Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung, und Forschung unter dem Förderkennzeichen **01DJ21009** gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

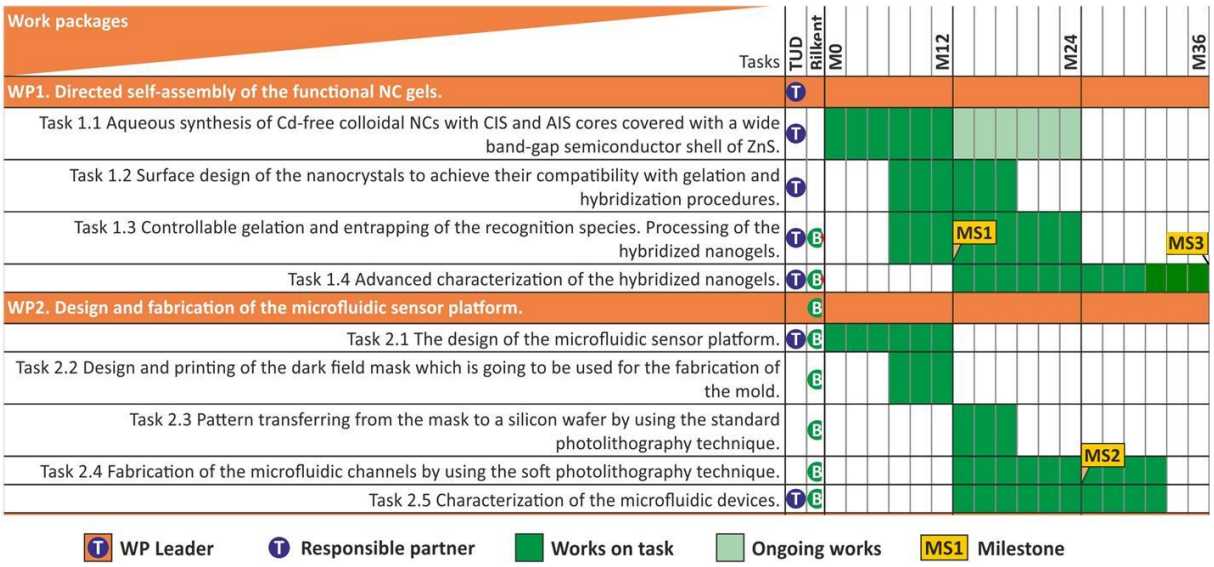
Kurzbericht MINARECO, 01DJ21009. 01.07.2021 – 30.06.2024,

Technische Universität Dresden

1. Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie technischer Stand

Ziel des Projektes MINARECO ist die Synthese im wässrigen von Cd-freien Quantenpunkten. Insbesondere Silber-Indium-Sulfid (AIS) oder Kupfer-Indium-Sulfid (CIS). Anschließend werden diese Quantenpunkte mit einer Schale aus dem Halbleiter Zinksulfid (ZnS) überzogen. Durch Oberflächenmodifikationen der Quantenpunkte mit geeigneten Molekülen (Liganden) soll eine gezielte Selbstorganisation der Quantenpunkte zu einem (Hydro-)Gel erfolgen. Als Oberflächenmodifikationen waren Moleküle aus der Klasse der Tetrazole vorgesehen. Diese ermöglichen ein Verknüpfen der einzelnen Quantenpunkte durch positiv geladene Metallkationen. Die schwammartige Struktur des sich bildenden Gels soll ausgenutzt werde um in die Poren des Gels Bioeinheiten bzw. Erkennungsspezies einzuschließen. Diese Bioeinheit ist in der Lage mit bestimmten Molekülen eines Analyten zu interagieren und anschließend mit dem Gel. Diese Interaktionen sollen genutzt werden um, durch die Kombination des Gels, der Bioeinheit und der Integration dieses Systems innerhalb eines mikrofluidischen Chips, einen Sensor zu entwickeln. Die wässrige Synthese von AIS wurde bis zu einem gewissen Grad bereits durch Eychmüller et al. entwickelt. [1] Nach Beschalung und Auftrennung der Quantenpunkte in einzelne Fraktionen erzielten die besten Quantenpunkte eine Quantenausbeute von 60 %. Die restlichen Fraktionen unterschieden sich in der Quantenausbeute als auch in der Emissionsfarbe, wodurch das Emissionspektrum zusätzlich verbreitert wurde. Die Synthese wurde als Ausgangspunkt gewählt.

2. Ablauf des Vorhabens



Die verschiedenen Aufgaben des Projektes MINARECO wurde entsprechend des Zeitplans für das Vorhaben durchgeführt. Zunächst stand die Weiterentwicklung und Optimierung der wässrigen Synthese der Nanokristalle im Fokus. Nachdem eine solide Basis erreicht wurde, wurde der Fokus auf die Modifikation der Nanokristalloberfläche und die anschließende Gelbildung gelegt. Anschließend wurden Bio-Einheiten in das Gel eingeschlossen und die sensorische Nutzung mittels „proof of concept“ Enzymreaktion durchgeführt. In ständiger Absprache mit den Forschungspartnern an der Bilkent-Universität wurde am Design von mikrofluidischen Chips für die sensorische Nutzung gearbeitet, welche die Gelbildung und Immobilisierung dieses innerhalb des Chips gewährleisten. Final wurde das hybride Nanogel-Enzym-System innerhalb des mikrofluidischen Chips hergestellt und getestet.

3. Wesentliche Ergebnisse sowie Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Durch veränderte Reaktionsbedingungen, insbesondere das Vorheizen einer Indium-Schwefel-Liganden-Lösung und die im Vergleich spätere Zugabe der Silberquelle konnte die Qualität der AIS-Quantenpunkte deutlich verbessert werden. Die resultierenden Quantenpunkte konnten nicht mehr in eindeutig unterscheidbare Fraktionen aufgetrennt werden, das heißt, die gesamte Ausbeute an AIS aus einer Synthese weist die gleichen Eigenschaften auf, wodurch sich die Ausbeute drastisch erhöht hat. Außerdem konnte für die gesamte Synthese die Quantenausbeute auf 67 % erhöht werden. Der ursprüngliche Ligand auf der Oberfläche der Quantenpunkte ist Glutathion. Dieses führt bereits zu einer negativen Oberflächenladung, wodurch eine Vernetzung der Quantenpunkte durch positive Metallkationen ermöglicht wird. Dadurch werden zusätzliche zeit- und kostenintensive Schritte erspart. Die aufwendige Synthese des Tetrazolliganden entfällt gänzlich. Außerdem kommt es zu keinem Qualitätsverlust der optischen Eigenschaften der Quantenpunkte durch potentiell schädliche Behandlungen. Bei Bedarf durch gesonderte Ansprüche ist es dennoch möglich die Oberfläche der Quantenpunkte zu verändern, um mit anderen Liganden die Gelbildung durchzuführen. Bei der Gelbildung hat die Wahl des Metallkations eine entscheidende Rolle. Zum einem sind manche Kationen effektiver als andere in der Gelbildung, wodurch weniger unnötige Stoffe in das System gelangen, zum anderen ist die Wahl des Kations zu beachten, sodass dieses mit potentiellen biologischen Stoffen (z.B. Enzyme, Antikörper) keine negativen Einflüsse hat. Der Großteil der im Gel entstehenden Poren ist im Größenbereich von 3 – 6 nm, was der Größe von typischen Antikörpern oder auch Enzymen entspricht. Durch eine Mischlösung von Quantenpunkten und Enzymen mit anschließender Zugabe eines Metallkations wird gleichzeitig die Gelbildung und das Einschließen der Enzyme erreicht. Dieses hybride System kann als Sensor genutzt werden. Als beispielhaftes System wurde ein AIS/ZnS Netzwerk mit eingeschlossener Glucose-Oxidase hergestellt. Die Glucose-Oxidase reagiert mit Glucose. Beim Abbau der Glucose wird Wasserstoffperoxid produziert. Dieses interagiert wiederum entweder mit der Oberfläche des Gels direkt oder mit den Liganden auf der Oberfläche und zerstört diese Teilweise. Dadurch kommt es zu einem Verlust an Emissionsintensität des Netzwerkes. Dieser Verlust lässt wiederum auf die Konzentration der Glucose in der Testlösung schließen. Somit kann aus dem optischen Signal des Gelnetzwerkes eine Aussage über eine Konzentration einer Testlösung getroffen werden. Dieses exemplarische System kann theoretisch mit vielen beliebigen Enzymen oder anderen Bioeinheiten gebildet werden, was diese Technologie sehr flexibel macht. Für den besseren Gebrauch, als auch zur Reduzierung von notwendigen Sensor- und Testmaterial, wird das System in einen mikrofluidischen Chip integriert. In diesem wird das Nanogel mit Bioeinheit fixiert, sodass nur noch Lösungen durch Chip fließen können. Somit werden nur noch wenige Mikroliter eines Analyten benötigt. Das Design der Chips wurde zusammen mit den Korporationspartnern aus der Bilkent-Universität in Ankara entwickelt. Diese übernahmen außerdem die Produktion der Chips.

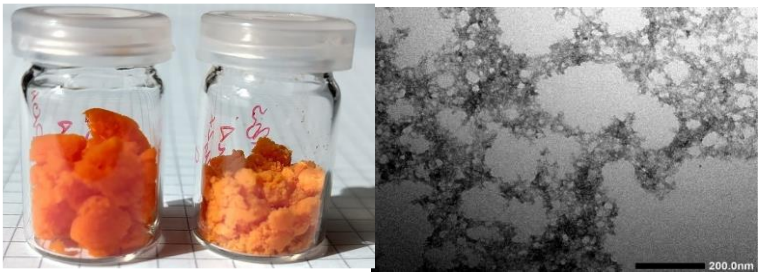


Abbildung 1 und 2: superkritisch getrocknete AIS/ZnS Aerogele (links) und elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Hydrogels (rechts)

[1] Stroyuk, O.; Raevskaya, A.; Spranger, F.; Selyshchev, O.; Dzhagan, V.; Schulze, S.; Zahn, D. R. T.; Eychmüller, A. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122*, 25, 13648–13658

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung, und Forschung unter dem Förderkennzeichen **01DJ21009** gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Eingehende Darstellung MINARECO

Zuwendungsempfänger:	Technische Universität Dresden	**Förderkennzeichen:** 01DJ21009
Vorhabenbezeichnung:	ERA-Net: Verbundprojekt MINARECO: Mikrofluidische Sensoren auf Basis anorganischer Nanogele mit spezifischen Bioerkennungskomplexen für Antikörper, Antibiotika oder reaktive Sauerstoffspezies; Teilvorhaben: Entwicklung und Herstellung anorganischer Nanogele, die mit Bioerkennungskomplexen hybridisiert sind	
Laufzeit des Vorhabens:	01.07.2021 - 30.06.2024	

AP1. Gezielte Selbstorganisation der funktionellen NC-Gele:

Aufgabe 1.1 Wässrige Synthese von Cd-freien kolloidalen NCs mit CIS- und AIS-Kernen, die mit einer Halbleiterhülle mit breiter Bandlücke aus ZnS bedeckt sind.

Stand der Technik und der Startpunkt der Aufgabe beziehen sich auf die wässrige Synthese von AIS nach Eychmüller et al [1]. Es wird eine Synthese von L-Glutathion bedeckten Nanopartikeln beschrieben, welche nach weiteren Aufarbeitungs- und Trennungsschritten maximal 60 % Photolumineszenzquantenausbeute erreichen. Der größte Nachteil dieser Methode ist, dass durch weitere Aufarbeitungsschritte nur ein Bruchteil der synthetisierten Partikel die besten optischen Eigenschaften erreichen und zur weiteren Verwendung geeignet sind. Die hergestellten Partikel sind bereits Cd-frei und weisen exzellente Wasserstabilität auf.

<u>Synthese von Silber-Indium-Sulfid (AIS)-Kernen</u>:

Bei Raumtemperatur werden 2,5 mL entionisiertes Wasser in ein 50 mL Gefäß gegeben. Unter ständigem Rühren werden 2,4 mL einer 0,5 M GSH-Lösung und 0,8 mL einer 1 M InCl3-Lösung, mit 0,25 M HNO3, hinzugefügt. Anschließend werden 1 mL einer 5 M NH4OH-Lösung langsam zugegeben, so dass sich der entstehende weiße Niederschlag vollständig auflöst. Daraufhin gibt man 1 mL einer 1 M Na_2S-Lösung und 0,25 mL einer 2 M Zitronensäurelösung hinzu. Die Lösung wird unter ständigem Rühren in einem heißen Ölbad auf bis zum Kochen erhitzt. Schließlich werden in die kochende Lösung 2 mL einer 0,1 M AgNO3-Lösung schnell zugegeben. Die so entstandene klare, rote Reaktionslösung wird dann 60 Minuten lang im heißen Ölbad gerührt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

<u>Wachstum der ZnS-Schale:</u>

Bei Raumtemperatur werden 3 mL einer 0,5 M GSH-Lösung mit 0,4 mL einer 5 M NH4OH-Lösung und 2,67 mL einer 0,6 M Zn(OAc)2-Lösung in einem separaten Gefäß unter ständigem Rühren vermischt. Anschließend wird so lange 5 M NH4OH-Lösung tropfenweise zugefügt, bis eine farblose klare Lösung entsteht. Diese Lösung wird unter Rühren bei Raumtemperatur zu den AIS-Kernen gegeben. Das Gemisch aus AIS-Kernen und Schalenlösung wird dann 10 Minuten lang in einem heißen Ölbad gerührt. Die so entstandene klare orangefarbene Lösung wird zunächst auf Raumtemperatur abgekühlt. Falls es während des Schalenwachstum zu einer Eintrübung der Lösung kam, wird tropfenweise 5 M NH4OH-Lösung zugegeben, wodurch eine klare rote-orange Lösung von Silber-Indium-Sulfid-Quantenpunkten mit einer Zinksulfidschale (AIS/ZnS) entsteht.

Aufarbeitung der AIS/ZnS-Quantenpunkte:

Der klaren AIS/ZnS-Quantenpunktlösung werden 10 mL des Antilösungsmittels *i*PrOH oder EtOH zugesetzt, um eine dauerhafte Trübung und einen Niederschlag zu erzielen. Die trübe Lösung wird 5 min lang bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Niederschlag wird vom Überstand abgetrennt und in 2 mL entionisiertem Wasser aufgelöst. Nach erneuten Ausfällen mit *i*PrOH oder EtOH wird der Niederschlag in 4 mL entionisiertem Wasser gelöst und unter Lichtausschluss gelagert. Unter Lichtausschluss ist diese Lösung mehrere Jahre stabil.

Ergebnisse der optimierten Synthese:

Durch veränderte Reaktionsbedingungen und Eduktzugabe währen der Synthese wird die Bildung von störenden Ag_2S Nanokristallen unterdrückt. Das führt zu einer homogeneren Zusammensetzung und Größenverteilung der Nanopartikel im Ganzen. Die für im wässrigem synthetisierten AIS Nanokristallen weisen typischerweise eine breite Größenverteilung auf, was zu einer zusätzlichen Verbreiterung der Emission führt. Die optimierte Synthese, welche den „hot-injection“ Ansatz von Hochtemperatur Synthesen in organischen Lösungsmitteln zu imitieren versucht, verhindert diese Größenverteilung. Dadurch weist der gesamte Ansatz der Synthese praktisch identische optische Eigenschaften auf, wodurch die effektive Ausbeute von Nanokristallen erhöht wurde. Die im wässrigen synthetisierten Cd-freien Quantenpunkte haben eine Quantenausbeute von 67 %.

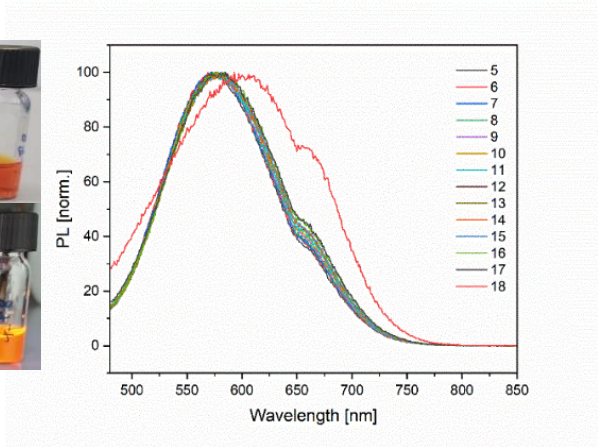


Abbildung 1 und 2: links: gesamte Synthese (großes Gefäß) und Versuch größenfraktioniert zu trennen (kleine Gefäße); rechts: Emissionsspektren der einzelnen Fraktionen

Aufgabe 1.2 Oberflächengestaltung der Nanokristalle, um ihre Kompatibilität mit Gelierungs- und Hybridisierungsverfahren zu erreichen:

Zunächst wurde die Funktionalisierung der Nanokristalle mit Tetrazolen geplant. Durch ihre negativen Teilladungen ermöglichen diese eine Gelierung durch Verbindungen mit positiv geladenen Metallkationen. Die Gruppe von Eychmüller et al. stellte bereits erfolgreich mit tetrazol verkappte CdTe-Nanogele her. [2] Der Nachteil dieser Methode ist die Synthese der Tetrazole. Bigall et al. fand heraus, dass durch eine Funktionalisierung mit Thiol-haltigen Carbonsäuren sich ebenfalls Wasserlöslichkeit von Nanokristallen erzielen lässt. Außerdem ermöglicht die negative Partialladung der Carbonsäuregruppe die Verbindung mit positiven Metallkationen. [3]

Phasentransfer von GSH-verkapptem AIS/ZnS nach *n*-Hexan:

Zu 1 mL einer AIS/ZnS-Lösung in Wasser werden 2,5 mL einer Lösungsmittelmischung aus 1 mL Toluol, 1 mL Oleylamin, 0,25 mL Ölsäure und 0,25 mL Ethanol hinzugefügt. Das resultierende Zweiphasensystem wird 5 Minuten lang kräftig geschüttelt. Anschließend wird das gesamte Gemisch 2 Minuten lang bei 10000 rpm zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Die obere quantenpunkthaltige organische Phase wird vorsichtig entfernt und die Quantenpunkte werden durch Zugabe von Ethanol ausgefällt. Die ausgefällten Quantenpunkte werden in 0,5 mL *n*-Hexan gelöst, durch Fällung mit Ethanol erneut gewaschen und schließlich in 1 mL *n*-Hexan gelöst.

Phasentransfer von Oleylamin/Ölsäure-verkapptem AIS/ZnS zu S-verkappten AUS/ZnS nach Wasser:

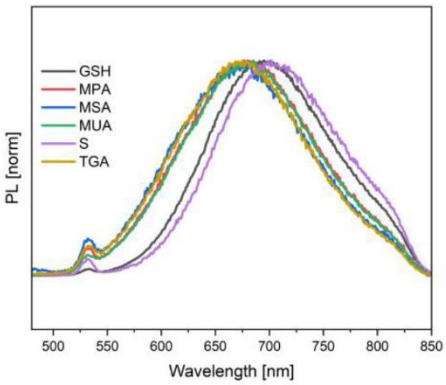
Zu 1 mL AIS/ZnS in *n*-Hexan werden 2 mL N-Methylformamid und 80 mg Na_2S gegeben. Die bräunliche Mischung wird 5 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden die Quantenpunkte durch Zugabe von *i*PrOH ausgefällt und in 0,5 mL entionisiertem Wasser gelöst. Die Quantenpunkte werden durch Ausfällen mit *i*PrOH und zweimaliges Auflösen in Wasser gewaschen und dann in 1 mL entionisiertem Wasser gelöst. Schließlich wird die braune Lösung 3 Minuten lang bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert,
wobei ein brauner Niederschlag und eine klare rote Lösung von S-verkappten AIS/ZnS entsteht.

Phasentransfer von Oleylamin/Ölsäure-verkapptem AIS/ZnS zu Carbonsäure-verkappten AIS/ZnS nach Wasser:

1,3 mL Methanol, 0,17 mL einer 1 M NaOH-Lösung und eine bestimmte Menge des gewählten Liganden werden zu 1 mL von Oleylamin/Ölsäure verkappten AIS/ZnS in Hexan gegeben. Das zweiphasige System wird über Nacht intensiv gerührt. Am folgenden Tag wird die Nanokristallhaltige Phase separiert und mit EtOH ausgefällt. Der Niederschlag wird in 1 mL entionisiertem Wasser gelöst.

Ergebnisse der Oberflächengestaltung:

Der direkte Ligandenaustausch von Glutathion zu einem anderen in wasserstabilisierenden Liganden ist schwierig. Deswegen wird ein zweiteiliger Ansatz gewählt, bei dem zunächst das Glutathion entfernt wird. Anschließend werden die neuen, schwach bindenden Liganden Oleylamin/Ölsäure durch den gewünschten Thiol-haltigen Liganden ersetzt. Der erste Transfer in die organische Phase verläuft praktisch Verlustfrei, ohne Einbußen bei den optischen Eigenschaften der Quantenpunkte. Der zweite Transfer zurück in die wässrige Phase geht einher mit Verlusten der Quantenausbeute. Außerdem kann es zu einer Verschiebung des Emissionmaximums kommen. Dennoch ist der Ligandenaustausch zu geeigneten gewünschten Liganden möglich und kann nach Bedarf durchgeführt werden.



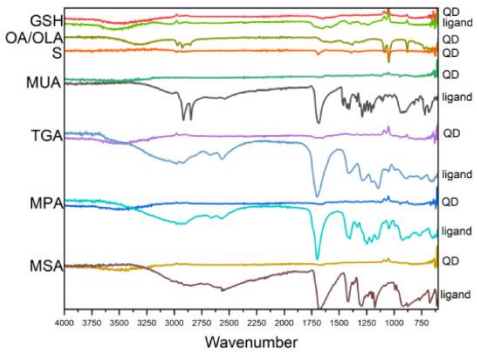


Abbildung 3 und 4: links: Emissionsspektren von wässrigen AIS/ZnS mit verschiedenen Liganden auf der Oberfläche; rechts: FTIR Spektren von purem Ligand und mit Ligand modifizierten Quantenpunkten

Aufgabe 1.3 Kontrollierbare Gelierung und Einschluss der Erkennungsspezies. Verarbeitung der hybridisierten Nanogele:

<u>Gelierung von AIS/ZnS:</u>

Abbildung 5 und 6: links: AIS/ZnS Hydrogele mit verschienden In:Ag Kationen Verhältnissen; rechts: AIS/ZnS Aerogele welche durch superkritische Trocknung mit CO_2 erhalten wurden

<u>Gelierung von S-, oder thiolhaltigen Carbonsäure verkappten AIS/ZnS durch Zugabe von mehrwertigen Kationen:</u>

Zu 100 µL S-verkapptem AIS/ZnS werden 1,9 mL entionisiertes Wasser hinzugefügt, so dass das Endvolumen 2 mL beträgt. Zu der resultierenden verdünnten Quantenpunktlösung wird eine 10 mM $MgCl_2$-Lösung in 20-µl-Schritten zugegeben, bis die Gelierung einsetzt. Das Gel wird 1 Tag lang ruhen gelassen, damit sich das Netzwerk vollständig ausbilden kann. Das Gel wird dann gewaschen, indem der Überstand über dem Gel vorsichtig entfernt wird, gefolgt von einer vorsichtigen Zugabe von neuem entionisiertem Wasser. Zwischen der Zugabe und der Entfernung von Wasser sollten mindestens 3 Stunden liegen. Dieser Waschschritt wird insgesamt 6 Mal wiederholt.

<u>Gelierung von AIS/ZnS durch Zugabe von Antilösungsmittel:</u>

Zu einer Lösung von AIS/ZnS wird in 40 µL-Schritten *i*PrOH zugegeben. Nach jeder Zugabe wird geprüft, ob sich eine Trübung entwickelt und ob diese durch leichtes Schütteln wieder in eine klare Lösung übergeht. Bleibt die Trübung bestehen, wird vorsichtig zusätzliches *i*PrOH über den Rand des Gefäßes zugegeben, wodurch eine Phasengrenze zwischen der wässrigen Quantenpunktlösung und reinem *i*PrOH entsteht. An der Phasengrenze bildet sich ein Gel, das sich innerhalb von 3 Tagen über die Gesamtheit der Quantenpunkte erstreckt. Wenn sich das Gel-Netzwerk vollständig gebildet hat, wird das Gel durch Entfernen und Hinzufügen von

Wasser in der gleichen Weise gewaschen wie bei der zuerst beschriebenen Gelierungsmethode.

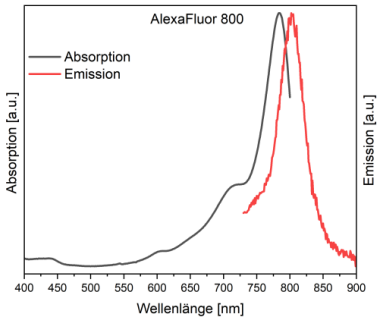
Abbildung 7: zeitlicher Verlauf der Bildung von Nanogelen nach Zugabe von Antilösungsmittel unter Weißlicht (links) und UV Licht (rechts)

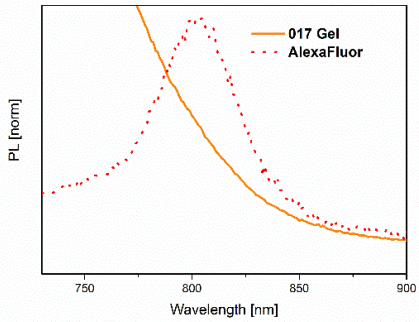
Ergebnisse:

Zunächst wurde als Gelierungssalz $Zn(OAc)_2$ verwendet. Nach einigen Testversuchen hat sich jedoch gezeigt, dass die Wahl des richtigen Salzes einen großen Einfluss auf die benötigte Menge bis zum Einsetzen der Gelierung hat. Deswegen wird final $MgCl_2$ zur Gelierung der Nanokristalle verwendet, da dies am effizientesten ist und somit am wenigsten potentiell störende Stoffe in das System einbringt. Diese Gelierungsmethode ist außerdem sehr schnell. Bei Zugabe größerer Mengen von Salzen kommt es zur sofortiger vollständiger Gelierung ohne dass mehrere Stunden oder Tage gewartet werden muss, bis sich das Gel vollständig gesetzt hat. Die Gelierung über Koordination mit Metallkationen ist der Gelierung durch Zugabe eines Antilösungsmittels vorzuziehen, da als Lösungsmittel weiterhin nur Wasser vorhanden ist und biologische Anwendungen somit nicht potentiell eingeschränkt werden. Außerdem hat sich währen der Versuche gezeigt, dass, falls nicht aus anderen Gründen benötigt, keine Modifizierung der ursprünglich synthetisierten Nanokristalle nötig ist. Das Glutathion auf der Oberfläche der Nanokristallen eignet sich ebenfalls zur Gelierung. Dadurch werden unnötige Arbeitsschritte, Chemikalien und mögliche Qualitätsverluste der optischen Eigenschaften vermieden.

Einfangen eines Bioerkennungskomplexes in das Nanogel:

Das durch Zugabe einer $MgCl_2$ frisch gebildete AIS/ZnS-Nanogel wird durch Beschallung in einem Ultraschallbad kurzzeitig zerstört. Daraufhin werden 10 µL einer Lösung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers (AlexaFluor800, kurz AF800) zu der Nanokristall/Nanogel-Lösung hinzugegeben. Das System wird kurzzeitig stark geschüttelt. Anschließend kommt es zu erneuten Ausbildung des Nanogelnetzwerkes in welches der Antikörper eingeschlossen wird. Durch den Einschluss in das Netzwerk stehen das Quantenpunktgel und der fluoreszenzmarkierte Antikörper in engem Kontakt miteinander, wodurch ein Energietransfer zwischen Gel und AF800 ermöglicht wird. Im hier beschriebenen System fungiert das Quantenpunktgel als Donor. Der Donor wird durch kurzwelliges Licht angeregt, für welches der Akzeptor, also AF800, größtenteils unempfänglich ist. Durch den engen Kontakt kann es zu einem Energietransfer vom Gel zu AF800 kommen, welches wiederum Licht emittiert. Um einen effizienten Energietransfer zu ermöglichen muss die Emission des Donors möglichst im Absorptionsbereich des Akzeptors liegen. Deswegen wird der Fokus auf orange/rot-emittierende Quantenpunkte gelegt.





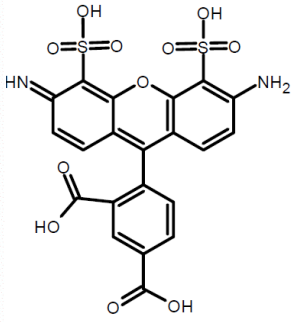


Abbildung 8,9 und 10: links: Absorptions- und Emissionspektren von AF800; Mitte: detektierbare Emission von AF800 (rot gepunktet) welches im Nanogel (orange) eingeschlossen ist; rechts: typische Struktur eines Markierungsfluorophors

Der fluoreszenzmarkierte Antikörper konnte erfolgreich in das Nanogel eingeschlossen werden. Auch nach mehrfachen Waschen konnte durch gezielte Anregung des Antikörpers die Emission von eben jenem im Nanogel detektiert werden. In dem nach den Waschritten des Gels abgenommenem Überstands konnte der Antikörper nicht nachgewiesen werden.

<u>Einfangen von Glucose-Oxidase in das Nanogel zur Detektion von Glucose:</u>

Die AIS/ZnS Quantenpunkte werden in einen PBS-Puffer mit eingestellten pH = 7 gelöst. In die Lösung wird das Enzym Glucose-Oxidase (GOD) zugegeben und gelöst. Durch Zugabe einer $MgCl_2$-Lösung verbinden sich die Quantenpunkte zu einer Gelstruktur und schließen gleichzeitig das Enzym in die Poren ein. Durch mehrfaches Waschen mit PBS-Puffer wird nicht eingeschlossenes GOD entfernt. Durch eine anschließende Zugabe von Glucose wird diese von GOD abgebaut und Wasserstoffperoxid wird freigesetzt. Diese reaktive Sauerstoffspezies greift das Nanogel an und zerstört es teilweise, was zu einem Abfall der Emission des Systems führt. Dieses System wurde ebenfalls im mikrofluidischen Chips getestet, indem entsprechende Lösung per Spritzenpumpe in den Chip gegeben wurde. Und anschließend analog verfahren wird. (mikrofluidischer Chip siehe 2.5)

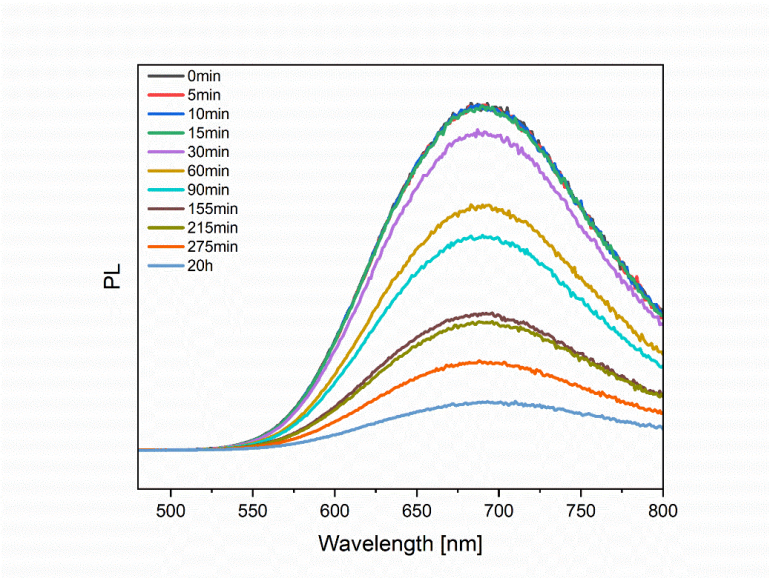
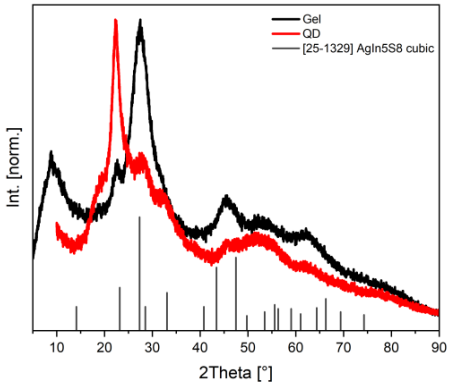


Abbildung 11: Emissionsspektren mit Verlauf der Abnahme der Intensität über Zeit eines AIS/ZnS Gels mit eingefangener Glucose-Oxidase nach Zugabe einer Glucose Lösung

Aufgabe 1.4 Erweiterte Charakterisierung der hybridisierten Nanogels

Die Eigenschaften der gebildeten Nanogele werden durch verschiedene Charakterisierungsmethoden untersucht. Unter anderen Absorption, Emission, Kristallstruktur und Oberflächeanalysen (FTIR). Die Oberfläche und das Porenvolumen von mit verschiedenen Gelierungsmethoden erhaltenen AIS/ZnS Nanogelen mit verschiedenen thiolhaltigen Carbonsäuren auf der Oberfläche wurden ebenfalls charakterisiert.



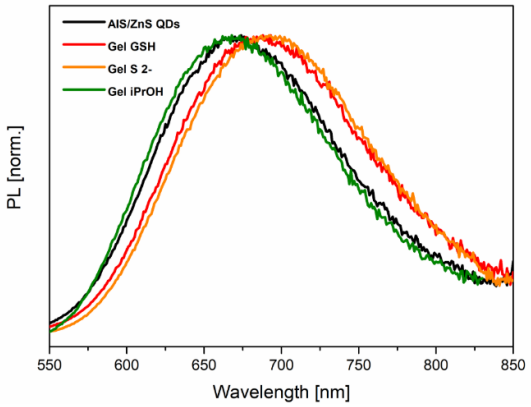
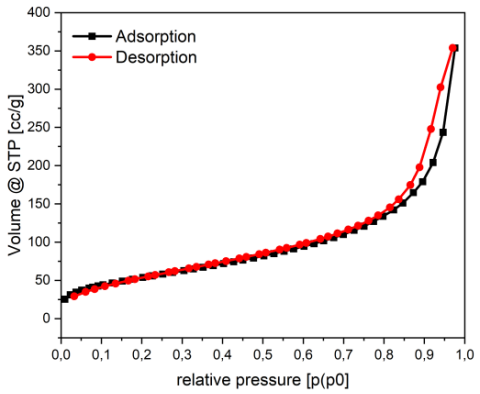


Abbildung 12 und 13: links: XRD Spektren von AIS/ZnS Nanokristallen und Nanogel; rechts: Emissionsspektren von AIS/ZnS Nanokristallen und Nanogelen mit verschiedenen Liganden und Gelierungsmethoden



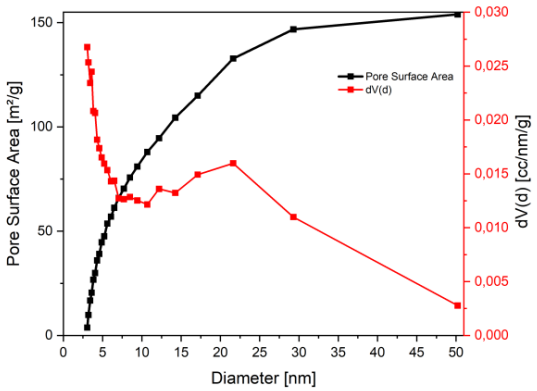
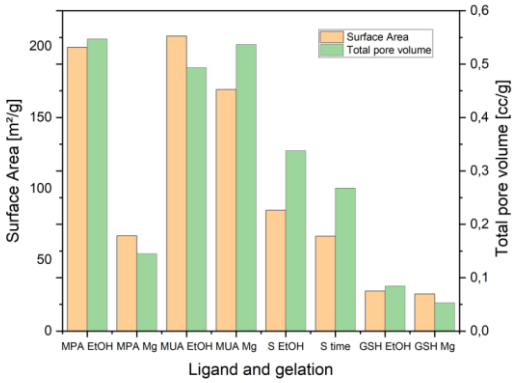


Abbildung 14 und 15: links: Isotherme einer BET Messung eines AIS/ZnS Nanogels; rechts:Porengrößenverteilung und Porenvolumen eines AIS/ZnS Nanogels



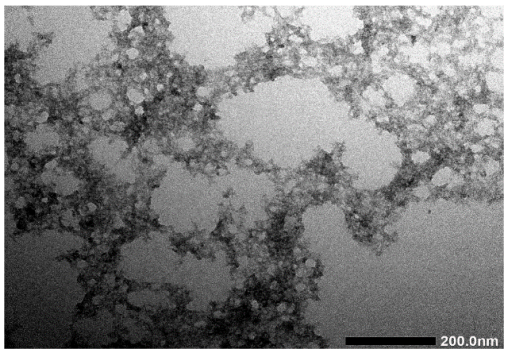


Abbildung 16 und 17: links: Zusammen der Oberfläche und des Porenvolumens von AIS/ZnS Gelen mit verschiedenen Liganden und Gelierungsmethoden; rechts: TEM Aufnahme eines AIS/ZnS Nanogels

AP2. Entwurf und Herstellung der mikrofluidischen Sensorplattform

Aufgabe 2.5 Charakterisierung der mikrofluidischen Geräte

Eine Lösung von GSH-gekappten AIS/ZnS-Quantenpunkten und eine 10 mM $MgCl_2$-Lösung werden in je eine 1 mL-Spritze gefüllt. Die Spritzen sind über PDMS-Kuppler aus rostfreiem Stahl mit einem mikrofluidischen Chip verbunden. Ein weiterer Kuppler ist mit dem Auslass des Chips verbunden, um eine saubere Entnahme der Lösungen zu gewährleisten. Die beiden Lösungen werden über Spritzenpumpen vorsichtig in den mikrofluidischen Chip gegeben. Die Durchflussgeschwindigkeit jeder Lösung beträgt 10 µL/min. Die Gesamtflussgeschwindigkeit der kombinierten Lösung im mikrofluidischen Kanal beträgt 20 µL/min. Kurz nach dem Zusammentreffen der beiden Lösungen beginnt sich das AIS/ZnS-Nanogel zu bilden, entweder durch Diffusion oder durch Mischungselemente (zum Beispiel eingebaute Kurven anstatt einer linearen Flussrichtung) in den mikrofluidischen Kanälen. Wenn die Strömungsgeschwindigkeiten in mikrofluidischen Chips ohne Mischelemente zu hoch sind, kommt es aufgrund der laminaren Strömung der beiden Lösungen und der unzureichenden Durchmischung nicht zur Gelierung. Am Auslass kann lumineszierendes AIS/ZnS-Hydrogel gesammelt werden.

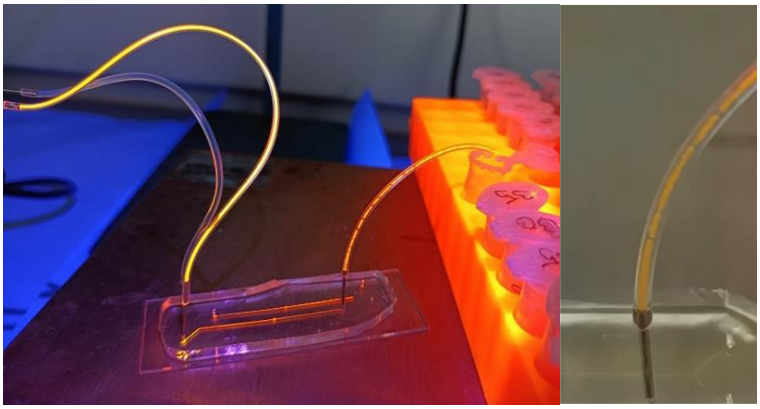


Abbildung 18 und 19: links: Zufluss und Abfluss von AIS/ZnS Nanokristallen und Salzlösung; rechts: Nahaufname vom Abfluss mit erkennbarer Gelstruktur

Um das Nanogel mit eingebauten Bioerkennungseinheiten als möglichen Sensor verwenden zu können, muss das Nanogel innerhalb des mikrofluidischen Chips fixiert werden. Dafür wurde das Design des Chips weiterentwickelt und zusätzlich zu den Mischelementen wurde eine Auffangkammer integriert. Das gebildete Nanogel mit eingeschlossenen Bioeinheiten strömt nach den Mischelementen in eine Auffangkammer. Diese ist rund und mit mehreren dünnen Ausgangskanälen versehen. Anschließend folgt ein weiterer Ring, welcher um sich um die Kammer legt. Durch weitere dünnes Ausgänge gelangt man abschließend zum Ausfluss des Chips. Zweck dieses Aufbaus ist, dass der Großteil des gebildeten Gels in der Kammer oder maximal in dem Zwischenring verbleibt. Durch die Ausgangskanäle soll lediglich eine Lösung gelangen, sodass diese gezwungen ist mit dem Nanogel und den Bioeinheiten zu interagieren, die Abbauprodukte aber dennoch entweichen können. Das Design erfüllt seinen Zweck des Fixierens des Nanogels. Jedoch müssen ausreichend niedrige Volumenströme für die Chipeingänge gewählt werden, da die schwammartige Struktur der Nanogele es eben diesem ermöglicht bei genügend großem Druck selbst du sehr kleine Ausgänge zu entweichen.

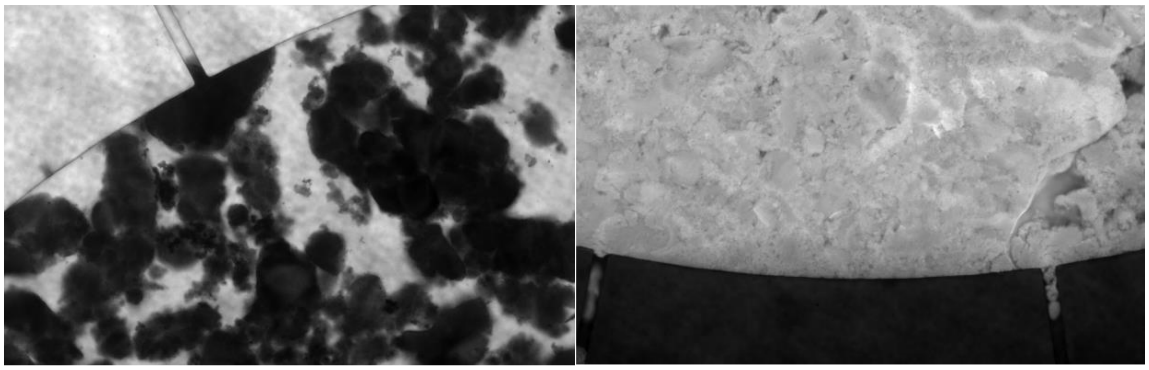


Abbildung 20 und 21: links: durch Nanogel verstopfter Ausgang aus Auffangkammer unter Weißlicht; rechts: gefüllte Auffangkammer mit durch Nanogel verstopfen Ausgängen unter UV-Licht

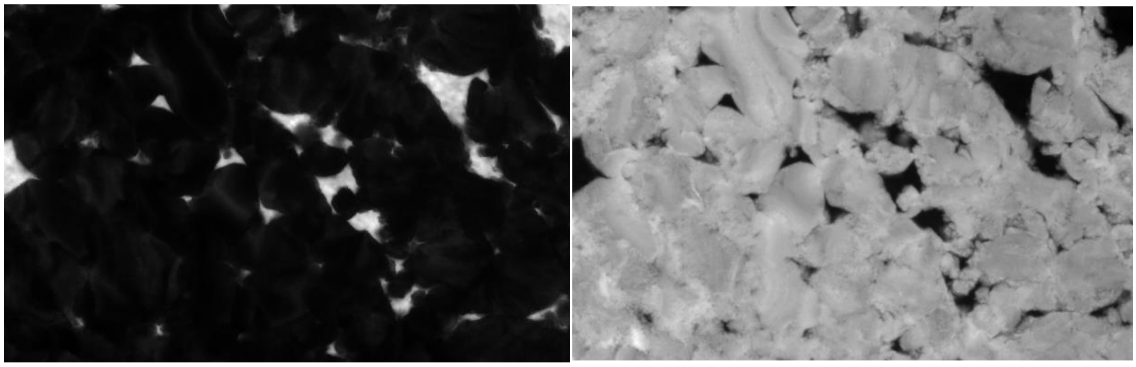


Abbildung 22 und 23: Struktur des im mikrofluidischen Chip fixierten Nanogels unter Weißlicht (links) und UV-Licht (rechts)

Abschließende Zusammenfassung – Ausblick:

Die wässrige Synthese von AIS/ZnS Nanokristallen wurde weiterentwickelt. Dabei konnte die Quantenausbeute auf beinahe 70 % erhöht werden. Weiterhin erzeugt die Optimierung homogene Nanokristalle, welche nicht durch weiterführende auf reinigende Schritte Aufgetrennt werden müssen. Somit wurde gleichzeitig die Ausbeute an Nanokristallen stark gesteigert. Der nach der Synthese vorliegende Ligand ist bereits hervorragend für die Bildung von Nanokristallen geeignet. Falls spezielle Anforderungen an das Nanogel bestehen ist eine nachträgliche Modifikation möglich. Die resultierenden Nanogele weisen vorwiegend Poren mit Größen um 3 – 6 nm auf. Diese Porengröße ist optimal für viele Enzyme oder Bioeinheiten. Der Einschluss dieser ist simpel und effektiv. Mit einem enzymatischen Versuch als proof of concept wurde gezeigt, dass sich dieses System als möglicher Sensor für viele verschiedene Analyten eignet. Außerdem werden durch die Verwendung von mikrofluidischen Chips nur äußerst geringe Probenmengen benötigt um ein analytisches Signal zu erhalten.

Durch die simple und schnelle Methode der Gelbildung und des Einschließens der Bioeinheiten innerhalb des Chips könnte diese Technologie genutzt werden um je nach Bedarf sich einen entsprechenden Sensor frisch herzustellen, indem man das Nanogel mit einer Bioeinheit seiner Wahl verbindet und einschließt.

Literatur:

[1] Stroyuk, O.; Raevskaya, A.; Spranger, F.; Selyshchev, O.; Dzhagan, V.; Schulze, S.; Zahn, D. R. T.; Eychmüller, A. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122*, 25, 13648–13658

[2] S. V. Voitekhovich, A. Wolf, C. Guhrenz, A. S. Lyakhov, L. S. Ivashkevich, M. Adam, N. Gaponik, S. Kaskel, A. Eychmüller, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 14746.

[3] D. Zámbó, A. Schlosser, P. Rusch, F. Lübkemann, J. Koch, H. Pfnür, N. C. Bigall, A Versatile Route to Assemble Semiconductor Nanoparticles into Functional Aerogels by Means of Trivalent Cations. *Small* 2020, 16, 1906934. https://doi.org/10.1002/smll.201906934

Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Zuwendung des BMBF wurde größtenteils für Personalmittel (ein wissenschaftlicher Mitarbeiter) sowie diverse Verbrauchsmaterialien und eine projektbezogene Dienstreise im Jahr 2022 verwendet.

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die Arbeite für das Erreichen der angestrebten Projektziele hätten ohne die Förderung nicht durchgeführt werden können. Die zur Verfügung gestellten Mittel ermöglichten die Finanzierung von teuren Ausgangsstoffen, Enzymen und fluoreszenzmarkierten Antikörpern, sowie die umfangreiche Charakterisierung von Quantenpunkten und Nanogelen.

Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse des MINARECO-Projektes sind sowohl von wissenschaftlichen, als auch von wirtschaftlichem Wert. Sie tragen zur Entwicklung von Verfahren zur technischen Anwendbarkeit von Hydrogelen als Sensoren für biologische Stoffe durch die Immobilisierung der Hydrogele als auch durch das Einfangen von Erkennungsspezies im Gel selber bei. Die Einfachheit und Geschwindigkeit der Herstellung der hybriden Nanogel-Bioeinheit-Systeme eröffnen eine Vielzahl an Möglichkeiten im Bereich der Detektion von Krankheiten oder reaktiven Sauerstoffspezies.

Während des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt bei anderen Stellen

Bei anderen Stellen sind bislang keine Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant sind.

Konferenzbeiträge:

T. Starzynski, N. Gaponik, A. Eychmüller, Assembly of AIS/ZnS-Quantum dots into hydrogels for incorporation of recognition species for biosensing (Poster), Bunsen-Tagung, 07. – 09. September 2022, Gießen