatriumcitrat-Dihydrat, 25,5 g Citronensäuremonohydrat pro 1000 ml	Hacker et al. (1988)

Tab. B.5: Bildanalyse mittels ImageJ

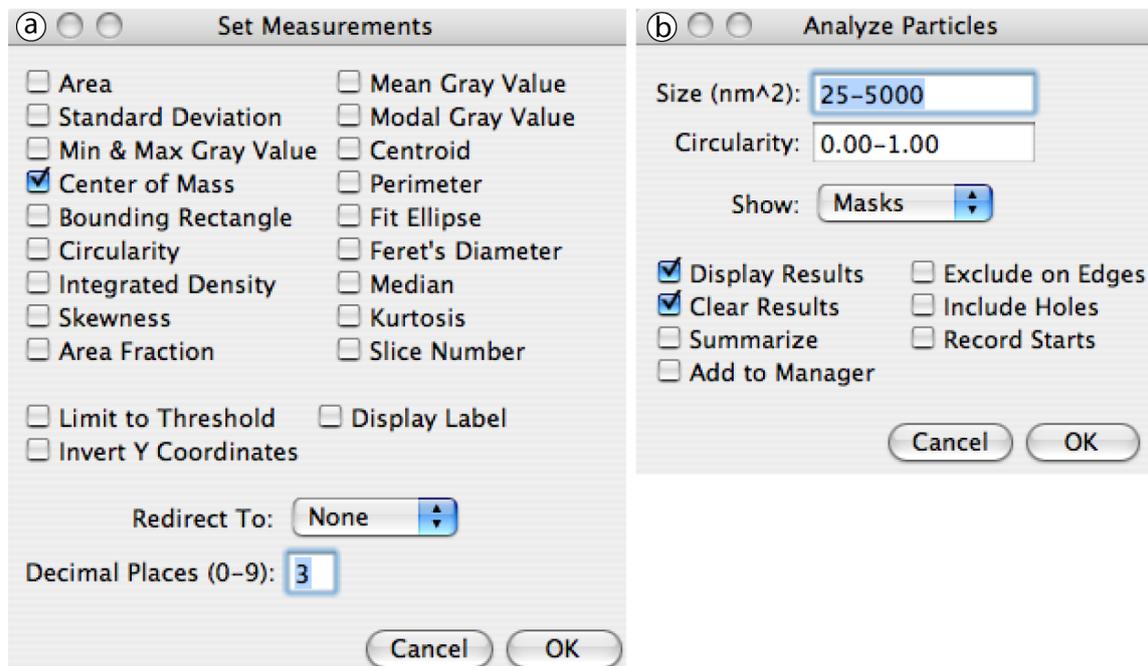


Abb. B.1: ImageJ-Dialoge: Set Measurements und Analyze Particles

Beispielablauf für die Bildanalyse einer AFM-Aufnahme

Am Beispiel des AFM-Bildes einer Positivkontrolle, markiert mit STP-Au15 und 2×4 min nachverstärkt mit Silberacetat/Hydrochinon werden beispielhaft die Prozessschritte Glätten, Binarisierung und Partikelerkennung basierend auf den Mittelpunktkoordinaten gezeigt.

- Nanoscope-Datei öffnen
- Process → Subtract Background (Rolling Ball Radius = 50; "Light Background" abwählen)
- Threshold → Set (Lower Threshold Level = 60; Upper Threshold Level = Vorschlagswert)
- Process → Binary → Make Binary (alle Optionen auswählen)
- Analyze → Set Measurements (nur "Center of Mass" auswählen)
- Analyze → Analyze Particles (Size = 25-5000; Circularity = 0.00-1.00, "Display Results" und "Clear Results" auswählen)

- Das erscheinende “Results”-Fenster abspeichern.

Die abgespeicherte Datei mit den Partikelkoordinaten dient im nachfolgenden Makro als Eingabedatei.

Makro 1: Simulation des Partikelwachstums ausgehend von Partikelkoordinaten

```
// Create new image, 512x512 pixels equal to 12000x12000 nm
newImage("Image", "8-bit White", 512, 512, 1);
run("Set Scale...", "distance=512 known=12000 pixel=1 unit=nm");

// Open file with particle coordinates
// Format of the file:
// First line is not interpreted
// Then follows one line per particle:
// ParticleNumber <TAB> X-Coordinate <TAB> Y-Coordinate
//
showMessage("Open Particle Coordinates File");
COORD_FILE=File.openAsString("");

// Convert the string to an array of lines
COORD_LINES=split(COORD_FILE,"\n");

// Get total number of particles
NoOfParticles=lengthOf(COORD_LINES);
print(NoOfParticles + " particles");

// Loop through the particles
for (PartNo=1; PartNo<NoOfParticles; PartNo++) {

// Split current line into an array of substrings
NXY=split(COORD_LINES[PartNo]);

// Get coordinates and convert nm to pixels
X=parseInt(NXY[1])*512/12000;
Y=parseInt(NXY[2])*512/12000;

// Draw a dot at particle coordinates
fillRect(X,Y,1,1);
}

// Enlargement
run("Make Binary");
run("Create Selection");
ENL=getNumber("Enlarge by ... nm? ", 24);
print(ENL);
```

```
run("Enlarge...", "enlarge="+ENL+" iterations=1 count=1");
```

Makro 2: Grafische Leitfähigkeitsprüfung

Dieses Makro geht aus von einer AFM-Aufnahme mit 512×512 px, entsprechend $12 \times 12 \mu\text{m}$. Die Elektroden liegen dabei oben und unten.

```
// Draw black electrodes
run("Colors...", "foreground=black background=white selection=yellow");
run("Specify...", "width=512 height=70 x=0 y=0");
run("Fill");
run("Specify...", "width=512 height=70 x=0 y=442");
run("Fill");

// Set fill color to red
run("Colors...", "foreground=red background=white selection=yellow");
run("Select None");

// Fill connected areas
floodFill(5,5);

// Reset colors
run("Colors...", "foreground=black background=white selection=yellow");
```

Literatur

- N. B. Adey, M. Lei, M. T. Howard, J. D. Jensen, D. A. Mayo, D. L. Butel, S. C. Coffin, T. C. Moyer, D. E. Slade, M. K. Spute, A. M. Hancock, G. T. Eisenhoffer, B. K. Dalley, and M. R. McNeely. Gains in sensitivity with a device that mixes microarray hybridization solution in a 25-microm-thick chamber. *Anal Chem*, 74(24):6413–7, 2002.
- A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez Jr., and P. G. Schultz. Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA. *Nature*, 382(6592):609–11, 1996.
- L. Authier, C. Grossiord, and P. Brossier. Gold nanoparticle-based quantitative electrochemical detection of amplified human cytomegalovirus DNA using disposable microband electrodes. *Anal Chem*, 73(18):4450–6, 2001.
- Y. C. Awasthi, R. Sharma, and S. S. Singal. Human glutathione S-transferases. *Int J Biochem*, 26(3):295–308, 1993.
- N. Becker and J. Wahrendorf. *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1998.
- F. F. Bier and J. P. Fürste. Nucleic acid based sensors. In F. W.; Scheller, F.; Schubert, and J. Fedrowitz, editors, *Frontiers in Biosensorics 1, Fundamental Aspects*, volume 80, pages 97–120. 1997.
- G. Binnig, C.F. Quate, and C. Gerber. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56:930–933, 1986.
- G. A. Blab, L. Cagnet, S. Berciaud, I. Alexandre, D. Husar, J. Remacle, and B. Lounis. Optical Readout of Gold Nanoparticle-Based DNA Microarrays without Silver Enhancement. *Biophys J*, 90(1):L13–5, 2006.
- J. R. Borden, C. J. Paredes, and E. T. Papoutsakis. Diffusion, mixing, and associated dye effects in DNA-microarray hybridizations. *Biophys J*, 89(5):3277–84, 2005.
- D. Boyer, P. Tamarat, A. Maali, B. Lounis, and M. Orrit. Photothermal imaging of nanometer-sized metal particles among scatterers. *Science*, 297(5584):1160–3, 2002.
- P. Boyle and J. Ferlay. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Annals of Oncology*, 16:481–488, 2005.
- K. R.; Brown, L. A.; Lyon, A. P. Fox, B. D. Reiss, and Michael J. Natan. Hydroxylamine Seeding of Colloidal Au Nanoparticles. 3. Controlled Formation of Conductive Au Films. *Chemistry of Materials*, 12:314–323, 2000a.

- K. R.; Brown, D. G.; Walter, and M. J. Natan. Seeding of Colloidal Au Nanoparticle Solutions. 2. Improved Control of Particle Size and Shape. *Chemistry of Materials*, 12: 306–313, 2000b.
- H. Cai, Y. Wang, P. He, and Y. Fang. Electrochemical detection of DNA hybridization based on silver-enhanced gold nanoparticle label. *Analytica Chimica Acta*, 469:165–172, 2002.
- Y. W. Cao, R. Jin, and C. A. Mirkin. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*, 297:1536–1540, 2002.
- J. J. Cras, C. A. Rowe-Taitt, D. A. Nivens, and F. S. Ligler. Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization. *Biosens Bioelectron*, 14:683–688, 1999.
- A. Csaki. *DNA-basierte molekulare Nanokonstruktion Ein Modellbeispiel und Applikationen unter Verwendung von DNA/DNA- und DNA-Nanopartikel-Komplexen in planar-technischer Umgebung*. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2003.
- A. Csaki, R. Möller, W. Straube, J.M. Köhler, and W. Fritzsche. DNA monolayer on gold substrates characterized by nanoparticle labeling and scanning force microscopy. *Nucleic Acids Res*, 29(16):e81, 2001.
- G. Danscher. Autometallography. A new technique for light and electron microscopic visualization of metals in biological tissues (gold, silver, metal sulphides and metal selenides). *Histochemistry*, 81(4):331–5, 1984.
- G. Danscher. Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. *Histochemistry*, 71(1):1–16, 1981a.
- G. Danscher. Light and electron microscopic localization of silver in biological tissue. *Histochemistry*, 71(2):177–86, 1981b.
- G. Danscher. Localization of gold in biological tissue. A photochemical method for light and electronmicroscopy. *Histochemistry*, 71(1):81–8, 1981c.
- M. Dequaire, C. Degrand, and B. Limoges. An electrochemical metalloimmunoassay based on a colloidal gold label. *Anal Chem*, 72(22):5521–8, 2000.
- F. Diehl, S. Grahlmann, M. Beier, and J. D. Hoheisel. Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucleic Acids Res*, 29(7): e38, 2001.
- E. Diessel, K. Grothe, H. M. Siebert, B. D. Warner, and J. Burmeister. Online resistance monitoring during autometallographic enhancement of colloidal Au labels for DNA analysis. *Biosens Bioelectron*, 19(10):1229–35, 2004.

- B. Ding and N. C. Seeman. Operation of a DNA robot arm inserted into a 2D DNA crystalline substrate. *Science*, 314(5805):1583–5, 2006.
- P. L. Dolan, Y. Wu, L. K. Ista, R. L. Metzenberg, M. A. Nelson, and G. P. Lopez. Robust and efficient synthetic method for forming DNA microarrays. *Nucleic Acids Res*, 29(21):e107, 2001.
- D. L. Eaton and T. K. Bammler. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci*, 49(2):156–64, 1999.
- E. Ermantraut, T. Schulz, J. Tuchscheerer, S. Wölfel, H.-P. Saluz, E. Thallner, and J. M. Köhler. Building Highly Diverse Arrayed Substance Libraries by Micro Offset Printing,. In D. J. Harrison and A. van den Berg, editors, *Micro Total Analysis Systems '98*, Dordrecht, 1998. Kluwer Scientific Publishing.
- T.L. Fare, E.M. Coffey, H. Dai, Y.D. He, D.A. Kessler, K.A. Kilian, J.E. Koch, E. LeProust, M.J. Marton, M.R. Meyer, R.B. Stoughton, G.Y. Tokiwa, and Y. Wang. Effects of atmospheric ozone on microarray data quality. *Anal Chem*, 75:4672–7675, 2003.
- J. Ferlay. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology*, mdl498, 2007.
- G. Festag, A. Steinbrück, A. Wolff, A. Csaki, R. Moller, and W. Fritzsche. Optimization of gold nanoparticle-based DNA detection for microarrays. *J Fluoresc*, 15(2):161–70, 2005.
- S. Fletcher. Electrochemical deposition of hemispherical nuclei under diffusion control. *Faraday Trans 1*, 79:467–479, 1983.
- Stephen P. A. Fodor, J. Leighton Read, Michael C. Pirrung, Lybert Stryer, Amy Tsai Lu, and Dennis Solas. Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis. *Science*, (767-773), 1991.
- A. V. Fotin, A. L. Drobyshev, D. Y. Proudnikov, A. N. Perov, and A. D. Mirzabekov. Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips. *Nucleic Acids Res*, 26(6):1515–1521, 1998.
- J. L. Fransaer and R. M. Penner. Brownian Dynamics Simulation of the Growth of Metal Nanocrystal Ensembles on Electrode Surfaces from Solution. I. Instantaneous Nucleation and Diffusion-Controlled Growth. *J Phys Chem B*, 103:7643–7653, 1999.
- W. Fritzsche, A. Csaki, and R. Möller. Nanoparticle-based optical detection of molecular interactions for DNA-chip technology. *SPIE*, 4626:17–22, 2002.
- F. R.; Furuya, V. N.; Joshi, J. F.; Hainfeld, R. D.; Powell, and P. M. Takavorian. Enzymatic Metallography as a Correlative in Light and Electron Microscopy. In I. M.; Anderson, R.; Price, E.; Hall, E.; Clark, and S. McKernan, editors, *Proceedings of Microscopy and Microanalysis*, volume 10 of *Microsc. Microanal.*, page 1210CD. Cambridge University Press, New York, 2004.

- Z. Guo, R. A. Guilfoyle, A. J. Thiel, R. Wang, and L. M. Smith. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res*, 22(24):5456–65, 1994.
- G. W. Hacker, L. Grimelius, G. Danscher, G. Bernatzky, W. Muss, H. Adam, and J. Thurner. Silver acetate autometallography: an alternative enhancement technique for immunogold-silver staining (IGSS) and silver amplification of gold, silver, mercury and zinc in tissues. *J Histotechnol*, 11:213–221, 1988.
- J. F.; Hainfeld, R. N.; Eisen, R. R.; Tubbs, and R. D. Powell. Enzymatic Metallography: A simple new staining method. In E.; Voekl, D.; Piston, R.; Gauvin, A. J.; Lockley, G. W.; Bailey, and S. McKernan, editors, *Proceedings of Microscopy and Microanalysis 2002*, volume 8 of *Microsc. Microanal.*, page 916CD. Cambridge University Press, New York, 2002.
- N. Halas. The optical properties of nanoshells. *Optics and Photonic News*, pages 26–30, 2002.
- M. H. Hayat. *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications*, volume 1-3. Academic Press, 1989.
- P. M. Heidrich. Am Bilde hängt, zum Bilde drängt doch alles ... *Laborjournal*, 03:62–63, 2004.
- A. Inskip, J. Elexperu-Camiruaga, N. Buxton, P. S. Dias, J. MacIntosh, D. Campbell, P. W. Jones, L. Yengi, J. A. Talbot, R. C. Strange, and et al. Identification of polymorphism at the glutathione S-transferase, GSTM3 locus: evidence for linkage with GSTM1*A. *Biochem J*, 312 (Pt 3):713–6, 1995.
- G. Jogikalmath. Tutorial: Chemical modification of silica surface and protocol of surface patterning for cell adhesion, 2002.
- C. Kooperberg, T. G. Fazio, J. J. Delrow, and T. Tsukiyama. Improved background correction for spotted DNA microarrays. *J Comput Biol*, 9(1):55–66, 2002.
- R. Kretschmer. *Entwurf, Aufbau und Testung eines Mikroreaktors für die DNA-Analytik mit Thermo- und Fluidmanagement*. Diplomarbeit, Fachhochschule Jena, 2002.
- P. M. Lackie, R. J. Hennessy, G. W. Hacker, and J. M. Polak. Investigation of immunogold-silver staining by electron microscopy. *Histochemistry*, 83(6):545–50, 1985.
- J. B. Lamture, K. L. Beattie, B. E. Burke, M. D. Eggers, D. J. Ehrlich, R. Fowler, M. A. Hollis, B. B. Kosicki, R. K. Reich, S. R. Smith, R. S. Varma, and M. E. Hogan. Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device. *Nucleic Acids Res*, 22(11):2121–5, 1994.
- S. A. Lange, G. Roth, S. Wittemann, T. Lacoste, A. Vetter, J. Grassle, S. Kopta, M. Kolleck, B. Breiteringer, M. Wick, J. K. Horber, S. Dubel, and A. Bernard. Measuring biomolecular binding events with a compact disc player device. *Angew Chem Int Ed Engl*, 45(2):270–3, 2006.

- R. L. Letsinger, R. Elghanian, G. Viswanadham, and C. A. Mirkin. Use of a steroid cyclic disulfide anchor in constructing gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates. *Bioconjug Chem*, 11(2):289–91, 2000.
- J. Li, H. Wang, Y. Zhao, L. Cheng, N. He, and Z. Lu. Assembly method fabrication linkers for covalently bonding DNA on glass surfaces. *Sensors*, 1:53–59, 2001.
- Z. Li, R. Jin, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger. Multiple thiol-anchor capped DNA-gold nanoparticle conjugates. *Nucleic Acids Res*, 30(7):1558–62, 2002.
- R. Liesegang. Die Kolloidchemie der histologischen Silber-Färbungen. In W. Ostwald, editor, *Kolloidchemische Beihefte*, volume 3, pages 1–46. Theodor Steinkopff, Dresden, Leipzig, 1911.
- R. J. Lipshutz, S. P. Fodor, T. R. Gingeras, and D. J. Lockhart. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet*, 21(1 Suppl):20–4, 1999.
- R. H. Liu, R. Lenigk, R. L. Druyor-Sanchez, J. Yang, and P. Grodzinski. Hybridization enhancement using cavitation microstreaming. *Anal Chem*, 75(8):1911–7, 2003.
- R. H. Liu, J. Yang, R. Lenigk, J. Bonanno, and P. Grodzinski. Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection. *Anal Chem*, 76(7):1824–31, 2004.
- L. M. Liz-Marzán. Nanometals: formation and color. *Materials Today*, February 2004: 26–31, 2004.
- L. M. Liz-Marzán. Tailoring Surface Plasmons through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles. *Langmuir*, 22(1):32–41, 2006.
- A. Loktionov, M. A. Watson, and M. Gunter. Glutathione-S-transferase gene polymorphisms in colorectal cancer patients: interaction between GSTM1 and GSTM3 allele variants as a risk-modulation factor. *Carcinogenesis*, 22(7):1053–1060, 2001.
- S.; Lorkowski, G.; Lorkowski, and P. Kullen. Biochips: Das Labor in der Streichholzsachtel. *Chemie in unserer Zeit*, 34(6):356–73, 2000.
- F. Lottspeich and H. Zorbas. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1. edition, 1998.
- G. MacBeath and S. L. Schreiber. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, 289(5485):1760–3, 2000.
- J. Marmur and P. Doty. Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J Mol Biol*, 3: 585–94, 1961.
- H. Marquardt and S. G. Schäfer. *Lehrbuch der Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin, 1997.

- K. Marquez-Perez. *Abscheidungsmechanismus und Eigenschaften elektrochemisch erzeugter Metall- und Legierungsfilme auf Silizium*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2003.
- M. K. McQuain, K. Seale, J. Peek, T. S. Fisher, S. Levy, M. A. Stremmer, and F. R. Haselton. Chaotic mixer improves microarray hybridization. *Anal Biochem*, 325(2): 215–26, 2004.
- C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, and J. J. Storhoff. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382(6592): 607–9, 1996.
- C. F. Monson and A. T. Woolley. DNA-templated construction of copper nanowires. *Nano Letters*, 3(3):359–363, 2003.
- P. E.; Pampin R.; Bourgeois D.; Remacle J.; Flandre D. Moreno-Hagelsieb, L.; Lobert. Sensitive DNA electrical detection based on interdigitated Al/Al₂O₃ microelectrodes. *Sensors and Actuators B*, 98:269–274, 2004.
- R. Mukhopadhyay. The versatility of microarrays. *Anal Chem*, 78(17):5969–5972, 2006.
- R. Möller. *DNA-Chips mit elektrischer Detektion*. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2006.
- R. Möller, A. Csaki, J.M. Köhler, and W. Fritzsche. DNA probes on chip surfaces studied by scanning force microscopy using specific binding of colloidal gold. *Nucleic Acids Res*, 28(20e91):1–5, 2000.
- R. Möller, A. Csaki, J.M. Köhler, and W. Fritzsche. Electrical classification of the concentration of bioconjugated metal colloids after surface adsorption and silver enhancement. *Langmuir*, 17:5426–5430, 2001.
- R. Möller, R. D. Powell, J. F. Hainfeld, and W. Fritzsche. Enzymatic control of metal deposition as key step for a low-background electrical detection for DNA chips. *Nano Lett*, 5(7):1475–82, 2005.
- J. M. Nam, C. S. Thaxton, and C. A. Mirkin. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science*, 301(5641):1884–6, 2003.
- J. M. Nam, S. I. Stoeva, and C. A. Mirkin. Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity. *J Am Chem Soc*, 126(19):5932–3, 2004.
- C. M. Niemeyer and M. Adler. Nanomechanical devices based on DNA. *Angew Chem Int Ed Engl*, 41(20):3779–83, 2002.
- C. M. Niemeyer and D. Blohm. DNA Microarrays. *Angew Chem*, 111(19):3039–3043, 1999.

- O. Olsvik, T. Popovic, E. Skjerve, K. S. Cudjoe, E. Hornes, J. Ugelstad, and M. Uhlen. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 7(1): 43–54, 1994.
- M. Ozsoz, A. Erdem, K. Kerman, D. Ozkan, B. Tugrul, N. Topcuoglu, H. Ekren, and M. Taylan. Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of Factor V Leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes. *Anal Chem*, 75(9):2181–7, 2003.
- S. J. Park, T. A. Taton, and C. A. Mirkin. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science*, 295(5559):1503–6, 2002.
- F. Patolsky, K. T. Ranjit, A. Lichtenstein, and I. Willner. Dendritic amplification of DNA analysis by oligonucleotide-functionalized Au-nanoparticles. *Chem Commun*, pages 1025–1026, 2000.
- R. M. Penner. Brownian Dynamics Simulations of the Growth of Metal Nanocrystal Ensembles on Electrode Surfaces in Solution: 2. The Effect of Deposition Rate on Particle Size Dispersion. *J Phys Chem B*, 105:8672–8678, 2001.
- J. Reichert, A. Csaki, J.M. Köhler, and W. Fritzsche. Chip-based optical detection of DNA hybridization by means of Nanobead Labeling. *Anal. Chem.*, 72:6025–6029, 2000.
- B. D. Reiss, J. K. N. Mbindyo, R. M. Benjamin, S. R. Nicewarner, T. E. Mallouk, M. J. Natan, and C. D. Keating. DNA-directed assembly of anisotropic nanoparticles on lithographically defined surfaces and in solution. *Materials Research Society*, 635: C6.2.1.–C6.2.6., 2001.
- J.; Richter, R.; Seidel, R.; Kirsch, M.; Mertig, W.; Pompe, J.; Plaschke, and H. K. Schackert. Nanoscale Palladium Metallization of DNA. *Advanced Materials*, 12(7):507–510, 2000.
- N. L. Rosi and C. A. Mirkin. Nanostructures in biodiagnostics. *Chem Rev*, 105(4): 1547–62, 2005.
- S. Rozhok, C. K.-F. Shen, P.-L. H. Littler, Z. Fan, C. Liu, C. A. Mirkin, and R. C. Holz. Methods for Fabricating Microarrays of Motile Bacteria. *Small*, 1(4):445–451, 2005.
- J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- B. Scharifker. Theoretical and experimental studies of multiple nucleation. *Electrochimica Acta*, 28(7):879–889, 1983.
- C. J. Schaupp, G. Jiang, T. G. Myers, and M. A. Wilson. Active mixing during hybridization improves the accuracy and reproducibility of microarray results. *Biotechniques*, 38(1):117–9, 2005.

- M. Schena, R. A. Heller, T. P. Theriault, K. Konrad, E. Lachenmeier, and R. W. Davis. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol*, 16(7):301–6, 1998.
- T. Schüler. *Chip-basierter elektrischer DNA-Nachweis zur Identifikation von Mikroorganismen*. Diplomarbeit, Fachhochschule Jena, 2005.
- J. Sharma, R. Chhabra, Y. Liu, Y. Ke, and H. Yan. DNA-templated self-assembly of two-dimensional and periodical gold nanoparticle arrays. *Angew Chem Int Ed Engl*, 45(5):730–5, 2006.
- E. Skutelsky, V. Goyal, and J. Alroy. The use of avidin-gold complex for light microscopic localization of lectin receptors. *Histochemistry*, 86(3):291–5, 1987.
- C. Sonnichsen, B. M. Reinhard, J. Liphardt, and A. P. Alivisatos. A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. *Nat Biotechnol*, 23(6):741–5, 2005.
- E. Southern, K. Mir, and M. Shchepinov. Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet*, 21(1 Suppl):5–9, 1999.
- E. M. Southern. DNA chips: analysing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale. *Trends Genet*, 12(3):110–5, 1996.
- B. Spielbauer and F. Stahl. Impact of microarray technology in nutrition and food research. *Mol Nutr Food Res*, 49(10):908–17, 2005.
- S. R. Sternberg. Biomedical Image Processing . *IEEE Computer*, 16(1):22–34, 1983.
- R. M. Stiger, S. Gorer, B. Craft, and R. M. Penner. Investigations of Electrochemical Silver Nanocrystal Growth on Hydrogen-Terminated Silicon(100). *Langmuir*, 15:790–798, 1999.
- J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger. One Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:1959–1964, 1998.
- J. J. Storhoff, A. D. Lucas, V. Garimella, Y. P. Bao, and U. R. Muller. Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes. *Nat Biotechnol*, 22(7):883–7, 2004.
- D. A. Stuart, A. J. Haes, C. R. Yonzon, E. M. Hicks, and R. P. Van Duyne. Biological applications of localised surface plasmonic phenomena. *IEE Proc.-Nanobiotechnol.*, 152(1):13–32, 2005.
- M. Su, S. Li, and V. P. Dravid. Microcantilever resonance-based DNA detection with nanoparticle probes. *Applied Physics Letter*, 82(20):3562–3564, 2003.
- T. A. Taton, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science*, 289:1757–1760, 2000.

- T. A. Taton, G. Lu, and C. A. Mirkin. Two-color labeling of oligonucleotide arrays via size-selective scattering of nanoparticle probes. *J Am Chem Soc*, 123(21):5164–5, 2001.
- S. Taylor, S. Smith, B. Windle, and A. Guiseppi-Elie. Impact of surface chemistry and blocking strategies on DNA microarrays. *Nucleic Acids Res*, 31(16):e87, 2003.
- P. H. Tran, D. A. Peiffer, Y. Shin, L. M. Meek, J. P. Brody, and K. W. Cho. Microarray optimizations: increasing spot accuracy and automated identification of true microarray signals. *Nucleic Acids Res*, 30(12):e54, 2002.
- S. Treptow-van Lishaut. *Modulation von Glutathion-S-Transferasen durch Ernährungsfaktoren*. PhD thesis, 1998.
- R. Tubbs, J. Pettay, D. Hicks, M. Skacel, R. Powell, T. Grogan, and J. Hainfeld. Novel bright field molecular morphology methods for detection of HER2 gene amplification. *J Mol Histol*, 35(6):589–94, 2004.
- M. Uhlen. Magnetic separation of DNA. *Nature*, 340(6236):733–4, 1989.
- M. Urban, R. Möller, and W. Fritzsche. A paralleled readout system for an electrical DNA-hybridization assay based on a microstructured electrode array. *Review of Scientific Instruments*, 74:1077–1081, 2003.
- J. Wang. From DNA biosensors to gene chips. *Nucleic Acids Res*, 28(16):3011–6, 2000.
- J. Wang, D. Xu, A. N. Kawde, and R. Polsky. Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization. *Anal Chem*, 73(22):5576–81, 2001.
- J. Wang, D. Xu, and R. Polsky. Magnetically-induced solid-state electrochemical detection of DNA hybridization. *J Am Chem Soc*, 124(16):4208–9, 2002.
- J. Wang, G. Liu, and A. Merkoci. Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets. *J Am Chem Soc*, 125(11):3214–5, 2003.
- Z. Wei and F. P. Zamborini. Directly monitoring the growth of gold nanoparticle seeds into gold nanorods. *Langmuir*, 20(26):11301–4, 2004.
- Y. Weizmann, F. Patolsky, and I. Willner. Amplified detection of DNA and analysis of single-base mismatches by the catalyzed deposition of gold on Au-nanoparticles. *Analyst*, 126(9):1502–4, 2001.
- Y. Weizmann, F. Patolsky, E. Katz, and I. Willner. Amplified telomerase analysis by using rotating magnetic particles: the rapid and sensitive detection of cancer cells. *Chembiochem*, 5(7):943–8, 2004.
- I. Willner, F. Patolsky, Y. Weizmann, and B. Willner. Amplified detection of single-base mismatches in DNA using microgravimetric quartz-crystal-microbalance transduction. *Talanta*, 56:847–856, 2002.

-
- R. Wirtz, C. Wälti, W. A. Germishuizen, M. Pepper, A. P. J. Middelberg, and A. G. Davies. High-sensitivity colorimetric detection of DNA hybridization on a gold surface with high spatial resolution. *Nanotechnology*, 14:7–10, 2003.
- S. Xiao, F. Liu, A.E. Rosen, J.F. Hainfeld, N.C. Seeman, K. Musier-Forsyth, and R.A. Kiehl. Selfassembly of metallic nanoparticle arrays by DNA scaffolding. *J Nanoparticle Res*, 4:313–317, 2002.
- Y. H. Yang, M. J. Buckley, and T. P. Speed. Analysis of cDNA microarray images. *Brief Bioinform*, 2(4):341–9, 2001.
- N. Zammattéo, L. Jeanmart, S. Hamels, S. Courtois, P. Louette, L. Hevesi, and J. Remacle. Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Anal Biochem*, 280(1):143–50, 2000.
- G.-J. Zhang, R. Möller, R. Kretschmer, A. Csaki, and W. Fritzsche. Microstructured Arrays with Pre-synthesized Capture Probes for DNA Detection Based on Metal Nanoparticles and Silver Enhancement. *Journal of Fluorescence*, 14(4):369–375, 2004.
- X. C. Zhou, S.J. O’Shea, and S. F. Y. Li. Amplified microgravimetric gene sensor using Au nanoparticle modified oligonucleotides. *Chem Commun*, pages 953–954, 2000.
- J. Ziauddin and D. M. Sabatini. Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature*, 411(6833):107–10, 2001.
- J. V. Zoval, R. M. Stiger, P. R. Biernacki, and R. M. Penner. Electrochemical Deposition of Silver Nanocrystallites on the Atomically Smooth Graphite Basal Plane. *J Phys Chem*, 100:837–844, 1996.

Wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

A. Schäferhenrich, G. Beyer-Sehlmeyer, G. Festag, A. Küchler, N. Haag, A. Weise, T. Liehr, U. Claussen, B. Marian, W. Sendt, J. Scheele, and B. L. Pool-Zobel. Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal. *Mutation Research*, 526(1-2):19–32, 2003.

T. Kautenburger, G. Beyer-Sehlmeyer, G. Festag, N. Haag, S. Kühler, A. Küchler, A. Weise, B. Marian, W. H. M. Peters, T. Liehr, U. Claussen, and B. L. Pool-Zobel. The gut fermentation product butyrate, a chemopreventive agent, suppresses glutathione S-transferase theta (hGSTT1) and cell growth more in human colon adenoma (LT97) than tumor (HT29) cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2005.

G. Festag, A. Steinbrück, A. Wolff, A. Csaki, R. Möller, and W. Fritzsche. Optimization of gold nanoparticle-based DNA detection for microarrays. *J Fluoresc*, 15(2):161–70, 2005.

A. Steinbrück, A. Csaki, G. Festag, and W. Fritzsche. Preparation and Optical Characterization of Core-Shell Bimetal Nanoparticles. *Plasmonics*, 1(1):79–85, 2006.

G. Festag, A. Steinbrück, A. Csaki, and W. Fritzsche. Single particle studies of the autocatalytic metal deposition onto surface-bound gold nanoparticles reveal a linear growth. *Nanotechnology*, 17:1–10, 2007.

A. Csaki, F. Garwe, A. Steinbrück, G. Maubach, G. Festag, A. Weise, I. Riemann, K. König, and W. Fritzsche. A Parallel Approach for Subwavelength Molecular Surgery Using Gene-Specific Positioned Metal Nanoparticles as Laser Light Antennas. *Nano Lett*, 2007.

Buchkapitel

G. Festag, U. Klenz, T. Henkel, A. Csaki, and W. Fritzsche. Biofunctionalization of Metallic Nanoparticles and Microarrays for Biomolecular Detection. In C. S. S. R. Kumar, editor, *Biofunctionalization of Nanomaterials*, volume 1 of *Nanotechnologies for Life Sciences*, pages 150–182. WILEY-VCH, Weinheim, 2005a.

Tagungsbandbeiträge (nur Erstautor)

G. Festag, T. Schüler, A. Steinbrück, A. Csaki, and W. Fritzsche. Specific metal deposition onto immobilized metal nanoparticles studied on single particle level. In AIP

Conference Proceedings. W. Fritzsche, editor, *DNA-based nanoscale integration*, volume 859, pages 55–62, Jena, Germany, 2006.

A. Steinbrück, A. Csaki, G. Festag, and W. Fritzsche. Designing plasmonic structures: Bi-metallic core-shell nanoparticles. In SPIE Proceedings. D. L. Andrews, J.-M. Nunzi, and A. Ostendorf, editors, *Nanophotonics*, volume 6195, page 6, Strasbourg, France, 2006b.

Vorträge (nur Erstautor)

G. Festag, R. Möller, and W. Fritzsche. Labeling with gold nanoparticles for DNA-chip technology. *Scanning-Probe-Microscopies and Organic Materials XI*, Kassel, Germany. 22-24 Sept 2002.

G. Festag, A. Csaki, R. Möller, and W. Fritzsche. Metallverstärkung von Goldnanopartikeln. *11. SPM-Usermeeting Veeco Instruments*, Hamburg, Germany. 19-20 Oct 2005.

Poster (nur Erstautor)

G. Festag, A. Steinbrück, A. Wolff, A. Csaki, R. Möller, and W. Fritzsche. Substrate modification for gold nanoparticle labeling. *Bioconjugated Nanoparticles in Molecular Diagnostics and Therapy*, Jena, Germany, 22-24 May 2003.

G. Festag, A. Steinbrück, A. Wolff, A. Csaki, R. Möller, and W. Fritzsche. Characterization of surface modification methods for nanoparticle-labeled DNA microarrays. *Scanning-Probe-Microscopies and Organic Materials XII*, Mainz, Germany, 24-26 Sept 2003.

G. Festag, T. Schüler, A. Steinbrück, A. Csaki, and W. Fritzsche. Characterization of silver enhancement methods for nanoparticle-based DNA microarrays. *Scanning Probe Microscopy in Life Sciences*, Berlin, Germany, 13 Oct 2005.

G. Festag, T. Schüler, A. Steinbrück, A. Csaki, and W. Fritzsche. Specific metal deposition onto immobilized metal nanoparticles on single particle level. *Particle 2006. Medical/Biochemical Diagnostic, Pharmaceutical, and Drug Delivery Applications of Particle Technology*, Wyndham Orlando Resort Orlando, Florida, 13-16 May 2006.

G. Festag, T. Schüler, D. Malsch, R. Möller, and W. Fritzsche. Specific metal deposition at the single particle level. *Scanning Probe Microscopies and Organic Materials XV*, Dresden, Germany, 27-29 Sept 2006.

G. Festag, T. Schüler, A. Steinbrück, A. Csaki, and W. Fritzsche. Single Particle Studies of Metal Deposition Onto Metal Nanoparticles. *Scanning Probe Microscopy in Life Sciences*, Berlin, Germany, 12 Oct 2006.

G. Festag, A. Steinbrück, A. Csaki, T. Schüler, and W. Fritzsche. Correlation of optical properties with nanostructure dimensions on a single metal particle level. *Molecular Plasmonics*, Jena, Germany, 10-12 May 2007.

Danksagung

Vielen Dank möchte ich all denen sagen, die mich während meiner Arbeit unterstützt und begleitet haben. Ein besonderes *Dankeschön* geht dabei an:

Prof. Dr. Beatrice L. Pool-Zobel, die mich über den gesamten Zeitraum mit anhaltendem Interesse begleitet und durch wertvolle Hinweise unterstützt hat;

Dr. habil. Wolfgang Fritzsche für die Vor-Ort-Betreuung am IPHT, seine fachliche und moralische Unterstützung sowie sein anhaltendes Interesse am Fortgang meiner Arbeiten;

Prof. Dr. Jürgen Popp für die kritische Diskussion meiner Arbeit;

Dr. Andrea Csáki und *Dr. Robert Möller*, die mich dereinst in die Materie einführten und die ich jederzeit um “Rat und Tat” bitten konnte;

Andrea Steinbrück, *Andreas Wolff* und *Robert Kretschmer* für die angenehme Atmosphäre beim Blick über den Tellerrand hinaus;

Thomas Schüler für seine ständige Hilfsbereitschaft und unzählige Silanisierungen;

alle *AFM-Nutzer* für das unkomplizierte “Terminhandling”;

beide *Spotexperten*, die mich immer wieder hilfsbereit beim Ringen um richtig platzierte Spots unterstützt haben;

Anett Reichert und die “PCR-Mädels” für ihre Hilfe in Sachen PCR ;

Franka Jahn für die Erstellung der REM-Aufnahmen, *Uwe Klenz* für das Rendering eindrucksvoller Bilder und *Roland Wehking* für die professionellen Fotos von Spotter und ACED-Reader;

Katrin Kandra, *Margitta Sossna*, *Horst Porwol* und *Andreas Ihring* für die Präparation der Chipsubstrate;

Dr. Julia Sauer, die mich immer hilfsbereit mit neuen PCR-Proben versorgt hat;

Josefine Bach für ihre fleißige Hilfe bei den GST-Versuchen;

Dr. Jörg Kraft für die spontane Bereitschaft, für mich Messungen am Atomabsorptionsspektrometer durchzuführen;

Marc-René Carlsohn für die Unterstützung beim Design der GST-Sonden;

Dr. Eckhard Birch-Hirschfeld für die Nutzung des Mikroarray-Readers;

die Mitglieder der ehemaligen Abteilung *Biotechnische Mikrosysteme* des IPHT, die für ein angenehmes und freundliches Arbeitsklima sorgten;

meine Eltern, die mich auf meinem bisherigen Weg begleitet haben und mich immer wieder seelisch-moralisch unterstützten.

Ein ganz besonders großes *Dankeschön* geht aber an meinen Mann *Karsten* für die vielen gemeinsamen Abende am Rechner, die kreative und effektive Unterstützung beim Arbeiten mit *ImageJ* und seinen “hartnäckigen” Optimismus.

Und nicht zu vergessen: “Hinter jeder erfolgreichen Frau steht ... eine erhebliche Menge Espresso”. (Julie Woodside)

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Grit Festag
Geburtsdatum: 21.01.1975
Geburtsort: Jena
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet
Adresse: Golmsdorfer Straße 15, 07749 Jena

AUSBILDUNG

1981–1991 Polytechnische Oberschule, Jena
1991–1993 Staatliches Gymnasium, Jena
1993 Allgemeine Hochschulreife mit dem Prädikat “sehr gut”
1993–1994 Studium der Veterinärmedizin, Universität Leipzig (Vorphysikum mit dem Prädikat “sehr gut”)
1994–1998 Studium der Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena (Ärztliche Vorprüfung und Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit dem Prädikat “gut”)
1998–2002 Studium der Ernährungswissenschaften, Friedrich-Schiller-Universität Jena (Diplom mit dem Prädikat “sehr gut”); Titel der Diplomarbeit: “Charakterisierung der GST-Isoenzyme der humanen Kolonzelllinie *LT97* - eine neue Zelllinie aus einem früheren Adenomstadium”
seit 06/2002 Promotion an der Friedrich-Schiller-Universität und am Institut für Photonische Technologien Jena

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Ich habe mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad *doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.) beworben und weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des oben genannten akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt.