

Dipl.-Phys. Andrea Isabel Matschulat

**Entwicklung neuer Sonden
für bioanalytische Anwendungen der
oberflächenverstärkten Raman-Streuung**

Die vorliegende Arbeit entstand an der BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung.

Impressum

**Entwicklung neuer Sonden
für bioanalytische Anwendungen
der oberflächenverstärkten Raman-Streuung**

2011

Herausgeber:

BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
Unter den Eichen 87

12205 Berlin

Telefon: +49 30 8104-0

Telefax: +49 30 8112029

E-Mail: info@bam.de

Internet: www.bam.de

Copyright © 2011 by

BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung

Layout: BAM-Arbeitsgruppe Z.64

ISSN 1613-4249

ISBN 978-3-9814281-8-6

**Entwicklung neuer Sonden für bioanalytische
Anwendungen der oberflächenverstärkten
Raman-Streuung**

Dissertation

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

im Fach Chemie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Dipl.-Phys. Andrea Isabel Matschulat,
geboren am 21.07.1982 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter: 1. Prof. Dr. Janina Kneipp
2. Prof. Dr. Ulrich Panne

eingereicht am: 28.10.2010
Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2011

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit vom Oktober 2007 bis Oktober 2010 in der Abteilung I der BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung sowie in Kooperation mit der Humboldt-Universität zu Berlin unter der Anleitung von Frau Prof. Janina Kneipp erarbeitet.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Panne für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die Möglichkeit, vielseitige apparative Ressourcen in der Abteilung I nutzen zu dürfen, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Janina Kneipp für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses interessanten Themas und den mir gewährten Freiraum zu dessen Bearbeitung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Optische Spektroskopie und Prozessanalytik“ sowie der Fachgruppe I.4 Prozessanalytik unter Leitung von Herrn Dr. Michael Maiwald an der BAM bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank meiner Kollegin Daniela Drescher für die Bereitstellung ihrer Zellen und Hilfestellung bei den Zell-Experimenten.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Kollegin Virginia Joseph für die Zusammenarbeit an der Gold-Bar sowie bei Frau Dr. Franziska Emmerling, Jörg Polte und Simone Rolf bedanken.

Mein Dank gilt ferner Anka Kohl, die meinen Rechner vorm Absturz bewahrt hat und durch ihre Hilfsbereitschaft mir stets unterstützend zur Seite stand.

Ferner möchte ich meiner Kollegin und Sitznachbarin Charlotte Giesen für deren Instruktionen und Hilfestellungen zur Durchführung des ELISA bedanken.

Jonas Schenk danke ich für die humorvolle und lockere Atmosphäre bei uns im Büro sowie interessanten fachlichen Diskussionen.

Mein Dank gilt ferner Sabine Flemig für ihre Hilfestellung zur MALDI-Probenpräparation und ihre Geduld bei den MALDI-Untersuchungen.

Yvonne Baermann-Stapel sei an dieser Stelle ebenfalls hervorgehoben für ihre Unterstützung und grenzenlose Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Michael Weller und Dr. Rudolph Schneider sei an dieser Stelle für ihre wertvollen Ratschläge zum Umgang mit Antikörpern und ELISA gedankt.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen Doktoranden der Arbeitsgruppe „Strukturanalytik und Umweltchemie“ von Prof. Michael Linscheid, insbesondere Ulf Bergmann und Violette Frochaux für die Benutzung ihrer Laborgerätschaften sowie fachlichen Diskussionen.

Herrn Dr. Orts-Gil möchte ich für die Erstellung der TEM-Aufnahmen an meinen Nanopartikeln danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, die mich fortwährend unterstützt hat.

Abstract

Surface-enhanced Raman scattering (SERS) has been established as a versatile tool for probing and labeling in analytical applications, based on the vibrational spectra of samples as well as label molecules in the proximity of noble metal nanostructures. The aim of this work was the construction of novel SERS hybrid probes. The hybrid probes consisted of Au and Ag nanoparticles and reporter molecules, as well as a targeting unit. The concept for the SERS hybrid probe design was followed by experiments comprising characterization techniques such as UV/Vis-spectroscopy (UV/Vis), Transmission electron microscopy (TEM) and Dynamic Light Scattering (DLS), respectively. SERS experiments were performed for studying and optimizing the plasmonic properties of nanoparticles with respect to their enhancement capabilities.

The SERS-probes had to meet following requirements: biocompatibility, stability in physiological media, and enhancement of Raman-signals from Raman reporter molecules enabling the identification of different probes even in a complex biological environment. Au and Ag nanoaggregates were found to be the most appropriate SERS substrates for the hybrid probe design.

The utilization of Raman reporters enabled the identification of different SERS probes in multiplexing experiments. In particular, the multiplexing capability of ten various reporter molecules *para*-aminobenzenethiol, 2-naphthalenethiol, crystal violet, rhodamine (B) isothiocyanate, fluorescein isothiocyanate, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), *para*-mercaptobenzoic acid, acridine orange, safranin O und Nile blue was studied using NIR-SERS excitation. As demonstrated by the results, the reporters could be identified through their specific Raman signature even in the case of high structural similarity. Chemical separation analysis of the reporter signatures was performed in a trivariate approach, enabling the discrimination through an automated calculation of specific band ratios. The trivariate identification could be a promising method for SERS-multiplexing in analytical applications.

Multivariate methods such as Principal Components Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) were as well applied for discrimination and imaging of the reporter signatures. With the help of multivariate imaging methods based on cluster analysis, it could be for the first time demonstrated that such methods provided a fast identification of various SERS hybrid probes inside the biological matrix. This was demonstrated using living 3T3 cells. Further, in a duplex imaging approach, the probes fulfill the requirements for the sensitive detection of both the specific reporter signatures and intrinsic information coming from eukaryotic cells. The results of cluster methods and principal components approaches for discrimination indicate that fast, multivariate evaluation of whole sets of multiple probes is feasible, beyond the visual inspection of individual spectra that has been practiced so far. This suggests multiplexing applications with SERS hybrid nano-probes and SERS tags in very high density sensing and biological imaging applications, where fast read-out is required.

The pH-sensitivity of SERS-Tags that consisted of different reporter molecules attached to aggregated Au and Ag nanoparticles in the range between pH~3-10 was studied. It could be demonstrated that the reporter molecules provided pH-dependent SERS signatures and could therefore be suitable for the sensitive pH-detection, e.g., inside cellular compartments.

The construction of targeted SERS probes was based on the integration of a goat-anti-mouse antibody as targeting element. Antibodies were coupled to Au and Ag nanoprobcs surrounded by a Bovine Serum Albumin (BSA) coating, which served as a carrier for the covalent linkage of a Raman reporter molecule and the targeting units at the same time. In experiments with BSA and a conjugated reporter the spectra of the BSA-coupled reporters provided an indication of the secondary structure of BSA, which is related to the BSA-reporter coupling procedure. In *in vitro*-experiments with BSA-coupled nanoprobcs inside 3T3 cells reporter signatures and intrinsic information from the cellular matrix could be delivered.

BSA enabled the coupling of reporter molecules as well as the targeting of antibodies, and served as stabilizer of the gold nanoaggregates. The functionality of the coupled antibodies after their integration into the SERS probe was retained. This was verified by the results of a direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Conjugates with implemented reporter molecules could be characterized using SERS. The application of the complete probes suggested a use of these novel biocompatible, stable and targeted SERS probes, that can be excited out-of-resonance also for other bioanalytical applications.

On the basis of the constructed SERS hybrid probes, comprising a large number of BSA-coupled reporters could, e.g., be implemented for automated high-throughput immunoassays, where they are arranged on a microstructured device for the simultaneous and multilevel SERS-readout in one step.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Konzept der Arbeit | 1 |
| 1.1 | SERS in der Bioanalytik: Stand der Forschung | 1 |
| 1.2 | Konzept der SERS-Sonden in dieser Arbeit | 2 |
| 2 | Theoretische Grundlagen | 4 |
| 2.1 | Hintergrund der SERS-Substratherstellung und Eigenschaften | 4 |
| 2.2 | Verfahren zur Charakterisierung von Nanopartikeln | 6 |
| 2.2.1 | UV/Vis-Spektroskopie (UV/Vis) | 6 |
| 2.2.2 | Dynamische Lichtstreuung (DLS) | 8 |
| 2.2.3 | Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) | 9 |
| 2.3 | Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS) | 10 |
| 2.3.1 | Elektromagnetischer Verstärkungseffekt (EM-Effekt) | 11 |
| 2.3.2 | Chemischer Verstärkungseffekt (CM-Effekt) | 12 |
| 2.4 | Chemometrische Verfahren | 13 |
| 2.4.1 | Hauptkomponentenanalyse (PCA) | 14 |
| 2.4.2 | Multivariate Kurvenauflösung (MCR) | 14 |
| 2.4.3 | Hierarchische Clusteranalyse (HCA) | 15 |
| 2.4.4 | K-Means Clusteranalyse (K-Means) | 16 |
| 2.5 | Matrix-gestützte Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) | 16 |
| 2.6 | Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) | 17 |
| 3 | Material und Methoden | 19 |
| 3.1 | Experimenteller Aufbau zur Raman-Streulichtmessung | 19 |
| 3.2 | Synthese von Au und Ag Nanopartikeln | 19 |
| 3.3 | Charakterisierung der hergestellten SERS-Substrate | 22 |
| 3.3.1 | UV/Vis-Spektroskopie | 22 |
| 3.3.2 | Dynamische Lichtstreuung | 22 |
| 3.3.3 | Untersuchungen zu den Verstärkungseigenschaften von Au und Ag NP | 22 |
| 3.3.4 | Bildgebung mittels TEM | 23 |
| 3.4 | Untersuchung der Raman-Signaturen von Reportern | 23 |
| 3.5 | Präparation binärer Reporter-Mischungen | 23 |
| 3.6 | Auswerteprozeduren der uni- und multivariaten Datenanalyse | 24 |
| 3.6.1 | Bestimmung chemischer Identifizierungsparameter | 24 |
| 3.6.2 | PCA-, HCA- und K-Means-Analysen | 24 |
| 3.6.3 | MCR-Analyse | 25 |
| 3.7 | Inkubation der SERS-Hybridsonden in 3T3-Zellen | 25 |
| 3.8 | Reporter-Signaturen in unterschiedlichen pH-Milieus | 25 |
| 3.9 | Herstellung von BSA-Reporter-Konjugaten | 26 |
| 3.9.1 | Bestimmung der Kopplungsdichte mittels MALDI-TOF-MS | 28 |
| 3.9.2 | SERS-Untersuchungen von Konjugaten in 3T3-Zellen | 28 |
| 3.10 | Kopplung von Zielfindungselementen und Reportern an BSA | 29 |
| 3.10.1 | Herstellung eines BSA-Antikörper-Konjugats | 29 |
| 3.10.2 | Herstellung eines BSA-Reporter-Antikörper-Konjugats | 30 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.11 | Untersuchung der Konjugate mittels ELISA | 31 |
| 3.11.1 | ELISA am BSA-Antikörper-Konjugat | 31 |
| 3.11.2 | ELISA am BSA-Reporter-Antikörper-Konjugat | 32 |
| 3.11.3 | SERS: ELISA-Produkte und BSA-Reporter-Antikörper-Konjugat | 32 |
| 4 | Metall-Nanopartikel als Substrate für SERS-Sonden | 33 |
| 4.1 | Untersuchung der plasmonischen Eigenschaften der Au und Ag NP | 33 |
| 4.2 | Untersuchung qualitativer spektraler Merkmale am Testanalyten Adenin | 38 |
| 4.3 | Bestimmung der SERS-Aktivität der Nanopartikel | 42 |
| 4.4 | Nähere Charakterisierung der ausgewählten Au und Ag NP | 44 |
| 4.5 | Schlussfolgerungen: Auswahl der SERS-Substrate | 48 |
| 5 | Reporter-Moleküle | 49 |
| 5.1 | Auswahl und Charakterisierung von Reporter-Molekülen | 50 |
| 5.1.1 | NIR-SERS Reportersignaturen | 52 |
| 5.1.2 | Detektionsempfindlichkeit von Reporter-Molekülen | 58 |
| 5.2 | Chemische Separierbarkeit | 61 |
| 5.3 | Schlussfolgerungen: Chemische Unterscheidbarkeit von Reporter-Signaturen | 64 |
| 5.4 | Multivariate Unterscheidbarkeit | 65 |
| 5.4.1 | Hauptkomponentenanalyse | 66 |
| 5.4.2 | Hierarchische Clusteranalyse | 71 |
| 5.4.3 | PCA und MCR: Binäre Reporter-Mischspektren | 73 |
| 5.4.4 | Schlussfolgerungen: Multivariate Unterscheidbarkeit von Reportern | 79 |
| 5.5 | Anwendung der Reporter für intrazelluläre Hybridsonden | 80 |
| 5.5.1 | Chemische und multivariate Bildgebung | 80 |
| 5.5.2 | Untersuchungen zur pH-Sensitivität von SERS-Sonden | 85 |
| 5.5.3 | Schlussfolgerungen: Reporter als Komponenten für SERS-Hybridsonden | 91 |
| 6 | Charakteristika von BSA-Reporter-Konjugaten und ihre Anwendung für intrazelluläre Hybridsonden | 93 |
| 6.1 | Eigenschaften von BSA-Reporter-Konjugaten | 94 |
| 6.1.1 | UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen | 95 |
| 6.1.2 | MALDI-TOF-MS-Untersuchungen | 96 |
| 6.1.3 | Anwendung der Konjugate für Hybridsonden in 3T3-Zellen | 101 |
| 6.1.4 | Schlussfolgerungen: BSA-Reporter-Konjugate als Komponenten für Hybridsonden | 111 |
| 6.2 | Kopplung von Zielfindungselementen an eine SERS-Sonde | 112 |
| 6.2.1 | Kopplung von Reportern und Antikörpern an BSA | 112 |
| 6.2.2 | ELISA: Untersuchung am BSA-(Reporter-)Antikörper-Konjugat | 113 |
| 6.2.3 | SERS-Nachweis des BSA-RBITC-Antikörper-Konjugats | 115 |
| 6.2.4 | Schlussfolgerungen: Eigenschaften zielgerichteter SERS-Sonden | 116 |
| 7 | Zusammenfassung | 119 |
| 8 | Ausblick | 121 |

| | |
|---------------------------------------|------------|
| 9 Anhang | 123 |
| 9.1 Tabellen | 123 |
| 9.2 Abkürzungsverzeichnis | 140 |
| 9.3 Lebenslauf | 142 |
| 9.4 Publikationsverzeichnis | 143 |
| Abbildungsverzeichnis | 145 |
| Tabellenverzeichnis | 151 |
| Literaturverzeichnis | 154 |

1 Konzept der Arbeit

1.1 SERS in der Bioanalytik: Stand der Forschung

Die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS) ist ein plasmonischer Effekt, bei dem das Ramanstreulicht von Molekülen, die in Nähe plasmonischer Strukturen gebracht werden, um mehrere Größenordnungen ($\sim 10^6$) verstärkt wird [1–4].

Einer der Vorteile von SERS ist, dass sie oberflächenselektiv und sensitiv ist. Mit SERS lassen sich nicht nur im Vergleich zur konventionellen Raman-Streuung schnell und empfindlich chemische bzw. biologische Komponenten geringer Konzentration (Monolagen) bis hin zum Einzelmolekülnachweis nachweisen, sondern auch zahlreiche biophysikochemische Prozesse aufklären [4–7].

Speziell in der *in vitro*- und *in vivo*-Biospektroskopie sowie in der Bioanalytik hat sich SERS als Untersuchungsmethode etabliert, da mit dieser Methode Informationen aus biologischen Systemen sowie molekularen Interaktionen gewonnen werden können, und zwar unter Einsatz geringer Probenmengen ($< \text{fL}$) [8–10]. SERS ermöglicht im Gegensatz zur Infrarot-Spektroskopie Untersuchungen in wässrigen Systemen, d. h., in stark IR-absorbierenden bzw. schwach Raman-streuenden Substanzen (Gewebe, Zellen) ohne großen präparativen Aufwand. Hinsichtlich der Untersuchung biologischer Proben ist unter Verwendung eines Mikro-Raman-Aufbaus eine Bildgebung mit hoher Ortsauflösung im Mikrometerbereich, dem sogenannten *Multispectral Imaging*, möglich [11, 12].

SERS kam bisher bei zahlreichen Fragestellungen zum Einsatz: Es existieren SERS-Untersuchungen zur DNA, Membranproteinen, enzymatischen Prozessen und biologischen Matrices, wie z. B. Bakterien, Viren und (Tumor-) Zellen [13–17]. Weiterhin konnte SERS zur Aufklärung pharmakologischer Fragestellungen beitragen [18]. Mittels SERS lassen sich dynamische Prozesse verfolgen, wie beispielsweise die Freisetzung von Neurotransmittern in lebenden Zellen [19, 20] bis hin zur Detektion biochemischer Prozesse wie der intrazellulären Phosphorylierung [21] und Detektion von Nikotinsäureadenin dinucleotidphosphat (NAADP) bei metabolischen Vorgängen in Zellen [22].

Da der SERS-Effekt in Gegenwart plasmonischer Nanostrukturen möglich ist, werden häufig Edelmetallnanopartikel, bestehend aus Au, Ag und Cu, verwendet. Diese Nanopartikel (NP) können je nach Fragestellung derart modifiziert werden, dass sie als sogenannte *SERS-Labels* mit hoher Spezifität, die sie durch Anbindung von Zielfindungselementen (Antikörpern, DNA, Peptide) erlangen, von der Zelle erkannt werden bzw. an ihr Ziel koppeln können [23–27].

Derartige *Labels* können beispielsweise in Hybridisierungsassays angewendet werden, wo sie als DNA-funktionalisierte Nanostrukturen mit Raman-Reportermolekülen versehen werden [28–33]. Funktionalisierte NP wurden auch zum Auslesen von Immunoassays, wie dem Nachweis des Prostata-spezifischen-Antigens im femtomolaren Bereich, angewendet [34–37].

Vor allem in Multiplexing-Experimenten finden *SERS-Labels* (auch *SERS-Tags* genannt) mit ihren molekularen Fingerabdrücken vielseitige Anwendung, da sie eine schnelle Identifizierung und Lokalisierung der jeweiligen Struktur, an die sie gebunden sind, durch ihre spezifische schmalbandige Signatur ermöglichen. Zum automatisierten, simultanen Auslesen einer Vielzahl unterschiedlichster Reporter-Signaturen innerhalb nanostrukturierter und miniaturisierter Assay-Plattformen oder innerhalb zellulärer Kompartimente be-

darf es daher einer Konstruktion biokompatibler SERS-*Labels*, die mit diversen Reporter-Einheiten und Zielfindungselementen ausgestattet sind. Diese SERS-*Labels* zeichnen sich durch ihre physikochemische und optische Robustheit aus [15, 38–44]. Ein Nachteil dieser SERS-*Tags* ist jedoch die dominierende vibronische Struktur der Reporter-Moleküle unter elektronisch resonanter Anregung, die gleichzeitig zu einem spektralen Informationsverlust führt. Eine Detektion weiterer Signaturen aus der unmittelbaren Umgebung der SERS-*Tags*, wie beispielsweise innerhalb zellulärer Systeme, ist damit nicht möglich [45, 46]. Bis auf die Vorteile im Bereich Multiplexing sind die Eigenschaften der SERS-*Tags* daher ähnlich mit denen fluoreszierender Quantenpunkte [47].

Derzeitige Arbeiten beschäftigen sich insbesondere mit dem Design von Edelmetall-Nanostrukturen, mit welchen eine besonders empfindliche SERS-Detektion von Reportern möglich ist [48–50]. Z. B. sei hier die Entwicklung von Kern-Schale NP erwähnt. Diese bestehen entweder aus NP, an denen unterschiedliche Reporter eingekapselt in einer Silizium-, Glas-, oder Polyethylenglycol (PEG)-Schutzhülle vorliegen, oder tragen Monolagen, bestehend aus diversen Raman-Reportern [51–53].

1.2 Konzept der SERS-Sonden in dieser Arbeit

In der Arbeit sollten folgende Ziele verfolgt werden: Es sollten biokompatible SERS-*Labels*, die mit Reportern und Zielfindungselementen ausgestattet sind, hergestellt werden. Die Grundstruktur dieser Hybrid-*Labels* basierte dabei auf aggregierten Au bzw. Ag NP, die mittels konventioneller Nasschemie hergestellt wurden. Es wurden die physikochemischen Eigenschaften, insbesondere die Stabilität der NP in verschiedenen salzhaltigen Medien sowie Puffersystemen untersucht. Diese Umgebungsmedien sollten eine biologische Umgebung, z. B. innerhalb zellulärer Kompartimente, mimen.

Als weitere Komponente zur Herstellung der SERS-Sonden wurden verschiedene Reporter-Moleküle untersucht. Die Untersuchungen zur empfindlichen Detektierbarkeit an fluorogenen sowie nicht-fluorogenen Reporter-Molekülen bildeten einen zentralen Aspekt der Arbeit. Die Reporter-Moleküle müssen sich insbesondere für *in vitro*- und *in vivo*-Experimente zerstörungsfrei detektieren lassen, weshalb eine Nahinfrarot (NIR)-Anregbarkeit angestrebt wurde. Die SERS-Untersuchungen hatten zum Ziel, bei NIR-Anregung und unter Verwendung geringer Reporter-Konzentrationen robuste SERS-Signaturen zu detektieren.

Um eventuelle Veränderungen in der physikochemischen Umgebung der Reporter untersuchen zu können, sollten verschiedene Reporter-Signaturen identifiziert und in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht werden. Es wurde in Arbeiten zur pH-Sensitivität von Reportern gezeigt, dass sich SERS-Signaturen mancher Raman-Reporter in Abhängigkeit von der sie umgebenden spektroskopierten Region verändern können und somit Auskunft über stattfindende physikochemische Prozesse liefern [9, 54–58].

Neben der Detektion von Reporter-Signaturen sollten die neuartigen SERS-*Labels* Sondenfunktion besitzen und die zusätzliche Detektion von Signaturen biomolekularer Komponenten ermöglichen. Insbesondere würde deren Einsatz in zellulären Systemen gestatten, die spektrale Information von der biologischen Umgebung der *Labels* zu detektieren.

Die neuen SERS-Hybridsonden wurden außerhalb und innerhalb zellulärer Systeme unter nicht-resonanten Bedingungen untersucht. Für *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen von Zellen und anderen empfindlichen Proben ist damit eine nahezu zerstörungsfreie und

molekülspezifische Analyse möglich [59]. Ein weiterer Vorteil der NIR-Anregung besteht darin, dass wässrige biologische Komponenten ein Absorptionsminimum aufweisen und keinerlei Zerstörung durch Photolyse unterliegen.

Um eine automatisierte Analyse und Identifikation der SERS-Sonden innerhalb komplexer Biomatrizes durchführen zu können, wurden univariate und multivariate Verfahren erprobt, die eine schnelle Analyse ermöglichen. Insbesondere hatte die Arbeit in diesem Zusammenhang auch zum Ziel, die konstruierten Hybrid-Labels mittels multivariater Bildgebung intrazellulär identifizieren zu können. Spektrales Multiplexing mit SERS-Tags, die mit unterschiedlichen Reportern versehen sind, wurde bisher noch nicht außerhalb von Biosystemen und unter Verwendung univariater Analysen durchgeführt [60, 61].

Das in der Arbeit hergestellte Hybrid-Label sollte aufgrund seiner Funktionalitäten insbesondere als Auslesewerkzeug für zukünftige Multiplexing-Immunoassays Anwendung finden, in denen es an multiple Antigenbindungsstellen koppeln und die Signatur des Reporters in Epitop-Nähe übermitteln kann.

Um die SERS-Sonden in biologischen Systemen oder in Immunoassays einsetzen zu können, müssen sie zielgerichtet an einen bestimmten Ort gelangen bzw. an ihr Ziel koppeln können. Aus dieser Anforderung heraus wurden Reporter an das Protein Bovines Serum Albumin (BSA) gekoppelt. BSA dient zur multifunktionalen Kopplung von Zielbindungselementen, wie beispielsweise eines Antikörpers und stabilisiert somit gleichzeitig die nanopartikulären SERS-Substrate. Abb. 1.1 zeigt eine schematische Darstellung des Konzepts für die in der Arbeit konstruierten SERS-Labels und Sonden. Die in dieser Arbeit konstruierten neuartigen SERS-Labels sollten in einem Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) erstmalig angewendet werden.

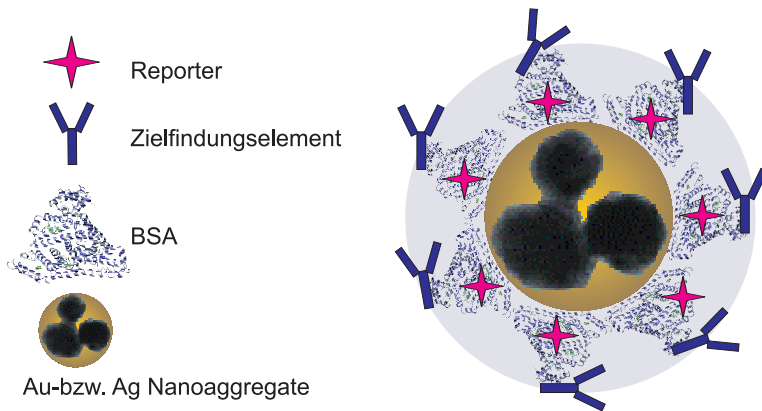


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung zum Konzept des in der Arbeit konstruierten SERS-Hybrid-Labels mit integrierten Zielfindungselementen (Antikörper) und Reportern.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Hintergrund der SERS-Substratherstellung und Eigenschaften

Seit der Entdeckung von kolloidalem Au und Ag im 19. Jahrhundert [62] sind Edelmetallpartikel gegenwärtig die meist verwendeten Nanostrukturen für SERS-Experimente, da sie eine hervorragende Grundlage zur theoretischen Beschreibung liefern und als reproduzierbare, biokompatible Plattformen mit Dimensionen, die mit denen biomolekularer Komponenten vergleichbar sind, Einsatz finden.

Die in der Arbeit verwendeten SERS-Substrate sind citratstabilisierte Au und Ag NP, die speziell zur Gruppe der Dispersionskolloide zählen [63]. Die Dispersionskolloide werden durch Reduktion eines Au-bzw. Ag-Salzes mittels Natriumcitrat nasschemisch (*Bottom-Up*-Methode) hergestellt [64]. Die infolge des Herstellungsprozesses entstehenden NP verfügen somit über eine Schutzhülle bestehend aus Citratliganden, die den anorganischen Kern vor Degradierung innerhalb einer physiologisch aggressiven Umgebung (z. B. hohe Elektrolytkonzentration) schützen sowie die NP in der Lösung elektrostatisch stabilisieren. Weiterhin bietet die Ligandenhülle die Möglichkeit zur Ausbildung elektrostatischer oder kovalenter Bindungen an Biomoleküle (Antikörper, Peptide, Proteine, Oligonukleotide) [37, 65, 66], die über basische funktionelle Gruppen wie Aminogruppen oder Thiolgruppen verfügen. Labile Passivierungsgruppen wie das Citrat können jedoch auch Austauschreaktionen mit stärker bindenden Liganden eingehen, was zur direkten Anbindung von Biomolekülen mit der Nanopartikeloberfläche führt [67].

Neben der nasschemischen Reduktion mit Natriumcitrat existieren alternative Herstellungsmethoden von NP wie die nasschemische Reduktion mittels Borhydrid [68, 69], die Verwendung von Hydroxylamin [70, 71], Ascorbinsäure [72], Polyethylenimin [73] oder Polyvinylpyrrolidon [74] als Reduktions-bzw. Stabilisationsmittel.

Der Entstehungsmechanismus der in der Arbeit hergestellten NP mittels nasschemischer Reduktion (siehe auch Abschn. 3.2) sei hier am Beispiel von Ag NP erläutert: Die ursprünglich nach Lee/Meisel [64] und später von Munro [75] abgewandelte, optimierte Methode geht von Silbernitrat aus, das durch Trinatriumcitrat zu kolloidal gelöstem, elementarem Ag reduziert wird (siehe Abb. 2.2).

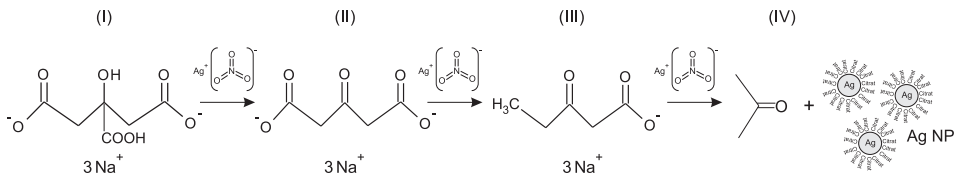


Abbildung 2.2: Reaktionsschema zur Herstellung citratstabilisierter Ag Nanopartikel. Das Silbernitrat wird durch Trinatriumcitrat zu elementarem, kolloidalem Ag reduziert.

Unter diesen Bedingungen bilden sich Ag NP bestehend aus sphärischen Teilchen aus. Das Trinatriumcitrat (I) wird dabei zu Acetodipicarsäure (β -Ketoglutarinsäure) (II) oder zu

den entsprechenden Salzen oxidiert; als weiteres Reaktionsprodukt entsteht Kohlendioxid. Acetodicarbonsäure (II) ist wie alle β -Ketosäuren eine relativ instabile Verbindung, die unter Decarboxylierung in Acetessigsäure (III) übergehen kann, diese wiederum zerfällt leicht in Aceton (IV) und Kohlendioxid.

Die *Bottom Up*-Methode stellt, verglichen mit der Vielzahl an unterschiedlichen SERS-Substratdesigns wie elektrochemisch aufgerauhten Elektroden und metallischen Inselfilmen, nach wie vor eine preisgünstigere Alternative zur Herstellung von NP im Größenbereich von 5-100 nm dar. Dieser Methode stehen Herstellungsprozeduren wie die Abtragung von NP aus makroskopischen Festkörpern, die sog. Laserablation [76] (*Top-Down*-Methode) und die Herstellung von NP durch Photoreduktionsprozesse [77] sowie innerhalb mikrofluidischer Systeme, entgegen [78]. Ein Nachteil der *Top-down*-Herstellung ist die Erzeugung von Strukturgrößen im Bereich von 100-200 nm, die im Vergleich zur konventionellen *Bottom-up*-Methode unter großem Aufwand herstellbar sind.

Die in der Arbeit verwendeten Dispersionskolloide haben viele positive Eigenschaften: So können die Nanopartikel als multifunktionale Plattformen zur SERS-Detektion in suspendierter Form eingesetzt und mit dem hinzugegebenen Analyten unmittelbar untersucht werden. Alternativ lassen sich die suspendierten NP zusammen mit einem Analyten auf Substraten, die meist aus Glas bestehen, immobilisieren [79]. Die Verwendung kolloidaler Suspensionen bietet im Gegensatz zu immobilisierten Nanostrukturen den Vorteil der Detektion einer durchschnittlichen SERS-Verstärkung, da die in der Nanopartikellösung vorherrschende Brownsche Molekularbewegung ein Ereignis-gemitteltes Spektrum liefert [80]. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Nanopartikellösung selbst sowie der darin befindliche Analyt einer geringeren Gefahr der Verdunstung und Zerstörung durch das Anregungslaserlicht aufgrund der vorherrschenden Brownschen Molekularbewegung unterliegen [81]. Eine weitere positive Eigenschaft von Dispersionskolloiden ist deren Modifizierung bzw. Funktionalisierung mit Zielfindungselementen wie DNA, Peptiden oder Antikörpern. Nanopartikel haben wegen ihrer Größe den Vorteil, dass sie sich in komplexe biologische Systeme gezielt integrieren lassen, wodurch eine molekulare Bildgebung durch Kontrastierung sowie SERS-Detektion zellulärer Kompartimente (z. B. Zellkern) möglich wird [43].

Im Gegensatz zu SERS-aktiven, flächigen Substraten ist eine Optimierung der SERS-Aktivität nur zum Zeitpunkt ihrer Herstellung möglich, da die Nanostrukturen immobilisiert auf der Substratoberfläche vorliegen. Bei kolloidalen Nanopartikelsuspensionen hingegen lassen sich gezielt durch Salzzugabe deren verstärkenden Eigenschaften beeinflussen bzw. die plasmonischen Eigenschaften der NP hinsichtlich der verwendeten Anregungswellenlänge optimieren. Eine wiederholte Anwendbarkeit bei flächigen Substraten ist dagegen kaum gewährleistet, da die untersuchten Analyten irreversibel an das Substrat anbinden. Bei flächigen SERS-Substraten ist des Weiteren selten eine Biokompatibilität gegeben, da es zur Denaturierung von Proteinen an der Luft-Substratgrenzfläche kommen kann [82]. Im Vergleich zu NP lassen sich auf flächigen Substraten immobilisierte NP nicht für *in vivo*- und *in vitro*-Experimente in biologische Proben integrieren.

2.2 Verfahren zur Charakterisierung von Nanopartikeln

2.2.1 UV/Vis-Spektroskopie (UV/Vis)

Die hergestellten Nanopartikelsuspensionen sollten in der Arbeit hinsichtlich ihrer optischen Eigenschaften untersucht werden. Verwendet wurde zur Charakterisierung der SERS-Substrate die UV/Vis-Spektroskopie (UV/Vis), die elektromagnetische Wellen des ultravioletten (UV) und des sichtbaren Spektralbereichs (VIS) nutzt, um Valenzelektronen in ungesättigten chemischen Substanzen anzuregen.

Kolloide streuen einfallendes Licht stark und haben die Besonderheit, dass ihre Ausdehnung unterhalb der Wellenlänge des sichtbaren Spektralbereichs liegt, wodurch sich ihre optischen Eigenschaften von Festkörpern wesentlich unterscheiden. Während makrokristallines Au keine Plasmonenbande aufweist und metallisch glänzend ist, weisen Au NP dagegen eine charakteristische Farbe auf, deren Ursache auf der Plasmonenresonanz beruht [83]. Untersucht man die Extinktion plasmonischer Nanostrukturen, so lassen sich dabei zwei Effekte finden: Ein Teil des eingestrahnten Lichts wird von den NP absorbiert und regt das Elektronengas, d. h., die Plasmonen in NP-Oberflächennähe an. Tritt keine Energieübertragung zwischen Lichtwelle und kolloidaler Suspension ein, so wird die Lichtwelle elastisch gestreut. Da die Anregung der Plasmonen nahezu vollständig für die Absorption verantwortlich ist, ist die Absorption als Plasmonenbande sichtbar. Die Extinktionsspektren von Au und Ag NP sind somit durch eine intensive Plasmonenbande charakterisiert, die aus einer kollektiven Oszillation der Valenzelektronen als Reaktion auf ein schwingendes äußeres elektromagnetisches Feld resultiert. Wenn die Größe sphärischer Partikel (>10 nm) wesentlich kleiner ist als die Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes, lässt sich die Lage und Breite der Plasmonenbande über die klassische Mie-Theorie bestimmen [84]. Hierbei hängt die Gesamtabsorption in einem mit isolierten Partikeln gefüllten Raum von der wellenlängenabhängigen relativen Dielektrizitätskonstanten des absorbierenden Mediums und der relativen Dielektrizitätskonstante des umgebenden Mediums ab. Neben dem Brechungsindex des Umgebungsmediums einer kolloidalen Flüssigkeit und der Elektronendichte innerhalb der NP hat auch deren Größe und geometrische Form Einfluss auf die Lage und Linienverbreiterung der Plasmonenbande [85]. Die Plasmonenabsorption in NP zeigt eine Temperaturabhängigkeit, die durch inkohärente Elektronenoszillationen mit einhergehenden Elektron-Elektron-Interaktionen hervorgerufen wird. Die Halbwertsbreite (FWHM), die eine $1/R$ -Abhängigkeit aufweist, wird durch die mittlere freie Weglänge der Elektronen beeinflusst. Da die optischen Eigenschaften von NP größenabhängig sind, verschiebt sich die Plasmonenresonanz für größere NP zu größeren Wellenlängen [86]. Darüber hinaus zeigen beispielsweise NP mit einem Durchmesser <4 nm eine Blauverschiebung der Plasmonenbande [87]. Diese Blauverschiebung kommt dadurch zustande, dass mit abnehmender Partikelgröße der Bohrsche Exzitonenradius kleiner wird und sich dadurch die Energie des Exzitons erhöht. Dieser Effekt ist der *Quantum Size Effekt*. Letzterer lässt sich auch im mittelinfraroten Spektralbereich (MIR) bei NP mit Durchmessern <20 nm beobachten [88].

Mie führte detaillierte Berechnungen zum Extinktionsverhalten isolierter Edelmetallnanopartikel durch. Dabei löste er die Maxwell-Gleichungen, die durch Transformation in Kugelkoordinaten speziell für sphärische NP eine analytische Lösung für Streu- und Ab-

sorptionsquerschnitt im Rahmen der klassischen Elektrodynamik liefern:

$$\sigma = \sigma_{Streu} + \sigma_{Absorp} \quad (1)$$

$$\sigma_{Absorp} = \frac{8\pi^2 r^3}{\lambda} \cdot \left| \text{Im} \left(\frac{\epsilon - \epsilon_0}{\epsilon + 2\epsilon_0} \right) \right| \quad (2)$$

$$\sigma_{Streu} = \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \cdot \left| \frac{\epsilon - \epsilon_0}{\epsilon + 2\epsilon_0} \right|^2 \quad (3)$$

mit

- σ_{Ext} = Extinktionsquerschnitt
- σ_{Absorp} = Absorptionsquerschnitt
- σ_{Streu} = Streuquerschnitt

einer Metallsphäre sowie

- λ = Wellenlänge des Lichts
- r = Radius der Metallsphäre
- ϵ = Dielektrizitätskonstante des Metalls, wobei $\epsilon = \epsilon' + i\epsilon''$
- ϵ_0 = Dielektrizitätskonstante des Umgebungsmediums

Nach Mie trägt für NP, deren Durchmesser klein ist im Vergleich zur Wellenlänge des Anregungslichts ($2R < \lambda_{Licht}$), lediglich die Dipol-Absorption zum Extinktionsquerschnitt bei (quasistatische Dipol-Approximation). Dagegen müssen für NP mit $2R > 25$ nm höhere Multipol-Ordnungen berücksichtigt werden [89].

Um die plasmonischen Eigenschaften von NP für SERS-Untersuchungen zu optimieren, wurde die in der Literatur häufig erwähnte induzierte Aggregation von NP durch Zugabe von NaCl bzw. KCl durchgeführt. Infolge der Salzzugabe kommt es zu einer Kompression der Helmholtz-Doppelschicht und zur Verdrängung der Anionen innerhalb dieser. Die entgegengesetzt geladenen Na^+ -Ionen vermindern die negative Ladung und somit die abstoßende Wechselwirkung unter den Partikeln. Sind ein oder mehrere Moleküle zwischen einzelnen NP, den sog. *Hot Spots* eines Aggregats lokalisiert, so führt das dazu, dass die Moleküle einem entsprechend höheren elektromagnetischen Feld ausgesetzt sind, was zu einer zusätzlichen Verstärkung führt [90]. Die UV/Vis-Spektroskopie wird deshalb zur Untersuchung von (Langzeit-)Stabilitäten, Alterungsprozessen sowie Koagulationsprozessen von kolloidalen Suspensionen eingesetzt. Optisch verfolgen lässt sich der Aggregationsprozess von NP durch das Aufspalten der Plasmonenbande in zwei Peaks, d. h., durch das Auftreten einer erweiterten Plasmonenbande (EPB). Die SERS-Resonanzen verschieben sich dadurch in Richtung höherer Anregungswellenlängen [91–94]. Die EPB entsteht dadurch, dass die Plasmonen durch das Längs- bzw. Halbachsenverhältnis, das sich infolge der Aggregation der NP vergrößert, derart untereinander koppeln, so dass es zu

einer Rotverschiebung der longitudinalen Plasmonenresonanz-Komponente kommt; der transversale Anteil hingegen bleibt unverändert [95]. Dabei kommt es bei kurzen Interpartikelabständen zur Kopplung der resonanzfähigen Dipole parallel und senkrecht zur Interpartikelachse. Die Resonanz senkrecht zur Interpartikelachse entspricht etwa der eines isolierten Partikels und verschiebt sich nur um wenige nm, während die Resonanz parallel zur Interpartikelachse zu etwa 710 nm verschoben ist [95, 96].

2.2.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Als weitere Charakterisierungsmethode für Nanopartikel wurde die Dynamische Lichtstreuung (DLS) angewendet, mit Hilfe derer eine Partikelgrößenbestimmung durch Messung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers möglich ist. Bei der DLS wird die Brownsche Molekularbewegung detektiert, um daraus die Größe der NP zu berechnen. Die Edelmetallnanopartikel werden mit Laserlicht (HeNe: 633 nm) bestrahlt und die Intensitätsfluktuationen des Streulichts analysiert. Kleine NP bewegen sich schneller als große NP, weshalb sich aus diesem Zusammenhang die Partikelgröße sowie seine Geschwindigkeit aufgrund der Brownschen Molekularbewegung über die Stokes-Einstein-Gleichung herleiten lassen [97]. Der hydrodynamische Radius (Stokesradius) ist der Radius einer hypothetisch festen Kugel, die in einem Lösungsmittel dieselben Diffusionseigenschaften besitzt wie das durch den hydrodynamischen Radius beschriebene Teilchen (z. B. Protein oder NP). Das Volumen eines Teilchens in Lösung setzt sich aus dem Volumen seiner Atomkerne, Elektronenwolken, sowie aus dem Volumen der das gelöste Teilchen umgebenden Lösungsmittelmoleküle zusammen. Bewegt sich der Partikel durch die Lösung, so ist es gezwungen, seine Solvathülle mitzuführen; d. h., je größer das Volumen des Teilchens ist, desto erschwerter ist die Diffusion. Da die realen Ausmaße des Partikels in Lösung nicht direkt messbar sind, wird der hydrodynamische Radius über die Stokes-Einstein-Beziehung [98] definiert:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \tag{4}$$

Hierbei ist D die Diffusionskonstante, r der hydrodynamische Radius, η die Viskosität des Lösungsmittels, T die Temperatur und k_B die Boltzmannkonstante. Eine zusätzliche Aussage aus den Daten der DLS-Messung lässt sich bezüglich der Größenverteilung der Partikel im System treffen, wobei eine qualitative Beurteilung nach dem Polydispersionsindex (PDI) erfolgt. Der PDI lässt sich aus folgender Gleichung extrahieren:

$$\ln(G_1) = a + bt + ct^2 + dt^3 + e^4 + \dots \tag{5}$$

Mit $G(1)$ der Korrelationsfunktion und b die Kumulante zweiter Ordnung (Durchschnittsdiffusionskoeffizient). Der Koeffizient c skaliert als $2c/b^2$ und entspricht dem PDI. Der aus der Signalintensität kalkulierte PDI ermöglicht somit eine Aussage über die Größenverteilung der NP. Monodisperse Systeme haben einen $PDI < 0.1$, für eine polydisperse Lösung liegt hingegen ein $PDI > 0.3$ vor.

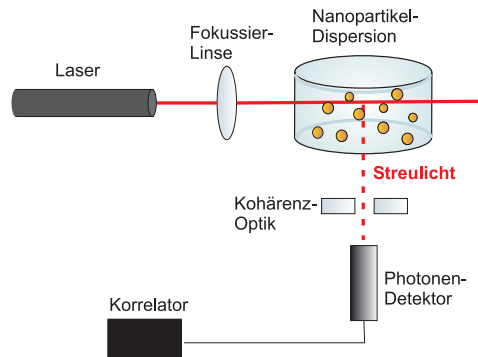


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung zu den Grundprinzipien der dynamischen Lichtstreuung (Erläuterungen im Text).

2.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Als bildgebendes Verfahren wurde in dieser Arbeit die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) verwendet. Diese stellt eine spezielle Betriebsart der Rasterelektronenmikroskopie (SEM) dar, bei der eine direkte Abb. von Objekten durch Elektronenstrahlen erzeugt wird. Die derzeitige Auflösungsgrenze liegt bei ~ 0.05 nm für ein *Transmission Electron Aberration-corrected Microscope (TEAM)* [99, 100]. Die Elektronen durchstrahlen das Objekt, das zu diesem Zweck entsprechend dünn sein muss. Je nach Ordnungszahl der Atome, aus denen das Objekt besteht, der Höhe der Beschleunigungsspannung und der gewünschten Auflösung kann die Objektstärke von wenigen Nanometern bis zu einigen Mikrometern reichen. Um eine Ablenkung der Elektronen mit Molekülen aus der Umgebung zu verhindern, befindet sich der Strahlengang im Ultrahochvakuum. Typische Beschleunigungsspannungen, die bei TEM eingesetzt werden, liegen bei 80 kV bis 400 kV, wobei der Bereich < 200 kV vorwiegend zur Untersuchung der Morphologie biologischer Materialien genutzt wird. Je höher die Ordnungszahl und je niedriger die Beschleunigungsspannung sind, desto dünner muss das Untersuchungsobjekt sein. Die von der Elektronenquelle gelieferten Elektronen werden vom Kondensor-Linsensystem derart abgelenkt, dass sie den zu beobachtenden Objektabschnitt gleichmäßig ausleuchten und zueinander parallel auf das Untersuchungsobjekt auftreffen. Die Elektronen wechselwirken mit den Proben-Atomen. Der innerhalb der Probe stattfindende Prozess ist die Elektronen-Streuung; verlieren die Elektronen dabei ihre Bewegungsenergie, so kommt es zu inelastischen Streuvorgängen. Je nach Höhe der verwendeten Beschleunigungsspannung der Primärelektronen sowie Materialeigenschaften der Probe können dabei folgende Arten von messbaren Phänomenen entstehen: Auger-Elektronen, Sekundärelektronen (SE), Rückstreuerelektronen (BSE), charakteristische Röntgenstrahlung, Bremsstrahlung und Fluoreszenz- bzw. Kathodolumineszenzanregung [101]. Elektronen, die das Objekt unter dem selben Winkel verlassen, werden in der hinteren Brennebene einer Objektivlinse in einem Punkt fokussiert (siehe Abb. 2.4). In dieser Brennebene können unter Verwendung einer Objektiv- bzw. Kontrastblende nur Elektronen diese passieren, sofern die Elektronen nicht gestreut wurden. Da Atome mit höherer Ordnungszahl sowie dickere Objektbereiche stärker streuen, wird der

entstehende Kontrast Massendickenkontrast genannt. Die Bildintensität hängt empfindlich von geringen lokalen Änderungen innerhalb einer kristallinen Probe, z. B. verursacht durch Neigung dieser Probe, sowie den darin vorliegenden Atomabständen ab. Mittels TEM lassen sich somit Kristalle mit struktureller Fehlordnung, Gitterdefekte oder Verzerrungen innerhalb der Probe untersuchen.

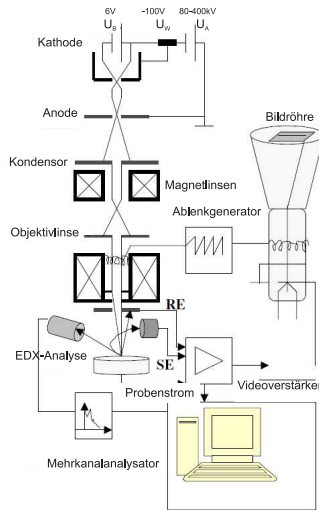


Abbildung 2.4: Strahlengang bei einem TEM. Erläuterungen: siehe Text.

2.3 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS)

Da als Hauptuntersuchungsmethode die Raman-Spektroskopie verwendet wurde, werden im Folgenden zunächst die theoretischen Grundlagen des Raman-Effekts erläutert sowie anschließend die oberflächenverstärkte Raman-Streuung. Der nach Chandrasekhara Raman 1928 benannte Raman-Effekt [102] beschreibt den Prozess der inelastischen Streuung von Photonen an Atomen oder Molekülen bzw. kristallinen Festkörpern, die zur Anregung von Molekülschwingungen (im Falle von Festkörpern: Phononen) führt. Allgemein kann die Wechselwirkung von Licht mit Molekülen und Molekülgittern als Stoßvorgang angesehen werden. In Abb. 2.5 sind die dem Raman-Effekt zugrunde liegenden Effekte skizziert.

Beim elastischen Stoß eines Photons (Korpuskels) bestimmter Energie $h \cdot \nu_0$ mit einem Molekül ändert sich sowohl der Energiezustand des Moleküls als auch die Frequenz des eingestrahlichten Lichts nicht, und man sieht infolge der Rayleigh-Streuung im Spektrum eine unveränderte Spektrallinie (b) (vgl. Abb. 2.5 d). Die Energie, die dabei abgegeben oder aufgenommen wird, entspricht der Differenz zwischen den Energieniveaus N_0 und N_1 einer Molekülschwingung. Überträgt infolge der Photon-Molekül-Wechselwirkung das Photon einen Teil seiner Energie auf ein Molekül, das sich im Schwingungs-Grundzustand ν_0 befindet, so wird dies in ein angeregtes Schwingungsniveau $h \cdot \nu_S$ gehoben. Die Emission

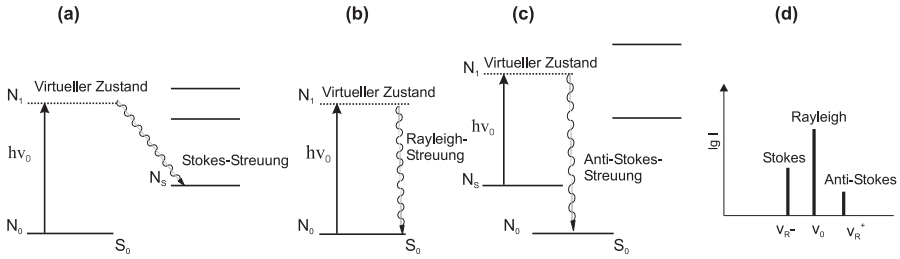


Abbildung 2.5: Raman-Streuung als inelastische Photonenstreuung mit Ausnahme von (b). (a) Termschema für die nicht-resonante Stokes-Strahlung. (b) Termschema zur Rayleigh-Strahlung als elastischer Streuprozess. (c) Anti-Stokes-Streuung. (d) Spektrallinien der drei Effekte beim Raman-Streuprozess.

der energieärmeren Photonen mit dem Energiezustand $h \cdot \nu_{R-}$ äußert sich in Form von Stokes-Linien (a). Beim Zusammenstoß von Photonen mit im ersten Anregungszustand ν_1 befindlichen Molekülen können Photonen mit höherer Energie $h \cdot \nu_{R+}$ generiert werden. Das Molekül verliert in diesem Fall die Schwingungsenergie $h \cdot \nu_s$. Die daraus resultierenden Linien sind die Anti-Stokes-Linien (c). Findet ein Übergang, ähnlich wie in (a) beschrieben, diesmal in ein real angeregtes Schwingungsniveau statt, so handelt es sich um resonante Raman-Streuung. Ein Problem der unverstärkten Raman-Streuung sind die Streuquerschnitte, die bei ca. 10^{-31} - 10^{-29} $\text{cm}^2/\text{Molekül}$ liegen und deutlich kleiner sind als die Streuquerschnitte der Fluoreszenz (10^{-17} - 10^{-16} $\text{cm}^2/\text{Molekül}$) [4]. Dies führt dazu, dass Raman-Signale häufig durch Fluoreszenz-Effekte überlagert werden.

Die Empfindlichkeit kann im Falle der oberflächenverstärkten Raman-Streuung jedoch um sechs bis acht Größenordnungen gesteigert werden [4, 92]. Bei SERS erfolgt die Wechselwirkung monochromatischen Lichts mit einem auf Edelmetallnanopartikeln adsorbierten Analyten. Dieser Effekt wurde im Jahre 1974 von Fleischmann *et al.* bei Untersuchungen von Pyridin-adsorbierten, plasmonischen Substratoberflächen erstmalig beschrieben. Jeanmaire und Van Duyne konnten 1977 den SERS-Effekt in eigenen Experimenten deuten [3, 103]. In 1977 deuteten neben Jeanmaire und Van Duyne Albrecht und Creighton jeweils unabhängig voneinander den Verstärkungsmechanismus des SERS-Effekts unterschiedlich. Während Jeanmaire und Van Duyne den Elektromagnetischen Verstärkungseffekt (EM-Effekt) als Ursache des SERS-Effekts erklärten, führten Albrecht und Creighton [2, 104] hingegen den SERS-Effekt auf den zwischen dem Adsorbat und plasmonischer Nanostruktur stattfindenden Ladungstransfer zurück.

2.3.1 Elektromagnetischer Verstärkungseffekt (EM-Effekt)

Der SERS-Effekt lässt sich in zwei Verstärkungsbeiträge einteilen: die elektromagnetische und chemische Verstärkung. Erstgenannter Verstärkungsmechanismus basiert auf einer Änderung des lokalen Feldes der Metalloberfläche durch einfallende Photonen. Der Hauptanteil an der Verstärkung von Raman-Streufeldern liegt dabei in der elektromagnetischen Verstärkung, die die elektromagnetische Interaktion zwischen dem Molekül und dem SERS-Substrat beschreibt.

Beim elektromagnetischen Verstärkungseffekt stelle man sich ein Raman-aktives Molekül vor, das in Nähe einer Nanostruktur mit $d < \lambda$, eingebettet in einem homogenen Medium, gebracht wird (siehe Abb. 2.6). Die frei beweglichen Valenzelektronen innerhalb dieses NP können durch Koinzidenz mit einer elektromagnetischen Welle E_0 zu kollektiven Schwingungen, den sog. Oberflächenplasmonen, angeregt werden. Ist die Oberflächenplasmonenresonanz erreicht, so wird innerhalb des NP ein Dipolmoment induziert. Aufgrund der entstehenden hohen Polarisierung des Metalls wird ein lokalisiertes, optisches Nahfeld generiert, das das im Abstand d befindliche Molekül ebenfalls zu Schwingungen anregt. Die vom Molekül emittierte Strahlung ist infolge des inelastischen Streuprozess gegenüber E_0 frequenzverschoben und entspricht der Raman-Streustrahlung. Dabei ist das Feld nicht nur auf die direkt adsorbierten Moleküle wirksam, sondern folgt einer Abnahme gemäß $(1/d)^{12}$ [4].

Die Überlagerung des durch Plasmonen induzierten Hertzschen Dipolfeldes mit dem einfallenden Wellenfeld resultiert dabei in einer zusätzlichen Verstärkung. Die elektromagnetische Feldverstärkung kann somit zu einer Vergrößerung des Raman-Streuquerschnitts um Faktor 10^6 führen; bei resonanter Anregung wurden sogar Verstärkungsfaktoren bis hin zu 10^{13} erreicht [92]. Ebenfalls können hohe Verstärkungsfaktoren durch atomare bzw. nanoskalige Rauigkeiten erzielt werden. Werden die Sphären jedoch größer, so führt die Wechselwirkung der einfallenden Strahlung zur Entstehung von Multipolen [105, 106]. Der SERS-Effekt konnte bisher an einer Vielzahl nanostrukturierter Substrate beobachtet werden:

- elektrochemisch aufgeraute Elektroden [103, 107, 108]
- Edelmetallnanopartikel [64]
- metallische Inselfilme [1, 48]

In der Regel liefern Silbrenanostrukturen bzw. flächige Silbersubstrate die intensivsten SERS-Spektren. Ebenfalls konnte der SERS-Effekt neben Au, Ag und Cu-Oberflächen auch an anderen Metalloberflächen bestehend aus Pt, Ni, Li, Na oder K beobachtet werden, da die Oberflächenplasmonenfrequenzen dieser Metalle im sichtbaren Spektralbereich liegen [109]. Bei der Verwendung eines geeigneten SERS-Substrattyps müssen folgende experimentelle Parameter berücksichtigt werden, wie die optimale Strukturgröße, Auswahl des Metalls sowie die verwendete Anregungswellenlänge. Deshalb muss für ein SERS-Experiment deren Eignung hinsichtlich ihrer verstärkenden Eigenschaften überprüft werden.

2.3.2 Chemischer Verstärkungseffekt (CM-Effekt)

Neben dem elektromagnetischen Verstärkungseffekt wird der chemische Verstärkungseffekt (CM-Effekt) beschrieben. Dieser beruht auf der Ausbildung eines Charge-Transfer-Komplexes, der mit einer Veränderung der Polarisierung des adsorbierten Moleküls einhergeht. Dieser Effekt ist allerdings nur über sehr kurze Distanzen wirksam (*First-Layer-Effect* bzw. *Short-Range-Modell*), da es entweder zu einer direkten, kovalenten Bindung oder zu einer Komplexbildung kommen muss. Der chemische Beitrag liefert eine Verstärkung um Faktor $10 - 10^2$ [110]. Eine weitere Hypothese und experimentelle Beschreibung

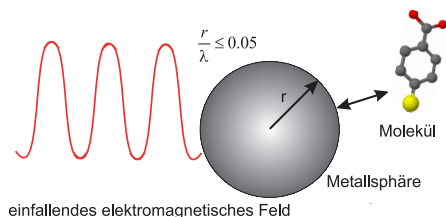


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung zu den Grundprinzipien des SERS-Effekts (Erläuterungen im Text).

des CM-Effekts findet man ausführlich in Arbeiten von Otto *et al.* [106, 111, 112]. Dem CM-Effekt liegen nach Otto *et al.* folgende Prozesse zugrunde: Zwischen dem adsorbierten Molekül und der metallischen Oberfläche kommt es zu einem Überlapp von Elektronenwellen-Funktionen innerhalb des Metalls und der aus dem Moleküladsorbat stammenden Elektronenwelle, der in ein jedoch nicht zwingend notwendiges Tunneln von Elektronen zwischen dem Substrat und dem Molekül resultieren kann. Man unterscheidet dabei den Ladungstransfer eines vom Substrat stammenden Leitungsband-Elektrons zum Valenzband des adsorbierten Moleküls, der zur Ausbildung eines negativ geladenen Ions (Elektron-Molekül-Komplex) führt. Dieser Effekt ist jedoch auch in umgekehrter Richtung möglich [110, 113, 114]. Da der CM-Effekt analytabhängig ist, ist die chemische Verstärkung für die erste Monolage einer adsorbierten Substanz am höchsten und lässt mit zunehmenden Adsorptionsschichten nach. Weiterhin kann eine chemische Verstärkung auch an sogenannten *Active Sites* wie beispielsweise Oberflächenrauigkeiten stattfinden. Phänomenologisch äußert sich der CM-Effekt durch auftretende Bandenverschiebungen gegenüber herkömmlichen Raman-Spektren sowie unterschiedlichen Verstärkungen verschiedener Substanzen mit ähnlichen Raman-Streuquerschnitten [92]. Der EM- und CM-Effekt lassen sich zu folgender Formel [4] zusammenfassen:

$$P^{SERS}(\nu_s) = N\sigma_{ads}^R |A(\nu_L)|^2 |A(\nu_S)|^2 I(\nu_L) \quad (6)$$

P^{SERS} beschreibt das Signal des anregenden Laserfeldes, $A(\nu_L)$ und $A(\nu_S)$ die Verstärkungsfaktoren des einstrahlenden Laserfeldes und des Raman-Streufeldes. Der vergrößerte Streuquerschnitt der adsorbierten Moleküle wird durch σ_{ads}^R formuliert. N beschreibt die Anzahl der am SERS-Prozess beteiligten Moleküle.

2.4 Chemometrische Verfahren

In dieser Arbeit wurden große Datenmengen, teilweise von komplexen biologischen Proben, deren Spektren überlagerte spektrale Informationen biologischer Komponenten enthalten, generiert. Um den maximalen Informationsgehalt aus den großen experimentellen Datensätzen zu extrahieren, wurden chemometrische Auswertemethoden angewendet. Diese strukturentdeckenden Verfahren umfassten Methoden wie die Hauptkomponentenanalyse (PCA), Hierarchische Clusteranalyse (HCA) und K-Means Clusteranalyse (K-Means). Gegenüber der univariaten Datenanalyse ermöglichen diese eine gleichzeitige

Untersuchung mehrerer statistischer Variablen sowie die Erkennung von Zusammenhangsstrukturen zwischen einzelnen Variablen. Im Folgenden sollen die Prinzipien der in der Arbeit verwendeten chemometrischen Methoden erläutert werden.

2.4.1 Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Bei der PCA (*Principal Components Analysis*, Hauptkomponentenanalyse), die erstmalig von Karl Pearson [115] formuliert wurde, werden die Spektren als Vektoren, die Punkte im n -dimensionalen Raum beschrieben, betrachtet [115]. Die quadratische Ausgangsmatrix X wird hierbei aus M Spektren mit jeweils N Datenpunkten gebildet und hat die Dimension $M \times N$. Mathematisch wird das durch die Darstellung der Ursprungsmatrix X mittels zweier Matrizes verwirklicht, die als *Scores* (Faktorenwerte, T) und *Loadings* (Faktorenloadungen, P) bezeichnet werden. Nichtquadratische Datenmatrizen müssen vor der Eigenwertberechnung quadratisch gemacht werden, was durch die Transformation in eine Korrelations- bzw. Kovarianzmatrix erfolgt. Als Faktor werden dann der Eigenwert mit seinem korrespondierenden Eigenvektor bezeichnet. Das mathematische Modell zeigt Abb. 2.7. Die ursprünglichen Koordinaten im Ursprungskordinatensystem X werden in das neue Koordinatensystem X' überführt. Ziel der PCA ist es, die Daten der Ursprungsmatrix derart anzuordnen, dass durch den ersten Faktor die maximale Varianz des Datensatzes beschrieben werden kann [116]. Jede weitere Hauptkomponente liegt orthogonal zu allen weiteren Koordinatenachsen. Durch die Visualisierung der *Scores* und *Loadings* können Zusammenhangsstrukturen der Daten besser analysiert werden. Die PCA hat den Vorteil informationsreiche, spektrale Anteile von informationsarmen Anteilen (Rauschen) ohne hohen Informationsverlust aus komplexen Datensätzen voneinander zu separieren.

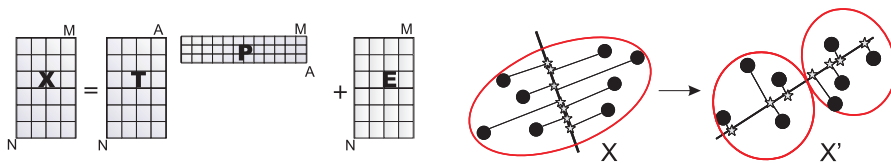


Abbildung 2.7: links. Darstellung der Ursprungsmatrix X durch *Scores* T , *Loadings* P und spektrale Residuen E . rechts. Transformation der Ursprungskordinaten in das neue Varianz-gewichtete Koordinatensystem X' .

2.4.2 Multivariate Kurvenauflösung (MCR)

In der Prozessdatenanalyse haben sich sowohl die PCA als auch die *Partial Least Square Regression* (PLSR) als chemometrische Werkzeuge etabliert [116]. Der wesentliche Nachteil von PCA und PLSR ist, dass die Hauptkomponenten abstrakte, sogenannte latente Variablen darstellen und häufig den physikalisch-chemischen Hintergrund nur ungenau widerspiegeln. Die Methoden der Multivariate Kurvenauflösung (MCR) erlauben hingegen das Einbringen von vorhandenem Wissen in die chemometrische Auswertung in Form von Nebenbedingungen [117]. Die MCR wurde in der Arbeit zur Identifizierung einzelner Reporterklassen aus einem komplexen Datensatz bestehend aus Reporter-Mischspektren, angewendet. Im Gegensatz zur Dekonvolution von Spektren [118, 119], wo nur einzelne

Banden separiert werden können, kann die MCR ganze Spektren und deren zugehörige Konzentrations-Zeit-Profile modellieren [120]. Das Ziel der multivariaten Kurvenauflösung besteht darin, aus einer Datenmatrix D die darin enthaltene Basisinformation der reinen Komponenten zu extrahieren, die in D überlagert enthalten sind [121]. Im Falle spektraler Daten wird D in zwei kleinere Matrizen C und S zerlegt, so dass möglichst viel Information über die Reinkomponentenspektren und deren zugehörige Konzentrationen enthalten ist. Dazu wird folgendes additives Modell angenommen:

$$D = CS^T + E \quad (7)$$

Dieses Modell aus Gl.7 entspricht dem Lambert-Beerschen Gesetz für Absorptionsspektren. Die Matrix D mit der Dimension $(z \times s)$ enthält in den z Zeilen die gemessenen Absorptionsspektren mit jeweils s Absorptionswerten. Die Absorptionsspektren stellen eine Funktion der Zeit dar, wenn es sich um einen Reaktionsprozess handelt. In der Matrix S^T $(a \times s)$ stehen in den a Zeilen die Spektren der Reinkomponenten. In der Matrix C $(z \times a)$ sind in den a Spalten die zu den Reinspektren gehörigen Konzentrationen entsprechend deren Beitrag im jeweiligen Absorptionsspektrum. Die Matrix E $(z \times s)$ enthält den spektralen Rest, der nicht durch die Reinkomponenten erklärt werden kann. Hier findet man also den Betrag eines zufälligen Rauschens aber auch systematische Störungen der Absorptionsspektren. Die Zerlegung in die beiden Matrizen C und S wird im allgemeinen Fall, wenn kein Vorwissen über die Zusammensetzung der Datenmatrix D vorhanden ist, über eine vorausgehende Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Man zerlegt dazu die Datenmatrix X in die Scoresmatrix T und die Hauptkomponentenmatrix P (siehe Abb. 2.7).

2.4.3 Hierarchische Clusteranalyse (HCA)

Die HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*, Hierarchische Clusteranalyse) wird als Spezialform der strukturentdeckenden Ballungsanalyse bezeichnet und reiht sich in die unüberwachten, multivariaten Analyseverfahren zur Klassifizierung und Mustererkennung von Objekten (z. B. Spektren) ein [122]. Die Visualisierung erfolgt i. d. R. in Form einer Baumstruktur, dem Dendrogramm, das die Ähnlichkeiten unter den Objekten hierarchisch angeordnet widerspiegelt. Das am häufigsten verwendete Verfahren ist das agglomerative Clusterverfahren, das den häufig verwendeten Clusteralgorithmus nach Ward verwendet [123]. Der Wards Algorithmus versucht Gruppierungen derart zu verknüpfen, dass das Ergebnis zu einer geringstmöglichen Heterogenität H führt. Die Heterogenität H und die Anzahl der Spektren $n(i)$ wird in ein Objekt I zusammengefasst. Ferner sei noch eine spektrale Distanz D definiert:

$$H(r, i) = D(r, i) = \frac{[n(p)+n(i)+[n(i)+n(q)] \cdot D(p,i) + [n(i)+n(q)] \cdot D(q,i) - n(i) \cdot D(q,i)]}{n+n(i)} \quad (8)$$

Ein Maß für die Ähnlichkeit zweier Objekte untereinander ist die Euklidische Distanz $D_{j,k}$. Diese beschreibt die Summe zwischen den Ordinatenwerten der Spektren $X_{j,i}$ und $X_{k,i}$

über alle ausgewählten Datenpunkte i :

$$D_{j,k} = \sqrt{\sum_{j=1}^k (x_{j,i} - x_{k,i})^2} \quad (9)$$

2.4.4 K-Means Clusteranalyse (K-Means)

Die K-Means Clusteranalyse (K-Means) ist ein Verfahren zur Clusteranalyse. Dabei wird aus einer Menge von ähnlichen Objekten eine vorher bekannte Anzahl von K Gruppen gebildet. Dieser Algorithmus ist im Vergleich zum hierarchischen Clusterverfahren ein bewachtes, multivariates Analyseverfahren zur Gruppierung von Objekten, da er zum schnellen Zusammenschluss sog. Clusterzentren (Zentroiden) führt [124]. Das K-Means Clusterverfahren lässt sich den partitionierenden Clusterverfahren zuordnen, wobei die K Cluster-Schwerpunkte zufällig verteilt werden. Abb. 2.8 zeigt eine schematische Darstellung zu diesem Verfahren. Jedes Objekt wird demjenigen Cluster zugeordnet, dessen Schwerpunkt ihm am nächsten liegt. Ähnlich wie bei der HCA wird eine Distanzfunktion verwendet. Für jeden Cluster wird der Schwerpunkt neu berechnet, so dass er in der Mitte des Clusters liegt. Basierend auf den neu berechneten Zentren werden die Objekte erneut, wie bereits beschrieben, auf die Cluster verteilt, bis sich die Schwerpunkte nicht mehr bewegen oder eine festgelegte maximale Iterationstiefe erreicht wird [125].

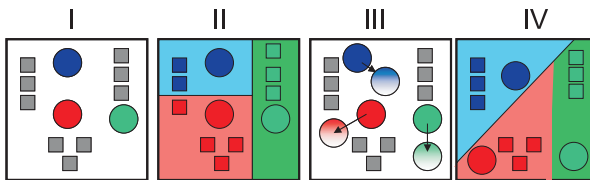


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung zum K-Means Algorithmus. I Drei Clusterzentren wurden zufällig gewählt. II Die durch Rechtecke repräsentierten Objekte (Datenpunkte) werden jeweils dem Cluster mit dem nächsten Clusterzentrum zugeordnet. III Die Zentren (jeweiligen Schwerpunkte) der Cluster werden neu berechnet. IV Die Objekte werden neu verteilt und erneut dem Cluster zugewiesen, dessen Zentrum am nächsten ist.

2.5 Matrix-gestützte Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Die in der Arbeit angewendete Matrix-gestützte Flugzeit-Massenspektrometrie (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight* Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS) ist eine Charakterisierungsmethode, mit der eine Bestimmung von Kopplungsdichten möglich ist [126]. Diese empfindliche Methode erlaubt eine schonende und schnelle Untersuchung von (Bio)polymeren >10 kDa, die mit Zielfindungseinheiten oder *Labels* versehen sein können [127–131]. In der Bioanalytik wird MALDI-TOF-MS vorwiegend zur Charakterisierung von Immunkonjugaten eingesetzt um Hapten-Kopplungsdichten zu ermitteln [132, 133].

Bei diesem Verfahren wird ein Biomolekül mit einem ca. tausendfachen, molaren Überschuss der Matrix gemischt, derart, dass nach Verdunstung des Lösungsmittels eine Kokristallisation von Matrix und Biomolekül eintritt. Die Ausbildung des Kokristalls ist die essentielle Voraussetzung für den MALDI-Prozess. Im Hochvakuumsystem (ca. 10^{-8} - 10^{-6} mbar) wird ein kurzer Laserpuls (UV-Laser: $\lambda=337$ nm, $t=3-5$ ns) auf den Kokristall gelenkt. Über resonante, elektronische Anregung der π -Elektronensysteme der Matrixmoleküle wird die zur Ionisation notwendige Energie eingekoppelt. Anschließend wird die in den Matrixmolekülen kurzfristig gespeicherte Energie in das Festkörperrgitter relaxiert und induziert dort eine starke Störung. Vor dem Erreichen des thermischen Gleichgewichts kommt es zu einem explosionsartigen Phasenübergang, während dessen neben den Matrixmolekülen auch die Biomoleküle in die Gasphase freigesetzt werden. Neben der wichtigen Funktion bei der Laserdesorption kommt der Matrix auch eine entscheidende Rolle bei der Ionisation der Biomoleküle zu: Die photoionisierten Matrixmoleküle bewirken durch den Prozess des Protonentransfers der gebildeten Radikale eine hohe Ausbeute an elektrisch geladenen Biomolekülen. Infolge des Ionisationsprozesses liegen meist einfach geladene Biomoleküle in der Gasphase des Hochvakuumsystems vor. Diese Ionen werden anschließend in einem elektrostatischen Feld von 100 bis einigen 1000 V/mm beschleunigt. Positive und/oder negative Ionen können durch die Polarität des angelegten Feldes selektiert werden. Eine Kopplung der MALDI-TOF-MS mit einem Flugzeitanalysator gestattet es, durch genaue Messung der Zeitspanne, die ein Ion benötigt, um die definierte feldfreie Driftstrecke zwischen der Beschleunigungselektrode und dem Detektor zu durchfliegen, die molekulare Masse des Biomoleküls exakt zu bestimmen.

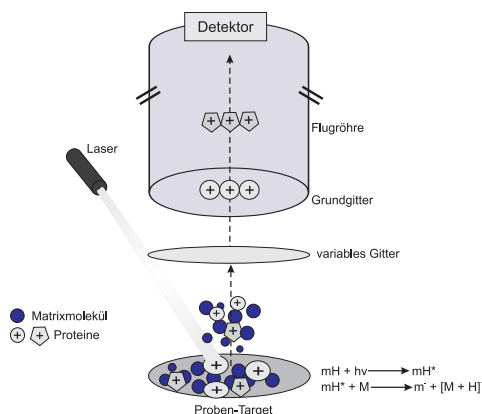


Abbildung 2.9: Prinzip der MALDI-TOF-MS Probenionisierung.

2.6 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Als analytische Nachweismethode zur Untersuchung der Immunogenität gekoppelter Antikörper wurde in der Arbeit der Enzym-gekoppelte Immunadsorptionstest (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*, ELISA) verwendet. Dieser stellt ein immunologisches Nachweisverfahren dar, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert [134]. Mit Hilfe des ELISA

können Proteine, Viren sowie niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine und Pestizide in einer Probe (Blutserum, Milch, Urin, etc.) nachgewiesen werden. Bei diesem Nachweisverfahren wird die Eigenschaft spezifischer Antikörper ausgenutzt, die an den nachzuweisenden Stoff, das Antigen, binden. Um die enzymatische Umsetzung des Substrats (z. B. Tetramethylbenzidin (TMB)-Färbelösung) zu gewährleisten, wird der Antikörper oder das Antigen mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient somit als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Das Reaktionsprodukt aus der Substratumsetzung kann durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden. Da der ELISA eine sensitive analytische Nachweismethode darstellt, kann aufgrund der gemessenen Signalstärke (bzw. optische Dichte), die abhängig von der Antigenkonzentration ist, ein quantitativer Nachweis erfolgen [135].

3 Material und Methoden

3.1 Experimenteller Aufbau zur Raman-Streulichtmessung

In der Arbeit wurde als Hauptuntersuchungsmethode die Raman-Spektroskopie eingesetzt. Die Raman-Untersuchungen erfolgten mit Hilfe eines mikrospektroskopischen LabRam HR800-Aufbaus (Horiba-Jobin Yvon, Bensheim, Deutschland). SERS-Untersuchungen an wässrigen und biologischen Proben wurden unter Verwendung eines $60\times$ Wasserimmersionsobjektivs durchgeführt. Das in das Raman-System integrierte BX41 Mikroskop kann im Auf- und Durchlichtmodus betrieben werden. Alle Raman-mikrospektroskopischen Untersuchungen an biologischen Proben wurden an einem Schrittmotor-betriebenen XY-Probentisch zur punktweisen Laserabrasterung in $2\ \mu\text{m}$ -Schritten durchgeführt. Der Durchmesser des durch das Objektiv fokussierten Laserstrahls auf den Proben betrug $\sim 1.8\ \mu\text{m}$. Ein 800 mm langer Spektrograph mit einem vor dem Eingangsspalt befindlichen Notch-Filter sowie eine Stickstoff-gekühlte CCD-Kamera (1024×256 Pixel, Symphony, Horiba Deutschland) wurden für die spektrale Dispersion und Sammlung des Ramanstreulichtsignals verwendet. Der Notch-Filter sorgt dafür, dass das elastisch gestreute Licht (Rayleigh-Signal) unterdrückt wird. Der Spektrograph bildet stigmatisch mit einer fokalen Länge von 800 mm ab. Er enthält optische Gitter (1800 Linien/mm und 300 Linien/mm) mit deren Hilfe das Licht dispergiert wird. Für die Experimente wurden zwei verschiedene Anregungswellenlängen verwendet: $\lambda=785\ \text{nm}$ (Ga:AlAs LED, Toptica, Graefelfing, Deutschland) und $\lambda=633\ \text{nm}$ (Helium-Neon-Laser, Horiba Jobin Yvon, Bensheim, Deutschland) mit Ausgangsleistungen von jeweils $15\ \text{mW}$ und $6\ \text{mW}$. Eine Abschwächung der Intensität um Faktor 10 wurde durch einen Neutraldichtefilter (ND1) ermöglicht, der bei allen Raman-Experimenten verwendet wurde. Damit betrug die Anregungsintensität der beiden verwendeten Laser entsprechend $8\cdot 10^4\ \text{W}/\text{cm}^2$ und $3\cdot 10^4\ \text{W}/\text{cm}^2$ auf den Untersuchungsobjekten. Die Frequenzkalibrierung erfolgte unter Verwendung eines $100\times$ -Objektivs an einer kristallinen Siliziumprobe (Siliziumlinie bei $\nu_1=520.7\ \text{cm}^{-1}$). Alle wässrigen Proben wurden, sofern nicht anders beschrieben, auf einem Kalziumfluorid-IR-Fenster (OPTISPEC[®], Korth, Deutschland) gemessen. Der experimentelle Aufbau zur Raman-Streulichtmessung ist in Abb. 3.10 dargestellt.

3.2 Synthese von Au und Ag Nanopartikeln

Die in der Arbeit hergestellten Nanopartikel decken einen Partikelgrößenbereich zwischen $10\ \text{nm}$ und $80\ \text{nm}$ ab und sind deshalb für die Anwendbarkeit in SERS-Experimenten hinsichtlich hoher Verstärkungsfaktoren interessant. Zwar ist die Kolloidherstellung mittels nasschemischer Reduktion von Metallkationen ihres korrespondierenden Salzes eine etablierte Methode, dennoch können die unterschiedlich hergestellten metallischen Nanostrukturen definierte Plamonenresonanzen aufgrund ihrer Größe, Morphologie und Dielektrizitätskonstante aufweisen und somit unterschiedliche Verstärkungseigenschaften in Gegenwart eines Analyten aufzeigen.

Für die Herstellung von Au und Ag NP wurde in der Arbeit als Reduktionsmittel das Trinatriumcitrat Dihydrat (99%, Merck) und das Natriumborhydrid (98%, J.T. Baker), die gleichzeitig zur elektrostatischen Stabilisierung der Kolloide dienen, verwendet. In-

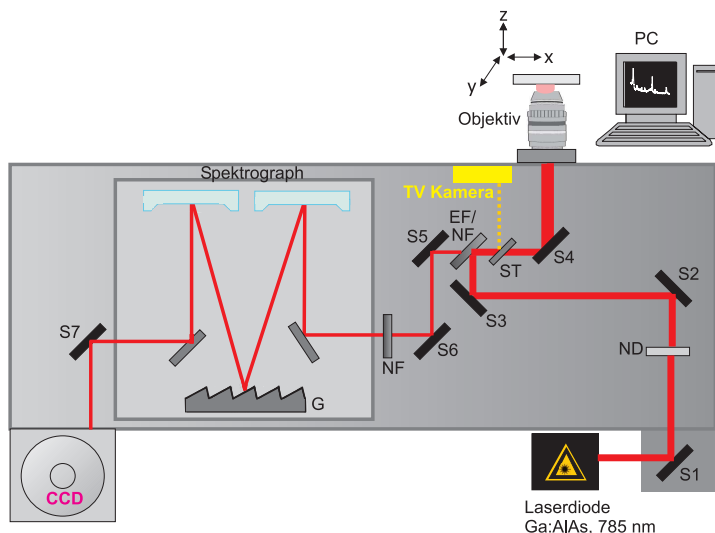


Abbildung 3.10: Experimenteller Aufbau zur Raman-Messung. S1-S7 Spiegel; ND Neutradichtefilter; EF Kantenfilter; NF Notchfilter; ST Strahlteiler; G Gitter.

folge des Reduktionsprozesses wurden als SERS-Substrate kolloidale Au und Ag NP aus ihren Ausgangssalzen Goldsäure(III)chlorid (99.9%, Sigma-Aldrich) bzw. Kaliumtetrachloraurat(III) (99.9%, Sigma-Aldrich) sowie Silbernitrat (99.9999%, Sigma-Aldrich) bzw. Silbersulfat (98.5%, Merck) gewonnen. Alle Chemikalien wurden in $58 \times 10 \times 10$ mm-Wägeschiffchen (Macherey Nagel GmbH) mit einer Feinwaage (PT120, Sartorius) eingewogen.

Zur Herstellung wurde ausschließlich ultrareines, entionisiertes Wasser (18 M Ω , Milli-Q Wasseraufreinigungssystem: Millipore, Bedford, MA) verwendet. Die Nanopartikelsynthese erfolgte in einem zuvor mit Königswasser und Ultrareinstwasser gespülten Dreihals-Rundkolben, der zur Vermeidung photolytischer Reaktionen mit Aluminiumfolie umwickelt wurde. Alle weiteren durchgeführten Syntheseschritte erfolgten unter normaler Atmosphäre. Vor der jeweiligen Synthese wurden die Lösungen frisch angesetzt. Für das Abmessen größerer Volumina wurden steril verpackte serologische Vollpipetten (5 ml-10 ml, neoLab) verwendet.

Bei der Citratmethode wurde die wässrige Goldsäurelösung und Silbernitrat- bzw. Silbersulfatlösung ca. eine Stunde lang in der Siedehitze ($T=100^\circ\text{C}$) von im Überschuss zugesetzten Natriumcitrat (siehe Tab. 3.1 und Tab. 3.2) reduziert. Die Reduktion der Silbernitratlösung bzw. Silbersulfatlösung durch Natriumborhydrid erfolgte in den Synthesevorschriften (d) und (e) bei 4°C . Alle hergestellten Kolloide wurden in abgedunkelten Standglasflaschen aufbewahrt.

Tabelle 3.1: Synthesevorschriften zur Herstellung von Au Nanopartikeln sowie der dafür benötigte molare Überschuss (X) an Citrat.

| Syntheseprotokoll | V_{ges} [ml] | Goldsalz | Reduktionsmittel | $c_{Goldsäure}$ [M] | $c_{Reduktionsmittel}$ [M] | X |
|----------------------------------|----------------|--|--|-------------------------|----------------------------|-------|
| A (Frens) ^[136, 137] | 55 | H ₂ AuCl ₄ · 3H ₂ O | HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ · 2H ₂ O | 1 · 10 ⁻³ | 38.8 · 10 ⁻³ | 4 × |
| B (Frens) ^[136, 137] | 57 | H ₂ AuCl ₄ · 3H ₂ O | HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ · 2H ₂ O | 2.54 · 10 ⁻⁴ | 3.4 · 10 ⁻² | 19 × |
| C (Aroca) ^[69] | 12 | H ₂ AuCl ₄ · 3H ₂ O | HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ · 2H ₂ O | 1 · 10 ⁻³ | 3.4 · 10 ⁻² | 7 × |
| D (Aroca) ^[69] | 12 | KAuCl ₄ | HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ · H ₂ O | 1 · 10 ⁻³ | 3.4 · 10 ⁻² | 6.8 × |
| E (Frens) ^[136, 137] | 50.035 | H ₂ AuCl ₄ · 3H ₂ O | HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ · 2H ₂ O | 2.54 · 10 ⁻⁴ | 3.4 · 10 ⁻² | 0.1 × |
| F (Frens) ^[136, 137] | 50.33 | H ₂ AuCl ₄ · 3H ₂ O | HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ · 2H ₂ O | 2.54 · 10 ⁻⁴ | 3.4 · 10 ⁻² | 0.9 × |
| G (Lee/Meisel) ^[64] | 225 | H ₂ AuCl ₄ · 3H ₂ O | HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ · 2H ₂ O | 3.05 · 10 ⁻⁴ | 3.4 · 10 ⁻² | 2.8 × |
| H (De Mey) ^[138] | 107 | H ₂ AuCl ₄ · 3H ₂ O | HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ · 2H ₂ O | 24.3 · 10 ⁻³ | 2.2 · 10 ⁻³ | 10 × |
| I (Horisberger) ^[139] | 251.5 | H ₂ AuCl ₄ · 3H ₂ O | HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ · 2H ₂ O | 3 · 10 ⁻⁴ | 38.8 · 10 ⁻³ | 4.5 × |
| J (Lee/Meisel, modifiziert) | 275 | H ₂ AuCl ₄ · 3H ₂ O | HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ · 2H ₂ O | 3.05 · 10 ⁻⁴ | 3.4 · 10 ⁻² | 2.9 × |

Tabelle 3.2: Synthesevorschriften zur Herstellung von Ag Nanopartikeln sowie der dafür benötigte molare Überschuss (X) an Citrat.

| Syntheseprotokoll | V_{ges} [ml] | Silbersalz | Reduktionsmittel | $c_{Silbersalz}$ [M] | $c_{Reduktionsmittel}$ [M] | X |
|---------------------------------|----------------|---------------------------------|--|-------------------------|----------------------------|--------|
| a (Aroca/Munro) ^[75] | 255 | AgNO ₃ | HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ · 2H ₂ O | 1.06 · 10 ⁻³ | 3.4 · 10 ⁻² | 0.6 × |
| b (Lee/Meisel) ^[64] | 250 | AgNO ₃ | HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ · 2H ₂ O | 1.08 · 10 ⁻³ | 3.4 · 10 ⁻² | 0.64 × |
| c (Aroca) ^[69] | 204 | Ag ₂ SO ₄ | HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ · 2H ₂ O | 1 · 10 ⁻³ | 3.4 · 10 ⁻² | 0.7 × |
| d (Aroca) ^[69] | 40 | AgNO ₃ | NaBH ₄ | 1 · 10 ⁻³ | 2 · 10 ⁻³ | 6 × |
| e (Aroca) ^[69] | 40 | Ag ₂ SO ₄ | NaBH ₄ | 1 · 10 ⁻³ | 2 · 10 ⁻³ | 6 × |

3.3 Charakterisierung der hergestellten SERS-Substrate

3.3.1 UV/Vis-Spektroskopie

Um die optischen Eigenschaften von Nanopartikeln zu untersuchen, eignet sich eine UV/Vis-spektroskopische Untersuchung. Aus der Position der Plasmonenbande (λ_{max}) lassen sich Informationen zur Partikelgröße und aus deren Halbwertsbreite (FWHM) Informationen zur Größenverteilung gewinnen.

Die Untersuchungen an kolloidalen Suspensionen sowie an farbstoff- und proteinhaltigen Lösungen wurden mit einem Doppelstrahl-UV/Vis-NIR-Spektralphotometer (V-670, Jasco, Deutschland) mit integriertem Einfachmonochromator, der einen Spektralbereich zwischen 190 und 2500 nm abdeckt, untersucht. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Photomultipliers (UV/Vis-Region) und eines Peltier-gekühlten PbSe-Detektors (NIR > 800 nm). Es wurden Spektren im Bereich zwischen 190-1200 nm mit einer Auflösung von 2 nm aufgenommen, wobei die Proben in Quarzglas-Halbmikroküvetten (10 mm × 10 mm × 45 mm, SUPRASIL[®], Hellma) vermessen wurden. Als Referenz diente eine mit dem entsprechenden Lösungsmittel befüllte Küvette mit identischer optischer Weglänge ($d=10$ mm).

Zur Charakterisierung der hergestellten BSA-Reporter-Konjugate (siehe Abschn. 6.1.1) wurden Extinktionsspektren im Spektralbereich von 250-800 nm aufgenommen.

3.3.2 Dynamische Lichtstreuung

Zur Untersuchung des hydrodynamischen Partikeldurchmessers nanopartikulärer Suspensionen erfolgten alle DLS-Messungen mit der Apparatur Nano Series Nano ZS (Malvern Instruments, UK) bei Raumtemperatur. Die Nanopartikelsuspensionen wurden in PMMA-Halbmikroküvetten (PLASTIBRAND[®], BRAND) untersucht. Für jede Probe wurden jeweils drei Messreihen, die 20 Einzelmessungen umfassten, aufgenommen. Die Aufzeichnung der Streukurven erfolgte mit Hilfe der DLS-Software DTSv601 (Malvern Instruments, UK).

3.3.3 Untersuchungen zu den Verstärkungseigenschaften von Au und Ag NP

Zur Detektion der Adeninspektren wurden jeweils zu 20 μ l einer Nanopartikellösung 2 μ l einer 10^{-4} M Analytlösung (Adenin, 99%, Fluka) pipettiert und anschließend vom Lösungsgemisch 1 s-Spektren bei 785 nm-Anregung ($\lambda=785$ nm, 1.5 mW) aufgenommen.

Um herauszufinden, ob sich in Gegenwart einer Elektrolytlösung die Detektionsfähigkeit geringer Konzentrationen verbessert, wurden zu 20 μ l einer Au bzw. Ag Nanopartikellösung jeweils 2 μ l Salzlösung (NaCl, 99.99%, Merck) und Adeninlösung beigemischt und anschließend untersucht.

Für die Bestimmung von Verstärkungsfaktoren erfolgten die Probenpräparationen folgendermaßen: Zunächst wurden jeweils 2 μ l NaCl-Lösung (10 mM), dann 2 μ l Adenin (10^{-4} M) zu 20 μ l Kolloid gegeben. Anschließend wurden 10 μ l Methanol (99.8%, J. T. Baker) hinzupipettiert (Endkonzentration: $c\sim 10^{-8}$ M) und die Signaturen bei 785 nm-Anregung ausgelesen. Zur Bestimmung der Verstärkungsfaktoren der ausgewählten SERS-Substrate wurde somit eine 10^{-5} M Adeninlösung sowie das Methanol der Konzentration c_{RS} betrachtet. Da sich von Methanol ein normales Raman-Signal I_{RS} , jedoch kein SERS-Signal, detektieren lässt, entspräche das gemessene Signal einem Signal, das von einem Analyten

ohne SERS-Substrat generiert wurde. Das Adenin wurde mit einer anderen (nicht zwingend notwendig) Konzentration c_{SERS} unter nicht-resonanten Bedingungen gemessen und generiert ein SERS-Signal I_{SERS} . Der Verstärkungsfaktor (EF) wurde nach folgender Formel [4] bestimmt:

$$EF = \frac{I_{SERS}/c_{SERS}}{I_{RS}/c_{RS}} \quad (10)$$

Die Signalintensität des Methanols wurde bei $\nu \sim 1026 \text{ cm}^{-1}$ abgelesen.

3.3.4 Bildgebung mittels TEM

Zur Bestimmung der Partikelgrößen und deren Morphologien diente ein TEM H8000 (HITACHI, Japan). Die Nanopartikellösungen wurden kurz vor der Untersuchung auf Kohlenstoff-beschichtete Kupfernetzchen (200 Maschen, PLANO, Deutschland) pipettiert ($V \sim 5 \mu\text{l}$). Anschließend erfolgte deren Trocknung und Evakuierung innerhalb der Ultrahochvakuumkammer des TEM. Es wurde eine Beschleunigungsspannung von 200 kV verwendet.

3.4 Untersuchung der Raman-Signaturen von Reportern

Für die Untersuchungen von Reporter-Signaturen wurden Moleküle wie *para*-Aminothiophenol (*p*ABT, 97%, Aldrich); 2-Naphthalenthiole (2-NAT, 99%, Fluka); Rhodamin(B)isothiocyanat (RBITC, 70%, Sigma); Kristallviolett (CV) (CV, >90%, J. T. Baker); *para*-Mercaptobenzoesäure (*p*MBA, 95%, Chempur); Nilblau (NB, >75%, Sigma-Aldrich), Acridinorange (AO, 1%-ige Lösung in Wasser, Fluka), Safranin O (SAF, 98%, Alfa Aesar) sowie Fluoresceinisothiocyanat (FITC, 90%, Sigma) und Dithionitobenzoesäure (DTNB, 98%, Sigma) verwendet. Zur Aggregation und Aktivierung von Nanopartikeln diente Natriumchlorid (99.99%, Merck). Für die wasserunlöslichen Chemikalien wurde Methanol (99.8%, J.T.Baker) als Lösungsmittel verwendet. Alle Chemikalien wurden in $58 \times 10 \times 10 \text{ mm}$ -Wägeschiffchen (Macherey Nagel GmbH) mit einer Feinwaage (PT120, Sartorius) eingewogen. In allen Experimenten wurde entionisiertes Wasser (18 M Ω , Milli-Q Wasseraufreinigungssystem: Millipore, Bedford, MA) eingesetzt. Die schwer- bzw. wasserunlöslichen Reporter *p*AbT, 2-NAT, RBITC, CV, NB und FITC wurden in Methanol zunächst vorgelöst und anschließend in die wässrige Phase (PBS-Puffer, 0.01 M, pH \sim 7.3) überführt. Die Präparation der Stammlösungen von *p*MBA und DTNB erfolgte im 0.01 M PBS-Puffer (pH \sim 7.3) bzw. 0.1 M Phosphatpuffer (ohne NaCl, pH \sim 7.3).

3.5 Präparation binärer Reporter-Mischungen

Zur Detektion von Reporter-Mischspektren wurde folgende Präparation vor den SERS-Untersuchungen vorgenommen: Zunächst wurden zu jeweils $20 \mu\text{l}$ Au NP-Lösung $2 \mu\text{l}$ der ersten Reporterlösung pipettiert und gut durchmischt. Anschließend erfolgte die Präparation der zweiten Reporterlösung mit dem Au Kolloid in einem neuen Reaktionsgefäß unter Verwendung derselben Präparationsvorschrift. Bei Bedarf wurden zur Erzeugung

von Nanoaggregaten und zur Aktivierung der Nanopartikellösung $2 \mu\text{l}$ einer Salzlösung mit entsprechender Konzentration (300 oder 1000 mM) hinzugegeben, bevor die Zugabe der jeweiligen Reporterlösung erfolgte. Anschließend wurden die jeweiligen Au-Reporterlösungen zueinander gegeben und erneut gut durchgemischt. Die Raman-Untersuchungen erfolgten unter nicht-resonanten Bedingungen bei $\lambda=785 \text{ nm}$.

3.6 Auswerteprozeduren der uni- und multivariaten Datenanalyse

3.6.1 Bestimmung chemischer Identifizierungsparameter

Zur chemischen Analyse wurden die spektralen Datensätze der Reporter-Signaturen *p*ABT, 2-NAT, RBITC, CV, *p*MBA, AO, SAF, NB, FITC und DTNB einer kosmischen Untergrundstrahl-Korrektur, die mit der Bildgebungssoftware für hyperspektrale Datensätze CytoSpec1.4 (CytSpec Inc., USA) erfolgte, unterzogen. Diese wurde ebenfalls zur Kalkulation von Basislinien-korrigierten Bandenverhältnissen, d. h., zur Berechnung des Verhältnisses zweier Banden-Integrale, verwendet.

3.6.2 PCA-, HCA- und K-Means-Analysen

Um die Hauptkomponentenanalyse sowohl für die Datenanalyse als auch für die Datenvisualisierung optimal nutzen zu können, mussten die Datensätze entsprechend aufbereitet bzw. standardisiert werden. Zunächst wurde eine kosmische Hintergrundstrahl-Korrektur mit der hyperspektralen Bildgebungssoftware CytoSpec1.4 (CytSpec Inc., USA) durchgeführt. Für die PCA wurden die spektralen Datensätze der an Au und Ag NP gemessenen Reporter-Signaturen (siehe Abschn. 5) analysiert. Um die aus der PCA hervorgegangenen Ergebnisse besser untereinander vergleichen zu können, wurden alle Reporter-Signaturen, mit Ausnahme der DTNB- und FITC-Signaturen, berücksichtigt.

Vor der PCA und HCA wurde die erste Ableitung der Spektren unter Verwendung des Savitzky-Golay Algorithmus (Anzahl an Glättungspunkten: 5) berechnet. Anschließend erfolgte eine Vektornormalisierung der abgeleiteten Datensätze. Die Hauptkomponentenanalyse und Hierarchische Clusteranalyse der Reporter-Signaturen wurde im Spektralbereich zwischen $300\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$ durchgeführt. Für die Erstellung der HCA-Dendrogramme wurde als Distanzmaß die Euklidische Distanz sowie der Cluster-Algorithmus nach Ward [123] verwendet. Die acht verschiedenen Reporter, die in Gegenwart von Au NP untersucht wurden, bildeten einen Datensatz bestehend aus 370 Spektren, für Ag NP entsprechend 381 Spektren. Hier wurden ebenfalls wie bei der PCA alle Reporter-Signaturen, mit Ausnahme der DTNB- und FITC-Signaturen, berücksichtigt.

Alle weiteren Datensätze, die von Raman-Untersuchungen in 3T3-Zellen herrührten, wurden in MatLab 7.0 (The Mathworks Inc., Natick, MA) unter Verwendung des Statistik-Tools *PLS toolbox* (Eigenvector Research, Inc.) analysiert. Als Input-Information für die Konstruktion von PCA-Kartierungen wurden dabei die Hauptkomponenten-*Scores* verwendet. Für die Hierarchische Clusteranalyse wurden unter Einbeziehung der Rekonstruktion der Daten zu sog. HCA-Kartierungen der Cluster-Algorithmus nach Ward verwendet. Als Distanzmaß wurde ebenfalls die Euklidische Distanz gewählt. Die K-Means Kartierungen wurden dementsprechend aus den Ausgabewerten der K-Means Clusteranalyse erstellt. Die Anzahl der spektralen Klassen wurde zuvor aus der Analyse der berechneten

Clusterindizes, den sog. Ausgabewerten der K-Means Analyse, ermittelt und in MatLab 7.0 als Silhouettendiagramme mit dem MatLab 7.0 *Silhouette Plot tool* dargestellt.

3.6.3 MCR-Analyse

Für die MCR-Analyse wurden sowohl die Reinspektren der jeweiligen Reporter als auch die Mischspektren in Cytospec1.4 einer kosmischen Hintergrundstrahl-Korrektur unterzogen. Die Daten wurden anschließend vektornormalisiert. Alle weiteren Analysen erfolgten in MatLab 7.0 unter Verwendung des *Fast Non-Negative Least Squares Fits* (FNNLS), der im ALS2004-GUI nach Jaumot [140] implementiert ist. Als einzige Nebenbedingung wurden positive, von Null verschiedene, Spektren angenommen.

3.7 Inkubation der SERS-Hybridsonden in 3T3-Zellen

Maus-Fibroblastenzellen (3T3; DSMZ, Braunschweig, Deutschland) wurden auf sterilen Mikroskop Deckgläsern (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in einer 6-Well-Kulturplatte für 24 h in *Dulbecco's Eagle Medium* (DMEM; Biochrom AG, Deutschland) mit 10% fetalem Kälberserum, 100 Einheiten/mL Penicillin und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin (Biochrom AG, Deutschland) bei einer Zelldichte von $\sim 10^4$ Zellen/ cm^2 im Inkubator (37°C , 5% CO_2 -Atmosphäre) kultiviert. Vor dem Experiment wurde die Au NP Suspension (Endkonzentration: 10^{-10} M) mit der Reporter-Lösung (Endkonzentration: *p*ABT 10^{-7} M; 2-NAT 10^{-6} M), zunächst in Zellkulturmedium verdünnt und anschließend den ausgesäten Zellen zugeführt. Die Hybrid-Nanosonden wurden mit den 3T3-Zellen in jeweils zwei separaten Schritten (siehe Abb. 3.11) inkubiert. Durch Fluid-Phasen-Aufnahme gelangten dabei die Hybridsonden in das Zellinnere.

Dabei wurde zunächst das Standard-Medium durch Zellkulturmedium ersetzt, das die *p*ABT-Hybridsonden bei einer Konzentration von 10^{-7} M enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Zellen mit PBS-Puffer (Biochrom AG, Deutschland) gewaschen. Es erfolgte eine Wachstumsphase in reinem Kulturmedium für eine Stunde. Im zweiten Schritt wurden die 2-NAT-Nanosonden (10^{-6} M 2-NAT) im Kulturmedium für 30 min inkubiert. Dem 2-NAT-Hybridsonden-Puls folgte eine einstündige Inkubationsphase erneut in Standard-Kulturmedium. Die Endosomen innerhalb der 3T3-Zellen enthielten bereits *p*ABT-Sonden und waren anderen Alters als die 2-NAT-Sonden-enthaltenden Endosomen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und unmittelbar danach Raman-mikrospektroskopische Untersuchungen an den lebenden Zellen bei 785 nm durchgeführt.

3.8 Reporter-Signaturen in unterschiedlichen pH-Milieus

Für die Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der in der Arbeit verwendeten Raman-Reporter wurden Phosphat-Pufferlösungen (50 mM) nach Sørensen im pH-Bereich 4-9 hergestellt [141]. Die pH-Werte der Pufferlösungen wurden mit einer pH-Quecksilber-Glaselektrode (CyberScan pH110, Eutech Instruments, Niederlande) eingestellt. Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit von Reporter-Molekülen wurde *para*-Aminothiophenol (*p*ABT, 97%, Aldrich) sowie der Phenoxazin-Farbstoff Nilblau (NB, >75%, Sigma-Aldrich) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC, 90%, Sigma) für die pH-Untersuchungen

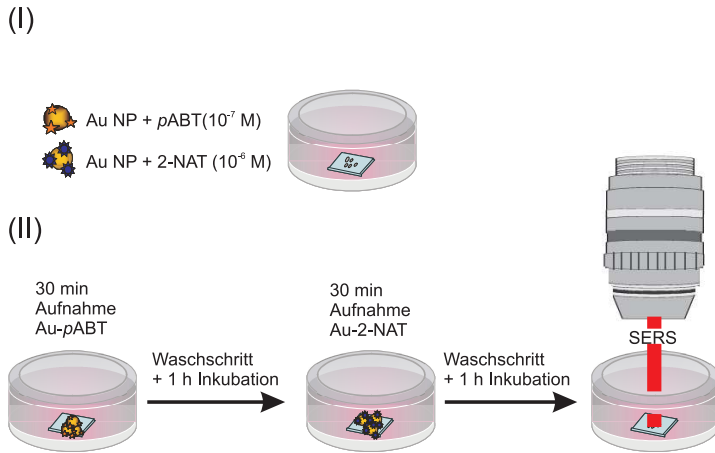


Abbildung 3.11: (I) Zwei verschiedene Au-Hybridsonden, die jeweils mit einer Art Reporter-Molekül inkubiert wurden. (II) Schema zur Durchführung der Inkubation zweier verschiedener SERS-Hybridsonden in 3T3-Zellen.

verwendet. Die für die Raman-Untersuchungen verwendeten Reporterkonzentrationen betragen $\sim 10^{-5}$ M (Ausnahme: NB mit $c \sim 10^{-6}$ M). Dadurch wurde gewährleistet, dass jede im Spektrum auftretende Bande bzgl. des S-N-Verhältnisses gut zu erkennen ist. Die wasserunlöslichen Reporter-Moleküle Nilblau und pABT wurden in Methanol (99.8%, J. T. Baker) gelöst und anschließend in die Pufferlösungen weiter verdünnt. Die Pufferkapazität wurde anhand des Nilblaus durch dessen Farbumschlag von blau nach rot (Entstehung von Nilrot) bei $\text{pH} \sim 9$ überprüft, indem $2 \mu\text{l}$ der gepufferten Reporter-Lösung zu $20 \mu\text{l}$ der Nanopartikellösung gegeben wurden. Als SERS-Substrate wurden präaggregierte Au und Ag NP ($c \sim 10^{-9}$ M für Au NP und $c \sim 10^{-10}$ M für Ag NP) verwendet. Zur Erstellung der Kalibrierkurven wurde ein geeignetes Bandenverhältnis berechnet, d. h., die pH-sensitive Bande bei einer bestimmten Wellenzahl mit einer pH-unempfindlichen Bande zueinander ins Verhältnis gesetzt.

Für die Untersuchung von pH-sensitiven Hybrid-Sonden in 3T3-Zellen wurden präaggregierte Au bzw. Ag NP, die durch eine 30 mM NaCl-Lösung erzeugt wurden, mit 10^{-6} M pABT in 3T3-Zellen inkubiert. Die Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von 3 h gemessen. Es wurde eine Falschfarben-Kartierung der in den 3T3-Zellen detektierbaren pH-Regionen in OriginPro7.5 (OriginLab, USA) erstellt, gebildet aus dem gleichen Bandenverhältnis wie für die erstellten Kalibrierkurven. Alle Raman-Untersuchungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm außerhalb des Resonanzbereichs durchgeführt.

3.9 Herstellung von BSA-Reporter-Konjugaten

Zur Herstellung von BSA-Reporter-Konjugaten wurde Bovines Serum Albumin (BSA, zellkulturgetestet, Cohn Fraktion V, Sigma-Aldrich) verwendet. Zur Kopplung an BSA wurden die Reporter-Moleküle (vgl. Abschn. 5) *para*-Aminothiophenol (pABT, 97%, Aldrich), Nilblau (NB, >75%, Sigma-Aldrich), Acridinorange (AO, 1%-ige Lösung in Wasser,

Fluka), Safranin O (SAF, 98%, Alfa Aesar), Fluoresceinisothiocyanat (FITC, 90%, Sigma) und Rhodamin(B)isothiocyanat (RBITC, 70%, Sigma) verwendet. Ferner wurde 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC, >97%, Sigma-Aldrich) eingesetzt.

Alle Chemikalien wurden in 58×10×10 mm-Wägeschiffchen (Macherey Nagel GmbH) mit einer Feinwaage (PT120, Sartorius) eingewogen. In allen Experimenten wurde entionisiertes Wasser (18 M Ω , Milli-Q Wasseraufreinigungssystem: Millipore, Bedford, MA) eingesetzt. Die Probenpräparation erfolgte in sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen (2 ml, Eppendorf). Die Aufreinigung der Protein-Farbstoff-Konjugate wurde mit Hilfe von PD-10-Säulen (GröÙenausschlusslimit: 5000 Da; GE Healthcare Lifesciences, Deutschland) unter Verwendung von MES-Puffer bzw. K₂CO₃-Puffer als Eluenten durchgeführt.

Als Ausgangssalze zur Herstellung von Kopplungspuffern wurden folgende Chemikalien eingesetzt: 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (>99%, Sigma) zur Herstellung von 0.1 M MES-Puffer (0.1 M, pH~4.5) sowie die Salze Natriumhydrogencarbonat (>99%, Merck) und Kaliumcarbonat (99.95%, Merck) zur Herstellung von K₂CO₃-Puffer (0.1 M, pH~9). Ziel dieser Präparation war es, die Farbstoffe kovalent an BSA zu koppeln, indem die Aminogruppe der Reporter Safranin, Nilblau und *p*ABT eine Amidbindung unter Beteiligung von EDC zur Carboxylgruppe des Proteins ausbildet [142, 143]. Im Falle von Acridinorange erfolgte eine Amidbindung der sekundären Amine des AO mit den Carboxylgruppen im BSA. Es wurden jeweils 10 mg/ml BSA-Lösung in MES-Puffer angesetzt. Zu 200 μ l BSA-Lösung wurden anschließend 500 μ l einer Safraninlösung (3 mg in 500 μ l MES-Puffer gelöst) hinzupipettiert. Nilblau und *p*ABT wurden dagegen in N,N-Dimethylformamid (DMF, <0.005% H₂O, Fluka) in der gleichen Konzentration angesetzt. Die Herstellung von BSA-AO-Konjugats erfolgte analog, indem Acridinorange-Lösung jeweils im gleichen Verhältnis zur BSA-Lösung gegeben wurde. Anschließend wurden 10 mg/ml EDC zur Aktivierung der Carboxylgruppen in Proteinen in 1 ml entionisiertes Wasser angesetzt und davon anschließend 100 μ l sofort zur BSA-Farbstofflösung hinzupipettiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur in einem Schüttler (Minishaker MS1, IKA, Deutschland) über Nacht. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Protein-Reporter-Konjugate mit Hilfe von PD-10-Säulen (GE Healthcare Lifesciences, Deutschland) unter Verwendung von MES-Puffer als Eluenten. Die Eluierung erfolgte mit Hilfe des Spin-Protokolls bei 1000 g für 2 min in der Zentrifuge (Biofuge Primo R, Heraeus, UK).

Für die Herstellung von BSA-RBITC-Konjugaten wurde eine BSA-Lösung (10 mg/ml) in 0.1 M K₂CO₃-Pufferlösung (pH~9) hergestellt. Der Farbstoff RBITC wurde in DMF gelöst. Die Konzentration betrug 10 mg/ml. Anschließend wurden zur BSA-Lösung 130 μ l der RBITC-Lösung gegeben und die Lösung 4 h im Eiswasserbad in einem mit Aluminiumfolie abgedunkelten Reaktionsgefäß gerührt. Es erfolgte eine Inkubation der BSA-RBITC-Lösung bei 4°C über Nacht. Analog zum FITC erfolgte die Ankopplung von RBITC über die Isothiocyanatgruppe an die freien Aminogruppen des Proteins (Lysinresiduen und N-terminale Aminogruppen). Die Präparation der BSA-FITC-Konjugate erfolgte nach Rinderknecht *et al.* [144, 145]. Hierfür wurde eine BSA-Lösung (0.1 g/ml) in 0.1 M K₂CO₃-Pufferlösung (pH~9) hergestellt. Anschließend wurden darin 0.017 g FITC gelöst und die Lösung im Eiswasserbad 4 h lang gerührt. Analog zur BSA-RBITC-Lösung wurde die Probe bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Aufreinigung der beiden Protein-Farbstoff-Konjugate wurde mit Hilfe von PD-10-Säulen (GE Healthcare Lifesciences, Deutschland) unter Verwendung von K₂CO₃-Puffer als Eluenten durchgeführt.

3.9.1 Bestimmung der Kopplungsdichte mittels MALDI-TOF-MS

Alle MALDI-TOF-MS-Untersuchungen erfolgten am Flugzeit-Massenspektrometer Bruker Reflex III (BRUKER Daltonik GmbH, Leipzig, Deutschland), in welchem ein 337 nm-UV-Laser mit 3 ns Pulslänge integriert ist. Integriert sind ferner ein Reflektor-Detektor für den Massenbereich $<10\,000$ Da und ein Linear-Detektor für Massen >10000 Da. Es wurde eine Beschleunigungsspannung von 20 kV gewählt und Massenspektren im Bereich 10000-140000 m/z aufgenommen.

Als Matrix-Grundsubstanz erwies sich die trans-3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure, $>99\%$, Protea, USA) am geeignetsten hinsichtlich des S-N-Verhältnisses. Die MALDI-Untersuchungen der hergestellten BSA-Reporter-Konjugate BSA-RBITC, BSA-FITC, BSA-*p*ABT, BSA-AO, BSA-SAF und BSA-NB sowie BSA als Standard erfolgten in einer Sinapinsäure-Matrix, bestehend aus einem Gemisch aus Acetonitril (ACN, 99,8%, wasserfrei, Sigma-Aldrich) und Trifluoressigsäure (TFA, 99,5%, Sigma) im Verhältnis ACN/0.1% TFA (50/50 Vv). Für die MALDI-Probenpräparation wurden die Proben nochmals mittels ZebaTM Mikro-Entsalzungs-Spinsäulen (Pierce, Belgien) aufgereinigt. Die untersuchten Reagenzien wurden auf ein MALDI-Target *via* Dünnschichtpräparation punktuell aufgetragen, d. h., vor der Probenauftragung (0.5 μ l pro Spot) wurde zunächst eine dünne Schicht (0.5 μ l pro Spot) der ACN/0.1% TFA-Matrixlösung auf das Target präpariert und trocknen gelassen, bevor die Proben, vorgelegt in der selbigen Matrix, punktuell aufgetragen wurden.

Zur Berechnung der Kopplungsdichte wurden die MALDI-Spektren in OriginPro7.5 (OriginLab, USA) eingelesen. Das Molekulargewicht des ungekoppelten BSA und der BSA-Reporter-Konjugate wurde aus dem Zentralpeak (M^+) des BSA berechnet. Für die Fitprozedur wurde ein Lorentzfit ausgewählt und mehrere Fitkurven unterhalb des Hauptpeaks (siehe Abschn. 6.1.2, Abb. 6.49) gelegt:

$$y = y_0 + \frac{2 \cdot A}{\pi} \cdot \frac{w}{4(\pi - \pi_0)^2 + w^2} \quad (11)$$

Mit A =Peakfläche und w =Halbwertsbreite des Peaks. Anschließend erfolgte aus den Mittelwerten der Massenpeaks die Berechnung der Kopplungsdichten.

3.9.2 SERS-Untersuchungen von Konjugaten in 3T3-Zellen

Für die *in vitro* SERS-Untersuchungen der BSA-Reporter-Konjugate wurden die Konjugate an präaggregierte Au bzw. Ag Nanopartikel gekoppelt und anschließend mit 3T3-Zellen inkubiert. Die Messungen der Konjugate BSA-RBITC, BSA-FITC, BSA-*p*ABT, BSA-AO, BSA-SAF und BSA-NB innerhalb der 3T3-Zellen erfolgten nach mehrmaligem Waschen der Zellen mit PBS-Puffer bei $\lambda=785$ nm. Die Untersuchungen des BSA-FITC-Konjugats in Gegenwart der aggregierten Au- und Ag SERS-Substrate erfolgten in Zellen zusätzlich bei 633 nm.

Für die Präparation der Au-Hybridsonden wurden zunächst 100 μ l einer Au NP-Lösung mit 10 μ l einer 300 mM NaCl-Lösung präaggregiert. Die Konzentration der Au NA betrug 10^{-9} M. Zur Au NA-Lösung wurden anschließend 10 μ l einer BSA-Reporterlösung (BSA-RBITC, BSA-FITC, BSA-*p*ABT, BSA-AO und BSA-SAF) pipettiert sowie 880 μ l

DMEM. Die Lösung wurde anschließend zu 1000 μl der 3T3-Zellsuspension hinzugegeben und für 3 h bei 37°C sowie 5% CO₂ inkubiert. Im Falle der Konjugate BSA-RBITC, BSA-FITC, BSA-pABT, BSA-AO und BSA-SAF erfolgte die Präparation von Ag-Hybridsonden ($\sim 2 \cdot 10^{-10}$ M) in gleicher Weise.

Für die Konstruktion von BSA-NB-Au- und BSA-NB-Ag-Hybridsonden wurden zu 20 μl Au NP 2 μl einer 300 mM mM NaCl pipettiert. Die Konzentration der Au NA betrug 10^{-9} M. Im Falle der Ag NA betrug die Konzentration $\sim 2 \cdot 10^{-10}$ M. Zur Au bzw. Ag NA-Lösung wurden anschließend 2 μl des BSA-NB-Konjugats gegeben und die Lösung anschließend in 1976 μl DMEM verdünnt. Die Lösung wurde anschließend zu 1000 μl der 3T3-Zellsuspension hinzugegeben und für 3 h bei 37°C sowie 5% CO₂ inkubiert.

Zur Konstruktion von zwei verschiedenen SERS-Hybridsonden bestehend aus BSA-AO- und BSA-NB-Konjugaten, die in einem Pulsexperiment mit 3T3-Zellen inkubiert (vgl. Abschn. 3.7) wurden, erfolgte die Präparation folgendermaßen: Zu 100 μl Au NP (10^{-9} M) wurden 10 μl NaCl (300 mM) hinzupipettiert. Anschließend wurden 10 μl einer BSA-AO-Lösung hinzugegeben und weiter in 880 μl DMEM verdünnt. Die Hybrid-Nanosonden wurden mit den 3T3-Zellen in jeweils zwei separaten Schritten durch Fluid-Phasen-Aufnahme inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden die Zellen mit PBS-Puffer (Biochrom AG, Deutschland) gewaschen. Es erfolgte eine Wachstumsphase in reinem Kulturmedium für eine Stunde. Im zweiten Schritt wurde die BSA-NB-Hybridsonden (Präparation analog wie bei BSA-AO) im Kulturmedium für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die 3T3-Zellen erneut mit PBS-Puffer gewaschen. Erneut erfolgte eine Wachstumsphase in reinem Kulturmedium für eine Stunde. Anschließend wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und unmittelbar danach wurden Raman-mikrospektroskopische Untersuchungen an den lebenden Zellen bei 785 nm durchgeführt. Die Inkubationsdauer der beiden Hybridsonden in der 3T3-Zellsuspension betrug insgesamt ca. 3 h bei 37°C sowie 5% CO₂.

3.10 Kopplung von Zielfindungselementen und Reportern an BSA

3.10.1 Herstellung eines BSA-Antikörper-Konjugats

Zur Herstellung eines BSA-Antikörper-Konjugats wurden folgende Chemikalien benötigt: Bovines Serum Albumin (BSA, zellkulturgetestet, Cohn Fraktion V, Sigma-Aldrich), Sulfo-succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat-Natriumsalz (Sulfo-SMCC, Sigma-Aldrich), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 99.995%, Aldrich), 2-Iminoethanol (98.0%, Fluka), affinitätsaufgereinigter polyklonaler Antikörper: Ziegen-Anti-Maus Immunglobulin G (Katalog#: 41-GM25, Fitzgerald Industries, USA). Dieser wurde in PBS-Puffer (7.88 mg/ml, pH \sim 7.4, 0.02% Natriumazid) bei 4°C gelagert. Als Lösungsmittel wurde entionisiertes Wasser (Milli-Q Wasseraufreinigungssystem: Millipore, Bedford, MA) verwendet.

Um das BSA-Antikörper-Konjugat herzustellen, wurde Sulfo-SMCC als Quervernetzer zwischen BSA und dem Antikörper verwendet. Diese Aktivierungsreaktion wird auch als NHS-Ester-vermittelte Konjugation bezeichnet [146]. Der heterobifunktionale Linker hat die positive Eigenschaft zum einen über ein Aminogruppen-reaktives NHS-Ester und zum anderen über eine Sulfhydryl-reaktive Maleimidgruppe zu verfügen [147–149]. Für die BSA-Aktivierung wurden zunächst 20 mg BSA in 0.1 M Natriumphosphatpuffer (0.15 M

NaCl, pH~7.3) bei einer Konzentration von 20 mg/ml angesetzt. Anschließend wurden 6 mg Sulfo-SMCC zur BSA-Lösung hinzugegeben. Die Lösung wurde dann für ca. 30 min bei Raumtemperatur im Schüttler (Minishaker MS1, IKA, Deutschland) inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des Sulfo-SMCC-aktivierten BSA mit einer PD-10-Säule (GE Healthcare Lifesciences, Deutschland) unter Verwendung von PBS-Puffer als Eluenten. Um eine Kopplungsfunktionalität zwischen SMCC-aktiviertem BSA und dem Antikörper herzustellen, erfolgte der Einbau von Sulfhydryl-Residuen in diese mit Hilfe von 2-Iminoethanol [146].

Zur Herstellung von 2-Iminoethanol-modifizierten Sekundärantikörpern (Ziege-Anti-Maus IgG) wurden 200 μ l der Antikörper-Stammlösung (7.88 mg/ml) verwendet. Zusätzlich wurde EDTA (10 mM) hinzugegeben um eine Metall-katalysierte Oxidation der Sulfhydrylgruppen zu verhindern. Es erfolgte die Zugabe von 2-Iminoethanol zur Antikörperlösung im 40-fachen molaren Überschuss. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde. Die Aufreinigung der modifizierten Antikörper wurde mit einer PD-Säule mit 0.1 M PBS-Puffer (10 mM EDTA) als Eluenten, durchgeführt. Zur Kopplung des aktivierten BSA mit dem 2-Iminoethanol-aktivierten Sekundär-Antikörper wurden beide Substanzen in einem Verhältnis von 15:1 (BSA:Antikörper) zusammengemischt, d. h., es wurden zu 200 μ l Antikörperlösung 520 μ l der Sulfo-SMCC-BSA-Lösung hinzugegeben. Es erfolgte anschließend eine 2-stündige Inkubationsphase bei Raumtemperatur. Das BSA-Antikörper-Konjugat wurde im Kühlschrank bei 4°C ohne Zusatz von Stabilisatoren gelagert.

3.10.2 Herstellung eines BSA-Reporter-Antikörper-Konjugats

Im folgenden wird die Herstellungsprozedur von Farbstoff-markierten Immunkonjugaten erläutert. Die Synthesewege erfolgten in Anlehnung der Standardprotokolle zur Herstellung und Kopplung reduzierter Antikörper an (Farbstoff-markierte) Proteine [146].

Zur Herstellung des BSA-Antikörper-RBITC-Konjugats wurde zunächst ein BSA-RBITC-Konjugat wie in Abschn. 3.9 hergestellt, allerdings mit einer 5 \times höheren Ausgangs-Konzentration der BSA-Farbstofflösung. Verwendet wurde der Reporter Rhodamin(B)isothiocyanat (RBITC, 70%, Sigma), der analog zu Abschn. 3.9 in N,N-Dimethylformamid (DMF, <0.005% H₂O, Fluka) vorgelöst und anschließend zur BSA-Lösung (0.15 M NaCl, pH~7.3, 10 mM EDTA) gegeben wurde. Nach dem Säulen hat das Konjugat eine Konzentration, die um ca. Faktor 5 vermindert ist, d. h., es lag eine Proteinendkonzentration von \sim 10 mg/ml vor. Im nächsten Schritt wurde die BSA-RBITC-Lösung mit Hilfe des Sulfo-SMCC aktiviert (siehe Abschn. 3.10.1) Für die Kopplung des Sekundärantikörpers ans aktivierte BSA-RBITC wurde der Sekundärantikörper mit 2-Iminoethanol aktiviert. Anschließend wurden das gesäulte BSA-RBITC-SMCC-Intermediat zur BSA-Antikörperlösung in einem molaren Überschuss von 4:1 (BSA-RBITC-SMCC:Antikörper) hinzugegeben und die Lösung anschließend 4 h im Eiswasserbad in einem mit Aluminiumfolie abgedunkelten Reaktionsgefäß gerührt. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation der BSA-RBITC-Antikörperlösung bei 4°C über Nacht. Das BSA-RBITC-Antikörper-Konjugat wurde im Kühlschrank bei 4°C ohne Zusatz von Stabilisatoren gelagert.

3.11 Untersuchung der Konjugate mittels ELISA

3.11.1 ELISA am BSA-Antikörper-Konjugat

Um die Antikörper-Antigen-Bindung des BSA-Antikörper-Konjugats zu testen, wurde ein ELISA durchgeführt. Die für den ELISA benötigten Puffersalze wurden von Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen. Zunächst wurde ein PBS-Puffer (10 mM Mononatriumphosphat, 70 mM Dinatriumphosphat, 130 mM Natriumchlorid, pH 7.6) hergestellt. Der Wasch-Puffer setzte sich aus 0.05% Tween 20, der im Verhältnis in 1:60 in Phosphatpuffer (40 mM Monokaliumphosphat, 375 mM Dikaliumphosphat, 1 mM Kaliumsorbat, pH 7.6; Merck, Deutschland) verdünnt wurde, zusammen. Der Citratpuffer wurde aus 200 mM Kaliumcitrat (monobasisch) sowie 1 mM Kaliumsorbat hergestellt. Der Blockpuffer setzte sich aus 70 mM PBS, pH~7.6 sowie 0.1% Casein zusammen.

Es wurden die Chemikalien 3 mM Wasserstoffperoxid (pH 4.0), Tris(hydroxymethyl)amino-methan (Merck, Deutschland), Casein-Natriumsalz (lot045K0159, Sigma-Aldrich), Tetramethylbenzidin (TMB, Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland) sowie Schwefelsäure (95–97%, J. T. Baker) benötigt. Als Stabilisator-Reagenz für den Peroxidase-markierten Antikörper wurde ferner Guardian_{TM} (Pierce, Deutschland) verwendet.

Es wurden folgende Immunreagenzien für den ELISA benötigt: Als Antigen wurde ein Meerrettichperoxidase-markierter, monoklonaler Antikörper Immunglobulin G (Katalog#: SM1863HRP, Acris Antibodies GmbH Herford, Deutschland), der ebenfalls in PBS-Puffer (pH~7.4, 1 mg/ml, 0.01% Thiomersal) gelagert wurde, verwendet. Für die Analyse wurde das in Abschn. 3.10.1 hergestellte Konjugat verwendet.

Zur Durchführung des Assays wurden ELISA-Mikrotiterplatten (ImmunoPlate F 96 Cert. Maxisorp, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit 96 flachbodigen Einbuchtungen, die eine hohe Protein-Bindungskapazität gewährleisten, verwendet. Die Inkubationen erfolgten auf einem Mikrotiterplattenschüttler Titramax 101 (Heidolph, Schwabach, Deutschland). Die Waschprozeduren erfolgten mit Hilfe eines automatisierten 96-Kanal-Plattenwaschers (ELX405 Select BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland). Zum Auslesen des Assays wurde ein Mikrotiterplatten-Spektalphotometer Spectramax Plus384 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) verwendet. Für das Auslesen der optische Dichte (OD)-Werte bei 450 nm wurde die Auswerte-Software SoftMax Pro5.3 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) verwendet.

Der ELISA basierte auf einem direkten Nachweis des gekoppelten Antikörpers und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Das hergestellte BSA-Antikörper-Konjugat wurde in einer Doppelbestimmung in zwei unterschiedlichen Konzentrationen, d. h., zu 1:20000 und 1:10000 in PBS-Coatingpuffer (70 mM, pH~7.6) verdünnt und auf eine Mikrotiterplatte (200 μ l pro Kavität) aufgetragen (*Coating*). Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Platte mit Parafilm abgedeckt und für ca. 14 h auf einem Mikrotiterplattenschüttler (750 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit Waschpuffer 3 \times gewaschen und ausreichend trockengeklopft. Vor Erstellung der Primär-Antikörper-Verdünnungsreihe, wurde die Primär-Antikörperlösung zunächst 1:1 mit Guardian_{TM} gemischt, um die Stabilität der Meerrettichperoxidase während der Reaktion aufrechtzuerhalten. Anschließend wurde die Antikörperlösung auf die benetzte Mikrotiterplatte (100 μ l pro Kavität) aufgetragen, und zwar mit einer Endverdünnung von 1:1000, 1:10000, 1:100000, im Block-Puffer (Probenauftragung + *Blocking*).

Nach einstündiger Inkubation erfolgte ein weiterer Waschschritt. Durch die Farbreaktion, verursacht durch die enzymatische Umsetzung des Substrats TMB (200 μl pro Kavität) (22 ml Citratpuffer (200 mM, $\text{pH}\sim 4.0$), 8.5 μl H_2O_2 und 575 μl TMB-Lösung)) wurde der fest an das BSA-Ziege-Anti-Maus-Konjugat gebundene Meerrettichperoxidase-markierte Primärantikörper nachgewiesen. Die Farbreaktion wurde unmittelbar nach der Farbentwicklung durch 1 M Schwefelsäure (100 μl pro Kavität) abgestoppt.

3.11.2 ELISA am BSA-Reporter-Antikörper-Konjugat

Es wurde ein direkter ELISA zum Nachweis des Sekundärantikörpers sowie zur Überprüfung seiner Funktionalität im BSA-RBITC-Antikörper-Konjugat durchgeführt. Zunächst wurde eine Konzentrationsreihe des hergestellten BSA-RBITC-Antikörper-Konjugats in einer Doppelbestimmung (1:1000 bis 1:6000-Verdünnung) in PBS-Coatingpuffer (70 mM, $\text{pH}\sim 7.6$) hergestellt. Diese Verdünnungen wurden dann auf die ELISA-Mikrotiterplatte (200 μl pro Kavität) aufgetragen. Die Inkubationszeit auf dem Mikrotiterplattenschüttler betrug 14 h. Anschließend wurde die Platte mit Waschpuffer ($3\times$) gewaschen. Vor Erstellung der Primärantikörper-Verdünnungsreihe wurde dieser zunächst 1:1 mit Guardian_{TM} und anschließend auf die gecoatete Mikrotiterplatte (100 μl pro Kavität) aufgetragen, und zwar in einer 1:1000 und 1:2000-Verdünnung (im Block-Puffer: 70 mM PBS, $\text{pH}\sim 7.6$, 0.1% Casein). Die Inkubationszeit betrug eine Stunde auf dem Schüttler. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschritt unter Verwendung von Waschpuffer ($3\times$). Zum Nachweis des Antikörper-Antigen-Komplexes wurde erneut eine TMB-Färbelösung auf die trockengekloppte ELISA-Platte (200 μl pro Kavität) aufgetragen. Bereits nach ~ 10 min färbte sich die Platte bläulich. Es wurde sofort mit 1 M H_2SO_4 -Lösung (100 μl pro Kavität) gestoppt und anschließend die optische Dichte bei 450 nm ausgelesen.

3.11.3 SERS: ELISA-Produkte und BSA-Reporter-Antikörper-Konjugat

Für die SERS-Detektion der ELISA-Kopplungsprodukte wurden jeweils 20 μl aus einer Kavität (1:1000-Verdünnung des Konjugats) der Mikrotiterplatte herauspipettiert und anschließend zu 200 μl einer präaggregierten Au-NP-Lösung pipettiert. Die Detektion des TMB²⁺-haltigen Kopplungsprodukts erfolgte unter präresonanten Bedingungen bei 633 nm.

Für die SERS-Detektion des hergestellten BSA-RBITC-Antikörper-Konjugats wurden 2 μl der Konjugatlösung zu 20 μl einer präaggregierten Au bzw. Ag NP-Lösung (mit 300 mM NaCl) pipettiert und bei 785 nm untersucht.

4 Metall-Nanopartikel als Substrate für SERS-Sonden

Zur späteren Konstruktion von SERS-Hybridsonden, deren Grundgerüst aus nanopartikelulären Au und Ag SERS-Substraten bestehen soll, wurden zunächst die optischen Eigenschaften der verschiedenartig hergestellten Au und Ag NP mittels UV/Vis-Spektroskopie und DLS untersucht. Da die Nanopartikel später mit Reporter-Molekülen versehen werden sollen, spielt der Einfluss zwischen SERS-Substrat und Reporter-Molekül eine bedeutende Rolle, insbesondere wenn die Nanopartikel später gekoppelt an Biomoleküle innerhalb der biologischen Matrix vorliegen und mit ihnen bestimmte Analyten detektiert werden sollen.

Aus diesem Grund sollte anhand von SERS-Experimenten die Wechselwirkung zwischen den hergestellten SERS-Substraten und einem Modell-Analyten, dem Adenin, untersucht werden, wobei zunächst die Spektren hinsichtlich qualitativer Merkmale untereinander verglichen wurden. Weiterhin wurden in Raman-Experimenten die verschiedenen NP hinsichtlich ihrer SERS-Aktivität in Gegenwart des Adenins untersucht. Die Untersuchungen sollten dazu dienen, um aus der Vielzahl hergestellter SERS-Substrate die geeigneten herauszustellen, die für weitere Experimente und zur Konstruktion von SERS-Sonden dienen sollten. Es erfolgten anschließend nähere Untersuchungen zu den plasmonischen Eigenschaften der ausgewählten NP in unterschiedlichen physiologischen Medien bzw. Puffern, um das Ausmaß der Aggregation sowie deren Stabilität innerhalb der Medien zu überprüfen. Diese Medien stellten eine extrazelluläre Modell-Umgebung dar. Ein weiterer Aspekt, der in diesem Abschn. diskutiert wird, ist die Untersuchung der Detektionsempfindlichkeit beider ausgewählter SERS-Substrate in Gegenwart geringer Analytkonzentrationen ($<10^{-5}$ M). Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe des Testanalyten Adenin in Abhängigkeit ihres Aggregationszustandes, induziert durch verschiedene Salzkonzentrationen, durchgeführt. Eine nähere Charakterisierung der ausgewählten Au und Ag NP sollte durch Bestimmung der Partikelgrößenverteilung und deren Morphologien mittels TEM-Bildgebung erfolgen.

4.1 Untersuchung der plasmonischen Eigenschaften der Au und Ag NP

Die wichtigsten Parameter, die die Größe und Form und somit die plasmonischen Eigenschaften von Nanopartikeln beeinflussen können, sind die Art des Metalls, das Reduktionsmittel sowie die Konzentration der in Lösung befindlichen Metallionen. Es wurden verschiedene Syntheseprotokolle angewendet und die NP hinsichtlich dieser Eigenschaften untersucht. Um zunächst zu überprüfen, dass es sich bei den hergestellten Au und Ag NP um Nanostrukturen mit plasmonischen Eigenschaften handelt, wurden die Nanopartikel-Suspensionen mittels UV/Vis-Spektroskopie und DLS untersucht. Abb. 4.12 und 4.13 zeigen die gemessenen Extinktionsspektren jeweils für die Au und Ag Nanopartikelösungen, deren Plasmonenresonanzen sich voneinander in der Position des Extinktionsmaximums (λ_{max}), Kurvenform und Halbwertsbreite (FWHM) unterscheiden.

Bis auf die Au NP-Syntheseprotokolle (B) und (E) sind alle weiteren Extinktionskurven unimodal. Die Bimodalität lässt sich dadurch begründen, dass unterschiedliche Partikelgrößenpopulationen in der Nanopartikelösung vorhanden sind. Ebenfalls bestätigen lässt sich das durch die DLS-Spektren, die überwiegend bimodale Verteilungen aufzeigen. In

Tabelle 4.3 und 4.4 sind die Charakteristika (λ_{max} , FWHM, PDI) der Au und Ag Nanopartikel zusammenfassend dargestellt. Vergleicht man die aus SERS-Messungen ermittelten relativen Signalintensitäten mit der FWHM und dem Polydispersionsindex, so ist zu erkennen, dass die Nanopartikelproben mit hohem PDI hohe SERS-Signalintensitäten zeigen. Diese Beobachtung lässt sich auch bei den Ag Nanopartikeln machen. Auffallend ist allerdings, dass zu große Ag Nanopartikel sich wiederum schlecht auf die relative Signalintensität auswirken können (vergleiche (b) und (c)). Dies bestätigt die Tatsache, dass Nanopartikel im Bereich 10 bis 80 nm geeignete Substrate zur Oberflächenverstärkung sind.

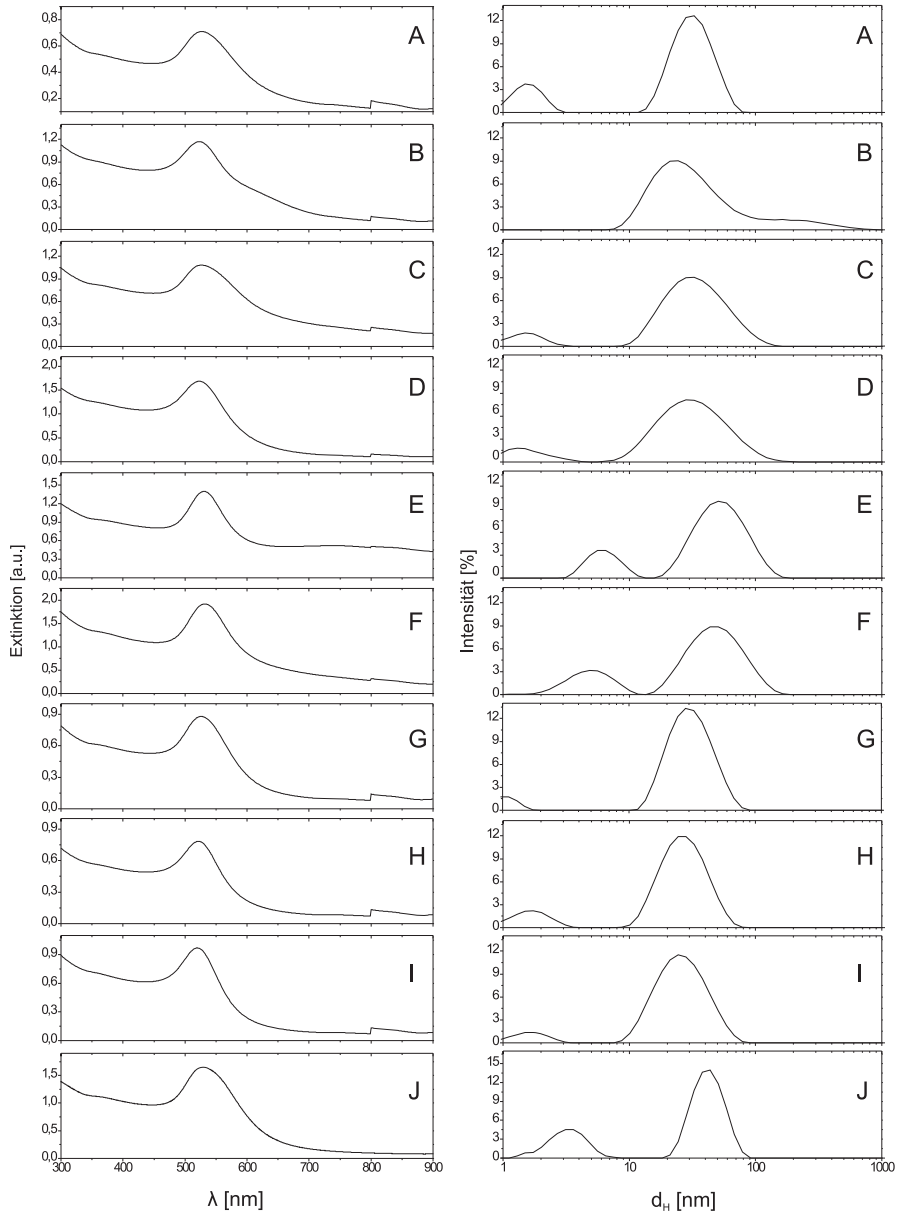


Abbildung 4.12: links. UV/Vis-Spektren der unterschiedlich hergestellten Au Nanopartikel. rechts. DLS-Spektren der Au Nanopartikel.

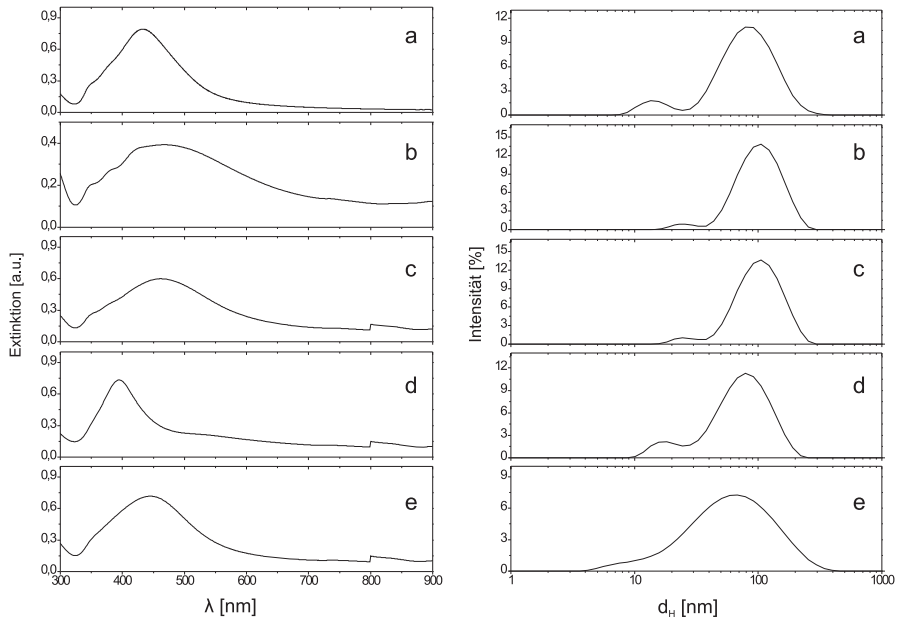


Abbildung 4.13: links. UV/Vis-Spektren der unterschiedlich hergestellten Ag Nanopartikel. rechts. DLS-Spektren der Ag Nanopartikel.

Tabelle 4.3: Charakteristika (aus ^aUV/Vis und ^bDLS) der unterschiedlich hergestellten Au Nanopartikelsuspensionen. Parameter: λ_{max} = Position des Extinktionsmaximums. FWHM= Halbwertsbreite. d_H = Hydrodynamischer Durchmesser. PDI= Polydispersionsindex. I_{SERS} = rel. SERS-Signalintensität.

| Au Kolloid | λ_{max}^a [nm] | FWHM ^a [nm] | d_H Peak I ^b [nm] | d_H Peak II ^b [nm] | PDI ^b | I_{SERS} ohne NaCl [cps] | I_{SERS} 10 mM NaCl [cps] | I_{SERS} 100 mM NaCl [cps] |
|------------|------------------------|------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| A | 526±2 | 110±2 | 33±0.6 | 2±0.6 | 0.6 | 1055±50 | 761±40 | 30±2 |
| B | 523±2 | 84±2 | 46±0.6 | n.b. ¹ | 0.4 | 358±20 | 30±2 | n.b. |
| C | 526±2 | 120±2 | 38±0.6 | 2±0.6 | 0.5 | 294±15 | 162±8 | 20±1 |
| D | 523±2 | 74±2 | 37±0.6 | 1±0.6 | 0.5 | n.b. | 87±4 | n.b. |
| E | 530±2 | 70±2 | 57±0.6 | 6±0.6 | 0.5 | 368±20 | 570±30 | 60±3 |
| F | 532±2 | 90±2 | 53±0.6 | 5±0.6 | 0.6 | 1549±80 | 821±40 | n.b. |
| G | 530±2 | 70±2 | 57±0.6 | 6±0.6 | 0.5 | n.b. | 189±10 | n.b. |
| H | 532±2 | 90±2 | 53±0.6 | 5±0.6 | 0.6 | 14±1 | 11±1 | 30±2 |
| I | 526±2 | 89±2 | 32±0.6 | 1±0.6 | 0.3 | 1079±50 | 278±14 | n.b. |
| J | 530±2 | 117±2 | 41±0.6 | 3±0.6 | 0.6 | 1085±50 | 1552±80 | 150±8 |

Tabelle 4.4: Charakteristika (aus ^aUV/Vis und ^bDLS) der unterschiedlich hergestellten Ag Nanopartikelsuspensionen. Parameter: λ_{max} = Position des Extinktionsmaximums. FWHM= Halbwertsbreite. d_H = Hydrodynamischer Durchmesser. PDI= Polydispersionsindex. I_{SERS} = rel. SERS-Signalintensität.

| Ag Kolloid | λ_{max}^a [nm] | FWHM ^a [nm] | d_H Peak I ^b [nm] | d_H Peak II ^b [nm] | PDI ^b | I_{SERS} 100 mM NaCl [cps] |
|------------|------------------------|------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------|------------------------------|
| a | 432±2 | 135±2 | 80±0.6 | 14±0.6 | 0.3 | 942±50 |
| b | 467±2 | 164±2 | 102±0.6 | 23±0.6 | 0.2 | 9±1 |
| c | 462±2 | 201±2 | 100±0.6 | 22±0.6 | 0.2 | 51±3 |
| d | 394±2 | 68±2 | 78±0.6 | 17±0.6 | 0.3 | 80±4 |
| e | 444±2 | 156±2 | 64±0.6 | n.b. ¹ | 0.4 | 169±9 |

¹ n.b.: nicht bestimmbar, da Peak nicht vorhanden

4.2 Untersuchung qualitativer spektraler Merkmale am Testanalyten Adenin

Um die qualitativen spektralen Merkmale von auf unterschiedlichen SERS-Substraten gemessenen Analyten zu untersuchen, wurden die hergestellten Au und Ag NP in Gegenwart eines Modellanalyten, der DNA-Base Adenin, untersucht. Das verschiedenartige Adsorptionsverhalten des Adenins in Abhängigkeit seiner verwendeten Konzentration an diversen SERS-Substraten (Nanopartikel, Inselfilme, elektrochemisch aufgeraute Elektroden [150]) wurde bereits in der Literatur in Form theoretischer Berechnungen und experimenteller Daten beschrieben, und ist der Grund dafür, dass SERS-Spektren sich voneinander hinsichtlich der Bandenlage und -intensität unterscheiden können [151–153]. Die Adsorption des Analyten auf einer Ag Nanopartikeloberfläche erfolgt dabei bei hohen Adeninkonzentrationen senkrecht via N7 und der exozyklischen Aminogruppe.

Abb. 4.14 zeigt die nach Giese [151] (a) theoretisch und (b) experimentell ermittelten Raman-Spektren polykristallinen Adenins sowie (c) die gemessenen SERS-Spektren einer 10^{-5} M Adeninlösung in Gegenwart von Ag NP. Auffallend ist, dass sich im theoretisch berechneten Raman-Spektrum (a) einige Moden in der Signalintensität von denen im experimentell bestimmten Raman-Spektrum (b) unterscheiden. Dennoch können die theoretisch berechneten Moden als Vergleichsgrundlage dienen, da die Bandenpositionen mit den experimentellen Daten gut übereinstimmen. Vergleicht man das SERS-Spektrum der mit Ag NP gemessenen Adeninlösung (c), so wird deutlich, dass mehrere Moden hinsichtlich ihrer Lage um bis zu 20 cm^{-1} im Vergleich zu ihren korrespondierenden Wellenzahlwerten im Raman-Spektrum des polykristallinen Adenins abweichen (vgl. Bande 1248 cm^{-1} in (b) mit Bande bei 1268 cm^{-1} in (c)). Ein weiterer Unterschied zwischen den SERS- und Raman-Spektren besteht darin, dass Raman-Moden (Ag-N Streckschwingungen) im Wellenzahlbereich zwischen 220 und 250 cm^{-1} im verstärkten Spektrum auftreten, die spezifisch für eine Molekül-Metallbindung sind [154].

Abb. 4.15 zeigt die an unterschiedlichen Au (A-J) und Ag Nanopartikeln (a-e) gemessenen Adeninspektren (siehe Tab. 4.5). Zu erkennen ist, dass sich die SERS-Spektren von Adenin an Au und Ag NP hinsichtlich ihrer Signalintensitäten deutlich voneinander unterscheiden, d. h., die Verstärkungseigenschaften der verschiedenen SERS-Substrate unterscheiden sich voneinander.

Das verschiedenartige Adsorptionsverhalten von Adenin auf den unterschiedlichen Au SERS-Substraten ist an der Form der Ring-Atemschwingung zu erkennen, die in Spektrum (C) und (E) eine Schulter aufweist. Dieses Phänomen konnte auch in TERS-Messungen von Adenin auf einer Au (111)-Oberfläche beobachtet werden [154]. Eine Entstehung dieser Schulter lässt sich womöglich darauf zurückführen, dass das Adeninmolekül verstärkt mit der Au NP-Oberfläche interagiert. Geringe Änderungen in der Position und Breite der Ring-Atemschwingung könnten einerseits auf einer Änderung der Adsorptionsgeometrie des Adeninmoleküls beruhen; andererseits ließe sich das Phänomen auch durch eine Veränderung in der molekularen Struktur des Adenins durch Protonierung am N7 oder Enol-Keto-Isomerisierung zurückführen [155]. Die Änderung der Adsorptionsgeometrie des Adenins könnte auch dadurch erklärbar sein, dass diesem an der Oberfläche von Au Kolloid (E) ein größerer Raum wegen weniger auf der Oberfläche befindlicher Citratliganden (vgl. Tab. 3.1) zur Verfügung steht und somit eine intensivere Interaktion mit der Oberfläche zulässt. Jedoch müsste dieses Phänomen auch in Gegenwart anderer Au NP

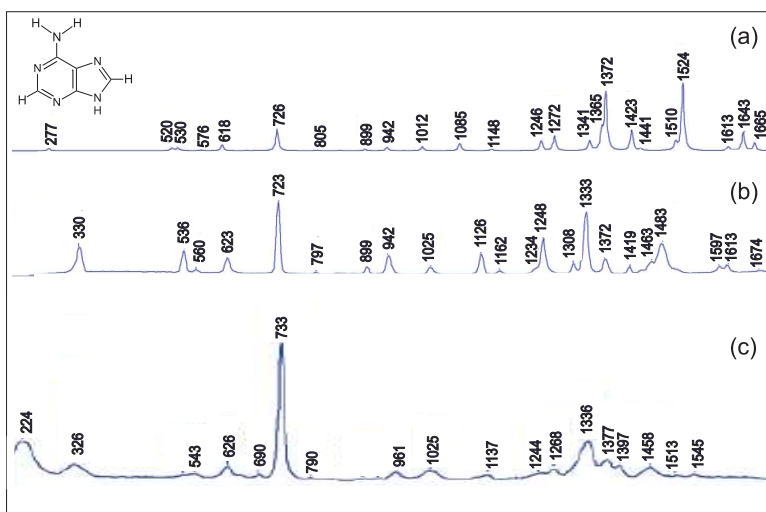


Abbildung 4.14: (a) Theoretisch berechnetes und (b) experimentell ermitteltes Raman-Spektrum von polykristallinem Adenin nach Giese [151]. (c) SERS-Spektrum einer 10^{-5} M Adeninlösung, die an Ag NP gemessen wurde. Anregungswellenlänge: 632 nm; Laserleistung: 4 mW; Akkumulationszeit: 10 s.

wie in (F) beobachtbar sein, das den zweitniedrigsten Citratüberschuss aufzeigt. Ebenfalls konnte eine Aufspaltung der Ring-Atemschwingung auch bei Ag Kolloid (b) durch das Auftreten einer Bande bei 727 und 744 cm^{-1} beobachtet werden. Vergleicht man die SERS-Spektren von Adenin für Ag NP, so war mit Ausnahme von Ag Kolloid (a), eine Detektion von Adenin unter nicht-resonanten Bedingungen bei allen Ag Kolloiden nur unter Verwendung einer hochkonzentrierten Salzlösung (100 mM) möglich.

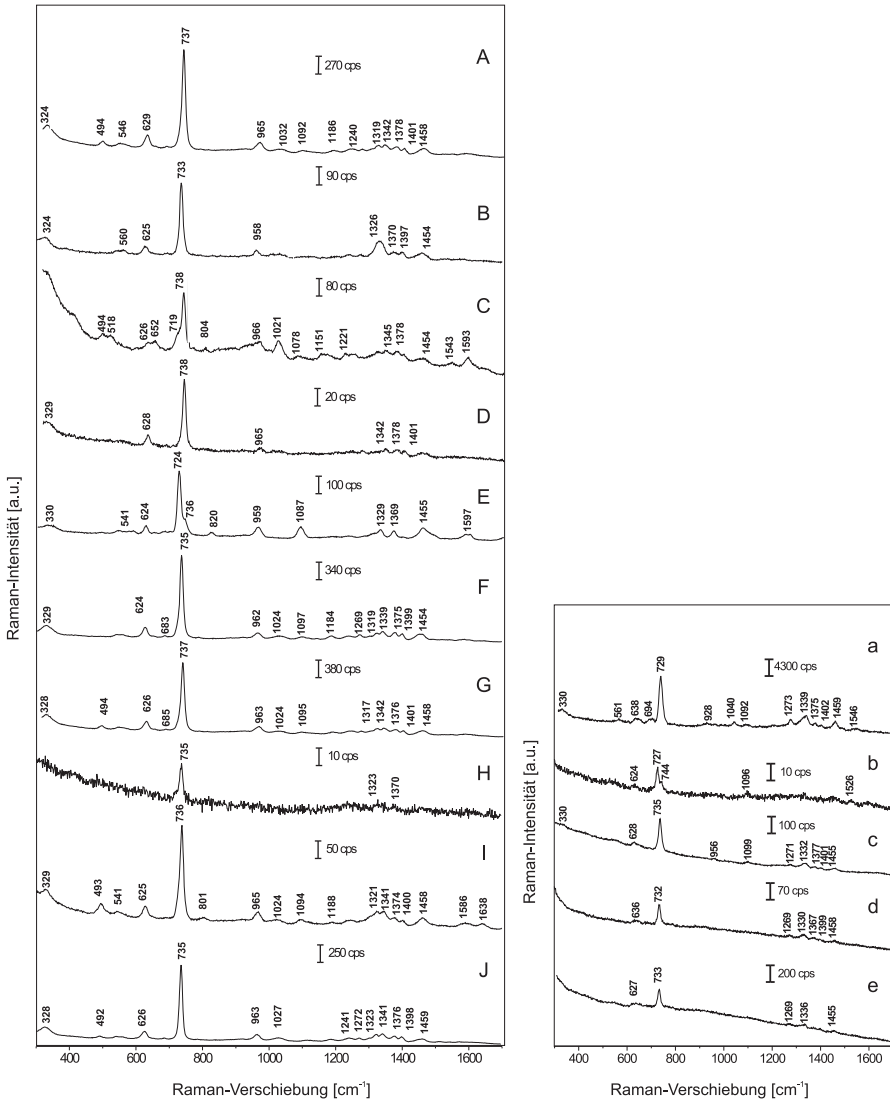


Abbildung 4.15: SERS-Spektren von 10^{-5} M Adenin an verschiedenen Au Nanopartikeln (A-J) und Ag Nanopartikeln (a-e). Anregungswellenlänge: 785 nm; Anregungsintensität: $8 \cdot 10^4$ W/cm²; Akkumulationszeit: 1 s.

Tabelle 4.5: Adenin-Moden und deren Zuordnungen. bend: Biegeschwingung; wag: Kippschwingung; breath: Atemschwingung; def: Deformationsschwingung; rock: Schaukelschwingung; sciss: Scherenschwingung; st: Streckschwingung; sqz group: Verdrängungsgruppe. tor: Torsionsschwingung.

| Mode _{N,RS} [cm ⁻¹] | Mode _{S,RS} [cm ⁻¹] (Ag Kolloid) | Mode _{S,RS} [cm ⁻¹] (Au Kolloid) | Zuordnungen nach [151, 156-160] |
|--|---|---|---|
| 330 | 329 | 326 | bend C6-NH ₂ |
| — | — | 491 | bend C6-NH ₂ |
| 504 | — | — | wag N9-H, tor NH ₂ |
| 536 | — | 545 | def R6 (sqz group N1-C6-C5, C2-N3-C4) |
| 560 | 562 | — | wag C2-H, N9-H |
| 623 | 638 | 625 | def R6 (sqz group C4-C5-C6, N1-C6-N10), |
| — | — | 683 | def R6 (sqz group C4-C5-C6, N1-C6-N10), |
| 723 | 735 | 735 | Ring-Atemschwingung (verdreht) |
| 797 | 789 | 787 | def R6 (wag C4-C5-C6), wag C8-H |
| — | — | 811 | def R6 (wag C4-C5-C6), wag C8-H |
| 839 | — | — | wag C8-H |
| 899 | — | — | def R6 (sqz group N1-C2-N3), R5 (st C5-N7) |
| 942 | 928 | — | def R6 (sqz group N1-C2-N3), R5 (st C5-N7) |
| — | — | 965 | def R5 (sqz group N7-C8-N9) |
| 1025 | 960 | 1029 | def R5 (sqz group N7-C8-N9) |
| — | 1013 | 1089 | rock NH ₂ |
| 1126 | — | — | rock NH ₂ |
| 1162 | 1138 | — | st C8-N9, A bend N9-H, C8-H, |
| — | 1197 | 1183 | bend C8H, N10-H11, st C4-N9, N3-C4, C6-N10 |
| — | 1203 | — | bend C8H, N10-H11, st C4-N9, N3-C4, C6-N10 |
| 1234 | — | 1240 | bend C8H, N10-H11, st C4-N9, N3-C4, C6-N10 |
| 1248 | 1273 | 1272 | rock NH ₂ , st C5-N7, N1-C2, C2-N3 |
| 1308 | — | 1320 | bend C8-H, N9-H, st N7-C8 |
| 1333 | 1337 | 1341 | st C2-N3, N1-C2, C5-C6, C5-N7 |
| 1372 | 1376 | 1375 | st C5-N7, N1-C2, bend C2-H, C8-H, |
| 1419 | 1402 | 1399 | bend C2-H, N9-H, st C8-N9, C4-N9 |
| 1463 | 1459 | 1455 | st C4-N9, C4-C5, C6-N10, N7-C8, bend C2-H |
| — | — | — | st C2-N3, N1-C6, bend C2-H, sciss NH ₂ |
| — | 1551 | — | st N7-C8, bend C8-H, sciss NH ₂ |
| 1597 | — | 1598 | st N3-C4, N1-C6, C5-N7, N7-C8, bend N9-H* |
| 1613 | — | — | sciss NH ₂ |
| — | 1635 | — | st N3-C4, N1-C6, C5-N7, N7-C8, bend N9-H |
| 1674 | — | — | sciss NH ₂ , st C6-N10, C5-C6 |

4.3 Bestimmung der SERS-Aktivität der Nanopartikel

Zur empfindlichen Detektion geringer Analytkonzentrationen ($\sim\mu\text{M}$ -Bereich) müssen die plasmonischen Eigenschaften von Au und Ag Nanopartikeln sowie deren verstärkenden Eigenschaften in Gegenwart von Analyten untersucht und optimiert werden.

Für die Bestimmung der relativen SERS-Aktivität und Empfindlichkeit der Au und Ag Kolloide wurde die relative Intensität der Ring-Atemschwingung des Adenins bei $\nu=735\text{ cm}^{-1}$ anhand der Spektren ermittelt und untereinander verglichen. Diese Untersuchung sollte dazu dienen, um für zukünftige Raman-Experimente das geeignetste Kolloid herauszufinden, das eine besonders sensitive SERS-Detektion unter Verwendung möglichst geringer Analytkonzentrationen gewährleistet. Abb. 4.16 zeigt die relativen Signalintensitäten der Adeninspektren, die durch die unterschiedlich hergestellten Au Nanopartikellösungen detektiert wurden. Eine Detektion von 10^{-5} M Adeninslösung war an allen Au Kolloiden mit Ausnahme von Au Kolloid (D) und (G) möglich. Am empfindlichsten konnte Adenin mit einer Konzentration von $c\sim 10^{-7}\text{ M}$ an Au (J), (C) und (E) detektiert werden.

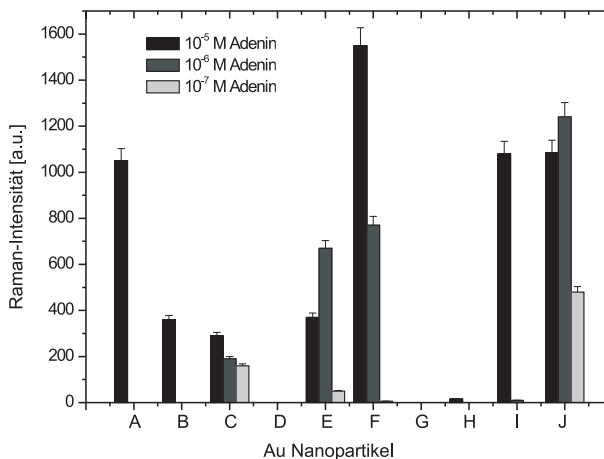


Abbildung 4.16: Relative SERS-Intensitäten der Ring-Atemschwingung bei $\sim 735\text{ cm}^{-1}$, die mit den unterschiedlich hergestellten Au Nanopartikeln bestimmt wurden.

Um herauszufinden, ob sich in Gegenwart einer Salzlösung die Detektionsfähigkeit bei geringer Analyt-Konzentration verbessert, wurden die Au- und Ag Nanopartikellösungen mit Salzlösung aktiviert und anschließend Adeninslösung beigemischt. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigt Abb. 4.17 und Abb. 4.18. Vergleicht man die Au NP-Lösungen in ihrer Fähigkeit sehr geringe Konzentrationen an Adenin gut verstärken zu können, so weist das Au Kolloid (J) die bestverstärkenden Eigenschaften neben Au Kolloid (E) und Au Kolloid (G) auf.

Wie in Abschn. 4.2 erwähnt, ließen sich Adeninspektren an den Ag Nanopartikeln mit Ausnahme von Ag (a) nur in Gegenwart einer sehr hohen Salzkonzentration (100 mM)

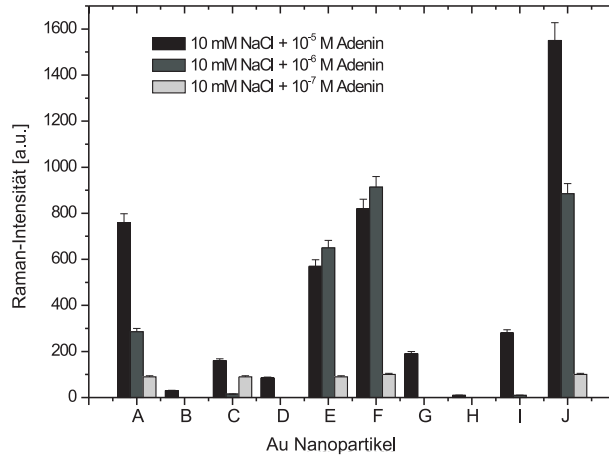


Abbildung 4.17: Relative SERS-Intensitäten der Ring-Atemschwingung bei $\sim 735 \text{ cm}^{-1}$, die mit den unterschiedlich hergestellten Au Nanoaggregaten (induziert durch 10 mM NaCl) bestimmt wurden.

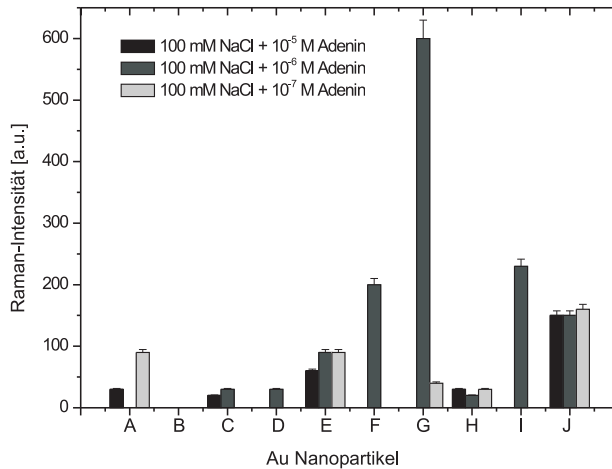


Abbildung 4.18: Relative SERS-Intensitäten der Ring-Atemschwingung bei $\sim 735 \text{ cm}^{-1}$, die mit den unterschiedlich hergestellten Au Nanoaggregaten (induziert durch 100 mM NaCl) bestimmt wurden.

detektieren. Abb. 4.19 zeigt deutlich, dass das Ag Kolloid (a) verglichen mit den anderen Ag Nanopartikeln die höchsten relativen Raman-Intensitäten aufweist, gefolgt von

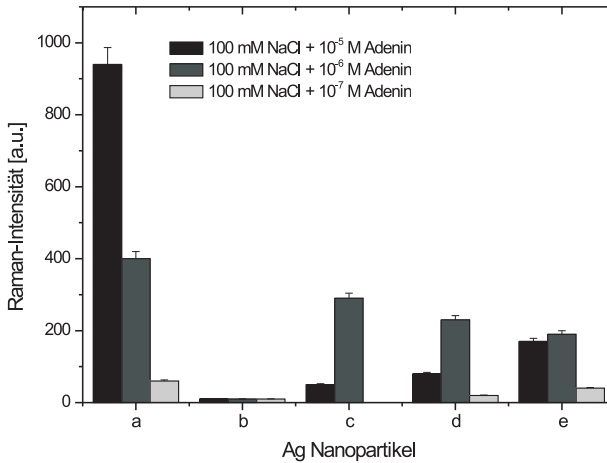


Abbildung 4.19: (Relative SERS-Intensitäten der Ring-Atemschwingung bei $\sim 735\text{ cm}^{-1}$, die mit den unterschiedlich hergestellten Ag Nanoaggregaten (induziert durch 100 mM NaCl) bestimmt wurden.

(e), (d), (c) und (b). Ag Kolloid (a) und Au Kolloid (J) werden wegen der genannten positiven Eigenschaften für weitere Untersuchungen berücksichtigt.

4.4 Nähere Charakterisierung der ausgewählten Au und Ag NP

Um eine Aussage darüber treffen zu können, wie gut ein SERS-Substrat verstärkt, ist die Bestimmung seines Verstärkungsfaktors (*Enhancement Factor*, EF) von großer Bedeutung. Die Prozedur zur Bestimmung des Verstärkungsfaktors mit Hilfe des Adenins zeigt, dass infolge des Adenins die Au und Ag NP Nanoaggregate ausgebildet haben, mit denen sich ein Verstärkungsfaktor von 10^6 ergibt. Dieser ist in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur ermittelten Verstärkungsfaktoren für Au und Ag Nanopartikel und impliziert, dass Nanoaggregate bessere Verstärkungseigenschaften haben [161]. Um die plasmonischen Eigenschaften der beiden SERS-Substrat-Kandidaten näher zu untersuchen, wurden die Nanopartikel zur Aggregation mit Hilfe von NaCl gebracht. Das NaCl hat ebenfalls bei SERS-Untersuchungen in lebenden Zellen Wirkung, da es ein Bestandteil von Phosphatpuffern ist und das Aggregationsverhalten von Nanopartikeln beeinflussen kann. Abb. 4.20 zeigt die unterschiedlichen Aggregationsstadien der Au und Ag Nanopartikel-suspensionen bei Verwendung verschiedener NaCl-Konzentrationen (10, 30 und 100 mM NaCl). Nach der Mie-Theorie [84] entspricht die zweite Plasmonenbande der longitudinalen Schwingung der elektromagnetischen Welle durch die lange Achse der Nanopartikel, was auf die Existenz von Partikelaggregaten hindeutet. Im Extinktionsspektrum deutet sich dieses Phänomen als erweiterte, rot verschobene Plasmonenbande (blaue Kurven in Abb. 4.20) an [91, 162]. Abb. 4.21 zeigt das Aggregationsverhalten der Au und Ag NP in drei verschiedenen Puffern. Beide SERS-Substrate zeigen ein ähnliches Aggregationsver-

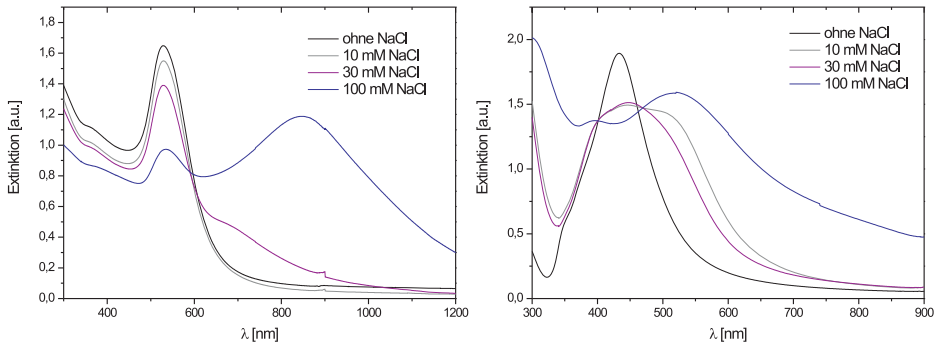


Abbildung 4.20: UV/Vis-Spektren der Au NP (links) und UV/Vis-Spektren der Ag NP (rechts) bei verschiedenen Salzkonzentrationen.

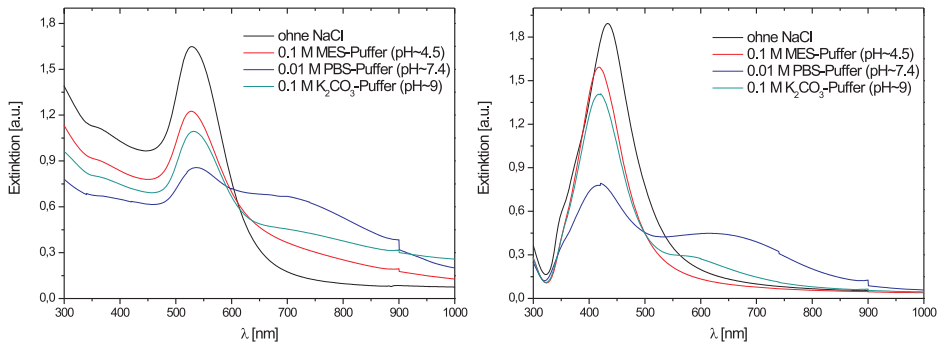


Abbildung 4.21: UV/Vis-Spektren der Au NP (links) und UV/Vis-Spektren der Ag NP (rechts) in verschiedenen Puffern.

halten sowohl in K₂CO₃-Puffer als auch in PBS-Puffer auf. Eine größere Ladungsdestabilisierung der NP in PBS-Puffer lässt sich auf das darin vorhandene NaCl zurückführen, während die Carbonatanionen eine geringere Ladungsdestabilisierung der Helmholtzhülle induzieren. In MES-Puffer hingegen bleiben die Au und Ag Nanopartikel stabil und bilden wenig Aggregate aus. Um den Einfluss der unterschiedlich erzeugten Aggregate auf die Raman-Verstärkung zu untersuchen, wurden die Nanopartikel in unterschiedlichen Aggregationszuständen zusammen mit dem Testanalyten Adenin untersucht. Abb. 4.22 zeigt die gemessenen Adeninspektren von beiden Substraten. Zu erkennen ist, dass es bei gleicher NaCl-Konzentration (siehe: 100 mM NaCl) Unterschiede in der Signalverstärkung auf Au und Ag NP gibt (vgl. (d) mit (d')). Im Gegensatz zu den Ag Nanopartikeln führt die mit 30 mM NaCl induzierte Aggregation zu besseren Signalen als bei den Ag NP. Ur-

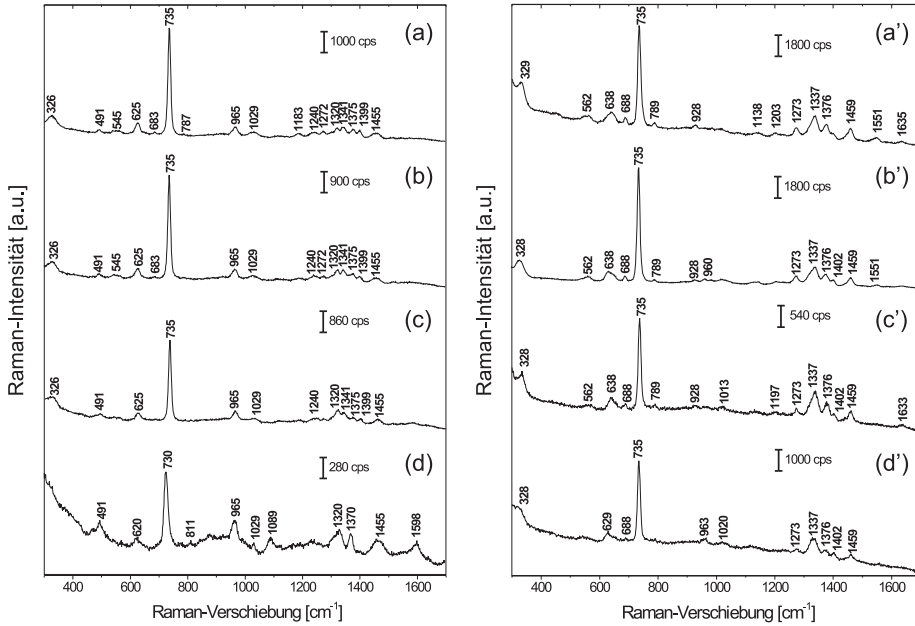


Abbildung 4.22: SERS-Spektren von Adenin (10^{-5} M) an Au NP (links) und Ag NP (rechts). (a)-(d): ohne NaCl, mit 10, 30, und 100 mM NaCl für Au NP und (a')-(b'): ohne NaCl, mit 10 mM NaCl, 30 mM NaCl und 100 mM NaCl für Ag NP. Anregungswellenlänge: 785 nm. Anregungsintensität: $8 \cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$. Akkumulationszeit: 1 s.

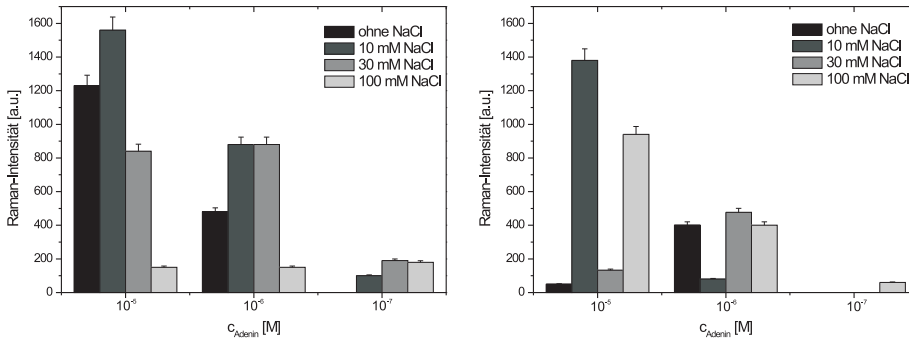


Abbildung 4.23: Relative SERS-Intensitäten der Ring-Atemschwingung bei $\sim 735 \text{ cm}^{-1}$, die mit den beiden ausgewählten Au und Ag Nanopartikellösungen bei verschiedenen NaCl- und Adeninkonzentrationen bestimmt wurden.

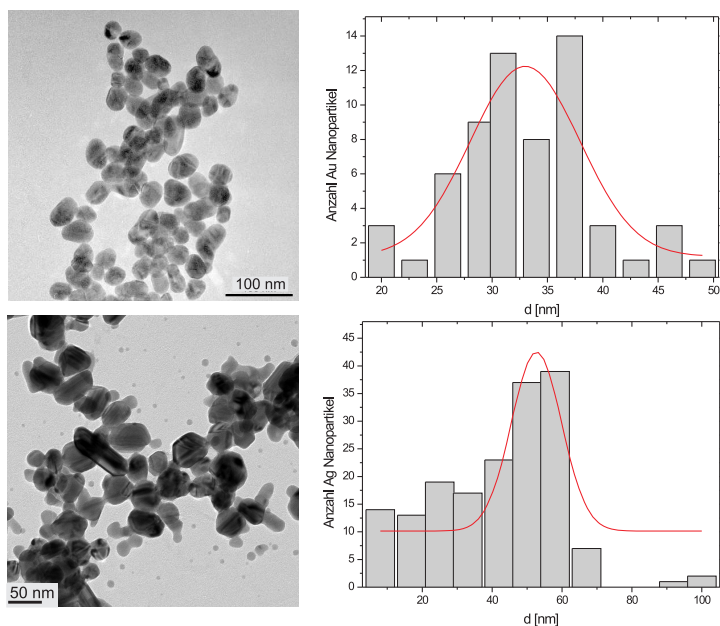


Abbildung 4.24: oben. TEM-Aufnahme und Histogramm der Au NP-Größen. unten. TEM-Aufnahme und Histogramm der Ag NP-Größen. Beschleunigungsspannung: 200 kV.

sache für das verschiedenartige Verstärkungsverhalten könnte die Oberflächenbedeckung von Citratliganden auf kolloidalem Au und Ag sein (vgl. molaren Citratüberschuss bei beiden Substraten in Abschn. 3.2).

Neben UV/Vis- und SERS-Untersuchungen wurden TEM-Aufnahmen der beiden nanopartikelulären SERS-Substrate (siehe Abb. 4.24) erstellt, da die DLS-Methode nur grobe Abschätzungen zur Partikelgröße liefert. Andererseits kann die auftretende bimodale Verteilung, die auch Partikelgrößen um die 3 nm aufzeigt, nicht mittels TEM aufgelöst werden. Es lässt sich aus der Kombination beider Methoden erschließen, dass sich unterschiedliche Partikelgrößen finden lassen, die sich jedoch hinsichtlich der SERS-Aktivität positiv auswirken (siehe Abb. 4.23). Das Histogramm zeigt die aus der TEM-Aufnahme bestimmten Partikelgrößen für sphärische Au NP im Bereich von 20 bis 50 nm. Bei Ag NP treten neben sphärischen Partikeln zusätzlich Partikel mit stabchenförmiger Morphologie auf, weshalb ein Partikelgrößenintervall zwischen 10 und 100 nm anzutreffen ist. Beide SERS-Substrate kommen aufgrund ihrer verstärkenden Eigenschaften für weitere Experimente in Frage, da zum einen deren Partikelgröße für intrazelluläre Untersuchungen geeignet sind. Zum anderen lassen sich mit beiden SERS-Substraten (Au (J) und Ag (a)) geringe Konzentrationen an Analytmolekülen detektieren (siehe SERS-Untersuchungen von 10^{-7} M auf Au (J)). Somit befinden sich auf einer NP-Oberfläche (Au Nanopartikellösung mit durchschnittlicher NP-Größe von 33 nm) ca. 100 Adeninmoleküle, deren Signaturen sich empfindlich detektieren lassen.

4.5 Schlussfolgerungen: Auswahl der SERS-Substrate

Die Untersuchungen der nanopartikulären SERS-Substrate haben ergeben, dass sich in Gegenwart des Testanalyten Adenin SERS-Spektren, die qualitative Unterschiede aufzeigen, detektieren lassen. Ein Vergleich der relativen Signalintensitäten der SERS-Spektren von Adenin hat ergeben, dass das nach Lee/Meisel (modifiziertes Syntheseprotokoll) hergestellte Au Kolloid sowie das nach Munro hergestellte Ag Kolloid die besten Signalverstärkenden Eigenschaften aufzeigen. Vergleicht man die relativen Signalintensitäten der beiden Kolloide untereinander, so liefern die o. g. SERS-Substrate hohe Verstärkungsfaktoren (für Au und Ag NP: $EF \sim 10^6$). Eine Detektion geringer Molekülkonzentrationen in Gegenwart von Au- und Ag Nanoaggregaten im μM -Bereich ist somit möglich. Es ist bekannt, dass man durch eine induzierte Aggregation mit Salzlösung kleine Aggregate bestehend aus 2-3 Nanopartikeln generiert, und man hohe Verstärkungsfaktoren mit diesen erzielt. In Aggregationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Nanoaggregate, die mit den beiden ausgewählten Substraten durch Salzzugabe induziert wurden, höhere Signalintensitäten liefern als bei unaggregierten NP. Ferner bildeten die Nanostrukturen Nanoaggregate innerhalb der extrazellulären biologischen Umgebung, d. h., in PBS- und K_2CO_3 -Puffer aus. Da es möglich war, in Gegenwart von aggregierten Au und Ag NP geringe Analytkonzentrationen zu detektieren, bildeten die Nanoaggregate die Grundlage zur Konstruktion von NIR-SERS-Hybridsonden.

5 Reporter-Moleküle

Für die Konstruktion von SERS-Sonden und deren Verwendbarkeit innerhalb komplexer Biosysteme müssen geeignete Reporter-Moleküle, die eine hochspezifische Raman-Signatur bei nicht-resonanter Anregung (NIR-Bereich) liefern, untersucht werden. Die NIR-Anregung biologischer Systeme, wie beispielsweise Zellen oder Gewebe, hat den Vorteil, dass diese im Bereich zwischen 700-900 nm eine minimale NIR-Strahlungsabsorption aufzeigen. Dies erlaubt einerseits eine effiziente Penetration des Anregungslichts zur *in vivo*-Bildgebung, andererseits werden dadurch zum Raman-Effekt konkurrierende und störende Fluoreszenzeffekte, die durch die Autofluoreszenz von Zellen oder Geweben entsteht, unterbunden [163].

Ziel war es, zunächst die Wechselwirkung zwischen Reporter-Molekülen und den Nanopartikeln hinsichtlich auftretender Aggregation zu untersuchen, da diese Einfluss auf die NIR-SERS Anregung hat. Souza *et al.* [45] konnten beispielsweise zeigen, dass die Interaktion und hohe Affinität des Reporter-Moleküls Imidazol eine Aggregation von Au NP derart induziert, dass die Oberflächenplasmonenresonanz-Absorption sich in Richtung des langwelligen NIR-Spektralbereichs verschiebt und somit eine effiziente SERS-Detektion möglich macht [164]. Dabei spielt nicht nur die NIR-SERS-Aktivität von Reportern eine Rolle; vielmehr noch ist zur Konstruktion von multifunktionalen nanopartikulären SERS-Sonden, die nicht nur die Signatur des an sie gebundenen Reporter-Moleküls wiedergeben, sondern gleichzeitig intrinsische Informationen biomolekularer Strukturen liefern, eine empfindliche Detektion erforderlich. Eine empfindliche Detektion ist nur dann gewährleistet, wenn sich Reporter-Moleküle in geringen Konzentrationen, d. h., besonders sensitiv detektieren lassen. Aufgrund dessen sollten verschiedene Reporter-Moleküle hinsichtlich ihrer empfindlichen Detektierbarkeit bei geringen Konzentrationen in Gegenwart von Nanopartikeln untersucht werden. Dies unterscheidet sie von konventionellen *Tags*, die ausschließlich die Signatur des Reporter-Moleküls, vowiegend beim oberflächenverstärkten resonanten Raman-Effekt (SERRS), d. h., bei der zum elektronischen Übergang resonanten Anregung der Moleküle, verstärken. Zwar wird dadurch meist eine viel empfindlichere Detektion erzielt, jedoch ist das Auslesen des molekularen Fingerabdrucks ausschließlich auf einen kleinen Anregungsbereich limitiert [23, 165–167]. Eine nicht-resonante Anregung hingegen verhindert eine photolytische Degeneration und Ausbleichen der Proben sowie des Reporter-Moleküls selbst und ermöglicht die freie Wahl der Anregungswellenlänge bzw. des Detektionsbereichs. Unter Verwendung einer ausgewählten Anregungswellenlänge können somit verschiedene Reporter-Spezies, die über einen großen Bereich Raman-Signaturen liefern, simultan detektiert werden [168]. In Experimenten, die einzig auf der resonanten Detektion von Reporter-Signaturen beruhen, sind die Reporter häufig Fluorophore [44, 169]. Nicht-fluorogene Systeme haben gegenüber Fluoreszenz-Labels ein höheres Potenzial zum spektralen Multiplexing aufgrund ihrer schmalen vibronischen Signatur [31, 170].

Um diese Systeme in biologischen Matrices untersuchen zu können, müssen diese innerhalb der physiologischen Umgebung stabil und biokompatibel sein. Es wurden deshalb systematische Untersuchungen verschiedener und strukturell sehr ähnlicher NIR-anregbarer Reporter-Moleküle in Abwesenheit und in Gegenwart der beiden nanopartikulären SERS-Substrattypen bestehend aus Au NP und Ag NP durchgeführt, um die auf unterschiedlichen Substraten gemessenen Raman-Signaturen hinsichtlich ihrer spektralen Variabili-

tät untereinander zu vergleichen. Ein systematischer Vergleich der Reporter-Signaturen in Gegenwart von Au und Ag Nanopartikeln unter Betrachtung der Signalstabilität sowie Diskussion spektraler Abweichungen sollte die Information zu deren chemischen Natur (in Gegenwart von Halidionen), d. h., zu deren molekularen Orientierung sowie strukturellen und elektronischen Eigenschaften, die sich in ihrer Raman-Signatur widerspiegelt, liefern. Insbesondere muss die Erkennung der Reporter-Signaturen gewährleistet sein und überprüft werden, um verlässliche Signaturen in Multiplexing-Applikationen verwenden zu können [171]. Molekül-Substratinteraktionen, die die plasmonischen Eigenschaften von nanopartikulären Substraten beeinflussen können, müssen ebenfalls mitberücksichtigt werden, da diese eine Ursache für spektrale Diskrepanzen bzw. Variabilitäten sein können. Eine systematische Untersuchung außerhalb des biologischen Systems ist zunächst notwendig um die Eignung und Stabilität von Reporter-gebundenen Nanopartikeln vor dem biologischen Untergrund, d. h., innerhalb biologischer Matrices beurteilen zu können.

5.1 Auswahl und Charakterisierung von Reporter-Molekülen

Im Folgenden werden die spektralen Merkmale der Reporter-Moleküle diskutiert und daraufhin untersucht, inwiefern diese die eingangs erwähnten Bedingungen erfüllen. Hierfür wurden die Raman-Signaturen der Reporter auf zwei verschiedenen SERS-Substraten bestehend aus Au und Ag NP untersucht. Um die Reporter später in komplexen Biosystemen einsetzen zu können, wurden die Au und Ag Nanopartikel in unterschiedlichen Aggregationszuständen in Gegenwart der Reporter-Moleküle untersucht. Durch die Verwendung verschiedener Salzkonzentrationen sollten dadurch unterschiedliche physiologische Bedingungen simuliert werden (vgl. Abschn. 4.4), denen die Nanopartikel ausgesetzt sind.

Abb. 5.25 zeigt die Strukturformeln der untersuchten Reporter-Moleküle. Neben Reporter-Fluorophoren (RBITC, FITC, AO, NB, SAF, CV) wurden auch nicht fluorogene Moleküle wie *p*ABT, *p*MBA, 2-NAT und DTNB in Gegenwart von Au und Ag NP untersucht.

Abb. 5.26 zeigt die Extinktionsspektren der Reporter bei einer Konzentration von $c \sim 10^{-5}$ M. Die Reporter-Moleküle weisen bei gleicher Konzentration verschiedene Extinktionswerte auf (siehe z. B. FITC), was auf der verschiedenartigen molekularen Struktur (Molekülaufbau des Farbstoffs selbst, Anzahl delokalisierten π -Elektronensysteme) der Reporter-Moleküle beruht. Zu erkennen ist, dass die Extinktionsmaxima der Reporter weit entfernt vom Nahinfrarot-Spektralbereich liegen, und die Anregungsfrequenz des Lasers in den Raman-Experimenten nicht mit den elektronischen Übergängen der molekularen Absorption der Reporter interferiert. Nilblau (NB) liegt der NIR-Absorption am nächsten, während *p*ABT ein Extinktionsmaximum im UV-Bereich aufzeigt.

Um die Wechselwirkung der unterschiedlichen Reporter-Moleküle in Gegenwart plasmonischer Nanostrukturen zu untersuchen, wurden verschiedene Mischungen von Reporter-Molekülen mit den beiden ausgewählten Au NP und Ag NP UV/Vis-spektroskopisch untersucht. Abb. 5.27 zeigt den Einfluss der Reporter jeweils in einer Au NP (links) und Ag NP-Suspension (rechts). Auffallend ist, dass RBITC und CV eine Aggregation der Au Nanopartikel, die durch die Ausprägung einer erweiterten Plasmonenbande (EPB) zustande kommt, induzieren. Dagegen zeigen die Reporter SAF und AO auf Au NP eine Abnahme der Extinktion sowie Verbreiterung der Extinktionskurve im Bereich von 650-900 nm. Die Aggregation der Au NP in Gegenwart von Kristallviolett ist intensiver

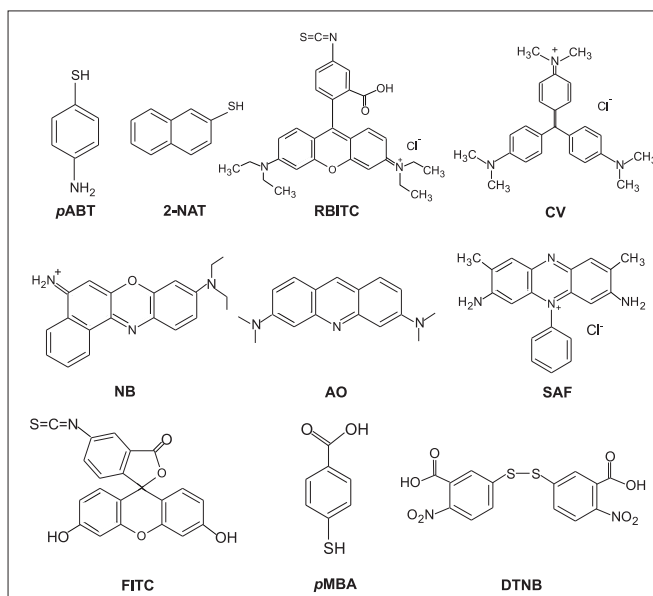


Abbildung 5.25: Strukturformeln der Reporter Moleküle. *p*ABT: *para*-Aminothiophenol. 2-NAT: 2-Naphthalenthiole. RBITC: Rhodamin(B)isothiocyanat. CV: Kristallviolett. NB: Nilblau. AO: Acridinorange. SAF: Safranin O. FITC: Fluoresceinisothiocyanat. *p*MBA: *para*-Mercaptobenzoessäure. DTNB: Dithionitrobenzoessäure.

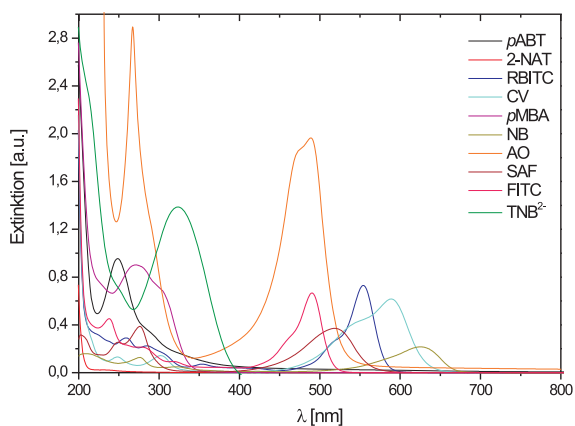


Abbildung 5.26: Extinktionsspektren der untersuchten Reporter-moleküle. Die Reporter wurden bei einer Konzentration von $c \sim 10^{-5}$ M untersucht.

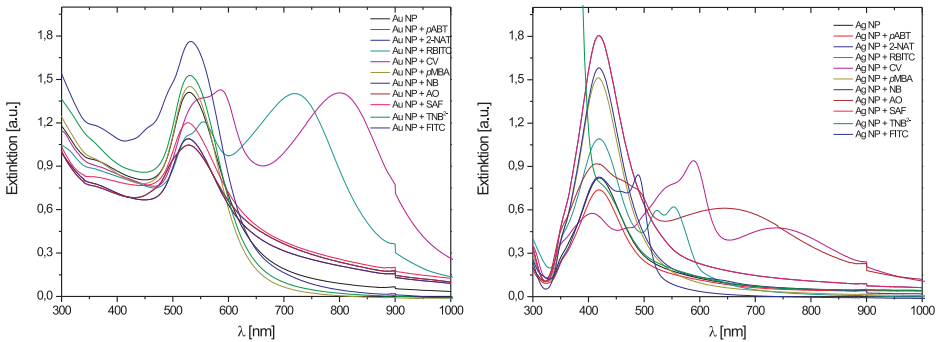


Abbildung 5.27: Extinktionsspektren der mit Raman-Reportern ($c \sim 10^{-5}$ M) inkubierten Au NP (links) und Ag NP (rechts).

als im Vergleich zu RBITC. Vergleicht man die Extinktionskurven mit denen für Ag NP, so fällt auf, dass unter gleichen Bedingungen bestimmte Reporter anders mit den Ag NP wechselwirken als mit den Au NP. Während DTNB (Aufspaltung in NTB^{2-} durch Adsorption an die Au NP Oberfläche) in der Au NP-Lösung keine Aggregation derer induziert [34, 172], führt die NTB^{2-} -Wechselwirkung auf der Ag-Oberfläche zu einer intensiven Aggregation, die zum Ausfallen der Ag NP führt. Im Vergleich zu den Au Nanopartikeln wird keine Aggregation bewirkt, obwohl die Thiobenzoationen (TNB^{2-}) des DTNB eine höhere Affinität zur Au-Oberfläche aufzeigen und selbstorganisierte Monoschichten ausbilden [173, 174]. Zur Ausprägung einer EPB kommt es jedoch bei den Reportern AO sowie dem CV in Gegenwart der Ag NP im Gegensatz zu den Au NP. Die Aggregation der Au und Ag NP durch das Kristallviolett bestätigt eine Wechselwirkung der CV-Moleküle mit den Nanopartikeln [175]. Vergleicht man die Extinktionsspektren der NP-CV-Mischungen mit den Spektren der Nanopartikelsuspensionen und der Farbstofflösung getrennt voneinander, so spiegeln die Spektren der NP-CV-Mischungen nicht die Summe aus den einzeln betrachteten Spektren nach Lambert-Beer wider [176], d. h., es liegt eine eindeutige Interaktion des CV-Moleküls mit den Substratoberflächen vor. Diese Interaktion (Ladungstransfer) entsteht bei der Ausbildung eines Donator-Akzeptor-Komplexes zwischen dem zentralen Carboniumion (C^+ Ion: Akzeptor) und den Ag bzw. Au NP (Elektronen-Donator) [177].

5.1.1 NIR-SERS Reportersignaturen

Um verlässliche reproduzierbare Reporter-Signaturen in Multiplexing-Applikationen verwenden zu können, muss hierfür zunächst deren spektrale Erkennung untersucht werden. Bei der Detektion von Raman-Signaturen müssen Reporter-Substratinteraktionen mit berücksichtigt werden, da diese Auslöser für Unterschiede wie z. B. Signalfuktuationen bzw. spektrale Variabilitäten sein können. Da Au und Ag Nanopartikel Raman-Signale

von Analyten unterschiedlich verstärken, sind qualitative bzw. quantitative Unterschiede zu erwarten. Deshalb wurden systematische Untersuchungen zum Vergleich der Reporter-Signaturen untereinander an verschiedenen Substraten durchgeführt.

Es wurden jeweils für Au NP und Ag NP neun verschiedene Reporter-Moleküle Raman-spektroskopisch untersucht und untereinander verglichen. Vor den SERS-Experimenten wurden Raman-Untersuchungen an 10^{-3} M Lösungen von Reporter-Molekülen durchgeführt. Da die Anregungswellenlänge nicht in Resonanz mit den elektronischen Übergängen gewählt wurde, konnten keine normalen Raman-Spektren gemessen werden. Die Konzentration der untersuchten Reporter in den kolloidalen Suspensionen betrug 10^{-5} M. Trotz der Tatsache, dass die Nanopartikel in Gegenwart bestimmter Reporter-Spezies eine Aggregation aufzeigten, blieben diese dennoch im Zeitraum der Raman-Untersuchungen stabil, und zwar in einem Intervall, das weit über dem der experimentellen Zeit (ca. 30 min) lag. Abb. 5.28 zeigt die SERS-Spektren (Akkumulationszeit: 1 s) bei nicht-resonanter Anregung. Es gibt zwei Reporter-Moleküle, die sich weder in Gegenwart von Au NP noch von Ag NP detektieren ließen. Im Falle der Au NP ließ sich Fluorescein nicht detektieren, während DTNB bei den Ag NP keinerlei Signatur zeigte. Betrachtet man zusätzlich das Extinktionsspektrum von DTNB mit Ag NP, so lässt sich hier ein Indiz für die Detektionsunfähigkeit finden: Durch die starke Aggregation der NP, die zum Ausfallen der Ag NP führt, konnten keine plasmonischen Strukturen eine Verstärkung des Raman-Streufeldes ausüben, da sie nun Festkörpereigenschaften hatten.

Dass es wichtig ist, die unterschiedlichen Verstärkungsmechanismen und Wechselwirkungsmechanismen der Raman-Reporter in Gegenwart der NP zu untersuchen, beweisen die Spektren von *p*ABT auf Au und Ag NP. Vergleicht man die *p*ABT-Spektren untereinander, so fällt auf, dass die SERS-Signaturen unterschiedliche Raman-Frequenzen aufweisen. Abweichungen lassen sich bei den Frequenzen 505 cm^{-1} , 702 cm^{-1} , 1142 cm^{-1} und 1429 cm^{-1} finden. Das Erscheinen einer Bande bei 1142 cm^{-1} lässt sich darauf zurückführen, dass die Ag NP verstärkt Aggregate in Gegenwart einer 10 mM NaCl-Lösung auszubilden vermögen. Yoon *et al.* konnten bei Untersuchungen von *p*ABT-Molekülen in Gegenwart von Au NP durch deren im Laufe der Zeit auftretenden Aggregation ebenfalls eine Linie bei dieser Frequenz beobachten [178, 179]. Als mögliche Ursache für die verschiedenartige Verstärkung dieser sog. b_2 -Symmetrieschwingungen diskutierten Yoon *et al.* die Reorientierung der *p*ABT-Moleküle auf der NP-Oberfläche, die auf intermolekulare Wechselwirkungen beruht. Letztere werden durch die zeitabhängige, steigende Oberflächenbelegung verursacht. Durch den Übergang der Moleküle von einer flachen in eine aufrechte Position erfahren die b_2 -Moden somit eine elektromagnetische Verstärkung. Da *p*ABT-Moleküle als bifunktionale Linker bekannt sind, neigen diese dazu, an die Au-Oberfläche eine kovalente S-Au-Bindung auszubilden [173]. Erkennbar wird dies durch die stark ausgeprägte Mode bei 1076 cm^{-1} [36, 180]. Eine vollständige Auflistung aller *p*ABT-Moden ist im Anhang gegeben.

Das in Abb. 5.28 weitere untersuchte SERS-Spektrum zeigt die spektralen Signaturen von Naphthalenthiole (2-NAT). Vergleicht man beide Spektren untereinander, so liefern diese Schwingungsbanden, die sowohl mit Au NA als auch mit Ag NA gleichermaßen detektierbar waren. Naphthalenthiole ist bekannt als Molekül, das flach an die metallische Oberfläche bindet, oder senkrecht zur Molekülebene stehend über die SH-Gruppe an die kolloidalen Oberflächen chemisorbiert. Vergleicht man die Spektren mit denen sehr

5.1 Auswahl und Charakterisierung von Reporter-Molekülen

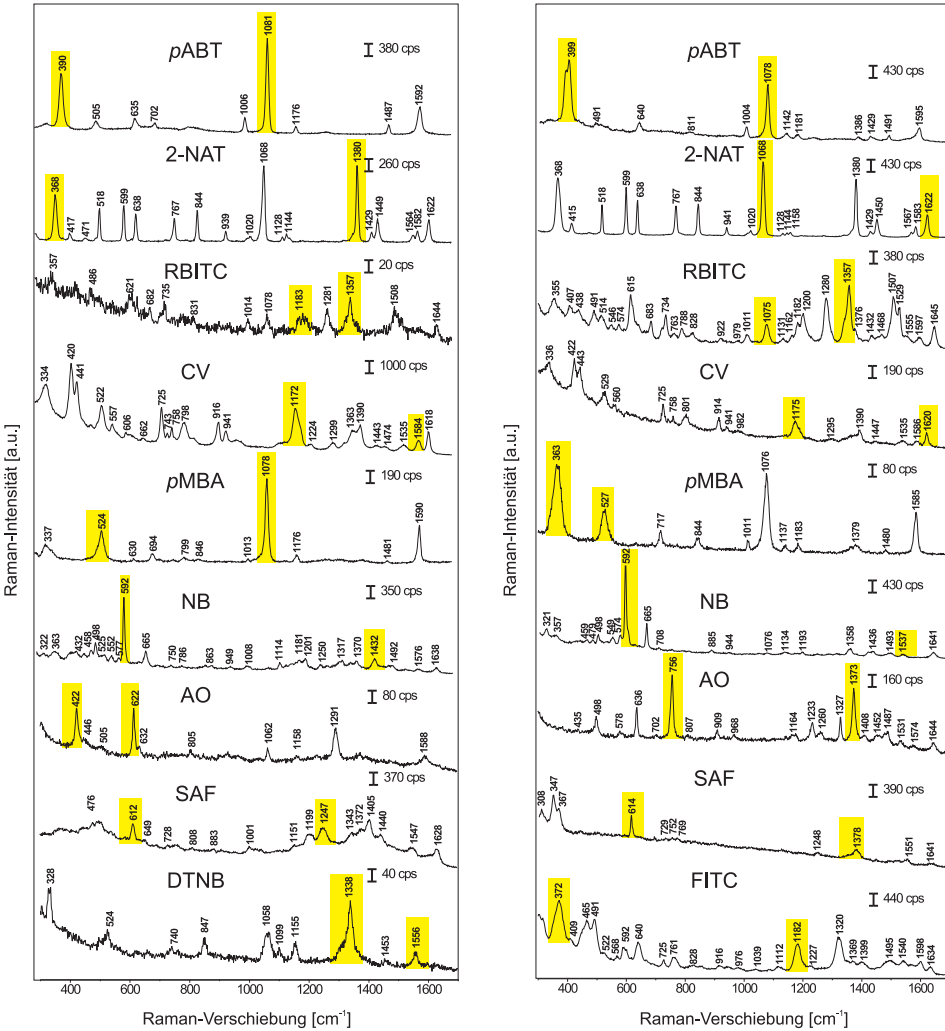


Abbildung 5.28: links. Reportersignaturen in Gegenwart von Au NP. rechts. Reportersignaturen in Gegenwart von Ag NP. Anregungswellenlänge: 785 nm. Anregungsintensität: $8 \cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$. Akkumulationszeit: 1 s. Die für die chemische Analyse (siehe Abschn. 5.2) ausgewählten Banden sind gelb hervorgehoben.

verdünnter Lösungen (~ 100 Moleküle) auf Ag-Inselfilmen [181], so konnten bei 10^{-6} M 2-NAT deutlich weniger spektrale Banden detektiert werden, weshalb eine Konzentration von 10^{-5} M für die Detektion an beiden Substraten geeigneter erschien. Dadurch konnten Spektren mit intensiveren und informationsreicheren Signaturen detektiert

werden. In der spektralen Region unterhalb der 1000 cm^{-1} treten die vom Aromaten herrührenden Streckschwingungen des 2-NAT auf sowie bei den Frequenzen 1567 cm^{-1} , 1580 cm^{-1} und 1621 cm^{-1} . Die symmetrische CH-Biegeschwingung bei 1068 cm^{-1} wird dabei vorwiegend verstärkt. Zu einer Dreifachaufspaltung der Banden kommt es im Bereich zwischen $1128\text{--}1160\text{ cm}^{-1}$, so dass sich qualitativ die 2-NAT-Signatur, die in Gegenwart der Au NP gemessen wurde, von der mit Ag NP gemessenen 2-NAT-Signatur unterscheidet [182, 183]. Allgemein lassen sich die Banden in zwei Kategorien einteilen: Valenz-Schwingungen wie beispielsweise die Ring-Streckschwingungen und CH-Deformationsschwingungen im Bereich zwischen 1000 cm^{-1} und 1650 cm^{-1} sowie Ring-Deformationsschwingungen und Drehschwingungen unterhalb der 1000 cm^{-1} .

Abb. 5.28 zeigt die Signaturen des Xanthen-Fluorophors RBITC. Vergleicht man die SERS-Signaturen und Signal-Rausch-Verhältnisse sowie deren relativen Signalintensitäten von RBITC in Gegenwart kolloidalen Goldes und Silbers, so konnten bei beiden SERS-Substraten gleichartige RBITC-Signale detektiert werden. Die fernab der resonanten Anregung gemessenen Spektren weisen Banden bei 1182 cm^{-1} , 1280 cm^{-1} , 1357 cm^{-1} , 1507 cm^{-1} , 1529 cm^{-1} und 1645 cm^{-1} auf und stimmen gut mit den SERS-Spektren von RBITC in kolloidalen Lösungen überein [184]. Die Linien bei 1357 cm^{-1} , 1507 cm^{-1} , 1529 cm^{-1} und 1645 cm^{-1} können den aromatischen C–C-Streckschwingungen zugeordnet werden [185, 186]. Die Banden bei 1182 cm^{-1} und 1280 cm^{-1} lassen sich den aromatischen C–H-Biegeschwingungen und C–C-Brücken-bzw. Streckschwingungen zuordnen [187].

Die Wechselwirkungsmechanismen zwischen dem Triphenyl-Farbstoff Kristallviolett und den Au bzw. Ag Nanopartikeln wurden im Abschn. 5.1 bereits angedeutet. Qualitative Unterschiede in den SERS-Spektren lassen sich hier ebenfalls zwischen den Au und Ag SERS-Substraten erkennen. So zeigt das CV-Spektrum für Au NA deutlich höhere Signalintensitäten, während für Ag NA die CV-Signale schwächer ausgeprägt sind. Vergleicht man die mit beiden unterschiedlichen SERS-Substraten detektierten CV-Spektren untereinander, so lassen sich informationsreichere Signaturen mit Au NA detektieren. Die mit Au NP und Ag NP untersuchten CV-Signaturen zeigen die gleichen Frequenzen auf, außer bei den Banden um 557 cm^{-1} (Gerüst-Schwingung des Aromaten), 662 cm^{-1} (C–H-Biegeschwingung), 1299 cm^{-1} (Ring C–C-Streckschwingung), und 1363 cm^{-1} (N–Ph-Streckschwingung). Die vom Ring herrührenden Schwingungen innerhalb beider CV-Signaturen indizieren einen Einfluss der Ring- π -Elektronen, wobei das größte Interaktionszentrum innerhalb der Carboniumion-Phenyleinheit liegt [5, 175]. Ferner werden die C–C-Streckschwingungen (1474 cm^{-1} und 1224 cm^{-1}) mit Ag NP nicht verstärkt.

Eine Detektion *p*MBA-spezifischer Moden konnte am besten an Nanoaggregaten durchgeführt werden. Lim *et al.* konnten z. B. zeigen, dass größere Nanopartikel ($d > 40\text{ nm}$) oder wachsende Nanopartikelschalen um einen Nanopartikelkern die Detektion von *p*MBA in Lösung deutlich verbessern können [44, 188]. Die intensiven Stokes-Merkmale bei 1076 cm^{-1} und 1586 cm^{-1} können der aromatischen Ringschwingung zugeordnet werden [57]. Vergleicht man beide Spektren untereinander, so unterscheiden sich diese jeweils durch die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Banden bei 1379 cm^{-1} und 1137 cm^{-1} . Spektrale Merkmale konnten bei 527 cm^{-1} , 717 cm^{-1} , und 844 cm^{-1} detektiert werden. Dies zeigt, dass die hergestellten SERS-Substrate eine gute Verstärkung der Raman-Signale des *p*MBA im Gegensatz zu Silizium-Schalennanopartikeln ermöglichen [46], da sich durch die hier hergestellten NP informationsreichere Spektren messen ließen.

Vergleicht man die *p*MBA-Signatur mit der von *p*ABT, so sind beide Spektren einander am ähnlichsten und lassen nur geringfügige Diskrepanzen bei 1076 cm^{-1} erkennen [189]. Die Orientierung des *p*MBA-Moleküls lässt sich durch die Anwesenheit der Linie bei 717 cm^{-1} ablesen. Letztere liefert die Information über eine flache Orientierung des Moleküls in Nähe der NP-Oberfläche. Dissoziierte Gruppen lassen sich an der COO⁻-Mode bei 1370 cm^{-1} ablesen. Dagegen tritt diese innerhalb der *p*MBA-Signatur mit Au NP nicht auf. Die Abwesenheit der β (SH)-Mode ist auf eine Dissoziation der SH-Gruppe an der NP-Oberfläche zurückzuführen [190].

Als weiterer Reporter, der sich in Gegenwart beider aggregierter NP im NIR anregen ließ, konnte der Phenoxazin-Farbstoff Nilblau detektiert werden [191–194], wobei einige Banden bei 1008 cm^{-1} (Xanthen-Ring Deformationsschwingung), 1114 cm^{-1} , 1181 cm^{-1} (β (CH)-Mode), 1201 cm^{-1} (ν_{as} (CNC), zentrale Ringschwingung + CH-Biegeschwingung), 1250 cm^{-1} , 1317 cm^{-1} und 1370 cm^{-1} (ν (C-N) Ringschwingung + ν (C-C) + CH-Biegeschwingung + CNH-Deformationsschwingung der Aminogruppe) mit kolloidalem Au detektiert werden konnten. Die relativen SERS-Signalintensitäten zeigen bei beiden Substraten ähnliche Werte an, was darauf zurückzuführen ist, dass die Wechselwirkung von Nilblau mit diesen gleichartig ist.

Die SERS-Spektren des Reporter-Moleküls Acridinorange, der sich den Acridin-Farbstoffen zuordnen lässt, mit Au und Ag NP weisen überwiegend Banden im Bereich von $1000\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ auf, die von Streckschwingungen des Kohlenstoff-Gerüsts herrühren [195]. Auffallend ist, dass im Vergleich zu den Au Nanopartikeln die Linien bei 1327 cm^{-1} , 1373 cm^{-1} , 1487 cm^{-1} , 1574 cm^{-1} und 1644 cm^{-1} , die bei Au NP nicht vorhanden sind, im Falle der Ag NP stärker ausgeprägt sind. Solche Beobachtungen konnten bei Untersuchungen zu Acridinorange auf Ag-Inselfilmen gemacht werden, deren Spektren denen auf Au NP ähneln. Zimmermann *et al.* begründeten diese Beobachtung mit dem verschiedenartigen Orientierungsverhalten des AO-Ringsystems relativ zur Substratoberfläche. Im Niederfrequenzbereich treten zwischen 150 cm^{-1} und 1000 cm^{-1} ebenfalls Banden auf, die den Biegeschwingungen der Ringeinheiten sowie C-NH₂-Schaukel- und Torsionsschwingungen zugeordnet werden können [196]. Spezifische Banden bei 350 cm^{-1} (HNH₂-Biegeschwingung) und 412 cm^{-1} (NH₂-Torsionsschwingung), deren Bandenintensitäts-Verhältnisse Interkalierungen mit DNA indizieren können, konnten hingegen nicht detektiert werden [197]. Die Anbindung von Acridinorange an die Ag NP sowie Au NP-Oberfläche erfolgt durch die am Ring befindliche Aminogruppe, wobei die Molekül-Längsachse normal zur NP-Oberfläche gerichtet ist. Die Tatsache, dass die A2- und B2-Moden bei Ag NP deutlich verstärkt werden, zeigt, dass das AO-Ringsystem nicht senkrecht zur Oberfläche orientiert ist. Andererseits schließt die Verstärkung der B1- und A1-Moden eine parallele Orientierung des Ringsystems zur Substratoberfläche aus, weshalb die Adsorptionsgeometrie zwischen beiden Extremen liegt [198]. Die Adsorptionsgeometrie von AO lässt wegen der Abschwächung der B1- und A1-Moden auf dessen parallele Anordnung zur NP-Oberfläche schließen [197]. Auffallend an dem AO-Spektrum auf Au ist, dass die C-C-C-Ringmode sich in zwei Banden (614 cm^{-1} und 632 cm^{-1}) aufspaltet. Grund dafür ist, dass diese eine Kombination aus Ring-Deformations- und CH-Deformationsschwingung ist [199]. Diese Bandenaufspaltung konnte jedoch auch mit Ag Nanopartikeln und auf Ag-Inselfilmen beobachtet werden.

Der an Au und Ag NA untersuchte Phenazin-Farbstoff Safranin O weist spektrale

Unterschiede auf beiden SERS-Substraten auf, da im Falle des kolloidalen Au vermehrt Banden im Bereich von $1151\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ detektierbar sind [200]. Ähnlich wie beim Acridinorange, das dem Safranin strukturell sehr ähnlich ist, lassen sich die Linien im Bereich $1248\text{-}1644\text{ cm}^{-1}$ aromatischen Ring-Streckschwingungen zuordnen [201]. Im Bereich zwischen $489\text{-}595\text{ cm}^{-1}$ treten vermehrt CH-Biegeschwingungen auf. Vergleicht man die drei Reporter-Moleküle Nilblau, Acridinorange und Safranin O untereinander, so lassen sich aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten bzw. Gemeinsamkeiten einige Banden derselben Spezies zuordnen; jedoch werden aufgrund geringer Unterschiede in der molekularen Struktur auch einige Abweichungen bei den SERS-Signaturen deutlich.

Im Gegensatz zum RBITC konnte der strukturell verwandte Xanthen-Farbstoff Fluorescein nur in Gegenwart von Ag NA detektiert werden. Fluorescein und seine Derivate existieren in verschiedenen Formen, d. h., in der kationischen, neutralen und anionischen Form [186, 202], abhängig vom pH-Gleichgewicht. In Abb. 5.28 ist das mit Ag NP gemessene FITC-Spektrum zu sehen. Die Signaturen deuten darauf hin, dass die anionische Spezies im Phosphat-gepufferten Milieu detektiert werden konnten. Die zwei stärksten Banden bei 370 cm^{-1} und 1324 cm^{-1} resultieren aus den Torsionsschwingungen und der aromatischen C-C-Streckschwingung des Xanthen-Skeletts [186]. Frequenzen im niederen Spektralbereich lieferten niederfrequente Banden der anionischen Fluorescein-Spezies, die bei Fluorescamin ebenfalls detektiert werden konnte [203, 204]. Die Linien bei 1540 cm^{-1} und 1598 cm^{-1} sind für die gelbe zwitterionische Struktur des Fluoresceins charakteristisch, da sie in der farblosen (Lacton-Struktur) und der roten (p-Quinonoid-Struktur) Form nicht auftreten [205]. Zwischen 1000 cm^{-1} und 1050 cm^{-1} lassen sich die vom Phenyl-Ring herrührenden Ring-Atemschwingungen finden. Ein Grund dafür, weshalb sich Fluorescein an Au NP nicht detektieren ließ, ist möglicherweise auf den höheren molaren Citratüberschuss bei den Au NP zurückzuführen, der dazu führt, dass die im Fluorescein vorhandenen OH⁻-Ionen eine Repulsion in Nähe der Ligandenhülle erfahren und somit FITC-Moleküle stärker abgeschirmt werden als im Falle der Ag NP [186]. Dies zeigt sich auch im Extinktionsspektrum von FITC mit Au und Ag NP (siehe Abschn. 5.1), das auf keinerlei Aggregation der NP hindeutet. Die Zugabe einer Salzlösung führte ebenfalls zu keiner Detektion von Fluorescein auf Au NP. Vergleicht man die Lage des Extinktionsmaximums von FITC mit dem von RBITC (siehe Abschn. 5.1), so ergibt sich für RBITC wegen des stärker im NIR-Bereich liegenden Extinktionsmaximums eine günstigere Bedingung zu dessen Detektion.

Das SERS-Spektrum von DTNB, auch Ellmans Reagenz genannt [206], konnte nur an Au NA gemessen werden. Zu erkennen ist eine intensive Bande bei 1338 cm^{-1} und 1555 cm^{-1} , die jeweils den symmetrischen und asymmetrischen Stickstoff-Streckschwingungen zugeordnet werden können [34, 172]. Die Bande bei 851 cm^{-1} lässt sich der Stickstoff-Scherenschwingung zuordnen.

5.1.2 Detektionsempfindlichkeit von Reporter-Molekülen

Neben der Untersuchung qualitativer, spektraler Merkmale von verschiedenen Reporter-Molekülen in Gegenwart von Au und Ag SERS-Substraten sind weitere Untersuchungen insbesondere zur empfindlichen Detektion bei geringen Reporter-Konzentrationen von Bedeutung. Eine empfindliche Detektion innerhalb der biologischen Matrix ist nur dann gegeben, wenn die Nanostrukturen nicht mit einem Überschuss an Reporter-Molekülen versehen werden; letztlich kann dieser entscheidende Auswirkungen auf die NP-Stabilität haben. Im Folgenden sollen deshalb die verschiedenen Reporter-Moleküle in Gegenwart verschiedener Salzkonzentrationen mit Au und Ag NP untersucht werden.

Abb. 5.29 zeigt die gemittelten Raman-Signalintensitäten der untersuchten NIR-SERS-Spektren des jeweiligen Reporters, aus denen ein Vergleich der Detektionsempfindlichkeit zwischen den beiden Au und Ag-SERS-Substraten gezogen werden sollte. In Abb. 5.1 (A)-(C) bzw. (a)-(c) sind die relativen Signalintensitäten für drei verschiedene Reporterkonzentrationen an Au und Ag NP/NA, d. h., bis zur geringstmöglich detektierbaren Reporterkonzentration (10^{-5} M, 10^{-6} M und 10^{-7} M) dargestellt.

Um zusätzlich den Einfluss der Salzlösungen auf die Verstärkung der Ramansignale zu untersuchen, wurden die Au und Ag Nanopartikel mit drei verschiedenen Salzkonzentrationen (10 mM, 30 mM und 100 mM) aktiviert. In Abb. 5.29 ist zu erkennen, dass sich im Vergleich zu allen anderen Reportern Acridinorange an Au NP nur bei einer Konzentration von $\sim 10^{-6}$ M, ebenfalls in Gegenwart von Halidionen, detektieren lässt (siehe Abb. 5.29 B).

Hingegen war eine Detektion von DTNB auf Au NP nur in deren aggregiertem Zustand möglich (siehe Abb. 5.29, (A)-(C)).

Im Gegensatz dazu zeigt Nilblau die höchste relative SERS-Intensität verglichen zu seinen strukturell ähnlichen Vertretern wie Acridinorange und Safranin sowie anderen Raman-aktiven Molekülen.

Ein Grund dafür könnte sein, dass das Extinktionsmaximum von Nilblau dem NIR-Anregungsbereich am nächsten liegt, d. h., präresonant angeregt wird und somit eine effiziente Verstärkung ermöglicht. Die durchschnittliche Signalintensität der Reporter nimmt in der Reihenfolge $\text{NB} > p\text{ABT} > 2\text{-NAT} > \text{CV} > \text{SAF} > p\text{MBA}$ ab. Abb. 5.29 (A)-(C) zeigen deutlich, dass FITC weder in Gegenwart von Au NP noch von Au NA detektiert werden konnte. Bezogen auf die SERS-Signalintensitäten verhalten sich RBITC und AO ähnlich. Betrachtet man die Lage der Extinktionsmaxima dieser beiden Reporter, so liegt das Extinktionsmaximum von RBITC näher am NIR-Bereich als bei Acridinorange. Vergleicht man die SERS-Signaturen und Signal-Rausch-Verhältnisse sowie deren relativen Signalintensitäten von RBITC an kolloidalem Silber, so konnten auf letzterem deutlich bessere Signale detektiert werden als im Vergleich zu Au NP. Ein möglicher Grund für diese Diskrepanz ist der infolge des Herstellungsprozesses überwiegender Anteil an Cl⁻-Ionen innerhalb des Au-Sols, das in Gegenwart des kationischen Farbstoffs RBITC zu einer stärkeren Wechselwirkung führt als bei den Ag NA (vgl. auch UV/Vis-Spektren von RBITC auf Au und auf Ag NP in Abschn. 5.1) [207]. Dies könnte eine Ursache für die Präzipitation von Au NP sowohl in Gegenwart der Halidionen als auch in Gegenwart der positiv geladenen RBITC-Moleküle sein. Ferner ist die Anzahl an Citratliganden aufgrund des größeren molaren Citratüberschusses bei den Au NP höher als bei den Ag NA, was zusätzlich zu einer größeren Molekülanzahl in Partikelnähe führt. Da das Stickstoffatom der

Thiocyanatgruppe elektropositiver ist, führt dies zur Adsorption des RBITC-Moleküls innerhalb der elektrischen Doppelschicht des Kolloids, wobei präferentiell eine elektrostatische Wechselwirkung mit den an die NP-Oberfläche chemisorbierten Citratliganden stattfindet [208].

Vergleicht man die Signalintensitäten der nicht fluorogenen Reporter-Moleküle *p*ABT, 2-NAT und *p*MBA untereinander, so weisen diese beachtlich hohe Werte auf. Ursache für diese Beobachtung ist einerseits die hohe Affinität der Moleküle zu den Substratoberflächen, andererseits findet in Gegenwart von Halidionen durch Ausbildung sog. *Hot Spots* eine Plasmonenkopplung statt [92, 96]. Bei kleineren Molekülkonzentrationen kann in Gegenwart von NaCl die empfindliche Detektion geringer Reporter-Konzentrationen an Au Nanopartikeln positiv beeinflusst werden, wenngleich das nicht bei jedem Reporter zu höheren Signalintensitäten führt. Die Reporter DTNB, *p*MBA, NB und CV lassen sich hingegen in Gegenwart von NaCl am empfindlichsten detektieren, was sich auf die hohe Affinität zu den NP-Oberflächen begründen lässt. Die SERS-Signaturen von 10^{-5} M *p*MBA konnte am besten an Nanoaggregaten bestehend aus Au und Ag Nanopartikeln gemessen werden. Auch hier hat, wie bei den anderen Reportern, das Wachsen von Nanopartikeln induziert durch deren Aggregation infolge der Salzlösung zu einer verbesserten Detektion *p*MBA-spezifischer Signaturen geführt. Weiterhin führt die Aggregation von Au Nanopartikeln zu deutlich höheren Signalen als beim kolloidalen Silber (vgl. Abb. 5.29 (A)-(C)).

Vergleicht man die untersuchten Reporter, die mit beiden Substraten untersucht wurden, so zeigt sich, dass deren SERS-Signalintensitäten sich substratspezifisch verhalten. Die Signalintensität des Reporters NB, untersucht an Ag NP, weist eine um Faktor 3 und im Falle des SAF eine um Faktor 2 höheren Wert auf als bei den Au NP (vgl. Abb. 5.29 (A) und (a)). Eine empfindlichere Detektion von NB und SAF an Ag Nanopartikeln ist somit möglich. Der Reporter *p*ABT weist hingegen mit Faktor 5 eine wesentlich höhere Signalintensität für Au NP auf als im Vergleich zu Ag NP. Kristallviolett weist eine um Faktor 3 höhere Signalintensität bei den Au NP auf als bei den Ag NP.

Auffallend ist, dass bei einer Reporter-Konzentration von 10^{-7} M unter Verwendung einer 100 mM NaCl-Lösung sich keine Raman-Signale mehr detektieren ließen. Offensichtlich hat die infolge der starken Aggregation anwachsende Partikelgröße negative Auswirkung auf die elektromagnetischen Verstärkungseigenschaften der Nanopartikel.

5.1 Auswahl und Charakterisierung von Reporter-Molekülen

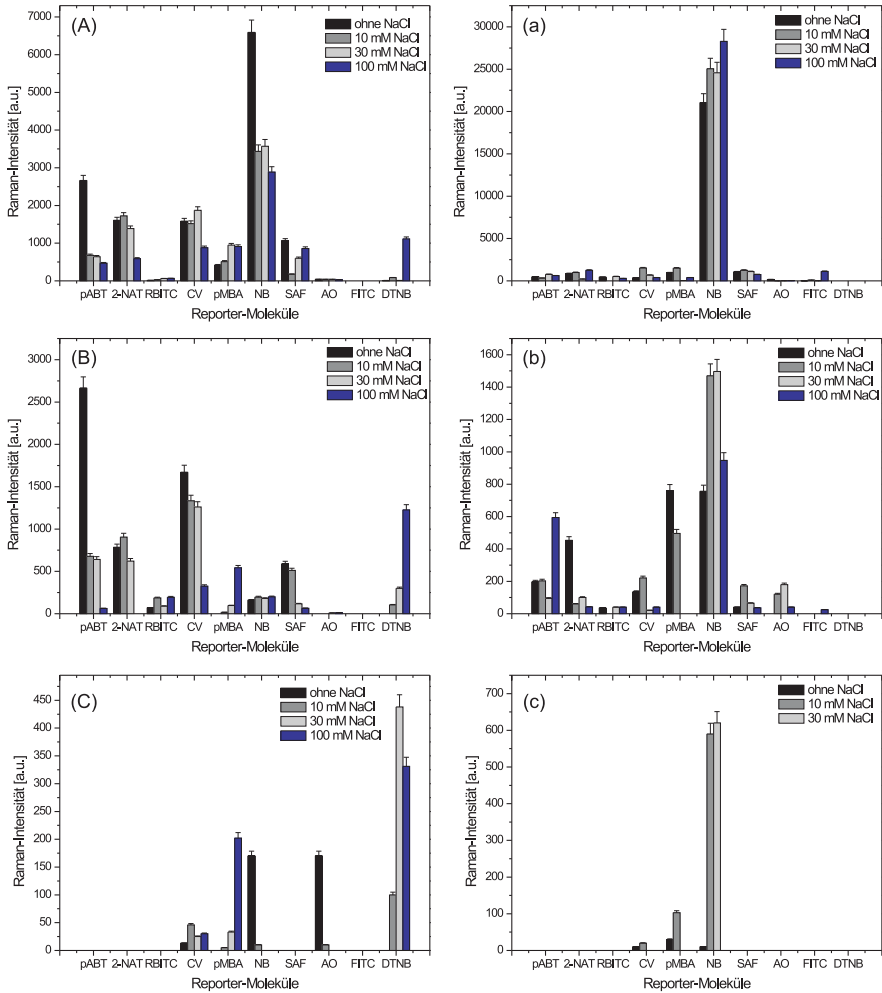


Abbildung 5.29: Gemittelte relative Signalintensitäten bei unterschiedlichen Reporter-Konzentrationen: 10^{-5} M (A), 10^{-6} M (B), 10^{-7} M (C) auf Au NP/NA und (a)-(c) auf Ag NP/NA.

5.2 Chemische Separierbarkeit

Im vorigen Kapitel (siehe Abschn. 5) konnte anhand der Reporter-Spektren gezeigt werden, dass diese Signaturen qualitativ gut unterscheidbar sind, was auf die verschiedenartige molekulare Struktur der Reporter-Moleküle zurückzuführen ist. Reporter-Signaturen zeichnen sich des Weiteren durch ihre hohe Spezifität, die durch das S-N-Verhältnis, die Anzahl der auftretenden Moden, deren Position (Wellenzahl) sowie durch deren Linienbreite (FWHM) und Form beschrieben wird, aus. Die Signaturen lassen sich durch ein weiteres Merkmal unterteilen wie der Uni-, Bi- oder Multimodalität der Banden. Um die Signaturen eindeutig identifizieren zu können, wie beispielsweise innerhalb komplexer biologischer Matrices, die die spektrale Information, herrührend von den Reporter-Molekülen, modifizieren oder überdecken können, ist die Suche nach einer geeigneten Identifizierungsmethode essentiell. Zudem ist die Untersuchung zur Multiplexing-Anwendbarkeit und Separierbarkeit von Reporter-Molekülen in Assayformaten, die sich häufig durch ein automatisiertes Auslesen komplexer Informationen in hohem Maße auszeichnen, bedeutend. Verfügt ein Spektrum über Merkmale, die nur von einer Variablen wie z. B. deren Position abhängt, so liegt ein univariater Zusammenhang vor. Im Falle eines von zwei Variablen abhängigen Zusammenhangs spricht man von einer bivariaten Abhängigkeit. Univariante Verfahren wie die Korrelationsanalyse können dazu dienen, spektrale Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Variablen aufzuspüren [209, 210]. Goddard *et al.* [171] nutzen z. B. die Korrelationsanalyse für Untersuchungen zur spektralen Variabilität von Raman-Signaturen sowie zum Verhalten der Peakintensitäten in Bezug auf etwaige Untergrundfluktuationen. Das einfachste Verfahren zur Exploration spektraler Eigenschaften von Raman-Signaturen stellt jedoch nach wie vor die sensorische Erfassung verschiedenartiger Raman-Spektren hinsichtlich eines Vergleichs untereinander dar.

Da Raman-Spektren die spektrale Vielfalt an molekularen Komponenten wiedergeben, können anhand bestimmter charakteristischer Moden, die einer bestimmten funktionellen Gruppe zugeordnet werden können, sortiert und somit voneinander unterschieden werden. Die als funktionelle Gruppen-Kartierung (*Functional Group Mapping*) bzw. chemische Kartierung bezeichnete Methode erlaubt es, einen definierten spektralen Parameter, wie beispielsweise die Absorption oder die Intensität bei einer gegebenen Frequenz, Wellenlänge oder Wellenzahl als Funktion von Ortskoordinaten wiederzugeben. Je nach ausgewählter Mode, die einen bestimmten prozentualen Anteil am Gesamtspektrum bzw. an der Gesamtkartierung trägt, liefert diese einen entsprechenden chemischen Kontrast [211]. Letzterer kann durch Auswahl der Berechnung von Peakintegralen oder Berechnung von Bandenhöhen oder Bandenverhältnissen beeinflusst werden [212].

Diese Problemstellung ist im Zusammenhang mit Spektren, die Schwingungsspektren sind, nicht neu, da z. B. die chemische Bildgebung bzw. Kartierung in der biomedizinischen Schwingungsspektroskopie ähnliche Probleme stellt. In *in vivo*-Experimenten fünf verschiedener Reporter-gelabelter Au-Silizium-Nanopartikel innerhalb der Mäuseleber konnten z. B. multiplexe chemische Kartierungen erfolgreich angewendet werden [38]. Im nachteiligen Gegensatz stehen herkömmliche Analysen wie die Darstellung und Vergleich der Raman-Moden untereinander anhand sog. Balken- bzw. Strichkodierungen [60], die die eindeutige Unterscheidbarkeit wegen auftretender spektraler Fluktuationen erschweren können.

Analog soll im Folgenden, auch wenn hier die Bildgebung noch nicht im Vordergrund steht,

eine „chemische Separierbarkeitsanalyse“ der Reporter-Signaturen durchgeführt und deren Eignung diskutiert werden. Die Separation erfolgte dabei durch Eingrenzung der Bandenposition, d. h., durch ein fixiertes Eingrenzungs-Intervall sowie unter Berücksichtigung fester Bandenverhältnisse.

Es wurden zwei Datensätze generiert, die jeweils 396 und 400 SERS-Spektren von neun verschiedenen Reportern gemessen an Au Nanoaggregaten und Ag Nanoaggregaten enthalten. Im räumlich aufgelösten Einzel-Reporter-Experiment wurden die Positionen einer bestimmten vom Reporterspektrum herrührenden Bande durch chemische Kartierungen dargestellt und jedes Reporter-Spektrum jeweils durch einen Pixel, der eine definierte Farbkodierung trägt, repräsentiert. Ausgewählt wurde die Intensität einer Bande bzw. eines festen Intensitätsverhältnisses, gebildet aus zwei Banden innerhalb des entsprechenden SERS-Spektrums. Aus Tab. 5.6 und Tab. 5.7 ist ersichtlich, dass ein spezielles Verhältnis zweier Banden verwendet werden kann, um das jeweilige charakteristische Reporter-Spektrum eindeutig zu identifizieren.

Wie eingangs erwähnt, werden bei konventionellen chemischen Kartierungen eine feste Intensität, Intensitätsverhältnis oder eine definierte Modenposition für jedes Spektrum ermittelt. Jedoch können innerhalb von komplexen Datensätzen, die teilweise zueinander sehr ähnliche Raman-Signaturen enthalten, geringfügige spektrale Verschiebungen bzw. Fluktuationen, verursacht durch die lokale Umgebung der untersuchten Moleküle, auftreten. Eine eindeutige Unterscheidbarkeit wäre somit z. B. bei Betrachtung zweier einander sehr ähnlicher Reporter-Signaturen (vgl. *p*ABT mit *p*MBA in Abschn. 5) ausgeschlossen. Deshalb ist eine Separation basierend auf einem individuellen Parameter wie ein Intensitätsverhältnis oder eine Bandenposition deutlich erschwert. Die hier ermittelten Parameter basieren dagegen auf einer trivariaten Identifikation von Reporter-Spektren mit Hilfe zweier spezieller Banden-Positionen und den dazugehörigen Intensitätsverhältnissen bzw. Bandenintegralen, was dazu führt, dass die berechneten Werte für *p*ABT und *p*MBA (vgl. dazu Abschn. 5) die Zuverlässigkeit dieser trivariaten Methode sowie deren Robustheit gegenüber spektralen Fluktuationen trotz großer spektraler Ähnlichkeit widerspiegeln. Somit zeigt die Methode, dass diese ein geeignetes Verfahren im Vergleich zu herkömmlichen Identifizierungs-Analysen darstellt und Anwendung in Multiplexing-Experimenten (siehe Abschn. 5.4) finden kann.

Tabelle 5.6: Charakteristische Bandenverhältnisse, die aus den SERS-Spektren von neun Reporter-Molekülen mit Au NP gewählt wurden. Diese Parameter wurden für die chemische Identifizierung des jeweiligen Reporters verwendet.

| | p -ABT | RBITC | 2-NAT | CV | p MBA | NB | AO | SAF | DTNB |
|-------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------|
| Bandenposition [cm^{-1}] | 1081/390 | 1357/1183 | 1380/368 | 1172/1584 | 1078/524 | 592/1432 | 622/422 | 612/1247 | 1338/1555 |
| Verhältnis | 1.3 \pm 0.5 | 1.5 \pm 0.5 | 1.7 \pm 0.1 | 6.3 \pm 0.4 | 2.0 \pm 0.2 | 4.0 \pm 1.7 | 2.2 \pm 1.2 | 1.6 \pm 0.8 | 10 \pm 2 |
| Anzahl der Spektren | 31 | 48 | 99 | 51 | 34 | 37 | 49 | 21 | 26 |

Tabelle 5.7: Charakteristische Bandenverhältnisse, die aus den SERS-Spektren von neun Reporter-Molekülen mit Ag NP gewählt wurden. Diese Parameter wurden für die chemische Identifizierung des jeweiligen Reporters verwendet.

| | p -ABT | RBITC | 2-NAT | CV | p MBA | NB | AO | SAF | FITC |
|-------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------|---------------|---------------|---------------|
| Bandenposition [cm^{-1}] | 1078/390 | 1357/1075 | 1068/1624 | 1175/1620 | 363/527 | 592/1537 | 756/1373 | 614/1378 | 1182/372 |
| Verhältnis | 0.5 \pm 0.2 | 3.4 \pm 0.5 | 3.9 \pm 0.6 | 3.1 \pm 0.4 | 3.2 \pm 0.3 | 25 \pm 5 | 1.0 \pm 0.3 | 0.4 \pm 0.2 | 1.1 \pm 0.2 |
| Anzahl der Spektren | 99 | 38 | 40 | 51 | 25 | 30 | 48 | 50 | 19 |

5.3 Schlussfolgerungen: Chemische Unterscheidbarkeit von Reporter-Signaturen

Die qualitativen Untersuchungen der Reporter-Signaturen haben gezeigt, dass diese sich eindeutig voneinander unterscheiden und identifizieren lassen. Unter den verschiedenen Reporter-Molekülen war im Falle des Nilblaus eine SERS-Detektion bei geringen Konzentrationen wegen hoher Signalintensitäten bei beiden SERS-Substraten am besten, was auf eine präresonante Anregung des Moleküls beruht. Weiterhin haben die SERS-Untersuchungen gezeigt, dass nicht jeder Reporter sich in Gegenwart von Au bzw. Ag NP detektieren lässt. Eine mögliche Ursache ist die Wechselwirkung des Reporter-Moleküls mit der jeweiligen Substratoberfläche, die unterschiedlich stark mit Citratliganden belegt sein und eine Detektion des Analyten erschweren kann.

Die trivariate Analyse der Reporter-Moleküle erlaubt eine eindeutige schnelle Identifizierbarkeit innerhalb eines komplexen Datensatzes bestehend aus verschiedenartigen und teilweise sehr ähnlichen Raman-Signaturen. Da es innerhalb der gemessenen Raman-Signaturen zu spektralen Intensitätsschwankungen kommen kann, erwies sich die arithmetisch gemittelte Farbkodierung als sinnvoll. Speziell für bioanalytische Anwendungen, bei denen bekannte Reporter mit ihren definierten spezifischen Intensitätsverhältnissen zum Einsatz kommen, wie beispielsweise als SERS-*Tag* angeordnet in einem Array für Hybridisierungsexperimente oder in Immunoassays, kann mit Hilfe dieser Methode ein automatisierter Vergleich der ausgewählten Bandenverhältnisse zur schnellen Identifikation der Reporter-Signaturen erzielt werden. Die chemische Separierbarkeitsanalyse bietet die Möglichkeit zur ortsabhängigen Darstellung von Reportern, insbesondere für mikrostrukturierte Assayformate. Das festgewählte Bandenverhältnis gewährleistet eine Stabilität des spektralen Identifizierungsparameters.

5.4 Multivariate Unterscheidbarkeit

Die trivariate bzw. chemische Analyse von Reporter-Signaturen hat gezeigt, dass eine Separierbarkeit derer möglich war (siehe Abschn. 5.2). In diesem Abschn. sollen multivariate Auswertemethoden zur Identifikation von Raman-Signaturen angewendet und diskutiert werden.

Mit Hilfe multivariater Analyseverfahren ist es möglich, komplexe Zusammenhangstrukturen zwischen Variablen sowie eine gleichzeitige Analyse mehrerer Variablen mit ihren einhergehenden Abhängigkeitsstrukturen aufzudecken, wo eine bloße visuelle Inspektion komplexer, hyperspektraler Datensätze unmöglich wird [213]. So konnten beispielsweise unter Verwendung von multivariaten Regressionsmethoden wie der *Partial Least Square Regression* (PLSR) Beziehungen zwischen einer abhängigen und einer oder mehreren unabhängigen Variablen erfolgreich analysiert werden [214, 215]. Es existieren experimentelle Arbeiten zur Unterscheidbarkeit verschiedenartig mit Farbstoffen beladener Mikrosphären unter Verwendung der Korrelationsanalyse [216, 217]. Abhängigkeiten zwischen evtl. hoch korrelierten Variablen können beschrieben werden und ermöglichen das Erstellen von Kalibriermodellen von sog. Produkteigenschaften (y-Variablen) aus prozessspektroskopischen Datensätzen (x-Variablen) [218, 219]. Multivariate Methoden ermöglichen eine automatisierte und schnelle Untersuchung komplexer, spektraler Zusammenhänge [220]. Diese positiven Eigenschaften machen sie zusätzlich zu einer probaten Analysemethode für Untersuchungen dynamischer Prozesse. Multivariate Auswertemethoden, wie z. B. die PCA und K-Means Clusteranalyse, wurden bisher erfolgreich bei Untersuchungen biologischer Proben wie z. B. verschiedenen Bakterienstämmen zu deren Identifizierung bzw. Klassifizierung angewendet [221, 222]. Insbesondere multivariate bildgebende Verfahren konnten zur Raman-spektroskopischen Identifikation von Organellen innerhalb eukaryotischer Zellen eingesetzt werden [12, 223–232].

Um die Multiplexing-Anwendbarkeit diverser Reporter-Moleküle für bioanalytische Fragestellungen innerhalb und außerhalb von biologischen Systemen zu untersuchen, wären hierfür multivariate Verfahren geeignet, insbesondere die multivariate Bildgebung von biologischen Systemen samt simultaner SERS-Detektion von verschiedenen inkorporierten Modell-Analyten bzw. Reporter-Molekülen. In mehrdimensionalen, hyperspektralen Datensätzen erlaubt dies eine Konstruktion mikrospektroskopischer Kartierungen chemischer Komponenten, die nach jeweiligem Merkmal einer molekularen Komponente farbkodiert sind. Multivariate Bildgebungsverfahren (PCA-, HCA-, oder K-Means-Kartierungen) von eingebrachten Analyten bzw. *Labels*, die z. B. als Modell-Pharmazeutika fungieren, konnten bereits angewendet werden [233, 234]. Es existieren multivariate Untersuchungsansätze zu einem in Lymphozyten eingebrachten Modell-Analyten, dem Rhodamin 6G [235]. Das MCR-Verfahren, das in der Arbeit ebenfalls Anwendung findet, wird u. a. im Zusammenhang mit der Raman-Bildgebung in der Literatur beschrieben [236, 237].

Jedoch sind Experimente wie die Identifikation und Separation des Analyten von intrazellulären Komponenten zur Beantwortung bioanalytischer Fragestellungen, wie z. B. in der klinischen Pharmakologie oder Tumordiagnostik, von Bedeutung, da diese erste Ansätze für eine Analyt-Quantifizierung innerhalb der komplexen Biomatrix liefern können. Speziell in Bezug auf spektrale Variabilitäten und Multiplexing-Eigenschaften verschiedener in Biomatrizes eingebrachter Raman-Sonden existieren bisher keine multivariaten Lösungsansätze. Dabei kann eben mit Hilfe dieser Verfahren die spektrale Interpretation

von Raman-Signaturen, die von verschiedenen Hybridsonden bzw. Multikomponentensonden in Biosystemen herrühren, erleichtert werden. Eine eindeutige Separation dieser Analytsignaturen vom spektralen, zellulären Untergrund sowie deren Identifikation wäre damit möglich.

Ziel war es, die Multiplexing-Anwendbarkeit diverser Reporter-Moleküle für bioanalytische Fragestellungen innerhalb und außerhalb von biologischen Systemen mittels uni- und multivariater Auswertemethoden zu untersuchen. In diesem Abschn. werden multivariate Verfahren wie die PCA sowie HCA und K-Means Clusteralgorithmen diskutiert. Insbesondere werden multivariate Untersuchungen zur Identifikation einzelner Reporter-Signaturen aus binären Raman-Mischsignaturen unter Verwendung der multivariaten Kurvenauflösung (MCR) durchgeführt. Als bioanalytisches Anwendungsbeispiel zur Anwendung multivariater Bildgebungsverfahren werden Experimente zur Inkorporation zweier verschiedener Hybrid-Sonden innerhalb von 3T3-Zellen sowie ihre Anwendbarkeit für Multiplexing-Experimente diskutiert.

5.4.1 Hauptkomponentenanalyse

Zur Identifizierung und Separation der Signaturen von Reporter-Molekülen in unbekanntem Mischungen oder in Gegenwart zusätzlich beigemengter Analyten, im Falle von bioanalytischen Anwendungen SERS-Experimente an SERS-Hybridsonden innerhalb von Zellen, können multivariate Methoden wie die Hauptkomponentenanalyse eingesetzt werden. Grund dafür ist, dass diese Methode nicht nur einzelne spektrale Merkmale berücksichtigt, sondern auch eine Analyse des gesamten spektralen Fingerabdrucks ermöglicht. Die erste Hauptkomponente repräsentiert die maximale Varianz innerhalb des Datensatzes; die zweite Hauptkomponente steht dementsprechend für die zweithöchste im Datensatz vorhandene Varianz u. s. w. Da die Basisspektren im neu berechneten Koordinatensystem jeweils orthogonal zueinander liegen, ist ein Überlapp der spektralen Information ausgeschlossen. Die multivariate Diskriminierung wurde an insgesamt acht verschiedenen SERS-Reportersignaturen durchgeführt. Um die Ergebnisse der PCA besser untereinander vergleichen zu können, erfolgte die Analyse unter Ausschluss der FITC- und DTNB-Signaturen.

Die spektralen Unterschiede in den Datensätzen bestehend aus 370 Spektren (für Au NP) und 381 Spektren (für Ag NP), die die Information der Reporter-Moleküle *p*ABT, RBITC, CV, 2-NAT, *p*MBA, NB, AO und SAF enthielten, wurden mit Hilfe der PCA untersucht. Die Datenmatrizen bestehend aus 1352 Datenpunkten (für Au NP) bzw. 1392 Datenpunkten (für Ag NP), die einen spektralen Bereich von 300-1700 cm^{-1} abdeckten, wurden durch eine lineare orthogonale Transformation (Lösung des Eigenwertproblems) in ein neues, Varianz-gewichtetes Koordinatensystem überführt. Diese Transformation führt dazu, dass korrelierte Variablen des spektralen Datensatzes in eine kleinere Anzahl an unkorrelierten Variablen derart überführt werden, dass die Varianz in Bezug auf die erste Koordinatenachse im neuen Koordinatensystem maximiert wird. Abb. 5.30 zeigt die Darstellung der Reporter-Datensätze als *Scores* im neuen Varianz-gewichteten Raum, wobei die ersten acht Hauptkomponenten gegen die acht weiteren Hauptkomponenten gegeneinander aufgetragen wurden.

Die Diagonalelemente sind nicht dargestellt, da diese den Eigenwert 1 liefern und keinerlei Information zur Korrelation der Datensätze untereinander liefern. Die *Scores*-Diagramme

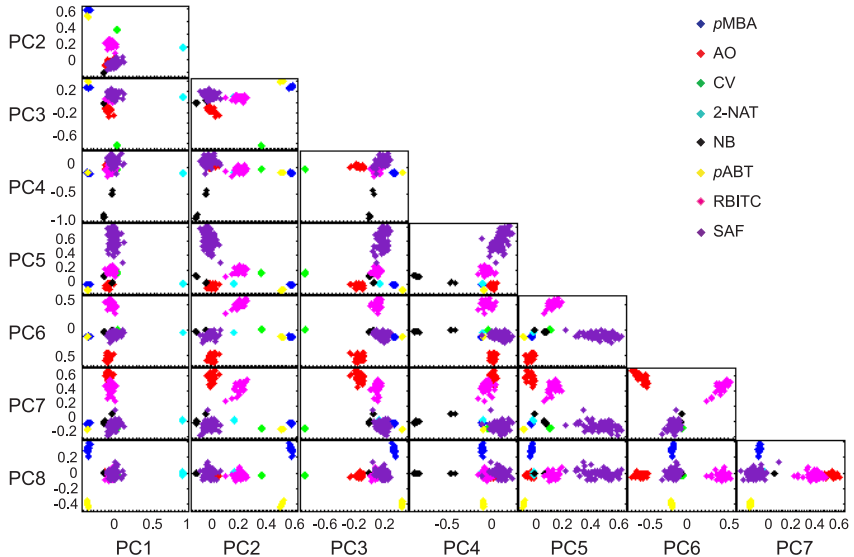


Abbildung 5.30: PCA der ersten acht PCA-Scores mit 433 Spektren der acht Reporter-Moleküle *p*ABT, 2-NAT, RBITC, CV, *p*MBA, NB, AO und SAF untersucht an Au Nanopartikeln.

zeigen eindeutig, dass die Reporter-Signaturen sich in bestimmte Klassen einsortieren lassen. Die Separation der acht verschiedenen Datensätze in ihre einzelnen Klassen erfolgte bei der zweiten Hauptkomponente gegen die fünfte Hauptkomponente. Innerhalb der ersten drei Komponenten lassen sich die zueinander sehr ähnlichen PC Scores der Reporter NB, AO und SAF nicht voneinander trennen. Hingegen zeigen die zueinander sehr ähnlichen Raman-Signaturen von *p*ABT und *p*MBA zwei voneinander getrennte Klassen (siehe PC1 vs. PC2). Die Reporter 2-NAT, RBITC und CV sind ebenfalls entlang der PC2- und PC3-Komponente gut separierbar. Jedoch vermögen höhere Hauptkomponenten das zu *p*MBA sehr ähnliche und räumlich nächstgelegene *p*ABT gut zu trennen (vgl. PC2 vs. PC8). Die Hauptkomponentenanalyse ist in der Lage, nicht nur die Korrelation zwischen spektralen Variablen zu erkennen, sondern auch spektrale Ausreißer auffindig zu machen. In Prozessanalysen, wie beispielsweise Untersuchungen an Reinstkomponenten, können somit Verunreinigungen erkannt werden. Für bioanalytische Anwendungen können spektrale Ausreißer jedoch eine Interaktion mit den dort gegenwärtigen Biomolekülen indizieren und somit erkannt werden. Die PCA soll hier als Nachweismethode für die Konformität der Reportersignaturen sowie deren Signalstabilität angewendet werden,

da sich anhand der *Scores* die Intraklassenvarianz der spektralen Klassen widerspiegelt. Tab. 5.8 zeigt die Ausgabe-Parameter der PCA. Sowohl für die MVA bei Au NP als auch bei Ag NP liegt der prozentual am höchsten erklärte Anteil innerhalb der ersten drei Hauptkomponenten. Allerdings liegen Erklärungswerte bis zur achten Hauptkomponente in beiden Fällen vor, was darauf hindeutet, dass diese einen signifikanten Beitrag (mit minimalem Rauschanteil) zur spektralen Gesamtheit liefern.

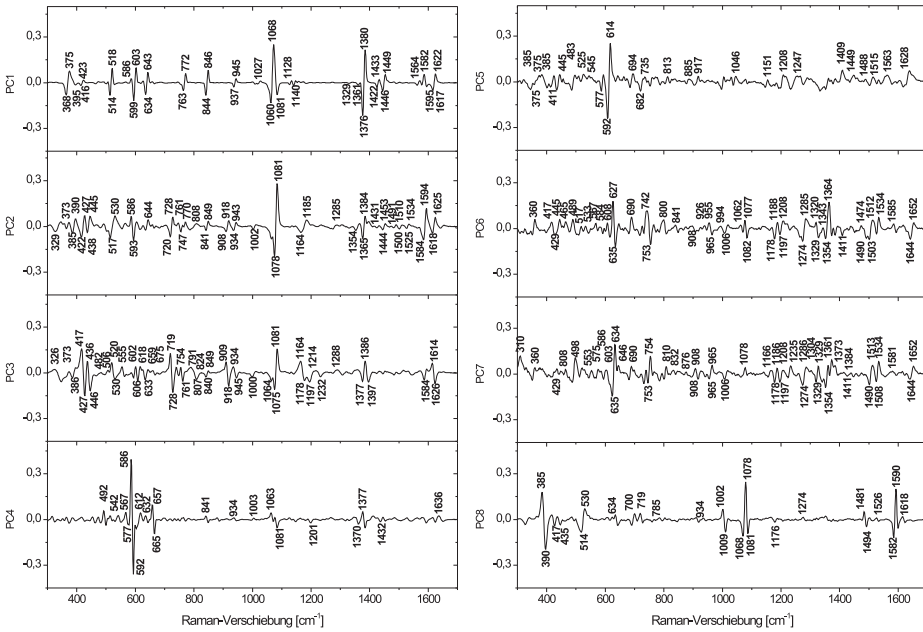


Abbildung 5.31: Aus der PCA ermittelte *Loadingspektren* der acht Hauptkomponenten für Au NP.

Die *Loadingspektren* können als Wichtungsfaktoren für jedes Originalvariable definiert werden. Für die Spektren bedeutet dies, dass die Gewichtung bzw. der relative Anteil der spektralen Merkmale aus dem (Original-)Datensatz entsprechend für jede Hauptkomponente dargestellt wird. Inwiefern das auf die Reporter-Datensätze zutrifft, soll im Folgenden diskutiert werden.

Abb. 5.31 zeigt die aus der PCA berechneten *Loadingspektren* für die acht Hauptkomponenten. Ein Vergleich der Originalvariablen mit den *Loadings* macht deutlich, dass diese die gleiche Bedeutung für die Beschreibung der acht Hauptkomponenten haben und durch diese repräsentiert werden. Deutlich wird dies insbesondere bei Betrachtung des *Loadingspektrums* in der ersten Hauptkomponente, welche ausschließlich Banden aufweist, die dem 2-NAT zugeordnet werden können (vgl. dazu das 2-NAT Spektrum in Abb. 5.28). Betrachtet man dazu den *Scoresplot* in Abb. 5.30, so weist der Datensatz von 2-NAT ebenfalls entlang der ersten Hauptkomponente und wird folglich gut durch das *Loadingspektrum*

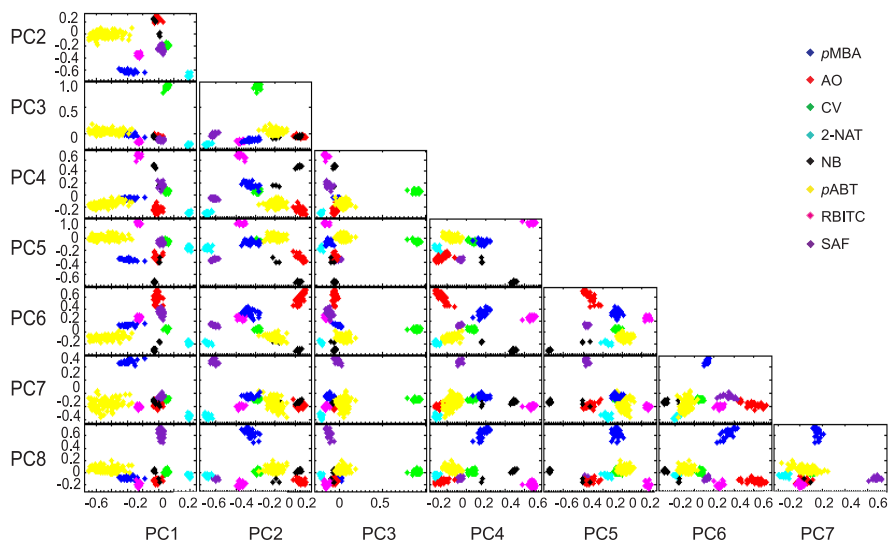


Abbildung 5.32: PCA der ersten acht PCA-Scores mit 387 Spektren der acht Reporter-Moleküle *p*ABT, 2-NAT, RBITC, CV, *p*MBA, NB, AO und SAF untersucht an Ag Nanopartikeln.

repräsentiert. Das *Loadingsspektrum* der zweiten Hauptkomponente weist dagegen spektrale Anteile von *p*ABT und *p*MBA auf, was zusätzlich durch den *Scoresplot* bestätigt wird. Die räumliche Nähe der Datensätze zueinander, spiegelt sich auch im *Loadingsspektrum* wider. Jedoch treten entlang PC2 zusätzlich spektrale Merkmale (siehe z. B. Bande bei 1623 cm^{-1}) von CV auf, das den Reportern *p*ABT und *p*MBA am nächsten liegt. Innerhalb von PC3 ist 2-NAT, im Vergleich zum Rest der Reporterklassen, positiv korreliert. CV-Moden treten vorwiegend entlang der negativen PC3-Achse auf, gefolgt von spektralen Merkmalen, die dem AO und NB zugeordnet werden können. Letztere werden durch das *Loadingsspektrum* PC4 repräsentiert. Die beiden zueinander sehr ähnlichen Reporter *p*MBA und *p*ABT können in PC8 erfolgreich mittels PCA voneinander separiert werden, was durch das *Loadingsspektrum* in PC8 ebenfalls deutlich wird. In PC5 bis PC7 wird deutlich, dass die zueinander sehr ähnlichen Reporter NB, SAF und AO sich nicht eindeutig voneinander trennen lassen und sich teilweise mit CV- bzw. RBITC-Moden überlagern (siehe *Scores*). Die PC Scores für die Reporterspektren untersucht an Ag Nanopartikeln zeigt Abb. 5.32. Innerhalb der ersten drei Komponenten lassen sich die zueinander sehr ähnlichen PC Scores der Reporter NB, AO nicht voneinander trennen; allerdings ist im Vergleich zum Au

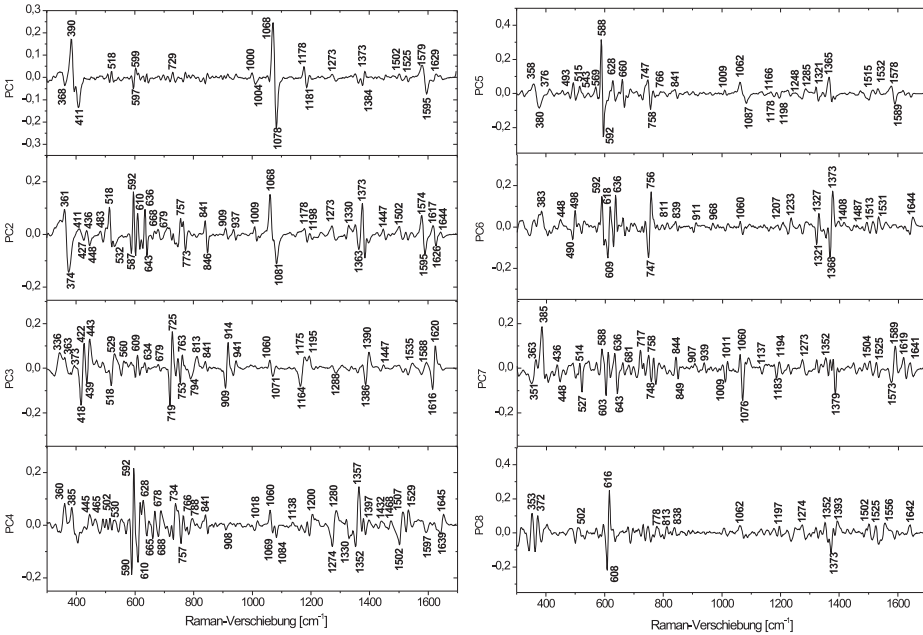


Abbildung 5.33: Aus der PCA ermittelte *Loadingsspektren* der acht Hauptkomponenten für Ag NP.

in den ersten beiden Komponenten bereits eine Trennung von Safranin von den übrigen beiden Reportern NB und AO möglich. NB und AO lassen sich in PC1 *vs.* PC6 erst voneinander trennen. Ebenfalls fällt auf, dass bereits in den ersten drei PCs sich sowohl *p*MBA als auch *p*ABT gut voneinander separieren lassen, da diese zueinander sehr ähnlichen Raman-Signaturen zwei deutlich voneinander getrennte spektrale Klassen (siehe PC1 *vs.* PC2) aufzeigen. Verglichen mit den *Scores* für Au NP ist 2-NAT gleichermaßen in den ersten drei Hauptkomponenten von den restlichen Daten trennbar und am weitesten entfernt. Grund dafür ist dessen charakteristisches Spektrum, das aufgrund seiner zahlreichen Banden sich von den übrigen Spektren abhebt. Auffallend ist, dass die *p*ABT-Spektren eine große Intraklassenvarianz im Vergleich zur RBITC-*Scores* aufzeigen.

Abb. 5.33 zeigt die aus der PCA berechneten *Loadingsspektren* für die acht Hauptkomponenten im Falle der an Ag NP untersuchten Reporter-Moleküle. Verglichen mit den *Loadingsspektren* für Au NP, lassen sich in der ersten PC spektrale Merkmale von 2-NAT (entlang der positiven PC1-Achse) und *p*ABT entlang der negativen PC1-PC2-Achse finden. Entlang der positiven PC2-Achse wird das *Loadingsspektrum* von AO- und NB-Moden dominiert. Dass SAF erst in PC8 gut von den restlichen Reportern separiert werden kann, zeigt das *Loadingsspektrum* von PC8. Der *Scoresplot* in Abb. 5.33 zeigt eine spektrale Klasse, die entlang der positiven PC8-Achse verläuft und mit dem *Loadingsspektrum* gut übereinstimmt. Entlang der positiven PC3-Achse sind spektrale Merkmale, die hauptsächlich

Tabelle 5.8: Ausgabe-Parameter der PCA der Reporter-Signaturen an Au (links) und an Ag NP (rechts).

| Scores | prozentual erklärter Anteil für PC | Scores | prozentual erklärter Anteil für PC |
|--------------------------|------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| PC 1 | 24.97 % | PC 1 | 16.96 % |
| PC 2 | 13.96 % | PC 2 | 12.60 % |
| PC 3 | 11.67 % | PC 3 | 12.02 % |
| PC 4 | 10.62 % | PC 4 | 9.67 % |
| PC 5 | 7.77 % | PC 5 | 8.60 % |
| PC 6 | 5.89 % | PC 6 | 7.82 % |
| PC 7 | 5.44 % | PC 7 | 6.31 % |
| PC 8 | 2.16 % | PC 8 | 4.44 % |
| Q Residuen | 17.58 % | Q Residuen | 22.59 % |
| Hotelling T ² | 82.42 % | Hotelling T ² | 77.41 % |

von CV herrühren, vertreten. RBITC-Moden werden ebenfalls gut im *Loadingsspektrum* der vierten PC vertreten und erklären diese Hauptkomponente aufgrund der darin enthaltenen spektralen Merkmale. Für Acridinorange erfolgt die Erklärung für PC6 entlang dieser und *p*MBA dementsprechend entlang der positiven PC7-Achse.

Die Aufteilung bzw. Verteilung der Hauptkomponenten erfolgt für beide SERS-Substrate auf unterschiedliche Art und Weise. Diese Tatsache spiegelt sich in den PC-*Scores* sowie in den *Loadingsspektren* wider. Die Ursache dafür ist in den Reporter-Spektren zu finden, die für beide Substrate nicht exakt gleiche spektrale Merkmale aufzeigen. Die Reporter-Signatur von Acridinorange sowie Safranin (für Au NP) zeigt, verglichen mit den auf Ag NP gemessenen Reporter-Spektren von AO und SAF, einige Abweichungen auf, die wiederum mit abweichenden Resultaten der PCA-Analyse einhergehen.

5.4.2 Hierarchische Clusteranalyse

Bei der Hierarchischen Clusteranalyse wurde die Gesamtinformation aller Reporterspektren über einen spektralen Bereich von 300-1700 cm^{-1} untersucht. Es sollte anhand der Clusteranalyse gezeigt werden, dass eine Diskriminierung der Reporter-Signaturen anhand ihrer spektralen Fingerabdrücke möglich ist. Die Ergebnisse der HCA zeigen Abb. 5.34 bzw. Abb. 5.35. Die Dendrogramme für Au und Ag NP spiegeln die hierarchische Anordnung der verschiedenen Reporter-Signaturen wider, und zwar angeordnet in einer Baumstruktur. Die Dendrogramme zeigen, dass innerhalb der jeweiligen Reporterklasse eine kleinere Varianz vorliegt als zwischen den verschiedenen Reporter-Gruppierungen. Ursache für die innerhalb eines Reporters vorliegende Varianz ist das S-N-Verhältnis, das innerhalb der gemessenen Raman-Signaturen geringfügig schwankte. Die Ähnlichkeit der Raman-Signaturen von *p*ABT und *p*MBA, die an Au NP gemessen wurden, ist im Dendrogramm ebenfalls zu erkennen. Die Reporter NB, AO und SAF liegen ebenfalls dicht beieinander innerhalb einer übergeordneten Gruppe mit einer Heterogenität von ca. 5.5. Die Reporter-Signaturen von 2-NAT hingegen weisen die höchste Heterogenität auf und liegen als eigener Cluster, gefolgt von *p*MBA und *p*ABT weit von den übrigen entfernt. Hieraus kann geschlossen werden, dass 2-NAT am unähnlichsten im Vergleich zu den restlichen Reporter-Signaturen ist.

Betrachtet man das Dendrogramm der an Ag NP untersuchten SERS-Signaturen, so wird auch hier deutlich, dass 2-NAT, verglichen mit den übrigen Reporter-Klassen, ebenfalls weit entfernt liegt. Allerdings liegen die Reporter-Signaturen von *p*ABT und *p*MBA wei-

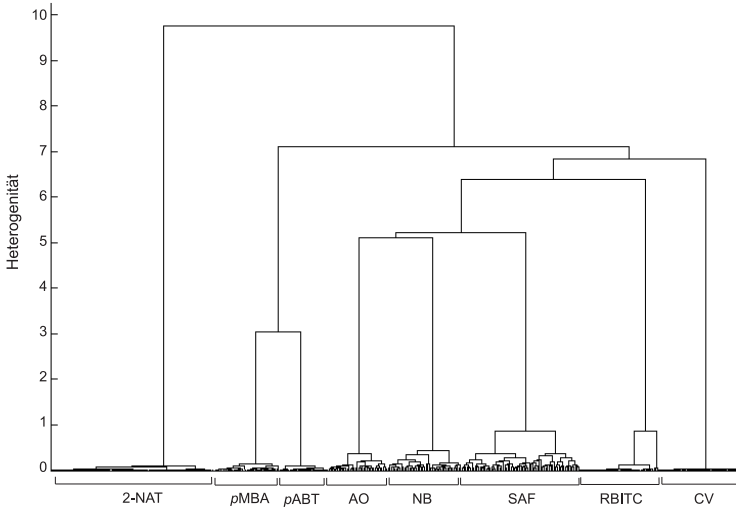


Abbildung 5.34: Hierarchische Clusteranalyse der acht Reporter (bei Au NP).

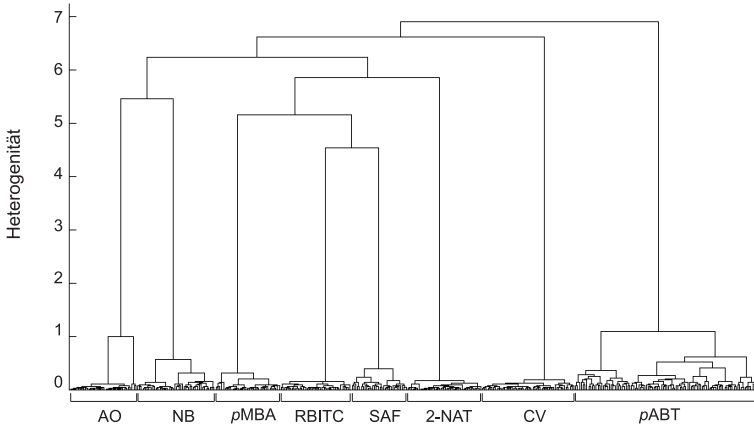


Abbildung 5.35: Hierarchische Clusteranalyse der acht Reporter (bei Ag NP).

ter voneinander weg als im Falle für Au NP. AO und NB bilden eine eigene Gruppe, jedoch in Abwesenheit von SAF. Vergleicht man dazu die *Scores* in Abb. 5.32, so lässt sich dort ein vergleichbares Resultat finden. Offenbar ist aufgrund der Natur der gemessenen Reporter-Signaturen an Ag NP eine bessere Separation unter den strukturell sehr ähnlich aufgebauten Molekülen AO, NB und SAF gegeben als im Falle für Au NP.

Die HCA stellt somit eine geeignete Methode zur Untersuchung und Identifizierung von Raman-Signaturen mit sehr hoher Ähnlichkeit zueinander dar. Dies macht sie zu einem nützlichen Werkzeug für die Analyse von Reporter-Signaturen speziell für Multiplexing-Experimente, in denen mehr als ein Reporter verwendet wird. Eine automatische Klassifizierung sowie Mustererkennung scheint somit möglich.

5.4.3 PCA und MCR: Binäre Reporter-Mischspektren

In Anwendungen, wo Sonden *Label*-Funktion haben, wie z. B. in Immunoassays, können neben chemischen Separierbarkeitsanalysen, Reporter durch bestimmte andere spektrale Parameter unterschieden werden (siehe Abschn. 5.2). Wenn man SERS-Sonden als *Tags* in mikrostrukturierten bioanalytischen Anwendungsplattformen einsetzen möchte, würde es sich anbieten zwei oder mehrere Reporter zugleich mit Hilfe multivariater Verfahren unterscheiden zu können, insbesondere dann, wenn spektrale Datensätze mit Reportern mehrere Charakteristika enthalten. Beim Abrastern einer mikrostrukturierten Plattform, die verschiedenartige *Labels* enthält, können dabei z. B. Mischspektren auftreten, da das abgerasterte Volumen größer sein kann als die mikrostrukturierte Umgebung selbst. Im Folgenden werden deshalb multivariate Methoden wie die PCA und MCR zur Identifikation und Extraktion spektraler, überlagerter Information einzelner Reporter-Signaturen aus binären Raman-Mischsignaturen diskutiert.

Wie in Abschn. 3.5 beschrieben, erfolgte die Konjugation der Reporter getrennt voneinander, um eine Konjugation beider Reporter an die NP zu vermeiden. Die Präparationsvorschriften der einzelnen Reporter-mischungen zeigt folgende Übersicht:

Tabelle 5.9: Übersicht zur Präparation binärer Mischsonden, die in zwei separaten Schritten hergestellt wurden (siehe Abschn. 3.5).

| Mischungen | Au $c_{ReporterI}$ [M] | Au $c_{ReporterII}$ [M] | Salzkonzentration [mM] |
|----------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| <i>p</i> MBA- <i>p</i> ABT | 10^{-5} | 10^{-6} | 30 |
| <i>p</i> MBA-2-NAT | 10^{-5} | 10^{-6} | 100 |
| <i>p</i> MBA-RBITC | 10^{-5} | 10^{-5} | 30 |
| <i>p</i> MBA-CV | 10^{-5} | 10^{-7} | 30 |
| <i>p</i> MBA-NB | 10^{-5} | 10^{-6} | 30 |
| <i>p</i> MBA-AO | 10^{-6} | 10^{-5} | 30 |
| <i>p</i> MBA-SAF | 10^{-6} | 10^{-6} | 30 |

Abb. 5.36 zeigt das Reinspektrum des Reporter-Moleküls *p*MBA und im Vergleich dazu die untersuchten binären Reporter-Gemische (B-H).

Um die spektralen Merkmale der Mischspektren mit den von Reinspektren vergleichen zu können und deren Ähnlichkeit zum jeweiligen Reinspektrum zu untersuchen, wurde zunächst eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt.

Abb. 5.37 zeigt die Ausgabe der ersten drei PCs der jeweiligen Reporter-Mischsignaturen. In (A) ist zu erkennen, dass sich die einander am ähnlichsten Reportersignaturen *p*ABT und *p*MBA sowie deren Mischsignaturen bei den Hauptkomponenten PC3-PC2 voneinander mit der PCA unterscheiden lassen. Am *Scoresdiagramm* lässt sich in den Mischspektren der dominierende spektrale Anteil des Reporters identifizieren. So ähnelt z. B.

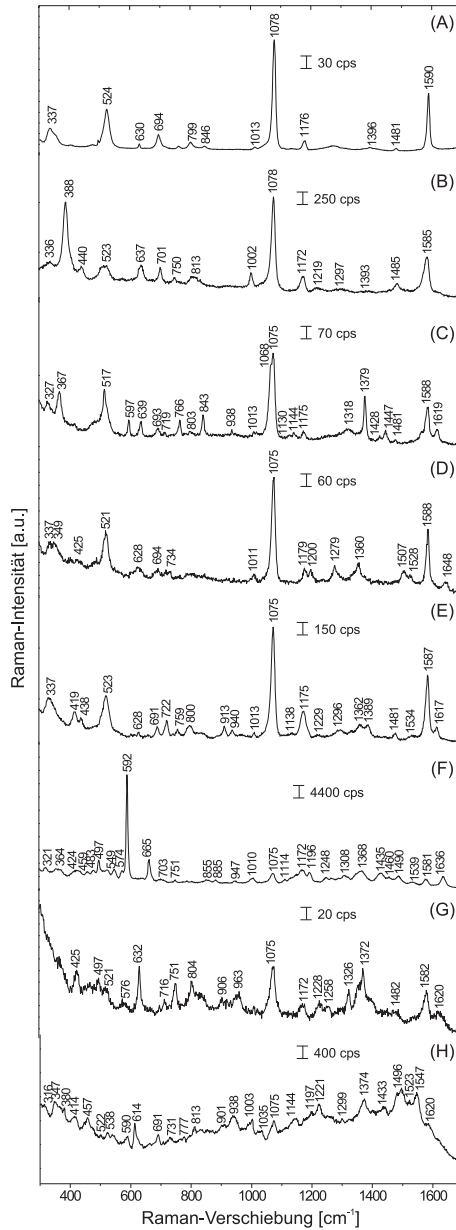


Abbildung 5.36: (A) SERS-Spektrum von *p*MBA sowie Reporter-Mischspektren (B) *p*MBA/*p*ABT, (C) *p*MBA/2-NAT, (D) *p*MBA/RBITC, (E) *p*MBA/CV, (F) *p*MBA/NB, (G) *p*MBA/AO und (H) *p*MBA/SAF, die an Au NP untersucht wurden. Anregungswellenlänge: 785 nm. Akkumulationszeit: 1 s.

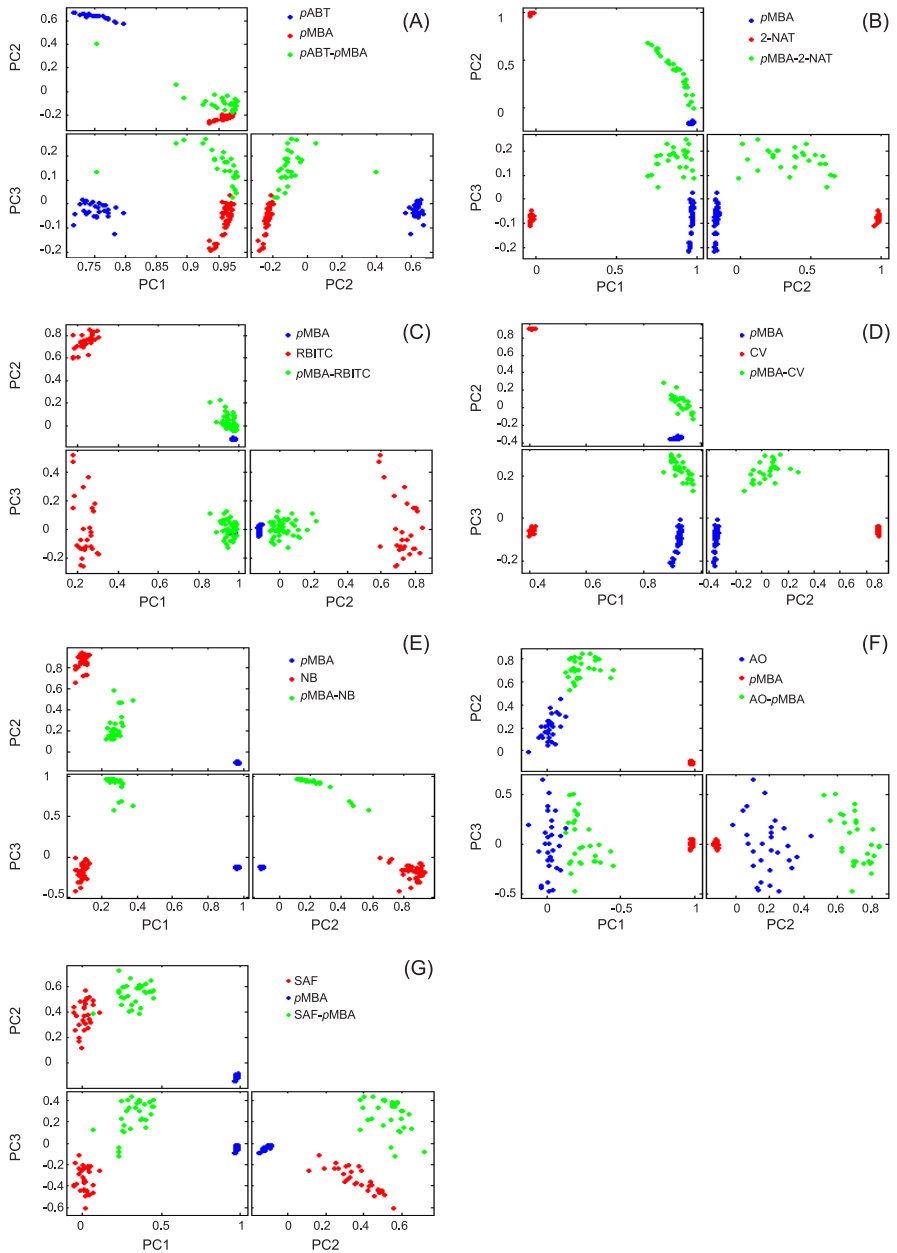


Abbildung 5.37: PCA der Mischspektren (A) *pMBA/pABT*, (B) *pMBA/2-NAT*, (C) *pMBA/RBITC*, (D) *pMBA/CV*, (E) *pMBA/NB*, (F) *pMBA/AO* und (G) *pMBA/SAF*. Die Analyse fand im Spektralbereich $300\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ statt.

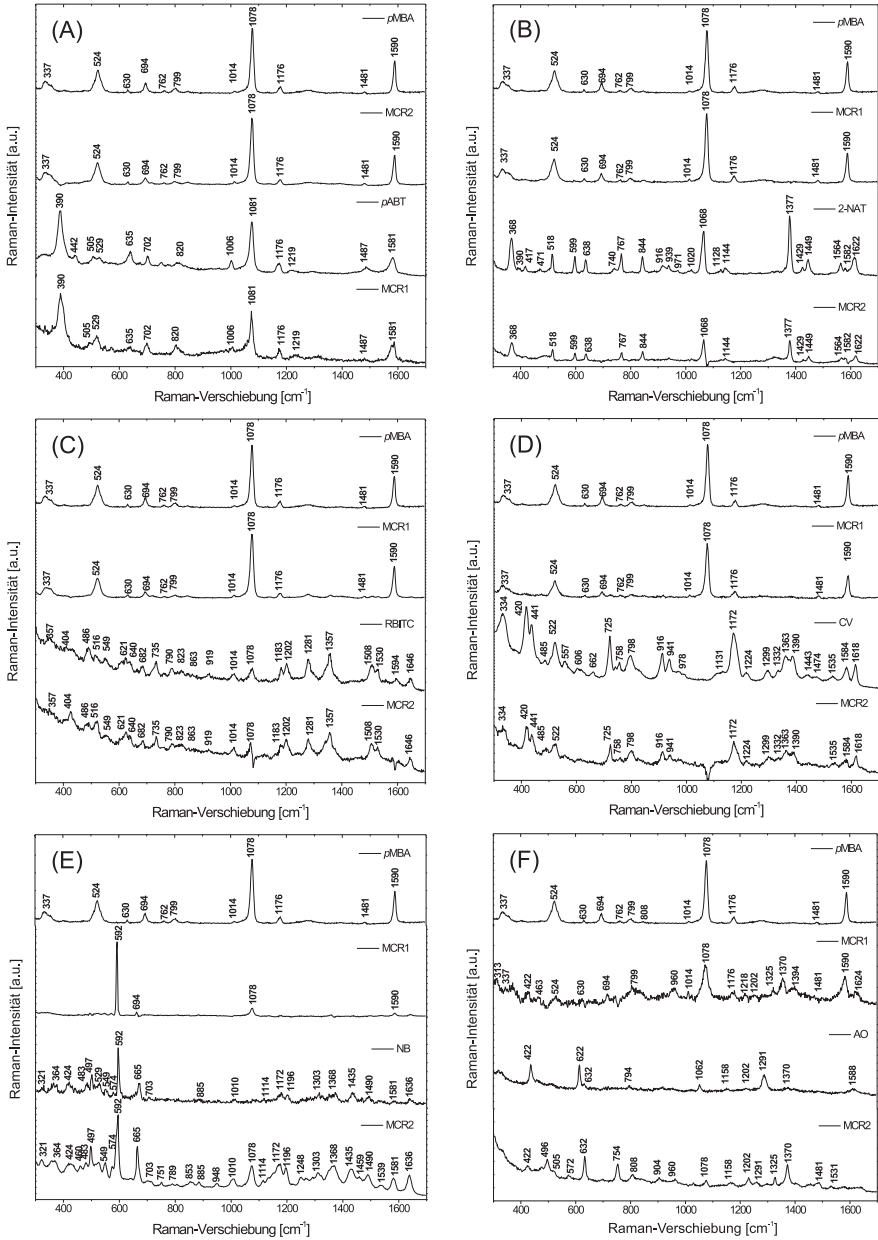


Abbildung 5.38: Berechnete MCR-Komponenten aus den Reporter-Mischspektren für Au NP (A) *p*MBA/*p*ABT, (B) *p*MBA/2-NAT, (C) *p*MBA/RBITC, (D) *p*MBA/CV, (E) *p*MBA/NB, (F) *p*MBA/AO Anregungswellenlänge: 785 nm. Anregungsintensität: 8·10⁴ W/cm². Akkumulationszeit: 1 s.

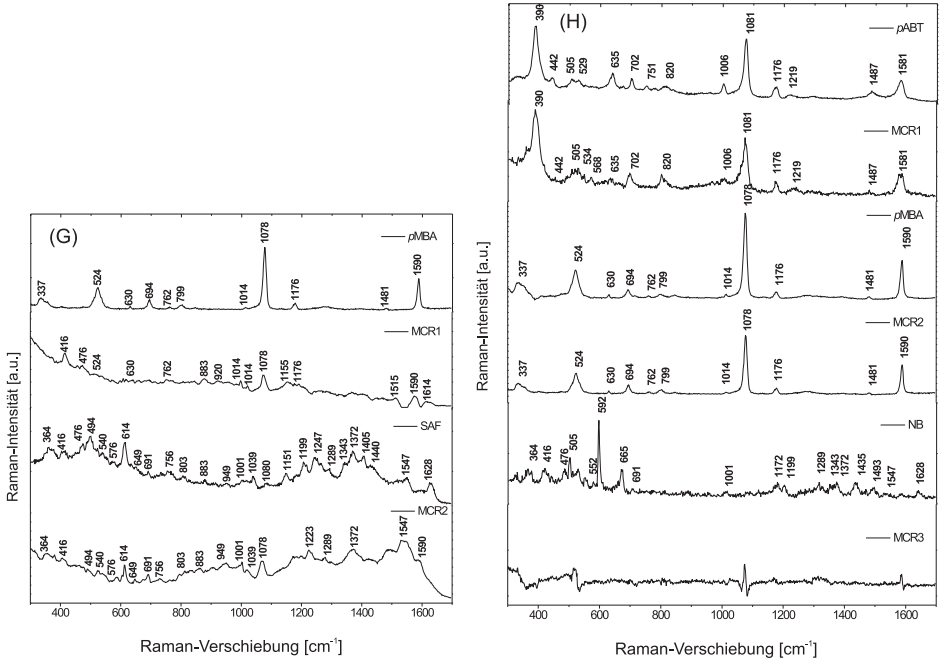


Abbildung 5.39: Berechnete MCR-Komponenten aus den Reporter-Mischspektren für Au NP (G) *p*MBA/SAF. (H) Ergebnisse der MCR unter Einbeziehung des NB-Reinspektrums. Anregungswellenlänge: 785 nm. Anregungsintensität: $8 \cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$. Akkumulationszeit: 1 s.

in Abb. 5.37 (A) das Mischspektrum den p MBA-Reinspektren.

Ein ähnliches Verhalten der Mischspektren gegenüber den p MBA-Reinspektren ist in den *Scoresdiagrammen* (B)-(E) zu erkennen.

Weiterhin ist mit Hilfe der PCA eine Separation der Signaturen p MBA/2-NAT möglich (B). Die Mischungen p MBA/CV (D) lassen sich ebenfalls sehr gut *via* PCA voneinander unterscheiden. Abb. 5.37 (E) zeigt, dass sich die Reporter-Signaturen von p MBA und NB sehr gut in allen drei PCs separieren lassen. Es liegt eine gute Separation zwischen p MBA/AO (F) und p MBA/SAF (G) vor.

Mit Hilfe der PCA können geeignete Kandidaten hinsichtlich ihres Multiplexings-Potentials ausfindig gemacht werden und auf evtl. Signalschwankungen untersucht werden. Letztere bilden eine wichtige Untersuchungsgrundlage für das Design stabiler SERS-Sonden in Bioapplikationen. Zudem zeigt die Qualität der Separation mittels PCA, dass die Dominanz einiger Reporter (z. B. NB) starken Einfluss auf die multivariate Unterscheidbarkeit von Reporter-Signaturen haben kann.

Tabelle 5.10: Ausgabe-Parameter der MCR.

| Reporter-Mischungen | Fitfehler | Varianz (R^2) | σ (Residuen) |
|---------------------|-----------|-------------------|---------------------|
| p MBA- p ABT | 6.99% | 99.51% | 9.75 |
| p MBA-2-NAT | 6.70% | 99.55% | 10.54 |
| p MBA-RBITC | 6.27% | 99.61% | 7.49 |
| p MBA-CV | 6.29% | 99.60% | 12.99 |
| p MBA-NB | 7.26% | 99.47% | 29.12 |
| p MBA-AO | 6.44% | 99.58% | 6.03 |
| p MBA-SAF | 6.66% | 99.56% | 6.66 |

Die Ergebnisse der multivariaten Kurvenauflösung von Reporter-Mischspektren sind in der Abb. 5.38 (A)-(G) dargestellt. Veranschaulichen soll die Analyse, inwiefern sich aus komplexen Mischungssignaturen ihre Reinsignaturen mit Hilfe dieser multivariaten Methode identifizieren lassen. Jedes Bild zeigt die in die MCR-Prozedur implementierten Reinspektren (z. B. Reporter p ABT in (A)) mit den jeweilig dazugehörigen berechneten MCR-Komponenten (MCR1, MCR2). Trotz der beiden zueinander sehr ähnlichen Reporter-Signaturen p ABT und p MBA werden die Spektren hinsichtlich ihrer charakteristischen Merkmale eindeutig identifiziert. Ein Vorteil besteht insbesondere in einer schnellen Analyse dieser komplexen Daten, die sich sensorisch nur schwer hinsichtlich ihrer einzelnen spektralen Beiträge erfassen und unterscheiden lassen.

In (C) können im Reporter-Gemisch p MBA/RBITC die Reporterspektren von p MBA und RBITC mit der MCR-Analyse gut modelliert werden. Abb. 5.38 (D) zeigt die Mischspektren p MBA/CV, wobei der Signal-Dip im CV-Spektrum indiziert, dass an dieser Stelle das MCR-Verfahren einen p MBA dominierenden Anteil erkennt, der sich mit dem von CV überlagert. Abb. 5.38 bzw. Abb. 5.39 zeigen die Mischspektren p MBA/NB (E), (F) p MBA/AO und (G) p MBA/SAF.

Die Grenzen der eindeutigen Identifizierung eines Reporters aus dem Mischdatensatz werden in Abb. 5.38 (E) deutlich. Auffallend ist die Dominanz des Reporters NB gegenüber p MBA. Die berechneten MCR-Komponenten zeigen, dass aus dem Mischspektrum die p MBA-Komponente am schlechtesten, verglichen mit den anderen MCR-Komponenten,

modelliert wurde. Letzteres lässt sich ebenfalls an den Residuen (29.12%) in Tab. 5.10 erkennen.

Abb. 5.39 zeigt, dass unter Einbeziehung eines zusätzlichen Reinspektrums, das nicht in dem Mischspektrendatensatz p MBA/ p ABT enthalten ist, die MCR-Komponenten von p MBA und p ABT dennoch richtig modelliert wurden. Die MCR-Analyse konnte hingegen im Falle des NB-Reinspektrums dessen spektrale Information zur Modellierung nicht verwenden, bzw. die spektralen Komponenten des Nilblau wurden nicht als Bestandteil des Mischdatensatzes erkannt. In diesem Sinne ist die Methode diesbezüglich in der Lage, die richtigen Merkmale, die im Mischdatensatz vorhanden sind, zu erkennen.

Die Untersuchungen mit Hilfe der MCR haben somit gezeigt, dass hinsichtlich der Reporter-Mischspektren eine gute Extrahierung und Identifizierung der darin enthaltenen Reporter-Signaturen möglich ist.

5.4.4 Schlussfolgerungen: Multivariate Unterscheidbarkeit von Reportern

Die NIR-SERS Spektren der verschiedenen Reporter-Moleküle konnten mit Hilfe der PCA und HCA separiert werden und machten somit eine schnelle Analyse möglich. Die multivariaten Analysen, d. h., PCA und MCR an Reporter-Mischspektren, haben gezeigt, dass sich Misch- und Reinspektren voneinander separieren lassen. In der MCR-Analyse, die eine *a priori*-Information, d. h., die Kenntnis über die Reinspektren erfordert, war eine Identifikation der jeweiligen Reporter-Moleküle aus dem Mischdatensatz möglich. Ergänzende multivariate Verfahren wie die PCA können zusätzlich dazu beitragen, die Beziehungen der Reportersignaturen aus Gemischen hinsichtlich ihrer (Un-)Ähnlichkeiten automatisch und schnell zu bestimmen. Diese Zusatzinformation ist nützlich für die Festlegung von Ausschlusskriterien. Speziell für Multiplexing-Applikationen, wie z. B. DNA-Hybridisierungsstudien oder Multikomponenten-Markierung der Reporter-funktionalisierten Sonden für Immunoassay-Plattformen, wäre es mittels MCR-Verfahren möglich, aus unterschiedlichen Regionen überlagerte Signale zu extrahieren und deren einzelne spektrale Anteile ggf. zu quantifizieren.

5.5 Anwendung der Reporter für intrazelluläre Hybridsonden

Im Abschn. 5.4 konnte gezeigt werden, dass sich die verschiedenen und teilweise sehr ähnlichen Reporter-Signaturen voneinander mittels trivariater und multivariater Verfahren voneinander unterscheiden lassen. Da die Reporter eindeutig identifiziert werden konnten, sollten ausgewählte Reporter nun zur Konstruktion von Hybridsonden, die in einem *in vitro*-Experiment zum Einsatz kommen, verwendet werden. Für die Konstruktion einer SERS-Hybridsonde wurden aggregierte Au Nanopartikel gewählt, an welche jeweils eine Reporter-Art konjugiert wurde. SERS-Hybridsonden haben die Eigenschaft, dass sie Informationen von der biomolekularen Umgebung liefern. Um diese positiven Eigenschaften für die hier entwickelten Hybridsonden nutzen zu können, wurden zwei Reporter *p*ABT und 2-NAT in geringen Konzentrationen verwendet. Die Konzentrationen von 10^{-7} M (für *p*ABT) und 10^{-6} M (für 2-NAT) führte zu einer unvollständigen Bedeckung von ca. 20% der NP-Oberflächen (siehe Abschn. 3.7).

Einige Reporter-Moleküle kamen bereits erfolgreich zur Konstruktion von NIR-SERS-Sonden zum Einsatz, da zum einen ihre Signatur innerhalb der Biomatrix in geringen Mengen nachweisbar war und zum anderen die Sonden eine Detektion biomolekularer Bestandteile innerhalb der Zellen ermöglichten [8, 9, 55, 56].

Um die Multiplexing-Kapazität von Reporter-konjugierten SERS-Hybridsonden zu untersuchen wurden zwei verschiedene Hybridsonden konstruiert und innerhalb von 3T3-Zellen mittels univariater und multivariater Analysen untersucht [238].

5.5.1 Chemische und multivariate Bildgebung

Zur Untersuchung der Multiplexing-Kapazität anhand zweier konstruierter Au-Hybridsonden innerhalb von 3T3-Zellen, wurden mit Hilfe der chemischen (univariaten) Bildgebung Raman-Kartierungen aus den spektralen Datensätzen erstellt. Diese Methode ermöglicht es, die Intensität einer Ramanbande an jedem Ort x darzustellen, um daraus ein Bild zu rekonstruieren. Die chemische Kartierung findet verbreitete Anwendung, da sie in einfacher Art und Weise Informationen zur Lokalisation von Molekülen gibt, die einen intensitätsabhängigen Beitrag zur jeweilig ausgewählten Frequenz liefern.

Für die Untersuchung der SERS-Sonden in 3T3-Zellen wurden multivariate Methoden eingesetzt, da sie im Vergleich zur univariaten Bildgebung eine Identifikation und Separation von Komponenten unter Einbeziehung gesamter spektraler Datensätze ermöglichen. Aus diesem Grund wurden multivariate Kompressionsmethoden wie die Hauptkomponentenanalyse, die Hierarchische Clusteranalyse sowie die K-Means Clusteranalyse zur Untersuchung der Multiplexing-Eigenschaften der inkorporierten Hybridsonden verwendet und evaluiert.

Für die Duplex-Bildgebung in lebenden Zellen sowie zur Untersuchung des Multiplexing-Potentials von SERS-Hybridsonden wurden zwei verschiedene Reporter Moleküle, *p*ABT und 2-NAT an Au Nanoaggregate konjugiert und in das endosomale System von 3T3-Fibroblastenzellen über Fluid-Phasen-Aufnahme eingeschleust (siehe Abschn. 3.7).

Abb. 5.40 I zeigt, dass eine intrazelluläre Aggregation der inkorporierten Au Nanopartikel nicht klar unterm Lichtmikroskop beobachtet werden kann, da eine relativ kurze Inkubationszeit von 30 min vorlag. Die Aufnahme der Hybrid-Sonden konnte jedoch durch Auftreten von Raman-Signalen aus dem Zellinneren bestätigt werden. Die chemischen

Kartierungen von 3T3-Zellen zeigen die zwei unterschiedlichen inkorporierten Hybrid-Sonden in Abb. 5.40 II. Jeder Bildpixel innerhalb der Kartierung repräsentiert dabei ein Raman-Spektrum.

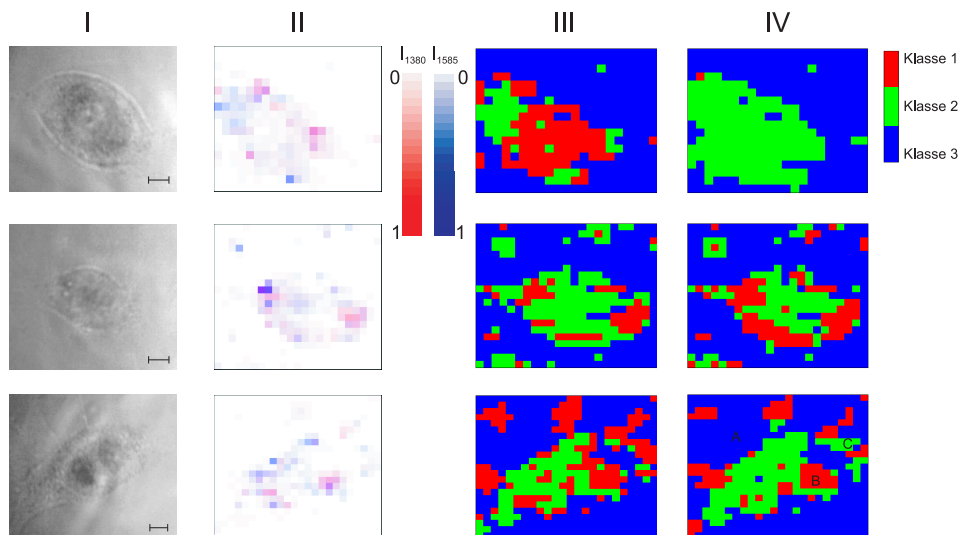


Abbildung 5.40: (I) Hellfeld-Aufnahmen, (II) Chemische Kartierungen, (III) HCA und (IV) K-Means Cluster-Kartierung der drei untersuchten 3T3-Zellen (Kartierungsgrößen (von oben nach unten): 21×18 Spektren, 23×21 Spektren und 24×23 Spektren). Skalierung von I: $4 \mu\text{m}$. Die Bilder in II wurden generiert durch eine Überlagerung zweier Bilder, basierend auf der Intensität der C-C-Streckschwingung von *p*ABT bei $\sim 1585 \text{ cm}^{-1}$ (blaue Skala) und bei der Ring-Streckschwingung (1380 cm^{-1}) von 2-NAT (rote Skala). Alle Bandenintensitäten wurden normalisiert zwischen dem niedrigsten (0) und höchsten Farbwert (1). Multivariate Cluster-Kartierungen (III und IV) basieren auf drei Klassen, die spektrale Information im Bereich $300\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$ enthalten. Aus den Spektren wurde die erste Ableitung gebildet und diese dann vektornormalisiert. Das Distanzmaß für die HCA war die Euklidische Distanz unter Implementierung des Wards Algorithmus. Die Klassen A, B und C im letzten Bild (Reihe IV) enthalten Signaturen wie sie in Abb. 5.41 repräsentativ dargestellt sind.

Die chemischen Kartierungen zeigen die verschiedenen farbkodierten Bandenintensitäten der beiden spezifischen Reporter-Moleküle (C-C Streckschwingung von *p*ABT bei 1585 cm^{-1} und Ring-Streckschwingung von 2-NAT bei 1380 cm^{-1}). Die blauen Pixel, die zwischen dem höchsten und niedrigsten Wert, d. h., von blau nach weiß skaliert wurden, entsprechen der normierten Bandenintensität der *p*ABT-Streckschwingung. Die roten Pixel repräsentieren die normierte Bandenintensität der 2-NAT-Ring-Streckschwingung (niedriger Wert: weiß, hoher Wert entsprechend rot). Ferner lieferte das Ergebnis dieser Bildanalyse violette Pixel, die aus der Überlagerung der Raman-Signaturen beider Reporter-

ter resultieren. Die chemische Kartierung zeigt weiterhin zelluläre, marginale Regionen, die hauptsächlich vom *p*ABT stammende Signaturen enthalten (siehe blaue Pixel in Abb. 5.40 II).

Es wurden multivariate Kartierungen unter Verwendung der HCA als unüberwachte Methode und K-Means als bewachte Analysenmethode erstellt. Die Ergebnisse der HCA-basierten Kartierungen von drei verschiedenen 3T3-Zellen zeigt Abb. 5.40 III, die entsprechenden K-Means-Bilder zeigt Abb. 5.40 IV. Vergleicht man die Cluster-Kartierungen, so ist jedem Pixel ein spezieller Farbwert zugeordnet, welcher wiederum einer bestimmten Klasse zugeordnet werden kann. Ein Vergleich beider multivariaten Analysen ergab, dass die Spektren insgesamt in drei spektrale Hauptklassen eingeteilt werden können. Obwohl beide Cluster-Methoden sich in ihren Algorithmen voneinander deutlich unterscheiden, zeigt ein Vergleich beider Kartierungen, dass die beiden Clustermethoden die gleichen spektralen Daten den entsprechenden Gruppen zuordnen (vergleiche Abb. 5.40 III und IV).

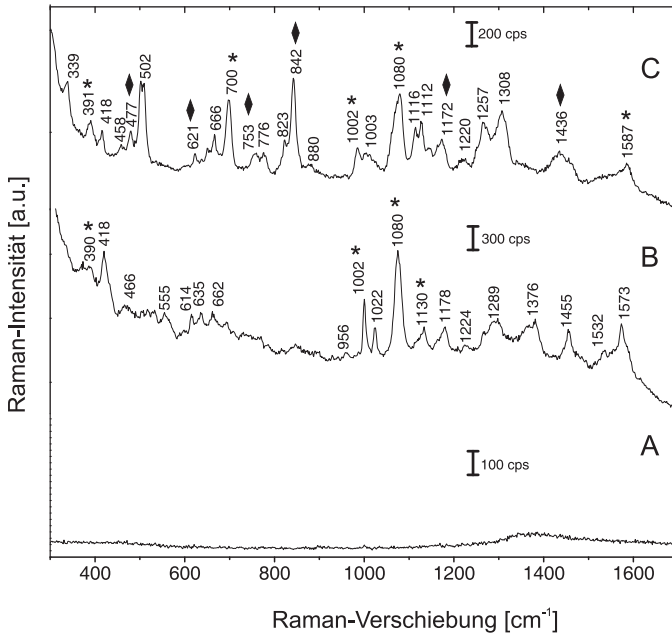


Abbildung 5.41: SERS-Spektren für die drei Klassen, die mittels K-Means-Analyse identifiziert wurden (siehe Bezeichnungen in Abb. 5.40 IV, letzte Reihe): (A) Spektrum ohne SERS-Signale, erhalten an einer Position, wo keine Nanosonden waren. (B) Spektrum, das SERS-Signale von *p*ABT (★) und zellulären Molekülen enthält. (C) Spektrum mit SERS-Signaturen beider Reporter *p*ABT (★) und 2-NAT (◆). Anregungswellenlänge: 785 nm. Anregungsintensität: $8 \cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$. Akkumulationszeit: 1 s.

Eine mögliche Ursache dafür ist, dass beide Methoden das gleiche Ziel-Kriterium haben. Letzteres beschreibt den Prozess, in welcher Art und Weise Objekte zusammengeführt

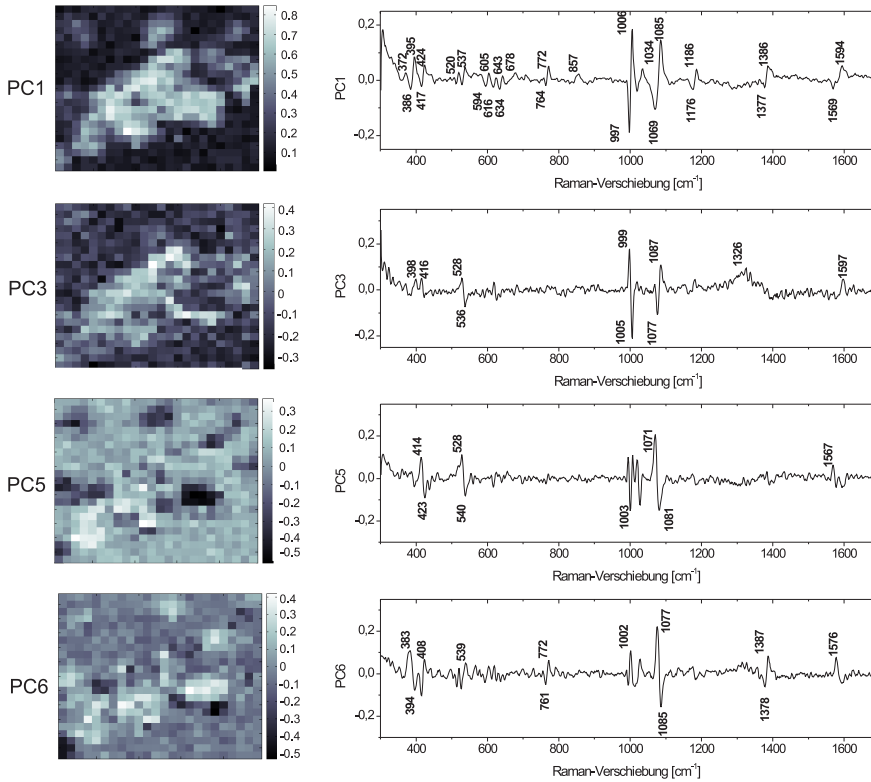


Abbildung 5.42: PCA-Kartierung (erstellt aus den Scores) einer 3T3-Zelle im SERS-Experiment mit *p*ABT- und 2-NAT-Hybridsonden (links) sowie die korrespondierenden *Loadingspektren* (rechts) für vier Hauptkomponenten. Der Datensatz zur Erstellung der PCA-Kartierung bestand aus 552 Spektren (vgl. Abb. 5.40).

und in Gruppen eingeteilt werden, was zu einer Maximierung der Varianz zwischen zwei Clustern führt. Die Intraklassenvarianz wird dabei minimiert. Es liegen in der Eingruppierung der Spektren in bestimmte Klassen dennoch einige Unterschiede vor. Ein Grund dafür könnte darin liegen, dass während des Vorgangs der Cluster-Fusionierung bei der HCA Objekte (hier Spektren) schrittweise jeweiligen Gruppierungen zugeordnet werden, entsprechend ihrer geringsten Distanz zueinander, bis nächste Gruppierungen zu größeren Clustern entstehen. Im nächsten Schritt werden die Objekte mit den kleinsten Distanzen zueinander zusammengeführt. Während diesem irreversiblen Vorgang liegen alle Objekte hierarchisch angeordnet vor. Im Gegensatz dazu weist der K-Means Algorithmus zufällig n Objekte K Clustern zu und berechnet daraus die Euklidische Distanz zwischen den Objekten und Clusterzentren (Zentroiden). Deshalb wechselt im Vergleich zu hierarchischen Methoden die Zuordnung der Objekte zu bestimmten Clustern, da sich durch Neuberechnungen Cluster-Zentren umsortieren [239, 240]. Die Cluster-Bildgebung

basiert auf Signalen, die von Hybrid-Sonden stammen sowie Signalen von zellulären Komponenten. Letztere stammen von Molekülen, die in der Umgebung der Sonde verstärkt werden. Variierende relative Signalintensitäten, die in verschiedene Spektren desselben Reporter-moleküls verursacht wurden, sei es durch Variation der Orientierung oder Konzentrationseffekte, können ebenfalls mit Hilfe der Cluster-Bildgebung erfasst werden. Vergleicht man die chemischen Kartierungen mit den multivariaten, so wird deutlich, dass mit multivariaten Methoden ein besserer Kontrast erzielt werden kann. So sind beispielsweise in Abb. 5.40 III und IV die filamentartigen Äste als charakteristische morphologische Merkmale der Fibroblasten-Zellen deutlich erkennbar, während sie in den chemischen Kartierungen nicht zu erkennen sind. Im Gegensatz zur chemischen Kartierung lassen sich in den HCA und K-Means-Kartierungen somit viel detailreichere Strukturen finden als bei der chemischen Kartierung.

Abb. 5.41 zeigt exemplarisch die drei verschiedenen Spektren, die ihren jeweiligen Klassen zugeordnet werden konnten (siehe auch letzte K-Means Kartierung in Abb. 5.40 IV). Die multivariate Analyse hat ergeben, dass offensichtlich eine Klasse alle Spektren enthält, die keine SERS-Signale wiedergibt (siehe Abb. 5.40, Klasse A). Die anderen beiden Cluster (B und C) enthalten hingegen Spektren mit SERS-Signalen. Vergleicht man die Eigenschaften unter Berücksichtigung der Multifunktionalität der SERS-Sonden, so enthalten alle Spektren Beiträge von Biomolekülen aus der Zelle, d. h., von der endosomalen Umgebung der Nanosonden. Die im Spektrum C vorhandenen spektralen Merkmale bei 502 cm^{-1} (S-S Streckschwingung), 614 cm^{-1} (C-C Drehschwingung, Tyr), 662 cm^{-1} (C-S Streckschwingung, Tyr), 956 cm^{-1} (C-C Gerüstschwingung, Proteine), 1022 cm^{-1} (Phenylalanin), 257 cm^{-1} (Amid III, Proteine), 1376 cm^{-1} (Trp) oder 1455 cm^{-1} (CH_2 , CH_3 , Proteine) lassen sich biomolekulare Komponenten zuordnen [55, 56, 241]. Ein Cluster enthält alle Spektren, die charakteristische Banden von *p*ABT und Banden zellulärer Komponenten aufweisen (siehe Spektrum B). Gruppe C weist Spektren auf, die Banden von 2-NAT und *p*ABT enthalten, jedoch wenige Komponenten von zellulären Molekülen aufzeigen. Da verschiedene Reporter-Beiträge in der spektralen Klasse C (siehe Abb. 5.40 IV) vorliegen, müssten diese von verschiedenen Sondentypen stammen, von einem Sondentyp, oder aus einem Anregungsvolumen, in dem mehr als eine Sonde erfasst wird. Betrachtet man die Lokalisierung der zwei Hybridsonden innerhalb der zellulären Ultrastruktur, so könnte dieser Typ an Mischspektren prinzipiell durch zwei verschiedene Situationen generiert worden sein:

(i) das fL-abgerasterte Volumen enthält verschiedene Vesikel, die jeweils einen unterschiedlichen Typ an Hybridsonden enthalten und (ii) es liegen größere endosomale Strukturen vor, die durch endosomale Fusionsprozesse [242] generiert worden sein könnten und somit einige Hybridsonden unterschiedlichen Typus enthalten. Solche Strukturen konnten bereits in Experimenten mit chemisch unmodifizierten SERS-Sonden und parallelen TEM-Untersuchungen untersucht werden [242, 243].

Die Hauptkomponentenanalyse wurde ebenfalls zur Bildkonstruktion verwendet. Zur Erstellung von Kartierungen wurden die ersten Ableitungen aller Daten heran gezogen. Die unterschiedlich berechneten Varianzen wurden zur Erzeugung des Bild-Kontrasts durch die aus der PCA berechneten *Scores* eingesetzt. Abb. 5.42 zeigt die erstellten PCA-Bilder für einen ausgewählten Datensatz (vgl. dazu die letzte Kartierung in Abb. 5.40 IV). Bei den Cluster-Kartierungen (letzte Reihe in Abb. 5.40) wird deutlich, dass

PC1 in die Richtung der größten Varianz in dem Datensatz zeigt, und verwendet werden kann um alle Spektren, die SERS-Signale liefern, als kontrastreiche Bildpixel darzustellen (helle Pixel im ersten Panel von Abb. 5.42). Dementsprechend enthält das *Loadingspektrum* von PC1 Merkmale aller Frequenzen, die charakteristisch für die Banden der Reporter-Moleküle *p*ABT und 2-NAT sind, sowie charakteristische Banden zellulärer Komponenten. Betrachtet man PC3, so kann ein Kontrast generiert werden zwischen Spektren, die Beiträge von beiden Reporter-Molekülen enthalten, im Gegensatz zu den anderen Spektren aus dem Datensatz. Die Verteilung der hohen *Scores* für PC3 zeigt, dass diese sehr gut übereinstimmen mit den Spektren aus Klasse C der Cluster-Kartierung (vergleiche PC3-Kartierung von Abb. 5.42 mit Abb. 5.40 IV in der letzten Reihe). Das Gleiche trifft für PC5 zu. Im Gegensatz dazu steht das aus PC6 rekonstruierte Bild, das spektrale Beiträge, die von 2-NAT stammen, zeigt. Hohe PC6 *Scores* stimmen ebenfalls mit den Spektren aus Klasse B im K-Means Bild (vgl. PC6 Bild in Abb. 5.42 mit Abb. 5.40 IV) überein, die hauptsächlich *p*ABT-Banden, aber kaum 2-NAT-Signale enthalten. Hierbei sei erwähnt, dass im Falle der intensiven Bande bei 1002 cm^{-1} , eine Überlagerung der charakteristischen Bande von *p*ABT mit der Ring-Atemschwingung des zellulären Moleküls Phenylalanin (siehe Abb. 5.41, Spektrum B) vorliegt [55]. Dieses spektrale Merkmal ist in allen Hauptkomponenten vertreten.

5.5.2 Untersuchungen zur pH-Sensitivität von SERS-Sonden

Eine andere Art von Hybridsonden soll im folgenden Abschn. diskutiert werden. Hierbei handelt es sich um aggregierte Au bzw. Ag NP, an welche ein pH-sensitiver Reporter konjugiert ist. Die SERS-Signatur eines Reporter-Moleküls, das eine pH-sensitive Raman-Signatur liefert, kann Informationen zum lokalen pH-Wert in der unmittelbaren Umgebung der Nanostruktur liefern [57]. Im Folgenden sollen verschiedene Reporter-Moleküle, die in der Arbeit verwendet wurden, auf ihre pH-Sensitivität untersucht werden. Es existieren bereits Arbeiten zum Reporter-Molekül *p*MBA auf Au NA, wobei es mit diesem Reporter möglich ist, pH-Änderungen innerhalb zellulärer Kompartimente lebender Zellen zu untersuchen [8, 9, 244, 245]. Als weitere Beispiele seien hier Arbeiten zu halochromen Molekülen wie das Methylengelb erwähnt, das ebenfalls pH-abhängige spektrale Merkmale aufgrund protonierbarer Endgruppen, wie die Dimethylaminogruppe und Azobindung, aufzeigt [246]. Mercaptopyridin z. B. konnte ebenfalls als pH-sensitives Molekül zur Konstruktion intrazellulärer pH-Sensoren identifiziert und eingesetzt werden [247].

Abb. 5.43 zeigt die *p*ABT-SERS-Spektren, die in Gegenwart von Au und Ag NA detektiert wurden. Für die Raman-Untersuchungen wurden Reporterkonzentrationen von $c\sim 10^{-5}\text{ M}$ eingesetzt. Dadurch wurde gewährleistet, dass jede im Spektrum auftretende Bande bzgl. des S-N-Verhältnisses gut zu erkennen ist. Die ausgewählten Bandenverhältnisse (grau hinterlegt) wurden in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgetragen. Als SERS-Substrate wurden präaggregierte Au NP ($c\sim 10^{-9}\text{ M}$) und Ag NP ($c\sim 10^{-9}\text{ M}$) verwendet. Der Modell-Analyt *p*ABT zeichnet sich dadurch aus, dass dieser stark auf der Au bzw. Ag NP-Oberfläche unter Ausbildung einer Au-S-Bindung bindet [190]. Die Schwefel-Gruppe von *p*ABT dissoziiert während der Anbindung auf der Metalloberfläche [248]. Die pH-sensitive NH_2 -Gruppe bleibt hingegen exponiert und protonierbar [249]. Bei den auf der NP-Oberfläche adsorbierten *p*ABT-Molekülen existieren dabei die Aromat- oder Quinonoid-Zustandsform, die abhängig vom pH-Wert und elektrostatischen Potential auftreten kann [250]. Betrachtet

man die spektralen Variabilitäten in den SERS-Spektren, so lassen sich geeignete Banden finden, mit denen es möglich ist, den pH-Wert im Bereich zwischen 3.83-9.95 zu untersuchen.

Zur Analyse der pH-Abhängigkeit von *p*ABT wurde das Bandenverhältnis aus der Bande bei 1586 cm^{-1} relativ zur Bande bei 1485 cm^{-1} (für Au NA) und im Falle des Ag NA die Bande bei 1593 cm^{-1} und 1492 cm^{-1} berechnet und in Abhängigkeit des pH-Wertes aufgetragen. Abb. 5.43 zeigt die berechneten Kalibrierkurven im pH-Bereich zwischen 3.83-9.95, wobei jeder Datenpunkt das berechnete Bandenverhältnis eines jeweiligen Mittelwertspektrums beim jeweiligen pH-Wert darstellt. Die pH-abhängige Bande bei 1586 cm^{-1} bzw. 1593 cm^{-1} kann der NH_2 -Scherenschwingung zugeordnet werden. Ferner lassen sich die Banden bei 1140 cm^{-1} und 1171 cm^{-1} auf den Protonierungszustand des Moleküls zurückführen, da im sauren Milieu die Aminogruppe protoniert vorliegt. Im basischen Milieu hingegen gibt das Ammoniumion ein Proton an die wässrige Lösung ab und geht in die ungeladene Aminogruppe über. Die intensiv verstärkten Banden bei 1161 cm^{-1} , 1386 cm^{-1} und 1432 cm^{-1} lassen sich den Ring-Schwingungen des Aromaten zuordnen und stimmen gut mit den Literaturwerten überein [251–254]. Die SERS-Spektren von *p*ABT wurden bereits untersucht und deren spektralen Komponenten diskutiert (siehe Abschn. 5.1.1) [58, 178, 179, 190, 249, 250, 255, 256].

Untersuchungen zu pH-Änderungen in lebenden Organismen sind insbesondere von Interesse, um die grundlegenden Mechanismen innerhalb von Zellen stattfindender physiologischer and metabolischer Prozesse besser zu verstehen.

Als Anwendungsbeispiel für die Detektion von pH-Werten innerhalb zellulärer Kompartimente sollen im Folgenden die Experimente zu *p*ABT-Au NA bzw. *p*ABT-Ag NA diskutiert werden. Die entstandenen Kalibrierkurven wurden im Falle des Reporters *p*ABT zur weiteren Analyse in 3T3-Zellen verwendet, um Falschfarbenplots aus den *p*ABT-Spektren zu erstellen. Abb. 5.44 zeigt die pH-Kartierung von drei 3T3-Zellen mit inkorporierten *p*ABT-Ag NA (A-C) und eine 3T3-Zelle mit inkorporierten *p*ABT-Au NA (D). Die Signaturen von *p*ABT, die innerhalb der Zellkompartimente, den Lysosomen, gemessen wurden, unterlagen keinen Signal-Schwankungen, was auf die chemische Robustheit und Inertheit der Hybridsonden zurückzuführen ist. Anhand der Falschfarben-Kartierungen ist ersichtlich, dass innerhalb der Zellkompartimente pH-Werte im Bereich 5-7 detektiert werden konnten. Somit ist die pH-Sensitivität bzw. der messbare pH-Bereich der *p*ABT-Sonde mit dem von *p*MBA-Sonden vergleichbar [8, 9].

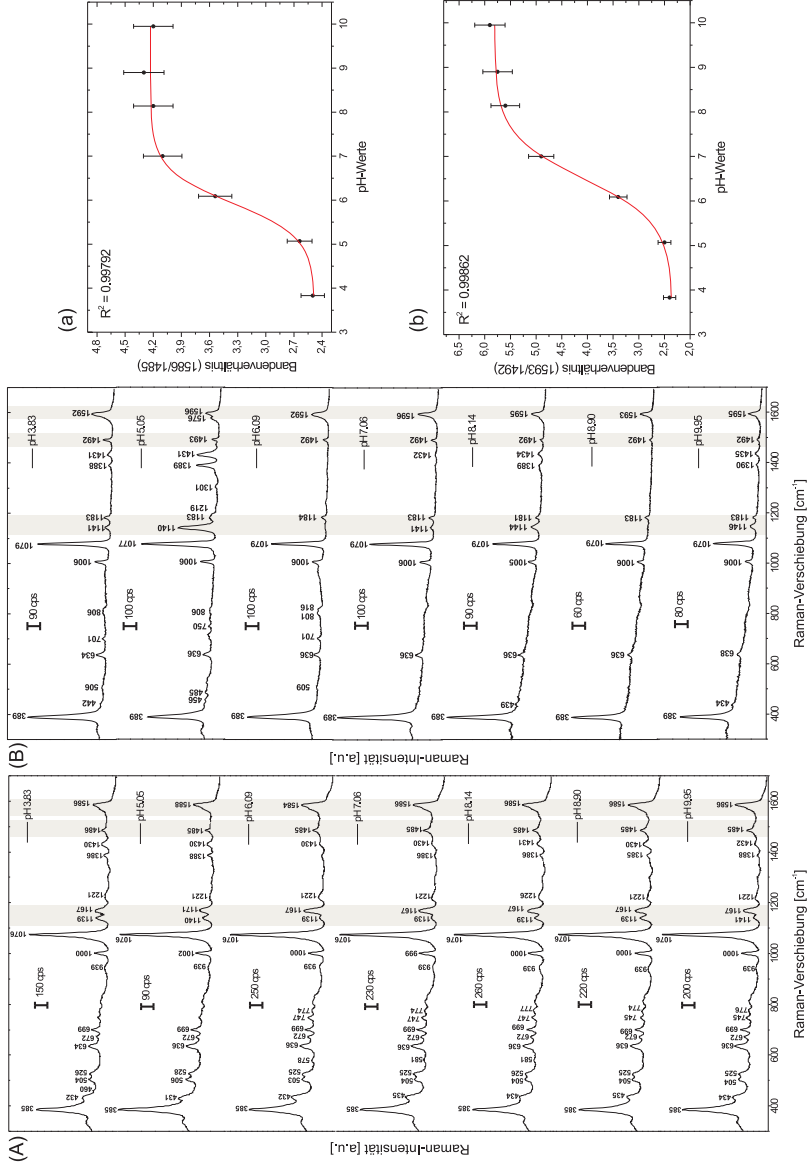


Abbildung 5.43: Untersuchungen der pH-Sensitivität von pABT an (A) Au NA und (B) Ag NA. Die pH-Kalibrierkurven von pABT an Au NA zeigt (a), für Ag NA (b). Anregungswellenlänge: 785 nm. Akkumulationszeit: 1 s.

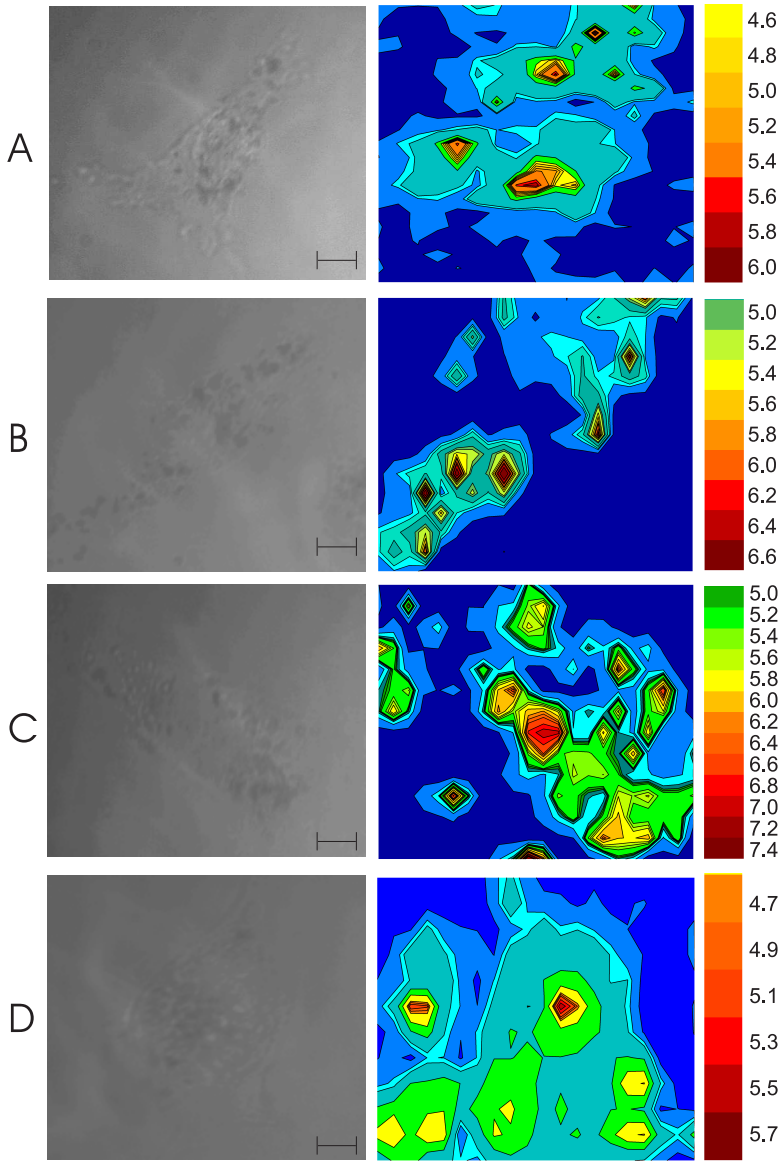


Abbildung 5.44: Untersuchungen der pH-Sensitivität von *p*ABT-Ag NA (A-C) in drei individuellen 3T3-Zellen. Die pH-Kartierungen A (21×17 Matrix), B (21×15 Matrix) und C (22×14 Matrix) wurden jeweils aus den pH-Kalibrierkurven von *p*ABT auf Ag NA (a) bzw. für Kartierung D (20×12 Matrix) aus der Kalibrierkurve von Au NA (b) erstellt (Größenbalken: $2.5 \mu\text{m}$). Anregungswellenlänge: 785 nm. Akkumulationszeit: 1 s.

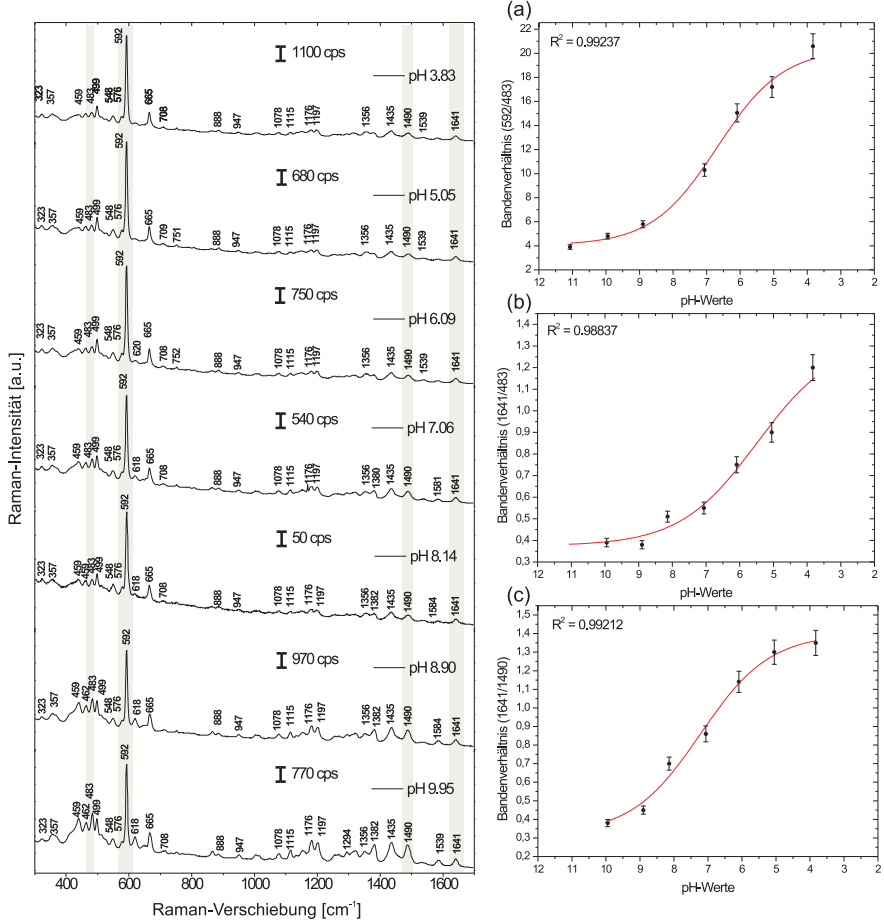


Abbildung 5.45: Untersuchungen der pH-Sensitivität von NB an Au NA. Die pH-Kalibrierkurven von NB an Au NA sind für die Bandenverhältnisse (a) 592/482, (b) 1641/483 und (c) 1641/1490 berechnet worden. Anregungswellenlänge: 785 nm. Akkumulationszeit: 1 s.

Ebenfalls wie bei der pH-Abhängigkeitsuntersuchung des Reporters *pABT* wurden Bandenverhältnisse im Falle des Phenoxazin-Farbstoffs Nilblau in Gegenwart von Au NA bestimmt. Für die Analyse wurden zwei Banden herausgesucht, wobei die Bande bei 1641 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{C}) + \nu(\text{C}-\text{N})$, Aminogruppe $\delta(\text{NH}_2)$) und bei 1490 cm^{-1} (Ring-Streckschwingung) für die Analyse verwendet wurden. Es wurden außerdem

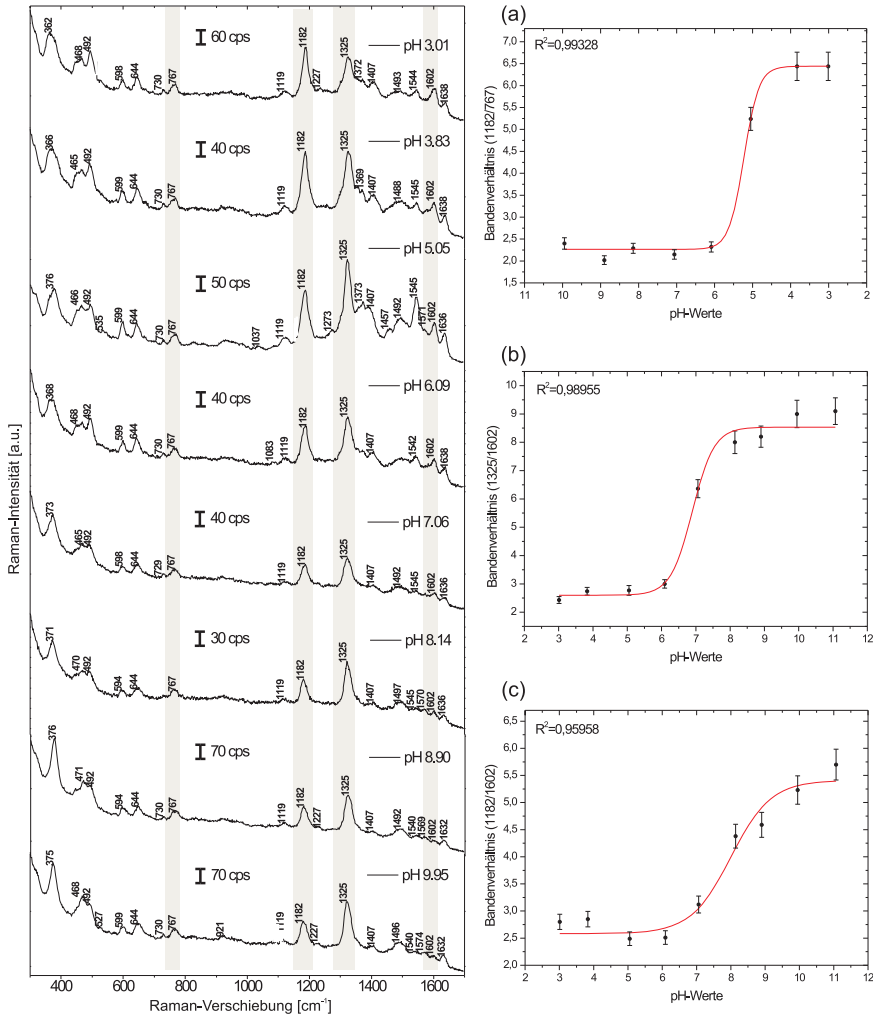


Abbildung 5.46: Untersuchungen der pH-Sensitivität von FITC an Ag NA. Die pH-Kalibrierkurven von FITC an Ag NA sind für die Bandenverhältnisse (a) 1182/767, (b) 1325/1602 und (c) 1182/1602 berechnet worden. Anregungswellenlänge: 785 nm. Akkumulationszeit: 1 s.

die Bandenverhältnisse aus 592 cm⁻¹ (arom. Biegeschwingung) und 483 cm⁻¹ (Ring-Deformationsschwingung, (CC), (CN)) berechnet. Die erstellten Kalibrierkurven zeigt Abb. 5.45 (a-c). Es konnten also mehrere pH-Wert-abhängige, spektrale Merkmale ermittelt werden. Im niederwellzahligen Bereich treten spektrale Unterschiede bei 459 cm⁻¹ und 483 cm⁻¹ in Form einer Verstärkung der Banden bei hohem pH-Wert auf. Dies lässt

sich ebenfalls bei 620 cm^{-1} , 865 cm^{-1} , 947 cm^{-1} , 1078 cm^{-1} , 1154 cm^{-1} , 1176 cm^{-1} , 1197 cm^{-1} , 1382 cm^{-1} , 1435 cm^{-1} , 1490 cm^{-1} und 1539 cm^{-1} beobachten [193, 257]. Unterschiede sind in den relativen Signalintensitäten ebenfalls zu verzeichnen. Auffallend ist, dass bei niedrigen pH-Werten ($\text{pH}\sim 3.8-7$) die Bandenverhältnisse deutlich höher sind als bei höheren pH-Werten. Eine Ursache dafür könnte ebenfalls in den unterschiedlich stark ausgeprägten Aggregationszuständen der NP sein, der durch den pH-Wert ebenfalls beeinflusst werden kann.

Abb. 5.46 zeigt die pH-abhängigen SERS-Signaturen von Fluoresceinisothiocyanat in Gegenwart von Ag NA. Fluorescein und sein Derivat Fluoresceinisothiocyanat existieren abhängig vom pH-Wert in drei verschiedenen prototropischen Zuständen: der kationischen ($\text{pk}_1=1.95$), neutralen ($\text{pk}_2=5.05$) und anionischen Form ($\text{pk}_3=7.00$) [186, 258]. Es wurden die Banden-Intensitätsverhältnisse bei 1182 cm^{-1} (C-OH, Phenol) und 767 cm^{-1} (CH-Biegeschwingung des Xanthen-Rings), 1325 cm^{-1} (CH-Biegeschwingung des Xanthen-Rings) und 1602 cm^{-1} (C-C-Streckschwingung) sowie 1182 cm^{-1} und 1602 cm^{-1} gebildet. Die Kalibrierkurven zeigen unterschiedliche sigmoidale Verläufe, wobei die Qualität des sigmoidalen Fits sich an den Bestimmtheitsmaßen ablesen lässt. Unterschiede sind in den relativen Signalintensitäten ebenfalls (vgl. $\text{pH}\sim 3.83$ mit $\text{pH}\sim 9.95$) zu verzeichnen. Vergleicht man die Bestimmtheitsmaße der Sigma-Kurven, so weist das Bandenintensitätsverhältnis zwischen 1182 cm^{-1} und 767 cm^{-1} den höchsten R^2 -Wert verglichen mit den beiden anderen auf (siehe Abb. 5.46 (a)). Neben pH-sensitiven Veränderungen der relativen Bandenintensitäten konnten zwei neue Banden bei 1370 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} identifiziert werden. Dies ist hier besonders in den Spektren ($\text{pH}\sim 3-7.06$) zu erkennen, bei denen zum neutralen pH-Bereich sich die Banden bei $\sim 1370\text{ cm}^{-1}$ und 1600 cm^{-1} abschwächen. Hildebrandt *et al.* konnten bei SERRS-Untersuchungen zu Fluorescein ebenfalls spektrale Unterschiede des Fluoresceins oberhalb von 1000 cm^{-1} im sauren Milieu ($\text{pH}\sim 3.5$) beobachten [186].

5.5.3 Schlussfolgerungen: Reporter als Komponenten für SERS-Hybridsonden

Die Untersuchungen zweier verschiedener SERS-Hybridsonden, bestehend jeweils aus *p*ABT-Au NA und 2-NAT-Au NA, haben ergeben, dass eine Visualisierung derer in lebenden Zellen durch Erstellung von HCA, PCA und K-Means Kartierungen möglich ist. Neben den charakteristischen Signaturen der beiden biokompatiblen SERS-Sonden konnten spektrale Informationen aus den lebenden 3T3-Zellen extrahiert werden. Die multivariaten Verfahren machten eine schnelle automatisierte Analyse der inkorporierten Sonden möglich. Ausgehend von den beiden aromatischen Thiolen, die an Au NP in geringen Konzentrationen verwendet wurden, suggerieren diese, dass eine Vielzahl an aromatischen Thiolen zur Konstruktion von Hybridsonden für eine sensitive Detektion geeignet ist. Die Ergebnisse der Clusteranalysen und PCA indizieren, dass eine schnelle multivariate Evaluierung eines Gesamtdatensatzes bestehend aus verschiedenartigen Sonden, bei visueller Inspektion der SERS-Spektren möglich ist [259]. Die konstruierten Sonden können somit in Hochdurchsatzassays Anwendung finden und mittels multivariater Methoden schnell analysiert werden.

Die Untersuchungen zur pH-Sensitivität von SERS-Sonden haben gezeigt, dass diese jeweils mit den Reporter-Molekülen *p*ABT, NB und FITC konjugiert eine charakteristische

pH-Antwort der sie umgebenden Puffer liefern. Exemplarisch für den Reporter *pABT* konnte gezeigt werden, dass die pH-Sonden eine Detektion von pH-Werten in intrazellulären Kompartimenten zulassen. Jedoch sei hier betont, dass die Nanosonden keine zelluläre Information aus der biologischen Umgebung liefern. Da die freibeweglichen *pABT*-pH-Sensoren über das gesamte Zytosol verteilt vorliegen, liefert die pH-Kartierung ein hyperspektrales Bild einer lebenden Zelle. Alle Reporter-Moleküle sind im pH-Bereich zwischen 3.83 und 9.95 einsetzbar.

6 Charakteristika von BSA-Reporter-Konjugaten und ihre Anwendung für intrazelluläre Hybridsonden

Zur Konstruktion nanopartikulärer SERS-Hybridsonden werden in diesem Abschn. die spektralen Eigenschaften von Reporter-Molekülen, die an ein Protein kovalent gekoppelt wurden, diskutiert. Hierbei wurde eine direkte Anbindung des BSA an die Au- bzw. Ag-Nanopartikeloberfläche zur Stabilisierung ausgenutzt [260]. Auf die Verwendung von Stabilisator-Agenzien, wie z. B. der Passivierung mittels *Linker*-Moleküle, wurde verzichtet, da diese die nachteilige Eigenschaft haben, die freie Nanopartikel-Oberfläche mit unerwünschten Adsorbaten zu belegen und somit eine Anbindung anderer Biomoleküle verhindern [261, 262]. Die Ankopplung von Proteinen an Nanopartikel erlaubt zudem nicht nur eine Nanopartikelstabilisierung, sondern auch die Einbringung biokompatibler Funktionalitäten. Die Einbringung solcher Zielfindungselemente (Antikörper) ans BSA soll im nächsten Schritt dieser Arbeit erfolgen. Um die erfolgte Kopplung von Reportern an BSA nachzuweisen, wurden Charakterisierungsmethoden wie die UV/Vis-Spektralphotometrie und MALDI-TOF-MS angewendet. Letztere diente der Überprüfung der erfolgten Kopplung sowie eine Abschätzung der Kopplungsdichten.

Für die Anwendbarkeit der konstruierten Hybrid-Sonden müssen deren chemische Inertheit, Stabilität und Identifizierbarkeit aufgrund ihrer sie auszeichnenden spektralen Signatur gewährleistet sein. Deshalb wurden die vibronischen Eigenschaften der verschiedenen BSA-Reporter-Konjugate außerhalb und innerhalb eines biologischen Systems, in diesem Fall in einer 3T3-Zellkultur, untersucht. Ein Vorteil von SERS wäre, dass die Sekundärstruktur von BSA bei Adsorption an NP untersucht werden kann.

Das hier verwendete Protein BSA, das über eine Sequenzhomologie von ca. 76% zu humanem Serum Albumin (HSA) verfügt, hat eine bedeutende physiologische Funktion in lebenden Organismen und stellt einen wesentlichen Bestandteil des Blutes dar [263, 264]. Zusätzlich trägt das gut wasserlösliche Protein zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes im Blutkreislauf bei und fungiert als Transportprotein für Abbauprodukte [265]. Präferentielle Anbindungsregionen für lösliche (z. B. Pharmazeutika) und wasserunlösliche (z. B. Fettsäuren) Liganden liegen in hydrophoben Einbuchtungen der Subdomänen IIA und IIIA [266, 267]. Diese Subdomänen werden durch Disulfidbrücken miteinander quervernetzt und bilden eine herzförmige Quartärstruktur aus [268]. BSA ist als Modell-Wirt geeignet, da seine Struktur genau untersucht ist.

Seine Verfügbarkeit, chemische Robustheit und hohe Affinität für kleine Moleküle mit variabler Struktur wie beispielsweise Farbstoffe (z. B. Porphyrine [269]), Zielfindungselemente wie Haptene [146] und Peptide [270, 271], begründen somit den vielseitigen Einsatz als endogenen Träger [272]. Die Ankopplung von Triarylmethan-Farbstoffen, wie beispielsweise Malchitgrünisothiocyanat, Kristallviolett, Ethylviolett sowie die nicht-kovalente Komplexierung von Fluorescein-Derivaten wie Bengalrosa [54, 273] oder Porphyrinen [274, 275] an BSA führt insbesondere dazu, dass diese Komplexe bei Anregung cytotoxische Eigenschaften entfalten können, welche im Zusammenhang mit der Photodynamischen Therapie (PDT) ausgenutzt werden können [276].

In der Bio-Raman-Spektroskopie konnten solche endogenen Träger, wie beispielsweise BSA-Indocyaningrün-Komplexe, bereits innerhalb zellulärer Kompartimente akkumuliert und untersucht werden, wie z. B. in Lysosomen [56]. Es existieren Untersuchungen zu

markierten Proteinen, deren Signatur mittels SERS außerhalb zellulärer Systeme ausgelesen werden konnte [277, 278].

Hinsichtlich der Verwendung von Fluorophoren [279] ist ein effizientes *Labelling* von Proteinen wichtig, wenn man diese als biokompatible Komplexe in Biosysteme einbringen will. So müssen die eingesetzten Fluorophor-Konzentrationen beachtet werden, da zu hohe Konzentrationen genotoxische Auswirkungen haben können.

Neben der Kontrastwirkung von BSA-Fluorophor-Komplexen können die eingebrachten Fluorophore verschiedenartig in Gegenwart von BSA wechselwirken.

Fluorescein-Derivate z. B. lassen sich mittels Raman-Spektroskopie untersuchen, insbesondere weil die Fluoreszenz in Gegenwart von Proteinen sowie protein-eingekapselter Nanopartikel gelöscht wird [280, 281]. Somit wäre eine Detektion ihrer vibronischen Struktur auch ohne SERS möglich.

In dieser Arbeit sollen die spektralen Eigenschaften von ungekoppelten und kovalent an BSA gekoppelten Reporter-Molekülen untersucht werden. Für eine spätere *in vitro*- und *in vivo*-Applikation ist zudem eine im Folgenden durchgeführte Diskussion von SERS-Spektren derer nötig.

6.1 Eigenschaften von BSA-Reporter-Konjugaten

Ziel dieser Präparation war es, die Farbstoffe kovalent an BSA zu koppeln, indem die Aminogruppe der Reporter Acridinorange, Safranin, Nilblau und *p*ABT eine Amidbin-

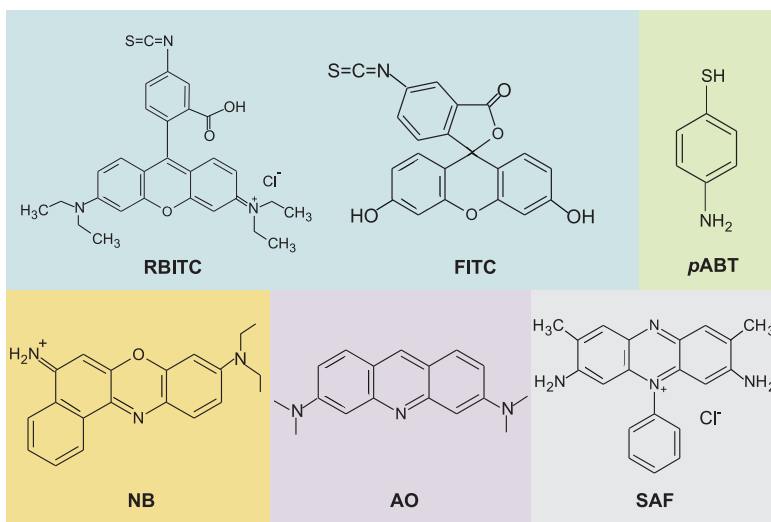


Abbildung 6.47: Strukturformeln der für die Kopplung verwendeten Reporter-Moleküle. Diese lassen sich in fünf Klassen unterteilen: Xanthen-Farbstoffe (Rhodamin(B)isothiocyanat (RBITC) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC)), Phenoxazin-Farbstoff Nilblau (NB), Acridin-Farbstoff Acridinorange (AO) und Phenazin-Farbstoff Safranin (SAF) sowie das *p*-Aminothiophenol (*p*ABT), das kein Fluorophor ist.

dung unter Beteiligung von EDC zur Carboxylgruppe des Proteins ausbildet [282]. Die Ankopplung der beiden Xanthen-Farbstoffe RBITC und FITC erfolgte durch die Isothiocyanatgruppe an die freien Aminogruppen des BSA, d. h., an die Lysinresiduen und N-terminalen Aminogruppen (siehe Abschn. 3.9). Abb. 6.47 zeigt die zur BSA-Kopplung verwendeten fünf verschiedenen Reporter-Klassen. Bei diesen Molekülen handelt es sich mit Ausnahme von *p*ABT um fluorogene Reporter-Moleküle.

6.1.1 UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen

Mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie lassen sich die ungekoppelten Reporter mit den an BSA-gekoppelten Reportern untereinander vergleichen. Die Kopplung kann dabei durch eine bathochrome Verschiebung im Extinktionsspektrum des Reporters verfolgt werden [277].

Abb. 6.48 zeigt die Extinktionsspektren im Spektralbereich von 250-800 nm. Farbstoffe, die an Proteine binden, koppeln vorwiegend an die protonierten Aminogruppen der Aminosäureresiduen oder an die freien Carboxylgruppen. Die erfolgte Kopplung geht häufig mit einem Anstieg der molaren Absorptivität und/oder bathochromen Verschiebung einher im Vergleich zum ungebundenen Farbstoff [283, 284]. Das BSA-AO-Konjugat bildet eine Ausnahme: Dort ist verglichen mit allen anderen Reportern die bathochrome Verschiebung des BSA-Acridinorange-Konjugats gering (vgl. Abb. 6.48 und Abschn. 6.1.2).

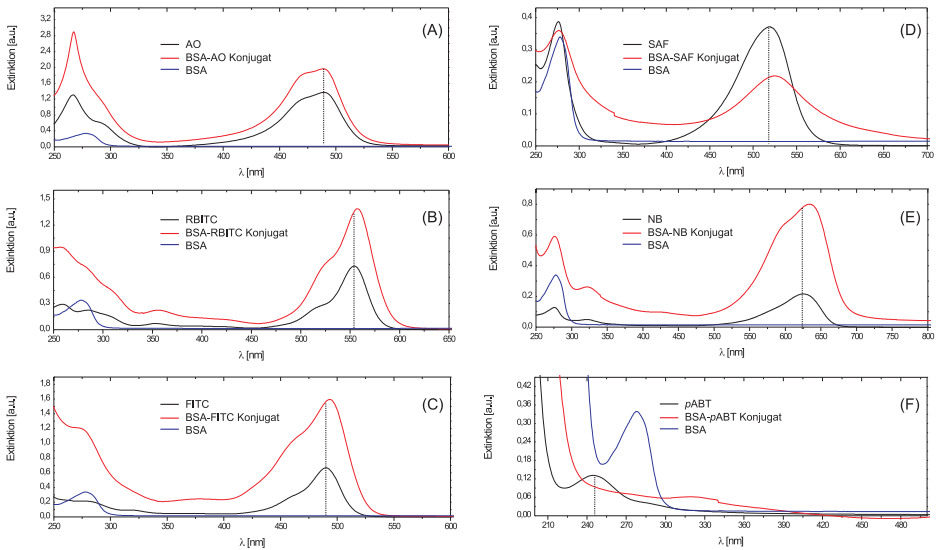


Abbildung 6.48: Extinktionsspektren der BSA-Reporter-Konjugate, Reporter und BSA (10^{-7} M) im Vergleich. (A) AO, BSA und BSA-AO, (B) RBITC, BSA und BSA-RBITC, (C) FITC, BSA und BSA-FITC, (D) SAF, BSA und BSA-SAF, (E) NB, BSA und BSA-NB und (F) *p*ABT, BSA und BSA-*p*ABT.

Das Extinktionsspektrum des BSA-*p*ABT-Konjugats zeigt bei Kopplung an das BSA keine auffällige Verschiebung, sondern liegt innerhalb der Extinktionskurve des BSA.

Verglichen mit den anderen Reportern zeigt das an BSA gekoppelte Safranin eine verminderte Extinktion. Die Ergebnisse in Tab. 6.11 zeigen, dass die Kopplung im Falle des Safranins an das BSA besser funktioniert hat als beim Nilblau. Ursache für diese unterschiedlichen Kopplungsausbeuten könnte das Lösungsmittel gewesen sein, da im Gegensatz zum Safranin das Nilblau nicht direkt in MES-Kopplungspuffer gelöst werden konnte, sondern zunächst in Dimethylformamid vorgelöst werden musste, ehe eine Weiterverdünnung erfolgen konnte.

6.1.2 MALDI-TOF-MS-Untersuchungen

Im Gegensatz zur UV/Vis-Spektroskopie ist eine Detektion ausschließlich kovalent gebundener Moleküle mittels MALDI-TOF-MS möglich, wodurch die Gefahr der Detektion leicht adsorptiv gebundener Moleküle ans Trägerprotein ausgeschlossen werden kann [119, 285]. Zwar können die Konjugate mittels UV/Vis-Spektroskopie charakterisiert werden (siehe Abschn. 6.1.1), jedoch ist diese Methode mit einigen Nachteilen verbunden. Ein Grund dafür ist, dass gekoppelte Moleküle sich schwer mit Hilfe der UV/Vis-Spektralphotometrie quantifizieren lassen, wenn deren Extinktion schwach ausgeprägt ist oder die Extinktion des gekoppelten Analyten mit dem Extinktionsmaximum des Trägerproteins zusammenfällt (siehe BSA-*p*ABT-Konjugat in Abschn. 6.1.1). Trotz ausreichender Aufreinigung des Kopplungsreagenz kann außerdem das Ergebnis verfälscht werden, so dass dadurch höhere Kopplungsdichten ermittelt werden als tatsächlich vorliegen. Deshalb erweist sich MALDI-TOF-MS hier als geeignete analytische Methode, da ausgeschlossen werden kann, dass nicht-kovalent gebundene Analyten miterfasst werden.

Tab. 6.11 zeigt die mittels MALDI-TOF-MS bestimmten durchschnittlichen Molekulargewichte, die für die unmodifizierten BSA-Standards mit den Molekulargewichten 66045 bzw. 66594 Da, die in zwei verschiedenen Experimenten verwendet wurden, bestimmt wurden. Die Abweichungen vom Molekulargewicht, das auf der Zusammensetzung der gesamten Aminosäuresequenz basiert und folglich 66430 Da beträgt [286], liegen bei ca. 0.6% bzw. 0.2%. Die natürlich vorkommende Isotopenverteilung ist Ursache dieser Abweichung. Abb. 6.49 zeigt die MALDI-Spektren der beiden ungekoppelten BSA-Standards (a,b) sowie der BSA-Reporter-Konjugate BSA-AO (c), BSA-RBITC (d), BSA-FITC (e), BSA-SAF (f), BSA-NB (g) und BSA-*p*ABT (h). Jedes Spektrum enthält zwei dominierende Peaks, die jeweils das Signal des einfach geladenen Moleküllions (M^+ , bei ca. 66000 m/z) und des zweifach geladenen Moleküllions (M^{+2} , bei etwa 33000 m/z) enthalten.

Der prozentuale Anteil modifizierbarer Residuen ($M[\%]$) wurde gemäß Gleichung (12) ermittelt:

$$M[\%] = \frac{M_{Konjugat} - M_{BSA}}{M_{Reporter} \times N_{Residuen}} \quad (12)$$

Dieser Wert ergibt sich durch Berechnung der Molekularmassendifferenz zwischen konjugiertem ($M_{Konjugat}$) und nativem bzw. ungekoppeltem BSA (M_{BSA}) dividiert durch das Produkt aus dem Molekulargewicht des gekoppelten Reporters ($M_{Reporter}$) und der durchschnittlichen Anzahl modifizierbarer Residuen ($N_{Residuen}$). Tab. 6.11 zeigt die Ergebnisse der für die verschiedenen Konjugate berechneten Kopplungsdichten (siehe Abschn. 3.9.1).

Da es sich bei der Herstellung der BSA-Reporter-Konjugate um zwei verschiedene Reaktionsmechanismen handelt, muss bei der Berechnung der prozentualen Modifikation die entsprechende Anzahl modifizierbarer Residuen berücksichtigt werden.

Tab. 6.12 zeigt diesen ermittelten prozentualen Anteil der bei der Kopplungsreaktion freien koppelbaren Residuen im BSA. Bei der Kopplungsreaktion der Reporter AO, SAF, NB und *p*ABT an BSA beträgt die Anzahl freier Carboxylgruppen insgesamt 99 (Asparaginsäure (Asp)=41, Glutamin (Glu)=58). Im Gegensatz dazu stehen für die Kopplung freier Aminogruppen des BSA wegen der Lysin-Residuen ca. 60 modifizierbare Aminogruppen zur Verfügung [286–288]. Demnach scheinen höhere Kopplungsverhältnisse im Falle der modifizierbaren Carboxylgruppen theoretisch möglich zu sein, da viele freie Residuen für die Kopplung der Aminogruppen in den Reporter-Molekülen verfügbar sind. Jedoch besteht hier die Möglichkeit, dass sich die meisten BSA-Amine mit ihren inter- oder intramolekularen Carboxylgruppen paaren.

Die Berechnung ergibt, dass Safranin und *p*ABT prozentual an die meisten BSA-Residuen koppeln können. Für Nilblau hingegen ergibt sich die geringste prozentuale Modifikation. Die beiden Farbstoffe RBITC und FITC zeigen ein ähnliches Ergebnis der modifizierten Lysingruppen im BSA.

Tabelle 6.11: Kopplungsdichten der verschiedenen BSA-Reporter-Konjugate.

| Konjugate | M_{BSA} [g/mol] | $M_{Reporter}$ [g/mol] | $M_{Konjugat}$ [g/mol] | Differenz $M_{Konjugat}$ [g/mol] | Kopplungsdichte |
|-------------------|-------------------|------------------------|------------------------|----------------------------------|-----------------|
| BSA-AO | 66045 | 265.35 | 70212 | 4167 | 16:1 |
| BSA-RBITC | 66594 | 536.08 | 69092 | 2498 | 5:1 |
| BSA-FITC | 66594 | 390.38 | 69080 | 2486 | 6:1 |
| BSA-SAF | 66045 | 350.85 | 72533 | 5770 | 16:1 |
| BSA-NB | 66045 | 732.85 | 68631 | 2586 | 4:1 |
| BSA- <i>p</i> ABT | 66045 | 125.19 | 68401 | 2356 | 16:1 |

Tabelle 6.12: Prozentualer Anteil modifizierter Residuen M [%] für die verschiedenen BSA-Konjugate.

| Konjugate | M[%] | modifizierbare Residuen | Anzahl modif. Residuen |
|-------------------|------|-------------------------|------------------------|
| BSA-AO | 16 | Asp41, Gln58 | 99 |
| BSA-RBITC | 8 | Lys60 | 60 |
| BSA-FITC | 11 | Lys60 | 60 |
| BSA-SAF | 19 | Asp41, Gln58 | 99 |
| BSA-NB | 4 | Asp41, Gln58 | 99 |
| BSA- <i>p</i> ABT | 19 | Asp41, Gln58 | 99 |

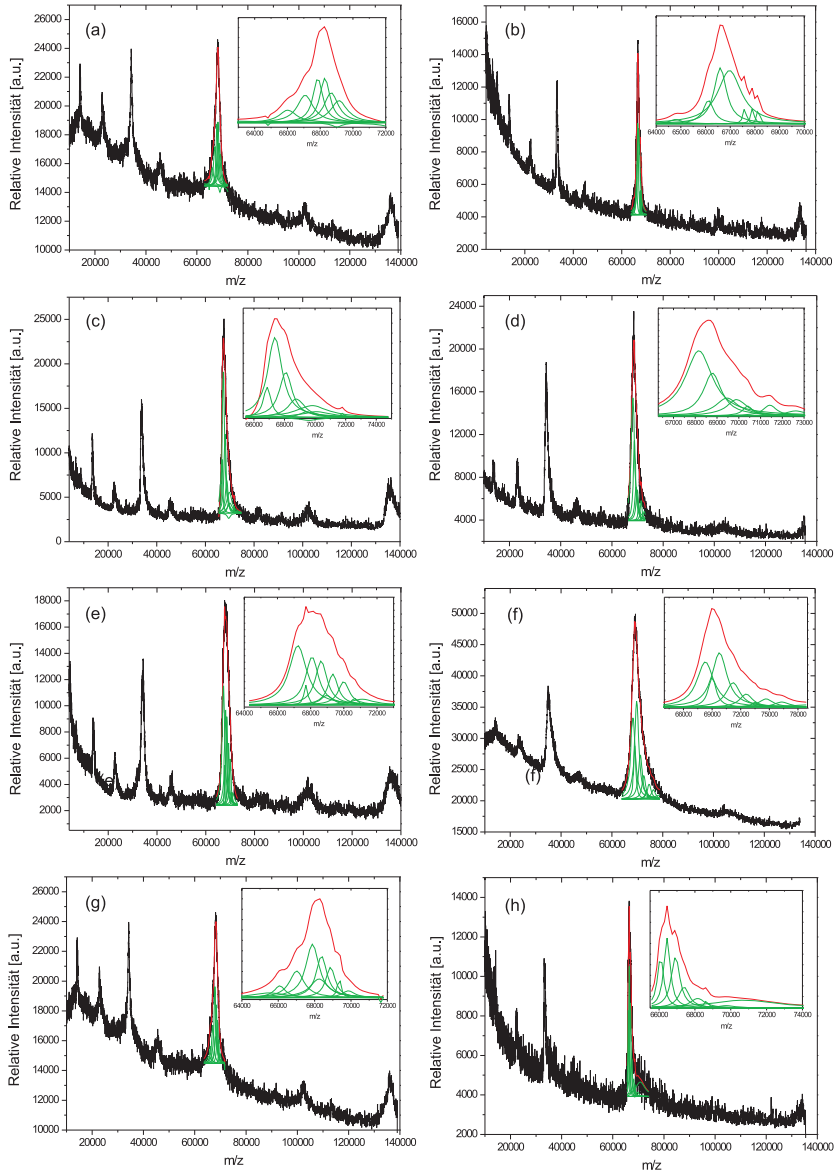


Abbildung 6.49: MALDI-Spektren der beiden ungekoppelten BSA-Standards (a,b) sowie der BSA-Reporter-Konjugate BSA-AO (c), BSA-RBITC (d), BSA-FITC (e), BSA-SAF (f), BSA-NB (g) und BSA-*p*ABT (h). Der für die Bestimmung der Kopplungsdichte betrachtete Hauptpeak ist jeweils vergrößert dargestellt und zeigt die Lorentzkurven der Fitprozedur. UV-Laser: 337 nm. Pulslänge: 3 nm. Beschleunigungsspannung: 20 kV. Massenbereich: 10000-140000 m/z.

Tabelle 6.13: Parameter der Lorentz-Fit-Prozedur zur Bestimmung der Kopplungsdichten: Area=Peakfläche, Center=Peakzentrum, Width=Halbwertsbreite FWHM, Height=Peak-Höhe, Ungekoppelte BSA-Standards (a,b), BSA-Reporter-Konjugate BSA-AO (c), BSA-RBIC (d), BSA-FITC (e), BSA-SAF (f), BSA-NB (g) und BSA-p-ABT (h).

| Peak | Area | Center | Width | Height |
|------|----------|--------|-------|--------|
| 1 | -46684 | 64840 | 55374 | -53671 |
| 2 | 33078E7 | 55251 | 18534 | 11362 |
| 3 | 51177E6 | 67083 | 11757 | 27712 |
| 4 | 50913E6 | 67857 | 72610 | 44639 |
| 5 | 52866E6 | 68288 | 75210 | 44749 |
| 6 | 49877E6 | 68670 | 10550 | 30097 |
| 7 | 42789E6 | 69150 | 12265 | 22210 |
| 8 | -51366E5 | 69021 | 74450 | -43922 |
| 9 | -42653E6 | 73382 | 10830 | -25073 |
| 10 | 2.5370E6 | 66021 | 12801 | 12617 |

| Peak | Area | Center | Width | Height |
|------|-----------|--------|-------|--------|
| 1 | 5.6362E6 | 66865 | 59243 | 60567 |
| 2 | 2.8534E7 | 67377 | 11402 | 15932 |
| 3 | 1.4475E7 | 68084 | 10231 | 90077 |
| 4 | 7.4885E6 | 68777 | 12954 | 36802 |
| 5 | 1.8794E6 | 69460 | 10644 | 11242 |
| 6 | 9.2848E6 | 69817 | 25044 | 23602 |
| 7 | 4.2166E6 | 70072 | 23543 | 11402 |
| 8 | 4.1648E6 | 69857 | 15413 | -58428 |
| 9 | 3.9711E5 | 71785 | 30935 | 80666 |
| 10 | -2.2358E7 | 65915 | 51537 | -27618 |

| Peak | Area | Center | Width | Height |
|------|------------|------------|-----------|-----------|
| 1 | 2.2368E6 | 63329 | 18295 | 77838 |
| 2 | 2.0825E6 | 65096 | 17965 | 73797 |
| 3 | 2.9728E6 | 66130 | 11087 | 17069 |
| 4 | 2.3200E6 | 66988 | 70841 | 20849 |
| 5 | 1.0058E7 | 67932 | 11836 | 54096 |
| 6 | 4.4370E5 | 69345 | 31697 | 89116 |
| 7 | 1.7823E5 | 71315 | 11320 | 10023 |
| 8 | 2.3210E6 | 70213 | 24013 | 61533 |
| 9 | 1.4365E7 | 68496 | 14630 | 62507 |
| 10 | -2.0868E23 | -2.1648E21 | 4.4558E16 | -2.9797E6 |

| Peak | Area | Center | Width | Height |
|------|------------|-------------|------------|------------|
| 1 | 3.9128E5 | 64712 | 58247 | 42746 |
| 2 | 1.9236E6 | 66117 | 52239 | 23443 |
| 3 | 5.3864E6 | 66597 | 60943 | 56267 |
| 4 | 9.7906E6 | 66972 | 11628 | 52604 |
| 5 | 3.9704E5 | 67502 | 15848 | 16233 |
| 6 | 3.8581E5 | 67903 | 15839 | 15507 |
| 7 | 2.2841E5 | 68146 | 11444 | 18269 |
| 8 | -4.867E146 | 62338E145 | 1.7859E99 | -1.5093E47 |
| 9 | 6.0223E158 | -4.5771E158 | 2.0263E109 | 1.8921E49 |
| 10 | 7.4840E5 | 64656 | 0.0011121 | 4.2843E8 |

| Peak | Area | Center | Width | Height |
|------|------------|----------|-----------|-----------|
| 1 | 1.8098E7 | 67232 | 12598 | 91454 |
| 2 | 1.0961E7 | 68086 | 94163 | 74103 |
| 3 | 9.1461E6 | 68635 | 85757 | 67896 |
| 4 | 5.6264E6 | 69336 | 75339 | 47844 |
| 5 | 4.5545E6 | 69936 | 80647 | 35953 |
| 6 | 7.2948E5 | 70647 | 44923 | 10330 |
| 7 | 2.3996E6 | 71106 | 16962 | 90062 |
| 8 | -1.7377E33 | 64231E28 | 4.0667E25 | -2.2702E7 |
| 9 | 2.1021E6 | 68968 | 89614 | 14775 |
| 10 | 1.2834E6 | 67714 | 26800 | 30487 |

| Peak | Area | Center | Width | Height |
|------|----------|--------|---------|--------|
| 1 | 4.2892E5 | 69750 | 12382 | 22053 |
| 2 | 3.1871E6 | 66085 | 42123 | 48167 |
| 3 | 4.3991E6 | 66447 | 42459 | 65958 |
| 4 | 4.4160E6 | 66920 | 58167 | 48331 |
| 5 | 2.2150E6 | 67394 | 71545 | 19709 |
| 6 | 1.3959E6 | 68150 | 99096 | 89674 |
| 7 | -24345 | 68526 | 27184 | -57013 |
| 8 | 3.0739E5 | 68635 | 30839 | 63445 |
| 9 | -12762 | 69048 | 0.31451 | -25832 |
| 10 | 5.1812E6 | 70745 | 45061 | 73199 |

| Peak | Area | Center | Width | Height |
|------|--------------|-------------|------------|------------|
| 1 | 2.7403E7 | 68166 | 15167 | 11502 |
| 2 | 1.2020E7 | 68786 | 10149 | 75399 |
| 3 | 5.0355E6 | 69094 | 11116 | 28827 |
| 4 | 2.1576E6 | 71427 | 73470 | 18694 |
| 5 | -4.1392E27 | 1.3906E23 | 5.1782E20 | -7.5489E6 |
| 6 | 1.4916E6 | 72612 | 11116 | 85427 |
| 7 | -3.6365E6 | 70936 | 0.0026991 | 8.5771E8 |
| 8 | -1.49354E153 | -3.5658E146 | 1.2611E131 | -2.4915E22 |
| 9 | 1.4597E6 | 70408 | 54261 | 17127 |
| 10 | 6.2038E6 | 69459 | 12606 | 31330 |

| Peak | Area | Center | Width | Height |
|------|----------|--------|-------|--------|
| 1 | 1.0600E5 | 70608 | 38165 | 17682 |
| 2 | 4.3873E7 | 68293 | 21296 | 13112 |
| 3 | 4.7319E7 | 69770 | 19148 | 15732 |
| 4 | 2.4084E7 | 71198 | 17982 | 85976 |
| 5 | 9.9624E6 | 72568 | 16689 | 37999 |
| 6 | 1.8700E6 | 73480 | 78987 | 15072 |
| 7 | 6.8604E6 | 74460 | 18214 | 23979 |
| 8 | 4.6681E6 | 76305 | 19524 | 15189 |
| 9 | 6.5905E6 | 79455 | 63479 | 70106 |

6.1.3 Anwendung der Konjugate für Hybridsonden in 3T3-Zellen

Im Folgenden werden die spektralen Eigenschaften von ungekoppelten und kovalent gekoppelten Reporter-Molekülen diskutiert. Hinsichtlich der *in vitro*- und *in vivo*-Applikationen werden die spektralen Unterschiede der BSA-Reporter-Sonden außerhalb und innerhalb von Zellen erörtert, wobei die hergestellten Konjugate BSA-AO, BSA-RBITC, BSA-FITC nicht resonant ($\lambda=785$ nm) und resonant ($\lambda=633$ nm) angeregt wurden. Im Falle des BSA-SAF-Konjugats erfolgte eine nicht resonante und im Falle des BSA-Nilblau-Konjugats eine präresonante Anregung bei 785 nm (siehe Abschn. 6.1.1).

Abb. 6.50 zeigt das unter nicht-resonanten Bedingungen in Gegenwart von Au NA gemessene Acridinorange (A) sowie das BSA-AO-Konjugat (B) und das unter präresonanten Bedingungen untersuchte Konjugat (C) sowie das in Zellen untersuchte Konjugat bei 785 nm (D). Die qualitativen Unterschiede zwischen den beiden auf unterschiedlichen Substraten gemessenen AO-SERS-Spektren wurden bereits im Abschn. 5.1.1 diskutiert.

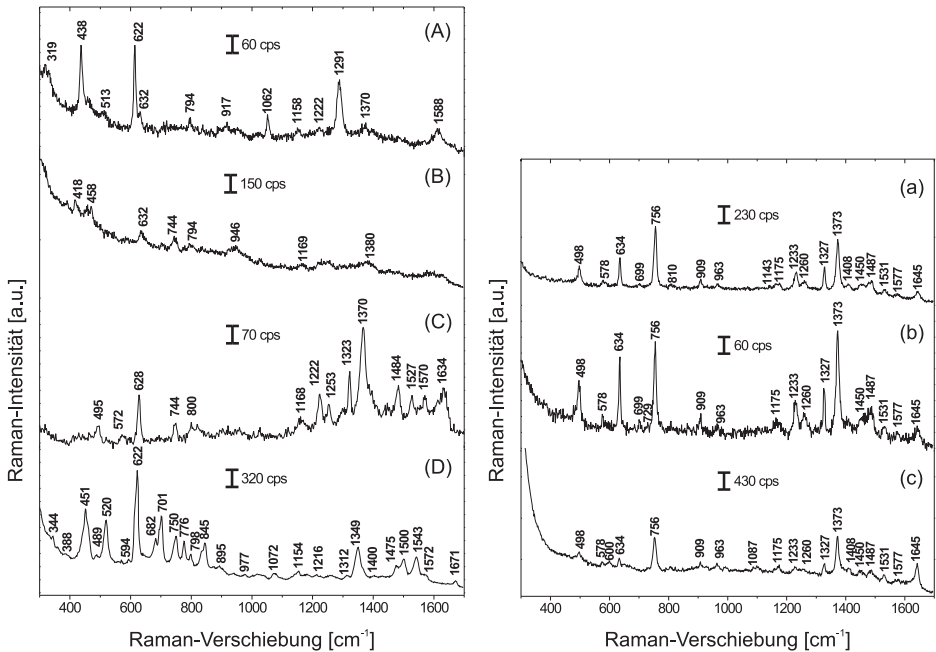


Abbildung 6.50: (A) Acridinorange (10^{-5} M) in Gegenwart von Au NA. (B) BSA-Acridinorange-Konjugat bei 785 nm Anregung. (C) BSA-Acridinorange-Konjugat bei 633 nm Anregung. (D) BSA-Acridinorange-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm Anregung. (a) Acridinorange (10^{-5} M) in Gegenwart von Ag NA. (b) BSA-Acridinorange-Konjugat bei 785 nm und (c) BSA-Acridinorange-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm. Inkubationszeit der Konjugate in Zellen: 3 h. Akkumulationszeit: 1 s.

Das an Au Nanoaggregaten untersuchte BSA-AO-Konjugat weist im Gegensatz zum AO-

Spektrum einige spektrale Unterschiede auf. So wird nur die Bande bei 632 cm^{-1} verstärkt. Außerdem treten zusätzliche Linien auf, die im reinen AO-Spektrum nicht auftreten bzw. nicht AO-Banden zugeordnet werden können, wie z. B. die Banden bei 418 cm^{-1} , 458 cm^{-1} und 744 cm^{-1} . Letztere können BSA-typischen Banden zugeordnet werden, wie dem Tryptophan (Trp) bei 458 cm^{-1} und 744 cm^{-1} (C-S Streckschwingung der Cys35 Residuen) [289].

Vergleicht man das unter präresonanten Bedingungen untersuchte BSA-AO-Konjugat, so lassen sich im Wellenzahlbereich $>1168\text{ cm}^{-1}$ deutlich mehr Schwingungsbanden erkennen. Im Vergleich zur nicht-resonanten Anregung liefert hier die resonante Anregung eine empfindlichere Anregung der AO-Banden. Unterschiede innerhalb des BSA-AO Spektrums könnten Hinweise auf das Zustandekommen einer β -Faltblattstruktur des BSA geben. Da die Kopplungsreaktion im sauren Milieu bei $\text{pH}\sim 4.5$ erfolgte, könnte das BSA in einer veränderten Sekundärstruktur vorliegen [290, 291]. Wie in der Literatur bekannt ist, resultiert diese Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur in einer Transformation der N-Form in die sog. F-Form [292].

Die F-Form zeichnet sich durch eine länglich ausgedehnte, weniger kompakte Form (11% Volumenanstieg) und ansteigende Asymmetrie des BSA-Moleküls aus, gefolgt von einem Abfall der helikalen Struktur (ca. 55% von der N-Form nach 45% in die F-Form) [293]. Infolge dieser strukturellen Veränderung im sauren Milieu könnte das zu einem Abfall der helikalen Struktur und folglich zu einem Übergang von der α -Helix in eine β -Faltblatt-Struktur führen. Dies geht mit der Öffnung des BSA-Moleküls, d. h., dem Aufbrechen von Salzbrücken und hydrophoben Interaktionen einher. Ein Indiz für diese auftretende Änderung der Sekundärstruktur des BSA infolge der im sauren Milieu stattgefundenen Kopplungsreaktion sind die in Abb. 6.50 (C) auftretenden Banden bei 1222 cm^{-1} , die ebenfalls auf eine Amid(III)- β -Faltblatt-Struktur des BSA hindeuten. Das Auftreten der Linie bei 572 cm^{-1} lässt sich der S-S-Streckschwingung zuordnen und deutet auf die Existenz von Disulfid-Brücken im Protein hin [279, 294, 295].

Das bei 785 nm untersuchte BSA-AO-Konjugat-Spektrum (siehe Abb. 6.50 (b)), das in Gegenwart von Ag NA gemessen wurde, zeigt die gleichen Banden wie das Spektrum des ungekoppelten AO. Unterschiede sind jedoch bei den in 3T3-Zellen untersuchten BSA-AO-Ag-Hybridsonden zu verzeichnen (siehe auch Tab. 9.26, Anhang). Die Banden bei 1227 cm^{-1} lassen sich der Amid(III)- β -Faltblatt-Konformation des BSA zuordnen. Weiterhin kann die Linie bei 1087 cm^{-1} der $\nu(\text{CN})$ -Streckschwingung sowie bei 1452 cm^{-1} der $\gamma(\text{CH}_2)$ -Schwingung von BSA zugeordnet werden, wobei letztere an dieser Stelle mit einer AO-Bande überlappt [10, 296]. In (D) ist das NIR-SERS-Spektrum der in 3T3-Zellen inkubierten BSA-AO-Au-Hybridsonden dargestellt. Verglichen mit den SERS-Spektren in (A), (B), (C) liefert das Spektrum höhere Intensitäten. Das Spektrum zeigt Banden, die dem BSA-Acridinorange-Konjugat zugeordnet werden können nebst Banden, die von zellulären Komponenten herrühren.

Abb. 6.51 zeigt die außerhalb und innerhalb der Zelle untersuchten BSA-Reporter-Konjugate für Au und Ag NP. Auffallend ist, dass das BSA-RBITC-Konjugat keine RBITC-typische Bande bei 1357 cm^{-1} aufzeigt (vgl. (A) mit (B)). Allerdings tritt diese Bande bei resonanter Anregung hervor. Das Erscheinen der Amid(III)-Bande bei 1251 cm^{-1} deutet auf eine veränderte Sekundärstruktur des BSA hin. Da das BSA-RBITC-Konjugat im basischen Milieu hergestellt wurde, sind die Lysin-Residuen im BSA positiv

geladen, so dass es zu einer starken Wechselwirkung mit den negativ geladenen Citratliganden auf der NP-Oberfläche kommen kann. Dies ist in Übereinstimmung mit der elektrostatischen Bindungshypothese [260]. Auffallend ist zudem die Abwesenheit der Banden im höherwellenzahligen Bereich $>1357\text{ cm}^{-1}$ in (B). Es zeigt sich hier, dass bei resonanter Anregung deutlich mehr Banden auftreten. Hier sind Raman-Banden von BSA bei 1015 cm^{-1} (Trp-Ringschwingung), 1068 cm^{-1} ($\gamma(\text{CN})$), 1192 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_2)$) und bei 1648 cm^{-1} (Amid I, willkürlich strukturell entfaltete α -Helix) ebenfalls neben RBITC-typischen Banden erkennbar [297, 298]. Im Falle der gemessenen Konjugat-Spektren in Gegenwart von Ag NA ähnelt dies dem ungekoppelten Reporterspektrum (vgl. Abb. 6.51 (a) und (b)). Das resonant-angeregte Konjugat-Spektrum zeigt einen hohen Untergrund, der von der Fluoreszenz des BSA-RBITC-Komplexes herrührt.

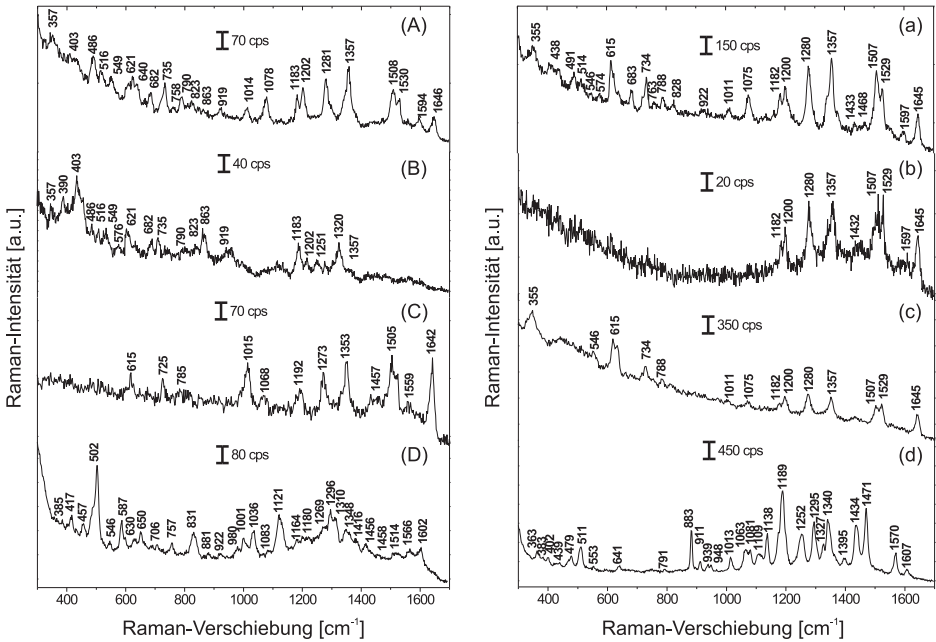


Abbildung 6.51: (A) RBITC (10^{-5} M) in Gegenwart von Au NA. (B) BSA-RBITC-Konjugat bei 785 nm Anregung. (C) BSA-RBITC-Konjugat bei 633 nm Anregung. (D) BSA-RBITC-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm Anregung. (a) RBITC (10^{-5} M) in Gegenwart von Ag NA. (b) BSA-RBITC-Konjugat bei 785 nm . (c) BSA-RBITC-Konjugat bei 633 nm und (d) BSA-RBITC-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm . Inkubationszeit der Konjugate in Zellen: 3 h . Akkumulationszeit: 1 s .

Abb. 6.51 (D) zeigt das NIR-SERS-Spektrum der BSA-RBITC-Au-Sonden innerhalb einer 3T3-Zelle. Die im Spektrum auftretende Bande bei 502 cm^{-1} lässt sich der $\gamma(\text{S-S})$ -Schwingung von BSA zuordnen. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese

auch anderen in der Zelle gegenwärtigen Proteinen zugeordnet werden kann. Ferner treten Linien bei 1605 cm^{-1} (Tyr+Phe), 1566 cm^{-1} (Amid II), 1340 cm^{-1} ($\gamma(\text{CH}_2)$), 1296 cm^{-1} (Amid III-Bande (α -Helix)) und 1001 cm^{-1} (Phe) neben RBITC-Banden auf. Letztere können mit Ausnahme der Bande bei 1001 cm^{-1} ebenfalls RBITC-typischen Linien zugeordnet werden und überlagern sich an diesen Positionen mit Schwingungsbanden, die den von Proteinen zugeordnet werden können [241, 299].

Die BSA-RBITC-Ag-Sonden, die in Zellen akkumuliert wurden, zeigen ein SERS-Spektrum mit zellulären und Reporter-spezifischen Banden auf (siehe Abb. 6.51 (d)). Diese Banden können dem unmittelbar an der NP-Oberfläche adsorbierten BSA zugeordnet werden und weisen auch hier auf die Sekundärstruktur des BSA hin. Geht man davon aus, dass diese Ag-Hybridsonden im Laufe der Inkubationsdauer in Lysosomen akkumuliert werden, so deuten die Spektren auf eine pH-abhängige Sekundärstruktur des BSA durch das Erscheinen bestimmter Banden hin [300]. Da hier kurze Inkubationszeiten gewählt wurden, herrschten innerhalb der früh herangereiften Lysosomen vermutlich höhere pH-Werte vor. Ausgehend davon, dass der pH-Wert des gepufferten BSA-Reporter-Ag-Systems sich innerhalb der Kompartimente geringfügig verändert, liegt die Vermutung nahe, dass ein pH-Milieu >7 vorherrschte. Das Auftreten der Bande bei 1252 cm^{-1} deutet auf eine α -helikale Sekundärstruktur (Amid III) des BSA oder anderer gegenwärtiger Proteine innerhalb der 3T3-Zelle hin [301]. Diese helikale Struktur des BSA geht im leicht basischen Milieu von der kompakten N-Form (Herz-Form) in die entfaltete, ausgedehntere F-Form über [302]. Die jeweiligen Zuordnungen sind in Tab. 9.27 (siehe Anhang) für Au und Ag NP aufgelistet.

Abb. 6.52 zeigt die untersuchten BSA-FITC-Konjugate in Gegenwart von Au (C-D) und Ag NP (b-c). Im Gegensatz zum Ag ließ sich der Reporter FITC nicht in Gegenwart von Au NA detektieren (vgl. Abschn. 5.1.1). Eine resonante Anregung führte jedoch zur Detektion FITC-typischer Banden in Gegenwart der Au NA. Während das BSA-FITC-Konjugat an Au NA außerhalb der Zelle nicht detektierbar war, war dies dagegen innerhalb der Zelle unter nicht-resonanter Anregung möglich. Die Banden lassen sich eindeutig dem FITC-BSA-Konjugat und Linien, die von zellulären Komponenten herrühren (siehe Tab. 9.28, Anhang), zuordnen. Hier kann vermutet werden, dass sich die BSA-FITC-Au-Sonde innerhalb der Lysosomen derart anreicherte, dass eine Detektion von Fluorescein-Banden somit möglich wurde. Abb. 6.52 (b) zeigt das SERS-Spektrum von BSA-FITC-inkubierten Ag Nanoaggregaten außerhalb der Zelle, das unter nicht-resonanten Bedingungen gemessen wurde. Das Auftreten der Bande bei 1272 cm^{-1} lässt sich BSA-spezifischen Linien zuordnen. Ebenfalls stammt die Bande bei 1150 cm^{-1} ($\omega(\text{NH}_3^+)$) vom BSA. Auffallend ist eine Aufspaltung der Linien in 644 cm^{-1} und 633 cm^{-1} , die durch die Detektion von Tyrosin-Residuen (Tyr) in Nähe der NP-Oberfläche verstärkt werden. Eine weitere Bandenaufspaltung ist bei 754 cm^{-1} und 768 cm^{-1} zu verzeichnen. Letztere stammen von C-S Schwingungen der Cystein-Residuen im BSA, die auf eine Entfaltung der α -Helix hindeuten (siehe (b)).

Das SERRS-Spektrum der innerhalb von 3T3-Zellen untersuchten BSA-FITC-Ag-Sonden zeigt Abb. 6.52 (c). Die Zellen wurden unter resonanten Bedingungen, d. h., bei 633 nm , untersucht, da eine Detektion bei 785 nm nicht möglich war. Hinsichtlich der Verwendung dieser Anregungswellenlänge auf lebende Zellen wurde deren Zustand auf eine Apoptose sensorisch, d. h., mikroskopisch überprüft, was an dem äußeren Erscheinungsbild der

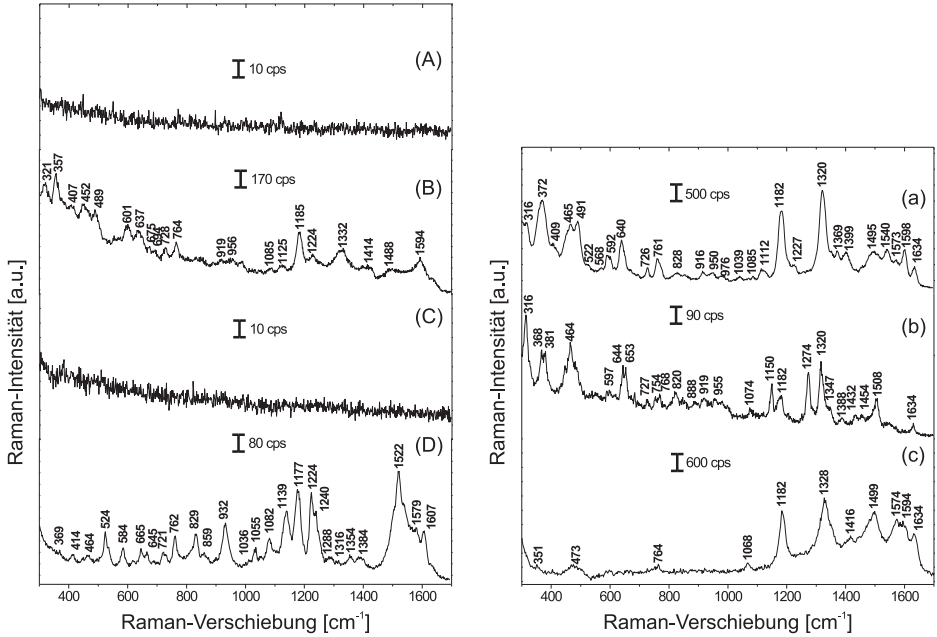


Abbildung 6.52: (A) FITC (10^{-5} M) in Gegenwart von Au NA bei 785 nm. (B) FITC bei 633 nm Anregung. (C) BSA-FITC-Konjugat bei 633 nm Anregung. (D) BSA-FITC-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm Anregung. (a) FITC (10^{-5} M) in Gegenwart von Ag NA. (b) BSA-FITC-Konjugat bei 785 nm. (c) BSA-FITC-Konjugat in 3T3-Zellen bei 633 nm. Inkubationszeit der Konjugate in Zellen: 3 h. Akkumulationszeit: 1 s.

Zellen erkennbar ist. Es waren jedoch keine morphologischen Veränderungen, wie das Zusammenschrumpfen des Zellkörpers oder Zerfall des Zellkerns, sichtbar. Ebenfalls konnte keine mikroskopisch erkennbare Blasenbildung (Pyknose) sowie stressbedingte Veränderung der Zellen in Form einer Kugelbildung dieser beobachtet werden. Des Weiteren war während der spektroskopischen Untersuchungen kein verstärktes Auftreten von Raman-Signaturen, die durch aus dem Zellkern ins Zytoplasma übertretende Nukleinsäuren stammen, detektierbar [12]. Das SERS-Spektrum in Abb. 6.52 (c) zeigt dominierende spektrale Komponenten des gekoppelten Reporters, weshalb sich im Vergleich zu den anderen SERS-Sonden weniger zelluläre Komponenten detektieren lassen. Neben FITC-typischen Banden treten zusätzlich Banden bei ~ 380 cm^{-1} (Guanin), ~ 999 cm^{-1} (Phenylalanin) und 1046 cm^{-1} (DNA-Gerüstschwingung) auf.

Abb. 6.53 zeigt die unter nicht-resonanten Bedingungen gemessenen BSA-Safranin-Spektren in Gegenwart von Au NA (B-C) und Ag NA (b-c). Ähnlich wie beim BSA-Fluorescein-Konjugat sind die Schwingungsbanden hauptsächlich dem Safranin zuzuordnen; alle weiteren Banden im Spektrum (C) stammen von intrazellulären Komponenten (siehe Tab. 9.29, Anhang). Spektrum (B) weist Linien auf, die Informationen zur Sekun-

därstruktur des BSA liefern. So tritt hier ebenfalls wie beim BSA-AO-Konjugat (vgl. Abb. 6.50) eine charakteristische Bande bei 1225 cm^{-1} (Amid III, β -Faltblatt) auf [303]. Diese könnte auf eine Veränderung in der Sekundärstruktur des BSA infolge der Kopplung im sauren Milieu hindeuten. Verglichen mit den bisher diskutierten SERS-Spektren der BSA-Reporter Konjugate ist die Anwesenheit der Bande bei $\sim 520\text{ cm}^{-1}$ (S-S-Streckschwingung) in allen an Au NA untersuchten BSA-Reporter-Konjugaten und im Falle für Ag NA bei $\sim 440\text{ cm}^{-1}$ (BSA-RBITC- und BSA-SAF-Konjugat) ein Indiz für die im BSA vorhandenen stabilen Disulfidbrücken. Diese Tatsache indiziert, dass keine Denaturierungseffekte des Proteins außerhalb bzw. innerhalb der Zellen vorlagen [279]. Zusätzlich lassen sich proteintypische Banden bei 1202 cm^{-1} ($\delta(\text{CH})$, Phe, Tyr) sowie bei $\sim 1005\text{ cm}^{-1}$ (Phe) finden. Ein Vergleich zwischen dem Safranin-Spektrum (A) und dem Konjugatspektrum (B) außerhalb der Zelle zeigt, dass im kurzwellzahligen Bereich einige spektrale Unterschiede (Banden bei 461 cm^{-1} , 480 cm^{-1} und 630 cm^{-1}) auftreten. Auffallend ist zudem eine Aufspaltung der Bande in eine Linie bei 633 cm^{-1} und 653 cm^{-1} . Vergleicht man das Konjugat-Spektrum (b) mit dem Reporter-Spektrum (a), so sind im Falle für Ag NA kaum Unterschiede zu verzeichnen. Eine Aufspaltung der Linien im kurzwellzahligen Bereich bei 357 cm^{-1} und 377 cm^{-1} ist wie beim BSA-Konjugat-Spektrum (B), das in Gegenwart von Au NA untersucht wurde, zu erkennen. Es tritt allerdings keine Aufspaltung der Bande bei 1383 cm^{-1} auf. BSA-typische Linien treten insbesondere bei 1126 cm^{-1} (Trp), 1175 cm^{-1} (Tyr+Phe) und 1442 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_2)$) auf.

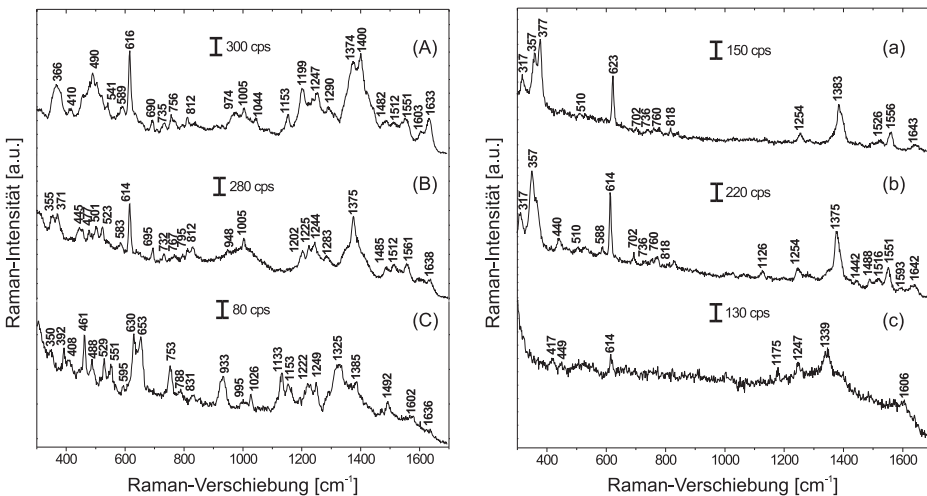


Abbildung 6.53: (A) SAF (10^{-5} M) in Gegenwart von Au NA bei 785 nm . (B) BSA-SAF-Konjugat bei 785 nm Anregung. (C) BSA-SAF-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm Anregung. (a) SAF (10^{-5} M) in Gegenwart von Ag NA. (b) BSA-SAF-Konjugat bei 785 nm . (c) BSA-SAF-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm . Inkubationszeit der Konjugate in Zellen: 3 h . Akkumulationszeit: 1 s .

Abb. 6.54 zeigt die untersuchten SERS-Spektren des in Gegenwart von Au NA (A-C) und Ag NA (a-c) gemessenen NB bzw. der BSA-NB-Konjugate. Die Nilblau- und BSA-Nilblau-Spektren konnten in Präresonanz gemessen werden. Auffallend ist, dass sich Nilblau im Vergleich zu anderen Reportern besonders empfindlich (vgl. Konzentration: μM -Bereich) detektieren lässt. Betrachtet man dazu die berechnete Kopplungsdichte von Nilblau (4:1), die in Abschn. 6.1.2 berechnet wurde, so ist die Signalintensität in den Spektren im Vergleich zu den anderen Reportern äußerst hoch. Ein Vergleich zwischen den Nilblauspektren und BSA-Nilblau-Spektren zeigt hier deutliche Unterschiede auf, wie z. B. das Fehlen der Bande bei 624 cm^{-1} im Konjugatspektrum der Au NA (B). Auffallend ist ausserdem die hohe Signalintensität im Vergleich zum reinen Nilblau an Au NA. Vergleicht man die Nilblauspektren in Gegenwart der Ag NA mit denen an Au NA, so werden auch hier spektrale Unterschiede deutlich: es fehlt ebenfalls die Bande bei 624 cm^{-1} , diesmal sowohl bei den Reporter-Spektrum (a) als auch im Konjugatspektrum (b). Alle weiteren Banden stammen von Biomolekülen aus der intrazellulären Matrix (siehe Tab. 9.30, Anhang).

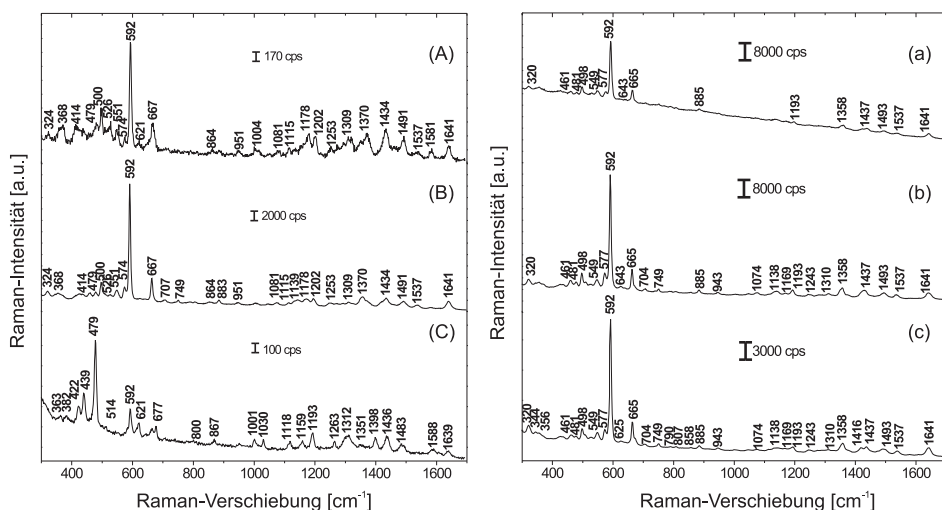


Abbildung 6.54: (A) NB (10^{-6} M) in Gegenwart von Au NA bei 785 nm . (B) BSA-NB-Konjugat bei 785 nm Anregung. (C) BSA-NB-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm Anregung. (a) NB (10^{-6} M) in Gegenwart von Ag NA. (b) BSA-NB-Konjugat bei 785 nm . (c) BSA-NB-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm . Inkubationszeit der Konjugate in Zellen: 3 h . Akkumulationszeit: 1 s .

Abb. 6.55 zeigt die erstellten chemischen Kartierungen, die auf Spektren basieren, die bei der entsprechenden dominierenden Bande der jeweiligen Au-Hybridsonden bestehend aus BSA-AO-, BSA-RBITC-, BSA-FITC-, BSA-SAF- und BSA-NB-Konjugaten innerhalb der 3T3-Zellen normiert wurde. Weiterhin zeigen die Kartierungen, dass die Au-Hybridsonden innerhalb der 3T3-Zellen im Zytosol verteilt sind. Im Zellkern hingegen konnten keine SERS-Hybridsonden angereichert werden, da an diesen Stellen keine SERS-Signale auftra-

ten (vgl. dazu blaue Regionen in den HCA und K-Means-Kartierungen). Sowohl die HCA als auch die K-Means-Analyse suggerieren, mit Ausnahme des BSA-SAF-Konjugats, drei spektrale Klassen, die die Reporter-Signatur (rot), Reporter-BSA Signaturen gemischt mit zellulären Komponenten (grün) und den spektralen Hintergrund (blau) ohne SERS-Signaturen, enthalten (siehe dazu Tab. 9.26-Tab. 9.30).

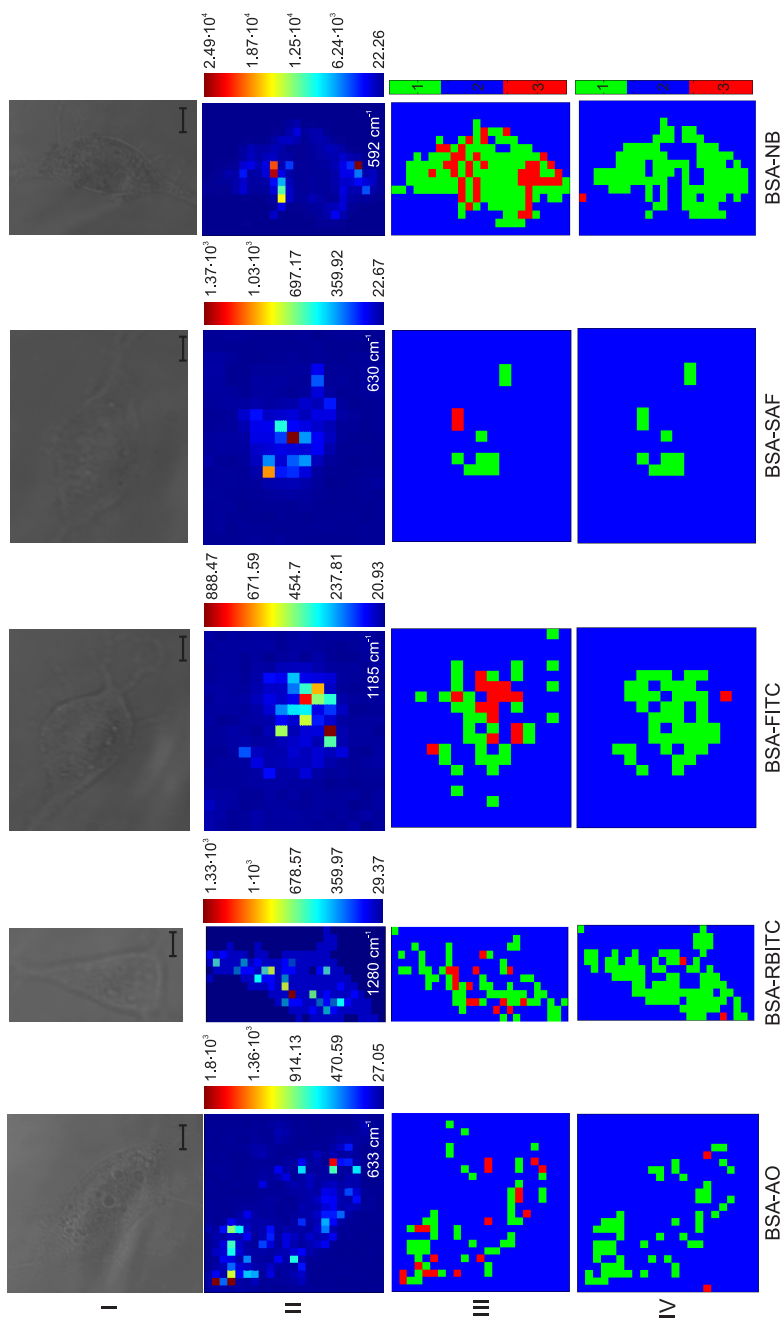


Abbildung 6-55: NIR-SERS Au-Hybridsonden in 3T3-Zellen (Inkubationszeit: 3 h). I Mikroskop-Hellfeld-Aufnahmen der Konjugate BSA-AO (6 μm -Balken), BSA-RBITC (6 μm -Balken), BSA-FITC (4 μm -Balken), BSA-SAF (4 μm -Balken) und BSA-NB (6 μm -Balken). II Chemische Kartierungen mit normierter Intensität der Hauptbande im jeweiligen Konjugat: BSA-AO (23 \times 24 Spektren), BSA-RBITC (12 \times 26 Spektren), BSA-FITC (19 \times 15 Spektren), BSA-SAF (19 \times 15 Spektren) und BSA-NB (16 \times 24 Spektren). III HCA-Kartierungen. IV K-Means-Cluster-Kartierungen. Anregungswellenlänge: 785 nm. Anregungsintensität: $8 \cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$. Akkumulationszeit: 1 s.

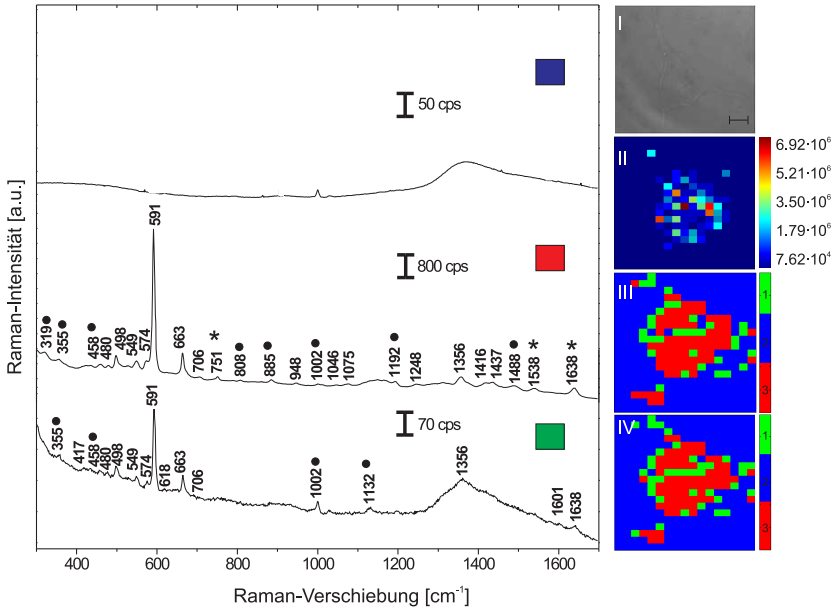


Abbildung 6.56: NIR-SERS Au-Mischhybridsonden (BSA-AO und BSA-NB) inkubiert mit einer 3T3-Zelle (Inkubationszeit: 3 h, (6 μm -Balken)). I Hellfeld-Aufnahme einer 3T3-Zelle. II Chemische Kartierung des Spektralbereichs von 300-1700 cm^{-1} . III HCA-Kartierung (17 \times 20 Spektren). IV K-Means-Cluster-Kartierung. Anregungswellenlänge: 785 nm. Anregungsintensität: $8 \cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$ (785 nm). Akkumulationszeit: 1 s. Die Spektren der Klasse 1 (grün) liefern Anteile von NB-Banden nebst zellulärer Komponenten. Klasse 2 (blau) enthält SERS-Spektren, die eine Bande bei $\sim 999 \text{ cm}^{-1}$ liefern, die jedoch dem spektralen Untergrund zugeordnet werden kann. Klasse 3 (rot) enthält Signaturen, die sowohl NB, AO (\star) als auch zelluläre Komponenten (\bullet) zeigen.

In Abschn. 5.5.1 konnten zwei verschiedene Au-Hybridsonden, an die jeweils eine Reporter-Art gekoppelt wurde, erfolgreich untersucht und identifiziert werden. Im Folgenden sollen nun SERS-Hybridsonden, die jeweils aus zwei BSA-Reporter-gekoppelten Au-Nanoaggregaten bestehen, in 3T3-Zellen untersucht werden. In Abb. 6.56 sind die Spektren sowie Kartierungen für diese zwei verschiedenen Au-Hybridsonden dargestellt, die jeweils aus BSA-AO-bzw. BSA-NB-Konjugaten, die an Au NA gekoppelt wurden, bestehen. Angelehnt an die Experimente in Abschn. 5.5.1 wurden multivariate Kartierungen, d. h., HCA-sowie K-Means-Kartierungen erstellt. Beide Clusteranalysen suggerieren drei Gruppierungen von Spektren, die die beiden Hybrid-Sonden aus der zellulären Matrix liefern (siehe Spektren in Abb. 6.56). Die erste Gruppe (blau) liefert den spektralen Untergrund, die zweite Gruppe (rot) liefert spektrale Komponenten, die Nilblau, Acridinorange sowie zellulären Komponenten zugeordnet werden können. Die letzte Gruppe (grün) liefert Signaturen von Nilblau und zellulären Bestandteilen. Die PCA-Kartierungen in Abb. 6.57 zeigen, dass die spektrale Information bereits durch die ersten drei Hauptkomponenten

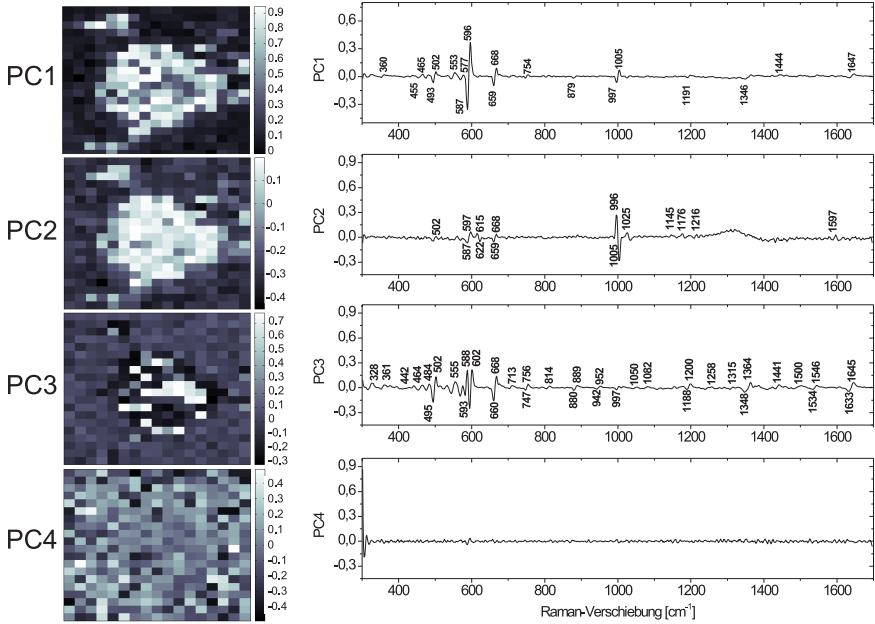


Abbildung 6.57: PCA-Kartierung einer 3T3-Zelle (17×20 Spektren), die mit BSA-NB und BSA-AO Au-Hybridsonden inkubiert wurde (links). Die Präparation erfolgte dabei wie in Abschn. 5.5.1. Die dazugehörigen *Loadingsspektren* sind für die ersten vier Hauptkomponenten dargestellt (rechts). Die Kartierung wurde aus 340 Spektren erstellt.

vollständig beschrieben werden kann, da die vierte PC nur noch Rauschteile enthält (siehe *Loadings* in PC4). Auch hier entsteht der Bildkontrast durch die aus der PCA hervorgegangenen Varianzen des spektralen Datensatzes. Betrachtet man die spektralen Merkmale entlang PC1, so lassen sich diese NB-Banden zuordnen (siehe Tab. 9.21). In PC2 sind spektrale Anteile des NB ebenfalls stark vertreten. In PC3 treten jedoch neben NB-Banden zusätzlich AO-Banden nebst zellulären Komponenten z. B. bei 1441 cm^{-1} , 1364 cm^{-1} , 1200 cm^{-1} und 1348 cm^{-1} auf [55].

6.1.4 Schlussfolgerungen: BSA-Reporter-Konjugate als Komponenten für Hybridsonden

Die UV/Vis- und MALDI-Untersuchungen haben ergeben, dass sich alle Reporter-Moleküle an BSA koppeln ließen, wobei die Kopplung der verschiedenen Reporter-Moleküle an die Lysinresiduen des BSA bzw. an dessen Carboxylgruppen erfolgte. Die SER(R)S-Untersuchungen an den hergestellten Konjugaten zeigten, dass im Gegensatz zum BSA-*p*ABT-Konjugat alle Konjugate an aggregierten Au und Ag-Nanopartikeln detektiert werden konnten. Obwohl die MALDI-Untersuchungen (siehe Abschn. 6.1.2) eine Kopplung des *p*ABT ans BSA eindeutig indizierten, konnten keine Spektren dieses

Konjugats detektiert werden. Dies könnte Hinweis darauf sein, dass das *p*ABT im BSA verborgen vorliegt, was zur Folge hatte, dass das *p*ABT zu weit entfernt von der plasmonischen Nanostruktur liegt und somit sein Nachweis nicht möglich war. Im Gegensatz dazu steht die Detektion von hohen Signalintensitäten des gekoppelten Nilblau trotz geringer Kopplungsdichte. Ein Grund dafür ist die präresonante Anregung des BSA-NB-Komplexes bei 785 nm (vgl. Abschn. 5.1). In den Experimenten liefern die SER(R)S-Spektren der BSA-Reporter-Konjugate Signaturen der gekoppelten Reporter und zusätzlich molekulare Information, die Hinweise auf die Sekundärstruktur des BSA-Moleküls, welche im Zusammenhang mit der Kopplung der Reporter-Moleküle ans BSA steht, gibt sowie über umgebende Moleküle, wie beispielsweise zelluläre Komponenten bei Anregung der Sonden in der Zelllinie 3T3.

Bei der Anwendung in Experimenten mit zwei verschiedenen SERS-Hybridsonden in 3T3-Zellen (AO konjugiert an BSA und NB konjugiert an BSA), konnten mittels multivariater Analyse (HCA- und K-Means-Clusteranalysen) drei verschiedene spektrale Klassen identifiziert werden. Diese ließen sich dem spektralen Untergrund, zwei spektralen Komponenten, die Acridinorange, Nilblau sowie zelluläre Banden enthalten und Signaturen von Nilblau und zellulären Komponenten zuordnen.

6.2 Kopplung von Zielfindungselementen an eine SERS-Sonde

6.2.1 Kopplung von Reportern und Antikörpern an BSA

In Abschn. 6 konnte gezeigt werden, dass Reporter-Moleküle sich an BSA koppeln und detektieren lassen. Im Folgenden soll eine BSA-Hülle konstruiert werden, die zum einen als multifunktionale Bindungsstelle für Reporter-Moleküle dient und die Ankopplung eines Antikörpers als Zielfindungselement erlaubt. In bisherigen SERS-basierten Immunoassays wurden SERS-*Tags* entwickelt, an die Raman-Reporter wie z. B. FITC kovalent an Kern-Schale-Nanopartikel, bestehend aus einer Siliziumschicht auf Au NP, separat von Antikörpern gekoppelt wurden [304]. Weitere Anwendungsplattformen für Immunoassays basieren auf Au NP, an welche Antikörper oder Reporter-konjugierte Antikörper chemisorbiert sind [299]. In der Literatur wird ferner die Ankopplung Raman-aktiver Reporter-Moleküle wie z. B. Dithionitrobenzoesäure an Zielfindungselemente, die als Indikator zur PSA-Antigenkopplung dienen, beschrieben. Ferner existieren Assayformate, die für die Protein G-Detektion entwickelt wurden um den Antikörper-Antigen-Komplex durch Auftreten von Reporter-Banden mittels SERS-Nachweis zu verfolgen [34, 172].

In diesem Abschn. werden zunächst die Charakteristika der SERS-Sonde, an die ein BSA-Antikörper-Konjugat gekoppelt wurde, diskutiert. Anschließend wurde eine Kopplung des Antikörpers an die BSA-RBITC-SERS-Sonde durchgeführt, um im nächsten Schritt diesen gebundenen Antikörper an einen Primärantikörper zu binden. Die Charakterisierung des BSA-Antikörper-Konjugats bzw. BSA-RBITC-Antikörper-Konjugats erfolgte dabei mit Hilfe eines enzymatisch-gestützten Immunogenitätsnachweises (ELISA). Letzterer stellt eine sinnvolle Methode dar, da mit dieser eine verlässliche Aussage für die erfolgte Antigen-Bindung der BSA-gekoppelten Sekundärantikörper getroffen werden kann.

6.2.2 ELISA: Untersuchung am BSA-(Reporter-)Antikörper-Konjugat

Zur Konstruktion von SERS-Sonden, an die Zielfindungselemente, in diesem Fall Antikörper, gekoppelt werden sollten, wurde zunächst ein BSA-Antikörper-Konjugat hergestellt (siehe Abschn. 3.9). Bei dem gekoppelten Antikörper handelt es sich um einen Sekundärantikörper (Ziege-Anti-Maus-Antikörper). Die erfolgte Kopplung des Sekundärantikörpers ans BSA sowie dessen Funktionalität wurde mit Hilfe eines direkten ELISA überprüft, in dem die Ausbildung eines Komplexes zwischen dem gekoppelten Sekundärantikörper und einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Primärantikörper (HRP-Maus IgG) erfolgte. Anschließend wurde ein BSA-Reporter-Antikörper-Konjugat hergestellt, bei dem der Reporter RBITC verwendet wurde. Abb. 6.58 zeigt das Schema zur Durchführung des direkten ELISA an den hergestellten Konjugaten, dem BSA-Ziege-Anti-Maus-bzw. BSA-RBITC-Ziege-Anti-Maus-Konjugat.

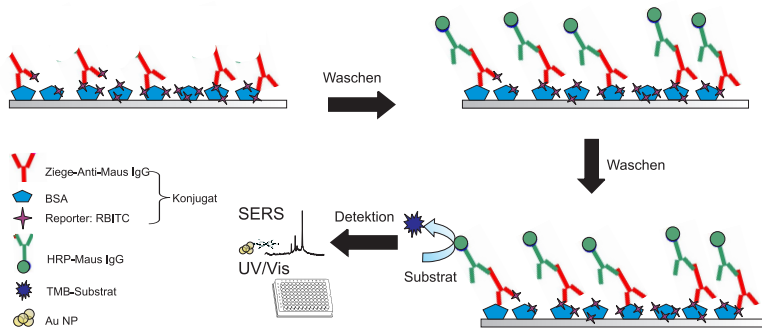


Abbildung 6.58: Schematische Darstellung des durchgeführten direkten ELISA am BSA-Antikörper-Konjugat bzw. BSA-RBITC-Antikörper-Konjugat. Als Antigen wurde ein HRP-markierter monoklonaler Antikörper gewählt. Neben einer Detektion mittels UV/Vis lässt sich das umgesetzte TMB mit Hilfe von SERS detektieren.

Die Ergebnisse des ELISA in Tab. 6.14 zeigen, dass ein BSA-Antikörper-Konjugat vorliegt (siehe Tab. 6.14, Spalten 1-4). Dies lässt sich an den OD-Werten, die mittels UV/Vis-Spektrophotometrie bei 450 nm ausgelesen wurden, erkennen. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich das BSA aufgetragen (Tab. 6.14, Spalten 5-8), um eine Immunaffinität zwischen dem HRP-Primärantikörper und BSA auszuschließen. Weiterhin kann aus dem ELISA die Information gezogen werden, dass der hinzugegebene Primärantikörper an den freien Sekundärantikörper gebunden hat (siehe Spalten 9-12).

Die ELISA-Ergebnisse des BSA-RBITC-Antikörper-Konjugats liefern trotz höherer Konzentrationen und geringen Verdünnungen des aufgetragenen Primärantikörpers TMB-Signale. Es hat verglichen mit dem ungekoppelten BSA eine deutlich geringere Kopplung von Sekundärantikörpern an das BSA-RBITC-Konjugat stattgefunden. Ursache hierfür könnte die starke Kopplung des RBITC ans BSA gewesen sein, das die Anbindung von Sekundärantikörpern erschwert. Eine sterische Hinderung verursacht durch das RBITC könnte ebenfalls Ursache für die geringere Anzahl gekoppelter Sekundärantikörper gewesen sein. Dennoch lässt sich auch hier eine erfolgte Anbindung des BSA-RBITC-Antikörper-Konjugats an den Primärantikörper anhand der OD-Werte ablesen.

Tabelle 6.14: OD-Werte des direkten ELISA zum Kopplungsnachweis des Sekundärantikörpers ans BSA. Aufgetragen sind zusätzlich die Negativ-Kontrollen (BSA) und Positiv-Kontrollen (Ziege-Anti-Maus-Antikörper).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | prim. Ak. |
|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|
| A | 0.022 | 0.017 | 0.017 | 0.016 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.06 | 0.08 | 0.017 | 0.03 | 1:1000 |
| B | 0.020 | 0.023 | 0.017 | 0.017 | 0.004 | 0.003 | 0.004 | 0.004 | 0.511 | 0.513 | 0.172 | 0.181 | 1:10000 |
| C | 0.055 | 0.090 | 0.089 | 0.034 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 3.672 | 3.606 | 1.569 | 1.667 | 1:100000 |
| D | 0.446 | 0.420 | 0.388 | 0.217 | 0.003 | 0.003 | 0.004 | 0.004 | 3.783 | 3.707 | 3.927 | 3.930 | 1:1000000 |
| Verdünnungen | 1:20000 | 1:10000 | 1:20000 | 1:10000 | 1:20000 | 1:10000 | 1:20000 | 1:10000 | 1:20000 | 1:10000 | 1:20000 | 1:10000 | 1:100000 |
| Analyten | BSA-Ak | BSA-Ak | BSA-Ak | BSA-Ak | BSA | BSA | BSA | BSA | Ak | Ak | Ak | Ak | Ak |

Tabelle 6.15: OD-Werte des direkten ELISA zum Kopplungsnachweis des Sekundärantikörpers ans BSA-RBITC-Konjugat.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | prim. Ak. |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|
| A | 0.223 | 0.087 | 0.169 | 0.099 | 0.25 | 0.195 | 0.133 | 0.127 | 0.181 | 0.236 | 0.323 | 0.33 | 1:1000 |
| B | 0.281 | 0.182 | 0.143 | 0.131 | 0.103 | 0.201 | 0.125 | 0.102 | 0.185 | 0.122 | 0.063 | 0.24 | 1:1000 |
| C | 0.102 | 0.195 | 0.082 | 0.128 | 0.085 | 0.071 | 0.098 | 0.149 | 0.139 | 0.077 | 0.123 | 0.074 | 1:2000 |
| D | 0.169 | 0.076 | 0.084 | 0.106 | 0.062 | 0.107 | 0.09 | 0.1 | 0.109 | 0.038 | 0.062 | 0.076 | 1:2000 |
| Konjugatverd. | 1:1000 | 1:1000 | 1:2000 | 1:2000 | 1:3000 | 1:3000 | 1:4000 | 1:4000 | 1:5000 | 1:5000 | 1:6000 | 1:6000 | 1:2000 |

Alternativ wurde versucht den ELISA mittels SERS auszulesen. Im ELISA wurde durch die katalytische Einwirkung der Meerrettichperoxidase das 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in einem ersten Schritt zum blau gefärbten Radikalkation und in einem weiteren Schritt zum gelb gefärbten 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimoniumsalz oxidiert. Die Peroxidaseaktivität hängt neben der H_2O_2 -Konzentration auch vom pH-Wert der Testlösung, von der Konzentration des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin sowie der Reaktionsdauer ab. Das oxidierte blau gefärbte 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Radikalkation wurde durch Absenkung des pH-Wertes und Abstoppen der peroxidatischen Aktivität mittels Schwefelsäure zum gelben TMB^{2+} überführt, dessen SERS-Spektrum in Abb. 6.59 dargestellt ist.

Misono *et al.* führten bereits Raman-Untersuchungen an den Oxidationsprodukten von TMB in Gegenwart von Meerrettichperoxidase durch [305]. Das in Abb. 6.59 dargestellte SERS-Spektrum von TMB^{2+} weist Banden bei 943 cm^{-1} ($\nu(\text{N-C}_2)$) sowie 1339 cm^{-1} , 1521 cm^{-1} und 1606 cm^{-1} , die den C-C-Streckschwingungen des Aromaten im TMB^{2+} zugeordnet werden können, auf [306–309]. Ähnlich wie beim Auslesen der OD-Werte beim ELISA-Experiment ließen sich womöglich aus den Intensitäten einer ausgewählten TMB^{2+} -Bande der verschiedenen Verdünnungen der ELISA-Kopplungsprodukte und damit die Menge des enzymatisch umgesetzten TMB^{2+} bestimmen, die im Idealfall eine lineare Konzentrationsabhängigkeit aufweisen würde. Jedoch bedarf es einerseits einer genauen Kenntnis der innerhalb der Probenverdünnungen vorhandenen TMB^{2+} -Konzentration. Andererseits müsste gewährleistet sein, dass die Detektion des TMB^{2+} in Gegenwart von Au oder Ag Nanopartikeln zu SERS-Signalen führt, die keinerlei Signalschwankungen unterliegen. Hierfür müsste die Wechselwirkung zwischen dem Analyten und den nanopartikulären Substraten genauer untersucht werden.

6.2.3 SERS-Nachweis des BSA-RBITC-Antikörper-Konjugats

In Abb. 6.60 sind die RBITC-Spektren und BSA-RBITC-Antikörper-Konjugat Spektren, die in Gegenwart von Au (A-B) und Ag NA (C-D) untersucht wurden, dargestellt. Die BSA-RBITC-Antikörper-Konjugate (B und D) weisen überwiegend spektrale Merkmale des gekoppelten Reporters RBITC auf. Jedoch zeigt insbesondere das Konjugatspektrum (B) spektrale Unterschiede im Vergleich zum ungekoppelten RBITC. Das Konjugat-Spektrum (B) weist im höherwellzahligen Bereich Banden bei 970 cm^{-1} (Phe), 1120 cm^{-1} ($\nu(\text{CN})$), 1157 cm^{-1} ($\nu(\text{CN})$), 1305 cm^{-1} ($\gamma(\text{CH}_2)$), 1377 cm^{-1} (Trp), 1420 cm^{-1} ($\nu(\text{COO}^-)$), 1470 cm^{-1} (Pro, Trp (CH_2)) und 1530 cm^{-1} (Trp) auf, die sich BSA zuordnen lassen [289, 297]. Es ist allerdings bekannt, dass NIR-SERS zum Nachweis von Antikörpern eingesetzt werden kann, weshalb Antikörper-spezifische Banden im SERS-Spektrum ebenfalls verstärkt worden sein könnten [301]. Vergleicht man das NIR-SERS Spektrum dieses Konjugats mit dem NIR-SERS Spektrum des BSA-RBITC-Konjugats in Gegenwart von Au NA, sind spektrale Unterschiede deutlich erkennbar (vgl. Spektrum 6.51 (B)). Im Gegensatz zum BSA-RBITC-Konjugatspektrum wird hier die Bande bei 1357 cm^{-1} verstärkt. Verglichen mit Au NA sind die BSA-RBITC-Konjugat- und BSA-RBITC-Antikörper-Konjugatspektren einander sehr ähnlich. Vergleicht man die BSA-RBITC-Antikörper-Konjugatspektren (Abb. 6.60 (B) und (D)), so fällt auf, dass das Spektrum (D) eine charakteristische Bande bei $\sim 1244\text{ cm}^{-1}$ aufweist. Diese Bande, die die α -helikale Struktur (AmidIII) des BSA beschreibt und Information zu dessen Sekundärstruktur liefert,

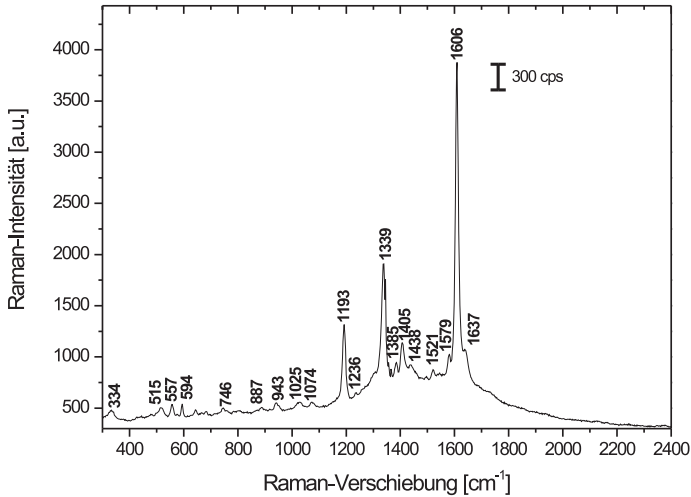


Abbildung 6.59: SERS-Spektrum von TMB^{2+} im BSA-RBITC-Antikörper-Konjugat (1:1000-Verdünnung) in Gegenwart von Au Nanoaggregaten. Anregungswellenlänge: 633 nm. Anregungsintensität: $3 \cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$. Akkumulationszeit: 1 s.

wurde in Gegenwart beider Substrate in Abschn. 6.51 (B) und (d)) beobachtet. Im Gegensatz zu dem an Au NA untersuchten Konjugatspektrum konnten bei den Ag NA Signaturen, die Informationen zur Sekundärstruktur des BSA liefern, detektiert werden. Das Spektrum (D) weist jedoch überwiegend spektrale Merkmale des RBITC auf. Die Banden bei 870 cm^{-1} (Trp), 1134 cm^{-1} ($\nu(\text{CN})$), 1160 cm^{-1} ($\nu(\text{CN})$), 1244 cm^{-1} (Amid III, Proteine) und 1378 cm^{-1} (Trp) lassen sich BSA-spezifischen Banden zuordnen.

6.2.4 Schlussfolgerungen: Eigenschaften zielgerichteter SERS-Sonden

Es wurden funktionstüchtige Zielfindungselemente, d. h., Sekundärantikörper (Ziege-Anti-Maus-Antikörper) in die SERS-Sonden integriert. Der in die Hybridsonden integrierte Reporter RBITC konnte anhand seiner SERS-Signaturen identifiziert werden. Der ELISA beweist, dass das Zielfindungselement zum einen gekoppelt an BSA vorliegt und nach erfolgter BSA-Ankopplung an den Primärantikörper binden kann. Die spektroskopischen Untersuchungen des BSA-RBITC-Antikörper-Konjugats an Au Nanoaggregaten lieferten Informationen aus der biomolekularen Umgebung des gekoppelten Reporters und weiterer Komponenten, die entweder von den gekoppelten Sekundärantikörpern selbst oder vom unmittelbar in NP-Nähe befindlichen BSA stammen könnten. Im Gegensatz dazu wies das Konjugat-Spektrum im Falle der Ag Nanoaggregate vorwiegend RBITC-Signaturen auf. Die BSA-RBITC-Konjugatspektren zeigten im Falle der Au NA spektrale Unterschiede zur SERS-Signatur des BSA-RBITC-Konjugats auf. Es konnte somit eine Hybrid-Sonde generiert werden, die aus Au- und Ag Nanoaggregaten besteht und von einer multifunktionalen BSA-Hülle umgeben sind, die neben der Detektion der Reporter-Signatur im Falle

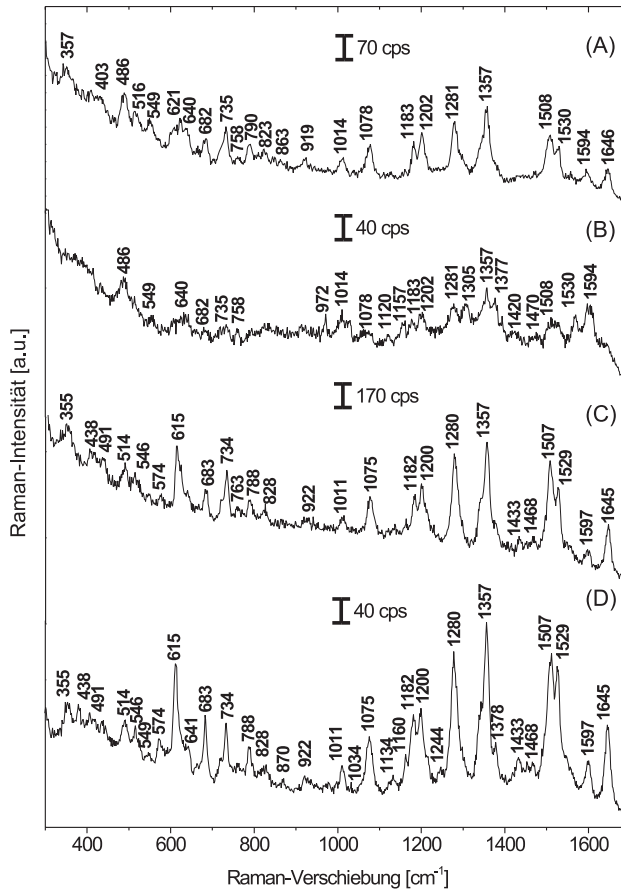


Abbildung 6.60: (A) SERS-Spektrum von RBITC auf Au NA. (B) SERS-Spektrum des BSA-Reporter-Antikörper-Konjugats auf Au NA. (C) SERS-Spektrum von RBITC auf Ag NA. (D) SERS-Spektrum des BSA-Reporter-Antikörper-Konjugats auf Ag NA. Anregungswellenlänge: 785 nm. Anregungsintensität: $8 \cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$. Akkumulationszeit: 1 s.

der Au NP eine zusätzliche Detektion molekularer Komponenten in Epitop-Nähe erlaubt. Die charakteristische Bande bei $\sim 1244 \text{ cm}^{-1}$, die Information zur Sekundärstruktur des BSA liefert, konnte nur im BSA-RBITC-Antikörper-Konjugatspektrum im Falle der Ag NA beobachtet werden.

7 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es neuartige SERS-Sonden für bioanalytische Anwendungen herzustellen. Bedingungen, die die Sonden erfüllen mussten, waren, dass sie eindeutig in Multiplexing-Experimenten identifizierbar sein und Zielfindungseigenschaften, d. h., Spezifität für ein bestimmtes biomolekulares Ziel, haben sollten. Als geeignete SERS-Substrate für Sonden wurden Aggregate von Edelmetall-Nanopartikeln identifiziert.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Au- und Ag-Nanoaggregate aufgrund ihrer Morphologien und Größe besonders für die Anregbarkeit im NIR und Detektion von Reporter-Molekülen im μM -Bereich anwendbar sind.

Es wurden insgesamt zehn Reporter-Moleküle *para*-Aminothiophenol, Rhodamin(B)isothiocyanat, Fluoresceinisothiocyanat, Dithionitrobenzoesäure, 2-Naphthalenthiole, *para*-Mercaptobenzoesäure, Kristallviolett, Acridinorange, Safranin O und Nilblau in Gegenwart der jeweiligen Au und Ag SERS-Substrate untersucht. Für die Anwendbarkeit in Multiplexing-Experimenten müssen die spektralen Signaturen von Reportern eindeutig identifizierbar und separierbar sein. Es konnte gezeigt werden, dass die zehn Reporter-Moleküle ein spezifisches fingerabdruckartiges SERS-Spektrum liefern und trotz teilweise großer Ähnlichkeit eindeutig identifizierbar sind. Hierfür wurde eine chemische Separierbarkeitsanalyse durchgeführt. Mit Hilfe dieser Analyse ließen sich die untersuchten Reporter-Signaturen anhand spezifischer Bandenverhältnisse eindeutig voneinander unterscheiden. Es konnte herausgestellt werden, dass die trivariate Identifizierbarkeit zweier spezifischer Banden Erfolg versprechend für multiplexe Anwendungen ist. Mit Hilfe multivariater Verfahren, insbesondere der Hauptkomponentenanalyse und Hierarchischen Clusteranalyse, konnte gezeigt werden, dass sich die Signaturen der unterschiedlichen Reporter gut voneinander diskriminieren. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass mit Hilfe multivariater Bildgebung basierend auf Clusteranalysen eine schnelle Identifizierung verschiedenartiger SERS-Sonden innerhalb der Biomatrix, d. h., in Zellen möglich ist. Verglichen mit der chemischen Bildgebung liefern die multivariaten Verfahren detailreichere Informationen der hyperspektralen Datensätze von der strukturellen Zusammensetzung einer Biomatrix (z. B. Zelle).

Weiterhin konnte in Experimenten mit variablem pH-Wert gezeigt werden, dass einige Reporter ein pH-abhängiges SERS-Spektrum liefern und konzipiell als pH-Sonden einsetzbar wären. In den Experimenten wurde gezeigt, dass sich pH-Werte in einem großen dynamischen Bereich detektieren lassen. Dies wäre von besonderem Interesse für pH-Messungen in zellulären Kompartimenten.

Ein weiteres Anliegen der Arbeit war es Zielfindungselemente in die SERS-Sonden zu integrieren. Als Beispiel für ein Zielfindungselement wurden die SERS-Sonden mit Antikörpern (Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörpern) funktionalisiert. Für die Ankopplung dieser Antikörper wurde Bovines Serum Albumin als Trägermolekül gewählt. Es konnte gezeigt werden, dass das BSA die Anbindung von Reporter-Molekülen und Zielfindungselementen sowie zur Stabilisierung der Nanoaggregate diente. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, lassen sich SERS-Sonden, die von einer solchen multifunktionalen BSA-Hülle umgeben sind, herstellen. Insbesondere liefern die *in vitro*-Experimente mit BSA-Reporter-gekoppelten Nanosonden in 3T3-Zellen neben Reporter-Signaturen zusätzlich Informationen aus der zellulären Matrix. Die Spektren der BSA-gekoppelten Reporter-Moleküle geben zudem Hinweise auf eine variable Konformation des BSA,

welche im Zusammenhang mit der Kopplung der Reporter-Moleküle an das BSA steht. Die Funktionstüchtigkeit des Zielfindungselements, in diesem Fall die Immunogenität der gekoppelten Sekundärantikörper, bleibt nach Integration in die SERS-Sonde erhalten. Dies belegen die Ergebnisse des direkten Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA). Derartige Konjugate unter Einsatz von Reportern verifizieren die Detektierbarkeit der Sonden mittels SERS. Damit konnte in einer Anwendung belegt werden, dass die SERS-Sonden für Immunoassays einsetzbar sind.

Grundsätzlich kann mit Hilfe multivariater Verfahren eine große Anzahl BSA-koppelbarer Reporter-Moleküle simultan mittels spektralem *Multiplexing* ausgelesen werden. Damit wäre der Ausgangspunkt für neue biokompatible, stabile, mobile und nicht resonant anregbare SERS-Sonden für bioanalytische Anwendungen geschaffen. Das in der Arbeit vorgeschlagene Konzept konnte somit erfolgreich umgesetzt werden.

8 Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein Konzept für SERS-Hybridsonden mit einem integrierten Zielfindungselement (Antikörper) und einem Reporter-Molekül erstellt werden. Aufbauend auf diesem Konzept wäre für deren Anwendung in Hochdurchsatz-Assays (z.B. Protein-Microarrays) eine mikrostrukturierte Anordnung verschiedenartig konfigurierter SERS-Sonden, die mit diversen Zielfindungselementen und Reporter-Molekülen versehen sind, denkbar. Hierfür bedarf es einer Optimierung der in der Arbeit konzipierten SERS-Hybridsonde hinsichtlich effektiver Ankopplung von Zielfindungselementen.

Zudem wäre ein Auslesen mittels SERS problemlos möglich, da in Gegenwart plasmonischer Nanostrukturen die Fluoreszenz des biologischen Hintergrundes gelöscht wird. Insbesondere liefern die Raman-Spektren schmalbandige spezifische Signaturen. Diese wären, wie in der Arbeit gezeigt wurde, mittels multivariater Analysen eindeutig identifizierbar. Zusätzlich und alternativ zu den in der Arbeit vorgeschlagenen Reporter-Molekülen können weitere fluorogene und nicht-fluorogene Reporter-Moleküle, wie sie in Immunoassays bereits Anwendung finden, eingesetzt werden [34, 36]. Um die sich immer weiter entwickelnden Eigenschaften von Nanostrukturen nutzen zu können, könnten SERS-Sonden noch empfindlicher durch Einsatz von *Nanoshells* oder *Core/Shell*-Nanopartikeln (Erweiterung der Empfindlichkeit im NIR-Bereich) gestaltet werden. Eine ultrasensitive Detektion molekularer Fingerabdrücke für die Antikörper-Antigen-Reaktion wäre zudem durch Verwendung von Silber-Verstärkern hinsichtlich einer Optimierung von SERS-Signalen denkbar [310].

9 Anhang

9.1 Tabellen

Tabelle 9.16: p -ABT-Moden und deren Zuordnungen nach [58, 173, 178–180, 311–316]. Abkürzungen: δ : Deformationsschwingung; γ : Deformationsschwingung aus der Ebene; ν : Valenzschwingung (Streckschwingung); π : Wippschwingung.

| Mode _{RRS} [cm ⁻¹] | Mode _{SERS} [cm ⁻¹] (Au NP) | Mode _{SERS} [cm ⁻¹] (Ag NP) | Zuordnungen |
|---|--|--|--|
| 321 | — | — | $\delta(\text{CS})$ |
| 391 | 390 | 399 | $\delta(\text{CS})$ |
| — | 505 | — | $\delta(\text{CS})$ |
| 463 | — | — | $\gamma(\text{CCC}), (\text{a}_1)$ |
| 634 | 635 | 640 | $\gamma(\text{CCC}), (\text{a}_1)$ |
| — | 702 | — | $\pi(\text{CS}) + \pi(\text{CH}) + \pi(\text{CC})$ |
| 799 | — | — | $\pi(\text{CH})$ |
| 822 | — | 811 | $\pi(\text{CH})$ |
| 1011 | 1006 | 1004 | $\gamma(\text{CC}) + \gamma(\text{CCC}), (\text{a}_1)$ |
| 1089 | 1081 | 1078 | $\nu(\text{CS}), (\text{a}_1)$ |
| — | — | 1142 | $\delta(\text{CH}), (\text{b}_2)$ |
| 1171 | 1176 | 1181 | $\delta(\text{CH}), (\text{a}_1)$ |
| 1206 | — | — | $\delta(\text{CH}), (\text{a}_1)$ |
| 1263 | — | — | $\delta(\text{CH}), (\text{a}_1)$ |
| 1310 | — | — | $\nu(\text{CC}) + \delta(\text{CH}), (\text{b}_2)$ |
| — | — | 1386 | $\nu(\text{CC}) + \delta(\text{CH}), (\text{b}_2)$ |
| 1403 | — | 1429 | $\nu(\text{CC}) + \delta(\text{CH}), (\text{b}_2)$ |
| 1480 | 1487 | — | $\nu(\text{CC}) + \delta(\text{CH})$ |
| 1518 | — | — | $\nu(\text{CC}) + \delta(\text{CH})$ |
| 1595 | 1592 | 1595 | $\nu(\text{CC}) + \delta(\text{CH})$ |
| 1620 | — | — | $\nu(\text{CC}), (\text{a}_1)$ |

Tabelle 9.17: 2-NAT-Moden und deren Zuordnungen nach [181, 317, 318]. Abkürzungen: bend: Biegeschwingung, def: Deformationsschwingung, st: Strecksschwingung, twist: Drehschwingung, wag: Schaukelschwingung.

| Mode _{NRS} [cm ⁻¹] | Mode _{SERS} [cm ⁻¹] (Au NP) | Mode _{SERS} [cm ⁻¹] (Ag NP) | Zuordnungen |
|---|--|--|---------------|
| 350 | 368 | 368 | Ring def + CS |
| 402 | 417 | 415 | Ring wag |
| — | 471 | — | Ring twist |
| 506 | — | — | Ring twist |
| 514 | 518 | 518 | Ring twist |
| 599 | 599 | 599 | Ring def |
| 626 | — | — | Ring twist |
| 639 | 638 | 638 | Ring twist |
| 764 | 767 | 767 | C-H wag |
| 842 | 844 | 844 | C-H twist |
| 905 | — | — | C-H twist |
| 940 | 941 | 939 | S-H bend |
| 952 | — | — | Ring def |
| 1022 | 1020 | 1020 | C-H bend |
| 1080 | 1068 | 1068 | C-H bend |
| 1131 | 1128 | 1128 | C-H bend |
| 1143 | 1144 | 1144 | C-H bend |
| — | 1158 | — | C-H bend |
| 1190 | — | — | C-H bend |
| 1240 | — | — | C-H bend |
| 1254 | — | — | C-H bend |
| 1343 | — | — | Ring st |
| 1364 | — | — | Ring st |
| 1378 | 1380 | 1380 | Ring st |
| 1429 | 1429 | 1429 | Ring st |
| 1452 | 1449 | 1450 | Ring st |
| 1529 | — | — | Ring st |
| 1567 | 1564 | 1567 | Ring st |
| 1592 | 1582 | 1583 | Ring st |
| 1621 | 1622 | 1622 | Ring st |

Tabelle 9.18: RBITC-Moden und deren Zuordnungen nach [184–187, 203, 319]. Abkürzungen: bend: Biegeschwingung, sk: Gerüstschwingung, st: Streckschwingung, tor: Drehschwingung.

| Mode _{RBS} [cm ⁻¹] | Mode _{SERS} [cm ⁻¹] (Au NP) | Mode _{SERS} [cm ⁻¹] (Ag NP) | Zuordnungen |
|---|--|--|--|
| 354 | 357 | 355 | tor / bend Ring |
| 403 | — | 407 | tor / bend Ring |
| — | — | 438 | tor / bend Ring |
| 484 | 486 | 491 | tor / bend Ring |
| 521 | — | 514 | tor / bend Ring |
| 555 | — | 546 | tor / bend Ring |
| 570 | — | 574 | tor / bend Ring |
| 610 | 621 | 615 | tor / bend Ring |
| 634 | — | — | C-C-C bend (Xanthen-Ring), tor / C-C-C + N-H bend |
| 659 | 682 | 683 | C-C-C bend (Xanthen-Ring), tor / C-C-C + N-H bend |
| 675 | — | — | C-H bend (Xanthen-Ring, außerhalb der Ebene) |
| 690 | — | — | C-H bend (Xanthen-Ring, außerhalb der Ebene) |
| 734 | 735 | 734 | C-H bend (Xanthen-Ring, außerhalb der Ebene) |
| 768 | — | 763 | C-H bend (Xanthen-Ring, außerhalb der Ebene) |
| 777 | — | 788 | C-H bend (Xanthen-Ring, außerhalb der Ebene) |
| 825 | 831 | 828 | C-H bend (Xanthen-Ring, außerhalb der Ebene) |
| 832 | — | — | C-H bend (Xanthen-Ring, außerhalb der Ebene) |
| 877 | — | — | C-H bend (Xanthen-Ring, außerhalb der Ebene) |
| 902 | — | 922 | C-C-C bend (Xanthen-Ring) |
| 931 | — | 979 | C-C-C bend (Xanthen-Ring) |
| 1013 | 1014 | 1011 | C-C-C bend (Xanthen-Ring) |
| 1040 | — | — | C-C-C bend (Xanthen-Ring) |
| 1088 | 1078 | 1175 | C-C-C bend (Xanthen-Ring) |
| 1129 | — | 1131 | C-C-C bend (Xanthen-Ring) |
| — | — | 1162 | C-C-C bend (Xanthen-Ring) |
| 1179 | 1183 | 1182 | C-C-C bend (Xanthen-Ring) |
| 1241 | — | 1200 | C-H bend (Methyl-Gruppe, Xanthen-Ring) |
| 1268 | 1281 | 1280 | C-H bend (Xanthen-Ring, innerhalb der Ebene) |
| 1313 | — | — | C-C st (Xanthen-Ring), C-C st + C-H bend (Ethylamin-Gruppe des XR) |
| 1360 | 1357 | 1357 | C-OH (phenol.), CCH (H26, H28, H29, H30) + C-OH bend |
| 1411 | — | — | C-H bend (Ethylamin-Gruppe des XR) |
| 1444 | — | 1432 | C-C st (XR) + C-C st (Phenyl-Gruppe des XR), arom C-C st |
| 1458 | — | 1468 | C-N st (XR) |
| 1513 | 1508 | 1507 | C-H bend (externe Gruppen Moden am XR) |
| — | — | 1529 | C-H bend (externe Gruppen Moden am XR) |
| 1569 | — | 1555 | C-C st (Xanthen-Ring) |
| 1590 | — | 1597 | C-C st (Xanthen-Ring) |
| 1601 | — | — | Xanthen-Ring C-C st |
| 1645 | 1644 | 1645 | sk (Xanthen-Ring), C-C stretch (Carbonylgruppe) |
| | | | sk (Xanthen-Ring), C-C stretch (Carbonylgruppe) |
| | | | Quinolin st, CO und CC st, XR sk |

Tabelle 9.19: CV-Moden und deren Zuordnungen nach [175, 320, 321]. Abkürzungen: bend: Biegeschwingung, sk: Gerüstschwingung, st: Streckschwingung.

| Mode _{RRS} [cm ⁻¹] | Mode _{ERS} [cm ⁻¹] (Au NP) | Mode _{ERS} [cm ⁻¹] (Ag NP) | Zuordnungen |
|---|---|---|----------------------------|
| 334 | 334 | 336 | Ph-C ⁺ -Ph bend |
| 426 | 420 | 422 | Ph-C ⁺ -Ph bend |
| — | 441 | 443 | Ph-C ⁺ -Ph bend |
| 532 | 522 | 529 | Ring sk Mode (Radikal) |
| 570 | 557 | 560 | Ring sk Mode (Radikal) |
| 616 | 606 | — | Ring sk Mode (Radikal) |
| — | 662 | — | Ring sk Mode (Radikal) |
| 729 | 725 | 725 | Ring C-H bend |
| — | 758 | 758 | Ring C-H bend |
| 770 | 798 | 801 | Ring C-H bend |
| 810 | — | — | Ring C-H bend |
| 918 | 916 | 914 | Ring sk Mode (Radikal) |
| 942 | 941 | 941 | Ring sk Mode (Radikal) |
| 982 | — | — | Ring sk Mode (Radikal) |
| 1142 | — | — | Ring C-H bend |
| 1182 | 1172 | 1175 | Ring C-H bend |
| 1192 | 1224 | — | Ring C-H bend |
| 1306 | 1299 | 1295 | Ring C-C st |
| 1377 | 1363 | — | N-phenyl st |
| 1390 | 1390 | 1390 | N-phenyl st |
| 1454 | 1443 | 1447 | Ring C-C st |
| 1489 | 1474 | — | Ring C-C st + Ring C-C st |
| 1542 | 1535 | 1535 | Ring C-C st |
| 1550 | — | — | Ring C-C st |
| 1594 | 1584 | 1586 | Ring C-C st |
| 1624 | 1618 | 1620 | Ring C-C st |

Tabelle 9.20: ρ MBA-Moden und deren Zuordnungen nach [44, 189, 190, 248]. Abkürzungen: δ : Deformations-schwingung. γ : Deformationsschwingung aus der Ebene. ν : Valenzschwingung (Strettschwingung). π : Wippschwingung.

| Mode _{RRS} [cm ⁻¹] | Mode _{ERS} [cm ⁻¹] (Au NP) | Mode _{ERS} [cm ⁻¹] (Ag NP) | Zuordnungen |
|---|---|---|--|
| 337 | 337 | 363 | $\delta(\text{CS})$ |
| — | 524 | 527 | $\delta(\text{CS})$ |
| 654 | 630 | — | $\gamma(\text{CCC}), (a_1)$ |
| 682 | 694 | — | $\pi(\text{CS}) + \pi(\text{CH}) + \pi(\text{CC})$ |
| 713 | — | 717 | $\gamma(\text{CCC})$ (arom. Ring) |
| 798 | — | 799 | $\pi(\text{CH})$ |
| 848 | 844 | 846 | $\delta(\text{COO}^-)$ |
| 1003 | 1013 | 1011 | $\gamma(\text{CC}) + \gamma(\text{CCC}), (a_1)$ |
| 1070 | 1078 | 1076 | $\nu(\text{C-C})_{ring}$ |
| 1132 | — | 1137 | $\delta(\text{C-H})$ |
| 1173 | 1176 | 1183 | $\delta(\text{C-H})$ |
| 1357 | — | 1379 | $\nu(\text{COO}^-)$ |
| 1480 | 1481 | 1480 | $\nu(\text{COO}^-)$ |
| 1575 | 1590 | 1585 | $\nu(\text{C-C})_{Ring}$ |

Tabelle 9.21: NB-Moden und deren Zuordnungen nach [200, 322, 323]. Abkürzungen: β : Wasserstoff-Deformationsschwingung (in der Ebene). δ : Deformationsschwingung, γ : Gerüst-/Deformationsschwingung (in der Ebene). ρ : Wasserstoff-Deformationsschwingung (außerhalb der Ebene). κ : Gerüst-/Deformationsschwingung (außerhalb der Ebene). σ : Strecksschwingung.

| Mode _{RRS} [cm ⁻¹] | Mode _{SERS} [cm ⁻¹] (Au NP) | Mode _{SERS} [cm ⁻¹] (Ag NP) | Zuordnungen |
|---|--|--|--|
| — | 322 | 321 | $\gamma(\text{CCC})$ |
| — | 363 | 357 | $\gamma(\text{CCC})$ |
| — | 432 | — | $\gamma(\text{CCC})$ |
| — | 458 | 459 | $\gamma(\text{CCC})$ |
| — | — | 479 | $\gamma(\text{CCC})$ |
| 500 | 498 | 498 | $\gamma(\text{CCC})$ |
| — | 525 | — | $\gamma(\text{CCC})$ |
| 550 | 552 | 549 | $\sigma(\text{CC})\beta(\text{CCH})\gamma(\text{CCC})$ |
| 575 | 577 | 574 | $\gamma(\text{H}), \rho(\text{CH}), \kappa(\text{CCC})$ Gerüst-/Biegschwingung |
| 593 | 592 | 592 | $\gamma(\text{CCC}), \gamma(\text{CNG})$ |
| 666 | 665 | 665 | $\sigma(\text{Ar-N}), \gamma(\text{CCC}), \gamma(\text{NCC})$ |
| — | — | 708 | $\sigma(\text{Ar-N}), \gamma(\text{CCC}), \gamma(\text{NCC})$ |
| — | 750 | — | $\sigma(\text{Ar-N}), \gamma(\text{CCC}), \gamma(\text{NCC})$ |
| — | 786 | — | $\sigma(\text{Ar-N}), \gamma(\text{CCC}), \gamma(\text{NCC})$ |
| — | 863 | — | $\sigma(\text{Ar-N}), \gamma(\text{CCC}), \gamma(\text{NCC})$ |
| 888 | — | 885 | $\rho(\text{CH}), \kappa(\text{CCC})$ |
| 950 | 949 | 944 | $\sigma(\text{Ar-N}), \gamma(\text{CCC}), \gamma(\text{NCC})$ |
| — | 1008 | — | $\sigma(\text{Ar-N}), \gamma(\text{CCC}), \gamma(\text{NCC})$ |
| — | — | 1076 | $\sigma(\text{Ar-N}), \gamma(\text{CCC}), \gamma(\text{NCC})$ |
| — | 1114 | — | $\sigma(\text{CC}), \beta(\text{CCH}), \gamma(\text{XYZ})$ |
| 1141 | — | 1134 | $\sigma(\text{CC}), \beta(\text{CCH}), \gamma(\text{XYZ})$ |
| 1178 | 1181 | 1193 | $\sigma(\text{CC}), \beta(\text{CCH}), \gamma(\text{XYZ})$ |
| 1254 | 1201 | — | $\sigma(\text{CC}), \beta(\text{CCH}), \gamma(\text{XYZ})$ |
| 1275 | 1250 | — | $\sigma(\text{CC}), \beta(\text{CCH}), \gamma(\text{XYZ})$ |
| 1354 | 1317 | — | $\sigma(\text{CC}), \beta(\text{CCH}), \gamma(\text{XYZ})$ |
| 1377 | 1370 | — | $\sigma(\text{CC}), \beta(\text{CCH}), \gamma(\text{XYZ})$ |
| 1443 | 1432 | 1358 | $\sigma(\text{CC}), \beta(\text{CCH}), \gamma(\text{CCC}), \beta(\text{CH}_3)$ |
| 1495 | 1492 | 1436 | $\sigma(\text{CC}), \beta(\text{CCH}), \gamma(\text{CCC}), \beta(\text{CH}_3)$ |
| 1515 | — | 1493 | $\sigma(\text{CC}), \beta(\text{CCH}), \gamma(\text{XYZ})$ |
| 1547 | 1576 | 1537 | $\sigma(\text{CC}), \beta(\text{CCH}), \gamma(\text{XYZ})$ |
| 1643 | 1638 | — | $\sigma(\text{CC}), \beta(\text{CCH}), \gamma(\text{CCC}), \delta(\text{NH})$ |
| — | — | 1641 | $\sigma(\text{CC}), \beta(\text{CCH}), \gamma(\text{CCC}), \delta(\text{NH})$ |

Tabelle 9.22: AO-Moden und deren Zuordnungen nach [197–199, 324–327]. Abkürzungen: def: Deformationsschwingung, st: Strecksschwingung.

| $\text{Mode}_{ERS} [\text{cm}^{-1}]$ | $\text{Mode}_{ERS} [\text{cm}^{-1}] (\text{Au NP})$ | $\text{Mode}_{ERS} [\text{cm}^{-1}] (\text{Ag NP})$ | Zuordnungen |
|--------------------------------------|---|---|--------------------------------------|
| – | 422 | 435 | Ring def, CC, CN |
| – | 446 | – | Ring def, CC, CN |
| 497 | 505 | 498 | Ring def, CC, CN |
| 587 | – | 578 | Ring def, CN def |
| – | 614 | – | Ring def, CC, CN |
| 634 | 632 | 636 | Ring def + CH def |
| – | – | 702 | Ring def |
| 753 | – | 756 | CH def |
| 808 | 805 | 807 | CH def |
| 862 | – | – | CH def |
| 901 | – | 909 | CH def + NH def + NC st |
| 926 | – | – | CH ₃ def |
| 975 | – | 968 | Ring def, st |
| – | 1062 | – | Ring def, st |
| – | 1158 | 1164 | CH def |
| – | – | 1233 | CH ₃ def |
| 1266 | – | 1260 | NH def + CN st |
| 1292 | 1291 | – | Ring st, def |
| 1324 | – | 1327 | CH ₃ def + CN st |
| 1376 | – | 1373 | Ring st, def |
| 1404 | – | 1408 | CH ₃ def + CN st |
| 1437 | – | – | CH ₃ def + CN st, Ring st |
| – | – | – | Ring st |
| – | – | 1452 | CN st + Ring st |
| – | – | 1487 | CN st + Ring st |
| 1544 | – | 1531 | Ring st |
| 1580 | 1588 | 1574 | Ring st |
| 1643 | – | 1644 | Ring st, def |
| | | | Ring st |

Tabelle 9.23: SAF-Moden und deren Zuordnungen nach [200, 201, 328]. Abkürzungen: δ : Deformationsschwingung; ip: in der Ebene; γ : Deformationsschwingung aus der Ebene; ν : Streckerschwingung.

| Mode _{RRS} [cm ⁻¹] | Mode _{SERS} [cm ⁻¹] (Au NP) | Mode _{SERS} [cm ⁻¹] (Ag NP) | Zuordnungen |
|---|--|--|--|
| — | — | 308 | $\gamma(\text{CCC})$ |
| — | — | 347 | $\gamma(\text{CCC})$ |
| — | — | 367 | $\gamma(\text{CCC})$ |
| — | 476 | — | $\delta(\text{Ring}), \text{CC}, \text{CN}$ |
| 611 | 612 | 614 | $\delta(\text{Ring}, \text{Phenazin-Typ Ring, ip}), \text{monosubst. Ring}$ |
| 698 | 649 | — | $\delta(\text{Ring (ip) monosubst. Ring}), \text{NH}_2 \text{ wag}$ |
| — | 728 | 729 | — |
| — | — | 752 | — |
| 763 | — | 769 | — |
| 799 | 808 | — | $\gamma(\text{CH}) \text{ monosubst. Ring (5H)}$ |
| 880 | 883 | — | $\delta(\text{Ring}, \text{Phenazin-Typ Ring})$ |
| — | 1001 | — | $\gamma(\text{CH}) \text{ 1,2,4,5-tetrasubst. Ring (1H)}, \gamma(\text{CH}) \text{ pentasubst. Ring (1H)}$ |
| 1149 | 1151 | — | $\delta(\text{CH})$ |
| 1202 | 1199 | — | $\delta(\text{CH})$ |
| 1251 | 1247 | 1248 | $\nu(\text{CN})$ |
| — | 1343 | — | $\delta(\text{CH}), \nu(\text{CN})$ |
| 1370 | 1372 | 1378 | $\nu(\text{Ring}) \text{ in Phenazin-Typ Ring, sym } \delta(\text{CH}_2)$ |
| — | 1405 | — | $\nu(\text{Ring}) \text{ in Phenazin}$ |
| 1423 | 1440 | — | $\nu(\text{Ring}) \text{ in Phenazin}$ |
| 1546 | 1547 | 1551 | $\nu(\text{Ring})$ |
| 1632 | 1628 | 1641 | $\nu(\text{Ring})$ |

Tabelle 9.24: DTNB-Moden und deren Zuordnungen nach [34, 172, 329].
 Abkürzungen: δ : Deformationsschwingung, γ : Deformationsschwingung
 aus der Ebene, ν : Valenzschwingung (Strettschwingung).

| Mode _{RRS} [cm ⁻¹] | Mode _{SERS} [cm ⁻¹] (Au NP) | Zuordnungen |
|---|--|---|
| — | 328 | $\delta(\text{CS})$ |
| — | 524 | $\delta(\text{CS})$ |
| — | 740 | $\delta(\text{CH})$ |
| 851 | 847 | $\delta(\text{COO}^-)$ |
| 1058 | 1058 | $\nu(\text{NCO})$ |
| 1100 | 1099 | $\gamma(\text{CCC}), \nu(\text{NCO}) \text{ NHS}$ |
| 1155 | 1155 | $\delta(\text{CH})$ |
| 1342 | 1338 | $\nu(\text{NO}_3)$ |
| 1461 | 1453 | $\nu(\text{CN}) + \nu(\text{Ring})$ |
| 1566 | 1556 | $\nu(\text{arom. Ring})$ |

Tabelle 9.25: FITC-Moden und deren Zuordnungen nach [184–187, 203, 319]. Abkürzungen: bend: Biegeschwingung, tor: Torsionsschwingung, st: Streckschwingung, sk: Gerüstschwingung.

| Mode _{RRS} [cm ⁻¹] | Mode _{SERS} [cm ⁻¹] (Ag NP) | Zuordnungen |
|---|--|---|
| 354 | 372 | tor/bend Ring |
| 403 | 409 | tor/bend Ring |
| — | 465 | tor/bend Ring |
| 484 | 491 | tor/bend Ring |
| 521 | 522 | tor/bend Ring |
| 570 | 568 | tor/bend Ring |
| 610 | 592 | tor/bend Ring |
| 634 | 640 | tor/bend Ring |
| 734 | 725 | C-C-C bend (Xanthen-Ring), tor/C-C-C + N-H bend |
| 768 | 761 | C-C-C bend (Xanthen-Ring), tor/C-C-C + N-H bend |
| 825 | 828 | C-H bend (Xanthen-Ring, außerhalb der Ebene) |
| 902 | 916 | C-H bend (Xanthen-Ring, außerhalb der Ebene) |
| 931 | 976 | C-C-C bend (Xanthen-Ring) |
| 1040 | 1039 | C-C-C bend (Xanthen-Ring) |
| 1116 | 1112 | C-C-C bend (Xanthen-Ring) |
| 1184 | 1182 | C-H bend (Xanthen-Ring, außerhalb der Ebene) |
| 1241 | 1227 | C-OH (phenolisch), CCH (H26, H28, H29, H30) + C-OH bend |
| 1311 | 1320 | C-O-C st (Xanthen-Ring), CCH bend, COC st |
| 1360 | 1369 | C-H bend (Xanthen-Ring, außerhalb der Ebene) |
| 1414 | 1399 | C-C st (XR) + C-C st (Phenyl-Gruppe des XR), arom. C-C st |
| 1499 | 1495 | C-C-C bend (Xanthen-Ring) |
| 1569 | 1540 | C-C-C bend (Xanthen-Ring) |
| 1596 | 1598 | Xanthen-Ring C-C st |
| 1634 | 1634 | sk (Xanthen-Ring), C-C st (Carbonylgruppe) |
| | | Quinolin st, CO und CC st, XR sk |

Tabelle 9.26: Zuordnungen der BSA-AO-Konjugat-Moden und (*) zellulären Komponenten. Abkürzungen: bend: Biegeschwingung; def: Deformationschwingung; tor: Torsionschwingung; st: Streckschwingung; wag: Schaukelschwingung; sciss: Scherenschwingung; T: Thymin; A: Adenin; G: Guanin; C: Cytosin; Met: Methionin; Pro: Prolin; Trp: Tryptophan.

| BSA-AO (Au NP) | Zuordnungen | BSA-AO (Ag NP) | Zuordnungen |
|----------------|-----------------------------------|----------------|---|
| 388* | bend C2N10 (G) | 498 | Ring def, C-C, C=N |
| 451* | tor und/oder bend (Ring) | 574 | Ring def |
| 489 | Ring def, C-C C=N | 600* | Guanin Ring def |
| 520 | NH def | 751 | CH def |
| 594* | G Ring def | 807 | extern. Gruppenmode |
| 622 | Ring def + CH def | 906* | extern. Gruppenmode |
| 682 | Ring def | 965 | Ring def |
| 701* | st(C-S) Met | 1087* | Phosphat: st(PO ₂ ⁻), st(C-C), st(C-O-C), glycosid. Verbindung |
| 750 | C-H def | 1098* | Phosphat: st(PO ₂ ⁻), st(C-C), st(C-O-C), glykosid. Verbindung |
| 776* | def R6 (wag C4-C5-C6), wag C8-H | 1175 | Nukleotide: st(CN), T, C, A, Ring |
| 798* | def R6 (wag C4-C5-C6),wag C8-H | 1227* | C=N st + ring st |
| 845 | Ring def | 1329 | Ring st |
| 895 | CH def | 1373 | Ring def; st |
| 977 | Ring def, st | 1409 | CN st + Ring |
| 1072* | st(C-S) anom. | 1452 | Ring st |
| 1154* | st C8-N9, A, bend N9-H, C8-H | 1487 | Ring st |
| 1216* | Protein, (Amid III) | 1531 | Ring st, Nukleotide, Lipide |
| 1312 | C=N st + Ring st | 1642* | Proteine, (C=C), olefin. |
| 1349 | CH + CH ₃ def | | |
| 1400 | Ring st | | |
| 1477* | Pro, Trp, (CH ₂ sciss) | | |
| 1500 | Ring st | | |
| 1543 | Ring st | | |
| 1572* | Trp | | |
| 1671* | st(C=N) (RNA, DNA) | | |

Tabelle 9.27: Zuordnungen der BSA-RBITC-Konjugat-Moden und (*) zellulären Komponenten. Abkürzungen: bend: Biegeschwingung; ip: in der Ebene, op: außerhalb der Ebene, breath: Atemschwingung; def: Deformationsschwingung, γ : Deformationsschwingung aus der Ebene, tor: Torsionsschwingung; st: Streckschwingung; wag: Schaukelschwingung, sk: Gerüstschwingung. A: Adenin, G: Guanin, C: Cytosin, Met: Methionin, Tyr: Tyrosin, Phe: Phenylalanin.

| BSA-RBITC (Au NP) | Zuordnungen | BSA-RBITC (Ag NP) | Zuordnungen |
|-------------------|--|-------------------|--|
| 385* | bend C2N10 (G) | 383 | bend C2N10 (G) |
| 417 | Xanthen Ring def | 402 | Xanthen Ring def |
| 457 | extern. Gruppenmode | 439 | Xanthen Ring def |
| 502 | tor und/oder bend (Ring) | 479 | Xanthen Ring def |
| 546 | tor und/oder bend (Ring) | 553 | tor und/oder bend (Ring) |
| 587 | tor und/oder bend (Ring) | 641 | C-C-C Ring ip bend |
| 650 | C-C-C Ring ip bend | 791* | Def R6 (wag C4C5C6); G, Proteine, Tyr |
| 706* | st (C-S) Met | 883 | C-H op bend |
| 757 | C-H op bend | 911 | C-H op bend |
| 831 | C-H op bend | 939 | C-H op bend |
| 922 | C-H op bend | 948 | C-H op bend |
| 980* | Ring def, st | 1013* | DNA sk |
| 1001* | Phe, Ring breath. | 1063* | st(CN) |
| 1121 | C-H ip bend st C8-N9, | 1081* | st(CN) |
| 1164* | st C8-N9, Adenin, bend N9-H,C8-H | 1109* | Proteine, st(CN) |
| 1180 | C-H ip bend (C-C st) | 1138 | C-H ip bend st C8-N9, |
| 1269* | Proteine, Lipide: Amid III/def(CH ₂ , CH ₃) | 1189 | C-H ip bend (C-C st) |
| 1296 | | 1252* | Lipide, Proteine: def(CH ₂ , CH ₃) |
| 1310 | | C-O-C st | C-O-C st |
| 1348 | | C-O-C st | A/Proteine, Ring st/ γ (CH ₂ , CH ₃) |
| 1416* | Aminosäuren, def(CH ₃), asym., st(COO ⁻) | XR st | XR st |
| 1456* | Lipide, Proteine: def(CH ₂ , CH ₃) | 1340 | Nukleotide, Proteine, Lipide, st(COO ⁻) |
| 1458* | Lipide, Proteine: def(CH ₂ , CH ₃) | 1395* | A, G |
| 1514* | | 1434* | Lipide, Proteine: def(CH ₂ , CH ₃) |
| 1566 | | A, C, G | arom. C-C st |
| 1602* | | 1471* | Proteine, Phe, Tyr |
| | | 1570 | |
| | | 1607* | |

Tabelle 9.28: Zuordnungen der BSA-FITC-Konjugat-Moden und (*) zellulären Komponenten. Abkürzungen: bend: Biegeschwingung, ip: in der Ebene, op: außerhalb der Ebene, breath: Atemschwingung, def: Deformationsschwingung, tor: Torsionsschwingung, st: Streckschwingung, sk: Gerüstschwingung, XRD: Xanthen-Ring-Deformationsschwingung, A: Adenin, G: Guanin, C: Cytosin, Met: Methionin, Tyr: Tyrosin, Phe: Phenylalanin, Pro: Prolin.

| BSA-FITC (Au NP) | Zuordnungen | BSA-FITC (Ag NP) | Zuordnungen |
|------------------|---|------------------|--------------------------------|
| 369 | | 384* | bend C2N10 (G) |
| 414 | tor XR | 409 | XR def |
| 464 | XR def | 466 | extern. Gruppenmode |
| 524* | extern. Gruppenmode | 502* | N-H def |
| 584 | N-H def | 717 | XR def |
| 645 | tor und/oder bend (Ring) | 746 | CH op bend |
| 665* | C-C-C ring ip bend | 999* | Phe, Ring breath. |
| 721 | C-S st gauche, G | 1046* | DNA sk |
| 762 | XR | 1126 | C-H ip bend |
| 829 | XR | 1192 | C-C st |
| 859* | extern. Gruppenmode | 1328 | XR, C-C |
| 932 | Proteine, Tyr: def(C-C-H) aliph., Tyr (Ring) | 1412 | CCH bend und C-C st |
| 1036* | DNA Gerüstschwingung | 1470 | CO und C-C st (Quinon) |
| 1055* | DNA/RNA, PO ²⁻ sym. | 1527 | A, C, G asym. COO ⁻ |
| 1082* | st (PO ²⁻), st(C-C), st(C-O-C), glykosid. | 1578 | A, C, G asym. COO ⁻ |
| 1139* | Pro | 1607 | extern. Gruppenmode |
| 1177 | C-C-H bend (H26,H28, H29, H30) | | |
| 1224 | C-O-C st XR | | |
| 1240 | extern. Gruppenmode, CO st | | |
| 1288 | XRS C-O-C st | | |
| 1316 | Phenoxidion st mit XR st | | |
| 1354 | XR st (XRS) | | |
| 1384* | Nukleotide, Proteine, Lipide, def(CH3) sym | | |
| 1522 | extern. Gruppenmode | | |
| 1579 | XR sk C-C st | | |
| 1607 | asym. COO ⁻ st, extern. Gruppenmode | | |

Tabelle 9.29: Zuordnungen der BSA-SAF-Konjugat-Moden und (*) zellulären Komponenten. Abkürzungen: bend: Biegeschwingung, breath: Atemschwingung, def: Deformationsschwingung, tor: Torsionsschwingung, st: Streckschwingung, γ : Deformationsschwingung aus der Ebene, β : Wasserstoff-Deformationsschwingung (in der Ebene), sk: Gerüstschwingung, sqz: Verdrängungsgruppe, wag: Schaukelschwingung, A: Adenin, G: Guanin, C: Cytosin, T: Thymin, Met: Methionin, Tyr: Tyrosin, Phe: Phenylalanin, Pro: Prolin.

| BSA-SAF (Au NP) | Zuordnungen | BSA-SAF (Ag NP) | Zuordnungen |
|-----------------|--|-----------------|---|
| 350 | tor XR | 498 | Ring def, CC C=N |
| 392* | bend C2N10 (Guanin) | 578 | Ring def, C-C, C-N |
| 408 | Xanthen Ring def | 600 | Ring def, C-C, C-N |
| 461 | extern. Gruppenmode | 634 | Ring def + C-H def |
| 488 | Ring def, CC C=N | 756 | CH def |
| 529 | Ring def, C-C, C-N | 909* | st(CC) |
| 551* | Def R6 (sqz C6N1C2N3C4C5), G | 963* | st(CC) |
| 595 | Ring def, C-C, C-N | 1087* | st(CN) |
| 630* | Ring def + C-H def | 1175* | Tyr + Phe |
| 653* | breath R6, def R5 (wag N7C8N9), G | 1233* | T, C, A, Ring st |
| 753 | CH def | 1260 | Ring def, st CC C-N |
| 788* | Def R6 (wag C4C5C6), G, Proteine, Tyr | 1327* | A/ Proteine: Ring st/ γ (CH ₂ , CH ₃) |
| 831* | def(CCH) aliphatic. Tyr (Ring) | 1373* | Nukleotide, Proteine, Lipide, def(CH ₃) sym. |
| 933 | CH ₃ def | 1408 | Ring st |
| 995* | Phe, Ring breath | 1450 | def(CH ₂) |
| 1026* | DNA sk | 1487* | Lipide, Proteine: def(CH ₂ , CH ₃) |
| 1133* | Pro | 1531* | A, C, G |
| 1153 | β (CH) | 1577* | Proteine, Amid II |
| 1222 | st (C-N-C) zentral. Ring + β (CH) | 1645* | Amid I |
| 1249 | Ring def, st CC C-N | | |
| 1325* | A/ Proteine: ring st / γ (CH ₂ , CH ₃) | | |
| 1385 | st(C-N) ring + st(C-C); β (CH)+ def(CNH) Aminogruppe | | |
| 1492 | Ring st | | |
| 1602* | Proteine, Phe, Tyr | | |
| 1636* | Nukleotide, Lipide, Proteine, (C=C) olefin. | | |

Tabelle 9.30: Zuordnungen der BSA-NB-Konjugat-Moden und (*) zellulären Komponenten. Abkürzungen: bend: Biegeschwingung, breath: Atemschwingung, def: Deformationsschwingung, tor: Torsionsschwingung, st: Streckschwingung, γ : Deformationsschwingung aus der Ebene, β : Wasserstoff-Deformationsschwingung (in der Ebene), ρ : Wasserstoff-Deformationsschwingung (außerhalb der Ebene), sk: Gerüstschwingung, sqz: Verdrängungsgruppe, A: Adenin, G: Guanin, C: Cytosin, T: Thymin, Met: Methionin, Tyr: Tyrosin, Phe: Phenylalanin.

| BSA-NB (Au NP) | Zuordnungen | BSA-NB (Ag NP) | Zuordnungen |
|----------------|---|----------------|---|
| 363 | for XR | 321 | for XR |
| 382* | bend C2N10(G) | 498 | Ring def, C-C C=N |
| 422 | Ring def, CC, C-N | 548* | Def R6 (sqz C6N1C2, N3C4C5), G |
| 439 | Ring def, CC, C-N | 573 | tor und/oder bend (Ring) |
| 479 | Ring def, CC, C-N | 592 | Ring def, C-C, C-N |
| 514 | Ring def, CC, C-N | 625* | Phe |
| 592 | Ring def, CC, C-N | 665 | Ring def |
| 621 | arom. bend | 703* | st(C-S) Met |
| 677 | Ring def | 750 | CH def |
| 800 | extern. Gruppenmode | 790* | $\rho(\text{NH}_3)$ |
| 867 | extern. Gruppenmode | 858* | Tyr |
| 1001* | Phe, Ring breath | 883 | extern. Gruppenmode |
| 1030* | DNA Gerüstschwingungen | 1132* | Pro |
| 1118* | st Proteine (CN) | 1357 | st(C=C) + st(C-N) central Ring + def(C-N-H) |
| 1159 | $\beta(\text{CH})$ | 1418 | Aminosäuren, def(CH ₃) asym., st(COO) |
| 1193 | st (C-N-C) central Ring + $\beta(\text{CH})$ | 1437 | Ring st |
| 1263* | T, C, A, Ring | 1493 | Ring st |
| 1312* | A/Proteine: Ring st/(CH ₂ , γ)(CH ₃) st(C=C) | 1540* | A, C, G |
| 1351 | st(C-N) Ring + def(CNH), Aminosäuren | 1641 | st(C=C) + st(C-N), Aminogruppe, def(NH ₂) |
| 1398* | def(CH ₃) asym., st(COO) | | |
| 1436 | Ring st | | |
| 1483 | Ring st | | |
| 1588* | Proteine, Phe, Tyr | | |
| 1639 | st(C=C) + st(CN), Aminogruppe, def(NH ₂) | | |

9.2 Abkürzungsverzeichnis

AO Acridinorange

BSA Bovines Serum Albumin

BSE Rückstreuelektronen

CM-Effekt Chemischer Verstärkungseffekt

CV Kristallviolett

DLS Dynamische Lichtstreuung

DTNB Dithionitbenzoesäure

EF Verstärkungsfaktor

ELISA Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest

EM-Effekt Elektromagnetischer Verstärkungseffekt

EPB erweiterten Plasmonenbande

FITC Fluoresceinisothiocyanat

FWHM Halbwertsbreite

HCA Hierarchische Clusteranalyse

K-Means K-Means Clusteranalyse

MALDI-TOF-MS Matrix-gestützte Flugzeit-Massenspektrometrie

MCR Multivariate Kurvenauflösung

NA Nanoaggregate

NAADP Nikotinsäureadenindinukleotidphosphat

2-NAT 2-Naphthalenthiole

NB Nilblau

NIR Nahinfrarot

NP Nanopartikel

OD optische Dichte

pABT para-Aminothiophenol

PCA Hauptkomponentenanalyse

PDI Polydispersionsindex

| | |
|-----------------------|---|
| PEG | Polyethylenglycol |
| PLSR | <i>Partial Least Square Regression</i> |
| pMBA | para-Mercaptobenzoessäure |
| RBITC | Rhodamin(B)isothiocyanat |
| SAF | Safranin O |
| SE | Sekundärelektronen |
| SEM | Rasterelektronenmikroskopie |
| SERS | oberflächenverstärkte Raman-Streuung |
| SERRS | oberflächenverstärkter resonanter Raman-Effekt |
| S-N-Verhältnis | Signal-Rausch-Verhältnis |
| TEAM | Transmission Electron Aberration-corrected Microscope |
| TEM | Transmissionselektronenmikroskopie |
| UV | ultravioletter Spektralbereich |
| UV/Vis | UV/Vis-Spektroskopie |
| VIS | sichtbarer Spektralbereich |

9.3 Lebenslauf

Name Andrea Isabel Matschulat

Geburtsdatum 21.07.1982

Geburtsort Berlin

Nationalität deutsch

Familienstand ledig

Ausbildung

10/2007-12/2010 **Dissertation**
„Entwicklung neuer Sonden für bioanalytische Anwendungen der oberflächenverstärkten Raman-Streuung“ betreut von Frau Prof. Kneipp

02/2007-09/2007 **Diplomarbeit**
„Mikroskopische Visualisierung von Au Nanopartikeln für die Medizin“ betreut von Herrn Prof. Eichler (TU Berlin)

04/2003-09/2007 **Studium**
der Physik an der Technischen Universität Berlin

06/1996-06/2002 **Abitur**
am Ulrich-von-Hutten Gymnasium in Berlin

9.4 Publikationsverzeichnis

Manuskripte

A. Matschulat, D. Drescher, J. Kneipp, Surface-Enhanced Raman Scattering Hybrid Nanoprobe Multiplexing and Imaging in Biological Systems, ACS Nano, **2010**, 4 (6), pp 3259–3269

V. Joseph, A. Matschulat, J. Polte, S. Rolf, F. Emmerling, J. Kneipp, SERS enhancement of individual gold nanospheres of defined size, *accepted*

Vorträge

A. Matschulat, D. Drescher, J. Kneipp, Multivariate analysis for surface-enhanced Raman scattering (SERS) probe multiplexing and imaging in biological matrices, DPG-Frühjahrstagung Section Condensed Matter, D-Regensburg, **2010**

J. Kneipp, V. Joseph, A. Matschulat, D. Drescher, 1-P and 2-P-excited SERS for biodiagnostic sensing, FTIR- Workshop: FTIR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics, D-Berlin, **2009**

A. Matschulat, F.-J. Schmitt, M. Schoengen, H. J. Eichler, Microscopical visualization of Gold- Nanoparticles for medical applications, DPG-Frühjahrstagung Section Condensed Matter, D-Berlin, **2008**

M. Schoengen, F.-J. Schmitt, A. Matschulat, H. J. Eichler, Combination of Atomic Force Microscopy with Time correlated fluorescence spectroscopy, DPG-Frühjahrstagung Section Condensed Matter, D-Berlin, **2008**

A. Matschulat, F.-J. Schmitt, C. Lochmann, H. J. Eichler, Photodynamische Diagnostik und Therapie- Marker in humanem Gewebe, Institutsseminar TU, D-Berlin, **2006**

Poster

A. Matschulat, D. Drescher, J. Kneipp, Multivariate analysis for SERS probe multiplexing and imaging in biological matrices, Tag der Chemie, D-Berlin, **2010**

A. Matschulat, D. Drescher, J. Kneipp, Multivariate analysis for surface-enhanced Raman scattering (SERS) probe multiplexing and imaging in biological matrices, DPG-Frühjahrstagung Section Condensed Matter, D-Regensburg, **2010**

A. Matschulat, I. Dörfel, J. Kneipp, New hybrid probes for NIR-SERS sensing, FTIR-Workshop: FTIR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics, D-Berlin, **2009**

D. Drescher, A. Matschulat, G. Orts-Gil, J. Kneipp, Combined intracellular SERS and cytotoxicity studies after uptake of silica nanoparticles, FTIR- Workshop: FTIR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics, D-Berlin, **2009**

A. Matschulat, D. Drescher, G. Orts-Gil, H. Kirmse, J. Kneipp, SERS hybrid probes as versatile tools for biological sensing, Jubiläumssymposium Licht-Materialien-Modelle, D-Berlin, **2009**

A. Matschulat, I. Dörfel, J. Kneipp, NIR-SERS probes for *in vitro* and *in vivo* bioanalytics, Tag der Chemie, D-Potsdam, **2009**

A. Matschulat, I. Dörfel, F. Emmerling, J. Kneipp, NIR-SERS probes for *in vitro* and *in vivo* bioanalytics, Anakon, D-Berlin, **2009**

A. Matschulat, I. Dörfel, J. Kneipp, NIR-SERS probes for *in vitro* and *in vivo* bioanalytics, GDCh- Doktorandentagung, D-Attendorn, **2009**

A. Matschulat, I. Dörfel, F. Emmerling, J. Kneipp, NIR SERS hybrid probes for *in vitro* and *in vivo* bioanalytics, DPG-Frühjahrstagung Section Condensed Matter, D-Dresden, **2009**

A. Matschulat, U. Panne, I. Dörfel, F. Emmerling, J. Kneipp, SERS-based optical probes for *in vitro* and *in vivo* bioanalytics, 21st International Conference on Raman Spectroscopy, Uk-London, **2008**

F.-J. Schmitt, A. Matschulat, M. Schoengen, K. Wache, J. Fuesers, H. J. Eichler, Combination of Microscopic Techniques and Time Resolved Fluorescence Spectroscopy for Biotechnological Applications, Seeing at the Nanoscale V, Santa Barbara, CA, USA, **2007**

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|--|----|
| 1.1 | Schematische Darstellung zum Konzept des in der Arbeit konstruierten SERS-Hybrid- <i>Labels</i> mit integrierten Zielfindungselementen (Antikörper) und Reportern. | 3 |
| 2.2 | Reaktionsschema zur Herstellung citratstabilisierter Ag Nanopartikel. Das Silbernitrat wird durch Trinatriumcitrat zu elementarem, kolloidalem Ag reduziert. | 4 |
| 2.3 | Schematische Darstellung zu den Grundprinzipien der dynamischen Lichtstreuung (Erläuterungen im Text). | 9 |
| 2.4 | Strahlengang bei einem TEM. Erläuterungen: siehe Text. | 10 |
| 2.5 | Raman-Streuung als inelastische Photonenstreuung mit Ausnahme von (b).(a) Termschema für die nicht-resonante Stokes-Strahlung. (b) Termschema zur Rayleigh-Strahlung als elastischer Streuprozess. (c) Anti-Stokes-Streuung. (d) Spektrallinien der drei Effekte beim Raman-Streuprozess. | 11 |
| 2.6 | Schematische Darstellung zu den Grundprinzipien des SERS-Effekts (Erläuterungen im Text). | 13 |
| 2.7 | links. Darstellung der Ursprungsmatrix X durch <i>Scores</i> T, <i>Loadings</i> P und spektrale Residuen E. rechts. Transformation der Ursprungskoordinaten in das neue Varianz-gewichtete Koordinatensystem X'. | 14 |
| 2.8 | Schematische Darstellung zum K-Means Algorithmus. I Drei Clusterzentren wurden zufällig gewählt. II Die durch Rechtecke repräsentierten Objekte (Datenpunkte) werden jeweils dem Cluster mit dem nächsten Clusterzentrum zugeordnet. III Die Zentren (jeweiligen Schwerpunkte) der Cluster werden neu berechnet. IV Die Objekte werden neu verteilt und erneut dem Cluster zugewiesen, dessen Zentrum am nächsten ist. | 16 |
| 2.9 | Prinzip der MALDI-TOF-MS Probenionisierung. | 17 |
| 3.10 | Experimenteller Aufbau zur Raman-Messung. S1-S7 Spiegel; ND Neutraldichtefilter; EF Kantenfilter; NF Notchfilter; ST Strahlteiler; G Gitter. | 20 |
| 3.11 | (I) Zwei verschiedene Au-Hybridsonden, die jeweils mit einer Art Reporter-Molekül inkubiert wurden. (II) Schema zur Durchführung der Inkubation zweier verschiedener SERS-Hybridsonden in 3T3-Zellen. | 26 |
| 4.12 | links. UV/Vis-Spektren der unterschiedlich hergestellten Au Nanopartikel. rechts. DLS-Spektren der Au Nanopartikel. | 35 |
| 4.13 | links. UV/Vis-Spektren der unterschiedlich hergestellten Ag Nanopartikel. rechts. DLS-Spektren der Ag Nanopartikel. | 36 |
| 4.14 | (a) Theoretisch berechnetes und (b) experimentell ermitteltes Raman-Spektrum von polykristallinem Adenin nach Giese [151]. (c) SERS-Spektrum einer 10^{-5} M Adenininlösung, die an Ag NP gemessen wurde. Anregungswellenlänge: 632 nm; Laserleistung: 4 mW; Akkumulationszeit: 10 s. | 39 |
| 4.15 | SERS-Spektren von 10^{-5} M Adenin an verschiedenen Au Nanopartikeln (A-J) und Ag Nanopartikeln (a-e). Anregungswellenlänge: 785 nm; Anregungsintensität: $8 \cdot 10^4$ W/cm ² ; Akkumulationszeit: 1 s. | 40 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.16 | Relative SERS-Intensitäten der Ring-Atemschwingung bei $\sim 735 \text{ cm}^{-1}$, die mit den unterschiedlich hergestellten Au Nanopartikeln bestimmt wurden. | 42 |
| 4.17 | Relative SERS-Intensitäten der Ring-Atemschwingung bei $\sim 735 \text{ cm}^{-1}$, die mit den unterschiedlich hergestellten Au Nanoaggregaten (induziert durch 10 mM NaCl) bestimmt wurden. | 43 |
| 4.18 | Relative SERS-Intensitäten der Ring-Atemschwingung bei $\sim 735 \text{ cm}^{-1}$, die mit den unterschiedlich hergestellten Au Nanoaggregaten (induziert durch 100 mM NaCl) bestimmt wurden. | 43 |
| 4.19 | (Relative SERS-Intensitäten der Ring-Atemschwingung bei $\sim 735 \text{ cm}^{-1}$, die mit den unterschiedlich hergestellten Ag Nanoaggregaten (induziert durch 100 mM NaCl) bestimmt wurden. | 44 |
| 4.20 | UV/Vis-Spektren der Au NP (links) und UV/Vis-Spektren der Ag NP (rechts) bei verschiedenen Salzkonzentrationen. | 45 |
| 4.21 | UV/Vis-Spektren der Au NP (links) und UV/Vis-Spektren der Ag NP (rechts) in verschiedenen Puffern. | 45 |
| 4.22 | SERS-Spektren von Adenin (10^{-5} M) an Au NP (links) und Ag NP (rechts). (a)-(d): ohne NaCl, mit 10, 30, und 100 mM NaCl für Au NP und (a')-(b'): ohne NaCl, mit 10 mM NaCl, 30 mM NaCl und 100 mM NaCl für Ag NP. Anregungswellenlänge: 785 nm. Anregungsintensität: $8 \cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$. Akkumulationszeit: 1 s. | 46 |
| 4.23 | Relative SERS-Intensitäten der Ring-Atemschwingung bei $\sim 735 \text{ cm}^{-1}$, die mit den beiden ausgewählten Au und Ag Nanopartikellösungen bei verschiedenen NaCl- und Adeninkonzentrationen bestimmt wurden. | 46 |
| 4.24 | oben. TEM-Aufnahme und Histogramm der Au NP-Größen. unten. TEM-Aufnahme und Histogramm der Ag NP-Größen. Beschleunigungsspannung: 200 kV. | 47 |
| 5.25 | Strukturformeln der Reporter Moleküle. <i>p</i> ABT: <i>para</i> -Aminothiophenol. 2-NAT: 2-NaphthalenthioI. RBITC: Rhodamin(B)isothiocyanat. CV: Kristallviolett. NB: Nilblau. AO: Acridinorange. SAF: Safranin O. FITC: Fluoresceinisothiocyanat. <i>p</i> MBA: <i>para</i> -Mercaptobenzoesäure. DTNB: Dithionitrobenzoesäure. | 51 |
| 5.26 | Extinktionsspektren der untersuchten Reportermoleküle. Die Reporter wurden bei einer Konzentration von $c \sim 10^{-5} \text{ M}$ untersucht. | 51 |
| 5.27 | Extinktionsspektren der mit Raman-Reportern ($c \sim 10^{-5} \text{ M}$) inkubierten Au NP (links) und Ag NP (rechts). | 52 |
| 5.28 | links. Reportersignaturen in Gegenwart von Au NP. rechts. Reportersignaturen in Gegenwart von Ag NP. Anregungswellenlänge: 785 nm. Anregungsintensität: $8 \cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$. Akkumulationszeit: 1 s. Die für die chemische Analyse (siehe Abschn. 5.2) ausgewählten Banden sind gelb hervorgehoben. | 54 |
| 5.29 | Gemittelte relative Signalintensitäten bei unterschiedlichen Reporter-Konzentrationen: 10^{-5} M (A), 10^{-6} M (B), 10^{-7} M (C) auf Au NP/NA und (a)-(c) auf Ag NP/NA. | 60 |
| 5.30 | PCA der ersten acht PCA-Scores mit 433 Spektren der acht Reporter-Moleküle <i>p</i> ABT, 2-NAT, RBITC, CV, <i>p</i> MBA, NB, AO und SAF untersucht an Au Nanopartikeln. | 67 |

| | | |
|------|--|----|
| 5.31 | Aus der PCA ermittelte <i>Loadingsspektren</i> der acht Hauptkomponenten für Au NP. | 68 |
| 5.32 | PCA der ersten acht PCA-Scores mit 387 Spektren der acht Reporter-Moleküle <i>p</i> ABT, 2-NAT, RBITC, CV, <i>p</i> MBA, NB, AO und SAF untersucht an Ag Nanopartikeln. | 69 |
| 5.33 | Aus der PCA ermittelte <i>Loadingsspektren</i> der acht Hauptkomponenten für Ag NP. | 70 |
| 5.34 | Hierarchische Clusteranalyse der acht Reporter (bei Au NP). | 72 |
| 5.35 | Hierarchische Clusteranalyse der acht Reporter (bei Ag NP). | 72 |
| 5.36 | (A) SERS-Spektrum von <i>p</i> MBA sowie Reporter-Mischspektren (B) <i>p</i> MBA/ <i>p</i> ABT, (C) <i>p</i> MBA/2-NAT, (D) <i>p</i> MBA/RBITC, (E) <i>p</i> MBA/CV, (F) <i>p</i> MBA/NB, (G) <i>p</i> MBA/AO und (H) <i>p</i> MBA/SAF, die an Au NP untersucht wurden. Anregungswellenlänge: 785 nm. Akkumulationszeit: 1 s. | 74 |
| 5.37 | PCA der Mischspektren (A) <i>p</i> MBA/ <i>p</i> ABT, (B) <i>p</i> MBA/2-NAT, (C) <i>p</i> MBA/RBITC, (D) <i>p</i> MBA/CV, (E) <i>p</i> MBA/NB, (F) <i>p</i> MBA/AO und (G) <i>p</i> MBA/SAF. Die Analyse fand im Spektralbereich 300-1700 cm^{-1} statt. | 75 |
| 5.38 | Berechnete MCR-Komponenten aus den Reporter-Mischspektren für Au NP (A) <i>p</i> MBA/ <i>p</i> ABT, (B) <i>p</i> MBA/2-NAT, (C) <i>p</i> MBA/RBITC, (D) <i>p</i> MBA/CV, (E) <i>p</i> MBA/NB, (F) <i>p</i> MBA/AO Anregungswellenlänge: 785 nm. Anregungsintensität: $8 \cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$. Akkumulationszeit: 1 s. | 76 |
| 5.39 | Berechnete MCR-Komponenten aus den Reporter-Mischspektren für Au NP (G) <i>p</i> MBA/SAF. (H) Ergebnisse der MCR unter Einbeziehung des NB-Reinspektrums. Anregungswellenlänge: 785 nm. Anregungsintensität: $8 \cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$. Akkumulationszeit: 1 s. | 77 |
| 5.40 | (I) Hellfeld-Aufnahmen, (II) Chemische Kartierungen, (III) HCA und (IV) K-Means Cluster-Kartierung der drei untersuchten 3T3-Zellen (Kartierungsgrößen (von oben nach unten): 21×18 Spektren, 23×21 Spektren und 24×23 Spektren). Skalierung von I: 4 μm . Die Bilder in II wurden generiert durch eine Überlagerung zweier Bilder, basierend auf der Intensität der C-C-Streckschwingung von <i>p</i> ABT bei $\sim 1585 \text{ cm}^{-1}$ (blaue Skala) und bei der Ring-Streckschwingung (1380 cm^{-1}) von 2-NAT (rote Skala). Alle Bandenintensitäten wurden normalisiert zwischen dem niedrigsten (0) und höchsten Farbwert (1). Multivariate Cluster-Kartierungen (III und IV) basieren auf drei Klassen, die spektrale Information im Bereich 300-1700 cm^{-1} enthalten. Aus den Spektren wurde die erste Ableitung gebildet und diese dann vektornormalisiert. Das Distanzmaß für die HCA war die Euklidische Distanz unter Implementierung des Wards Algorithmus. Die Klassen A, B und C im letzten Bild (Reihe IV) enthalten Signaturen wie sie in Abb. 5.41 repräsentativ dargestellt sind. | 81 |

| | | |
|------|--|----|
| 5.41 | SERS-Spektren für die drei Klassen, die mittels K-Means-Analyse identifiziert wurden (siehe Bezeichnungen in Abb. 5.40 IV, letzte Reihe): (A) Spektrum ohne SERS-Signale, erhalten an einer Position, wo keine Nanosonden waren. (B) Spektrum, das SERS-Signale von <i>p</i> ABT (★) und zellulären Molekülen enthält. (C) Spektrum mit SERS-Signaturen beider Reporter <i>p</i> ABT (★) und 2-NAT (◆). Anregungswellenlänge: 785 nm. Anregungsintensität: $8 \cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$. Akkumulationszeit: 1 s. | 82 |
| 5.42 | PCA-Kartierung (erstellt aus den Scores) einer 3T3-Zelle im SERS-Experiment mit <i>p</i> ABT- und 2-NAT-Hybridsonden (links) sowie die korrespondierenden <i>Loadingsspektren</i> (rechts) für vier Hauptkomponenten. Der Datensatz zur Erstellung der PCA-Kartierung bestand aus 552 Spektren (vgl. Abb. 5.40). | 83 |
| 5.43 | Untersuchungen der pH-Sensitivität von <i>p</i> ABT an (A) Au NA und (B) Ag NA. Die pH-Kalibrierkurven von <i>p</i> ABT an Au NA zeigt (a), für Ag NA (b). Anregungswellenlänge: 785 nm. Akkumulationszeit: 1 s. | 87 |
| 5.44 | Untersuchungen der pH-Sensitivität von <i>p</i> ABT-Ag NA (A-C) in drei individuellen 3T3-Zellen. Die pH-Kartierungen A (21×17 Matrix), B (21×15 Matrix) und C (22×14 Matrix) wurden jeweils aus den pH-Kalibrierkurven von <i>p</i> ABT auf Ag NA (a) bzw. für Kartierung D (20×12 Matrix) aus der Kalibrierkurve von Au NA (b) erstellt (Größenbalken: 2,5 μm). Anregungswellenlänge: 785 nm. Akkumulationszeit: 1 s. | 88 |
| 5.45 | Untersuchungen der pH-Sensitivität von NB an Au NA. Die pH-Kalibrierkurven von NB an Au NA sind für die Bandenverhältnisse (a) 592/482, (b) 1641/483 und (c) 1641/1490 berechnet worden. Anregungswellenlänge: 785 nm. Akkumulationszeit: 1 s. | 89 |
| 5.46 | Untersuchungen der pH-Sensitivität von FITC an Ag NA. Die pH-Kalibrierkurven von FITC an Ag NA sind für die Bandenverhältnisse (a) 1182/767, (b) 1325/1602 und (c) 1182/1602 berechnet worden. Anregungswellenlänge: 785 nm. Akkumulationszeit: 1 s. | 90 |
| 6.47 | Strukturformeln der für die Kopplung verwendeten Reporter-Moleküle. Diese lassen sich in fünf Klassen unterteilen: Xanthen-Farbstoffe (Rhodamin(B)isothiocyanat (RBITC) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC)), Phenoxazin-Farbstoff Nilblau (NB), Acridin-Farbstoff Acridinorange (AO) und Phenazin-Farbstoff Safranin (SAF) sowie das <i>p</i> -Aminothiophenol (<i>p</i> ABT), das kein Fluorophor ist. | 94 |
| 6.48 | Extinktionsspektren der BSA-Reporter-Konjugate, Reporter und BSA (10^{-7} M) im Vergleich. (A) AO, BSA und BSA-AO, (B) RBITC, BSA und BSA-RBITC, (C) FITC, BSA und BSA-FITC, (D) SAF, BSA und BSA-SAF, (E) NB, BSA und BSA-NB und (F) <i>p</i> ABT, BSA und BSA- <i>p</i> ABT. | 95 |

- 6.49 MALDI-Spektren der beiden ungekoppelten BSA-Standards (a,b) sowie der BSA-Reporter-Konjugate BSA-AO (c), BSA-RBITC (d), BSA-FITC (e), BSA-SAF (f), BSA-NB (g) und BSA-*p*ABT (h). Der für die Bestimmung der Kopplungsdichte betrachtete Hauptpeak ist jeweils vergrößert dargestellt und zeigt die Lorentzkurven der Fitprozedur. UV-Laser: 337 nm. Pulslänge: 3 nm. Beschleunigungsspannung: 20 kV. Massenbereich: 10000-140000 m/z. 99
- 6.50 (A) Acridinorange (10^{-5} M) in Gegenwart von Au NA. (B) BSA-Acridinorange-Konjugat bei 785 nm Anregung. (C) BSA-Acridinorange-Konjugat bei 633 nm Anregung. (D) BSA-Acridinorange-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm Anregung. (a) Acridinorange (10^{-5} M) in Gegenwart von Ag NA. (b) BSA-Acridinorange-Konjugat bei 785 nm und (c) BSA-Acridinorange-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm. Inkubationszeit der Konjugate in Zellen: 3 h. Akkumulationszeit: 1 s. 101
- 6.51 (A) RBITC (10^{-5} M) in Gegenwart von Au NA. (B) BSA-RBITC-Konjugat bei 785 nm Anregung. (C) BSA-RBITC-Konjugat bei 633 nm Anregung. (D) BSA-RBITC-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm Anregung. (a) RBITC (10^{-5} M) in Gegenwart von Ag NA. (b) BSA-RBITC-Konjugat bei 785 nm. (c) BSA-RBITC-Konjugat bei 633 nm und (d) BSA-RBITC-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm. Inkubationszeit der Konjugate in Zellen: 3 h. Akkumulationszeit: 1 s. 103
- 6.52 (A) FITC (10^{-5} M) in Gegenwart von Au NA bei 785 nm. (B) FITC bei 633 nm Anregung. (C) BSA-FITC-Konjugat bei 633 nm Anregung. (D) BSA-FITC-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm Anregung. (a) FITC (10^{-5} M) in Gegenwart von Ag NA. (b) BSA-FITC-Konjugat bei 785 nm. (c) BSA-FITC-Konjugat in 3T3-Zellen bei 633 nm. Inkubationszeit der Konjugate in Zellen: 3 h. Akkumulationszeit: 1 s. 105
- 6.53 (A) SAF (10^{-5} M) in Gegenwart von Au NA bei 785 nm. (B) BSA-SAF-Konjugat bei 785 nm Anregung. (C) BSA-SAF-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm Anregung. (a) SAF (10^{-5} M) in Gegenwart von Ag NA. (b) BSA-SAF-Konjugat bei 785 nm. (c) BSA-SAF-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm. Inkubationszeit der Konjugate in Zellen: 3 h. Akkumulationszeit: 1 s. 106
- 6.54 (A) NB (10^{-6} M) in Gegenwart von Au NA bei 785 nm. (B) BSA-NB-Konjugat bei 785 nm Anregung. (C) BSA-NB-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm Anregung. (a) NB (10^{-6} M) in Gegenwart von Ag NA. (b) BSA-NB-Konjugat bei 785 nm. (c) BSA-NB-Konjugat in 3T3-Zellen bei 785 nm. Inkubationszeit der Konjugate in Zellen: 3 h. Akkumulationszeit: 1 s. . . . 107

6.55 NIR-SERS Au-Hybridsonden in 3T3-Zellen (Inkubationszeit: 3 h). I Mikroskop-Hellfeld-Aufnahmen der Konjugate BSA-AO (6 μm -Balken), BSA-RBITC (6 μm -Balken), BSA-FITC (4 μm -Balken), BSA-SAF (4 μm -Balken) und BSA-NB (6 μm -Balken). II Chemische Kartierungen mit normierter Intensität der Hauptbande im jeweiligen Konjugat: BSA-AO (23 \times 24 Spektren), BSA-RBITC (12 \times 26 Spektren), BSA-FITC (19 \times 15 Spektren), BSA-SAF (19 \times 15 Spektren) und BSA-NB (16 \times 24 Spektren). III HCA-Kartierungen. IV K-Means-Cluster-Kartierungen. Anregungswellenlänge: 785 nm. Anregungsintensität: $8\cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$. Akkumulationszeit: 1 s. 109

6.56 NIR-SERS Au-Mischhybridsonden (BSA-AO und BSA-NB) inkubiert mit einer 3T3-Zelle (Inkubationszeit: 3 h, (6 μm -Balken)). I Hellfeld-Aufnahme einer 3T3-Zelle. II Chemische Kartierung des Spektralbereichs von 300-1700 cm^{-1} . III HCA-Kartierung (17 \times 20 Spektren). IV K-Means-Cluster-Kartierung. Anregungswellenlänge: 785 nm. Anregungsintensität: $8\cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$ (785 nm). Akkumulationszeit: 1 s. Die Spektren der Klasse 1 (grün) liefern Anteile von NB-Banden nebst zellulärer Komponenten. Klasse 2 (blau) enthält SERS-Spektren, die eine Bande bei $\sim 999 \text{ cm}^{-1}$ liefern, die jedoch dem spektralen Untergrund zugeordnet werden kann. Klasse 3 (rot) enthält Signaturen, die sowohl NB, AO (\star) als auch zelluläre Komponenten (\bullet) zeigen. 110

6.57 PCA-Kartierung einer 3T3-Zelle (17 \times 20 Spektren), die mit BSA-NB und BSA-AO Au-Hybridsonden inkubiert wurde (links). Die Präparation erfolgte dabei wie in Abschn. 5.5.1. Die dazugehörigen *Loadingspektren* sind für die ersten vier Hauptkomponenten dargestellt (rechts). Die Kartierung wurde aus 340 Spektren erstellt. 111

6.58 Schematische Darstellung des durchgeführten direkten ELISA am BSA-Antikörper-Konjugat bzw. BSA-RBITC-Antikörper-Konjugat. Als Antigen wurde ein HRP-markierter monoklonaler Antikörper gewählt. Neben einer Detektion mittels UV/Vis lässt sich das umgesetzte TMB mit Hilfe von SERS detektieren. 113

6.59 SERS-Spektrum von TMB^{2+} im BSA-RBITC-Antikörper-Konjugat (1:1000-Verdünnung) in Gegenwart von Au Nanoaggregaten. Anregungswellenlänge: 633 nm. Anregungsintensität: $3\cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$. Akkumulationszeit: 1 s. 116

6.60 (A) SERS-Spektrum von RBITC auf Au NA. (B) SERS-Spektrum des BSA-Reporter-Antikörper-Konjugats auf Au NA. (C) SERS-Spektrum von RBITC auf Ag NA. (D) SERS-Spektrum des BSA-Reporter-Antikörper-Konjugats auf Ag NA. Anregungswellenlänge: 785 nm. Anregungsintensität: $8\cdot 10^4 \text{ W/cm}^2$. Akkumulationszeit: 1 s. 117

Tabellenverzeichnis

| | | |
|------|---|-----|
| 3.1 | Synthesevorschriften zur Herstellung von Au Nanopartikeln sowie der dafür benötigte molare Überschuss (X) an Citrat. | 21 |
| 3.2 | Synthesevorschriften zur Herstellung von Ag Nanopartikeln sowie der dafür benötigte molare Überschuss (X) an Citrat. | 21 |
| 4.3 | Charakteristika (aus ^a UV/Vis und ^b DLS) der unterschiedlich hergestellten Au Nanopartikelsuspensionen. Parameter: λ_{max} = Position des Extinktionsmaximums. FWHM= Halbwertsbreite. d_H = Hydrodynamischer Durchmesser. PDI= Polydispersionsindex. I_{SERS} = rel. SERS-Signalintensität. | 37 |
| 4.4 | Charakteristika (aus ^a UV/Vis und ^b DLS) der unterschiedlich hergestellten Ag Nanopartikelsuspensionen. Parameter: λ_{max} = Position des Extinktionsmaximums. FWHM= Halbwertsbreite. d_H = Hydrodynamischer Durchmesser. PDI= Polydispersionsindex. I_{SERS} = rel. SERS-Signalintensität. | 37 |
| 4.5 | Adenin-Moden und deren Zuordnungen. bend: Biegeschwingung; wag: Kippschwingung; breath: Atemschiwingung; def: Deformationsschiwingung; rock: Schaukelschiwingung; sciss: Scherenschiwingung; st: Streckschwiwingung; sqz group: Verdrängungsgruppe. tor: Torsionsschiwingung. | 41 |
| 5.6 | Charakteristische Bandenverhältnisse, die aus den SERS-Spektren von neun Reporter-Molekülen mit Au NP gewählt wurden. Diese Parameter wurden für die chemische Identifizierung des jeweiligen Reporters verwendet. | 63 |
| 5.7 | Charakteristische Bandenverhältnisse, die aus den SERS-Spektren von neun Reporter-Molekülen mit Ag NP gewählt wurden. Diese Parameter wurden für die chemische Identifizierung des jeweiligen Reporters verwendet. | 63 |
| 5.8 | Ausgabe-Parameter der PCA der Reporter-Signaturen an Au (links) und an Ag NP (rechts). | 71 |
| 5.9 | Übersicht zur Präparation binärer Mischsonden, die in zwei separaten Schritten hergestellt wurden (siehe Abschn. 3.5). | 73 |
| 5.10 | Ausgabe-Parameter der MCR. | 78 |
| 6.11 | Kopplungsdichten der verschiedenen BSA-Reporter-Konjugate. | 98 |
| 6.12 | Prozentualer Anteil modifizierter Residuen M [%] für die verschiedenen BSA-Konjugate. | 98 |
| 6.13 | Parameter der Lorentz-Fit-Prozedur zur Bestimmung der Kopplungsdichten: Area=Peakfläche, Center=Peakzentrum, Width=Halbwertsbreite FWHM, Height=Peak-Höhe. Ungekoppelte BSA-Standards (a,b), BSA-Reporter-Konjugate BSA-AO (c), BSA-RBITC (d), BSA-FITC (e), BSA-SAF (f), BSA-NB (g) und BSA-pABT (h). | 100 |
| 6.14 | OD- Werte des direkten ELISA zum Kopplungsnachweis des Sekundärantikörpers ans BSA. Aufgetragen sind zusätzlich die Negativ-Kontrollen (BSA) und Positiv-Kontrollen (Ziege-Anti-Maus-Antikörper). | 114 |
| 6.15 | OD- Werte des direkten ELISA zum Kopplungsnachweis des Sekundärantikörpers ans BSA-RBITC-Konjugat. | 114 |

| | | |
|------|--|-----|
| 9.16 | <i>p</i> ABT-Moden und deren Zuordnungen nach [58, 173, 178–180, 311–316]. Abkürzungen: δ : Deformationsschwingung. γ : Deformationsschwingung aus der Ebene. ν : Valenzschwingung (Streckschwingung). π : Wippschwin- gung. | 125 |
| 9.17 | 2-NAT-Moden und deren Zuordnungen nach [181, 317, 318]. Abkürzun- gen: bend: Biegeschwingung. def: Deformationsschwingung. st: Streck- schwingung. twist: Drehschwingung. wag: Schaukelschwingung. | 126 |
| 9.18 | RBITC-Moden und deren Zuordnungen nach [184–187, 203, 319]. Abkür- zungen: bend: Biegeschwingung. sk: Gerüstschwingung. st: Streckschwin- gung. tor: Drehschwingung. | 127 |
| 9.19 | CV-Moden und deren Zuordnungen nach [175, 320, 321]. Abkürzungen: bend: Biegeschwingung. sk: Gerüstschwingung. st: Streckschwingung. . . . | 128 |
| 9.20 | <i>p</i> MBA-Moden und deren Zuordnungen nach [44, 189, 190, 248]. Abkür- zungen: δ : Deformationsschwingung. γ : Deformationsschwingung aus der Ebene. ν : Valenzschwingung (Streckschwingung). π : Wippschwingung. . . . | 129 |
| 9.21 | NB-Moden und deren Zuordnungen nach [200, 322, 323]. Abkürzungen: β : Wasserstoff-Deformationsschwingung (in der Ebene). δ : Deformati- onsschwingung. γ : Gerüst-/Deformationsschwingung (in der Ebene). ρ : Wasserstoff-Deformationsschwingung (außerhalb der Ebene). κ : Gerüst- /Deformationsschwingung (außerhalb der Ebene). σ : Streckschwingung. . . . | 130 |
| 9.22 | AO-Moden und deren Zuordnungen nach [197–199, 324–327]. Abkürzun- gen: def: Deformationsschwingung. st: Streckschwingung. | 131 |
| 9.23 | SAF-Moden und deren Zuordnungen nach [200, 201, 328]. Abkürzungen: δ : Deformationsschwingung. ip: in der Ebene. γ : Deformationsschwingung aus der Ebene. ν : Streckschwingung. | 132 |
| 9.24 | DTNB-Moden und deren Zuordnungen nach [34, 172, 329]. Abkürzungen: δ : Deformationsschwingung. γ : Deformationsschwingung aus der Ebene. ν : Valenzschwingung (Streckschwingung). | 133 |
| 9.25 | FITC-Moden und deren Zuordnungen nach [184–187, 203, 319]. Ab- kürzungen: bend: Biegeschwingung. tor: Torsionsschwingung. st: Streck- schwingung. sk: Gerüstschwingung. | 134 |
| 9.26 | Zuordnungen der BSA-AO-Konjugat-Moden und (*) zellulären Kompo- nenten. Abkürzungen: bend: Biegeschwingung. def: Deformationsschwin- gung. tor: Torsionsschwingung. st: Streckschwingung. wag: Schaukel- schwingung. sciss: Scherenschwingung. T: Thymin. A: Adenin. G: Guanin. C: Cytosin. Met: Metionin. Pro: Prolin. Trp: Tryptophan. | 135 |
| 9.27 | Zuordnungen der BSA-RBITC-Konjugat-Moden und (*) zellulären Kom- ponenten. Abkürzungen: bend: Biegeschwingung. ip: in der Ebene. op: außerhalb der Ebene. breath: Atemschiwingung. def: Deformationsschwin- gung. γ : Deformationsschwingung aus der Ebene. tor: Torsionsschwin- gung. st: Streckschwingung. wag: Schaukelschwingung. sk: Gerüstschwin- gung. A: Adenin. G: Guanin. C: Cytosin. Met: Metionin. Tyr: Tyrosin. Phe: Phenylalanin. | 136 |

| | | |
|------|--|-----|
| 9.28 | Zuordnungen der BSA-FITC-Konjugat-Moden und (*) zellulären Komponenten. Abkürzungen: bend: Biegeschwingung. ip: in der Ebene. op: außerhalb der Ebene. breath: Atemschwingung. def: Deformationsschwingung. tor: Torsionsschwingung. st: Streckschwingung. sk: Gerüstschwingung. XRD: Xanthen-Ring-Deformationsschwingung. A: Adenin. G: Guanin. C: Cytosin. Met: Metionin. Tyr: Tyrosin. Phe: Phenylalanin. Pro: Prolin. | 137 |
| 9.29 | Zuordnungen der BSA-SAF-Konjugat-Moden und (*) zellulären Komponenten. Abkürzungen: bend: Biegeschwingung. breath: Atemschwingung. def: Deformationsschwingung. tor: Torsionsschwingung. st: Streckschwingung. γ : Deformationsschwingung aus der Ebene. β : Wasserstoff-Deformationsschwingung (in der Ebene). sk: Gerüstschwingung. sqz: Verdrängungsgruppe. wag: Schaukelschwingung. A: Adenin. G: Guanin. C: Cytosin. T: Thymin. Met: Metionin. Tyr: Tyrosin. Phe: Phenylalanin. Pro: Prolin. | 138 |
| 9.30 | Zuordnungen der BSA-NB-Konjugat-Moden und (*) zellulären Komponenten. Abkürzungen: bend: Biegeschwingung. breath: Atemschwingung. def: Deformationsschwingung. tor: Torsionsschwingung. st: Streckschwingung. γ : Deformationsschwingung aus der Ebene. β : Wasserstoff-Deformationsschwingung (in der Ebene). ρ : Wasserstoff-Deformationsschwingung (außerhalb der Ebene). sk: Gerüstschwingung. sqz: Verdrängungsgruppe. A: Adenin. G: Guanin. C: Cytosin. T: Thymin. Met: Metionin. Tyr: Tyrosin. Phe: Phenylalanin. | 139 |

Literatur

- [1] J. A. Creighton. Surface raman electromagnetic enhancement factors for molecules at the surface of small isolated metal spheres - the determination of adsorbate orientation from sers relative intensities. *Surface Science*, 124(1):209–219, 1983.
- [2] J. A. Creighton, C. G. Blatchford, and M. G. Albrecht. Plasma resonance enhancement of raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 75:790–798, 1979.
- [3] D. L. Jeanmaire and R. P. Van Duyne. Surface raman spectroelectrochemistry: Part i. heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 84(1):1–20, 1977.
- [4] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, , and M.S. Feld. Surface-enhanced raman scattering and biophysics. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 14:R597–R624, 2002.
- [5] M. V. Canameres, C. Chenal, R. L. Birke, and J. R. Lombardi. Dft, sers, and single-molecule sers of crystal violet. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(51):20295–20300, 2008.
- [6] J. P. Smith. Medical and biological sensors: a technical and commercial review. *Sensor Review*, 25(4):241–245, 2005.
- [7] C. Rodger, W. E. Smith, G. Dent, and M. Edmondson. Surface-enhanced resonance-raman scattering: An informative probe of surfaces. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, (5):791–799, 1996.
- [8] J. Kneipp, H. Kneipp, B. Wittig, and K. Kneipp. Novel optical nanosensors for probing and imaging live cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2):214–226, 2010.
- [9] J. Kneipp, H. Kneipp, B. Wittig, and K. Kneipp. Following the dynamics of ph in endosomes of live cells with sers nanosensors. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(16):7421–7426, 2010.
- [10] T. Cotton. Application of surface-enhanced raman spectroscopy to biological systems. *Journal of Raman Spectroscopy*, 22:729–742, 1991.
- [11] I. Chourpa, F. H. Lei, P. Dubois, M. Manfait, and G. D. Sockalingum. Intracellular applications of analytical sers spectroscopy and multispectral imaging. *Chemical Society Reviews*, 37(5):993–1000, 2008.
- [12] C. Krafft, T. Knetschke, R. H. W. Funk, and R. Salzer. Studies on stress-induced changes at the subcellular level by raman microspectroscopic mapping. *Analytical Chemistry*, 78(13):4424–4429, 2006.

-
- [13] B. H. Jun, M. S. Noh, J. Kim, G. Kim, H. Kang, M. S. Kim, Y. T. Seo, J. Baek, J. H. Kim, J. Park, S. Kim, Y. K. Kim, T. Hyeon, M. H. Cho, D. H. Jeong, and Y. S. Lee. Multifunctional silver-embedded magnetic nanoparticles as sers nanoprobe and their applications. *Small*, 6(1):119–125, 2010.
- [14] K. L. Rule and P. J. Vikesland. Surface-enhanced resonance raman spectroscopy for the rapid detection of cryptosporidium parvum and giardia lamblia. *Environmental Science and Technology*, 43(4):1147–1152, 2009.
- [15] X. M. Qian, X. H. Peng, D. O. Ansari, Q. Yin-Goen, G. Z. Chen, D. M. Shin, L. Yang, A. N. Young, M. D. Wang, and S. M. Nie. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced raman nanoparticle tags. *Nature biotechnology*, 26(1):83–90, 2008.
- [16] J. P. Scaffidi, M. K. Gregas, V. Seewaldt, and T. Vo-Dinh. Sers-based plasmonic nanobiosensing in single living cells. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 393:1135–1141, 2009.
- [17] M. Roca and A. J. Haes. Probing cells with noble metal nanoparticle aggregates. *Nanomedicine*, 3(4):555–565, 2008.
- [18] I. Nabiev, I. Chourpa, and M. Manfait. Selective analysis of antitumor drug interaction with living cancer cells as probed by surface-enhanced raman spectroscopy. *European Biophysics Journal*, 19:311–316, 1991.
- [19] F. Katsumasa, I. Sawako, K. Hamada, N. I. Smith, A. Taguchi, Y. Inouye, and S. Kawata. Time-resolved observation of surface-enhanced raman scattering from gold nanoparticles during transport through a living cell. *Journal of Biomedical Optics*, 14(2):024038, 2009.
- [20] R. J. Dijkstra, W. J. J. M. Scheenen, N. Dam, E. W. Roubos, and J. J. ter Meulen. Monitoring neurotransmitter release using surface-enhanced raman spectroscopy. *Journal of Neuroscience Methods*, 159(1):43–50, 2007.
- [21] C. M. Shachaf, S. V. Elchuri, A. L. Koh, J. Zhu., L. N. Nguyen, D. J. Mitchell, K. B. Swartz, L. Sun, S. Chan, R. Sinclair, and G. P. Nolan. A novel method for detection of phosphorylation in single cells by surface enhanced raman scattering (sers) using composite organic-inorganic nanoparticles. *PLoS One*, 4(4):e5206–e5206, 2009.
- [22] E. A. Vitol, E. Brailoiu, Z. Orynbayeva, N. J. Dun, G. Friedman, and Y. Gogotsi. Surface-enhanced raman spectroscopy as a tool for detecting ca^{2+} mobilizing second messengers in cell extracts. *Analytical Chemistry*, 82(16):6770–6774, 2010.
- [23] S. Lee, S. Kim, J. Choo, S. Y. Shin, Y. H. Lee, H. Y. Choi, S. Ha, K. Kang, and C. H. Oh. Biological imaging of hek293 cells expressing plec1 using surface-enhanced raman microscopy. *Analytical Chemistry*, 79:916–922, 2007.

- [24] M. Sanles-Sobrido, W. Exner, L. Rodriguez-Lorenzo, B. Rodriguez-González, M. A. Correa-Duarte, R. A. Alvarez-Puebla, and L. M. Liz-Marzán. Design of sers-encoded, submicron, hollow particles through confined growth of encapsulated metal nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 131(7):2699–2705, 2009.
- [25] A. G. Tkachenko, H. Xie, D. Coleman, W. R. Glomm, J. Ryan, M. F. Anderson, S. Franzen, and D. L. Feldheim. Multifunctional gold nanoparticle-peptide complexes for nuclear targeting. *Journal of the American Chemical Society*, 125(16):4700–4701, 2003.
- [26] W. Xie, L. Wang, Y. Zhang, L. Su, A. Shen, J. Tan, and J. Hu. Nuclear targeted nanoprobe for single living cell detection by surface-enhanced raman scattering. *Bioconjugate Chemistry*, 20(4):768–773, 2009.
- [27] A. G. Tkachenko, H. Xie, Y. L. Liu, D. Coleman, J. Ryan, W. R. Glomm, M. K. Shipton, S. Franzen, and D. L. Feldheim. Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: Comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains. *Bioconjugate Chemistry*, 15(3):482–490, 2004.
- [28] T. Kang, S. M. Yoo, I. Yoon, S. Y. Lee, and B. Kim. Patterned multiplex pathogen dna detection by au particle-on-wire sers sensor. *Nano Letters*, 10(4):1189–1193, 2010.
- [29] K. K. Strelau, R. Kretschmer, R. Moller, W. Fritzsche, and J. Popp. Sers as tool for the analysis of dna-chips in a microfluidic platform. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(4):1381–1384, 2010.
- [30] N. L. Rosi and C. A. Mirkin. Nanostructures in biodiagnostics. *Chemical Reviews*, 105(4):1547–1562, 2005.
- [31] L. Sun, C. X. Yu, and J. Irudayaraj. Surface-enhanced raman scattering based non-fluorescent probe for multiplex dna detection. *Analytical Chemistry*, 79(11):3981–3988, 2007.
- [32] C. A. Mirkin. Programming the assembly of two- and three-dimensional architectures with dna and nanoscale inorganic building blocks. *Inorganic Chemistry*, 39(11):2258–2272, 2000.
- [33] T. Vo-Dinh, D. L. Stokes, G. D. Griffin, M. Volkan, U. J. Kim, and M. I. Simon. Surface-enhanced raman scattering (sers) method and instrumentation for genomics and biomedical analysis. *Journal of Raman Spectroscopy*, 30(9):785–793, 1999.
- [34] D. S. Grubisha, R. J. Lipert, H. Y. Park, J. Driskell, and M. D. Porter. Femtomolar detection of prostate-specific antigen: An immunoassay based on surface-enhanced raman scattering and immunogold labels. *Analytical Chemistry*, 75(21):5936–5943, 2003.
- [35] S. Schlücker, B. Küstner, A. Punge, R. Bonfig, A. Marx, and P. Ströbel. Immuno-raman microspectroscopy: In situ detection of antigens in tissue specimens by

- surface-enhanced raman scattering. *Journal of Raman Spectroscopy*, 37(7):719–721, 2006.
- [36] Y. Cui, B. Ren, J. L. Yao, R. A. Gu, and Z. Q. Tian. Multianalyte immunoassay based on surface-enhanced raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38(7):896–902, 2007.
- [37] B. R. Lutz, C. E. Dentinger, L. Sun, L. N. Nguyen, J. N. Zhang, A. J. Chmura, A. N. Allen, S. Chan, and B. Knudsen. Raman nanoparticle probes for antibody-based protein detection in tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(4):371–379, 2008.
- [38] C. L. Zavaleta, B. R. Smith, I. Walton, W. Doering, G. Davis, B. Shojaei, M. J. Natan, and S. S. Gambhir. Multiplexed imaging of surface enhanced raman scattering nanotags in living mice using noninvasive raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32):13511–13516, 2009.
- [39] R. J. Stokes, F. McKenzie, E. McFarlane, A. Ricketts, L. Tetley, K. Faulds, J. Alexander, and D. Graham. Rapid cell mapping using nanoparticles and sers. *The Analyst*, 134(1):170–175, 2009.
- [40] G. Maltzahn von, A. Centrone, J. H. Park, R. Ramanathan, M. J. Sailor, T. A. Hatton, and S. N. Bhatia. Sers-coded gold nanorods as a multifunctional platform for densely multiplexed near-infrared imaging and photothermal heating. *Advanced Materials*, 21(31):3175, 2009.
- [41] L. O. Brown and S. K. Doorn. A controlled and reproducible pathway to dye-tagged, encapsulated silver nanoparticles as substrates for sers multiplexing. *Langmuir*, 24(6):2277–2280, 2008.
- [42] T. Vo-Dinh, P. Kasili, and M. Wabuyele. Nanoprobes and nanobiosensors for monitoring and imaging individual living cells. *Nanomedicine*, 2(1):22–30, 2006.
- [43] M. Xiao, J. Nyagilo, V. Arora, P. Kulkarni, D. Xu, X. Sun, and D. P. Davé. Gold nanotags for combined multi-colored raman spectroscopy and x-ray computed tomography. *Nanotechnology*, 21(3):035101, 2010.
- [44] I. I. S. Lim, P. N. Njoki, H. Y. Park, X. Wang, L. Y. Wang, D. Mott, and C. J. Zhong. Gold and magnetic oxide/gold core/shell nanoparticles as bio-functional nanoprobes. *Nanotechnology*, 19(30):305102, 2008.
- [45] G. R. Souza, C. S. Levin, A. Hajitou, R. Pasqualini, W. Arap, and J. H. Miller. In vivo detection of gold-imidazole self-assembly complexes: Nir-sers signal reporters. *Analytical Chemistry*, 78(17):6232–6237, 2006.
- [46] B. Küstner, M. Gellner, M. Schütz, F. Schöppler, A. Marx, P. Ströbel, P. Adam, C. Schmuck, and S. Schlücker. Sers labels for red laser excitation: silica-encapsulated sams on tunable gold/silver nanoshells. *Angewandte Chemie*, 48:1–5, 2009.

- [47] Y. Xing, Q. Chaudry, C. Shen, K. Y. Kong, H. E. Zhau, L. W. Chung, J. A. Petros, R. M. O'Regan, M. V. Yezhelyev, J. W. Simons, M. D. Wang, and S. Nie. Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry. *Nature Protocols*, 2(5):1152–1165, 2007.
- [48] R. P. Duyne Van, A. J. Haes, and A. D. McFarland. Nanoparticle optics: sensing with nanoparticle arrays and single nanoparticles. *Proceedings of SPIE*, 5223:197–207, 2003.
- [49] J. M. Bergen, H. A. Recum von, T. T. Goodman, A. P. Massey, and S. H. Pun. Gold nanoparticles as a versatile platform for optimizing physicochemical parameters for targeted drug delivery. *Macromolecular Bioscience*, 6(7):506–516, 2006.
- [50] G. B. Braun, S. J. Lee, T. Laurence, N. Fera, L. Fabris, G. C. Bazan, M. Moskovits, and N. O. Reich. Generalized approach to sers-active nanomaterials via controlled nanoparticle linking, polymer encapsulation, and small-molecule infusion. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(31):13622–13629, 2009.
- [51] K. Kim, H. B. Lee, J. W. Lee, and K. S. Shin. Poly(ethylenimine)-stabilized silver nanoparticles assembled into 2-dimensional arrays at water-toluene interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 345(1):103–108, 2010.
- [52] S. P. Mulvaney, M. D. Musick, C. D. Keating, and M. J. Natan. Glass-coated analyte-tagged nanoparticles: A new tagging system based on detection with sers. *Langmuir*, 19:4784–4790, 2003.
- [53] W. E. Doering and S. M. Nie. Spectroscopic tags using dye-embedded nanoparticles and surface-enhanced raman scattering. *Analytical Chemistry*, 75(22):6171–6176, 2003.
- [54] J. Kneipp, H. Kneipp, and K. Kneipp. Two-photon vibrational spectroscopy for biosciences based on surface-enhanced hyper-raman scattering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46):17149–17153, 2006.
- [55] J. Kneipp, H. Kneipp, M. McLaughlin, D. Brown, and K. Kneipp. In vivo molecular probing of cellular compartments with gold nanoparticles and nanoaggregates. *Nano Letters*, 6(10):2225–2231, 2006.
- [56] J. Kneipp, H. Kneipp, W. L. Rice, and K. Kneipp. Optical probes for biological applications based on surface enhanced raman scattering from indocyanine green on gold nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 77(8):2381–2385, 2005.
- [57] S. W. Bishnoi, C. J. Rozell, C. S. Levin, B. R. Johnson, D. H. Johnson, and N. J. Halas. All-optical nanoscale ph meter. *Nano Letters*, 6(8):1687–1692, 2006.
- [58] Z. Y. Wang, A. Bonoiu, M. Samoc, Y. P. Cui, and P. N. Prasad. Biological ph sensing based on surface enhanced raman scattering through a 2-aminothiophenol-silver probe. *Biosensors & Bioelectronics*, 23(6):886–891, 2008.

-
- [59] R. Lubart, Y. Wollman, H. Friedmann, S. Rochkind, and I. Laulicht. Effects of visible and near-infrared lasers on cell-cultures. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 12(3):305–310, 1992.
- [60] M. Gellner, K. Koempe, and S. Schlücker. Multiplexing with sers labels using mixed sams of raman reporter molecules. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(7):1839–1844, 2009.
- [61] G. Wang, H.-Y. Park, R. J. Lipert, and M. D. Porter. Mixed monolayers on gold nanoparticle labels for multiplexed surface-enhanced raman scattering based immunoassays. *Analytical Chemistry*, 81(23):9643–9650, 2009.
- [62] M. Faraday. The bakerian lecture: Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 147:145–181, 1857.
- [63] D. J. Shaw and R. W. Williams. *Introduction to colloid and surface chemistry*, volume 2. Butterworths and Co., London, [1970].
- [64] P. C. Lee and D. Meisel. Adsorption and surface-enhanced raman of dyes on silver and gold sols. *Journal of Physical Chemistry*, 86(17):3391–3395, 1982.
- [65] W. Fritzsche and T. A. Taton. Metal nanoparticles as labels for heterogeneous, chip-based dna detection. *Nanotechnology*, 14(12):R63–R73, 2003.
- [66] M. V. Yezhelyev, X. Gao, Y. Xing, A. Al-Hajj, S. M. Nie, and R. M. O'Regan. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *The Lancet Oncology*, 7(8):657–667, 2006.
- [67] C. M. Niemeyer. Nanopartikel, Proteine und Nucleinsäuren: Die Biotechnologie begegnet den Materialwissenschaften. *Angewandte Chemie*, 113(22):4254–4287, 2001.
- [68] N. Shirtcliffe, U. Nickel, and S. Schneider. Reproducible preparation of silver sols with small particle size using borohydride reduction: For use as nuclei for preparation of larger particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 211(1):122–129, 1999.
- [69] R. F. Aroca, R. A. Alvarez-Puebla, N. Pieczonka, S. Sanchez-Cortez, and J. V. Garcia-Ramos. Surface-enhanced raman scattering on colloidal nanostructures. *Advances in Colloid and Interface Science*, 116(1-3):45–61, 2005.
- [70] N. Leopold and B. Lendl. A new method for fast preparation of highly surface-enhanced raman scattering (sers) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(24):5723–5727, 2003.
- [71] K. Brown and M. J. Natan. Hydroxylamine seeding of colloidal au nanoparticles in solution and on surfaces. *Langmuir*, 14(4):726–728, 1998.
- [72] D. Andreescu, T. K. Sau, and D. V. Goia. Stabilizer-free nanosized gold sols. *Journal of Colloid and Interface Science*, 298(2):742–751, 2006.

- [73] Y. Luo. Size-controlled preparation of polyelectrolyte-protected gold nanoparticles by natural sunlight radiation. *Materials Letters*, 61(11-12):2164–2166, 2007.
- [74] L. Rodriguez-Lorenzo, R. A. Alvarez-Puebla, F. J. G. de Abajo, and L. M. Liz-Marzan. Surface enhanced raman scattering using star-shaped gold colloidal nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(16):7336–7340, 2010.
- [75] C. H. Munro, W. E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, and P. C. White. Characterization of the surface of a citrate-reduced colloid optimized for use as a substrate for surface-enhanced resonance raman-scattering. *Langmuir*, 11(10):3712–3720, 1995.
- [76] P. Smejkal, J. Pflieger, K. Sisikova, B. Vlckova, O. Dammer, and M. Slouf. In-situ study of ag nanoparticle hydrosol optical spectra evolution during laser ablation/fragmentation. *Applied Physics A-Materials Science & Processing*, 79:1307–1309, 2004.
- [77] A. M. Ahern and R. L. Garrell. In situ photoreduced silver nitrate as a substrate for surface-enhanced raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 59(23):2813–2816, 1987.
- [78] M. Köhler, J. Albert, G. Mayer, U. Hübner, and J. Wagner. Bildung von goldnanopartikeln und nanopartikelaggregaten in statischen mikromischern in gegenwart von rinderserumalbumin (bsa). *Chemie Ingenieur Technik*, 77(7):867–873, 2005.
- [79] T. Makiabadi, A. Bouvree, V. Le Nader, H. Terrisse, and G. Louarn. Preparation, optimization, and characterization of sers sensor substrates based on two-dimensional structures of gold colloid. *Plasmonics*, 5(1):21–29, 2010.
- [80] Kwan Kim, Seung Joon Lee, and Kyung Lock Kim. Surface-enhanced raman scattering of 4-nitrothioanisole in ag sol. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(41):16208–16212, 2004.
- [81] M. Muniz-Miranda and M. Innocenti. Afm and micro-raman investigation on filters coated with silver colloidal nanoparticles. *Applied Surface Science*, 226(1-3):125–130, 2004.
- [82] R. E. Holt and T. M. Cotton. Surface-enhanced resonance raman and electrochemical investigation of glucose oxidase catalysis at a silver electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 111(8):2815–2821, 1989.
- [83] L. Genzel, T. P. Martin, and U. Kreibig. Dielectric function and plasma resonances of small metal particles. *Zeitschrift Für Physik B-Condensed Matter*, 21(4):339–346, 1975.
- [84] G. Mie. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik*, 330(3):377–445, 1908.
- [85] S. Link and M. A. El-Sayed. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(21):4212–4217, 1999.

- [86] M. M. Alvarez, J. T. Houry, T. G. Schaaff, M. N. Shafiqullin, I. Vezmar, and R. L. Whetten. Optical absorption spectra of nanocrystal gold molecules. *The Journal of Physical Chemistry B*, 101(19):3706–3712, 1997.
- [87] B. Palpant, B. Prevel, J. Lerme, E. Cottancin, M. Pellarin, M. Treilleux, A. Perez, J. L. Vialle, and M. Broyer. Optical properties of gold clusters in the size range 2-4 nm. *Physical Review B*, 57(3):1963–1970, 1998.
- [88] L. Genzel and U. Kreibig. Dielectric function and infrared-absorption of small metal particles. *Zeitschrift Für Physik B-Condensed Matter*, 37(2):93–101, 1980.
- [89] R. Ruppin. Optical-properties of small metal spheres. *Physical Review B*, 11(8):2871–2876, 1975.
- [90] M. Inoue and K. Ohtaka. Surface enhanced raman-scattering by metal spheres .1. cluster effect. *Journal of the Physical Society of Japan*, 52(11):3853–3864, 1983.
- [91] A. M. Schwartzberg, C. D. Grant, A. Wolcott, C. E. Talley, T. R. Huser, R. Bogomolni, and J. Z. Zhang. Unique gold nanoparticle aggregates as a highly active surface-enhanced raman scattering substrate. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(50):19191–19197, 2004.
- [92] M. Moskovits. Surface-enhanced spectroscopy. *Reviews of Modern Physics*, 57:783–826, 1985.
- [93] S. E. J. Bell and M. R. McCourt. Sers enhancement by aggregated au colloids: effect of particle size. *Physical Chemistry. Chemical Physics*, 11:7455 – 7462, 2009.
- [94] Y. Björnstahl. Die Struktur von blauen Goldsolen. *Colloid and Polymer Science*, 86(2):1435–1536, 1939.
- [95] T. J. Norman, C. D. Grant, D. Magana, J. Z. Zhang, J. Liu, D. L. Cao, F. Bridges, and A. Van Buuren. Near infrared optical absorption of gold nanoparticle aggregates. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(28):7005–7012, 2002.
- [96] G. C. Schatz. Electrodynamics of nonspherical noble metal nanoparticles and nanoparticle aggregates. *Journal of Molecular Structure-Theochem*, 573:73–80, 2001.
- [97] A. Einstein. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik*, 322(8):549–560, 1905.
- [98] R. Kubo. Fluctuation-dissipation theorem. *Reports on Progress in Physics*, 29:255–284, 1966.
- [99] U. Dahmen, R. Erni, V. Radmilovic, C. Kisielowski, M. D. Rossell, and P. Denes. Background, status and future of the transmission electron aberration-corrected microscope project. *Philosophical Transactions of the Royal Society A-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 367(1903):3795–3808, 2009.

- [100] H. H. Rose. Optics of high-performance electron microscopes. *Science and Technology of Advanced Materials*, 9(1):1–30, 2008.
- [101] B. G. Yacobi, D. B. Holt, and L. L. Kazmerski. An introduction to microanalysis of solids. In Holt D. B. Yacobi, B. G. and L. L. Kazmerski, editors, *Microanalysis of Solids*, volume 1, pages 3–10. Plenum Press, New York, [1994].
- [102] C. V. Raman. The raman effect. investigation of molecular structure by light scattering. *Transactions of the Faraday Society*, 25:0781–0791, 1929.
- [103] M. Fleischmann, P. J. Hendra, and A. J. McQuillan. Raman-spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, 26(2):163–166, 1974.
- [104] M. G. Albrecht and J. A. Creighton. Anomalously intense raman spectra of pyridine at a silver electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 99(15):5215–5217, 1977.
- [105] P. K. Aravind and H. Metiu. The enhancement of raman and fluorescent intensity by small surface-roughness - changes in dipole emission. *Chemical Physics Letters*, 74(2):301–305, 1980.
- [106] A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn, and W. Akemann. Surface-enhanced raman scattering. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 4(5):1143–1212, 1992.
- [107] A. Martins, A. Queiros, and F. Silva. Surface-structure-sensitive adsorption of adenine on gold electrodes. *ChemPhysChem*, 6(6):1056–1060, 2005.
- [108] K. M. Erwin, E. Koglin, J. M. Sequaris, P. Valenta, and H. W. Nürnberg. Surface enhanced raman spectra of nucleic acid components at a silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 114:179–194, 1980.
- [109] E. J. Zeman and G. C. Schatz. An accurate electromagnetic theory study of surface enhancement factors for ag, au, cu, li, na, al, ga, in, zn, and cd. *Journal of Physical Chemistry*, 91(3):634–643, 1987.
- [110] B. N. J. Persson. On the theory of surface-enhanced raman scattering. *Chemical Physics Letters*, 82:561–565, 1981.
- [111] A. Otto. Surface-enhanced raman scattering: classical and chemical origins. In *Light scattering in solids IV. Electronic scattering, spin effects, SERS and morphic effects*, pages 289–418. Springer-Verlag, Berlin, Germany, [1984]. ISBN: 3-540-11942-6 English.
- [112] A. Otto. Surface-enhanced raman-scattering of adsorbates. *Journal of Raman Spectroscopy*, 22(12):743–752, 1991.
- [113] P. A. Champion and K. A. Kambhampati. Surface-enhanced raman scattering. *Chemical Society Reviews*, 27(4):241–250, 1998.

-
- [114] P. Kambhampati and A. Campion. Surface enhanced raman scattering as a probe of adsorbate-substrate charge-transfer excitations. *Surface Science*, 428:115–125, 1999.
- [115] K. Pearson. On lines and planes of closest fit to a system of points in space. *The London, Edinburgh, and Philosophical Magazine and Journal of Science*, 6(2):559–572, 1901.
- [116] W. Kessler and R. W. Kessler. Multivariate Curve Resolution - Integration von Wissen in Chemometrische Modelle. *Chemie Ingenieur Technik*, 82(4):441–451, 2010.
- [117] R. Tauler, A. Smilde, and B. Kowalski. Selectivity, local rank, 3-way data-analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. *Journal of Chemometrics*, 9(1):31–58, 1995.
- [118] M. Morhac and V. Matousek. Complete positive deconvolution of spectrometric data. *Digital Signal Processing*, 19(3):372–392, 2009.
- [119] D. H. Butler and M. G. McNamee. Ftir analysis of nicotinic acetylcholine receptor secondary structure in reconstituted membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1150(1):17–24, 1993.
- [120] V. L. Sutherland, J. A. Timlin, L. T. Nieman, J. F. Guzowski, M. K. Chawla, P. F. Worley, B. Roysam, B. L. McNaughton, M. B. Sinclair, and C. A. Barnes. Advanced imaging of multiple mrnas in brain tissue using a custom hyperspectral imager and multivariate curve resolution. *Journal of Neuroscience Methods*, 160(1):144–148, 2007.
- [121] R. Tauler. Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 30(1):133–146, 1995.
- [122] A. K. Jain, M. N. Murty, and P. J. Flynn. Data clustering: A review. *ACM Computing Surveys*, 31:265–323, 1999.
- [123] J. H. Ward. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58(301):236–244, 1963.
- [124] D. J. C. MacKay. An example inference task: Clustering. In *Information Theory, Inference, and Learning Algorithms*, pages 284–292. Cambridge University Press, Cambridge, [2003].
- [125] T. Kanungo, D. M. Mount, N. S. Netanyahu, C. D. Piatko, R. Silverman, and A. Y. Wu. An efficient k-means clustering algorithm: Analysis and implementation. *Ieee Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 24(7):881–892, 2002.
- [126] T. Keough, M. P. Lacey, G. M. Trakshel, and T. N. Asquith. The use of maldi mass spectrometry to characterize synthetic protein conjugates. *International Journal of Mass Spectrometry*, 169:201–215, 1997.

- [127] M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, and A. N. Tyler. Fast atom bombardment of solids (fab) - a new ion-source for mass-spectrometry. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, (7):325–327, 1981.
- [128] M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, and E. T. Whalley. Fast atom bombardment mass-spectrometry of bradykinin and related oligopeptides. *Biomedical Mass Spectrometry*, 8(8):337–342, 1981.
- [129] M. Barber and B. N. Green. The analysis of small proteins in the molecular weight range 10-24 kda by magnetic sector mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 1(5):80–83, 1987.
- [130] M. Karas and F. Hillenkamp. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60(20):2299–2301, 1988.
- [131] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, and T. Matsuo. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2(8):151–153, 1988.
- [132] M. Adamczyk, A. Buko, Y.-Y. Chen, J. R. Fishpough, J. C. Gebler, and D. D. Johnson. Characterization of protein-hapten conjugates. 1. matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of immuno bsa-hapten conjugates and comparison with other characterization methods. *Bioconjugate Chemistry*, 5(6):631–635, 1994.
- [133] W. N. E. van Dijk-Wolthuis, L. van de Water, P. van de Wetering, M. J. van Steenberg, J. J. Kettenes-van den Bosch, W. J. W. Schuyl, and W. E. Hennink. Synthesis and characterization of poly-l-lysine with controlled low molecular weight. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 198(12):3893–3906, 1997.
- [134] E. Engvall and P. Perlmann. Enzyme-linked immunosorbent assay (elisa) quantitative assay of immunoglobulin-g. *Immunochemistry*, 8(9):871–874, 1971.
- [135] J. E. Butler, T. L. Feldbush, P. L. McGivern, and N. Stewart. Enzyme-linked immunosorbent assay (elisa) - measure of antibody concentration or affinity. *Immunochemistry*, 15(2):131–136, 1978.
- [136] G. Frens and J. TH. G. Overbeek. Repeptization and the theory of electrostatic colloids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 38(2):376–387, 1972.
- [137] G. Frens. Particle-size and sol stability in metal colloids. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift Für Polymere*, 250(7):736–741, 1972.
- [138] J. DeMey, M. Moeremans, G. Geuens, R. Nuydens, and M. Debrabander. High-resolution light and electron-microscopic localization of tubulin with the igs (immuno gold staining) method. *Cell Biology International Reports*, 5(9):889–899, 1981.
- [139] M. Horisberger and J. Rosset. Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron-microscopy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 25(4):295–305, 1977.

- [140] J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, and R. Tauler. A graphical user-friendly interface for mcr-als: a new tool for multivariate curve resolution in matlab. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 76(1):101–110, 2005.
- [141] S. P. L. Soerensen. Enzymstudien ii. Über die messung und bedeutung der wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen prozessen. *Biochemische Zeitschrift*, 21:131–304, 1909.
- [142] J. V. Staros, R. W. Wright, and D. M. Swingle. Enhancement by n-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Analytical Biochemistry*, 156(1):220–222, 1986.
- [143] Z. Grabarek and J. Gergely. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Analytical Biochemistry*, 185(1):131–135, 1990.
- [144] H. Rinderknecht. Ultra-rapid fluorescent labelling of proteins. *Nature*, 193:167–168, 1962.
- [145] A. Landel. Stability studies on fluorescein isothiocyanate-bovine serum albumin conjugate. *Analytical Biochemistry*, 73:280–289, 1976.
- [146] G. T. Hermanson. Antibody modification and conjugation. In Academic Press, editor, *Bioconjugate Techniques*, volume 2, pages 783–795. Elsevier Inc., London, [2008].
- [147] M. Brinkley. A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens and crosslinking reagents. *Bioconjugate Chemistry*, 3(1):2–13, 1992.
- [148] G. Mattson, E. Conklin, S. Desai, G. Nielander, M. D. Savage, and S. Morgensen. A practical approach to cross-linking. *Molecular Biology Reports*, 17(3):167–183, 1993.
- [149] S. Yoshitake, M. Imagawa, E. Ishikawa, Y. Nitsu, I. Urushizaki, M. Nishiura, R. Kanazawa, H. Kurosaki, S. Tachibana, N. Nakazawa, and H. Ogawa. Mild and efficient conjugation of rabbit fab' and horseradish peroxidase using a maleimide compound and its use for enzyme immunoassay. *Journal of Biochemistry*, 92(5):1413–1424, 1982.
- [150] Y. J. Xiao, Y. F. Chen, and X. X. Gao. Comparative study of the surface enhanced near infrared raman spectra of adenine and nad+ on a gold electrode. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 55(6):1209–1218, 1999.
- [151] B. Giese and D. McNaughton. Surface-enhanced raman spectroscopic and density functional theory study of adenine adsorption to silver surfaces. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(1):101–112, 2001.
- [152] S. E. J. Bell and N. M. S. Sirimuthu. Quantitative surface-enhanced raman spectroscopy. *Chemical Society Reviews*, 37(5):1012–1024, 2008.

- [153] T. Watanabe, O. Kawanami, H. Katoh, K. Honda, Y. Nishimura, and M. Tsuboi. Sers study of molecular adsorption: Some nucleic acid bases on ag electrodes. *Surface Science*, 158(1-3):341–351, 1985.
- [154] K. F. Domke, D. Zhang, and B. Pettinger. Tip-enhanced raman spectra of picomole quantities of dna nucleobases at au(111). *Journal of the American Chemical Society*, 129(21):6708–6709, 2007.
- [155] W. S. Oh, M. S. Kim, and S. W. Suh. Surface-enhanced raman-scattering (sers) of nucleic-acid components in silver sol - guanine series. *Journal of Raman Spectroscopy*, 18(4):253–258, 1987.
- [156] B. Giese and D. McNaughton. Density functional theoretical (dft) and surface-enhanced raman spectroscopic study of guanine and its alkylated derivatives. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 4:5171–5182, 2002.
- [157] A. Rodes, M. Rueda, F. Prieto, C. Prado, J. M. Feliu, and A. Aldaz. Adenine adsorption at single crystal and thin-film gold electrodes: An in situ infrared spectroscopy study. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(43):18784–18794, 2009.
- [158] S. E. J. Bell and N. M. S. Sirimuthu. Surface-enhanced raman spectroscopy (sers) for sub-micromolar detection of dna/rna mononucleotides. *Journal of the American Chemical Society*, 128(49):15580–15581, 2006.
- [159] J. Kundu, O. Neumann, B. G. Janesko, D. Zhang, S. Lal, A. Barhoumi, G. E. Scuseria, and N. J. Halas. Adenine- and adenosine monophosphate (amp)-gold binding interactions studied by surface-enhanced raman and infrared spectroscopies. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(32):14390–14397, 2009.
- [160] E. Papadopoulou and S. E. J. Bell. Surface enhanced raman evidence for ag+ complexes of adenine, deoxyadenosine and 5'-damp formed in silver colloids. *Analyst*, 2010.
- [161] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, and M. S. Feld. Ultrasensitive chemical analysis by raman spectroscopy. *Chemical Reviews*, 99(10):2957–2975, 1999.
- [162] T. J. Norman, C. D. Grant, D. Magana, J. Z. Zhang, J. Liu, D. L. Cao, F. Bridges, and A. Van Buuren. Near infrared optical absorption of gold nanoparticle aggregates. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(28):7005–7012, 2002.
- [163] P. Hildebrandt, A. Epding, F. Vanhecke, S. Keller, and B. Schrader. Molecule-specificity of surface-enhanced raman-scattering. *Journal of Molecular Structure*, 349:137–140, 1995.
- [164] C. G. Blatchford, J. R. Campbell, and J. A. Creighton. Plasma resonance enhanced raman-scattering by adsorbates on gold colloids - the effects of aggregation. *Surface Science*, 120(2):435–455, 1982.

- [165] N. Peica and W. Kiefer. Characterization of indigo carmine with surface-enhanced resonance raman spectroscopy (serrs) using silver colloids and island films, and theoretical calculations. *Journal of Raman Spectroscopy*, 39:47–60, 2008.
- [166] A. J. Lowe, Y. S. Huh, A. D. Strickland, D. Erickson, and C. A. Batt. Multiplex single nucleotide polymorphism genotyping utilizing ligase detection reaction coupled surface enhanced raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 82(13):5810–5814, 2010.
- [167] W. E. Doering, M. E. Piotti, M. J. Natan, and R. G. Freeman. Sers as a foundation for nanoscale, optically detected biological labels. *Advanced Materials*, 19(20):3100–3108, 2007.
- [168] B. Küstner, M. Gellner, M. Schütz, F. Schöppler, A. Marx, P. Ströbel, P. Adam, C. Schmuck, and S. Schlücker. Sers labels for red laser excitation: Silica-encapsulated sams on tunable gold/silver nanoshells. *Angewandte Chemie*, 48(11):1950–1953, 2009.
- [169] J. Ni, R. J. Lipert, G. B. Dawson, and M. D. Porter. Immunoassay readout method using extrinsic raman labels adsorbed on immunogold colloids. *Analytical Chemistry*, 71(21):4903–4908, 1999.
- [170] X. Su, J. Zhang, L. Sun, T. W. Koo, S. Chan, N. Sundararajan, M. Yamakawa, and A. A. Berlin. Composite organic-inorganic nanoparticles (coins) with chemically encoded optical signatures. *Nano Letters*, 5(1):49–54, 2005.
- [171] G. Goddard, L. O. Brown, R. Habbersett, C. I. Brady, J. C. Martin, S. W. Graves, J. P. Freyer, and S. K. Doorn. High-resolution spectral analysis of individual sers-active nanoparticles in flow. *Journal of the American Chemical Society*, pages 6081–6090, 2010.
- [172] C. Lin, Y.-M. Yang, Y.-F. Chen, T.-S. Yang, and H.-C. Chang. A new protein assay based on raman reporter labeled immunogold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 24:178–183, 2008.
- [173] M. S. Bizzarri, A. R. Cannistraro, and M. S. Salvatore. Sers detection of thrombin by protein recognition using functionalized gold nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(4):306–310, 2007.
- [174] C. A. Szafranski, W. Tanner, P. E. Laibinis, and R. L. Garrell. Surface-enhanced raman spectroscopy of aromatic thiols and disulfides on gold electrodes. *Langmuir*, 14(13):3570–3579, 1998.
- [175] I. Persaud and W. E. I. Grossman. Surface-enhanced raman scattering of triphenylmethane dyes on colloidal silver. *Journal of Raman Spectroscopy*, 24:107–112, 1993.
- [176] A. Beer. Bestimmung der absorption des rothen lichts in farbigen flüssigkeiten. *Annalen der Physik*, 86:78–87, 1852.

- [177] J. Gicquel, M. Carles, and H. Bodot. Resonance raman investigation of charge-transfer complexes between a trityl cation (crystal violet) and sulfonated azo derivatives. *The Journal of Physical Chemistry*, 83(6):699–706, 1979.
- [178] J. H. Yoon, J. S. Park, and S. Yoon. Time-dependent and symmetry-selective charge-transfer contribution to sers in gold nanoparticle aggregates. *Langmuir*, 25(21):12475–12480, 2009.
- [179] K. S. Shin. Effect of surface morphology on surface-enhanced raman scattering of 4-aminobenzenethiol adsorbed on gold substrates. *Journal of Raman Spectroscopy*, 39(4):468–473, 2008.
- [180] Y. L. Wang, X. Q. Zou, W. Ren, W. D. Wang, and E. K. Wang. Effect of silver nanoplates on raman spectra of p-aminothiophenol assembled on smooth macroscopic gold and silver surface. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(8):3259–3265, 2007.
- [181] R. A. Alvarez-Puebla, D. S. Dos Santos, and R. F. Aroca. Surface-enhanced raman scattering for ultrasensitive chemical analysis of 1 and 2-naphthalenethiols. *The Analyst*, 129(12):1251–1256, 2004.
- [182] S. Lee, S. Joo, S. Park, S. Kim, H. C. Kim, and T. D. Chung. Sers decoding of micro gold shells moving in microfluidic systems. *Electrophoresis*, 31(10):1623–1629, 2010.
- [183] B. H. Jun, J. H. Kim, H. Park, J. S. Kim, K. N. Yu, S. M. Lee, H. Choi, S. Y. Kwak, Y. K. Kim, D. H. Jeong, M. H. Cho, and Y. S. Lee. Surface-enhanced raman spectroscopic-encoded beads for multiplex immunoassay. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 9(2):237–244, 2007.
- [184] J. W. Chen, J. H. Jiang, X. Gao, J. L. Gong, G. L. Shen, and R. Q. Yu. Gold-aggregated, dye-embedded, polymer-protected nanoparticles (gdps): A new type of tags for detection with sers. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, 294(1-3):80–85, 2007.
- [185] P. Hildebrandt and M. Stockburger. Surface-enhanced resonance raman-spectroscopy of rhodamine-6g adsorbed on colloidal silver. *Journal of Physical Chemistry*, 88(24):5935–5944, 1984.
- [186] P. Hildebrandt and M. Stockburger. Surface enhanced resonance raman-study on fluorescein dyes. *Journal of Raman Spectroscopy*, 17(1):55–58, 1986.
- [187] M. Majoube and M. Henry. Fourier-transform raman and infrared and surface-enhanced raman-spectra for rhodamine-6g. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 47(9-10):1459–1466, 1991.
- [188] S. P. Xu, B. Zhao, W. Q. Xu, and Y. Fan. Preparation of au-ag cores-shell nanoparticles and application of bimetallic sandwich in surface-enhanced raman scattering (sers). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 257-258:313–317, 2005.

-
- [189] C.J. Orendorff, A. Gole, T. K. Sau, and C. J. Murphy. Surface-enhanced raman spectroscopy of self-assembled monolayers: Sandwich architecture and nanoparticle shape dependence. *Analytical Chemistry*, 77(10):3261–3266, 2005.
- [190] A. Michota and J. Bukowska. Surface-enhanced raman scattering (sers) of 4-mercaptobenzoic acid on silver and gold substrates. *Journal of Raman Spectroscopy*, 34(1):21–25, 2003.
- [191] C. W. Lin, J. R. Shulok, S. D. Kirley, L. Cincotta, and J. W. Foley. Lysosomal localization and mechanism of uptake of nile blue photosensitizers in tumor-cells. *Cancer Research*, 51(10):2710–2719, 1991.
- [192] A. Grofcsik, M. Kubinyi, and W. J. Jones. Fluorescence decay dynamics of organic dye molecules in solution. *Journal of Molecular Structure*, 348:197–200, 1995.
- [193] R. Mazeikiene, G. Niaura, and A. Malinauskas. Raman spectroelectrochemical study of electrochemical decomposition of poly(neutral red) at a gold electrode. *Journal of Colloid and Interface Science*, 336(1):195–199, 2009.
- [194] K. Hutchinson, R. E. Hester, W. J. Albery, and A. R. Hillman. Raman-spectroscopic studies of a thionine-modified electrode. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I*, 80:2053–2071, 1984.
- [195] J. Ferguson. Absorption studies of acid-base equilibria of dye solutions. *Chemical Physics Letters*, 17(4):543–546, 1972.
- [196] O. A. Ryazanova, I. M. Voloshin, V. L. Makitruk, V. N. Zozulya, and V. A. Karachevtsev. ph-induced changes in electronic absorption and fluorescence spectra of phenazine derivatives. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 66(4-5):849–859, 2007.
- [197] E. Koglin and J. M. Sequaris. Interaction of proflavine with dna studied by colloid surface enhanced resonance raman-spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 141:405–409, 1986.
- [198] A. Murza, S. Sanchez-Cortes, and J. V. Garcia-Ramos. Fluorescence and surface-enhanced raman study of 9-aminoacridine in relation to its aggregation and excimer emission in aqueous solution and on silver surface. *Biospectroscopy*, 4(5):327–339, 1998.
- [199] H. G. Bingler, H. Brunner, A. Leitner, F. R. Aussenegg, and A. Wokaun. Interference enhanced surface raman scattering of adsorbates on a silverspacer silverspacer-islands multilayer system. *Molecular Physics*, 85(3):587–606, 1995.
- [200] G. Nascimento do and M. L.A. Temperini. Studies on the resonance raman spectra of polyaniline obtained with near-ir excitation. *Journal of Raman Spectroscopy*, 39(7):772–778, 2008.

- [201] G. Ciric-Marjanovic, N. V. Blinova, M. Trchova, and J. Stejskal. Chemical oxidative polymerization of safranines. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(9):2188–2199, 2007.
- [202] K. Wang and Y. S. Li. Surfactant-aided surface-enhanced resonance raman spectroscopic study of some anionic dye molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*, 27(5):385–389, 1996.
- [203] L. L. Wang, A. Roitberg, C. Meuse, and A. K. Gaigalas. Raman and ftir spectroscopies of fluorescein in solutions. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 57(9):1781–1791, 2001.
- [204] A. K. Kalkan and S. J. Fonash. Laser-activated surface-enhanced raman scattering substrates capable of single molecule detection. *Applied Physics Letters*, 89(23):89, 2006.
- [205] R. Markuszewski and H. Diehl. The infrared-spectra and structures of the 3 solid forms of fluorescein and related-compounds. *Talanta*, 27(11):937–946, 1980.
- [206] G. Ellman and H. Lysko. A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Analytical Biochemistry*, 93:98–102, 1979.
- [207] P. Hildebrandt, S. Keller, A. Hoffmann, F. Vanhecke, and B. Schrader. Enhancement factor of surface-enhanced raman scattering on silver and gold surfaces upon near-infrared excitation. indication of an unusual strong contribution of the chemical effect. *Journal of Raman Spectroscopy*, 24(11):791–796, 1993.
- [208] S. Schneider, H. Grau, P. Halbig, and P. Freunscht. Stabilization of silver colloids by various types of anions and their effect on the surface-enhanced raman spectra of organic dyes. *Journal of Raman Spectroscopy*, 27(1):57–68, 1996.
- [209] K. Pearson, G.U. Yule, N. Blanchard, and A. Lee. The law of ancestral heredity. *Biometrika*, 2(2):211–236, 1903.
- [210] G.U. Yule. On the theory of correlation. *Journal of the Royal Statistical Society*, 60(4):812–854, 1897.
- [211] D. C. Fernandez, R. Bhargava, S. M. Hewitt, and I. W. Levin. Infrared spectroscopic imaging for histopathologic recognition. *Nature Biotechnology*, 23:469 – 474, 2005.
- [212] P. Lasch, W. Haensch, D. Naumann, and M. Diem. Imaging of colorectal adenocarcinoma using ft-ir microspectroscopy and cluster analysis. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1688(2):176–186, 2004.
- [213] B. R. Lutz, C. E. Dentinger, L. N. Nguyen, L. Sun, J. W. Zhang, A. N. Allen, S. Chan, and B. S. Knudsen. Spectral analysis of multiplex raman probe signatures. *ACS Nano*, 2(11):2306–2314, 2008.
- [214] C. Spearman. The proof and measurement of association between two things. *The American Journal of Psychology*, 15(1):72–101, 1904.

-
- [215] J. B. Ramsey. Tests for specification errors in classical linear least-squares regression analysis. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Statistical Methodology*, 31(2):350–371, 1969.
- [216] D. A. Watson, L. O. Brown, D.F. Gaskill, M. Naivar, S. W. Graves, S. K. Doorn, and J. P. Nolan. A flow cytometer for the measurement of raman spectra. *Cytometry Part A*, 73A(2):119–128, 2008.
- [217] H.-N. Wang and T. Vo-Dinh. Multiplex detection of breast cancer biomarkers using plasmonic molecular sentinel nanoprobes. *Nanotechnology*, 20(6):065101, 2009.
- [218] S. Romero-Torres, J. D. Pérez-Ramos, K. R. Morris, and E. R. Grant. Raman spectroscopic measurement of tablet-to-tablet coating variability. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38(2):270–274, 2005.
- [219] K. Janné, J. Pettersen, N. O. Lindberg, and T. Lundstedt. Hierarchical principal component analysis (pca) and projection to latent structure (pls) technique on spectroscopic data as a data pretreatment for calibration. *Journal of Chemometrics*, 15(4):203–213, 2001.
- [220] R. Goodacre, M. Timmins, R. Burton, N. Kaderbhai, A. M. Woodward, D. B. Kell, and P. J. Rooney. Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism fingerprinting and artificial neural networks. *Microbiology*, 144:1157–1170, 1998.
- [221] D. Cam, K. Keseroglu, M. Kahraman, F. Sahin, and M. Culha. Multiplex identification of bacteria in bacterial mixtures with surface-enhanced raman scattering. *Journal of Raman Spectroscopy*, 41(5):484–489, 2010.
- [222] J. Guicheteau, S. Christesen, D. Emge, A. Hyre, and L. Argue. Bacteria classification via surface enhanced raman spectroscopy and principal component analysis. *Edgewood Chemical Biological Center Aberdenn Proving Ground MD*, pages 1–6, 2006.
- [223] C. Krafft, T. Knetschke, A. Siegner, R. H. W. Funk, and R. Salzer. Mapping of single cells by near infrared raman microspectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 32(1):75–83, 2003.
- [224] C. Krafft, T. Knetschke, R. H. W. Funk, and R. Salzer. Identification of organelles and vesicles in single cells by raman microspectroscopic mapping. *Vibrational Spectroscopy*, 38(1-2):85–93, 2005.
- [225] M. Diem. A decade of vibrational micro-spectroscopy of human cells and tissue (1994–2004).pdf. *The Analyst*, 129:880–885, 2004.
- [226] J. W. Chan, D. S. Taylor, T. Zwerdling, S. M. Lane, K. Ihara, and T. Huser. Micro-raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. *Biophysical Journal*, 90(2):648–656, 2006.

- [227] Y. Harada, P. Dai, Y. Yamaoka, M. Ogawa, H. Tanaka, K. Nosaka, K. Akaji, and T. Takamatsu. Intracellular dynamics of topoisomerase i inhibitor, cpt-11, by slit-scanning confocal raman microscopy. *Histochemistry and Cell Biology*, 132(1):39–46, 2009.
- [228] R. J. Swain and M. M. Stevens. Raman microspectroscopy for non-invasive biochemical analysis of single cells. *Biochemical Society Transactions*, 35:544–549, 2007.
- [229] S. W. E. van de Poll, T. C. B. Schut, A. van den Laarse, and G. J. Puppels. In situ investigation of the chemical composition of ceroid in human atherosclerosis by raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 33(7):544–551, 2002.
- [230] C. Matthäus, T. Chernenko, J. A. Newmark, C. M. Warner, and M. Diem. Label-free detection of mitochondrial distribution in cells by nonresonant raman microspectroscopy. *Biophysical Journal*, 93(2):668–673, 2007.
- [231] B. Bird, M. Miljkovic, M. Romeo, J. Smith, N. Stone, M. George, and M. Diem. Infrared micro-spectral imaging: distinction of tissue types in axillary lymph node histology. *BMC Clinical Pathology*, 8(1):8, 2008.
- [232] K. W. Short, S. Carpenter, J. P. Freyer, and J. R. Mourant. Raman spectroscopy detects biochemical changes due to proliferation in mammalian cell cultures. *Biophysical Journal*, 88(6):4274–4288, 2005.
- [233] C. Eliasson, J. Englebretsson, A. Loren, J. Abrahamsson, K. Abrahamsson, and M. Josefson. Multivariate methodology for surface enhanced raman chemical imaging of lymphocytes. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 81(1):13–20, 2006.
- [234] M. Ogawa, Y. Harada, Y. Yamaoka, K. Fujita, H. Yaku, and T. Takamatsu. Label-free biochemical imaging of heart tissue with high-speed spontaneous raman microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382(2):370–374, 2009.
- [235] C. Eliasson, A. Loren, J. Englebretsson, M. Josefson, J. Abrahamsson, and K. Abrahamsson. Surface-enhanced raman scattering imaging of single living lymphocytes with multivariate evaluation. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(4):755–760, 2005.
- [236] K. E. Shafer-Peltier, A. S. Haka, J. T. Motz, M. Fitzmaurice, R. R. Dasari, and M. S. Feld. Model-based biological raman spectral imaging. *Journal of Cellular Biochemistry*, pages 125–137, 2002.
- [237] J. J. Andrew and T. M. Hancewicz. Rapid analysis of raman image data using two-way multivariate curve resolution. *Applied Spectroscopy*, 52(6):797–807, 1998.
- [238] K. K. Maiti, U. S. Dinish, C. Y. Fu, J.-J. Lee, K.-S. Soh, S.-W. Yun, R. Bhuvaneshwari, M. Olivo, and Y.-T. Chang. Development of biocompatible sers nanotag with increased stability by chemisorption of reporter molecule for in vivo cancer detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(2):398–403, 2010.

- [239] J. Wang, J. Delabie, H. Aasheim, E. Smeland, and O. Myklebost. Clustering of the som easily reveals distinct gene expression patterns: results of a reanalysis of lymphoma study. *BMC Bioinformatics*, 3(1):36, 2002.
- [240] P.J. Rousseeuw. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 20:53–65, 1987.
- [241] H.-W. Tang, X. B. Yang, J. Kirkham, and D. A. Smith. Probing intrinsic and extrinsic components in single osteosarcoma cells by near-infrared surface-enhanced raman scattering. *Analytical Chemistry*, 79(10):3646–3653, 2007.
- [242] N. A. Bright, B. J. Reaves, B. M. Mullock, and J. P. Luzio. Dense core lysosomes can fuse with late endosomes and are re-formed from the resultant hybrid organelles. *Journal of Cell Science*, 110(Pt 17):2027–40., 1997.
- [243] S. Duclos, R. Corsini, and M. Desjardins. Remodeling of endosomes during lysosome biogenesis involves ‘kiss and run’ fusion events regulated by rab5. *Journal of Cell Science*, 116(5):907–918, 2003.
- [244] J. Kneipp, H. Kneipp, B. Wittig, and K. Kneipp. One- and two-photon excited optical ph probing for cells using surface-enhanced raman and hyper-raman nano-sensors. *Nano Letters*, 7(9):2819, 2007.
- [245] C. E. Talley, L. Jusinski, C. W. Hollars, S. M. Lane, and T. Huser. Intracellular ph sensors based on surface-enhanced raman scattering. *Analytical Chemistry*, 76(23):7064–7068, 2004.
- [246] RA; Ando, NP; Pieczonka, PS; Santos, and RF Aroca. Chromic materials for responsive surface-enhanced resonance raman scattering systems: a nanometric ph sensor. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(11(34)):7505–7508, 2009.
- [247] K. L. Nowak-Lovato and K. D. Rector. Targeted surface-enhanced raman scattering nanosensors for whole-cell ph imagery. *Applied Spectroscopy*, 63(4):387–395, 2009.
- [248] S. B. Lee, K. Kim, and M. S. Kim. Surface-enhanced raman-scattering of ortho-mercaptobenzoic acid in silver sol. *Journal of Raman Spectroscopy*, 22(12):811–817, 1991.
- [249] L. Sun, B. Johnson, T. Wade, and R. M. Crooks. Selective electrostatic binding of ions by monolayers of mercaptan derivatives adsorbed to gold substrates. *Journal of Physical Chemistry*, 94(26):8869–8871, 1990.
- [250] W. Hill and B. Wehling. Potential- and ph-dependent surface-enhanced raman scattering of p-mercapto aniline on silver and gold substrates. *Journal of Physical Chemistry*, 97(37):9451–9455, 1993.
- [251] K. Kim and H. S. Lee. Effect of ag and au nanoparticles on the sers of 4-aminobenzenethiol assembled on powdered copper. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(40):18929–18934, 2005.

- [252] S. Thomas, N. Biswas, S. Venkateswaran, S. Kapoor, S. Naumov, and T. Mukherjee. Studies on adsorption of 5-amino tetrazole on silver nanoparticles by sers and dft calculations. *The Journal of Physical Chemistry A*, 109:9928–9934, 2005.
- [253] M. Osawa, N. Matsuda, K. Yoshii, and I. Uchida. Charge transfer resonance raman process in surface-enhanced raman scattering from p-aminothiophenol adsorbed on silver: Herzberg-teller contribution. *The Journal of Physical Chemistry*, 98(48):12702–12707, 1994.
- [254] K. Kim and J. K. Yoon. Raman scattering of 4-aminobenzenethiol sandwiched between ag/au nanoparticle and macroscopically smooth au substrate. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(44):20731–20736, 2005.
- [255] X. Q. Zou and S. J. Dong. Surface-enhanced raman scattering studies on aggregated silver nanoplates in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(43):21545–21550, 2006.
- [256] M. A.; Kramer D.; Hagenstrom H.; Kolb D. M.; Mandler D. Batz, V.; Schneeweiss. Electrochemistry and structure of the isomers of aminothiophenol adsorbed on gold. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 491:55–68, 2000.
- [257] R. Mazeikiene, G. Niaura, O. Eicher-Lorka, and A. Malinauskas. Raman spectro-electrochemical study of toluidine blue, adsorbed and electropolymerized at a gold electrode. *Vibrational Spectroscopy*, 47(2):105–112, 2008.
- [258] V. Zanker and W. Peter. Die prototropen formen des fluoresceins. *Chemische Berichte*, 91:572–580, 1958.
- [259] A. Matschulat, D. Drescher, and J. Kneipp. Surface-enhanced raman scattering hybrid nanoprobe multiplexing and imaging in biological systems. *ACS Nano*, 4(6):3259–3269, 2010.
- [260] S. H. Brewer, W. R. Glomm, M. C. Johnson, M. K. Knag, and S. Franzen. Probing bsa binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir*, 21(20):9303–9307, 2005.
- [261] J. Jose and K. Burgess. Benzophenoxazine-based fluorescent dyes for labeling biomolecules. *Tetrahedron*, 62(48):11021–11037, 2006.
- [262] C. D. Keating, K. M. Kovaleski, and M. J. Natan. Protein : colloid conjugates for surface enhanced raman scattering: Stability and control of protein orientation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(47):9404–9413, 1998.
- [263] J. Ghuman, P. A. Zunszain, I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, M. Otagiri, and S. Curry. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Journal of Molecular Biology*, 353(1):38–52, 2005.
- [264] P. A. Zunszain, J. Ghuman, T. Komatsu, E. Tsuchida, and S. Curry. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Structure Biology*, 3:6, 2003.

- [265] H. Ansell and J. Wharton. Vorlesungen über die physiologie und pathologie des blutes und der andern animalischen flüssigkeiten. In D.L. Posner, editor, *Bibliothek von Vorlesungen der vorzüglichsten und berühmtesten des Auslandes über Medizin, Chirurgie und Geburtshilfe*, volume 34, pages 8–506. Kristen Ernst Kollmann, Leipzig, [1839].
- [266] X.M. He and D. C. Carter. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 358:209–215, 1992.
- [267] A. Sulkowska. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 614(1-3):227–232, 2002.
- [268] S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, and N. Franks. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nature Structural Biology*, 5(9):827–835, 1998.
- [269] S. Cohen and R. Margalit. Binding of porphyrin to human serum-albumin - structure-activity-relationships. *Biochemical Journal*, 270(2):325–330, 1990.
- [270] S. S. Lateef, S. Gupta, L.i P. Jayathilaka, S. Krishnanchettiar, J.-S. Huang, and B.-S. Lee. An improved protocol for coupling synthetic peptides to carrier proteins for antibody production using dmf to solubilize peptides. *Journal of Biomolecular Techniques*, 18(3):173–176, 2007.
- [271] S.I. Dworetzky, R.E Lanford, and C.M. Feldherr. The effects of variations in the number and sequence of targeting signals on nuclear uptake. *The journal of Cell Biology*, 107:1279–1287, 1988.
- [272] F. Q. Li, H. Su, J. Wang, J. Y. Liu, Q. G. Zhu, Y. B. Fei, Y. H. Pan, and J. H. Hu. Preparation and characterization of sodium ferulate entrapped bovine serum albumin nanoparticles for liver targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 349(1-2):274–282, 2008.
- [273] S. C. Tseng, R. P. Feenstra, and B. D. Watson. Characterization of photodynamic actions of rose bengal on cultured cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 35(8):3295–3307, 1994.
- [274] M. S. Baptista and G. L. Indig. Effect of bsa binding on photophysical and photochemical properties of triarylmethane dyes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(23):4678–4688, 1998.
- [275] J. L. Riggs, R. J. Seiwald, J. H. Burckhalter, C. M. Downs, and T. G. Metcalf. Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *American Journal of Pathology*, 34(6):1081–1097, 1958.
- [276] A. C. Bhasikuttan, A. V. Sapre, and L. V. Shastri. Photoinduced electron transfer in crystal violet (cv⁺)–bovine serum albumin (bsa) system: evaluation of reaction paths and radical intermediates. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 150(1-3):59–66, 2002.

- [277] G. Hungerford, J. Benesch, J. F. Mano, and R. L. Reis. Effect of the labelling ratio on the photophysics of fluorescein isothiocyanate (fitc) conjugated to bovine serum albumin. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 6(2):152–158, 2007.
- [278] S. Cavalu, S. Cîntabreve, Pinzaru, N. Leopold, and W. Kiefer. Raman and surface enhanced raman spectroscopy of 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-yloxy-3-carboxamide labeled proteins: Bovine serum albumin and cytochrome c. *Biopolymers*, 62(6):341–348, 2001.
- [279] M. Iosin, F. Toderas, P. L. Baldeck, and S. Astilean. Study of protein-gold nanoparticle conjugates by fluorescence and surface-enhanced raman scattering. *Journal of Molecular Structure*, 924-926:196–200, 2009.
- [280] S. A. Moore, K. A. Glenn, and R. M. Palepu. Spectroscopic investigations on the interaction of crystal violet with nonionic micelles of brij and igepal surfactants. *Journal of Solid State Chemistry*, 36:563–571, 2007.
- [281] J. Bhattacharya, S. Jasrapuria, T. Sarkar, R. GhoshMoulick, and A. K. Dasgupta. Gold nanoparticle-based tool to study protein conformational variants: implications in hemoglobinopathy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1):14–19, 2007.
- [282] R. Timkovich. Detection of stable addition of carbodiimide to proteins. *Analytical Biochemistry*, 79(1-2):135–143, 1977.
- [283] T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, V. Tomas, and J. Fenoll. Determination of proteins in serum by fluorescence quenching of rose bengal using the stopped-flow mixing technique. *The Analyst*, 125(3):507–510, 2000.
- [284] A. A. Waheed, K. S. Rao, and P. D. Gupta. Mechanism of dye binding in the protein assay using eosin dyes. *Analytical Biochemistry*, 287(1):73–79, 2000.
- [285] I. Wengatz, R. D. Schmid, S. Kreissig, C. Wittmann, B. Hock, A. Ingendoh, and F. Hillenkamp. Determination of the hapten density of immuno-conjugates by matrix-assisted uv laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Letters*, 25(11):1983 – 1997, 1992.
- [286] K. Hirayama, S. Akashi, M. Furuya, and K. Fukuhara. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum-albumin by esims and frit-fab lc ms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173(2):639–646, 1990.
- [287] D. C. Carter, B. Chang, J. X. Ho, K. Keeling, and Z. Krishnasami. Preliminary crystallographic studies of four crystal forms of serum albumin. *European Journal of Biochemistry*, 226(3):1049–1052, 1994.
- [288] J. E. Patterson and D. M. Geller. Bovine microsomal albumin - amino terminal sequence of bovine proalbumin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 74(3):1220–1226, 1977.

-
- [289] P. Painter and J. L. Koenig. Raman spectroscopic study of the structure of antibodies. *Biopolymers*, 14(3):457–468, 1975.
- [290] L. G. C. Pereira, O. Theodoly, H. W. Blanch, and C. J. Radke. Dilatational rheology of bsa conformers at the air/water interface. *Langmuir*, 19(6):2349–2356, 2003.
- [291] V. Bloomfield. The structure of bovine serum albumin at low ph. *Biochemistry*, 5(2):684–689, 1966.
- [292] W. F. Harrington, P. Johnson, and R. H. Ottewill. Bovine serum albumin and its behaviour in acid solution. *Biochemical Journal*, 62(4):569–582, 1956.
- [293] D. C. Carter, X. M. He, S. H. Munson, P. D. Twigg, K. M. Gernert, M. B. Broom, and T. Y. Miller. 3-dimensional structure of human-serum albumin. *Science*, 244(4909):1195–1198, 1989.
- [294] H. Sugeta and A. Go. S-s and c-s stretching vibrations and molecular conformations of dialkyl disulfides and cystine. *Chemistry Letters*, (1):83–86, 1972.
- [295] H. Sugeta, A. Go, and T. Miyazawa. Vibrational-spectra and molecular-conformations of dialkyl disulfides. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 46(11):3407–3411, 1973.
- [296] H. Fabian and P. Anzenbacher. New developments in raman spectroscopy of biological systems. *Vibrational Spectroscopy*, 4(2):125–148, 1993.
- [297] G. D. Chumanov, R. G. Efremov, and I. R. Nabiev. Surface-enhanced raman spectroscopy of biomolecules. part i.—water-soluble proteins, dipeptides and amino acids. *Journal of Raman Spectroscopy*, 21:43–48, 1990.
- [298] A. M. Ahern and R. L. Garrell. Protein-metal interactions in protein-colloid conjugates probed by surface-enhanced raman spectroscopy. *Langmuir*, 7(2):254–261, 1991.
- [299] X. X. Han, H. Y. Jia, Y. F. Wang, Z. C. Lu, C. X. Wang, W. Q. Xu, B. Zhao, and Y. Ozaki. Analytical technique for label-free multi-protein detection-based on western blot and surface-enhanced raman scattering. *Analytical Chemistry*, 80(8):2799–2804, 2008.
- [300] T. Miyazawa and E. R. Blout. The infrared spectra of polypeptides in various conformations: Amide i and ii bands1. *Journal of the American Chemical Society*, 83(3):712–719, 1961.
- [301] X. Dou, Y. Yamaguchi, H. Yamamoto, S. Doi, and Y. Ozaki. Nir sers detection of immune reaction on gold colloid particles without bound/free antigen separation. *Journal of Raman Spectroscopy*, 29(8):739–742, 1998.
- [302] J. F. Foster, E. G. Samsa, and G. F. Hanna. Streaming orientation studies on denatured proteins. v. bovine serum albumin1. *Journal of the American Chemical Society*, 76(23):6044–6049, 1954.

- [303] A. Synytsya, P. Alexa, J. de Boer, M. Loewe, M. Moosburger, M. Würkner, and K. Volka. Raman spectroscopic study of serum albumins: an effect of proton- and gamma-irradiation. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38(12):1646–1655, 2007.
- [304] M. Manimaran and N. R. Jana. Detection of protein molecules by surface-enhanced raman spectroscopy-based immunoassay using 2-5 nm gold nanoparticle labels. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38:1326–1331, 2007.
- [305] Y. Misono, Y. Ohkata, T. Morikawa, and K. Itoh. Resonance raman and absorption spectroscopic studies on the electrochemical oxidation processes of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 436(1-2):203–212, 1997.
- [306] V. Guichard, A. Bourkba, O. Poizat, and G. Buntinx. Vibrational studies of reactive intermediates of aromatic amines. 2. free-radical cation and dication resonance raman spectroscopy of n,n,n',n'-tetramethylbenzidine and n,n,n',n'-tetraethylbenzidine. *The Journal of Physical Chemistry*, 93(11):4429–4435, 1989.
- [307] R. E. Hester and K. P. J. Williams. Resonance raman studies of the p-benzosemiquinone and p, p[prime or minute]-biphenylsemiquinone free-radical anions. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 78(3):573–584, 1982.
- [308] M. J. Weaver, D. S. Corrigan, P. Gao, D. Gosztola, and L. W. H. Leung. Some applications of surface raman and infrared spectroscopies to mechanistic electrochemistry involving adsorbed species. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 45:291–302, 1987.
- [309] A. Moissette, I. Gener, and C. Bremard. Probing the spontaneous ionization of aromatic amines by adsorption in activated acidic zeolite hzsm-5. *Journal of Raman Spectroscopy*, 33(5):381–389, 2002.
- [310] Xiaohui Ji Weiqing Xu Xiaoling Li Lianying Wang Yubai Bai Bing Zhao Xu, Shuping and Yukihiro Ozaki. Immunoassay using probe-labelling immunogold nanoparticles with silver staining enhancement via surface-enhanced raman scattering. *The Analyst*, 129:63–68, 2004.
- [311] Y. Cui, B. Ren, J.-L. Yao, R.-A. Gu, and Z.-Q. Tian. Synthesis of agcoreaushell bimetallic nanoparticles for immunoassay based on surface-enhanced raman spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(9):4002–4006, 2006.
- [312] L. B. Yang, W. D. Ruan, X. Jiang, B. Zhao, W. Q. Xu, and J. R. Lombardi. Contribution of zno to charge-transfer induced surface-enhanced raman scattering in au/zno/patp assembly. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(1):117–120, 2009.
- [313] D. Joseph and K. E. Geckeler. Surfactant-directed multiple anisotropic gold nanostructures: Synthesis and surface-enhanced raman scattering. *Langmuir*, 25(22):13224–13231, 2009.

- [314] Y. Chen, C. G. Wang, Z. F. Ma, and Z. M. Su. Controllable colours and shapes of silver nanostructures based on ph: application to surface-enhanced raman scattering. *Nanotechnology*, 18(32):325602, 2007.
- [315] L. Y. Cao, P. Diao, L. M. Tong, T. Zhu, and Z. F. Liu. Surface-enhanced raman scattering of p-aminothiophenol on a au(core)/cu(shell) nanoparticle assembly. *ChemPhysChem*, 6(5):913–918, 2005.
- [316] L.-S. Jiao, L. Niu, J. Shen, T. You, S. Dong, and A. Ivaska. Simple azo derivatization on 4-aminothiophenol/au monolayer. *Electrochemistry Communications*, 7:219–222, 2005.
- [317] R. A. Alvarez-Puebla, E. Arceo, P. J. G. Goulet, J. J. Garrido, and R. F. Aroca. Role of nanoparticle surface charge in surface-enhanced raman scattering. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(9):3787–3792, 2005.
- [318] T. H. Joo, M. S. Kim, and K. Kim. Surface-enhanced raman scattering of benzenethiol in silver sol. 18:57–60, 1987.
- [319] G. S. S. Saini, S. Kaur, S. K. Tripathi, C. G. Mahajan, H. H. Thanga, and A. L. Verma. Spectroscopic studies of rhodamine 6g dispersed in polymethylcyanoacrylate. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(4):653–658, 2005.
- [320] E. J. Liang, X. L. Ye, and W. Kiefer. Surface-enhanced raman spectroscopy of crystal violet in the presence of halide and halate ions with near-infrared wavelength excitation. *The Journal of Physical Chemistry A*, 101(40):7330–7335, 1997.
- [321] N. O. Mchedlov-Petrosyan, Yu. N. Surov, V. A. Trofimov, and A. Y. Tsivadze. Vibrational spectra of certain triphenylmethane dyes and their structure in solution. *Theoretical and Experimental Chemistry*, 26(6):644–653, 1991.
- [322] F. Ni, H. Feng, L. Gorton, and T. M. Cotton. Electrochemical and sers studies of chemically modified electrodes - Nile blue-a, a mediator for nadh oxidation. *Langmuir*, 6(1):66–73, 1990.
- [323] S. K. Miller, A. Baiker, M. Meier, and A. Wokaun. Surface-enhanced raman scattering and the preparation of copper substrates for catalytic studies. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I*, 80:1305–1312, 1984.
- [324] F. Zimmermann, B. Hossenfelder, J. C. Panitz, and A. Wokaun. Sers study of acridine orange and its binding to dna strands. *Journal of Physical Chemistry*, 98(48):12796–12804, 1994.
- [325] E. M. Nour, L. H. Chen, and J. Laane. Resonance raman and far-infrared studies of charge-transfer complexes of iodine. *Journal of Raman Spectroscopy*, 17(6):467–469, 1986.

- [326] G. Lévi, J. Pantigny, J. P. Marsault, and J. Aubard. Ser spectra of acridine and acridinium ions in colloidal silver sols. electrolytes and ph effects. *Journal of Raman Spectroscopy*, 24(11):745–752, 1993.
- [327] M. J. A. Canada, A. R. Medina, J. Frank, and B. Lendl. Bead injection for surface enhanced raman spectroscopy: automated on-line monitoring of substrate generation and application in quantitative analysis. *Analyst*, 127(10):1365–1369, 2002.
- [328] M. Jasiorski, A. Skoczylas, K. Hermanowicz, K. Haimann, W. Strek, and K. Maruszewski. Surface-enhanced raman spectra of substances adsorbed on ag₀ clusters deposited on sio₂ submicron spheres prepared by the sol-gel method. *Optical Materials*, 26(2):145–149, 2004.
- [329] B. N. Rospendowski, J. M. Campbell, J. Reglinski, and W. E. Smith. Direct spectroscopic determination of functional sulfhydryl-groups on intact cell-surfaces by surface-enhanced resonance raman-scattering. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 21(4):257–261, 1992.