



(10) **DE 10 2009 050 287 A1** 2011.05.26

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2009 050 287.4**

(22) Anmeldetag: **20.10.2009**

(43) Offenlegungstag: **26.05.2011**

(51) Int Cl.: **C12Q 1/00 (2006.01)**

(71) Anmelder:

**Friedrich-Schiller-Universität Jena, 07743 Jena,
DE**

(72) Erfinder:

**Möller, Robert, Dr., 07743 Jena, DE; Popp, Jürgen,
Prof. Dr., 07751 Jena, DE; Schüler, Thomas, 07745
Jena, DE; Strelau, Katharina, 07745 Jena, DE**

(74) Vertreter:

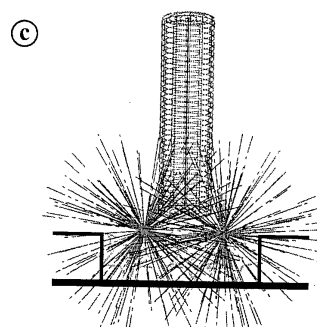
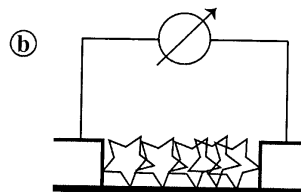
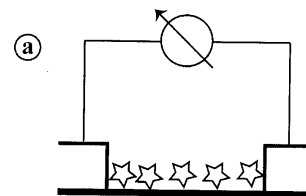
**Patent- und Rechtsanwaltskanzlei Bock Bieber
Donath Partnerschaftsgesellschaft, 07745 Jena**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
siehe Folgeseiten

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **SERS-Substrat**



(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein neuartiges SERS-Substrat, ein Verfahren zu dessen Herstellung, ein Verfahren zu dessen Überprüfung und dessen Verwendung. Die Aufgabe der Erfindung, neuartige SERS-Substrate bereitzustellen, die im Vergleich zu Reinraum-SERS-Substraten preiswert herstellbar sind und die gegenüber zufällig angeordneten Metallpartikel-SERS-Substraten weitestgehend geordnete Partikelstrukturen aufweisen, wird dadurch gelöst, dass die SERS-Substrate aus enzymatisch auf einer Substratoberfläche abgeschiedenen Nanopartikeln aus Metall bestehen und die Charakterisierung der SERS-Aktivität über elektrische Leitfähigkeitsmessungen oder Grauwertanalyse erfolgt.

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

FESTAG, G., u.a.: Growth and percolation of metal nanostructures in electrode gaps leading to conductive paths for electrical DNA analysis. Nanotechnology (2008) 19 (12) 125303/1-125303/9

MÖLLER, R., u.a.: Enzymatic Control of Metal Deposition as Key Step for a Low-Background Electrical Detection for DNA Chips. Nano Lett. (2005) 5 (7) 1475-1482

Internetdokument, Adresse www.springerlink.com/content/kq23u42153636g44/,
Zusammenfassung zu: **SCHÜLER, t. u.a.: Enzyme-induced growth of silver nanoparticles studied on single particle level. J. Nanoparticle research (Mai 2009, elektronisch veröffentlicht 13.09.2008) 11 (4) 939-946 [recherchiert am 29.04.2010]**

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein neuartiges SERS-Substrat, ein Verfahren zu dessen Herstellung, ein Verfahren zu dessen Überprüfung und dessen Verwendung.

[0002] Enzyme zur Herstellung von Nanopartikeln sind bspw. aus US 6,670,113 bekannt. Gemäß dieser Offenbarung werden Enzyme genutzt, um Metallpartikel abzuscheiden oder anzureichern (Reaktion von Enzymen mit Metallionen um eine Metallabscheidung zu erreichen).

[0003] Gemäß US 6,670,113 wird dabei wie folgt verfahren:

- Verwendung des Enzyms Meerrettich-Peroxidase
- Aufbringen des Enzyms auf Oberfläche, eintrocknen lassen
- Inkubation mit 1 ml 0,2% Silberacetat in Wasser für 3 min
- 2x mit Wasser waschen
- 1 ml Lösung bestehend aus 2,5 mg/ml Hydrochinon, 1 mg/ml Silberacetat und 0,06% Wasserstoffperoxid in 0,1 M Citratpuffer pH 3,8 zugeben
- Silberabscheidung innerhalb einer Minute sichtbar
- Verwendung dieses Prinzips für biologische Anwendungen wie z. B. Immunfärbung,
- Detektion von Bakterien, in Situ Hybridisierung, Detektion von einzelnen Genen,
- Visualisierung mit dem bloßen Auge
- Visualisierung mittels Mikroskop
- Reflexion
- Elektronmikroskopie
- Polarographische, elektrochemische, elektrische Detektion
- X-ray Spektroskopie
- Chemische Tests
- Detektion über die Masse
- Lichtstreuung
- Magnetische Detektion
- Autometallographie
- Scanning Probe Microscopy

[0004] Aus der Publikation R. Möller, R. D. Powell, J. F. Hainfeld, W. Fritzsche, Nano Lett. 2005, 5, 1475–1482 sind Nanopartikel für die elektrische Detektion bekannt. Gemäß dieser Publikation wird eine Enzymreaktion als Alternative zu den modifizierten sphärischen Nanopartikeln für einen elektrischen DNA-Nachweis verwendet.

[0005] Dabei wird wie folgt verfahren:

- Anbindung von Streptavidin – modifizierter Meerrettich – Peroxidase an Biotin – modifizierte DNA
- Zugabe des EnzMet™ – Kits → enzymatische Silberabscheidung
- Detektion über Auslesen der elektrischen Leitfähigkeit der einzelnen DNA-Spots

[0006] Das Verfahren der Nutzung eines Enzyms zur Anbindung von Nanopartikeln an die DNA ist eine Alternativmethode zu Streptavidin – modifizierten sphärischen Goldnanopartikeln. Der Vorteil bei der Verwendung von Enzymen besteht in der Reduzierung des Hintergrundsignals durch die hochspezifische Reaktion des Enzyms, was zu einer höheren Sensitivität führt.

[0007] US 2003/0211488 A1 offenbart die Verwendung von Nanopartikeln als SERS-Substrate.

[0008] Dabei wird wie folgt verfahren:

- Modifizierung von Goldnanopartikeln mit Thiol – modifizierter DNA mit internem Raman-Label
- Nutzung dieses DNA-Nanopartikel-Komplexes als Label für einen sequenzspezifischen DNA-Nachweis
- Detektion über Oberflächenverstärkte Raman Spektroskopie
- Erhöhung der Verstärkung und damit Erhöhung des Signals durch zusätzliche Silberabscheidung an Goldnanopartikeln
- Die zusätzliche Silberverstärkung ermöglicht zusätzlich eine optische Auswertung

[0009] Die Nachteile dieser technischen Lösung sind, dass eine umständliche Modifizierung der Goldnanopartikel mit Thiol – modifizierter DNA erfolgen muss, keine Aussagen über zeitliche Dauer der Silberabscheidung getroffen werden können und keine Aussagen möglich sind, ob das SERS-Signal nach bestimmter Silberabscheidungszeit abfällt.

[0010] Aus der Publikation Z. Wang, L. J. Rothberg, Appl. Phys. B 84, 289–293 (2006) ist bekannt, dass eine Abhängigkeit der SERS-Verstärkung von der Dichte der Silberfilme auf einer Oberfläche abhängt, bei geringer Belegung der Oberfläche mit Silber (einzelne Silberpartikelinseln) nur eine sehr geringe SERS-Verstärkung erfolgt, mit zunehmender Größe und Dichte der Silberpartikelinseln ein Anstieg der SERS-Verstärkung erfolgt und für den Fall, dass sich eine leitfähige Schicht aus den Silberpartikelinseln bildet, die SERS-Verstärkung wieder abfällt.

[0011] US 2004 018 03 79 sind SERS-Substrate und ihre Charakterisierung bekannt als Biosensor für die Detektion von intrazellulären Analyten mittels SERS, wobei das SERS-Substrat mit Nanosphere Lithography oder FON hergestellt wird (film over nanospheres).

[0012] Aus der Publikation N. Felidj, J. Aubard, and G. Levi, J. R. Krenn, A. Hohenau, G. Schider, A. Leitner, and F. R. Aussenegg, Appl. Phys. Lett., Vol. 82, No. 18 ist folgendes bekannt, dass SERS-Substrate mittels Elektronenstrahl-Lithographie hergestellt werden können, wobei ein hochreproduzierbares SERS-Substrat ausbildbar ist, das auf einen schmalbandigen Wellenlängenbereich einstellbar ist.

[0013] Die Nachteile der bisher bekannten SERS-Substrate sind:

- hochreproduzierbare SERS-Substrate (hergestellt bspw. mit EBL) sind sehr teuer,
- günstige SERS-Substrate sind nicht großflächig reproduzierbar und müssen somit charakterisiert werden,
- für die Charakterisierung wird das SERS-Substrat üblicherweise mit einem Ramanreporter belegt und das SERS-Signal dieses Reporters gemessen, anschließend muss der Reporter wieder entfernt werden, damit das SERS-Substrat für die Analyse von anderen Analyten genutzt werden kann,
- häufig wird aus einer Charge SERS-Substrate nur ein einzelnes charakterisiert und dessen Ergebnisse auf die anderen übertragen, da sich die Ramanreporter meist nicht vollständig entfernen lassen
- SERS-Substrate immer nur für einen bestimmten (meist recht schmalbandigen) Wellenlängenbereich (100–200nm) einsetzbar.

[0014] Darüber hinaus ist u. a. aus den Publikationen Schüler, T., Steinbrück, A., Festag, G., Möller, R. und Fritzsche, W. "Enzyme-induced growth of silver nanoparticles studied at single particle level", Journal of Nanoparticle Research (2008) und Festag, G., Schüler, T., Möller, R., Csaki, A. und Fritzsche, W. „Growth and percolation of metal nanostructures in electrode gaps leading to conductive paths for electrical DNA analysis, Nanotechnology (2008), 19 die Enzyminduzierte Silberpartikelabscheidung an sich bekannt.

[0015] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, die Nachteile des Standes der Technik zu vermeiden, insbesondere neuartige SERS-Substrate bereit zu stellen, die im Vergleich zu Reinraum-SERS-Substraten preiswert herstellbar sind und die gegenüber zufällig angeordneten Metallpartikel-SERS-Substraten weitestgehend geordnete Partikelstrukturen aufweisen, sowie ein Verfahren zu deren Herstellung und ein Verfahren zu deren Überprüfung anzugeben.

[0016] Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die Merkmale des 1., des 6. und des 12. Patentanspruchs gelöst. Weitere günstige Ausgestaltungsmöglichkeiten der Erfindung sind in den nachgeordneten Patentansprüchen angegeben.

[0017] Das Wesen der Erfindung besteht darin, dass SERS-Substrate in Form von enzymatisch hergestellten Nanopartikeln auf Substratoberflächen bereit gestellt werden.

[0018] Die erfindungsgemäßen, enzymatisch hergestellten Nanopartikel, insbesondere enzymatisch hergestellten Silbernanopartikel, können auf beliebigen 2D- oder 3D-Substratoberflächen aufgebracht werden. Neben üblichen 2D-Oberflächen/Materialien, wie bspw. Glas oder Silizium, können auch Polymere oder Hydrogele verwendet werden. Grundsätzlich eignet sich jedes Material, das die Möglichkeit besitzt, erfindungsgemäß ein Enzym auf der Trägersoberfläche zu immobilisieren.

[0019] Auf einem Substrat, bspw. Glas, Silizium, Polymere, werden gemäß der Erfindung zwischen zwei Elektroden Linker-Moleküle, bspw. einzelsträngige DNA verankert, an welche Enzym-Moleküle, wie bspw. ein Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex, gebunden sind, vermittels deren Enzymaktivität eine Abscheidung von charakteristisch geformten Silbernanopartikeln auf dem Substrat erfolgt.

[0020] Die enzymatische Reaktion kann von verschiedenen Enzymen katalysiert werden. Neben der enzymatischen Abscheidung von Silber ist auch die Herstellung von anderen Metallnanopartikeln möglich. Bspw. kann neben der Meerrettich-Peroxidase induzierten Silberabscheidung auch Glukoseoxidase oder alkalische Phosphatase zum Einsatz kommen.

[0021] Die charakteristische Form der enzymatisch abgeschiedenen (gewachsenen) Silberpartikel zeichnet sich durch ein Wüstenrosenähnliches Wachstum aus. Die gebildeten Partikel (mit Wüstenrosen-Form) besitzen spitze, eckige Strukturen, wodurch sie sich deutlich von herkömmlichen sphärischen metallischen Nanopartikeln unterscheiden. Wie in der REM-Aufnahme in [Fig. 2](#) zu sehen ist, bestehen die Einzelpartikel dabei aus verschiedenen Plättchen, welche ineinander und nebeneinander wachsen und dadurch die ausgeprägten Wüstenrosen ähnlichen Formationen bilden ([Fig. 3](#)).

[0022] Aufgrund dieses Partikelwachstums können diese enzymatisch hergestellten Partikel selbst bei hohen Partikeldichten, bis hin zu einer geschlossenen leitfähigen Schicht, als SERS-Substrat verwendet werden. Ihre eckigen und rauen Nanostrukturen führen durch die lokalen Überhöhungen des elektromagnetischen Feldes zu einer Verhinderung des Zusammenbrechens der SERS-Aktivität. Dadurch ist es möglich die SERS-Aktivität dieser enzymatisch hergestellten metallischen Nanostrukturen mit Hilfe einer einfachen elektrischen Leitfähigkeitsmessung zu charakterisieren.

[0023] Die enzymatische Reaktion kann gemäß der Erfindung von verschiedenen Enzymen katalysiert werden. Neben der Abscheidung von Silber ist auch die Herstellung von anderen Metallnanopartikeln möglich. Beispielsweise kann neben der Meerrettichperoxidase induzierten Silberabscheidung auch Glukoseoxidase oder alkalische Phosphatase zum Einsatz kommen.

[0024] Da die enzymatische Abscheidung der Metallnanopartikel, insbesondere der Silbernanopartikel auf dem Substrat zwischen den beiden Elektroden, von der Konzentration der Linker-Moleküle abhängig ist, wird die Metallnanopartikeldichte, insbesondere die Silbernanopartikeldichte (optimal etwa 50 bis 70%) erfindungsgemäß durch die Konzentration der Linker-Moleküle (bspw. einzelsträngige DNA beliebiger Sequenz, die endständig Amin- und Biotin-modifiziert ist) eingestellt. Bspw. kann durch eine Linker-Konzentration von 5 μM eine Partikeldichte von etwa 60% eingestellt werden.

[0025] Zu Immobilisierung des Enzyms auf der Substratoberfläche wird ein Linkermolekül benötigt. Das Linkermolekül muss in seiner Eigenschaft eine Bindungsfunktionalität für das Enzym besitzen (bspw. Biotin). Und zusätzlich eine weitere Funktionalität, um auf der Trägeroberfläche zu binden (bspw. eine Amino-Modifizierung). Als Linkermolekül kann somit zum Beispiel DNA verwendet werden, welche endständig Biotin als auch Amino-modifiziert ist.

[0026] In Folge eines weiteren Wachstums der enzymatisch hergestellten Silbernanopartikel auf dem Substrat wird gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren eine metallische Verbindung zwischen den beiden Elektroden generiert.

[0027] Diese metallische Verbindung zwischen den beiden Elektroden wird erfindungsgemäß dazu verwendet, durch eine einfache Leitfähigkeitsmessung die SERS-Aktivität der neuartigen SERS-Substrate zu bestimmen, da überraschend gefunden wurde, dass eine Beziehung zwischen der SERS-Aktivität und der Leitfähigkeit der erfindungsgemäßen SERS-Substrate (enzymatisch abgeschiedene Metallnanopartikel, insbesondere Silbernanopartikel, auf einem Substrat zwischen zwei Elektroden) besteht.

[0028] Die erfindungsgemäßen SERS-Substrate zeigen zwischen etwa 1 bis 10 μS ihre höchste SERS-Aktivität, wohin gegen bei SERS-Substraten gemäß dem Stand der Technik bei etwa 1 μS die SERS-Aktivität bereits zusammen bricht.

[0029] Im Rahmen der Erfindung liegt aber auch neben dieser elektrischen SERS-Substrat-Analyse die Charakterisierung der SERS-Aktivität über Grauwertanalyse (optische Analyse).

[0030] Der besondere Vorteil der erfindungsgemäßen SERS-Substrate in Form von enzymatisch hergestellten Metallnanopartikeln, insbesondere enzymatisch hergestellten Silbernanopartikeln, besteht darin, dass diese zur Charakterisierung der SERS-Aktivität über elektrische Leitfähigkeit oder Grauwertanalyse verwendet werden, wodurch eine Charakterisierung der SERS-Substratoberfläche in sehr kurzer Zeit möglich ist und nicht direkt vor deren bestimmungsgemäßen Einsatz erfolgen muss (entgegen dem Stand der Technik keine umständlichen Charakterisierungen unter Verwendung von Standardmolekülen notwendig), bzw. dass keine teuren, im Reinraum hergestellten SERS-Substrate nötig sind, um gute SERS-Messungen durchführen zu können. Dies ist auf Grund der Wüstenrosen-ähnlichen Struktur der enzymatisch abgeschiedenen Silbernanopartikel (**Fig. 3**) möglich. Diese Struktur verhindert durch die vielen nadelartigen Vorsprünge einen Abfall der SERS-Aktivität bei der Ausbildung einer leitfähigen Schicht von enzymatisch abgeschiedenen Silbernanopartikeln. Dadurch ist eine Charakterisierung der SERS-Aktivität der enzymatisch abgeschiedenen Silbernanopartikel auch bei größeren Partikeldichten möglich. Dies steht im Gegensatz zu dem Verhalten von sphärischen Nanopartikeln. Diese Eigenschaft ermöglicht eine einfache und schnelle Charakterisierung der SERS-Substrate über die elektrische Leitfähigkeit. Zusätzlich ist eine optische Charakterisierung über die Analyse der Grauwerte möglich.

[0031] Weiterhin zeigen die erfindungsgemäßen, enzymatisch abgeschiedenen Metallnanopartikel, insbesondere Silbernanopartikel, einen breiten Absorptionsbereich. Während der Absorptionsbereich von sphärischen Nanopartikeln sehr schmalbandig ist (im Durchschnitt 50–200 nm), reicht der Absorptionsbereich der enzymatisch abgeschiedenen Silbernanopartikel vom nahen UV bis in den IR-Bereich. Dies ermöglicht die Verwendung der enzymatisch abgeschiedenen Silbernanopartikel mit den verschiedensten Anregungsfrequenzen, da diese im Absorptionsbereich des Metall-Substrates liegen müssen.

[0032] Außerdem ist es möglich diese SERS-Substrate auch für quantitative Analysen zu nutzen. Dazu werden mehrere SERS-Substrate hergestellt. Durch die Messung der elektrischen Leitfähigkeit werden die SERS-Substrate hinsichtlich ihrer SERS-Aktivität charakterisiert, um die Messungen auf verschiedenen SERS-Substraten vergleichbar zu machen. Anschließend werden die SERS-Substrate mit verschiedenen Konzentrationen der Analytlösung inkubiert und vermessen. Mithilfe der somit ermittelten Kalibrationsreihe können anschließend unbekannte Konzentrationen bestimmt werden.

[0033] Die erfindungsgemäßen SERS-Substrate können bspw. für die Detektion von niedermolekula-

ren Substanzen (bspw. Farbstoffe, Antibiotika) von Biomolekülen (bspw. DNA, PNA, Proteine), von Naturstoffen und von organischen Polymeren verwendet werden.

[0034] Die Erfindung wird nachstehend an Hand der Zeichnungen und der Ausführungsbeispiele näher erläutert. Es zeigen:

[0035] **Fig. 1:** eine schematische Darstellung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung der erfindungsgemäßen SERS-Substrate (Immobilisierung von Meerrettich-Peroxidase-Molekülen im Elektrodenspalt und enzymatische Abscheidung von Metallnanopartikeln, insbesondere Silbernanopartikeln, auf einer Substratoberfläche),

[0036] **Fig. 2:** eine Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen SERS-Substrates (Metallpartikel in Form von Silberpartikeln mit Wüstenrosen-ähnlicher Form auf Substratoberfläche, hergestellt nach dem in **Fig. 1** schematisch dargestellten Verfahren) und

[0037] **Fig. 3:** eine schematische Darstellung einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen SERS-Substrates (Metallpartikel auf Substratoberfläche).

Ausführungsbeispiel 1

Herstellung einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen SERS-Substrates

- Waschen der Trägermaterialien 5 min im Ultraschallbad in Azeton, Ethanol und destilliertem H₂O
- Trocknung unter Stickstoff
- Nasschemische Aktivierung mit einer 1:1:1 (v/v/v)-Mischung von konz. HCl:H₂O₂:H₂O für 10 min bei 20°C
- gründliche Reinigung mit destilliertem H₂O
- Trocknung mit Stickstoff und abschließend im Trockenofen bei 80–100°C für 5 min
- alternativ physikalische Aktivierung mit Hilfe eines Plasmastrippers bei 1 mbar bei 400 W für 30 min
- alternativ Aktivierung mittels Plasmaätzen in einem zweistufigen Prozess: 30 sec im Argonplasma bei 50 W und 5 Pa und 5 min im Sauerstoffplasma bei 50 W und 5 Pa
- Silanisierung mit 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (GOPS) in einer 10 mM Lösung GOPS in wasserfreiem Toluol für 6 h bei 70°C unter permanentem Rühren
- anschließend jeweils zweimal 5 min in Toluol, Ethanol und Wasser waschen
- Spotten der Biotin-modifizierten Fänger-DNA in 3 × SSC oder 150 mM Phosphatpuffer (PB) jeweils mit pH 8,5
- Inkubation der gespotteten Trägermaterialien für 3 h in einer Feuchtkammer bei 37°C

- 5 min Waschen in einer 0,1%-igen wässrigen Triton X-100 Lösung
- Reinigung für 2 × 2 min in HCl pH 4,0 und 10 min in einer 100 mM KCl Lösung
- kurz mit destilliertem H₂O waschen
- 15 min in eine 50 mM Ethanolaminlösung mit 0,1% SDS in Tris pH 9,0 inkubieren
- kurz mit destilliertem H₂O waschen und unter Stickstoff trocknen
- Anbindung des Enzymkomplexes in einer 1:1000 Verdünnung in PBS pH 7,4/0,05% Tween 20 für 1 h bei 20°C
- 6 × 5 min mit PBS pH 7,4/0,05% Tween 20 waschen
- Spülen mit destilliertem H₂O
- mit Stickstoff trocknen
- Inkubation der Trägeroberfläche mit EnzMet™ Kit zur Silberabscheidung für 5 min
- Stoppen der Reaktion durch Waschen mit destilliertem H₂O
- unter Stickstoff trocknen

Überprüfung/Charakterisierung

- Charakterisierung der SERS-Aktivität über die Messung der elektrischen Leitfähigkeit
- Liegt die elektrische Leitfähigkeit der Substrate zwischen 1 µS und 10 µS kann das Substrat verwendet werden

Ausführungsbeispiel 2

SERS-Messungen mit dem gemäß Ausführungsbeispiel 1 hergestellten SERS-Substrat zum Nachweis von niedermolekularen Substanzen in Form von Farbstoffen

- Inkubation des SERS-Substrates mit Farbstofflösung (z. B. Kristallviolett oder Carboxyfluoreszein) definierter Konzentration für 1 h bei Raumtemperatur
- Abpusten der Farbstofflösung mit Druckluft und Trocknen der SERS-Substrate
- Messen der SERS-Spektren des Farbstoffes mit Raman-Mikroskop und frequenzverdoppeltem Nd:YAG-Laser
- Durch Vermessen verschiedener Konzentrationen ist die Aufstellung einer Kalibrationsgerade möglich, welche im Anschluss die Ermittlung unbekannter Analytkonzentrationen ermöglicht

Ausführungsbeispiel 3

SERS-Messungen mit dem gemäß
Ausführungsbeispiel 1 hergestellten SERS-
Substrat zum Nachweis von niedermolekularen
Substanzen in Form von Antibiotika

- Inkubation des SERS-Substrates mit Lösung des Antibiotikums (z. B. Vancomycin oder Ciprofloxacin) definierter Konzentration für 1 h bei Raumtemperatur
- Abpusten der Antibiotikum-Lösung mit Druckluft und Trocknen der SERS-Substrate
- Messen der SERS-Spektren des Antibiotikums mit Raman-Mikroskop und frequenzverdoppeltem Nd:YAG-Laser
- Durch Vermessen verschiedener Konzentrationen ist die Aufstellung einer Kalibrationsgerade möglich, welche im Anschluss die Ermittlung unbekannter Analytkonzentrationen ermöglicht

Ausführungsbeispiel 4

Herstellung der SERS-Substrate
und deren Verwendung für SERS-
Messungen zum DNA-Nachweis

Variante a)

- Waschen der Trägermaterialien 5 min im Ultraschallbad in Azeton, Ethanol und destilliertem H₂O
- Trocknung unter Stickstoff
- Nasschemische Aktivierung mit einer 1:1:1 (v/v/v)-Mischung von konz. HCl:H₂O₂:H₂O für 10 min bei 20°C
- gründliche Reinigung mit destilliertem H₂O
- Trocknung mit Stickstoff und abschließend im Trockenofen bei 80–100°C für 5 min
- alternativ physikalische Aktivierung mit Hilfe eines Plasmastrippers bei 1 mbar bei 400 W für 30 min
- alternativ Aktivierung mittels Plasmaätzen in einem zweistufigen Prozess: 30 sec im Argonplasma bei 50 W und 5 Pa und 5 min im Sauerstoffplasma bei 50 W und 5 Pa
- Silanisierung mit 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (GOPS) in eine 10 mM Lösung GOPS in wasserfreiem Toluol für 6 h bei 70°C unter permanentem Rühren
- anschließend jeweils zweimal 5 min in Toluol, Ethanol und Wasser waschen
- Spotten der Biotin-modifizierten Fänger-DNA in 3 × SSC oder 150 mM Phospatpuffer (PB) jeweils mit pH 8,5
- Inkubation der gespotteten Trägermaterialien für 3 h in einer Feuchtkammer bei 37°C
- 5 min Waschen in einer 0,1%-igen wässrigen Triton X-100 Lösung
- Reinigung für 2 × 2 min in HCl pH 4,0 und 10 min in einer 100 mM KCl Lösung

- kurz mit destilliertem H₂O waschen
- 15 min in eine 50 mM Ethanolaminlösung mit 0,1% SDS in Tris pH 9,0 inkubieren
- kurz mit destilliertem H₂O waschen und unter Stickstoff trocknen
- einzelsträngige Proben-DNA in 5 × SSC pH 7,0/0,1% SDS aufnehmen und anschließend zur Hybridisierung auf die Trägeroberfläche geben
- Inkubation für zwei Stunden bei der Hybridisierungstemperatur im Hybridisierungssofen
- jeweils 5 min in 2 × SSC/0,1% SDS; 2 × SSC und 0,2 × SSC waschen, mit Stickstoff trocken blasen und bei 4°C im Kühlschrank lagern
- einzelsträngige, am 3' oder/und 5' Ende mit einem Ramanaktiven Molekül modifizierten Label-DNA in 5 × SSC pH 7,0/0,1% SDS aufnehmen und anschließend zur Hybridisierung auf die Trägeroberfläche geben
- Inkubation für zwei Stunden bei der Hybridisierungstemperatur im Hybridisierungssofen
- jeweils 5 min in 2 × SSC/0,1% SDS; 2 × SSC und 0,2 × SSC waschen, mit Stickstoff trocken blasen und bei 4°C im Kühlschrank lagern
- Anbindung des Enzymkomplexes in einer 1:1000 Verdünnung in PBS pH 7,4/0,05% Tween 20 für eine Stunde bei 20°C entweder in der Hybridisierungskammer
- 6 × 5 min mit PBS pH 7,4/0,05% Tween 20 waschen
- Spülen mit destilliertem H₂O
- mit Stickstoff trocknen
- Inkubation der Trägeroberfläche mit EnzMet™ Kit zur Silberabscheidung für 5 min
- Stoppen der Reaktion durch Waschen mit destilliertem H₂O
- unter Stickstoff trocknen
- Charakterisierung der SERS-Aktivität über die Messung der elektrischen Leitfähigkeit
- Liegt die elektrische Leitfähigkeit der Substrate zwischen 1 μS und 10 μS kann das Substrat verwendet werden
- Detektion des Raman-aktiven Moleküls mittels eines konventionellen Mikro-Raman-Spektrometers

Variante b)

- Waschen der Trägermaterialien 5 min im Ultraschallbad in Azeton, Ethanol und destilliertem H₂O
- Trocknung unter Stickstoff
- Nasschemische Aktivierung mit einer 1:1:1 (v/v/v)-Mischung von konz. HCl:H₂O₂:H₂O für 10 min bei 20°C
- gründliche Reinigung mit destilliertem H₂O
- Trocknung mit Stickstoff und abschließend im Trockenofen bei 80–100°C für 5 min
- alternativ physikalische Aktivierung mit Hilfe eines Plasmastrippers bei 1 mbar bei 400 W für 30 min

- alternativ Aktivierung mittels Plasmaätzen in einem zweistufigen Prozess: 30 sec im Argonplasma bei 50 W und 5 Pa und 5 min im Sauerstoffplasma bei 50 W und 5 Pa
- Silanisierung mit 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (GOPS) in eine 10 mM Lösung GOPS in wasserfreiem Toluol für 6 h bei 70°C unter permanentem Rühren
- anschließend jeweils zweimal 5 min in Toluol, Ethanol und Wasser waschen
- Spotten der Biotin-modifizierten Fänger-DNA in 3 × SSC oder 150 mM Phospatpuffer (PB) jeweils mit pH 8,5
- Inkubation der gespotteten Trägermaterialien für 3 h in einer Feuchtkammer bei 37°C
- 5 min Waschen in einer 0,1%-igen wässrigen Triton X-100 Lösung
- Reinigung für 2 × 2 min in HCl pH 4,0 und 10 min in einer 100 mM KCl Lösung
- kurz mit destilliertem H₂O waschen
- 15 min in eine 50 mM Ethanolaminlösung mit 0,1% SDS in Tris pH 9,0 inkubieren
- kurz mit destilliertem H₂O waschen und unter Stickstoff trocknen
- einzelsträngige Proben-DNA in 5 × SSC pH 7,0/0,1% SDS aufnehmen und anschließend zur Hybridisierung auf die Trägeroberfläche geben
- Inkubation für zwei Stunden bei der Hybridisierungstemperatur im Hybridisierungssofen
- jeweils 5 min in 2 × SSC/0,1% SDS; 2 × SSC und 0,2 × SSC waschen, mit Stickstoff trocknen blasen und bei 4°C im Kühlschrank lagern
- Anbindung des Enzymkomplexes in einer 1:1000 Verdünnung in PBS pH 7,4/0,05% Tween 20 für 1 h bei 20°C
- 6 × 5 min mit PBS pH 7,4/0,05% Tween 20 waschen
- Spülen mit destilliertem H₂O
- mit Stickstoff trocknen
- Inkubation der Trägeroberfläche mit EnzMet™ Kit zur Silberabscheidung für 5 min
- Stoppen der Reaktion durch Waschen mit destilliertem H₂O
- unter Stickstoff trocknen
- einzelsträngige, am 3' oder/und 5' Ende mit einem Ramanaktiven Molekül modifizierten Label-DNA in 5 × SSC pH 7,0/0,1% SDS aufnehmen und anschließend zur Hybridisierung auf die Trägeroberfläche geben
- Inkubation für 2 h bei der optimierten Hybridisierungstemperatur im Hybridisierungssofen
- jeweils 5 min in 2 × SSC/0,1% SDS; 2 × SSC und 0,2 × SSC waschen, mit Stickstoff trocknen blasen und bei 4°C im Kühlschrank lagern
- Charakterisierung der SERS-Aktivität über die Messung der elektrischen Leitfähigkeit

- Liegt die elektrische Leitfähigkeit der Substrate zwischen 1 μS und 1 μS kann das Substrat verwendet werden
- Detektion des Raman-aktiven Moleküls mittels eines konventionellen Mikro-Raman-Spektrometers

Variante c)

- Waschen der Trägermaterialien 5 min im Ultraschallbad in Azeton, Ethanol und destilliertem H₂O
- Trocknung unter Stickstoff
- Nasschemische Aktivierung mit einer 1:1:1 (v/v/v)-Mischung von konz. HCl:H₂O₂:H₂O für 10 min bei 20°C
- gründliche Reinigung mit destilliertem H₂O
- Trocknung mit Stickstoff und abschließend im Trockenofen bei 80–100°C für 5 min
- alternativ physikalische Aktivierung mit Hilfe eines Plasmastrippers bei 1 mbar bei 400 W für 30 min
- alternativ Aktivierung mittels Plasmaätzen in einem zweistufigen Prozess: 30 sec im Argonplasma bei 50 W und 5 Pa und 5 min im Sauerstoffplasma bei 50 W und 5 Pa
- Silanisierung mit 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (GOPS) in eine 10 mM Lösung GOPS in wasserfreiem Toluol für 6 h bei 70°C unter permanentem Rühren
- anschließend jeweils zweimal 5 min in Toluol, Ethanol und Wasser waschen
- Spotten der Biotin-modifizierten Fänger-DNA in 3 × SSC oder 150 mM Phospatpuffer (PB) jeweils mit pH 8,5
- Inkubation der gespotteten Trägermaterialien für 3 h in einer Feuchtkammer bei 37°C
- 5 min Waschen in einer 0,1%-igen wässrigen Triton X-100 Lösung
- Reinigung für 2 × 2 min in HCl pH 4,0 und 10 min in einer 100 mM KCl Lösung
- kurz mit destilliertem H₂O waschen
- 15 min in eine 50 mM Ethanolaminlösung mit 0,1% SDS in Tris pH 9,0 inkubieren
- kurz mit destilliertem H₂O waschen und unter Stickstoff trocknen
- Anbindung des Enzymkomplexes in einer 1:1000 Verdünnung in PBS pH 7,4/0,05% Tween 20 für 1 h bei 20°C
- 6 × 5 min mit PBS pH 7,4/0,05% Tween 20 waschen
- Spülen mit destilliertem H₂O
- mit Stickstoff trocknen
- Inkubation der Trägeroberfläche mit EnzMet™ Kit zur Silberabscheidung für 5 min
- Stoppen der Reaktion durch Waschen mit destilliertem H₂O
- unter Stickstoff trocknen
- einzelsträngige Proben-DNA in 5 × SSC pH 7,0/0,1% SDS aufnehmen und anschließend zur Hybridisierung auf die Trägeroberfläche geben

- Inkubation für 2 h bei der Hybridisierungstemperatur im Hybridisierungssofen
- jeweils 5 min in 2 × SSC/0,1% SDS; 2 × SSC und 0,2 × SSC waschen, mit Stickstoff trocken blasen und bei 4°C im Kühlschrank lagern
- einzelsträngige, am 3' oder/und 5' Ende mit einem Ramanaktiven Molekül modifizierten Label-DNA in 5 × SSC pH 7,0/0,1% SDS aufnehmen und anschließend zur Hybridisierung auf die Trägeroberfläche geben
- Inkubation für 2 h bei der Hybridisierungstemperatur im Hybridisierungssofen
- jeweils 5 min in 2 × SSC/0,1% SDS; 2 × SSC und 0,2 × SSC waschen, mit Stickstoff trocken blasen und bei 4°C im Kühlschrank lagern
- Charakterisierung der SERS-Aktivität über die Messung der elektrischen Leitfähigkeit
- Liegt die elektrische leitfähigkeit der Substrate zwischen 1 μ S und 10 μ S kann das Substrat verwendet werden
- Detektion des Raman-aktiven Moleküls mittels eines konventionellen Mikro-Raman-Spektrometers

[0038] Alle in der Beschreibung, den nachfolgenden Ansprüchen und den Zeichnungen dargestellten Merkmale können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination miteinander erfindungswesentlich sein.

Bezugszeichenliste

- a** – durch die Immobilisierung von Merrettich-Peroxidase-Molekülen im Elektrodenspalt werden Silbernanopartikel abgeschieden
- b** – abgeschiedene Silbernanopartikel führen zu einer elektrisch leitfähigen Schicht
- c** – Nutzung der leitfähigen Schicht als SERS-Substrat

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- US 6670113 [[0002](#), [0003](#)]
- US 2003/0211488 A1 [[0007](#)]
- US 20040180379 [[0011](#)]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- R. Möller, R. D. Powell, J. F. Hainfeld, W. Fritzsche, Nano Lett. 2005, 5, 1475–1482 [[0004](#)]
- Z. Wang, L. J. Rothberg, Appl. Phys. B 84, 289–293 (2006) [[0010](#)]
- N. Felidj, J. Aubard, and G. Levi, J. R. Krenn, A. Hohenau, G. Schider, A. Leitner, and F. R. Aussenegg, Appl. Phys. Lett., Vol. 82, No. 18 [[0012](#)]
- T., Steinbrück, A., Festag, G., Möller, R. und Fritzsche, W. "Enzyme-induced growth of silver nanoparticles studied an single particle level", Journal of Nanoparticle Research (2008) [[0014](#)]
- Festag, G., Schüler, T., Möller, R., Csaki, A. und Fritzsche, W. „Growth and percolation of metal nanostructures in elektrode gaps leading to conductive paths for electrical DNA analysis, Nanotechnology (2008) [[0014](#)]

Patentansprüche

1. SERS-Substrat bestehend aus enzymatisch auf einer Substratoberfläche abgeschiedenen Nanopartikeln aus Metall.

2. SERS-Substrat gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Metall Silber ist.

3. SERS-Substrat gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Nanopartikel eine Wüstenrosenähnliche Form besitzen, in dem sie spitze, eckige Strukturen aufweisen.

4. SERS-Substrat gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Substratoberfläche aus Glas, Silizium, Polymeren oder Hydrogel besteht.

5. SERS-Substrat gemäß Anspruch 1, 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Substratoberfläche Linker-Moleküle, trägt, an welche Metallnanopartikel gebunden sind.

6. Verfahren zur Herstellung eines SERS-Substrats gemäß einem oder mehrerer der voran stehenden Ansprüche bei dem auf einer Substratoberfläche zwischen zwei Elektroden Linker-Moleküle verankert werden, an welche im Anschluss Enzym-Moleküle gebunden werden, vermittels derer anschließend Metallnanopartikel auf der Substratoberfläche abgeschieden werden.

7. Verfahren zur Herstellung eines SERS-Substrats gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Linker-Moleküle einzelsträngige DNA verwendet wird.

8. Verfahren zur Herstellung eines SERS-Substrats gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Enzym-Molekül Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex, Glukoseoxidase oder alkalische Phosphatase verwendet wird.

9. Verfahren zur Herstellung eines SERS-Substrats gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Metallnanopartikel Silbernanopartikel verwendet werden.

10. Verfahren zur Überprüfung eines SERS-Substrats gemäß 1, 2, 3, 4 oder 5 bei dem die SERS-Aktivität durch Leitfähigkeitsmessung bestimmt wird.

11. Verfahren zur Überprüfung eines SERS-Substrats gemäß 1, 2, 3, 4 oder 5 bei dem die SERS-Aktivität durch Grauwertanalyse (c) bestimmt wird.

12. Verwendung eines SERS-Substrats gemäß 1, 2, 3, 4 oder 5 zum Nachweis von chemischen oder biologischen Substanzen.

13. Verwendung eines SERS-Substrats gemäß 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanzen Antibiotika oder DNA sind.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

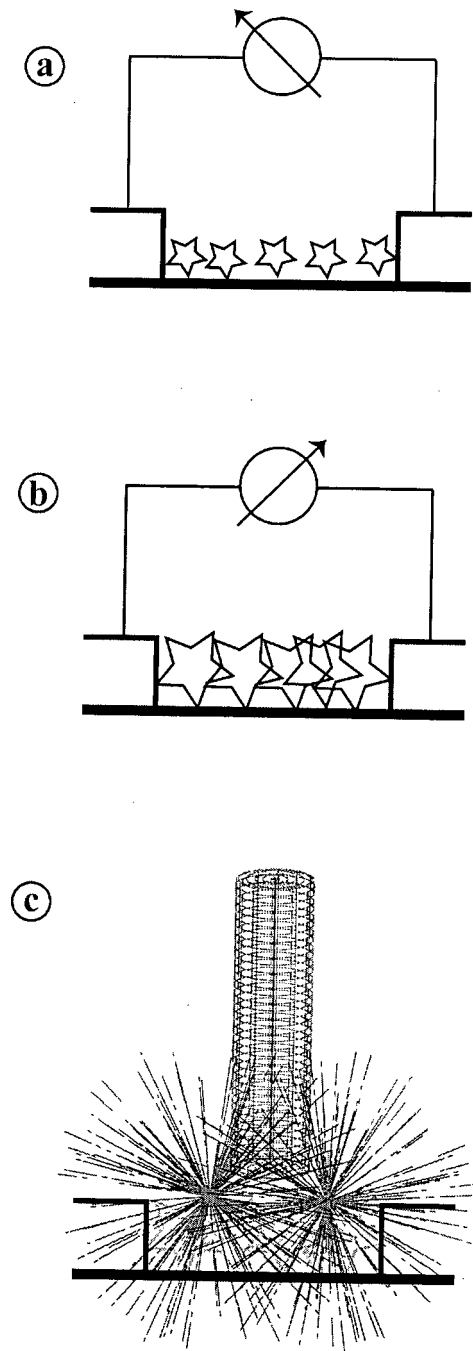


Fig .1



Fig. 2

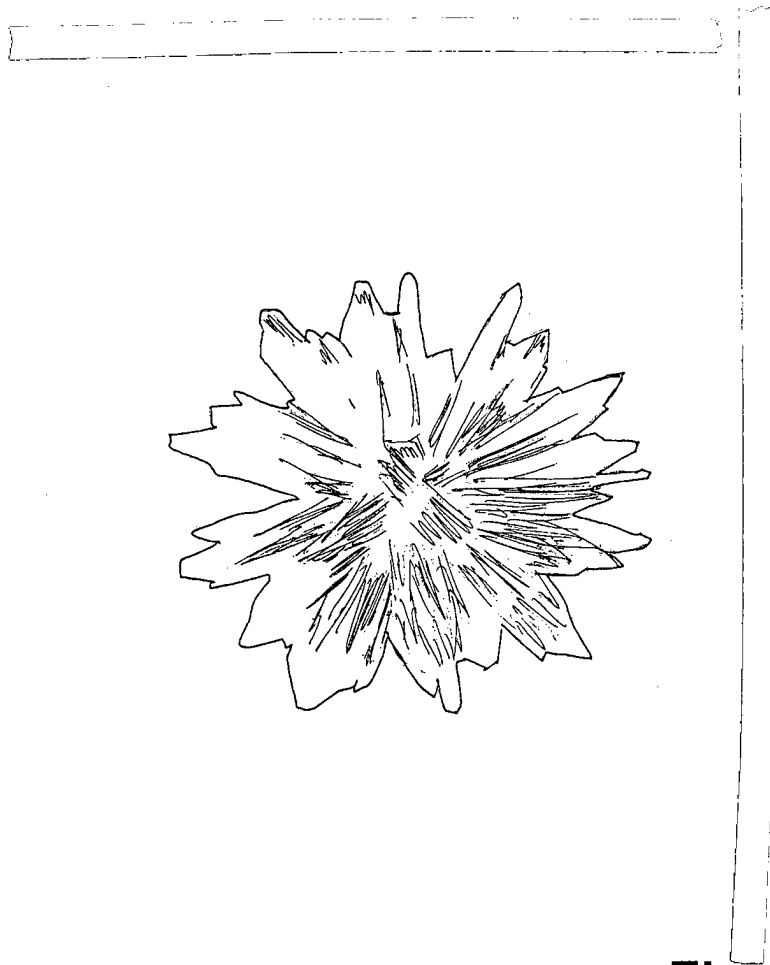


Fig. 3