

Bioanalytik

DOI: 10.1002/ange.200501552

Quantenpunkte als effiziente Energieacceptoren in einem zeitaufgelösten Fluoroimmun- testsyste**

Niko Hildebrandt,* Loïc J. Charbonnière,*
Michael Beck, Raymond F. Ziessel und
Hans-Gerd Löhmannsröben

Professor Herbert Dreeskamp zum 76. Geburtstag gewidmet

Im letzten Jahrzehnt wurden Halbleiternanopartikel als Bausteine für die Nanotechnologie intensiv erforscht. Sphä-

[*] Dipl.-Ing. (FH) N. Hildebrandt, Dr. M. Beck,
Prof. Dr. H.-G. Löhmannsröben
Physikalische Chemie
Institut für Chemie und Interdisziplinäres Zentrum für Photonik
Universität Potsdam
Karl-Liebknecht-Straße 24–25, 14476 Potsdam-Golm (Deutschland)
Fax: (+49) 331-977-5058
E-mail: hildebr@uni-potsdam.de
Dr. L. J. Charbonnière, Prof. Dr. R. F. Ziessel
Laboratoire de Chimie Moléculaire
UMR 7509-ECPM-ULP
25, rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex (Frankreich)
Fax: (+33) 3-9024-2689
E-mail: charbonn@chimie.u-strasbg.fr

[**] Diese Arbeit wurde durch das Deutsche Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit (InnoNet Programm 16N0225) und das französische Centre National de la Recherche Scientifique unterstützt. Die Autoren danken Frank Sellrie, Universität Potsdam, für die Streptavidinmarkierung, Dr. Sophie Haebel, Universität Potsdam, für MALDI-TOF-Experimente sowie Dr. Jennifer Weiss-Wytko und Prof. Jack Harrowfield, Université Louis Pasteur de Strasbourg, für fruchtbare Diskussionen.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

rische oder ellipsoide Nanopartikel, auch bekannt als Quantum Dots (qdots) oder Quantenpunkte, haben größenabhängige optische Eigenschaften mit extrem hohen Absorptionsquerschnitten.^[1] Durch eine umschließende Hülle vom umgebenden Medium abgeschirmt, zeigen sie schmale und symmetrische Emissionsbanden mit Quantenausbeuten bis nahezu 100%.^[2] Außerdem bieten die anorganischen Kerne der qdots eine höhere Photostabilität als organische Farbstoffe oder lumineszierende Proteine.^[3,4] Aktuelle Beiträge berichten über die mögliche Derivatisierung der qdot-Oberflächen,^[5] was einen breiten Anwendungsbereich für chemische und biologische Wechselwirkungen eröffnet.^[6] All diese besonderen Eigenschaften machen qdots zu ausgezeichneten Sonden für die analytische Fluoreszenzspektroskopie, wobei Nachweisgrenzen bis zum einzelnen Partikel erreicht werden können.^[4] Bei der Absorption von Photonen mit Energien, die höher als die Bandlücke des Halbleitermaterials sind, zeigen qdots extrem hohe Extinktionskoeffizienten über einen breiten Wellenlängenbereich. Die dadurch entstehenden Excitonen (Elektron-Loch-Paare) rekombinieren unter Abgabe von Photonen mit schmalen Emissionsbanden. Mit diesen Eigenschaften sind qdots hervorragende Donoren für den resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET)^[7] – eine ideale Technik zur Untersuchung von Vorgängen im Nanometerbereich, wie etwa zahlreichen biologischen Prozessen. Unter anderem wurde ein homogener Maltosesensor beschrieben, der die Maltosekonzentration durch die Messung der steigenden qdot-Lumineszenz detektiert, welche mit der Verdrängung eines FRET-Acceptorfarbstoffes durch Maltose einhergeht.^[8]

Auf der anderen Seite wird die Verwendung von qdots als FRET-Acceptoren durch signifikante direkte Anregung erschwert, die das Ausmaß des resonanten Energietransfers begrenzt und die Fluoreszenzemission verfälscht. Quantenpunkte wurden als Acceptoren in einigen Festkörpersystemen auf der Basis von Halbleiterquantentöpfen,^[9] mit kleinen qdots^[10] oder mit blau emittierenden Polymeren^[11] als Energiedonoren eingesetzt, eine Verwendung in diskreten molekularen Systemen in Lösung wurde allerdings nur selten beschrieben.^[12,13] Mattoussi et al. begründeten die mangelnde Effizienz beim Energietransfer von organischen oder anorganischen Donoren auf qdot-Acceptoren damit, dass der fluoreszente Resonanzenergietransfer langsamer ist als der strahlende Zerfall der Donoren.^[12]

Hier berichten wir über CdSe/ZnS-Kern-Schale-Quantenpunkte als Energieacceptoren in einem zeitaufgelösten Fluoroimmuntestsysteem, das einen Terbium-Chelatkomplex mit langer Lumineszenzlebensdauer als Energiedonor und die starke Biotin-Streptavidin-Bindung als Erkennungsprozess nutzt.

Der TbL-Chelatkomplex besteht aus einem Terbium-Kation und einem Liganden mit zwei an einem Glutamatge-

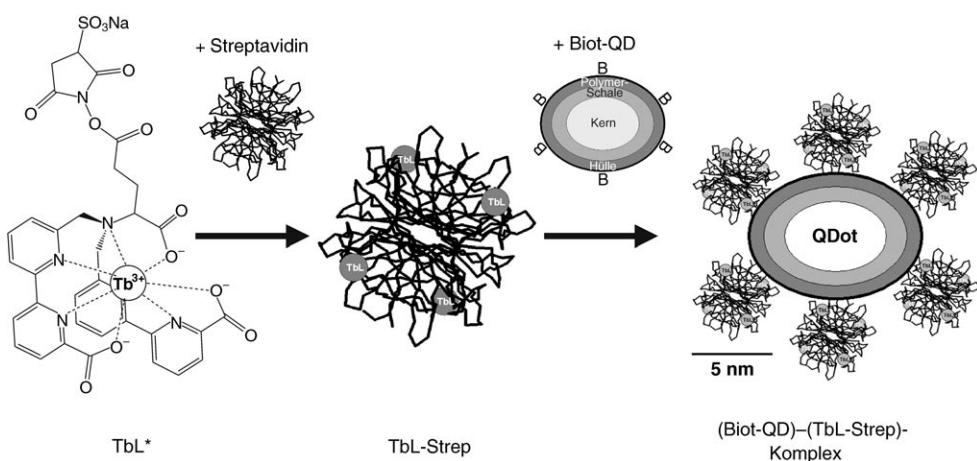


Abbildung 1. Schema für die Bildung des Komplexes (Biotin-QD)-(TbL-Streptavidin); mit TbL markiertes Streptavidin bindet an Biotin auf der Polymeroberfläche des Quantenpunkts.

rüst angebrachten 6-Carboxybipyridin-Armen (Abbildung 1). Die terminale Carboxygruppe des Glutamats wurde mit dem Natriumsalz von *N*-Hydroxysulfosuccinimid in Gegenwart von EDC-HCl (EDC = *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid) nach einer bereits beschriebenen Methode aktiviert.^[14] Der aktivierte Ester, TbL*, wurde mit Streptavidin in PBS-Puffer (pH 7.4) ca. 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nichtumgesetzter Komplex wurde durch umfassende Dialyse des Proteins entfernt. Das Absorptionsspektrum von TbL-Strep ist eine nahezu perfekte Linearkombination der Spektren von Streptavidin und 3,5-TbL-Komplexen (Abbildung 2). Das Material mit diesem Markierungsverhältnis wurde in allen weiteren Experimenten verwendet (in Abbildung 1 vereinfacht dargestellt durch vier TbL-Marker an Streptavidin).

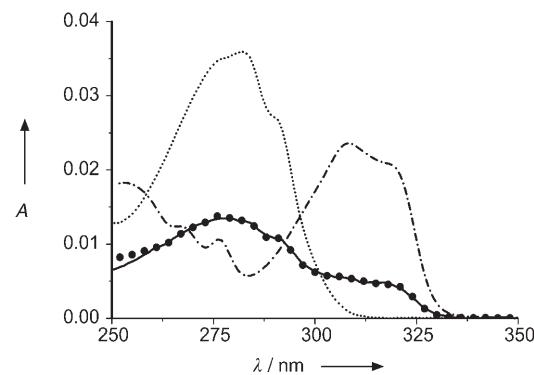


Abbildung 2. UV/Vis-Absorptionsspektren von Streptavidin (···, $c = 4.25 \times 10^{-7} \text{ M}$), TbL* (-·-, $c = 2.27 \times 10^{-6} \text{ M}$), TbL-Strep (—, $c = 1.55 \times 10^{-7} \text{ M}$) und einer Linearkombination von Streptavidin und TbL* (●).

Die MALDI-TOF-Massenspektren des markierten Streptavidintetramers verdeutlichen, dass die Markierung nicht auf einer Stelle jeder Monomereinheit lokalisiert ist (Abbildung S1, Hintergrundinformationen). Zwar machen markierte Proteine mit einem einzelnen Marker pro Monomer den deutlich größten Anteil aus, im Spektrum finden sich aber auch Monomere mit null, zwei oder drei (Spurenmen-

gen) TbL-Komplexen, was auf mindestens zwei unterschiedliche Umgebungen des Tb-Komplexes schließen lässt. Nach Anregung der auf den Bipyridinchromophoren lokalisierten $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge des Liganden bei 308 nm wurde das Lumineszenzspektrum von TbL-Strep mit den typischen Emissionslinien der elektronischen Übergänge von Tb^{3+} ($^5D_4 \rightarrow ^7F_J$, $J=0-6$) gemessen (Abbildung 3). Die Anregung des Ligan-

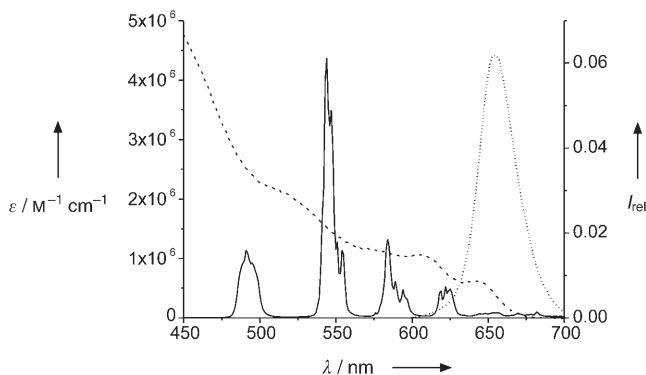


Abbildung 3. Normiertes Emissionsspektrum (Intensität I) von TbL-Strep (—) und Emissions- (···) sowie Absorptionsspektrum (----) von Biot-QD.

den resultiert in einem effizienten Energietransfer auf das Terbium-Ion. Die Markierung störte die molekulare Umgebung des Terbium-Zentralatoms nur in sehr geringem Maße. In reinem Wasser klingt die Lumineszenzlebensdauer von TbL-Strep biexponentiell ab, mit einer langlebigen Hauptkomponente von $1500 \pm 10 \mu\text{s}$ (97 %) und einer kurzlebigen Nebenkomponente von $200 \pm 30 \mu\text{s}$ (3 %) (Abbildung S2, Hintergrundinformationen). Die lange Lebensdauer ist mit dem Wert von reinem TbL in Wasser (1.48 ms)^[14] vergleichbar. In einem 2 % Rinderserumalbumin (BSA) enthaltenden 50 mM Boratpuffer bei pH 8.3^[15] zeigte die Lumineszenzabklingzeit von TbL-Strep zwei exponentielle Anteile, wobei die Hauptkomponente wieder der langlebigen TbL-Abklingzeit mit $1500 \pm 50 \mu\text{s}$ (60 %) entspricht, während der zweite Anteil von $450 \pm 30 \mu\text{s}$ (40 %) von unspezifischen Wechselwirkungen von TbL-Spezies herröhrt, die durch BSA gelöscht wurden. In diesem Puffer, den auch wir in unseren Experimenten verwendeten, liegen somit zwei Arten von Donoren vor. Die Gesamtquantenausbeute des Systems in diesem Puffer beträgt 14.5 % (31 % für reines TbL in Wasser^[14]).

Als Energieacceptorkomponente unseres Fluoroimmuntestsystems verwendeten wir einen mit einer ZnS-Schutzschale umgebenen ellipsoiden Multischicht-CdSe-Halbleiterkern. Dieser vollständige qdot war wiederum von einem Polymer-Biotin-Komplex mit fünf bis sieben Biotinmolekülen pro qdot umhüllt (Abbildung 1), sodass sich eine mittlere Längsachse der biotinylierten Quantenpunkte (Biot-QDs) von 10 bis 12 nm ergab.^[16] Diese Nanopartikel haben charakteristische Absorptions- und Emissionsspektren mit einem Emissionsmaximum bei 655 nm (Abbildung 3). Im Boratpuffer zeigen sie ein multiexponentielles Lumineszenzabklingverhalten im Nanosekundenbereich (Abbildung S3,

Hintergrundinformationen), das mit der Größen- und Formverteilung zusammenhängt.^[17]

Nach Försters Theorie des resonanten Energietransfers^[18] mit einem Brechungsindex von $n = 1.4$ für Biomoleküle in wässriger Lösung^[19] und unter der Annahme, dass die lange Lebensdauer des angeregten Zustandes des Tb-Donors eine statistische Verteilung der Donor-Acceptor-Dipole (Orientierungsfaktor $\kappa^2 = 2/3$) zulässt, wurde ein Förster-Radius von $R_0 = 81 \text{ \AA}$ berechnet. Dieser Wert entspricht dem mittleren Donor-Acceptor-Abstand, bei dem die Hälfte der Energie des Donors auf den Acceptor übertragen wird. Die besonders hohen Absorptionen der qdots führen dazu, dass dieser R_0 -Wert größer ist als bei gewöhnlichen Donor-Acceptor-Paaren (mit Abständen zwischen 21 und 61 Å)^[20] oder bei Paaren, die qdots als Donoren enthalten (47–65 Å).^[12]

Um den Erkennungsprozess zu induzieren und den Energietransfer zu messen, wurde eine Lösung von TbL-Strep ($c = 1 \times 10^{-9} \text{ M}$) mit steigenden Mengen Biot-QD versetzt. Jede Probe wurde mit einem Xe-Cl-Excimerlaser bei 308 nm angeregt, und anschließend wurden die Emissionen bei 545 und 665 nm detektiert. Diese Banden sind die optimalen spektralen Bereiche zur Messung der Emissionen von TbL-Strep bzw. Biot-QD. Biot-QD wurde bei 665 nm anstatt am Maximum bei 655 nm gemessen, um der schwachen Hintergrundlumineszenz von TbL-Strep auszuweichen, die bei 655 nm noch präsent ist (Abbildung 3). Emissionsmessungen wurden im zeitaufgelösten Modus durch Integration in einem Zeitfenster von 250 bis 1000 µs nach dem Anregungspuls aufgenommen, sodass sich zwei langlebige Intensitäten I_{665} und I_{545} ergaben. Durch diese Methode wurden die Autofluoreszenz der Probe und des Puffers sowie Störungen durch Lichtstreuung in der Messapparatur drastisch reduziert.^[21] Abbildung 4 zeigt den Intensitätsquotienten R , aufgenommen in den beiden Detektionskanälen ($R = I_{665}/I_{545}$), als Funktion des Konzentrationsverhältnisses [Biot-QD]/[TbL-Strep] bei unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Die Zugabe von Biot-QD zu TbL-Strep führt zu einem starken Anstieg von R bei kleinen qdot-Konzentrationen ($[\text{Biot-QD}]/[\text{TbL-Strep}] < 0.2$), der bei höheren qdot-Konzentrationen abflacht. Dieses Phänomen entwickelt sich zeitlich langsam (Abbildung 4a), und ein Gleichgewicht wird nach 4.5 Stunden erreicht (Abbildung 4b).^[22] Der deutliche Anstieg im ersten Teil der Kurve, der kleinen qdot-Konzentrationen entspricht ($[\text{Biot-QD}]/[\text{TbL-Strep}] < 0.1$), ist hauptsächlich auf die starke Zunahme der langlebigen qdot-Emission zurückzuführen. Bei $[\text{Biot-QD}]/[\text{TbL-Strep}] > 0.4$ wird die Emission nahezu konstant. Eine Extrapolation des linearen Anstiegs bei kleinen Konzentrationen führt zu einem Schnittpunkt mit der Plateaulinie bei $[\text{Biot-QD}]/[\text{TbL-Strep}] \approx 0.13-0.16$. Dieser Wert stimmt hervorragend mit der vom Hersteller angegebenen Zahl von Biotinmolekülen pro qdot (5–7) überein, was darauf hindeutet, dass alle Biotinmoleküle auf der Nanopartikeloberfläche erreichbar bleiben.

In einem Kontrollexperiment konnte ein dynamischer Energietransfer zwischen TbL und den qdots ausgeschlossen werden, da der schwache lineare Anstieg von R mit $[\text{Biot-QD}]/[\text{reines TbL}]$ auf einen stärkeren Abfall von I_{545} gegenüber I_{665} zurückzuführen war (Abbildung S4a, Hintergrundinformationen). Somit ziehen wir den Schluss, dass der starke

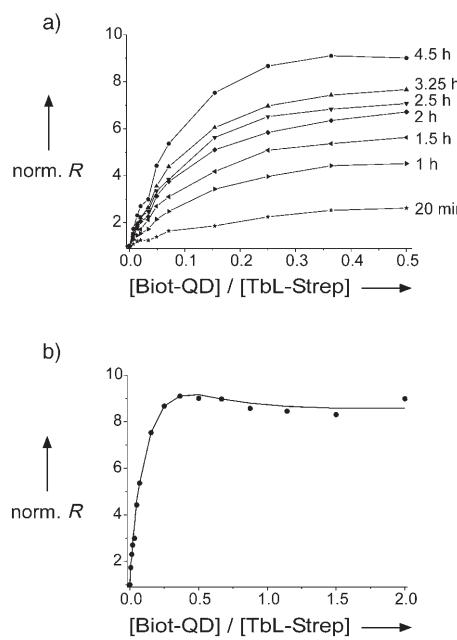


Abbildung 4. a) Intensitätsquotient R als Funktion des Konzentrationsverhältnisses $[Biot-QD]/[TbL-Strep]$ von 0 bis 0.5 bei Inkubationszeiten von 20 min bis 4.5 h. b) R nach 4.5 h (Gleichgewicht) für Konzentrationsverhältnisse von 0 bis 2. Ausgangskonzentration: $[TbL-Strep] = 1 \times 10^{-9} \text{ M}$. In beiden Diagrammen wurde R für $[Biot-QD]/[TbL-Strep] = 0$ (d.h. ohne Zusatz von Biot-QD) auf 1 normiert.

Anstieg von R mit $[Biot-QD]/[TbL-Strep]$ (Abbildung 4b) ein klares Anzeichen für einen resonanten Fluoreszenzenergietransfer von TbL auf qdots durch den Streptavidin-Biotin-Komplex ist.

Einen weiteren Nachweis dafür, dass die qdot-Emission durch Energietransfer vom Terbium ausgelöst wird, lieferten die Lumineszenzabklingzeiten bei 665 nm für unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse $[Biot-QD]/[TbL-Strep]$ (Abbildung 5). In Gegenwart von TbL-Strep zeigt das qdot-Emissionsprofil zwei neue langlebige Komponenten mit $560 \pm 40 \mu\text{s}$ und $170 \pm 20 \mu\text{s}$, die durch Energietransfer aus den beiden Tb-Donorspezies entstehen. Geht man davon aus, dass die intrinsische Abklingzeit von Biot-QD sehr kurz ist,^[17]

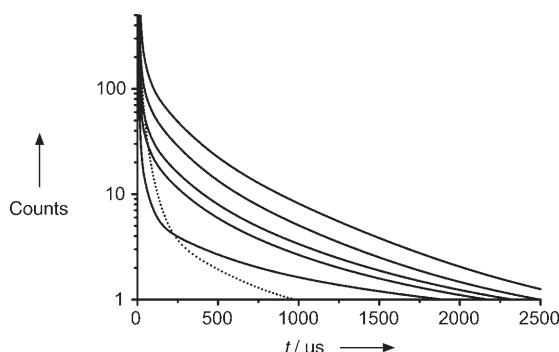


Abbildung 5. Intensitätsabklingverhalten bei 665 nm ($\lambda_{ex}=308 \text{ nm}$) für unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse $[Biot-QD]/[TbL-Strep]$ (0, 0.014, 0.034, 0.071 und 0.25), durchgehende Linien von oben nach unten, $[Biot-QD]=0-2.0 \times 10^{-10} \text{ M}$ und für reines Biot-QD (gepunktete Linie, $[Biot-QD]=1.0 \times 10^{-10} \text{ M}$).

können die langlebigen Komponenten, die man für Biot-QD in Gegenwart von TbL-Strep ermittelt, als Lumineszenzabklingzeiten des Donors in Gegenwart des Acceptors (τ_{DA}) betrachtet werden.^[20] Die Berechnung der Energietransfergeschwindigkeit und des mittleren Abstandes r zwischen Donor-Acceptor-Paaren mit multiexponentiellen Donorlumineszenzabklingzeiten ergab einen mittleren Abstand von $r=72-76 \text{ \AA}$, je nach der Menge von hinzugegebenem Biot-QD (Abbildung S5 und theoretische Behandlung, Hintergrundinformationen).^[19] Diese Abstände spiegeln den angenommenen Aufbau des Komplexes aus Abbilung 1 sehr gut wider und resultieren in Energietransfergeschwindigkeiten von $k_{ET1}=(1.1 \pm 0.3) \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ und $k_{ET2}=(3.9 \pm 0.6) \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ sowie einer Effizienz von $E=63 \pm 4\%$. Es soll an dieser Stelle angemerkt werden, dass diese Berechnung für aus Punktdipolen bestehende sphärisch symmetrische Systeme gilt und weder geometrische Anisotropien der ellipsoiden qdots noch die nichtstatistische Verteilung der Tb-Acceptoren um den Nanokristall berücksichtigt.^[24]

Zusammenfassend belegen unsere Ergebnisse, dass TbL-qdot ein sehr vielversprechendes Donor-Acceptor-Paar für FRET-Experimente ist. Die Verwendung von Donoren mit langlebigen angeregten Zuständen hat vor allem zwei Vorteile: Zum einen ermöglichen sie einen effizienten Energietransfer zu den qdots, der über die konkurrierende strahlende Desaktivierung des Donors dominiert.^[12] Zum anderen lässt die verlängerte Abklingzeit des qdot-Acceptors (bis zu mehrere hundert μs) die Anwendung zeitaufgelöster Messmethoden zu, woraus stark verbesserte Detektionsempfindlichkeiten resultieren. Die Nachweigrenze liegt bei unseren experimentellen Bedingungen bei ca. $3.3 \times 10^{-12} \text{ M}$. Der große R_0 -Wert, der aus der sehr hohen qdot-Absorption resultiert, erweitert den Anwendungsbereich von Energietransferexperimenten auf sehr große Proteine, ohne dass ebenfalls große fluoreszierende Proteine als Energiedonoren oder -acceptoren verwendet werden müssen. Weitere Arbeiten zu diesem Thema werden zurzeit durchgeführt.

Experimentelles

TbL wurde nach Literaturangaben hergestellt.^[14] Synthese und Charakterisierung von TbL*: $[TbL]Na_4H_2O$ (45 mg, 55 μmol) wurde in 10 mL Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und mit *N*-Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalzhydrat (14 mg, 60 μmol) und EDC-HCl (12 mg, 63 μmol) versetzt. Die Lösung wurde 92 h bei Raumtemperatur gerührt, bis der Startkomplex vollständig aufgelöst war. Zur Fällung des Produktes wurde THF hinzugegeben. Nach Zentrifugieren und Trocknen unter Vakuum wurde $[TbL^*] \cdot 5H_2O$ (45 mg, 81 %) in Form eines gelben Pulvers isoliert. Elementaranalyse: ber. für $C_{33}H_{24}N_6NaO_{13}STb \cdot 5H_2O$ (%): C 38.99, H 3.37, N 8.27; gef.: C 39.20, H 3.56, N, 8.39; FAB⁺-MS: $m/z: 682.2 ([TbL^* - C_5H_3NNaO_5S]^+, 95\%)$, 727.2 ($[TbL^* - C_4H_3NNaO_5S + H]^+, 55\%$); IR (KBr): $\nu = 3447 \text{ (s)}, 1735 \text{ (w)}, 1624 \text{ (m)}, 1388 \text{ (w)}, 1231 \text{ (w)}, 1043 \text{ (w) cm}^{-1}$.

TbL-Strep-Markierung: 0.5 mg TbL* wurden in 2 μL DMSO vorgelöst und mit 1 mg Streptavidin in 200 μL PBS-Puffer (pH 7.4) gemischt. Nach 24 Stunden Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit Millipore-Wasser verdünnt und dialysiert.

Biotinylierte qdots (Qdot 655 Biotin Conjugate-Trial Size Lot No. 0603-0050) wurden von Quantum Dot Corp. (Hayward, USA) bezogen. Die FRET-Messungen wurden mit einem modifizierten

Kryptor-Analysator (Fa. Cezanne, Nîmes, Frankreich) für zeitaufgelöste integrierte Einzelphotonenzählung in zwei Kanälen (545 nm und 665 nm; filterbasierte Wellenlängentrennung) mit 2 µs Integrationsschritten über 8 ms mit OPTex-XeCl-Excimerlaser (Fa. Lambda Physik AG, Göttingen) als Anregungsquelle mit 20 Hz Wiederholungsrate durchgeführt. Qdot-Lebenszeitmessungen wurden an einem Andor-iStar-ICCD-System mit Monochromator und spektralgraphischer Wellenlängentrennung (Fa. LOT-Oriel, Darmstadt) mit XeCl-Excimerlaser-Anregung durchgeführt.

Eingegangen am 6. Mai 2005,
veränderte Fassung am 8. August 2005
Online veröffentlicht am 25. Oktober 2005

Stichwörter: Immunassays · Lumineszenz · Quantenpunkte · Resonanter Fluoreszenzenergietransfer (FRET) · Terbium

- [1] a) A. P. Alivisatos, *Science* **1996**, *271*, 933–937; b) C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706–8715.
- [2] a) X. Peng, M. C. Schlamp, A. V. Kadavanich, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7019–7029; b) P. Reiss, J. Bleuse, A. Pron, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 781–784.
- [3] B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Briantou, A. Libchaber, *Science* **2002**, *298*, 1759–1762.
- [4] W. C. W. Chan, S. M. Nie, *Science* **1998**, *281*, 2016–2018.
- [5] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentilila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, *307*, 538–544.
- [6] M. Green, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4221–4223; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4129–4131.
- [7] a) E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6166–6235; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042–6108; b) A. R. Clapp, I. L. Medintz, J. M. Mauro, B. R. Fisher, M. G. Bawendi, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 301–310; c) I. Geissbuehler, R. Hovius, K. L. Martinez, M. Adrian, K. Ravindranathan Thampi, H. Vogel, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1412–1416; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1388–1392.
- [8] I. L. Medintz, A. R. Clapp, H. Mattoussi, E. R. Goldman, B. M. Fisher, J. M. Mauro, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 630–638.
- [9] M. Achermann, M. A. Petruska, S. Kos, D. L. Smith, D. D. Koleske, V. I. Kimov, *Nature* **2004**, *429*, 642–646.
- [10] C. R. Kagan, C. B. Murray, M. Nirmal, M. G. Bawendi, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *76*, 1517–1520.
- [11] M. Anni, L. Manna, R. Cingolani, D. Valerini, A. Creti, M. Lomascolo, *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *85*, 4169–4171.
- [12] A. R. Clapp, I. L. Medintz, B. R. Fisher, G. P. Anderson, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1242–1250.
- [13] N. N. Mamedova, A. K. Nicholas, A. L. Rogach, J. Studer, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 281–286.
- [14] N. Weibel, L. J. Charbonnière, M. Guardigli, A. Roda, R. Ziesel, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4888–4896.
- [15] Dieses Puffersystem wurde wegen seiner optimalen photophysikalischen Bedingungen für die qdots ausgewählt. Der PBS-Puffer führt hingegen zu merklichen Einbußen in der Energietransfereffizienz.
- [16] Qdot Biotin Conjugates User Manual (Cat. 1030-1, Cat. 1032-1), <http://www.qdots.com>.
- [17] a) B. R. Fisher, H. J. Eisler, N. E. Stott, M. G. Bawendi, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 143–148; b) G. Schlegel, J. Bohnenberger, I. Potatova, A. Mews, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88*, 137401.
- [18] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, *2*, 55–75.
- [19] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer/Plenum, New York, **1999**.
- [20] B. Valeur, *Molecular Fluorescence, Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [21] L. J. Charbonnière, R. Ziessel, M. Guardigli, A. Roda, N. Sabatini, M. Cesario, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2436–2437.
- [22] Vorangegangene Studien zu den Lebensdauern angeregter Tb-Zustände haben gezeigt, dass der Zusatz von BSA im Puffersystem eine wichtige Rolle spielt. Über unspezifische Wechselwirkungen zwischen BSA und Streptavidin, die mit der Biotin-Streptavidin-Bindung konkurrieren können, wurde bereits berichtet.^[23] In unserem Fall führen diese unspezifischen Wechselwirkungen zu einer langsamem Gleichgewichtseinstellung des Systems. Die Wechselwirkung von BSA mit Streptavidin muss zuerst unterbrochen werden, bevor die thermodynamisch bevorzugte (TbL-Strep)-(Biot-QD)-Wechselwirkung auftreten kann. Das Ablösen des BSA von der emittierenden Tb-Spezies unterbindet den Lösungsprozess und ist vermutlich der Auslöser für die steigende Tb-Emission bei [Biot-QD]/[TbL-Strep] < 0.25 (Abbildung S4b, Hintergrundinformationen).
- [23] J. H. F. Erkens, S. J. Dieleman, R. A. Dressendorfer, C. J. Strasburger, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *67*, 153–161.
- [24] H. E. Grecco, K. A. Lidke, R. Heintzmann, D. S. Lidke, C. Spagnuolo, O. E. Martinez, E. A. Jares-Erijman, T. M. Jovin, *Microsc. Res. Tech.* **2004**, *65*, 169–179.