

SERS-Marker für die Anregung mit rotem Laserlicht: Glasverkapselte SAMs auf Gold/Silber-Nanoschalen**

Bernd Küstner, Magdalena Gellner, Max Schütz, Friedrich Schöppler, Alexander Marx,
Philipp Ströbel, Patrick Adam, Carsten Schmuck und Sebastian Schlücker*

Die Wechselwirkung von funktionellen Nanomaterialien mit Biomolekülen ist ein zentrales Thema der Nanobiotechnologie.^[1] Detektion, Markierung und Sensorik von oder mit Biomolekülen sind nur wenige Anwendungsbeispiele.^[2] Die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS, surface-enhanced Raman scattering), eine hochempfindliche Raman-Technik für Moleküle, die sich in der Nähe von metallischen Nanostrukturen befinden, spielt dabei eine immer wichtigere Rolle.^[3] Eine SERS-Detektion bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber gängigen Markierungsmethoden (mit z.B. molekularen Fluorophoren), darunter ihre hohe Multiplexing-Kapazität. Das enorme Potenzial für eine parallele Detektion von zahlreichen Zielmolekülen mit SERS-Markern ergibt sich dabei aus der schmalen Linienbreite von Raman-Schwingungsbanden.^[4] Für die gleichzeitige Anregung der charakteristischen Spektren unterschiedlicher Raman-Marker benötigt man zudem nur eine einzige Laserlinie. Weitere wichtige Gesichtspunkte sind die Quantifizierung der Zielmolekülkonzentration und die äußerst hohe SERS-Empfindlichkeit, besonders die der oberflächenverstärkten Resonanz-Raman-Streuung (SERRS, surface-enhanced resonance Raman scattering).^[5]

Es gibt bereits einige Nanopartikelsonden zum selektiven Nachweis von Proteinen^[6] und Nucleinsäuren^[7] mit SERS oder SERRS. Bisherige Ansätze beruhen allerdings entweder auf einer vollständigen, selbstorganisierten Monolage (SAM)

an Raman-Markermolekülen auf der Oberfläche der Nanopartikel oder auf einer Submonolage von verkapselten Raman-Markern. Von einer verkapselten vollständigen SAM – d.h. einer Kombination beider Ansätze – wurde bislang noch nicht berichtet.

Das Aufbringen einer SAM auf die Nanopartikeloberfläche hat einige entscheidende Vorteile: So wird z.B. die Coadsorption störender Moleküle aus der Umgebung an die Partikeloberfläche verhindert oder zumindest verringert, wodurch eine Interferenz mit ungewünschten spektralen Beiträgen vermieden wird. Zusätzlich garantiert eine SAM die maximale Bedeckung der Nanopartikeloberfläche mit Raman-Markermolekülen, wodurch eine maximale SERS-Empfindlichkeit für den betreffenden Raman-Marker gegeben ist. Spektroskopisch gesehen führt die einheitliche Anordnung der Raman-Markermoleküle relativ zur Normalen der Nanopartikeloberfläche zu schmalen und reproduzierbaren Raman-Banden, die nur von wenigen Normalmoden herrühren (SERS-Auswahlregeln^[3a]). Diese Eigenschaften sind alle äußerst wichtig für das Multiplexing. Zwei Hauptnachteile dieses Konzeptes sind Partikelaggregation und Desorption der Raman-Markermoleküle von der Nanopartikeloberfläche, hervorgerufen durch den direkten Kontakt der SAM mit der Lösungsumgebung. Eine Verkapselung würde diese Nachteile aufheben oder wenigstens mindern sowie für chemische und mechanische Stabilität sorgen. Eine Schutzschicht kann aus unterschiedlichen Materialien wie Glas oder Polymeren (einschließlich Proteinen) hergestellt werden.^[1,2] Besonders Glas ist vielversprechend, weil es auch bei einer sehr langen Lagerzeit stabil bleibt. Frühere Entwürfe glasverkapselter SERS-Marker beruhten auf der Coadsorption von Raman-Markermolekülen zusammen mit Siliciumdioxid-Vorstufenmolekülen auf der Nanopartikeloberfläche, was zur Glasverkapselung von SERS-Markern mit Submonolagenbedeckung führte,^[8] allerdings resultiert bei dieser Anwendung sicherlich keine vollständige und dichtgepackte SAM mit den oben genannten Vorteilen.

Wir berichten hier über die erste Glasverkapselung einer vollständigen SAM auf einem metallischen Nanopartikel (Abbildung 1), welche die Vorteile von SAMs und Glashüllen in einer einzigen funktionellen Einheit kombiniert. Wir haben herausgefunden, dass durch die Verwendung einer SAM auf Gold/Silber-Nanoschalen, die für Anregung mit rotem Laserlicht in biomedizinischen Anwendungen optimiert sind, ca. 180-mal intensivere SERS-Signale als bei bisherigen Ansätzen mit einzelnen Goldnanopartikeln erzielt werden. SERS-Kartierungsexperimente, kombiniert mit Rasterelektronenmikroskopie (REM), zeigen reproduzierbare SERS-Signale auf einer Partikel-zu-Partikel-Basis. Darüber hinaus demon-

[*] B. Küstner, M. Gellner, M. Schütz, F. Schöppler, Prof. Dr. S. Schlücker
Institut für Physikalische Chemie, Universität Würzburg
Am Hubland, 97074 Würzburg (Deutschland)
E-Mail: sebastian.schluecker@uos.de

Prof. Dr. A. Marx, Prof. Dr. P. Ströbel
Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Mannheim
Theodor-Kutzer-Ufer 1–3, 68167 Mannheim (Deutschland)

Dr. P. Adam
Institut für Pathologie, Universität Würzburg
Josef-Schneider-Straße 2, 97080 Würzburg (Deutschland)

Prof. Dr. C. Schmuck
Institut für Organische Chemie, Universität Duisburg-Essen
Universitätsstraße 5, 45141 Essen (Deutschland)

[**] Wir danken für finanzielle Unterstützung durch die DFG (SCHL 594/4-1 und Heisenberg-Stipendium für S.S.), das BMBF (EXIST Seed; B.K., M.S. und S.S.), den Freistaat Bayern (FLÜGGE; M.G. und M.S.) und das IZKF Würzburg (A.M., P.S. und P.A.). Herzlichen Dank an Florian Baum, Oliver Breunig, Timo Hefner, Carina Jehn, Kristin Kröker, Nicolas Rühl und Sandra Sänze für technische Unterstützung. SERS: oberflächenverstärkte Raman-Streuung, SAM: selbstorganisierte Monolage.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200804518> zu finden.

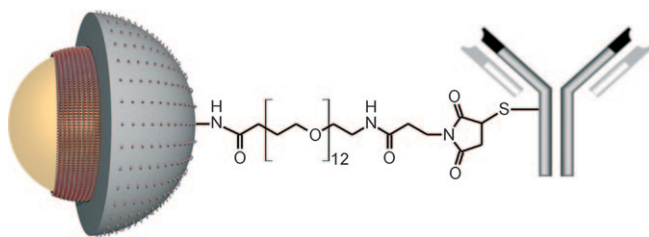


Abbildung 1. Glasverkapselte, biofunktionalisierte SERS-Marker. Links: Au/Ag-Nanopartikel mit einer SAM von Raman-Markermolekülen (rot) und einer schützenden Glashülle mit Aminogruppen (grau). Mitte: heterobifunktionaler Polyethylenglycol-Abstandhalter. Rechts: monoklonaler Antikörper zum Antigennachweis.

strieren wir die Anwendung dieses Konzeptes in der Immun-SERS-Mikroskopie^[9] anhand der selektiven Lokalisierung eines Zielproteins in einem Prostata-Gewebeschnitt.

Die hier präsentierten SERS-Marker (Abbildung 1) beruhen auf einzelnen kolloidalen Gold/Silber-Nanoschalen mit durchstimmbaren Plasmonenresonanzen im roten bis nah-infraroten Spektralbereich.^[10,11] Dies ist wichtig für biomedizinische und biologische SERS-Anwendungen, da die Autofluoreszenz von Zellen oder Geweben durch Anregung mit längerwelligem Laserlicht minimiert und somit das Signal/Hintergrund-Verhältnis erhöht werden kann; dies ist besonders wichtig für SERS-Anwendungen *in vivo*.^[12] Die Gold/Silber-Nanoschalen bilden das SERS-Substrat, das vollständig mit einer organischen SAM aus Raman-Markern bedeckt ist.^[9a,11b] Die äußerste Schale aus Glas hat nicht nur eine Schutzfunktion, sondern ermöglicht auch eine effektive Bio-konjugation.^[13] Verkapselung und Biokonjugation des Nanopartikels sind entscheidend für das Erreichen der gewünschten Selektivität, Empfindlichkeit und Stabilität.

Die Gold/Silber-Nanoschalen wurden gemäß den Vorschriften von Xia und Mitarbeitern hergestellt.^[10] Der durchschnittliche Durchmesser beträgt ca. 60 nm, die Dicke der Schale ca. 5 nm (Abbildung 2). Die Glasverkapselung, die zum Schutz der SAM und zur weiteren Biofunktionalisierung dient, wurde durch eine Polyelektrolyt-Beschichtung (Schicht-für-Schicht-Aufwachsen) und anschließendes Wachstum der Glashülle mit einer modifizierten Stöber-Methode^[14] erreicht. Bei der Polyelektrolyt-Methode wird die SAM zunächst mit Poly(allylamin-Hydrochlorid) und anschließend mit Polyvinylpyrrolidon beschichtet. Das Wachs-

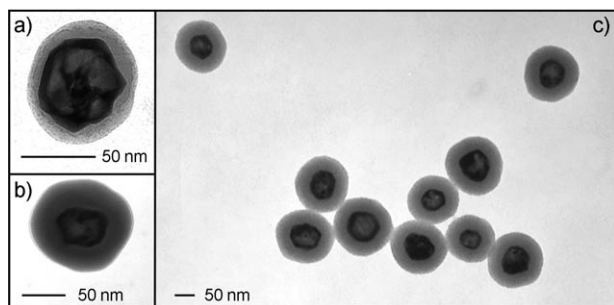


Abbildung 2. TEM-Aufnahmen von glasverkapselten SERS-Markern mit einer ca. 10 nm (a) und einer ca. 25 nm (b,c) dicken Glashülle. Der Durchmesser der Au/Ag-Nanoschalen beträgt ca. 60 nm.

tum der Glashülle wird mit einem Ammoniak/2-Propanol-Gemisch und in 2-Propanol gelöstem Tetraethylorthosilicat (TEOS) erreicht. Die TEM-Bilder der glasverkapselten Gold/Silber-Nanoschalen in Abbildung 2 belegen die hohe Reproduzierbarkeit dieser kombinierten Polyelektrolyt/Stöber-Methode. In Abbildung 2a sind die Gold/Silber-Nanoschalen mit einer ca. 10 nm dicken Glashülle beschichtet. Eine dickere Glashülle (ca. 25 nm) wird durch die Zugabe einer größeren Menge an TEOS erreicht (Abbildung 2b,c).

Um zu belegen, dass die Nanoschalen reproduzierbare SERS-Signale auf einer Partikel-zu-Partikel-Basis liefern, wurde ein kombiniertes REM/SERS-Experiment durchgeführt (Abbildung 3). Das REM-Bild (Abbildung 3a) zeigt,

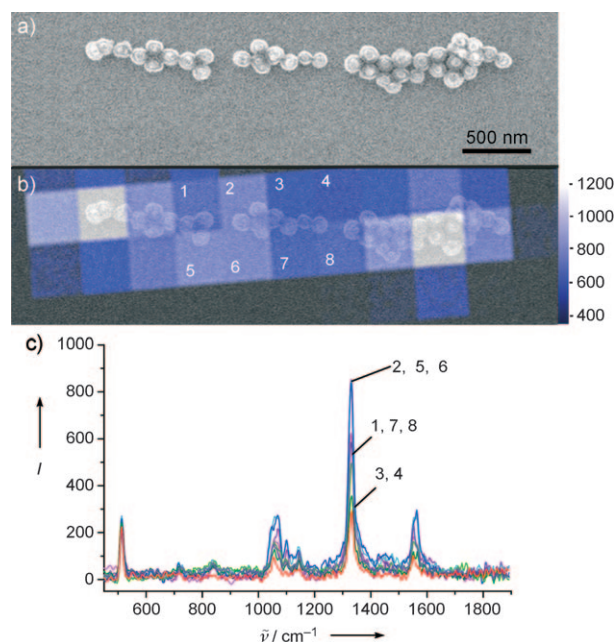


Abbildung 3. a) Rasterelektronenmikroskopie (REM)-Aufnahmen von glasverkapselten SERS-Markern auf einem Siliciumwafer. b) SERS-Falschfarbenbild, überlagert mit REM-Aufnahme. c) In den Quadraten 1–8 aufgenommene SERS-Spektren. Als Raman-Markermolekül wurde 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) verwendet.

dass die Mehrheit der Partikel aus Monomeren besteht und dass nur ein kleiner Teil an verkapselten Dimeren (15–16%) vorhanden ist. Das überlagerte SERS-Falschfarbenbild wurde in einem Raman-Kartierungsexperiment mit den gleichen Partikeln erhalten (Abbildung 3b). Die sehr hellen Pixel zeigen an, dass die wenigen Dimere eine hohe Signalintensität aufweisen. Die SERS-Spektren (Abbildung 3c) belegen, dass die SERS-Signale reproduzierbar sind. Als Raman-Markermolekül wurde 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) verwendet, das dominante SERS-Banden bei ca. 1340 (symmetrische NO_2 -Streckschwingung) sowie 1050 und 1550 cm^{-1} (Phenylringmoden) aufweist.

Das Vorhandensein einer SAM auf einem SERS-Substrat hat einige wichtige positive Auswirkungen. Ein Gesichtspunkt ist, wie viele Banden in den entsprechenden SERS-

Spektren beobachtet werden. Abbildung 4 zeigt einen Vergleich zwischen 4-Mercaptobenzoessäure (4-MBA) als SAM und Rhodamin 6G (R6G) auf Gold/Silber-Nanoschalen. Es

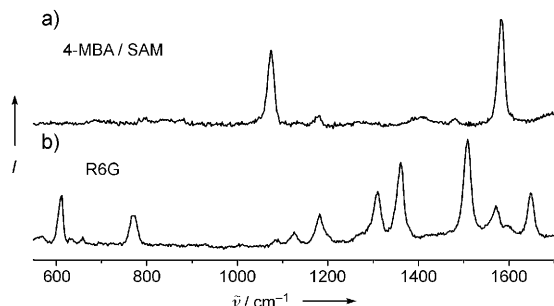


Abbildung 4. a) Im SERS-Spektrum von 4-Mercaptobenzoessäure, das als SAM auf den Au/Ag-Nanoschalen vorliegt, zeigen sich nur zwei dominante Raman-Banden. b) Das SERS-Spektrum von Rhodamin 6G weist deutlich mehr Banden auf. Beide Spektren wurden mit roter Laseranregung erhalten ($\lambda = 632.8$ nm).

ist offensichtlich, dass eine SAM von Vorteil für das Multiplexing ist: Das SERS-Spektrum von 4-MBA (Abbildung 4a) zeigt lediglich zwei dominante Raman-Banden bei 1082 und 1592 cm^{-1} , das R6G-Spektrum dagegen deutlich mehr Banden (Abbildung 4b).

Die Signalintensität der SERS-Marker ist ein weiterer wichtiger Aspekt; hier sind die Vorteile einer kompletten SAM offensichtlich: Sie gewährleistet die maximale Oberflächenbedeckung und damit die höchstmögliche Empfindlichkeit. Die signifikant höhere Empfindlichkeit einer vollständigen SAM verglichen mit einer Submonolage an Raman-Markern (beide auf dem gleichen SERS-Substrat) wird in Abbildung 5a verdeutlicht. Kolloidale Lösungen von Gold/Silber-Nanoschalen wurden mit a) 4-MBA und b) 1:9-Mischungen von MBA und 3-Mercapto-*n*-propyltrimethoxysilan (MPTMS) inkubiert (beide in Ethanol/PVP). Diese und andere Stöchiometrien (1:20) wurden in früheren Ansätzen zur Glasverkapselung der SERS-Marker verwendet, bei denen das MPTMS den Nanopartikel vitreophil macht.^[8] Die SERS-Signale des Raman-Markers (4-MBA) wurden auf eine der Raman-Banden des Lösungsmittels Ethanol bei 882 cm^{-1} normiert. Bei einer Bedeckung mit einer vollständigen Monolage waren die SERS-Signale 22 ± 5 -mal ($n = 3$ Messungen) höher als bei Bedeckung mit einer Submonolage (Abbildung 5a). Außer der maximalen Bedeckung der Oberfläche mit etwa 45000 Markermolekülen^[15] muss auch die Effizienz des SERS-Substrats für die Anregung mit rotem Laserlicht berücksichtigt werden (siehe Hintergrundinformationen).^[11b] Der Vergleich zwischen Gold/Silber-Nanoschalen und Gold-Vollkugeln als SERS-Substrate ist in Abbildung 5b gezeigt. In beiden Fällen wurde der gleiche Raman-Marker, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoessäure), verwendet. 60 nm große Gold/Silber-Schalen weisen ein 4.6 ± 0.7 -mal ($n = 4$) höheres Signal als Gold-Vollkugeln auf. Zur Entfernung von Dimeren wurden beide kolloidalen Lösungen gefiltert (Porengröße: 220 und 100 nm) und anschließend bei

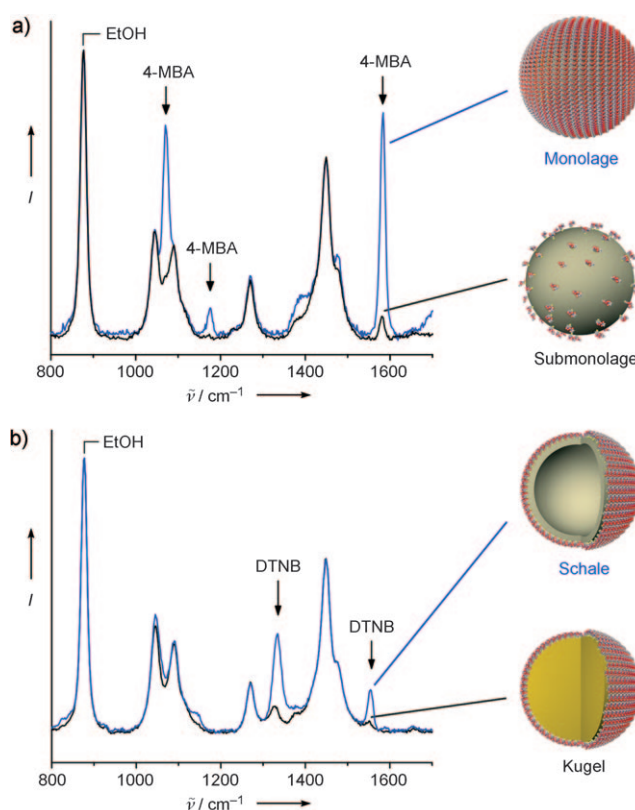


Abbildung 5. a) Einfluss der Oberflächenbedeckung auf die SERS-Intensität: vollständige SAM verglichen mit einer Submonolagenbedeckung an Raman-Markermolekülen. b) Einfluss des SERS-Substrats: Au/Ag-Nanoschalen verglichen mit Au-Vollkugeln für Anregung mit rotem Laserlicht.^[16]

gleicher optischer Dichte vermessen. In Anlehnung an Mie-Rechnungen ist der Extinktionskoeffizient der Gold/Silber-Schalen 1.7-mal größer als der von Gold-Vollkugeln (siehe Hintergrundinformationen). Dies entspricht einer 8-fachen Signalintensität bei gleicher Partikelkonzentration. Beide Parameter – Oberflächenbedeckung (SAM gegenüber Submonolage) und SERS-Effizienz des Substrates (Au/Ag-Schalen gegenüber Au-Vollkugeln) – führen zu einer insgesamt $176 = 22 \times 8$ -mal höheren Signalintensität als bei herkömmlichen SERS-Markern, die auf Gold-Vollkugeln mit Submonolagenbedeckung beruhen.^[8]

Die verbesserten SERS-Marker wurden in der SERS-Mikroskopie^[9] an Gewebeschnitten getestet. Dazu wurde das Prostata-spezifische Antigen als Zielprotein verwendet. Die entsprechenden Immun-SERS-Marker tragen ca. 225 Antikörper pro Nanopartikel (siehe Hintergrundinformationen). SERS-Mikroskopieexperimente unter Anregung mit rotem Laserlicht zeigen deutlich das spezifische Binden der SERS-markierten PSA-Antikörper im Epithel der Prostata, kombiniert mit intensiven Signalen bei minimaler Autofluoreszenz (siehe Hintergrundinformationen).

Experimentelles

Silbernitrat, Polyvinylpyrrolidon (PVP), Ethylenglycol, Tetrachlorgoldsäure (HAuCl_4), 5,5-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), 4-Mercaptobenzoessäure (4-MBA), Poly(allylamin-Hydrochlorid) (PAH), Tetraethylorthosilicat (TEOS), 3-Amino-*n*-propyltrimethoxysilan (APTMS), 3-Mercapto-*n*-propyltrimethoxysilan (MPTMS), 2-Propanol, Ethanol und Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) wurden bei Sigma/Aldrich/Fluka erworben. Succinimidyl[(*N*-maleimidopropionamido)(dodecaethylenglycol)]ester (heterobifunktionales Vernetzungsreagens) wurde von Pierce Biotechnology erworben. Monoklonales Maus-anti-Mensch-Prostata-spezifisches Antigen (PSA) wurde von Dako cytometry bezogen. In allen Reaktionsschritten wurde 18.2 MΩ Wasser (Millipore) verwendet.

Glasverkapselung von SAM-beschichteten SERS-Markern: Die Synthese der SERS-Marker ist in den Hintergrundinformationen beschrieben. Zur Entfernung überschüssiger Raman-Markermoleküle wurde die kolloidale SERS-Markerlösung zweimal zentrifugiert (40 min, 4000 Umin⁻¹) und in Wasser aufgenommen. Unter starkem Rühren wurde die Lösung zu einer wässrigen PAH-Lösung (2 g L⁻¹ PAH und 3.5 g L⁻¹ NaCl) gegeben und 15 min im Ultraschallbad behandelt. Die Lösung wurde 3 h gerührt und anschließend 40 min bei 4000 Umin⁻¹ zentrifugiert. Das Gold/Silber-Kolloid wurde in H₂O aufgenommen und tropfenweise zu einer wässrigen PVP-Lösung (4 g L⁻¹ PVP in H₂O) gegeben. Die Lösung wurde anschließend über Nacht gerührt. Die Polyelektrolyt-beschichtete Partikellösung wurde zweimal je 40 min lang bei 4000 Umin⁻¹ zentrifugiert und in einer Mischung aus Wasser und 2-Propanol aufgenommen. Ein Gemisch aus Ammoniak und 2-Propanol (4 Vol-% NH₃) wurde zugegeben. Unter starkem Rühren wurde TEOS (1 Vol-% TEOS in 2-Propanol) in sechs Schritten über 6 h hinzugefügt. Die Dicke der Glashülle kann durch die Menge an zugegebenem TEOS eingestellt werden. Ein ähnliches Verfahren wurde bei der Glasverkapselung von CTAB-stabilisierten (CTAB = Cetyltrimethylammoniumbromid) Goldstäbchen verwendet.^[17] Morphologie und Schichtdicke der glasverkapselten SERS-Marker wurden transmissionselektronenmikroskopisch (TEM) bestimmt (Abbildung 2).

Eingegangen am 13. September 2008

Online veröffentlicht am 4. Februar 2009

Stichwörter: Gewebediagnostik · Markierungen · Nanotechnologie · Raman-Spektroskopie · SERS-Mikroskopie

- [1] a) *Nanobiotechnology* (Hrsg.: C. M. Niemeyer, C. A. Mirkin), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**; b) (Hrsg.: C. A. Mirkin, C. M. Niemeyer), *Nanobiotechnology II*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [2] a) *New Frontiers in Ultrasensitive Bioanalysis* (Hrsg.: X.-H. N. Xu), Wiley, New York, **2007**; b) *Nanomaterials for Cancer Diagnosis* (Hrsg.: C. Kumar), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**; c) *Nanomaterials for Medical Diagnosis and Therapy* (Hrsg.: C. Kumar), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [3] a) R. Aroca, *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, Wiley, New York, **2006**; b) K. A. Willets, R. P. Van Duyne, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 267–297; c) D. A. Stuart, A. J. Haes, C. R. Yonzon, E. M. Hicks, R. P. Van Duyne, *IEE Proc. Nanobiotechnol.* **2005**, *152*, 13–32.
- [4] a) Y. C. Cao, R. Jin, C. A. Mirkin, *Science* **2002**, *297*, 1536–1540; b) D. Graham, B. J. Mallinder, D. Whitcombe, N. D. Watson, W. E. Smith, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1069–1074.
- [5] a) D. Graham, B. J. Mallinder, W. E. Smith, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1103–1105; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1061–1063; b) D. Graham, K. Faulds, W. E. Smith, *Chem. Commun.* **2006**, 4363–4371; c) K. Faulds, F. McKenzie, W. E. Smith, D. Graham, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1861–1863; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1829–1831.
- [6] a) J. Ni, R. J. Lipert, G. B. Dawson, M. D. Porter, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4903–4908; b) D. S. Grubisha, R. J. Lipert, H.-Y. Park, J. Driskell, M. D. Porter, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5936–5943; c) Y. C. Cao, R. Jin, J.-M. Nam, C. S. Thaxton, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14676–14677; d) X. Su, J. Zhang, L. Sun, T.-W. Koo, S. Chan, N. Sundararajan, M. Yamakawa, A. A. Berlin, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 49–54; e) J.-H. Kim, J.-S. Kim, H. Choi, S.-M. Lee, B.-H. Jun, K.-N. Yu, E. Kuk, Y.-K. Kim, D. H. Jeong, M.-H. Cho, Y.-S. Lee, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6967–6973.
- [7] a) D. Graham, B. J. Mallinder, W. E. Smith, *Biopolymers* **2000**, *57*, 85–91; b) Y. C. Cao, R. Jin, C. A. Mirkin, *Science* **2002**, *297*, 1536–1540; c) R. Jin, Y. C. Cao, C. S. Thaxton, C. A. Mirkin, *Small* **2006**, *2*, 375–380.
- [8] a) S. P. Mulvaney, M. D. Musick, C. D. Keating, M. J. Natan, *Langmuir* **2003**, *19*, 4784–4790; b) W. E. Doering, S. Nie, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6171–6176; c) W. E. Doering, M. E. Piotti, M. J. Natan, R. G. Freeman, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 3100–3108.
- [9] a) S. Schlücker, B. Küstner, A. Punge, R. Bonfig, A. Marx, P. Ströbel, *J. Raman Spectrosc.* **2006**, *37*, 719–721; b) L. Sun, K.-B. Sung, C. Dentinger, B. Lutz, L. Nguyen, J. Zhang, H. Qin, M. Yamakawa, M. Cao, Y. Lu, A. J. Chmura, J. Zhu, X. Su, A. A. Berlin, S. Chan, B. Knudsen, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 351–356.
- [10] a) Y. G. Sun, B. T. Mayers, Y. N. Xia, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 481–485; b) Y. Sun, Y. Xia, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5297–5305.
- [11] a) J. B. Jackson, N. J. Halas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17930–17935; b) M. Gellner, B. Küstner, S. Schlücker, *Vib. Spectrosc.* **2008**, DOI: 10.1016/j.vibspec.2008.07.011.
- [12] a) X. Qian, X.-H. Peng, D. O. Ansari, Q. Yin-Goen, G. Z. Chen, D. M. Shin, L. Yang, A. N. Young, M. D. Wang, S. Nie, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 83–90; b) S. Keren, C. Zavaleta, Z. Cheng, A. de la Zerda, O. Gheysens, S. S. Gambhir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 5844–5849.
- [13] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, **2008**.
- [14] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69.
- [15] Diese Zahl wurde für 60 nm große Partikel unter Verwendung von Daten aus rastertunnelmikroskopischen Untersuchungen auf SAMs (0.26 nm² pro Molekül) errechnet: A. H. Schäfer, C. Seidel, L. Chi, H. Fuchs, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 839–842.
- [16] Die Konzentration des Kolloids mit Submonolagenbedeckung ist doppelt so groß wie die mit Monolagenbedeckung (a); die Konzentration der Au-Nanokugeln ist 1.7-mal höher als die von Au/Ag-Nanoschalen, während die optische Dichte gleich ist (b).
- [17] I. Pastoriza-Santos, J. Perez-Juste, L. M. Liz-Marzan, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 2465–2467.