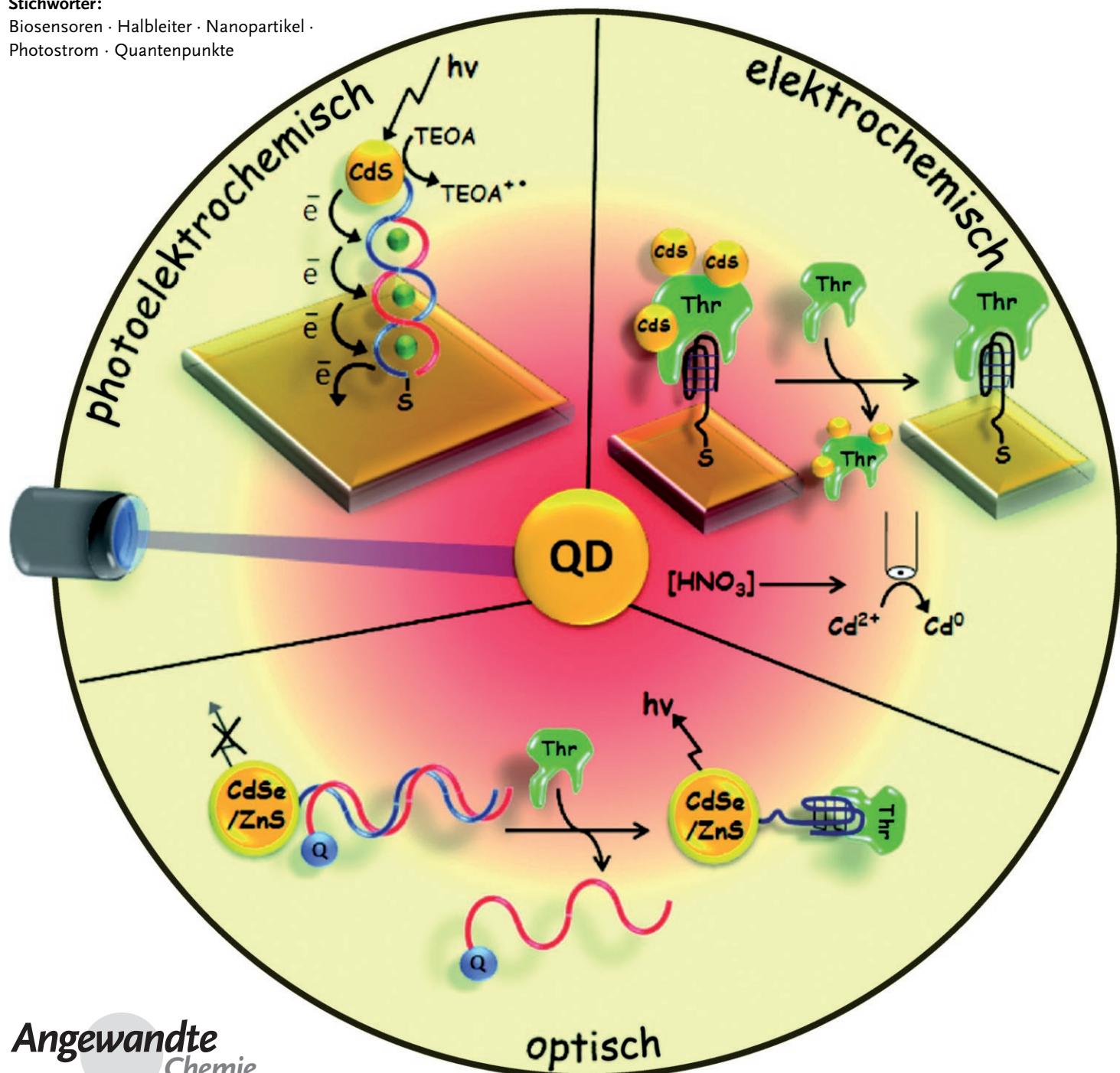


# Halbleiterquantenpunkte für die Bioanalyse

Ron Gill, Maya Zayats und Itamar Willner\*

**Stichwörter:**

Biosensoren · Halbleiter · Nanopartikel ·  
Photostrom · Quantenpunkte



**H**albleiternanopartikel (oder Halbleiterquantenpunkte) verfügen über einzigartige photophysikalische Eigenschaften (z. B. eine größenabhängige Fluoreszenz), zeigen hohe Fluoreszenzausbeuten und sind gegen photochemische Zersetzung stabil. Dies ermöglicht ihre Verwendung als Markierungen für die optische Parallelanalyse von Immunkomplexen und DNA-Hybridisierungen oder zur Verfolgung katalytischer biochemischer Umwandlungen. So können die Replizierung oder Telomerisierung von Nucleinsäuren, die Oxidation von Phenolderivaten durch Tyrosinasen oder die Hydrolyse von Peptiden durch Proteasen anhand des resonanten Fluoreszenzenergietransfers oder des lichtinduzierten Elektronentransfers analysiert werden. Durch Photoanregung von Quantenpunkt-Biomolekül-Hybriden, die mit Elektroden verbunden sind, gelingt die photoelektrochemische Übersetzung biologischer Erkennungsprozesse oder katalytischer Umwandlungen. Beispiele sind die Erzeugung eines Photostroms durch CdS-Nanopartikel, die über DNA-Doppelstränge mit einer Elektrode verknüpft sind, oder das Auftreten von Photostromen als Folge biochemischer Umwandlungen. Beim elektrochemischen DNA- oder Protein-Nachweis binden mit Nucleinsäuren oder Proteinen funktionalisierte Halbleiternanopartikel an biologische Komplexe. Nach der anschließenden Zersetzung der Nanopartikel lassen sich die Ionen nachweisen, und der Erkennungsprozess wird offenkundig.

## 1. Einleitung

Halbleiter-Nanopartikel (NPs) oder Halbleiter-Quantenpunkte (QDs) empfehlen sich durch einzigartige photophysikalische Eigenschaften für die Anwendung als langlebige und hoch empfindliche Markierungen in optischen Biosensoren. Charakteristisch für Halbleiter-QDs sind hohe Fluoreszenzausbeuten, die Beständigkeit gegen photochemische Zersetzung<sup>[1]</sup> und eine größenabhängige Lumineszenz.<sup>[2–6]</sup> Letztere Eigenschaft ermöglicht es, optische Markierungen aus ein und demselben Material anzufertigen, indem nur die Größe der QDs variiert wird – hierin liegt der große Vorteil von QDs als Fluoreszenzmarkierungen für Parallelanalysen. Anders als molekulare Fluorophore, deren Anregung in einem engen Spektralbereich erfolgen muss, zeichnen sich Halbleiter-QDs durch breite Absorptionsbänder aus. QDs unterschiedlicher Größe lassen sich darum in einer Parallelanalyse mit einer gemeinsamen Wellenlänge anregen und geben sich anschließend durch ihre Fluoreszenz zu erkennen. Leistungsfähige Synthesemethoden für Halbleiter-QDs stehen bereits zur Verfügung, und eine chemische Modifizierung der QD-Oberfläche durch Aufbringen von Monoschichten oder dünnen Filmen ist seit einigen Jahren ebenfalls möglich.<sup>[7]</sup> An der Oberfläche solchermaßen funktionalisierter QDs können wiederum Liganden oder Rezeptoreinheiten fixiert werden. Die Aufgabe der QDs in den resultierenden Konjugaten besteht darin, auf der Oberfläche stattfindende Erkennungsprozesse anzuzeigen.<sup>[8,9]</sup>

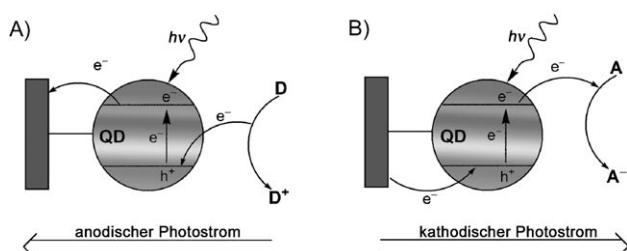
Quantenpunkte sind außerdem photoelektrochemisch aktiv.<sup>[10]</sup> Die Anregung von Halbleiter-QDs resultiert in

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	7715
<b>2. Wasserlösliche Quantenpunkte und ihre Funktionalisierung mit Biomolekülen</b>	7716
<b>3. Halbleiterquantenpunkte als optische Markierungen für die Bioanalyse</b>	7718
<b>4. Chemilumineszierende Halbleiterquantenpunkte in der Bioanalyse</b>	7727
<b>5. Halbleiternanopartikel für die photoelektrochemische Bioanalyse</b>	7728
<b>6. Halbleiternanopartikel als elektrochemische Markierungen für Erkennungsprozesse</b>	7731
<b>7. Zusammenfassung und Ausblick</b>	7733

einem Elektronentransfer vom Valenzband in das Leitungsband und der Erzeugung von Elektron-Loch-Paaren. Während die Lumineszenz der QDs auf der Elektron-Loch-Rekombination unter Lichtemission beruht, entstehen durch Einfang von Leitungsbandelektronen in Energiesenken an der Oberfläche („surface traps“) langlebige Elektron-Loch-Paare. So wird die Abgabe eingefangener Elektronen an eine Elektrode (oder an einen Elektronenakzeptor A in Lösung) möglich, was einen Photostrom zur Folge hat. Die Abgabe der Leitungsbandelektronen an eine Elektrode ergibt in Kombination mit einer Elektronenaufnahme von einem gelösten Elektronendonator D einen anodischen Photostrom (Abbildung 1A). Umgekehrt resultiert die Abgabe von Leitungsbandelektronen an einen gelösten Elektronenakzeptor mit anschließender Elektronenaufnahme von der Elektrode (um die Löcher im Valenzband zu füllen) in einem kathodischen Photostrom (Abbildung 1B). Die Anlagerung von Halbleiter-QDs auf Oberflächen und die photoelektrochemischen Aktivitäten dieser Systeme wurden in zahlreichen Studien untersucht. Dabei wurden Schichten von ca. 3 nm großen Cadmiumsulfid(CdS)-Nanopartikeln auf Goldsubstraten mit einer selbstorganisierten Monoschicht (SAM) aus einem Alkandithiol befestigt, indem das Substrat abwech-

[\*] R. Gill, Dr. M. Zayats, Prof. I. Willner  
Institute of Chemistry, The Hebrew University of Jerusalem  
Jerusalem 91904 (Israel)  
Fax: (+ 972) 2-6527-715  
E-Mail: willnea@vms.huji.ac.il  
Homepage: <http://chem.ch.huji.ac.il/willner>



**Abbildung 1.** An Elektroden gebundene Halbleiter-NPs erzeugen anodische (A) und kathodische Photoströme (B).

selnd in eine Ethanollösung des Dithiols (im Beispiel 1,6-Hexandithiol oder 1,10-Decandithiol) und eine Dispersion der CdS-Nanopartikel in H<sub>2</sub>O/Heptan mit inversen Micellen aus Natriumbis(2-ethylhexyl)sulfosuccinat (Aerosol OT, AOT) eingetaucht wurde.<sup>[11]</sup> Der Photostrom dieser Elektroden wurde in Gegenwart von Triethanolamin als Elektronendonator beobachtet. In einem weiteren Beispiel erzielten CdS-Nanopartikel auf mit Kohlenstoffnanoröhren (CNTs) modifizierten Goldelektroden sehr hohe Quantenausbeuten.<sup>[12]</sup> Das photoelektrochemische Verhalten von Elektroden mit Halbleiter-QD-Filmen wurde auch im Hinblick auf die Entwicklung von Solarzellen intensiv untersucht.<sup>[13–16]</sup>

Durch ihre photoelektrochemischen und Fluoreszenzeigenschaften bieten sich QDs als Komponenten für Sensoren an. Ein System aus CdSe/ZnS-QDs mit zweierlei Größe wurde zum K<sup>+</sup>-Nachweis in wässriger Lösung genutzt.<sup>[17]</sup> Ein 3.2 nm großer Quantenpunkt ( $\lambda_{em} = 545$  nm) diente als Energiedonor, ein 5.6 nm großes Partikel ( $\lambda_{em} = 635$  nm) als Energieakzeptor. An jedes Partikel war über eine Liponsäurebrücke eine [15]Krone-5-Einheit als selektiver K<sup>+</sup>-Rezeptor angebracht. Nach Zugabe des Metallions entstand ein QD(545 nm):K<sup>+</sup>:QD(635 nm)-Sandwichkomplex, in dem die

unterschiedlich großen Quantenpunkte nahe genug für einen Energietransfer zusammenkommen. Beim Erhöhen der K<sup>+</sup>-Konzentration nahm daher die Emission bei 545 nm zugunsten derjenigen bei 635 nm ab. In einem weiteren Beispiel wurde ein ratiometrischer pH-Sensor synthetisiert, indem ein pH-empfindlicher Squarain-Farbstoff an der Oberfläche von QDs befestigt wurde.<sup>[18]</sup> QDs sind darüber hinaus intrinsisch temperaturempfindlich: CdSe/ZnS-QDs in Poly(laurylmethacrylat)-Matrices zeigen eine lineare und reversible Fluoreszenzänderung zwischen 315 und 100 K.<sup>[19]</sup>

QDs sind aussichtsreiche Markierungen für die Bioanalyse, weil sie von ähnlicher Größe sind wie Enzyme, Antigene/Antikörper, Proteinrezeptoren oder Nucleinsäuren. Biochemische Prozesse könnten nach einer optischen oder photoelektrochemischen Übersetzung über eine elektronische Kommunikation mit QDs in Hybridnanosystemen verfolgt werden. Bei der Einführung der Biomaterial-QD-Hybridstrukturen in Zellen zur Aufklärung und Steuerung zellulärer Prozesse könnte sich weiterhin die Kombination aus dem gezielten Transport der Biomoleküle und den photophysikalischen Eigenschaften der QDs als vorteilhaft erweisen.

In den vergangenen Jahren wurden durch die Anwendung von Halbleiter-QDs als optische Markierungen oder zur (photo)elektrochemischen Übersetzung beim Nachweis biochemischer Erkennungsprozesse und Transformationen große Fortschritte erzielt. Die Einsatzmöglichkeiten fluoreszierender QDs in der Bioanalyse wurden in Übersichtsartikeln dargelegt.<sup>[20–22]</sup> Hier soll der Schwerpunkt auf QDs liegen, die entweder als optische Markierungen biochemische Umwandlungen anzeigen oder die photoelektrochemische Übersetzung solcher Prozesse oder Erkennungsphänomene ermöglichen.

## 2. Wasserlösliche Quantenpunkte und ihre Funktionalisierung mit Biomolekülen

Die günstigen photophysikalischen Eigenschaften von Halbleiter-QDs – hohe Fluoreszenzquantenausbeuten und Beständigkeit gegen photochemische Zersetzung – zeigen sich zunächst in organischen Lösungsmitteln; in wässrigen Medien werden hingegen deutlich geringere Lumineszenzquantenausbeuten erhalten. Vermutlich reagieren die Oberflächen mit Wasser, wodurch Energiesenken zum Einfang der Leitungsbandelektronen entstehen.<sup>[23]</sup> Da biochemische



Ron Gill fertigt zurzeit unter Anleitung von Professor I. Willner seine Doktorarbeit an. Er befasst sich dabei mit Halbleiternanopartikeln in der Bioanalyse sowie mit der Entwicklung von Biosensoren. Er ist Stipendiat der Clore-Stiftung und wurde mit einem Wolf-Doktorandenpreis ausgezeichnet.



Maya Zayats promovierte 2007 unter in der Gruppe von Professor I. Willner an der Hebrew University in Jerusalem. Zu ihren Forschungsinteressen zählen die Entwicklung elektronischer Biosensoren und die Anwendung von Nanopartikeln in der Bioanalyse. Sie erhielt ein Eshkol-Stipendium des Israelischen Wissenschaftsministeriums und den Yashinski-Preis.



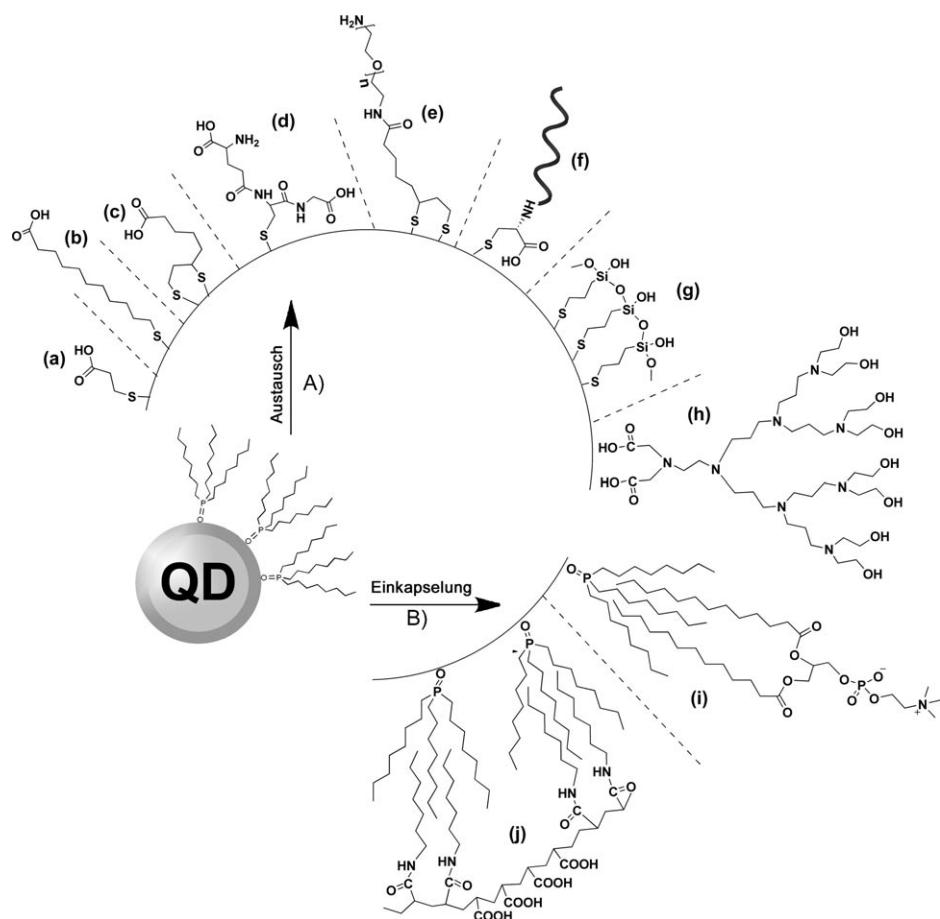
Itamar Willner promovierte an der Hebrew University in Jerusalem im Jahr 1978. Nach einem Postdoktorat an der University of California in Berkeley kehrte er an die Hebrew University zurück, an der er nun als Professor über Bioelektronik, Nanobiotechnologie, Synthesen und Anwendungen von Metall- und Halbleiternanopartikeln sowie Elektro- und Photochemie forscht. Er erhielt den Israelischen Chemiepreis (2002) sowie den Rothschild-Preis (2008) und ist Mitglied der Israelischen Akademie der Wissenschaften sowie der Europäischen Akademie der Wissenschaften und Künste.

Erkennungsprozesse oder Umwandlungen gewöhnlich in wässrigen Medien stattfinden, müssen die vorteilhaften Lumineszenzeigenschaften der zur Verfolgung dieser Prozesse eingesetzten QDs auch in einer solchen Umgebung erhalten bleiben. Zur Stabilisierung der Fluoreszenz in wässrigen Medien wurde die Oberfläche von Halbleiter-QDs mit Proteinschutzschichten passiviert<sup>[24,25]</sup> oder mit Siliciumoxid<sup>[26,27]</sup> oder Polymerfilmen überzogen.<sup>[1,28,29]</sup> Mit diesen Verfahren lassen sich zwar die photophysikalischen Eigenschaften der QDs aufrechterhalten, die passivierenden Schichten stehen aber manchen Anwendungen in der Bioanalyse im Wege.

Quantenpunkte wurden als optische Markierungen eingesetzt, um katalytische Prozesse oder Strukturänderungen von Biomolekülen anhand eines resonanten Fluoreszenzenergietransfers (FRET) oder einer Elektronentransferlösung zu verfolgen.<sup>[30,31]</sup> Allerdings sprechen diese photophysikalischen Verfahren auf den Abstand von Donor-Akzeptor- bzw. Chromophor-Löscher-Paaren an und sind folglich mit dem Einsatz passivierter fluoreszierender QDs unvereinbar, die von dicken Schutzschichten umgeben sind. Daher muss die Struktur der Schutzschicht so geartet sein, dass die photophysikalischen Eigenschaften der Partikel weitestgehend genutzt werden können. Synthesemethoden für wasserlösliche QDs mit hohen Fluoreszenzquantenausbeuten sind bekannt.<sup>[20,32,33]</sup> Dabei werden wasserlösliche (makro)molekulare Beschichtungsreagenzien in Form von Monoschichten oder dünnen Filmen durch kovalente oder koordinative Wechselwirkungen auf der QD-Oberfläche abgeschieden (Abbildung 2). CdSe-QDs einheitlicher Größe mit hohen Fluoreszenzquantenausbeuten (25 %) wurden durch Aufbringen einer Glutathion(GSH)-Schicht in Wasser stabilisiert.<sup>[34]</sup> Mit Glutathion überzogene CdTe-QDs (GSH-CdTe) mit einstellbarer Fluoreszenz (500–650 nm) und hoher Quantenausbeute (bis 45 %) wurden in wässrigen Medien synthetisiert und zum Anfärben immobilisierter Zellen verwendet.<sup>[35]</sup> Wasserlösliche CdSe/CdS-Kern-Schale-QDs mit einer Beschichtung aus thioliertem Cyclodextrin und einer Quantenausbeute von 46 % in Wasser wurden in einem Schritt synthetisiert.<sup>[36]</sup>

Ein weiteres Herstellungsverfahren für wasserlösliche QDs beruht auf dem Austausch organischer Liganden wie Trioctylphosphinoxid (TOPO) oder Octadecylamin (ODA), die bei der QD-Synthese eingeführt werden, gegen wasserlösliche Thiolatliganden in einem Zweiphasensystem aus Wasser und einem organischen Solvens. Für Halbleiter-QDs werden dabei zumeist Derivate aliphatischer Carbonsäuren wie Mercaptoessigsäure (MAA),<sup>[25,37,38]</sup> Mercaptopropionsäure

(MPA) oder Mercaptoundecansäure (MUA) eingesetzt. Di-hydrophilopronsäure(DHLA)-Derivate binden als starke zweizähnige Liganden über zwei Thiolgruppen fest an die Oberfläche wasserlöslicher CdSe/ZnS-QDs.<sup>[24,39]</sup> Auch Liponsäurederivate, die Polyethylenglykolbrücken mit Verknüpfungsstellen für Biomoleküle tragen, wurden an QDs immobilisiert.<sup>[40,41]</sup> Diese Einheiten verhindern einerseits eine unspezifische Adsorption und ermöglichen andererseits die kovalente Anbindung der Biomoleküle. Peptide mit Polycystein-Domänen wurden ebenfalls bei der Synthese wasserlöslicher QDs einbezogen.<sup>[42,43]</sup> Durch Austausch von ODA-Liganden gegen Dendrone erhielt man wasserlösliche QDs mit Quantenausbeuten von 36 %.<sup>[44]</sup> Interessanterweise lieferten Dendrone mit Carboxylatgruppen als Hafteinheiten höhere Quantenausbeuten in Wasser als solche mit Thiolgruppen.<sup>[45]</sup> Alternativ zum Austausch der organischen Gruppen, die nach der Synthese die Partikeloberfläche bedecken, kann man auch amphiphile Polymere aufbringen, die über eine hydrophobe Seitenkette mit der organischen Schutzschicht wechselwirken, und ein PEG-Rückgrat enthalten, das die Wasserlöslichkeit erhöht.<sup>[46,47]</sup> Nach diesem Prinzip modifizierte



**Abbildung 2.** Modifizierung von Halbleiter-QDs mit funktionellen Schutzschichten zur Solubilisierung in Wasser, um die Lumineszenzeigenschaften zu erhalten und/oder weitere Biomoleküle kovalent an die Oberfläche zu binden. A) Austausch der organischen Schutzschicht gegen eine hydrophile Schicht: a–d) (d) Thiol-Monoschichten, e) Glutathion, f) Peptide mit endständigem Cysteinrest, g) thiolierte Siloxane, h) Dendrone mit Carboxygruppen. B) Einkapselung unter Bildung von Doppelschichtfilmen i) mit einem Phospholipid, j) mit einem Diblockcopolymer.

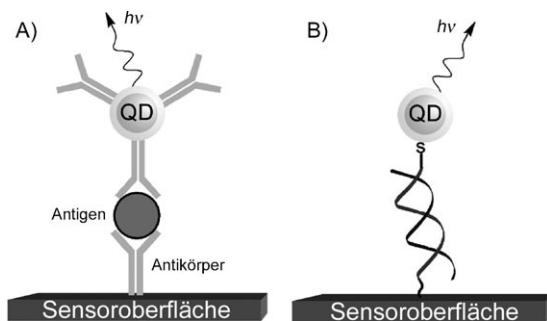
QDs behielten bei Übergang in wässrige Medien Quantenausbeuten von 55 % bei.

Biomoleküle wurden nach verschiedenen Methoden auf Quantenpunkten verankert. Am häufigsten werden primäre Aminogruppen des Biomoleküls mit Carbonsäureresten auf der Schutzschicht der Nanopartikel verknüpft. Dieses Verfahren eignet sich für DNA, die über eine einzige, terminale primäre Aminogruppe verfügt,<sup>[48]</sup> könnte aber bei Proteinen, die mehrere Carbonsäure- und Aminogruppen enthalten, zu einer Vernetzung oder Aggregation führen. Künstliche Proteine mit einer positiv geladenen Domäne<sup>[24]</sup> oder positiv geladene Proteine wie Avidin<sup>[49]</sup> oder Papain<sup>[50]</sup> lagern sich elektrostatisch an die negativ geladene Oberfläche mit Carbonsäuren functionalisierter QDs an. Antikörper mit freien Thiolgruppen (nach Reduktion mit DTT) wurden an QDs mit freien Aminofunktionen in der Schutzschicht konjugiert; als Vernetzungsgens diente unter anderem Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC).<sup>[51]</sup> Eine Einheit aus sechs Histidinresten (Polyhistidin-Markierung) bindet carboxyfunktionalisierte QDs. Proteine,<sup>[41,52]</sup> Antikörper,<sup>[53]</sup> Peptide<sup>[54]</sup> und DNA<sup>[55]</sup> mit dieser Markierung konnten auf der Oberfläche von QDs verankert werden.

Schutzschichten bewahren nicht nur die photophysikalischen Eigenschaften von QDs, sondern ermöglichen oft auch die Anlagerung an Elektroden. So wurden CdS-Nanopartikel mit 2-Aminoethanthiol- und 2-Mercaptoethansulfonat-Überzug kovalent an eine mit 3,3'-Dithiobis(succinimidyl-propionat) modifizierte Goldelektrode gekuppelt.<sup>[56]</sup> Durch tunnellspektroskopische Messungen (TS) an einem einzelnen Partikel, dessen Größe aus einem Rastertunnelmikroskopie-(STM)-Bild bekannt war, gelang die Bestimmung der Bandlücke. CdS-Nanopartikel mit *p*-Aminothiophenol-Schutzschicht wurden durch elektrochemische Polymerisation an eine Goldelektrode gebunden, die mit einer *p*-Aminothiophenol-Monoschicht functionalisiert war.<sup>[57]</sup> Der Photostrom der Elektrode in Gegenwart von Triethanolamin hing stark vom Oxidationszustand der Dianilinbrücken ab. Auch mit Mercaptopropionsäure beschichtete CdSe-QDs ließen sich kovalent mit selbstorganisierten Monoschichten aus 11-Amino-1-undecanthiol auf Goldsubstraten verknüpfen.<sup>[58]</sup> Messungen der Oberflächenplasmonenresonanz ergaben, dass der Bindungsprozess schon vor Abscheidung einer Monoschicht beendet war. Als Alternative zur kovalenten Verknüpfung wurden Wasserstoffbrücken genutzt, um CdS-NPs auf Elektroden zu befestigen. Sowohl die NPs als auch die Elektroden waren zu diesem Zweck mit thiolierten Barbitursäurederivaten functionalisiert.<sup>[59]</sup>

### 3. Halbleiterquantenpunkte als optische Markierungen für die Bioanalyse

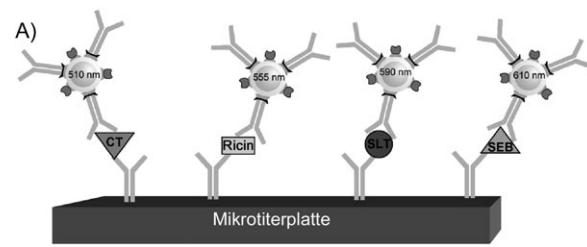
Funktionalisierte Halbleiter-QDs wurden als Fluoreszenzmarkierungen für zahlreiche Erkennungsprozesse eingesetzt,<sup>[60–65]</sup> z. B. in Immunassays zum Proteinnachweis (Abbildung 3 A) oder zur Analyse von Nucleinsäuren (Abbildung 3 B). CdSe/ZnS-QDs mit Avidingruppen wurden als Fluoreszenzmarkierungen an biotinylierte Antikörper angebracht. Immunassays mit diesen Antikörper-NP-Konjugaten



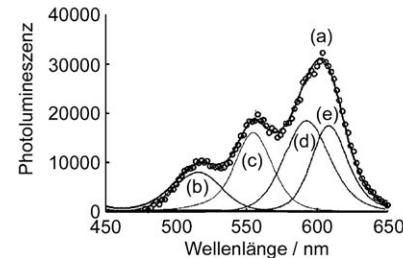
**Abbildung 3.** Fluoreszenzanalysen: A) für ein Antigen durch mit Antikörpern functionalisierte QDs; B) für eine DNA-Sequenz durch QDs mit einer Nucleinsäure.

bewährten sich bei Nachweis toxischer Proteine wie dem Enterotoxin B von Staphylokokken und Choleratoxin.<sup>[49,66]</sup> Ein paralleler Fluoreszenzimmunassay von vier Toxinen – Choleratoxin (CT), Ricin, Shigatoxin 1 (SLT) und dem Enterotoxin B von Staphylokokken (SEB) – im Mikrotiterplattenformat nutzte CdSe/ZnS-QDs unterschiedlicher Größe (Abbildung 4 A). Die unterschiedliche Fluoreszenz der vier QD-Antikörper-Konjugate codierte jeweils für ein Toxin (Abbildung 4 B).<sup>[67]</sup> In Immunassays für den parallelen Nachweis der Bakterien *Escherichia coli* O157:H7 und *Salmonella typhimurium*<sup>[68]</sup> sowie zur Unterscheidung zwischen den Proteinen Diphtherietoxin und Tetanustoxin<sup>[69]</sup> wurden zwei QDs mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen mit den entsprechenden Antikörpern verknüpft.

Herkömmliche DNA-Fluoreszenzmikroassays beruhen auf der Hybridisierung der Ziel-DNA zwischen einer Ein-



( ) = PG-zb      (■) = MBP-zb



**Abbildung 4.** A) Optische Parallelanalyse für Antigene auf einer Mikrotiterplatte anhand der Fluoreszenz unterschiedlich großer Quantenpunkte. B) Das Fluoreszenzspektrum für vier Toxine als Analyte (a; Konzentration:  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) und die Zerlegung in einzelne Spektren: b) CT, c) Ricin, d) SLT und e) SEB. Wiedergabe nach Lit. [67] mit Genehmigung der American Chemical Society.

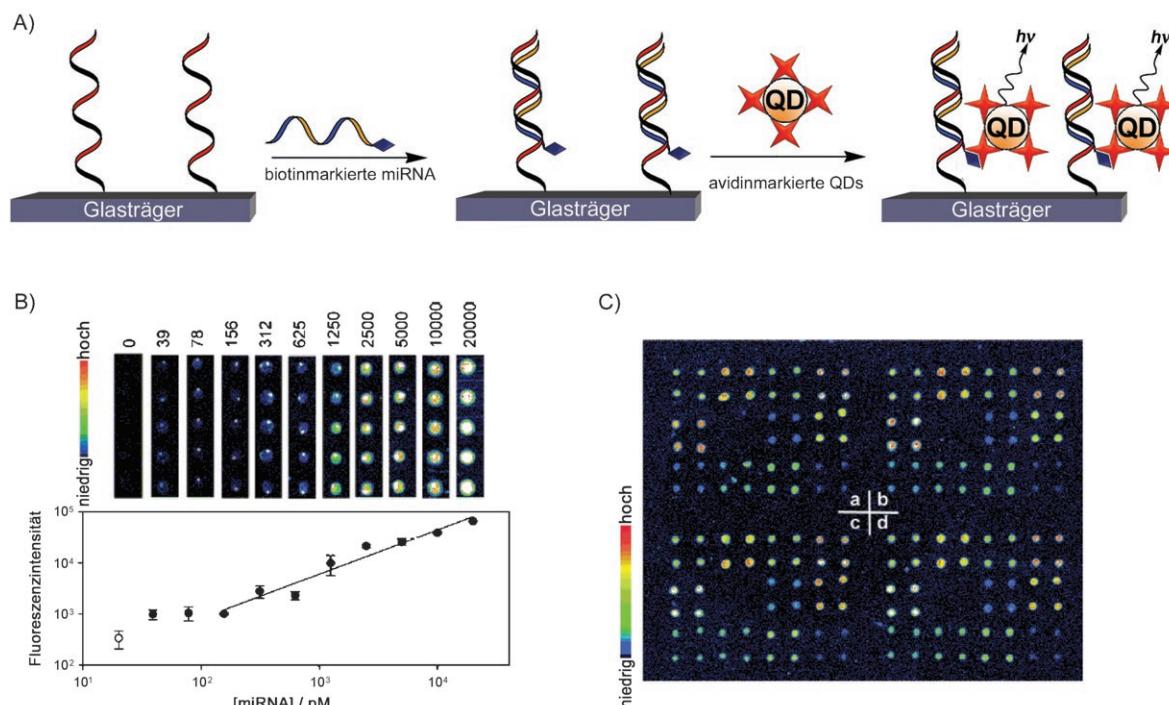
fangsonde auf einer Oberfläche und einer Signalsonde, die mit einem Fluorophor verknüpft ist. Vor kurzem wurden DNA-funktionalisierte QDs als Signalsonden in solchen DNA-Mikroassays eingesetzt, so zum Nachweis eines einzigen abweichenden Nucleotids („single-nucleotide polymorphism“, SNP) im menschlichen Onkogen p53 und in der Detektion multipler Allele des Hepatitis-B- und Hepatitis-C-Virus in Mikroassays.<sup>[70]</sup> Mit CdSe/ZnS-QDs unterschiedlicher Größe funktionalierte DNA wurden als Sonde für Hepatitis-B- und Hepatitis-C-Genotype in Gegenwart menschlicher Gene getestet. Die Erkennung einer genau übereinstimmenden Sequenz aus dem Gen p53 in Gegenwart von Oligonucleotidsequenzen, die sich lediglich in einem Nucleotid unterschieden, gelang bei Raumtemperatur in gepufferter Lösung binnen Minuten und mit Signalverhältnissen über 10.

QDs eigneten sich auch für den Nachweis von miRNAs in Mikroanordnungen.<sup>[71]</sup> Streptavidin-QD-Konjugate markierten miRNA mit biotinyliertem 3'-Ende, die durch Hybridisierung mit komplementären DNA-Sequenzen auf einem Glasträger immobilisiert war. Die Fluoreszenz der QD-Markierungen identifizierte dann die miRNA (Abbildung 5 A). In einem Modellsystem wurde eine miRNA-Nachweisgrenze um 0.4 fmol erreicht, und der dynamische Nachweisbereich erstreckte sich von 156 bis 20000 pm (Abbildung 5 B). Diese Methode wurde in einer Analyse von 11 miRNA-Sequenzen aus Reis angewendet (Abbildung 5 C). Auch das Screening von siRNA gelang mithilfe von QD-Konjugaten als Hybridisierungssonden in Kombination mit mRNA-Vervielfältigung und Cy5-Markierung. Die Hybridisierung der Cy5-markierten mRNA-Sense-Sequenz mit der QD-konjugierten

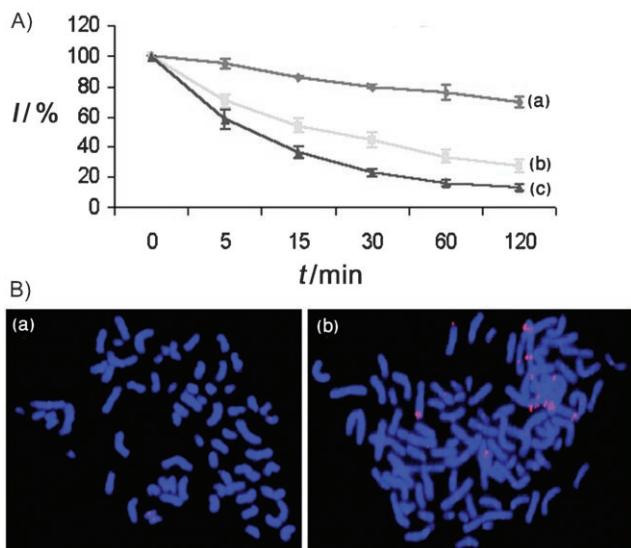
siRNA-Antisense-Sequenz ließ sich durch FRET-Analyse verfolgen.<sup>[72]</sup>

DNA-QD-Konjugate wurden ferner als Sonden in Fluoreszenzassays mit In-situ-Hybridisierung (FISH) eingesetzt. Bei solchen FISH-Assays wird die Genom-DNA denaturiert und anschließend mit einer DNA-Sequenz markiert, die eine Fluoreszenzmarkierung trägt, um Chromosomen auf das Vorliegen komplementärer DNA-Sequenzen zu prüfen. Durch eine FISH-Analyse mit QD-Markierung gelang beispielsweise der Nachweis des Y-Chromosoms in menschlichen Spermien.<sup>[73]</sup> Eine ähnliche Methode wurde genutzt, um menschliche Chromosomen in der Metaphase zu analysieren.<sup>[74]</sup> Die QD-Markierung der DNA ergab dabei ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis als übliche Fluorophore wie FITC und Texasrot und war überdies beständiger gegen photochemische Zersetzung (Abbildung 6 A). Das Verfahren ließ sich auf wichtige Krankheitsgene übertragen: Durch QD-markierte DNA wurde das Gen für den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors nachgewiesen (human epidermal growth factor receptor 2, HER2; Abbildung 6 B), das bei ungefähr 25–30 % aller Brustkrebskrankungen stark vermehrt auftritt und ein erhöhtes Rezidivrisiko anzeigt. Die FISH-Technik wurde auch zum parallelen Nachweis unterschiedlicher mRNA in Zellen<sup>[75]</sup> und zur Visualisierung eines PUC18-Plasmids in *Escherichia coli*-HB101-Bakterien angewendet.<sup>[76]</sup>

Auch immobilisierte oder in Polymerkügelchen integrierte QDs wurden für Analysen genutzt. Durch Anbringen vieler QDs auf einem Kügelchen ließ sich die Emission deutlich verstärken, und der Einsatz unterschiedlich großer QDs zur Codierung von Kügelchen ermöglichte Parallel-

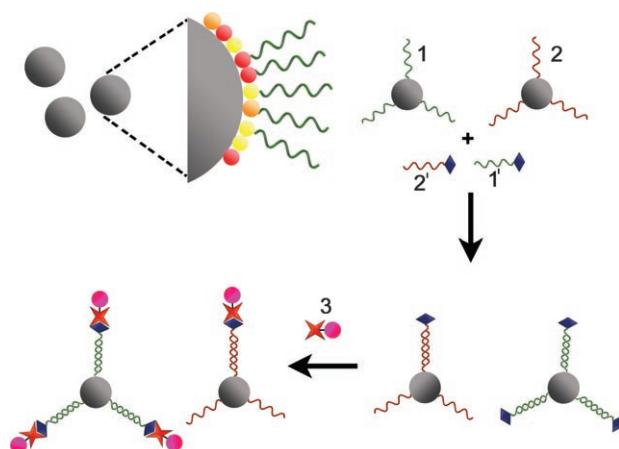


**Abbildung 5.** miRNA-Analyse mit fluoreszierenden QDs: A) Anlagerung der streptavidinmarkierten QDs an einen DNA/miRNA-Doppelstrang auf einem Glasträger. B) Fluoreszenzintensitäten bei unterschiedlichen Konzentrationen der Ziel-miRNA (oben) und eine Kalibrierungskurve (unten). C) Analyse von 11 miRNAs aus Reis. Wiedergabe nach Lit. [71] mit Genehmigung der Oxford University Press.



**Abbildung 6.** A) Vergleich der photochemischen Beständigkeit von Hybriden aus einem Chromosom und einer QD-Nucleinsäure (a), einer Texasrot(TR)-Nucleinsäure (b) und einer mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) funktionalisierten Nucleinsäure (c). B) FISH-Bilder von menschlichen Lymphozyten mit wenig HER2-Gen (links) und SK-BR-3-Brustkrebszellen mit viel HER2-Gen (rechts). Die QDs für die Analyse waren mit einer Nucleinsäure funktionalisiert, deren Sequenz komplementär zum HER2-Gen ist. Wiedergabe nach Lit. [74] mit Genehmigung der Oxford University Press.

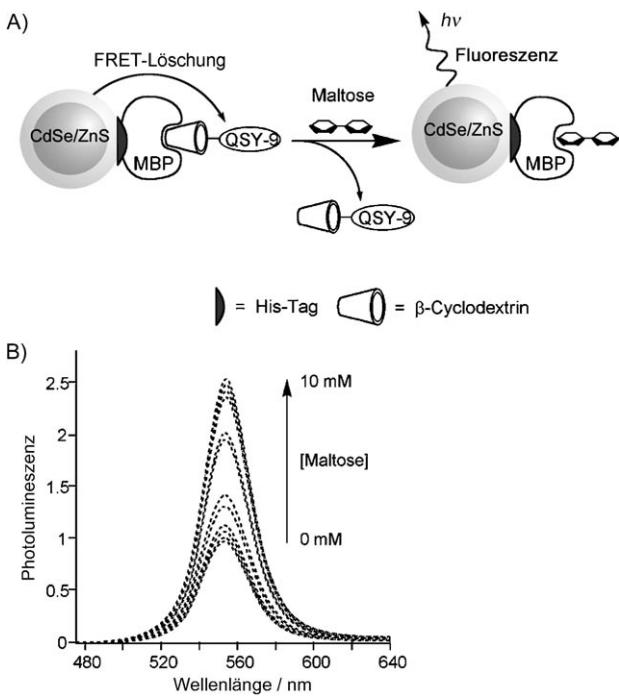
analysen. Die Exprimierung von Genen wurde mithilfe von QDs auf magnetischen Mikrokügelchen analysiert (Abbildung 7).<sup>[77]</sup> QDs unterschiedlicher Größe wurden in wechselnden Verhältnissen an magnetischen Mikrokügelchen befestigt. Jedes so funktionalisierte Partikel trug außerdem eine spezifische Nucleinsäure als Einfangsonde, die durch die jeweilige QD-Zusammensetzung codiert war. Im Beispiel waren zwei magnetische Kügelchen mit unterschiedlichem QD-Code mit den Nucleinsäuren **1** bzw. **2** funktionalisiert. Falls die biotinylierten cRNA-Analyte **1'** und **2'** vorlagen, kam



**Abbildung 7.** Parallelanalyse von cRNAs mit QD-Kügelchen-Kompositen als Einfangsonden und einem IR-emittierenden QD-Avidin-Hybrid als optischer Reportereinheit. Nach Lit. [77]; Copyright 2006 American Chemical Society.

es zu einer Hybridisierung mit den funktionalisierten Mikrokügelchen, die durch **3**, ein Konjugat aus einem IR-emittierenden QD und Avidin, übersetzt wurde. Diese IR-emittierenden QDs zeigen Mikropartikel an, auf denen es zu einer Hybridisierung kam. Die optische Detektion der entsprechenden Codes identifizierte die an der Hybridisierung beteiligte Nucleinsäure und somit die gebundenen cRNAs. Auf diese Weise gelang nicht nur die Parallelanalyse unterschiedlicher cRNAs, überdies konnte die Genexprimierung anhand der Intensität der IR-Emission durch die QDs quantifiziert werden. Kügelchen mit QDs wurden auch mit einem Farbstoff kombiniert, um die DNA-Hybridisierung zu verfolgen.<sup>[78]</sup> In einem alternativen Ansatz kamen Sandwichanalysen mit antikörperbeschichteten QD-Kügelchen-Kompositen und einem als Reporterelement fungierenden Antikörper mit Farbstoffmarkierung zum Einsatz. Diese Systeme wurden zum Nachweis von Indikatoren für Infektionskrankheiten<sup>[79]</sup> und Autoantikörper eingesetzt.<sup>[80]</sup>

Verschiedene Sensorverfahren nutzen QDs als FRET-Donoren. Ein übliches FRET-Verfahren beruht auf der Verdrängung einer Löscheinheit,<sup>[81]</sup> wie im Fall der Anlagerung von Maltose an ein Konstrukt aus dem Maltose bindenden Protein (MBP) und CdSe/ZnS-QDs.<sup>[39]</sup> Diese Partikel wurden zunächst mit einem Konjugat aus  $\beta$ -Cyclodextrin und dem Farbstoff QSY-9 umgesetzt, was in der Lösung der QD-Lumineszenz durch den Farbstoff resultierte (Abbildung 8A). Die Verdrängung des farbstoffmarkierten Zuckers aus der Bindung zum Protein durch Maltosezugabe regenerierte daraufhin die QD-Lumineszenz (Abbildung 8B).

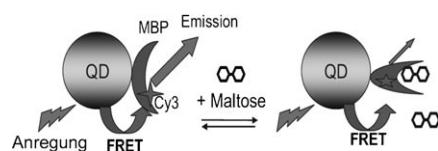


**Abbildung 8.** A) CdSe/ZnS-QDs in einem Verdrängungsassay für Maltose. Zur Erkennung diente das Maltose bindende Protein (MBP), ein Konjugat aus  $\beta$ -Cyclodextrin und dem Farbstoff QSY-9 wurde als FRET-Löscher eingesetzt. B) Änderung der Fluoreszenz mit Maltosekonzentration. Wiedergabe mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd nach Lit. [39].

Dieses Verfahren ließ sich in einem QD-Sensor für Maltose in Lösung umsetzen.

Ein ähnliches Verdrängungsassay mit QDs zeigt das Vorliegen des Sprengstoffs Trinitrotoluol (TNT) an.<sup>[82]</sup> CdSe/ZnS-QDs wurden mit einem Antikörperfragment funktionalisiert, das TNT selektiv bindet. Das analoge Substrat Tri-nitrobenzol (TNB) wurde kovalent mit dem Farbstoff BHQ-10 (**4**) verknüpft und an das QD-Antikörper-Konjugat gebunden; eine Löschung der QD-Fluoreszenz war die Folge (Abbildung 9 A). Der Analyt TNT verdrängte das TNB-(BHQ-10)-Konjugat, sodass der FRET zwischen QD und Farbstoff aufgehoben und die QD-Fluoreszenz wiederhergestellt wurde (Abbildung 9 B). Entsprechende Verdrängungsassays zum Nachweis von Glycoproteinen sind ebenfalls bekannt.<sup>[83]</sup>

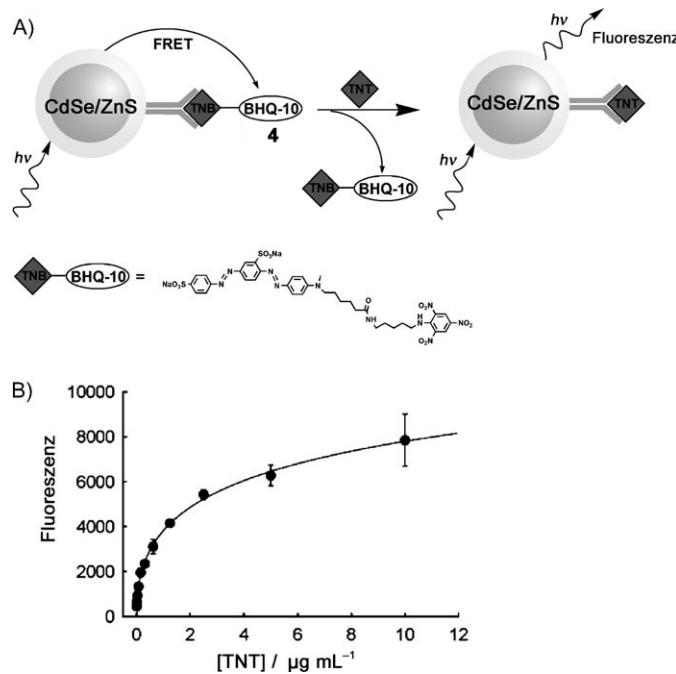
FRET-Biosensoren mit einem anderen Wirkprinzip nutzen Änderungen in Proteinstrukturen nach der Wechselwirkung mit dem Substrat. Diese Methode führte zu einem reagentienfreien Maltosesensor auf QD-Basis.<sup>[84]</sup> CdSe/ZnS-QDs wurden mit der Mutante MBP41C des Maltose bindenden Proteins funktionalisiert; diese Mutante trägt einen Cysteinrest nahe der Bindungsstelle, der aber nicht an der Maltosebindung teilnimmt. Dieser Aminosäurerest wurde spezifisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert, der gegenüber den QDs als FRET-Akzeptor wirkt. Nach der Bindung von Maltose ändert sich die Konformation von MBP, wodurch sich wiederum die Umgebung des Farbstoffs ändert, dessen Fluoreszenz also von der Maltosekonzentration abhängt (Abbildung 10). Diese Konformationsänderungen verstärkten einerseits den FRET vom QD zum Farbstoff und andererseits die strahlungslose Relaxation des Farbstoffs.



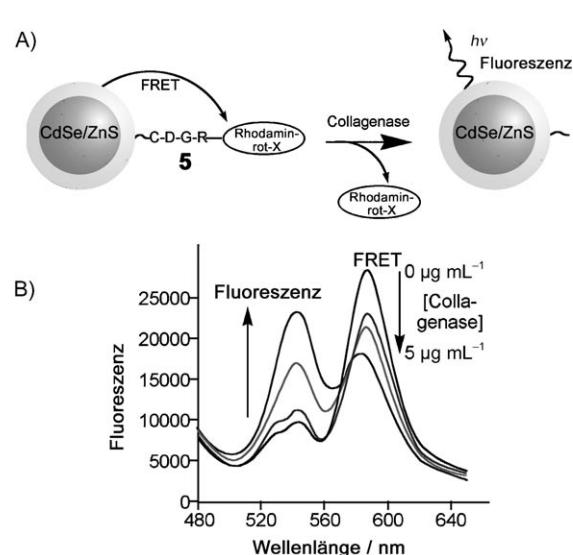
**Abbildung 10.** Steuerung des FRET zwischen CdSe und Cy3 an Maltose bindendem Protein (MBP) durch Anlagerung von Maltose und eine Konformationsänderung im MBP (nach Lit. [84]).

Die katalytische Aktivität einer Reihe proteolytischer Enzyme wurde anhand des FRET in QD- und farbstoffmarkierten Peptiden analysiert.<sup>[54,85-87]</sup> CdSe-ZnS-QDs wurden mit unterschiedlichen Peptiden modifiziert – unter anderem auch mit Peptidsequenzen, die spezifische Spaltstellen für Proteasen enthielten. An den entgegengesetzten Enden der Peptidsequenz wurden Löscheinheiten angebracht. QDs, die mit einer Schicht aus derart modifizierten Peptiden überzogen waren, zeigten keine Fluoreszenz infolge eines FRET. Die sequenzselektive Hydrolyse der Peptide durch eine Protease entfernte die Löscheinheiten und stellte die QD-Fluoreszenz wieder her. In einem Beispiel<sup>[85]</sup> spaltete Collagenase das mit Rhodaminrot-X markierte Peptid **5** von CdSe/ZnS-QDs ab (Abbildung 11 A). Im angebundenen Zustand löschte der Farbstoff die QD-Fluoreszenz, nach der hydrolytischen Ab-spaltung trat die Fluoreszenz aber wieder auf (Abbildung 11 B).

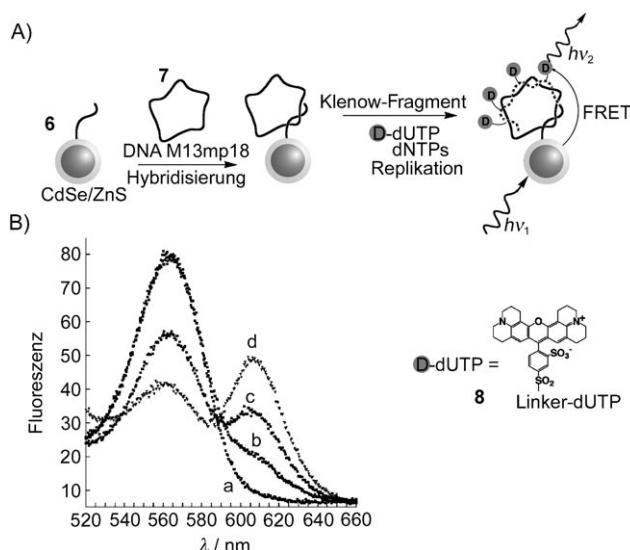
Auch die Hybridisierung mit komplementären Nucleinsäuren und katalytische DNA-Umwandlungen wurden mit Hilfe von FRET-Prozessen unter Beteiligung von QDs erfasst. Konjugate aus CdSe/ZnS-QDs und Nucleinsäuren zeigten die DNA-Replizierung an.<sup>[88]</sup> An die CdSe/ZnS-NPs wurde der DNA-Primer **6** angebracht (Abbildung 12), der komplemen-



**Abbildung 9.** A) Verdrängungsanalyse von TNT an Anti-TNT-Antikörpern auf CdSe/ZnS-QDs mit BHQ-10 als Löscher. B) Kalibrierkurve für den TNT-Nachweis. Wiedergabe aus Lit. [82] mit Genehmigung der American Chemical Society.



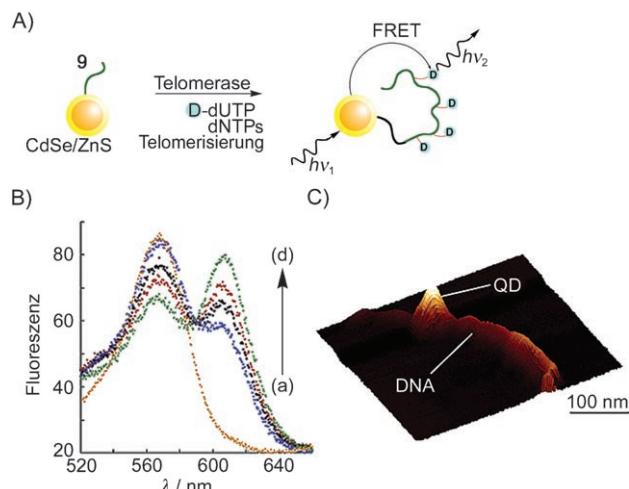
**Abbildung 11.** A) CdSe/ZnS-QDs in der optischen Analyse der proteasevermittelten Hydrolyse des mit Rhodaminrot-X funktionalisierten Peptids **5**. B) Abnehmende Fluoreszenz des Farbstoffs und entsprechende Verstärkung der QD-Fluoreszenz bei steigender Collagenase-Konzentration. Wiedergabe nach Lit. [85] mit Genehmigung der American Chemical Society.



**Abbildung 12.** A) Optische Detektion der M13-Phagen-DNA 7 durch mit Nucleinsäuren functionalisierte CdSe/ZnS-QDs. Die Replizierung der DNA 7 in Gegenwart einer dNTP-Mischung mit Texasrot-markierten dUTPs (8) führte zum Einbau des Farbstoffs und löste einen FRET aus. B) Die Änderung der Fluoreszenz nach dem Einbau des Farbstoffs 8 in die replizierte DNA nach 0 (a), 10 (b), 30 (c) und 60 min (d) zur Analyse der M13-Phagen-DNA gemäß (A). Wiedergabe nach Lit. [88] mit Genehmigung der American Chemical Society.

tär zu einer spezifischen Domäne von M13-mp18-DNA (7) ist. Auf die Hybridisierung der Einzelstrang-DNA 7 mit dem Primer 6 folgte die Replizierung des Doppelstrangs in Gegenwart von Polymerase und einer dNTP-Mischung, die mit Texasrot functionalisiertes dUTP (8) enthielt. Bei diesem Prozess wurde die replizierte DNA mit dem Farbstoff markiert (Abbildung 12 A). Texasrot wurde als Energieakzeptor gewählt, weil die Absorption dieses Farbstoffs mit der Emission der QDs überlagert. Der FRET von den Halbleiter-NPs zu den Farbstoffeinheiten lösche einerseits die Fluoreszenz der QDs und regte anderseits die Emission des Farbstoffs an (Abbildung 12 B). So wurde nicht nur die ursprüngliche Hybridisierung zwischen der Ziel-DNA und der Nucleinsäuresonde 6 verstärkt und detektierbar, überdies konnte nun auch der zeitliche Verlauf des Replizierungsprozesses verfolgt werden.

Die Telomeraseaktivität – ein wichtiges Indiz für Krebs – wurde mit einem analogen Verfahren untersucht. Telomere sind G-reiche Wiederholungseinheiten, die die genetische Information auf den Chromosomen schützen. Während eine Zelle ihren Lebenszyklus durchläuft, nimmt die Länge der Telomere ständig ab. Beim Unterschreiten einer bestimmten Kettenlänge wird die Zellproliferation eingestellt.<sup>[89,90]</sup> In gewissen Zellen wird das Ribonucleoprotein Telomerase angereichert, was zu einer Verlängerung der Telomerketten führt. Dieser Effekt wirkt der natürlichen Verkürzung entgegen, und es resultieren „unsterbliche“ Zellen. In über 95 % aller Krebszellarten liegen erhöhte Telomerase-Spiegel vor; folglich ist das Enzym ein allgemeines Indiz für maligne oder Krebszellen.<sup>[91,92]</sup> Zur Analyse der Telomeraseaktivität wurden CdSe/ZnS-QDs mit dem DNA-Primer 9 modifiziert, der von Telomerase erkannt wird (Abbildung 13 A). In Ge-

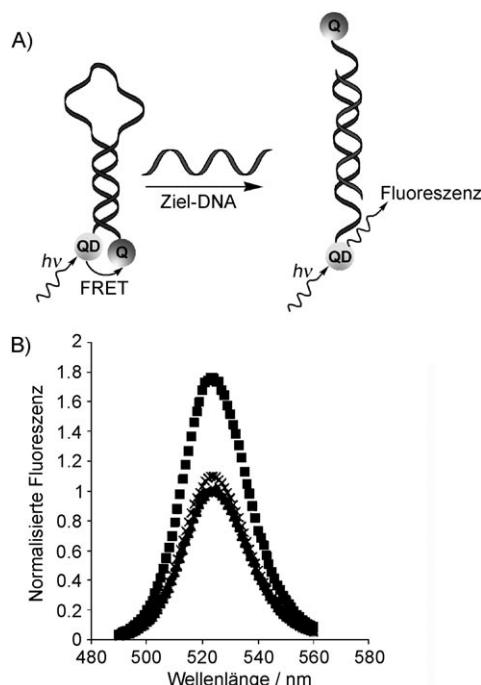


**Abbildung 13.** A) Optische Analyse der Telomeraseaktivität durch Einbau von Texasrot-dUTP (8) in Telomere, die an CdSe/ZnS-QDs gebunden sind. B) Änderung der Fluoreszenz bei der Telomerisierung der functionalisierten QDs 9 in Gegenwart von Telomerase, die aus 10000 HeLa-Zellen extrahiert wurde, 0,5 mm dNTPs und 100  $\mu\text{M}$  Texasrot-dUTP nach 0 (a), 10 (b), 30 (c) und 60 min (d). C) AFM-Bild der Telomere auf den QDs. Wiedergabe nach Lit. [88] mit Genehmigung der American Chemical Society.

genwart von Telomerase und einer dNTP-Mischung, die mit Texasrot functionalisiertes dUTP (8) enthielt, wurden die Nucleinsäuresequenzen an den QDs telomerisiert, wobei das mit Texasrot markierte Nucleotid in die Telomere eingebaut wurde (Abbildung 13 A). Dieser Telomerisierungsprozess ließ sich anhand des FRET von den QDs zu den Farbstoffeinheiten verfolgen (Abbildung 13 B).<sup>[88]</sup> In Rasterkraftmikroskopie(AFM)-Bildern sind 300 nm lange Telomerketten an den QDs erkennbar, was einem Einbau von ungefähr 1000 Nucleotiden in den Telomerstrang entspricht (Abbildung 13 C).

Der FRET von CdSe/ZnS-QDs wurde eingesetzt, um die Hybridisierung von DNA in „molekularen Leuchtfeldern“ (molecular beacons, MBs) zu verfolgen.<sup>[93–95]</sup> Solche Konstrukte bestehen aus einem QD und einer Löscheinheit Q an den entgegengesetzten Enden eines Einzelstrang-DNA-Oligonucleotids. Ohne Ziel-DNA lagen die Oligonucleotide in der Haarnadelstruktur vor, die QDs und Löscheinheiten nahe zueinander bringt, und die QD-Fluoreszenz wurde durch einen FRET gelöscht. Die Hybridisierung einer Ziel-DNA öffnete den Doppelstrang am Stamm der Oligonucleotid-Haarnadelstruktur. Dabei entfernte sich der QD so weit von der Löscheinheit, dass die Fluoreszenz wieder auftreten konnte (Abbildung 14 A).

In einem Beispiel wurden CdSe/ZnS-QDs an das 5'-Ende einer Nucleinsäure mit Haarnadelstruktur geknüpft, an deren 3'-Ende sich 4-(4'-Dimethylaminophenylazo)benzoësäure-(Dabcyl)-Löscheinheiten befanden. Mithilfe dieser Konstrukte gelang es, einzelne Basenfehlpaarungen zu detektieren.<sup>[93]</sup> Um Sonden für einen DNA-Parallelnachweis zu erhalten, wurden CdSe/ZnS-QDs mit drei verschiedenen Größen an unterschiedliche DNA-Haarnadelstrukturen gebunden, deren anderes Ende eine Löscheinheit trug („black-hole quencher-2“, BHQ2).<sup>[94]</sup> Diese molekularen Leuchtsi-

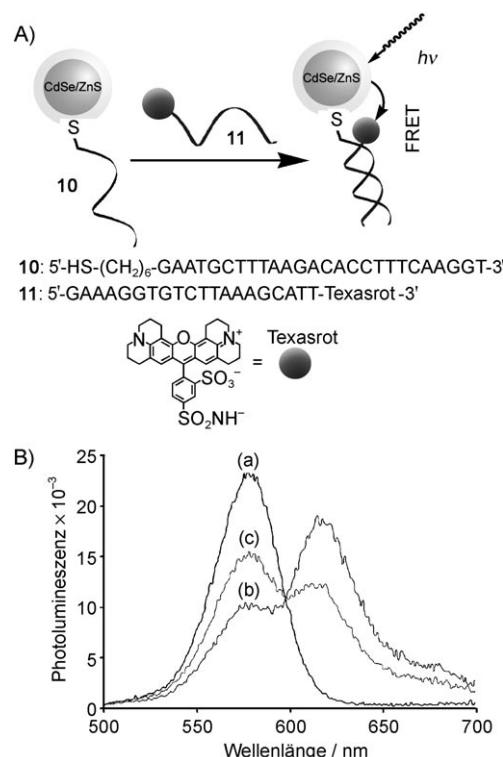


**Abbildung 14.** A) Optischer Nachweis von DNA durch Nucleinsäure-Haarnadelschleifen mit QDs und Löscheinheiten Q. B) Fluoreszenzintensitäten: ◆: ohne Ziel-DNA, ■: mit Ziel-DNA (5'-AAACCCAAA-CCCAA-3'), ▲: mit Ziel-DNA mit einer falschen Base (5'-AAACCCGAA-CCCAA-3') (SMT), ×: mit nichtkomplementärer DNA (5'-AGGTATG-CTCACCTT-3') (NST). Wiedergabe nach Lit. [94] mit Genehmigung von IOP Publisher Ltd.

gnale (molecular beacons) konnten bei der Hybridisierung zwischen der komplementären Ziel-DNA, Sequenzen mit einer Basenfehlpaarung (SMT) und unspezifischer DNA (NST) unterscheiden (Abbildung 14 B). Gegenüber einer Probe mit unspezifischer DNA wurde die Fluoreszenzintensität in Gegenwart der komplementären Ziel-DNA um 90% gesteigert.

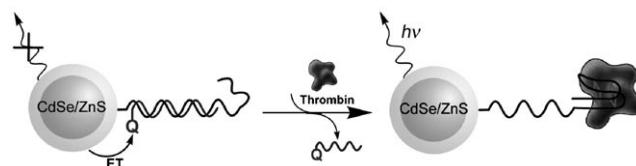
Ein FRET in einem DNA-Doppelstrang mit angebundenen CdSe/ZnS-QDs und Farbstoffeinheiten zeigte die DNA-Hybridisierung und die Spaltung von DNA durch DNase I an.<sup>[96]</sup> Mit der Nucleinsäure **10** functionalisierte CdSe/ZnS-QDs wurden mit einer komplementären Nucleinsäure **11** hybridisiert, die den Farbstoff Texasrot trug (Abbildung 15 A). Die Beobachtung des resonanten Energietransfers von den QDs auf die Farbstoffeinheiten gab Aufschluss über den zeitlichen Verlauf des Hybridisierungsprozesses. Der resultierende DNA-Doppelstrang wurde mit DNase I gespalten, was die Intensität der FRET-Bande des Farbstoffs verringerte und die Fluoreszenz der CdSe/ZnS-QDs verstärkte (Abbildung 15 B). Infolge einer unspezifischen Adsorption des Farbstoffs auf den QDs wurde deren Lumineszenz aber nicht vollständig wiederhergestellt.

Aptamere sind Nucleinsäuresequenzen, die Proteine oder niedermolekulare Substrate spezifisch binden. Bei der Auswahl von Aptameren aus einer kombinatorischen Bibliothek mit  $10^{15}$ – $10^{16}$  DNA-Sequenzen hilft eine als systematische Ligandenevolution durch exponentielle Anreicherung (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) bezeichnete Prozedur. Die Erkennung durch Ap-



**Abbildung 15.** A) Doppelstrangbildung aus CdSe/ZnS- und Texasrot-modifizierten DNA-Strängen. B) Fluoreszenzspektren der mit **10** functionalisierten CdSe/ZnS-QD (a), des DNA-Doppelstrangs **10/11** mit QDs und dem Texasrot-Chromophor (b) und nach Behandlung des DNA-Doppelstrangs mit DNase I (c). Wiedergabe nach Lit. [96] mit Genehmigung der American Chemical Society.

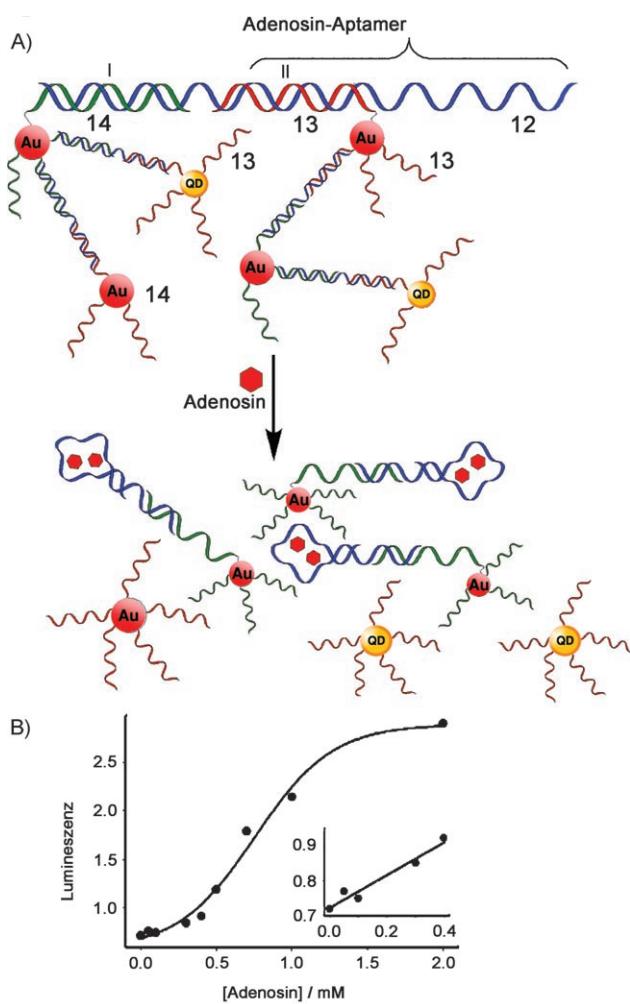
tamere führte zur Entwicklung von zahlreichen elektrochemischen<sup>[97,98]</sup> und optischen<sup>[99,100]</sup> Sensoren. QDs wurden auch eingesetzt, um die Komplexierung von Aptameren mit Proteinen zu detektieren.<sup>[101]</sup> Ein Antithrombinaptamer wurde an QDs gekuppelt und mit einem Konjugat aus einer komplementären Oligonukleotidsequenz und einer Löscheinheit hybridisiert (Abbildung 16). Die QD-Fluoreszenz war in der resultierenden Doppelstrangstruktur gelöscht. Durch Zusatz von Thrombin wurde der Doppelstrang aber getrennt, und das Aptamer änderte seine Konformation unter Bildung eines Thrombin bindenden Quadruplexes. Nach der Verdrängung der Löscheinheiten vom nunmehr blockierten Aptamer stieg die Intensität der QD-Lumineszenz etwa um das 19-fache an. Auf ähnliche Weise wurde Thrombin durch ein Konjugat aus dem Antithrombin-Aptamer und PbS-QDs detektiert.<sup>[102]</sup> Die Bindung von Thrombin an dieses Konjugat resultierte in einer



**Abbildung 16.** Thrombin-Nachweis: Durch Trennung einer Wechselwirkung zwischen dem Antithrombin-Aptamer und einer Nucleinsäure mit Löscheinheit Q wird die QD-Fluoreszenz wiederhergestellt (nach Lit. [101]).

selektiven Fluoreszenzlösung, weil ein Ladungstransfer vom Thrombin auf die QDs stattfand. Diese Methode detektierte Thrombin bis hinab zu Konzentrationen von  $1 \times 10^{-9} \text{ M}$  und hoch selektiv in Gegenwart großer Proteinmengen.

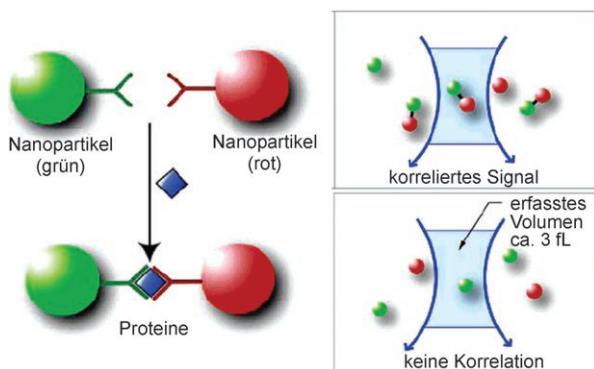
QD-Aptamer-Sensoren können nicht nur Proteine, sondern auch niedermolekulare Verbindungen nachweisen.<sup>[103]</sup> Das Aptamer **12** für Adenosinmonophosphat (AMP) wurde nahe dem 3'-Ende mit der kurzen Nucleinsäuresequenz **13** hybridisiert, die ein QD trug, und am 5'-Ende mit der kurzen Nucleinsäuresequenz **14** hybridisiert, die an ein Goldnanopartikel gebunden war. In den resultierenden Konstrukten wurde die Fluoreszenz der QDs durch die Gold-NPs gelöscht (Abbildung 17A). Auf Zusatz von Adenosin änderte sich die Aptamerkonformation: Die QDs und die Au-NPs konnten sich frei bewegen, und mit zunehmendem Abstand von den



**Abbildung 17.** A) Nachweis von Adenosinmonophosphat (AMP) anhand der Fluoreszenzlösung funktionalisierter QDs durch Goldnanopartikel. Das Anti-AMP-Aptamer **12** verknüpft die mit einem CdSe-QD functionalisierte Nucleinsäure **13** mit der Nucleinsäure **14**, die Au-NPs trägt. In Gegenwart von AMP wird dieses Konstrukt getrennt, und die QD-Fluoreszenz tritt wieder auf. B) Änderung des Fluoreszenzintensitäts mit der AMP-Konzentration. Einschub: Vergrößerung des Bereichs zwischen 0.0 und 0.4 mM AMP. Wiedergabe nach Lit. [103] mit Genehmigung der American Chemical Society.

Au-NPs regenerierte sich die QD-Fluoreszenz. Da die Spaltung durch die Adenosinkonzentration gesteuert wurde, ließ sich diese anhand der Fluoreszenz quantitativ bestimmen (Abbildung 17B). Ein ähnliches System wurde für den Nachweis von Kokain eingesetzt.<sup>[103]</sup>

Dank ihrer hellen und beständigen Fluoreszenz eignen sich schon einzelne Quantenpunkte<sup>[104, 105]</sup> als Biosensoren.<sup>[105–110]</sup> Ein Detektionsverfahren für einzelne Partikel ist die Colokalisierung (Abbildung 18). Dabei werden zwei QDs

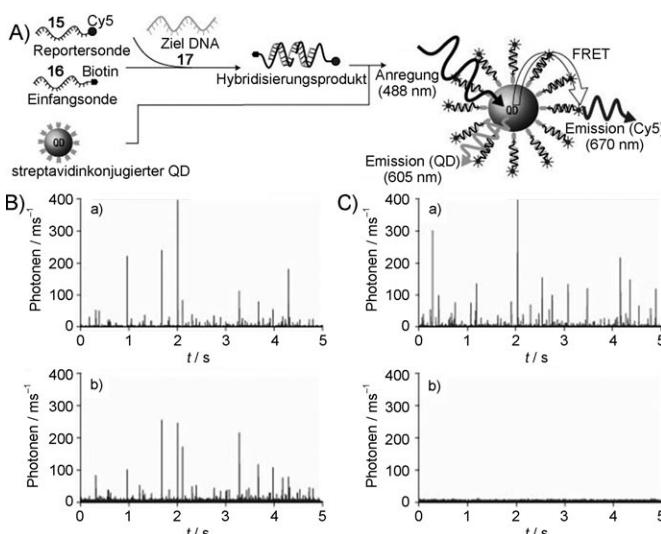


**Abbildung 18.** Nachweis von TNF-α durch Colokalisierung zweier unterschiedlich großer, mit Antikörpern functionalisierter QDs. Wiedergabe nach Lit. [108] mit Genehmigung der American Chemical Society.

unterschiedlicher Farbe mit Erkennungsstellen für einen Analyten versehen und in hoch verdünnter Lösung durch einen Detektor geleitet. Ohne Analyt tritt dabei nur dann und wann die Fluoreszenz eines einzelnen QDs auf. In Gegenwart des Analyten kommt es dagegen zu einer Aggregation der QDs, und wenn ein solches Aggregat den Detektor passiert, wird die Fluoreszenz beider QDs gleichzeitig aktiviert. Diese Methode wurde unter anderem zum Nachweis des Proteins TNF-α eingesetzt.<sup>[108]</sup> CdSe-QDs mit zweierlei Größe wurden mit dem TNF-α-Antikörper versehen. In Gegenwart des Analyten TNF-α wurde die Colokalisierung der QDs beobachtet: Beim Passieren eines Detektors ließ sich in dem kleinen Volumen im Sichtfeld eines konfokalen Mikroskops die Fluoreszenz beider QD-Arten nachweisen. Bei einem verwandten Verfahren wird die Verteilung colokalizierter QDs auf einer Oberfläche ermittelt. Colokalisierungsmethoden mit QDs wurden auch herangezogen, um DNA<sup>[106–108]</sup> und Bakterien zu detektieren.<sup>[108]</sup>

Eine andere Einzelpartikelfluoreszenz-Methode kombiniert den FRET und die Colokalisierung von Fluorophoren als Detektionsverfahren. In Gegenwart eines Analyten wird dabei ein farbstoffmarkierter Komplex auf fluoreszierenden QDs gebildet, die anschließend durch zwei Detektorkanäle geleitet werden, um die QD-Fluoreszenz und die FRET-Emission des Farbstoffs zu erfassen. Die beiden Emissionen sind nur im Fall einer Colokalisierung gleichzeitig zu beobachten. Derartige Sensoren mit Einzelpartikel-FRET (single particle FRET, sp-FRET) wurden auf DNA<sup>[109, 111]</sup> und RNA-Protein-Wechselwirkungen angewendet.<sup>[112]</sup> Beispielsweise wurde die Ziel-DNA **17** an eine mit einem Farbstoff modifizierte Reportersonde **15** und eine biotinylierte Einfangsonde

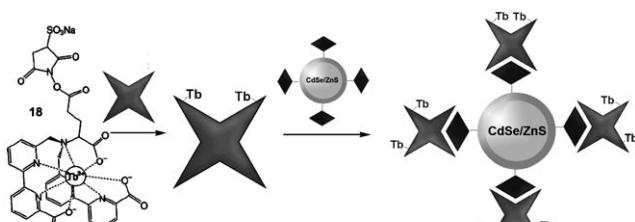
**16** gebunden und an Streptavidin-QD-Konjugate gekuppelt (Abbildung 19 A).<sup>[109]</sup> Nur in Gegenwart der Ziel-DNA wird ein Fluoreszenzsignal sowohl auf dem Donor- als auch auf



**Abbildung 19.** A) Nachweis einer Ziel-DNA **17** durch Colokalisierung eines Hybrids aus der Ziel-DNA mit der QD-tragenden Sonde **15** und der Cy5-modifizierten Nucleinsäure **16**. B) Fluoreszenz des CdSe/Cy5-Hybridsystems in Gegenwart von **17** ( $4.8 \times 10^{-10} \text{ M}$ ) bei der Anregung der QDs mit  $\lambda = 488 \text{ nm}$ : a) Fluoreszenz der QDs bei  $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$ . b) Fluoreszenz von Cy5 bei  $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$ . C) Fluoreszenz des CdSe/Cy5-Hybridsystems ohne **17** bei der Anregung mit  $\lambda = 488 \text{ nm}$ : a) Fluoreszenz der QDs bei  $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$ . b) Fluoreszenz von Cy5 bei  $\lambda_{\text{em}} = 690 \text{ nm}$ . Wiedergabe nach Lit. [109] mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd.

dem Akzeptor-Detektionskanal aufgezeichnet (Abbildung 19B). Die Nachweigrenze für diese QD-Struktur (ca. 5 fm) war um fast zwei Größenordnungen niedriger als für „molekulare Leuchtfeuer“ unter denselben Bedingungen. Zwar werden FRET-Prozesse gewöhnlich durch den Abstand zwischen Donor und Akzeptor bestimmt, doch in DNA-Doppelsträngen trat unter Flussbedingungen auch bei vergleichsweise großen Abständen ein FRET auf. Diese Beobachtung wurde mit einer Verbiegung der Doppelstrang-DNA erklärt, die die Donor- und Akzeptoreinheiten an den Molekülen näher zueinander bringt und dadurch einen FRET ermöglicht.<sup>[111]</sup>

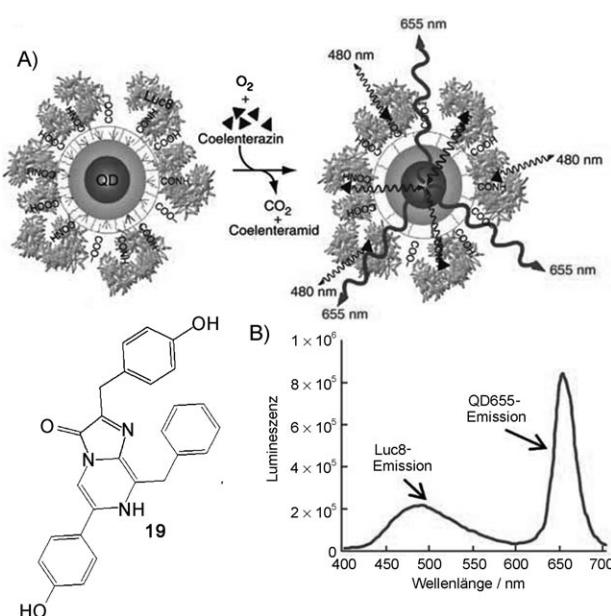
Während QDs in älteren FRET-Biosensoren stets als Energiedonoren auftraten, übernahmen sie neuerdings auch die Rolle von Energieakzeptoren. Übliche organische Farbstoffe, die bei kürzeren Wellenlängen emittieren als ein benachbarter Quantenpunkt, ergaben keinen signifikanten FRET, weil die Exzitonenlebensdauer für den QD-Akzeptor länger war als für den Farbstoff und weil der QD bei der Anregungswellenlänge des Farbstoffs schon zu einem merklichen Ausmaß direkt angeregt wurde.<sup>[113]</sup> Lanthanoidkomplexe mit langlebiger Lumineszenz könnten dieses Problem lösen. Tb- (**18**) oder Eu-Komplexe waren als FRET-Donoren in einem Biotin-Avidin-Modellbiosensor mit QDs als FRET-Akzeptoren erfolgreich (Abbildung 20),<sup>[114,115]</sup> die Kombination von Lanthanoidkomplexen und QDs muss sich beim



**Abbildung 20.** Resonanter Fluoreszenzenergietauscher in einem Hybrid aus Tb-markiertem Avidin und biotinylierten CdSe/ZnS-QDs. Wiedergabe nach Lit. [115] mit Genehmigung der American Chemical Society.

Nachweis von Biomolekülen aber noch bewähren. Die starke Hintergrundfluoreszenz durch direkte Anregung der QDs könnte ein grundlegendes Problem solcher Systeme darstellen.

Beim resonanten Biolumineszenzenergietauscher (BRET) auf QDs tritt das Problem einer externen Lichtquelle nicht auf, und es konnten selbstleuchtende Quantenpunkte erhalten werden.<sup>[116]</sup> Beispielsweise wurde Luc8, eine Variante der *R.-reniformis*-Luciferase, an CdSe/ZnS-Quantenpunkte gekuppelt, die mit einer Carbonsäure beschichtet waren. Nach der Zugabe von Coelenterazin (**19**), einem lumineszierenden Luciferase-Substrat, erschienen Banden bei 480 nm (für die Emission von Coelenterazin) und 655 nm (für die Emission der QDs; Abbildung 21). Die Methode eignete sich auch für die empfindliche Detektion von Proteasen.<sup>[117]</sup> Das künstliche Peptid **20** mit 15 Aminosäureeinheiten, das aus der Substratsequenz der Protease MMP-2 und einer Markierung aus sechs Histidinresten besteht, wurde an den C-Terminus des Proteins Luc8 angeknüpft. Durch Koordination der Histidinreste an den QD-Quantenpunkten konnte eine Steigerung der Emissionsintensität um bis zu 100-fach beobachtet werden.



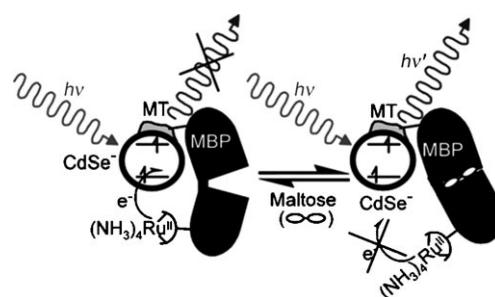
**Abbildung 21.** A) Energietransfer in Luc8-funktionalisierten CdSe-QDs nach der Zugabe von Coelenterazin (**19**) und  $\text{O}_2$ . Die Chemilumineszenz von Luc8 bei  $\lambda = 480 \text{ nm}$  regt die QDs an und resultiert in der Emission bei 655 nm. B) Emissionsspektrum der Luc8-funktionalisierten QDs nach der Reaktion mit **19** und  $\text{O}_2$ . Wiedergabe nach Lit. [116] mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd.

dinmarkierung an Ni<sup>2+</sup>-Ionen wurde das modifizierte Protein mit den QDs verbunden, und nach dem Zusatz von Coelenterazin kam es zu einem BRET. Die Proteolyse durch MMP-2 unterbrach dann den Kontakt zwischen Luc8 und dem QD, und der BRET blieb aus (Abbildung 22).

Alle bisher beschriebenen Systeme setzten auf einen FRET zum photophysikalischen Nachweis biochemischer Erkennungsprozesse und Umsetzungen, diese Funktion kann alternativ aber auch ein Elektronentransfer übernehmen. Die Aktivität verschiedener Enzyme wurde anhand der Fluoreszenzlösung von Halbleiter-QDs durch einen Elektronentransfer untersucht.

Analog zur Analyse von Konformationsänderungen des Maltose bindenden Proteins (MBP) bei der Anlagerung von Maltose mithilfe eines FRET (siehe Abbildung 10) kann auch die Lösung der Fluoreszenz von CdSe-QDs als Folge eines Elektronentransfers die Bindung von Maltose an das MBP anzeigen.<sup>[118]</sup> MBP auf der Oberfläche eines CdSe-QD wurde mit einem Rutheniumkomplex funktionalisiert. Durch die Zugabe von Maltose wurde der Elektronentransfer zwischen Metallkomplex und QD aufgehoben, was das Vorliegen des Monosaccharids anzeigen (Abbildung 23). In ähnlicher Weise konnten Änderungen im Solvatisierungsmuster durch Lösen eines Elektronentransfers erfasst werden. CdSe-QDs wurden mit einem Fettsäure bindenden Protein verknüpft, das in der Nähe der Bindungsstelle außerdem einen Ruthenium(II)-Komplex trug. Anhand von Änderungen der Fluoreszenz beim Wechsel des Solvatisierungszustands nach der Bindung wurde das Vorliegen von Fettsäuren nachgewiesen.<sup>[119]</sup>

Die Tyrosinase-Aktivität wurde mithilfe von CdSe/ZnS-QDs analysiert,<sup>[120]</sup> die mit einer Monoschicht des Tyrosinmethylester-Derivats **21** überzogen waren. Die Tyrosinase-vermittelte Oxidation der Tyrosineinheiten erzeugte Dopachinoneinheiten, die die QD-Fluoreszenz löschen (Abbildung 24 A). Am Rückgang der QD-Fluoreszenz bei unterschiedlichen Tyrosinase-Konzentrationen war die Tyrosinase-



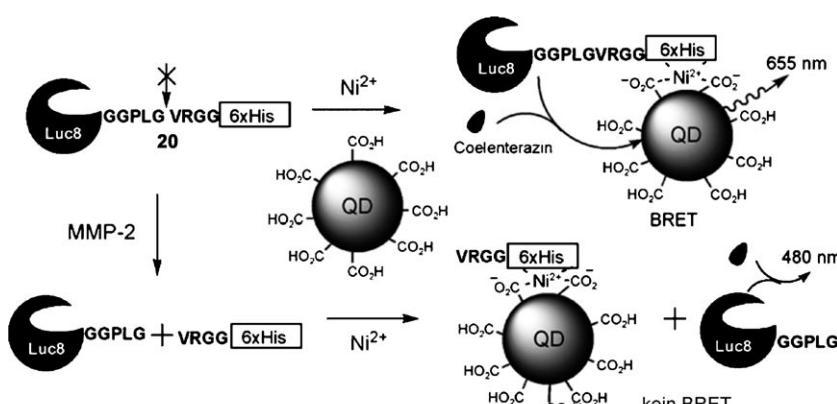
**Abbildung 23.** Steuerung des photochemischen Elektronentransfers zwischen CdSe und [Ru<sup>II</sup>(phen)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sup>2+</sup>-Einheiten an MBP: Die Anlagerung von Maltose verursacht eine Strukturänderung, die auch die Elektronentransferabstände betrifft. phen = Phenanthrolin. Wiedergabe nach Lit. [118] mit Genehmigung der American Chemical Society.

Aktivität bei der oxidativen Bildung von L-Dopa-Resten abzulesen (Abbildung 24B). Weil in Melanomzellen erhöhte Tyrosinasespiegel vorliegen, könnte ein solcher schneller optischer Tyrosinase-Nachweis durch QDs in einem Diagnosesystem zur Anwendung kommen.

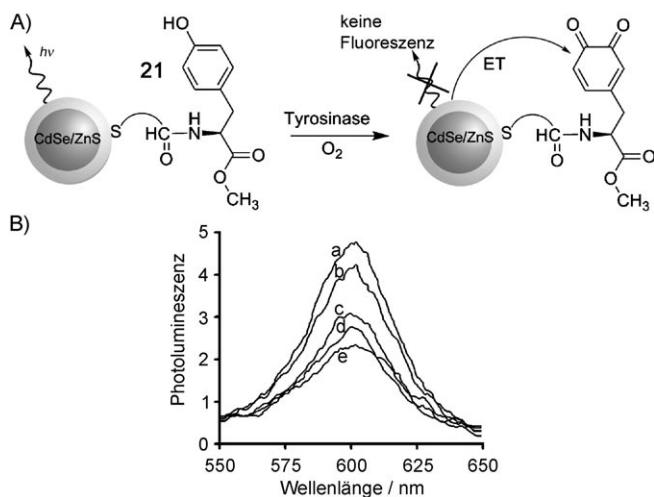
Die Oxidation phenolischer Gruppen durch Tyrosinase kam auch in der Analyse der Thrombin-Aktivität mithilfe von QDs zum Einsatz.<sup>[120]</sup> Die CdSe/ZnS-QDs wurden mit dem Peptid **22** funktionalisiert, das die spezifische Substratsequenz für Thrombin sowie einen Tyrosinrest enthält. Die Tyrosinase-vermittelte Oxidation der Tyrosineinheiten führte auch hier zu Dopachinoneinheiten, die die QD-Fluoreszenz löschen (Abbildung 25 A). Die Spaltung des Peptids durch Thrombin entfernte die Chinongruppen und stellte die QD-Fluoreszenz wieder her (Abbildung 25 B).

Eine weitere bioanalytische Anwendung beruht auf dem chemischen Schalten der QD-Lumineszenz.<sup>[121]</sup> Die Einwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> löscht die Lumineszenz von CdSe/ZnS-QDs vermutlich dadurch, dass oxidische Energiesenken („surface oxide traps“) für die Leitungsbandedektronen gebildet werden. Daher eignen sich QDs zur quantitativen Bestim-

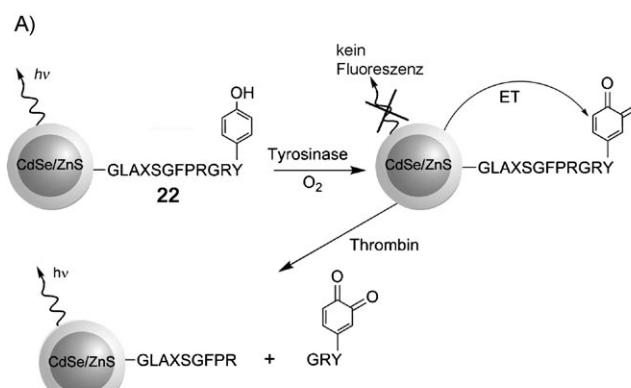
mung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Auf solchen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-empfindlichen QDs beruhen auch optische Biosensoren für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erzeugende Oxidasen. Mit Fluorescein markierte und mit Avidin funktionalisierte CdSe/ZnS-QDs wurden zur optischen Glucosebestimmung eingesetzt (Abbildung 26 A). Biotinylierte Glucose-Oxidase wurde an die Partikel geknüpft, und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, das Produkt der katalytischen Oxidation von Glucose mit O<sub>2</sub>, modifizierte daraufhin die Oberfläche der QDs, sodass deren Lumineszenz gelöscht wurde. Der an Avidin befestigte, nicht H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-empfindliche Fluoreszenzfarbstoff diente als Standard für die Änderung der QD-Fluoreszenz durch Einwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die QD-Lumineszenz nahm mit steigender Glucosekonzentration ab, was sich zur quantitativen Glucosebestimmung nutzen ließ (Abbildung 26 B). In ähnlicher Weise wurde in der Acetylcholinesterase-Cholinoxidase-Kaskade gebildetes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



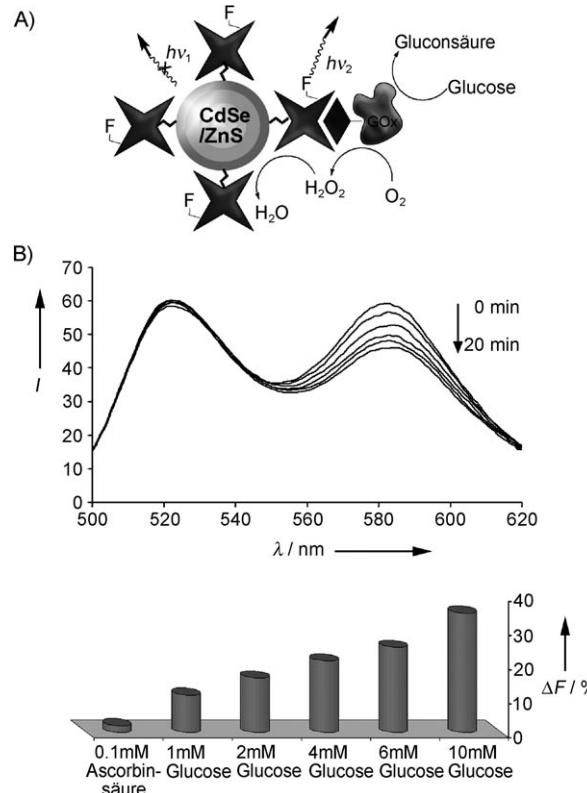
**Abbildung 22.** A) Nachweis der Matrixmetalloproteinase (MMP)-Aktivität bei der Spaltung des 6xHis-markierten Peptids **20**, das an Luc8 gebunden ist, auf der Grundlage des resonanten Biolumineszenzenergietransfers zu CdSe-QDs. Ohne MMP-2 bleibt das Peptid intakt, und die durch Luc8 in Gegenwart von Coelenterazin (**19**) und O<sub>2</sub> induzierte Biolumineszenz wird zusammen mit der BRET-induzierten Emission der QDs beobachtet. In Gegenwart von MMP-2 wird das Peptid **20** gespalten, und es tritt nur noch die Biolumineszenz durch Luc8 und **19**/O<sub>2</sub> auf (nach Lit. [117]).



**Abbildung 24.** A) Analyse der Tyrosinase-Aktivität anhand der katalytischen Oxidation von Tyrosinmethylester auf CdSe/ZnS-QDs zum Dopachinon-Derivat, das die QD-Fluoreszenz durch Elektronentransfer löscht. B) Abnahme der QD-Fluoreszenz durch Tyrosinase-vermittelte Oxidation nach 0 (a), 0.5 (b), 2 (c), 5 (d) und 10 min (e). Wiedergabe nach Lit. [120] mit Genehmigung der American Chemical Society.



**Abbildung 25.** A) Nachweis von Tyrosinase- und Thrombin-Aktivität: Die Tyrosinase-vermittelte Oxidation des Peptids **22** auf CdSe/ZnS-QDs resultiert in einer Lösung der QD-Fluoreszenz durch Elektronentransfer. Die anschließende Abspaltung des Peptidteils mit der Dopachinongruppe durch Thrombin stellt die QD-Fluoreszenz wieder her. B) Fluoreszenz von QDs mit **22** (a), nach 10-minütiger Reaktion mit Tyrosinase (b) und nach weiterer 6-minütiger Umsetzung mit Thrombin (c). Wiedergabe nach Lit. [120] mit Genehmigung der American Chemical Society.



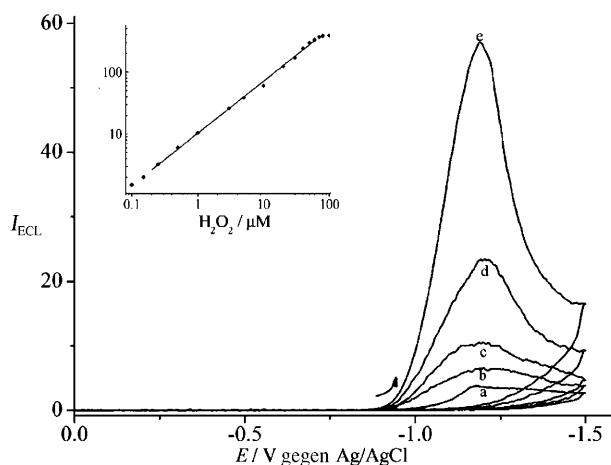
**Abbildung 26.** A) Ratiometrische Glucosemessung mithilfe biotinylierter GOx, die mit Konjugaten aus fluorophormarkiertem Avidin und CdSe/ZnS-QD verbunden ist. B) Oben: ratiometrische Fluoreszenzanalyse von 5 mM Glucose durch die GOx-QDs-Konstrukte nach 0, 2, 5, 10, 15 und 20 min. Unten: Fluoreszenzlösung der GOx-funktionalisierten CdSe/ZnS-QDs nach 10 min bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (nach Lit. [121]).

detektiert. Mit diesem System konnte nicht nur die Enzymkaskade untersucht werden, sondern es war auch möglich, Acetylcholinesterase-Hemmer durch Lumineszenzmessungen zu charakterisieren.

#### 4. Chemilumineszierende Halbleiterquantenpunkte in der Bioanalyse

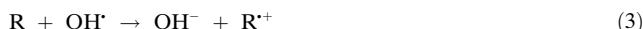
Chemilumineszenz<sup>[122–124]</sup> und Biochemilumineszenz<sup>[125–127]</sup> zeigen häufig Prozesse in Bioanalysen an. Für Halbleiterquantenpunkte wurden über die Photolumineszenz hinaus auch Kathodolumineszenz,<sup>[128]</sup> Chemilumineszenz (CL)<sup>[129]</sup> und Elektrochemilumineszenz (ECL)<sup>[129, 130]</sup> beobachtet. Weil die Elektrochemilumineszenz von QDs einen Elektronentransfer zwischen elektrochemisch angeregten Nanokristallen und weiteren Reaktanten voraussetzt, können ECL-Sensoren auf der Grundlage von QDs entwickelt werden. Der Hauptvorteil der ECL-Analyse besteht im Fehlen jeglicher Hintergrundsignale, die bei der Anregung oder durch eine unspezifische Adsorption auftreten können. Als Beispiel für eine biochemische Spezies, die durch ECL mit QDs erfasst werden kann, ist Wasserstoffperoxid zu nennen. So erzeugt ein Film aus CdSe-Nanopartikeln auf

einer paraffinierten Graphitelektrode in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  beim Anlegen eines Potentials von  $-1.2 \text{ V}$  gegen  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  eine ECL,<sup>[131]</sup> die von der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration in der Lösung abhing (Abbildung 27). Die Nachweisgrenze lag unter  $1 \mu\text{M}$ , und die Detektion war hoch reproduzierbar (1.18% relative Standardabweichung bei  $10 \mu\text{M} \text{ H}_2\text{O}_2$ ).



**Abbildung 27.** Potentialinduzierte Elektrochemilumineszenz von CdSe-QDs nach Zusatz von a) 0, b) 0.5, c) 1, d) 3 und e)  $10 \mu\text{M} \text{ H}_2\text{O}_2$ . Eingeschub: Kalibrierkurve. Wiedergabe nach Lit. [131] mit Genehmigung der American Chemical Society.

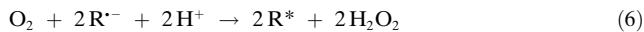
Einen möglichen Mechanismus für die Elektrochemilumineszenz von QDs in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  liefern die Gleichungen (1)–(5). Die elektrochemische Reduktion der QDs führt zu einem Radikal anion, das mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zum Hydroxylradikal reagiert. Die Oxidation der QDs durch Hydroxylradikale könnte QD-Radikalkationen ergeben, und als Resultat der anschließenden Rekombination von Radikal anionen und Radikalkationen werden angeregte QDs erhalten, die Licht emittieren.



Im Fall von QDs sind zwei Arten von ECL zu unterscheiden. Bei der Bandlücken-Chemilumineszenz<sup>[129,131]</sup> entspricht das Luminesenzspektrum dem Photolumineszenzspektrum; die Lumineszenz ist daher großenabhängig und folglich einstellbar. Oft ist die Chemilumineszenz aber durch Oberflächenzustände bedingt. Unter diesen Bedingungen tritt das ECL-Spektrum rotverschoben auf, und es ist unabhängig von der Partikelgröße. Dies mag in Parallelanalysen hinderlich sein, bei allgemeinen Anwendungen wie der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Detektion ist diese auf Oberflächenzuständen beruhende ECL aber ebenso effizient und empfindlich wie Bandlücken-

ECL.<sup>[132]</sup> Der beschriebene Mechanismus der Elektrolumineszenz in Gegenwart von Wasserstoffperoxid lässt schon vermuten, dass ECL-Sensoren für biologische Hydroxylradikalfänger wie GSH entwickelt werden könnten.<sup>[133]</sup> Das Abfangen der Hydroxylradikale führt dazu, dass weniger elektronendefizierte QDs gemäß Gleichung (3) – und folglich auch weniger angeregte QDs – entstehen.

Nicht nur Wasserstoffperoxid, sondern auch gelöster Sauerstoff kann eine ECL bewirken [Gl. (6)].



Gelöster Sauerstoff führt bei gleicher Konzentration zu einer effizienteren ECL als  $\text{H}_2\text{O}_2$ .<sup>[134]</sup> Dies könnte erklären, warum die ECL in Gegenwart von Glucose-Oxidase und des zugehörigen Substrats Glucose nicht verstärkt, sondern abgeschwächt wurde.

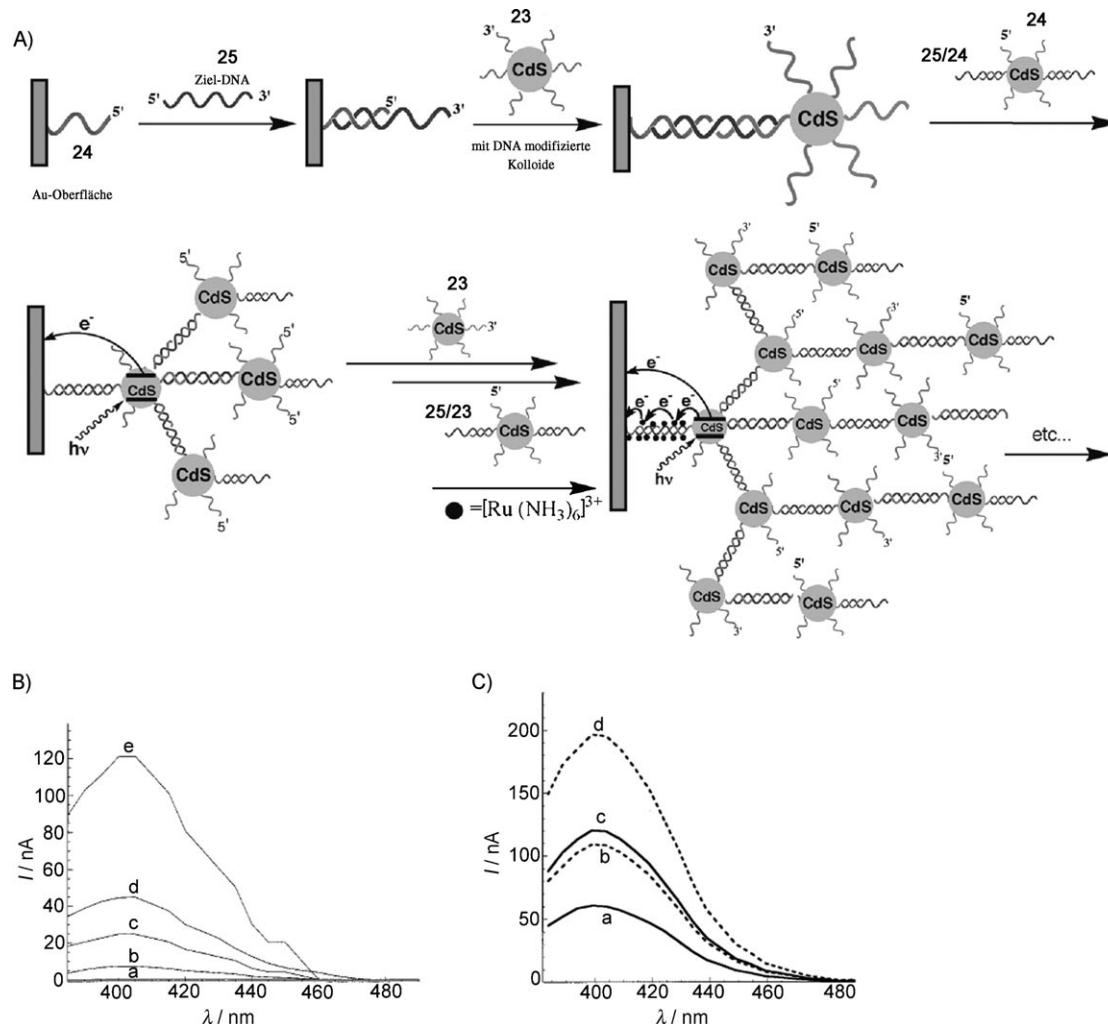
Alle zuvor beschriebenen ECL-Systeme beruhen auf einer kathodischen ECL bei hohen negativen Potentialen. Eine anodische ECL erwies sich dagegen zum Nachweis von Catecholen wie Dopamin und Adrenalin als nützlich.<sup>[135]</sup> Die an der Elektrode produzierten, oxidierten Catechole löschen vermutlich den Energietransfer, anstelle ihn zu fördern, denn die Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol, das die Oxidation von Dopamin verhindert, stellte die ECL fast in vollem Umfang wieder her. Die Dopamin-Nachweisgrenze lag unter  $1 \mu\text{M}$ .

Schließlich stellte sich die Chemilumineszenz von Lösungen mit CdS-NPs in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  als empfindlich gegenüber vielfältigen biologischen Verbindungen und Metallionen heraus.<sup>[136]</sup>

## 5. Halbleiternanopartikel für die photoelektrochemische Bioanalyse

Die Anregung von Halbleiter-QDs kann nicht nur zur Lumineszenz führen. An Elektrodenoberflächen verankerte QDs können überdies nach einer Anregung Elektron-Loch-Spezies bilden, die direkt durch Injektion von Leitungsbandelektronen oder stufenweise – durch Abgabe der Leitungsbandelektronen an einen Elektronenakzeptor im Elektrolyten und Aufnahme von Elektronen in Valenzbandlöcher – mit der Elektrode wechselwirken (siehe Abbildung 1). Diese beiden Prozesse führen zu einem anodischen bzw. kathodischen Photostrom. Verschiedene QD-DNA-Hybride<sup>[137–139]</sup> und QD-Protein-Konjugate<sup>[140,141]</sup> wurden an Elektroden befestigt. Die photoelektrochemischen Eigenschaften der QDs in diesen Systemen wurden nachweislich von den Biomolekülen beeinflusst.

Mit Nucleinsäuren functionalisierte CdS-QDs auf Elektroden eigneten sich zum Nachweis vervielfältigter DNA-Sequenzen anhand eines Photostroms.<sup>[137]</sup> Die  $(2.6 \pm 0.4) \text{ nm}$  großen Halbleiternanopartikel wurden mit einer der beiden thiolierten Nucleinsäuren **23** oder **24** functionalisiert, die komplementär zum 5'- und 3'-Ende der Ziel-DNA **25** sind (Abbildung 28). Durch Hybridisierungsprozesse wurden auf einer Goldelektrode stufenweise Schichten der CdS-NPs erzeugt, wobei die Ziel-DNA die mit den komplementären Nucleinsäuresequenzen functionalisierten CdS-QDs ver-

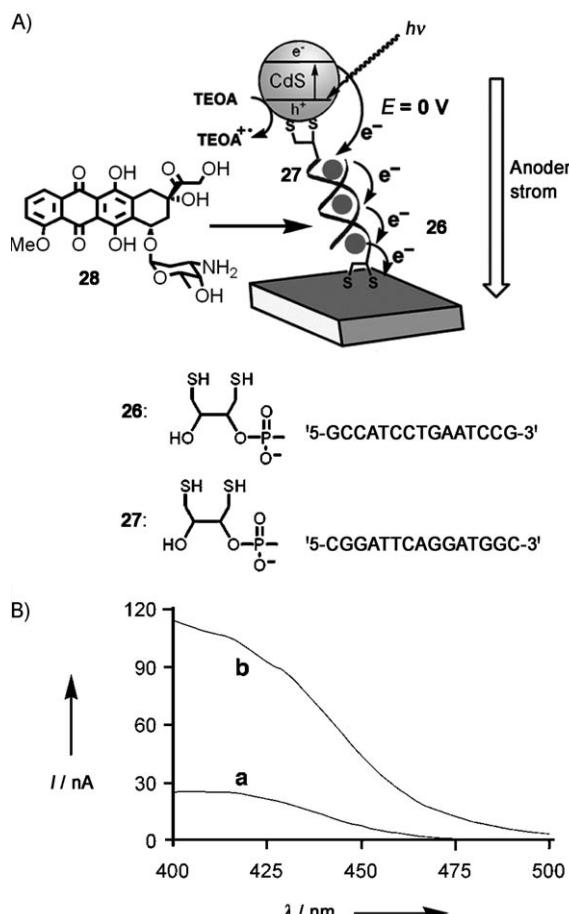


**Abbildung 28.** A) Abscheidung mit **23** und **24** funktionalisierter CdS-NPs unter Vernetzung durch **25**. Die Einlagerung von  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  in die DNA-Struktur erleichtert den Ladungstransport und verstärkt den Photostrom. B) Photoströme: a) ohne CdS-NPs und b–e) mit einer bis vier Schichten CdS-NPs in Gegenwart von  $2 \times 10^{-2}$  M Triethanolamin. C) Der Effekt von  $5 \times 10^{-6}$  M  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  auf die Photoströme (in Gegenwart von  $2 \times 10^{-2}$  M Triethanolamin): a,b) zwei Schichten CdS-NPs ohne bzw. mit  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ ; c,d) vier Schichten CdS-NPs ohne bzw. mit  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  (nach Lit. [137]).

netzte (Abbildung 28A). Bei der Bestrahlung der resultierenden Anordnungen in Gegenwart des Elektronendonors Triethanolamin (TEOA) wurde ein Photostrom vermerkt, der mit zunehmender Zahl an CdS-NP-Schichten auf der Elektrode größer wurde (Abbildung 28B). Die Photostromspektren entsprachen den Absorptionsspektren der CdS-NPs, sodass der Photostrom auf die Anregung der CdS-Nanopartikel zurückgeführt wurde. Die Abgabe von Leitungsbanden-Elektronen an die Elektrode ging dabei von QDs in Elektrodennähe aus. Dafür spricht auch, dass elektrostatisch an die DNA gebundene  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Einheiten ( $E^\circ = -0.16$  V vs. SCE) den Photostrom der DNA-CdS-Anordnung erhöhten. Die  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Einheiten vermittelten das „Springen“ der Leitungsbanden-Elektronen von CdS-Partikeln, die fernab der Elektrode gebunden waren (Abbildung 28C). Der elektrische Kontakt zwischen photochemisch angeregten QDs und Elektrodenoberflächen über verbrückende DNA-Einheiten ist von grundlegendem Interesse.

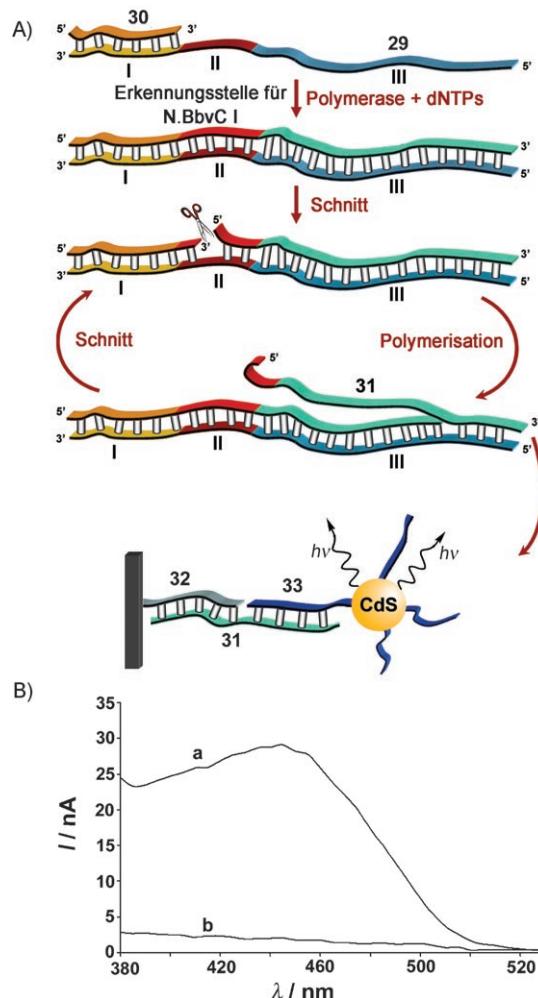
Der Ladungstransport durch DNA wird kontrovers diskutiert. Während DNA in einigen Studien als leitfähige Matrix dargestellt wird,<sup>[142]</sup> spricht die Mehrheit der Ergebnisse dafür, dass Nucleinsäuren mit zufälliger Basensequenz isolierend wirken.<sup>[143]</sup> Die geringen Photoströme für Strukturen aus QD-Nucleinsäure-Hybriden, in denen Halbleiter-QDs über Nucleinsäuredoppelstränge mit einer Elektrode verbunden sind, spricht für ein Isolatorverhalten von DNA und dafür, dass die Photoströme auf Partikel nahe der Elektrode zurückgehen. Die Einlagerung redoxaktiver Komponenten in DNA-Doppelstränge kann aber einen elektrischen Kontakt zwischen den photochemisch angeregten Halbleiter-QDs und der Elektrode herstellen, wenn die eingeschobenen Einheiten sich am Ladungstransport beteiligen. Solche redoxaktiven Komponenten verstärkten nicht nur den Photostrom, sondern sie ermöglichten es, die Richtung des Photostroms über das Potential zu steuern.<sup>[138]</sup> Die Dithiol-funktionalisierte Einzelstrang-DNA **26** wurde auf einer Goldoberfläche immobilisiert und mit dem komplementären,

ebenfalls Dithiol-funktionalisierten DNA-Strang **27** hybridisiert, um CdS-Nanopartikel mit der Oberfläche zu verbinden (Abbildung 29 A). Durch den Einschub von Doxorubicin (**28**) in den DNA-Doppelstrang wurden Ladungsüberträgereinheiten eingeführt, die den Photostrom gegenüber dem System ohne **28** um das Vierfache verstärkten (Abbildung 29 B).



**Abbildung 29.** A) Verstärkung des Photostroms von CdS-NPs, die über einen DNA-Doppelstrang mit einer Elektrode verknüpft sind, durch die Einlagerung von Doxorubicin (**28**). B) Photoströme für CdS-NPs/DNA-Doppelstränge ohne (a) und mit Doxorubicin (b) in Gegenwart von 20 mM Triethanolamin (nach Lit. [138]).

Die Bindung von CdS-NPs auf einer Elektrodenoberfläche mit anschließender Erzeugung eines Photostroms wurde in einem DNA-Sensor genutzt (Abbildung 30 A).<sup>[139]</sup> Das System bestand aus einem DNA-Strang **29** mit Erkennungssequenz (I), einer Schnittstelle (II), die durch Doppelstrangbildung entsteht, und einer Reportersequenz (III). Nach der Hybridisierung von **29** mit dem Analyt **30** in Gegenwart von Polymerase/dNTPs und des schneidenden Enzyms Nb.BbvC I wurde diese „DNA-Maschine“ aktiviert, was zur Replizierung und anschließend zur Spaltung des gebildeten Doppelstrangs führte. Der Schnitt löste eine weitere Replizierung von **29** aus, wobei die Nucleinsäure **31** freigesetzt wurde. Dieses Spaltprodukt **31** band dann über das 3'-Ende an eine Elektrode, deren Oberfläche mit der komplementären Nucleinsäuresequenz **32** modifiziert war. Konjugate aus CdS-



**Abbildung 30.** Photoelektrochemischer Nachweis einer Nucleinsäure mithilfe einer DNA-Maschine: A) Bei der Verlängerung der Ziel-DNA **30** durch eine DNA-Maschine wird die DNA-Sequenz **31** erzeugt, die die mit **33** functionalisierten CdS-NPs mit einer Elektrode verknüpft. B) Experimentelle Photoströme ohne (a) und mit Ziel-DNA (b;  $1 \times 10^{-6}$  M, nach 90 min). Wiedergabe nach Lit. [139] mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

NPs und der Nucleinsäuresequenz **33**, die komplementär zum 5'-Ende von **31** war, lagerten sich ebenfalls an diese Spezies an. Durch diesen Prozess wurden die CdS-NPs mit der Elektrode verknüpft, und es kam zu einem Photostrom (Abbildung 30 B).

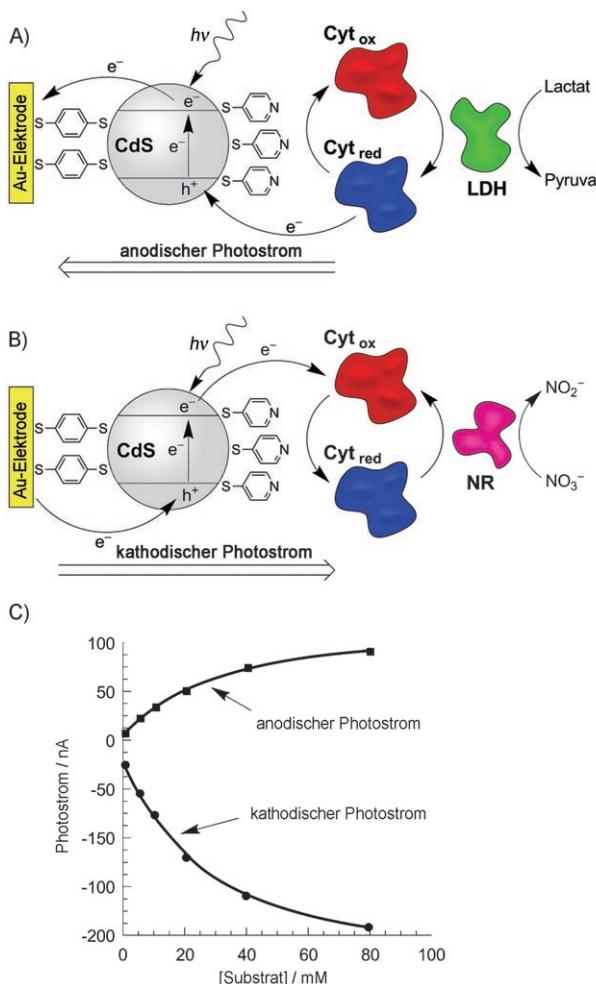
Die Herstellung eines elektrisch leitenden Kontakts zwischen Halbleiter-QDs und Elektroden über Proteine hinweg erscheint schwieriger, weil diese isolierend wirken.<sup>[144]</sup> Der Aufbau von QD-Protein-Hybridanordnungen auf Elektroden kann aber zu leitfähigen Strukturen führen. In den beiden Konfigurationen sind die Halbleiter-QDs direkt mit der Elektrode verknüpft, während die Proteine an der QD-Oberfläche binden und die photoelektrochemischen Eigenschaften der Halbleiter-QDs modifizieren. Dies kann grundsätzlich auf zweierlei Weise erfolgen: 1) Niedermolekulare redoxaktive Proteine können mit den QDs wechselwirken, und ein elektrischer Kontakt zwischen den Leitungsbandelektronen oder Valenzbandlöchern und den Redoxzentren

der Proteine könnte den Photostrom des Hybridsystems beeinflussen. 2) Ein Katalysator, der an die QDs gebunden ist, könnte Produkte liefern, die als Elektronenakzeptoren oder -donoren wirken und die QDs aktivieren.

Enzyme oder redoxaktive Proteine wurden entsprechend mit Halbleiter-QDs verknüpft, und der Photostrom diente als Maß für die Enzymaktivität. In Konstrukten aus Cytochrom-c-Einheiten und CdS-NPs hing die Richtung des Photostroms von der Oxidationsstufe der Cytochrom-c-Einheit ab.<sup>[140]</sup> Die CdS-NPs wurden mithilfe eines Dithiols auf einer Goldelektrode verankert, und Mercaptopyridineinheiten, die eine elektrische Kommunikation zwischen Cytochrom c und den NPs ermöglichen, wurden an die Halbleiter-NPs geknüpft (Abbildung 31). In Gegenwart von reduziertem Cytochrom c war die photoelektrokatalytische Oxidation von Lactat durch Lactat-Dehydrogenase (LDH) mit einem anodischen Photostrom gekoppelt (Abbildung 31 A). Die Anregung der NPs führte zur Abgabe der Leitungsbandelektronen an die Elek-

trode und zur Oxidation des reduzierten Cytochrom c durch die Valenzbandlöcher. Das solchermaßen oxidierte Cytochrom c vermittelte anschließend die LDH-katalysierte Oxidation von Lactat. In ähnlicher Weise bewirkte oxidiertes Cytochrom c die elektrokatalytische Reduktion von  $\text{NO}_3^-$  zu  $\text{NO}_2^-$  durch Nitrat-Reduktase (NR; Abbildung 31B). Die Übertragung von Leitungsbandelektronen auf das oxidierte Cytochrom c reduzierte diese Einheit, während ein Elektronentransfer von der Elektrode die Valenzbandlöcher der NPs wieder auffüllte. Die durch Cytochrom c vermittelte Reduktion von  $\text{NO}_3^-$  zu  $\text{NO}_2^-$  wurde von einem kathodischen Photostrom begleitet, wenn die Elektrode auf SCE-Potential gehalten wurde. Die Photoströme für verschiedene Konzentrationen der Substrate (Abbildung 31C) zeigen, dass sich Halbleiter-NPs für den Einsatz in photoelektrochemischen Biosensoren eignen. In einer ähnlichen Studie wurden mit Mercaptobernsteinsäure beschichtete CdSe/ZnS-QDs mit Cytochrom c kombiniert.<sup>[145]</sup>

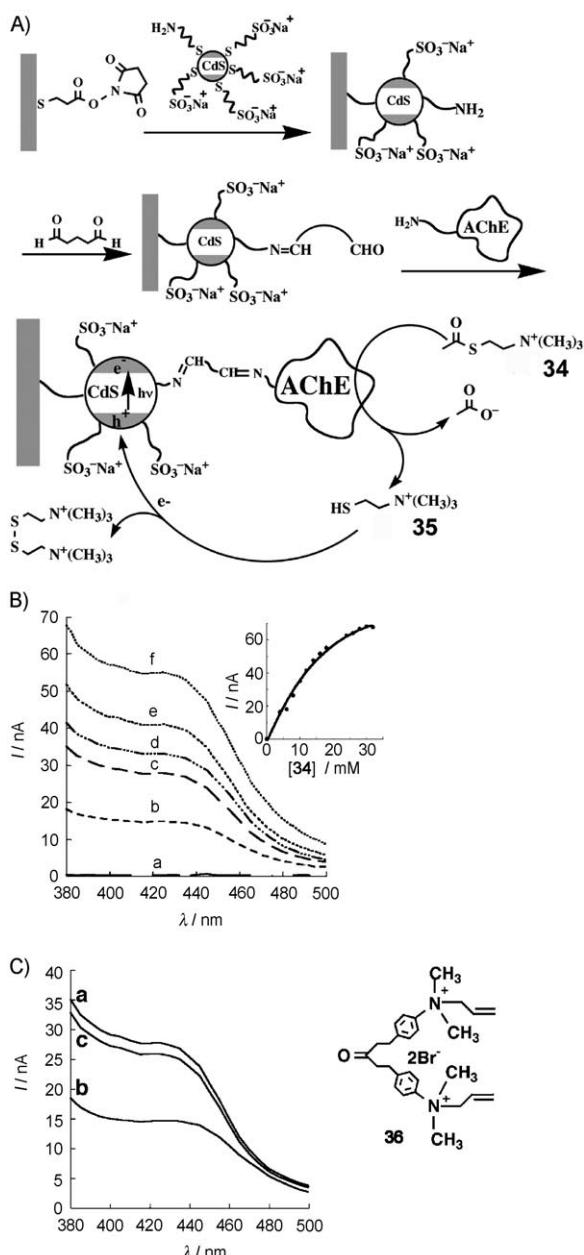
Die Erzeugung eines Photostroms durch QDs infolge einer enzymkatalysierten Reaktion wurde in einem Biosensor für Acetylcholinesterasehemmer genutzt.<sup>[141]</sup> CdS-NPs wurden auf einer Goldelektrode angebracht und mit Acetylcholinesterase (AChE) verknüpft (Abbildung 32 A). Die durch Acetylcholinesterase katalysierte Hydrolyse von Acetylthiocholin (**34**) ergab den Elektronendonator Thiocholin (**35**), der photochemisch erzeugte Valenzbandlöcher der CdS-NPs auffüllte. Die resultierenden Photoströme waren von der Substratkonzentration abhängig (Abbildung 32 B), und Acetylcholinesterasehemmer wie 1,5-Bis(4-allyldimethylammoniophenyl)pentan-3-on-dibromid (**36**) minderten deren Intensität (Abbildung 32 C). Daher wurde das System als Sensor für chemische Kampfstoffe vorgeschlagen, die als Acetylcholinesterasehemmer wirken. Auch die Aktivität des Enzyms Tyrosinase ließ sich photoelektrochemisch nachweisen.<sup>[146]</sup> CdS-Nanopartikel wurden mit dem thiolierten Tyrosinmethylester **37** funktionalisiert und mit  $\text{O}_2$  in Gegenwart von Tyrosinase umgesetzt (Abbildung 33 A). Das resultierende Dihydroxyphenylderivat wurde an eine Elektrode geknüpft, die mit einer Phenylboronsäure-Monoschicht überzogen war. Der Photostrom, der in Gegenwart von Triethanolamin erhalten wurde (Abbildung 33 B), zeigte dann die Enzymaktivität an. Die Nachweisgrenze für Tyrosinase bei diesem Analyseverfahren entsprach 0.2 U.



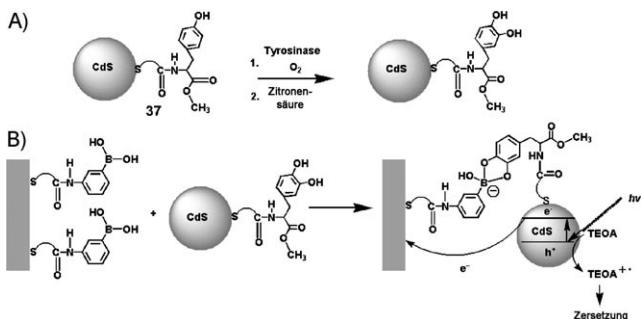
**Abbildung 31.** Photoströme bei Enzymkaskaden an CdS-NPs: A) die durch Cytochrom c vermittelte Oxidation von Lactat durch LDH und B) die durch Cytochrom c vermittelte Reduktion von Nitrat durch Nitrat-Reduktase (NR). C) Die Photoströme aus diesen biochemischen Kaskaden bei unterschiedlichen Konzentrationen der Substrate Lactat bzw. Nitrat. Wiedergabe nach Lit. [140] mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

## 6. Halbleiternanopartikel als elektrochemische Markierungen für Erkennungsprozesse

Durch ihre Größe und die leicht vorzunehmende Modifizierung ihrer Oberfläche mit Biomolekülen sind Halbleiternanopartikel ideale lösliche elektrochemische Markierungen für biologische Erkennungsprozesse. Die anschließende chemische Zersetzung der Markierung und die elektrochemische Erfassung der freigesetzten Ionen ermöglichen eine quantitative Analyse der markierten Biomoleküle. Diese Nachweismethode verstärkt zugleich das Signal eines Erkennungsprozesses, denn beim Auflösen eines einzigen NP werden zahlreiche Ionen freigesetzt.

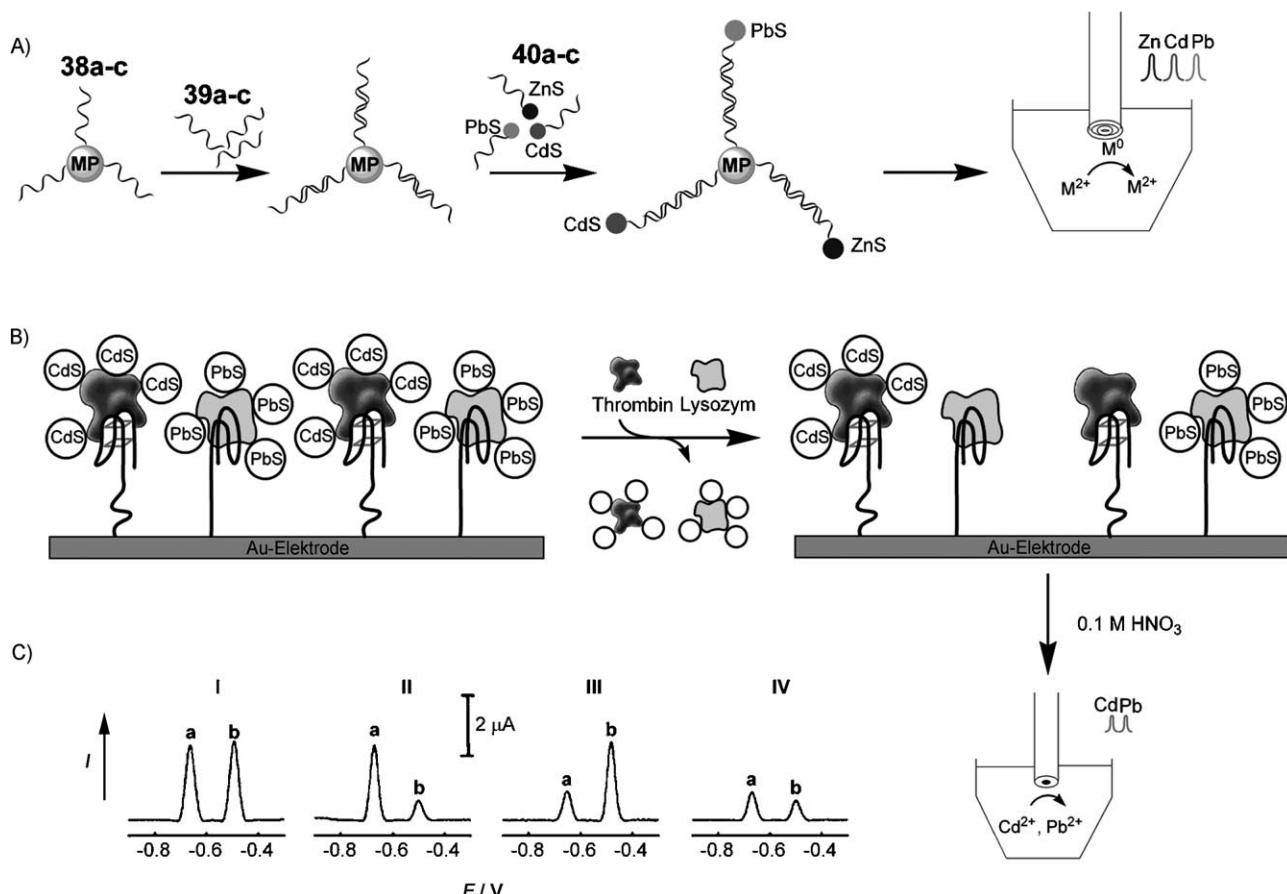


Dieses Prinzip unterliegt dem elektrochemischen Nachweis von Proteinen<sup>[147, 148]</sup> oder DNA<sup>[149–151]</sup> mithilfe von Nanopartikeln. Durch Einsatz verschiedener Halbleiter-NPs gelang die Parallelanalyse mehrerer Zielstrukturen. So wurden mit Nucleinsäuren modifizierte CdS-Nanopartikel als Markierungen beim Nachweis einer DNA-Hybridisierung angewendet.<sup>[152]</sup> Nach dem Auflösen des CdS mit 1M HNO<sub>3</sub>



wurde Cd<sup>2+</sup> elektrochemisch reduziert und als Cd<sup>0</sup> auf der Elektrode abgeschieden. Eine anschließende Oxidation entfernte das Cd<sup>0</sup> wieder von der Elektrode, und das Signal für dabei gebildetes Cd<sup>2+</sup> ermöglichte die DNA-Analyse. Diese Vorgehensweise wurde weiterentwickelt, indem magnetische Partikel mit einer Nucleinsäuresonde als Sensoren eingesetzt wurden, die mit einer Ziel-DNA hybridisieren. Mit Nucleinsäuren funktionalisierte CdS-NP-Markierungen hybridisierten dann ebenfalls mit einer einsträngigen Domäne der Ziel-DNA. Die durch die Ziel-DNA verbundenen Sonden – mit den magnetischen Partikeln einerseits und den CdS-NPs andererseits – wurden magnetisch abgetrennt, und nach erneutem Auflösen des CdS, elektrochemischer Abscheidung des Cd-Metalls und Ablösen wurde ein verstärktes Signal für die Ziel-DNA erhalten. Dieses System vereint die Vorteile der magnetischen Abtrennung von geringen Mengen an CdS-NPs, wie sie bei den DNA-Erkennungsprozessen eingesetzt werden, mit der Verstärkung durch die elektrochemische Detektion nach der Zersetzung der Nanopartikel. Folglich gelang der hoch empfindliche Nachweis von DNA mit einer Nachweisgrenze von 100 fmol bei 6 % relativer Standardabweichung.<sup>[152]</sup>

Halbleiter-NPs unterschiedlicher Zusammensetzungen können als Codes bei der Parallelanalyse von Antikörpern oder DNA-Sequenzen dienen. In einem Modellsystem für eine solche Analyse unterschiedlicher Nucleinsäuren mit Halbleiter-NPs<sup>[153]</sup> (Abbildung 34 A) wurden drei verschiedene Arten magnetischer Partikel mit drei Nucleinsäuren **38a–c** modifiziert und anschließend mit den komplementären Ziel-Nucleinsäuren **39a–c** hybridisiert. Die Partikel wurden daraufhin mit ZnS-, CdS- oder PbS-Halbleiternanopartikeln verknüpft, die ebenfalls Nucleinsäuren trugen. Die Nucleinsäuren **40a–c** auf diesen Partikeln waren komplementär zu den Ziel-Nucleinsäuren auf den magnetischen Partikeln. Die magnetischen Partikel erleichterten die Abtrennung und Reinigung der Analyte, während die Halbleiterpartikel für eine überschneidungsfreie elektrochemische Identifizierung der hybridisierten DNA sorgten. Nach dem Auflösen der Nanopartikel wurden definierte Redoxwellen erhalten, die eine elektrochemische Parallelanalyse der Ziel-DNAs ermöglichen. Auch Abweichungen in nur einem Nucleotid (SNP) ließen sich mithilfe von verschiedenen QDs erkennen.



**Abbildung 34.** A) Elektrochemische DNA-Parallelanalyse mithilfe magnetischer Partikel, die unterschiedliche DNA-Sonden und spezifische, mit Nucleinsäuren functionalisierte Metallsulfidpartikel tragen. B) Verdrängungsassay der Proteine Thrombin und Lysozym, bei dem mit Thrombin functionalisierte CdS-QDs-Partikel und mit Lysozym modifizierte PbS-QDs eingesetzt wurden. C) Voltammogramme für den gleichzeitigen Nachweis von Lysozym (a) und Thrombin (b): I) weder (a) noch (b) vorhanden; II) 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  (a) und kein (b); III) kein (a) und 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (b); IV) 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  (a) und 0.5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (b). Wiedergabe nach Lit. [97] mit Genehmigung der American Chemical Society.

nen.<sup>[154]</sup> ZnS-, CdS-, PbS- und CuS-NPs wurden mit den vier Mononukleotiden verknüpft und in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt, um bestimmte SNPs zu erhalten. Jede Mutationsstelle erhielt dadurch ihre eigene elektronische Signatur.

Eine analoge Strategie war bei einem Proteinimmunassay<sup>[155]</sup> zur Parallelanalyse von vier Antigenen erfolgreich. Durch Einsatz weiterer Metallsulfid-Kompositnanostrukturen wurde die Auswahl an anorganischen Markierungen für den parallelen Nachweis von Biomolekülen vergrößert, und der Verstärkungsgrad wurde erhöht. InS-Nanostäbe führten beispielsweise zu einem weiteren charakteristischen voltammetrischen Signal, während die Nanostabform der Markierung eine effizientere Verstärkung ergab, weil die Stäbe mehr Metall für die elektrochemische Analyse freisetzen als sphärische NPs.<sup>[156]</sup>

Eine solche Codierung von Biomolekülen durch Halbleiter-NPs wurde auch zur Parallelanalyse unterschiedlicher Proteine über spezifische Aptamere verwendet.<sup>[97]</sup> Eine Goldelektrode wurde mit Aptameren für Thrombin und Lysozym functionalisiert (Abbildung 34B). Thrombin und Lysozym wurden mit CdS- bzw. PbS-NPs markiert, an die entsprechenden Aptamere gebunden und schließlich durch

die Analyten – nichtfunctionalisierte Thrombin oder Lysozym – von der Elektrodenoberfläche verdrängt. Die quantitative Analyse der beiden Proteine gelang durch die elektrochemische Erfassung der freigesetzten Ionen nach dem Auflösen der an den Oberflächen verbliebenen Metallsulfide (Abbildung 34C).

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Die einzigartigen photophysikalischen Eigenschaften von Halbleiter-QDs werden in der Nanobiotechnologie zunehmend beachtet. Ihre hohen Fluoreszenzquantenausbeuten, ihre Beständigkeit gegen photochemische Zersetzung und ihre größenabhängige Lumineszenz führten zur Entwicklung verschiedener Biosensoren auf QD-Basis. Über den Einsatz als effiziente Lumineszenzmarkierungen hinaus erscheint auch eine Codierung anhand der Partikelgröße lumineszierender QDs für die Parallelanalyse von Biomolekülen vielversprechend. Die nanometergroßen QDs sind zellgängig, und in vitro waren sie bereits bei der Bildgebung in verschiedenen Zellbereichen erfolgreich. Die Einschleusung functionalisierter QDs in Zellen, um intrazelluläre Stoff-

wechselprozesse zu verfolgen, ist ein interessantes Forschungsziel, und die Ladungsabgabe durch Halbleiter-QDs ist ebenfalls aussichtsreich im Hinblick auf zukünftige Anwendungen von QDs in der „Nanomedizin“. Die Abgabe der Leitungsbandenlektronen von Halbleiter-NPs an Sauerstoff unter Bildung zellschädigender Substanzen<sup>[157]</sup> hat solche Partikel für die Krebstherapie ins Gespräch gebracht. Dabei sollen zellgängige QDs synthetisiert werden, die gezielt Tumorzellen abtöten.

Biomolekül-QD-Hybridsysteme für photoelektrochemische Anwendungen sind noch wenig fortgeschritten, doch ihre Tauglichkeit für Biosensoren wurde bereits nachgewiesen. Mögliche Perspektiven eröffnen sich hier etwa im Einsatz der Hybridstrukturen als Template: DNA wirkt beispielsweise als Templat bei der Synthese von Metallnanodrähten durch Reduktion mit dem DNA-Rückgrat verknüpfter Metallionen.<sup>[158]</sup> Die QD-vermittelte photoelektrochemische Reduktion von Ionen, die an DNA gebunden sind, könnte zu Metall-Halbleiter-Metall-Nanostrukturen führen.

Der Einsatz von Halbleiter-QDs als Lichtkollektoren in Solarzellen könnte ebenfalls von Biomolekül-QD-Nanostrukturen profitieren.<sup>[137]</sup> Biomoleküle wie DNA könnten als Template für Metallnanodrähte dienen, die Leitungsbandenlektronen der photochemisch angeregten QDs abfangen. Dieser Prozess könnte die Ladungstrennung fördern und die Effizienz der Solarzellen erhöhen. Die Rolle von Halbleiternanopartikeln bei der elektrochemischen Verfolgung von Erkennungsprozessen deutet auf weitere Anwendungsmöglichkeiten in der Bioanalyse hin. Mithilfe von Nanopartikeln unterschiedlicher Zusammensetzung gelingt der parallele Nachweis verschiedener Analyte. In diesem Zusammenhang ist auch die verstärkende Wirkung der Nanopartikel bei der Analyse von Bedeutung.

Der rasante Fortschritt bei der Entwicklung funktioneller Hybridsysteme aus Biomolekülen und Halbleiternanopartikeln und ihre vielfältigen Anwendungen in der Bioanalyse heben QDs weit über den Rang simpler Fluoreszenzmarkierungen hinaus. Ihr Einsatz als optische Reportereinheiten für biochemische Umwandlungen und bei der Untersuchung intrazellulärer Prozesse *in vitro* sowie der potenzielle Nutzen photochemisch erzeugter Elektron-Loch-Paare für die *In-vivo*-Analyse und zum Auslösen chemischer Reaktionen verheißen glänzende Aussichten in der Analytik, der Nanomedizin und – möglicherweise – einer *In-vivo*-„Nanoelektronik“.

*Unsere Untersuchungen über Biomolekül-Halbleiterquantenpunkt-Hybride wurden durch das Converging Technologies Program der Israel Science Foundation und das NanoSci-ERA-Konsortium (Projekt NANOLICHT) gefördert.*

Eingegangen am 13. Januar 2008  
Übersetzt von Dr. Volker Jacob, Mannheim

- [1] X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale, M. P. Bruchez, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 41–46.
- [2] L. Brus, *Appl. Phys. A* **1991**, *53*, 465–474.
- [3] A. P. Alivisatos, *Science* **1996**, *271*, 933–937.

- [4] K. Grieve, P. Mulvaney, F. Grieser, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2000**, *5*, 168–172.
- [5] P. Alivisatos, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 47–52.
- [6] M. Nirmal, L. Brus, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 407–414.
- [7] Y. Xing, Q. Chaudry, C. Shen, K. Y. Kong, H. E. Zhau, L. W. Chung, J. A. Petros, R. M. O'Regan, M. V. Yezhelyev, J. W. Simons, M. D. Wang, S. Nie, *Nat. Protocols* **2007**, *2*, 1152–1165.
- [8] I. Willner, B. Willner, E. Katz, *Bioelectrochemistry* **2007**, *70*, 2–11.
- [9] R. Baron, B. Willner, I. Willner, *Chem. Commun.* **2007**, 323–332.
- [10] P. V. Kamat, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 2834–2860.
- [11] T. Nakanishi, B. Ohtani, K. Uosaki, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 1571–1577.
- [12] L. Sheeney-Haj-Ichia, B. Basnar, I. Willner, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 80–85; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 78–83.
- [13] R. J. Ellingson, M. C. Beard, J. C. Johnson, P. R. Yu, O. I. Micic, A. J. Nozik, A. Shabaev, A. L. Efros, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 865–871.
- [14] R. D. Schaller, V. I. Klimov, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 186601.
- [15] R. Plass, S. Pelet, J. Krüger, M. Grätzel, U. Bach, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 7578–7580.
- [16] A. J. Nozik, *Physica E* **2002**, *14*, 115–120.
- [17] C. Y. Chen, C. T. Cheng, C. W. Lai, P. W. Wu, K. C. Wu, P. T. Chou, Y. H. Chou, H. T. Chiu, *Chem. Commun.* **2006**, 263–265.
- [18] P. T. Sneer, R. C. Somers, G. Nair, J. P. Zimmer, M. G. Bawendi, D. G. Nocera, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13320–13321.
- [19] G. W. Walker, V. C. Sundar, C. M. Rudzinski, A. W. Wun, M. G. Bawendi, D. G. Nocera, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *83*, 3555–3557.
- [20] I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman, H. Mattoussi, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 435–446.
- [21] W. C. W. Chan, D. J. Maxwell, X. H. Gao, R. E. Bailey, M. Y. Han, S. M. Nie, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 40–46.
- [22] R. C. Somers, M. G. Bawendi, D. G. Nocera, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 579–591.
- [23] S. R. Cordero, P. J. Carson, R. A. Estabrook, G. F. Strouse, S. K. Buratto, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 12137–12142.
- [24] H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12142–12150.
- [25] W. C. W. Chan, S. M. Nie, *Science* **1998**, *281*, 2016–2018.
- [26] D. Gerion, F. Pinaud, S. C. Williams, W. J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8861–8871.
- [27] M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, *281*, 2013–2016.
- [28] T. Pellegrino, L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A. L. Rogach, S. Keller, J. Raedler, G. Natile, W. J. Parak, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 703–707.
- [29] X. H. Gao, Y. Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung, S. M. Nie, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 969–976.
- [30] A. R. Clapp, I. L. Medintz, H. Mattoussi, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 47–57.
- [31] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4676–4704; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562–4588.
- [32] A. M. Smith, H. W. Duan, M. N. Rhyner, G. Ruan, S. M. Nie, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 3895–3903.
- [33] T. Pellegrino, S. Kudera, T. Liedl, A. M. Javier, L. Manna, W. J. Parak, *Small* **2005**, *1*, 48–63.
- [34] M. Baumle, D. Stamou, J. M. Segura, R. Hovius, H. Vogel, *Langmuir* **2004**, *20*, 3828–3831.
- [35] Y. G. Zheng, S. J. Gao, J. Y. Ying, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 376–380.
- [36] K. Palaniappan, C. H. Xue, G. Arumugam, S. A. Hackney, J. Liu, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 1275–1280.
- [37] D. M. Willard, L. L. Carillo, J. Jung, A. Van Orden, *Nano Lett.* **2001**, *1*, 469–474.

- [38] S. P. Wang, N. Mamedova, N. A. Kotov, W. Chen, J. Studer, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 817–822.
- [39] I. L. Medintz, A. R. Clapp, H. Mattoussi, E. R. Goldman, B. Fisher, J. M. Mauro, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 630–638.
- [40] H. T. Uyeda, I. L. Medintz, J. K. Jaiswal, S. M. Simon, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3870–3878.
- [41] W. Liu, M. Howarth, A. B. Greytak, Y. Zheng, D. G. Nocera, A. Y. Ting, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1274–1284.
- [42] F. Pinaud, D. King, H. P. Moore, S. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6115–6123.
- [43] G. Iyer, F. Pinaud, J. Tsay, S. Weiss, *Small* **2007**, *3*, 793–798.
- [44] Y. Liu, R. Brandon, M. Cate, X. Peng, R. Stony, M. Johnson, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8796–8802.
- [45] Y. C. Liu, M. Kim, Y. J. Wang, Y. A. Wang, X. G. Peng, *Langmuir* **2006**, *22*, 6341–6345.
- [46] W. W. Yu, E. Chang, J. C. Falkner, J. Y. Zhang, A. M. Al-Somali, C. M. Sayes, J. Johns, R. Drezek, V. L. Colvin, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2871–2879.
- [47] M. S. Nikolic, M. Krack, V. Aleksandrovic, A. Kornowski, S. Förster, H. Weller, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6727–6731; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6577–6580.
- [48] D. J. Zhou, J. D. Piper, C. Abell, D. Klenerman, D. J. Kang, L. M. Ying, *Chem. Commun.* **2005**, 4807–4809.
- [49] E. R. Goldman, E. D. Balighian, H. Mattoussi, M. K. Kuno, J. M. Mauro, P. T. Tran, G. P. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6378–6382.
- [50] Z. B. Lin, S. X. Cui, H. Zhang, Q. D. Chen, B. Yang, X. G. Su, J. H. Zhang, Q. H. Jin, *Anal. Biochem.* **2003**, *319*, 239–243.
- [51] S. Pathak, M. C. Davidson, G. A. Silva, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1839–1845.
- [52] E. R. Goldman, I. L. Medintz, A. Hayhurst, G. P. Anderson, J. M. Mauro, B. L. Iverson, G. Georgiou, H. Mattoussi, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *534*, 63–67.
- [53] U. L. Lao, A. Mulchandani, W. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14756–14757.
- [54] I. L. Medintz, A. R. Clapp, F. M. Brunel, T. Tiefenbrunn, H. T. Uyeda, E. L. Chang, J. R. Deschamps, P. E. Dawson, H. Mattoussi, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 581–589.
- [55] I. L. Medintz, L. Berti, T. Pons, A. F. Grimes, D. S. English, A. Alessandrini, P. Facci, H. Mattoussi, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1741–1748.
- [56] M. Miyake, H. Matsumoto, M. Nishizawa, T. Sakata, H. Mori, S. Kuwabata, H. Yoneyama, *Langmuir* **1997**, *13*, 742–746.
- [57] E. Granot, F. Patolsky, I. Willner, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 5875–5881.
- [58] P. J. Cameron, X. Zhong, W. Knoll, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 10313–10319.
- [59] R. Baron, C. H. Huang, D. M. Bassani, A. Onopriyenko, M. Zayats, I. Willner, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4078–4083; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4010–4015.
- [60] K. E. Sapsford, T. Pons, I. L. Medintz, H. Mattoussi, *Sensors* **2006**, *6*, 925–953.
- [61] J. M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 207–218.
- [62] J. M. Klostranec, W. C. W. Chan, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1953–1964.
- [63] C. J. Murphy, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 520A–526A.
- [64] M. Shingyoji, D. Gerion, D. Pinkel, J. W. Gray, F. Q. Chen, *Talanta* **2005**, *67*, 472–478.
- [65] A. Zajac, D. S. Song, W. Qian, T. Zhukov, *Colloids Surf. B* **2007**, *58*, 309–314.
- [66] E. R. Goldman, G. P. Anderson, P. T. Tran, H. Mattoussi, P. T. Charles, J. M. Mauro, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 841–847.
- [67] E. R. Goldman, A. R. Clapp, G. P. Anderson, H. T. Uyeda, J. M. Mauro, I. L. Medintz, H. Mattoussi, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 684–688.
- [68] L. J. Yang, Y. B. Li, *Analyst* **2006**, *131*, 394–401.
- [69] A. Hoshino, K. Fujioka, N. Manabe, S. Yamaya, Y. Goto, M. Yasuhara, K. Yamamoto, *Microbiol. Immunol.* **2005**, *49*, 461–470.
- [70] D. Gerion, F. Q. Chen, B. Kannan, A. H. Fu, W. J. Parak, D. J. Chen, A. Majumdar, A. P. Alivisatos, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4766–4772.
- [71] R. Q. Liang, W. Li, Y. Li, C. Y. Tan, J. X. Li, Y. X. Jin, K. C. Ruan, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e17.
- [72] R. Bakalova, Z. Zhelev, H. Ohba, Y. Baba, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11328–11335.
- [73] S. Pathak, S. K. Choi, N. Arnheim, M. E. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4103–4104.
- [74] Y. Xiao, P. E. Barker, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e28.
- [75] P. M. Chan, T. Yuen, F. Ruf, J. Gonzalez-Maeso, S. C. Sealoff, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e161.
- [76] S. M. Wu, X. Zha, Z. L. Zhang, H. Y. Xie, Z. Q. Tian, J. Peng, Z. X. Lu, D. W. Pang, Z. X. Xie, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 1062–1067.
- [77] P. S. Eastman, W. M. Ruan, M. Doctolero, R. Nuttall, G. De Feo, J. S. Park, J. S. F. Chu, P. Cooke, J. W. Gray, S. Li, F. Q. F. Chen, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1059–1064.
- [78] M. Y. Han, X. H. Gao, J. Z. Su, S. Nie, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 631–635.
- [79] J. M. Klostranec, Q. Xiang, G. A. Farca, J. A. Lee, A. Rhee, E. I. Lafferty, S. D. Perrault, K. C. Kain, W. C. W. Chan, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2812–2818.
- [80] A. Sukhanova, A. S. Susha, A. Bek, S. Mayilo, A. L. Rogach, J. Feldmann, V. Oleinikov, B. Reveil, B. Donvito, J. H. M. Cohen, I. Nabiev, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2322–2327.
- [81] I. Yildiz, M. Tomasulo, F. M. Raymo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11457–11460.
- [82] E. R. Goldman, I. L. Medintz, J. L. Whitley, A. Hayhurst, A. R. Clapp, H. T. Uyeda, J. R. Deschamps, M. E. Lassman, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6744–6751.
- [83] E. Oh, D. Lee, Y. P. Kim, S. Y. Cha, D. B. Oh, H. A. Kang, J. Kim, H. S. Kim, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 8127–8131; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7959–7963.
- [84] I. L. Medintz, A. R. Clapp, J. S. Melinger, J. R. Deschamps, H. Mattoussi, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2450–2455.
- [85] L. F. Shi, V. De Paoli, N. Rosenzweig, Z. Rosenzweig, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10378–10379.
- [86] E. Chang, J. S. Miller, J. T. Sun, W. W. Yu, V. L. Colvin, R. Drezek, J. L. West, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 1317–1321.
- [87] L. F. Shi, N. Rosenzweig, Z. Rosenzweig, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 208–214.
- [88] F. Patolsky, R. Gill, Y. Weizmann, T. Mokari, U. Banin, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13918–13919.
- [89] R. K. Moyzis, J. M. Buckingham, L. S. Cram, M. Dani, L. L. Deaven, M. D. Jones, J. Meyne, R. L. Ratliff, J. R. Wu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 6622–6626.
- [90] T. M. Bryan, T. R. Cech, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11*, 318–324.
- [91] N. W. Kim, M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. C. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich, J. W. Shay, *Science* **1994**, *266*, 2011–2015.
- [92] J. W. Shay, S. Bacchetti, *Eur. J. Cancer* **1997**, *33*, 787–791.
- [93] J. H. Kim, D. Morikis, M. Ozkan, *Sens. Actuators B* **2004**, *102*, 315–319.
- [94] J. H. Kim, S. Chaudhary, M. Ozkan, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 195105.
- [95] N. C. Cady, A. D. Strickland, C. A. Batt, *Mol. Cell. Probes* **2007**, *21*, 116–124.
- [96] R. Gill, I. Willner, I. Shweky, U. Banin, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23715–23719.

- [97] J. A. Hansen, J. Wang, A. N. Kawde, Y. Xiang, K. V. Gothelf, G. Collins, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2228–2229.
- [98] R. Polksy, R. Gill, L. Kaganovsky, I. Willner, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2268–2271.
- [99] V. Pavlov, Y. Xiao, B. Shlyahovsky, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11768–11769.
- [100] J. Liu, Y. Lu, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 96–100; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 90–94.
- [101] M. Levy, S. F. Cater, A. D. Ellington, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2163–2166.
- [102] J. H. Choi, K. H. Chen, M. S. Strano, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15584–15585.
- [103] J. W. Liu, J. H. Lee, Y. Lu, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4120–4125.
- [104] Z. Gueroui, A. Libchaber, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 166108.
- [105] S. Hohng, T. Ha, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 956–960.
- [106] Y. P. Ho, M. C. Kung, S. Yang, T. H. Wang, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1693–1697.
- [107] H. C. Yeh, Y. P. Ho, I. M. Shih, T. H. Wang, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e35.
- [108] A. Agrawal, C. Y. Zhang, T. Byassee, R. A. Tripp, S. M. Nie, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1061–1070.
- [109] C. Y. Zhang, H. C. Yeh, M. T. Kuroki, T. H. Wang, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 826–831.
- [110] T. Pons, I. L. Medintz, X. Wang, D. S. English, H. Matoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15324–15331.
- [111] C. Y. Zhang, L. W. Johnson, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3552–3555; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3482–3485.
- [112] C. Y. Zhang, L. W. Johnson, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7775–7781.
- [113] A. R. Clapp, I. L. Medintz, B. R. Fisher, G. P. Anderson, H. Matoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1242–1250.
- [114] N. Hildebrandt, L. J. Charbonnière, M. Beck, R. F. Ziessel, H.-G. Löhmannsröben, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7784–7788; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7612–7615.
- [115] L. J. Charbonnière, N. Hildebrandt, R. F. Ziessel, H.-G. Löhmannsröben, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12800–12809.
- [116] M. K. So, C. J. Xu, A. M. Loening, S. S. Gambhir, J. H. Rao, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 339–343.
- [117] H. Q. Yao, Y. Zhang, F. Xiao, Z. Y. Xia, J. H. Rao, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4424–4427; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4346–4349.
- [118] M. G. Sandros, D. Gao, D. E. Benson, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12198–12199.
- [119] B. P. Aryal, D. E. Benson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15986–15987.
- [120] R. Gill, R. Freeman, J. P. Xu, I. Willner, S. Winograd, I. Shweky, U. Banin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15376–15377.
- [121] R. Gill, L. Bahshi, R. Freeman, I. Willner, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1700–1703; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1676–1679.
- [122] A. Roda, P. Pasini, M. Guardigli, M. Baraldini, M. Musiani, M. Mirasoli, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 752–759.
- [123] W. Y. Lee, *Mikrochim. Acta* **1997**, *127*, 19–39.
- [124] F. Patolsky, Y. Weizmann, E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2474–2478; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2372–2376.
- [125] C. Dodeigne, L. Thunus, R. Lejeune, *Talanta* **2000**, *51*, 415–439.
- [126] V. Pavlov, Y. Xiao, R. Gill, A. Dishon, M. Kotler, I. Willner, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2152–2156.
- [127] Y. Weizmann, M. K. Beissenhirtz, Z. Cheglakov, R. Nowarski, M. Kotler, I. Willner, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7544–7548; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7384–7388.
- [128] J. Rodriguez-Viejo, K. F. Jensen, H. Matoussi, J. Michel, B. O. Dabbousi, M. G. Bawendi, *Appl. Phys. Lett.* **1997**, *70*, 2132–2134.
- [129] S. K. Poznyak, D. V. Talapin, E. V. Shevchenko, H. Weller, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 693–698.
- [130] N. Myung, Z. F. Ding, A. J. Bard, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 1315–1319.
- [131] G. Z. Zou, H. X. Ju, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6871–6876.
- [132] H. Y. Han, Z. G. Sheng, J. G. Liang, *Anal. Chim. Acta* **2007**, *596*, 73–78.
- [133] H. Jiang, H. X. Ju, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6690–6696.
- [134] H. Jiang, H. X. Ju, *Chem. Commun.* **2007**, 404–406.
- [135] X. Liu, H. Jiang, J. P. Lei, H. X. Ju, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8055–8060.
- [136] Y. X. Li, P. Yang, P. Wang, X. Huang, L. Wang, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 225602.
- [137] I. Willner, F. Patolsky, J. Wasserman, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1913–1916; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1861–1864.
- [138] R. Gill, F. Patolsky, E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4630–4633; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4554–4557.
- [139] R. Freeman, R. Gill, M. Beissenhirtz, I. Willner, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6*, 416–422.
- [140] E. Katz, M. Zayats, I. Willner, F. Lisdat, *Chem. Commun.* **2006**, 1395–1397.
- [141] V. Pardo-Yissar, E. Katz, J. Wasserman, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 622–623.
- [142] D. Porath, G. Cuniberti, R. Di Felice, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *237*, 183–227.
- [143] P. J. de Pablo, F. Moreno-Herrero, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, P. Herrero, A. M. Baro, P. Ordejon, J. M. Soler, E. Artacho, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 4992–4995.
- [144] I. Willner, *Science* **2002**, *298*, 2407–2408.
- [145] C. Stoll, S. Kudera, W. J. Parak, F. Lisdat, *Small* **2006**, *2*, 741–743.
- [146] H. B. Yildiz, R. Freeman, R. Gill, B. Willner, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2811–2816.
- [147] H. Wu, G. D. Liu, J. Wang, Y. H. Lin, *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 1573–1577.
- [148] G. Liu, Y. Y. Lin, J. Wang, H. Wu, C. M. Wai, Y. Lin, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7644–7653.
- [149] J. Wang, *Small* **2005**, *1*, 1036–1043.
- [150] A. Merkoci, M. Aldavert, S. Marin, S. Alegret, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 341–349.
- [151] A. Merkoci, *FEBS J.* **2007**, *274*, 310–316.
- [152] J. Wang, G. D. Liu, R. Polksy, A. Merkoci, *Electrochem. Commun.* **2002**, *4*, 722–726.
- [153] J. Wang, G. D. Liu, A. Merkoci, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3214–3215.
- [154] G. Liu, T. M. H. Lee, J. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 38–39.
- [155] G. D. Liu, J. Wang, J. Kim, M. R. Jan, G. E. Collins, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 7126–7130.
- [156] J. Wang, G. D. Liu, Q. Y. Zhu, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6218–6222.
- [157] R. Bakalova, H. Ohba, Z. Zhelev, M. Ishikawa, Y. Baba, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1360–1361.
- [158] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature* **1998**, *391*, 775–778.