

Ein Quantenpunkt-basiertes molekulares Lineal zur optischen Multiplexanalyse**

Frank Morgner, Daniel Geißler, Stefan Stufler, Nathaniel G. Butlin, Hans-Gerd Löhmannsröben und Niko Hildebrandt*

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

Anwendungen auf der Grundlage des Förster-Resonanz-energietransfers (FRET) spielen eine wichtige Rolle bei der Bestimmung von Konzentrationen und Abständen in nanoskaligen Systemen in der Biologie, Biochemie und Medizin.^[1–3] Wegen der r^{-6} -Abstandsabhängigkeit von FRET können Strukturveränderungen molekularer Systeme im Bereich 1–10 nm mit sehr hoher Genauigkeit weit unterhalb der Beugungsbegrenzung des Lichts gemessen werden. Stryer et al.^[4,5] beschrieben das „spektroskopische Lineal“ bereits vor über 40 Jahren, und es wird nach wie vor häufig für In- und Ex-vivo-Studien inter- und intramolekularer Wechselwirkungen mittels Spektroskopie und Mikroskopie teilweise bis auf Einzelmolekülniveau verwendet.^[6–9] Zahlreiche FRET-basierte Biosensoren für intrazelluläre Untersuchungen wurden bis heute entwickelt.^[10–14] Obwohl die meisten dieser Anwendungen einzelne Sensoren verwenden, gibt es einige neuere Entwicklungen dualer FRET-Paare für Zell-Imaging mit fluoreszierenden Proteinen^[15–17] und hier sogar mit nur einer Anregungswellenlänge.^[18] Die Verwendung der Multiplexing-FRET-Technik erlaubt eine simultane Messung mehrerer Abstände oder Konformationsänderungen, womit Zeit und Aufwand verringert und die bioanalytische Information durch eine mögliche Korrelation der simultanen Vorgänge erhöht werden kann.

Die FRET-Kombination von lumineszierenden Terbium-Komplexen (luminescent terbium complexes, LTCs) als Donoren und Halbleiterquantenpunkten (quantum dots, QDs) als Akzeptoren bietet signifikante Vorteile bezüglich Empfindlichkeit, Abstand und multiparametrischer Analyse („Multiplexing“) im Vergleich zu anderen Donor-Akzeptor-Paaren.^[19,20] Wegen der großen Überlappungsintegralwerte können außergewöhnlich große Förster-Radien (R_0 , der Donor-Akzeptor-Abstand, bei dem die FRET-Effizienz 50 % beträgt) bis zu 11 nm erreicht werden,^[21–23] wogegen konventionelle Donor-Akzeptor-Paare selten R_0 -Werte von mehr als 6 nm erreichen.^[24] Es wurden nanoplasmonische Lineale entwickelt, bei denen Abstände von bis zu ca. 70 nm gemessen werden können,^[25,26] allerdings verwenden diese Anwendungen relativ große Edelmetall-Nanopartikel (bis zu 40 nm) und sind beim Multiplexing zur simultanen Messung mehrerer variabler Abstände (z. B. bei vielen intrazellulären Vorgängen innerhalb einer Messung) eingeschränkt. Die Pionierarbeit von Weiss et al. demonstrierte Quantenpunkt-basierte optische Multiplexlineale mittels ultrahochauflösender Kolokalisation (ultra-high-resolution colocalization, UHRC).^[27] Obwohl FRET Vorteile bezüglich Auflösungsgenauigkeit und für dynamische Messungen hat,^[28] ist UHRC gut für Abstandsmessung im Bereich einiger nm bis zu einigen 10 μ m geeignet.^[29]

Zwei sehr wichtige Aspekte für intrazelluläre Studien mit QDs sind die Form und die Größe dieser Nanosensoren, die beide entscheidend sein können z. B. für die Zellaufnahme und den Einfluss der QDs auf die zu untersuchenden Biomoleküle. Kern und Schale der QDs können durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) relativ genau vermessen werden. Allerdings sind die Geräte recht teuer, und die Experimente sind zeitaufwändig und in der Regel nicht unter denselben Bedingungen möglich wie die eigentlichen bioanalytischen Untersuchungen (z. B. Lebendzell-Bildgebung). Weiterhin ist es sehr schwierig, die genauen Maße des gesamten QD (z. B. inklusive Polymerhülle und Biofunktionalisation) zu ermitteln, und TEM liefert nur zweidimensionale Bilder. Invitrogen gibt für seine polymerbeschichteten Qdots hydrodynamische Durchmesser an (Tabelle 1), die durch Größenausschlusschromatographie mittels HPLC durch Laufzeitvergleich mit einem Standardprotein ermittelt werden. Obwohl dies eine Abschätzung der Gesamtgröße ermöglicht, bleibt die Form unberücksichtigt, und die Werte sind relativ ungenau für QDs mit länglichen (z. B. ellipsoiden) Formen, wie sie sehr häufig vorliegen.^[30–32]

[*] Dipl.-Chem. F. Morgner, Dr. S. Stufler, Dr. N. Hildebrandt[†]
NanoPolyPhotonik

Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung
Geiselbergstraße 69, 14476 Potsdam-Golm (Deutschland)
E-Mail: niko.hildebrandt@iap.fraunhofer.de

Dipl.-Chem. D. Geißler, Prof. Dr. H.-G. Löhmannsröben
Physikalische Chemie, Universität Potsdam
Karl-Liebknecht-Straße 24–25, 14476 Potsdam-Golm (Deutschland)

Dr. N. G. Butlin
Lumiphore Inc.
4677 Meade St., Suite 216, Richmond, CA 94804 (USA)

[†] Aktuelle Adresse:

Institut d'Electronique Fondamentale
Bâtiment 220, Université Paris-Sud 11
F-91405 Orsay Cedex (Frankreich)
E-Mail: niko.hildebrandt@u-psud.fr

[**] Wir danken der Europäischen Kommission für finanzielle Unterstützung (FP7 Collaborative Project NANOONOSTICS-HEALTH-F5-2009-242264 und FP6 Specific Targeted Research Project POC4 Life-LSHB-CT-2007-037933) und Dr. Loïc J. Charbonnière für eine fruchtbare Diskussion über das Manuskript.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201002943> zu finden.

Tabelle 1: Abmessungen von Biot-QDs und mittlere Donor-Akzeptor-Abstände A und B .^[a]

Biot-QD		529	565	604	653	712
Größe von Kern + Schale	$x=y$	1.5–2	2.1 ^[b]	2	3	3
	z	1.5–2	2.75 ^[b]	4.7	6	6
Gesamtgröße	$x=y$	6	6.8	7.2	8.1	8.35
	z	6	7.4	9.9	11.1	11.35
hydrodynamischer Radius		6	7	8	9	9.25
A	–	–	6.3	6.7	7.6	7.85
B		6.5	8	9	10	10.25

[a] Größe von Kern + Schale (Radien bzw. Ellipsoidhalbachsen x , y und z) und hydrodynamische Radien wurden von Invitrogen zur Verfügung gestellt. Die Ellipsoidhalbachsen der Gesamtpartikel (x , y und z) wurden mit den hydrodynamischen Radien a unter der Annahme einer einheitlichen Dicke der Polymerbeschichtung über den gesamten QD und desselben Volumens von Kugel und Ellipsoid berechnet ($a^3 = xyz$). Alle Werte in nm. Alle Abmessungen sind auch in der Abbildung S5 in den Hintergrundinformationen dargestellt. [b] Der Radius von 2.3 nm (Invitrogen) wurde bezüglich einer leichten Streckung (wie in Lit. [30] dargestellt) korrigiert.

Kürzlich demonstrierten wir die Anwendung von zehn LTC-QD-Paaren für die ultraempfindliche Multiplexdiagnostik.^[33] Hier zeigen wir, dass diese LTC-QD-Paare auch als molekulare Lineale für Multiplexing genutzt werden können. Eine zeitaufgelöste Analyse von fünf LTC-QD-FRET-Paaren mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen ermöglichte die Bestimmung der Gesamtmaße (Form und Größe) von fünf verschiedenen biokompatiblen QDs. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei, dass nur eine einzige Anregungswellenlänge verwendet wird. Unser spektroskopisches LTC-QD-Lineal ermöglicht die simultane Messung verschiedener QDs mit variablen Schichtgrößen. Die Experimente wurden unter physiologischen Bedingungen mit spektroskopischer Standardausrüstung durchgeführt. Das LTC-QD-FRET-Lineal ist für Messungen vom einfachen QD bis hin zu dick beschichteten QDs geeignet. Darüber hinaus können die LTC-QD-FRET-Paare bei QDs mit dünnen Beschichtungen für intrazelluläre Multiplexanalysen verwendet werden. Dank der hellen Lumineszenz und des effizienten FRET unseres Donor-Akzeptor-Paars lassen sich alle Messungen bei sehr niedrigen Konzentrationen ($< \text{nm}$) durchführen.

Zur Validierung unseres spektroskopischen Lineals verwendeten wir einen kommerziell erhältlichen LTC (Lumiphore Inc., USA) als FRET-Donor in Kombination mit fünf verschiedenen kommerziellen QDs (Invitrogen, USA) als Akzeptoren. Durch die Ausnutzung der großen Unterschiede der Lumineszenzlebenszeiten von LTCs (ms) und QDs (ns) konnten die zeitaufgelösten Lumineszenzabklingkurven des Donors (LTC) und des Akzeptors (QD) zur Berechnung der Abstände verwendet werden, um somit eine unabhängige Kontrolle unserer Ergebnisse zu erhalten. Der LTC Lumi4-Tb, der auf einer Isophthalamidstruktur basiert,^[34,35] wurde an Streptavidin (sAv) gebunden, mit einem Verhältnis Lumi4-Tb/sAv = 4.4. Lumi4-Tb ist in verschiedenen physiologischen Puffern sehr stabil und verlässlich, mit sehr guten spektroskopischen Eigenschaften. Die Lumineszenzabklingzeit betrug (2.5 ± 0.1) ms, und die Lumineszenzquantenausbeute

($\Phi = \Phi_{\text{sens}} \Phi_{\text{Tb}}$) war 0.6 ± 0.1 mit $\Phi_{\text{sens}} = 0.83 \pm 0.17$ für die Sensibilisierung vom Liganden zum Tb^{3+} und $\Phi_{\text{Tb}} = 0.72 \pm 0.15$ für die Tb^{3+} -Lumineszenz. Absorptions- und Emissionsspektren befinden sich in Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen. Die fünf QDs wurden wegen ihrer in die Emissionslücken der LTC-Spektren passenden Emissionswellenlängen ausgewählt. In diesem Fall kommt es zu nur geringem spektroskopischem Übersprechen („cross-talk“) zwischen den einzelnen Detektionskanälen (Abbildung S2). Die Emissionsmaxima waren 529, 565, 604, 653 und 712 nm. Die Größen der CdSe/ZnS-Kern/Schale-QDs (CdSeTe/ZnS im Fall von 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 weist 5 bis 7 Biotinmoleküle (Biot) an seiner Oberfläche auf, sodass Biot-QDs mit unterschiedlichen Formen und Größen resultieren (Tabelle 1).

Unsere Experimente wurden in Lösungen mit steigenden Konzentrationen an Biot-QD bei konstanter Konzentration an Lumi4-Tb-sAv durchgeführt, sodass eine steigende Zahl stabiler (Lumi4-Tb-sAv)-(Biot-QD)-Bikonjugate (wegen der starken Bindung zwischen Biot und sAv) entstand. Die Messung mehrerer unterschiedlicher Konzentrationen der FRET-Komplexe hat zwei Vorteile: Erstens haben wir Zugriff auf viele unabhängige Lumineszenzabklingkurven für dasselbe LTC-QD-FRET-System, was in einer besseren statistischen Charakterisierung der angeglichenen Abklingzeiten resultiert. Zweitens können wir die Konzentrationsgrenzen bestimmen, bei denen wir noch ausreichend hohe Lumineszenzintensitäten für eine quantitative Analyse der Donor-Akzeptor-Abstände erhalten. Zur Bewertung unseres spektroskopischen Lineals wurden die LTC-QD-Abstände durch die Strukturinformationen der Biot-QDs und des LTC-sAv abgeschätzt (Tabelle 1 und Abbildung S5). Die zufällige Markierung von Lumi4-Tb über das komplette sAv und die längliche Form der QDs resultieren in einer Donor-Akzeptor-Abstandsverteilung. Da die Punktdipolnäherung der FRET-Theorie auch für Halbleiterquantenpunkte geeignet ist,^[36] legten wir eine relativ kleine imaginäre Oberfläche von 1 nm Durchmesser im Zentrum der QD-Kerne als FRET-Akzeptor-Ebene fest. Für die sphärischen QD529 wählten wir eine FRET-Donor-Ebene (1 nm außerhalb der Biot-QD529-Oberfläche), die den mittleren Donor-Akzeptor-Abstand B repräsentiert. Für die ellipsoiden QDs definierten wir zwei FRET-Donor-Ebenen. Eine ist der kürzest mögliche Abstand (kleine Ellipsoidhalbachse) und die andere ein mittlerer langer Abstand (1.5 nm außerhalb der hydrodynamischen Oberfläche). Dadurch ergeben sich zwei mittlere Donor-Akzeptor-Abstände A (kurz) und B (lang) zwischen der QD-Akzeptor-Ebene und den beiden LTC-Donor-Ebenen.

Um die Donor-Akzeptor-Abstände r mit dem spektroskopischen Lineal zu bestimmen, führten wir eine zeitaufgelöste Analyse der Lumi4-Tb- und QD-Lumineszenzsignale durch. Für die Bestimmung von r benötigt man die Lumineszenzabklingzeiten des Donors (Lumi4-Tb) in Abwesenheit (τ_D) und in Anwesenheit des Akzeptors (QD) (τ_{DA}). Wegen des großen Unterschieds zwischen den Lebenszeiten der angeregten Zustände des LTC-Donors und der QD-Akzeptoren ist die FRET-sensibilisierte Akzeptorabklingzeit

$\tau_{AD} = \tau_{DA}$.^[37] Dies bietet den Vorteil des Zugangs zu Abstandsinformationen durch die Analyse des FRET-sensibilisierten QD-Akzeptor-Lumineszenzzerfalls, was für eine Multiplexmessung mit einem Donor, der von mehreren Akzeptoren gelöscht wird, eine notwendige Voraussetzung ist. Die Donor-Akzeptor-Abstände können nach Gleichung (1) berechnet werden.

$$\frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = \eta_{\text{FRET}} \quad (1)$$

R_0 ist der Förster-Radius und η_{FRET} die FRET-Effizienz. Alle FRET-Systeme wurden nacheinander bei zehn verschiedenen Verhältnissen von Lumi4-Tb-sAv zu Biot-QD vermessen. Da Lumineszenzabklingzeiten konzentrationsunabhängig sind, kann jede der aufgenommenen Zeitkurven zur Abstandsbeziehung verwendet werden. Abbildung 1 zeigt einige repräsentative Abklingkurven der Lumi4-Tb-sAv- und Biot-QD653-Lumineszenz nach Hintergrundkorrektur.

Die Zugabe von Biot-QD653 zu Lumi4-Tb-sAv führt zur Lumineszenzlöschung von Lumi4-Tb, und neue kürzere

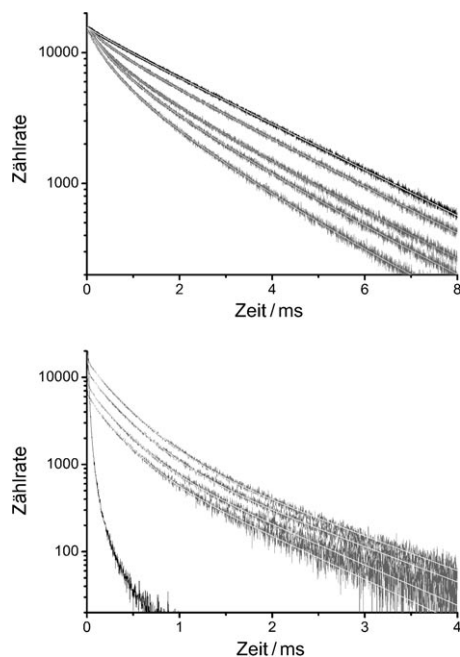


Abbildung 1. Repräsentative Lebenszeitkurven der (Lumi4-Tb-sAv)-(Biot-QD653)-Systeme mit mathematischen Angleichen (dünne weiße Linien). Oben: Hintergrundkorrigierte Lumi4-Tb-Emission bei 542 ± 10 nm. Die schwarze monoexponentielle Kurve repräsentiert reines Lumi4-Tb-sAv (0.2 nm). Steigende Konzentrationen an Biot-QD (= sinkendes Verhältnis X zwischen Lumi4-Tb-sAv und Biot-QD) führen zu FRET-Löschung der Lumi4-Tb-Lumineszenz. Die Biot-QD653-Konzentrationen betragen von oben nach unten: 7 μM ($X=30$), 30 μM ($X=6$), 170 μM ($X=1.2$) und 330 μM ($X=0.6$). Unten: QD653-Emission bei 660 ± 10 nm, korrigiert um Hintergrund- und Lumi4-Tb-Signal. Reines Lumi4-Tb-sAv zeigt kein Signal. Steigende Biot-QD-Konzentrationen führen zu FRET-Sensibilisierung der QD653-Lumineszenz. Die Konzentrationen an Biot-QD653 betragen von unten nach oben 7 μM ($X=30$), 17 μM ($X=12$), 30 μM ($X=6$) und 70 μM ($X=3$). Die schwarze Kurve zeigt das Lumineszenzsignal von reinem Biot-QD bei einer Konzentration von 330 μM (ohne Lumi4-Tb-sAv).

Zeitkomponenten werden in den Abklingkurven deutlich sichtbar. Die QD653-Lumineszenzkurven zeigen ebenfalls eine neue Abklingzeitkomponente. Hier steigt aber die Intensität mit der Zugabe von Biot-QD653 wegen der FRET-Sensibilisierung. Obwohl der Lumineszenzzerfall von direkt angeregten QDs im Bereich von 10 bis 100 ns liegt, führt die sehr starke QD-Lumineszenz (durch direkte QD-Anregung) zu einer Abklingkurve, die bei sehr hoher Biot-QD653-Konzentration auch nach einigen ms noch vorhanden ist (Abbildung 1 unten). Da die FRET-sensibilisierten Biot-QD653-Kurven jedoch in einem deutlich geringeren Konzentrationsbereich liegen, kann die Lumineszenz durch direkte Anregung vernachlässigt werden. Deshalb muss die QD653-Lumineszenz aus der FRET-Sensibilisierung durch Lumi4-Tb resultieren. Die FRET-Experimente wurden für alle (Lumi4-Tb-sAv)-(Biot-QD)-Kombinationen durchgeführt, und die Lumineszenzabklingzeiten (τ_D , τ_{DA} und τ_{AD}), FRET-Effizienzen (η_{FRET}) und Donor-Akzeptor-Abstände (r) aus den Abklingkurven mittels multiexponentieller mathematischer Angleiche ermittelt (Details zur Abklingzeitanalyse befinden sich in Lit. [23] und im Experimentellen Teil). Alle gemessenen und berechneten Werte befinden sich in Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen. Da für eine Multiplexuntersuchung die zeitaufgelöste Analyse der QD-Akzeptorlumineszenz notwendig ist, wurden zunächst die verschiedenen QD-Lumineszenzabklingkurven nach τ_{DA1} und τ_{DA2} angeglichen. Die beiden mittleren Abstände r_1 und r_2 wurden dann mit Gleichung (1) berechnet. Um die Werte der Akzeptoranalyse zu bestätigen, wurden die Lumineszenzabklingkurven des Lumi4-Tb-Donors nach τ_D und zwei mittleren τ_{DA1} und τ_{DA2} (mit konstant gehaltenem τ_D) für alle verschiedenen Konzentrationen angeglichen. Diese Donoranalyse bestätigte die Ergebnisse der Akzeptorberechnungen.

Abbildung 2 zeigt die Resultate des zeitaufgelösten spektroskopischen Lineals (Akzeptorlumineszenzabklingkurven) im Vergleich zu den Strukturinformationen der Biot-QD aus Tabelle 1. Die Ergebnisse der FRET-Messungen passen sehr gut zu den Erwartungen aus den Biot-QD-Maßen ($A < \text{hydrodynamischer Radius der Biot-QD} < B$). Die steigenden Donor-Akzeptor-Abstände, die aus den zunehmenden Größen der Biot-QD resultieren, konnten mit den

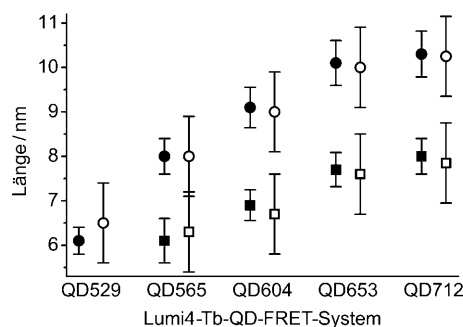


Abbildung 2. Abstandsmessungen an verschiedenen Lumi4-Tb-QD-FRET-Systemen. Die offenen Symbole repräsentieren die mittleren Donor-Akzeptor-Referenzabstände A (Quadrat) und B (Kreis), die aus den QD-Maßen mit einer Unsicherheit von ± 1 nm abgeschätzt wurden. Die vollen Symbole repräsentieren die aus der zeitaufgelösten Analyse berechneten Abstände (molekulares Lineal).

zeitaufgelösten FRET-Messungen sehr genau detektiert werden, und dies sogar bei sub-nanomolaren Konzentrationen. Zudem war eine Unterscheidung zwischen den sphärischen und den länglichen QDs möglich.

Um die dreidimensionale Form der QDs (Zigarrenform mit zwei kurzen oder Fladenform mit zwei langen Achsen) zu bewerten, betrachteten wir die Anteile der verschiedenen präexponentiellen Faktoren und Intensitäten der multiexponentiell abklingenden Lumineszenzkurven (Abbildung 1) etwas genauer. Diese Analyse erlaubt die Messung der Konzentrationsanteile (präexponentiellen Faktoren) der Lumi4-Tb-Komplexe und deren Lumineszenzintensitäten (Produkt von präexponentiellen Faktoren und Abklingzeiten) bei den zwei Abständen (A und B bzw. r_1 und r_2) vom QD-Zentrum. Der steigende Intensitätsquotient von kurzer und langer Abstandskomponente mit zunehmender QD-Größe (Abbildung S4) zeigt den steigenden Anteil der kurzlebigen Komponente an der Gesamtlumineszenz an. Auch der Konzentrationsanteil von Lumi4-Tb-Komplexen, die einen kleinen Abstand zum QD-Zentrum haben, nimmt mit der QD-Größe zu (Abbildung 3). Da der mittlere Abstand

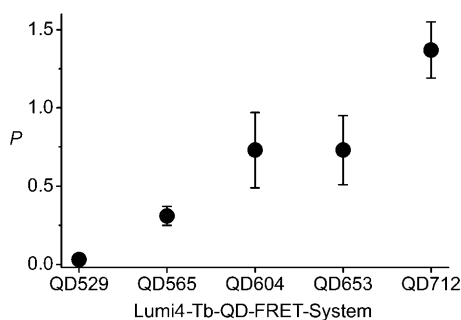


Abbildung 3. Konzentrationsquotient P von Lumi4-Tb-Komplexen beim kleinem Abstand A und beim mittleren langen Abstand B , berechnet aus den präexponentiellen Faktoren der biexponentiellen QD-Abklingkurven. Der steigende relative Anteil der kurzen Abstandskomponente wird durch die Streckung der QDs entlang der z -Achse mit zunehmender Größe hervorgerufen, was durch TEM-Aufnahmen bestätigt wurde.^[30] Die Analyse von P erlaubt eine dreidimensionale Bewertung der QDs.

zwischen Oberfläche und Zentrum eines zigarrenförmigen Ellipsoids $a = (xyz)^{1/3}$ ist, nimmt der relative Anteil von Biot-sAv-Bindungsstellen nahe des Abstands der kurzen Achsen $x = y$ bei einer Streckung entlang der z -Achse zu. Deshalb ist die Zunahme des relativen Anteils von kurzer zu langer Abstandskomponente in den exponentiellen Abklingkurven ein sehr deutlicher Hinweis einer zigarrenförmigen Streckung der QDs mit zunehmender Größe.^[30] Weiterhin sind die Intensitäts- und Konzentrationsanteile der kurzen im Vergleich zur langen QD529-Komponente vernachlässigbar, was die sphärische Form dieser QDs mit nur einem mittleren Abstand B bestätigt (Tabelle 1). Alle präexponentiellen Faktoren und Intensitätswerte sowie deren Berechnung befinden sich in Tabelle S1.

Zusammenfassend haben wir eine neue QD-basierte Multiplexing-Technik für Anwendungen als spektroskopisches Lineal bei niedrigen Konzentrationen vorgestellt. Mit

den verwendeten LTC-QD-FRET-Paaren können extrem große FRET-Abstände (mit Förster-Radien bis 11 nm) gemessen werden, ohne die Hilfe von zusätzlichen FRET-Verstärkern.^[38] Die hier vorgestellte Arbeit ist nach unserem Kenntnisstand die erste Demonstration eines molekularen FRET-Lineals für Multiplexanalysen. Dieser neue Ansatz kombiniert die Vorteile der simultanen Analyse verschiedener biofunktionaler Vorgänge mit hoher Empfindlichkeit und Geschwindigkeit. Zudem erlaubt unsere Technik die Multiplexmessung von sehr genauen Größen- und Forminformationen funktioneller Quantenpunkte unter physiologischen Bedingungen. Unsere derzeitigen Forschungen gelten der Umsetzung unseres Konzepts in „echten“ Anwendungen, z. B. in der Biostrukturanalyse, zum Lebendzell-Imaging oder für die Echtzeit-PCR, sowie der grundlegenden Untersuchung von Nano-FRET-Biosystemen. Die Verwendung von Lanthanoidkomplexen und Halbleiterquantenpunkten für biologische FRET-Studien bietet zahlreiche Vorteile, und wir sind zuversichtlich, dass unsere Demonstration eines hochempfindlichen spektroskopischen FRET-Lineals für die Multiplexanalyse einen wichtigen Beitrag zu vielen Anwendungen in den Lebenswissenschaften und der Nanotechnologie leisten wird.

Experimentelles

Lumi4-Tb wurde von Lumiphore in der Streptavidin-gekoppelten Version bezogen (4.4 Lumi4-Tb/sAv). Lumineszenzabklingkurven wurden in 50 mM Boratpuffer (pH 8.3) mit 2 % Rinderserumalbumin (BSA) und 0.5 M KF aufgenommen. Die Größen der CdSe/ZnS- und CdSe/Te/ZnS-Kern/Schale-Quantenpunkte wurden von Invitrogen mittels TEM und die hydrodynamischen Durchmesser der Biot-QDs mittels Größenausschlusschromatographie an HPLC bestimmt. Das Probenvolumen betrug 150 μ L für alle spektroskopischen Messungen. Alle Proben enthielten 0.2 nM Lumi4-Tb-sAv, außer für die Kontrollmessungen mit reinem Puffer und reinen Biot-QDs (330 pM). Die Biot-QD-Konzentrationen waren 7, 17, 30, 70, 100, 130, 170, 200, 270 und 330 pM. Alle Proben wurden mit einem gepulsten Stickstofflaser (SpectraPhysics, USA) mit 100 Schuss bei 20 Hz Repetitionsrate und einer Pulsenergie von ca. 50 μ J (auf der Probe) bei 337.1 nm angeregt. Ein modifiziertes KRYPTOR-Laboranalysesystem (Cezanne, France) mit zwei Photonenvervielfacher-Detektionskanälen und wechselbaren Bandpassfiltern (Delta, DK und Semrock, USA) wurde für die Messungen mit dem spektroskopischen Lineal verwendet (Messaufbau in Abbildung S6). Für alle Proben wurden die Lumi4-Tb- und die QD-Emission simultan in den beiden Detektionskanälen (Lumi4-Tb-Kanal und QD-Kanal) gemessen. Zeitkurven wurden von 0 bis 8 ms nach dem Anregungspuls in 4000 Zeitkanälen von je 2 μ s gemessen. Mathematische Angleiche wurden mit dem Programm FAST (Edinburgh Instruments, Großbritannien) durchgeführt.

Eingegangen am 15. Mai 2010

Online veröffentlicht am 30. August 2010

Stichwörter: Biosensoren · FRET · Quantenpunkte · Spektroskopische Lineale · Terbium

- [1] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4676; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562.
- [2] P. R. Selvin, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 730.

- [3] H. Bazin, M. Pr  audat, E. Trinquet, G. Mathis, *Spectrochim. Acta Part A* **2001**, 57, 2197.
- [4] L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, 47, 819.
- [5] L. Stryer, R. P. Haugland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, 58, 719.
- [6] V. V. Didenko, *Biotechniques* **2001**, 31, 1106.
- [7] E. A. Jares-Erijman, T. M. Jovin, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1387.
- [8] B. Schuler, *ChemPhysChem* **2005**, 6, 1206.
- [9] P. G. Wu, L. Brand, *Anal. Biochem.* **1994**, 218, 1.
- [10] D. M. Chudakov, S. Lukyanov, K. A. Lukyanov, *Trends Biotechnol.* **2005**, 23, 605.
- [11] B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science* **2006**, 312, 217.
- [12] E. A. Jares-Erijman, T. M. Jovin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 409.
- [13] I. L. Medintz, *Trends Biotechnol.* **2006**, 24, 539.
- [14] A. Miyawaki, *Dev. Cell* **2003**, 4, 295.
- [15] H. W. Ai, K. L. Hazelwood, M. W. Davidson, R. E. Campbell, *Nat. Methods* **2008**, 5, 401.
- [16] D. M. Grant, W. Zhang, E. J. McGhee, T. D. Bunney, C. B. Talbot, S. Kumar, I. Munro, C. Dunsby, M. A. A. Neil, M. Katan, P. M. W. French, *Biophys. J.* **2008**, 95, L69.
- [17] A. Piljic, C. Schultz, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 156.
- [18] Y. Niino, K. Hotta, K. Oka, *PLoS ONE* **2009**, 4, e6036.
- [19] L. J. Charbonni  re, N. Hildebrandt, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 3241.
- [20] N. Hildebrandt, H.-G. Löhmannsröben, *Curr. Chem. Biol.* **2007**, 1, 167.
- [21] L. J. Charbonni  re, N. Hildebrandt, R. F. Ziessel, H.-G. Löhmannsröben, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 12800.
- [22] N. Hildebrandt, L. J. Charbonni  re, M. Beck, R. F. Ziessel, H.-G. Löhmannsröben, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7784; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7612.
- [23] N. Hildebrandt, L. J. Charbonni  re, H.-G. Löhmannsröben, *J. Biomed. Biotechnol.* **2007**, Article ID 79169.
- [24] B. W. Van der Meer, G. Coker, S. Y. S. Chen, *Resonance Energy Transfer: Theory and Data*, VCH, New York, **1994**.
- [25] G. L. Liu, Y. D. Yin, S. Kunchakarra, B. Mukherjee, D. Gerion, S. D. Jett, D. G. Bear, J. W. Gray, A. P. Alivisatos, L. P. Lee, F. Q. F. Chen, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, 1, 47.
- [26] C. S  nnichsen, B. M. Reinhard, J. Liphardt, A. P. Alivisatos, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 741.
- [27] T. D. Lacoste, X. Michalet, F. Pinaud, D. S. Chemla, A. P. Alivisatos, S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 9461.
- [28] S. Weiss, *Science* **1999**, 283, 1676.
- [29] X. Michalet, T. D. Lacoste, S. Weiss, *Methods* **2001**, 25, 87.
- [30] B. N. G. Giepmans, T. J. Deerinck, B. L. Smarr, Y. Z. Jones, M. H. Ellisman, *Nat. Methods* **2005**, 2, 743.
- [31] L. Jauffred, L. B. Oddershede, *Nano Lett.* **2010**, 10, 1927.
- [32] E. Oh, M. Y. Hong, D. Lee, S. H. Nam, H. C. Yoon, H. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3270.
- [33] D. Geißler, L. J. Charbonni  re, R. F. Ziessel, N. G. Butlin, H. G. Löhmannsröben, N. Hildebrandt, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 1438; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1396.
- [34] M. K. Johansson, R. M. Cook, J. D. Xu, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16451.
- [35] S. Petoud, S. M. Cohen, J. C. G. B  nzli, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13324.
- [36] C. Curutchet, A. Franceschetti, A. Zunger, G. D. Scholes, *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112, 13336.
- [37] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [38] I. Gryczynski, J. Malicka, Z. Gryczynski, J. R. Lakowicz, C. D. Geddes, *J. Fluoresc.* **2002**, 12, 131.