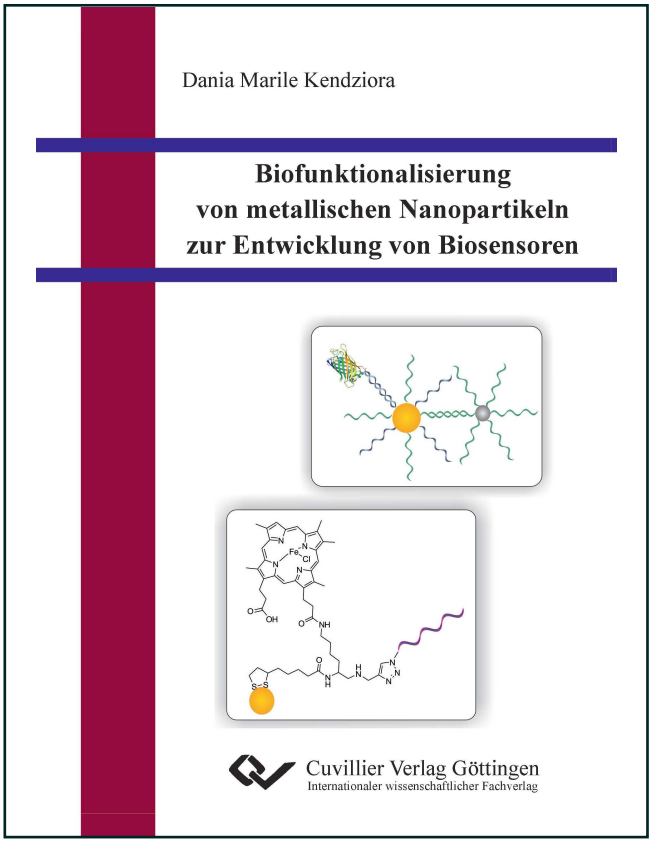
Dania Kendziora (Autor)

Biofunktionalisierung von metallischen Nanopartikeln zur Entwicklung von Biosensoren



https://cuvillier.de/de/shop/publications/6424

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: https://cuvillier.de

INHALTSVERZEICHNIS

Kurzzusammenfassung 9

1 Einleitung 11

1.1 Synthese und Eigenschaften von metallischen Nanopartikeln 11

1.1.1 Citrat-Methode zur Synthese von Gold Nanopartikeln 13

1.1.2 Synthese von Gold Nanopartikeln mit Thiol-Liganden 14

1.1.3 Photochemische Synthese von Gold Nanopartikeln 15

1.1.4 Polyol-Methode zur Synthese von metallischen Nanopartikeln 17

1.1.5 Synthese von fluoreszenten Gold Nanopartikeln 18

1.2 Biofunktionalisierung von metallischen Nanopartikeln 19

1.2.1 Linker zur Modifikation von Gold Nanopartikeln 20

1.2.2 Synthese von Gold Nanopartikel-DNA Konjugaten 21

1.2.3 Synthese von Nanopartikel-Protein Konjugaten 23

1.3 Anwendungen von metallischen Nanopartikeln 25

1.3.1 Fluoreszente Nanopartikel als optische Marker und Sensoren 26

1.3.2 Anwendungen von Nanopartikeln in der Oberflächen-verstärkten Raman Spektroskopie 27

1.3.3 Anwendungen von Nanopartikeln in der Tumorzellenforschung 28

1.3.4 Verwendung von Nanopartikeln als Biosensoren 30

1.4 Aufgabenstellung 32

2 Ergebnisse und Diskussion 34

2.1 Synthese von Nanopartikeln in Gegenwart von Metallothioneinen 34

2.1.1 Expression und Reinigung von Metallothionein-Fusionsproteinen 34

2.1.2 Photochemische Synthese von metallischen Nanopartikeln 36

2.2 Verknüpfung von Nanopartikeln mit BAG1-Peptiden 41

2.2.1 Modifikation des trifunktionellen Linkers mit einem Fluoreszenzmarker 43

2.2.2 Entfernung der Boc-Schutzgruppe des Atto610-modifizierten Linkers 45

2.2.3 Modifikation von BAG1 Peptiden durch Einführung eines Alkin 47

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

2.2.4 Modifikation eines Propargylglycin-BAG1-Peptids durch Kupfer-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition 59
2.2.5 Modifikation von magnetischen Nanopartikeln mit fluoreszent-markiertem trifunktionellen Linker 62
2.3 Synthese und Modifikation von Gold Nanopartikeln zur Anwendung in der Tumorzellenforschung 67
2.3.1 Synthese von Liponsäure-stabilisierten AuNP 68
2.4 Trifunktionelle Linkersysteme zur Modifikation von Gold Nanopartikeln 72
2.4.1 Synthese von Gold Nanopartikeln mit Boc-geschützten Liponsäure-Linkern 73
2.4.2 Synthese von Gold Nanopartikeln mit trifunktionellen Liponsäure-Linkern mit freien Aminen 75
2.4.3 Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition zur Modifikation von Alkin-funktionalisierten AuNP 82
2.4.4 Modifizierung der freien Aminogruppe der AuNP-L2a-DNA1 86
2.4.5 Untersuchung der Voraussetzungen für Immobilisierungsexperimente 89
2.4.6 DNA-vermittelte Immobilisierung von AuNP-DNA1-Häm 93
2.5 DNA-vermittelter Aufbau von Protein-AuNP-AgNP Konjugaten zum Nachweis in SERS-Experimenten 96
2.5.1 Synthese des EYFP-DNA4 Konjugats 97
2.5.2 Synthese von Citrat-stabilisierten AuNP 101
2.5.3 Modifikation von Citrat-stabilisierten AuNPs mit DNA-Oligonukleotiden 102
2.5.4 Test der Stabilität von DNA-modifizierten Nanopartikel 103
2.5.5 Immobilisierung von EYFP-DNA4 auf DNA-modifizierten AuNP 105
2.5.6 Direkte Hybridisierung von DNA-modifizierten Nanopartikeln mit einem fluoreszenten Protein 106
2.5.7 Oberflächen-verstärkte Raman-Spektroskopie des EYFP-AuNP-AgNP Konstrukts 109
3 Zusammenfassung und Ausblick 114
3.1 Synthese von Nanopartikeln in Gegenwart von Metallothioneinen 114
3.2 Verknüpfung von magnetischen Nanopartikeln mit BAG1-Peptiden 115
3.3 Synthese und Modifikation von Gold Nanopartikeln zur Anwendung in der Tumorzellenforschung 116

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

3.4 Trifunktionelle Linker zur Modifikation von Gold Nanopartikeln 117
3.5 DNA-vermittelter Aufbau von Protein-AuNP-AgNP Konjugaten zum Nachweis in SERS-Experimenten 118
4 Material und Methoden 120
4.1 Chemikalien 120
4.2 Pufferverzeichnis 120
4.3 Verwendete Methoden und Geräte 122
4.3.1 Oberflächen-verstärkte Raman Spektroskopie 122
4.3.2 Transmissionselektronenmikroskopie 122
4.3.3 Matrix-unterstützte Laser-Desorption Ionisation 123
4.3.4 UV-Vis und Fluoreszenz-Spektroskopie 123
4.3.5 Schnelle Flüssigkeitschromatographie 124
4.3.6 Hochdruckflüssigkeitschromatographie 124
4.3.7 Polyacrylamid Gelelektrophorese 125
4.3.8 Agarose Gelelektrophorese 127
4.3.9 Färbemethoden für die Gelelektrophorese 127
4.4 Modifikation eines trifunktionellen Linkers mit Atto610-NHS 128
4.5 Modifikation des HA-Peptids mit 3-Ethynylanillin durch Diazokupplung[178] 129
4.6 Kupfer-freie Azid-Alkin Cycloaddition mit Linker für Ene-artige Reaktion[139] 130
4.7 Synthese von Gold Nanopartikeln 131
4.7.1 Citrat-Methode[63] 131
4.7.2 Synthese von AuNP in Gegenwart von Liponsäure und Liponsäure-Derivaten[28] 132
4.7.3 Photochemische Synthese zur Bildung von Nanopartikeln[29] 133
4.8 Modifikation von Liponsäure-AuNP mit Octadecylamin 134
4.9 Kupfer-katalysierte Azid-Akin Cycloaddition zur Modifikation von AuNP-L2 mit Azid-DNA[143] 134
4.10 Kovalente Verknüpfung von Häm mit AuNP-L2a-DNA1 135
4.11 Rekonstitution von Apo-Myoglobin durch Häm-DNA-AuNPs 135
4.12 Synthese von AuNP-Mb 136
4.13 Synthese des Myoglobin-DNA1 Konjugats 136
4.14 DNA-vermittelte Immobilisierung von AuNP 137
4.14.1 Beschichtung von Mikrotiterplatten mit Streptavidin 137
4.14.2 Immobilisierung von DNA-AuNP 137

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

4.14.3 Bestimmung der Aktivität von Myoglobin durch AmpliFluRed™ 138

4.15 DNA-vermittelter Aufbau von AuNP-AgNP-Protein Konjugaten 138

4.15.1 DNA-Modifizierung von Nanopartikeln durch Ligandenaustausch 138

4.15.2 Synthese von EYFP-DNA4 Konjugaten 139

4.15.3 Testhybridisierung verwendeter DNA-Sequenzen 139

4.15.4 Hybridisierung von AuNP-DNA2-cDNA4 mit EYFP-DNA4 139

4.15.5 Hybridisierung von AuNP-DNA2-cDNA4 mit AgNP-cDNA2 und EYFP-DNA4 . 140

4.16 Verwendete DNA-Sequenzen 141

4.17 Expression von Metallothionein-Fusionsproteinen 141

4.18 Amylose Affinitätschromatographie 142

5 Abkürzungsverzeichnis 143

6 Literatur 146

7 Danksagung 152

8 Lebenslauf 154

9 Publikationen 155

10 Konferenzbeiträge 155

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.