

Freie Universität  Berlin

Nanopartikel als Verstärkungsstrategie in fluoreszenzbasierten Immunoassays

Dissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

von

Pablo Darío Quevedo

aus Bernau bei Berlin

Berlin
Oktober 2017

Die Arbeit wurde unter der Leitung von Dr. Ute Resch-Genger im Fachbereich 1.10 Biophotonik an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung im Zweiggelände Berlin-Adlershof im Zeitraum vom Mai 2012 bis Oktober 2017 angefertigt.

1. Gutachter: Dr. Ute Resch-Genger

2. Gutachter: Prof. Dr. Nora Kulak

Disputation am: 13.02.2018

„It's not the mountain we conquer, but ourselves“

Sir Edmund Hillary

Danksagung

Diese Arbeit ist unter der Leitung von Dr. Ute Resch-Genger entstanden. Ihr gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit, die hier vorgestellte Arbeit anzufertigen und für die intensive Betreuung. Ich möchte ihr ganz ausdrücklich dafür danken, dass sie mich fachlich und sprachlich bei der Anfertigung mit ihren umfassenden Kenntnissen und Erfahrungen in persönlichen Gesprächen unterstützt hat.

Bei Prof. Dr. Nora Kulak möchte ich mich dafür bedanken, dass sie als zweite Gutachterin meine Monographie beurteilt.

Ebenfalls gilt mein besonderer Dank meinen Bürokollegen Dr. Thomas Behnke, Dr. Daniel Geißler und Dr. Christian Würth, die mir in der Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen, mich bei der Anfertigung von Publikationen und der Dissertationsschrift durch einen intensiven wissenschaftlichen Austausch unterstützten, mich stets motivierten und mich bei guter Laune hielten. Dr. Zerrin Fidan sei gedankt für die tollen Unterhaltungen in den Mittagspausen im Park und viele fröhliche Momente.

Ebenso möchte ich mich beim Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, Projekt AMPLI-DYE, Projekt-Nr. 0315844A, Programm KMU-innovativ-6) für die finanzielle Unterstützung bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen weiteren Kollegen und Kolleginnen des Fachbereiches 1.8 und 1.10 bedanken, insbesondere bei Denny Binder, Dr. Claudia Brunner, Sabine Flemig, Dr. Markus Grabolle, Dr. Julia Grandke, Arne Güttler, Soheil Hatami, Dr. Andreas Hennig, Angelika Hoffmann, Dr. Katrin Hoffmann, Kristin Hoffmann, Martin Kaiser, Dr. Andreas Lehmann, Marko Moser, Nithiya Nirmalanathan, Dr. Jutta Pauli, Maria Richter, Dr. Michael Schäferling, Ralf Schneider, Dr. Rudolf Schneider, Norman Scholz, Jagoda Sloniec, Monika Spieles und Christin Sprowitz. Danke für die schöne Zeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Iryna Driehorst und Sören Selve von der TU Berlin für die REM- und TEM-Messungen und Prof. Dr. Christina Graf für die Kryo-REM-Messungen bedanken. Dr. Heike Borcharding möchte ich für die Ratschläge hinsichtlich der Proteinquantifizierung auf (NP-)Oberflächen danken.

Meinen Freunden Jenny Hamm, Tina Röbel, Sylvia Hauke, Julia Wolter und Emily Delbrück, die mir in der Zeit immer zur Seite gestanden haben und einfach tolle Menschen sind, möchte ich ebenfalls ganz besonders danken.

Meinen Kollegen vom Magic Mountain, im Besonderen Mathias Leutner und Janet Firmont, möchte ich dafür danken, mir die Möglichkeit gegeben zu haben, dass ich Arbeit und Promotion zeitlich und auch emotional vereinbaren und beides mit viel Leidenschaft und Engagement erfüllen konnte.

Ebenfalls gilt mein innigster Dank meiner geliebten Freundin Marie-Luise Kühne und ihrer ganzen Familie, besonders hervorzuheben, ihre Mutter und ihren Vater, die mich sehr herzlich in ihre Familie aufgenommen haben.

Als letztes sei im besonderen Maße meiner Familie, besonders meinem Vater, José Pablo Quevedo, und meiner Mutter, Barbara Quevedo, gedankt, die mich mit all der Liebe und Zuneigung versorgt und mir den Willen, den Mut und die Stärke gegeben haben, meinen eigenen Weg zu gehen und die jederzeit an mich glauben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	4
2.1	Immunoassays	4
2.1.1	Definition und Funktionsweise	4
2.1.2	Detektionsmethoden und Signalverstärkungsstrategien	5
2.1.3	Assayformate	15
2.2	Nanopartikel	17
2.2.1	Herstellung und Eigenschaften von Nanopartikeln	18
2.2.2	Herstellung fluoreszenter Nanopartikel	22
2.2.3	Charakterisierung fluoreszenter Nanopartikel	24
2.3	Nanopartikel in bioanalytischen Lebenswissenschaften	26
2.3.1	Biokonjugation von Nanopartikeln	26
2.3.2	SAv-Quantifizierung	30
3	Experimentelles	34
3.1	Materialien und Methoden	34
3.1.1	Verwendete Chemikalien	34
3.1.2	Allgemeine Angaben	36
3.1.3	Programme	37
3.2	Herstellung fluoreszenter Nanopartikel	37
3.2.1	Farbstoffnanopartikel mittels „Top-down“- und LbL-Verfahren	37
3.2.2	Farbstoffbeladung von Polymerpartikeln	38
3.3	Charakterisierung der Nanopartikel	38
3.3.1	Physikalische Charakterisierung	38
3.3.2	Chemische Charakterisierung	39
3.3.3	Optische Charakterisierung	39
3.4	Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel-SAv-Konjugate	40
3.4.1	Streptavidin-Konjugation	40
3.4.2	BCA-Assay und Biotin-FITC-Titration	43
3.5	Durchführung der CRP-Immunoassays	45
3.5.1	CRP-ELISA	46
3.5.2	Partikelbasierte CRP-Immunoassays	47
3.5.3	Test unspezifischer und spezifischer Wechselwirkungen SAv-funktionalisierter 100 und 500 nm PS NP	47

4	Ergebnisse und Diskussion	49
4.1	Herstellung und Charakterisierung der fluoreszenten Nanopartikel	49
4.1.1	Auswahl der Farbstoffe und Nanopartikel	49
4.1.2	Farbstoffnanopartikel mittels „Top-down“-Verfahren	53
4.1.3	Farbstoffbeladene Polystyrolnanopartikel	58
4.1.4	Vergleich der Nanopartikel-Label	65
4.2	Streptavidinfunktionalisierung	65
4.2.1	Biokonjugationsstrategien und potentielle Störeinflüsse	66
4.2.2	Einfluss der SAV-Funktionalisierung und der NP-Größe auf spezifische und unspezifische Wechselwirkungen	72
4.2.3	Streptavidin-Quantifizierung	76
4.3	CRP-Immunoassays mit Nanopartikel-Labeln	87
4.3.1	Aufbau des CRP-Immunoassays	87
4.3.2	Einfluss der Partikelparameter auf den CRP-Immunoassay	88
4.3.3	Screening-Test: CRP-Immunoassays mit weiteren farbstoffbeladenen Nanopartikeln zur Erhöhung der Signalintensität	95
4.3.4	Vergleich der Nachweisempfindlichkeiten	97
5	Zusammenfassung und Ausblick	101
6	Summary and Outlook	103
7	Anhang	i
7.1	Publikationsliste	i
7.2	Abkürzungsverzeichnis	i
7.3	Verwendete Symbole	iii
	Literaturverzeichnis	xxiv

1 Einleitung

Der steigende Trend in der Medizin bzw. Bioanalytik, Krankheiten möglichst früh zu erkennen und zu behandeln, setzt voraus, die entsprechenden Biomarker schon in sehr geringen Konzentrationen in vitro nachzuweisen. Sofern keine sehr empfindlichen Nachweisverfahren vorhanden sind, muss zwangsweise der Analyt aufkonzentriert werden, was mit einem zusätzlichen Arbeitsaufwand, Kosten und ggf. höheren Unsicherheiten verbunden ist. Die elegantere Lösung ist es, die entsprechenden Nachweisverfahren sensitiver zu gestalten, so dass schon geringe Mengen des zu untersuchenden Analyten mit einem einzigen Schritt nachweisbar sind. Des Weiteren benötigen viele Nachweisverfahren Zeit, nicht zuletzt dadurch, dass die verwendeten Proben zur Analyse meist in Labore eingeschickt werden müssen. Eine geringe zeitliche Verzögerung von der Diagnose bis zum Befund und zur geeigneten Behandlung kann bei vielen Erkrankungen maßgeblich für den Erfolg der Heilung sein. Hierbei stellen Point-of-care-Tests (POCT), welche direkt am Krankenbett durchgeführt werden können, eine vielversprechende Alternative dar [1–3]. Dementsprechend hoch ist das Bemühen, neue Tests und Nachweisverfahren zu entwickeln, welche sensitiv und schnell durchzuführen sind. Die Detektion in Fluoreszenz kann helfen, die Sensitivität der Tests zu erhöhen [4, 5]. Ein Parameter ist hierbei die Fluoreszenzintensität, welche direkt korreliert mit der Anzahl an signalerzeugenden Einheiten je Analyt. Klassische Enzymimmunoassays [6] haben den Vorteil, dass sie durch die Verwendung eines Enzymlabels innerhalb von wenigen Minuten hohe Mengen eines farblosen Substrates in ein farbiges oder fluoreszierendes Produkt umwandeln und so je Analyt hunderte bis tausende signalerzeugende Moleküle generieren. Nachteilig beim signalerzeugenden Schritt ist jedoch die Temperatur- und Zeitabhängigkeit von Enzymreaktionen, weshalb der gleiche Immunoassay bei geringer Variation dieser Parameter nicht unmittelbar miteinander vergleichbar ist, und dass solche Enzyme nicht für alle POCT-Produkte eingesetzt werden können.

Durch Verwendung von fluoreszenten Farbstofflabeln kann dieses Problem umgangen werden. Durch die Wahl eines geeigneten Farbstoffes können die Signalintensität erhöht und Störeffekte, z.B. durch die biologische Matrix, minimiert werden [4]. Dies umfasst spektroskopische Farbstoffeigenschaften wie die Lage der Absorptions- und Emissionsbanden, die Photolumineszenzquantenausbeute, den molaren Extinktionskoeffizienten und die Lumineszenzabklingzeiten. Aber auch andere physikochemische Eigenschaften wie die Stabilität gegenüber Licht und Temperatur sind bei der Auswahl entscheidend. POCT-Tests, speziell Lateral-Flow-Tests [7, 8] wie z.B. kommerziell erhältliche Schwangerschaftstests [9], verwenden jedoch statt reinen Farbstoffen oftmals farbige Nanopartikel (NP) als Label (Abbildung 1.1 links).

Aufgrund ihrer Größe besitzen NP je nach Material physikochemische Eigenschaften, welche die makroskopischen oder molekularen Strukturen desselben Materials nicht aufweisen [10]. Durch ihr sehr großes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis besitzen sie zumeist eine gesteigerte chemische Reaktivität und höhere Oberflächenladung [11]. Zudem können sie veränderte, teils größenabhängige optische und magnetische [11, 12] Eigenschaften besitzen und verschiedene quantenmechanische Effekte zeigen. Beispiele sind hierfür die partikelgrößen- und formabhängige spektrale Lage der Plasmonenbande von Gold-NP oder die Absorptions- und Lumineszenzeigenschaften von Halbleiter-Quantenpunkten [10, 13, 14].

Durch ihre besonderen Eigenschaften werden NP z.B. als Pigmente in Kosmetika, Arzneimitteln, Farben und Lacken, als Putzhilfe in Zahnpasta, als Absorber für ultraviolette (UV) Strahlung in Sonnencremes, als Kontrastverstärkung im Magnetresonanztomographie, als Verdickungsmittel in Tomatenketchup, als Katalysatoren zur Erzeugung von selbstreinigenden Beschichtungen, als Zusatz bzw. Füllstoff in Kunststoffen und Gummiartikeln, als Schmiermittel, als optische Sensoren in Immunoassay- oder Imaginganwendungen und als Wirkstoffträgermittel eingesetzt. [11, 12, 15–17].

NP können in vielen verschiedenen Größen und Formen aus diversen Materialien und mit unterschiedlichen Eigenschaften produziert werden. Durch geeignete Oberflächengruppen lassen sich die Nanomaterialien einfach weiter funktionalisieren und somit unter anderem an Antikörper bzw. Proteine binden [18], wodurch sie z.B. für POCT-Anwendungen als geeignete Label zur Verfügung stehen [9]. Um NP-Label in Immunoassays verwenden zu können, kommen vorrangig zwei Methoden infrage: einerseits die direkte Kopplung an den Detektionsantikörper und andererseits die Kopplung an Streptavidin (SAv), welches anschließend an einen Biotin-tragenden Detektionsantikörper gebunden wird. Die SAv-Biotin-Bindung [19] wird vielfach verwendet, da die Kopplung aufgrund der Stärke und der Spezifität der Bindung sehr stabil ist, die Reaktion während des Assays durchgeführt werden kann und der Einsatz des Labels bei der Verwendung verschiedener biotinylierter Antikörper variabel gestaltbar ist.

Die Biofunktionalisierung setzt eine einfache Methode voraus, Mengen an gebundenem Proteinen zuverlässig nachweisen und bestimmen zu können. Nur so können vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden. Mittels Bicinchoninsäure- (BCA) und Biotin-Fluoresceinisothiocyanat-(FITC)-Assay können die quantitative Kopplung bzw. die SAv-Aktivität analysiert werden. Viele Methoden sind jedoch nur für reine Proteinlösungen frei von potentiellen Störfaktoren wie z.B. Farbstoffen oder Nanopartikeln geeignet [20]. BCA-Assays werden z.B. durch (Sulfo)-NHS-Ester beeinflusst [21, 22], welche gerne für das Koppeln von Proteinen an carboxylierte Oberflächen verwendet werden. Zudem können nanopartikelbedingte Streueffekte das Ergebnis spektroskopischer Proteinquantifizierungsmethoden beeinträchtigen. Daher ist es wichtig, die verwendeten Methoden unter diesen Bedingungen so zu gestalten, dass sie auch belastbare Ergebnisse liefern.

Die Verwendung von farbigen NP-Labeln in Immunoassays hat einen besonderen Vorteil. Aufgrund ihrer Größe können NP sehr hohe Mengen an Farbstoffen tragen, weshalb bei der Detektion auch eine höhere Fluoreszenzintensität erwartet werden kann.

In der Literatur gibt es eine Vielzahl an Methoden, Farbstoffe zu verkapseln, in NP einzuquellen oder chemisch/ physikalisch an NP zu binden. Eine Möglichkeit ist es, Farbstoff-NP durch Vermahlen von Farbstoffen im „Top-Down“-Verfahren herzustellen und sie anschließend mit alternierend geladenen Polymerschichten zu verkapseln [23,24]. Eine andere Möglichkeit besteht darin, Farbstoffe in Polymerpartikel einzuquellen [25]. Hierbei sind weitere physikochemische Farbstoffeigenschaften wie die Hydrophobizität und die Löslichkeit der Farbstoffe für die Verkapselung bzw. das Einquellen entscheidend. Nach der Verkapselung von Farbstoffkristalliten oder Beladung von Polymerpartikeln befinden sich die einzelnen Farbstoffe in sehr enger räumlicher Nähe, was unter anderem die Bildung von gering- oder nicht-fluoreszenten dimeren Spezies zur Folge haben kann [26]. Durch gezielte Farbstofffreisetzung, wie z.B. durch Auflösen der Partikel oder durch Extraktion des Farbstoffes mit einem organischen Lösungsmittel, und die dabei erfolgende Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute der freigesetzten, nicht mehr miteinander wechselwirkenden Farbstoffmoleküle kann die Signalintensität gesteigert werden (Supernovaeffekt [27], siehe Abbildung 1.1 rechts). Jedoch werden gefärbte Nanopartikel fast ausschließlich ohne Extraktion in biologischen Assays verwendet [28].

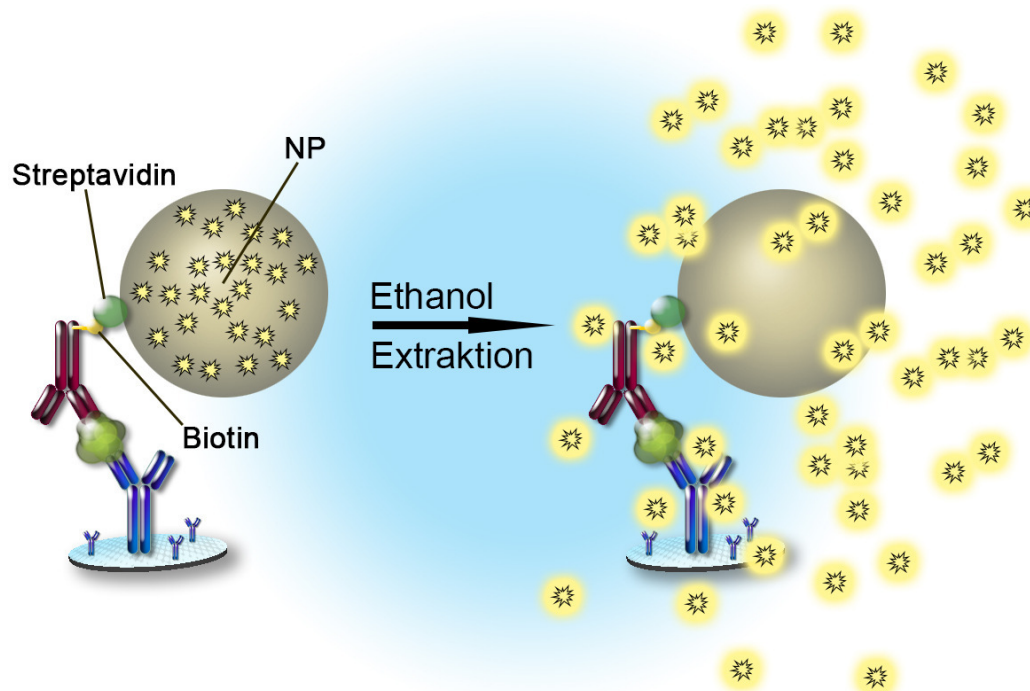


Abbildung 1.1: Schematische Abbildung der Farbstoffextraktion beim Immunoassay

Ziel der Arbeit war es, einen Immunoassay aufzubauen, welcher möglichst sensitiv ist. Zur Signalgebung sollten Methoden und Farbstoff-NP entwickelt werden, welche eine sehr hohe Menge an Farbstoffen tragen können und die eine gezielte Freisetzung von Farbstoffmolekülen ermöglichen. Zudem sollten SA_v-Funktionalisierungs- und SA_v-Quantifizierungsstrategien für solche Farbstoff-NP gefunden werden. Als NP-Trägermaterial wurden dafür repräsentativ Polystyrol-NP gewählt.

2 Grundlagen

2.1 Immunoassays

Immunoassays [29] sind in der heutigen Zeit ein nicht mehr wegzudenkender Bestandteil in der Bioanalytik und medizinischen Diagnostik. Sie werden unter anderem zur Kontrolle von umweltgefährdenden Substanzen im Oberflächenwasser [30], zur Überwachung der Lebensmittelqualität [31] und zur Bestimmung krankheitsspezifischer Biomarker eingesetzt [32]. Seit der Einführung eines einfach anzuwendenden Schwangerschaftsschnelltests in den 1970er Jahren [33] wurden bis heute eine Vielzahl solcher Tests für verschiedene Biomarker entwickelt. Bei Betrachtung der in Marburg ansässigen Firma NanoRepro AG (Gründung 2006), die auf dem Gebiet von Schnelldiagnostika (Schnelltests, POCT [3], Lateral-Flow-Tests [8], z.B. Schwangerschaftstest [9], Scheidenpilztest) agiert, sind die Umsatzzahlen für den Verkauf von Schnelltests seit 2008 bis 2013 von 67.000 Euro auf 1.050.000 Euro rasant gestiegen. Im Jahr 2015 wurde mittlerweile die Markteinführung für einen HIV-Schnelltest bekannt gegeben [34]. Dies zeigt, was für einen stetig wachsenden Stellenwert Immunoassays besitzen.

2.1.1 Definition und Funktionsweise

Bei einem Immunoassay wird ein Analyt durch die spezifische Bindung an ein Antigen oder einen Antikörper nachgewiesen bzw. quantifiziert [35, 36]. Antikörper sind Proteine aus der Klasse der Globuline, die in Wirbeltieren als Reaktion auf körperfremde Stoffe (Antigene) gebildet werden, und diese unter Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes (Immunkomplex) binden (Immunreaktion). Dabei wird zwischen polyklonalen und monoklonalen Antikörpern unterschieden. Binden die Antikörper an verschiedene Bindungsstellen (Epitope) eines Antigens, handelt es sich um polyklonale Antikörper, eine Mischung monoklonaler Antikörper. Monoklonale Antikörper binden nur an ein Epitop eines Antigens [6]. Der Analyt als solches kann entweder ein Antigen oder ein Antikörper sein. Im Folgenden wird ausschließlich der zu untersuchende Analyt das Antigen sein.

Die einfachste Form eines Immunoassays ist der direkte, nicht-kompetitive, heterogene Immunoassay (Abbildung 2.1 oben) [6]. Hierbei wird in einem ersten Schritt der sich in einer flüssigen Phase befindliche Analyt an einer festen Phase immobilisiert, an den in einem zweiten Schritt ein Detektionsantikörper bindet. Um das Antigen bzw. die Antigen-Antikörper-Bindung nachweisen zu können, muss der Antikörper mit einem Label markiert werden, mit dessen Hilfe je nach Detektionsmethode (Abschnitt 2.1.2.5)

ein Signal erzeugt werden kann [37]. In Abbildung 2.1 wurde das Label über einen zweiten Antikörper (Sekundäantikörper) an den Detektionsantikörper gebunden. Durch die Verwendung von zwei Phasen können vor der Detektion ungebundene Antikörper und Analyten separiert werden.

Beim indirekten, nicht-kompetitiven, heterogenen Immunoassay (Abbildung 2.1 unten) wird das Antigen sandwichartig an zwei für das Antigen spezifische Antikörper gebunden (Sandwichimmunoassay) [6]. In Sandwichimmunoassays werden vorwiegend monoklonale Antikörper verwendet. In einem ersten Schritt wird ein Fängerantikörper auf einer festen Phase immobilisiert und anschließend der Analyt an den Fängerantikörper gebunden. Im dritten Schritt wird ein Detektionsantikörper an ein anderes Epitop des Antigens gebunden, an den das detektierbare Label gekoppelt wird (Abbildung 2.1). Bei dieser Methode muss das Antigen mindestens zwei unterscheidbare Epitope auf verschiedenen Seiten besitzen und groß genug sein, um zwei Antikörper binden zu können, um eine sterische Hinderung des Fänger- und Detektionsantikörpers zu verhindern [6]. Die Auswahl der sich nicht sterisch hindernden Antikörper ist ein entscheidender Faktor für die erfolgreiche Durchführung des Immunoassays. Der Vorteil dieser Methode gegenüber dem direkten Immunoassay liegt in seiner höheren Spezifität gegenüber dem Antigen, da anstelle eines Antikörpers zwei verwendet werden, was das Aufreinigen des Analyten vor der Analyse nicht unbedingt erforderlich macht und somit ebenfalls das Signal-Rausch-Verhältnis durch die Reduktion von unspezifischen Wechselwirkungen verbessert. Dadurch ist der Sandwichimmunoassay sensitiver, liefert eine höhere Signalintensität und wird aufgrund dessen häufig bevorzugt angewandt [6]. Anders als bei nicht-kompetitiven Assays konkurriert bei einem kompetitiven Assay der Analyt unbekannter Konzentration mit dem zugegebenen markierten Analyten bekannter Konzentration. Bei den homogenen Assays, die vollständig in Lösung ohne Adsorptionsschritte ablaufen, entfallen die Separationsschritte, da der markierte Analyt nur nach der Bindung an den Antikörper ein Signal erzeugt [36] bzw. das auf den Detektor fallende Licht von dem gebundenen Label anders polarisiert ist als das vom ungebundenem Label (Polarisationsassay) [38].

Generell gehören Immunoassays zu den Relativmethoden, was die Aufnahme einer Kalibrierkurve von Proben mit verschiedenen bekannten Analytkonzentrationen (Standards) und eine anschließende Kurvenanpassung zur Konzentrationsbestimmung der unbekanntes Analysenprobe erfordert. Bei konventionellen nicht-kompetitiven Assays ist die Stärke des Detektionssignals direkt proportional zur Analytkonzentration der unbekanntes Probe und bei kompetitiven Assays indirekt proportional. Die Durchführung erfolgt vorwiegend in Kunststoff-Multititerplatten (MTP), da Proteine hieran besonders gut adsorbieren, und wegen der möglichen Verwendung kleiner Probenmengen sowie der hohen, parallel messbaren Proben- und Standardanzahl.

2.1.2 Detektionsmethoden und Signalverstärkungsstrategien

Die Quantifizierung des Analyten in Immunoassays kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Eine Vielzahl an Immunoassays erfordert die Präsenz eines gebundenen Labels, das das detektierte Signal erzeugt. Bei vielen Immunoassays wird ein optisches Signal erzeugt, das in Absorption oder Fluoreszenz ausgelesen werden kann. Als Label werden hierfür Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe oder farbige/ fluoreszierende NP verwendet.

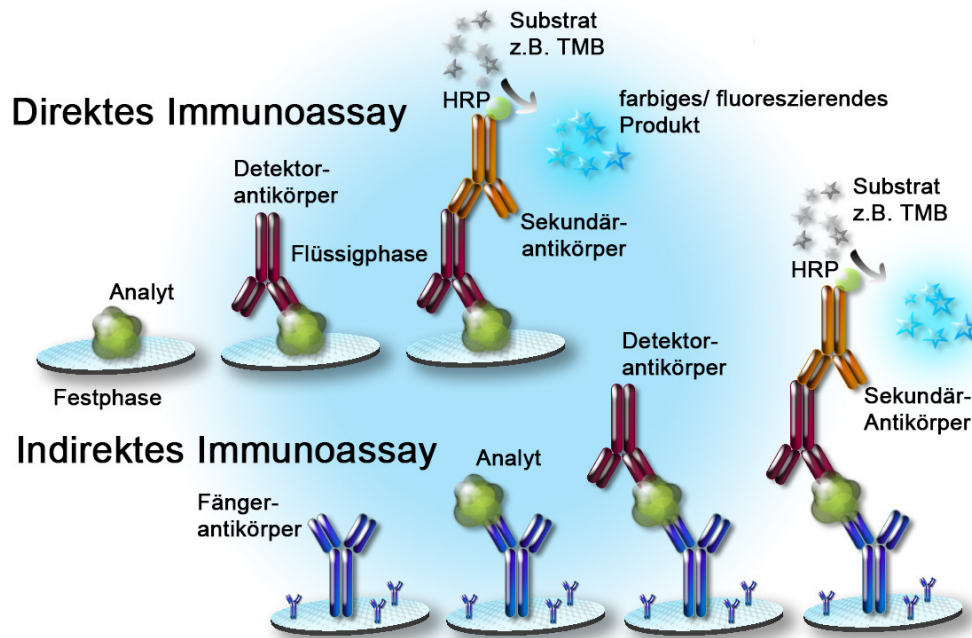


Abbildung 2.1: Schematische Abbildung eines direkten und indirekten, nicht-kompetitiven, heterogenen Immunoassays mit einem über einen sekundären Antikörper gekoppeltes Enzymlabel zur Signalerzeugung.

Enzyme (Abbildungen 2.1 und 2.2 (b)) wie die Meerrettichperoxidase (HRP) wandeln ein farbloses Substrat zu einem farbigen oder fluoreszenten Produkt um, das in Absorption bzw. Fluoreszenz detektiert werden kann (siehe Abschnitt 2.1.2.3). Immunoassays, welche Enzyme als Label verwenden, werden Enzymimmunoassays (EIA) genannt [39]. Fluoreszenzfarbstoffe (Abbildung 2.2 (a)) [6], welche nach Anregung mit Licht fluoreszieren, werden auch als Label in Immunoassays eingesetzt. Immunoassays, welche fluoreszierende Farbstoffe als Label verwenden, werden Fluoreszenzimmunoassays (FIA) genannt. Als Partikellabel [17] werden unter anderem Quantenpunkte [40], kolloidales Gold und Silber [8, 9, 41] oder farbstoffgefüllte Polymerpartikel [25, 42] eingesetzt (Abbildung 2.2 (c)). Bei Partikeln, wie z.B. Halbleiterquantenpunkten oder farbstoffgefüllten Partikeln, wird ebenfalls ein Fluoreszenzsignal detektiert, weshalb Immunoassays, welche diese Partikellabel verwenden, auch zu den FIA gezählt werden.

2.1.2.1 Die Grundlagen der optischen Spektroskopie

Moleküle sind in der Lage, elektromagnetische Strahlung mit der Energie E_h zu absorbieren (Gleichung 2.1), wobei h das Planck'sche Wirkungsquantum, ν die Frequenz der Strahlung und c_0 die Lichtgeschwindigkeit sind. Dabei wird das Molekül aus seinem elektronischen und vibronischen Grundzustand (Singulett-Zustand, S_0 , v_0 statistisch besetzt [43]), in dem es sich bei Raumtemperatur (RT) befindet, in ein vibronisches Energieniveau (v_0 bis v_n) eines höheren, elektronisch angeregten Zustandes (S_1 , S_2 , S_n) angeregt, was schematisch in der Abbildung 2.3, dem Jablonski-Diagramm, dargestellt ist. Dieser Prozess wird Absorption genannt (rote Pfeile). Es können

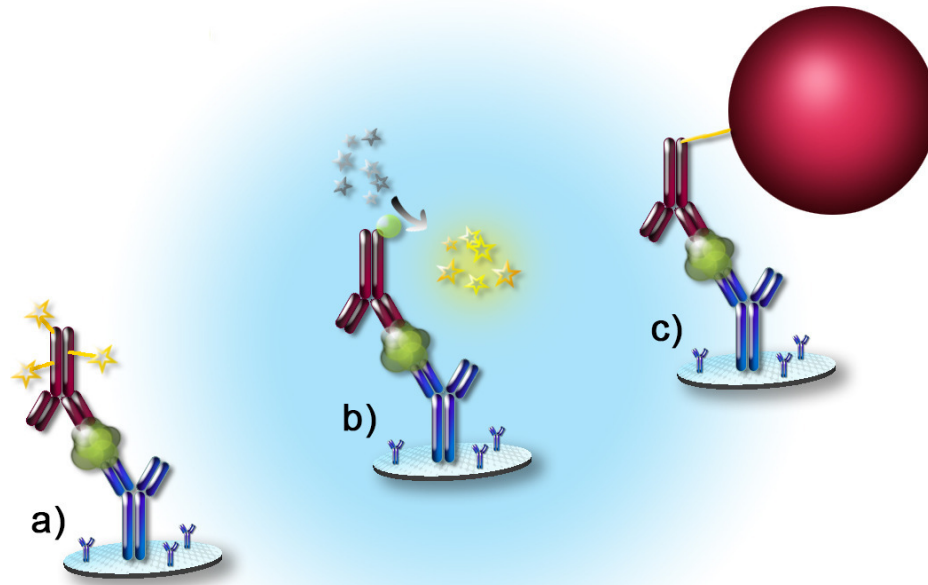


Abbildung 2.2: Schematische Abbildung verschiedener Label in Immunoassays: Fluoreszenzfarbstoffe (a), HRP (b) und NP (c).

hierbei nur bestimmte Wellenlängen λ absorbiert werden (Gleichung 2.1), da nur diskrete Energieniveaus besetzt werden können (schwarze Balken). Liegt die eingestrahelte Wellenlänge im ultravioletten, sichtbaren oder nahen infraroten Bereich, wird im Allgemeinen von UV/Vis-Spektroskopie oder Absorptionsspektroskopie gesprochen. Bei der Messung einer Wellenlänge wird im Allgemeinen von Photometrie gesprochen.

$$E_h = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c_0}{\lambda} \quad (2.1)$$

Anschließend wird das Molekül in einen vibronischen Grundzustand v_0 des elektronisch angeregten Zustandes, z.B. durch Zusammenstöße mit Umgebungsmolekülen unter Energieabgabe in Form von Wärme, abgesenkt, was innere Relaxation (IR) genannt wird. Durch energetisch gleiche Energieniveaus kann das Molekül von einem höheren Energieniveau in ein tiefer gelegenes Energieniveau übergehen ($S_2 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_0$, $T_2 \rightarrow T_1$, Innere Konversion, IC). Aus dem v_0 des ersten elektronisch angeregten Zustandes S_1 kann der Übergang in den Grundzustand neben IC auch durch Emission von Licht, Fluoreszenz genannt (grüne Pfeile), erfolgen. Bei der Anregung und der Detektion der Emission im UV/Vis/NIR-Bereich wird im Allgemeinen von Fluoreszenzspektroskopie bzw. Fluorometrie, analog zur Absorption, gesprochen. Im Allgemeinen ist die Energie der Emission kleiner als die der Absorption (Abbildung 2.3), wodurch es bei der Aufnahme von Spektren zu einer Verschiebung des Absorptions- und Emissionsmaximums kommt, was Stokes Shift genannt wird (Abbildung 2.4). Für fluoreszente Farbstoffe mit einem kleinen Stokes Shift kann es zu Reabsorption des emittierten Lichtes kommen (innere Filtereffekt), was zur Löschung der Fluoreszenz führen kann [44, 45].

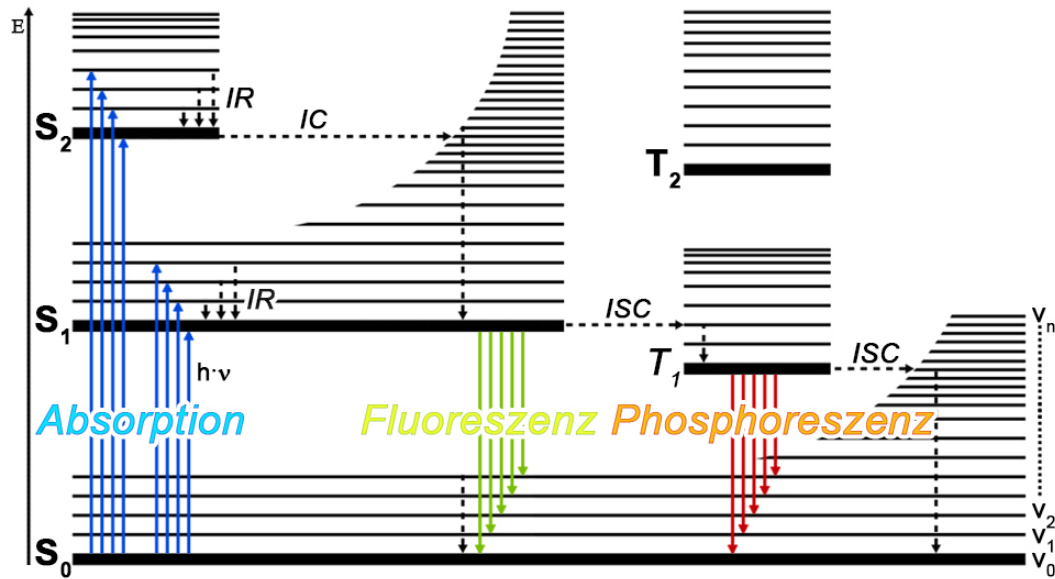


Abbildung 2.3: Jablonski-Diagramm.

Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Übergang von S_0/v_0 in einen der angeregten Zustände S_n/v_n und vice versa stattfindet, hängt dabei vom Übergangsdipolmoment ab.

Weiterhin kann das Molekül durch Intersystem Crossing (ISC) von dem S_1, v_0 in ein vibronisches Energieniveau des tiefer gelegenen ersten angeregten Triplett-Zustandes T_1 bei energetischer Überlappung beider Niveaus übergehen. Von dort aus kann das Molekül entweder mittels ISC in das S_0, v_n übergehen und strahlungslos in ein tieferes vibronisches Niveau relaxieren oder vom T_1 durch Emission von elektromagnetischer Strahlung, Phosphoreszenz genannt, direkt in ein tiefer gelegenes vibronisches Niveau S_0 übergehen. Im Allgemeinen finden die Übergänge (vertikale, durchgezogene Pfeile) innerhalb von 10^{-15} s statt, was zu keiner Änderung der Atomkernabstände innerhalb der Moleküle führt (Frank-Condon-Prinzip). Der IR- und IC-Prozess dauert ca. 10^{-12} s. Die Lebensdauer eines sich im S_1 -Niveau befindlichen Moleküls vor der Emission liegt typischerweise bei 10^{-8} bis 10^{-9} s [43].

Je mehr Photonen N_{em} nach der Anregung im Verhältnis zu den absorbierten Photonen N_{abs} emittiert werden, desto stärker luminesziert die Probe. Dieses wird in Form der dimensionslosen Photolumineszenzquantenausbeute (Quantenausbeute) Φ_f (Gleichung 2.2) [43, 45] angegeben. Φ_f kann aus dem Verhältnis der Ratenkonstanten der emittierenden Prozesse Γ und der Summe der emittierenden und strahlungslosen (k_{nr}) Prozesse dargestellt werden und liegt zwischen 0 und 1.

$$\Phi_f = \frac{N_{\text{em}}}{N_{\text{abs}}} = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{\text{nr}}} \quad (2.2)$$

Eine weitere substanzspezifische Messgröße ist die Fluoreszenzlebenszeit τ (Gleichung 2.3) [43]. Sie gibt die Zeit an, welche der Farbstoff in einem elektronisch angeregten

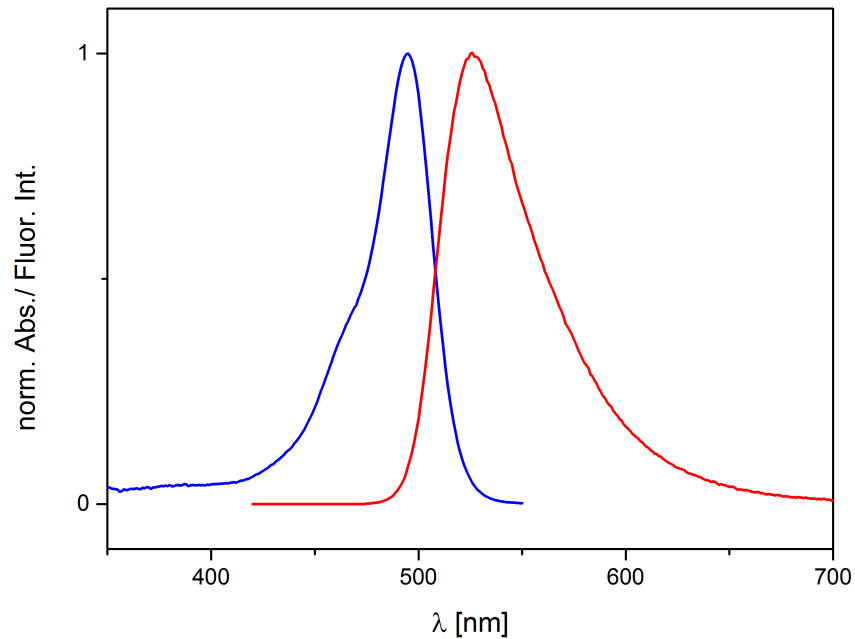


Abbildung 2.4: Normierte Absorptions- (blau) und Emissionsspektren (rot) von Biotin-4-Fluorescein (B4F, siehe Anhang, Abbildung 7.2). Die Differenz der beiden Maxima entspricht dem Stokes Shift.

Zustand verweilt, bevor er durch Emission eines Photons in den elektronischen Grundzustand zurückkehrt.

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2.3)$$

Durch Multiplikation des Extinktionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$, der ein Maß für die Stärke eines Moleküls ist, bei einer bestimmten Wellenlänge Licht zu absorbieren, und der Quantenausbeute ergibt sich aus deren Produkt die Brillanz B (Gleichung 2.4) [46].

$$B = \epsilon(\lambda)\Phi_f \quad (2.4)$$

Für farbstoffbeladene Polystyrolnanopartikel (PS NP) im Bereich von 10 nm kann annähernd die Gleichung 2.5 unter folgender Voraussetzung verwendet werden [44,45]: Es dürfen keine Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffen auftreten [44,45]. Unter dieser Voraussetzung kann der molare dekadische Extinktionskoeffizient $\epsilon_{NP}(\lambda)$ für Farbstoffe im Partikel verwendet werden, multipliziert mit der Anzahl N der Farbstoffe im Partikel.

$$B = N\epsilon_{NP}(\lambda)\Phi_f \quad (2.5)$$

Für PS NP mit sehr hohen Farbstoffbeladungen können Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen auftreten. Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen

führen zumeist zur Bildung von wenig oder nichtfluoreszenten Dimeren oder Aggregaten [26], die dann als Energiesenken für homo-Förster-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET)-Prozesse (homo-FRET: FRET zwischen chemisch identischen, aber spektroskopisch unterscheidbaren Spezies, also z.B. zwischen Molekülen in verschiedenen Mikroumgebungen) fungieren können [47]. Dies bedeutet auch, dass in diesem Fall kein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der Farbstoffmoleküle pro Partikel, ihrem molaren Extinktionskoeffizienten und ihrer Fluoreszenzquantenausbeute besteht und dass diese beiden spektroskopischen Farbstoffeigenschaften im Falle von Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen konzentrationsabhängig werden können. Damit können die Signale von Partikel-Reportern anhand der spektroskopischen Eigenschaften der Farbstoffe und ihrer Beladungskonzentration pro Partikel im Gegensatz zu den Signalen von freigesetzten oder enzymatisch erzeugten Farbstoffen nur abgeschätzt werden. Um solche Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen und Einflüsse von Partikelgrößen zu erfassen, müssen Absorptionswirkungsquerschnitte (statt $N \cdot \epsilon_{\text{NP}}(\lambda)$, siehe Gleichung 2.5) und Fluoreszenzquantenausbeuten von Farbstoff-beladenen NP als Funktion der Beladungskonzentration und Partikelgröße z.B. mittels Ulbrichtkugelspektroskopie bestimmt werden [44, 48].

Des Weiteren kann Fluoreszenzlöschung durch die Partikelmatrix sowie Partikelstreuung einen Einfluss auf die Quantenausbeute besitzen.

2.1.2.2 Streulichtkorrektur und Bestimmung der NP-Konzentration

Bei der Bestimmung der Absorption von Farbstoffen im NP oder der Absorption von Farbstoffen in einer NP-Suspension kommt es durch die NP zur Streuung des eingestrahnten Lichtes. Daher kann die Absorption der Farbstoffe nicht direkt bestimmt werden. Eine Methode, um den Streulichtbeitrag zu korrigieren, ist die Aufnahme eines Extinktionsspektrums (Streulichtkurve) unbeladener NP (Referenzprobe). Dabei müssen folgende Anforderungen an die Referenzprobe und die Messung gestellt werden: Es müssen jeweils identische NP mit gleichen morphologischen und physikalischen Eigenschaften und gleichem Streuverhalten im gleichen Medium vermessen werden. Die Konzentration der NP-Suspension muss so gewählt werden, dass die Streulichtkurve der Referenzprobe auf der Streulichtkurve der zu untersuchenden Probe liegt. Unter der Annahme, dass das Streuverhalten der Probe nicht durch partikelbedingte Wechselwirkungen mit den Farbstoffen beeinflusst wird, kann das Extinktionsspektrum der Referenzprobe von der Probe abgezogen werden.

Bei Kenntnis der Konzentration der Referenzprobe kann so die Konzentration einer unbekannt Probe ermittelt werden.

2.1.2.3 Signalerzeugung und -verstärkung

EIA. Die Signalerzeugung erfolgt beim EIA durch den Umsatz von farblosen Substraten in Chromophore oder Luminophore (Abbildung 2.2 (b)). Die Signalverstärkung basiert dabei auf dem enzymkatalysierten Schritt, bei dem von einem Enzym pro Zeiteinheit eine definierte Anzahl von Substraten umgesetzt wird [37]. Häufig verwendete Enzyme sind die Meerrettichperoxidase (HRP), die alkalische Phosphatase (AP) oder β -Galactosidase [43]. HRP wandelt in Gegenwart

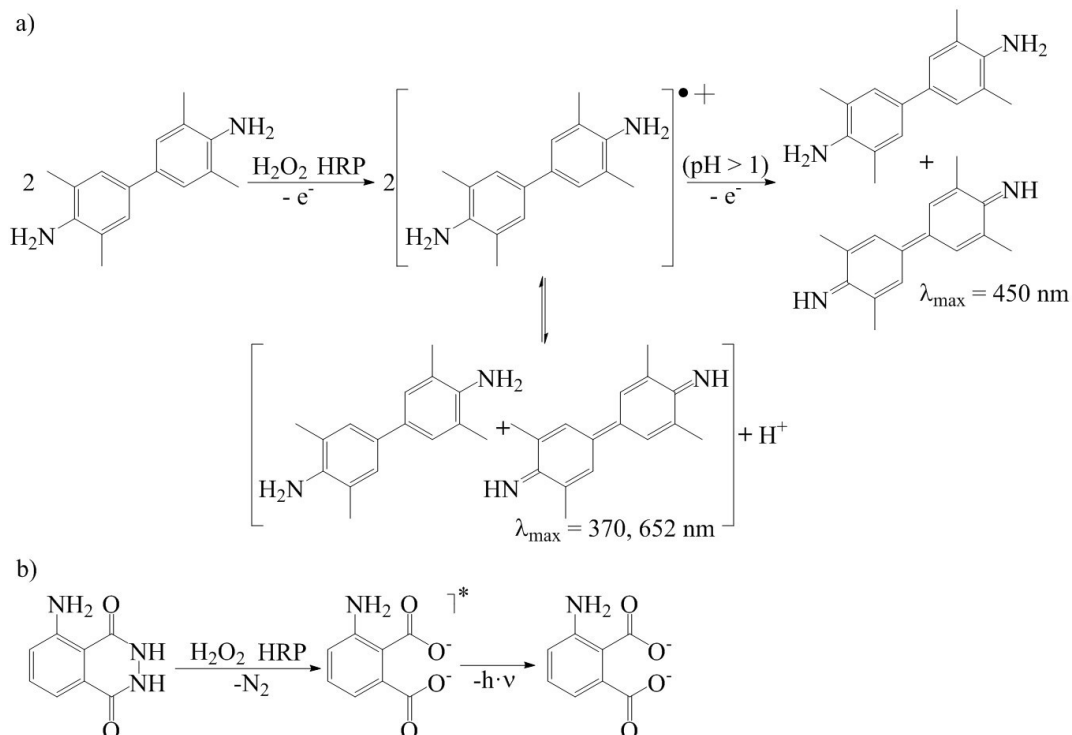


Abbildung 2.5: Oxidation von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin zu 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidindiimin (a) [49, 50] und von Luminol zu 3-Aminophthalat (b) [52–54].

eines Wasserstoffdonors/Reduktionsmittels Wasserstoffperoxid in Wasser um. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) ist ein häufig genutzter Wasserstoffdonor, der nach der katalysierten Reaktion zum blauen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinsemiquinonimin umgewandelt wird ($\epsilon_{650\text{nm}} = 39.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$), das bei einer Wellenlänge von 650 nm in Absorption detektiert werden kann (Abbildung 2.5 (a)) [49, 50]. Durch die Zugabe von Schwefelsäure wird die Reaktion abgestoppt und es findet ein Farbumschlag nach Gelb statt, was die Detektion des stabilen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidindiimins ($\epsilon_{450\text{nm}} = 59.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bei einer Wellenlänge von 450 nm in Absorption ermöglicht [49, 50]. Ein weiteres Reduktionsmittel ist Luminol, das nach der Oxidation unter Emission von Licht bei einer Wellenlänge von 428 nm (Chemilumineszenz) zu 3-Aminophthalat umgewandelt wird (Abbildung 2.5 (b)), was die Detektion eines Lumineszenzsignals ermöglicht. Ein Vorteil der Verwendung von Enzymen ist die Generierung von tausenden Farbstoffmolekülen je Analyt in kurzer Zeit, und durch die Variation der Reaktionszeit ist es möglich, die Signalintensität bei geringer Analytkonzentration zu steuern. Je länger die Reaktionszeit ist, desto mehr Farbstoffmoleküle werden erzeugt und desto größer ist das Signal. Durch die Verlängerung der Reaktionszeit kann somit das Signal erhöht bzw. verstärkt werden. Jedoch ist die Enzymaktivität und damit die Geschwindigkeit und Vergleichbarkeit der Assays stark abhängig von Temperatur, Substratkonzentration, pH-Wert und Ionenstärke [51].

FIA. Das FIA nutzt ein Fluoreszenzsignal durch die Verwendung fluoreszenter Label aus (Abbildung 2.2 (a)). Die Signalerzeugung beruht dabei auf der

Anzahl der gebundenen Fluorophore, deren spektroskopischen Eigenschaften (z.B. Extinktionskoeffizient, Quantenausbeute, Stokes Shift, Fluoreszenzlebensdauer). Zudem bietet der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen den Vorteil der Auswahl einer großen Bibliothek an Fluorophoren mit verschiedenen Eigenschaften, die bei der Immunoassayentwicklung individuell angepasst werden können. Jedoch ist die Anzahl der gebundenen Fluorophore (Markierungsgrad) auf 2 bis 7 je Antikörper beschränkt, da höhere Markierungsgrade zu Einbußen in der Antikörperaktivität und/ oder der Photolumineszenzquantenausbeute [55] führen können.

Nanopartikel als Label (Abbildung 2.2 c)) können an dieser Stelle maßgeblich zur Erhöhung der Fluoreszenzintensität und somit zur Signalverstärkung beitragen [17, 37]. Als Grundlage hierbei dient das Konzept von Mikrokapseln als Transporter für pharmakologische Wirkstoffe [15] in der Medizin, bei dem in Abhängigkeit der Größe der Kapsel viele Wirkstoffe transportiert werden können. Dieses System ist auf NP übertragbar, welche große Mengen an Fluorophoren tragen (z.B. 100 bis 1000, einige sogar 10.000 bis 100.000 Farbstoffmoleküle je NP, abhängig von der Farbstoffkonzentration und der Partikelgröße). Solche NP können u.a. durch Verkapselung des Farbstoffes [23, 24, 56, 57] oder Einlagern des Farbstoffes in eine Polymermatrix [25, 37, 58] hergestellt werden. Die sehr große Anzahl an Fluorophoren pro NP pro Analyt führt zu einer vielfachen Signalverstärkung gegenüber konventionellen FIA mit antikörpergebundenen Fluorophoren.

Durch die hohe Anzahl an eng beieinander liegenden Farbstoffmolekülen kann es jedoch zum Löschen durch Dimerisierung der Farbstoffmoleküle und Energietransfer kommen [26]. Auflösen des NP (Supernovaeffekt [23, 24, 56, 57]) oder Extraktion der Farbstoffe [58] mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel kann dieses Problem jedoch umgehen. Zugleich ist es möglich, durch die Freisetzung des Farbstoffes einen weiteren Signalverstärkungseffekt zu generieren. Je nach Lösungsmittel kann die Quantenausbeute des Farbstoffes variieren. Dabei kann die Quantenausbeute des freien Farbstoffes in Lösung gegenüber dem in NP-gebundenen durchaus größer sein. Durch die Verwendung von Farbstoffen, die weder zu Dimerbildung neigen noch Reabsorptionseffekte zeigen, ein großer Stokes Shift reduziert oder unterbindet Reabsorptionseffekte, ist es allerdings auch möglich, fluoreszente NP herzustellen, die konventionell detektiert werden können. Bei konventionellen Detektionsmethoden werden die Farbstoffe direkt im NP detektiert [28, 59].

2.1.2.4 Labelvergleich & Signalverstärkungsfaktoren

Die Sensitivität eines Immunoassays ist neben der Bindung des Labels (ein entscheidender Parameter ist hier die Bindungskonstante) unter anderem abhängig von der Größe des Messsignals. Dabei ist die Signalintensität unter anderem abhängig von der Anzahl der detektierbaren Reportermoleküle je gebundenem Analyten. Bei einem EIA entspricht dieser dem detektierbaren farbigen bzw. fluoreszenten Produkt nach der enzymatischen Umwandlung. In Abhängigkeit der Temperatur und der Reaktionszeit können dabei sehr hohe Mengen produziert werden, was demnach auch zu einem hohen Signal führt. Die Signalintensität ist zudem abhängig von molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$ des Produktes. Dabei kann die Menge (Konzentration c) an Produkt durch die Messung der Extinktion E über das Lambert-Beer'sche-Gesetz (Gleichung 2.6) bestimmt

werden. d entspricht hierbei der Schichtdicke.

$$E = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (2.6)$$

Beim FIA ist die gemessene Signalintensität auch abhängig von der Anzahl der gemessenen Fluorophore je Analyt und von weiteren spektroskopischen Eigenschaften des Farbstoffes wie z.B. dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$ und der Quantenausbeute Φ_f . Durch das Anbinden von weiteren Fluorophoren an Detektions- oder Sekundärantikörpern bzw. das Koppeln von weiteren Sekundärantikörpern an den Detektionsantikörper können demnach auch höhere Signalintensitäten erreicht werden. Wobei das Ankoppeln von mehr Fluorophoren je Antikörper durch die Wechselwirkung der Farbstoffe untereinander und ggf. das Blockieren der Bindungsstellen bzw. die Kopplung von mehreren Sekundärantikörpern durch die vorhandenen Epitope und den Platzbedarf limitiert ist. Im Falle von NP können höhere Signalintensitäten durch das Einbringen von noch mehr Farbstoffen je NP erreicht werden. Von Signalverstärkung kann demnach gesprochen werden, wenn die Anzahl an detektierbaren Reportermolekülen je Analyt, $\epsilon(\lambda)$ oder Φ_f erhöht wird, woraus sich entsprechende Signalverstärkungsfaktoren ableiten lassen.

2.1.2.5 Anbindung des Detektionslabels

Im Allgemeinen kann das Label über drei verschiedene Methoden an den Detektionsantikörper angebunden werden (Abbildung 2.6): über (a) die direkte Anbindung an den Detektionsantikörper, (b) die indirekte Anbindung eines markierten Sekundärantikörpers (Anti-Antikörper) oder (c) markiertes Streptavidin (SAv) an den biotinylierten Detektionsantikörper (Abschnitt 2.1.2.6) [39].

Das direkte Anbinden (a) besitzt den Vorteil, dass ein Kopplungsschritt weniger im Laufe der Immobilisierung der Biomoleküle durchgeführt werden muss, was den Zeit- und Arbeitsaufwand durch einen weiteren zu kontrollierenden Reaktionsschritt inkl. zusätzlicher unspezifischer Wechselwirkungen reduziert. Nachteilig ist dabei, dass nur wenige Farbstoffmoleküle (FIA) an einen Antikörper gebunden werden können, da ein zu hoher Markierungsgrad zu einer Herabsetzung der Aktivität des Antikörpers oder im Falle von Farbstoffen zu einer Herabsetzung der Quantenausbeute durch Selbstlöschung führen kann [55, 57]. Zudem sind die markierten Primärantikörper nur für ein Assay/Analyt einsetzbar.

Durch die Verwendung von sekundären Antikörpern beim indirekten Immunoassayformat (b) können diese Probleme teilweise umgangen werden. Ein sekundärer Antikörper kann einerseits an mehrere verschiedene primäre Detektionsantikörper binden und andererseits können, sofern es genug Platz und Bindungsstellen gibt, mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden, was zur Erhöhung des Detektionssignals je Analyt beiträgt. Jedoch lassen sich auch Sekundärantikörper nur mit einer kleinen Anzahl an Fluorophoren labeln [55].

Methode (c) besitzt den Vorteil des einfachen Austausches der SAv-markierten Label untereinander. Dadurch muss nicht jeder spezifische Detektionsantikörper an verschiedene Label gebunden werden, sondern kann durch die Biotinanbindung an SAv-tragende Label gekoppelt werden. Dieses modulare Baukastensystem kann somit

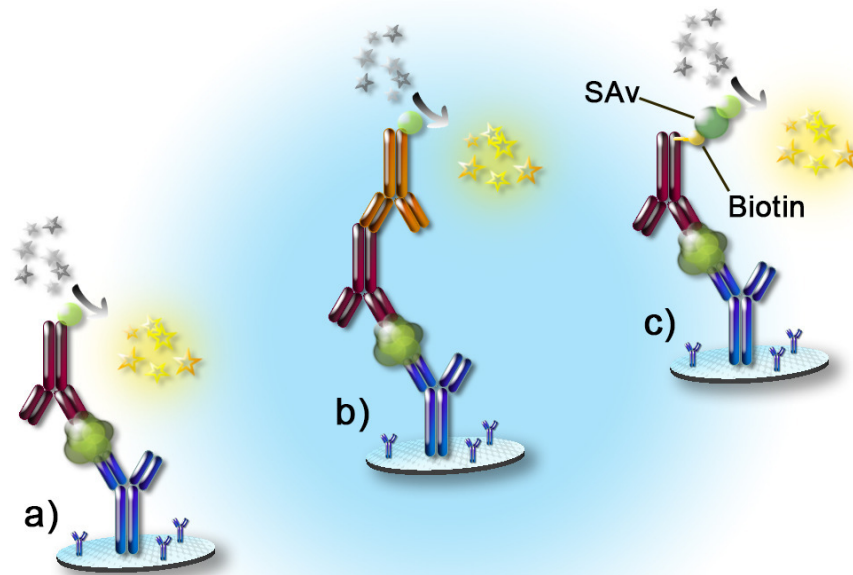


Abbildung 2.6: Schematische Abbildung verschiedener Möglichkeiten der Labelanbindung in Immunoassays mit HRP als Label: über die direkte Kopplung an den Detektionsantikörper (a), über die Anbindung eines Sekundärantikörpers (b) und über die Verknüpfung des biotinylierten Detektionsantikörpers an ein Streptavidin-HRP-Konjugat (c).

hinsichtlich des Labels an die Bedürfnisse des Immunoassays bzw. des Anwenders angepasst werden.

2.1.2.6 Das Biotin-Streptavidin-System

Seit der Entdeckung des Glycoproteins Avidin (Av) sowie des sehr stark verwandten kohlenhydratfreien Proteins SAV und deren starker Wechselwirkung mit Biotin werden beide Proteine zum Koppeln von Labeln und Sonden an Moleküle genutzt [19]. Wie in Abschnitt 2.1.2.5 beschrieben, kann das labelgebundene SAV an den biotinylierten Detektionsantikörper binden. Av ($M = 66$ kDa) [60] und SAV ($M = 66$ kDa) [19] bestehen aus jeweils vier identischen Monomereinheiten (Tetramer), die paarweise angeordnet sind (Abbildung 2.7 a) [61], wobei jede Einheit jeweils ein Molekül Biotin an sich binden kann. SAV ist gegenüber Av leichter kultivierbar und kann dadurch hochrein hergestellt werden. Der isoelektrische Punkt (pI) von SAV ist ins Saure verschoben und liegt bei einem pH-Wert von 5 bis 6, was zu geringerer unspezifischer Adsorption in z.B. Immunoassays führt (pI_{Avidin} liegt bei $pH = 10$) [19, 62]. Jedes Streptavidinmonomer (Abbildung 7.1) besitzt 159 Aminosäuren und ist somit um 30 Aminosäuren länger als Avidin. Beim sogenannten Core-SAV ist der N- und C-Terminus jeweils auf 125 - 127 Aminosäuren verkürzt ($M = 52,8$ kDa), wodurch die Löslichkeit in wässrigen Lösungsmitteln und die Stärke der Biotin-SAV-Bindung erhöht wurde. Die Assoziationskonstante für die Bindung von core-SAV und Biotin beträgt $K_a = 2,5 \cdot 10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, wodurch sie zu einer

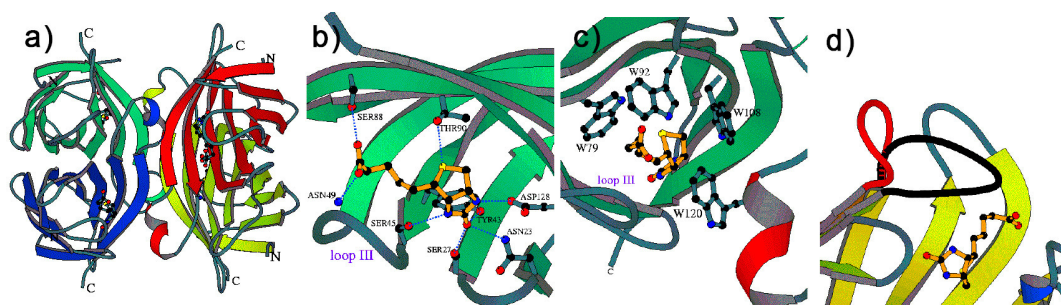


Abbildung 2.7: Wechselwirkung von Biotin und Streptavidin. Tetrameres Streptavidin (a), Wechselwirkung von Biotin und Streptavidin über Wasserstoffbrückenbindungen (b), über VDW-Wechselwirkungen (c) und durch Falten einer Proteinbindungsschleife (d) [64].

der stärksten, nicht-kovalenten Bindungen zählt [19]. Daher wurde in den folgenden Forschungsarbeiten ausschließlich Core-SAv eingesetzt. Core-SAv entspricht zu 33 % dem Aufbau von Av [19] und besitzt eine molekulare Größe von 45·45·50 Å [63].

Die Stärke der Bindung beruht vorwiegend auf drei verschiedenen Mechanismen und Wechselwirkungen [65–72]. Einerseits tragen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen verschiedenen Resten der Aminosäureuntereinheiten des SAv und den Heteroatomen des Biotins dazu bei (Abbildung 2.7 b) und andererseits haben hydrophobe Van-der-Waals-Wechselwirkungen (VDW-Wechselwirkungen) zwischen Biotin und Tryptophan (Trp) einen entscheidenden Anteil daran. Dabei wechselwirkt ein Molekül Biotin pro SAv-Monomer mit dem sich intramolekular befindlichen Trp79, Trp92, Trp108 und intermolekular mit Trp120 eines benachbarten Monomers (Abbildung 2.7 c). Das erklärt unter anderem die stärkere Bindung Biotins an tetrameres SAv (Multivalenz) gegenüber monomerem SAv ($K_a \approx 1 \cdot 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) [73]. Weiterhin faltet sich eine ungeordnete Proteinbindungsschleife (offene Konformation, rot) nach der Anbindung von Biotin so (geschlossene Konformation, schwarz), dass es das Biotinmolekül einschließt und den Biotin-SAv-Komplex stabilisiert (Abbildung 2.7 d). Hierbei spielen ebenfalls VDW-Wechselwirkungen zwischen Biotin und Trp120 und ionischen Wechselwirkungen zwischen von Glu51 und Arg84 von jeweils benachbarten SAv-Monomeren [70, 74, 75] eine Rolle.

2.1.3 Assayformate

Zum Austesten von NP-Labels ist es sinnvoll, einen Immunoassay als Modellassay zu verwenden. Hier eignet sich vor allem ein (modifiziertes) indirektes Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) im Sandwichformat. Hierfür wurde ein Assay für den quantitativen Nachweis von c-reaktivem Protein (CRP) verwendet.

2.1.3.1 ELISA

Der EIA und der ELISA wurden in den 1960er Jahren zeitgleich erfunden und sind fast miteinander identisch [76]. Der EIA umfasst, wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben, die heterogenen und homogenen Immunoassayformate, während, wie sich aus dem

Namen Enzym-linked Immunosorbent Assay ableiten lässt, beim ELISA die Antikörper adsorbiert werden (heterogener Assay).

2.1.3.2 C-reaktives Protein

Für die Entwicklung und Testung von neuartigen Labeln und Detektionstechniken werden oftmals standardisierte und gut charakterisierte Modellassays verwendet. Der Nachweis von C-reaktivem Protein (CRP) ist ein etablierter Immunoassay, welcher als Modellassay verwendet werden kann [32, 77–80]. CRP ist ein homopentameres Plasmaprotein aus der Familie der Pentraxine [81], welches 1930 zum ersten Mal von Tillet et al. beschrieben wurde [81, 82]. Es wird in der Leber produziert, kommt beim Menschen in wenigen mg/L im Blut vor und wird vom Körper bei Entzündungen wie einer Organerkrankung bis zu 10.000fach vermehrt ausgeschüttet [81]. CRP gilt somit als unspezifischer Entzündungsmarker [32]. Durch die Quantifizierung von CRP lassen sich Rückschlüsse auf den Schweregrad einer entzündlichen Krankheit ziehen. Aber auch bei sonst vermeintlich gesunden Menschen dient CRP z.B. als Marker zur Erkennung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen [81, 83, 84], dem Metabolischen Syndrom [83], Autoimmunkrankheiten [79], Arteriosklerose [85], koronare Herzkrankheit [85] oder bösartigen Tumoren [79] und dient der Überwachung von chronischen Entzündungen [79]. Die Konzentration von CRP im Blut bei gesunden Menschen liegt im Durchschnitt bei 0,8 mg/L [80, 81]. Auch Werte um einen Faktor 10 kleiner wurden gemessen. Bei solchen geringen Konzentrationen ist es wichtig, genaue, zuverlässige und reproduzierbare Werte mit Hilfe eines Immunoassays bestimmen zu können und die Nachweisgrenzen so klein wie möglich zu gestalten [78, 85].

2.1.3.3 Kurvenanpassung und Qualitätskriterien

Zur qualitativen Auswertung und zum Vergleich von Immunoassays können vier Parameter verwendet werden [31], welche aus dem 5-PL-Fit (Gleichung 2.7) der Dosis-Wirkungs-Kurven (aufgetragene relative Fluoreszenzintensitäten bzw. Absorption gegen die verwendeten Antigenkonzentrationen) erhalten werden können (siehe Abbildung 2.8).

$$y = A_{\min} + \frac{A_{\max} - A_{\min}}{\left[1 + \left(\frac{x_0}{x}\right)^h\right]^s} \quad (2.7)$$

Sensitivität. Der EC_{50} -Wert (mittlere effektive Konzentration) kann für den Vergleich der Assaysensitivitäten verwendet werden. Er entspricht dem Umkehrpunkt der Kurve.

LOD. Die untere Nachweisgrenze (LOD) wird ermittelt über den Mittelwert der Signalintensitäten der Blindwertmessungen y_B und deren Standardabweichung σ (Gleichung 2.8). Die zum Signal y_{LOD} gehörige Konzentration $c(y_{LOD})$ entspricht dem LOD.

$$y_{LOD} = y_B + 3 \cdot \sigma \quad (2.8)$$

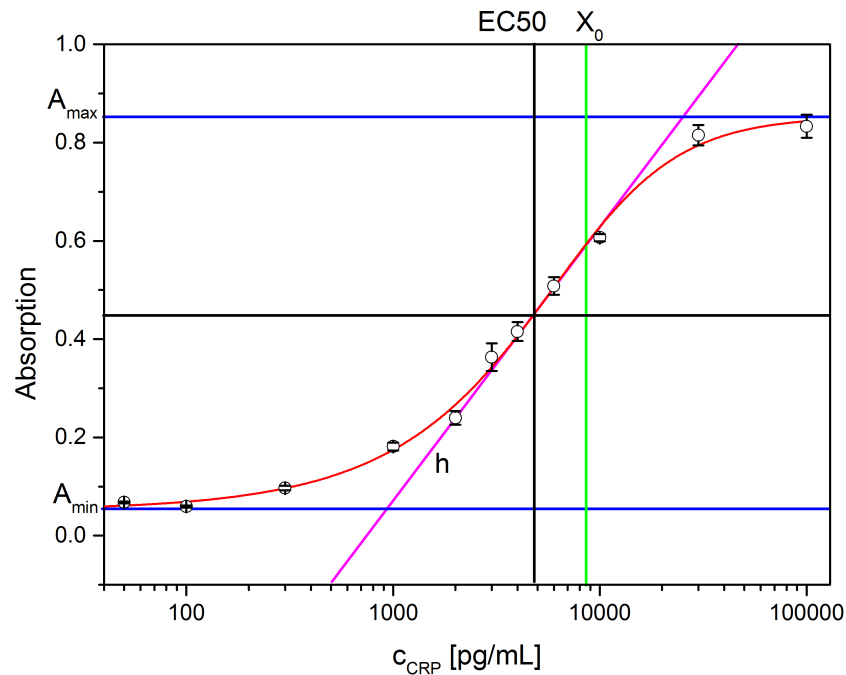


Abbildung 2.8: Dosis-Wirkungs-Kurven mit 5-PL-Fit und Parametern der Kurvenanpassung.

Dynamischer und relativer dynamischer Bereich. Der dynamische Bereich (DR) wird aus der Differenz der Signalintensitäten an der maximalen (A_{\max}) und minimalen Antigenkonzentration (A_{\min}) berechnet (siehe Gleichung 2.9). Zum Vergleich von Absorptions- und Fluoreszenzmessungen kann die Berechnung des relativen dynamischen Bereichs (RDR) verwendet werden. Dabei wird DR durch A_{\max} geteilt (Gleichung 2.10).

$$DR = A_{\max} - A_{\min} \quad (2.9)$$

$$RDR = \frac{A_{\max} - A_{\min}}{A_{\max}} \quad (2.10)$$

Güte des Fits. Die Güte des Fits beschreibt die Korrelation der gemessenen Daten mit der Fitfunktion. Zur Auswertung kann das Bestimmtheitsmaß (R^2) verwendet werden. Es kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei 0 einer Übereinstimmung von 0 % und 1 einer Übereinstimmung von 100 % entspricht.

2.2 Nanopartikel

Nanomaterialien bieten aufgrund ihrer verschiedenen Größen, Formen und Eigenschaften vielfältige Einsatzmöglichkeiten in den Bereichen der Natur-, Lebenswissenschaften und Medizin [11, 12, 17, 40, 86–91].

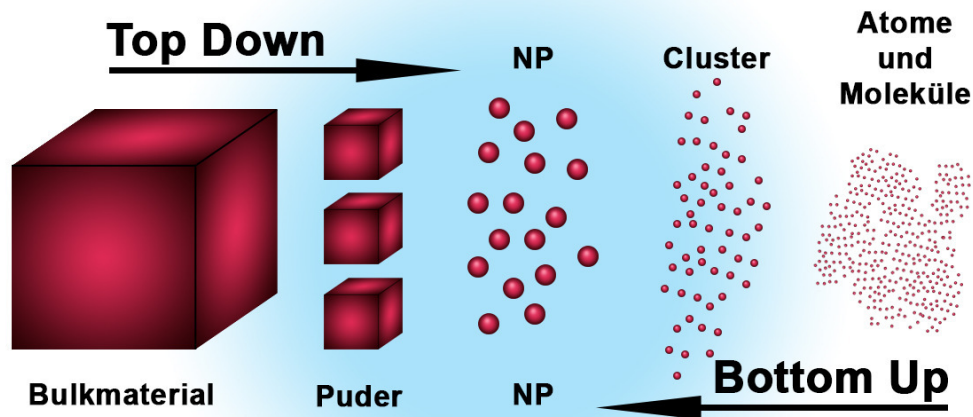


Abbildung 2.9: Herstellung von NP nach dem „Top-down“- und „bottom-up“-Verfahren.

2.2.1 Herstellung und Eigenschaften von Nanopartikeln

2.2.1.1 Herstellung

Die Herstellung von Nanomaterialien kann in zwei Prozesse unterteilt werden (Abbildungen 2.9) [11]: den Aufbau („Bottom-up“) von atomarer Ebene bis hin zu nanoskaligen Kompositen und den Abbau („Top-down“) von makroskopischen Systemen zu nanoskaligen Kompositen [23, 24, 56, 92–96]. Je nach Methode ist es das Ziel, möglichst reproduzierbar definierte Nanomaterialien mit definierter Größe, d.h. enger bzw. monodisperser Größenverteilung (siehe Abschnitt 2.2.3), und Struktur zu erhalten.

2.2.1.2 Stabilität von Nanopartikeln

Die Stabilität einer NP-Suspension hängt von den abstoßenden (repulsiv) und anziehenden (attraktiv) Kräften zwischen benachbarten NP ab. Je nachdem welche Kräfte überwiegen, ist eine Suspension entweder stabil oder die NP neigen zur Aggregation bzw. Koagulation. So ist es oft erforderlich, die Nanomaterialien nach oder während des Herstellungsprozesses zu stabilisieren. Attraktive Wechselwirkungen beruhen primär auf Van-der-Waals-Kräften (VDW-Kräfte) und repulsive Wechselwirkungen auf elektrostatischer Abstoßung (Coulomb-Wechselwirkungen) z.B. durch die Bildung einer elektrochemischen Doppelschicht. Beide Kräfte sind abhängig vom Abstand r_x der wechselwirkenden Teilchen. Werden die Potentiale beider Kräfte summiert, ergibt sich je nach Abstand der Teilchen zueinander, welche Art von Wechselwirkung dominiert.

Die Stabilisierung einer Suspension kann hauptsächlich auf zwei verschiedenen

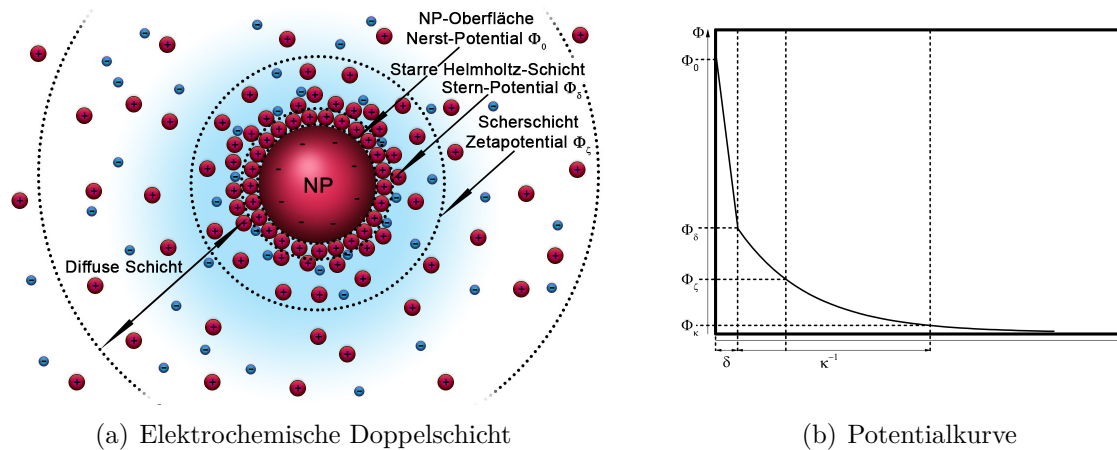


Abbildung 2.10: Aufbau der elektrochemischen Doppelschicht (a) und Potentialverlauf der elektrochemischen Doppelschicht (b) nach dem Modell von Otto Stern.

Wegen erreicht werden: durch Erhöhung der elektrostatischen Abstoßung oder durch sterische Hinderung (Erhöhung des Abstandes über die Reichweite der VDW-Kräfte hinaus) [97]. Um eine Dominanz der Abstoßungskräfte zu realisieren, muss die Dicke der elektrochemischen Doppelschicht groß genug sein.

Elektrostatische Stabilisierung. Im Fall der elektrostatischen Abstoßung wird der Partikel positiv oder negativ durch das Einbringen, Anbinden oder Adsorbieren geladener Teilchen, Ionen oder funktioneller Gruppen geladen. Durch die entgegengesetzt geladenen Ionen an der NP-Oberfläche kommt es infolgedessen zur Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht (Abbildung 2.10 (a)). Die Dicke der Doppelschicht kann in nächster Näherung als κ^{-1} definiert werden, was dem Debye-Hückel-Parameter entspricht (Gleichung 2.11), und hängt unter anderem von der Ionenstärke I_S (Gleichung 2.12) ab, wobei N_A die Avogadro-Konstante, e_0 die Elementarladung, ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante im Vakuum, ϵ_r die stoffspezifische relative Dielektrizitätskonstante, k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, z_i die Anzahl der Ladungsträger und c_i die Volumenkonzentration der Elektrolyse sind.

$$\kappa = \left(\frac{2 \cdot N_A \cdot e_0^2 \cdot I_S}{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot k_B \cdot T} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.11)$$

$$I_S = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 \cdot c_i \quad (2.12)$$

Die meistverwendete Modellvorstellung zur Erklärung und Berechnung der elektrochemischen Doppelschicht beruht auf dem Molekularkondensator von Stern, der die Modellvorstellungen von Helmholtz, der von einer starren Doppelschicht ausging, und Gouy-Chapman, die beide eine diffuse Doppelschicht zu Grunde legten, kombinierte (Abbildung 2.10 (a)). Das Potential an der NP-Oberfläche wird Nernstpotential Φ_0

genannt (Abbildung 2.10 (b)). Die an die Oberfläche angrenzenden, entgegengesetzt geladenen Ionen bilden den starren Teil der Doppelschicht (starre Helmholtz-Schicht), wobei das Potential nach dem Helmholtz-Modell über den Bereich δ linear abnimmt. Das dazugehörige Potential wird Stern-Potential Φ_δ genannt (Abbildung 2.10 (b)). An die Helmholtz-Schicht schließt sich der diffuse Teil der Doppelschicht mit der Ausdehnung κ^{-1} an, die die wechselwirkenden Ionen als bewegte Raumladungswolke in Richtung der Elektrolytvolumenphase betrachtet und bei der das Potential (Abbildung 2.10 (b)) exponentiell gegen 0 abnimmt (Gleichung 2.13). Das Potential am Rand der diffusen Schicht ist gleich Φ_κ .

$$\Phi = \Phi_\delta \cdot e^{-\kappa r_x} \quad (2.13)$$

Im Fall von hohen Elektrolytkonzentrationen wird die Doppelschicht ($\kappa^{-1} \propto I_S$) stark komprimiert, wodurch der diffuse Teil in den starren Teil übergeht und es zur Destabilisierung des kolloidalen Systems bis hin zur Koagulation kommt. Für verdünnte Suspensionen ist die Doppelschicht um das kolloidale Teilchen sehr ausgedehnt [98], wobei die Dicke der Doppelschicht einen wichtigen Einflussfaktor hinsichtlich der Stabilität einer NP-Suspension darstellt.

Eine Aussage über die Stabilität eines kolloidalen Systems trifft das Zetapotential Φ_ζ . Oberhalb des kritischen Zetapotentials tritt keine Koagulation auf. Das Zetapotential (Abbildung 2.10 (b)) entspricht dem Potential an der Abscherschicht eines bewegten Partikels innerhalb der diffusen Doppelschicht (Abbildung 2.10 (a)). Je größer der Betrag von Φ_ζ ist, desto höher sind die repulsiven Wechselwirkungen und um so stabiler ist der Partikel. Das Zetapotential kann bei Kenntnis der elektrophoretischen Mobilität U_e experimentell bestimmt werden (Gleichung 2.14), wobei $\epsilon_0 \cdot \epsilon_r$ die Dielektrizitätskonstante der Probe, ν die Viskosität der Flüssigkeit und $f(ka)$ die Henryfunktion ist, die für ein wässriges Medium in der Regel 1,5 beträgt [99].

$$\Phi_\zeta = \frac{3U_e\nu}{2\epsilon_0 \cdot \epsilon_r f(ka)} \quad (2.14)$$

U_e kann durch das Anlegen eines elektrischen Feldes E_F an die Probe und Messung der Wanderungsgeschwindigkeit v der NP mit der Ladung q_{NP} bestimmt werden. Unter Einbeziehung des Stokeschen Gesetzes ist v in idealisierter Form (gilt nur für unendlich verdünnte, ladungsträgerfreie Lösungen) abhängig vom Partikelradius r_{NP} (Gleichung 2.15).

$$U_e = \frac{v}{E_F} = \frac{q_{NP}}{6\pi\nu r_{NP}} \quad (2.15)$$

Sterische und elektrosterische Stabilisierung. Eine sterische Stabilisierung der NP wird meist durch die kovalente Anbindung oder Adsorption von Polymeren mit einer sehr großen Masse von $M \leq 10.000$ g/mol an die NP-Oberfläche erreicht. Bei Annäherung der beiden NP kommt es entropisch bedingt zu einer repulsiven Wechselwirkung [100].

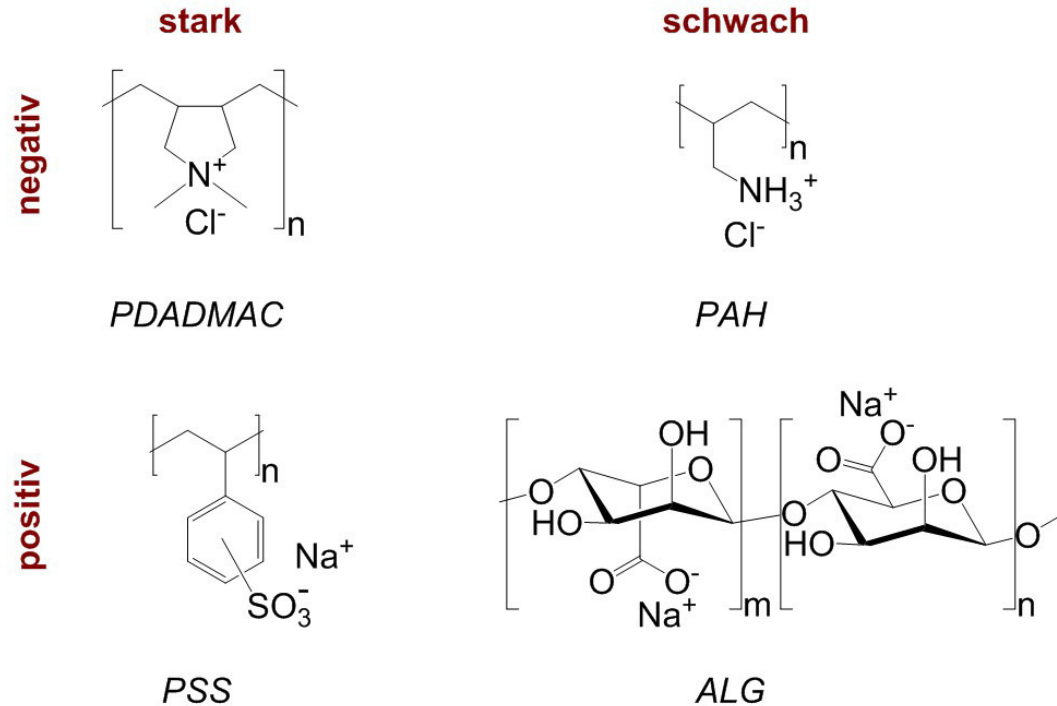


Abbildung 2.11: Strukturformeln der in Publikationen oft beschriebenen schwachen, starken, negativen und positiven Polyelektrolyten.

Werden die Strategien der elektrostatischen und der sterischen Stabilisierung miteinander vereint, wird allgemein von elektrosterischer Stabilisierung gesprochen. Dabei werden an der Oberfläche des Partikels sogenannte Polyelektrolyte (PE), Polymere mit vielen geladenen Gruppen, kovalent angebunden oder adsorbiert.

2.2.1.3 Das Layer-by-Layer Verfahren

Um eine ausreichende Stabilisierung durch Adsorption zu erreichen, werden PE meist in mehreren Lagen mittels Layer-by-Layer (LbL) Technik aufgetragen [101]. Beim Layer-by-Layer Verfahren werden nacheinander mehrere alternierende Schichten entgegengesetzt geladener PE aufgetragen, wobei die Adsorption durch einzelne Reinigungsschritte separiert werden muss, da es ohne diese zur Koagulation der PE und der Partikel führt. Mit dem Auftragen jeder Schicht kommt es zu einer Ladungsinversion der Oberfläche. Zum Einsatz kommen hierbei verschiedene Typen von PE mit unterschiedlichen Molmassen, welche in starke und schwache (pH-Wert-abhängig) unterteilt werden können (Abbildung 2.11). Prinzipiell kann jede Art Polyelektrolyt unabhängig von Substrat, Substratgröße und -form verwendet werden [101–103]. Einige der häufig verwendeten PE sind Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC), Polystyrolsulfonat (PSS), Polyallylaminhydrochlorid (PAH) und Natrium-Alginat (ALG) (Abbildung 2.11).

2.2.1.4 Auswahl der Farbstoffe

Die Auswahl der fluoreszenten Farbstoffe hängt von verschiedenen Faktoren ab, die unter anderem durch die Partikelpräparation und durch die Detektionsmethode bestimmt werden: Die Farbstoffe sollen in wasserunlösliche Partikel eingequollen werden (siehe Abschnitt 2.2.2), da die Durchführung der Immunoassays im wässrigen Milieu stattfindet. Gleichzeitig sollen sie aufgrund der Signalverstärkungsstrategie (Supernovaeffekt, siehe Abschnitt 2.1.2.3) in organischen Lösungsmitteln löslich sein. Daher beschränkt sich die Auswahl auf hydrophobe/lipophile Farbstoffe, wobei der log D-Wert eine Aussage darüber trifft, wie hydrophob ein Farbstoff ist [104] (siehe Anhang). Um eine möglichst hohe Signalverstärkung in Fluoreszenz zu erreichen, muss der Fluoreszenzfarbstoff einen hohen Extinktionskoeffizienten bei λ_{ex} und eine hohe Quantenausbeute besitzen (siehe Abschnitt 2.1.2.3 und 2.1.2.4).

Anwendungsrelevante Eigenschaften beinhalten thermisch, photo- und langzeitstabile Farbstoffe, die mit konventionellen MTP-Readern auslesbar sind, wobei sich die Detektion an der enzymkatalysierten Umsetzung von TMB oder Luminol orientiert. Andere physikochemische Eigenschaften resultieren aus technischen und assayspezifischen Anforderungen. Um eine Reduktion von Selbst-Löscheffekten, von proteinmediierter Autofluoreszenz und gerätespezifischen Reflektionen (z.B. durch die MTP) zu erreichen, können Farbstoffe mit einem großen Stokes Shift eingesetzt werden, wie z.B. Farbstoffe, die im nahen Infrarot (NIR-Farbstoffe) emittieren .

2.2.1.5 Auswahl der Nanopartikel

Die Auswahl und Herstellung der Partikel werden durch die Farbstoffe, die Ankopplung von Proteinen an die NP-Oberfläche und durch die Durchführung des Immunoassays bestimmt. Da die Ankopplung und der Assay im wässrigen Milieu stattfinden, müssen die NP in diesem unlöslich, suspendier- und stabilisierbar sein und an ihrer Oberfläche funktionelle Gruppen [18] für die Proteinkopplung tragen. In einem organischen Lösungsmittel muss der NP auflösbar oder extrahierbar sein, um den Farbstoff freizusetzen. Das organische Lösungsmittel muss ebenfalls so gewählt werden, dass die Kunststoff-MTP nicht beschädigt wird.

2.2.2 Herstellung fluoreszenter Nanopartikel

Farbstoffnanopartikel können nach verschiedenen Synthesestrategien hergestellt werden. Für den Einsatz in Immunoassays bieten sich z.B. zwei verschiedene Partikellabel besonders an, Farbstoffnanopartikel (Farbstoff-NP) nach Brümmel et al. (Abschnitt 2.2.2.1) und farbstoffbeladene PS NP nach Behnke et al. (Abschnitt 2.2.2.2), die nach der Herstellung mit Proteinen funktionalisiert werden können.

2.2.2.1 Farbstoffnanopartikel durch Nassmahlung

Gemäß der Arbeiten von Brümmel et al. [23, 24, 56, 57] ist es möglich, im „Top-down“-Verfahren Farbstoff-NP durch Nassmahlung der reinen Farbstoffe herzustellen (Abbildung 2.12). Dabei werden die Partikel während und nach der Synthese durch die Zugabe von anionischen Tensiden stabilisiert. Durch die negative Ladung der

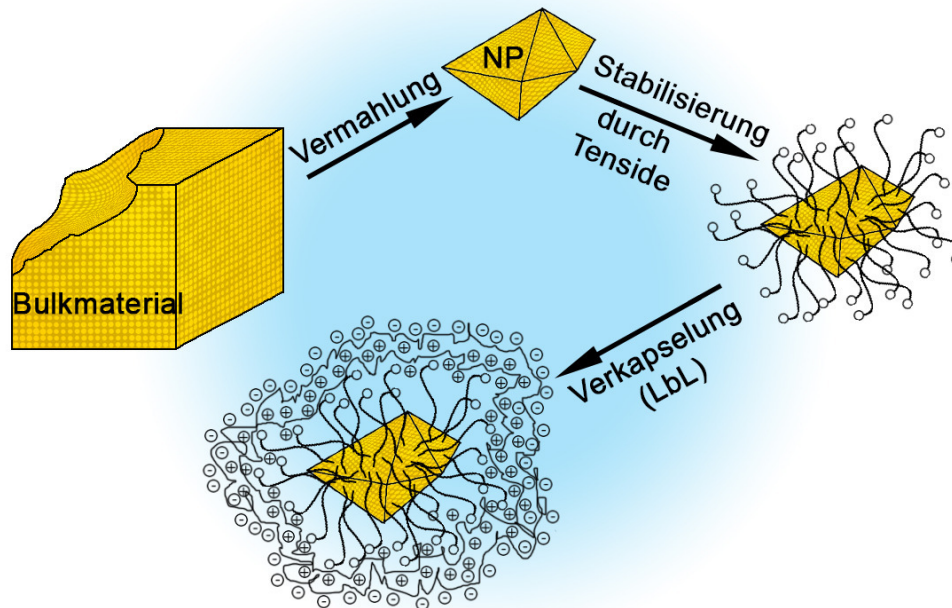


Abbildung 2.12: Schematische Abbildung der Herstellung von Farbstoff-NP durch Vermahlung nach Brümmel et al.

NP können weitere stabilisierende PE-Schichten mittels LbL-Technik (Abschnitt 2.2.1.3) aufgetragen werden. Gleichzeitig dienen die anionischen Gruppen der letzten PE-Schicht der Biofunktionalisierung der Partikel. Der Vorteil dieser Synthesestrategie liegt in der hohen Farbstoffdichte. Durch Zugabe von Ethanol (EtOH) können die Partikel aufgelöst, die Farbstoffe freigesetzt und damit die Signalintensität gesteigert werden.

2.2.2.2 Farbstoffbeladung von Polystyrolnanopartikeln durch Quellen der Polymermatrix

Farbstoff-NP auf der Basis von Polymerpartikeln, wie z.B. Polystyrolnanopartikeln (PS NP), können nach der Quellmethode (Abbildung 2.13) von Behnke et al. hergestellt werden [25]. Dabei wird der hydrophobe Farbstoff in einem organischen Lösungsmittel gelöst und in die wässrige NP-Suspension gegeben. Der NP wird durch das Lösungsmittel aufgequollen und der hydrophobe Farbstoff kann in den hydrophoben NP eindringen. Durch das Abtrennen des Lösungsmittelgemisches und Redispersieren der NP in Wasser schrumpft der NP und der Farbstoff wird fest in der Polymermatrix eingelagert. Durch die Zugabe von Tetrahydrofuran (THF) lassen sich die Partikel auflösen und der Farbstoff freisetzen bzw. lässt sich der Farbstoff durch die Zugabe von EtOH extrahieren [58]. Diese Methode ist besonders geeignet, da immer die gleichen NP verwendet und je nach Anwendung definierte Mengen an unterschiedlichen Farbstoffen eingelagert werden können.

Viele dieser definierten Polymer-NP sind mittlerweile preisgünstig mit derivatisierbaren Carboxy- und Aminogruppen an der Oberfläche zu erhalten, welche während der Synthese (Emulsionspolymerisation) durch eine Copolymerisation eingebracht werden, wobei im

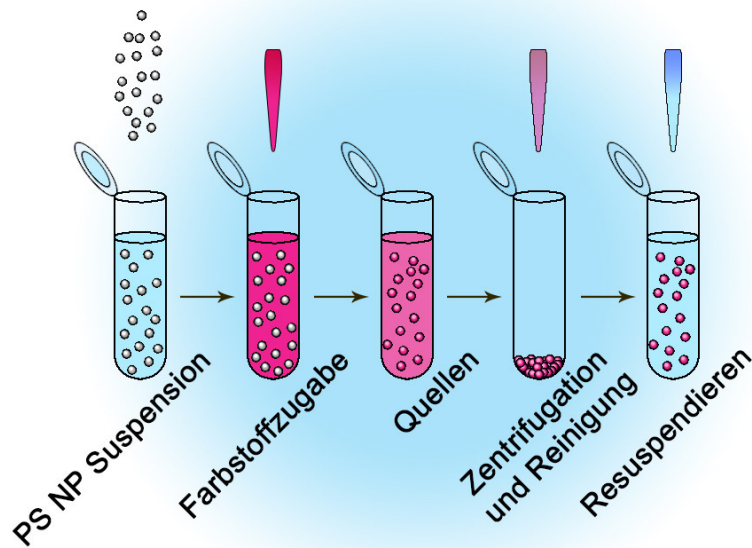


Abbildung 2.13: Schematische Abbildung der Quellprozedur zum Färben von PS NP nach Behnke et al.

Wesentlichen nur die sich an der Oberfläche befindlichen Gruppen für weitere chemische Modifikationen zur Verfügung stehen. Dabei spielt die Größe der zu verwendenden NP für die angedachte Anwendung als Partikellabel eine entscheidende Rolle. Je größer der NP ist, um so mehr Farbstoff kann dieser aufnehmen, wobei es bei NP größer als 1000 nm zu ungleichmäßigen Farbstoffbeladungen innerhalb der Matrix kommen kann. Je kleiner der NP ist, um so geringer ist die Neigung zu sedimentieren, was neben dem Volumen ebenfalls von seiner Masse und damit von seiner Dichte abhängig ist. Weiterhin kann es bei der Bindung der nachfolgend biofunktionalisierten NP an die biotinylierten Antikörper des Immunkomplexes zu sterischen Hinderungen durch die Größe des Partikellabels kommen.

2.2.3 Charakterisierung fluoreszenter Nanopartikel

Für die Charakterisierung von NP steht eine Vielfalt von Methoden zur Verfügung, mit denen verschiedenste physikalische, chemische und optische Eigenschaften untersucht werden können [10, 12, 105, 106].

2.2.3.1 Mikroskopische Techniken

Zur Bestimmung von Größe und Gestalt von Nanomaterialien eignen sich besonders mikroskopische Methoden [105, 106]. Normale Durchlicht- bzw. Auflichtmikroskope können jedoch aufgrund von Beugungsgrenzen keine Strukturen auf der Nanometerskala auflösen. Mittels Elektronenstrahlung lassen sich Proben im Vakuum untersuchen [106]. Dabei werden unter anderem das Transmissions- (TEM, engl. transmission electron

microscope) und Rasterelektronenmikroskop (SEM, engl. scanning electron microscope) verwendet.

2.2.3.2 Dynamische Lichtstreuung

Mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) [105], auch Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) genannt, lassen sich Partikelgrößen im Bereich von 1 bis 10.000 nm messen [107]. Durch die Brownsche Molekularbewegung der NP entstehen Intensitätsfluktuationen des eingestrahlten, sich an der Probe streuenden Lichtes. Wird die Intensität I zeitabhängig mit sich selbst korreliert (Autokorrelation), führt dies zu einer Intensitäts-Zeit- bzw. Feld-Zeit-Autokorrelationsfunktion g_1 , welche anschließend als Exponentialfunktion dargestellt wird. Mittels Kumulantenanalyse folgt aus dem Koeffizienten b der Reihenentwicklung von g_1 (Gleichung 2.16, gilt nur für geringe Polydispersitäten) der Diffusionskoeffizient D der NP [106–109]. Dieser steht durch die Stokes-Einstein-Beziehung (Gleichung 2.17) direkt in Relation mit dem hydrodynamischen Radius r_h , welcher als Z-Average-Wert angegeben wird. Analog dem Modell der elektrochemischen Doppelschicht in Abbildung 2.10 (a) umgeben den NP Teilchen wie z.B. Ionen und Solvatmoleküle, die aufgrund von attraktiven Wechselwirkungen an dem Partikel haften, somit das Volumen des NP vergrößern und mit durch das Lösungsmittel mit der Viskosität η geführt werden müssen. Der gemessene Radius entspricht dem hydrodynamischen Radius r_h , wobei r_h größer als der gemessene Radius r mittels TEM oder REM ist.

$$\ln(g_1) = a + bt + ct^2 + dt^3 + et^4 + \dots \quad (2.16)$$

a, b, c, d, e : Koeffizienten t : Zeit

$$D = \frac{b}{q^2} = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_h} \quad (2.17)$$

q : Streufaktor

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_L} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.18)$$

n_0 : Brechungsindex der Probe θ : Streuwinkel λ_L : Laserwellenlänge

Der Polydispersitätsindex (PDI) gibt an, ob eine Probe monodispers oder polydispers ist, und wird aus den Koeffizienten b und c der Kumulantenanalyse gewonnen (Gleichung 2.19) [107, 110].

$$PDI = \frac{2c}{b^2} \quad (2.19)$$

- $0 < PDI < 0,05$ monodispers
- $0,1 < PDI < 0,2$ enge Verteilung
- $0,2 < PDI < 0,5$ breite Verteilung
- $0,5 < PDI < 0,7$ sehr breite Verteilung
- $0,7 < PDI < 1$ Ergebnisse nicht auswertbar

Innerhalb einer synthetisierten Partikelprobe liegt jedoch meist ein Ensemble an verschieden großen NP statt einheitlicher Partikel vor. Statt der Kumulantenanalyse kann hier die Verteilungsanalyse angewandt werden, mit der nicht exakt ein Wert bzw. eine Größe erhalten wird, sondern durch Anpassen von g_1 mit mehrfachen Exponentialfunktionen eine Größenverteilung. Dafür wird ein Satz an definierten NP-Größen vorgegeben und nach der Methode der kleinsten Quadrate (NNLS, engl. non-negative least square) die Exponentialfunktion (Gleichung 2.16) je NP-Größe angepasst [109, 111]. Einige NP-Größen ergeben hierfür bessere Ergebnisse, was anhand der Größenverteilung sichtbar wird.

Partikel, die innerhalb des Ensembles einen größeren Durchmesser \varnothing besitzen, werden nach der Rayleigh-Approximation ($I \approx \varnothing^6$) stärker gestreut und deshalb bei der Größenverteilung stärker gewichtet (intensitätsgewichtete Größenverteilung). Eine volumengewichtete oder (partikel)anzahlgewichtete Verteilung kann aus der intensitätsgewichteten Größenverteilung berechnet werden. Hierbei werden die NP-Größen bzw. ihre Intensitätsfluktuationen stärker berücksichtigt [107].

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes kann über die Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit der NP auch das Zetapotential (Abschnitt 2.2.1.2) bestimmt werden, das Aufschluss darüber gibt, wie stabil eine NP-Suspension ist.

2.3 Nanopartikel in bioanalytischen Lebenswissenschaften

In den letzten Jahrzehnten wurde mit steigendem Interesse an dem Einsatz von Nanopartikeln als Label in Immunoassays geforscht [17, 40, 89, 90, 105]. Durch das Verkapseln vieler Farbstoffe ist es möglich, sehr hohe Signale je Analyt zu generieren (Abschnitt 2.1.2.3). Weiterhin können viele Proteine an den meist deutlich größeren Partikel angebunden werden, wodurch die Wahrscheinlichkeit, dass ein Partikel an einen Antikörper bindet, ansteigt. Nichtsdestotrotz ist die Signalverstärkung durch farbstoffbeladene NP, durch die Vielzahl an Antikörper-Antigen-Paaren, an NP mit unterschiedlichen Eigenschaften (Größe, Material, Funktionalisierung und spektroskopische Eigenschaften) und an Assayformaten schwierig zu quantifizieren. Der Einfluss von Partikelparametern ist ebenfalls schwer hervorzusagen. Hierzu finden sich kaum Studien.

2.3.1 Biokonjugation von Nanopartikeln

Die Anbindung von Antikörpern an NP kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Da bei dem Aufbau eines modularen Systems die Label substituierbar sein sollen, eignet sich

die Bindung der Antikörper an das Label über das SA_v-Biotin-System (siehe Abschnitt 2.1.2.5). Die Anbindung von SA_v an NP kann auf verschiedene Arten realisiert werden, je nachdem welche chemischen (funktionalisierbaren) Gruppen auf der Oberfläche der Nanopartikel vorhanden sind, wie z.B. Thiolgruppen (-SH), Carboxylgruppen (-COOH), Aminogruppen (-NH₂) oder Hydroxylgruppen (-OH), und welche freizugänglichen chemischen Gruppen das Protein trägt [18,86]. Sollte der NP bzw. das verwendete Protein nicht die nötigen koppelbaren Gruppen tragen, müssen diese zuvor chemisch induziert werden.

2.3.1.1 Kopplung von Proteinen an Nanopartikel mittels EDC/NHS-Ester-Chemie

Die wohl am weitesten verbreitete Methode zur Kopplung von Proteinen ist die Kopplung des NP über an der Oberfläche sitzende Carboxylgruppen an Aminogruppen des Proteins. Koppelbare Aminogruppen finden sich beim N-Terminus und bei der Aminosäure Lysin [112], welche bei vielen Proteinen in der Aminosäuresequenz vorhanden ist. Als Tetramer besitzt SA_v 16 Lysine (Abbildung 7.1) und 4 N-terminale Gruppen, was zusammen 20 Aminogruppen ergibt. Die kovalente Anbindung kann in einem Schritt (Abbildung 2.14 (a)) im wässrigen Milieu mittels *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC) bzw. in zwei Schritten (Abbildung 2.14 (b)) mittels EDC und *N*-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz (sulfo-NHS) erfolgen. Trotz des geringeren Zeit- und Arbeitsaufwandes der Einstufensynthese wird bevorzugt die Zweistufensynthese angewandt, da sie eine Polymerisierung des Proteins (Quervernetzung des Proteins untereinander) unterbindet und ein stabiles Intermediat gebildet wird (siehe Abbildung 2.14 (b)), welches nicht wie das instabile Intermediat mit dem im Überschuss vorliegenden Wasser reagieren kann. Dieses Intermediat ist für mehrere Stunden nach der Synthese unterhalb von pH = 8 stabil und hydrolysiert nur langsam. Im leicht Basischen (7 < pH < 9) ist der Aktivester sehr reaktiv gegenüber (NH₂)-Gruppen. Meist wird aus dem Grund der erste Syntheseschritt bei pH = 5 und der zweite bei pH = 7,4 durchgeführt [18]. Zudem wird keine, wie bei der Einstufensynthese in Abbildung 2.14 gezeigt, positive Ladung am NP bei der Bildung des EDC-Esters eingeführt, sondern eine negative Ladung an der sulfo-NHS-Gruppe. Dadurch wird die negative Ladung des NP unterstützt und NP-Aggregation minimiert [18].

In einem ersten Schritt wird die Carboxylgruppe durch die Bildung eines sulfo-NHS-Esters aktiviert und in einem zweiten Schritt, nach der Reinigung der aktivierten NP, reagiert der Ester mit SA_v. Die Herausforderung bei der Methode ist das Vermeiden von NP-Quervernetzung durch das Protein. Diese kann durch die Menge an aktivierten Estergruppen und Proteinen sowie durch die Oberflächenladung des NP sehr gut eingestellt werden.

2.3.1.2 Kopplung von Proteinen an NP mittels Maleimid-Thiol-Kopplung

Eine weitere Methode ist die Ankopplung von SA_v via Maleimid-Thiol-Kopplung (Maleimid = MAL). Gleichzeitig können so auch Abstandshalter eingeführt werden. Häufig werden dafür heterobifunktionelle Polyethylenglycol-Linker (PEG-Linker) eingesetzt, welche einerseits eine *N*-Hydroxysuccinimid-(NHS)-Esterfunktionalität und andererseits eine MAL-Gruppe besitzen. In einem ersten Schritt wird der PEG-Linker

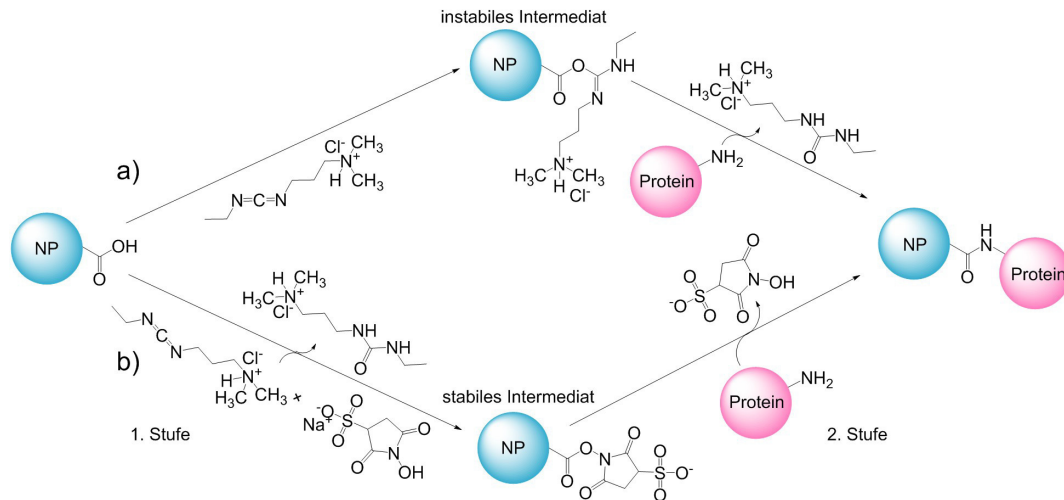


Abbildung 2.14: Kovalente Anbindung von Proteinen mittels der einstufigen EDC- a) und der zweistufigen EDC/ sulfo-NHS-Kopplung b).

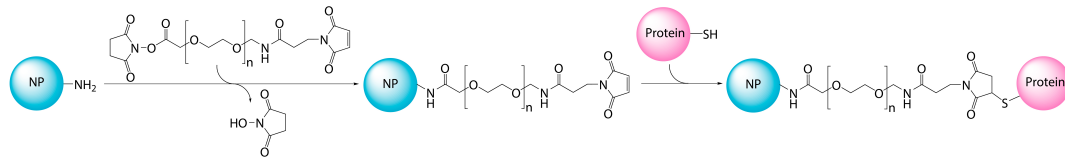


Abbildung 2.15: Kovalente Anbindung von Proteinen mittels PEG-Linkers.

über den aktivierten NHS-Ester an die NH_2 -funktionalisierten NP gekoppelt (Abbildung 2.15) und in einem zweiten Schritt die MAL-Gruppe an die SH-Gruppen des Proteins gebunden [18].

Einfluss eines PEG-Abstandshalters. PEG-Linker besitzen verschiedene Eigenschaften, welche aus der Länge des verwendeten PEG [113–115] und der gekoppelten Menge resultieren [116]. Je mehr PEG an der Oberfläche eines NP gebunden ist, um so mehr ändert sich die PEG-Konformation von einer pilz- in eine bürstenartige Konformation [117]. Einerseits wird dadurch die Oberfläche besser abgeschirmt und NP-Aggregation vermindert und andererseits sind die im NP befindlichen Moleküle gegenüber äußeren Einflüssen besser geschützt. Gleichzeitig wird die unspezifische Adsorption an Oberflächen bzw. die von Proteinen an den NP reduziert [114]. Zudem kann es durch den PEG-Linker aufgrund des größeren Abstandes zwischen dem Protein und der NP-Oberfläche zu einer besseren Zugänglichkeit für Rezeptoren führen, was im Falle von gebundenem SA_v einer verbesserten Zugänglichkeit für Antikörper gebundenes Biotin entspricht.

2.3.1.3 Thiolisierung von Proteinen

Um Proteine mittels Maleimid-funktionalisierten Linkern an Oberflächen zu binden, muss das verwendete Protein frei zugängliche Thiolgruppen tragen. In der Regel werden dafür die Thiolgruppen der Aminosäure Cystein, die in vielen Proteinen in der Aminosäuresequenz vorhanden ist, ausgenutzt. Bei Proteinen wie SA_v, in denen

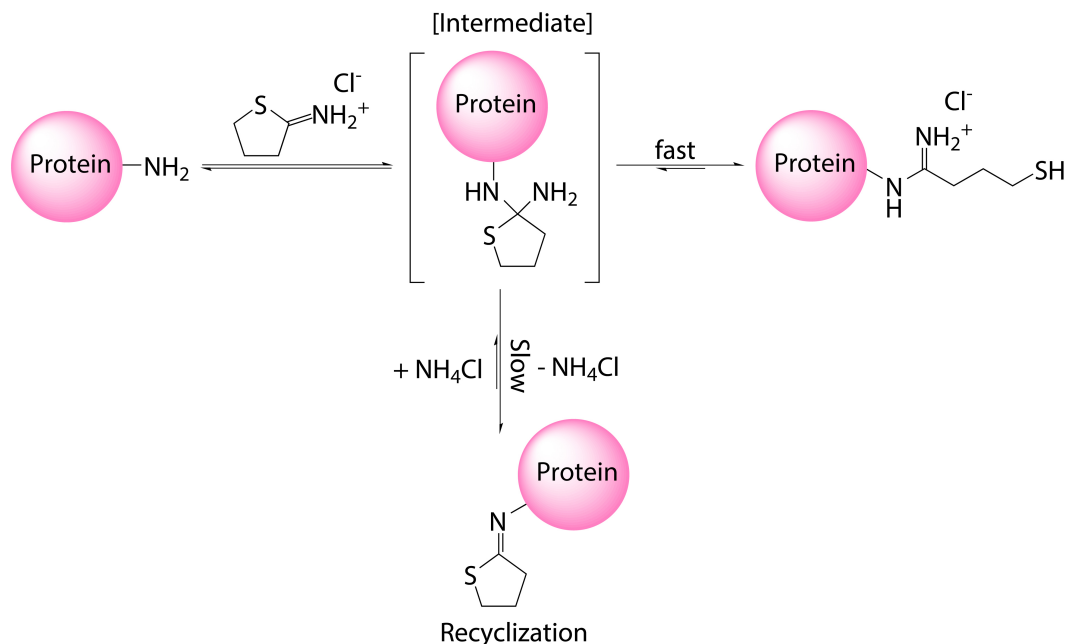


Abbildung 2.16: Thiolisierung von Aminofunktionalitäten an Proteinen mit 2-Iminothiolanhydrochlorid.

keine Cysteine bzw. Thiolgruppen existieren, müssen diese erst synthetisch erzeugt werden, was z.B. durch die Anbindung von 2-Iminothiolanhydrochlorid (Traut's Reagenz) im wässrig-basischen Milieu an Aminofunktionalitäten (Abbildung 2.16) geschieht [18]. Anzumerken ist, dass das Reaktionsprodukt keine lange Stabilität aufweist und nach der Synthese zügig an die Maleimidfunktion des Linkers gekoppelt werden muss, da es sonst, wie in Abbildung 2.16 gezeigt, zur Rezyklisierung des Thiols kommt und somit kein aktives Thiol zur Verfügung steht. Der Vorteil der Kopplung von SA_v mittels MAL-PEG-NHS in Kombination mit der gezielten Thiolisierung von einer Thiolgruppe pro SA_v ist die Unterdrückung von Quervernetzung und eine erhöhte Zugänglichkeit des SA_v durch den PEG-Abstandshalter (Spacer) für den biotinylierten Antikörper zur Ankopplung des NP-Labels.

2.3.1.4 Bestimmung des Thiolisierungsgrades von Proteinen mittels Ellman's Test

Zur Bestimmung der Anzahl von induzierten Thiolgruppen dient der Ellman's Test [118–124]. Die dabei zu Grunde liegende chemische Reaktion ist in Abbildung 2.17 dargestellt. Bei der Reaktion von einem Thiol im basischen Milieu mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman's Reagenz) entstehen dabei jeweils ein freies und ein proteingebundenes Äquivalent 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (TNB), welches als Dianion (TNB²⁻) vorliegt.

Die Bestimmung des Thiolisierungsgrades (TG) erfolgt nach Formel 2.20, wobei $A_{280 \text{ nm}}$ die Extinktion E des Proteins bei 280 nm mit dem zugehörigen molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280 \text{ nm}}$ bzw. $A_{412 \text{ nm}}$, die Extinktion E von TNB²⁻ bei 412 nm mit dem molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{412 \text{ nm}}$ ist.

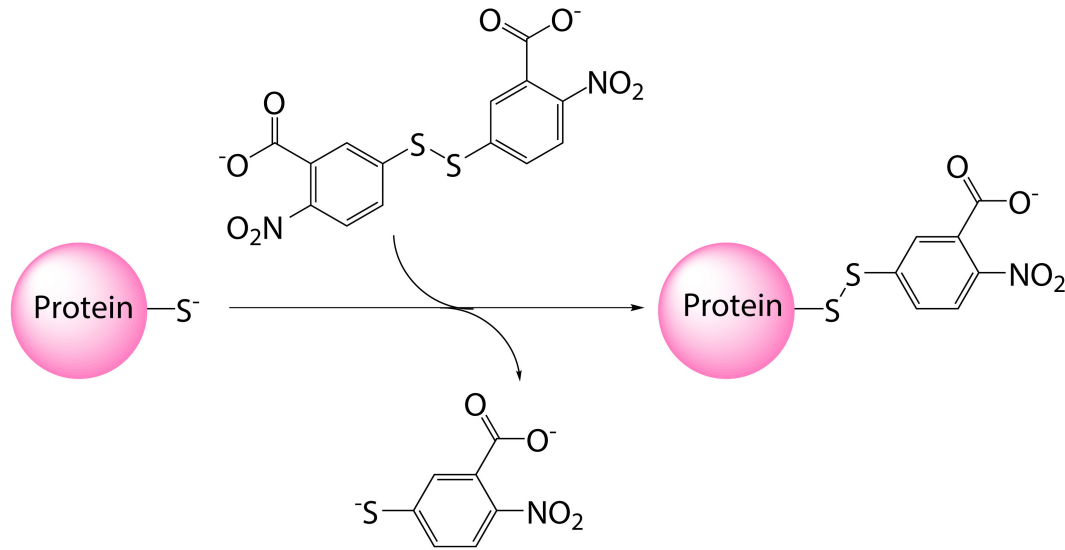


Abbildung 2.17: Reaktion von 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) mit Thiolen.

$$TG = \frac{A_{412 \text{ nm}} \cdot \epsilon_{280 \text{ nm}}}{A_{280 \text{ nm}} \cdot \epsilon_{412 \text{ nm}}} \quad (2.20)$$

In Abbildung 2.18 ist das Absorptionsspektrum von thiolysiertem SA_v vor und nach dem Ellman's Test zu sehen, wobei das Absorptionsmaximum bei 412 nm TNB²⁻ und bei ca. 330 nm DTNB nach vollständiger Reaktion mit dem Protein entspricht.

2.3.2 SA_v-Quantifizierung

Für die Quantifizierung von Proteinen gibt es verschiedene Methoden, z.B. die Bestimmung der Absorption bei 280 nm, den Lowry-Assay, den Bradford-Assay und den BCA-Assay [125, 126]. Diese zählen zu den photometrischen Methoden. Meist müssen hierfür reine Proteinlösungen verwendet werden, da ggf. Störfaktoren, wie z.B. Puffer, das Ergebnis beeinflussen können. Weiterhin existieren proteinspezifische Assays. Ein SA_v-spezifischer Assay ist der Biotin-FITC-Assay, welcher die Affinität von Biotin gegenüber SA_v ausnutzt (Abschnitt 2.1.2.6).

2.3.2.1 BCA-Assay für die Quantifizierung von Proteinen

Um die insgesamt vorhandene Menge von Proteinen zu bestimmen, kann der BCA-Assay [126–128] verwendet werden. Er wurde für die Quantifizierung von Proteinen in wässrigen Proben entwickelt. Dem Assay liegt die Biuretreaktion zu Grunde, bei der ein Kupfer(II)-Ion im basischen Milieu von mindestens zwei Peptidbindungen innerhalb des Proteins komplexiert wird (siehe Abbildung 2.19 links). Anschließend wird das Kupfer(II) unter Anwesenheit des Proteins zu Kupfer(I) reduziert (siehe Abbildung 2.19 Mitte), das nach Komplexierung mit der Bicinchoninsäure (siehe Abbildung 2.19 rechts) zu einem intensiv violetten Komplex führt [127] und bei 562 nm in Absorption spektroskopisch detektiert werden kann.

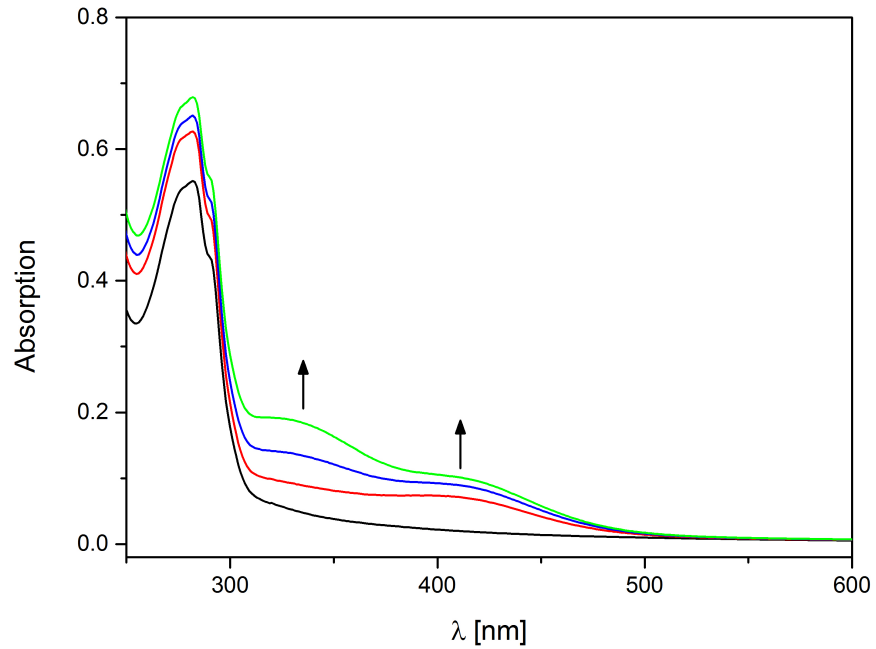


Abbildung 2.18: Absorptionsspektrum von thiolysiertem SAV vor und nach dem Ellman's Test.

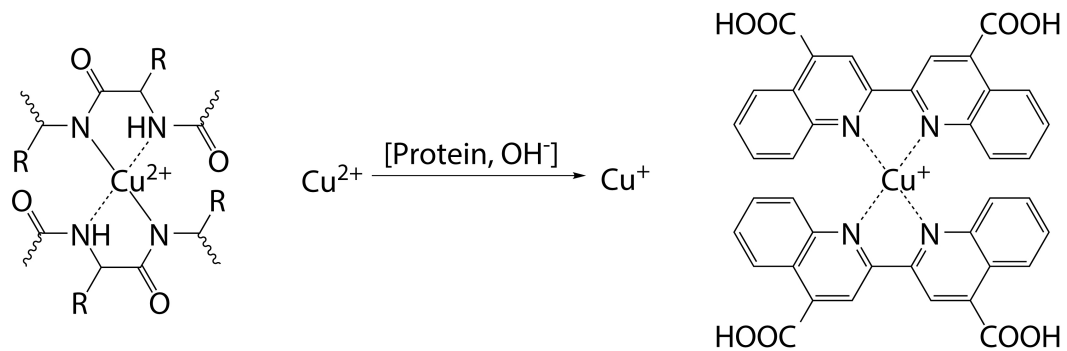


Abbildung 2.19: Schematische Darstellung des BCA-Assays: links, Biuretreaktion (R = Aminosäurereste); Mitte, Reduktion von Kupfer(II) zu Kupfer(I) in Anwesenheit von Proteinen; rechts, Kupfer(I)-BCA-Komplex.

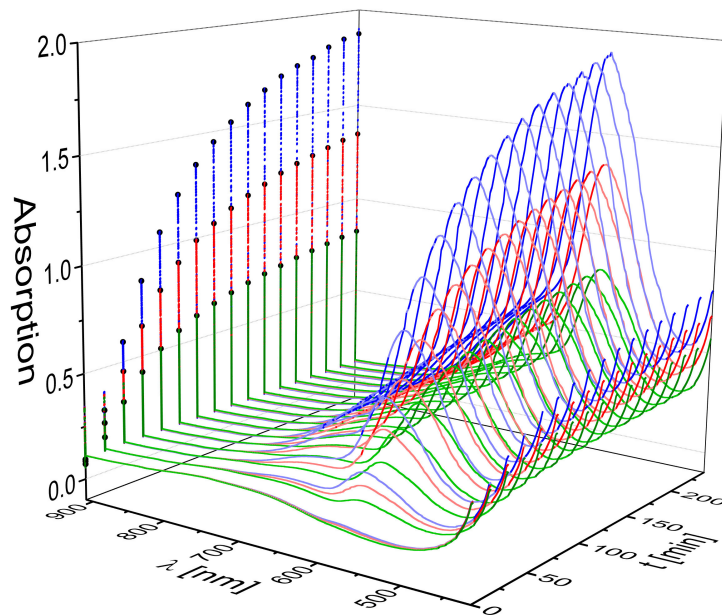


Abbildung 2.20: Zeitabhängige Absorptionsspektren eines BCA-Assays bei drei verschiedenen SA-Konzentrationen.

Der BCA-Assay ist zeit- und temperaturabhängig und ist keine Endpunktreaktion. Zur Quantifizierung einer Probe unbekannter Proteinkonzentration muss eine Kalibrierkurve von Proben bekannter Konzentration aufgenommen werden, wobei die Quantifizierung und die Kalibrierung unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt werden müssen. In Abbildung 2.20 ist die Zeitabhängigkeit der Absorptionsspektren eines BCA-Assays von SA bei Raumtemperatur (RT) dargestellt. Durch die Korrelation der Absorption mit der Zeit können in vertikaler Ausrichtung die Konzentrationsreihen und in horizontaler Ausrichtung die zeitabhängige Verschiebung der Absorptionsmaxima bei 562 nm abgelesen werden.

2.3.2.2 Biotin-FITC-Titration für die Quantifizierung von Streptavidin

Die Biotin-FITC-Titration [61, 129–134] ist ein fluorimetrischer Assay, mit dessen Hilfe SA im wässrig-alkalischen Milieu quantifiziert werden kann. Grundlage dafür bildet die wie in Abschnitt 2.1.2.6 beschriebenen Wechselwirkungen von Biotin mit Av oder SA und die Fluoreszenzlöschung des an Biotin-gebundenen Fluoresceins durch die Wechselwirkung mit Av bzw. SA. Nach Barbarakis et al. und Kada et al. eignen sich Fluorescein, Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Biotin-4-Fluorescein (B4F, Abbildung 7.2) am besten [61, 135]. In Gegenwart von B4F bindet das fluoresceintragende Biotin in eine der vier Bindungstaschen des SA, wobei die Fluoreszenz nach der Kopplung gelöscht wird (Abbildung 2.21). Erst nach der Sättigung aller vier Bindungstaschen des SA steigt die Fluoreszenzintensität durch ungebundenes B4F (Überschuss) an (weiße Kreise) [130]. Am Knickpunkt des Graphen (weiße Kreise) kann die Menge

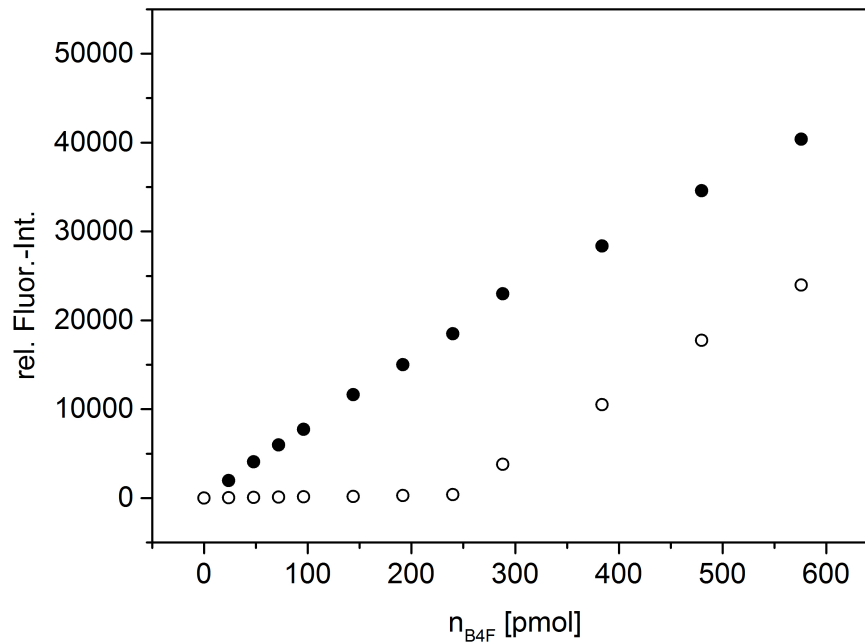


Abbildung 2.21: Oben: Schematische Darstellung der Biotin-FITC-Titration. Unten: Biotin-FITC-Titrationskurven mit (weiße Kreise) und ohne (schwarze Kreise) SAv.

an verbrauchten B4F ermittelt werden, mit der auf die Menge an vorliegendem SAv rückgeschlossen werden kann. Wenn alle vier Bindungstaschen zugänglich sind, entspricht das einem Bindungsverhältnis von vier Liganden pro SAv, was dem Stöchiometrieffaktor entspricht. Gleichzeitig kann bei Stöchiometrieffaktor kleiner als vier, bspw. durch die Blockade einer Bindungstasche, partielle Proteindenaturierung oder durch die sterisch gehinderte Zugänglichkeit von B4F auf die Funktionalität rückgeschlossen werden, weswegen die Biotin-FITC-Titration die funktionelle Menge an SAv angibt. Solange alle Bindungstaschen für B4F zugänglich sind, entspricht die funktionelle der totalen Menge an SAv, welche auch aus dem BCA-Assay erhalten werden kann.

3 Experimentelles

3.1 Materialien und Methoden

3.1.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien

Name	Kurzbezeichnung	Bezugsquelle
Alginat	ALG	Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)
BCA Protein Assay Kit		Thermo Scientific Inc. (USA)
Biotin-4-Fluorescein	B4F	Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)
Bovine Serum Albumin	BSA	Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)
BSA-Biotin-Konjugat		Thermo Scientific Inc. (USA)
C-reaktives Protein (30-AC05S)	CRP,	Fitzgerald Industries International (USA)
CRP Detektionsantikörper biotinyliert (1B-484-C100)		Exbio Praha, a.s.
CRP Fängerantikörper (10-C189B)		Fitzgerald Industries International (USA)
Cumarin 7	C7	Radiant Dyes Laser & Accessoires GmbH (Deutschland)
Cumarin 153	C153	Radiant Dyes Laser & Accessoires GmbH (Deutschland)

<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylcarbodiimid Hydrochlorid	EDC	Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat		Carl Roth GmbH & Co. KG (Deutschland)
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)	Ellman's Reagenz	Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)
Ethanol	EtOH	Merck KGaA (Deutschland)
<i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz	Sulfo-NHS	Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)
2-Iminothiolanhydrochlorid	Traut's Reagenz	Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)
Itrybe		Otava Ltd. (Ukraine/USA)
Lumogen® F305		Kremer Pigmente GmbH & Co. KG (Deutschland)
<i>O</i> -[<i>N</i> -(3-Maleimidopropionyl)aminoethyl]- <i>O</i> -heptacosaethylenglycol	MAL-PEG-NHS (n = 27)	Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)
2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure	MES	Merck KGaA (Deutschland)
Natriumcarbonat		Carl Roth GmbH & Co. KG (Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat		Carl Roth GmbH & Co. KG (Deutschland)
Natriumchlorid		Carl Roth GmbH & Co. KG (Deutschland) und Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat		Carl Roth GmbH & Co. KG (Deutschland)
Natriumhydroxid		Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)
Nilrot	NR	Fluka Chemie GmbH (Deutschland)

PD 10 Chromatographiesäulen (Sephadex G25)		GE Healthcare (Großbritannien)
(1,10-Phenanthrolin)tris[4,4,4- trifluoro-1-(2-thienyl)- 1,3-butandionato]europium(III)	Eu(TTFA) ₃ (phen)	Prof. Dr. U Kynast, FH Münster (Deutschland)
Polyallylamin	PAH	Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)
aminierte PS NP (100 nm)		Kisker Biotech GmbH & Co. KG (Deutschland)
carboxylierte PS NP (100/500/1000 nm)		Kisker Biotech GmbH & Co. KG (Deutschland)
Streptavidin		Thermo Scientific Inc. (USA)
Streptavidin-Horseradish- Peroxidase-Konjugat	SAv-HRP	Thermo Scientific Inc. (USA)
Tetrahydrofuran	THF	Merck KGaA (Deutschland) und Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)
Tris(1,3-diphenyl-1,3- propandionato)(1,10- phenanthrolin)europium(III)	Eu(dbm) ₃ (phen)	Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)
Turbo TMB-ELISA Substrate Solution		Thermo Scientific Inc. (USA)
<i>meso</i> -Tetraphenylporphyrin	TPP	Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)
Tween 20 [®]		AppliChem GmbH (Deutschland)

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Das verwendete Wasser wurde vor Verwendung an einer Reinstwasseraufbereitungsanlage ((Milli-Q[®] Merck) gereinigt. Die verwendeten Mikro- und Nanopartikel wurden vor jeder Verwendung im Ultraschallbad behandelt.

3.1.2 Allgemeine Angaben

pH-Wertmessungen. pH-Werte wurden an einem 780 pH Meter von METROHM gemessen.

Zentrifugation. Die Zentrifugationen wurden an einer Zentrifuge des Typs 5415D sowie 5424R von Eppendorf durchgeführt.

3.1.3 Programme

Berechnung der log D-Werte. Die Berechnung der log D-Werte erfolgte mit Marvin Sketch aus dem Softwarepack Marvin Beans (Version 15.9.14.0) von ChemAxon (<https://www.chemaxon.com>). Die Ionenkonzentrationen wurden dabei auf 100 mM gesetzt.

Datenauswertung. Die Auswertung aller gemessenen Parameter erfolgte mit Microsoft Excel 2010 bzw. OriginLab OriginPro 9.0G.

Grafiken. Sofern nicht durch eine Referenz ausgewiesen, wurden die verwendeten Grafiken mit OriginPro 9.0G, ChemDraw Prime 15.0 und Adobe Photoshop CC erstellt.

3.2 Herstellung fluoreszenter Nanopartikel

3.2.1 Farbstoffnanopartikel mittels „Top-down“- und LbL-Verfahren

3.2.1.1 „Top-down“-Verfahren zur Synthese von Farbstoffnanopartikeln

Es wurden 1 mg SDS, 20 mg Farbstoff (C7 und C153) und 1 g Glaskugeln ($\varnothing = 3$ mm) eingewogen und mit 2 mL Wasser vermengt. Anschließend wurde das Gemisch 15 min bei RT im Vortexer geschüttelt (Prozedur A) und danach 15 min bei RT im Ultraschallbad behandelt (Prozedur B). Beide Prozeduren wurden in abwechselnder Reihenfolge viermal durchgeführt (insgesamt 2 h). Dann wurden die Glaskugeln abfiltriert und die Suspension mit Wasser auf 10 mL aufgefüllt.

3.2.1.2 LbL-Verfahren

10 mL der Partikelsuspension wurde mit 10 mL der Polyelektrolytlösung (5 bis 20 mg/mL PAH in 100 mM Boratpuffer (Schicht A) bzw. 5 bis 20 mg/mL ALG in 0,5 NaCl-Lösung (Schicht B)) versetzt und 2 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension abzentrifugiert und die Partikel dreimal mit Wasser gewaschen. Die Prozedur wurde insgesamt viermal durchgeführt, so dass die NP 4 alternierende Schichten A/B/A/B trugen.

Zentrifugationsbedingungen. Als Zentrifugationsbedingungen wurden für die zermahlene NP ein relativer Zentrifugalkraft-Wert (engl. rel. centrifugal force, rcf) von 5.000 g, 60 min, bei RT gewählt.

3.2.2 Farbstoffbeladung von Polymerpartikeln

3.2.2.1 Farbstoffbeladung

Die Farbstoffbeladung von COOH- bzw. NH₂-funktionalisierten PS NP verschiedener Größen erfolgte nach der Methode von Behnke et. al [25]. Zu 1 mL einer PS NP Suspension (5 mg/mL) wurden 167 μ L einer Farbstofflösung (0,5 - 20 mM in THF) gegeben und für 30 min geschüttelt. Anschließend wurden 800 μ L Milli-Q-Wasser zugegeben und die Partikel abzentrifugiert, danach der Überstand abgenommen und die Partikel in Puffer resuspendiert (Waschprozedur). Die Partikelsuspension wurde insgesamt dreimal mit Puffer gewaschen (COOH-Funktionalisierung: 50 mM MES-Puffer, pH 5; NH₂-Funktionalisierung: 100 mM Phosphatpuffer, pH 8) und auf eine Konzentration von 50 mg/mL aufkonzentriert.

Zentrifugationsbedingungen. Die NP wurden nach den Angaben in Tabelle 3.2 bei 20°C bzw. RT abzentrifugiert.

Tabelle 3.2: Zentrifugationsbedingungen für PS NP bei der Beladungs- und SAV-Kopplungsprozedur.

Material	\varnothing_{NP} [nm]	rcf-Wert [g]	Zeit [min]
PS NP	100	15.000	45 bis 60
PS NP	500	6.000	15
PS NP	1000	3.000	15

3.3 Charakterisierung der Nanopartikel

3.3.1 Physikalische Charakterisierung

3.3.1.1 Größenbestimmung und Zetapotentialmessung mittels dynamischer Lichtstreuung

DLS- und Zetapotentialmessungen erfolgten an einem Zetasizer Nano ZS (ZEN 3600) von Malvern. NP-Größenverteilungen und Zetapotentiale wurden mittels DLS in PS und PMMA Makro- und Halbmikro-Küvetten in Wasser bzw. DTS1060, DTS1061 und DTS1070 Kapillarezellen von Malvern in 10 mM Phosphatpuffer (pH = 7,4) gemessen. Für alle verwendeten NP wurde ein Brechungsindex (R_f) von 1,59 angenommen. Die Viskosität von Wasser wurde auf $\eta = 0,8872$ mPa·s und ein R_f von 1,33 bei 25°C voreingestellt. Die Equilibriumszeit wurde auf 300 s gesetzt. Der Messwinkel betrug 173°. Das Analysenmodell wurde auf „General porpuse“ bzw. „Auto mode“ eingestellt. Für Zetapotentialmessungen wurde die Smoluchowski-Methode gewählt.

3.3.1.2 REM und TEM

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden unter der Leitung von Iryna Driehorst und Sören Selve an der Technischen Universität Berlin an einem Hitachi S-2700 bzw. S-520 und einem FEI Tecnai G² 20 S-TWIN durchgeführt.

3.3.2 Chemische Charakterisierung

3.3.2.1 Oberflächenfunktionalisierungsdichte der PS NP

Die konduktometrischen Messungen wurden an einem Microprocessor Conductivity Meter LF 537 der Wissenschaftlich-Technische Werkstätten Weilheim durchgeführt.

Laut Herstellerangaben entsprach die Anzahl an derivatisierbaren COOH- und NH₂-Gruppen für die 100 nm PS NP (-COOH, -NH₂) 4 nmol/mg und für 500 und 1000 nm PS NP (-COOH) 2 nmol/mg.

Zusätzlich wurden die totalen Mengen an funktionellen COOH- bzw. NH₂-Gruppen der verwendeten NP (10 mL, 0,5 mg/mL) in einer Dreifachbestimmung konduktometrisch [136, 137] durch Zugabe von Natronlauge bzw. Salzsäure (10 mM) mittels zweifacher Hin- und Rücktitration bestimmt.

3.3.3 Optische Charakterisierung

3.3.3.1 Absorptions-, Fluoreszenz- und Quantenausbeutemessungen.

Extinktionen und Absorptionsspektren wurden an einem Spekord 210 Plus von Analytik Jena und Cary 5000 von Varian und Fluoreszenzspektren an einem FSP 920 von Edinburgh Instruments Ltd. in 111-QS Quarzglasküvetten von Hellma bei RT aufgenommen. Die Quantenausbeuten wurden absolut an einem Quantaaurus-QY-C11347-11 von Hamamatsu Photonics in Quarzglasküvetten mit langem Hals bestimmt.

3.3.3.2 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe

Zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$ wurden drei Farbstoffkonzentrationen (1, 5 und 10 μM) je Farbstoff in EtOH hergestellt und die Extinktionen bei definierten Wellenlängen in 1x1 cm Quarzglasküvetten gemessen. Als Referenz wurde EtOH verwendet. $\epsilon(\lambda)$ ergibt sich demnach aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Gleichung 2.6).

3.3.3.3 Bestimmung der Quantenausbeuten der Farbstoffe

Zur Bestimmung der absoluten Quantenausbeute der Farbstoffe in EtOH wurden Farbstofflösungen mit Extinktionen von 0,1 im Absorptionsmaximum gewählt. Als Referenz wurde EtOH verwendet.

3.3.3.4 Bestimmung der Quantenausbeuten der in PS NP eingequollenen Farbstoffe

Zur Bestimmung der absoluten Quantenausbeute der in PS NP eingequollenen Farbstoffe wurden zuvor die Konzentrationen der NP-Suspensionen in Wasser so eingestellt, dass die sich in Absorption ergebenden Extinktionsspektren und dem darin enthaltenen Streulichtbeitrag mit dem Extinktionsspektrum der verwendeten Referenzprobe überdecken. Die gemessenen Extinktionen der Farbstoffpartikel lagen im Maximum bei 0,1. Als Referenzprobe wurden unbeladene PS NP gleicher Größe und Funktionalität in Wasser verwendet.

3.3.3.5 Streukurvenkorrektur und Bestimmung der NP-Konzentration

Durch die Probenpräparation kann es durch die Verdünnungs-, Aufkonzentrations- und Waschschrte zu Partikelverlust, d.h. zu einer Veränderung der Ausgangskonzentration (50 mg/mL), kommen. Zur Bestimmung der NP-Konzentrationen wurde eine Streukurve (Absorptionsspektrum) von unbeladenen PS NP bekannter Konzentration in Wasser aufgenommen. Als Referenzprobe wurde Wasser verwendet. Anschließend wurden die beladenen NP-Proben so verdünnt, dass die gemessenen Streukurven mit der der unbeladenen NP-Probe übereinstimmen. Durch die Kenntnis der Ausgangskonzentrationen und der zugegebenen Volumina aller Proben kann unter der Annahme identischer Partikel und identischem Streuverhalten auf die Partikelkonzentrationen der beladenen Partikel rückgeschlossen werden.

3.3.3.6 Bestimmung der Farbstoffbeladungsmenge der PS NP

Die Bestimmung der Farbstoffbeladungsmenge wurde nach zwei vergleichbaren Methoden von Laux et. al [58] durchgeführt. Methode A: Hierbei wurden 1 - 10 μL der gefärbten PS NP mit bis zu 2000 μL EtOH verdünnt und nach 30 min die Partikel bei RT bei höchstmöglichem rcf-Wert abzentrifugiert. Methode B: Hierbei wurden 1 - 10 μL der gefärbten PS NP mit bis zu 2000 μL THF aufgelöst. Anschließend wurden bei beiden Methoden die Absorptionsspektren der Farbstoffe aufgenommen und nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz unter Kenntnis des Extinktionskoeffizienten die Menge an Farbstoff pro mg PS errechnet.

3.4 Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel-SAv-Konjugate

3.4.1 Streptavidin-Konjugation

3.4.1.1 Kovalente Anbindung von Streptavidin an carboxy-funktionalisierte PS NP mittels EDC

Die direkte kovalente Anbindung von SAv an NP mittels EDC erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Hermanson et. al [18]. Es wurden dabei jeweils ein Edukt

(EDC oder SAV) variiert und das zweite (EDC oder SAV) konstant gehalten, um den Einfluss auf die SAV-Kopplung zu testen (siehe auch Anhang, Tabelle 7.3).

Variante A - Variation der EDC-Menge: 0; 1; 3; 6; 9; 12; 15; 18; 21; 24; 27 und 30 μL einer EDC-Lösung (15 mM in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4) und jeweils 12 μL einer SAV-Lösung (2,5 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4) wurden zu jeweils 200 μL einer Suspension von COOH-funktionalisierten NP (5 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4) gegeben.

Variante B - Variation der SAV-Menge: 15; 18; 21; 24; 27 und 30 μL einer SAV-Lösung (2,5 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4), jeweils 12 μL einer EDC-Lösung (15 mM in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4) wurden zu jeweils 200 μL einer Suspension von COOH-funktionalisierten NP (5 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4) gegeben.

Variante C - Variation der EDC und SAV-Menge: 24 bzw. 30 μL einer EDC-Lösung (15 mM in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4) und jeweils 24 bzw. 30 μL einer SAV-Lösung (2,5 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4) wurden zu jeweils 200 μL einer Suspension von COOH-funktionalisierten NP (5 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4) gegeben.

Die Reaktionsmischungen schüttelten 5 h bei RT und anschließend wurden die Partikel zweimal mit MilliQ-Wasser gewaschen und die Suspension auf 200 μL (5 mg/mL PS NP) eingestellt.

3.4.1.2 Kovalente Anbindung von Streptavidin an carboxy-funktionalisierte PS NP mittels EDC und sulfo-NHS

Optimierungsexperimente. Die direkte kovalente Anbindung von SAV an NP mittels EDC/sulfo-NHS erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Hermanson et. al [18]. Es wurden dabei jeweils entweder EDC/ sulfo-NHS oder SAV variiert, um den Einfluss auf die SAV-Kopplung zu testen (siehe auch Anhang, Tabelle 7.4).

Variante A: Jeweils 4, 8, 16 und 32 μL einer EDC-Lösung (150 mM in 50 mM MES-Puffer, pH = 5) und 2, 4, 8 und 16 μL einer sulfo-NHS-Lösung (300 mM in 50 mM MES-Puffer, pH 5) wurden zu 200 μL einer Suspension von COOH-funktionalisierten NP (50 mg/mL in 50 mM MES-Puffer, pH = 5) gegeben und 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die Partikel einmal gewaschen, ungepuffert (100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4) und auf 200 μL Volumen eingestellt. Nach dem Waschen wurden jeweils 80 μL einer SAV-Lösung (11,7 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4) gegeben und das Reaktionsgemisch für mindestens 3 h (bzw. über Nacht) geschüttelt.

Variante B: Jeweils 8 μL einer EDC-Lösung (150 mM in 50 mM MES-Puffer, pH = 5) und 4 μL einer sulfo-NHS-Lösung (300 mM in 50 mM MES-Puffer, pH 5) wurden zu 200 μL einer Suspension von COOH-funktionalisierten NP (50 mg/mL in 50 mM MES-Puffer, pH = 5) gegeben und 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurden die Partikel einmal gewaschen, ungepuffert (100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4) und auf 200 μL Volumen eingestellt. Nach dem Waschen wurden jeweils 5, 10, 20, 40 und 80 μL einer SAV-Lösung (11,7 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4) gegeben und das Reaktionsgemisch für mindestens 3 h (bzw. über Nacht) geschüttelt.

Im Anschluss wurden die Partikel aus Variante A bzw. B dreimal mit Milli-Q-Wasser gewaschen, der Überstand des Reaktionsgemisches aufbewahrt und die Suspension auf

200 μL (50 mg/mL PS NP) eingestellt.

SAv-Anbindung via EDC/ sulfo-NHS-Kopplung. Die SAv-Anbindung erfolgte nach der Vorschrift der Optimierungsexperimente. Es wurden dafür 32 μL der EDC-Lösung, 16 μL einer sulfo-NHS-Lösung, 80 μL einer SAv-Lösung und 800 μL einer Suspension von COOH-funktionalisierten NP verwendet. Die Konzentration und der pH-Wert des Puffers entsprach ebenfalls der vorherigen Vorschrift. Die NP-Suspension wurde nach dem Waschen und Umpuffern jeweils auf 800 μL eingestellt.

3.4.1.3 Kovalente Anbindung von Streptavidin an amino-funktionalisierte PS NP

Die SAv-Funktionalisierung erfolgte nach einer Methode von Steinhauser et. al [138–140]. 200 μL einer NHS-PEG-MAL-Lösung (80 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 8) wurden zu 800 μL einer Suspension von NH_2 -funktionalisierten PS NP (25 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 8) gegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 4 h bei RT geschüttelt und danach zweimal mit Phosphatpuffer (100 mM, pH = 8) gewaschen. Für die Thiolysierung von SAv wurden 320 μL einer 2-Iminothiolyanhydrochloridlösung (1,25 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 8) und 400 μL des Phosphatpuffers (pH = 8) zu 80 μL einer SAv-Lösung (11,7 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4) gegeben, das Gemisch für 2 h bei RT geschüttelt und danach säulenchromatographisch (PD-10-Chromatographiesäule, 100 mM Phosphatpuffer, pH = 8) gereinigt. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte über ein BCA-Assay und die Bestimmung des Thiolysierungsgrades über den Ellman's Test. 1 mL des thiolisierten SAv (0,87 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 8) wurden zu 800 μL der PEG-MAL-funktionalisierten NP (25 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 8) gegeben und über Nacht bei RT geschüttelt. Im Anschluss wurden die Partikel dreimal mit Milli-Q-Wasser gewaschen, der Überstand des Reaktionsgemisches für die Bestimmung der Massenbilanz aufbewahrt und die Suspension auf 800 μL (25 mg/mL PS NP) eingestellt.

Thiolysierung von SAv. Zur Optimierung des Thiolysierungsgrades wurden 320, 620 und 920 μL einer 2-Iminothiolyanhydrochloridlösung (1,25 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 8) und 400 μL des Phosphatpuffers (pH = 8) zu 80 μL einer SAv-Lösung (11,7 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4) gegeben. Das Gemisch wurde für 2 h bei RT geschüttelt und danach säulenchromatographisch (PD-10-Chromatographiesäule) gereinigt. Die Bestimmung des Thiolysierungsgrades erfolgte über den Ellman's Test.

Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von SAv. Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von SAv erfolgte über Absorptionmessungen von SAv verschiedener Konzentrationen in Wasser bei einer Wellenlänge von 280 nm und der Anwendung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes.

Ellman's Test. Der Ellman's Test wurde nach Literaturmethoden [118–123] für die Bestimmung von kovalent gebundenen Thiol-Gruppen an SAv in

einer Küvette an einem UV/Vis-Spektrometer bzw. in einer transparenten Glas-MTP an einem MTP-Auslesegerät durchgeführt. Hierzu wird eine 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)-Lösung (10,1 mM portionsweise, 0,8 μL /Portion) zu einer Lösung thiolisierten SAV (in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 8) bekannter Konzentration (ermittelt über den BCA-Assay) gegeben und ein Absorptionsspektrum vor der ersten und nach der portionsweisen Zugabe mit jeweils 15 min Wartezeit aufgenommen, bis die Absorptionsbande bei 412 nm nicht weiter anstieg. Anschließend wurde der Thiolisierungsgrad aus der Absorption des vollständig entstandenen *p*-Nitrothiophenols bei 412 nm ($\epsilon = 13.600 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und der Absorption der Absorptionsbande des SAV bei 280 nm ($\epsilon = 187.000 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) aus der ersten Absorptionsmessung nach Formel 2.20 aus Abschnitt 2.3.1.4 berechnet.

3.4.2 BCA-Assay und Biotin-FITC-Titration

3.4.2.1 Absorptions- und Fluoreszenzmessungen

Absorptions- und Fluoreszenzmessungen der BCA- und Biotin-FITC-Assays wurden an einem Infinite M200Pro von Tecan in 96 Well-Mikrotiterplatten (schwarz mit transparentem Boden bzw. transparent aus Polystyrol) von Greiner (Best.-Nr.: 655801, 655087) durchgeführt.

3.4.2.2 BCA-Assay

Der BCA-Assay wurde für die Bestimmung der SAV-Konzentration nach der Vorschrift mit dem BCA-Assay Kit von Thermo Scientific Inc. in einer transparenten 96-Well MTP bei RT durchgeführt. Hierbei wurden in einer Dreifachbestimmung jeweils 25 μL der unverdünnten Probe bzw. des Standards (9 Standards von 0 bis 2.000 $\mu\text{g/mL}$ SAV) pro Well pipettiert, anschließend 200 μL der Reaktionslösung (50:1, BCA-Reagenz:Kupfer(II)-Reagenz) zugegeben, die MTP für 4 h auf einem Probenschüttler geschüttelt und danach an einem MTP-Auslesegerät das Absorptionssignal in einem Wellenlängenbereich von 552 bis 572 nm gemessen. Anschließend wurden die Absorptionen gegen die bekannten Konzentrationen der Standards grafisch aufgetragen und die Kurve gefittet. Daraus wurden die unbekanntenen SAV-Konzentration der Proben ermittelt.

Für die Bestimmung der NP-gebundenen SAV-Mengen wurde die Vorschrift in einer abgewandelten Form angewandt. In einer Dreifachbestimmung wurden 40 bzw. 50 μL der unverdünnten Suspension in ein Probenröhrchen gegeben und mit 320 bzw. 400 μL der Reaktionslösung versetzt. Die Reaktionszeit der Proben im Schüttler betrug für die 100 nm PS NP 3,5 h und für die 500 nm PS NP 4 h. Im Anschluss wurden die Proben bei 21.500 *g* (45 min) für die 100 nm PS NP bzw. bei 16.000 *g* (7 min) für die 500 nm PS NP bei RT abzentrifugiert, jeweils 225 μL des Überstandes in jeweils ein Well einer transparenten 96-Well MTP überführt und in Absorption UV/Vis-spektroskopisch vermessen. Zur Bestimmung der Konzentration der SAV-Stammlösung, hergestellt nach der Arbeitsanweisung von Thermo Scientific Inc., wurde der Stamm im Verhältnis 1:10 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH = 7,4) verdünnt und nach der zuvor genannten Prozedur analysiert.

3.4.2.3 Biotin-FITC-Titration

Die Biotin-FITC-Titration wurde nach bekannten Literaturmethoden [61, 129–134] für die Bestimmung von SAV an NP und in Überständen optimiert. Die Probenvorbereitung und Durchführung erfolgte in einer schwarzen 96-Well MTP mit transparentem Boden bei RT. In 12 verschiedene Wells wurden jeweils 100 μL der verdünnten Probe (1:28 in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4) gegeben und anschließend erfolgte die Zugabe von 0; 0,15; 0,3; 0,45; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,4; 3,0 und 3,6 μL der B4F-Lösung (160 μM in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4). Während der Reaktion wurde die MTP bei RT für 30 min geschüttelt und anschließend das Fluoreszenzsignal ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$) an einem MTP-Auslesegerät detektiert. Nach der Auftragung der gemessenen Fluoreszenzsignale gegen die zugegebenen B4F-Stoffmengen konnte nach der linearen Regression (RGP-Funktion; Excel) im Schnittpunkt der beiden Geraden die Menge an SAV-gebundenem B4F ermittelt werden.

Zur Bestimmung der SAV-Konzentration der SAV-Stocklösung, hergestellt nach der Arbeitsanweisung von Thermo Scientific Inc., wurde der Stock im Verhältnis 1:10 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH = 7,4) verdünnt und nach der zuvor genannten Prozedur analysiert.

Zur Bestimmung der SAV Menge von den Stammlösungen und den Überständen wurde ein Stöchiometriefaktor von 4 Biotinmolekülen pro SAV angenommen.

Test zum Einfluss der Farbstoffe auf die SAV-Funktionalität.

SAV-funktionalisierte, unbeladene 100 nm PS NP (carboxyliert) wurden nach der Vorschrift aus Abschnitt 3.2.2.1 mit den Farbstoffen C153 (10 mM), TPP (2 mM), Nilrot (2 mM) und F305 (10 mM) beladen bzw. mit THF (gleiches Mischungsverhältnis) behandelt und anschließend mit Wasser gewaschen.

3.4.2.4 Berechnung der totalen und aktiven gebundenen Streptavidinmenge pro PS NP

Die Anzahl von gebundenen SAV-Molekülen pro NP wurde als Quotient der bestimmten totalen und aktiven SAV-Menge, hervorgehend aus den Daten vom BCA-Assay und der Biotin-FITC-Titration, und der eingesetzten Menge an NP ermittelt. Für die Berechnung wurden die NP als sphärische Partikel mit einer Dichte $\rho = 1050 \text{ kg/m}^3$ für PS angenommen. Für die Berechnung des maximalen Bedeckungsgrades von SAV pro 100 nm und 500 nm PS NP wurde eine monomolekulare Bedeckung von SAV mit einer sphärischen Gestalt mit einem Durchmesser $\varnothing_{\text{SAV}} = 4,7 \text{ nm}$ angenommen.

3.4.2.5 Berechnung der Massenbilanz

Die Berechnung der Massenbilanz (MB) erfolgte durch die Summe von partikelgebundener SAV Menge (n_{SAVNP}) und ungebundener Menge an SAV im Überstand ($n_{\text{SAVÜberstand}}$). Bei der Übereinstimmung mit der eingesetzten Menge SAV ($n_{\text{SAVZugabe}}$) ergibt sie sich zu 100%.

$$MB = \frac{n_{\text{SAVNP}} + n_{\text{SAVÜberstand}}}{n_{\text{SAVZugabe}}} \quad (3.1)$$

3.5 Durchführung der CRP-Immunoassays

Absorptions- und Fluoreszenzmessungen. Absorptions- und Fluoreszenzmessungen der Immunoassays wurden an einem Infinite M200Pro von Tecan in 96 Well-Mikrotiterplatten (schwarz mit transparentem Boden bzw. transparent aus Polystyrol, hochbindend) von Greiner (Best.-Nr.: 655081, 655097) durchgeführt.

Waschschritte. Das Waschen der Mikrotiterplatten erfolgte an einem HydroFlex-Mikrotiterplattenwascher von Tecan.

Antikörper und Antigen. Zum Aufbau eines CRP Sandwichimmunoassays als Standardmodellassay wurden ein monoklonaler (Maus) Anti-CRP Fängerantikörper (10-C189B), ein biotinylierter monoklonaler (Maus) Anti-CRP Detektionsantikörper (1B-484-C100) und Humanes CRP (30-AC05S) kommerziell erworben, aliquotiert und bei -20°C gekühlt gelagert.

Allgemeine Parameter und Bedingungen. Alle Immunoassays und alle Messungen wurden in hochbindenden 96-Well-MTP bei RT durchgeführt. Die Zugabe erfolgte mit einer 8- bzw. 12-Kanal-Pipette. Der Inkubationsschritt erfolgte auf einem Schütteltisch und die MTP-Waschprozedur in einem MTP-Wascher mit Wasch-Puffer mit 4 Wiederholungen je Waschschritt.

Für den Aufbau und die Durchführung des CRP Sandwichimmunoassays wurden verschiedene Puffer- und Reaktionslösungen hergestellt:

Pufferlösungen

- Coating-Puffer: (50 mmol/L NaCO_3 ; pH 9,6)
- Waschpuffer: (80 mmol/L PBS-Puffer, $\text{Na}_2\text{HPO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_3/\text{NaCl}$; 0,05 v/v% Tween 20[®]; pH 7,6)
- Blocking-Puffer: (Waschpuffer; 1 w/v% BSA)

Reaktionslösungen

- Fängerantikörperlösung (A): (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 10-C189B in Coating-Puffer)
- CRP Proteinstandards (B): (0 bis 1.000.000 pg/mL 30-AC05S) in Blocking-Puffer)
- Detektionsantikörperlösung (C): (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 1B-484-C100 in Blocking-Puffer)
- SAv-HRP-lösung (D): (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Blocking-Puffer)
- PS NP-SAv-Konjugat-Suspension (E): (0,1 mg/mL PS NP in Blocking-Puffer)

3.5.1 CRP-ELISA

Die Durchführung des CRP-ELISA erfolgte nach abgewandelten Vorschriften von Fitzgerald Industries Int. und Thermo Scientific Inc.

Durchführung

1. Schritt:
 - (a) Zugabe von 50 μL der Fängerantikörperlösung (A) pro Well
 - (b) Inkubationszeit: 2 h
 - (c) 4x Waschen
2. Schritt:
 - (a) Zugabe von 300 μL des Blocking-Puffers pro Well
 - (b) Inkubationszeit: 30 min
 - (c) 4x Waschen
3. Schritt:
 - (a) Zugabe von 50 μL der Standards (B) pro Well
 - (b) Inkubationszeit: 1 h
 - (c) 4x Waschen
4. Schritt:
 - (a) Zugabe von 50 μL der Detektionsantikörperlösung (C) pro Well
 - (b) Inkubationszeit: 1 h
 - (c) 4x Waschen
5. Schritt:
 - (a) Zugabe von 50 μL der SAv-HRP-lösung (D) pro Well
 - (b) Inkubationszeit: 1 h
 - (c) 4x Waschen
6. Schritt:
 - (a) Zugabe von 100 μL der TMB-Substrat-Lösung pro Well
 - (b) Inkubationszeit: 30 min
 - (c) Zugabe von 100 μL 2 mol/L Schwefelsäure
 - (d) Auslesen des Absorptionssignals bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ am MTP-auslesegerät

Parameter und Auswertung. Die gemessenen Absorptionen aus drei Assays wurden gemittelt und die Standardabweichung errechnet. Im Anschluss wurden die Mittelwerte gegen die verwendeten CRP-Konzentrationen grafisch aufgetragen und die Kurve mittels 5PL-Fit (siehe Abschnitt 2.1.3.3) angepasst. Dabei wurde der Fitbereich auf CRP-Konzentrationen von 1 bis 1.000.000 pg/mL festgelegt und keine Gewichtung eingestellt. Das Detektionslimit (LOD) wurde aus den mindestens 3 Messungen von Proben ohne CRP-Zugabe (nur Zugabe von Blocking-Puffer) nach Gleichung 2.8 berechnet.

3.5.2 Partikelbasierte CRP-Immunoassays

Die Durchführung des partikelbasierten CRP-FIA erfolgte nach dem abgewandelten Protokoll des CRP-ELISA aus Abschnitt 3.5.1, wobei die Schritte 1 bis 4 identisch sind.

Durchführung

5. Schritt:

- (a) Zugabe von 50 μL der PS NP-SAv-Konjugat-Suspension (E) pro Well
- (b) Inkubationszeit: 1 h
- (c) 4x Waschen

6. Schritt:

- (a) Zugabe von 200 μL Wasch-Puffer pro Well
- (b) Auslesen der Fluoreszenzintensität im wässrigen Milieu
- (c) Waschpuffer mit Pipette entfernen
- (d) Zugabe von 200 μL EtOH: pro Well
- (e) Inkubationszeit: 5-30 min
- (f) Auslesen der Fluoreszenzintensität im EtOH

3.5.2.1 Parameter und Auswertung

Mittels MTP-Auslesegerät wurden in Fluoreszenz die Signale je Well in einer Dreifachmessung ausgelesen. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen sind in Tabelle 3.3 angegeben. Sofern nicht anders angegeben lag t_{Lag} bei 0 μs . Für $\text{Eu}(\text{TTFA})_3(\text{phen})$ wurde zudem bei $t_{\text{Lag}} = 40 \mu\text{s}$ gemessen. Z_{Pos} wurde auf 16048 μm , t_{Int} auf 20 μs und $\#_{\text{Blitz}}$ auf 10 eingestellt. Der Gain der Detektorspannung wurde für die einzelnen Label auf die höchste CRP Proteinstandardkonzentration hin optimiert oder zur Vergleichbarkeit verschiedener Label angepasst. Die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten aus drei Messungen wurden gemittelt und die Standardabweichung errechnet. Im Anschluss wurden die Mittelwerte gegen die verwendeten CRP-Konzentrationen grafisch aufgetragen und die Kurve mittels 5PL-Fit (siehe Abschnitt 2.1.3.3) angepasst. Dabei wurde der Fitbereich auf CRP-Konzentrationen von 1 bis 1.000.000 mg/mL festgelegt und keine Gewichtung eingestellt. Das Detektionslimit (LOD) wurde aus den mindestens 3 Messungen von Proben ohne CRP-Zugabe (nur Zugabe von Blocking-Puffer) nach Gleichung 2.8 berechnet.

3.5.3 Test unspezifischer und spezifischer Wechselwirkungen SAv-funktionalisierter 100 und 500 nm PS NP

In verschiedene Kavitäten einer MTP wurden jeweils 350 μL eines Phosphatpuffers (100 mM, pH 7,4) (A), einer BSA-Lösung (0,5 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4) (B) und einer BSA-Biotin-Konjugat-Lösung (0,5 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4) (C) gegeben. Die MTP wurde über Nacht bei RT geschüttelt und anschließend zweimal mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden in die jeweiligen Kavitäten A, B und C 350 μL SAv-funktionalisierte, C153-beladene (10 mM)

Tabelle 3.3: Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Farbstoffe im NP und nach Extraktion.

Farbstoff	λ_{ex}	λ_{em}
Farbstoff	[nm]	[nm]
C153	423	533
NR	550	640
Lumogen® F305	540	620
Itrybe	615	780
Eu(TTFA) ₃ (phen)	345	613

100 nm PS NP mit und PEG und 500 nm PS NP ohne PEG (1,4 mg/mL in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4) gegeben, die MTP für 1 h bei RT geschüttelt und dann zweimal mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,4) gewaschen. Im Anschluss wurde 350 μL EtOH zugegeben und das Fluoreszenzsignal nach den Bedingungen aus Abschnitt 3.5.2.1 gemessen.

4 Ergebnisse und Diskussion

Durch den Einsatz von farbstoffbeladenen NP als Label in Immunoassays soll eine möglichst hohe Signalintensität erreicht werden, um die Sensitivität des Assays zu steigern. Hierbei wurden systematisch verschiedene Parameter wie Farbstoff, NP, SAV-Funktionalisierung und Messmethode variiert und zum Abschluss mit einem herkömmlichen ELISA verglichen.

4.1 Herstellung und Charakterisierung der fluoreszenten Nanopartikel

4.1.1 Auswahl der Farbstoffe und Nanopartikel

4.1.1.1 Farbstoffauswahlkriterien

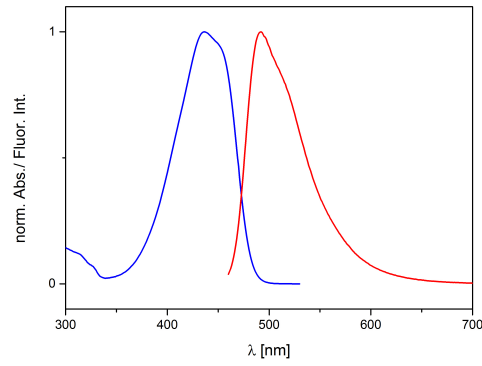
Als Grundlage des Aufbaus eines sehr empfindlichen und modularen Sandwichimmunoassays dienen SAV-funktionalisierte Farbstoff-NP. Auf dieser Basis sollten die ausgewählten Farbstoffe folgende Kriterien erfüllen: Der Farbstoff sollte (a) nicht in Wasser löslich und somit hydrophob sein, da sich sonst die Partikel entweder während der Assaydurchführung auflösen oder der Farbstoff extrahiert wird, (b) fluoreszent sein, da Fluoreszenz empfindlicher als Absorption ist, (c) eine sehr hohe Brillanz, d.h. einen hohen Extinktionskoeffizienten und eine hohe Quantenausbeute aufweisen, (d) einen großen Stokes Shift besitzen, um Reabsorption zu vermeiden, (e) thermisch stabil und (f) photostabil sein, um ein mögliches Ausbleichen der Partikel zu verhindern, (g) preiswert sein, (h) ggf. eine Absorptionsbande bei 400 nm bzw. 450 nm aufweisen, da bei diesen Wellenlängen typische Auslesegeräte in der Medizin arbeiten, und (i) in organischen, nicht-toxischen Lösungsmitteln wie EtOH, die eine MTP nicht angreifen können, löslich sein.

Als geeignete Kandidaten wurden Cumarin 7 (C7), Cumarin 153 (C153) aus der Klasse der Cumarin-Farbstoffe und *meso*-Tetraphenylporphyrin (TPP) aus der Klasse der Porphyrine aufgrund ihrer Absorptionsbanden im Wellenlängenbereich von 400 bis 450 nm und ihres hohen molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten identifiziert (Abbildung 4.1 (a)-(c)). Cumarin-Farbstoffe werden auf Grund ihrer spektroskopischen Eigenschaften häufig als Laserfarbstoffe eingesetzt [141, 142] und zeigen in organischen Lösungsmitteln eine sehr hohe Quantenausbeute. TPP ist in Ethanol nur mäßig löslich und zeigt nur eine geringe Quantenausbeute, zeichnet sich aber durch einen sehr hohen molaren Extinktionskoeffizienten im Spektralbereich 400 - 450 nm aus. Aufgrund seiner schmalen und stark ausgeprägten Absorptionsbande im UV-Bereich (Soret-Bande) [143]

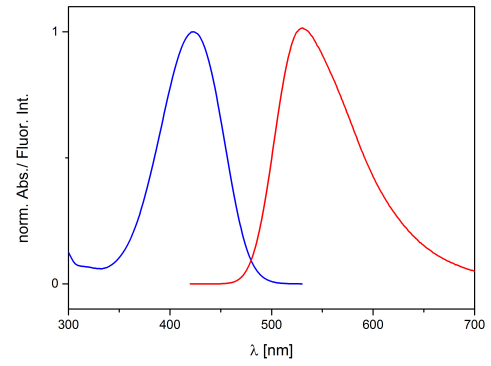
Tabelle 4.1: Spektroskopische Eigenschaften der verschiedenen Farbstoffe: Absorptions- λ_{abs} und Emissionsmaximum λ_{em} , Extinktionskoeffizient $\epsilon(\lambda_{\text{abs}})$ und Quantenausbeute Φ_f .^a [150]

Farbstoff	λ_{abs} [nm]	$\epsilon(\lambda_{\text{abs}})$ [mol ⁻¹ cm ⁻¹ L]	λ_{em} [nm]	Φ_f [%]	Lsm.
C153	423	17900	525	57	EtOH
C7	436	50800	492	93	EtOH
Eu(TTFA) ₃ phen	352	57200	612	24	THF
Eu(dbm) ₃ phen	342	57200	614	1	THF
F305	577	41100	614	63	EtOH
Itrybe	608	55800	766	22 ^a	EtOH
NR	548	36200	628	72	EtOH
TPP	417	479000	653	7	THF

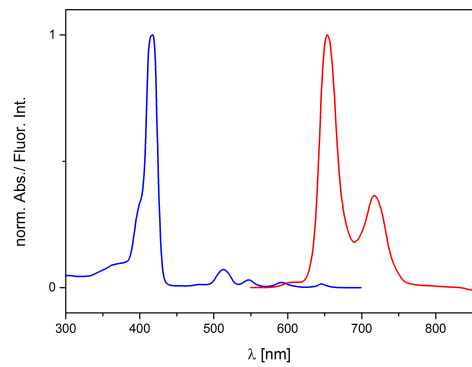
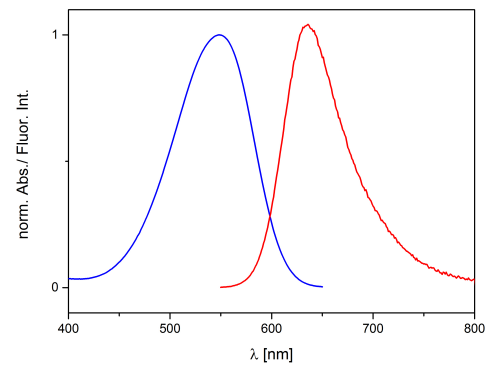
ist TPP jedoch besonders gut geeignet, Signale in Absorption in Immunoassays zu detektieren. Unabhängig von ihrer Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge wurden auch weitere Farbstoffe ausgewählt wie bspw. der Laserfarbstoff Nilrot (Abbildung 4.1 (d)). Aufgrund seines solvatochromen Verhaltens findet dieser Phenoxazin-Farbstoff häufig Anwendung beim Anfärben von Zellen oder als Polaritätssonde [144–149]. Zudem besitzt Nilrot einen sehr großen Stokes Shift. Der kationische Heptamethin-Farbstoff Itrybe [140, 150] ist ebenfalls geeignet. Er besitzt eine sehr breite Absorptionsbande und emittiert im NIR-Bereich (Abbildung 4.1 (e)) innerhalb des diagnostischen Fensters, in dem die Absorption, Streuung und Autofluoreszenz von Wasser und Blutbestandteilen auf ein Minimum reduziert ist [140, 151]. Des Weiteren besitzt Itrybe in polaren und protischen Lösungsmitteln gegenüber anderen NIR-Farbstoffen eine sehr hohe Quantenausbeute. Auch der photostabile Lumogen[®]-Farbstoff F305 [152–155] zeichnet sich als potentieller Kandidat aus. Er gehört zu der Klasse der Perylenbisimide, die im Allgemeinen für ihre hohe Brillanz, thermische und chemische Stabilität und ihre Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln (Abbildung 4.1 (f)) bekannt sind [156]. Lanthanoid-Komplexverbindungen werden ebenfalls in Immunoassays, unter anderem in Multiparameterassays [157], beim Bau von organischen Leuchtdioden (OLED) oder als Laserfarbstoffe [158] eingesetzt. Als vielversprechend gelten Eu(TTFA)₃phen und Eu(dbm)₃phen (Abbildungen 4.1 (g) und (h)) [159–161]. Solche Eu-Komplexe mit β -Diketonato-Liganden absorbieren im UV-Bereich und emittieren bei 612 nm, wobei die Emissionsbanden sehr schmal sind. Sie besitzen eine hohe Quantenausbeute, eine lange Lebensdauer und sind für zeitverzögerte Fluoreszenzmessungen gut geeignet [162]. Die spektralen Eigenschaften der Farbstoffe (a)-(h) sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Die Strukturformeln sind in Abbildung 7.2 im Anhang gezeigt.



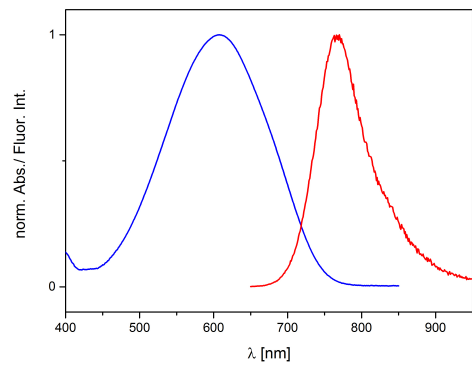
(a) Cumarin 7



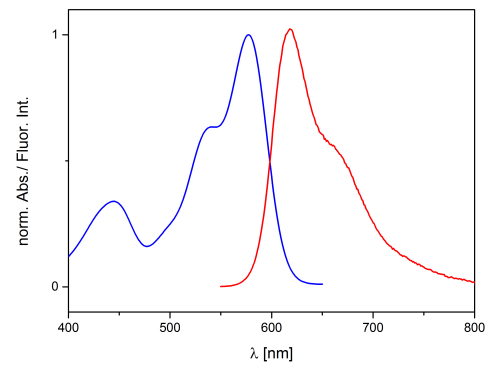
(b) Cumarin 153

(c) *meso*-Tetraphenylporphyrin

(d) Nilrot



(e) Itrybe



(f) Lumogen® F305

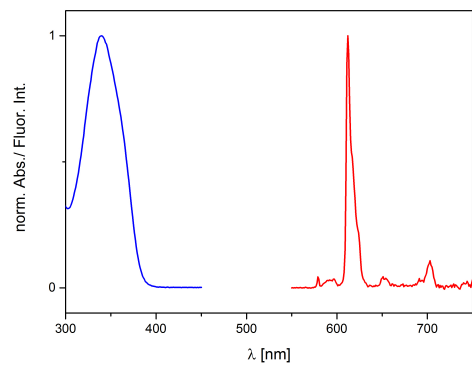
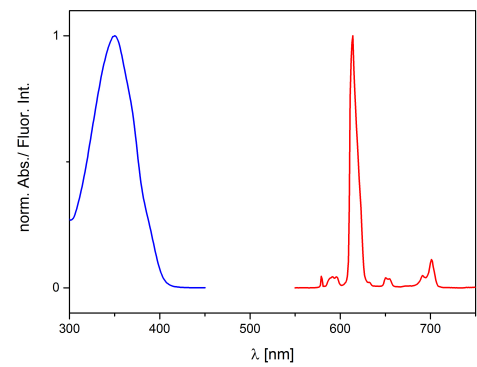
(g) Eu(TTFA)₃phen(h) Eu(dbm)₃phen

Abbildung 4.1: Normierte Absorptions- (blau) und Emissionsspektren (rot) der verschiedenen Farbstoffe.

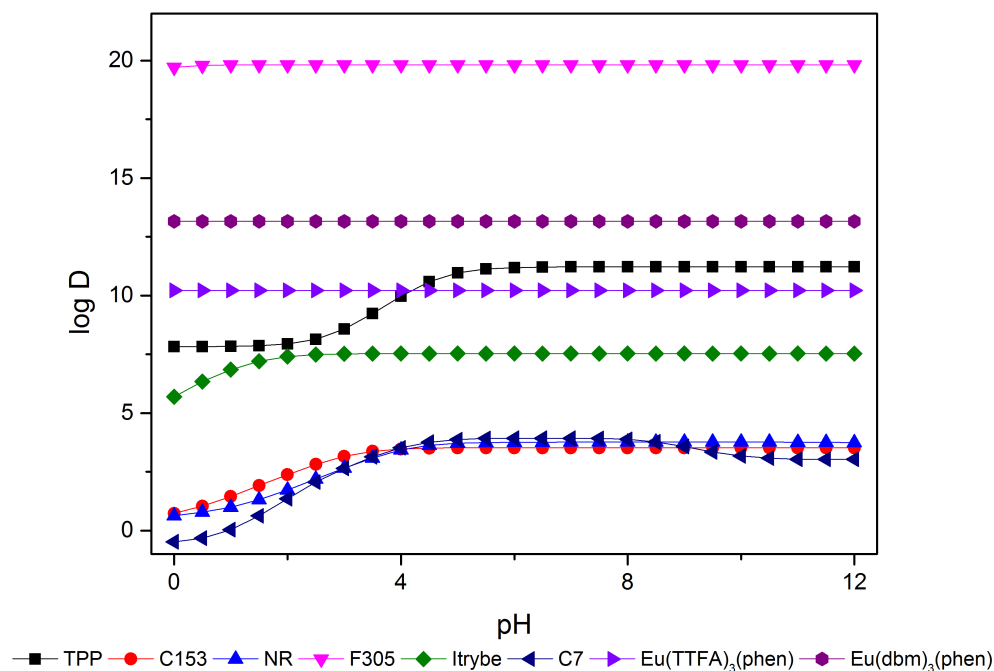


Abbildung 4.2: Log D-Werte verwendeter Farbstoffe.

4.1.1.2 Log D-Werte

Zum Abschätzen der Hydrophobizität der Farbstoffe kann der log D-Wert herangezogen werden, welcher theoretisch berechnet werden (siehe Anhang, Gleichung 7.1) und pH-Wert-abhängig sein kann. Werte von > 0 entsprechen dabei hydrophoben Farbstoffen. Wie aus Abbildung 4.2 hervorgeht, liegen die Werte aller Farbstoffe bei einem pH-Wert von 7 bei einem log D-Wert von über 3,5. Bei der Herstellung der NP kann der pH-Wert durch die Zugabe von Zusatzstoffen und organischen Lösungsmitteln variieren, jedoch können auch über weite pH-Wertbereiche die log D-Werte als konstant angenommen werden (siehe Abbildung 4.2). Als besonders hydrophob erweist sich dabei F305, gefolgt von den Lanthanoidkomplexen und TPP. Im Allgemeinen besitzen polyzyklische, aromatische Stoffe höhere log D-Werte.

4.1.1.3 Nanopartikelauswahlkriterien

Neben den Anforderungskriterien an die Farbstoffe stellen sich auch Anforderungen an die partikulären Label, die sich unter anderem vom Ziel ableiten, möglichst hohe Signalintensitäten durch Verkapseln großer Farbstoffmengen zu erreichen, definierte Mengen an Farbstoff je NP einzubauen, um reproduzierbare Immunoassays durchzuführen, und ausreichende Mengen an zugänglichen funktionellen Gruppen zur Anbindung von SA_v zur Verfügung zu haben. Dabei ist es von besonderem Interesse, dass die NP (a) sich in einem wässrigen Medium nicht auflösen lassen, jedoch in einem organischen Lösungsmittel auflösbar sind oder sich der Farbstoff aus der Partikelmatrix extrahieren lässt. Am geeignetsten ist ein nicht-toxisches Lösungsmittel

wie EtOH. Zudem müssen die NP (b) im wässrigen Milieu bei verschiedenen pH-Werten suspendierbar sein, und nicht zur Aggregation neigen, und sich (c) definiert und reproduzierbar mit einer engen Größenverteilung (d) kostengünstig und einfach herstellen lassen. (e) An ihrer Oberfläche müssen die NP funktionelle Gruppen zur kovalenten Anbindung von Biomolekülen tragen. Zudem sollen die biofunktionalisierten NP (f) spezifisch an die Detektionsantikörper binden und (g) geringe unspezifische Wechselwirkungen mit der MTP sowie der biologischen Matrix aufweisen.

Für die Herstellung der NP-Label wurden entsprechend der beschriebenen Kriterien zwei partikuläre Systeme, Farbstoff-NP mittels „Top-down“-Verfahren (Abschnitt 4.1.2.1) und PS NP, welche mit Farbstoffen beladen werden (Abschnitt 4.1.3.1), ausgewählt.

4.1.2 Farbstoffnanopartikel mittels „Top-down“-Verfahren

4.1.2.1 Herstellung durch Nassmahlung

Nach Brümmel et al. [23, 24, 56, 57] lassen sich solche Systeme durch Nassmahlung von Farbstoffen und zeitgleicher Tensidstabilisierung herstellen. Zudem dienen die geladenen Tenside dazu, die Partikel im Anschluss zu funktionalisieren, was durch das Beschichten mit verschiedenen, alternierend geladenen PE geschieht (LbL-Technik). Die letzte PE-Schicht trägt funktionelle Gruppen, an denen Streptavidin kovalent angebonden werden kann. Zur Herstellung der Partikel wurden die Farbstoffe C7 und C153 als Testsubstanzen mit SDS in Wasser durch abwechselndes Schütteln im Vortexer und Behandeln im Ultraschallbad durch den Zusatz von Glasperlen vermahlen. In Tabelle 4.2 sind die Ergebnisse der DLS sowie die Zetapotentiale der NP angegeben.

Tabelle 4.2: NP-Größen $\varnothing_{Z-Average}$, PDI und Zetapotentiale Φ_{ζ} ausgewählter C7- und C153-Farbstoff-NP.

Farbstoff	$\varnothing_{Z-Average}$ [nm]	PDI	Φ_{ζ} [mV]
C7	287±12	0,4	-26±1
C153	370±11	0,4	-43±1

Aus den PDI-Werten folgt, dass es sich um polydisperse Proben mit einer breiten Größenverteilung handelt, wobei die durchschnittlichen Partikelgrößen zwischen 200 bis 400 nm liegen. Da jedoch die Analyse polydisperser Partikelproben mittels DLS wie in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben durch die Kumulantenanalyse nicht geeignet ist, können die so gewonnenen Daten nur einen Hinweis auf die Größenverteilung geben. Im Vergleich dazu wurden intensitätsgewichtete Größenverteilungen mittels DLS aufgenommen (Abbildung 4.3). Hier ist zu erkennen, dass in der polydispersen Probe Partikelgrößen zwischen 50 bis 1.000 nm sowie größere Aggregate erhalten wurden. Jedoch verschiebt sich die intensitätsgewichtete Verteilung zu Gunsten größerer Partikel. Daher wurden zusätzlich REM-Messungen durchgeführt (Abbildung 4.4). Wie zu erkennen ist, wurden nach der Synthese amorphe, polydisperse NP mit einer breiten Größenverteilung mit Partikelgrößen von ca. 50 bis ca. 5.000 nm erhalten. Folglich war die nach Brümmel et al. angewandte Methode hinsichtlich der Homogenität

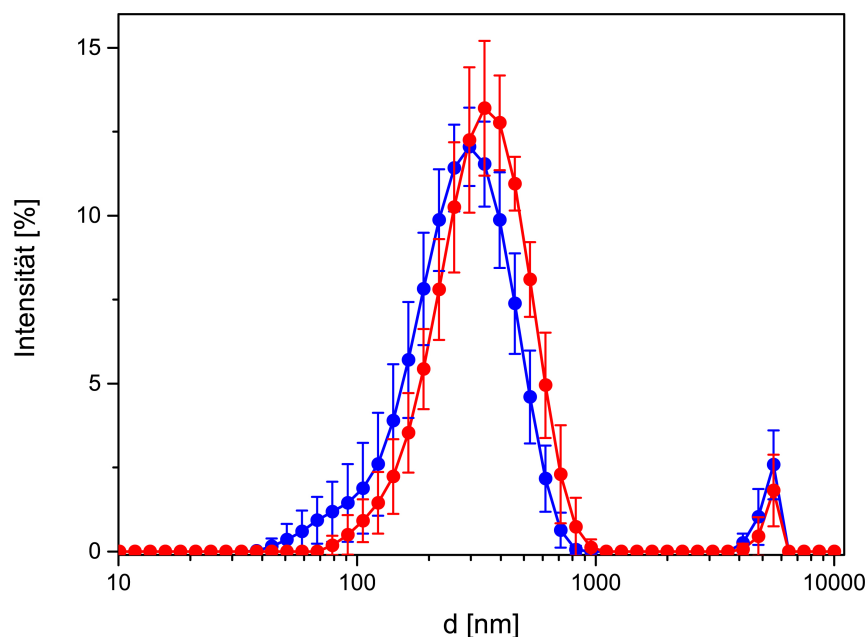


Abbildung 4.3: Intensitätsgewichtete Größenverteilungen von C7- (blau) und C153-Farbstoff-NP (rot) nach der Synthese. Standardabweichungen entstanden aus 6 unabhängigen Messungen.

der Probe nicht erfolgreich. Ferner wurde versucht, durch Zentrifugation und den Einsatz von Spritzenfiltern die Partikel in einzelne Größenfraktionen zu separieren, was nicht erfolgreich war, da es durch die wirkenden Scherkräfte zu Aggregation der NP kam. Die Erhöhung der Mahldauer führte zu keinen kleineren NP bzw. engeren Größenverteilungen.

Hinsichtlich ihrer Stabilität besitzen die Partikel in Wasser suspendiert Zetapotentiale von -25 bis -65 mV. Trotz des ausreichenden Zetopotentials und der Lagerung bei 4 bis 8°C sind die Partikel nicht lange stabil und es bildeten sich nach mehreren Tagen sichtbar große Farbstoffaggregate, die sich als Bodensatz ablagerten, was eine Folge des Ostwald-Reifungsprozesses und der geringen Wechselwirkung des Tensids mit der Oberfläche der Farbstoffpartikel sein kann. In Abbildung 4.5 sind C7-Farbstoff-NP nach der Synthese (Tag 0) nach mehreren Tagen mittels DLS wiederholt vermessen worden. Es ist deutlich erkennbar, dass die Größenverteilung breiter geworden ist und sich zu größeren NP verschoben hat. Analog verhält es sich mit C153-Farbstoff-NP. Daher ist es notwendig, die Partikel zeitnah nach der Synthese durch Beschichtung mit PE weiter zu stabilisieren.

4.1.2.2 Stabilisierung mittels Layer-by-Layer-Verfahren

Durch das Aufbringen alternierender, entgegengesetzt geladener PE-Schichten lassen sich die Farbstoff-NP stabilisieren und funktionalisieren. Zum Beschichten der synthetisierten Farbstoff-NP wurden PAH und ALG (Abbildung 2.11) verwendet. Das

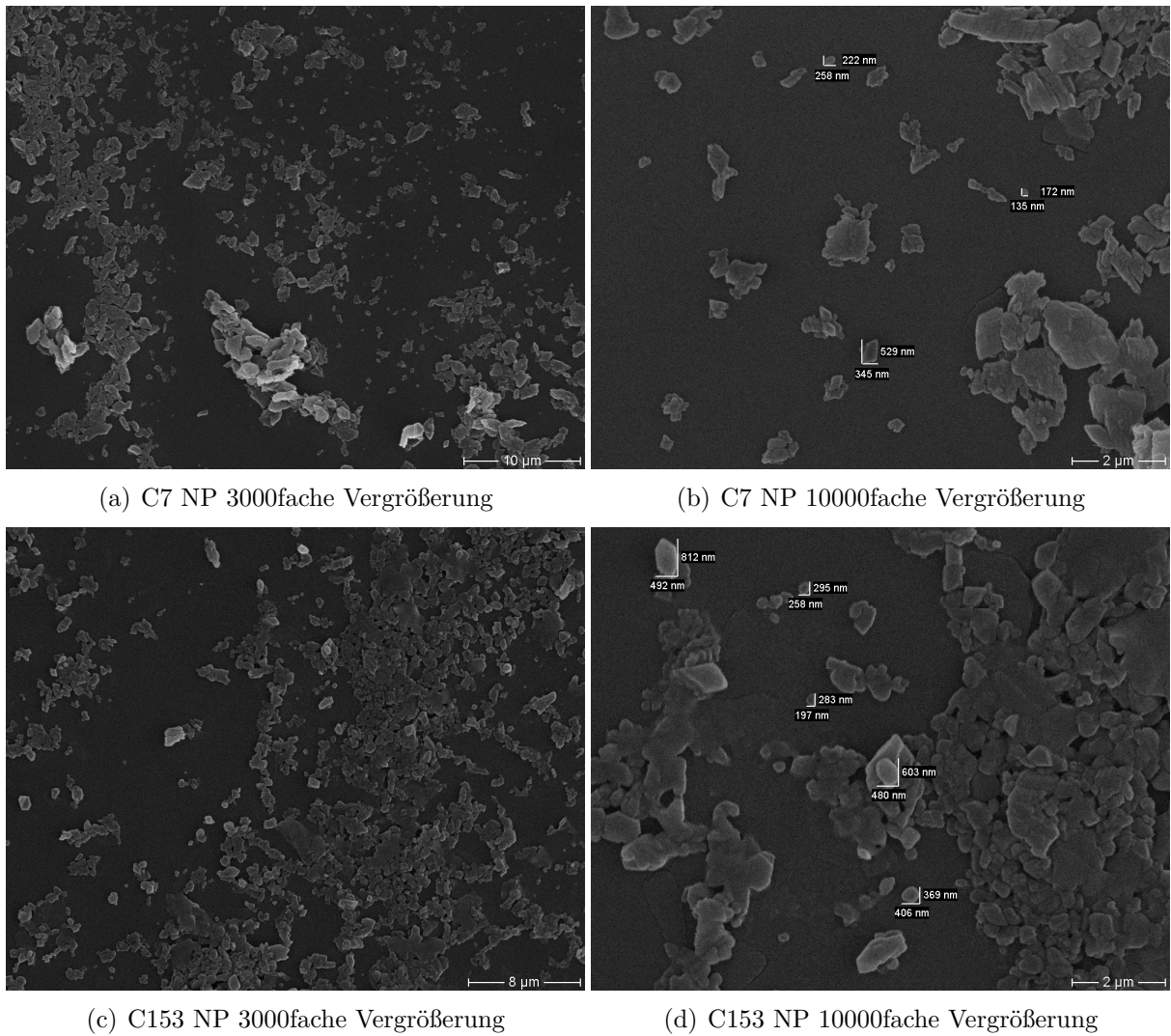


Abbildung 4.4: REM-Aufnahmen von SDS-stabilisierten C7- und C153-Farbstoff-NP.

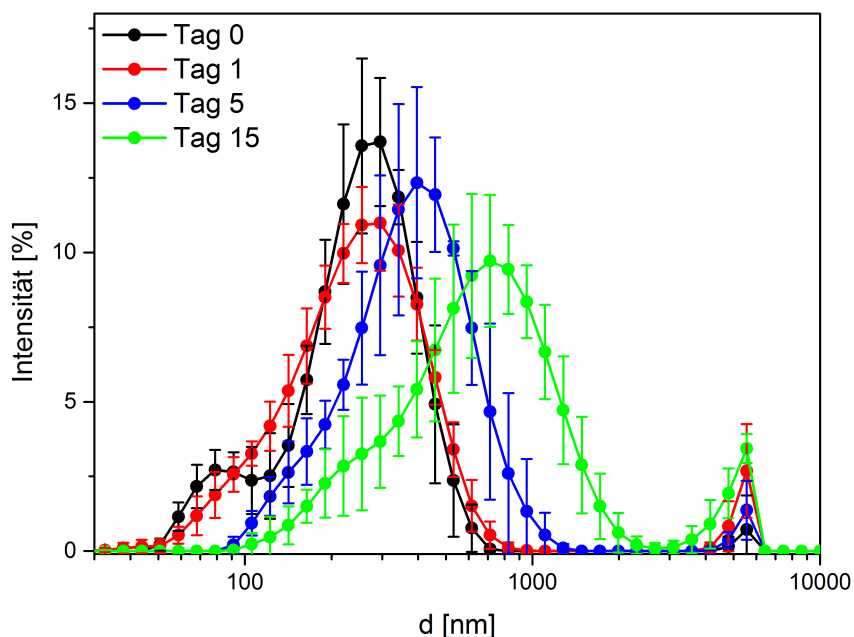


Abbildung 4.5: Intensitätsgewichtete Größenverteilungen von C7-Farbstoff-NP nach der Synthese und nach 15 Tagen. Standardabweichungen entstanden aus 6 unabhängigen Messungen.

Aufbringen der PE-Schichten erfolgte durch Suspendieren der NP in einer PE-Lösung definierter Konzentration in Puffer oder Wasser mit oder ohne Salzzusatz. Typische PE-Konzentrationen liegen in der Größenordnung von mehreren Milligramm pro Milliliter [101], wobei häufig 1 bis 5 mg/mL verwendet werden. Der pH-Wert beeinflusst neben dem Protonierungsgrad von schwachen PE auch deren Ladungsdichte und damit ihre Konformation und Interaktion untereinander. Durch die Wahl eines geeigneten pH-Wertes kann die Schichtdicke der PE-Schichten [163, 164] eingestellt werden. Durch den Zusatz von Salzen wie Natriumchlorid kann ebenfalls die Konformation und somit die Schichtdicke variiert werden [101, 165].

Um die optimalen Bedingungen des LbL-Verfahrens nach Brümmel et al. für die Beschichtung der synthetisierten Cumarin-NP zu finden, wurden verschiedene PE-Konzentrationen in einer NaCl-Lösung zum Beschichten verwendet. Aus den Abbildungen 4.6 (a) und (b) folgt anhand des positiv und negativ alternierenden Zetapotentials nach jedem Beschichtungsschritt, dass sich die Partikel mit jeweils zwei alternierenden Schichten PAH und ALG beschichten lassen. Es ist ebenfalls zu erkennen, dass die PAH-Menge einen Einfluss auf die Höhe des Zetapotentials hat. Für die C7-Farbstoff-NP gilt, je größer die eingesetzte Menge an PE, desto höher das Zetapotential. Die Ladung bei geringeren PE-Mengen liegt hier bei ca. 15 mV und bei großen PAH-Mengen bei 25 - 45 mV nach der 1. bzw. 2. Beschichtung mit PAH. Bei C153-Farbstoff-NP variiert das Zetapotential ebenfalls mit verschiedenen PAH-Mengen. Jedoch verhält sich das Zetapotential entgegengesetzt zur ansteigenden PAH-Menge. Je

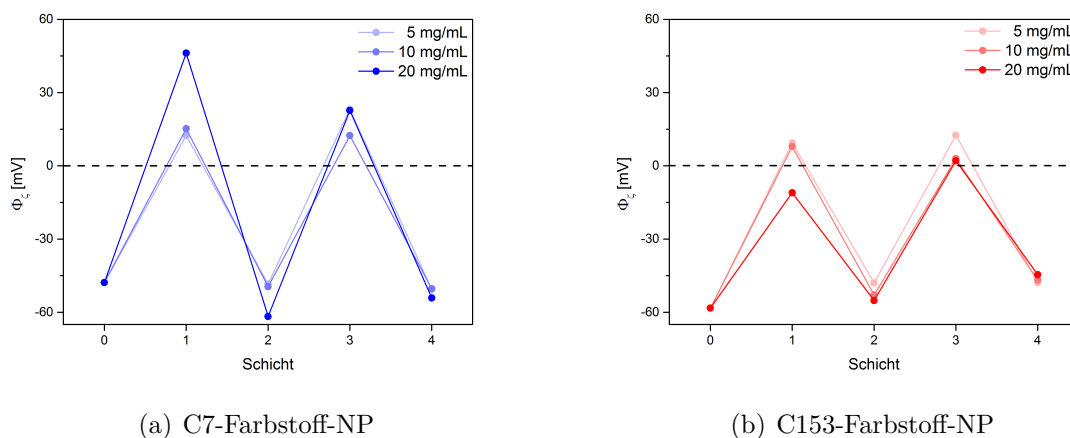


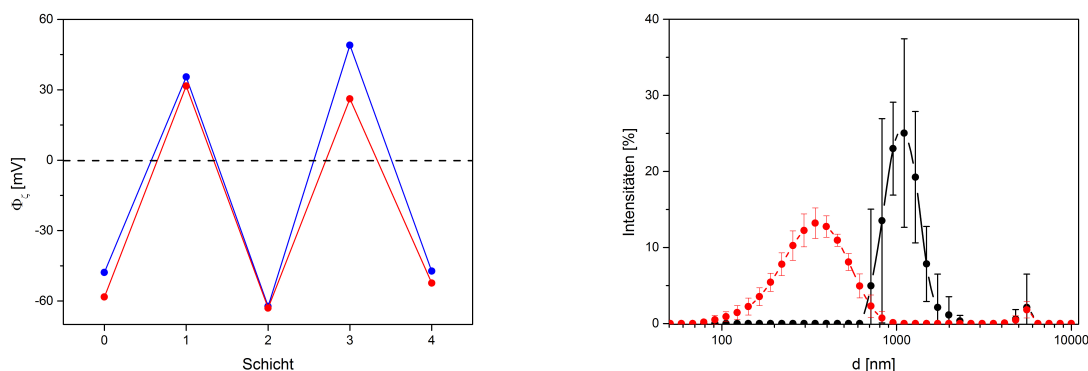
Abbildung 4.6: Zetapotentiale Φ_ζ von (a) C7- und (b) C153-Farbstoff-NP vor und nach dem Beschichten mit jeweils zwei alternierenden Schichten PAH und ALG mit verschiedenen PE-Konzentrationen jeweils (5, 10 und 20 mg/mL). Die Mittelwerte der Zetapotentiale entstanden aus 6 unabhängigen Messungen. Standardabweichungen liegen je Messwert unter 4 mV.

höher die PAH-Menge, desto kleiner das Zetapotalential. Die ALG-Menge wiederum besitzt nur einen geringen Einfluss auf die Höhe des Zetapotalentials, welches bei ca. -45 mV konstant bleibt. Obwohl ALG wie PAH ein schwacher PE ist, ist die Ladungsinversion vollständig bzw. größer. Ein Grund für die unvollständige Ladungsinversion nach der ersten Beschichtung mit PAH könnte sein, dass PAH einige Tensidmoleküle abreißt und dadurch weniger Ladungen auf der Oberfläche vorhanden sind [166]. Zudem hat die Konzentration von Leitsalzen und pH-Wertänderungen einen empfindlichen Einfluss auf die Zetapotalentialmessung, weshalb das gemessene Zetapotalential trotz Puffer variieren kann.

Zur weiteren Optimierung der Beschichtungsprozedur wurden die PE-Konzentrationen angepasst. Die Konzentration des PAH wurde auf 20 mg/mL gesetzt, während die Konzentration des ALG auf 5 mg/mL reduziert wurde. In Abbildung 4.7 (a) ist zu erkennen, dass die Zetapotentiale nach der Beschichtung des PAH über 25 mV liegen und die Partikel stärker stabilisiert sind.

Bei Betrachtung der Größenverteilung der beschichteten NP, hier am Beispiel von einer repräsentativen Probe C153-Farbstoff-NP mit vier alternierenden PE-Schichten (Abbildung 4.7 (b)), ist zu erkennen, dass die Größe der NP zunimmt und diese nach DLS im Mittel 1.000 nm groß sind. Bei Betrachtung von REM-Aufnahmen (Abbildung 4.8) der gleichen Probe wird ersichtlich, dass die Partikel partiell aggregiert sind und Größen von 1.000 nm besitzen. Eventuell aggregieren die NP während der Aufreinigung bei der Zentrifugation. Es kann zudem eine Folge von LbL-bedingter Quervernetzung mehrerer NP sein. Des Weiteren können auch einzelne PE-Schichten im folgenden Beschichtungsschritt abgerissen worden und aggregiert sein. Für die letzten beiden Varianten spricht Abbildung 4.8 links oben, da hier nicht-farbstoffgefüllte Netzstrukturen zu sehen sind.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Verkapseln und Stabilisieren von C7



(a) Zetapotentiale von C7- und C153-Farbstoff-NP (b) Intensitätsgewichtete Größenverteilung von C153-Farbstoff-NP

Abbildung 4.7: (a) Zetapotentiale Φ_z von C7- (blau) und C153-Farbstoff-NP (rot) vor und nach dem Beschichten mit jeweils zwei alternierenden Schichten PAH und ALG mit unterschiedlichen PE-Konzentrationen (20 mg/mL PAH; 5 mg/mL ALG). Die Standardabweichungen liegen pro Messwert unter 4 mV. (b) Repräsentative intensitätsgewichtete Größenverteilung von C153-Farbstoff-NP vor (rot) und nach (schwarz) der Beschichtung mit vier alternierenden PE-Schichten (PAH/ALG/PAH/ALG). Die Mittelwerte und Standardabweichungen entstanden aus 6 unabhängigen Messungen.

und C153 als Testsubstanzen realisiert werden konnte. Jedoch sind die hergestellten Farbstoff-NP nur über wenige Tage stabil. Ebenso weisen die NP eine sehr breite Größenverteilung auf, was zu unterschiedlich großen Farbstoffmengen je NP führt und die NP für spätere Anwendungen als NP-Label einschränkt. Um genaue und reproduzierbare Messwerte zu erhalten, ist die definierte Menge an Farbstoffen je Antigen ein wichtiger Parameter.

Durch das Beschichten der NP mit PE lassen sich die NP weiter stabilisieren, jedoch kommt es infolgedessen zu noch breiten Größenverteilungen durch Quervernetzung. Ggf. sind die gebildeten NP zu groß für Anwendungen in Immunoassays. Gleichzeitig können auch PE NP entstehen, die keinen Farbstoff in sich tragen, was den Einsatz als Label noch weiter einschränkt, da diese NP kein Signal erzeugen können.

4.1.3 Farbstoffbeladene Polystyrolnanopartikel

4.1.3.1 Farbstoffbeladung

Als zweites System wurden PS NP, die nach einer Methode von Behnke et al. mit Farbstoffen beladen wurden, getestet. Nach dieser Methode lassen sich hydrophobe Farbstoffe mit log D-Werten (Tabelle 4.3), die größer 1 sind, in PS NP einquellen [25]. Der Vorteil von Polymerpartikeln ist, dass sie sich reproduzierbar mit einer monodispersen Größenverteilung in definierten Größen herstellen lassen (Abbildung 4.9 (a)) oder kostengünstig, kommerziell, mit verschiedenen Oberflächenfunktionalitäten verfügbar sind.

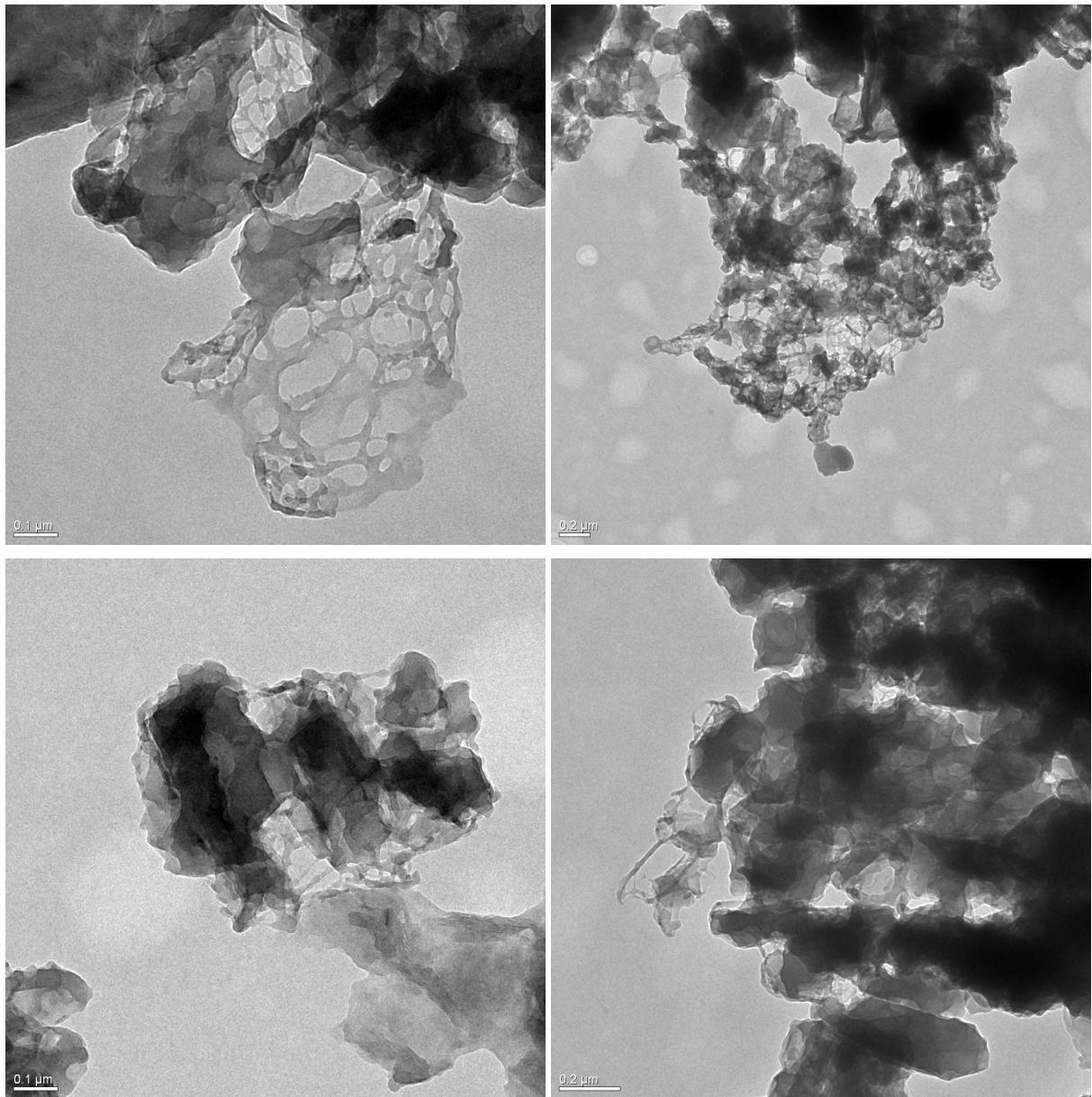


Abbildung 4.8: TEM-Aufnahmen von SDS-stabilisierten C153-Farbstoff-NP nach vier alternierenden PE-Schichten (PAH/ALG/PAH/ALG). Maßstab 0,1 (linke Seite) bis 0,2 μm (rechte Seite).

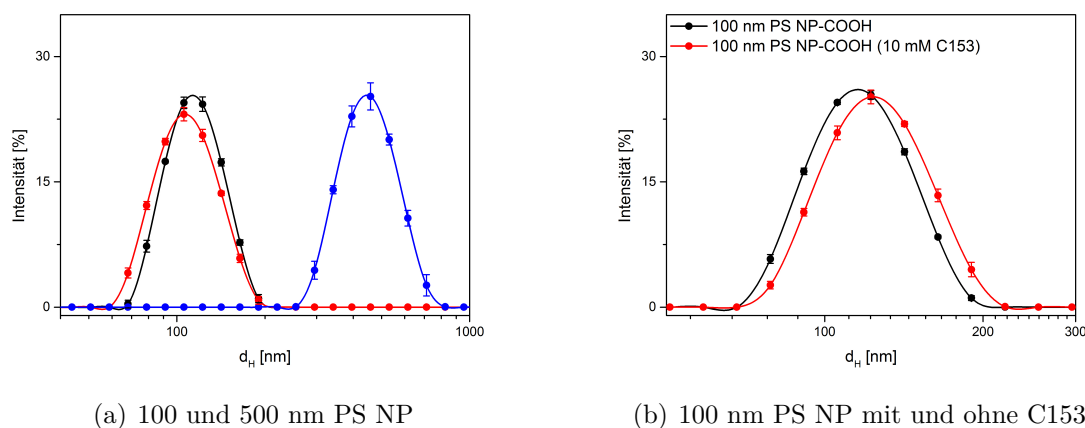


Abbildung 4.9: Mittels DLS gemessene intensitätsgewichtete, monodisperse Größenverteilungen von (a) 100 nm PS NP mit einer carboxy- (schwarz) und aminofunktionalisierten (rot) Oberfläche und 500 nm (blau) PS NP mit einer carboxyfunktionalisierten Oberfläche und von (b) 100 nm PS NP mit einer carboxyfunktionalisierten Oberfläche vor (schwarz) und nach (rot) der Beladung mit C153 (10 mM). Die Messwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus 5 unabhängigen Messungen. Die PDI lagen unterhalb von 0,05.

Die Farbstoffmenge, die NP-Größe und die SAV-Anbindung können für die spätere Anwendung der NP als Label in Immunoassays einen Einfluss auf den Assay haben. Die Größen verwendeter NP, wie z.B. Halbleiterquantenpunkte, Gold- und Silber-NP, Latexpartikel sowie magnetische Partikel, in Immunoassays reichen von wenigen nm bis mehreren μm [59, 167–176]. Deshalb wurden zwei verschiedene NP-Größen ($\varnothing_{\text{NP}} = 100, 500$ nm) und PS NP mit zwei verschiedenen Oberflächenfunktionalitäten (carboxylierte und aminierte 100 nm PS NP) mit verschiedenen Farbstoffkonzentrationen (0,5 bis 10 mM Farbstoff in THF, Beladungskonzentration der Farbstofflösung vor dem Einquellen) beladen (Tabelle 4.3). Durch die Beladungsprozedur wurde der Partikeldurchmesser nicht wesentlich beeinflusst. In Abbildung 4.9 ist der Größenzuwachs von carboxylierten 100 nm PS NP nach dem Einquellen mit C153 dargestellt. Einige Farbstoffe führten beim Beladen mit höheren Farbstoffkonzentrationen zum Ausflocken der Partikel (Tabelle 4.3). Die Farbstoffe C7 und $\text{Eu}(\text{dbm})_3\text{phen}$ wurden aufgrund ihrer ähnlichen spektroskopischen Eigenschaften gegenüber C153 und $\text{Eu}(\text{TTFA})_3\text{phen}$ und wegen ihres Ausflockens bei vergleichsweise geringen Beladungskonzentration für weitere Versuche ausgeschlossen. Zudem ist die Quantenausbeute des $\text{Eu}(\text{dbm})_3\text{phen}$ -Komplexes um das 24-fache kleiner als die des $\text{Eu}(\text{TTFA})_3\text{phen}$ -Komplexes.

4.1.3.2 Bestimmung des Farbstoffgehaltes

Um die Menge an eingequollenem Farbstoff zu bestimmen, können die gefärbten PS NP entweder in THF aufgelöst oder der Farbstoff mit EtOH extrahiert werden. Beide Methoden liefern vergleichbare Ergebnisse. Im zweiten Fall müssen die Partikel abgetrennt werden, um die Partikelstreuung, welche zur Absorption beiträgt, zu unterdrücken [58].

Tabelle 4.3: Berechnete log D-Werte bei einem pH-Wert von 5,5 (pH-Wert des Quelllösungsmittelgemisches [177]) von verschiedenen Farbstoffen, eingequollen in aminierte und carboxylierte 100 und 500 nm PS NP.

Farbstoff	\varnothing_{NP} [nm]	COOH/ NH ₂	log D	c_{Beladung} [mM]	Ausflocken
C153	100	COOH	3,5	0,5; 1; 2; 5; 10	nein
C153	100	NH ₂	3,5	10	nein
C153	500	COOH	3,5	10	nein
C7	100	COOH	3,9	0,5; 1; 2	ja
Eu(dbm) ₃ phen	100	COOH	13,2	1	ja
Eu(TTFA) ₃ phen	100	COOH	10,2	1	ja
F305	100	COOH	19,8	0,5; 1; 2; 10	nein
Itrybe	100	COOH	7,5	0,5	ja
NR	100	COOH	3,8	0,5; 1; 2	nein
TPP	100	COOH	11,1	0,5; 1; 2	nein

Einflussfaktoren auf Farbstoffbeladung. Die Fähigkeit eines Farbstoffes in die Polymermatrix eingequollen zu werden, hängt neben dem log D-Wert von noch weiteren Faktoren ab, wie z.B. von seiner Löslichkeit im Quelllösungsmittelgemisch, von seiner Ladung und der Wechselwirkung mit den NP.

Beladungseffizienzen. In Tabelle 4.4 sind die Beladungseffizienzen δ (Verhältnis von eingequollener Farbstoffmenge zu eingesetzter Beladungsmenge) und die Anzahl eingequollener Farbstoffe je NP der ausgewählten Farbstoffe (siehe Abschnitt 4.1.1.1) C153, TPP, Nilrot, Itrybe, Lumogen® F305 und Eu(TTFA)₃phen für aminierte und carboxylierte 100 und 500 nm PS NP angegeben. Zu erkennen ist, dass die Beladungseffizienz der nicht-ionischen Farbstoffe C153, F305, Nilrot und TPP mit ansteigendem log D-Wert (Tabelle 4.3) ebenfalls ansteigt (Abbildung 4.10). Lumogen® F305 wurde zu fast 100 % in den 100 nm PS NP eingequollen, was an seinem hohen log D-Wert liegt. Da TPP auch einen hohen log D-Wert mit 11 besitzt, wird auch dieser Farbstoff bis zu 80 % in die Polymermatrix eingebaut. Die Farbstoffe mit den geringsten log D-Werten NR und C153 werden zu 60 bzw. 50 % eingequollen. Itrybe und Eu(TTFA)₃phen fallen bereits bei geringen Beladungskonzentrationen (> 0,5 bzw. > 1 mM) aufgrund der hohen Polarität des THF-Wasser-Gemisches aus. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass die Beladungseffizienzen von ca. 20 % trotz der hohen log D-Werte gering ist.

Tabelle 4.4: Beladungseffizienzen δ , mittlere Anzahl an Farbstoffen je NP und Quantenausbeuten Φ_f von verschiedenen Farbstoffen eingequollen in aminierte und carboxylierte 100 und 500 nm PS NP.

Farbstoff	\varnothing_{NP} [nm]	COOH/ NH ₂	c_{Beladung} [mM]	δ [%]	Anzahl an Farbstoffen je NP	Φ_f [%]
C153	100	COOH	10	51	$56 \cdot 10^3$	22
C153	100	NH ₂	10	41	$45 \cdot 10^3$	20
C153	500	COOH	10	79	$10.850 \cdot 10^3$	20
Eu(TTFA) ₃ phen	100	COOH	1	21	$2 \cdot 10^3$	39
F305	100	COOH	10	100	$110 \cdot 10^3$	14
Itrybe	100	COOH	0,5	20	$1 \cdot 10^3$	6
NR	100	COOH	2	64	$14 \cdot 10^3$	13
TTP	100	COOH	2	76	$17 \cdot 10^3$	4

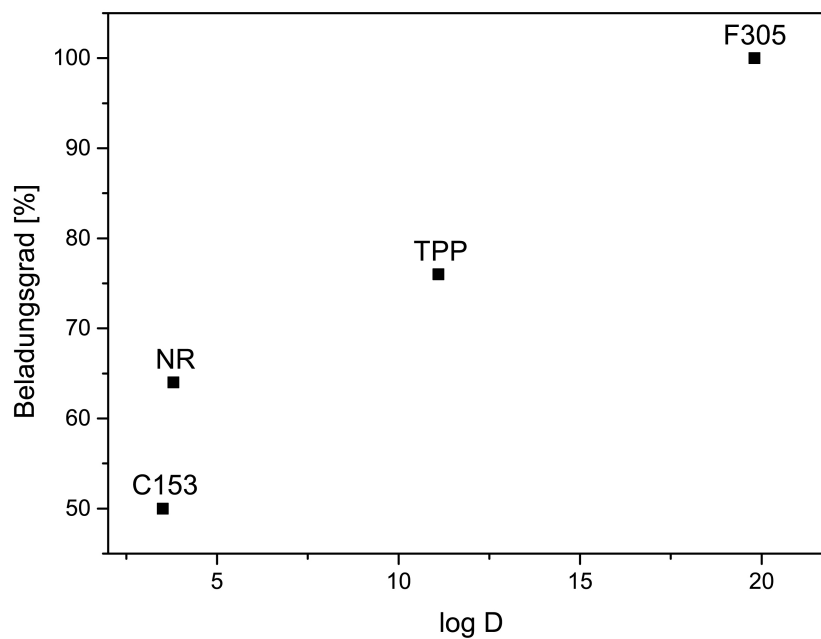


Abbildung 4.10: Korrelation des log D-Wertes und der Beladungseffizienz von carboxylierten, 100 nm PS NP mit verschiedenen neutralen, organischen Farbstoffen.

4.1.3.3 Vergleich der Beladungseffizienzen und spektroskopischen Eigenschaften

Um die spektroskopischen Eigenschaften und die Beladungseffizienzen von carboxylierten, 100 nm PS NP zu vergleichen, wurden diese mit C153 in verschiedenen Farbstoffkonzentrationen beladen. Anschließend wurde die Menge an eingequollenem Farbstoff durch Auflösen der Partikel in THF bestimmt. Zudem wurden die Quantenausbeuten (absolut) und die Absorption von C153 im NP gemessen.

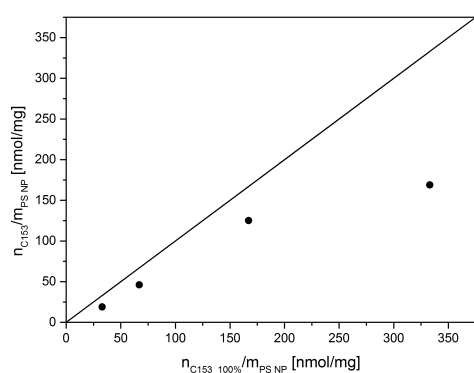
Wie aus Abbildung 4.11 (a) hervorgeht, steigt die Menge an eingequollenem C153 mit steigender Konzentration der Beladungslösung an, bis es zu einer Sättigung kommt und die Beladungseffizienz abnimmt. Bei höheren Beladungskonzentrationen beginnt C153 auszufallen. Die höchste Beladungseffizienz von ca. 70 % wurde für eine Ausgangskonzentration von 2 bis 5 mM erreicht.

Die absolute Quantenausbeute von freiem C153 in Styrol (Monomer) beträgt 87 % wohingegen die gemessene Quantenausbeute von C153 im NP mit steigendem Farbstoffgehalt je NP, wie in Abbildung 4.11 (b) gezeigt, sinkt. Eine Erklärung hierfür sind vermutlich die Bildung nicht-fluoreszenter Dimere oder Fluoreszenzlöscheffekte durch die Polymermatrix, Unterschiede im lokalen elektrischen Feld und Reabsorptionseffekte (siehe Abschnitt 2.1.2.1) [44, 45]. Zudem kann sich die Polarität und die Dielektrizitätskonstante der Farbstoffe bei steigender Beladung ändern.

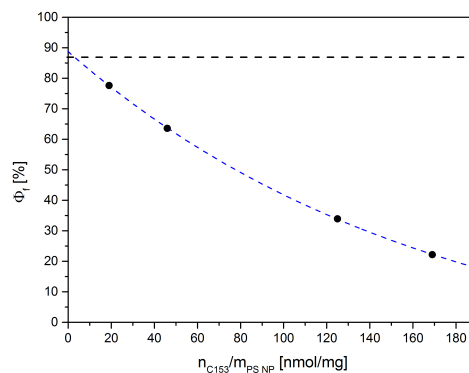
Anschließend wurde die Absorption von C153 im Partikel bestimmt (siehe auch Anhang, Tabelle 7.2). Aufgrund der Partikelstreuung kann jedoch nicht die reine C153-Absorption direkt gemessen werden (Abbildung 4.11 (c)). Für eine Korrektur des Streulichtbetrags (siehe Abschnitt 2.1.2.2) der PS NP wurde die Extinktion einer Suspension von unbeladenen Partikeln gleicher Konzentration aufgenommen (durchgängige schwarze Kurve). Durch Subtraktion der Extinktion der unbeladenen NP von denen der C153-beladenen NP können die Absorptionen von C153 im NP ermittelt werden.

In Abbildung 4.11 (d) ist die streulichtkorrigierte Absorption von C153 im NP bei $\lambda = 423$ nm gegenüber der bestimmten Konzentration an C153 nach dem Auflösen der PS NP mit THF dargestellt. Der lineare Zusammenhang zwischen der Absorption und der C153-Konzentration deutet darauf hin, dass sich der mittlere molare Extinktionskoeffizient für C153 im NP in Abhängigkeit der Beladungsmenge kaum ändert. Aus dem linearen Fit in Abbildung 4.11 (d) ergibt sich ein Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\text{NP},423 \text{ nm}}$ von C153 im PS NP von $22.150 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (siehe auch Tabelle 7.2).

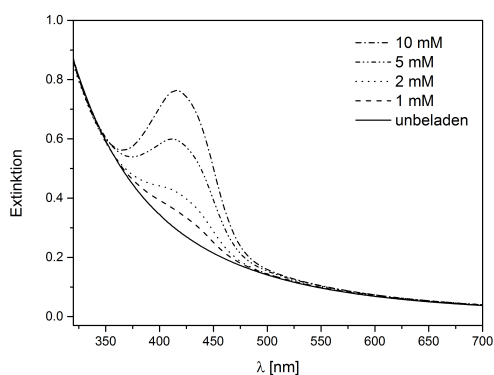
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass große Mengen an Farbstoffen in PS NP eingequollen werden können, wobei die einquellbare Farbstoffmenge mit dem log D-Wert des Farbstoffes korreliert. Allerdings ist dies von weiteren Faktoren abhängig, so dass sich nicht zwangsweise alle Farbstoffe mit großem log D-Wert in hohen Mengen und großen Beladungseffizienzen einquollen lassen. Limitierend hierbei ist z.B. die Löslichkeit des Farbstoffes in der Quelllösung bzw. die Neigung der PS NP bei Beladung einiger Farbstoffe zu aggregieren. Bei hohen Beladungsmengen nimmt die Quantenausbeute der eingequollenen Farbstoffmoleküle im Allgemeinen ab. Diese Effekte bzw. die Konzentration, bei denen sie auftreten, sind farbstoffspezifisch.



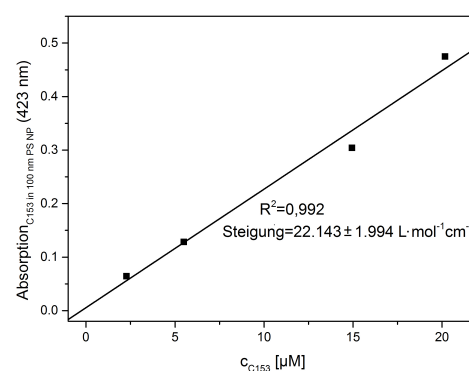
(a) Beladungsmengen



(b) Quantenausbeuten



(c) Extinktionsspektren von C153-beladenen und unbeladenen PS NP



(d) Extinktionskoeffizient von C153 im NP

Abbildung 4.11: (a) Beladungsmenge (schwarze Linie entspricht vollständigem Einbau von C153 in die PS NP), (b) Quantenausbeute Φ_f (schwarze, gestrichelte Linie entspricht der Quantenausbeute von C153 in monomeren Styrol), (c) Extinktionen von C153-beladenen, 100 nm PS NP. (d) Extinktionskoeffizient von C153 im NP, bestimmt unter Berücksichtigung der Partikelstreuung.

Für die Verwendung der NP als Label in Immunoassays ist wichtig, sehr hohe Signalintensitäten zu erreichen. Entscheidend dabei ist einerseits die Brillanz des Farbstoffes, das Produkt aus Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient bzw. aus Quantenausbeute und Absorptionswirkungsquerschnitt, und andererseits die Anzahl der detektierbaren Farbstoffe. Durch die Abnahme der Quantenausbeute mit steigender Farbstoffbeladung ist die Steigerung der Signalintensität bei der Detektion im NP limitiert. Es kann nicht unbegrenzt Farbstoff eingelagert werden, um noch höhere Signale zu erzeugen. Durch Extraktion des Farbstoffes aus dem NP sollte die Steigerung der Fluoreszenzintensität nicht mehr von der Quantenausbeute bzw. dem Extinktionskoeffizienten abhängen, sondern fast ausschließlich von der Menge an eingequollenem Farbstoff. Je mehr Farbstoff eingelagert und auch wieder extrahiert werden kann, desto höher sollte das Signal sein. Ein entscheidender Faktor ist somit die Extraktionseffizienz. Beim Bestimmen der Farbstoffmenge im NP durch Auflösen

mit THF oder Extraktion mit EtOH konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden, woraus geschlossen werden kann, dass die Extraktion von C153 mit EtOH fast vollständig abläuft [58].

4.1.4 Vergleich der Nanopartikel-Label

Beim Vergleich der beiden entwickelten NP-Systeme, Farbstoff-NP mittels „Top-down“-Verfahren und Farbstoff-NP durch Einquellen von Farbstoffen in PS NP, ist zu erkennen, dass die Größenverteilung vermahlener Farbstoff-NP sehr breit ist und nach der Beschichtung mit PE noch größer wird. Es konnten nicht die für die Reproduzierbarkeit eines Immunoassays notwendigen einheitlichen NP mit definierter Größe hergestellt werden. Dahingegen besitzen die PS NP vor und nach der Farbstoffbeladung eine monodisperse Größenverteilung und es kann durch die Variation der Farbstoffkonzentration die mittlere Farbstoffmenge im NP kontrolliert eingestellt werden. Die Menge des eingequollenen Farbstoffs ist dabei unter anderem abhängig von dem log D-Wert des Farbstoffs [25], aber auch von weiteren Faktoren wie z.B. seiner Löslichkeit im Quelllösungsmittelgemisch. Zudem zeichnet sich die Herstellung durch einen geringen Arbeits- und Zeitaufwand aus. Weiterhin sind die PS NP mit vielen verschiedenen Oberflächengruppen erhältlich, um sie für spätere Anwendungen wie z.B. als Label in Immunoassays weiter zu funktionalisieren. Daher wurde sich für die folgende SAV-Funktionalisierung und den Einsatz in einem Immunoassay ausschließlich auf kommerzielle PS NP beschränkt.

4.2 Streptavidinfunktionalisierung

Um die NP als Label in Immunoassays verwenden zu können, müssen die PS NP direkt an die Detektions- oder Sekundärantikörper oder an SAV gebunden werden (siehe Abschnitt 2.1.2.5). Aufgrund der Vorzüge des SAV-Biotin-Systems, bei der eine weitere Funktionalisierung der SAV-markierten NP universell mit biotinmarkierten Antikörpern erfolgt (siehe Abschnitt 2.1.2.6), wurden die PS NP über die an der Oberfläche befindlichen Carboxy- und Aminogruppen mittels EDC-, EDC/ sulfo-NHS-Ester-Kopplung (siehe Abschnitt 2.3.1.1) und der Kopplung mit heterobifunktionellen PEG-Linkern (siehe Abschnitt 2.3.1.2) ausschließlich an SAV angebinden, mit dem Ziel, den Einfluss der Anbindung des NP an den Detektionsantikörper auf das Immunoassays zu untersuchen. Die Art der SAV-NP-Anbindung kann ggf. einen Einfluss auf die Anbindung von SAV an den biotinmarkierten Antikörper besitzen (spezifische Wechselwirkung) aufgrund von unterschiedlicher sterischer Hinderung. Zudem kann es auch zu unterschiedlichen unspezifischen Wechselwirkungen kommen, da durch das Auftragen einer PEG-Schicht der NP andere Oberflächeneigenschaften bekommt.

Die Menge an gebundenem SAV kann mittels BCA- und Biotin-FITC-Assay bestimmt werden, welche im Abschnitt 4.2.3 genauer untersucht werden.

4.2.1 Biokonjugationsstrategien und potentielle Störeinflüsse

An die Konjugation von SAV an unterschiedlich große PS NP wurden daher folgende Anforderungen gestellt: keine NP-Aggregation bzw. kaum Anwachsen der Größenverteilung durch die SAV-Funktionalisierung, die Funktionalität von SAV sollte erhalten bleiben bzw. muss SAV zugänglich für den biotinylierten Antikörper sein und die NP sollten nach der Funktionalisierung kaum unspezifische Wechselwirkungen mit der biologischen Matrix oder dem MTP-Material aufweisen. Im folgenden Abschnitt wurden die NP daher mit SAV funktionalisiert und im Anschluss systematisch untersucht.

Da die PS NP für die Verwendung als Label in Immunoassays mit Farbstoffen beladen werden müssen, kann ggf. auch der Farbstoff einen Einfluss auf die SAV-Anbindung bzw. die SAV-Funktionalität besitzen, welcher im Abschnitt 4.2.3.4 untersucht wird.

4.2.1.1 Kovalente Kopplung von SAV an carboxyfunktionalisierte NP

Als Erstes wurde die SAV-Anbindung mittels EDC-Kopplung und anschließend mittels EDC/ sulfo-NHS-Kopplung durchgeführt und der Einfluss der EDC bzw. EDC/ sulfo-NHS-Menge und SAV auf Kopplungseffizienz, die Anzahl gebundenen SAV je NP und die NP-Aggregation untersucht mit dem Ziel, große Mengen an SAV bei geringer NP-Aggregation zu binden.

Kovalente Anbindung von SAV an 100 nm PS NP-COOH via EDC. Bei der EDC-Kopplung wurden verschiedene Mengen an EDC und an SAV bei konstanter NP-Menge umgesetzt (siehe Abschnitt 3.4.1.1 und im Anhang Tabelle 7.3). Die Abbildung 4.12 zeigt die Kopplungseffizienz in Prozent und die mittlere Anzahl an gebundenen SAV je NP in Abhängigkeit von der SAV- und EDC-Konzentration. Hierbei wurden die gebundenen SAV-Mengen mittels BCA-Assay ohne Abtrennung der NP vor der Absorptionsmessung bestimmt. Das kann zu Abweichungen des Messwertes vom Realwert durch die Partikelstreuung führen (siehe Abschnitt 4.2.3.1). Um Beiträge von Streulicht zu erfassen, wurde die Extinktion um den Streuuntergrund der PS NP korrigiert (siehe Abschnitt 2.1.2.2).

Kopplungseffizienz. Wie aus Abbildung 4.12 hervorgeht, werden hohe Kopplungseffizienzen (50 %) bei hohen EDC- und geringen SAV-Mengen erhalten, während bei hohen SAV- und kleinen EDC-Mengen die Kopplungseffizienz abnimmt. Bei kleineren EDC-Mengen sind Nebenreaktionen des instabilen Harnstoffintermediates mit Wasser als Reaktionspartner wahrscheinlicher, da Wasser gegenüber SAV ebenfalls in großem Überschuss vorliegt. Optimal wären dementsprechend hohe Mengen an EDC und viel höhere Mengen an SAV. Bei noch höheren Mengen an EDC und SAV kam es zum Ausflocken der NP. Dieses ist vermutlich auf die in Abschnitt 2.3.1.1 beschriebene Proteinquervernetzung der NP zurückzuführen. Bei geringen Mengen an SAV wurde kaum SAV gebunden. Bei hohen SAV-Mengen und dem Verzicht von EDC wird SAV dennoch adsorptiv an die Oberfläche gebunden.

Anzahl gebundener SAV je NP. Eine hohe Anzahl gebundener SAV je NP wird hingegen bei hohen SAV- und mittleren EDC-Mengen erreicht. Je mehr SAV als

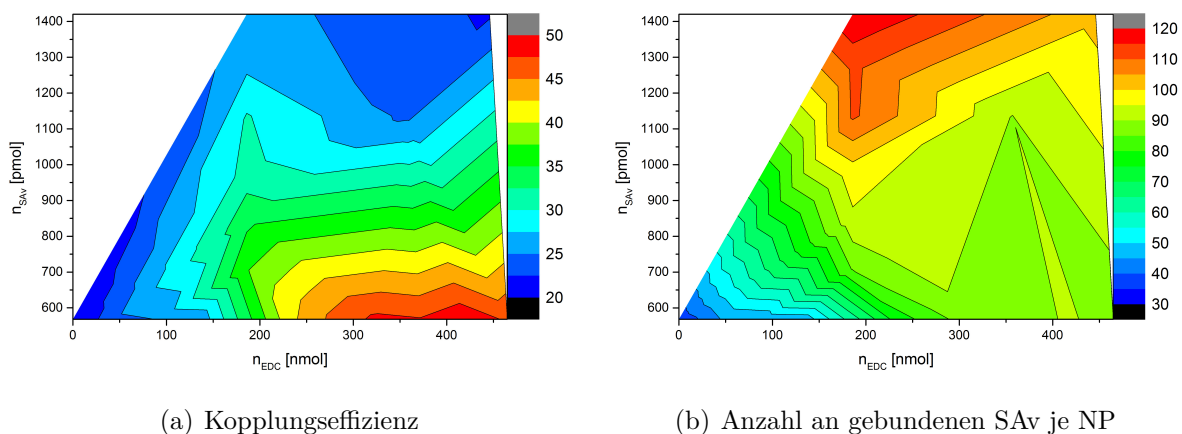


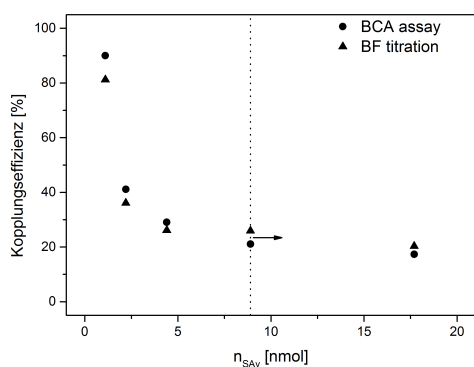
Abbildung 4.12: Mittels BCA-Assay bestimmte (a) Kopplungseffizienzen [%] und (b) mittlere Anzahl gekoppelter SAV je NP [SAV/NP] von NP-gebundenem SAV an nicht-gefärbte, carboxyfunctionalisierte 100 nm PS NP via EDC-Kopplung.

Reaktionspartner vorhanden ist, desto mehr kann auch am NP, unabhängig wie effizient die Reaktion abläuft, gebunden werden.

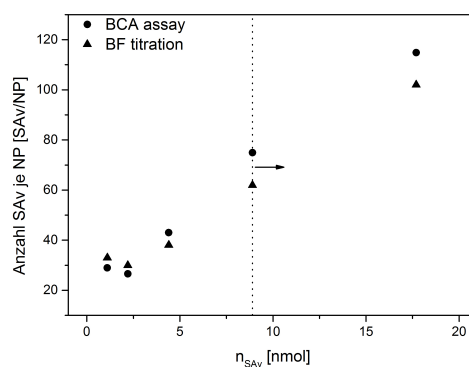
Kovalente Anbindung von SAV an 100 nm PS NP-COOH via EDC/sulfo-NHS. Wie bereits in Abschnitt 2.3.1.1 erläutert, besitzt die kovalente Anbindung von SAV über ein sulfo-NHS-Esterintermediat Vorteile gegenüber der Anbindung via EDC-Kupplung. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen (Abbildung 4.13) wurden die Mengen an SAV (schwarze Symbole) oder EDC/ Sulfo-NHS (weiße Symbole) variiert und der jeweilige Reaktionspartner konstant gelassen (siehe Abschnitt 3.4.1.2 und im Anhang Tabelle 7.4). Die SAV-Quantifizierung zur Bestimmung der Kopplungseffizienz und der Bedeckungsdichte wurde mittels BCA-Assay (Kreise) und Biotin-FITC-Titration (Dreiecke) durchgeführt. Beide Methoden wurden für die folgenden Versuche auf verschiedene Störeinflüsse untersucht und mittels Massenbilanzkalkulation verglichen (siehe Abschnitt 4.2.3).

Wie aus Abbildung 4.13 (a) und (c) ersichtlich ist, steigt auch hier mit zunehmender EDC/ sulfo-NHS-Menge und abnehmender SAV-Menge die Kopplungseffizienz sowie die Anzahl an gebundenem SAV je NP mit zunehmender SAV- und EDC/ sulfo-NHS-Menge (Abbildung 4.13) an. Jedoch besitzen die Mengen an eingesetztem EDC und sulfo-NHS keinen ausgeprägten Einfluss auf die Kopplung des SAV im Vergleich zur reinen Anbindung von SAV via EDC-Kopplung, da wie in Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben, ein gegen Hydrolyse stabiles Intermediat gebildet wird.

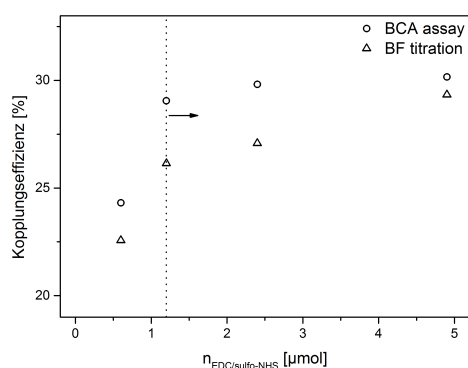
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Anbindung über EDC/ sulfo-NHS besser geeignet ist, da die Proteinquervernetzung und die NP-Aggregation geringer war und gleichzeitig hohe Mengen an SAV gebunden werden konnten. Das BCA-Assay und die Biotin-FITC-Titration lieferten vergleichbare Ergebnisse (siehe auch Abschnitt 4.2.3.3), so dass daraus geschlossen werden kann, dass nach der Konjugation das partikelgebundene SAV fast vollständig funktional war.



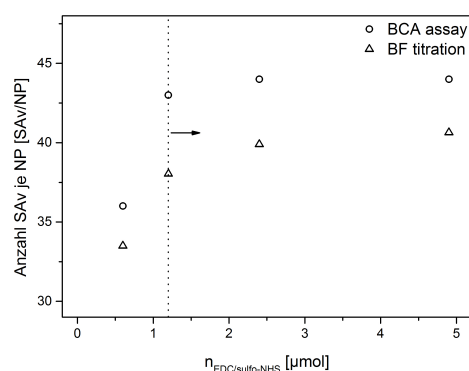
(a) Kopplungseffizienz/ SAV-Einfluss



(b) Anzahl SAV je NP/ SAV-Einfluss



(c) Kopplungseffizienz/ EDC/ sulfo-NHS-Einfluss



(d) Anzahl SAV je NP/ EDC/ sulfo-NHS-Einfluss

Abbildung 4.13: Die mittels BCA-Assay (Kreise) und Biotin-FITC-Titration (Dreiecke) bestimmte (a,c) Kopplungseffizienz und (b,d) Anzahl von SAV je NP von NP-gebundenem SAV an nicht-gefärbte, carboxy-funktionalisierte 100 nm PS NP via EDC/ sulfo-NHS-Kopplung bei Variation (a,b) der SAV- (schwarze Symbole) und (c,d) der EDC/ Sulfo-NHS-Menge (weiße Symbole). Die gestrichelten Linien/Pfeile zeigen den Anstieg des PDI auf über 0,05 [20].

4.2.1.2 Größenverteilung von SAV-funktionalisierten PS NP

Um eine möglichst hohe Signalintensität in Immunoassays zu erreichen, muss möglichst viel Farbstoff in NP eingequollen werden. Prinzipiell können dabei größere NP mehr Farbstoff einlagern. Zugleich kann die NP-Größe einen Einfluss auf die Biotin-SAV-Wechselwirkung sowie unspezifische Wechselwirkung haben. Wie bereits erwähnt wurde, variiert je nach Material die NP-Größe verwendeter Partikellabel in der Literatur von wenigen nm bis hin zu einigen μm .

Im Folgenden wurde daher der Einfluss der Proteinkonjugation auf die NP-Größe, Größenverteilung und NP-Aggregation untersucht. Dafür wurden unbeladene und C153-beladene 100, 500 und 1000 nm PS NP mittels EDC/ sulfo-NHS-Kopplung mit SAV konjugiert und anschließend mittels DLS untersucht.

Größenverteilung von ungefärbten, 100 nm PS NP. Bei Betrachtung des hydrodynamischen Durchmessers und des PDI (siehe im Anhang Abbildung 7.3) kann ein Anstieg beider Größen bei zunehmender SAV- und EDC/ sulfo-NHS-Menge beobachtet werden. Einerseits ist der Größenzuwachs der SAV-NP-Konjugate auf die kovalente Anbindung von SAV zurückzuführen, andererseits ist es nicht auszuschließen, dass ebenfalls SAV-quervernetzte Partikelaggregate gebildet wurden. Der PDI als Maß für die Monodispersität (siehe Abschnitt 2.2.3.2) übersteigt den Wert von 0,05 ab einer gewissen SAV- bzw. EDC/ sulfo-NHS-Konzentration (Abbildung 4.13, gestrichelte Linie/Pfeile). Eine mögliche Ursache hierfür ist das Einsetzen von Quervernetzung mehrerer NP durch SAV.

Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen wurden folglich EDC/ sulfo-NHS- und SAV-Mengen ausgewählt, bei denen eine ausreichend hohe Anzahl an SAV je NP und Kopplungseffizienz sowie minimale Partikelaggregation ($PDI < 0,05$) erreicht wurden (siehe Abschnitt 3.4.1.2). Der Größenzuwachs von d_H unter den optimierten Kopplungsbedingungen betrug dabei 20 bis 30 nm (Abbildung 4.14 (a)). Da es auch bei sehr hohen SAV-Mengen nicht zur NP-Aggregation kam und die erreichte Anzahl an SAV je NP und die Kopplungseffizienzen, mit denen der EDC-Kopplung aus Abschnitt 4.2.1.1 vergleichbar sind (siehe Tabelle 7.3 und 7.4), wurden weitere carboxylierte PS NP nur noch via EDC/ sulfo-NHS-Kopplung mit SAV funktionalisiert.

Größenverteilung von SAV-funktionalisierten, 500 und 1000 nm PS NP. Da größere NP mit größeren Farbstoffmengen beladen werden können, was bei der Verwendung als NP-Label potentiell zu einer höheren Signalintensität im Immunoassay führen kann, wurden 500 und 1000 nm PS NP mit SAV funktionalisiert und der Größenzuwachs mittels DLS untersucht, um NP-Aggregation auszuschließen. Hinsichtlich der carboxylierten 500 nm PS NP liegt der Zuwachs im gleichen Bereich wie bei den 100 nm PS NP (Abbildung 4.14 (b)), wobei auch hier der PDI nach der Kopplung nur geringfügig ansteigt, jedoch unterhalb von 0,05 liegt. In Abbildung 4.14 (c) ist die intensitätsgewichtete Größenverteilung von carboxylierten 1000 nm PS NP vor und nach SAV-Anbindung zu sehen. Obwohl die Größenverteilung kaum breiter wird, wächst d_H um 200 nm an, was einerseits an der SAV-Kopplung und andererseits an einer veränderten Doppelschicht liegen kann. Der PDI lag vor und nach der Synthese bei 0,39, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass sich keine NP-Aggregate bildeten.

Größenverteilung von SAV-funktionalisierten, C153-beladenen, 100 und 500 nm PS NP. Da die NP, die als Label in Immunoassays getestet werden, mit Farbstoffen beladen sind, wurden folglich mit C153-beladene 100 und 500 nm PS NP mit SAV funktionalisiert und mittels DLS untersucht. Aufgrund der C153-Beladung kommt es neben der SAV-Funktionalisierung durch die Färbung mit C153 zusätzlich zu einem geringen Größenzuwachs (Abbildung 4.14 (b) und (d)). Auch hier zeigt sich, dass d_H für die C153-beladenen und SAV-funktionalisierten 100 nm PS NP lediglich um 20 bis 30 nm anwuchs. Der PDI lag unter 0,05, was für das Ausbleiben von NP-Aggregaten spricht. Für die 500 nm PS NP kam es zu einem Zuwachs von 50 bis 100 nm und die Größenverteilung wurde breiter. Der PDI betrug 0,1. Dies könnte ein Anzeichen dafür sein, dass sich partiell NP-Aggregate bildeten.

Es kann daraus geschlossen werden, dass die SAV-Funktionalisierung nach optimierten

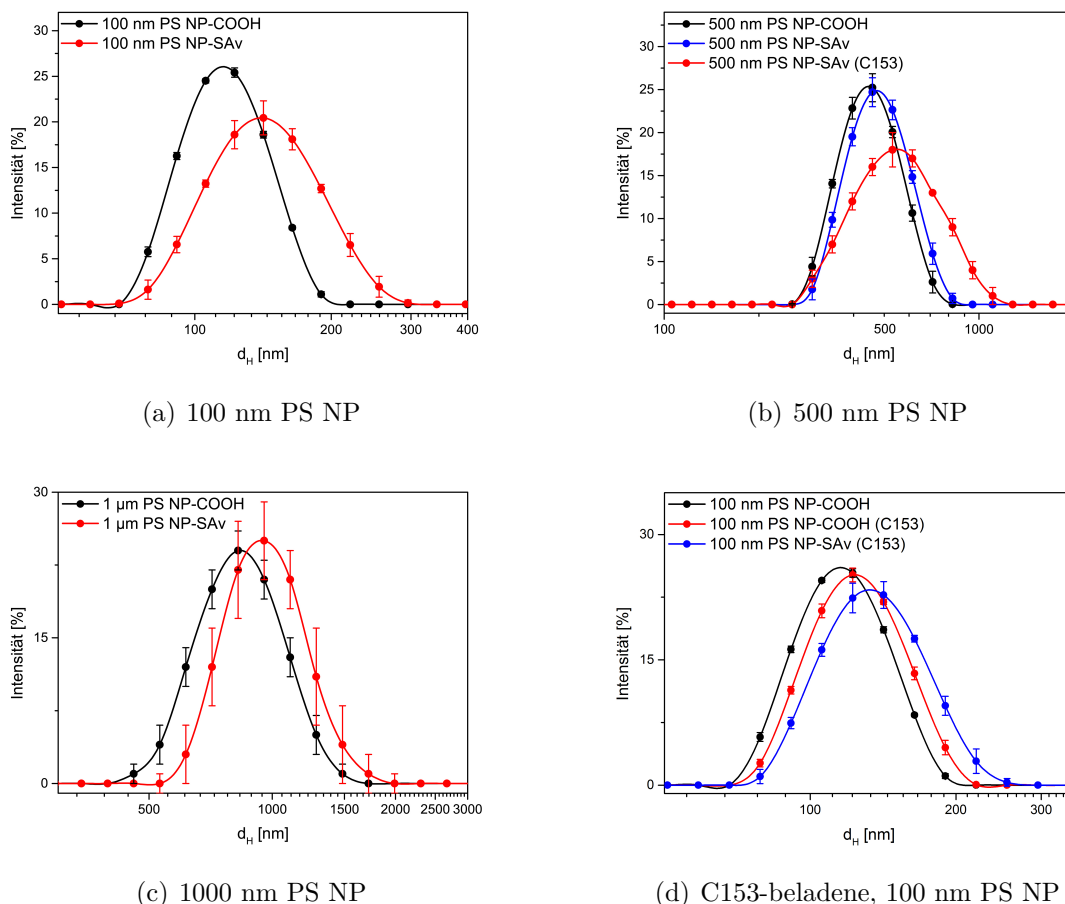


Abbildung 4.14: Intensitätsgewichtete Größenverteilungen von unbeladenen (a) 100, (b) 500 und (c) 1000 nm PS NP und (d) von C153-beladenen, 100 nm PS NP mit und ohne SAv-Funktionalisierung. Die Messwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus 5 unabhängigen Messungen.

Bedingungen für unbeladene und beladene PS NP verschiedener Größen gleichermaßen geeignet ist, sich kaum NP-Aggregate bilden und homogene Proben hergestellt wurden. Zudem scheint C153 die Partikelfunktionalisierung nicht zu beeinflussen.

4.2.1.3 Kovalente Kopplung von SAv an aminofunktionalisierten NP

Eine andere Methode, um SAv an NP zu binden, mögliche NP-Aggregation auszuschließen, die Anzahl des zu bindenden SAv besser kontrollieren zu können und ggf. die Zugänglichkeit von biotinylierten Antikörpern durch lange Linker zu erhöhen, ist die Maleimid-Thiol-Kopplung (Abschnitt 2.3.1.2) mit einem heterobifunktionellen PEG-Linker. In einem ersten Schritt müssen dafür die Aminogruppen an der Oberfläche des NP in Maleimid (MAL)-Gruppen umfunktionalisiert werden. Anschließend reagieren diese mit Thiolgruppen des Proteins, welche bspw. als funktionelle Gruppe in der Aminosäure Cystein vorkommen. Da SAv kein Cystein besitzt, müssen Thiolgruppen durch Reaktion von Aminogruppen des Proteins mit 2-Iminothiolan eingeführt werden

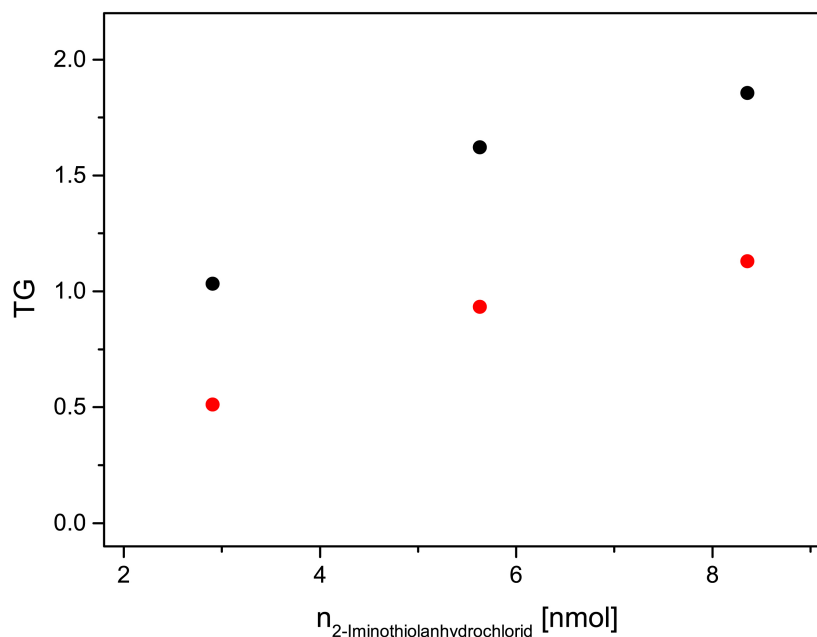


Abbildung 4.15: Mittlerer Thiolyierungsgrad (TG) von SAV nach Umsatz mit verschiedenen Mengen an 2-Iminothiolanhydrochlorid bei $\text{pH} = 8$ direkt nach der Reaktion (schwarz) und nach 12 Tagen (rot).

(Abbildung 2.15). Durch diese Strategie lässt sich genau die Anzahl der einzuführenden Thiolgruppen kontrollieren. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen der Kopplung von SAV an die NP erfolgte nach Moser et al. [138–140], welcher zur Umfunktionalisierung einen heterobifunktionellen PEG-Linker mit jeweils einer endständigen MAL- und NHS-Gruppe verwendete. Diese Bedingungen wurden für die MAL-Thiol-Kopplung übernommen, so dass nur die Thiolyierung von SAV optimiert wurde.

4.2.1.4 Optimierung der Thiolyierung von SAV

Um die Quervernetzung von NP durch SAV zu unterbinden, sollte bei der Thiolyierung im Mittel nur eine Thiolgruppe je SAV eingeführt werden. Daher wurden Tests durchgeführt, um Reaktionsbedingungen zu ermitteln, mit denen ein mittlerer Thiolyierungsgrad (TG; mittlere Anzahl der Thiolgruppen je SAV) von 1 erreicht wird. In Abbildung 4.15 ist der TG von SAV nach Umsatz mit verschiedenen Mengen an 2-Iminothiolanhydrochlorid nach der Reaktion und nach 12 Tagen dargestellt. Wie zu erkennen ist, wird ein TG von 1 bei der kleinsten eingesetzten Menge an 2-Iminothiolanhydrochlorid erhalten. Nach weiteren 12 Tagen wurde die Aktivität der Thiolgruppen nochmals getestet, wobei diese auf 50 bis 60% zurückging, was auf Rezyklisierung der Thiolgruppen zurückzuführen ist [18].

4.2.2 Einfluss der SA_v-Funktionalisierung und der NP-Größe auf spezifische und unspezifische Wechselwirkungen

4.2.2.1 Einfluss der Kopplungsmethoden auf spezifische und unspezifische Wechselwirkungen

Mit dem Ziel, spezifische und unspezifische Wechselwirkungen der direkt SA_v-funktionalisierten und der SA_v-PEG-funktionalisierten NP im Immunoassay abzuschätzen, erfolgten Untersuchungen an Modellsystemen. Dazu wurden BSA sowie ein BSA-Biotin-Konjugat in PBS-Puffer an eine MTP adsorbiert. BSA wird beim heterogenen (Sandwich-)Immunoassay zum Absättigen freier Bindungsstellen nach der Adsorption des Fängerantikörpers zugegeben. Nach einem Waschschrift, um ungebundenes BSA sowie BSA-Biotin zu entfernen, wurden C153-gefärbte, 100 nm PS NP, welche mit SA_v einerseits mittels EDC/ sulfo-NHS- (direkte SA_v-Funktionalisierung) und andererseits mittels MAL-Thiol-Kopplung mit einem heterobifunktionellen PEG-Linker (PEG-Funktionalisierung) funktionalisiert waren, zugegeben. Zur weiteren Kontrolle wurden beide NP-Sorten in unbehandelte Kavitäten (Kontrollkavitäten), welche weder BSA noch BSA-Biotin enthielten, gegeben. Im Anschluss wurden nach einem weiteren Waschschrift, um ungebundene Partikel zu entfernen, der Farbstoff mit EtOH extrahiert und die resultierende Fluoreszenz gemessen.

Die Signalintensitäten der direkt SA_v-funktionalisierten NP aus den Reaktionen mit den Kontrollkavitäten und den BSA- und BSA-Biotin-behandelten Kavitäten wurden auf den Wert der direkt SA_v-funktionalisierten NP aus der Reaktion mit der Kontrollkavität normiert (normierte relative Fluoreszenzintensität = 1). Die Signalintensitäten der SA_v-PEG-funktionalisierten NP aus den Reaktionen mit den Kontrollkavitäten und den BSA- und BSA-Biotin-behandelten Kavitäten wurden auf den Wert der SA_v-PEG-funktionalisierten NP aus der Reaktion mit der Kontrollkavität normiert (normierte relative Fluoreszenzintensität = 1).

Spezifische Wechselwirkungen der NP sind nur mit den BSA-Biotin behandelten Kavitäten zu erwarten, da die beiden unterschiedlich SA_v-funktionalisierten NP nur spezifisch an biotinmarkiertes BSA binden können. Bei der Zugabe beider NP-Sorten in die Kontrollkavitäten bzw. die BSA-behandelten Kavitäten sind demnach keine oder nur unspezifische Wechselwirkungen zu erwarten.

Wie in Abbildung 4.16 zu erkennen ist, steigt das Signal bei der Wechselwirkung der direkt SA_v-funktionalisierten NP mit BSA gegenüber den Kontrollkavitäten an, was stärkeren unspezifischen Wechselwirkungen der direkt SA_v-funktionalisierten NP mit adsorbiertem BSA zuzuschreiben ist. Im Vergleich dazu sinkt das Signal der SA_v-PEG-funktionalisierten NP fast auf 0 ab, was auf eine starke Reduktion der unspezifischen Wechselwirkungen SA_v-PEG-funktionalisierter NP durch Adsorption von BSA zurückzuführen ist. Dies kann den Eigenschaften der PEG-Schicht zugeschrieben werden (Abschnitt 2.3.1.2), d.h. die Oberfläche der NP wird durch PEG hydrophiler, was die Adsorption an BSA vermutlich reduziert [178]. Nach der Wechselwirkung beider NP-Sorten mit BSA-Biotin steigt das Signal wieder an. Dies ist auf die spezifische Bindung der NP an BSA-Biotin zurückzuführen. Nach der Differenz der Signale der spezifischen Wechselwirkungen (NP/BSA-Biotin) und der unspezifischen Wechselwirkungen (NP/BSA) ist das Signal der direkt SA_v-funktionalisierten NP

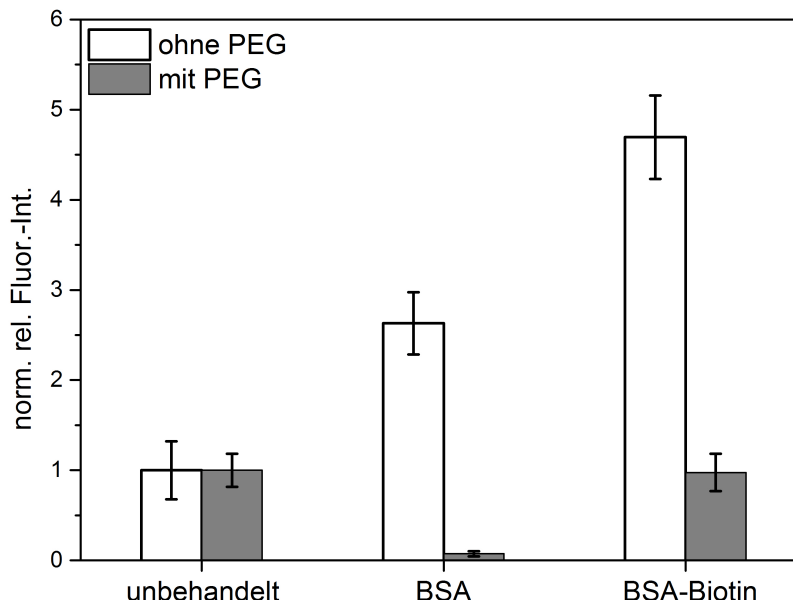


Abbildung 4.16: Normierte (norm.) relative (rel.) Fluoreszenzintensität (Fluor.-Int.) von SAV-funktionalisierten, 100 nm PS NP mit (weiße Balken) und ohne PEG (graue Balken) nach der Wechselwirkung mit unbehandelten, BSA- und BSA-Biotin-behandelten Kavitäten einer MTP. Die Messwerte der NP mit und ohne PEG aus den Reaktionen mit den unbehandelten, BSA- und BSA-Biotin-behandelten Kavitäten wurden auf die jeweiligen Werte der NP mit und ohne PEG aus den Reaktionen mit den unbehandelten Kavitäten normiert. Die angegebenen Fehlerbalken (Standardabweichungen) wurden aus drei unabhängigen Messungen berechnet.

doppelt so hoch wie das der SAV-PEG-funktionalisierten NP, was auf eine bessere Anbindung der direkt SAV-funktionalisierten NP an BSA-Biotin schließen lässt. Ggf. ist das Signal auch etwas höher, da trotz identischer Beladungsprozedur die direkt SAV-funktionalisierten NP ca. 10 % mehr Farbstoffmoleküle tragen (Tabelle 4.4). Zugleich ist für die PEGylierten NP das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis besser, was auch ein nicht zu vernachlässigender Parameter für die Sensitivität eines Immunoassays ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei der Verwendung direkt SAV-funktionalisierter NP im Modellassay das Untergrundsignal durch unspezifische Wechselwirkungen höher ist und PEGylierte NP ein geringeres Untergrundsignal aufgrund geringerer unspezifischer Wechselwirkungen erzeugen. Gleichzeitig könnte jedoch die Signalintensität der direkt funktionalisierten NP durch eine bessere Anbindung der NP an biotinylierte Detektionsantikörper höher sein.

4.2.2.2 Einfluss der NP-Größe auf spezifische und unspezifische Wechselwirkungen

Mit dem Ziel, den Einfluss der NP-Größe auf spezifische und unspezifische Wechselwirkungen im Immunoassay abzuschätzen, erfolgten weitere Untersuchungen an dem aus Abschnitt 4.2.2.1 verwendeten Modellsystemen (Abbildung 4.17). Dazu wurde BSA sowie BSA-Biotin in PBS-Puffer an eine MTP adsorbiert. Nach einem Waschgang, um nicht adsorbiertes BSA sowie BSA-Biotin zu entfernen, wurden einerseits direkt SAV-funktionalisierte, C153-beladene ($c_{\text{Beladung}} = 10 \text{ mM}$), 100 (weiß schraffierte Balken) und 500 nm (grau schraffierte Balken) PS NP und andererseits zur Kontrolle (Kontrollproben) C153-beladene ($c_{\text{Beladung}} = 10 \text{ mM}$), 100 (weiße Balken) und 500 nm (graue Balken) PS NP, welche nicht mit SAV funktionalisiert waren, zugegeben. Zur weiteren Kontrolle wurden alle vier NP-Sorten in unbehandelte Kavitäten (Kontrollkavitäten), welche weder BSA noch BSA-Biotin enthielten, gegeben. Im Anschluss wurden nach einem weiteren Waschschritt, um ungebundene Partikel zu entfernen, der Farbstoff mit EtOH extrahiert und die resultierende Fluoreszenz gemessen.

Die Signalintensitäten der unfunktionalisierten und SAV-funktionalisierten 100 nm NP aus den Reaktionen mit den Kontrollkavitäten und den BSA- und BSA-Biotin-behandelten Kavitäten wurden auf den Wert der unfunktionalisierten 100 nm NP aus der Reaktion mit der Kontrollkavität normiert (normierte relative Fluoreszenzintensität = 1). Die Signalintensitäten der unfunktionalisierten und SAV-funktionalisierten 500 nm NP aus den Reaktionen mit den Kontrollkavitäten und den BSA- und BSA-Biotin-behandelten Kavitäten wurden auf den Wert der unfunktionalisierten 500 nm NP aus der Reaktion mit der Kontrollkavität normiert (normierte relative Fluoreszenzintensität = 1).

Spezifische Wechselwirkungen sind nur für die SAV-funktionalisierten 100 und 500 nm NP mit den BSA-Biotin behandelten Kavitäten zu erwarten, da die SAV-funktionalisierten NP nur spezifisch an biotinmarkiertes BSA binden können. Bei der Zugabe der SAV-funktionalisierten 100 und 500 nm NP in die Kontrollkavitäten bzw. die BSA-behandelten Kavitäten sind demnach keine oder nur unspezifische Wechselwirkungen zu erwarten. Für die unfunktionalisierten 100 und 500 nm NP sind für alle Kavitäten keine oder nur unspezifische Wechselwirkungen zu erwarten.

Das Signal für die 100 und 500 nm NP ohne SAV (Abbildung 4.17, weiß und graue unschraffierte Balken) in Abwesenheit und Gegenwart von BSA bzw. BSA-Biotin ist gleich hoch. Daraus lässt sich ableiten, dass BSA keinen Einfluss auf unspezifische Adsorption der nicht-SAV-funktionalisierten PS NP mit der MTP hat. Durch das Anbinden von SAV an 100 oder 500 nm PS NP (weiß bzw. graue schraffierte Balken) kommt es im Vergleich zu den Kontrollproben zu einer Abnahme der Signalintensität in den Kontrollkavitäten, was einer Abnahme unspezifischer Wechselwirkungen entspricht. Die unspezifische Wechselwirkung von SAV-funktionalisierten 100 oder 500 nm NP mit BSA-behandelten Kavitäten ist gegenüber den unspezifischen Wechselwirkungen der Kontrollproben ohne SAV auch etwas geringer. Gleichzeitig steigen die unspezifischen Wechselwirkungen der SAV-funktionalisierten NP im Vergleich zu den gleichen Proben in unbehandelten Kavitäten an, was auch bereits in Abschnitt 4.2.2.1 zu beobachten war. Scheinbar sind die Wechselwirkungen zwischen SAV und BSA stärker als zwischen

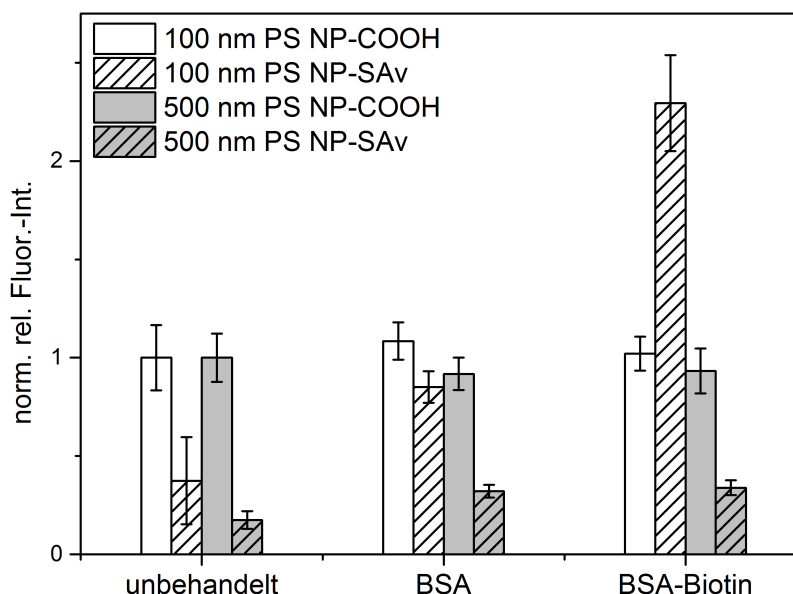


Abbildung 4.17: Normierte (norm.) relative (rel.) Fluoreszenzintensität (Fluor.-Int.) von unfunktionalisierten (unschraffierte Balken) und direkt SAv-funktionalisierten (schraffierte Balken), C153-beladenen (10 mM), 100 (weiße Balken) und 500 nm (graue Balken) PS NP nach der Wechselwirkung mit unbehandelten, BSA- und BSA-Biotin-behandelten Kavitäten einer MTP. Die Messwerte beider 100 nm NP-Sorten wurden auf den Messwert der unfunktionalisierten 100 nm NP in der Kontrollkavität und die Messwerte beider 500 nm NP-Sorten wurden auf den Messwert der unfunktionalisierten 100 nm NP in der Kontrollkavität normiert. Die angegebenen Fehlerbalken (Standardabweichungen) wurden aus drei unabhängigen Messungen berechnet.

SAv und der MTP.

Beim Vergleich der SAv-funktionalisierten 100 oder 500 nm NP ist das Signal der 500 nm NP geringer als das der 100 nm NP, was auf eine geringere unspezifische Wechselwirkung der 500 nm NP hinweist. Die 500 nm NP sind zu ca. 40 % mit SAv bedeckt, während die 100 nm NP nur zu ca. 4 % mit SAv bedeckt sind (Tabelle 4.5 und im Anhang Tabelle 7.6). Anscheinend reduziert ein hoher SAv-Bedeckungsgrad unspezifische Wechselwirkungen.

Die Signalintensitäten der SAv-funktionalisierten, 100 nm PS NP mit BSA-Biotin-behandelten Kavitäten ist fast dreimal stärker gegenüber den Signalintensitäten der nur mit BSA-behandelten Kavitäten. Die höhere Signalintensität resultiert demnach zu ca. 60 % aus der spezifischen Wechselwirkung von SAv mit Biotin, während 40 % des Signals von unspezifischen Wechselwirkungen herrührt. Die Signale der 500 nm, SAv-funktionalisierten PS NP in BSA-Biotin-behandelten Kavitäten ist fast identisch mit denen der gleichen Partikel in BSA-behandelten Kavitäten, was auf keine

bzw. sehr geringe spezifische Wechselwirkungen schließen lässt. Die geringe spezifische Bindung der SAV-funktionalisierten 500 nm NP an biotinmarkiertes BSA ist vermutlich auf eine sterische Hinderung zurückzuführen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Größe der verwendeten NP einen Einfluss auf die spezifische Anbindung der NP an biotinmarkiertes BSA besitzt. Demnach binden die kleineren SAV-funktionalisierten 100 nm NP besser, wohingegen die großen SAV-funktionalisierten 500 nm NP nur unspezifisch an die MTP adsorbieren.

4.2.3 Streptavidin-Quantifizierung

Die Menge an partikelgebundenem SAV kann mittels BCA- und Biotin-FITC-Assay untersucht werden. Dabei gibt der BCA-Assay die Gesamtmenge an Protein an (Abschnitt 2.3.2.1), ohne eine Aussage über die Funktionalität von SAV zu treffen, während die Biotin-FITC-Titration eine Aussage darüber trifft, ob und wie viel SAV funktional ist (Abschnitt 2.3.2.2). Voraussetzung für diese Aussage ist die Bindung eines Moleküls in die Bindungstasche eines Proteins. Durch die Biotin-SAV-Wechselwirkung ist das für SAV möglich, bei anderen Proteinen ist es jedoch eher schwierig, einen Funktionalitätstest durchzuführen. Sofern alle Bindungstaschen funktional sind, kann SAV 4 Biotinmoleküle binden.

Oftmals wird in vielen Publikationen nur das ungebundene SAV im Überstand quantifiziert und die Differenz zur eingesetzten Menge als gebundenes SAV angenommen. Diese Methode hat den Nachteil, dass sie keine Aussage darüber trifft, ob das gebundene SAV noch funktional ist bzw. kann sie nur angewandt werden, solange der Überstand vermessen werden kann. Im folgenden Abschnitt sollen beide Methoden zur Quantifizierung von partikelgebundenem SAV durch die Bestimmung der Massenbilanz überprüft und miteinander verglichen werden.

Da beide Assays ursprünglich für SAV-Lösungen entwickelt wurden, wurden die Assays auf mögliche Störeinflüsse durch die Partikelmatrix, Partikelstreuung und weitere Additive wie z.B. Farbstoffe untersucht.

4.2.3.1 BCA-Assay

Einfluss der Partikelstreuung auf die photometrische SAV-Quantifizierung im BCA-Assay. Nach Empfehlungen des Herstellers ist der BCA-Assay am besten geeignet für reine Proteinlösungen. Beim Quantifizieren von partikelgebundenem SAV, kommt es bei der Absorptionmessung zu einem hohen Untergrundsignal durch die Partikelstreuung (Abbildung 4.18 (a), schwarze gestrichelte Linie). Gerade bei NP-Proben mit geringen Mengen an gebundenem SAV überdeckt die NP-Streuung das durch das Protein hervorgerufene Messsignal und führt zu hohen Messunsicherheiten. Daher ist es erforderlich, entweder das Signal um den Streuuntergrund zu korrigieren, was durch eine Absorptionmessung derselben Probe bei gleichen Messbedingungen in Wasser oder die Messung der Probe zu Reaktionsbeginn ($t = 0$) bedingt geschehen kann. Nachteilig hierbei ist die Notwendigkeit des Voraussetzens einer Referenzprobe mit der exakt gleichen Konzentration in Wasser, außerdem trägt der nicht reduzierte Kupfer(II)-BCA-Komplex ebenfalls zur Absorption bei (4.18 (a), schwarze durchgezogene Linie).

Ein anderer Ansatz ist das Abtrennen der NP vor der Absorptionsmessung durch Zentrifugation und anschließendem Messen des Absorptionsspektrums des Überstandes. Da jedoch der BCA-Assay fortlaufend ist (keine Endpunktreaktion) und nicht vor dem Abtrennen gestoppt werden kann, muss der zeitliche Einfluss der Zentrifugation berücksichtigt werden. Eine kurze Zentrifugationszeit kann das Problem umgehen. Große NP wie 500 nm PS NP können in 7 min bei hohen rcf-Werten (16.000 - 22.000 g) abzentrifugiert werden. Bei kleineren 100 nm PS NP dauert die Zentrifugation 45 min bis zur vollständigen Sedimentation. Um mögliche Einflüsse so gering wie möglich zu halten, können die Partikel abgetrennt werden, nachdem das Absorptionssignal des BCA-Assays nicht mehr signifikant ansteigt. In Abbildung 4.18 (b) wurden verschiedene Konzentrationen an SA_v im BCA-Assay vermessen und zu verschiedenen Zeitpunkten das Absorptionssignal bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert. Die Absorption steigt bei jeder Konzentration während der Reaktion innerhalb der ersten 75 min steil an und flacht anschließend ab. Ab 150 min wird ein geringerer, gleichmäßiger Anstieg des Absorptionssignals beobachtet, wobei das Absorptionssignal innerhalb von 15 min um 3 % ansteigt. Generell wurde eine Reaktionszeit des BCA-Assays von 240 min nach Herstellerempfehlung gewählt.

Der mögliche Zentrifugationseinfluss und die zeitliche Verzögerung der Absorptionsmessung kann bei einer Zentrifugationszeit von 7 min für die 500 nm PS NP vernachlässigt werden. Daher wurde der BCA-Assay 240 min lang für die 500 nm PS NP durchgeführt und anschließend die NP abzentrifugiert. Die Zentrifugationsdauer von 45 min für die 100 nm PS NP nach dem BCA-Assays mit einer Reaktionszeit von 240 min führt zu einem Anstieg des Absorptionssignals von 9 %, was zu einer Überbestimmung führt. Um die zeitliche Verzögerung und den möglichen Einfluss der Zentrifugation zu verringern, wurde die Reaktionszeit auf 210 min verkürzt und die Proben vor der Detektion für 45 min zentrifugiert (siehe Abbildung 4.23).

Einfluss der Partikelmatrix auf die SA_v-Quantifizierung im BCA-Assay. Die NP-Matrix kann ebenfalls mit dem Kupfer(II)-BCA-Komplex reagieren. Ggf. sind in der NP-Matrix noch synthesebedingte Rückstände zu finden. In Abbildung 4.18 (a) ist der Einfluss der Matrix der verwendeten carboxy- und aminofunktionalisierten, 100 nm PS NP vor bzw. nach dem Waschen und Abzentrifugieren der NP dargestellt. Der Zuwachs des Absorptionssignals der carboxyfunktionalisierten 100 nm und 500 nm PS NP (siehe Anhang Abbildung 7.4) gegenüber der Absorption des Kupfer(II)-BCA-Komplexes (Abbildung 4.18 (a), schwarze durchgezogene Linie) liegt bei 0,01 bis 0,06 und ist somit vernachlässigbar. Dieses Absorptionssignal kann von der Reaktion der NP-Matrix mit dem Kupfer(II)-BCA-Komplex herrühren. Allerdings reagiert der Komplex nach Herstellerangaben ebenso mit der Umgebungsluft, was zu einem Anstieg des Absorptionssignals führt. Der Zuwachs der gewaschenen, aminofunktionalisierten, 100 nm PS NP liegt bei 0,19 und ist auf die NP-Matrix zurückzuführen (Abbildung 4.18 (a)). Durch Herstellerinformationen ist bekannt, dass die Aminogruppen durch Umfunktionalisierung vorheriger Carboxygruppen von carboxyfunktionalisierten PS NP unter Bildung einer Amidbindung hergestellt wurden. Da Peptidbindungen partiell für die Reaktivität von Proteinen im BCA-Assay verantwortlich sind, kann das erhöhte Absorptionssignal dem Vorliegen von Amidbindungen zugeschrieben werden. Demnach kann es zu einer Überbestimmung von SA_v an aminofunktionalisierten PS NP beim

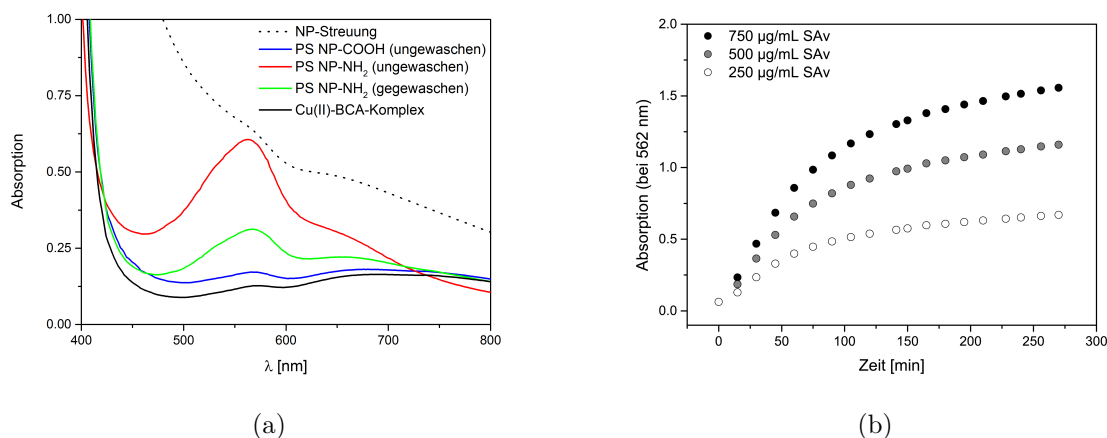


Abbildung 4.18: (a) Absorptionsspektren des Kupfer(II)- bzw. Kupfer(I)-BCA-Komplexes nach der Reaktion mit ungewaschenen (rot) und gewaschenen amino- (grün) und carboxyfunktionalisierter (blau), ungefärbten, 100 nm PS NP vor (schwarze gestrichelte Linie; carboxylierte, 100 nm PS NP) und nach (durchgezogene Linien) dem Zentrifugieren der NP. (b) Zeitabhängige Absorptionsmessung des Kupfer(I)-BCA-Komplexes bei Reaktion mit SAV im BCA-Assay bei verschiedenen SAV-Konzentrationen bei einer Wellenlänge von 562 nm.

BCA-Assay kommen, gerade wenn es sich um solche unfunktionalisierten NP handelt.

Kreuzreaktionen von Additiven bei der SAV-Quantifizierung. Weiterhin können verschiedene Additive den Kupfer(II)-BCA-Komplex reduzieren, wodurch es zu einer Überbestimmung von SAV kommen kann. Nach eigenen Untersuchungen sowie auch nach den Herstellerangaben konnten keine Kreuzreaktionen mit dem eingesetzten MES- und Phosphatpuffer, dem teilweise verwendeten Tween 20 und mit Maleimid (MAL) nachgewiesen werden [179–181]. Dagegen zeigten NHS, sulfo-NHS und NHS-PEG-MAL als einzelne Substanzen im BCA-Assay einen deutlichen Anstieg des Absorptionssignals [21, 22]. Durch mehrmaliges Waschen während der Partikelpräparation können additive und emulsionspolymerisationsbedingte Rückstände entfernt werden und eine Überbestimmung ausgeschlossen werden. In Abbildung 4.18 (a) ist die Absorption nach der Reaktion von aminofunktionalisierten 100 nm PS NP mit dem BCA-Assay und anschließender Zentrifugation vor (rot) und nach (grün) dem Waschen dargestellt. Nach dem Waschen ist die Absorption der NP um 60 % reduziert. Die Erhöhung der Absorption durch ungewaschene, carboxyfunktionalisierte 100 nm PS NP liegt bei 0,05 und ist vernachlässigbar.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die im BCA-Assay eingesetzten NP-Protein-Konjugate sehr gut aufgereinigt werden müssen, um unerwünschte Kreuzreaktionen und eine daraus resultierende Überbestimmung von SAV auszuschließen. Zudem sollte jede Substanz, welche im BCA-Assay neben dem Protein eingesetzt wird, auf potentielle Kreuzreaktivitäten mit diesem Assay untersucht werden.

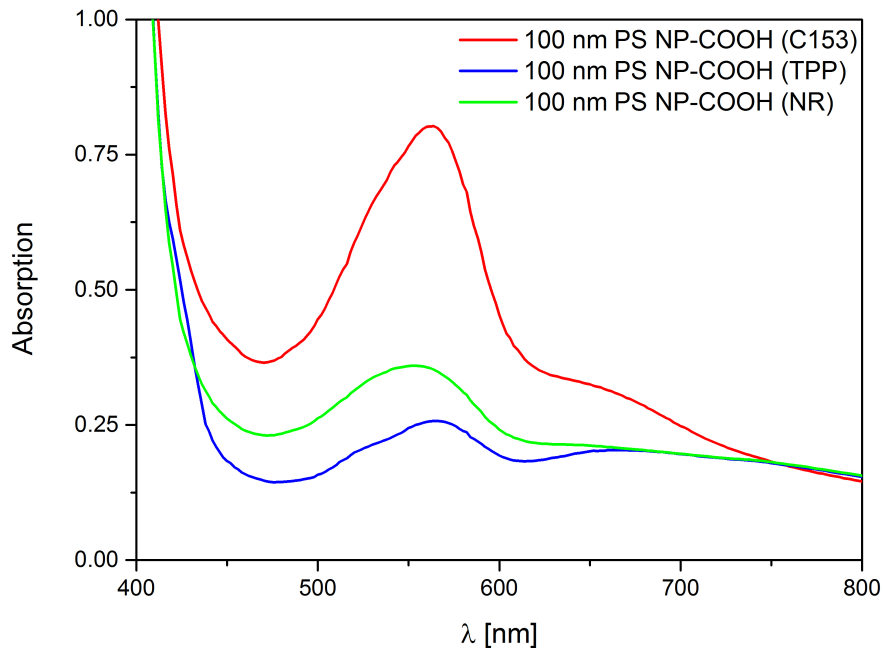


Abbildung 4.19: Absorptionsspektren des Kupfer(I)-BCA-Komplexes nach der Reaktion mit C153-, TPP- und Nilrot-gefärbten, carboxyfunctionalisierten, 100 nm PS NP im BCA-Assay.

Einfluss von Farbstoffen auf die SA_v-Quantifizierung. Um die Reaktivität der Farbstoffe im BCA-Assay zu untersuchen, wurden carboxylierte, 100 nm PS NP, beladen mit C153, TPP oder NR, im BCA-Assay eingesetzt und vor der Absorptionsmessung abzentrifugiert. In Abbildung 4.18 ist deutlich das Anwachsen des Absorptionssignals bei 562 nm um 0,66 für C153-gefärbte NP (rot) zu erkennen. TPP (blau) und NR (grün) zeigen dagegen ein geringeres Anwachsen des Absorptionssignals um 0,13 bzw. 0,23. Möglicherweise stammt die Zunahme der Absorption von freigesetztem Farbstoff, welcher nur an der Oberfläche der NP absorbiert war. Einen Hinweis darauf könnte das Absorptionsspektrum des Kupfer(I)-BCA-Komplexes (Abbildung 4.19) geben. Für die NR-beladenen NP ist das Absorptionsspektrum etwas ins Blaue verschoben und für die TPP-beladenen NP ist eine strukturelle Veränderung des Absorptionsspektrums zu erkennen. Hierbei könnte es sich um einen zusätzlichen Absorptionsbeitrag der Farbstoffe handeln.

Um die Überbestimmung von SA_v an C153-gefärbten PS NP weiter zu untersuchen, wurden carboxylierte, 100 nm PS NP mit verschiedenen Mengen C153 (0,5;1;2;10 mM) beladen und mit SA_v funktionalisiert. Wie in Abbildung 4.20 gezeigt ist, steigt die Summe des im Überstand und am NP gefundenen SA_v mit steigender C153-Menge über 100 % an. Bei Beladungskonzentrationen von 2 sowie 10 mM wurde ca. 10 % mehr SA_v gefunden. Aus diesen Ergebnissen kann demnach geschlossen werden, dass einige Farbstoffe zu einer Überbestimmung von SA_v beim BCA-Assay führen können. Im Fall des verwendeten C153 liegt die Überbestimmung an SA_v bei ca. 10 %.

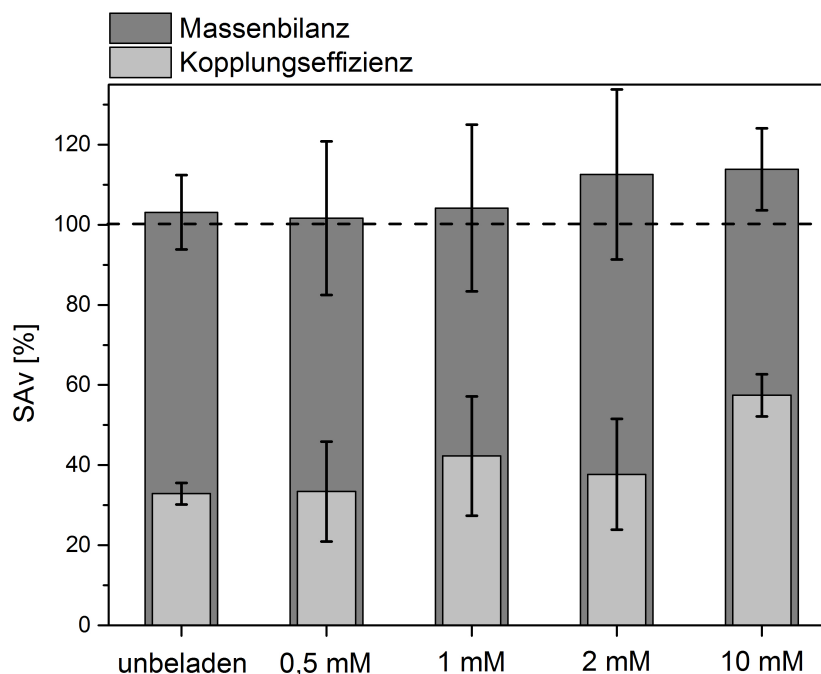


Abbildung 4.20: Massenbilanzen und Kopplungseffizienzen von SAV gebunden an unbeladene und C153-gefärbte (Konzentrationsangabe der Beladungslösung), carboxylierte, 100 nm PS NP, die mittels BCA-Assay gemessen wurden. Die angegebenen Fehlerbalken (Standardabweichungen) wurden aus drei unabhängigen Messungen berechnet.

4.2.3.2 Biotin-FITC-Titration

Einfluss von NP und Farbstoffen auf die SAV-Quantifizierung in der Biotin-FITC-Titration. Die Biotin-FITC-Titration reagiert selektiv auf biotinbindende Proteine wie SAV. Auch hier werden mögliche Störeinflüsse durch die Partikelmatrix und Farbstoffe untersucht. In Abbildung 4.21 (a) sind verschiedene Biotin-FITC-Titrations dargestellt, in denen Biotin-4-Fluorescein (B4F) mit und ohne SAV, jeweils in Abwesenheit und Gegenwart von carboxylierten, C153-gefärbten, 100 nm PS NP titriert wurde. Durch die Zugabe von SAV wird die Emission von B4F bis zur Sättigung aller SAV-Bindungstaschen gelöscht. Anschließend steigt das Fluoreszenzsignal linear an, was dem Anstieg von frei in Lösung befindlichem B4F entspricht. Anhand des Knickpunktes kann die Menge an verbrauchtem B4F bestimmt werden und daraus die Menge an eingesetztem SAV.

Die Fluoreszenzintensität steigt ohne SAV in Abhängigkeit der zugegebenen B4F-Menge linear in Abwesenheit und Gegenwart der NP jeweils gleich an, d.h. dass weder die NP noch der Farbstoff einen Einfluss auf den linearen Anstieg besitzen. Der erhöhte Untergrund ist auf die spektrale Überlagerung der Absorptions- und Emissionsbanden von B4F und C153 (Abbildung 4.22 (a)) zurückzuführen. Beide Farbstoffe lassen sich im Absorptionsmaximum von B4F bei $\lambda = 485$ nm anregen und emittieren im Spektralbereich der B4F-Emission.

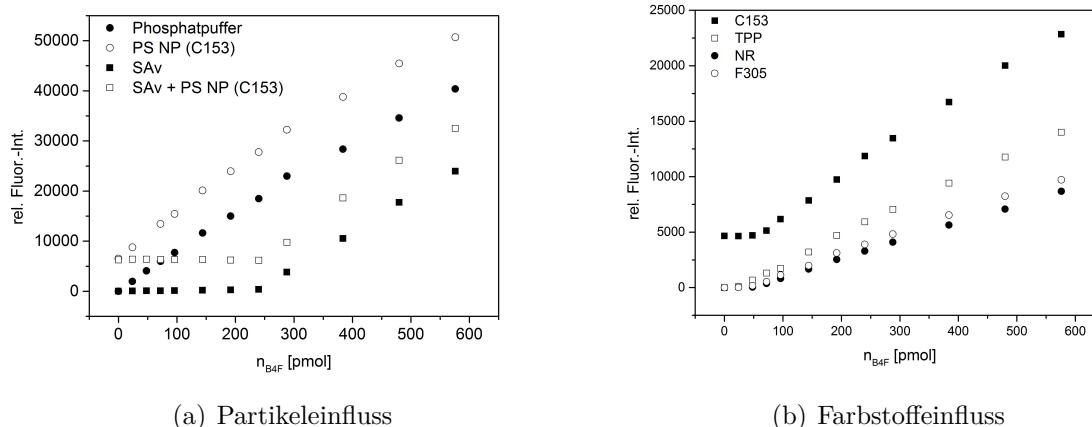


Abbildung 4.21: (a) Biotin-FITC-Titration mit (Quadrate) und ohne SAV (Kreise) in jeweils Abwesenheit (schwarze Symbole) und Gegenwart (weiße Symbole) von carboxylierten, C153-gefärbten, 100 nm PS NP in Phosphatpuffer (100 mM). Die Menge an zugegebenen SAV war jeweils gleich. (b) Biotin-FITC-Titration von SAV-funktionalisierten, gefärbten, 100 nm PS NP (carboxyfunktionalisiert). Als Farbstoffe wurden C153 (schwarze Quadrate), TPP (weiße Quadrate), Nilrot (schwarze Kreise) und F305 (weiße Kreise) verwendet.

Nach Zugabe von SAV ist zu sehen, dass die zugegebenen Partikel sowie C153 keinen Einfluss auf die Lage des Knickpunktes besitzen und in den Versuchen ohne und mit C153-beladene NP identische Mengen an SAV bestimmt werden konnten.

Neben C153-beladenen Partikeln wurden weitere Farbstoffe, unter anderem Nilrot, Lumogen® F305 und TPP, untersucht. Die Absorptionsbanden dieser Farbstoffe überlagern sich spektral mit der Emissionsbande von B4F (Abbildung 4.22 (b)-(c)), wodurch es zu Reabsorption des von B4F emittierten Lichtes bei $\lambda = 525$ nm kommen kann. Dadurch kann es zu einem flacheren linearen Anstieg des Fluoreszenzsignals von ungebundenem B4F kommen. In Abbildung 4.21 (b) sind die Titrationskurven von partikelgebundenem-SAV an NR-, F305- und TPP-beladenen 100 nm PS NP (EDC/sulfo-NHS-Kopplung) gezeigt, bei denen ein kleinerer linearer Anstieg zu sehen ist. Durch den flacheren Anstieg kann es ggf. zur Unterbestimmung von SAV kommen. Die C153-beladenen NP dagegen zeigen dagegen nur einen höheren Signaluntergrund, jedoch kein Abflachen des Anstiegs. Jedoch ist dieser Fehler trotz der unterschiedlichen Anstiege vernachlässigbar, da der Knickpunkt durch den Reabsorptionseffekt nur geringfügig verschoben wird.

Die Biotin-FITC-Titration wird durch Partikelstreuung oder spektrale Interferenzen mit Kodierungsfarbstoffen nicht beeinträchtigt und ist daher gut für die Quantifizierung von SAV verwendbar.

4.2.3.3 Methodenvergleich und Massenbilanz

Zum Vergleich des BCA- und Biotin-FITC-Assays wurden ungefärbte, carboxylierte, 100 nm PS NP via EDC/sulfo-NHS-Ester-Kopplung und ungefärbte, aminierte 100 nm PS NP via MAL-Thiol-Kopplung mit SAV funktionalisiert und im Anschluss mit

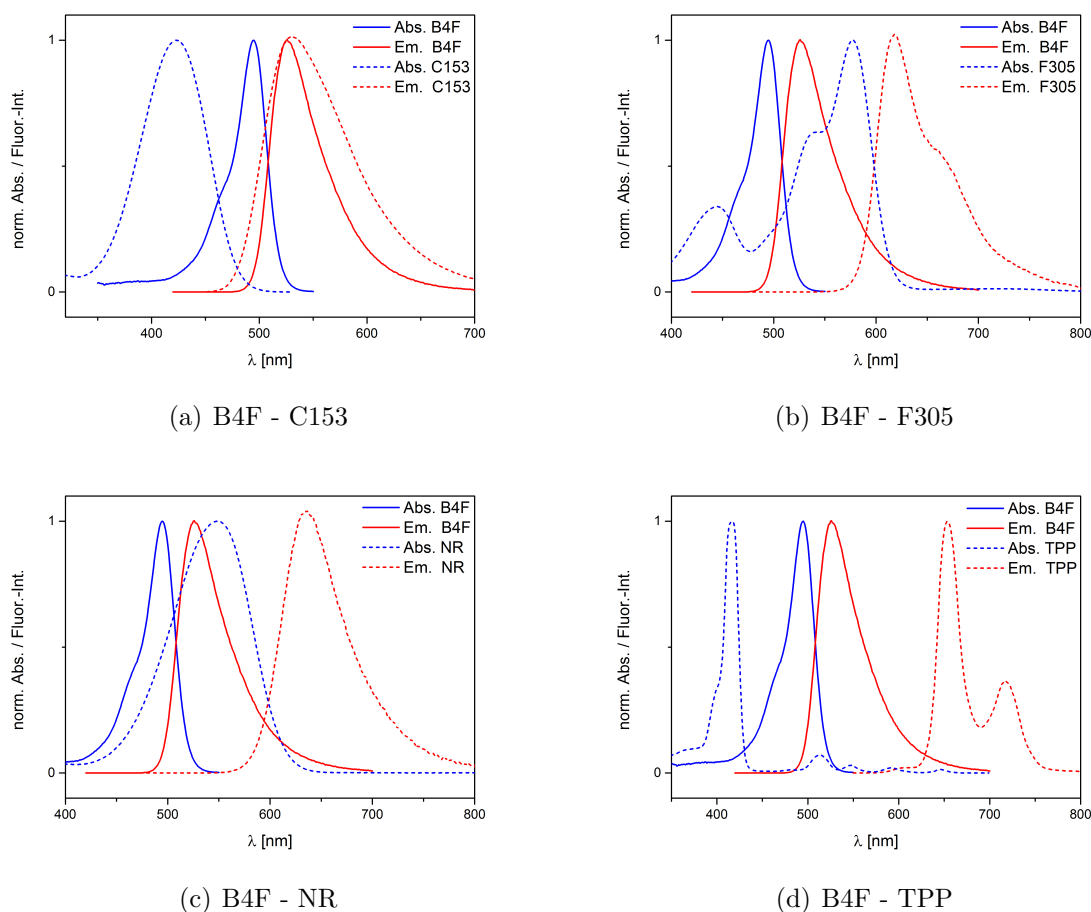


Abbildung 4.22: Normierte Absorptions- und Emissionsspektren von B4F und der Farbstoffe (a) C153, (b) Lumogen® F305, (c) Nilrot und (d) TPP.

dem BCA-Assay und der Biotin-FITC-Titration die Menge an partikelgebundenem und ungebundenem SAV im Überstand bestimmt. Aus dem Vergleich der bekannten eingesetzten Menge an SAV mit der Summe des gebundenen und ungebundenen SAV (Massenbilanz) lassen sich Rückschlüsse auf die Richtigkeit der Ergebnisse und Anwendbarkeit des Nachweises ziehen.

Während der BCA-Assay die totale Menge an SAV ermittelt (Abschnitt 2.3.2.1), gibt die Biotin-FITC-Titration die Menge an funktionellem SAV an (Abschnitt 2.3.2.2). Soweit keine Biotin-Bindungsaschen von SAV durch partielle Proteindenaturierung oder durch sterische Hinderung unzugänglich sind, kann über die Menge an verbrauchtem Biotin-FITC mit Hilfe des Stöchiometriefaktors von 4 die insgesamt vorhandene Menge an funktionalem SAV berechnet werden. Kann eine Bindungstasche kein Biotin aufnehmen, reduziert sich folglich der Stöchiometriefaktor, was zu einer Unterbestimmung der gesamten Menge an SAV führt. Nach Herstellerangaben sind alle Bindungstaschen des eingesetzten SAV aktiv. Zudem wurde das SAV vor der Biokonjugation mittels BCA-Assay und Biotin-FITC-Titration quantifiziert, was zu identischen Mengen an SAV führte. Daher soll davon ausgegangen werden, dass nicht-reagiertes SAV im Überstand nach der SAV-Funktionalisierung zu 100 % funktional

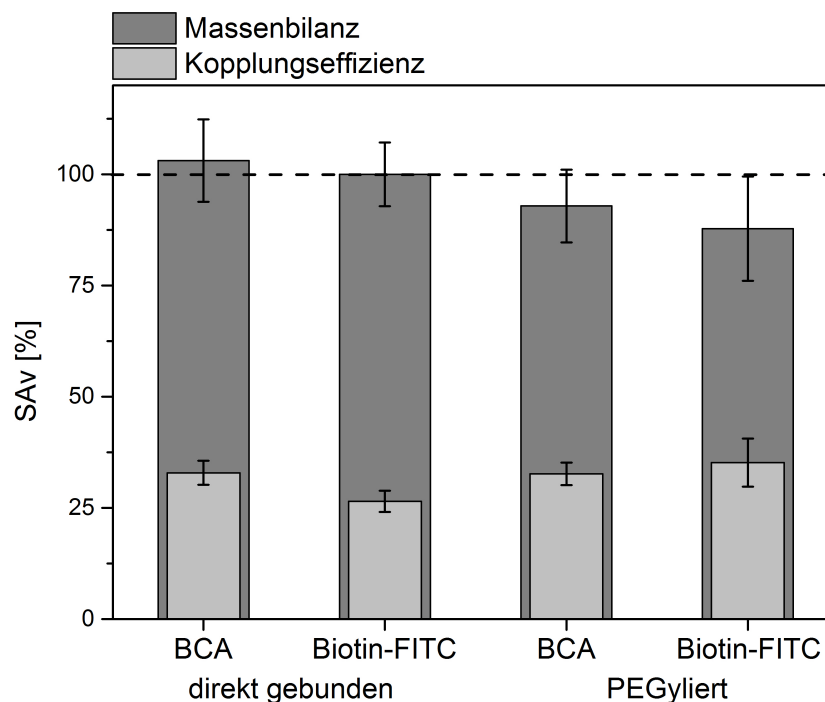


Abbildung 4.23: Kopplungseffizienzen von SAV gebunden an ungefärbte 100 nm PS NP mittels EDC/ sulfo-NHS-Ester-Chemie (direkt gebunden) und mittels PEG-Linker (PEGyliert) und die zugehörigen Massenbilanzen. Die SAV-Quantifizierung von partikelgebundenem und ungebundenem SAV im Überstand wurde mit Hilfe des BCA- Biotin-FITC-Assay durchgeführt. Die angegebenen Fehlerbalken (Standardabweichungen) wurden aus drei unabhängigen Messungen berechnet.

ist, d.h. alle Bindungstaschen sind für Biotin-FITC zugänglich, und somit wird die Berechnung der totalen Menge des nicht gebundenen SAV mit dem Stöchiometriefaktor 4 durchgeführt.

In Abbildung 4.23 ist zu erkennen, dass der BCA- und Biotin-FITC-Assay vergleichbare Werte liefern. Das bedeutet, dass fast alles NP-gebundene SAV auch funktional ist. Für die direkte Kopplung von SAV entspricht die Menge an wiedergefundenem SAV (dunkelgraue Balken) im Rahmen der Messunsicherheiten der eingesetzten Menge an SAV (Massenbilanz = 100 %). Für die Kopplung über den PEG-Linker wurde ca 10 % weniger SAV mit beiden Methoden gefunden.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann trotz einer Abweichung von 10 % für PEG-gekoppeltes SAV geschlossen werden, dass beide Methoden für die SAV-Quantifizierung an NP geeignet sind.

4.2.3.4 Einfluss der Farbstoffe auf die SAV-Kopplung und die SAV-Funktionalität

Für die Anwendung in photo- und fluometrischen Immunoassays müssen die NP mit Farbstoffen beladen werden. Farbstoffe können einen Einfluss auf die Kopplungseffizienz und die SAV-Funktionalität besitzen, die im Folgenden untersucht wurden.

Einfluss von Farbstoffen auf die SA_v-Kopplung. Um den Einfluss der Farbstoffe auf die SA_v-Kopplung zu untersuchen, wurden unbeladene, C153- (10 mM) und TPP-gefärbte (2 mM), 100 nm PS NP mit SA_v via EDC/sulfo-NHS- und MAL-PEG-Thiol-Kopplung funktionalisiert und anschließend SA_v mittels BCA- und Biotin-FITC-Assay quantifiziert. In Tabelle 4.5 sind die bestimmten Kopplungseffizienzen, die mittlere Anzahl an gebundenen SA_v je NP sowie die zugehörigen Messunsicherheiten gezeigt, welche im Anhang in Abbildung 7.6 noch einmal grafisch dargestellt sind.

Tabelle 4.5: Mittels BCA- und Biotin-FITC-Titration gemessene Kopplungseffizienzen (KE) und mittlere Anzahl gebundener SA_v je NP (SA_v/NP). Die angegebenen Fehler (Standardabweichungen) wurden aus drei unabhängigen Messungen berechnet.

Farbstoff- beladung	PEG	KE [%]		SA _v /NP	
		BCA	Biotin-FITC	BCA	Biotin-FITC
unbeladen	nein	33±3	26±2	48±4	39±3
TPP (2 mM)	nein	45±4	3±1	66±5	4±2
C153 (10 mM)	nein	57±5	48±6	84±8	71±8
unbeladen	PEG	33±3	35±5	89±7	96±15
TPP (2 mM)	PEG	37±3	21±3	100±8	57±9
C153 (10 mM)	PEG	40±3	30±4	109±9	81±11

Wie aus Tabelle 4.5 folgt, konnte die Kopplungseffizienz und die Menge an direkt gebundenem SA_v durch das Beladen der NP mit Farbstoffen gesteigert werden. Eine mögliche Erklärung könnte die Zunahme der Hydrophobizität der PS NP durch das Beladen mit hydrophoben Farbstoffen sein. Dadurch nehmen die attraktiven Wechselwirkungen zwischen den NP und SA_v zu [20, 178]. Wird dagegen die Oberfläche der NP durch PEG abgeschirmt, ist die attraktive Wechselwirkung zwischen der NP-Oberfläche und SA_v geringer und der Effekt ist kleiner [20, 117].

Beim Vergleich der Ergebnisse des BCA-Assays und der Biotin-FITC-Titration wird bis zu 20 % weniger SA_v mit der Biotin-FITC-Titration an der NP-Oberfläche von unbeladenen und C153-beladenen, 100 nm PS NP gefunden, welche direkt mit SA_v- und mit SA_v-PEG-funktionalisiert waren. Dies liegt ggf. an einer eingeschränkten Zugänglichkeit bzw. Funktionalität von SA_v. Für TPP-beladene NP ist der Unterschied der gefundenen SA_v Mengen weitaus größer. Hier wurden gegenüber der Biotin-FITC-Titration mittels BCA-Assay ca. 90 % mehr SA_v für direkt SA_v-funktionalisierte und 40 % mehr SA_v für SA_v-PEG-funktionalisierte NP an der NP-Oberfläche gefunden. Dies lässt vermuten, dass die Zugänglichkeit bzw. die Funktionalität von SA_v an TPP-beladenen NP viel geringer ist. Da die Farbstoffe nach der Beladung der NP auch an der Oberfläche der NP adsorbiert sein können, können die adsorbierten Farbstoffe mit SA_v wechselwirken.

Diese Kopplungsuntersuchungen zeigen, dass Kodierfarbstoffe prinzipiell die Kopplungsreaktion und insbesondere die Proteinfunktionalität beeinflussen können.

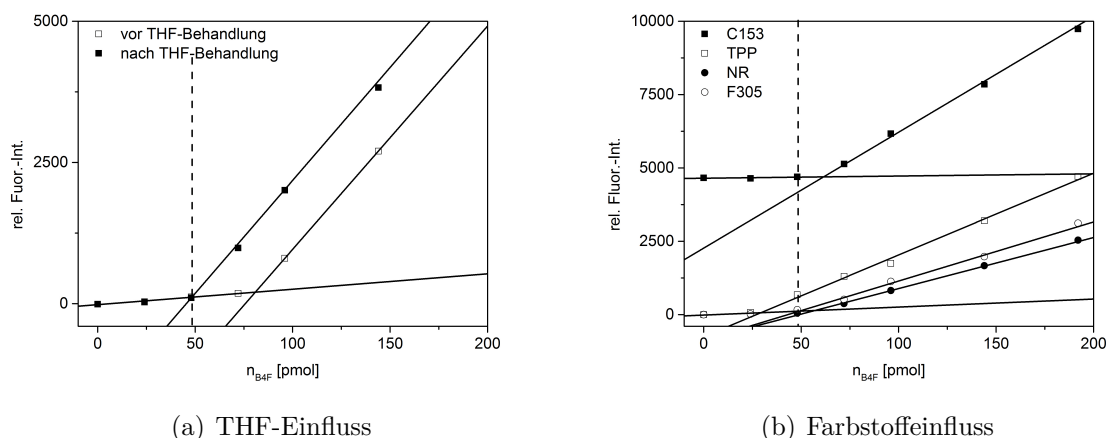


Abbildung 4.24: Biotin-FITC-Titration von 100 nm PS NP, welche mittels EDC/sulfo-NHS-Kopplung mit SAV funktionalisiert und anschließend mit (a) THF behandelt und (b) mit Farbstoff-THF-Lösungen verschiedener Farbstoffkonzentrationen gefärbt wurden. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Menge an SAV-gebundenem B4F nach der Zugabe von THF.

Generell sollten bei der Kopplung von Proteinen zwei unterschiedliche Methoden zur Proteinquantifizierung, sofern vorhanden, angewandt werden.

Einfluss der Farbstoffe auf die SAV-Funktionalität. Der Einfluss von Farbstoffen auf die Funktionalität von SAV wurde daraufhin genauer untersucht. Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit der Farbstoffe im wässrigen Medium konnten SAV in Gegenwart der verwendeten Farbstoffe nicht mit B4F titriert und so eine mögliche Wechselwirkung zwischen SAV und den Farbstoffen untersucht werden. Daher wurde SAV an ungefärbte, carboxylierte, 100 nm PS NP gebunden und die Menge an SAV mittels Biotin-FITC-Titration bestimmt. Anschließend wurden die SAV-funktionalisierten NP mit Farbstoff beladen und die Menge an noch funktionalem SAV bestimmt. Zur Kontrolle, um den Einfluss des Quelllösungsmittels zu bestimmen, wurde eine Probe nur mit dem Quelllösungsmittelgemisch ohne Farbstoff behandelt.

In Abbildung 4.24 (a) ist die Biotin-FITC-Titration von SAV-funktionalisierten, ungefärbten, 100 nm PS NP vor und nach der Zugabe des Quelllösungsmittels dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Knickpunkt nach der Behandlung mit THF zu kleineren B4F-Mengen verschoben ist und somit weniger B4F an SAV gebunden hat. Durch den Einfluss des organischen Lösungsmittels (THF) kommt es partiell zu Proteindenaturierung [182].

In Abbildung 4.24 (b) sind Biotin-FITC-Titrationen der SAV-funktionalisierten NP, welche erst nach SAV-Funktionalisierung mit C153 (10 mM), TPP (2 mM), NR (2 mM) und F305 (10 mM) beladen wurden, dargestellt. Der Farbstoffeinfluss auf die SAV-Funktionalität kann bei C153, NR und F305 vernachlässigt werden. Als einziger Farbstoff beeinflusst TPP die Funktionalität von SAV stärker als THF. Dies könnte ggf. an einer Wechselwirkung von TPP mit SAV liegen, die zur Denaturierung von SAV führt. Untersuchungen an mit verschiedenen TPP-Mengen beladenen, direkt

SAv-funktionalisierten, 100 nm PS NP zeigen, dass die Massenbilanz mit steigender TPP-Menge (Abbildung 4.25) abnimmt. Dabei wird deutlich, dass gebundenes SAv schon bei der kleinsten Beladungsmenge nicht mehr quantitativ nachgewiesen werden kann. Dagegen konnte mittels BCA-Assay die SAv-Anbindung an der Oberfläche der NP nachgewiesen werden (siehe Anhang Abbildung 7.5). Durch die Funktionalisierung TPP-beladener NP mit PEG kann die Wechselwirkung zwischen TPP und gebundenem SAv stark reduziert werden. Dies folgt aus der Bestimmung der Massenbilanzen und Kopplungseffizienzen mittels Biotin-FITC- (Abbildung 4.25) und BCA-Assay (siehe Anhang Abbildung 7.5) von SAv-PEG-funktionalisierten, TPP-beladenen, 100 nm PS NP.

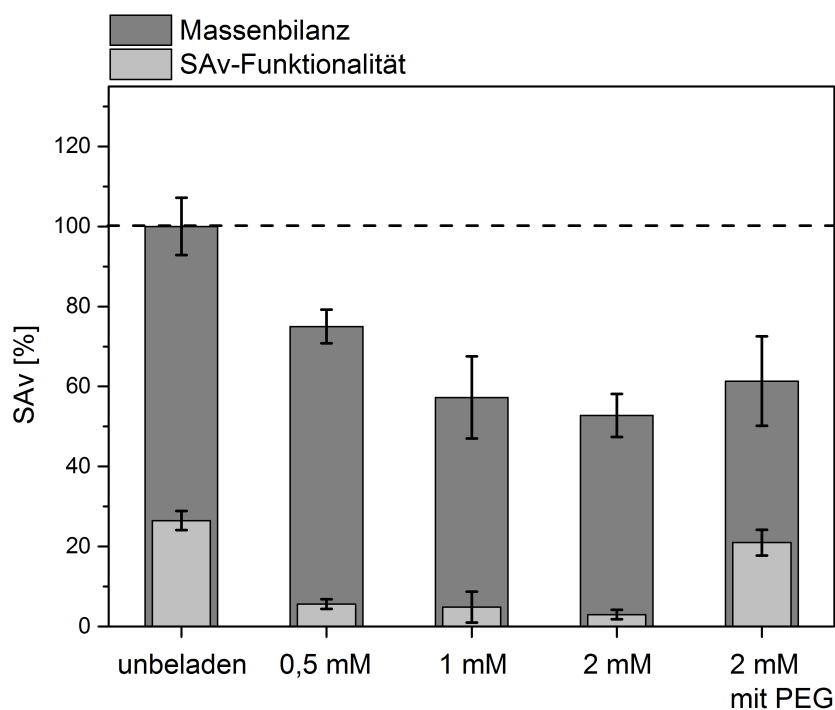


Abbildung 4.25: Massenbilanzen von SAv, gebunden an unbeladene und TPP-gefärbte, carboxylierte und aminierte (PEG), 100 nm PS NP, die mittels Biotin-FITC-Titration bestimmt wurden. Die angegebenen Konzentrationen entsprechen der Farbstoffkonzentration der Beladungslösungen. Die angegebenen Fehlerbalken (Standardabweichungen) wurden aus drei unabhängigen Messungen berechnet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass farbstoffspezifische Einflüsse zu einem Verlust an SAv-Funktionalität führen können. Dies kann insbesondere problematisch bei farbstoffdotierten Partikeln sein, wo es keine Angaben zum verwendeten Farbstoff gibt. Solche Farbstoff-Protein-Wechselwirkungen können, wie im Fall von TPP gezeigt, durch eine PEG-Funktionalisierung abgeschirmt werden.

4.3 CRP-Immunoassays mit Nanopartikel-Labeln

Anschließend werden die hergestellten NP in einem Sandwich-ELISA für den Nachweis des Entzündungsmarkers C-reaktives Protein (CRP) eingesetzt und bezogen auf ihre Leistung im Immunoassay verglichen. Dabei werden Einflussfaktoren wie Detektionsmethode, NP-Größe, Farbstoffbeladung, SAv-Funktionalisierung und verwendete Farbstoffe systematisch untersucht.

4.3.1 Aufbau des CRP-Immunoassays

In einem ersten Schritt wurde der Fängerantikörper auf der MTP immobilisiert, anschließend wurden freie Bindungsstellen mit BSA bedeckt, danach CRP gebunden, im Anschluss der biotinylierte Detektionsantikörper gebunden und im letzten Schritt das HRP-SAv-Konjugat gekoppelt, bevor das Absorptionssignal nach TMB-Zugabe und Abstoppen mit H_2SO_4 detektiert wurde (siehe Abschnitt 3.5). In Abbildung 4.26 ist die Dosis-Wirkungs-Kurve mit einem 5-PL-Fit gezeigt (siehe auch Tabelle 4.8).

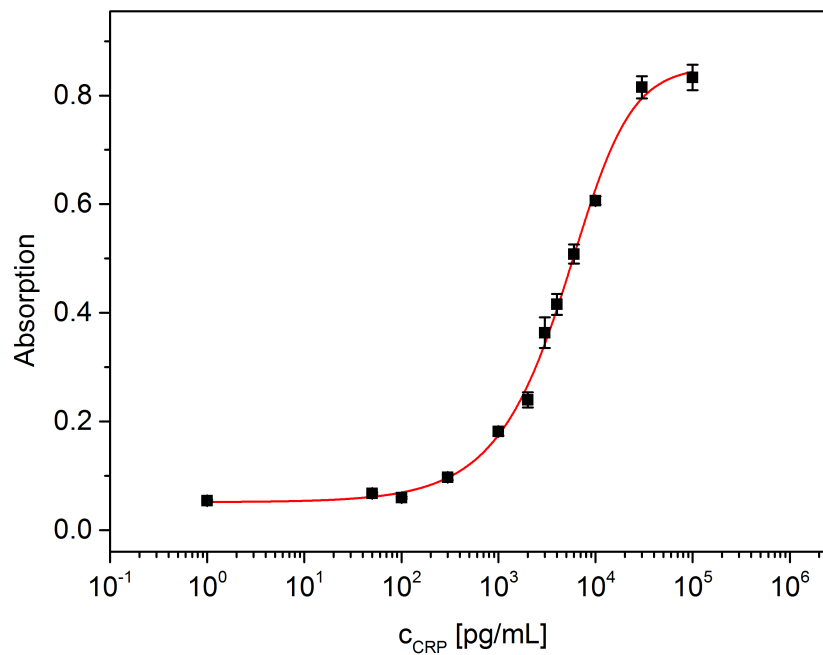


Abbildung 4.26: Dosis-Wirkungs-Kurven mit 5-PL-Fit für den CRP-ELISA mit HRP und TMB. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Messungen inkl. Standardabweichung.

4.3.2 Einfluss der Partikelparameter auf den CRP-Immunoassay

4.3.2.1 NP-Label und Qualitätskriterien

Zum Testen der fluoreszenten NP-Label wurde das HRP-SAv-Konjugat durch die SAv-funktionalisierten NP ersetzt. Alle weiteren Assay-Bedingungen wurden gleich gelassen. Nach der Detektion des Fluoreszenzsignals wurden die Messwerte mittels 5-PL-Fit angepasst und die Qualitätsparameter EC_{50} , DR, RDR, LOD und R^2 ermittelt (siehe 2.1.3.3). Anhand dieser Parameter wurden die NP- mit dem HRP-Label verglichen und so eine Aussage zur Sensitivität getroffen. Die Sensitivität hängt unter anderem von der Höhe des Untergrundsignals und von der Höhe des Detektionssignals pro Antigen ab. Zudem hängt sie auch von der Bindung des Labels an den biotinmarkierten Detektionsantikörper ab.

4.3.2.2 Signalverstärkung und Einflüsse verschiedener (Nanopartikel)parameter auf das Immunoassay

Bei einem optisch ausgelesenen Assay wird die Signalgröße bestimmt durch die Zahl N der absorbierenden und/oder fluoreszenten Moleküle, die vom jeweiligen Messgerät angeregt und detektiert werden, sowie durch ihren molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$ bei der verwendeten Anregungswellenlänge und ihre Fluoreszenzquantenausbeute Φ_f , die beide farbstoffspezifisch und umgebungsabhängig sind. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Farbstoffmoleküle nicht miteinander wechselwirken und sich die Signalbeiträge pro Farbstoffmolekül additiv verhalten. Weitere geräteseitige Einflussgrößen beinhalten bei Fluoreszenzmessungen die gerätespezifische Anregungslichtintensität und die wellenlängenabhängige spektrale Empfindlichkeit des Detektionssystems. Die Nachweisempfindlichkeit wird zudem durch Signalbeiträge vom Hintergrund (Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis) und damit auch durch unspezifische Wechselwirkungen bestimmt.

Beim enzymkatalysierten Entwicklungsschritt basiert die Signalgenerierung darauf, innerhalb weniger Minuten eine hohe Anzahl von Farbstoffen zu produzieren. Das detektierte Absorptionssignal E ist direkt proportional zur Farbstoffkonzentration c nach dem Gesetz von Lambert-Beer (Gleichung 2.6). Der Substratumsatz ist dabei zeit-, temperatur- und pH-abhängig sowie abhängig von der Ionenstärke und Substratkonzentration [51]. Je länger die Dauer des Entwicklungsschrittes gewählt wird, desto mehr Farbstoffmoleküle tragen zum Detektionssignal bei und je höher ist das Signal (Signalverstärkung). Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen-Gesetzes kann durch die Detektion des Absorptionssignals die Anzahl der produzierten Farbstoffmoleküle berechnet werden, welche wiederum direkt proportional ist zur Antigenkonzentration.

Bezogen auf die optische Signalerzeugung mit Partikel-Reportern wie den hier verwendeten Farbstoff-beladenen Polymerpartikeln sollte eine Signalverstärkung durch höhere Beladungsmengen erreicht werden. Je mehr Farbstoffe pro NP eingebaut werden können, desto höher sollte das detektierte Signal sein. Dabei muss berücksichtigt werden, dass sich die optischen Eigenschaften der Farbstoffmoleküle in der Polymermatrix in Abhängigkeit von der Farbstoffbeladung z.B. durch Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen ändern können (siehe auch Abschnitt

2.1.2.1) und für einige Farbstoffe sogar in Abhängigkeit von der Partikelgröße (Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis) [25]. Werden die Farbstoffmoleküle aus den NP freigesetzt, kann das Problem der Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen umgangen werden und es gilt $B = N \cdot \Phi_f \cdot \epsilon(\lambda)$.

Um die Signalintensität zu steigern, d.h. zu verstärken, muss einer der signalrelevanten Parameter erhöht werden. Daraus lässt sich ein Signalverstärkungsfaktor (SF) als Quotient aus dem gesteigerten Wert und dem geringeren Wert eines gleichen Parameters ableiten (siehe Anhang Gleichung 7.2).

Um die signalrelevanten Parameter zu beeinflussen, können das Detektionsprinzip (1) (Detektion im Partikel oder nach Farbstoffextraktion), die NP-Größe (2), die Farbstoffbeladungsmenge (3) und der verwendete Farbstoff (5) geändert werden (siehe Abschnitte 2.1.2.1, 4.1.1.1, 4.1.3.2 und 4.1.3.3). Dabei muss auch berücksichtigt werden, dass die durch den NP-definierten Parameter wie die NP-Größe (2), die Beladungsmenge (3) und die SAV-Anbindung (4) auch einen Einfluss auf den CRP-Immunoassay besitzen, z.B. auf die Bindung an den Detektionsantikörper. Im Folgenden wurde der Einfluss der Parameter 1 bis 4 mit C153-gefärbten PS NP auf das CRP-Immunoassays untersucht.

4.3.2.3 Einfluss des Detektionsschemas

Die meisten partikelbasierten Immunoassays lesen NP direkt aus, ohne den Farbstoff zuvor zu extrahieren [28, 183, 184]. Nachteilig sind dabei farbstoff- und beladungskonzentrationsabhängige Löscheffekte. Solche Löscheffekte können durch eine Farbstoffextraktion, wie sie hier durchgeführt wurde, umgangen werden. So steigt z.B. die absolut bestimmte Quantenausbeute von C153 durch die Extraktion von C153 aus 100 nm PS NP etwa um einen Faktor 3 von $\Phi_f = 20\%$ im Partikel ($c_{\text{Beladung}} = 10 \text{ mM}$) auf $\Phi_f = 60\%$ des freien Farbstoffs in EtOH an (siehe auch Tabelle 4.6).

Unter Berücksichtigung der Assay- und Detektionsbedingungen und der Kavitätengeometrie (siehe Anhang Tabelle 7.7) können maximal $7,3 \cdot 10^9$ 100 nm NP während des Immobilisierungsschritts als Monolage in einer hexagonal dichtesten Packung gebunden werden (siehe Anhang Tabelle 7.7). Bei der höchstmöglichen C153-Beladung von 10 mM bei der Quellprozedur (siehe Abschnitt 4.1.3.2) befinden sich durchschnittlich 56.000 C153-Moleküle in einem NP. Damit befinden sich maximal $4,1 \cdot 10^{14}$ C153-Moleküle in der Kavität. Bei der Detektion des Farbstoffes im Partikel können nur die Farbstoffe detektiert werden, die sich im Strahlengang in Partikeln auf dem Boden der Kavität befinden, maximal $2,4 \cdot 10^{12}$ C153-Moleküle. Da jedoch auch Antikörper an der Kavitätenwand immobilisiert sind, werden die daran gebundenen Partikellabel bei der Detektion nicht berücksichtigt. Durch Extraktion können jedoch auch die Farbstoffe detektiert werden. Danach können sich bei Farbstoffextraktion maximal $4,3 \cdot 10^{12}$ C153-Moleküle im Volumen des Detektionsstrahls befinden, was bei gleichen optischen Eigenschaften der Farbstoffe zu einem theoretischen SF von 1,78 führt (siehe auch Tabelle 4.6). Durch beide Effekte kann somit durch die Extraktionsmethode für den betrachteten Farbstoff C153 und die verwendete Beladungskonzentration theoretisch ein SF von $1,78 \cdot 2,57 = 4,57$ erreicht werden (Tabelle 4.6).

In Abbildung 4.27 (a) sind die Dosis-Wirkungs-Kurven für den CRP-Immunoassay mit C153-beladenen, direkt SAV-funktionalisierten, 100 nm NP des Farbstoffes im wässrigen Medium (blau) und nach Extraktion in EtOH (rot) dargestellt. Die Signalintensitäten

Tabelle 4.6: Gemessene^a und theoretische^b SF. ^cSignalintensität am EC_{50} -Wert korrigiert um A_{\min} . ^dC153-Moleküle im Detektionsstrahl ($0,4 \text{ mm}^2$). ^egemessen für eine Suspension von C153-beladenen, ($c_{\text{Beladung}} = 10 \text{ mM}$), direkt SAV-funktionalisierten, 100 nm PS-NP. ^fC153 in EtOH.

Parameter	Detektion im Partikel	Detektion nach Extraktion	SF
$EC_{50 \text{ korrr.}}^c$	11.000 rel. Fluor.-Int.	15.000 rel. Fluor.-Int.	1,56 ^a
DR	15.000 rel. Fluor.-Int.	24.000 rel. Fluor.-Int.	1,56 ^a
Φ_f	22 % ^e	57 % ^f	2,57 ^b
C153 ^d	$2,4 \cdot 10^{12}$ C153	$4,3 \cdot 10^{12}$ C153	1,78 ^b

bei Farbstoffextraktion steigen stärker mit ansteigender CRP-Konzentration an als bei direkter Messung des Farbstoffes im Partikel. Beim Vergleich der Signalintensitäten des um A_{\min} korrigierten EC_{50} -Wertes ($EC_{50 \text{ korrr.}} = EC_{50} - A_{\min}$, Korrektur des Untergrundsignals) und DR (siehe Tabelle 4.8) ergibt sich somit ein experimentell bestimmter SF von ca. 1.56 (siehe Tabelle 4.6), welcher deutlich unter dem theoretisch abgeschätzten Wert von 4.57 liegt. Der geringere Effekt könnte auf Einflüsse des MTP-Lesegeräts zurückzuführen sein, da die Messungen ebenfalls von spezifischen Eigenschaften des MTP-Lesegeräts wie z.B. des Gains abhängig sind (siehe Anhang). Zudem kann ebenfalls keine Aussage getroffen werden, ob die Ankopplung der Antikörper bzw. der NP bestimmte Bereiche der Kavitäten, wie z.B. den Boden, bevorzugen. Des Weiteren lässt sich nicht mit Bestimmtheit sagen, ob die Farbstoffe zu 100 % aus dem Partikel extrahiert wurden. Weitere Versuche zeigten jedoch, dass die Signalintensität nach 5 und 30 min Extraktionszeit gleich war. Zudem ergaben Versuche bei der Bestimmung des Farbstoffgehalts (siehe Abschnitt 4.1.3.2), dass das Auflösen der NP in THF, bei dem alle Farbstoffe freigesetzt werden müssen, und die Extraktion von C153 mit EtOH für 100 nm PS NP vergleichbare Ergebnisse liefern [58].

4.3.2.4 Einfluss der Nanopartikelgröße

Als zweiter Parameter wurde der Einfluss der NP-Größe auf die Signalverstärkung sowie den CRP-Immunoassay untersucht. Die Farbstoffbeladungsmenge steigt mit dem NP-Volumen. Somit können mit größeren NP gegebenenfalls höhere Signalintensitäten je Antigen erzeugt werden, sofern sterische Effekte vernachlässigt werden können.

So wurden zum Vergleich mit den C153-gefärbten 100 nm PS NP, 500 nm PS NP mit C153 (10 mM) beladen, direkt mit SAV funktionalisiert und anschließend im CRP-Immunoassay getestet. Der Platzbedarf von 500 nm PS NP ist größer, weshalb nur ca. $2,9 \cdot 10^8$ NP als Monolage in einer hexagonal dichtesten Packung je Kavität Platz haben, was ca. 4 % an NP im Vergleich zu 100 nm PS NP entspricht. Es befinden sich 1.850.000 C153-Moleküle in jedem NP und damit maximal $3,2 \cdot 10^{15}$ C153-Moleküle in einer Kavität, 8 mal mehr als bei 100 nm NP.

In Abbildung 4.27 (b) sind die Dosis Wirkungs-Kurven inkl. 5-PL-Fit für C153-beladene, 500 nm PS NP gezeigt. Die Signalintensitäten von C153, gemessen im Partikel (Kreise), weisen nur ein geringfügig höheres Untergrundsignal als die für 100 nm PS NP erhaltenen

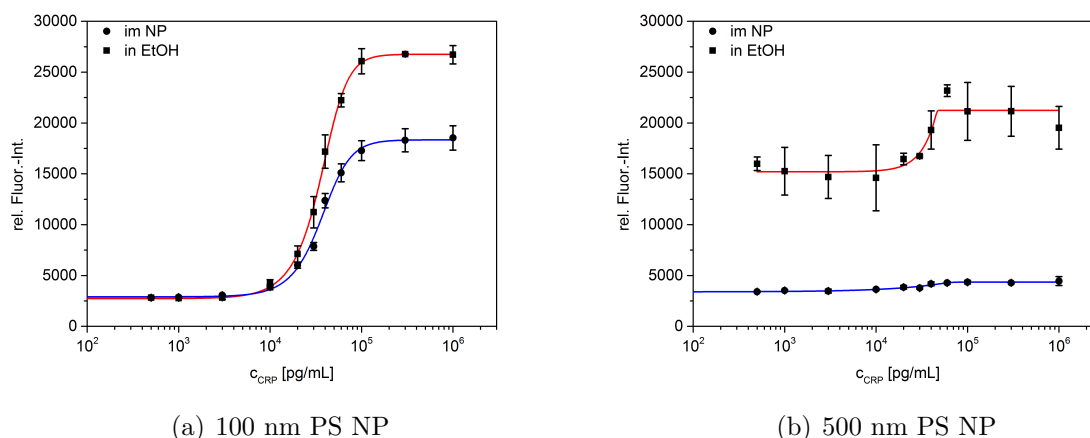


Abbildung 4.27: Dosis-Wirkungs-Kurven mit 5-PL-Fit für den CRP-Immunoassay mit C153-beladenen, direkt SAV-funktionalisierten, (a) 100 und (b) 500 nm NP mit Detektion von C153 im Partikel im wässrigen Medium (blau) oder nach Extraktion in EtOH (rot). Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Messungen inkl. der Standardabweichungen.

Signale auf, wohingegen die Signale des extrahierten Farbstoffs einen um Faktor 6 höheres Untergrundsignal besitzen, was zu einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis führt. Allgemein ist der DR mit 1000 rel. Fluoreszenzintensitäten für die Detektion im Partikel bzw. 6000 relative Fluoreszenzintensitäten für die Messung nach Extraktion gering. Dies kann eine Folge einer schlechteren Anbindung der 500 nm PS NP an die biotinmarkierten Detektionsantikörper (geringere spezifische Wechselwirkung) gegenüber den 100 nm PS NP sein aufgrund einer stärkeren sterischen Hinderung der größeren 500 nm NP (siehe auch Abschnitt 4.2.2.2). Während 100 nm PS NP eine sehr gute spezifische Anbindung ($DR = 24000$ rel. Fluoreszenzintensitäten) trotz geringer unspezifischer Adsorption ($A_{\min} = 2700$ rel. Fluoreszenzintensitäten) aufweisen ($RDR = 0,90$), ist die spezifische Anbindung der 500 nm PS NP sehr gering und die unspezifische Adsorption sehr hoch ($RDR = 0,28$). Zudem könnte C153 aus den größeren 500 nm NP nur unvollständig extrahiert worden sein [58].

Das deutlich höhere Untergrundsignal der 500 nm PS NP, gemessen nach der C153-Extraktion in EtOH, verglichen mit der Signalintensität der 100 nm PS NP nach C153-Extraktion, kann eine Folge hoher unspezifischer Adsorption und der 33-fach höheren Menge an Farbstoffen je NP sein. Die Quantenausbeute sollte in dem Fall kaum einen Einfluss auf die Höhe des Untergrundsignals haben, da die absolut bestimmten Quantenausbeuten von C153, gemessen in C153-beladenen ($c_{\text{Beladung}} = 10$ mM), direkt SAV-funktionalisierten 100 und 500 nm NP sich nur geringfügig unterscheiden und für beide NP-Sorten bei ca. bei 20 % liegen.

Aus den gefundenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass 500 nm PS NP fast ausschließlich unspezifisch im CRP-Immunoassay binden und daher nicht für die Quantifizierung von CRP geeignet sind.

4.3.2.5 Einfluss der Farbstoffbeladungsmenge

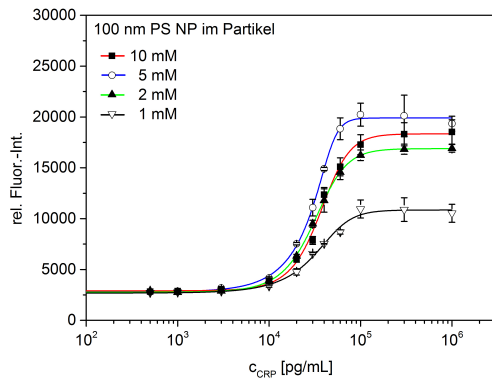
Um den Einfluss der Beladungsmenge auf den CRP-Immunoassay zu untersuchen, wurden 100 nm PS NP mit verschiedenen Mengen an C153 ($c_{\text{Beladung}} = 1; 2; 5; 10 \text{ mM}$) beladen und im Immunoassay eingesetzt. Die effektiven eingebauten Mengen je NP und die spektroskopischen Eigenschaften sind im Anhang in Tabelle 7.2 zusammengefasst. In Abbildung 4.28 sind die Dosis-Wirkungs-Kurven mit 5-PL-Fit für den CRP-Immunoassay für die C153-Detektion im Partikel und nach Extraktion dargestellt.

Bei der Detektion von C153 im NP (Abbildung 4.28 (a)) steigen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten mit steigender Farbstoffmenge je NP bis zur Farbstoffbeladungskonzentration von 5 mM an (blaue Linie) und fallen anschließend ab (rote Linie). Wie in Abbildung 4.28 (b) gezeigt, fällt der DR (schwarze Kreise) sowie der korrigierte EC_{50} -Wert (schwarze Quadrate) bei einer großen Anzahl an eingequollenen C153-Molekülen je NP ab und die gemessenen Werte korrelieren nicht mit der Menge an eingebautem Farbstoff. Wie bereits in Abschnitt 4.1.3.3 diskutiert, sinkt die Quantenausbeute mit steigender Partikelkonzentration. Je mehr Farbstoffe eingequollen werden, desto mehr wird die Fluoreszenz gelöscht und umso stärker sinkt die Brillanz (Gleichung 2.5, Abbildung 4.28 (b)) unter der theoretischen Annahme, dass der $\epsilon_{423 \text{ nm}}$ von C153 im NP gleich groß ist wie der des freien C153 und dass er sich in Abhängigkeit der eingequollenen Farbstoffmenge nicht ändert. Jedoch sollte, wie in Abschnitt 2.1.2.1 beschrieben, bei hohen Farbstoffbeladungen, bei denen Farbstoff-Farbstoff-Wechselwirkungen stattfinden können, statt des Extinktionskoeffizienten der Absorptionswirkungsquerschnitt zur Berechnung der Brillanz verwendet werden. Messungen zur Bestimmung des Absorptionswirkungsquerschnittes von Farbstoffen im NP sind jedoch sehr aufwendig und wurden daher nicht durchgeführt. In Abbildung 4.28 (e) ist die Brillanz mit dem DR (schwarze Kreise) sowie dem korrigierten EC_{50} -Wert (schwarze Quadrate) korreliert. Die gute lineare Korrelation lässt vermuten, dass die gemessenen Signalintensitäten neben der eingebauten Farbstoffmenge je NP hauptsächlich von der Quantenausbeute abhängen bzw. sich der mittlere molare Extinktionskoeffizient von C153 nur geringfügig mit der Menge an eingequollenem Farbstoff ändert (siehe auch Abschnitt 4.1.3.3). Zur Berechnung der Brillanz nach Gleichung 2.5 wurde in nächster Näherung der Extinktionskoeffizient von C153 in EtOH angenommen.

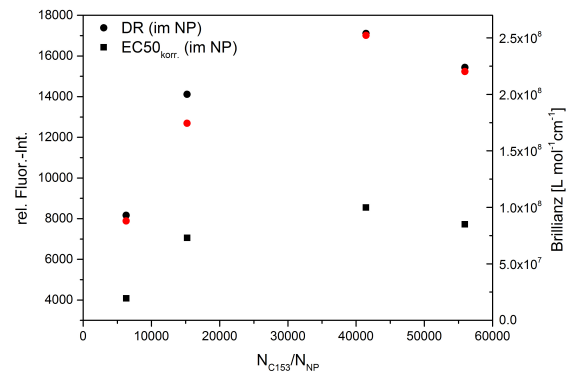
Bei der Detektion der Fluoreszenzintensitäten nach der Extraktionsmethode (Abbildung 4.28 (c)) steigen die gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten mit steigender Farbstoffmenge je NP an. Da das Signal nach der Extraktion (Abbildung 4.28 (d)) für DR (Kreise) oder den korrigierten $EC_{50 \text{ kor.}}$ -Wert (Quadrate) linear mit der eingebauten Farbstoffmenge ansteigt, kann daraus gefolgert werden, dass die Signalintensitäten nur von der eingebauten Farbstoffmenge je NP abhängen.

4.3.2.6 Einfluss der SAV-Anbindung

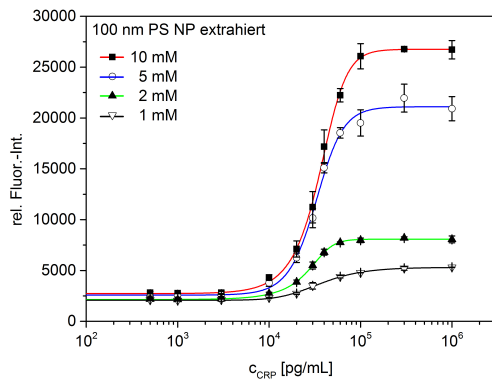
Nachdem in Vorexperimenten gezeigt werden konnte, dass PEGylierte, SAV-funktionalisierte NP kaum unspezifische Wechselwirkungen eingehen (Abschnitt 4.2.2.1), wurden C153-beladene (10 mM), 100 nm PS NP, welche einerseits direkt mit SAV- und andererseits mit SAV-PEG-funktionalisiert waren, im CRP-Immunoassay eingesetzt. Möglicherweise sorgt der PEG-Linker neben seiner Funktion, die



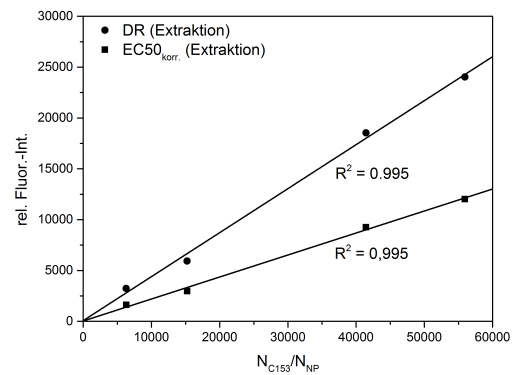
(a) im Partikel



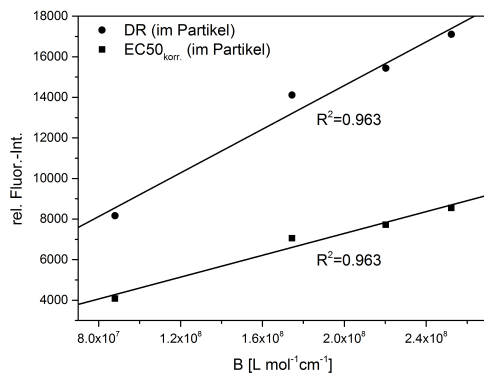
(b) im Partikel



(c) nach Extraktion



(d) nach Extraktion



(e) im Partikel

Abbildung 4.28: Dosis-Wirkungs-Kurven mit 5-PL-Fit für den CRP-Immunoassay mit C153-beladenen, direkt SAV-funktionalisierten, 100 nm NP (a) gemessen im NP und (c) nach Farbstoffextraktion in EtOH. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Messungen inkl. der Standardabweichungen. Korrelation der eingebauten Menge an Farbstoff je NP mit DR und $EC_{50 \text{ kor.}}$ (b) im Partikel und (d) nach Farbstoffextraktion gemessen. (e) Korrelation der Brillanz mit DR und $EC_{50 \text{ kor.}}$ im Partikel.

NP-Oberfläche abzuschirmen, zudem für eine bessere Zugänglichkeit für die Anbindung des SAv an den biotinylierten Antikörper (siehe Abschnitt 2.3.1.2).

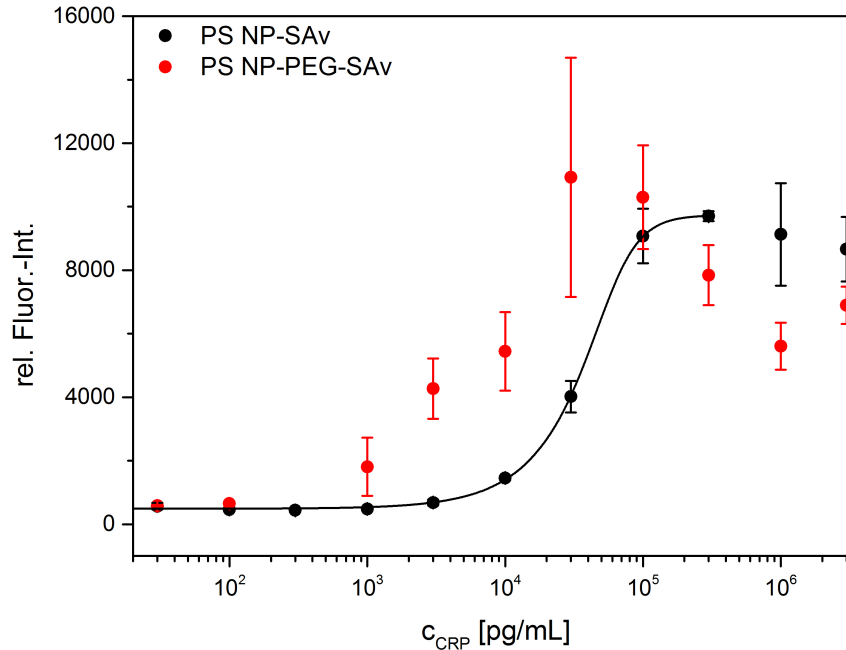


Abbildung 4.29: Dosis-Wirkungs-Kurven mit 5-PL-Fit für den CRP-Immunoassay mit C153-beladenen (10 mM), via EDC/ sulfo-NHS (schwarz) sowie MAL-PEG-Thiol (rot) SAv-funktionalisierten, 100 nm PS NP mit Detektion nach Extraktion in EtOH. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Messungen inkl. der Standardabweichungen.

In Abbildung 4.29 sind die Dosis Wirkungs-Kurven inkl. 5-PL-Fit für C153-beladene, 100 nm PS NP, die direkt und über einen PEG-Linker mit SAv funktionalisiert wurden, dargestellt. Die für die PEGylierten PS NP im Assay resultierenden Signalintensitäten streuten trotz mehrmaliger Assaywiederholungen stark, so dass die Anpassung der Messwerte mit dem 5-PL-Fit nicht möglich war. Die Ursache für die Schwankungen und Reproduzierbarkeitsprobleme konnten bislang nicht geklärt werden. Möglicherweise bindet SAv durch den flexiblen PEG-Linker besser an die biotinmarkierten Antikörper. Es wäre auch denkbar, dass SAv durch den PEG-Linker an mehrere Immunkomplexe binden kann. Eine Ursache für die Schwankungen der PEGylierten NP könnte das Abreißen der NP mit oder ohne gebundene Immunkomplexe während der Waschschritte durch veränderte NP-NP- oder NP-Immunkomplex-Wechselwirkungen oder eine unvollständige C153-Extraktion sein. Eventuell würden PEG-Linker mit einer anderen Linkerlänge als der verwendeten PEG-Länge ($M_{\text{PEG}} = 1,5 \text{ kDa}$, ca. 100 \AA) bessere Ergebnisse erzielen.

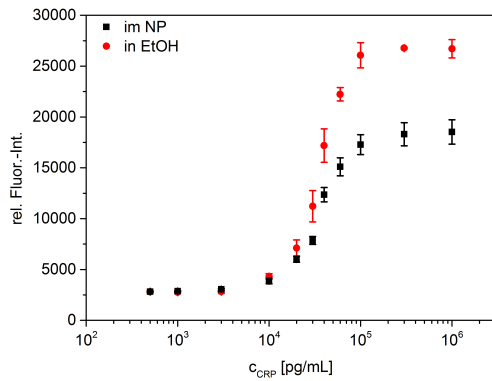
4.3.3 Screening-Test: CRP-Immunoassays mit weiteren farbstoffbeladenen Nanopartikeln zur Erhöhung der Signalintensität

Wie im Abschnitt 4.3.2.2 beschrieben, lassen sich N , Φ_f , $\epsilon(\lambda)$ auch über die Variation des Farbstoffes verändern. Hierzu wurden Screening-Tests mit den Farbstoffen NR ($c_{\text{Beladung}} = 2 \text{ mM}$), Itrybe (0,5 mM), F305 (10 mM) und $\text{Eu}(\text{TTFA})_3(\text{phen})$ (1 mM) durchgeführt, welche in carboxylierte, 100 nm PS NP eingequollen und direkt mit SAv funktionalisiert wurden. Im Anhang in Abbildung 7.7 sind die zugehörigen Massenbilanzen und Kopplungseffizienzen dargestellt. Anschließend wurden diese NP-Label im CRP-Immunoassay eingesetzt. Die Screening-Tests sollten lediglich dazu dienen, weitere Farbstoffe zu identifizieren, die noch höhere Signalintensitäten liefern. Sie wurden nicht quantitativ in Bezug auf die vier Qualitätsparameter aus Abschnitt 2.1.3.3 untersucht.

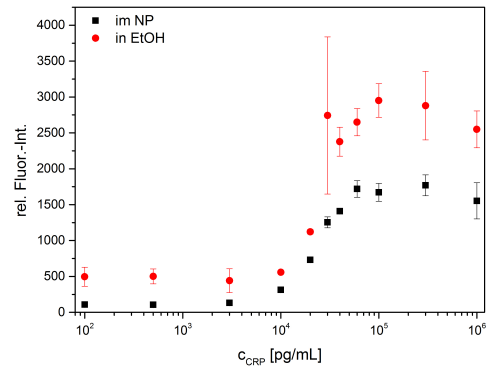
In Tabelle 4.7 sind die theoretischen SF_{Φ_f} angegeben, die sich durch die Erhöhung oder Erniedrigung der Quantenausbeute der Farbstoffe im NP und in EtOH ergeben (siehe auch Abbildung 7.10). Demnach sollte NR, Itrybe und F305 in Bezug auf Φ_f nach der Extraktion höhere Signalintensitäten ergeben. Zudem sind in Tabelle 4.7 $\epsilon(\lambda)$ in EtOH und die Anzahl der eingequollenen Farbstoffe N angegeben, woraus sich die Brillanz der Farbstoffe nach Extraktion nach Gleichung 2.5 bestimmen lässt. Aus dem Vergleich der Brillanzen von NR, Itrybe, F305 und $\text{Eu}(\text{TTFA})_3(\text{phen})$ mit der Brillanz von C153 lassen sich die theoretischen SF_B ermitteln, die sich ergeben, wenn statt C153 einer der vier anderen Farbstoffe im Immunoassay verwendet wird. Demnach sollte F305 im Vergleich zu C153 die Signalintensität steigern. Die SF_B von NR, Itrybe, und $\text{Eu}(\text{TTFA})_3(\text{phen})$ sind geringer.

In Abbildung 4.30 sind die Dosis-Wirkungs-Kurven mit 5-PL-Fit für die vier verschiedenen NP-Label gezeigt, welche bei identischen Messbedingungen, wie die für die direkt SAv-funktionalisierten, C153-beladenen, 100 nm PS NP (Abbildung 4.27 (a)) eingesetzt, aufgenommen wurden (siehe auch Abbildungen 7.8 und 7.9 und Tabelle 7.8). Bei allen Farbstoffen konnten keine höheren Signalintensitäten im Vergleich zu den C153-beladenen NP bei einem Gain von 120, weder im NP noch nach Extraktion gemessen, erreicht werden (Tabelle 4.7). Die geringeren Signalintensitäten von Itrybe und $\text{Eu}(\text{TTFA})_3(\text{phen})$ sind einerseits auf die geringe Farbstoffbeladung und die niedrigen Quantenausbeuten zurückzuführen, andererseits kann auch bei allen NP-Labeln der Farbstoff einen Einfluss auf die Anbindung der Label an den Immunkomplex haben, da bis auf den Farbstoff alle Parameter wie z.B. NP-Größe, -material, SAv-Anbindung (die Anzahl der SAv lag bei allen NP zwischen 40 und 70 SAv je NP) identisch waren. Dies könnte sich auf die teils hohen Messunsicherheiten und Streuung der Messwerte einiger NP-Label auswirken.

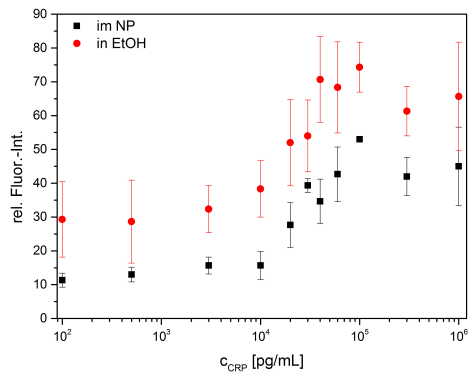
Zudem war das Untergrundsignal nach der Extraktion teilweise höher als bei der Messung des Farbstoffes im NP im Vergleich zu den C153-beladenen NP. Durch den Einsatz des Eu-Komplexes konnte jedoch das Untergrundsignal, welches möglicherweise von Autofluoreszenz der Polymer- und Proteinmatrix herrührt [185], durch zeitverzögerte Messungen (engl. time-gated) reduziert werden. Lanthanoid-Komplexe sind allgemein für ihre langen Lumineszenzlebenszeiten bekannt und werden daher häufig in zeitverzögerten Bioassays eingesetzt [185, 186].



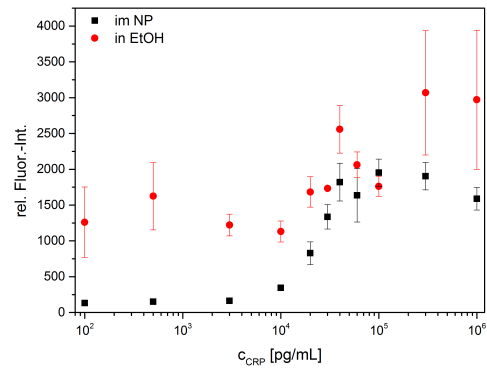
(a) C153



(b) NR



(c) Itrybe



(d) Lumogen® F305

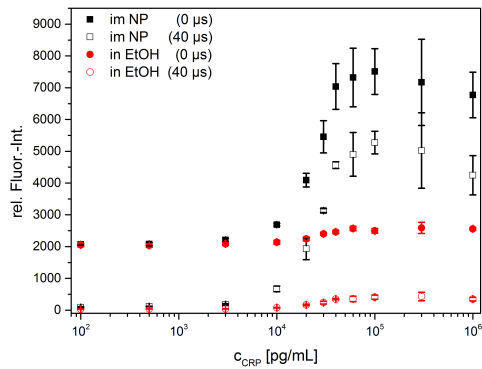
(e) $\text{Eu}(\text{TTFA})_3(\text{phen})$ im NP

Abbildung 4.30: Dosis-Wirkungs-Kurven für den CRP-Immunoassay mit (a) C153- (10 mM), (b) Nilrot- (2 mM), (c) Itrybe- (0,5 mM), (d) F305- (10 mM) und (e) $\text{Eu}(\text{TTFA})_3(\text{phen})$ -beladenen (1 mM), SAV-funktionalisierten, 100 nm PS NP mit Detektion im Partikel und nach Extraktion in EtOH. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Messungen inkl. der Standardabweichungen.

Tabelle 4.7: Theoretisch bestimmte SF von verschiedenen Farbstoffen, welche sich durch die Veränderung der absolut bestimmten Quantenausbeute Φ_f von Farbstoffen im NP oder nach Extraktion in EtOH ergeben, Anzahl der Farbstoffe je NP, molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei $\lambda_{\text{Abs.}}$ in EtOH und die maximalen relativen Fluoreszenzintensitäten nach Farbstoffextraktion. ^a [150]. ^bin THF, da Eu(TTFA)₃(phen) nur bedingt in EtOH löslich ist. ^c SF für die Quantenausbeute der Farbstoffe nach Extraktion in EtOH. ^dSF für die Brillanz der Farbstoffe NR, Itrybe, F305 und Eu(TTFA)₃(phen) gegenüber C153 nach Farbstoffextraktion in EtOH. ^efür Eu(TTFA)₃(phen) nach 40 μ s Zeitverzögerung gemessen im NP.

Farbstoff	C153	NR	Itrybe	F305	Eu(TTFA) ₃ (phen)
^c Beladung	10 mM	2 mM	0,5 mM	10 mM	1 mM
Φ_f im NP	22	13	6	14	39
Φ_f in EtOH	57	72	22 ^a	63	24 ^b
SF Φ_f ^c	2,5	5,5	3,6	4,5	0,6
$\epsilon(\lambda)$ [mol ⁻¹ cm ⁻¹ L]	17900	36200	55800	41100	57200 ^b
($\lambda_{\text{Abs.}}$ [nm])	(423)	(548)	(608)	(577)	(352)
Anzahl der Farbstoffe im NP	56·10 ³	14·10 ³	1·10 ³	110·10 ³	2·10 ³
SF _B ^d	-	0,64	0,02	4,98	0,05 ^b
Max. rel. Fluor.-Int.	27.000	3.000	75	3.000	5.500 ^e

Nach der Variation verschiedener Parameter kann geschlossen werden, dass innerhalb der getesteten Proben NP mit kleineren Durchmessern spezifischer an den Immunkomplex binden. Zudem können mit sehr hohen Beladungskonzentrationen nach der Farbstoffextraktion sehr hohe Signale erzielt werden, welche unter anderem höher als die der gemessenen Signale der Farbstoffe im NP liegen. Sofern die Signalintensität der Farbstoffe im NP gemessen werden soll, werden die höchsten Signalintensitäten nicht zwangsweise bei den höchsten Beladungskonzentrationen erzielt, da die Signalintensitäten auch von der Quantenausbeute abhängig sind, welche sich je nach Farbstoffkonzentration ändern kann. Die direkte Anbindung von SA_v an die NP führt zu reproduzierbaren Ergebnissen beim Nachweis von CRP, während eine PEG-Schale die Bindung der Label an den Immunkomplex stört. Ebenso können Farbstoffe einen Einfluss auf die Bindung an den Immunkomplex haben. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass C153-beladene, direkt SA_v-funktionalisierte, 100 nm PS NP die besten Ergebnisse nach Farbstoffextraktion erzielten, um reproduzierbar CRP nachzuweisen.

4.3.4 Vergleich der Nachweisempfindlichkeiten

Nach der Untersuchung verschiedener NP- und Farbstoffparameter wurden direkt SA_v-funktionalisierte, C153-beladene (10 mM), 100 nm PS NP als am besten geeignetes Label ermittelt. Mit ihnen konnten beim Vergleich aller Assays (Tabelle 4.8) allgemein

die besten Werte für EC_{50} , DR, RDR, LOD, R^2 und die höchsten Signalintensitäten nach der Farbstoffextraktion mit EtOH erreicht werden. Der partikelbasierte Assay, mit direkt SAV-funktionalisierten, maximal C153-beladenen, 100 nm PS NP, wurde daraufhin mit einem ELISA (SAV-HRP als Label, TMB als Substrat) verglichen (siehe auch Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8: Einfluss verschiedener NP- und Farbstoffparameter und der Detektionsmethode auf EC_{50} , DR, RDR, LOD und R^2 für C153-beladene, direkt-SAV-funktionalisierte, 100 und 500 nm PS NP im CRP-Immunoassay gemessen im NP und nach Extraktion in EtOH.

Label	\varnothing_{NP} [nm]	c_{C153} [mM]	Det.	EC_{50} [pg/mL]	DR	RDR	LOD [pg/mL]	R^2
PS NP	100	10	extrah.	36100	24000	0,90	4900	0,998
		5		32700	18500	0,88	8700	0,994
		2		27600	5900	0,73	5600	0,999
		1		36000	3200	0,61	3600	0,997
PS NP	100	10	im NP	36400	15400	0,84	5100	0,995
		5		30600	17100	0,86	1200	0,998
		2		31600	14100	0,84	2000	1,000
		1		33900	8200	0,75	2100	0,990
PS NP	100	10	extrah.	35700	13400	0,91	4400	0,998
				41700	6700	0,90	4800	0,997
PS NP	500	10	extrah.	35900	6000	0,28	32500	0,839
			im NP	25500	1000	0,22	11100	0,942
HRP				4800	0,80	0,94	40	0,996

In Abbildung 4.31 sind die auf A_{max} normierten Dosis Wirkungs-Kurven beider Assays inkl. 5-PL-Fit dargestellt. Wie zu erkennen ist, können mit dem ELISA geringere Mengen an CRP nachgewiesen werden. Der EC_{50} -Wert liegt bei 4.800 pg/mL, wohingegen der um einen Faktor von 10 höhere EC_{50} -Wert des NP-Assays bei ca. 36.000 pg/mL liegt. Das NP-Label bindet demnach erst bei größeren CRP-Mengen an den Immunkomplex. Das lässt vermuten, dass die SAV-funktionalisierten NP schlechter an die biotinmarkierten Detektionsantikörper binden und dass die Diffusion hier ein entscheidender Faktor ist ($K_d(\text{SAV-NP}/\text{Immunkomplex}) > K_d(\text{SAV-HRP}/\text{Immunkomplex})$) [36]. Weitere Ursachen können eine sterische Hinderung von SAV für die Anbindung des biotinmarkierten Detektionsantikörpers sein. Für große 500 nm NP konnte bereits gezeigt werden, dass die spezifische Anbindung wesentlich geringer ist, als bei 100 nm NP (Abschnitt 4.3.2.4). Der steilere Anstieg h des partikelbasierten Immunoassays ($h_{NP} = 3,6$; $h_{HRP} = 1,6$; siehe

auch Abbildung 2.8) könnte auf den höheren Platzbedarf der NP zurückzuführen sein. Während HRP-SAv an jeden adsorbierten biotinylierten Antikörper binden kann, kann im Falle eines größeren NP dieser weitere NP daran hindern, an weitere Antikörper zu binden, die ggf. von ihm verdeckt werden, was zu einer schnelleren Sättigung des Messsignals führen müsste. Wie in Abbildung 4.31 zu erkennen ist, erreichen beide Label bei ca. 10^6 pg/mL die Sättigung des Detektionssignals. Nach dieser Annahme detektiert ein NP nicht nur ein Analytmolekül, sondern mehrere, was die mittlere Menge an detektierbaren Farbstoffen je Analyt drastisch reduzieren würde. Aufschluss darüber würde bspw. die Menge an adsorbiertem Immunkomplex je Fläche geben, welche nicht bekannt ist bzw. zu bestimmen war. Daraus ergibt sich, dass ggf. kleinere NP ein besseres Ergebnis erzielen könnten.

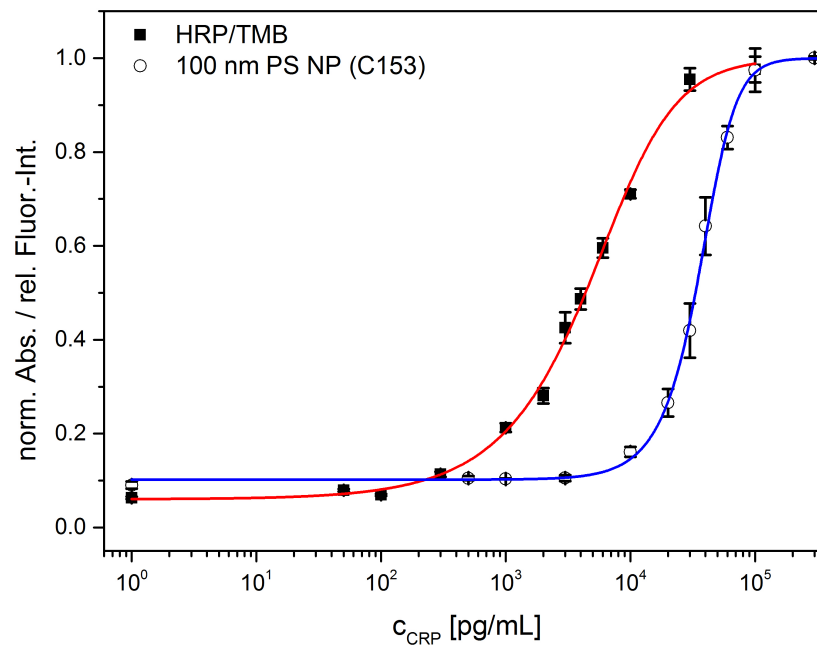


Abbildung 4.31: Dosis-Wirkungs-Kurven mit 5-PL-Fit für den CRP-Immunoassay mit HRP/TMB in Absorption (blau) und C153-beladenen (10 mM) direkt SAv-funktionalisierten, 100 nm PS NP mit Detektion nach Extraktion in EtOH (schwarz). Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Messungen inkl. der Standardabweichungen.

Weiterhin ist zu erkennen, dass das Untergrundsignal bei den NP etwas höher liegt im Vergleich zum ELISA. Zudem liegt der LOD des partikelbasierten Assays (4900 pg/mL) um einen Faktor von 100 über dem ELISA (40 pg/mL). Dies kann ggf. auf eine größere unspezifische Adsorption der NP zurückzuführen sein. Da der DR nicht direkt verglichen werden kann, muss der RDR verwendet werden. Auch hier liefert der ELISA einen größeren RDR im Vergleich zu den NP, auch wenn der Unterschied nur gering ist. R^2 , welcher für die Anpassung der Fits an den Graphen steht, ist bei beiden Assays fast identisch, auch wenn die Messunsicherheiten bei den NP etwas höher sind.

Beide Assays sollten gute Ergebnisse bei der Quantifizierung von unbekanntem

CRP-Proben ergeben, sie decken aber unterschiedliche Konzentrationsbereiche ab. Beide Assays sind aber für die Detektion von CRP im medizinisch relevanten Bereich geeignet. So liegt bei einem gesunden Menschen die CRP-Menge im Blut bei ca. 0,8 mg/L [81] und bei einem erkrankten Menschen darüber. Diese CRP-Mengen lassen sich problemlos mit Hilfe des NP-Assays nachweisen. Jedoch wurden für die Messungen ausschließlich Pufferlösungen untersucht und keine menschlichen Proben in Körperflüssigkeit, bei denen zusätzliche Matrixeffekte auftreten können.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von fluoreszenten Farbstoffnanopartikeln, welche als Label in einem Immunoassay eingesetzt werden und die Signalintensität und Sensitivität des Assays steigern sollten. Dafür wurden systematische Verkapselungsstrategien für verschiedene neutrale und ionische/ geladene Farbstoffe untersucht und systematische Untersuchungen zu Einflussgrößen wie Nanopartikelgröße, Biokonjugation und Farbstoffbeladungskonzentration durchgeführt. Es wurden zwei unterschiedliche Partikelsysteme hergestellt und in Bezug auf ihre reproduzierbare Herstellung und spätere Eignung für den Einsatz als Nanopartikellabel in Immunoassays systematisch untersucht. Dabei stellten sich aufgrund ihrer Stabilität, ihrer einfachen und reproduzierbaren Herstellung, ihrer engen und definierten Größenverteilung, ihrer ausreichend funktionellen Oberflächengruppen und durch die Möglichkeit die Farbstoffmenge im NP präzise einzustellen, farbstoffbeladene Polystyrolpartikel als besonders geeignet heraus.

Für die Anbindung von SAV an amino- und carboxyfunktionalisierte Polystyrolnanopartikel wurden zwei verschiedene Kopplungsmethoden, die Anbindung über EDC/ sulfo-NHS und über einen heterobifunktionellen PEG-Linker, getestet. Beide Kopplungsstrategien sind geeignet, um Streptavidin an die Partikeloberfläche zu binden unter Vermeidung von NP-Aggregation.

Die Mengen an partikelgebundenem SAV wurden mit Hilfe des BCA- und Biotin-FITC-Assays bestimmt. Da beide Assays vorrangig für die Quantifizierung von Proteinen in Lösung entwickelt wurden, mussten beide Assays erst auf mögliche Wechselwirkungen mit Farbstoffen und der Partikelmatrix sowie Störeinflüsse durch die Partikelstreuung und spektrale Interferenzen mit den Kodierfarbstoffen untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass einige Farbstoffe den Kupfer(II)-BCA-Komplex reduzieren und es folglich zu einer Überbestimmung von Streptavidin kommt. Weiterhin konnten Farbstoffe wie *meso*-Tetraphenylporphyrin identifiziert werden, die mit Streptavidin wechselwirken und dadurch die Biotin-Anbindung stark beeinträchtigen, so dass es bei der Biotin-FITC-Titration zu einer Unterbestimmung von funktionalem Streptavidin kommt.

Durch das Anbinden von SAV über einen PEG-Linker konnte die NP-Oberfläche abgeschirmt werden, so dass die Wechselwirkungen von an der NP-Oberfläche befindlichem *meso*-Tetraphenylporphyrin mit SAV reduziert und die Funktionalität von Streptavidin erhalten werden konnte. Zudem wurde eine Methode entwickelt, um die Partikelstreuung bei der Absorptionsmessung zu korrigieren.

Streptavidinfunktionalisierte, gefärbte Nanopartikel wurden anschließend in einem Immunoassay zum Nachweis von CRP getestet. Dazu wurden vier Qualitätsparameter

(EC_{50} -Wert, Detektionslimit (LOD), dynamischer bzw. relativer dynamische Bereich, Güte des Fits (R^2)) aufgestellt, anhand derer die Assays in Bezug auf eine Steigerung der Sensitivität und Signalintensität untersucht wurden. Zudem wurden vier weitere Parameter wie Detektionsprinzip (Detektion von fluoreszenten Nanopartikeln versus Farbstofffreisetzung), Nanopartikelgröße, Farbstoffbeladung und Art der Streptavidinanbindung untersucht, welche einen Einfluss auf die Sensitivität und Signalintensität besitzen. Diese mit Cumarin 153-beladenen PS NP zeigten, dass bei der Verwendung hochbeladener Partikel höhere Fluoreszenzintensitäten durch die Extraktion des Farbstoffes mit Ethanol erreicht werden können. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Größe des Nanopartikels einen Einfluss auf spezifische und unspezifische Wechselwirkungen mit der Mikrotiterplatte sowie den daran adsorbierten Proteinen hat, was bei 500 nm Partikeln zu einem ungewollt höheren Untergrundsignal führte und zu einer geringen spezifischen Bindung.

Der Einsatz PEGylierter Nanopartikel im Immunoassay konnte keine reproduzierbaren Ergebnisse liefern. Anhand verschiedener Beladungskonzentrationen konnte gezeigt werden, dass die Größe des Fluoreszenzsignals der farbstoffbeladenen Partikel das Signal hauptsächlich von der Quantenausbeute und der Anzahl der eingequollenen Farbstoffe und speziell für Cumarin 153 kaum vom molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten abhängt und das Signal nicht bei der größten Beladungsmenge maximal wird. Wird der Farbstoff aus den Partikeln extrahiert, hängt die Signalintensität nur noch von der Anzahl der Farbstoffe ab.

Screening-Experimente mit den Farbstoffen Cumarin 153, Nilrot, *meso*-Tetraphenylporphyrin, Lumogen® F305, Itrybe und $\text{Eu}(\text{TTFa})_3(\text{phen})$ zeigten, dass mit Cumarin 153 die besten Ergebnisse erzielt werden. Die anderen Farbstoffe schienen partiell die Anbindung der NP an den Immunkomplex zu stören oder zeigten verstärkte Lösch- und Aggregationseffekte.

Beim Vergleich des entwickelten partikelbasierten Immunoassays mit einem ELISA lagen die EC_{50} -Werte des Partikelassays um einen Faktor von 10 höher. Dies liegt eventuell an der schlechteren Bindung der Partikel an den Immunkomplex.

Eine Steigerung der Nachweisstärke des partikelbasierten Immunoassays könnte eventuell durch eine Optimierung der Partikelgröße erreicht werden. Der Einsatz von kleineren Partikeln könnte die Sensitivität des partikelbasierten Immunoassays weiter steigern. Eventuell ist die Anbindung kleinerer Nanopartikel besser. Zudem ist ihr Platzbedarf kleiner, weshalb mehr Immunkomplexe je NP detektiert werden. Obwohl sie wesentlich weniger Farbstoffe tragen, könnte es ein Optimum zwischen der Anzahl der Farbstoffe und der NP-Größe sowie dem Platzbedarf geben, um möglichst sensitiv mit einem hohen Signal Analyten nachweisen zu können. Zudem sind nach den Untersuchungen zu unspezifischen und spezifischen Wechselwirkungen bei kleineren Polystyrolnanopartikeln noch geringere unspezifische Wechselwirkungen zu erwarten.

Ein weiterer Ansatz könnte die Herstellung eines katalytischen Systems sein. Sofern ein Katalysator in Polystyrolpartikel eingequollen werden kann und anschließend ebenfalls ein Substrat umsetzt, könnte die Anzahl der detektierten Farbstoffe je Analyt noch weitaus größer ausfallen und so schon sehr geringe Mengen an Analyt detektieren, was ggf. die Sensitivität des Assays steigert.

6 Summary and Outlook

The aim of the present work was the development of fluorescent nanoparticles, which could be used as label in an immunoassay to enhance the signal intensity and sensitivity. Therefore, systematic encapsulation strategies with varying neutral and ionic/ charged dyes were performed to identify influencing parameters like nanoparticle size, bioconjugation, and dye loading concentration.

Two different types of particle systems were assessed in more detail in terms of their reproducible production and their applicability as nanoparticle label. Due to their stability, simple and reproducible production, narrow and defined particle size distribution, and availability with different surface functional groups together with the possibility to incorporate a precise amount of dyes, dye loaded polystyrene nanoparticles were identified as a suitable particle system.

For the covalent coupling of streptavidin (SAv) on amino and carboxy functionalized polystyrene nanoparticles, required for assay development and antibody conjugation, two different conjugation strategies were tested, the coupling via EDC/ sulfo-NHS chemistry and via heterobifunctional PEG linker. Both coupling strategies are suitable to bind Streptavidin on the nanoparticle surface without nanoparticle aggregation.

The amount of particle-bound SAv was quantified using the BCA and Biotin-FITC assay. The former assay provides the total amount of protein without information on its function whereas the latter measures solely the amount of functional, biotin-binding protein. As both assays are designed for quantification of SAv in solution, both assays had to be tested for interactions with dyes and the particle matrix and for influences from particle scattering and absorption as well as well fluorescence of the embedded dyes. It was shown that some dyes like certain coumarins can reduce the BCA copper(II) complex and as a result yield an overdetermination of SAv with the BCA assay. Furthermore, dyes like meso-tetraphenylporphyrine were identified, that affect SAv strongly, and as a result, lead to an underdetermination of SAv with the Biotin-FITC assay. In this respect, also a method was developed to consider particle scattering in absorption measurements.

Coupling of SAv via PEG linker leads to a shielding of the nanoparticle surface, thereby reducing interactions between *meso*-tetraphenylporphyrine located close to or at the nanoparticle surface with SAv and preserving the functionality of SAv.

SAv-functionalized, dye loaded nanoparticles were subsequently used as labels in a Sandwich immunoassay to determine c-reactive protein (CRP) and compared to a classical ELISA using an enzyme-functionalized detection antibody and the colorimetric substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. For the particle-based immunoassay, the biotinylated detection antibody was functionalized with these dye-stained, SAv-functionalized nanoparticles. Four quality parameters (average effective concentration (EC_{50}), limit of detection (LOD), dynamic range/ relative dynamic range (DR/ RDR), and goodness of fit (R^2)) were chosen that allowed to evaluate the immunoassays in terms of signal intensity enhancement and sensitivity. In this respect, also the influence of the principle of signal generation (detection of fluorescent nanoparticles versus dye extraction and measurement of dissolved dye molecules) as well as the influence of nanoparticle size, dye loading concentration, and SAv conjugation chemistry were studied.

These studies showed an influence of nanoparticle size on the specific and unspecific interactions of SAv with the microtiter plate and the adsorbed proteins, accounting for the higher background signal and low specific binding observed for 500 nm-sized nanoparticles. The use of PEGylated nanoparticles in immunoassays provided no reproducible results. Initially performed screening tests with the different staining dyes Coumarin 153, Nile Red, Lumogen® F305, Itrybe and Eu(TTFA)₃(phen) showed that Coumarin 153 gives the best results. The other dyes seem to hinder partially the binding of the nanoparticles on the immune complex or showed more fluorescence quenching or aggregation effects. Subsequently performed systematic studies, focusing on mainly on Coumarin 153-stained nanoparticles, revealed that the signal size clearly depended on dye properties like the fluorescence quantum yield as well as on the amount of incorporated dye molecules and a signal enhancement could be demonstrated for the dye extraction approach.

A comparison of the developed particle-based immunoassay and an ELISA revealed a 10-fold higher EC_{50} value for the particle-based immunoassay. This could be due to a less good binding of the particles on the immune complex.

Most likely, an increase of the signal intensity/ sensitivity of the particle-based immunoassay could be achieved by further optimization of the particle size and it is anticipated that the use of smaller particles could increase the sensitivity of the particle-based immunoassay. Although smaller nanoparticles can incorporate only a lower amount of dyes, there seem to be an optimum between the amount of incorporated dyes, the nanoparticle size, and the required space (a big nanoparticle could hide more unlabeled immune complexes, than a small nanoparticle) to quantify analytes sensitively with a high signal. Furthermore, unspecific adsorption is expected to be lower for smaller particles. An alternative approach to enhance the sensitivity of particle-based assays could present the use of a catalytic system. In this case, a catalyst could be incorporated into the nanoparticles, which then turns a substrate into a colored or fluorescent product after extraction of the catalyst.

7 Anhang

7.1 Publikationsliste

Veröffentlichungen mit Peer-Review-Verfahren

P.D. Quevedo, T. Behnke, U. Resch-Genger, „Streptavidin conjugation and quantification - A method evaluation for nanoparticles“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **408**, 4133-4149 (2016).

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abs.	A bsorption
ALG	A lginat
APTES	3- A minpropyltriethoxysilan
appl.	a ppliziert
Äquiv.	Ä quivalent
Av	A vidin
B4F	B iotin-4-fluorescein
BCA	Bicinchoninsäure (<i>engl.</i> B icichonic acid)
BSA	Rinderalbumin (<i>engl.</i> b ovine serum a lbumin)
bspw.	b eispielsweise
bzw.	b eziehungsweise
C7	C umarin 7
C153	C umarin 153
CRP	C -reaktives P rotein
dbm	D ibenzylmethan
DLS	D ynamische L ichtstreuung
DMSO	D imethylsulfoxid
DTNB	5,5'- D ithiobis(2- n itrobenzoesäure)
EDC	N - E thyl- N -(3- d imethylaminopropyl)carbodiimidehydrochlorid
em	E mission
EIA	Enzym-Immunoassay (<i>engl.</i> e nzyme i mmuno a ssay)
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>engl.</i> e nzyme l inked i mmunosorbent sorbent a ssay)
EtOH	Ethanol
FITC	F luorescein i sothiocyana t
Fluor.	F luoreszenz
FRET	F örster- R esonanz- E nergie- T ransfer

HRP	Meerrettichperoxidase (<i>engl.</i> horseradish peroxidase)
IC	Innere Konversion (<i>engl.</i> internal conversion)
i.d.R.	in der Regel
Int.	Intensität
IR	Innere Relaxation (<i>engl.</i> internal relaxation)
ISC	Interkombination (<i>engl.</i> inter system crossing)
k.A.	keine Angabe
LbL	Layer-by-layer
LYS	Lysin
MAL	Maleimid
max	Maximum
MB	Massenbilanz
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MTP	Mikrotiterplatte
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NNLS	<i>engl.</i> Non-negativ least square
norm.	normierte
NP	Nanopartikel
NR	Nilrot
OLED	organische Leuchtdiode (<i>engl.</i> organic light emitting diode)
PAH	Polyallylaminhydrochlorid
PCS	Photonenkorrelationspektroskopie (<i>engl.</i> photon correlation spectroscopy)
PDADMAC	Poly(diallyldimethylammoniumchlorid)
PDI	Polydispersitätsindex
PE	Polyelektrolyt
PEG	Polyethylenglycol
phen	1,10-Phenanthrolin
PI	Polydispersitätsindex
POCT	Point-of-care-Tests
PS	Polystyrol
PSS	Polystyrolsulfonat
QD	Quantenpunkt (<i>engl.</i> quantum dot)
rel.	relative
rcf	relative Zentrifugalkraft (<i>engl.</i> relative centrifugal force)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
R_f	Brechungsindex <i>engl.</i> refractive index
PMMA	Polymethylmethacrylat
RT	Raumtemperatur
SAv	Streptavidin
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate)
SEM	Rasterelektronenmikroskop (<i>engl.</i> scanning electron microscope)
SF	Signalverstärkungsfaktor
Si	Silica
sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz
TEM	Transmissionselektronenmikroskop (<i>engl.</i> transmission electron microscope)
TG	Thiolisierungsgrad

THF	Tetra hydrofuran
TMB	3,3',5,5'- Tetra methylbenzidin
TNB	2-Nitro-5- thi benzoesäure)
TPP	<i>meso</i> - Tetra phenylporphyrin
Tryptophan	Trypt ophan
TTFA	Th enoyltrifluoro acet on
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
VDW	Van-der-Waals
VF	Verstärkungs faktor
Vis	sichtbar (<i>engl.</i> visible)
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

7.3 Verwendete Symbole

# _{Blitz}	Anzahl der Blitze
A	Absorption
B	Brillanz
c_0	Lichtgeschwindigkeit
c	Konzentration
d	Schichtdicke
D	Diffusionskoeffizient
δ	Beladungseffizienz
d_H	Hydrodynamischer Durchmesser
E	Extinktion
E_h	Energie
E_F	Elektrisches Feld
η	Viskosität
e_0	Elementarladung
ϵ	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
ϵ_0	Dielektrizitätskonstante im Vakuum
ϵ_r	stoffspezifische relative Dielektrizitätskonstante
EC_{50}	Mittlere effektive Konzentration
$f(ka)$	Henryfunktion
g	G-Faktor, Vielfaches der Erdbeschleunigung
Γ	Ratenkonstante
I	Ionenstärke
h	Plancksches Wirkungsquantum
I	Intensität
I_S	Ionenstärke
k	Ratenkonstante
κ	Ausdehnung der diffusen Doppelschicht
K_a	Assoziationskonstante

k_B	Boltzmann-Konstante
K_d	Dissoziationskonstante
λ	Wellenlänge
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
m	Masse
M	Molare Masse
n	Stoffmenge
N	Anzahl
n_0	Brechungsindex
N_A	Avogadro-Konstante
ν	Frequenz
\varnothing	Durchmesser
$\varnothing_{z-Average}$	Durchmesser (z-Average-Wert)
π	Kreiszahl
pI	Isoelektrischer Punkt
Φ	Potential
Φ_f	Quantenausbeute
Φ_ζ	Zetapotential
q_{NP}	Ladung eines NP
q	Streufaktor
R_f	Brechungsindex
r_H	Hydrodynamischer Radius
r_{NP}	Radius eines NP
r_x	Abstand
ρ	Dichte
$S_{0,1,2,n}$	Singulettzustand
t	Zeit
τ	Fluoreszenzlebenszeit
t_{Int}	Integrationszeit
t_{Lag}	Zeitverzögerung
T	Temperatur
$T_{0,1,2,n}$	Tripletzustand
θ	Streuwinkel
U_e	Elektrophoretische Mobilität
v	Geschwindigkeit
$v_{0,1,2,n}$	Vibronischer Zustand
V	Volumen
z	Anzahl der Ladungsträger

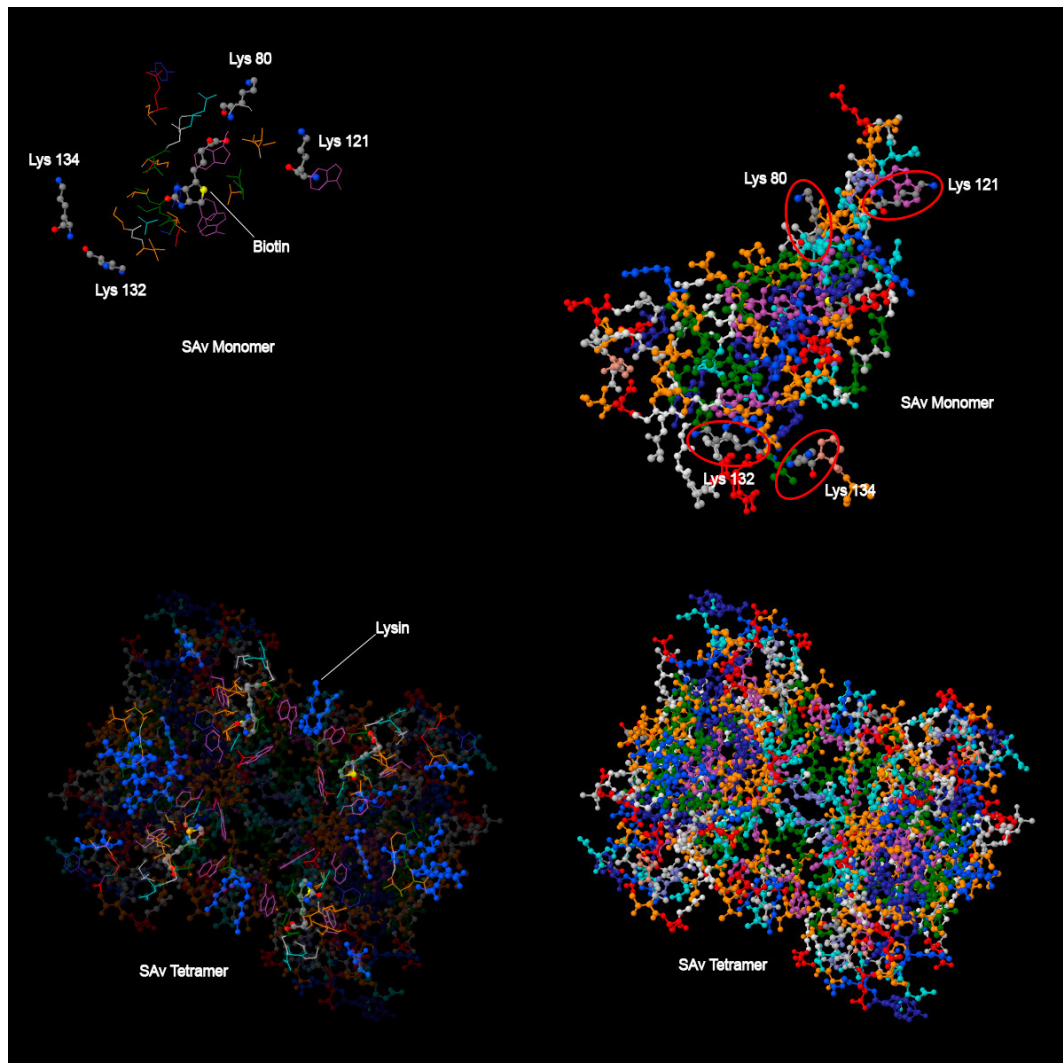


Abbildung 7.1: Mono- (oben) und tetrameres SAV (unten) mit gekennzeichneten Lysineinheiten und Biotin in den Bindungstaschen des SAV [187, 188].

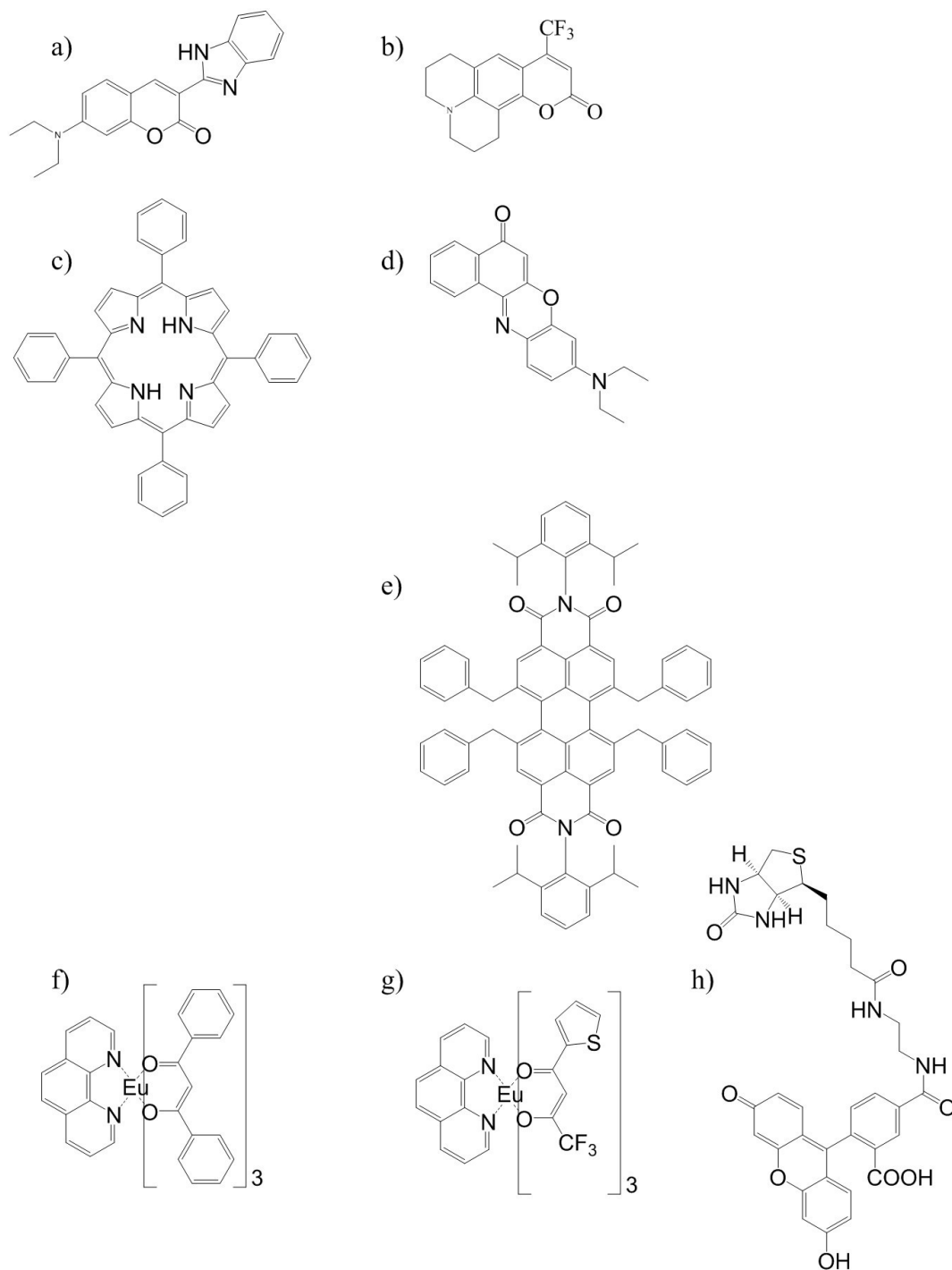


Abbildung 7.2: Strukturformeln verwendeter Farbstoffe: a) Cumarin 7, b) Cumarin 153, c) *meso*-Tetraphenylporphyrin, d) Nilrot, e) LumogenTM F305, f) Eu(TTFA)₃phen, g) Eu(dbm)₃phen und h) Biotin-4-Fluorescein. Itrybe darf aufgrund der Geheimhaltung der Strukturformel nicht dargestellt werden.

$$\log D = \frac{\sum_{i=1}^n c_{\text{O}}^i}{\sum_{i=1}^n c_{\text{W}}^i} \quad (7.1)$$

Log D-Werte. Der log D-Wert repräsentiert die Verteilung einer Substanz in einem Gemisch aus Octanol (O) und Wasser (W) (Gleichung 7.1) [25] und trifft eine Aussage über die Hydrophilie bzw. Lipophilie des Stoffes. Die Vorlage verschiedener Spezies n des gleichen Stoffes kann vom pH-Wert abhängig sein, weshalb der log D-Wert die Existenz mehrerer Spezies i berücksichtigt und daher ebenfalls vom pH-Wert abhängt. Positive log D-Werte entsprechen einer lipophilen und negative log D-Werte einer hydrophilen Substanz. Je größer der Betrag des log D-Wertes ist, desto stärker ist die Tendenz des Stoffes sich in Wasser bzw. Octanol oder einem hydrophoben Lösungsmittel zu lösen. Zur Abschätzung des log D-Werte können computergestützte Berechnungen durchgeführt werden.

Tabelle 7.1: Eingequollene Farbstoffmenge von verschiedenen Farbstoffen in aminierten und carboxylierten 100 und 500 nm PS NP.

\varnothing_{NP} [nm]	COOH/ NH ₂	Farbstoff	c_{Beladung} [mM]	Menge an Farbstoff je 1 mg PS [nmol/mg]
100	COOH	C153	10	169
100	COOH	C153	5	125
100	COOH	C153	2	46
100	COOH	C153	1	19
100	COOH	TTP	2	51
100	COOH	NR	2	47
100	COOH	Itrybe	0,5	3
100	COOH	F305	10	332
100	COOH	Eu(TTFA) ₃ phen	1	7
500	COOH	C153	10	262
100	NH ₂	C153	10	136

Tabelle 7.2: Farbstoffgehalt in nmol C153/mg PS bzw. in Anzahl C153-Moleküle je NP, Beladungseffizienzen δ , Quantenausbeuten Φ_f und Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{423 \text{ nm}}$ von carboxylierten, C153-beladenen, 100 nm PS NP bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen. Der Extinktionskoeffizient von C153 bei 423 nm wurde nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz auf Basis der gemessenen Absorptionen von C153 im NP nach Streukurvenkorrektur (Schichtdicke der Küvette $d=1 \text{ cm}$, $c_{\text{NP}}=0,12 \text{ mg/mL}$) und des Farbstoffgehaltes bestimmt.

c_{Beladung} [mM]	δ [%]	c_{Beladung} [C153/NP]	Φ_f [%]	$\epsilon_{\text{NP},423 \text{ nm}}$ [L·mol ⁻¹ cm ⁻¹]
10	51	$56 \cdot 10^3$	22	23.550
5	75	$41 \cdot 10^3$	34	20.350
2	69	$15 \cdot 10^3$	64	23.350
1	57	$6 \cdot 10^3$	78	28.300

Tabelle 7.3: Kopplungsbedingungen, Kopplungseffizienzen (KE) und Anzahl an SA_v je NP (SA_v/NP) gemessen mit dem BCA-Assay.

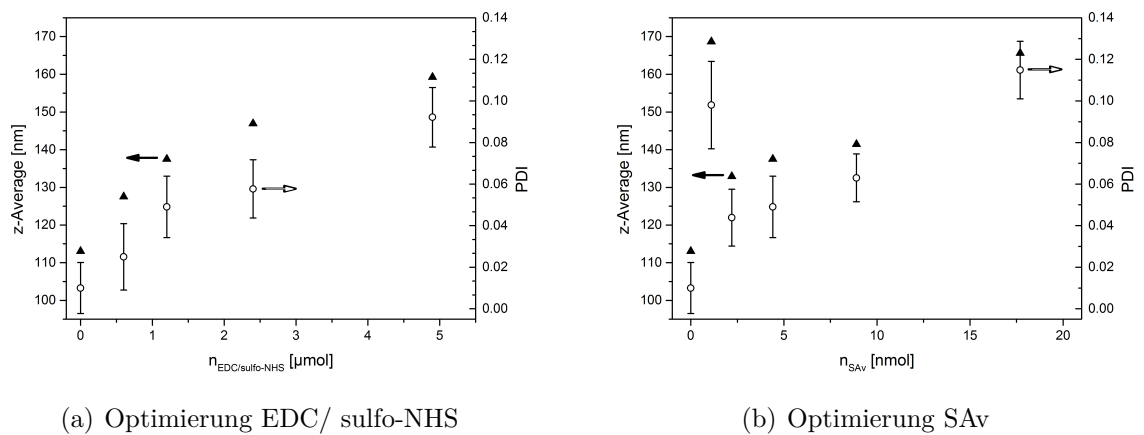
V _{EDC} ^a	c _{EDC} ^a	n _{EDC} ^a	V _{SA_v}	c _{SA_v}	n _{SA_v}	V _{NP}	c _{NP}	m _{NP}	KE _{BCA}	SA _v /NP _{BCA}
[μL]	[mM]	[nmol]	[μL]	[nM]	[pmol]	[μL]	[mg/mL]	[mg]	[%]	[SA _v /NP]
0	15	0	12	47	568	200	5	1	20	37
1	15	15	12	47	568	200	5	1	21	39
3	15	45	12	47	568	200	5	1	24	45
6	15	90	12	47	568	200	5	1	25	46
9	15	135	12	47	568	200	5	1	25	47
12	15	180	12	47	568	200	5	1	33	60
15	15	225	12	47	568	200	5	1	42	77
18	15	270	12	47	568	200	5	1	46	8
2	15	315	12	47	568	200	5	1	48	89
24	15	360	12	47	568	200	5	1	48	88
27	15	405	12	47	568	200	5	1	49	91
30	15	450	12	47	568	200	5	1	47	87
12	15	180	15	47	710	200	5	1	37	86
12	15	180	18	47	852	200	5	1	34	94
12	15	180	21	47	994	200	5	1	31	99
12	15	180	24	47	1136	200	5	1	30	111
12	15	180	27	47	1278	200	5	1	27	111
12	15	180	30	47	1420	200	5	1	26	120
24	15	360	24	47	1136	200	5	1	90	24
30	15	450	30	47	1420	200	5	1	22	102

Tabelle 7.4: Kopplungsbedingungen, Kopplungseffizienzen (KE) und Anzahl an SA_v je NP (SA_v/NP) gemessen mit dem BCA- und dem Biotin-FITC-Assay. *EDC/ sulfo-NHS

#	V _{EDC*} [μL]	c _{EDC*} [mM]	n _{EDC*} [nmol]	V _{SA_v} [μL]	c _{SA_v} [nM]	n _{SA_v} [pmol]	V _{NP} [μL]	c _{NP} [mg/mL]	m _{NP} [mg]	KE _{BCA} [%]	SA _v /NP _{BCA} [SA _v /NP]	KE _{B4F} [%]	SA _v /NP _{B4F} [SA _v /NP]
1	4/2	150/300	600	20	222	4432	200	50	10	24	36	23	33
2	8/4	150/300	1200	20	222	4432	200	50	10	29	43	26	38
3	16/8	150/300	2400	20	222	4432	200	50	10	30	44	27	40
4	32/16	150/300	4900	20	222	4432	200	50	10	30	44	29	41
5	8/4	150/300	1200	5	222	1108	200	50	10	90	29	81	33
6	8/4	150/300	1200	10	222	2216	200	50	10	41	27	36	30
7	8/4	150/300	1200	40	222	8864	200	50	10	21	75	26	62
8	8/4	150/300	1200	80	222	17727	200	50	10	17	115	20	102

Tabelle 7.5: Optimierung der direkten SAv Kopplung an 100 nm PS NP-COOH via EDC/sulfo-NHS-Ester-Chemie. Angaben des z-Averages und PDI. Die Standardabweichungen entstanden aus 6 unabhängigen Messungen.

#	\bar{D}_z -Average	PDI
1	128±1	0,025±0,016
2	138±1	0,049±0,015
3	147±1	0,058±0,014
4	159±1	0,092±0,014
5	169±1	0,098±0,021
6	133±1	0,044±0,014
7	141±1	0,063±0,012
8	166±1	0,115±0,014



(a) Optimierung EDC/ sulfo-NHS

(b) Optimierung SAv

Abbildung 7.3: Mittels DLS bestimmte Z-Average-Werte und PDI für die Optimierung von (a) EDC/ sulfo-NHS bei einer konstanten SAv-Menge (4,4 nmol) und von (b) SAv bei einer konstanten EDC/ sulfo-NHS-Menge (1,2 μmol). Die Standardabweichungen der z-Average-Werte und PDI wurden aus 6 unabhängigen Messungen und lagen bei 1 nm (z-Average) und 0,02 (PDI).

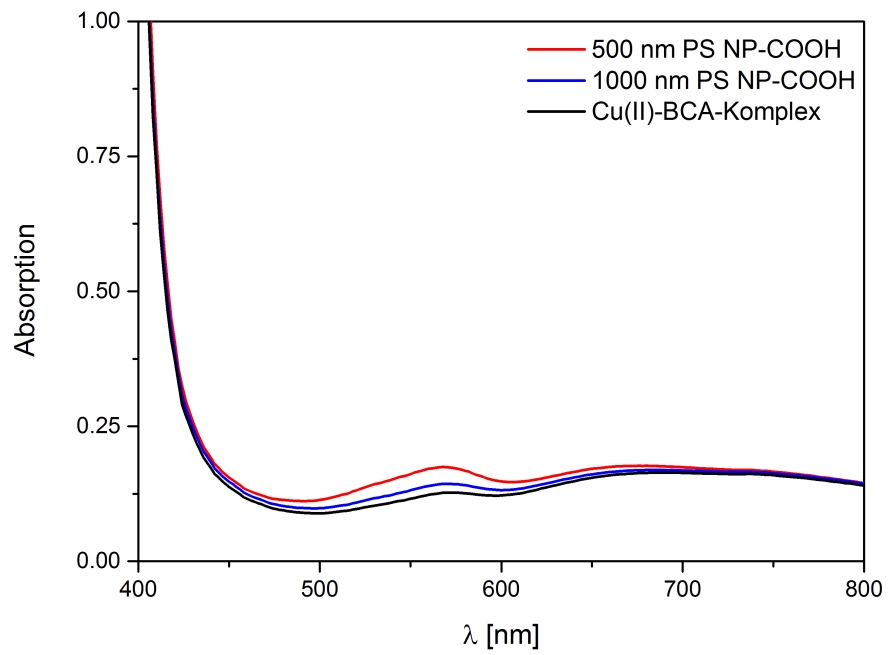


Abbildung 7.4: Absorptionsspektren ungefärbter 500 und 1000 nm PS NP nach Reaktion im BCA-Assay.

Tabelle 7.6: Anzahl von Carboxylgruppen, maximale Bedeckung von SAV je NP, Anzahl von SAV je NP bei 100 % Umsatz und Anzahl gekoppelter SAV je NP mittels Biotin-FITC Assay für PS und Si NP mit verschiedenen Größen. ^aAnzahl funktioneller Gruppen entsprechend der Herstellerangaben.

Material	PS	PS	PS
Größe [nm]	100	500	1000
Anzahl COOH-Gruppen je NP ^a	1.330	82.800	662.200
Maximale SAV-Bedeckung je NP	1.850	45.300	181.100
Anzahl von SAV je NP bei 100 % Kopplungseffizienz	147	18.350	147.000
Anzahl gebundener SAV-Moleküle je NP mit Biotin-FITC Assay	40	19.500	43.600
Anzahl gebundener SAV-Moleküle je NP mit BCA-Assay	50	13.650	82.000

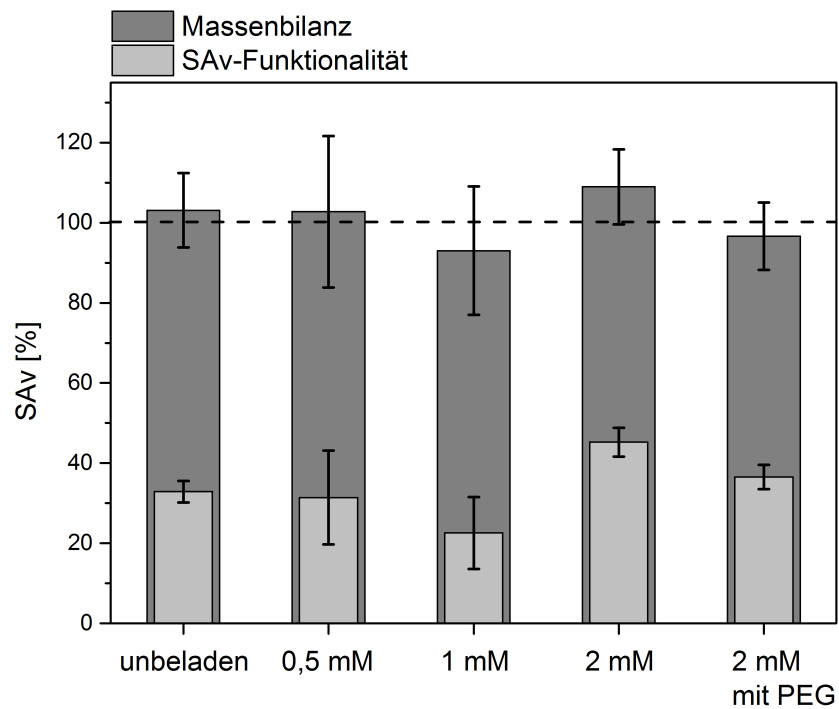
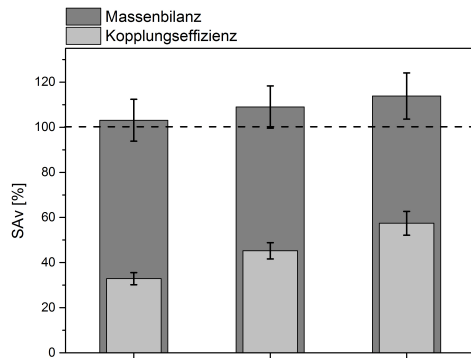
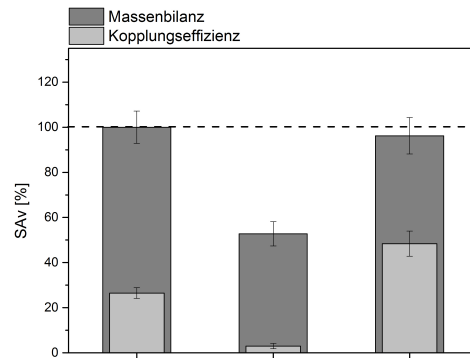


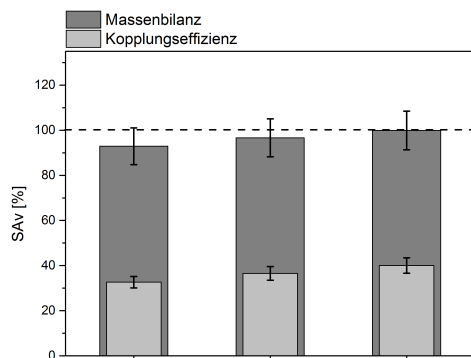
Abbildung 7.5: Massenbilanzen und Kopplungseffizienzen von SAV gebunden an unbeladene und TPP-gefärbte, carboxylierte, 100 nm PS NP, die mittels BCA-Assay bestimmt wurden. Die angegebenen Fehlerbalken (Standardabweichungen) wurden aus drei unabhängigen Messungen berechnet.



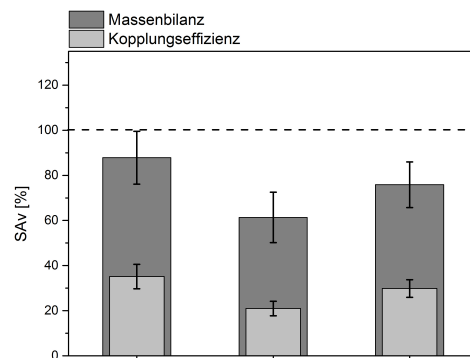
(a) BCA-Assay / EDC/ sulfo-NHS



(b) Biotin-FITC-Assay / EDC/ sulfo-NHS



(c) BCA-Assay / MAL-Thiol



(d) Biotin-FITC-Assay / MAL-Thiol

Abbildung 7.6: Kopplungseffizienzen und Massenbilanzen von SAV gebunden an C153- und TPP-gefärbte, 100 nm PS NP mittels (a,b) EDC/ sulfo-NHS-Kupplung und (c,d) mittels MAL-Thiol-Kopplung mit PEG-Linker. Die C153- und TPP-Beladungskonzentration lag bei 10 bzw. 2 mM. Die SAV-Quantifizierung wurde mit Hilfe (a,c) des BCA-Assays und (b,d) der Biotin-FITC-Titration durchgeführt. Die angegebenen Fehlerbalken (Standardabweichungen) wurden aus drei unabhängigen Messungen berechnet.

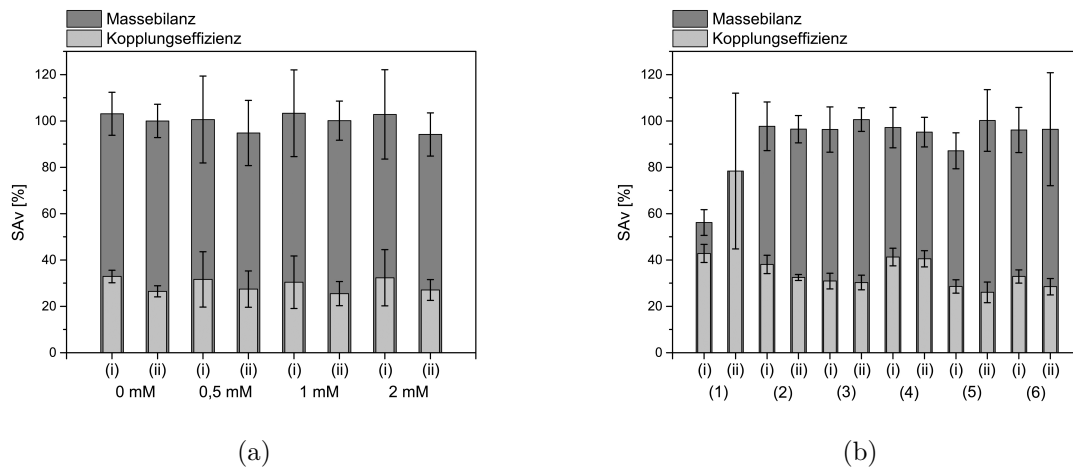


Abbildung 7.7: (a) Kopplungseffizienzen und Massenbilanzen von SAV gebunden an NR-gefärbte 100 nm PS NP bei verschiedenen Beladungskonzentrationen. (b) Kopplungseffizienzen und Massenbilanzen von SAV gebunden an C153-gefärbte 500 nm PS NP (10 mM) (1) und an F305- (2 mM) (2), NR- (2 mM) (3), Itrybe- (0,5 mM) (4), $\text{Eu}(\text{TTFa})_3(\text{phen})$ - (1 mM) (5) und $\text{Eu}(\text{dbm})_3(\text{phen})$ -gefärbte (1 mM) (6) 100 nm PS NP. Die SAV-Kopplung erfolgte mittels EDC/ sulfo-NHS-Kopplung. Die angegebenen Fehlerbalken (Standardabweichungen) wurden aus drei unabhängigen Messungen berechnet.

Tabelle 7.7: Maximal immobilisierte Menge C153-beladener (10 mM), 100 nm PS NP je Well einer MTP (Monolage, hexagonal dichteste Kugelpackung), die maximale detektierbare C153-Menge im Partikel oder nach Extraktion und der daraus resultierende Verstärkungsfaktor bei gleichen optischen Eigenschaften der Farbstoffe im Partikel und in Lösung. ^aHerstellerinformation Tecan-Trading AG. ^bHerstellerinformation Greiner Bio One International GmbH.

Parameter	Wert	Parameter	Wert
$V_{\text{Füllstand}}$	100 mm ³	\varnothing_{NP}	100 nm
$h_{\text{Füllstand}}$	2,9 mm	$A_{\text{NP-Platzbedarf}}$	$8,8 \cdot 10^{-9}$ mm ²
$A_{\text{Boden}}^{\text{b}}$	34,0 mm ²	NP_{Boden}	$3,9 \cdot 10^9$ NP
$A_{\text{Wandung}}^{\text{b}}$	30,2 mm ²	$\text{NP}_{\text{Wandung}}$	$3,4 \cdot 10^9$ NP
A_{Gesamt}	64,2 mm ²	$\text{NP}_{\text{Kavität}}$	$7,3 \cdot 10^9$ NP
$\varnothing_{\text{Strahl}}^{\text{a}}$	0,7 mm	$N_{\text{C153}}/N_{\text{NP}}$	54.000
A_{Strahl}	0.4 mm ²	$N_{\text{C153 Boden}}$	$2,2 \cdot 10^{14}$
$A_{\text{Strahl}}/A_{\text{Boden}}$	1,0 %	$N_{\text{C153 Wandung}}$	$1,9 \cdot 10^{14}$
V_{Strahl}	1,1 mm ³	$N_{\text{C153 Kavität}}$	$4,1 \cdot 10^{14}$
$V_{\text{Strahl}}/V_{\text{Füllstand}}$	1,1 %	$N_{\text{C153 Strahl(Boden)}}$	$2,4 \cdot 10^{12}$
		$N_{\text{C153 Strahl(Volumen)}}$	$4,3 \cdot 10^{12}$

$$SF_1 = \frac{N_2}{N_1}; N_2 > N_1; SF_2 = \frac{\Phi_{f,2}}{\Phi_{f,1}}; \Phi_{f,2} > \Phi_{f,1}; SF_3 = \frac{\epsilon(\lambda)_2}{\epsilon(\lambda)_1}; \epsilon(\lambda)_2 > \epsilon(\lambda)_1 \quad (7.2)$$

Berechnung des Signalverstärkungsfaktors nach Gleichung 7.2. Durch z.B. Erhöhung der Farbstoffmenge (SF_1), der Quantenausbeute (SF_2) oder des Extinktionskoeffizienten (SF_3) eines Farbstoffes kann die Signalintensität des Fluoreszenzsignals verstärkt werden.

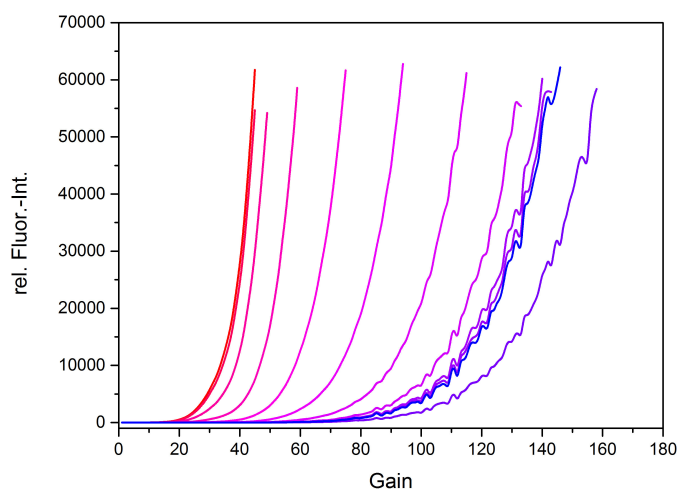


Abbildung 7.8: Einfluss des Gainfaktors auf die Fluoreszenzintensität gemessen für verschiedene Konzentrationen von Fluorescein-Natrium im basisch wässrigen Milieu. Die größte vermessene Konzentration lag bei $6,54 \cdot 10^{-4}$ M und die kleinste bei $1,80 \cdot 10^{-9}$ M. Die Konzentrationen nehmen von Rot nach Blau ab.

Einfluss des Gainfaktors. Für den Vergleich von Immunoassays, müssen die gemessenen Intensitäten unter gleichen Bedingungen aufgenommen werden. Das schließt auch den Gainfaktor des verwendeten MTP-Auslesegerätes ein. Durch die Erhöhung des Gains wird die Detektorspannung reguliert und somit die Verstärkung für das Fluoreszenzsignal. Das verwendete MTP-Auslesegerät kann 50.000 bis 60.000 relative Fluoreszenzintensitäten detektieren bevor der Detektor gesättigt ist. Optimalerweise liegen die zu messenden relativen Fluoreszenzintensitäten bei 40.000. Mit steigendem Gain-Faktor steigt das Messsignal exponentiell an (Abbildung 7.8). Die Verstärkung des Fluoreszenzsignals ist zudem abhängig von dem Spektralbereich der Emission (spektrale Empfindlichkeit des Detektors), welche wiederum abhängig vom verwendeten Farbstoff ist, und von der eingesetzten Farbstoffkonzentration (siehe Abbildung 7.8). Dementsprechend müssen, um große Signalintensitäten zu erreichen bei kleinen Farbstoffkonzentrationen hohe und bei großen Farbstoffkonzentrationen kleine Gainfaktoren eingestellt werden. Zugleich wird aber auch ein gegebenenfalls vorhandenes Untergrundsignal verstärkt, was zu einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses führen kann. Zudem ist die Streuung (Rauschen) der gemessenen Daten bei kleineren Farbstoffkonzentrationen und höheren Gainfaktoren deutlich größer, was folglich zu größeren Messunsicherheiten führt. Für den Vergleich von Assays, gemessen mit verschiedenen Gainfaktoren, können die bestimmten Signalintensitäten in Abhängigkeit des eingestellten Gainfaktors bei Kenntnis der Exponentialkurve umgerechnet werden.

Zur Untersuchung des Einflusses des Gain-Faktors auf die Assayparameter wurde der CRP-Immunoassay mit 100 nm, C153 beladenen, direkt SAV-funktionalisierten PS NP mit der Extraktionsmethode bei verschiedenen Gainfaktoren durchgeführt. In Abbildung 7.9 sind die Dosis-Wirkungs-Kurven mit 5-PL-Fit gezeigt bei einem Gain von 100, 110

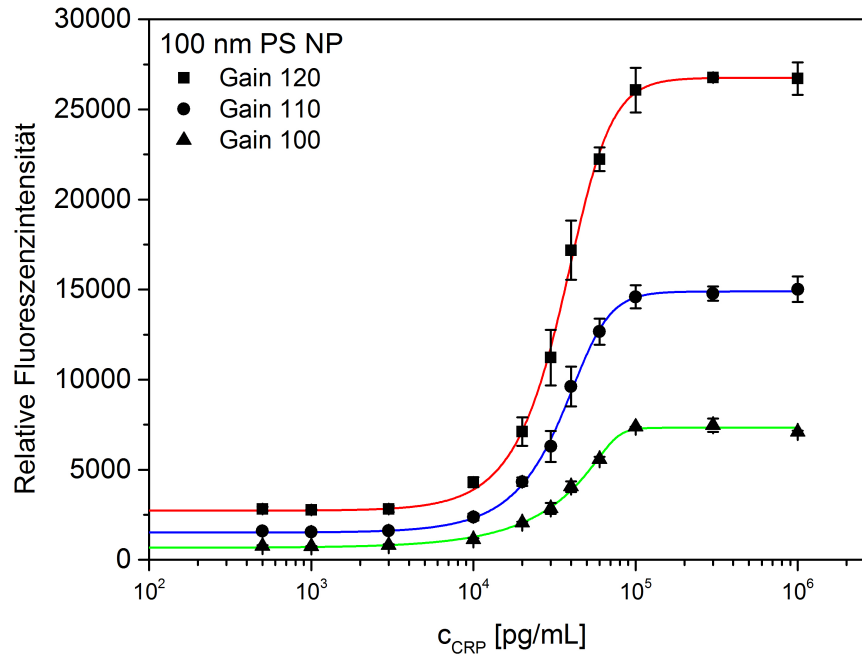


Abbildung 7.9: Dosis-Wirkungs-Kurven mit 5-PL-Fit für den CRP-Immunoassay mit C153-beladenen, direkt SAv-funktionalisierten, 100 nm NP mit Extraktionsmethode mit Gainfaktorvariation. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Messungen inkl. der Standardabweichung.

und 120. Wie zu erkennen ist, steigt die gemessene Signalintensität bzw. der DR wie auch der Signaluntergrund. Dennoch hat der Gainfaktor kaum Einfluss auf den LOD bzw. den EC_{50} -Wert. Die Werte sind in Tabelle 7.8 dargestellt. Sinnvoll ist es, den Gain für die höchsten Signale zu optimieren, welche mit dem verwendeten System bei ca. 40.000 relativen Fluoreszenzintensitäten liegen.

Tabelle 7.8: Einfluss des Gainfaktors auf EC_{50} , DR, RDR, LOD und R^2 für C153-beladene (10 mM), direkt-SAv-funktionalisierte, 100 nm PS NP im CRP-Immunoassay nach Extraktion in EtOH.

Gain	EC_{50} [pg/mL]	DR	RDR	LOD [pg/mL]	R^2
120	36.100	24.000	0,90	4.900	0,998
110	35.700	13.400	0,91	4.400	0,998
100	41.700	6.700	0,90	4.800	0,997

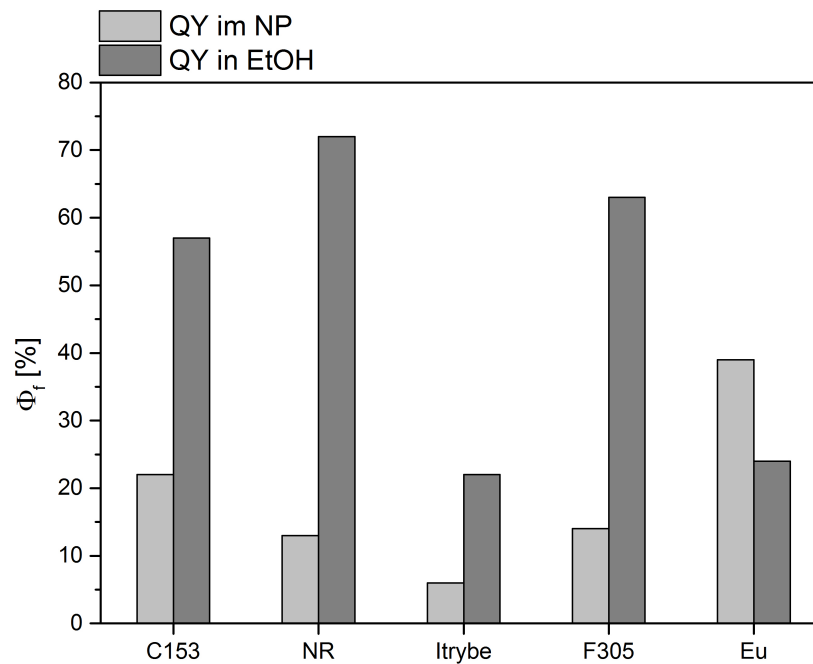


Abbildung 7.10: Quantenausbeuten Φ_f verschiedener Farbstoffe im NP (hellgrau) und nach Extraktion mit EtOH (dunkelgrau). Für $\text{Eu}(\text{TTFA})_3(\text{phen})$ wurde die Quantenausbeute in THF angegeben. $c_{\text{Beladungslösung}}$ [mM]: 10 (C153), 2 (NR), 0,5 (Itrybe), 10 (F305), 1 ($\text{Eu}(\text{TTFA})_3(\text{phen})$).

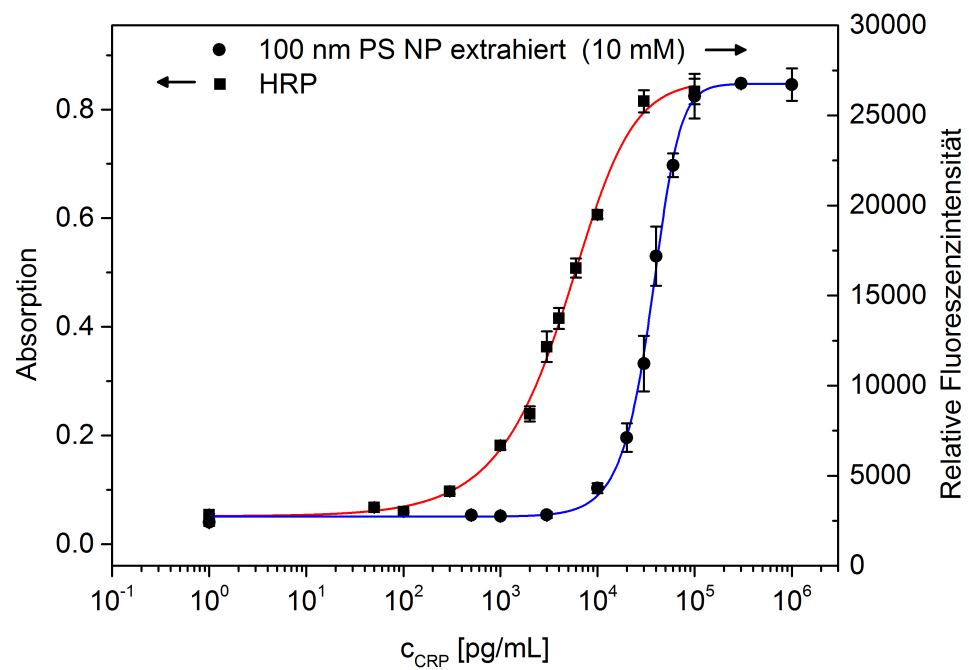


Abbildung 7.11: Dosis-Wirkungs-Kurven mit 5-PL-Fit für den CRP-Immunoassay mit HRP/ TMB detektiert in Absorption (blau) und für C153-beladenen (10 mM) direkt SAV-funktionalisierten, 100 nm PS NP mit Detektion nach Extraktion in EtOH (schwarz). Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Messungen inkl. der Standardabweichungen.

Literaturverzeichnis

- [1] E. Stürenburg, R. Junker, „Point-of-Care Testing in Microbiology“, *Deutsches Ärzteblatt International* **106**, 48-54 (2009).
- [2] R. Junker, H. Schlebusch, P. B. Luppä, „Point-of-Care Testing in Hospitals and Primary Care“, *Deutsches Ärzteblatt International* **107**, 561-567 (2010).
- [3] P. B. Luppä, H. Schlebusch, *POCT - Patientennahe Labordiagnostik*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2008.
- [4] E. P. Diamandis, „Immunoassays with time-resolved fluorescence spectroscopy: Principles and applications“, *Clinical Biochemistry* **21**, 139 - 150 (1988).
- [5] I. A. Hemmilä, *Applications of Fluorescence in Immunoassays*, Wiley, 1991.
- [6] M. Seydack, „Immunoassays: Basic Concepts, Physical Chemistry and Validation“, in *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II*, U. Resch-Genger (Herausgeber), 6 aus *Springer Series on Fluorescence*, 401-428, Springer Berlin Heidelberg, 2008.
- [7] A. K. Yetisen, M. S. Akram, C. R. Lowe, „Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices“, *Lab Chip* **13**, 2210-2251 (2013).
- [8] G. A. Posthuma-Trumpie, J. Korf, A. van Amerongen, „Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**, 569-582 (2009).
- [9] A. Hauk, „Diagnostik mit Teststreifen: Wie der Schwangerschaftstest funktioniert“, *Biologie in unserer Zeit* **45**, 85-85 (2015).
- [10] P. Alivisatos, P. F. Barbara, A. W. Castleman, J. Chang, D. A. Dixon, M. L. Klein, G. L. McLendon, J. S. Miller, M. A. Ratner, P. J. Rossky, S. I. Stupp, M. E. Thompson, „From Molecules to Materials: Current Trends and Future Directions“, *Advanced Materials* **10**, 1297-1336 (1998).
- [11] H. Goesmann, C. Feldmann, „Nanoparticulate Functional Materials“, *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 1362-1395 (2010).
- [12] B. Pelaz, S. Jaber, D. J. de Aberasturi, V. Wulf, T. Aida, J. M. de la Fuente, J. Feldmann, H. E. Gaub, L. Josephson, C. R. Kagan, N. A. Kotov, L. M. Liz-Marzán, H. Mattoussi, P. Mulvaney, C. B. Murray, A. L. Rogach, P. S.

- Weiss, I. Willner, W. J. Parak, „The State of Nanoparticle-Based Nanoscience and Biotechnology: Progress, Promises, and Challenges“, *ACS Nano* **6**, 8468-8483 (2012).
- [13] A. L. Efros, M. Rosen, „The electronic structure of semiconductor nanocrystals“, *Annual Review of Materials Science* **30**, 475-521 (2000).
- [14] P. Moriarty, „Nanostructured materials“, *Reports on Progress in Physics* **64**, 297 (2001).
- [15] A. J. Khopade, F. Caruso, „Stepwise Self-Assembled Poly(amidoamine) Dendrimer and Poly(styrenesulfonate) Microcapsules as Sustained Delivery Vehicles“, *Biomacromolecules* **3**, 1154-1162 (2002).
- [16] E. Donath, G. B. Sukhorukov, F. Caruso, S. A. Davis, H. Möhwald, „Novel Hollow Polymer Shells by Colloid-Templated Assembly of Polyelectrolytes“, *Angewandte Chemie International Edition* **37**, 2201-2205 (1998).
- [17] P. D. Howes, R. Chandrawati, M. M. Stevens, „Colloidal nanoparticles as advanced biological sensors“, *Science* **346**, 1247390 (2014).
- [18] G. Hermanson, „Bioconjugate Techniques, 3rd Edition“, in *Bioconjugate Techniques, 3rd Edition*, 1-1146, Elsevier Science BV, 2013.
- [19] N. M. Green, „[5] Avidin and streptavidin“, in *Avidin-Biotin Technology*, M. Wilchek, E. A. Bayer (Herausgeber), 184 aus *Methods in Enzymology*, 51-67, Academic Press, 1990.
- [20] P. D. Quevedo, T. Behnke, U. Resch-Genger, „Streptavidin conjugation and quantification - A method evaluation for nanoparticles“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **408**, 4133-4149 (2016).
- [21] S. K. Vashist, B. Zhang, D. Zheng, K. Al-Rubeaan, J. H. Luong, F.-S. Sheu, „Sulfo-N-hydroxysuccinimide interferes with bicinchoninic acid protein assay“, *Analytical Biochemistry* **417**, 156-158 (2011).
- [22] S. K. Vashist, C. K. Dixit, „Interference of N-hydroxysuccinimide with bicinchoninic acid protein assay“, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **411**, 455-457 (2011).
- [23] C. P.-y. Chan, Y. Brümmel, M. Seydack, K.-k. Sin, L.-w. Wong, E. Merisko-Liversidge, D. Trau, R. Renneberg, „Nanocrystal Biolabels with Releasable Fluorophores for Immunoassays“, *Analytical Chemistry* **76**, 3638-3645 (2004).
- [24] Y. Brümmel, C. P.-y. Chan, R. Renneberg, A. Thuenemann, M. Seydack, „On the Influence of Different Surfaces in Nano- and Submicrometer Particle Based Fluorescence Immunoassays“, *Langmuir* **20**, 9371-9379 (2004).

- [25] T. Behnke, C. Würth, E.-M. Laux, K. Hoffmann, U. Resch-Genger, „Simple strategies towards bright polymer particles via one-step staining procedures“, *Dyes and Pigments* **94**, 247 - 257 (2012).
- [26] U. Rösch, S. Yao, R. Wortmann, F. Würthner, „Fluorescent H-Aggregates of Merocyanine Dyes“, *Angewandte Chemie International Edition* **45**, 7026-7030 (2006).
- [27] C. P.-y. Chan, Y.-c. Cheung, R. Renneberg, M. Seydack, *New Trends in Immunoassays*, 123-154, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008.
- [28] J. Yan, M. C. Estévez, J. E. Smith, K. Wang, X. He, L. Wang, W. Tan, „Dye-doped nanoparticles for bioanalysis“, *Nano Today* **2**, 44-50 (2007).
- [29] R. O’Kennedy, C. Murphy, *Immunoassays: Development, Applications and Future Trends*, Pan Stanford Publishing, 2017.
- [30] J. Grandke, L. Oberleitner, U. Resch-Genger, L.-A. Garbe, R. J. Schneider, „Quality assurance in immunoassay performance - carbamazepine immunoassay format evaluation and application on surface and waste water“, *Anal. Methods* **5**, 3754-3760 (2013).
- [31] J. Grandke, L. Oberleitner, U. Resch-Genger, L.-A. Garbe, R. J. Schneider, „Quality assurance in immunoassay performance - comparison of different enzyme immunoassays for the determination of caffeine in consumer products“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405**, 1601-1611 (2013).
- [32] J. Wilkins, J. R. Gallimore, E. G. Moore, M. B. Pepys, „Rapid Automated High Sensitivity Enzyme Immunoassay of C-Reactive Protein“, *Clinical Chemistry* **44**, 1358-1361 (1998).
- [33] J. L. Vaitukaitis, „Development of the Home Pregnancy Test“, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1038**, 220-222 (2004).
- [34] „NanoRepro AG - Dem Leben zuliebe“, <http://www.nano.org/>, 2015.
- [35] A. McNaught, A. Wilkinson, *Compendium of chemical terminology: IUPAC recommendations: Gold Book*, Blackwell Science, Oxford England Malden, MA, USA, 1997.
- [36] D. Wild, *The Immunoassay Handbook*, Elsevier Ltd., 2013.
- [37] S. Dhawan, „Signal amplification systems in immunoassays: implications for clinical diagnostics“, *Expert Review of Molecular Diagnostics* **6**, 749-760 (2006).
- [38] Y. Du, *Fluorescence Polarization Assay to Quantify Protein-Protein Interactions in an HTS Format*, 529-544, Springer New York, New York, NY, 2015.
- [39] R. Corley, *A guide to methods in the biomedical sciences*, Springer, New York, 2004.

- [40] K. D. Wegner, P. T. Lanh, T. Jennings, E. Oh, V. Jain, S. M. Fairclough, J. M. Smith, E. Giovanelli, N. Lequeux, T. Pons, N. Hildebrandt, „Influence of Luminescence Quantum Yield, Surface Coating, and Functionalization of Quantum Dots on the Sensitivity of Time-Resolved FRET Bioassays“, *ACS Applied Materials & Interfaces* **5**, 2881-2892 (2013).
- [41] M. S. Szymanski, R. A. Porter, „Preparation and quality control of silver nanoparticle-antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays“, *Journal of Immunological Methods* **387**, 262-269 (2013).
- [42] B. J. Battersby, M. Trau, „Optically Encoded Particles and Their Applications in Multiplexed Biomedical Assays“, *Australian Journal Chemistry* **60**, 343-353 (2007).
- [43] J. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, New York, 2006.
- [44] T. J. Russin, E. I. Altinoglu, J. H. Adair, P. C. Eklund, „Measuring the fluorescent quantum efficiency of indocyanine green encapsulated in nanocomposite particulates“, *Journal of Physics: Condensed Matter* **22**, 334217 (2010).
- [45] A. Huber, T. Behnke, C. Würth, C. Jaeger, U. Resch-Genger, „Spectroscopic Characterization of Coumarin-Stained Beads: Quantification of the Number of Fluorophores Per Particle with Solid-State ^{19}F -NMR and Measurement of Absolute Fluorescence Quantum Yields“, *Analytical Chemistry* **84**, 3654-3661 (2012).
- [46] A. Faucon, J. Fresnais, A. Brosseau, P. Hulin, S. Nedellec, J. Hemez, E. Ishow, „Photoactive chelating organic nanospheres as central platforms of bimodal hybrid nanoparticles“, *J. Mater. Chem. C* **1**, 3879-3886 (2013).
- [47] M. K. Johansson, R. M. Cook, „Intramolecular Dimers: A New Design Strategy for Fluorescence-Quenched Probes“, *Chemistry ? A European Journal* **9**, 3466-3471 (2003).
- [48] D. D. Evanoff, G. Chumanov, „Size-Controlled Synthesis of Nanoparticles. 2. Measurement of Extinction, Scattering, and Absorption Cross Sections“, *The Journal of Physical Chemistry B* **108**, 13957-13962 (2004).
- [49] P. D. Josephy, T. Eling, R. P. Mason, „The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates.“, *Journal of Biological Chemistry* **257**, 3669-3675 (1982).
- [50] N. Muhammad, T. Dworeck, M. Fioroni, U. Schwaneberg, „Engineering of the E. coli Outer Membrane Protein FhuA to overcome the Hydrophobic Mismatch in Thick Polymeric Membranes“, *Journal of Nanobiotechnology* **9**, 1-9 (2011).
- [51] P. Champe, R. Harvey, D. Ferrier, *Biochemistry*, Lippincott's illustrated reviews, Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- [52] E. Huntress, L. Stanley, A. Parker, „The Preparation of 3-Aminophthalhydrazide for Use in the Demonstration of Chemiluminescence“, *Journal of the American Chemical Society* **56**, 241-242 (1934).

- [53] E. H. White, O. Zafiriou, H. H. Kagi, J. H. M. Hill, „Chemiluminescence of Luminol: The Chemical Reaction“, *Journal of the American Chemical Society* **86**, 940-941 (1964).
- [54] E. H. White, M. M. Bursey, „Chemiluminescence of Luminol and Related Hydrazides: The Light Emission Step“, *Journal of the American Chemical Society* **86**, 941-942 (1964).
- [55] S. Vira, E. Mekhedov, G. Humphrey, P. S. Blank, „Fluorescent-labeled antibodies Balancing functionality and degree of labeling“, *Analytical Biochemistry* **402**, 146-150 (2010).
- [56] C. P.-y. Chan, Y. Bruemmel, M. Seydack, K.-k. Sin, L.-w. Wong, E. Merisko-Liversidge, D. Trau, R. Renneberg, „Nanocrystal Biolabels with Releasable Fluorophores for Immunoassays“, *Analytical Chemistry* **76**, 3638-3645 (2004).
- [57] D. Trau, W. Yang, M. Seydack, F. Caruso, N.-T. Yu, R. Renneberg, „Nanoencapsulated Microcrystalline Particles for Superamplified Biochemical Assays“, *Analytical Chemistry* **74**, 5480-5486 (2002).
- [58] E.-M. Laux, T. Behnke, K. Hoffmann, U. Resch-Genger, „Keeping particles brilliant - simple methods for the determination of the dye content of fluorophore-loaded polymeric particles“, *Analytical Methods* **4**, 1759-1768 (2012).
- [59] G. Worsley, S. Attree, J. Noble, A. Horgan, „Rapid duplex immunoassay for wound biomarkers at the point-of-care“, *Biosensors and Bioelectronics* **34**, 215-220 (2012).
- [60] J. Korpela, „Avidin, a high affinity biotin-binding protein, as a tool and subject of biological research.“, *Medical Biology* **62**, 5-26 (1984).
- [61] G. Kada, H. Falk, H. J. Gruber, „Accurate measurement of avidin and streptavidin in crude biofluids with a new, optimized biotin-fluorescein conjugate“, *Biochimica et Biophysica Acta* **1427**, 33-43 (1999).
- [62] B. M. Barth, R. Sharma, E. I. Altinoglu, T. T. Morgan, S. S. Shanmugavelandy, J. M. Kaiser, C. McGovern, G. L. Matters, J. P. Smith, M. Kester, J. H. Adair, „Bioconjugation of Calcium Phosphosilicate Composite Nanoparticles for Selective Targeting of Human Breast and Pancreatic Cancers In Vivo“, *ACS Nano* **4**, 1279-1287 (2010).
- [63] A. Arakaki, S. Hideshima, T. Nakagawa, D. Niwa, T. Tanaka, T. Matsunaga, T. Osaka, „Detection of biomolecular interaction between biotin and streptavidin on a self-assembled monolayer using magnetic nanoparticles“, *Biotechnology and Bioengineering* **88**, 543-546 (2004).
- [64] „Streptavidin Project Description“, <http://faculty.washington.edu/stenkamp/stefanieweb/abstract.html>, 2003.

- [65] R. E. Stenkamp, I. L. Trong, L. Klumb, P. S. Stayton, S. Freitag, „Structural studies of the streptavidin binding loop“, *Protein Science* **6**, 1157-1166 (1997).
- [66] S. Freitag, I. L. Trong, A. Chilkoti, L. A. Klumb, P. S. Stayton, R. E. Stenkamp, „Structural studies of binding site tryptophan mutants in the high-affinity streptavidin-biotin complex“, *Journal of Molecular Biology* **279**, 211-221 (1998).
- [67] S. Freitag, I. L. Trong, L. A. Klumb, V. Chu, A. Chilkoti, P. S. Stayton, R. E. Stenkamp, „X-ray crystallographic studies of streptavidin mutants binding to biotin“, *Biomolecular Engineering* **16**, 13-19 (1999).
- [68] V. Chu, P. S. Stayton, S. Freitag, I. Le Trong, R. E. Stenkamp, „Thermodynamic and structural consequences of flexible loop deletion by circular permutation in the streptavidin-biotin system“, *Protein Science* **7**, 848-859 (1998).
- [69] P. S. Stayton, S. Freitag, L. A. Klumb, A. Chilkoti, V. Chu, J. E. Penzotti, R. To, D. Hyre, I. L. Trong, T. P. Lybrand, R. E. Stenkamp, „Streptavidin-biotin binding energetics“, *Biomolecular Engineering* **16**, 39-44 (1999).
- [70] P. Weber, D. Ohlendorf, J. Wendoloski, F. Salemme, „Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin“, *Science* **243**, 85-88 (1989).
- [71] G. Gitlin, E. A. Bayer, M. Wilchek, „Studies on the biotin-binding sites of avidin and streptavidin. Tyrosine residues are involved in the binding site“, *Biochemical Journal* **269**, 527-530 (1990).
- [72] G. Gitlin, E. A. Bayer, M. Wilchek, „Studies on the biotin-binding site of streptavidin. Tryptophan residues involved in the active site“, *Biochemical Journal* **256**, 279-282 (1988).
- [73] M. H. Qureshi, S.-L. Wong, „Design, production, and characterization of a monomeric streptavidin and its application for affinity purification of biotinylated proteins“, *Protein Expression and Purification* **25**, 409 - 415 (2002).
- [74] B. A. Katz, „Binding of biotin to streptavidin stabilizes intersubunit salt bridges between Asp61 and His87 at low pH“, *Journal of Molecular Biology* **274**, 776 - 800 (1997).
- [75] G. Kurzban, G. Gitlin, E. Bayer, M. Wilchek, P. Horowitz, „Biotin binding changes the conformation and decreases tryptophan accessibility of streptavidin“, *Journal of Protein Chemistry* **9**, 673-682 (1990).
- [76] R. M. Lequin, „Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)“, *Clinical Chemistry* **51**, 2415-2418 (2005).
- [77] W. Zhan, A. J. Bard, „Electrogenerated Chemiluminescence. 83. Immunoassay of Human C-Reactive Protein by Using Ru(bpy)₃²⁺-Encapsulated Liposomes as Labels“, *Analytical Chemistry* **79**, 459-463 (2007).

- [78] H. Y. Tsai, C. F. Hsu, I. W. Chiu, C. B. Fuh, „Detection of C-Reactive Protein Based on Immunoassay Using Antibody-Conjugated Magnetic Nanoparticles“, *Analytical Chemistry* **79**, 8416-8419 (2007).
- [79] W. L. Roberts, R. Sedrick, L. Moulton, A. Spencer, N. Rifai, „Evaluation of Four Automated High-Sensitivity C-Reactive Protein Methods: Implications for Clinical and Epidemiological Applications“, *Clinical Chemistry* **46**, 461-468 (2000).
- [80] D. R. Claus, A. P. Osmand, H. Gewurz, „Radioimmunoassay of human C-reactive protein and levels in normal sera“, *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **87**, 120-128 (1976).
- [81] M. B. Pepys, G. M. Hirschfield, „C-reactive protein: a critical update“, *The Journal of Clinical Investigation* **111**, 1805-1812 (2003).
- [82] W. S. Tillett, T. Francis, „Serological reactions in pneumonia with a nonprotein somatic fraction of pneumococcus“, *The Journal of Experimental Medicine* **52**, 561-571 (1930).
- [83] P. M. Ridker, J. E. Buring, N. R. Cook, N. Rifai, „C-Reactive Protein, the Metabolic Syndrome, and Risk of Incident Cardiovascular Events: An 8-Year Follow-Up of 14 719 Initially Healthy American Women“, *Circulation* **107**, 391-397 (2003).
- [84] P. M. Ridker, C. H. Hennekens, J. E. Buring, N. Rifai, „C-Reactive Protein and Other Markers of Inflammation in the Prediction of Cardiovascular Disease in Women“, *New England Journal of Medicine* **342**, 836-843 (2000).
- [85] W. Koenig, M. Sund, M. Fröhlich, H.-G. Fischer, H. Löwel, A. Döring, W. L. Hutchinson, M. B. Pepys, „C-Reactive Protein, a Sensitive Marker of Inflammation, Predicts Future Risk of Coronary Heart Disease in Initially Healthy Middle-Aged Men: Results From the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992“, *Circulation* **99**, 237-242 (1999).
- [86] K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Medintz, „Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology“, *Chemical Reviews* **113**, 1904-2074 (2013).
- [87] N. L. Rosi, C. A. Mirkin, „Nanostructures in Biodiagnostics“, *Chemical Reviews* **105**, 1547-1562 (2005).
- [88] F. P. Zamborini, L. Bao, R. Dasari, „Nanoparticles in Measurement Science“, *Analytical Chemistry* **84**, 541-576 (2012).
- [89] J. Wang, X. Wang, L. Ren, Q. Wang, L. Li, W. Liu, Z. Wan, L. Yang, P. Sun, L. Ren, M. Li, H. Wu, J. Wang, L. Zhang, „Conjugation of Biomolecules with Magnetic Protein Microspheres for the Assay of Early Biomarkers Associated with Acute Myocardial Infarction“, *Analytical Chemistry* **81**, 6210-6217 (2009).

- [90] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, „Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine“, *Journal of Physics D: Applied Physics* **36**, R167-R181 (2003).
- [91] I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman, H. Mattoussi, „Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing“, *Nature Materials* **4**, 435-446 (2005).
- [92] J. Groza, J. F. Shackelford, E. J. Lavernia, M. T. Powers, *Materials processing handbook*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2007.
- [93] R. Gilbert, *Emulsion polymerization : a mechanistic approach*, Academic Press, London San Diego, 1995.
- [94] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, „Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range“, *Journal of Colloid and Interface Science* **26**, 62-69 (1968).
- [95] G. Odian, *Principles of polymerization*, Wiley, Hoboken, N.J, 2004.
- [96] P. Coloson, C. Henrist, R. Cloots, „Nanosphere Lithography: A Powerful Method for the Controlled Manufacturing of Nanomaterials“, *Journal of Nanomaterials* **ID 948510**, 1-19 (2013).
- [97] T. Sato, R. Ruch, *Stabilization of colloidal dispersions by polymer adsorption*, Dekker, New York, 1980.
- [98] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*, Springer, 2002.
- [99] R. Hunter, *Zeta potential in colloid science : principles and applications*, Academic Press, London San Diego, 1988.
- [100] D. Napper, *Polymeric stabilization of colloidal dispersions*, Academic Press, London New York, 1983.
- [101] G. Decher, „Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites“, *Science* **277**, 1232-1237 (1997).
- [102] G. Decher, J. Hong, J. Schmitt, „Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces“, *Thin Solid Films* **210/211, Part 2**, 831-835 (1992).
- [103] G. Schneider, G. Decher, „From Functional Core/Shell Nanoparticles Prepared via Layer-by-Layer Deposition to Empty Nanospheres“, *Nano Letters* **4**, 1833-1839 (2004).
- [104] J. Sangster, *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*, Wiley Series in Solutions Chemistry, Wiley, 1997.
- [105] A. Lopez-Serrano, R. M. Olivas, J. S. Landaluze, C. Camara, „Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact“, *Analytical Methods* **6**, 38-56 (2014).

- [106] K. E. Sapsford, K. M. Tyner, B. J. Dair, J. R. Deschamps, I. L. Medintz, „Analyzing Nanomaterial Bioconjugates: A Review of Current and Emerging Purification and Characterization Techniques“, *Analytical Chemistry* **83**, 4453-4488 (2011).
- [107] „Zetasizer Nano Series User Manual“, 2004.
- [108] A. Müller, „Lichtstreuung an Nanomaterialien“, http://www.meerholz.uni-koeln.de/fileadmin/user_upload/Docs/Praktikum/Versuchsanleitungen/Skript-Lichtstreuung_A._Mueller.pdf, 2010.
- [109] X. Zhu, J. Shen, W. Liu, X. Sun, Y. Wang, „Nonnegative least-squares truncated singular value decomposition to particle size distribution inversion from dynamic light scattering data“, *Appl. Opt.* **49**, 6591-6596 (2010).
- [110] D. Thassu, *Ocular drug delivery systems barriers and application of nanoparticulate systems*, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, 2013.
- [111] I. D. Morrison, E. F. Grabowski, C. A. Herb, „Improved techniques for particle size determination by quasi-elastic light scattering“, *Langmuir* **1**, 496-501 (1985).
- [112] U. Wollenberger, *Analytische Biochemie: Eine praktische Einführung in das Messen mit Biomolekülen*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- [113] Q. Mu, T. Hu, J. Yu, „Molecular Insight into the Steric Shielding Effect of PEG on the Conjugated Staphylokinase: Biochemical Characterization and Molecular Dynamics Simulation.“, *PLoS ONE* **8**, e68559 (2013).
- [114] Q. He, J. Zhang, J. Shi, Z. Zhu, L. Zhang, W. Bu, L. Guo, Y. Chen, „The effect of PEGylation of mesoporous silica nanoparticles on nonspecific binding of serum proteins and cellular responses“, *Biomaterials* **31**, 1085-1092 (2010).
- [115] J.-M. Williford, M. M. Archang, I. Minn, Y. Ren, M. Wo, J. Vandermark, P. B. Fisher, M. G. Pomper, H.-Q. Mao, „Critical Length of PEG Grafts on IPEI/DNA Nanoparticles for Efficient in Vivo Delivery“, *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2**, 567-578 (2016).
- [116] J. M. Harris, N. E. Martin, M. Modi, „Pegylation“, *Clinical Pharmacokinetics* **40**, 539-551 (2001).
- [117] D. E. Owens, N. A. Peppas, „Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles“, *International Journal of Pharmaceutics* **307**, 93-102 (2006).
- [118] G. L. Ellman, „A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans“, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **74**, 443-450 (1958).
- [119] G. L. Ellman, „Tissue sulfhydryl groups“, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **82**, 70-77 (1959).
- [120] H. Collier, „A note on the molar absorptivity of reduced Ellman’s reagent, 3-carboxylato-4-nitrothiophenolate“, *Analytical Biochemistry* **56**, 310-311 (1973).

- [121] S. Leubner, S. Hatami, N. Esendemir, T. Lorenz, J.-O. Joswig, V. Lesnyak, S. Recknagel, N. Gaponik, U. Resch-Genger, A. Eychmüller, „Experimental and theoretical investigations of the ligand structure of water-soluble CdTe nanocrystals“, *Dalton Trans.* **42**, 12733-12740 (2013).
- [122] J. Sedlak, R. H. Lindsay, „Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman’s reagent“, *Analytical Biochemistry* **25**, 192-205 (1968).
- [123] C. K. Riener, G. Kada, H. J. Gruber, „Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman’s reagent and with 4,4’-dithiodipyridine“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **373**, 266-276 (2002).
- [124] P. W. Riddles, R. L. Blakeley, B. Zerner, „Ellman’s reagent: 5,5’-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)-a reexamination“, *Analytical Biochemistry* **94**, 75-81 (1979).
- [125] G. Legler, C. M. Müller-Platz, M. Mentges-Hettkamp, G. Pflieger, E. Jülich, „On the chemical basis of the Lowry protein determination“, *Analytical Biochemistry* **150**, 278-287 (1985).
- [126] G. Rimkus, S. Bremer-Streck, C. Grüttner, W. A. Kaiser, I. Hilger, „Can we accurately quantify nanoparticle associated proteins when constructing high-affinity MRI molecular imaging probes?“, *Contrast Media and Molecular Imaging* **6**, 119-125 (2011).
- [127] P. Smith, R. Krohn, G. Hermanson, A. Mallia, F. Gartner, M. Provenzano, E. Fujimoto, N. Goeke, B. Olson, D. Klenk, „Measurement of protein using bicinchoninic acid“, *Analytical Biochemistry* **150**, 76-85 (1985).
- [128] K. J. Wiechelman, R. D. Braun, J. D. Fitzpatrick, „Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation“, *Analytical Biochemistry* **175**, 231-237 (1988).
- [129] T. Buranda, G. M. Jones, J. P. Nolan, J. Keij, G. P. Lopez, L. A. Sklar, „Ligand Receptor Dynamics at Streptavidin-Coated Particle Surfaces: A Flow Cytometric and Spectrofluorimetric Study“, *The Journal of Physical Chemistry B* **103**, 3399-3410 (1999).
- [130] H. J. Gruber, G. Kada, M. Marek, K. Kaiser, „Accurate titration of avidin and streptavidin with biotin-fluorophore conjugates in complex, colored biofluids“, *Biochimica et Biophysica Acta* **1381**, 203-212 (1998).
- [131] G. Kada, K. Kaiser, H. Falk, H. J. Gruber, „Rapid estimation of avidin and streptavidin by fluorescence quenching or fluorescence polarization“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1427**, 44-48 (1999).
- [132] T. Schiestel, H. Brunner, G. E. M. Tovar, „Controlled surface functionalization of silica nanospheres by covalent conjugation reactions and preparation of high

- density streptavidin nanoparticles“, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **4**, 504-511 (2004).
- [133] M. J. Waner, D. P. Mascotti, „A simple spectrophotometric streptavidin-biotin binding assay utilizing biotin-4-fluorescein“, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **70**, 873-877 (2008).
- [134] R. Mittal, M. P. Bruchez, „Biotin-4-Fluorescein Based Fluorescence Quenching Assay for Determination of Biotin Binding Capacity of Streptavidin Conjugated Quantum Dots“, *Bioconjugate Chemistry* **22**, 362-368 (2011).
- [135] M. S. Barbarakis, T. Smith-Palmer, L. G. Bachas, S.-Y. Chen, B. W. Van Der Meer, „Enhancement of the emission intensity of fluorophore-labeled avidin by biotin and biotin derivatives. Evaluation of different fluorophores for improved sensitivity“, *Talanta* **40**, 1139 - 1145 (1993).
- [136] A. Hennig, H. Borchering, C. Jaeger, S. Hatami, C. Würth, A. Hoffmann, K. Hoffmann, T. Thiele, U. Schedler, U. Resch-Genger, „Scope and Limitations of Surface Functional Group Quantification Methods: Exploratory Study with Poly(acrylic acid)-Grafted Micro- and Nanoparticles“, *Journal of the American Chemical Society* **134**, 8268-8276 (2012).
- [137] A. Hennig, A. Hoffmann, H. Borchering, T. Thiele, U. Schedler, U. Resch-Genger, „Simple Colorimetric Method for Quantification of Surface Carboxy Groups on Polymer Particles“, *Analytical Chemistry* **83**, 4970-4974 (2011).
- [138] M. Moser, T. Behnke, C. Hamers-Allin, K. Klein-Hartwig, J. Falkenhagen, U. Resch-Genger, „Quantification of PEG-Maleimide Ligands and Coupling Efficiencies on Nanoparticles with Ellman’s Reagent“, *Analytical Chemistry* **87**, 9376-9383 (2015).
- [139] I. Steinhauser, B. Spänkuch, K. Strebhardt, K. Langer, „Trastuzumab-modified nanoparticles: Optimisation of preparation and uptake in cancer cells“, *Biomaterials* **27**, 4975 - 4983 (2006).
- [140] T. Behnke, J. E. Mathejczyk, R. Brehm, C. Würth, F. R. Gomes, C. Dullin, J. Napp, F. Alves, U. Resch-Genger, „Target-specific nanoparticles containing a broad band emissive {NIR} dye for the sensitive detection and characterization of tumor development“, *Biomaterials* **34**, 160 - 170 (2013).
- [141] G. Reynolds, K. Drexhage, „New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers“, *Optics Communications* **13**, 222-225 (1975).
- [142] S. Tuccio, K. Drexhage, G. Reynolds, „cw laser emission from coumarin dyes in the blue and green“, *Optics Communications* **7**, 248-252 (1973).
- [143] M. O. Senge, M. Davis, „Porphyrin (porphine) - A neglected parent compound with potential“, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **14**, 557-567 (2010).

- [144] H. Tajalli, A. G. Gilani, M. Zakerhamidi, P. Tajalli, „The photophysical properties of Nile red and Nile blue in ordered anisotropic media“, *Dyes and Pigments* **78**, 15-24 (2008).
- [145] P. Greenspan, E. P. Mayer, S. D. Fowler, „Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets.“, *The Journal of Cell Biology* **100**, 965-973 (1985).
- [146] J. N. Lampe, C. Fernandez, A. Nath, W. M. Atkins, „Nile Red Is a Fluorescent Allosteric Substrate of Cytochrome P450 3A4.“, *Biochemistry* **47**, 509-516 (2008).
- [147] M. Sutter, S. Oliveira, N. N. Sanders, B. Lucas, A. van Hoek, M. A. Hink, A. J. Visser, S. C. De Smedt, W. E. Hennink, W. Jiskoot, „Sensitive Spectroscopic Detection of Large and Denatured Protein Aggregates in Solution by Use of the Fluorescent Dye Nile Red“, *Journal of Fluorescence* **17**, 181-192 (2007).
- [148] S. D. Fowler, W. J. Brown, J. Warfel, P. Greenspan, „Use of Nile red for the rapid in situ quantitation of lipids on thin-layer chromatograms.“, *Journal of Lipid Research* **28**, 1225-32 (1987).
- [149] D. L. Sackett, J. Wolff, „Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces“, *Analytical Biochemistry* **167**, 228-234 (1987).
- [150] S. Hatami, C. Wurth, M. Kaiser, S. Leubner, S. Gabriel, L. Bahrig, V. Lesnyak, J. Pauli, N. Gaponik, A. Eychmüller, U. Resch-Genger, „Absolute photoluminescence quantum yields of IR26 and IR-emissive Cd_{1-x}Hg_xTe and PbS quantum dots - method- and material-inherent challenges“, *Nanoscale* **7**, 133-143 (2015).
- [151] R. Weissleder, „A clearer vision for in vivo imaging“, *Nature Biotechnology* **19**, 316-317 (2001).
- [152] „94700 - 94739 Fluoreszenzfarbstoffe“, http://www.kremer-pigmente.com/media/files_public/94700-94739.pdf.
- [153] K. A. Colby, J. J. Burdett, R. F. Frisbee, L. Zhu, R. J. Dillon, C. J. Bardeen, „Electronic Energy Migration on Different Time Scales: Concentration Dependence of the Time-Resolved Anisotropy and Fluorescence Quenching of Lumogen Red in Poly(methyl methacrylate)“, *The Journal of Physical Chemistry A* **114**, 3471-3482 (2010).
- [154] A. P. Green, A. R. Buckley, „Solid state concentration quenching of organic fluorophores in PMMA“, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 1435-1440 (2015).
- [155] R. Hikmet, M. Peeters, B. Van, R. WEGH, „Light conversion layer comprising an organic phosphor combination“, 2012.
- [156] A. Pfreintner, *Chirale Hochleistungsfluoreszenzfarbstoffe auf Basis der Perylenbisimide*, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2008.

- [157] D. Geißler, S. Stuffer, H.-G. Löhmansröben, N. Hildebrandt, „Six-Color Time-Resolved Förster Resonance Energy Transfer for Ultrasensitive Multiplexed Biosensing“, *Journal of the American Chemical Society* **135**, 1102-1109 (2013).
- [158] Q. Wang, Q. Shi, S. Li, W. Wang, S. Zheng, „Fluorescence enhancement and quenching of Eu(TTFA)₃ by Ag nanoparticles at different excitations“, *Journal of Luminescence* **157**, 349-351 (2015).
- [159] D. Atwood, *The rare earth elements : fundamentals and applications*, John Wiley & Sons, Inc, Chichester, West Sussex, United Kingdom Hoboken, 2012.
- [160] N. T. Kalyani, S. Dhoble, „Organic light emitting diodes: Energy saving lighting technology-A review“, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **16**, 2696-2723 (2012).
- [161] H. Bauer, J. Blanc, D. L. Ross, „Octacoordinate Chelates of Lanthanides. Two Series of Compounds“, *Journal of the American Chemical Society* **86**, 5125-5131 (1964).
- [162] G. Shao, Y. Li, K. Feng, F. Gan, M. Gong, „Diphenylethyne based β-diketonate europium(III) complexes as red phosphors applied in LED“, *Sensors and Actuators B: Chemical* **173**, 692-697 (2012).
- [163] S. S. Shiratori, M. F. Rubner, „pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes“, *Macromolecules* **33**, 4213-4219 (2000).
- [164] M. Elzbieciak, S. Zapotoczny, P. Nowak, R. Krastev, M. Nowakowska, P. Warszynski, „Influence of pH on the Structure of Multilayer Films Composed of Strong and Weak Polyelectrolytes“, *Langmuir* **25**, 3255-3259 (2009).
- [165] C. Buron, C. Filiâtre, F. Membrey, C. Bainier, L. Buisson, D. Charrat, A. Foissy, „Surface morphology and thickness of a multilayer film composed of strong and weak polyelectrolytes: Effect of the number of adsorbed layers, concentration and type of salts“, *Thin Solid Films* **517**, 2611-2617 (2009).
- [166] J. Kötz, S. Kosmella, T. Beitz, „Self-assembled polyelectrolyte systems“, *Progress in Polymer Science* **26**, 1199-1232 (2001).
- [167] M. Saleh, H. Soliman, O. Haenen, M. El-Matbouli, „Antibody-coated gold nanoparticles immunoassay for direct detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissues“, *Journal of Fish Diseases* **34**, 845-852 (2011).
- [168] T. Le, L. Zhu, X. Yang, „A quantum dot-based immunoassay for screening of tylosin and tilmicosin in edible animal tissues“, *Food Additives & Contaminants: Part A* **32**, 719-724 (2015).
- [169] A. D. Kurdekar, L. A. A. Chunduri, S. M. Chelli, M. K. Haleyurgirisetty, E. P. Bulagonda, J. Zheng, I. K. Hewlett, V. Kamiseti, „Fluorescent silver nanoparticle based highly sensitive immunoassay for early detection of HIV infection“, *RSC Adv.* **7**, 19863-19877 (2017).

- [170] J. Zou, Y. Tang, Y. Zhai, H. Zhong, J. Song, „A competitive immunoassay based on gold nanoparticles for the detection of chromium in water samples“, *Anal. Methods* **5**, 2720-2726 (2013).
- [171] B. S. S. Guirgis, C. Sá e Cunha, I. Gomes, M. Cavadas, I. Silva, G. Doria, G. L. Blatch, P. V. Baptista, E. Pereira, H. M. E. Azzazy, M. M. Mota, M. Prudêncio, R. Franco, „Gold nanoparticle-based fluorescence immunoassay for malaria antigen detection“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402**, 1019-1027 (2012).
- [172] J. Pi, Y. Long, N. Huang, Y. Cheng, H. Zheng, „A sandwich immunoassay for detection of A?1-42 based on quantum dots“, *Talanta* **146**, 10-15 (2016).
- [173] J. García-Fernández, L. Trapiella-Alfonso, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, „A Quantum Dot-Based Immunoassay for Screening of Tetracyclines in Bovine Muscle“, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 1733-1740 (2014).
- [174] T. Alefantis, P. Grewal, J. Ashton, A. S. Khan, J. J. Valdes, V. G. D. Vecchio, „A rapid and sensitive magnetic bead-based immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B for high-through put screening“, *Molecular and Cellular Probes* **18**, 379-382 (2004).
- [175] M. Tudorache, A. Tencaliec, C. Bala, „Magnetic beads-based immunoassay as a sensitive alternative for atrazine analysis“, *Talanta* **77**, 839-843 (2008).
- [176] J. Noble, S. Attree, A. Horgan, A. Knight, N. Kumarswami, R. Porter, G. Worsley, „Optical Scattering Artifacts Observed in the Development of Multiplexed Surface Enhanced Raman Spectroscopy Nanotag Immunoassays“, *Analytical Chemistry* **84**, 8246-8252 (2012).
- [177] E.-M. Laux, „Charakterisierung und Applikation von fluoreszenten Polystyrol-Nanopartikeln“, Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, 2011.
- [178] R. Zhong, Y. Liu, P. Zhang, J. Liu, G. Zhao, F. Zhang, „Discrete Nanoparticle-BSA Conjugates Manipulated by Hydrophobic Interaction“, *ACS Applied Materials & Interfaces* **6**, 19465-19470 (2014).
- [179] „Handbuch BCA Protein Assay Kit“, https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf, 2012.
- [180] R. E. Brown, K. L. Jarvis, K. J. Hyland, „Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances“, *Analytical Biochemistry* **180**, 136-139 (1989).
- [181] R. J. Kessler, D. D. Fanestil, „Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid“, *Analytical Biochemistry* **159**, 138-142 (1986).

- [182] N. W. Fadnavis, R. Seshadri, G. Sheelu, K. V. Madhuri, „Relevance of Frank’s solvent classification as typically aqueous and typically non-aqueous to activities of firefly luciferase, alcohol dehydrogenase, and alpha-chymotrypsin in aqueous binaries“, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **433**, 454-465 (2005).
- [183] H. Härmä, *Particle Technologies in Diagnostics.*, Tekes, Helsinki, 2002.
- [184] M. Seydack, „Nanoparticle labels in immunosensing using optical detection methods“, *Biosensors and Bioelectronics* **20**, 2454 - 2469 (2005).
- [185] H. Siitari, I. Hemmilä, E. T. Soini, Lövgren, V. Koistinen, „Detection of hepatitis B surface antigen using time-resolved fluoroimmunoassay“, *Nature* **301**, 258-260 (1983).
- [186] E. Soini, T. Lövgren, R. C. B., „Time-Resolved Fluorescence of Lanthanide Probes and Applications in Biotechnology“, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **18**, 105-154 (1987).
- [187] „Wildtype Core-Streptavidin with Biotin at 1.4Å“, <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1MK5>, 2006.
- [188] D. E. Hyre, I. Le Trong, E. A. Merritt, J. F. Eccleston, N. M. Green, R. E. Stenkamp, P. S. Stayton, „Cooperative hydrogen bond interactions in the streptavidin-biotin system“, *Protein Science* **15**, 459-467 (2006).