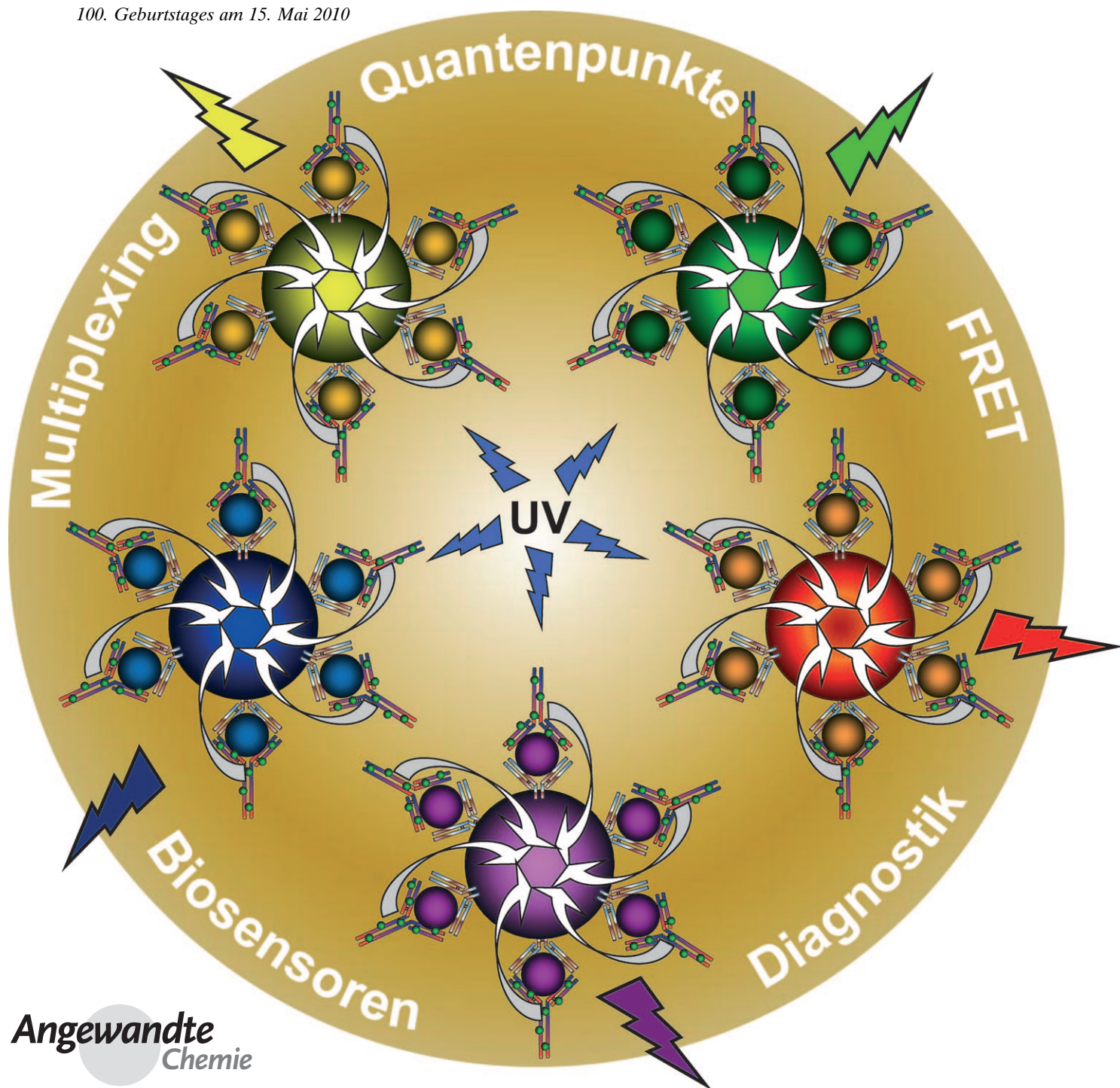


Quantenpunkt-Biosensoren für hochempfindliche Multiplexdiagnostik**

Daniel Geißler, Loïc J. Charbonnière, Raymond F. Ziessel, Nathaniel G. Butlin, Hans-Gerd Löhmannsröben und Niko Hildebrandt*

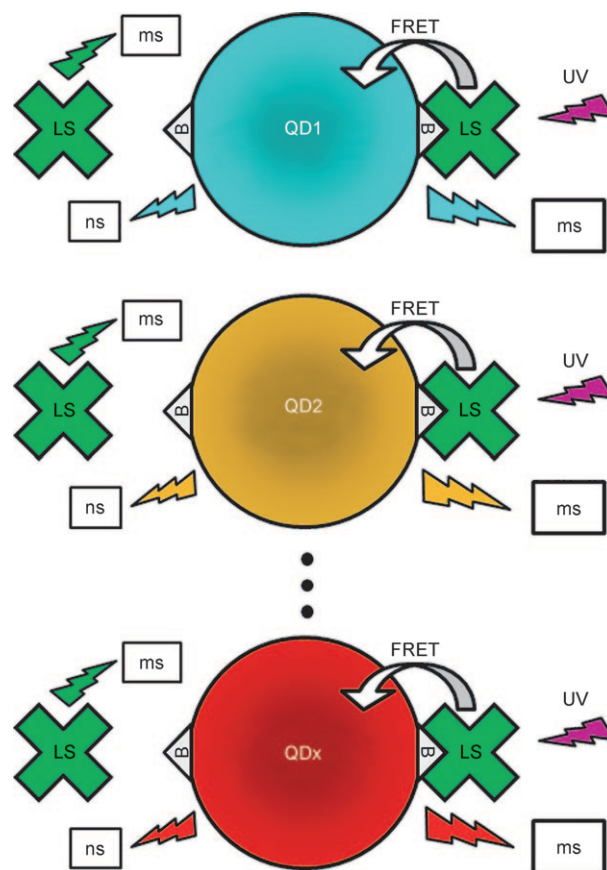
In memoriam Theodor Förster anlässlich seines
100. Geburtstages am 15. Mai 2010



Angewandte
Chemie

Nanobiosensoren sind zu einem schnell wachsenden Feld der Diagnostik geworden.^[1–8] Zwar ist der In-vitro-Diagnostikmarkt mit jährlichen Wachstumsraten von ca. 10 %^[9] eines der größten Segmente für die Gesundheitsversorgungsindustrie, allerdings finden die spezialisierten Techniken, z.B. die patientennahe Diagnostik (point-of-care testing) und das so genannte Multiplexing, weiterhin enormes Interesse.^[10] In-vitro-Diagnostiktests, die auf Multiplexdetektion basieren, werden jährliche Wachstumsraten von 26 % in den kommenden Jahren vorausgesagt.^[11] Multiplexdiagnostik ermöglicht die simultane Messung mehrerer klinischer Parameter in ein und der selben Probe, was kürzere Analysezeiten und geringere Kosten pro Datenpunkt zur Folge hat. Der Wunsch nach Multiplexdiagnostik resultiert auch aus der Entdeckung immer neuer Biomarker (z.B. für die Alzheimer-Krankheit)^[12] für höhere Selektivität und Empfindlichkeit.

Hier präsentieren wir ein homogenes Testformat, das sehr hohe Empfindlichkeit mit Multiplexdetektion kombiniert und somit große Vorteile gegenüber herkömmlichen diagnostischen Tests bietet. Unser System (Schema 1) basiert auf FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) von lumineszierenden Terbiumkomplexen (luminescent terbium complexes, LTCs) auf verschiedene Halbleiterquantenpunkte (quantum dots, QDs), hervorgerufen durch die molekulare Erkennung zwischen Streptavidin (sAv) und Biotin (Biot). Dieses biologische Bindungssystem wurde ausgewählt, um eine Konzepttauglichkeit für den Multiplex-FRET-Test zu demonstrieren, denn es ist auf echte diagnostische Tests, z. B. RNA-, DNA-, Aptamer-, Peptid- oder Protein-basierte biologische Erkennung, übertragbar. Ein kompetitiver Immunassay für den Einzelanalyten Östradiol mithilfe eines FRET von Europium auf QDs wurde bereits demonstriert.^[13] Um die Nachweisgrenzen (limits of detection, LODs) bezüglich der In-vitro-Diagnostik bewerten zu können, haben wir unser System mit dem etablierten und hochempfindlichen Immunassay-FRET-Paar aus Tris(bipyridin)/Eu³⁺ (EuTBP) und Allophycocyanin (APC)^[14,15] verglichen, das in vielen hoch-



Schema 1. Prinzip des Multiplex-FRET-Tests. LTC-markiertes Streptavidin (LS) bindet an biotinylierte (B) QDs, was zu einer räumlichen Nähe zwischen LTCs und QDs führt und somit FRET ermöglicht. Vor der Bindung (linke Seite) führt UV-Anregung zu LTC- und QD-Lumineszenz mit ms- bzw. ns-Abklingzeiten. Nach der Bindung (rechte Seite) wird Energie von LTCs auf QDs übertragen, was Lumineszenzlöschung der LTCs und das Auftreten einer langlebigen QD-Lumineszenz mit ms-Abklingzeiten zur Folge hat. Durch das Ausblenden der Detektion kurzer Zeiten (time-gating) wird die ns-Lumineszenz unterdrückt, und die ms-Lumineszenzintensitäten bei verschiedenen Emissionswellenlängen können direkt zur Messung der Konzentration der unterschiedlichen FRET-Komplexe (LS-QD1 bis sAv-QDx) verwendet werden.

empfindlichen diagnostischen Immunassays und Drogentests für den Einzelanalytnachweis verwendet wird.^[16,17]

QDs haben außergewöhnliche chemische und physikalische Eigenschaften, die heutzutage weitestgehend bekannt sind.^[18,19] Außerdem werden QDs häufig in den verschiedensten Anwendungen der Lebenswissenschaften eingesetzt.^[1–8,20–24] Ihre größenabhängigen Absorptions- und Emissionswellenlängen sowie die schmalen und symmetrischen Emissionsbanden machen QDs zu idealen Kandidaten für optisches Multiplexing. Zwar wurden sie in biologischen Tests als FRET-Donoren mit verschiedenen organischen Farbstoffen als Akzeptoren genutzt,^[25–29] allerdings wurde auch gezeigt, dass sie ineffiziente FRET-Akzeptoren mit herkömmlichen organischen Fluorophoren als Donoren sind.^[30] Um QDs als effiziente FRET-Akzeptoren zu nutzen, benötigt man Lanthanoid-Donoren mit langen Lebenszeiten

[*] Dr. N. Hildebrandt
NanoPolyPhotonik
Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung
Geiselbergstraße 69, 14476 Potsdam-Golm (Deutschland)
E-Mail: niko.hildebrandt@iap.fraunhofer.de

D. Geißler, Prof. Dr. H.-G. Löhmannsröben
Physikalische Chemie, Universität Potsdam (Deutschland)

Dr. L. J. Charbonnière
Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire Analytique
ECPM, Strasbourg (Frankreich)

Dr. R. F. Ziessel
Laboratoire de Chimie Organique et Spectroscopie Avancée
ECPM, Strasbourg (Frankreich)

Dr. N. G. Butlin
Lumiphore Inc., Richmond (USA)

[**] Wir danken der Europäischen Kommission für finanzielle Unterstützung (Specific Targeted Research Project POC4Life-LSHB-CT-2007-037933) und Cezanne SA (Nîmes, Frankreich) für fruchtbare Kooperation und Diskussionen sowie technische Unterstützung bezüglich des KRYPTOR-Laboranalysensystems.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200906399> zu finden.

(bis zu Millisekunden) der angeregten Zustände.^[31–34] Die einzigen anderen Alternativen sind Biolumineszenz(BRET)-oder Chemilumineszenz(CRET)-Resonanzenergietransfer ohne externe Lichtanregung.^[35–37]

Die Kombination von QD-Akzeptoren mit LTC-Donoren in zeitaufgelöstem FRET bringt signifikante Vorteile bezüglich Empfindlichkeit, Abstand und Multiplexdetektion gegenüber anderen Donor-Akzeptor-Paaren mit sich.^[31] Die langlebige (Millisekunden-)Terbiumlumineszenz der LTCs ermöglicht das Ausblenden der Detektion kurzer Zeiten, was zu einer fast vollständigen Unterdrückung der kurzlebigen Autofluoreszenz der biologischen Probe sowie der Fluoreszenz direkt angeregter QDs führt. Wegen der hohen Überlappintegralwerte können außergewöhnlich große Förster-Radien (R_0 , der Donor-Akzeptor-Abstand, bei dem die FRET-Effizienz 50 % beträgt) bis zu 11 nm erreicht werden, wogegen herkömmliche Donor-Akzeptor-Paare nur wesentlich kleinere R_0 -Werte erreichen (selten mehr als 6 nm).^[38] Durch die Auswahl von QDs mit Emissionswellenlängen zwischen oder jenseits der gut getrennten LTC-Lumineszenzbanden wird Multiplex-FRET von einem LTC zu vielen QDs vom grünen bis zum NIR-Spektralbereich ermöglicht.

Als vergleichender Ansatz wurden zwei verschiedene LTCs als Energiedonoren verwendet. „TbL“ basiert auf einem Glutamatgerüst, das mit zwei chromophoren Einheiten aus anionischem Bipyridyl N-funktionalisiert ist^[39] und in unseren Laboratorien synthetisiert wurde. TbL wurde mit „Lumi4Tb“ verglichen, das auf einer Isophthalamidstruktur basiert^[40,41] und kommerziell erhältlich ist (Lumiphore Inc., USA). Die LTCs wurden an sAv gebunden (LTC-sAv), mit Bindungsraten von 11.5 TbL per sAv und 4.4 Lumi4Tb per sAv. Lumineszenzabklingzeiten waren (1.6 ± 0.2) ms für TbL-sAv und (2.3 ± 0.1) ms für Lumi4Tb-sAv. Die LTC-Absorptions- und Emissionsspektren (Abbildung 1 in den Hintergrundinformationen) liegen etwa 100 nm auseinander, was eine einfache Unterscheidung zwischen Anregungs- und Emissionsstrahlung ermöglicht.

Die in unserer Studie verwendeten fünf verschiedenen QDs waren kommerziell erhältliche QDots (Invitrogen, USA) mit Emissionsmaxima bei 529, 565, 604, 653 oder 712 nm. Die QDs wurden wegen ihrer hohen Extinktionskoeffizienten über einen breiten Wellenlängenbereich (was zu gutem spektralem Überlapp mit den LTCs führt; Abbildung 2 in den Hintergrundinformationen) und wegen ihrer in die Emissionslücken der LTC Spektren passenden Emissionswellenlängen (Abbildung 3 in den Hintergrundinformationen) ausgewählt. Weiterhin ermöglichen die schmalen und symmetrischen Emissionsbanden der QDs und die Auswahl geeigneter Bandpassfilter ein Multiplexdetektionssystem mit geringem spektroskopischem Übersprechen (crosstalk) zwischen den einzelnen Detektionskanälen. Die Formen der CdSe/ZnS-Kern-Schale-QDs (CdSeTe/ZnS bei QD712) reichen von Kugeln mit 3 nm Durchmesser (QD529) bis zu Ellipsoiden mit 6 und 12 nm langen Achsen (QD712). Jeder QD ist polymerbeschichtet und hat 5–7 Biotin-Einheiten an seiner Oberfläche. Die Größen der Biot-QDs reichen von 12 (Biot-QD529) bis 18.5 nm (Biot-QD712) hydrodynamischem Durchmesser (alle Daten in Tabelle 1 in den Hintergrundinformationen).

Zur Visualisierung der Multiplexdetektion von fünf LTC-QD-FRET-Systemen wurde eine Biot-QD-Mischung in kleinen Aliquoten zu einer LTC-sAv-Stammlösung gegeben, und die Emissionsspektren wurden in bestimmten Zeitfenstern (Time-Gating-Detektion) aufgenommen. Das Auftreten von langlebigen QD-Emissionsbanden ist ein deutlicher Hinweis auf Multiplex-FRET vom LTC-Donor auf alle fünf QD-Akzeptoren. Abbildung 1 zeigt die mit steigendem Biot-QD/Lumi4Tb-sAv-Konzentrationsverhältnis aus dem Lumi4Tb-Emissionsspektrum herauswachsenden QD-FRET-Emissionsbanden. Wie aus dem vergrößerten interessanten Bereich ersichtlich wird, stammen diese ansteigenden Signale von langlebiger FRET-sensibilisierter QD-Emission, was den Fünffach-Multiplex-FRET von Lumi4Tb auf QDs im beschriebenen System bestätigt.

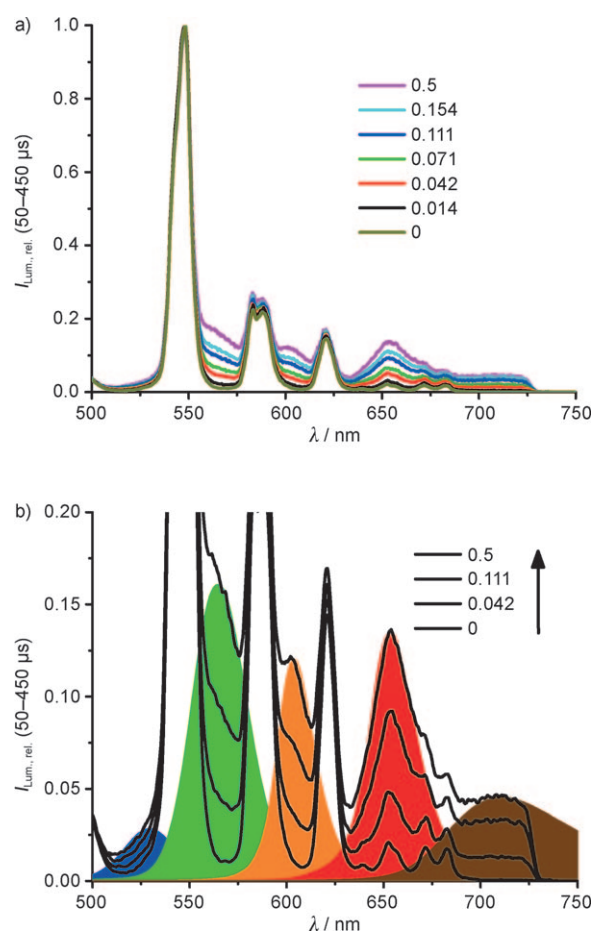


Abbildung 1. a) Zeitaufgelöste Emissionsspektren bei steigenden Konzentrationsverhältnissen von Biot-QD per Lumi4Tb-sAv. Hintergrundautofluoreszenz der biologischen Proben und QD-Emission durch direkte Laseranregung wurden durch die Messung in einem Zeitfenster von 50–450 µs effizient unterdrückt. Die Spektren sind auf das 545-nm-Emissionsmaximum von Lumi4Tb normalisiert. b) Vergrößerter interessanter Bereich mit einer Überlagerung der stationären Emissionsspektren von QD529 (blau), QD565 (grün), QD604 (orange), QD653 (rot) und QD712 (braun). Die mit dem Biot-QD/Lumi4Tb-sAv-Verhältnis steigenden Intensitäten der QD-Emissionsbanden im genannten Zeitfenster stammen von simultanem FRET von Lumi4Tb auf alle fünf QDs. Die Ergebnisse für TbL sind sehr ähnlich und befinden sich in Abbildung 4 der Hintergrundinformationen.

Zur Durchführung der hochempfindlichen Multiplexdetektion aller fünf FRET-Systeme innerhalb einer Probe wurden die zeitverzögerten Lumineszenzintensitäten der LTC-Donoren, $I(D)$, und der QD Akzeptoren, $I(A)$, für steigende Biot-QD/LTC-sAv-Konzentrationsverhältnisse aufgenommen. Abbildung 2 zeigt die Lumineszenzintensi-

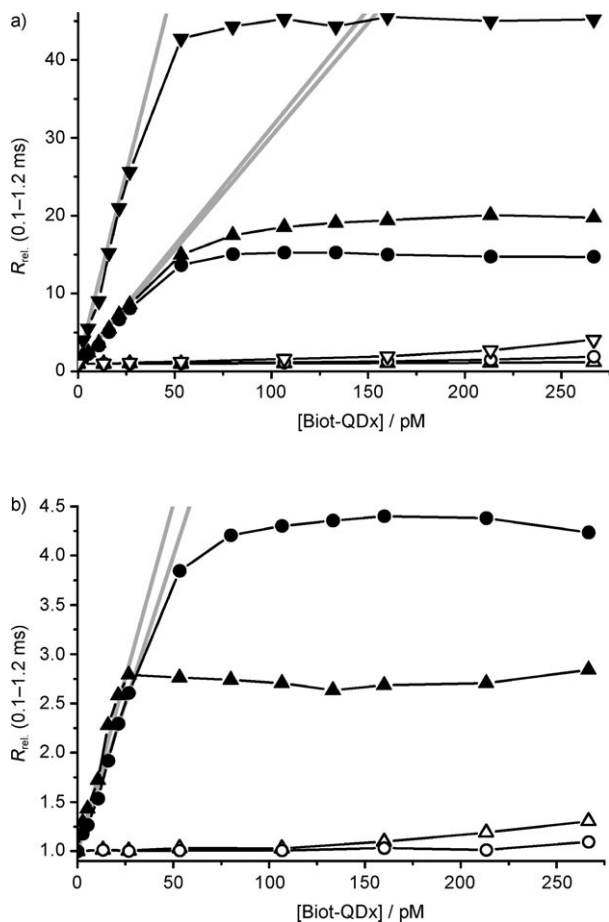


Abbildung 2. Relative Lumineszenzintensitäts-Verhältnisse (zum besseren Vergleich bei $[Biot-QDx]=0$ auf 1 normiert) von QD(FRET-Akzeptor)- und Lumi4Tb(FRET-Donor)-Lumineszenz über der Biot-QDx-Konzentration für a) $x=712$ (▼), $x=565$ (▲) und $x=653$ (●) sowie b) $x=604$ (●) und $x=529$ (▲). Die gefüllten Symbole repräsentieren die FRET-Experimente, in denen die QDs durch Lumi4Tb FRET-sensibilisiert wurden, was aus der Lumi4Tb-sAv-Biot-QD-Bindung resultiert (steigender R -Wert über der Konzentration bis zu einem bestimmten R -Niveau, an dem die Bindung gesättigt ist). Die leeren Symbole sind Kontrollexperimente mit Biot-QDx und nicht konjugiertem (freiem) Lumi4Tb, in denen keine Bindung und somit auch kein FRET auftreten kann (der geringe Anstieg bei hohen QD-Konzentrationen entsteht durch starke, kurzlebige Lumineszenz direkt angeregter QDs, die nach 0.1 ms immer noch messbar ist). Der Anstieg von R erreicht bei etwa 60 pM Biot-QDx (außer bei Biot-QD529 wegen der schwachen Lumineszenzsignale) einen Maximalwert. Hier beträgt die gesamte Biot-QD-Konzentration 300 pM (wegen der fünf verschiedenen Biot-QDx) und die Lumi4Tb-sAv Konzentration ca. 1800 pM, was zu Biokonjugaten mit sechs Lumi4Tb-sAv per Biot-QDx führt. Dieser Wert stimmt mit dem Bindungsverhältnis von fünf bis sieben Biotineinheiten per QD (wie von Invitrogen spezifiziert) gut überein und zeigt die Sättigung der Biot-QDs mit Lumi4Tb-sAv. Ergebnisse für TbL befinden sich in Abbildung 6 der Hintergrundinformationen.

täts-Verhältnisse ($R=I(A)/I(D)$) in Abhängigkeit von der Biot-QD-Konzentration für Lumi4Tb-sAv und nicht konjugiertes (freies) Lumi4Tb als Nichtbindungskontrolle. Bereits nach der Zugabe von winzigen Mengen der Biot-QD-Mischung zu den LTC-sAv-Stammlösungen steigt die FRET-sensibilisierte QD-Lumineszenzintensität signifikant an, wogegen die LTC-Lumineszenzintensitäten fallen (siehe Abbildung 5 der Hintergrundinformationen für Lumineszenz-abklingkurven), was zu einer Erhöhung des R -Werts für alle fünf FRET-Systeme führt (Abbildung 2). Die sehr hohe Empfindlichkeit der Multiplexdetektion wird durch die sub-pikomolaren LODs für alle fünf FRET-Systeme unterstrichen (Tabelle 1, 1. Reihe).

Messungen der LTC-sAv-Biot-QD-Einzelttests unter denselben Bedingungen führen zu sehr ähnlichen Ergebnissen (Tabelle 1, 2. Reihe), was das geringe spektroskopische Übersprechen unserer Technik verdeutlicht. Dieser große Vorteil resultiert aus den schmalen und symmetrischen Wellenlängenbandbreiten der QDs, den gut getrennten Emissionsbanden der LTCs und der Auswahl adäquater Filter. Für alle Messungen wurden Kontrollexperimente mit LTCs ohne sAv durchgeführt, um potenzielle Signale durch dynamischen FRET oder Lumineszenz von direkt angeregten QDs auszuschließen.

Um die LODs unseres hochaffinen sAv-Biot-Systems mit echten diagnostischen Anwendungen wie Immunassays (die Antigen-Antikörper-Bindungen mit deutlich geringeren Affinitäten verwenden) zu vergleichen, muss eine gut etablierte Referenz zum Vergleich verwendet werden. Aus diesem Grund haben wir die gleichen Experimente (sAv-Biot-Bindung) mit dem FRET-Paar EuTbP-APC (siehe oben) durchgeführt, das eine äußerst hohe Empfindlichkeit für viele wissenschaftliche Anwendungen und kommerzielle Diagnostiktests bietet.^[14–17] Selbst die experimentellen Parameter der FRET-Paare sind sehr ähnlich: Der EuTbP-Donor ist ebenfalls ein Lanthanoidkomplex (4.1 EuTbP per sAv), und der APC-Akzeptor (10–15 Biot per APC) ist ebenfalls relativ groß (scheibenförmiges 105-kDa-Phycobiliprotein mit ca. 3 nm Dicke und 10–13 nm Durchmesser).^[42,43] Der sAv-Biot-Assay dieses einzelnen FRET-Paares resultierte in einer LOD von (24 ± 12) pM.^[32] Die sub-pikomolaren LODs aller verschiedenen FRET-Paare innerhalb des Multiplexexperiments (und der Einzeltests) sind signifikant niedriger (Tabelle 1, 3. Reihe). Daraus folgt, dass unser LTC-QD-Multiplextest nicht nur eine simultane Detektion von bis zu fünf Bioanalyten ermöglicht, sondern auch eine 40–240-mal höhere Empfindlichkeit als ein gut etabliertes homogenes Immunassay-FRET-Paar bietet und deshalb ein großes Potenzial für echte Diagnostikanwendungen hat.

Zusammenfassend haben wir eine neue und schnelle Technik für die hochempfindliche Multiplexdetektion entwickelt. Die Multiplextechnik eröffnet die deutlichen Vorteile der simultanen Messung verschiedener Biokomplexe bei äußerst hoher Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Geschwindigkeit. Eines der Hauptziele zukünftiger QD-Techniken sollte die Entwicklung stabiler und reproduzierbarer QDs mit einer effizienten, robusten und stabilen Antikörperkopplungschemie zur Ermöglichung echter Immunassays sein. Die Entwicklung effizienter QD-Sensoren spielt eine

Tabelle 1: Aus dem linearen Teil der Assay-Kalibrationskurven (graue Linien in Abbildung 2) ermittelte LODs, die aus dem Nullstandardwert (R bei $[\text{Biot-QD}] = 0$) plus dreimal der Nullstandardabweichung aus 40 Messungen berechnet werden.

Biot-QD	529	565	604	653	712
$\text{LOD}_M^{[a]}$ [pM]	0.63 ± 0.15	0.12 ± 0.03	0.37 ± 0.16	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.04
$\text{LOD}_S^{[b]}$ [pM]	0.95 ± 0.3	0.17 ± 0.03	0.32 ± 0.12	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.02
$\text{SVF}^{[c]}$	38 ± 28	200 ± 150	65 ± 60	240 ± 168	200 ± 167

[a] Multiplex. [b] Einzeltests. [c] $\text{SVF}(\text{Empfindlichkeits-Verbesserungsfaktor}) = \text{LOD}(\text{st})/\text{LOD}_M$, wobei $\text{LOD}(\text{st})$ die LOD von EuTBP-sAv-Biot-APC ((24 ± 12) pM) als Standardreferenz ist. Hohe Fehlerwerte ergeben sich aus der Summierung der beiden relativen LOD-Fehler.

wertsbreite) mit einer maximalen Transmission nahe am Emissionsmaximum der QD-Akzeptoren (zwischen den LTC-Emissionsbanden) und am 545-nm-Emissionsmaximum der LTC-Donoren (siehe Abbildung 3 in den Hintergrundinformationen) erreicht. Zur Unterdrückung von Proben- oder Messungenauigkeiten und zur Korrektur der abnehmenden LTC-Konzentrationen bei Zugabe der QD-Mischung wurde eine ratiometrische Messung (Intensitätsverhältnis $R = I(A)/I(D)$) durchgeführt.

wichtige Rolle für die Bionanotechnologie, und wir glauben, dass unsere hochempfindliche Multiplex-FRET-Methode einen signifikanten Beitrag zu RNA-, DNA-, Aptamer-, Peptid- und Protein-basierten Sensoranwendungen in der Biologie, Chemie, Medizin und Physik leisten wird.

Experimentelles

TbL wurde synthetisch an freie Lysine des sAv gekoppelt.^[33] Das TbL/sAv-Verhältnis betrug 11.5:1. Lumi4Tb wurde von Lumiphore in der bereits gekoppelten Version geliefert (Lumi4Tb/sAv 4.4:1). Lumineszenzabklingkurven wurden in 50 mM Boratpuffer (pH 8.3) mit 2 % Rinderserumalbumin (BSA) und 0.5 M KF aufgenommen. KF verbessert die Leistung von TbL, da es koordiniertes Wasser verdrängt, das die Lumineszenz effektiv löscht. Obwohl KF nicht für Lumi4Tb benötigt wird, wurde es im Puffer beibehalten, um gleiche experimentelle Bedingungen zu gewährleisten. Die Größen der CdSe/ZnS- und CdSeTe/ZnS-Kern-Schale-Quantenpunkte wurden von Invitrogen mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und die hydrodynamischen Durchmesser der Biot-QDs mit Größenaus-schlusschromatographie an HPLC bestimmt. Alle Proben wurden mit einem gepulsten Nd:YAG-OPO-Lasersystem (OPO: GWU, Deutschland; Laser: Spectra Physics, USA) mit 20 Hz Wiederholrate und Pulsenergien von 10 μJ bei 320 nm angeregt. Diese Anregungswellenlänge wurde gewählt, um gleiche Extinktionskoeffizienten für TbL-sAv und Lumi4Tb-sAv zu erzielen ($16500 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Fünffach-Multiplexing wurde an einem Spektrographen mit ICCD-Kamera-Detektion (LOT-Oriel, Deutschland) gemessen. Die Messungen wurden nach 1 h Inkubationszeit bei Raumtemperatur durchgeführt. Zeitverzögerte (50–450 μs) Lumineszenzspektren (500–725 nm) der LTC-Donoren und der fünf QD-Akzeptoren wurden simultan gemessen. Eine Biot-QD-Mischung (mit 3 nM Biot-QD529, 2 nM Biot-QD565, 1 nM Biot-QD604, 1 nM Biot-QD653 und 3 nM Biot-QD712 in Boratpuffer) wurde in kleinen Aliquoten zu einer Lösung von 10 nM LTC-sAv gegeben. QD-Konzentrationen wurden variiert, um Unterschiede im spektralen Überlapp und in der Lumineszenzquantenausbeute zu normalisieren, sodass sich vergleichbare Lumineszenzintensitäten für alle fünf QDs ergaben. Ein modifiziertes KRYPTOR-Laboranalysensystem (Cezanne, Frankreich) mit zwei Photonenvervielfacher-Detektionskanälen und wechselbaren Bandpassfiltern (Messaufbau siehe Abbildung 7 in den Hintergrundinformationen) wurde für die hochempfindlichen Messungen verwendet. Das Probenvolumen betrug 150 μL . Eine Biot-QD-Mischung (0.4 nM von jedem Biot-QD) wurde in kleinen Aliquoten zu einer 2 nM Stammlösung von LTC-sAv gegeben. Für die einzelnen LTC-sAv-Biot-QD-Tests wurden 1 nM Stammlösungen von Biot-QD in kleinen Aliquoten zu einer 1 nM Stammlösung von LTC-sAv gegeben. Nach minimal 30 min Inkubationszeit wurden die Lumineszenzintensitäten der LTC-Donoren, $I(D)$, und der QD-Akzeptoren, $I(A)$, in einem Zeitfenster von 0.1 bis 1.2 ms gemessen. Spektrale Auflösung wurde mit Bandpassfiltern (ca. 10 nm Halb-

Eingegangen am 12. November 2009,
veränderte Fassung am 11. Dezember 2009
Online veröffentlicht am 27. Januar 2010

Stichwörter: Biosensoren · FRET · Lanthanoidkomplexe · Multiplexing · Quantenpunkte

- [1] P. Alivisatos, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 47.
- [2] W. C. W. Chan, S. M. Nie, *Science* **1998**, *281*, 2016.
- [3] R. Gill, M. Zayats, I. Willner, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7714; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7602.
- [4] E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6166; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6042.
- [5] I. L. Medintz, H. Mattoussi, A. R. Clapp, *Int. J. Nanomed.* **2008**, *3*, 151.
- [6] I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman, H. Mattoussi, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 435.
- [7] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, *307*, 538.
- [8] S. G. Penn, L. He, M. J. Natan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 609.
- [9] RNCSS—Global In Vitro Diagnostic Market Analysis, Research Report, Juni 2009, Noida (Indien).
- [10] N. Hildebrandt, H.-G. Löhmansröben, *Curr. Chem. Biol.* **2007**, *1*, 167.
- [11] Select Biosciences—*Multiplexed Diagnostics 2008*, Strategic Report, Juni 2008, Sudbury (Großbritannien).
- [12] S. Ray, M. Britschgi, C. Herbert, Y. Takeda-Uchimura, A. Boxer, K. Blennow, L. F. Friedman, D. R. Galasko, M. Jutel, A. Karydas, J. A. Kaye, J. Leszek, B. L. Miller, L. Minthorn, J. F. Quinn, G. D. Rabinovici, W. H. Robinson, M. N. Sabbagh, Y. T. So, D. L. Sparks, M. Tabaton, J. Tinklenberg, J. A. Yesavage, R. Tibshirani, T. Wyss-Coray, *Nat. Med.* **2007**, *13*, 1359.
- [13] H. Härmä, T. Soukka, A. Shavel, N. Gaponik, H. Weller, *Anal. Chim. Acta* **2007**, *604*, 177.
- [14] H. Bazin, M. Préludat, E. Trinquet, G. Mathis, *Spectrochim. Acta Part A* **2001**, *57*, 2197.
- [15] G. Mathis, *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 1953.
- [16] http://www.cezanne.fr/ev_technoprod4.htm#; November 2009.
- [17] <http://www.htrf.com/products/>; November 2009.
- [18] A. P. Alivisatos, *Science* **1996**, *271*, 933.
- [19] Y. Yin, A. P. Alivisatos, *Nature* **2005**, *437*, 664.
- [20] T. Jamieson, R. Bakhshi, D. Petrova, R. Pocock, M. Imani, A. M. Seifalian, *Biomaterials* **2007**, *28*, 4717.
- [21] M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, *281*, 2013.
- [22] M. P. Bruchez, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 533.
- [23] F. M. Raymo, I. Yildiz, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 2036.
- [24] R. C. Somers, M. G. Bawendi, D. G. Nocera, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 579.

- [25] A. R. Clapp, I. L. Medintz, H. Mattoussi, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 47.
- [26] A. R. Clapp, I. L. Medintz, J. M. Mauro, B. R. Fisher, M. G. Bawendi, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 301.
- [27] I. L. Medintz, A. R. Clapp, H. Mattoussi, E. R. Goldman, B. Fisher, J. M. Mauro, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 630.
- [28] A. R. Clapp, T. Pons, I. L. Medintz, J. B. Delehanty, J. S. Melinger, T. Tiefenbrunn, P. E. Dawson, B. R. Fisher, B. O'Rourke, H. Mattoussi, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1921.
- [29] A. R. Clapp, I. L. Medintz, H. T. Uyeda, B. R. Fisher, E. R. Goldman, M. G. Bawendi, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18212.
- [30] A. R. Clapp, I. L. Medintz, B. R. Fisher, G. P. Anderson, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1242.
- [31] L. J. Charbonnière, N. Hildebrandt, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 3241.
- [32] L. J. Charbonnière, N. Hildebrandt, R. F. Ziessel, H.-G. Löhmannsröben, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12800.
- [33] N. Hildebrandt, L. J. Charbonnière, M. Beck, R. F. Ziessel, H.-G. Löhmannsröben, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7784; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7612.
- [34] N. Hildebrandt, L. J. Charbonnière, H.-G. Löhmannsröben, *J. Biomed. Biotechnol.* **2007**, 79169.
- [35] X. Y. Huang, L. Li, H. F. Qian, C. Q. Dong, J. C. Ren, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5264; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5140.
- [36] M. K. So, C. J. Xu, A. M. Loening, S. S. Gambhir, J. H. Rao, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 339.
- [37] H. Q. Yao, Y. Zhang, F. Xiao, Z. Y. Xia, J. H. Rao, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4424; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4346.
- [38] B. W. Van der Meer, G. Coker, S. Y. S. Chen, *Resonance Energy Transfer: Theory and Data*, VCH, New York; Cambridge, **1994**.
- [39] N. Weibel, L. J. Charbonnière, M. Guardigli, A. Roda, R. Ziessel, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4888.
- [40] M. K. Johansson, R. M. Cook, J. D. Xu, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16451.
- [41] S. Petoud, S. M. Cohen, J. C. G. Bünzli, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13324.
- [42] A. N. Glazer, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Bioenerg.* **1984**, *768*, 29.
- [43] J. Y. Liu, T. Jiang, J. P. Zhang, D. C. Liang, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 16945.