

Photonen aufkonvertierende Nanopartikel zur optischen Codierung und zum Multiplexing von Zellen, Biomolekülen und Mikrosphären

Hans H. Gorris* und Otto S. Wolfbeis

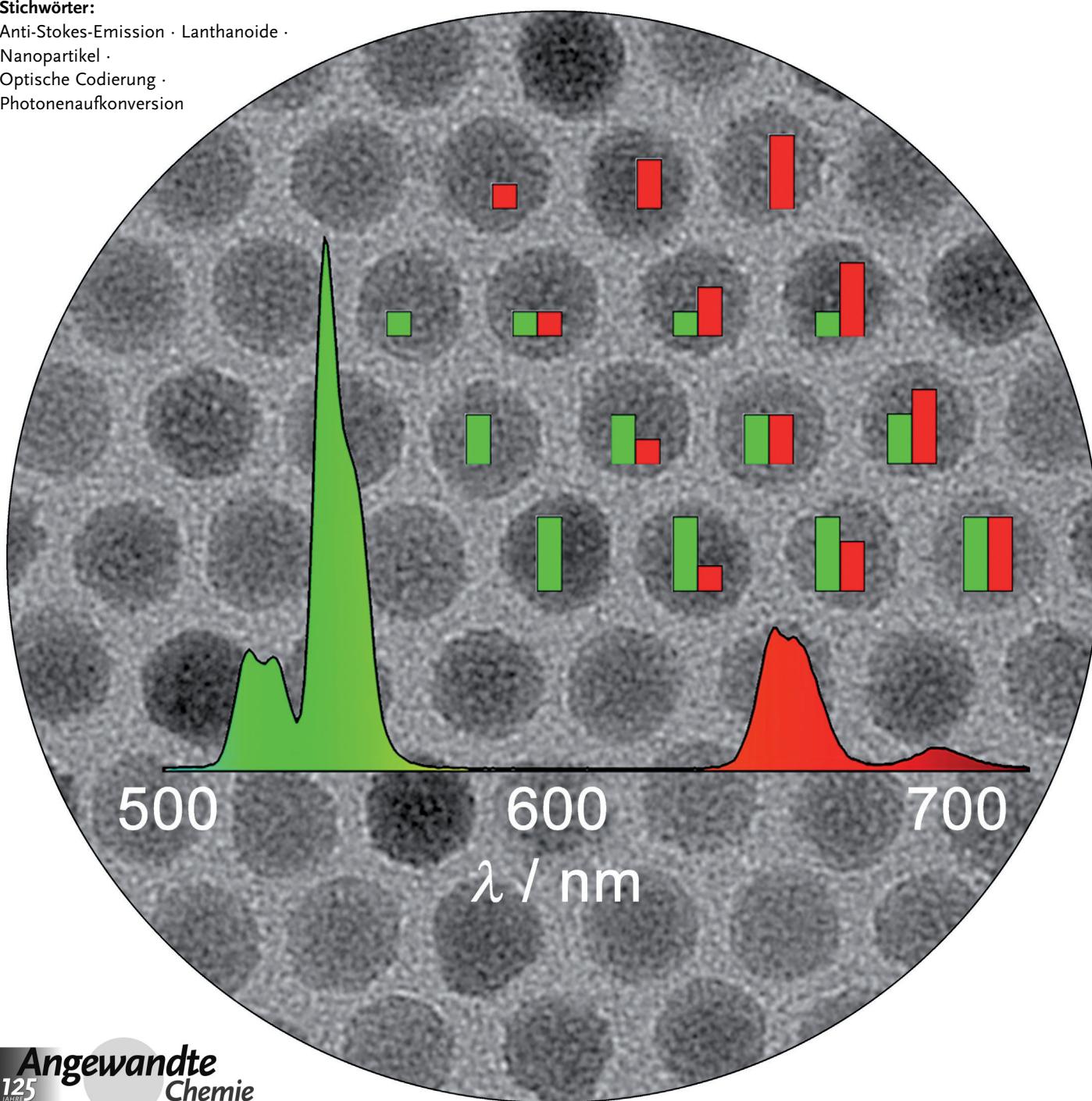
Stichwörter:

Anti-Stokes-Emission · Lanthanoide ·

Nanopartikel ·

Optische Codierung ·

Photonenaufkonversion



Photonen aufkonvertierende Nanopartikel (*photon upconverting nanoparticles, UCNPs*) sind Lanthanoid-dotierte Nanokristalle, die unter Nahinfrarotanregung sichtbares Licht emittieren (Anti-Stokes-Emission). Diese einzigartige optische Eigenschaft schließt Hintergrundfluoreszenz und Lichtstreuung durch biologisches Material aus. Ein weiteres Kennzeichen der UCNPs ist die Emission von mehreren schmalen Emissionslinien, was neue Wege für die optische Codierung bereitet. Eindeutige Emissionssignaturen können erzielt werden, indem man die Mehrfachemission der UCNPs durch die Zusammensetzung der Dotanden oder durch eine Oberflächenmodifikation mit Farbstoffen einstellt. Wenn nur die Intensität einer Emissionslinie justiert wird, während eine weitere Emissionslinie als konstantes Referenzsignal fungiert, können ratiometrische Codes entwickelt werden, die unabhängig von Schwankungen der absoluten Signalintensitäten sind. Die Kombination mehrerer UCNPs, die jeweils durch ihre Kennung aus Emissionslinien eindeutig identifizierbar sind, erhöht den Umfang der Codierungen exponentiell und schafft so die Voraussetzungen zur Steigerung der Mehrfachdetektion von Analyten. Dieser Aufsatz zeigt das Potenzial der UCNPs zur Markierung und Codierung von Biomolekülen, Mikrosphären und sogar ganzen Zellen auf.

1. Einleitung

Die Entwicklung neuer Codierungsstrategien ist eine treibende Kraft für die Mehrfachdetektion von Analyten in komplexen Mischungen mit minimierten Probenvolumina, verkürzter Assaydauer und verringerten Kosten. Die Mehrfachdetektion von Analyten ermöglicht Genotypisierung,^[1] medizinische Diagnosen,^[2] Screening von kombinatorischen Bibliotheken^[3] und Umweltüberwachung.^[4] Multiplexassays lassen sich grob in zwei Formate einteilen: Im ersten Format wird eine Vielzahl von Sonden durch deren räumliche Position auf einem planaren Array identifiziert.^[5] Beim zweiten Format werden die Sonden an suspendierte Mikrosphären gebunden, die mit einem Identifizierungscode oder „Strichcode“ markiert sind.^[6] Mikrosphären in Suspension haben eine große Oberfläche und ermöglichen eine schnelle Bindung. Während bei planaren Arrays die Sonden einzeln aufgetragen werden müssen, können codierte Mikrosphären schneller und homogener in einem großen Ansatz synthetisiert werden.^[7] Daher haben codierte Mikrosphären das Potenzial, die Kosten pro Array drastisch zu senken, sofern sie durch die Verwendung einfacher und preiswerter Instrumentierung detektiert werden können. Codierte Mikrosphären^[8,9] – und sogar Zellen^[10] – profitieren von höherer Flexibilität, da sie in Suspension durch Durchfluszytometrie sortiert oder in Arrays mit Femtoliter-großen Gefäßen geladen werden können.^[11,12] Beide Detektionsmethoden ermöglichen das parallele Auslesen einer großen Zahl verschiedener Sonden. Außerdem ist jeder Typ codierter Mikrosphären in mehreren Kopien vorhanden, wodurch die Beobachtung einer statistisch relevanten Sondenzahl in einem einzigen Experiment möglich wird.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	3669
2. Eigenschaften von Photonen aufkonvertierenden Nanopartikeln zur Multiplexcodierung	3671
3. Einstellung mehrerer Farben durch die Materialzusammensetzung von UCNPs	3672
4. Einstellung mehrerer Farben durch Beschichtung der Oberfläche von UCNPs mit Farbstoffen	3674
5. Multiparametercodierung	3676
6. Synthese und Oberflächenmodifizierung biokompatibler UCNPs	3677
7. Mehrfarbmarkierung von Zellen mit UCNPs für die Bildgebung	3678
8. Durch die Position codierte heterogene Assays	3679
9. Durch Mikrosphären codierte heterogene Assays	3680
10. Homogene Multiplexassays	3680
11. Chemische Mehrfachsensoren	3681
12. Zusammenfassung und Ausblick	3681

Der maximale Grad der Parallelisierung mithilfe (suspendierter) Mikrosphären hängt von der Zahl an Identifizierungscodes ab, die getrennt voneinander detektiert werden können. Verschiedenste optische Codierungsstrategien wurden beschrieben, um so viele Codes wie möglich zu erhalten. Beispielsweise lassen sich Mikropartikel mit zweidimensionalen Mustern graphisch codieren.^[13–18] Die Definition und die Auflösung optischer Muster im Mikrometermaßstab erfordert jedoch eine anspruchsvolle Instrumentierung.

[*] Dr. H. H. Gorris, Prof. O. S. Wolfbeis
Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg
93040 Regensburg (Deutschland)
E-Mail: hans-heiner.gorris@ur.de

rung. Dagegen nutzt die spektrale Codierung entweder charakteristische IR- oder Raman-Signaturen^[19–24] oder die Emissionsspektren und -intensitäten der lumineszierenden Materialien, wie fluoreszierende Farbstoffe, Quantenpunkte oder Photonen aufkonvertierende Nanopartikel als codierende Elemente. Die Markierung von Mikropartikeln mit Fluorophoren ist wahrscheinlich die gängigste Methode zur spektralen Codierung.^[8,25] Mikrosphären, die gewöhnlich aus Polystyrol bestehen, lassen sich in organischen Lösungsmitteln, die definierte Konzentrationen von Fluorophoren enthalten, quellen. Nach der Überführung in eine wässrige Lösung schrumpfen die Mikrosphären und schließen die Fluorophore dauerhaft ein.

Die spektrale Codierung ist kompatibel mit optischen Standarddetektionssystemen wie Durchflusszytometrie und ist deswegen vielseitig anwendbar. Aus Gleichung (1) ergibt sich die maximale Zahl an spektralen Codes (C), wobei i die

$$C = i^w - 1 \quad (1)$$

Zahl der unterscheidbaren Intensitätsniveaus und w die Zahl an Wellenlängen ist.^[26] Ein Intensitätsniveau muss immer subtrahiert werden, da es nicht vom Hintergrund unterscheidbar ist. C lässt sich exponentiell erhöhen, indem mehrere Intensitätsniveaus und mehrere Wellenlängen gleichzeitig verwendet werden. Zum Beispiel ergeben vier Intensitätsniveaus und zwei Wellenlängen $15 (=4^2-1)$ Codes (Abbildung 1), während zehn Intensitätsniveaus und vier Wellenlängen im Prinzip 9999 Codes liefern. Der tatsächliche Codierungsumfang ist jedoch begrenzt durch a) breite und überschneidende Emissionsspektren, b) Schwankungen in den Signalintensitäten und c) störende Hintergrundsignale.

Mehrere Ansätze wurden untersucht, um die begrenzte Zahl an Codes zu erhöhen, die durch konventionelle Fluorophore erzeugt werden können. Zum Beispiel lässt sich die Emission von Fluorophor-dotierten Siliciumoxidnanopartikeln einstellen, indem die Effizienz des resonanten Fluoreszenzenergietransfers zu verschiedenen Akzeptoren angepasst wird.^[27] Zusätzliche Informationen bietet die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer.^[28] Und auch Biomoleküle wie DNA lassen sich als Codierungselement für einen kombinatorischen Code verwenden. In diesem Fall wird ein bestimmter DNA-Strichcode an jede Mikrosphäre gebunden. Der DNA-Strichcode kann anschließend unter Verwendung

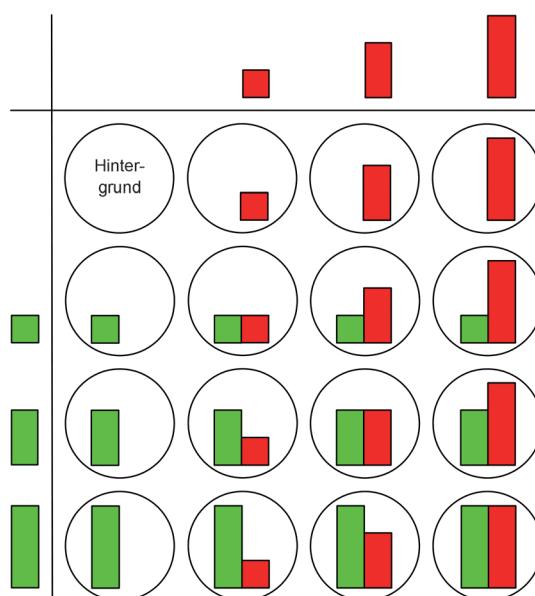


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Codierung. Mikrosphären sind markiert mit Kombinationen zweier fluoreszierender Farbstoffe, die entweder grünes oder rotes Licht emittieren. Die Emissionsintensität jedes Farbstoffs kann einzeln durch die Konzentration eingestellt werden. Mikrosphären, die keine Fluorophore enthalten, können nicht vom Hintergrund unterschieden werden. Deswegen ergibt die Kombination aus zwei Farben und vier Intensitätsniveaus 15 ($=4^2-1$) Codes.

von komplementären Oligonucleotiden, die verschiedene Fluorophore tragen, durch aufeinander folgende Hybridisierungs- und Dehybridisierungsschritte decodiert werden.^[29,30]

Codes, die auf Nanopartikeln basieren, bieten besondere Vorteile gegenüber konventionellen, organischen Fluorophoren, da sie weitgehend resistent gegen Photobleichen sind und ihre Emissionsspektren durch eine geeignete Nanopartikelplanung genau abgestimmt werden können. Zum Beispiel kann die Oberflächenstruktur von Goldnanopartikeln für die Mehrfachcodierung angepasst werden, um charakteristische Resonanzwellenlängen für die Oberflächenplasmonenresonanz zu erhalten.^[31–36] Lumineszierende Nanopartikel können auf die gleiche Weise für die spektrale Codierung verwendet werden wie organische Fluorophore. Quantenpunkte des Typs (Cd/Zn)Se weisen großenabhängige Emissionsfarben auf,^[26,37,38] wodurch eine Reihe von Codierungs-



Hans-Heiner Gorris studierte Biologie an der Universität Münster und der University of York (England). Er promovierte bei Dr. Andreas Frey 2005 an der Universität Lübeck. Anschließend arbeitete er mit Prof. David Walt an der Tufts University (USA) an der Einzelmolekülkinetik von Enzymen in optischen Faserbündel-Arrays. Seit 2009 ist er Mitglied der Fakultät für Chemie und Pharmazie an der Universität Regensburg und leitet die Gruppe „Bioanalytik im Mikro- und Nanometer-Maßstab“. Seine Forschungsinteressen gelten insbesondere hochempfindlichen Nachweismethoden in der Biosensorik.



Otto S. Wolfbeis ist Professor für Analytische Chemie und Oberflächenchemie an der Universität Regensburg. Sein Forschungsschwerpunkt liegt auf (faser)optischen Chemosensoren, Fluoreszenzspektroskopie, fluoreszierenden Sonden und Markierungen sowie lumineszierenden Nanomaterialien. Er hat mehr als 500 wissenschaftliche Artikel und Aufsätze veröffentlicht. Wolfbeis ist Gründerherausgeber der Springerreihe über Fluoreszenz, Chefredakteur von *Microchimica Acta* und einer der zehn Kuratoren der *Angewandten Chemie*.

elementen generiert werden kann. Anregungslicht einer einzelnen Wellenlänge – typischerweise im UV-Bereich – kann zum gleichzeitigen Auslesen aller Codes eingesetzt werden.^[39,40] Die Einsetzbarkeit von Quantenpunkten in biologischen Anwendungen ist jedoch eingeschränkt, einerseits weil Cadmium(II) toxisch ist und andererseits weil die Anregung bei kurzen Wellenlängen zu einer recht starken Hintergrundfluoreszenz durch biologische Materialien führt.

Diese Einschränkungen können durch die Verwendung einer relativ neuen Klasse von Nanopartikeln – den Photonen aufkonvertierenden Nanopartikeln (UCNPs) – elegant vermieden werden. Während die Eigenschaften und das Potenzial von UCNPs bereits früher beschrieben wurden,^[41–43] richtet sich dieser Aufsatz auf die Entwicklung neuer Codierungsstrategien, die sich aus den einzigartigen Lumineszenzeigenschaften der UCNPs ergeben.

2. Eigenschaften von Photonen aufkonvertierenden Nanopartikeln zur Multiplexcodierung

Effiziente spektrale Codierungsstrategien zur Mehrfachanalyse biologischer Proben erfordern sowohl geringe Hintergrundsignale durch Biomoleküle als auch eine gute Trennung der Emissionssignale, um so viele Codes wie möglich unterscheiden zu können. Störungen durch Hintergrundsignale sind besonders bei Verwendung von kurzwelligem Licht ein Problem. Rayleigh-Streuung tritt vor allem im UV-Bereich auf und nimmt mit der vierten Potenz der Wellenlänge ab. Zudem weisen viele Biomoleküle Autofluoreszenz bei Verwendung von kurzwelligem Licht auf.^[44] Am anderen Ende des Spektrums gibt es dagegen nur geringe Wechselwirkungen zwischen Nahinfrarot(NIR)-Licht und biologischem Material. Somit führt NIR-Licht kaum zu Hintergrundlumineszenz oder durch Licht verursachte Schäden. Außerdem dringt NIR-Licht tief in biologische Materialien ein, wodurch mehrschichtige biologische Proben untersucht werden können. Mehrere Strategien wurden entwickelt, um die Vorteile langwelliger Anregung zu nutzen. Die einfachste Möglichkeit ist die Verwendung organischer Fluorophore, die langwelliges Licht absorbieren.^[45] Die Quantenausbeute organischer Farbstoffe verringert sich jedoch bei langwälligen Absorptionsmaxima. Im Unterschied dazu ermöglichen nichtlineare optische Verfahren die Anregung von organischen Fluorophoren^[46] oder Quantenpunkten^[47] mit zwei oder mehr langwälligen Photonen und die Detektion der Emissionen bei kürzeren Wellenlängen (sogenannte Anti-Stokes-Emission). Zweiphotonenanregung^[48,49] und Frequenzverdopplung^[50] sind die am häufigsten verwendeten Anti-Stokes-Prozesse, erfordern jedoch eine hohe Photonenflussdichte, weil die gleichzeitige Absorption von zwei Photonen bzw. die Kombination von zwei Photonen äußerst seltene Ereignisse sind. Deswegen werden teure und leistungsstarke gepulste Laser benötigt, die aber wiederum nachteilige Wirkungen auf biologische Materialien haben können.

Photonen aufkonvertierende Nanopartikel (UCNPs) sind anorganische Nanokristalle, bei denen die Erzeugung einer Anti-Stokes-Emission unter günstigeren Bedingungen erfol-

gen kann. Ein kontinuierlicher Diodenlaser reicht aus, um die Absorption von zwei oder mehr Photonen langwälligen Lichts zu bewirken. UCNPs emittieren anschließend Licht einer kürzeren Wellenlänge mit einer großen Anti-Stokes-Verschiebung.^[51] Die effizientesten UCNPs, die bisher bekannt sind, bestehen aus einem hexagonalen NaYF_4 -Wirtgitter (Abbildung 2), das mit dreiwertigen Ytterbium- und

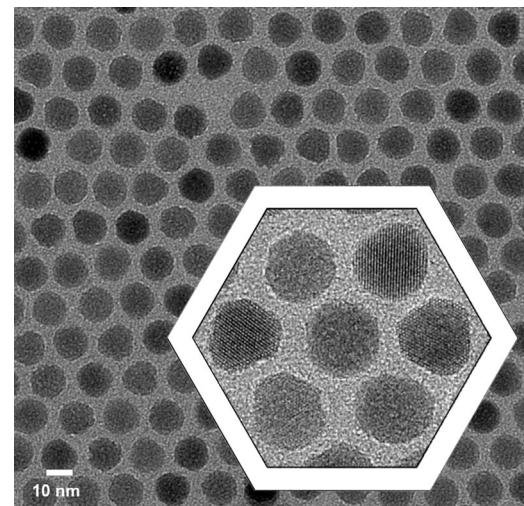


Abbildung 2. Transmissionselektronenmikroskopische (TEM)-Aufnahme von monodispersen UCNPs des Typs NaYF_4 : 30 % Gd, 18 % Yb, 2 % Er mit einer Vergrößerung von 75 000× (160 000× im vergrößerten Ausschnitt). Die hexagonale Kristallphase führt zu einer hexagonalen Form der einzelnen Nanopartikel, die sich in einem Wabenmuster anordnen (hervorgehoben im Ausschnitt).

Erbiumionen in geringer Konzentration dotiert ist (NaYF_4 : 20 % Yb, 2 % Er).^[52–55] Das hexagonale Wirtgitter richtet die dotierten Ionen optimal für einen Energietransfer-Aufkonversions-Mechanismus (energy transfer upconversion, ETU) zwischen den f-Orbitalen der Yb^{3+} - und Er^{3+} -Ionen aus, die weitgehend übereinstimmende Energiedifferenzen aufweisen.^[56] Außerdem hat das NaYF_4 -Wirtgitter eine geringe Phononenenergie, wodurch die Geschwindigkeit der Multiphononenrelaxation niedrig ist und die angeregten Zustände Lebenszeiten bis zu Millisekunden aufweisen können.^[57] Diese langlebigen, metastabilen Zustände der Lanthanoide erklären, warum die Sensibilisierung über ETU bis zu ca. 10^6 -mal effizienter ist als die simultane Zweiphotonenanregung.

NIR-Licht mit einer Wellenlänge von 980 nm befördert Elektronen des Sensibilisators Yb^{3+} im Grundzustand $^2\text{F}_{7/2}$ in den angeregten Zustand $^2\text{F}_{5/2}$ (entsprechend dem Spin-Orbit-Kopplungsschema von Russel und Saunders)^[58,59] mit einer Energiedifferenz von ungefähr 10^4 cm^{-1} (Abbildung 3). Der Aktivator Er^{3+} wird anschließend in zwei aufeinander folgenden Energietransferschritten mit einer ähnlichen Energiedifferenz wie Yb^{3+} sensibilisiert. Zuerst werden Elektronen des Grundzustands $^4\text{I}_{15/2}$ in den metastabilen Zustand $^4\text{I}_{11/2}$ angehoben. Wegen seiner langen Lebenszeit ist eine starke Besetzung des $^4\text{I}_{11/2}$ -Zustands möglich, was einen zweiten Energietransferschritt zur Besetzung der $^4\text{F}_{7/2}$ -Multiplizität ermöglicht. Nach Multiphononenrelaxation emittiert das Er^{3+} -Ion grünes Licht vom Zustand $^2\text{H}_{11/2}$ (521 nm) oder $^4\text{S}_{3/2}$

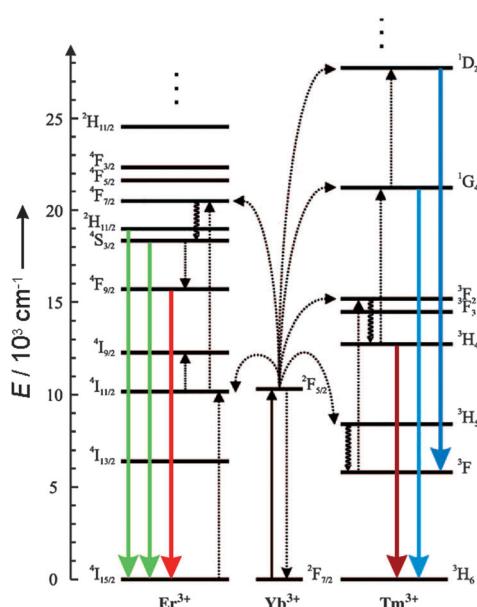


Abbildung 3. Schematisches Energienivea-Diagramm der Anti-Stokes-Prozesse in UCNPs des Typs $\text{NaYF}_4\text{:Yb,Tm/Er}$. Eingeschlossen in einem hexagonalen NaYF_4 -Nanokristall fungiert Yb^{3+} als Sensibilisator, der NIR-Licht absorbiert, und Er^{3+} oder Tm^{3+} als Aktivatoren, die sichtbares oder nahinfrarotes Licht emittieren. Durchgehende Pfeile zeigen die Strahlungsübergänge, gepunktete Pfeile die strahlungsgesetzlichen Übergänge und die gebogenen Pfeile Multiphononenrelaxation. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [53].

(543 nm). Zusätzliche Relaxationsschritte führen zur Besetzung des ${}^4\text{F}_{9/2}$ -Zustands; das Er^{3+} -Ion emittiert dann rotes Licht (657 nm). Dementsprechend zeigt das Emissionsspektrum von UCNPs des Typs $\text{NaYF}_4\text{:Yb,Er}$ hauptsächlich zwei in grün und rot gut getrennte Emissionslinien.

Konventionelle organische Fluorophore weisen breite Emissionsbanden auf, die sich abhängig von der chemischen Umgebung zu längeren oder kürzeren Wellenlängen verschieben können. Dagegen sind die Emissionslinien der UCNPs sehr schmal und verschieben sich nicht, da die für den Energietransfermechanismus relevanten elektronischen Übergänge innerhalb der inneren, von der Umgebung abgeschirmten f-Orbitale erfolgen. Die schmalen Emissionsbanden oder -linien der Lanthanoide ermöglichen sowohl eine größere Zahl als auch eine erhöhte Stabilität von Codes im sichtbaren Spektrum als die breiten und überlappenden Emissionsbanden der organischen Fluorophore. Diese Vorteile der Lanthanoide wurden bereits früher zur Entwicklung von Lanthanoid-dotierten Mikrostrichcodes im klassischen Abkonversionsmodus verwendet.^[60] Es ist zu beachten, dass die absoluten Emissionsintensitäten der UCNPs abhängig von der Herstellung in gewissem Maße variieren. Allerdings können diese Abweichungen vermieden werden, indem nur UCNPs aus einer einzigen Großsynthese verwendet werden. Darüber hinaus sind der Energietransfermechanismus und die Emissionsintensitäten der UCNPs abhängig von der Temperatur, was für die Entwicklung von Nanothermometern genutzt wurde.^[61–63]

Eine dritte Art von Schwankungen in der Lumineszenzintensität der UCNPs wird durch Oberflächeneffekte verur-

sacht.^[64] Nahe an der Oberfläche befindliche Aktivatorionen kommen in Kontakt mit Lösungsmittelmolekülen, die die Emission löschen können. Vor allem Wasser übt wegen seiner hohen Stretschwingsenergien, die zu strahlungsgesetzlichen Relaxationsprozessen führen, einen starken Löscheffekt aus.^[65] In Er^{3+} -dotierten UCNPs beispielsweise stimmen die Schwingungsmodi von Wasser (ca. 3500 cm^{-1}) nahezu mit der Energiedifferenz der Übergänge zwischen dem ${}^4\text{I}_{11/2}$ - und dem ${}^4\text{I}_{13/2}$ -Zustand überein,^[65] was ein Zwischenschritt für die Emission von rotem Licht ist. Deshalb erscheint die rote Emission verstärkt, wenn UCNPs in Wasser suspendiert vorliegen. Allgemein führt der starke Löscheffekt von Wasser zu der ungünstigen Situation, dass UCNPs in organischen Lösungsmitteln heller als in Wasser sind, in einem biologischen Zusammenhang jedoch wässrige Suspensionen eindeutig die größte Rolle spielen. Auch Schwermetalle und bestimmte Anionen können die Emission von UCNPs löschen.^[66]

Die Herstellung kleinerer UCNPs führt normalerweise zu verstärkten Löscheffekten auf der Oberfläche, da das Volumen stärker mit dem Radius abnimmt als die Oberfläche. Demgegenüber sind für viele bioanalytische Anwendungen kleine UCNPs erforderlich. Eine elegante Möglichkeit, Löscheffekte auf der Oberfläche zu minimieren und die Aufkonvertierungseffizienz zu maximieren, ist die Umhüllung der UCNPs mit einer dünnen Schicht Wirtsmaterials (NaYF_4), wodurch sich keine Dotierungen auf der Oberfläche der UCNPs mehr befinden.^[67–69] Ein ähnlicher Effekt kann durch die Beschichtung der UCNPs mit einer Siliciumoxidhülle erreicht werden.^[70] Solche Beschichtungen bieten zusätzliche Vorteile, die in Abschnitt 6 diskutiert werden.

3. Einstellung mehrerer Farben durch die Materialzusammensetzung von UCNPs

Der modulare Aufbau von Sensibilisatoren und Aktivatoren in einem gemeinsamen Wirtsgitter ermöglicht die Entwicklung eines kombinatorischen Codes mit verschiedenen Farben. Der Dotand Yb^{3+} kann wegen seines einzigen, vorherrschenden Energieübergangs von ${}^2\text{F}_{7/2}$ zu ${}^2\text{F}_{5/2}$ genutzt werden, um gezielt NIR-Licht zu absorbieren und Aktivatorionen zu sensibilisieren, die diskrete Emissionslinien aufweisen. Die Farbcodierung lässt sich durch die Wahl des Aktivators und seiner Konzentration im NaYF_4 -Gitter justieren. Dabei müssen jedoch die allgemeinen Grenzen der Fluorometrie berücksichtigt werden. Wie im Gesetz von Parker gezeigt [Gl.(2)], hängt die gemessene Fluoreszenzin-

$$F = I \varepsilon c l QY k \quad (2)$$

tensität F ab von a) der Intensität I des Anregungslichts, b) dem molaren Extinktionskoeffizienten ε bei der Anregungswellenlänge, c) der Konzentration des Luminophors (UCNP), d) der optischen Weglänge l in der Probe, e) der Quantenausbeute QY des Luminophors und f) verschiedenen geometrischen Faktoren k .

Es ist noch schwieriger, die nichtlineare Lumineszenzintensität der UCNPs zu standardisieren, da deren Quantenausbeute abhängig von der Anregungsintensität zunimmt.^[71–74] Die beiden Emissionslinien Er^{3+} -dotierter UCNPs beispielsweise können mit zunehmender Intensität des Anregungslichts jeweils eine unterschiedliche Leistungsabhängigkeit aufweisen. Beobachtungen zeigen, dass die grüne Emission von Er^{3+} mit einem Exponenten von 2.0 und die rote Emission mit einem Exponenten von 2.4 in Bezug auf die Anregungslichtintensität zunimmt.^[75] Dieser Effekt fällt jedoch nur ins Gewicht, falls sich die Anregungsenergie in hohem Maße verändert.

Eine Methode, variierende Anregungsintensitäten zu berücksichtigen, besteht in der Verwendung eines internen Referenzsignals. In diesem Fall wird das Wirtgitter mit zwei oder mehr Aktivatorionen dotiert. Das erste Aktivatorion liefert ein konstantes Referenzsignal, während das Signal des zweiten Aktivatorions zur Codierung dient. Um diese ratiometrische Codierungsstrategie zu verdeutlichen, haben wir UCNPs des Typs $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm,Er}$ verwendet, wobei Yb^{3+} als Sensibilisator, Tm^{3+} als Aktivator für das konstante Referenzsignal (blaue Emission) und Er^{3+} als Aktivator für das einstellbare Codierungssignal (grüne und rote Emission; Abbildung 4) fungieren.^[76] Die Emission von Er^{3+} sollte bevorzugt als Codierungssignal verwendet werden, weil seine Intensität bei einer optimalen Dotierungskonzentration von 0.5% höher und somit über einen größeren Bereich einstellbar ist als die Intensität der blauen Emission von Tm^{3+} .

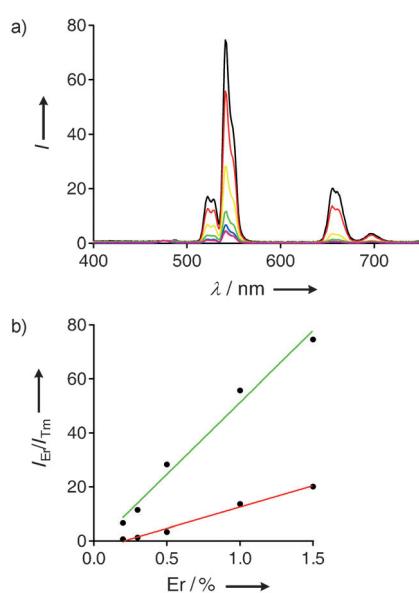


Abbildung 4. a) Einstellen der Intensität einzelner Emissionslinien durch die Dotierung von UCNPs des Typs $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}$ mit verschiedenen Konzentrationen des Aktivatorions Er^{3+} . Während die Konzentration an Tm^{3+} für ein konstantes Referenzsignal gleich gehalten wird, wird die Konzentration an Er^{3+} schrittweise von 0.01% (violette Linie) auf 1.5% (schwarze Linie) erhöht, um die Intensität der grünen und der roten Emission zu steigern. Die Spektren sind normiert auf die blaue Emission von Tm^{3+} bei 475 nm. b) Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen den normierten Signalintensitäten ($I_{\text{Er}}/I_{\text{Tm}}$) und der Er^{3+} -Konzentration sowohl bei der grünen als auch bei der roten Emission (in den entsprechenden Farben gekennzeichnet).

Die Dotierungskonzentration von Er^{3+} wurde schrittweise von 0.01 auf 1.5% erhöht, um einen Satz von sieben Codes zu erhalten.

Bei einer ratiometrischen Codierung wird die absolute Signalintensität i aus Gleichung (1) durch das Verhältnis von I_{code} zu I_{ref} ersetzt. Die Zahl w der für die Analytik nutzbaren Wellenlängen kann durch die Wahl verschiedener Aktivatorionen ai festgelegt werden. Weil die Emission eines Aktivatorions als konstantes Referenzsignal benötigt wird, das vom Hintergrund unterscheidbar sein muss, kann der Codierungsumfang C der UCNPs mit Gleichung (3) beschrieben werden.

$$C_{\text{UCNP}} = \left(\frac{I_{\text{code}}}{I_{\text{ref}}} \right)^{(ai-1)} \quad (3)$$

Die schmalen Emissionslinien der UCNPs ermöglichen es, wesentlich mehr Codes im sichtbaren Spektralbereich unterzubringen, als dies bei konventionellen organischen Fluorophoren mit ihren breiten Emissionsbanden der Fall ist. In der Praxis ist die Zahl der für die Codierung geeigneten Emissionslinien begrenzt, da die Emission von Übergängen zwischen diskreten Energieniveaus abhängt. Die normalerweise verwendeten Emissionslinien von Er^{3+} , Tm^{3+} und Ho^{3+} reichen jedoch aus, um einen großen Satz von Codes zu erhalten. Ein Blick auf die Gesamtfarbe aller Emissionslinien zeigt, dass ein durchgängiges Spektrum des sichtbaren Lichts erreicht werden kann (Abbildung 5).^[77] Kürzlich wurde ein neuer Energiemigrationsmechanismus in Kern-Schale-UCNPs mit den Aktivatorionen Tb^{3+} , Eu^{3+} , Dy^{3+} und Sm^{3+} beschrieben,^[78] deren zusätzliche Emissionslinien den Codierungsumfang von UCNPs weiter erhöhen.

Anstatt die Intensität des codierenden Signals schrittweise zu erhöhen, kann auch die komplexe Signatur der Mehrfachemission der UCNPs als „Strichcode“ verwendet werden. Jede Dotanden Zusammensetzung definiert somit einen charakteristischen Strichcode. Diese Codierungsstrategie wurde zur Analyse mehrerer Bioanalyten von Nann und Mitarbeitern entwickelt.^[79] UCNPs, die mit Siliciumoxid beschichtet waren und einen Durchmesser von 20 nm hatten, wurden mit verschiedenen Aktivatorionen dotiert, um einen Satz von vier Strichcodes zu erhalten: a) $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$ für blaues, grünes, rotes und IR-Licht, b) $\text{NaYbF}_4:\text{Er}$ für grünes und rotes Licht, c) $\text{NaYbF}_4:\text{Tm}$ für blaues und NIR-Licht und d) $\text{NaYbF}_4:\text{Ho}$ für grünes Licht. Auch nach Mischung aller vier Strichcodes waren sie leicht voneinander zu unterscheiden. Dieses Strichcodesystem ist stabil, aber die Zahl der Codes ist durch die Zahl an verfügbaren Aktivatorionen begrenzt. Mehr Strichcodes können erhalten werden, wenn verschiedene Aktivatorionen, die jeweils eine charakteristische Signatur von mehreren Emissionslinien aufweisen, relativ zueinander variiert werden, ähnlich wie bei ratiometrischer Codierung. In diesem Fall definieren die relativen Intensitäten der Signaturen den Code.

Nicht nur die Signatur als Ganzes, sondern auch die Intensitäten einzelner Emissionslinien eines Aktivatorions können durch die Temperatur während der Synthese,^[80,81] die Wahl des Lösungsmittels für die Synthese^[82] oder eine zusätzliche Dotierung mit Ce^{3+} ,^[83] Dy^{3+} ,^[84] oder Alkalimetall-

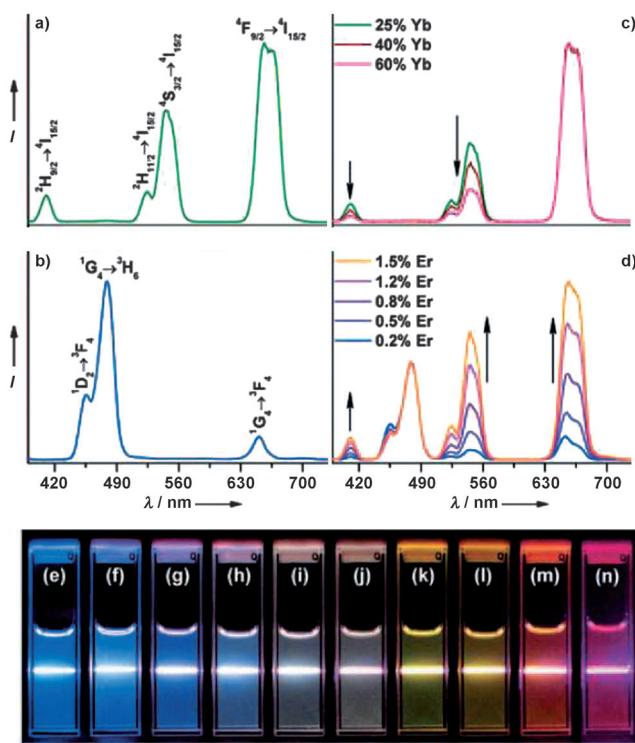


Abbildung 5. Emissionsspektren von UCNPs in Ethanol unter Anregung bei 980 nm: a) NaYF_4 : 18 % Yb^{3+} , 2 % Er^{3+} ; b) NaYF_4 : 20 % Yb^{3+} , 0.2 % Tm^{3+} ; c) NaYF_4 : 25–60 % Yb^{3+} , 2 % Er^{3+} ; d) NaYF_4 : 20 % Yb^{3+} , 0.2 % Tm^{3+} , 0.2–1.5 % Er^{3+} . Die Fotos zeigen die Gesamtemission der UCNPs: e) NaYF_4 : 20 % Yb^{3+} , 0.2 % Tm^{3+} ; f–j) NaYF_4 : 20 % Yb^{3+} , 0.2 % Tm^{3+} , 0.2–1.5 % Er^{3+} ; k–n) NaYF_4 : 18–60 % Yb^{3+} , 2 % Er^{3+} . Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [77]. Copyright 2008 American Chemical Society.

ionen^[85] eingestellt werden. Der Einsatz von KMnF_3 anstatt KYF_4 als Wirtgitter für Yb/Er führt zu UCNPs, die nur eine einzige Emissionslinie aufweisen.^[86] Die flexible Einstellung der Signaturen ermöglicht es, einen großen Satz charakteristischer Strichcodes zu erhalten. Die Gruppen von Zhang und Stucky^[87] fertigten beispielsweise Strichcodes aus Kern-Schale-UCNPs mit variierbarem Kernmaterial. Im Kern wurde das NaYF_4 -Wirtgitter mit unterschiedlichen Kombinationen aus Yb^{3+} , Ho^{3+} und Tm^{3+} dotiert, während die Schale aus reinem NaYF_4 bestand. Solche Partikel ($\text{NaYF}_4\text{:Yb, Ho, Tm@NaYF}_4$) ergaben zehn unterscheidbare Signaturen. Mit einem Modellassay zur Hybridisierung von DNA wurde gezeigt, dass die charakteristischen Signaturen dieser UCNPs als Strichcodes verwendet werden können. Außerdem wurden UCNPs aus Lanthanoid-dotierten Oxiden als Strichcodes für Immunassays verwendet.^[88]

Multiplexassays, wie Durchflusszytometrie oder Femtoliterarrays, basieren auf Mikrosphären, die einen ca. 100-fach größeren Durchmesser als UCNPs haben. Solange die Emissionslinien spektral auflösbar sind, können Mikrosphären mit zwei oder mehr codierten UCNPs beladen werden. Auf diese Weise kann der Codierungsumfang für die Mehrfachdetektion von Bioanalyten exponentiell erhöht werden. Normalerweise werden Polymermikrosphären mit organischen Fluorophoren^[25] oder Quantenpunkten^[26] beladen, um

ihre Signalintensität zur Codierung einzustellen. Die exakte quantitative Beladung der Polymermikrosphären ist jedoch anspruchsvoll. Dagegen sind ratiometrische Codes von UCNPs, die auf die Mikrosphären geladen werden, resistent gegen Schwankungen in der Beladungseffizienz. Dieses Prinzip wurde vor kurzem mit Lanthanoid-dotierten abkonvertierenden Nanopartikeln demonstriert.^[89] Mit einer automatisierten Mikrofluidikvorrichtung wurden verschiedene Mengen an Dy^{3+} - oder Sm^{3+} -dotierten Nanopartikeln jeweils mit einer konstanten Menge an Eu^{3+} -dotierten Nanopartikeln in Polyethylenglycol(PEG)-Diacrylat gemischt. Nach der Photopolymerisierung entstanden hydrophile Mikrosphären aus PEG-Acrylat-Polymer mit einer homogenen Größe, die 24 unterschiedliche Codes trugen (Abbildung 6). Diese Codes ließen sich mit einer kleineren Fehlerrate als 0.1 % voneinander unterscheiden. Die Methode kann leicht für die Aufkonversionscodierung angepasst werden.

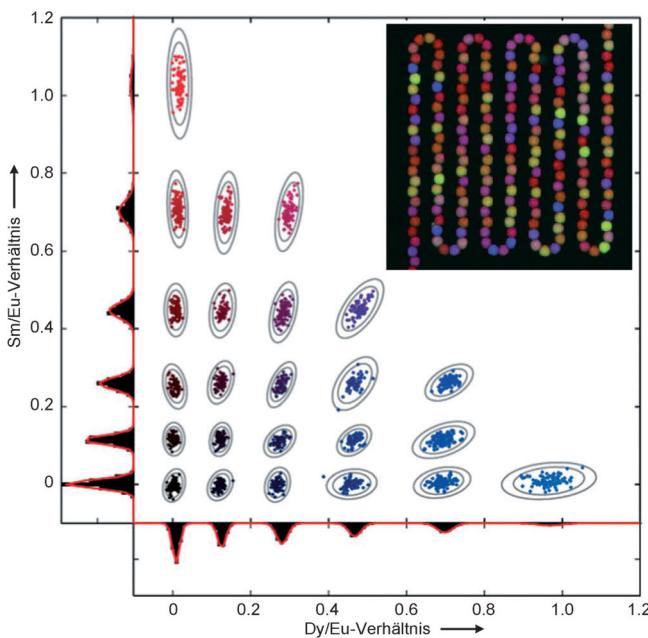


Abbildung 6. Matrix aus codierten Polymermikrosphären. Kristalline YVO_4 -Nanopartikel wurden entweder mit Dy^{3+} relativ zu Eu^{3+} oder mit Sm^{3+} relativ zu Eu^{3+} dotiert. Beide Arten von abkonvertierenden Nanopartikeln wurden auf Mikrosphären geladen, und jeder Punkt des Streudiagramms repräsentiert eine Mikrosphäre. Jede codierte Mikrosphäre kann in einem eng begrenzten Feld lokalisiert werden, und es gibt keine Überschneidung mit Mikrosphären, die eine andere Codierung tragen. Die Verhältnisse der Dy^{3+} - und Eu^{3+} -Emission sowie der Sm^{3+} - und Eu^{3+} -Emission sind als Histogramm entlang der jeweiligen Achsen eingezeichnet. In den Histogrammen sind alle Codes zusammen gruppiert. Der Ausschnitt zeigt Mikrosphären, die unterschiedliche Codes (in Falschfarben) tragen, in einem Mikrofluidikkanal. Adaptiert mit Genehmigung aus Lit. [89]. Copyright 2012 The Royal Society of Chemistry.

4. Einstellung mehrerer Farben durch Beschichtung der Oberfläche von UCNPs mit Farbstoffen

Statt die Zusammensetzung des aufkonvertierenden Materials zu ändern, kann man auch die Oberfläche der UCNPs

so beschichten, dass bestimmte Emissionslinien herausgefiltert werden. Diese Strategie ist vor allem effektiv bei UCNPs, die zwei Hauptemissionen aufweisen, wie $\text{NaYF}_4\text{:Yb,Er}$ (grün und rot) oder $\text{NaYF}_4\text{:Yb,Tm}$ (blau und NIR). Eine der beiden Emissionslinien kann selektiv reabsorbiert werden, indem die in der Beschichtung enthaltene Menge eines organischen Farbstoffs^[90] oder von Goldnanopartikeln^[91] eingestellt wird. Die zweite Emission wird dagegen nicht reabsorbiert und kann als Referenzsignal genutzt werden. Beispielsweise wurde die grüne Emissionslinie von UCNPs des Typs $\text{NaYF}_4\text{:Yb,Er}$ in zehn Schritten angepasst, indem die Nanopartikel mit unterschiedlichen Mengen des violetten Farbstoffs Rhodamin B beschichtet wurden. Jedes Intensitätsniveau wurde anschließend verwendet, um einen Code I_{code} zu definieren (Abbildung 7a). Da das Absorptionspektrum von Rhodamin B keinen Überlapp mit der roten Emissionslinie der UCNPs aufweist, fungierte die Intensität der roten Emission als konstantes Referenzsignal I_{ref} .

Die Absorption durch Rhodamin B auf der Oberfläche der UCNPs kann durch Gleichung (4) analog zum Lambert-Beerschen Gesetz beschrieben werden, wobei – für eine

$$-\log\left(\frac{I_c}{I_0}\right) = ac \quad (4)$$

einzelne (grüne) Emissionslinie des UCNPs – I_0 der Intensität der ungefilterten Emission entspricht und I_c die durch eine gegebene Konzentration c an Rhodamin B auf der Nanopartikeloberfläche gefilterte Emissionsintensität darstellt. Die Absorption a durch Rhodamin B hängt von der Wellenlänge λ , der Dicke der Oberflächenbeschichtung und der Mikroumgebung ab. Wenn jedoch die konstante rote Emission der UCNPs als internes Referenzsignal für die gefilterte grüne Emission eingesetzt wird, ändert sich Gleichung (4) zu Gleichung (5), wobei I_{ref} die Intensität der ungefilterten roten

$$-\log\left(\frac{I_{\text{code}}}{I_{\text{ref}}}\right) = ac \quad (5)$$

Emission und I_{code} die Intensität der gefilterten grünen Emission ist. Ein Satz von zehn ratiometrischen Codes wurde aus dem linearen Zusammenhang $-\log(I_{\text{code}}/I_{\text{ref}})$ abgeleitet. Das Codierungssignal und das Referenzsignal sind austauschbar: Wenn die Beschichtung aus einem blaugrünen Farbstoff anstelle des violetten Farbstoffs Rhodamin B besteht, wird die rote Emission gezielt reabsorbiert, um das Codierungssignal I_{code} anzupassen, während die grüne Emission als Referenzsignal I_{ref} wirkt. UCNPs des Typs $\text{NaYF}_4\text{:Yb,Tm}$ (Abbildung 7b) zeigen vorwiegend blaue und NIR-Emissionslinien, die gut voneinander getrennt sind und deren Intensitäten sich durch eine Farbstoffbeschichtung mit überlappenden Absorptionsspektren einzeln einstellen lassen. Beispielsweise wurde Fluorescein verwendet, um die blaue Emission gezielt abzuschirmen, während ein langwellig absorbierender Farbstoff^[45] eingesetzt wurde, um die NIR-Emission abzuschirmen. In beiden Fällen wirkte die ungefilterte zweite Emission als internes Referenzsignal, um ratiometrische Codes zu erhalten.

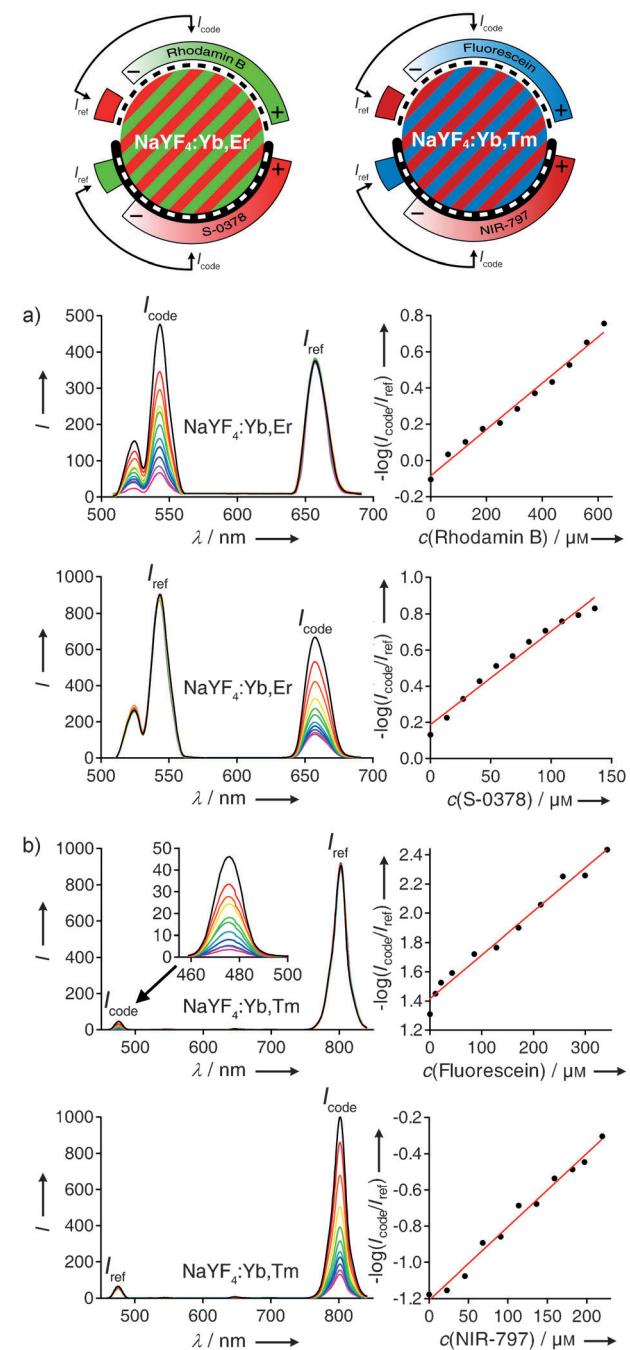


Abbildung 7. Differentielle Einstellung der Emissionsintensitäten von UCNPs durch einen organischen Farbstoff. a) UCNPs des Typs $\text{NaYF}_4\text{:Yb,Er}$ sind mit unterschiedlichen Konzentrationen von Rhodamin B (oben) oder von Farbstoff S-0378 (unten) umhüllt. Die Konzentration an Rhodamin B wird in zehn Schritten erhöht, um die grüne Emission ($\lambda_{\text{max}} = 543 \text{ nm}$) gezielt immer stärker zu reabsorbieren, während die rote Emission ($\lambda_{\text{max}} = 657 \text{ nm}$) konstant bleibt. Ein linearer Zusammenhang ergibt sich bei der Auftragung von $-\log(I_{\text{code}}/I_{\text{ref}})$ gegen die Konzentration an Rhodamin B. Alternativ kann die Intensität der NIR-Emission selektiv durch den Farbstoff S-0378 eingestellt werden. b) UCNPs des Typs $\text{NaYF}_4\text{:Yb,Tm}$ zeigen zwei Emissionslinien, die einzeln eingestellt werden können, entweder durch Fluorescein zur Reduktion der blauen Emission ($\lambda_{\text{max}} = 475 \text{ nm}$) oder durch den Farbstoff NIR-797 zur Reduktion der NIR-Emission ($\lambda_{\text{max}} = 802 \text{ nm}$). Adaptiert mit Genehmigung aus Lit. [90].

Die beiden Emissionslinien von UCNPs des Typs $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ zeigen nahezu die gleiche Intensität, aber die NIR-Emission von $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$ ist ungefähr 25-mal intensiver als die blaue Emission. In solchen Fällen ist es besser, die starke NIR-Emission durch eine Filterbeschichtung anzupassen und die blaue Emission als Referenzsignal zu verwenden. Auf diese Weise vermeidet man die Detektion eines sehr schwachen Signals, das aus der Abschirmung der ohnehin schon schwachen blauen Emission resultiert.

Außer als Filter für die Emission der UCNPs können organische Farbstoffe auch als zusätzliche Codierungselemente fungieren. Li et al.^[92] überzogen UCNPs des Typs $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}/\text{Tm}$ beispielsweise mit einer dünnen Siliciumoxidschicht, die Fluorophore oder Quantenpunkte enthielt. In diesem Fall wirkten die UCNPs als Energiedonor für einen resonanten Lumineszenzenergietransfer (LRET) zu Fluorescein, Tetramethylrhodamin oder Quantenpunkten. Das Emissionsspektrum dieser Kern-Schale-Nanopartikel änderte sich, da die ursprüngliche Lumineszenz der UCNPs gelöscht wurde und neue Emissionslinien erschienen, die charakteristisch für den Farbstoff in der Siliciumoxidschicht sind. Die kombinierten Emissionslinien können als eindeutige Strichcodes verwendet werden. Ein ähnlicher Ansatz wurde vor kurzem für die In-vivo-Bildgebung verwendet.^[93] Außerdem können die Farbstoffe direkt durch sichtbares Licht angeregt werden, wie bei etablierten Codierungsstrategien, die auf Mikrosphären beruhen.^[25] Somit lassen sich zwei spektrale Signaturen erzeugen: eine durch Anregung mit sichtbaren Licht und die andere durch NIR-Anregung für die Aufkonversion. Kürzlich wurde ein organischer Farbstoff als Antenne für UCNPs verwendet, der einen breiten Bereich des nahinfraroten Lichts absorbiert und die Aufkonvertierungseffizienz stark erhöht.^[94] Die Anpassung von Antennenfarbstoffen auf UCNPs bietet einen zusätzlichen Codierungsweg. Die Kombination all dieser Eigenschaften als Codierungsparameter wird die Zahl der möglichen Codes exponentiell steigern.

5. Multiparametercodierung

Die Intensität der mehrfachen Emissionslinien ist nicht der einzige Parameter der UCNPs, der für eine ratiometrische Mehrfachcodierung geeignet ist. Die Lebenszeit der Lumineszenz kann relativ einfach mit modernen Instrumenten bestimmt werden. Die Lebenszeit ist ein interessanter zusätzlicher Parameter für das Multiplexing, da sie anders als die Intensität [siehe das Gesetz von Parker, Gl. (2)] weder von der Intensität des Anregungslichts noch von der Empfindlichkeit des Detektors abhängt. Somit ist sie ein intrinsisch selbstreferenzierter Parameter.^[95] Organische Fluorophore und Quantenpunkte haben normalerweise kurze Lebenszeiten (im Bereich von 0.1 bis 20 ns), die schwerer zu bestimmen sind als längere Lebenszeiten.^[28] Dagegen haben UCNPs langlebige, metastabile Zustände mit Abklingzeiten im Bereich von μs bis mehrere ms, weil f-f-Übergänge der Elektronen aus Symmetriegründen verboten und deswegen weniger wahrscheinlich sind.^[57,96]

Die langen Abklingzeiten von UCNPs können effizient von der kurzlebigen Autofluoreszenz biologischen Materials getrennt werden, wenn die Signalaufzeichnung in definierten Zeitfenstern erfolgt. Abkonvertierende Nanopartikel des Typs $\text{NaYF}_4:\text{Ce},\text{Tb}$, die durch UV-Licht angeregt und sichtbares Licht emittieren, ermöglichen die Verwendung von Zeit-aufgelöstem LRET für bioanalytische Anwendungen (Abbildung 8).^[97,98] Es ist jedoch nicht nötig, Hintergrundsignale durch zeitaufgelöste Messungen abzutrennen, wenn UCNPs verwendet werden, da ihre Anregung durch NIR-Licht erst gar nicht zu Autofluoreszenz führt. Vielmehr bietet die große Bandbreite an Lebenszeiten, die spezifisch für jede Art von UCNPs sind, einen großen Satz an mehrparametrischen Signaturen für eine neue Codierungsdimension, die weit über die Intensitäts-basierte Codierung hinausgeht.

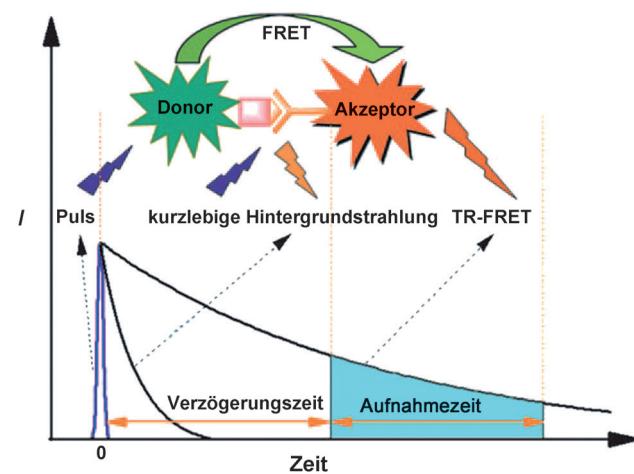


Abbildung 8. Das Prinzip des zeitaufgelösten LRET – häufig als resonanter Fluoreszenzenergietransfer (FRET) bezeichnet – für die Bioanalytik. Der Energietransfer von einem abkonvertierenden Nanopartikel des Typs $\text{NaYF}_4:\text{Ce},\text{Tb}$ verlängert die Lumineszenzlebenszeit des kurzlebigen, organischen Farbstoffs, der an die Nanopartikeloberfläche gebunden ist. Das zeitaufgelöste LRET-Signal wird nach der Anregung zeitversetzt in einem definierten Zeitfenster gemessen. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [97].

Der zweite Ansatz für eine mehrparametrische Codierung beruht auf der Kombination von UCNPs mit anderen Materialien zu Hybridnanopartikeln mit zusätzlichen Eigenschaften wie Magnetismus. Magnetische UCNPs können durch Magnetkraft^[99] getrennt werden oder als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie (MRT) wirken.^[100] Es wurden zwei Arten magnetischer UCNPs unterschieden: Ferromagnetische Materialien wie Eisenoxid (Ferrit, Fe_3O_4) werden superparamagnetisch, wenn sie unterhalb einer kritischen Größe als Nanopartikel vorliegen. Anders als das Volumenmaterial haben superparamagnetische Nanopartikel kein permanentes magnetisches Moment, sondern sind nur solange magnetisch, wie ein externes magnetisches Feld angelegt ist. Diese Reversibilität ist entscheidend, um eine Aggregation der Nanopartikel zu verhindern. Superparamagnetische UCNPs wurden hergestellt, indem entweder eine lumineszierende Hülle aus $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ um einen Fe_3O_4 -Kern synthetisiert wurde,^[101] UCNPs mit Fe_3O_4 gemeinsam in

eine Siliciumoxidhülle eingeschlossen wurden^[102] oder superparamagnetische Nanopartikel an die Oberfläche der UCNPs konjugiert wurden.^[103, 104]

Paramagnetische Materialien werden häufig in der MRT eingesetzt.^[105] Gadolinium(III) ist das effizienteste Kontrastmittel, da es die größte Zahl an ungepaarten Elektronen (sieben) hat und seine langen Relaxationszeiten die Relaxationsrate der umgebenden ¹H-Kerne in Wasser erhöhen.^[106] Paramagnetische Kontrastmittel sind nur effektiv bei direktem Kontakt mit Wasser und werden daher typischerweise in Form von Chelaten verwendet.^[106] Nach diesem Schema wurden Gd³⁺-Chelate an die Oberfläche von UCNPs angeknüpft, um paramagnetische Hybridnanopartikel herzustellen.^[107] Alle Lanthanoidionen haben ähnliche Atomradien, und daher kann Gd³⁺ als zusätzlicher Dotand in einen NaYF₄-Nanokristall integriert werden. Beispielsweise wurde eine Gd³⁺-Dotierung verwendet, um die Größe von UCNPs zu steuern^[108, 109] oder um abkonvertierende Nanopartikel mit UV-Licht anzuregen.^[110] Die paramagnetischen Eigenschaften des Codotanden Gd³⁺ ermöglichen es sogar, das Wachstum von UCNPs mithilfe von Magnetresonanzspektroskopie zu analysieren.^[111]

Mit Gd³⁺ dotierte paramagnetische UCNPs bieten eine weitere Dimension für multimodale Bildaufnahmen.^[112] Hyeon et al.^[100] erhöhten die Konzentration an Gd³⁺ in NaYF₄-Nanokristallen schrittweise von 0 auf 12.8 nm, um das MRT-Signal in sieben Stufen einzustellen. Nachdem paramagnetische UCNPs mit Zellen inkubiert worden waren, war ihr MRT-Kontrast stark erhöht. Die Gruppe von Prasad^[113] dotierte NaYF₄-Nanokristalle mit Gd³⁺-Konzentrationen von 0, 2, 5 und 10 nm und fand eine lineare Abhängigkeit der Kontrastverstärkung von der Gd³⁺-Konzentration. Diese Beziehung ist analog zur linearen Abhängigkeit des Lumineszenzsignals von der Konzentration des Aktivatorions Er³⁺ (Abbildung 4). Infolgedessen stellt das über einen weiten Bereich einstellbare Magnetresonanzsignal unserer Meinung nach eine vielversprechende neue Codierungsdimension dar. Eine weitere Art der bimodalen Bildgebung wurde durch die Kombination der Aufkonversion mit der Röntgencomputertomographie (CT) ermöglicht. In diesem Fall fungierten UCNPs, die zusätzlich mit Yb³⁺ dotiert waren^[114] oder an die Iod angebracht war,^[115] als CT-Kontrastmittel. Sogar trimodale Hybridpartikel wurden hergestellt, indem der lumineszierende NaYF₄:Yb,Er-Kern mit Gd³⁺ als MRT-Kontrastmittel und mit ¹⁸F als radioaktives Isotop für die Emissions tomographie modifiziert wurde.^[116] Der modulare Zusammenbau der UCNPs lässt genügend Spielraum für die Einführung neuer Materialeigenschaften, die eine Multiparametercodierung für Hochdurchsatzverfahren ermöglichen.

6. Synthese und Oberflächenmodifizierung biokompatibler UCNPs

Bioanalytische Anwendungen erfordern die Verfügbarkeit von UCNPs, die klein, in Wasser dispergierbar, nicht toxisch und für (stabile) Oberflächenfunktionalisierungen geeignet sind, sowie eine hohe Aufkonvertierungseffizienz

aufweisen. Die Optimierung dieser Parameter ist immer noch ein reges Forschungsgebiet, und derzeit sind keine UCNPs verfügbar, die all diese Voraussetzungen erfüllen.^[117] Es gibt bereits Aufsätze über die Routen zur Synthese verschiedener UCNPs.^[41–43] Helle UCNPs, die auf einem NaYF₄-Wirtgitter basieren, wurden durch Copräzipitation von Lanthanoidsalzen,^[53, 118] thermale Zersetzung von Lanthanoidtrifluoracetaten,^[119, 120] solvothermale,^[54, 121, 122] hydrothermale^[121, 123] oder ionothermale Synthesen^[124] hergestellt. Die solvothermale Synthese in Ölsäure und Octadecen hat sich zur bevorzugten Syntheseroute entwickelt, da sie einfach ist, sehr monodisperse Nanopartikel ergibt, keine toxischen Nebenprodukte anfallen und kein zusätzlicher Erhitzungsschritt notwendig ist, um die effizientere hexagonale Phase zu erhalten. Die zelluläre Bildgebung erfordert besonders kleine UCNPs (< 10 nm im Durchmesser), um eine freie Zugänglichkeit zu intrazellulären Bereichen und eine bessere Ausscheidung zu ermöglichen.^[125] Es ist jedoch wegen verschiedener Löscheffekte, die in Abschnitt 2 diskutiert wurden, schwierig, UCNPs zu synthetisieren, die sowohl klein sind als auch eine hohe Aufkonvertierungseffizienz aufweisen. Erst kürzlich ist es gelungen, den Durchmesser der UCNPs auf unter 10 nm zu reduzieren, indem verschiedene Codotanden wie Yb³⁺^[126] oder Gd³⁺^[108, 127] in die Wirtmatrix eingebracht wurden oder indem Oleylamin zur Reaktionsmischung hinzugefügt wurde.^[109, 128]

Die solvothermale Synthese in Ölsäure ergibt UCNPs, die mit einer Schicht aus Ölsäure bedeckt sind. Solche Partikel sind nur in organischen Lösungsmitteln dispergierbar und müssen weiter modifiziert werden, bevor sie in wässrigen Lösungen verwendet werden können.^[42] Zudem ist für weitere Biokonjugationsschritte gegebenenfalls eine Oberflächenmodifizierung erforderlich.^[129] In Wasser dispergierbare UCNPs, die zugleich für die Biokonjugation geeignet sind, erhält man entweder durch Veränderung der Ölsäure oder durch Silanisierung auf der Oberfläche. Ölsäure oder andere hydrophobe Liganden auf der Oberfläche von UCNPs können mithilfe von Ligandenaustausch durch kleine hydrophile Liganden wie Hydroxyethylidiphosphonsäure,^[130] Adipinsäure,^[131] Zitronensäure^[75] oder Polymere ersetzt werden.^[65, 132–135] Alternativ können amphiphile Blockcopolymeren^[68, 136] oder Phospholipide^[137] über hydrophobe Wechselwirkungen an die Oberflächenschicht aus Ölsäure adsorbiert werden. Ölsäure kann spezifisch an ihrer ungesättigten C=C-Bindung durch ein Lemieux-von-Rudloff-Reagens^[138] oder durch Ozonolyse^[104] oxidiert werden, um Azelainsäure auf der Nanopartikeloberfläche zu erhalten. Außerdem lässt die Ölsäureschicht auf der Oberfläche auch durch Protonierung der Ölsäure bei pH 4 entfernen.^[139] Die Tatsache, dass die Ölsäure auf UCNPs unter leicht sauren Bedingungen entfernt werden kann, weist schon auf den Hauptnachteil des Ligandenaustausches oder der Ligandenmodifizierung hin: die begrenzte Stabilität aufgrund von Ligandendissoziation oder -austausch.^[55] Zusätzlich können Polymere, die für einen Ligandenaustausch verwendet werden, zu Vernetzung und Aggregation der Nanopartikel führen.

Eine stabile Siliciumoxidschicht führt zu UCNPs, die gut in Wasser dispergierbar, biokompatibel^[140] und nach Standardvorschriften silanisierbar sind. Die Einführung reaktiver

Gruppen ermöglicht anschließende Biokonjugationsschritte. Normalerweise werden Wasser-in-Öl-Mikroemulsionen verwendet, um eine Siliciumoxidschicht auf der Oberfläche von Ölsäure-beckten UCNPs herzustellen.^[141] Hydrophobe UCNPs können in wässrigem Ammoniak mit einem Überschuss an Cyclohexan und einem Detergenz dispergiert werden. Die Dicke der Siliciumoxidbeschichtung lässt sich durch die Zugabe definierter Mengen an Tetraethylorthosilicat festlegen, und ein weiteres Organosilan ermöglicht die Einführung funktioneller Gruppen auf der Nanopartikeloberfläche. Am häufigsten werden reaktive Aminosilane eingesetzt, um Amin-funktionalisierte UCNPs^[142,143] zu erzeugen, die an Biomoleküle wie Biotin,^[143] Folsäure,^[144,145] Peptide,^[146] Avidin,^[147,148] Antikörper^[149,150] oder DNA^[151,152] konjugiert werden können. Der Zusatz von 3-Azido-propyltriethoxysilan während der Silanisierung ermöglicht die Durchführung von Klick-Reaktionen auf den Nanopartikeln,^[153] z. B. zur Konjugation von DNA.^[154] Auf PEG basierende Silanisierungsreagentien wurden verwendet, um Maleimidgruppen für die Bindung an Proteine einzuführen.^[55]

Die effiziente und reproduzierbare Synthese und Oberflächenmodifizierung von UCNPs bildet die Grundlage für zahlreiche bioanalytische Anwendungen in der Bildgebung und Sensorik. Die nächsten Abschnitte zeigen ausgewählte Beispiele, wie das Multiplexing mit UCNPs für die Mikroskopie und die Biosensorik nutzbar ist.

7. Mehrfarbmarkierung von Zellen mit UCNPs für die Bildgebung

Die Fluoreszenzbildgebung ist – zusätzlich zu MRT – eine der leistungsstärksten Methoden, um einen detaillierten Blick in lebende Zellen und Organismen zu erhalten. Durch Fluoreszenz werden auch solche Moleküle sichtbar, die kein MRT-Signal aufweisen (wie Sauerstoff oder viele Ionen) oder deren Signale nicht von anderen unterscheidbar sind (wie Fructose in Gegenwart von Glucose). Die Qualität der Fluoreszenzbildgebung wurde durch konfokale, Zweiphotonen- oder hochauflösende Mikroskopie stark verbessert. Im gleichen Maße, wie sich diese Techniken weiterentwickeln, erhöhen sich auch die Anforderungen an fluoreszierende Sonden. Beispielsweise führen die hohen Anregungsleistungen der Laser-induzierten Fluoreszenzmikroskopie zu starkem Photobleichen konventioneller Fluorophore.

UCNPs bieten eine wertvolle Alternative für die Bildgebung biologischer Präparate,^[155] weil sie nicht photobleichen. NIR-Licht dringt tief in mehrschichtige biologische Proben ein, und bei Verwendung von UCNPs des Typs NaYF₄:Yb,Er wurde die Abbildung eines Rattenkörpers bis in eine Tiefe von 10 mm beschrieben.^[156] Allerdings sollte bedacht werden, dass nicht nur das NIR-Licht das Gewebe passieren muss, sondern auch die sichtbare Emission der UCNPs, bevor sie detektiert werden kann. Die Abbildung tiefliegender Strukturen wurde erreicht, indem UCNPs des Typs NaYF₄:Yb,Tm eingesetzt wurden, die NIR-Licht bei $\lambda = 800$ nm emittieren.^[157,158] Die Gruppe von Andersson-Engels^[72] hat kürzlich gezeigt, dass die nichtlineare Nahinfrarotemission Tm-dotierter UCNPs hochauflösende Mikroskopie ermöglicht. Die

große Reichweite von NIR-Licht in biologischem Gewebe wurde auch zur Freisetzung von photoaktivierbaren Verbindungen^[159–163] oder zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies für die photodynamische Therapie genutzt,^[164–166] indem UCNPs verwendet wurden, die kurzwelliges Licht emittieren.

Unmodifizierte UCNPs wurden zunächst dazu verwendet, um ihre Verteilung in Fadenwürmern,^[167–169] höheren Tieren^[140,156,170] und Pflanzen^[171] zu beobachten. Die Vorteile der UCNPs wurden anschließend für die biomedizinische Forschung an ganzen Tieren genutzt, wie kürzlich in einem Übersichtsartikel beschrieben.^[172] Für die Abbildung von Blut- und Lymphgefäßen^[74,173,174] oder für die Verfolgung von Zellen werden keine spezifischen Liganden auf der Oberfläche von UCNPs benötigt. Für die parallele Verfolgung verschiedener Zelllinien ist eine Mehrfachmarkierung mit codierten UCNPs erforderlich. Die Gruppe von Liu^[175] codierte UCNPs durch Einstellung der Materialzusammensetzung: Drei Codes wurden erzeugt, indem zwei Arten von Er³⁺-dotierten UCNPs und eine Art von Tm³⁺-dotierten UCNPs verwendet wurden.

UCNPs werden leicht durch Endozytose aufgenommen, besonders wenn sie Amingruppen auf der Oberfläche tragen.^[176] Auf diese Weise codierte Zellen können auch in Tiere injiziert werden, um deren zelluläre Dynamik über die Zeit zu verfolgen. Die Gruppe von Wang^[177] dotierte aufkonvertierende Nanostäbchen des Typs NaYF₄:Yb,Er zusätzlich mit La³⁺ oder Ce³⁺, um die Emissionsintensitäten einzustellen. Sie wiesen auch darauf hin, dass sich die Farbausgabe von tiefer im Gewebe gelegenen UCNPs von Grün nach Rot verschiebt, da rotes Licht biologisches Material über größere Distanzen durchqueren kann. Einerseits kann diese Emissionsverschiebung dazu dienen, die Lage der UCNPs unter der Haut zu bestimmen; andererseits ist es in diesem Fall schwierig, eine Codierungsstrategie umzusetzen, die auf der Emissionsintensität der UCNPs basiert. Selbst ein ratiometrischer Ansatz wird dadurch erschwert, dass sich das Verhältnis der beiden Emissionslinien verschiebt, wenn sich die Position der UCNPs verlagert. Die Gruppe von Kim^[178] verwendete Kombinationen aus UCNPs und Quantenpunkten für ein Doppelmarkierung von Zellen und deren Verfolgung in Tiermodellen (Abbildung 9). Zwar sind Codierungsstrategien auf Basis der Einstellung der Materialzusammensetzung von UCNPs häufiger, allerdings wurden auch UCNPs, die durch unterschiedliche Oberflächenbeschichtung mit organischen Farbstoffen codiert wurden, für die Verfolgung von Zellen *in vivo* verwendet.^[93]

Während sich die Zytotoxizität der UCNPs sowie deren Aufnahme in die Zelle ohne spezifische Oberflächenliganden untersuchen lassen,^[75,100,179–182] müssen für die Zielsteuerung hin zu krebsspezifischen Strukturen Liganden an der Oberfläche angebracht werden. Die Beschichtung der UCNPs mit Folsäure steuert sie an den Folsäurerzeptor,^[144,183] der auf vielen Tumorzellen überexprimiert wird.^[184] Alternativ wurden UCNPs mit Neurotoxinen^[185] oder dem cyclischen Peptid RGDFK markiert, das spezifisch für $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf der Oberfläche bestimmter Tumorzellen ist.^[146,186] Die allermeisten Studien über die Steuerung zu Krebszellen wurden mit UCNPs durchgeführt, die mit tumorspezifischen Antikörpern beschichtet waren.^[113,150,187–190] Ohne den Einsatz von

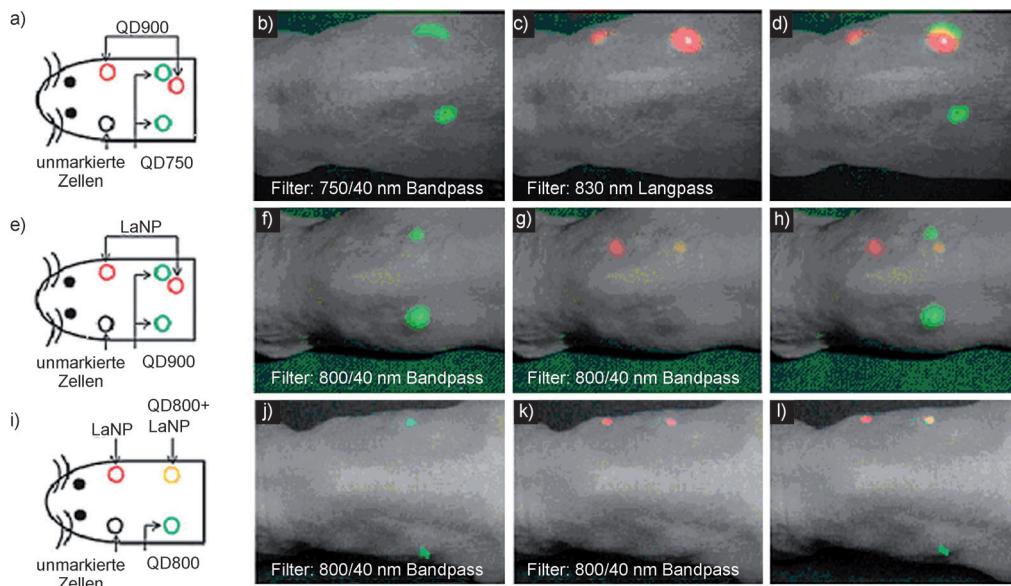


Abbildung 9. HeLa-Zellen werden mit verschiedenen Arten von Quantenpunkten oder UCNPs des Typs $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Tm}^{3+}$ markiert und subkutan in haarlose Mäuse injiziert. a) Schema der Implantierung von Zellen, die mit zwei Arten von Quantenpunkten, QD750 (grün) und QD900 (rot), markiert sind. Die Maus in (b) und (c) wird mit einem 660-nm-Laser beleuchtet. d) Übereinandergelegte Bilder von (b) und (c). e) Implantierung von Zellen, die jeweils mit einer Art von Quantenpunkt, QD800 (grün) und UCNP (rot) markiert sind. f) Bild des Objekts unter Beleuchtung mit einem 660-nm-Laser. g) Bild des Objekts unter Anregung mit einem 980-nm-Diodenlaser. h) Übereinandergelegte Bilder von (f) und (g). i) HeLa-Zellen sind entweder mit QD800 (grün), UCNP (rot), oder sowohl QD800 als auch UCNP (gelb) markiert und werden an verschiedenen Stellen implantiert. Bild unter Anregung j) mit einem 660-nm- und k) mit einem 980-nm-Laser. l) Übereinandergelegte Bilder von (j) und (k). Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [178]. Copyright 2011 The Royal Society of Chemistry.

Codierungsstrategien kann pro Experiment nur einer von vielen Tumormarkern untersucht werden. Dagegen ermöglicht die Markierung verschiedener Liganden mit codierenden UCNPs die gleichzeitige Beobachtung verschiedener Tumormarker.

Außer der Zellmarkierung ist es auch möglich, spezifische molekulare Sonden („Sensoren“) zu entwickeln, die ihre Lumineszenz in Gegenwart eines intrazellulären Analyten, wie Sauerstoff, ändern.^[191] Wie kürzlich in einem Aufsatz dargelegt,^[192] gibt es zahlreiche organische Fluorophore, die auf die Gegenwart unterschiedlicher Analyte reagieren. Die Entwicklung solcher von UCNPs abgeleiteten Sonden ist jedoch eine besonders anspruchsvolle Aufgabe, da sie normalerweise nicht auf ihre chemische Umgebung ansprechen. Tatsächlich ist ihr inertes Verhalten in vielen Situationen hochwillkommen. Die einzigen Parameter, die die Lumineszenz der UCNPs direkt beeinflussen, sind die Temperatur,^[62,63,193,194] mit einigen Einschränkungen der pH-Wert^[139] und einige Schwermetallionen.^[66] Die Detektion von nahezu jedem anderen intrazellulären Analyten erfordert, dass die Oberfläche der UCNPs mit einem analytenspezifischen organischen Farbstoff ausgestattet wird, der z.B. durch das Emissionslicht der UCNPs angeregt wird.^[92] Die Emission mehrerer Farben durch UCNPs ist für eine intrazelluläre Sensorik nützlich, da eine Emissionslinie ein weitgehend konstantes Referenzsignal liefert, wohingegen eine zweite Emissionslinie durch den Analyten über eine organische Sonde auf der Oberfläche der UCNPs beeinflusst wird. Diese

Strategie bietet viele Möglichkeiten für neue lumineszierende Sonden in intrazellulären Anwendungen

8. Durch die Position codierte heterogene Assays

Die schwache Wechselwirkung von NIR-Licht mit biologischen Materialien ist das entscheidende Kriterium für die Entwicklung der Aufkonversionstechnik in biologischen Assays.^[195]

Bevor UCNPs im Nanometerbereich zur Verfügung standen, bahnte die Gruppe von Tanke^[196] schon den Weg für die Verwendung aufkonvertierender Partikel mit einem Durchmesser von 0.1 bis 1 μm in der Histologie und in heterogenen Bioassays. Die Nachweigrenze der DNA-Hy-

bridisierung auf einem Mikroarray verringerte sich um den Faktor 4 bei Verwendung der Aufkonversionstechnik anstelle von konventioneller Fluoreszenzmarkierung.^[197]

Solche aufkonvertierenden Partikel wurden in Teststreifen (lateral flow assay, LFA) für den Nachweis von DNA,^[198,199] Pathogenen^[200,201] und Proteinen^[202] eingesetzt. In einem typischen LFA bindet der Analyt in einer Probe an ein Nachweisreagens (beispielsweise einen Antikörper) und fließt anschließend über eine Nitrocellulosemembran mit einer Testlinie, auf der ein Analyt-spezifischer Fängerantikörper immobilisiert ist, und einer weiteren Kontrolllinie, auf der sich ein Fängerantikörper befindet, der das Nachweissystem bindet und somit anzeigt, ob der Assay funktioniert hat. Der Schwangerschaftstest ist wahrscheinlich der bekannteste LFA für den Nachweis des Schwangerschaftshormons „humane Choriongonadotropin“ (hCG) in Urin. Gegenüber den Empfindlichkeiten der üblichen Gold- oder Latexpartikel wurde die Empfindlichkeit für hCG durch die Verwendung der Aufkonversionstechnik um einen Faktor von 10 bis 100 verbessert.^[203] LFAs eignen sich auch zum Multiplexing – beispielsweise waren zusätzlich zu hCG noch zwei weitere Proteine auf dem gleichen Teststreifen nachweisbar.^[203] Die aufkonvertierenden Mikropartikel enthielten unterschiedliche Dotanden, um jedem Analyten eine eindeutige Farbe zuzuweisen. In einem kompetitiven LFA wurden zwölf getrennte Testlinien auf einer Nitrocellulosemembran verwendet, um mehrere Drogen in Speichelproben gleichzeitig nachzuweisen.^[204] Um den Grad des Multiplex-

ings weiter zu erhöhen, wurden zwei Arten aufkonvertierender Mikropartikel jeweils mit eindeutiger Dotanden Zusammensetzung und Farbe für verschiedene Analyten eingesetzt. Dieser LFA wurde zum Nachweis mehrerer Pathogene in Speichel und Plasma verwendet.^[205] Antigene, die von HIV, Hepatitis C und Tuberkulose abgeleitet waren, wurden auf getrennten Testlinien einer Nitrocellulosemembran immobilisiert, um die entsprechenden Antikörper zu fangen, die eine Infektion anzeigen.

Die Gruppe von Soukka^[206–208] setzte aufkonvertierende Mikropartikel für Immunassays auf Mikrotiterplatten ein. Soukka et al. wiesen jedoch darauf hin, dass die unspezifische Bindung dieser relativ großen Partikel die Empfindlichkeit beeinträchtigt, und betonten den Bedarf an monodispersen Nano- statt Mikropartikeln. Tatsächlich wurde eine viel bessere Assayleistung erreicht, als das humane Adenovirus mithilfe von UCNPs auf Oligonucleotidarrays, die auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert waren, genotypisiert wurde.^[209]

9. Durch Mikrosphären codierte heterogene Assays

Die Mikrotiterplatte als Festphase für Immunassays kann durch Mikrosphären ersetzt werden, und suspendierte Mikrosphären können durch Durchflusszytometrie sortiert oder in Femtoliterarrays eingeordnet werden, wie in der Einleitung beschrieben.^[11] Für die Entwicklung eines Sandwich-Immunassays auf Mikrosphären wurden Proteine, Viren, Bakterien oder sogar Sporen auf der Oberfläche von Polystyrol- oder magnetischen Mikrosphären immobilisiert.^[210] Anschließend wurde ein entsprechender Antikörper, der mit einem aufkonvertierenden Mikropartikel markiert war, zu den Mikrosphären gegeben, und die markierten Mikrosphären wurden mithilfe von Durchflusszytometrie sortiert. In einem anderen Format erfolgte der Nachweis des Analyten auf der Mikrosphärenoberfläche durch einen biotinylierten Antikörper, der wiederum durch einen Neutravidin-markierten aufkonvertierenden Partikel detektiert wurde. Zum Multiplexing wurden die Mikrosphären mit Lanthanoiden markiert, die verschiedene Farben emittierten.

Obwohl Mikrosphärenassays prinzipiell für den Hochdurchsatz einsetzbar sind und einen hohen Grad an Multiplexing ermöglichen, sind sie in der Praxis durch die Zahl an Identifizierungscodes eingeschränkt. Daher würden Mikrosphärenassays stark von der Fähigkeit profitieren, eine hohe Zahl von codierenden UCNPs zu erzeugen oder verschiedene Arten von UCNPs in einer Mikrosphäre zu kombinieren, wie in Abbildung 6 gezeigt. Noch wichtiger ist allerdings, dass der Nachweis durch Aufkonversion für die Codierung von vielen Mikrosphären reserviert werden kann, während konventionelle Fluorophore als Reporter für die Analytbindung verwendet werden können. In diesem Fall sind die Anregungsmodi der UCNPs und der konventionellen Fluorophore so gut voneinander getrennt, dass es keine Interferenz gibt.

10. Homogene Multiplexassays

In homogenen Assayformaten bleiben sowohl der Analyt als auch das Detektionsreagens in Lösung.^[211–213] Für diese Art von Assay ist es notwendig, dass die Emissionsintensität der UCNPs ausschließlich durch den Analyten verändert wird. Dies wird meistens durch LRET erreicht, wobei die UCNPs als Donor und ein organischer Farbstoff,^[214] Goldnanopartikel,^[149,215,216] Quantenpunkt,^[217] Kohlenstoffnanopartikel,^[218,219] Graphenoxid,^[220] Mangandioxid^[221] oder Phycobiliprotein^[222] als Akzeptor wirken. Goldnanopartikel haben sich als die effizientesten Akzeptoren für UCNPs herausgestellt (Abbildung 10), doch ihr großer Durchmesser (gegenüber denen organischer Farbstoffe) kann zur sterischen Hinderung während der Analyterkennung führen.

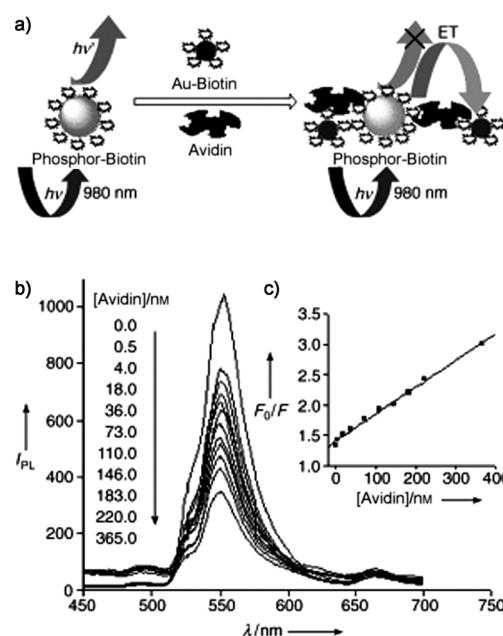


Abbildung 10. a) Schema eines auf LRET basierenden Assays für Avidin. Biotinylierte UCNPs wirken als Energiedonoren und biotinylierte Goldnanopartikel als Energieakzeptoren. Avidin vernetzt Donor und Akzeptor. b) Emissionspektren in Gegenwart einer zunehmenden Avidinkonzentration. c) Es lässt sich ein linearer Zusammenhang zwischen relativer Lumineszenzintensität (F_0/F) und der Konzentration von Avidin beobachten. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [215].

Weil LRET ein stark abstandsabhängiger Prozess ist,^[223] kann nur die Emission von solchen Ionen gelöscht werden, die nahe an der Oberfläche der UCNPs liegen.^[224] Deshalb sind kleine UCNPs, die gut in Wasser dispergierbar sind, vorteilhaft für die Verwendung in homogenen Assays. Die Effizienz, mit der die Emission organischer Farbstoffe gelöscht werden kann, liegt jedoch typischerweise unterhalb von 50 %, auch wenn die Löscheffizienz erst kürzlich auf 82 % erhöht wurde.^[225] Um die geringe Löscheffizienz des Aufkonversions-LRET zu umgehen, wurde ein Nucleaseassay entwickelt, der auf einem sequenziellen Energietransfer beruht (Abbildung 11).^[224]

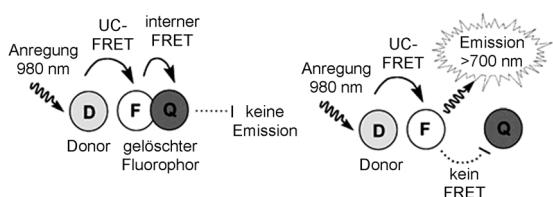


Abbildung 11. Homogener Enzymaktivitätsassay mit einem UCNP-Donor (D) und einem doppelt markierten Substrat, dessen Emission durch internen FRET gelöscht wird. Der Fluorophor wird durch einen UC-FRET unter kontinuierlicher NIR-Beleuchtung angeregt. Das intakte Substrat fluoresziert nicht. Das hydrolytische Enzym trennt den Fluorophor (F) und den Löscher (Q), die sich an den gegenüberliegenden Enden des Substrats befinden, sodass die Emission des Fluorophors wiederhergestellt wird. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [224].

Die Gruppe von Wheeler^[226] verwendete UCNPs des Typs $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ als Donor und einen fluoreszierenden Farbstoff als Akzeptor für einen homogenen DNA-Assay. Einzelsträngige DNA wurde an aminsilanisierte UCNPs gebunden, und ein komplementärer DNA-Strang wurde mit Carboxy-rhodamin markiert, dessen Anregungsspektrum mit der grünen Emission der UCNPs überlappt. Nach der Hybridisierung mit einem komplementären 26-mer-Oligonukleotid wurde die grüne Emission der UCNPs gelöscht. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei nur 1.3 nm DNA. Dank der Unterscheidbarkeit einzelner Fehlpaarungen in der Nucleotidsequenz wurde es möglich, Punktmutationen nachzuweisen, die mit der Sichelzellenanämie in Verbindung gebracht werden.^[227,228] Die Gruppe von Soukka^[229] nutzte die mehrfachen Emissionslinien der UCNPs zum parallelen Nachweis von DNA. Auf aminfunktionalisierten UCNPs des Typs $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ wurden zwei unterschiedliche Sequenzen einzelsträngiger Fänger-DNA angebracht. Nach der Bindung der einzelsträngigen Ziel-DNA wurden zwei spezifische Sonden zugegeben, die entweder nur die grüne oder nur die rote Emission der UCNPs absorbierten, sodass sich die jeweilige Emission trennen und detektieren ließ. Nur eine NIR-Anregungswellenlänge war nötig, um zwei verschiedene DNA-Zielstränge ohne Interferenz gleichzeitig zu detektieren.

Es wird intensiv daran geforscht, UCNPs für homogene Assayformate verfügbar zu machen. Beispielsweise wurden homogene Assays für den hintergrundfreien Nachweis von Hormonen,^[230] Glucose,^[216,220] Lectinen^[231] oder ATP^[232] in Blut oder anderen unbehandelten biologischen Proben beschrieben. Substrate für Nucleasen oder Proteasen bestehen normalerweise aus oligomeren Nucleotiden oder Peptidsequenzen,^[233] deren gegenüberliegende Enden mit einem FRET-Donor und -Akzeptor markiert sind. Während in einem intakten Oligonukleotid oder Peptid die Donorfluoreszenz gelöscht wird, trennt die enzymatische Spaltung Donor vom Akzeptor und stellt damit die Emission des Donors wieder her. Da der fluoreszierende Donorfarbstoff durch ein UCNP ersetzt werden kann, ist es unkompliziert, die LRET-Aufkonversionstechnik auf vorhandene FRET-Substrate zu übertragen. Dieses Detektionssystem wurde eingesetzt, um Assays für Endonukleasen,^[224] Caspase,^[234] Thrombin^[218] oder Metalloproteininasen^[219] zu entwickeln.

11. Chemische Mehrfachsensoren

UCNPs in Sensorfilmen wurden zur vollständig reversiblen Beobachtung von Ammoniak,^[235] Kohlendioxid,^[236] Sauerstoff,^[237] pH-Wert^[238] und Schwermetallionen^[66,239] in Echtzeit eingesetzt. UCNPs werden zwar nicht direkt von Analyten beeinflusst, können aber als Nanolichtquellen fungieren, deren Emission durch einen zugesetzten Indikator verändert wird. Der Abschirm- oder Löscheffekt des nicht-fluoreszierenden Indikators hängt von der Konzentration des Analyten ab. Die vom Analyten abhängige Verringerung der Emission der UCNPs wurde für die Messung von Ammoniak,^[235] Kohlendioxid^[236] und pH-Wert^[238] verwendet. Es ist denkbar, UCNPs mit verschiedenen Emissionsfarben für chemische Mehrfachsensoren zu verwenden. Allerdings wurde dies bisher noch nicht gezeigt. In einem anderen Schema wirkten UCNPs als Nanolampen zur Anregung von fluoreszierenden Sonden, die beispielsweise durch Sauerstoff gelöscht werden konnten.^[237] Die Intensität und die Abklingzeit der Sondenemission hängen vom lokalen $p\text{O}_2$ -Wert ab. Diese Methode wartet ebenfalls noch auf ihren Einsatz in Mehrfachsensoren.

12. Zusammenfassung und Ausblick

Sowohl Mehrfachcodierung als auch Photon-Aufkonvertierung sind neu entstehende Techniken mit einem enormen Potenzial für bioanalytische Anwendungen. Die Mehrfachcodierung schafft die Voraussetzungen für eine parallele Quantifizierung einer großen Zahl von Analyten. Die Zahl an möglichen Codes kann durch Gleichung (1) berechnet werden. Verglichen mit konventionellen Markierungen haben UCNPs viele Vorteile: Sie können mit NIR-Licht angeregt werden und emittieren im sichtbaren Bereich (Anti-Stokes-Emission). NIR-Licht durchdringt biologisches Material viel besser und erzeugt keine starke Autofluoreszenz. Das Spektrum der UCNPs besteht typischerweise aus mehreren schmalen Emissionslinien, was die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Codierungselemente minimiert. Die Intensität mehrerer Emissionslinien kann für eine ratiometrische Codierung entweder einzeln angepasst werden, oder aber die gesamte spektrale Signatur fungiert als Strichcode. Anders als Quantenpunkte enthalten UCNPs zudem keine toxischen Schwermetallionen.

Drei Hauptstrategien sind geeignet, eine große Zahl spektraler Codes auf Grundlage von UCNPs zu entwickeln: Erstens lässt sich die Zusammensetzung der Aktivatorionen so verändern, dass ein bestimmtes Emissionsspektrum oder bestimmte Farben definiert werden. Zweitens kann ein organischer Farbstoff auf die Oberfläche der UCNPs gebunden werden, um die Emission einzustellen. Drittens eignen sich Hybridmaterialien, um zusätzliche Eigenschaften wie Magnetismus hinzuzufügen. Jede Strategie für sich kann einen großen Satz an Codes ergeben – die Zahl der möglichen Codes nimmt jedoch exponentiell zu, wenn diese Ansätze kombiniert werden. Beispielsweise ergeben fünf Arten von UCNPs, die jeweils zehn ratiometrische Codes definieren, 100 000 (10^5) Codes, während die Codezahl auf 10^{25} ($(10^5)^5$)

steigt, wenn Hybrid-UCNPs eingesetzt werden, die zusätzlich fünf paramagnetische Intensitätsniveaus aufweisen. Diese Menge sollte in überschaubarer Zukunft für die Mehrfachdetektion von Analyten ausreichen. Die hohe Codierungsleistung von UCNPs geht sogar über bioanalytische Anwendungen hinaus, und findet z.B. Anwendungen im Sicherheitsbereich, beim Fälschungsschutz oder bei der Authentifizierung von Dokumenten und kommerziellen Produkten.^[240–242]

Es stellt sich die Frage: Warum sind UCNPs noch nicht weiter verbreitet? Eine Antwort ist, dass es trotz der enormen Weiterentwicklungen bei der Herstellung von UCNPs noch immer keine Standardvorschriften für die Gewinnung von hellen und kleinen hydrophilen UCNPs gibt, wie sie für die Bildgebung und für bioanalytische Anwendungen benötigt werden. Erst vor kurzem wurden UCNPs kommerziell verfügbar. Nach unserer Auffassung sind UCNPs derzeit in einer Phase, in der Quantenpunkte vor zwanzig Jahren waren. Während Quantenpunkte jedoch wie klassische Fluorophore messbar sind, gilt es, für die Detektion der Anti-Stokes-Emission von UCNPs zusätzliche Hürden zu überwinden, bevor sie standardmäßig eingesetzt werden können. Zum Beispiel müssen Mikrotiterplatten-Lesegeräte und Durchflusszytometer an die Detektion der Aufkonversion angepasst werden. Tatsächlich sind bisher nur wenige Fluorometer kommerziell erhältlich, die im Aufkonversionsmodus arbeiten können. Die Situation ist etwas besser im Falle der Fluoreszenzmikroskopie, da viele Geräte, die ursprünglich für die Zweiphotonenmikroskopie entwickelt wurden, auch für UCNPs einsetzbar sind. Wir sagen voraus, dass – wenn diese Probleme erst gelöst sind – auf UCNPs basierende Codierungsstrategien neue Wege des Multiplexings für Genotypisierung, Hochdurchsatzverfahren, Zellsteuerung, Diagnosen vor Ort (point-of-care diagnosis)^[243] und Produktauthentifizierung bereiten werden.

Wir danken Stefan Wilhelm für die Aufnahme der TEM-Bilder in Abbildung 2, Dr. Daniela E. Achatz für die Daten in Abbildung 4 und Andreas Sedlmeier für die deutsche Übersetzung des Artikels.

Eingegangen am 11. Oktober 2012
Online veröffentlicht am 28. Februar 2013

- [1] P. Hardenbol, F. L. Yu, J. Belmont, J. MacKenzie, C. Bruckner, T. Brundage, A. Boudreau, S. Chow, J. Eberle, A. Erbilgin, M. Falkowski, R. Fitzgerald, S. Ghose, O. Iartchouk, M. Jain, G. Karlin-Neumann, X. H. Lu, X. Miao, B. Moore, M. Moorhead, E. Namsaraev, S. Pasternak, E. Prakash, K. Tran, Z. Y. Wang, H. B. Jones, R. W. Davis, T. D. Willis, R. A. Gibbs, *Genome Res.* **2005**, *15*, 269–275.
- [2] J. M. Klostranec, Q. Xiang, G. A. Farcas, J. A. Lee, A. Rhee, E. I. Lafferty, S. D. Perrault, K. C. Kain, W. C. W. Chan, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2812–2818.
- [3] M. Meldal, S. F. Christensen, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3551–3554; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3473–3476.
- [4] S. Ahn, D. M. Kulic, D. L. Erdner, D. M. Anderson, D. R. Walt, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 5742–5749.
- [5] S. P. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767–773.

- [6] N. H. Finkel, X. H. Lou, C. Y. Wang, L. He, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 352A–359A.
- [7] R. Wilson, A. R. Cossins, D. G. Spiller, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6250–6263; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6104–6117.
- [8] R. J. Fulton, R. L. McDade, P. L. Smith, L. J. Kienker, J. R. Kettman, *Clin. Chem.* **1997**, *43*, 1749–1756.
- [9] E. Morgan, R. Varro, H. Sepulveda, J. A. Ember, J. Apgar, J. Wilson, L. Lowe, R. Chen, L. Shivraj, A. Agadir, R. Campos, D. Ernst, A. Gaur, *Clin. Immunol.* **2004**, *110*, 252–266.
- [10] P. O. Krutzik, G. P. Nolan, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 361–368.
- [11] H. H. Gorris, D. R. Walt, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3970–3986; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3880–3895.
- [12] H. H. Gorris, T. M. Blicharz, D. R. Walt, *FEBS J.* **2007**, *274*, 5462–5470.
- [13] S. R. Nicewarner-Pena, R. G. Freeman, B. D. Reiss, L. He, D. J. Pena, I. D. Walton, R. Cromer, C. D. Keating, M. J. Natan, *Science* **2001**, *294*, 137–141.
- [14] K. Braeckmans, S. C. De Smedt, C. Roelant, M. Leblans, R. Pauwels, J. Demeester, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 169–173.
- [15] D. C. Pregibon, M. Toner, P. S. Doyle, *Science* **2007**, *315*, 1393–1396.
- [16] H. Lee, J. Kim, H. Kim, S. Kwon, *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 745–749.
- [17] S. C. Chapin, D. C. Appleyard, D. C. Pregibon, P. S. Doyle, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2337–2341; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2289–2293.
- [18] S. H. Kim, J. W. Shim, S. M. Yang, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1203–1206; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1171–1174.
- [19] H. Fenniri, L. H. Ding, A. E. Ribbe, Y. Zyrianov, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8151–8152.
- [20] H. Fenniri, S. Chun, L. H. Ding, Y. Zyrianov, K. Hallenga, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10546–10560.
- [21] J. Raez, D. R. Blais, Y. Zhang, R. A. Alvarez-Puebla, J. P. Bravo-Vasquez, J. P. Pezacki, H. Fenniri, *Langmuir* **2007**, *23*, 6482–6485.
- [22] L. Sun, K. B. Sung, C. Dentinger, B. Lutz, L. Nguyen, J. W. Zhang, H. Y. Qin, M. Yamakawa, M. Q. Cao, Y. Lu, A. J. Chmura, J. Zhu, X. Su, A. A. Berlin, S. Chan, B. Knudsen, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 351–356.
- [23] J. H. Kim, H. Kang, S. Kim, B. H. Jun, T. Kang, J. Chae, S. Jeong, J. Kim, D. H. Jeong, Y. S. Lee, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2306–2308.
- [24] S. Lee, S. Joo, S. Park, S. Kim, H. C. Kim, T. D. Chung, *Electrophoresis* **2010**, *31*, 1623–1629.
- [25] F. J. Steemers, J. A. Ferguson, D. R. Walt, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 91–94.
- [26] M. Y. Han, X. H. Gao, J. Z. Su, S. Nie, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 631–635.
- [27] L. Wang, W. H. Tan, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 84–88.
- [28] M. Grabolle, P. Kapusta, T. Nann, X. Shu, J. Ziegler, U. Resch-Genger, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7807–7813.
- [29] B. K. Oh, J. M. Nam, S. W. Lee, C. A. Mirkin, *Small* **2006**, *2*, 103–108.
- [30] J. R. Epstein, J. A. Ferguson, K. H. Lee, D. R. Walt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13753–13759.
- [31] L. M. Liz-Marzán, *Langmuir* **2006**, *22*, 32–41.
- [32] R. Bukasov, J. S. Shumaker-Parry, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1113–1118.
- [33] M. A. El-Sayed, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 257–264.
- [34] S. J. Oldenburg, R. D. Averitt, S. L. Westcott, N. J. Halas, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *288*, 243–247.
- [35] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1870–1901.
- [36] C. X. Yu, J. Irudayaraj, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 572–579.
- [37] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 763–775.
- [38] R. Gill, M. Zayats, I. Willner, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7714–7736; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7602–7625.

- [39] S. Giri, E. A. Sykes, T. L. Jennings, W. C. W. Chan, *ACS Nano* **2011**, *5*, 1580–1587.
- [40] T. Song, Q. Zhang, C. L. Lu, X. Q. Gong, Q. H. Yang, Y. H. Li, J. Q. Liu, J. Chang, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 2169–2177.
- [41] M. Haase, H. Schäfer, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5928–5950; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5808–5829.
- [42] F. Wang, X. G. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 976–989.
- [43] H. S. Mader, P. Kele, S. M. Saleh, O. S. Wolfbeis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 1–15.
- [44] O. S. Wolfbeis in *Molecular luminescence spectroscopy: Methods and applications*, Vol. 1 (Hrsg.: S. G. Schulman), Wiley, New York, **1985**, S. 167–369.
- [45] H. H. Gorris, S. M. Saleh, D. B. M. Groegel, S. Ernst, K. Reiner, H. Mustroph, O. S. Wolfbeis, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1433–1437.
- [46] M. Albota, D. Beljonne, J. L. Bredas, J. E. Ehrlich, J. Y. Fu, A. A. Heikal, S. E. Hess, T. Kogej, M. D. Levin, S. R. Marder, D. McCord-Maughon, J. W. Perry, H. Rockel, M. Rumi, C. Subramaniam, W. W. Webb, X. L. Wu, C. Xu, *Science* **1998**, *281*, 1653–1656.
- [47] D. R. Larson, W. R. Zipfel, R. M. Williams, S. W. Clark, M. P. Bruchez, F. W. Wise, W. W. Webb, *Science* **2003**, *300*, 1434–1436.
- [48] G. S. He, L. S. Tan, Q. Zheng, P. N. Prasad, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1245–1330.
- [49] M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning, H. L. Anderson, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3292–3316; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3244–3266.
- [50] P. Campagnola, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3224–3231.
- [51] F. Auzel, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 139–173.
- [52] K. W. Krämer, D. Biner, G. Frei, H. U. Güdel, M. P. Hehlen, S. R. Lüthi, *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 1244–1251.
- [53] S. Heer, K. Kömpe, H. U. Güdel, M. Haase, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 2102–2105.
- [54] Z. Q. Li, Y. Zhang, *Nanotechnology* **2008**, *19*, 345606.
- [55] R. B. Liebherr, T. Soukka, O. S. Wolfbeis, H. H. Gorris, *Nanotechnology* **2012**, *23*, 485103.
- [56] A. Aebischer, M. Hostettler, J. Hauser, K. Kramer, T. Weber, H. U. Güdel, H. B. Buergi, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2869–2873; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2802–2806.
- [57] J. F. Suyver, J. Grimm, M. K. van Veen, D. Biner, K. W. Kramer, H. U. Güdel, *J. Lumin.* **2006**, *117*, 1–12.
- [58] J.-C. G. Bünzli, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2729–2755.
- [59] P. Hänninen, H. Härmä, *Springer Series on Fluorescence*, Vol. 7 (Hrsg.: O. S. Wolfbeis), Springer, Heidelberg, **2011**, S. 1–45.
- [60] M. J. Dejneka, A. Streltsov, S. Pal, A. G. Frutos, C. L. Powell, K. Yost, P. K. Yuen, U. Muller, J. Lahiri, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 389–393.
- [61] M. A. R. C. Alencar, G. S. Maciel, C. B. de Araujo, A. Patra, *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *84*, 4753–4755.
- [62] L. H. Fischer, G. S. Harms, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4640–4645; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4546–4551.
- [63] A. Sedlmeier, D. Achatz, L. H. Fischer, H. H. Gorris, O. S. Wolfbeis, *Nanoscale* **2012**, *4*, 7090–7096.
- [64] F. Wang, J. A. Wang, X. G. Liu, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7618–7622; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7456–7460.
- [65] J. C. Boyer, M. P. Manseau, J. I. Murray, F. C. J. M. van Veggel, *Langmuir* **2010**, *26*, 1157–1164.
- [66] S. M. Saleh, R. Ali, O. S. Wolfbeis, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 14611–14617.
- [67] F. Vetrone, R. Naccache, V. Mahalingam, C. G. Morgan, J. A. Capobianco, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 2924–2929.
- [68] G. S. Yi, G. M. Chow, *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 341–343.
- [69] H. Guo, Z. Q. Li, H. S. Qian, Y. Hu, I. N. Muhammad, *Nanotechnology* **2010**, *21*, 125602.
- [70] Q. Lü, F. Y. Guo, L. Sun, A. H. Li, L. C. Zhao, *J. Appl. Phys.* **2008**, *103*, 123533.
- [71] C. Würth, J. Pauli, C. Lochmann, M. Spieles, U. Resch-Genger, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1345–1352.
- [72] C. T. Xu, P. Svenmarker, H. C. Liu, X. Wu, M. E. Messing, L. R. Wallenberg, S. Andersson-Engels, *ACS Nano* **2012**, *6*, 4788–4795.
- [73] J. C. Boyer, F. C. J. M. van Veggel, *Nanoscale* **2010**, *2*, 1417–1419.
- [74] Q. Liu, T. S. Yang, W. Feng, F. Y. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5390–5397.
- [75] S. W. Wu, G. Han, D. J. Milliron, S. Aloni, V. Altoe, D. V. Talapin, B. E. Cohen, P. J. Schuck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 10917–10921.
- [76] D. E. Achatz, Dissertation, Universität Regensburg, **2012**.
- [77] F. Wang, X. G. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5642–5643.
- [78] F. Wang, R. Deng, J. Wang, Q. Wang, Y. Han, H. Zhu, X. Chen, X. Liu, *Nat. Mater.* **2011**, *10*, 968–973.
- [79] O. Ehlert, R. Thomann, M. Darbandi, T. Nann, *ACS Nano* **2008**, *2*, 120–124.
- [80] W. B. Niu, S. L. Wu, S. F. Zhang, J. Li, L. A. Li, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 3305–3314.
- [81] W. B. Niu, S. L. Wu, S. F. Zhang, L. Li, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3908–3910.
- [82] W. B. Niu, S. L. Wu, S. F. Zhang, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 9113–9117.
- [83] G. Y. Chen, H. C. Liu, G. Somesfalean, H. J. Liang, Z. G. Zhang, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 385704.
- [84] V. Mahalingam, R. Naccache, F. Vetrone, J. A. Capobianco, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3481–3483.
- [85] Q. Q. Dou, Y. Zhang, *Langmuir* **2011**, *27*, 13236–13241.
- [86] J. Wang, F. Wang, C. Wang, Z. Liu, X. Liu, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10553–10556; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10369–10372.
- [87] F. Zhang, Q. H. Shi, Y. C. Zhang, Y. F. Shi, K. L. Ding, D. Y. Zhao, G. D. Stucky, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 3775–3779.
- [88] F. Zhang, R. C. Haushalter, R. W. Haushalter, Y. Shi, Y. Zhang, K. Ding, D. Zhao, G. D. Stucky, *Small* **2011**, *7*, 1972–1976.
- [89] R. E. Gerver, R. Gomez-Sjoberg, B. C. Baxter, K. S. Thorn, P. M. Fordyce, C. A. Diaz-Botia, B. A. Helms, J. L. DeRisi, *Lab Chip* **2012**, *12*, 4716–4723.
- [90] H. H. Gorris, R. Ali, S. M. Saleh, O. S. Wolfbeis, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 1652–1655.
- [91] Z. Q. Li, L. M. Wang, Z. Y. Wang, X. H. Liu, Y. J. Xiong, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 3291–3296.
- [92] Z. Q. Li, Y. Zhang, S. Jiang, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4765–4769.
- [93] L. A. Cheng, K. Yang, M. W. Shao, S. T. Lee, Z. A. Liu, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 2686–2692.
- [94] W. Q. Zou, C. Visser, J. A. Maduro, M. S. Pshenichnikov, J. C. Hummelen, *Nat. Photonics* **2012**, *6*, 560–564.
- [95] F. Martínez Ferreras, O. S. Wolfbeis, H. H. Gorris, *Anal. Chim. Acta* **2012**, *729*, 62–66.
- [96] S. Schietinger, T. Aichele, H. Q. Wang, T. Nann, O. Benson, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 134–138.
- [97] D. T. Tu, L. Q. Liu, Q. Ju, Y. S. Liu, H. M. Zhu, R. F. Li, X. Y. Chen, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6430–6434; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6306–6310.
- [98] Q. Ju, D. T. Tu, Y. S. Liu, R. F. Li, H. M. Zhu, J. C. Chen, Z. Chen, M. D. Huang, X. Y. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1323–1330.
- [99] G. Z. Ren, S. J. Zeng, J. H. Hao, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 20141–20147.
- [100] Y. I. Park, J. H. Kim, K. T. Lee, K. S. Jeon, H. Bin Na, J. H. Yu, H. M. Kim, N. Lee, S. H. Choi, S. I. Baik, H. Kim, S. P. Park, B. J. Park, Y. W. Kim, S. H. Lee, S. Y. Yoon, I. C. Song, W. K. Moon, Y. D. Suh, T. Hyeon, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 4467–4473.
- [101] H. C. Lu, G. S. Yi, S. Y. Zhao, D. P. Chen, L. H. Guo, J. Cheng, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 1336–1341.

- [102] Z. Y. Liu, G. S. Yi, H. T. Zhang, J. Ding, Y. W. Zhang, J. M. Xue, *Chem. Commun.* **2008**, 694–696.
- [103] C. C. Mi, J. P. Zhang, H. Y. Gao, X. L. Wu, M. Wang, Y. F. Wu, Y. Q. Di, Z. R. Xu, C. B. Mao, S. K. Xu, *Nanoscale* **2010**, 2, 1141–1148.
- [104] J. Shen, L. D. Sun, Y. W. Zhang, C. H. Yan, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5731–5733.
- [105] D. Jańczewski, Y. Zhang, G. K. Das, D. K. Yi, P. Padmanabhan, K. K. Bhakoo, T. T. Y. Tan, S. T. Selvan, *Microsc. Res. Tech.* **2011**, 74, 563–576.
- [106] E. Tóth, L. Helm, A. E. Merbach, *Top. Curr. Chem.* **2002**, 221, 61–101.
- [107] Z. Q. Li, Y. Zhang, B. Shuter, N. M. Idris, *Langmuir* **2009**, 25, 12015–12018.
- [108] F. Wang, Y. Han, C. S. Lim, Y. H. Lu, J. Wang, J. Xu, H. Y. Chen, C. Zhang, M. H. Hong, X. G. Liu, *Nature* **2010**, 463, 1061–1065.
- [109] Q. Liu, Y. Sun, T. S. Yang, W. Feng, C. G. Li, F. Y. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 17122–17125.
- [110] P. A. Tanner, J. W. Wang, *Chem. Phys. Lett.* **2008**, 455, 335–338.
- [111] R. Komban, J. P. Klare, B. Voss, J. Nordmann, H. J. Steinhoff, M. Haase, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 6612–6616; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 6506–6510.
- [112] D. Q. Chen, Y. L. Yu, F. Huang, A. P. Yang, Y. S. Wang, *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 6186–6192.
- [113] R. Kumar, M. Nyk, T. Y. Ohulchanskyy, C. A. Flask, P. N. Prasad, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, 19, 853–859.
- [114] Y. L. Liu, K. L. Ai, J. H. Liu, Q. H. Yuan, Y. Y. He, L. H. Lu, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 1466–1471; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 1437–1442.
- [115] G. Zhang, Y. L. Liu, Q. H. Yuan, C. H. Zong, J. H. Liu, L. H. Lu, *Nanoscale* **2011**, 3, 4365–4371.
- [116] Q. Liu, Y. Sun, C. G. Li, J. Zhou, C. Y. Li, T. S. Yang, X. Z. Zhang, T. Yi, D. M. Wu, F. Y. Li, *ACS Nano* **2011**, 5, 3146–3157.
- [117] C. X. Li, J. Lin, *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 6831–6847.
- [118] G. S. Yi, H. C. Lu, S. Y. Zhao, G. Yue, W. J. Yang, D. P. Chen, L. H. Guo, *Nano Lett.* **2004**, 4, 2191–2196.
- [119] H. X. Mai, Y. W. Zhang, R. Si, Z. G. Yan, L. D. Sun, L. P. You, C. H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6426–6436.
- [120] J. N. Shan, Y. G. Ju, *Nanotechnology* **2009**, 20, 275603.
- [121] J. H. Zeng, J. Su, Z. H. Li, R. X. Yan, Y. D. Li, *Adv. Mater.* **2005**, 17, 2119–2123.
- [122] C. Liu, H. Wang, X. Li, D. Chen, *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 3546–3553.
- [123] L. Y. Wang, Y. D. Li, *Chem. Mater.* **2007**, 19, 727–734.
- [124] X. M. Liu, J. W. Zhao, Y. J. Sun, K. Song, Y. Yu, C. A. Du, X. G. Kong, H. Zhang, *Chem. Commun.* **2009**, 6628–6630.
- [125] M. Longmire, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Nanomedicine* **2008**, 3, 703–717.
- [126] G. Y. Chen, T. Y. Ohulchanskyy, R. Kumar, H. Agren, P. N. Prasad, *ACS Nano* **2010**, 4, 3163–3168.
- [127] H. T. Wong, F. Vetrone, R. Naccache, H. L. W. Chan, J. H. Hao, J. A. Capobianco, *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 16589–16596.
- [128] A. D. Ostrowski, E. M. Chan, D. J. Gargas, E. M. Katz, G. Han, P. J. Schuck, D. J. Milliron, B. E. Cohen, *ACS Nano* **2012**, 6, 2686–2692.
- [129] W. R. Algar, D. E. Prasuhn, M. H. Stewart, T. L. Jennings, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, I. L. Medintz, *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 825–858.
- [130] H. Schäfer, P. Ptacek, K. Kömppe, M. Haase, *Chem. Mater.* **2007**, 19, 1396–1400.
- [131] Q. B. Zhang, K. Song, J. W. Zhao, X. G. Kong, Y. J. Sun, X. M. Liu, Y. L. Zhang, Q. H. Zeng, H. Zhang, *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, 336, 171–175.
- [132] G. S. Yi, G. M. Chow, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, 16, 2324–2329.
- [133] L. Q. Xiong, T. S. Yang, Y. Yang, C. J. Xu, F. Y. Li, *Biomaterials* **2010**, 31, 7078–7085.
- [134] N. J. J. Johnson, N. M. Sangeetha, J. C. Boyer, F. C. J. M. van Veggel, *Nanoscale* **2010**, 2, 771–777.
- [135] Z. Q. Li, Y. Zhang, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 7896–7899; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7732–7735.
- [136] S. J. Budijono, J. N. Shan, N. Yao, Y. Miura, T. Hoye, R. H. Austin, Y. G. Ju, R. K. Prud'homme, *Chem. Mater.* **2010**, 22, 311–318.
- [137] L. L. Li, R. B. Zhang, L. L. Yin, K. Z. Zheng, W. P. Qin, P. R. Selvin, Y. Lu, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 6225–6229; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 6121–6125.
- [138] Z. G. Chen, H. L. Chen, H. Hu, M. X. Yu, F. Y. Li, Q. Zhang, Z. G. Zhou, T. Yi, C. H. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 3023–3029.
- [139] N. Bogdan, F. Vetrone, G. A. Ozin, J. A. Capobianco, *Nano Lett.* **2011**, 11, 835–840.
- [140] R. A. Jalil, Y. Zhang, *Biomaterials* **2008**, 29, 4122–4128.
- [141] J. N. Shan, Y. G. Ju, *Appl. Phys. Lett.* **2007**, 91, 123103.
- [142] C. Louis, R. Bazzi, C. A. Marquette, J. L. Bridot, S. Roux, G. Ledoux, B. Mercier, L. Blum, P. Perriat, O. Tillement, *Chem. Mater.* **2005**, 17, 1673–1682.
- [143] S. Sivakumar, P. R. Diamente, F. C. van Veggel, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 5878–5884.
- [144] H. Hu, L. Q. Xiong, J. Zhou, F. Y. Li, T. Y. Cao, C. H. Huang, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 3577–3584.
- [145] L. Cheng, K. Yang, Y. G. Li, J. H. Chen, C. Wang, M. W. Shao, S. T. Lee, Z. Liu, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 7523–7528; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 7385–7390.
- [146] T. Zako, H. Nagata, N. Terada, A. Utsumi, M. Sakono, M. Yohda, H. Ueda, K. Soga, M. Maeda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, 381, 54–58.
- [147] D. Y. Kong, Z. W. Quan, J. Yang, P. P. Yang, C. X. Li, J. Lin, *J. Nanopart. Res.* **2009**, 11, 821–829.
- [148] S. M. Saleh, R. Ali, T. Hirsch, O. S. Wolfbeis, *J. Nanopart. Res.* **2011**, 13, 4603–4611.
- [149] M. Wang, W. Hou, C. C. Mi, W. X. Wang, Z. R. Xu, H. H. Teng, C. B. Mao, S. K. Xu, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 8783–8789.
- [150] M. Wang, C. C. Mi, W. X. Wang, C. H. Liu, Y. F. Wu, Z. R. Xu, C. B. Mao, S. K. Xu, *ACS Nano* **2009**, 3, 1580–1586.
- [151] S. Jiang, Y. Zhang, *Langmuir* **2010**, 26, 6689–6694.
- [152] L. Y. Wang, Y. D. Li, *Chem. Commun.* **2006**, 2557–2559.
- [153] H. S. Mader, M. Link, D. E. Achatz, K. Uhlmann, X. H. Li, O. S. Wolfbeis, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 5416–5424.
- [154] M. M. Rubner, D. E. Achatz, H. S. Mader, J. A. Stolwijk, J. Wegener, G. S. Harms, O. S. Wolfbeis, H. A. Wagenknecht, *ChemPlusChem* **2012**, 77, 129–134.
- [155] F. Wang, D. Banerjee, Y. S. Liu, X. Y. Chen, X. G. Liu, *Analyst* **2010**, 135, 1839–1854.
- [156] D. K. Chatterjee, A. J. Rufalhah, Y. Zhang, *Biomaterials* **2008**, 29, 937–943.
- [157] M. Nyk, R. Kumar, T. Y. Ohulchanskyy, E. J. Bergey, P. N. Prasad, *Nano Lett.* **2008**, 8, 3834–3838.
- [158] J. Pichaandi, J. C. Boyer, K. R. Delaney, F. C. J. M. van Veggel, *J. Phys. Chem. C* **2011**, 115, 19054–19064.
- [159] C. J. Carling, J. C. Boyer, N. R. Branda, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 10838–10839.
- [160] C. J. Carling, F. Nourmohammadian, J. C. Boyer, N. R. Branda, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 3870–3873; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 3782–3785.
- [161] Y. M. Yang, Q. Shao, R. R. Deng, C. Wang, X. Teng, K. Cheng, Z. Cheng, L. Huang, Z. Liu, X. G. Liu, B. G. Xing, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 3179–3183; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 3125–3129.
- [162] M. K. G. Jayakumar, N. M. Idris, Y. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 8483–8488.
- [163] J. V. Garcia, J. Yang, D. Shen, C. Yao, X. Li, R. Wang, G. D. Stucky, D. Zhao, P. C. Ford, F. Zhang, *Small* **2012**, 8, 3800–3805.

- [164] P. Zhang, W. Steelant, M. Kumar, M. Scholfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4526.
- [165] C. Wang, H. Q. Tao, L. Cheng, Z. Liu, *Biomaterials* **2011**, *32*, 6145–6154.
- [166] K. Liu, X. M. Liu, Q. H. Zeng, Y. L. Zhang, L. P. Tu, T. Liu, X. G. Kong, Y. H. Wang, F. Cao, S. A. G. Lambrechts, M. C. G. Aalders, H. Zhang, *ACS Nano* **2012**, *6*, 4054–4062.
- [167] S. F. Lim, R. Riehn, W. S. Ryu, N. Khanarian, C. K. Tung, D. Tank, R. H. Austin, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 169–174.
- [168] S. F. Lim, R. Riehn, C. K. Tung, W. S. Ryu, R. Zhuo, J. Dalland, R. H. Austin, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 405701.
- [169] J. Chen, C. R. Guo, M. Wang, L. Huang, L. P. Wang, C. C. Mi, J. Li, X. X. Fang, C. B. Mao, S. K. Xu, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 2632–2638.
- [170] Z. L. Wang, J. H. Hao, H. L. W. Chan, G. L. Law, W. T. Wong, K. L. Wong, M. B. Murphy, T. Su, Z. H. Zhang, S. Q. Zeng, *Nanoscale* **2011**, *3*, 2175–2181.
- [171] A. Hischemöller, J. Nordmann, P. Ptacek, K. Mummenhoff, M. Haase, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2009**, *5*, 278–284.
- [172] J. Zhou, Z. Liu, F. Y. Li, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1323–1349.
- [173] S. A. Hilderbrand, F. W. Shao, C. Salthouse, U. Mahmood, R. Weissleder, *Chem. Commun.* **2009**, 4188–4190.
- [174] H. Kobayashi, N. Kosaka, M. Ogawa, N. Y. Morgan, P. D. Smith, C. B. Murray, X. C. Ye, J. Collins, G. A. Kumar, H. Bell, P. L. Choyke, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 6481–6484.
- [175] L. A. Cheng, K. Yang, S. A. Zhang, M. W. Shao, S. T. Lee, Z. A. Liu, *Nano Res.* **2010**, *3*, 722–732.
- [176] J. F. Jin, Y. J. Gu, C. W. Y. Man, J. P. Cheng, Z. H. Xu, Y. Zhang, H. S. Wang, V. H. Y. Lee, S. H. Cheng, W. T. Wong, *ACS Nano* **2011**, *5*, 7838–7847.
- [177] X. F. Yu, M. Li, M. Y. Xie, L. D. Chen, Y. Li, Q. Q. Wang, *Nano Res.* **2010**, *3*, 51–60.
- [178] S. Jeong, N. Won, J. Lee, J. Bang, J. Yoo, S. G. Kim, J. A. Chang, J. Kim, S. Kim, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8022–8024.
- [179] J. N. Shan, J. B. Chen, J. Meng, J. Collins, W. Soboyejo, J. S. Friedberg, Y. G. Ju, *J. Appl. Phys.* **2008**, *104*, 094308.
- [180] M. X. Yu, F. Y. Li, Z. G. Chen, H. Hu, C. Zhan, H. Yang, C. H. Huang, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 930–935.
- [181] F. Vetrone, R. Naccache, A. J. de La Fuente, F. Sanz-Rodríguez, A. Blazquez-Castro, E. M. Rodriguez, D. Jaque, J. G. Sole, J. A. Capobianco, *Nanoscale* **2010**, *2*, 495–498.
- [182] S. H. Nam, Y. M. Bae, Y. I. Park, J. H. Kim, H. M. Kim, J. S. Choi, K. T. Lee, T. Hyeon, Y. D. Suh, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6217–6221; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6093–6097.
- [183] L. Q. Xiong, Z. G. Chen, M. X. Yu, F. Y. Li, C. Liu, C. H. Huang, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5592–5600.
- [184] P. S. Low, W. A. Henne, D. D. Doornewerd, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 120–129.
- [185] X. F. Yu, Z. B. Sun, M. Li, Y. Xiang, Q. Q. Wang, F. F. Tang, Y. L. Wu, Z. J. Cao, W. X. Li, *Biomaterials* **2010**, *31*, 8724–8731.
- [186] L. Q. Xiong, Z. G. Chen, Q. W. Tian, T. Y. Cao, C. J. Xu, F. Y. Li, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 8687–8694.
- [187] Q. Q. Zhan, J. Qian, H. J. Liang, G. Somesfalean, D. Wang, S. L. He, Z. G. Zhang, S. Andersson-Engels, *ACS Nano* **2011**, *5*, 3744–3757.
- [188] G. S. Yi, Y. F. Peng, Z. Q. Gao, *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 2729–2734.
- [189] S. Jiang, Y. Zhang, K. M. Lim, E. K. W. Sim, L. Ye, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 155101.
- [190] M. Wang, C. C. Mi, Y. X. Zhang, J. L. Liu, F. Li, C. B. Mao, S. K. Xu, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 19021–19027.
- [191] X. D. Wang, H. H. Gorris, J. A. Stolwijk, R. J. Meier, D. B. M. Groegel, J. Wegener, O. S. Wolfbeis, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 901–906.
- [192] M. Schäferling, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 3590–3614; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3532–3554.
- [193] F. Vetrone, R. Naccache, A. Zamarron, A. J. de La Fuente, F. Sanz-Rodríguez, L. M. Maestro, E. M. Rodriguez, D. Jaque, J. G. Sole, J. A. Capobianco, *ACS Nano* **2010**, *4*, 3254–3258.
- [194] B. Dong, B. S. Cao, Y. Y. He, Z. Liu, Z. P. Li, Z. Q. Feng, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 1987–1993.
- [195] D. E. Achatz, R. Ali, O. S. Wolfbeis, *Topics Curr. Chem.* **2010**, *300*, 29–50.
- [196] H. J. M. A. A. Zijlmans, J. Bonnet, J. Burton, K. Kardos, T. Vail, R. S. Niedbala, H. J. Tanke, *Anal. Biochem.* **1999**, *267*, 30–36.
- [197] F. van de Rijke, H. Zijlmans, S. Li, T. Vail, A. K. Raap, R. S. Niedbala, H. J. Tanke, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 273–276.
- [198] P. L. A. M. Corstjens, M. Zuiderwijk, M. Nilsson, H. Feindt, R. S. Niedbala, H. J. Tanke, *Anal. Biochem.* **2003**, *312*, 191–200.
- [199] P. Corstjens, M. Zuiderwijk, A. Brink, S. Li, H. Feindt, R. S. Niedbala, H. Tanke, *Clin. Chem.* **2001**, *47*, 1885–1893.
- [200] P. L. A. M. Corstjens, L. van Lieshout, M. Zuiderwijk, D. Cornelis, H. J. Tanke, A. M. Deelder, G. J. van Dam, *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 171–176.
- [201] C. C. Liu, X. B. Qiu, S. Ongagna, D. F. Chen, Z. Y. Chen, W. R. Abrams, D. Malamud, P. L. A. M. Corstjens, H. H. Bau, *Lab Chip* **2009**, *9*, 768–776.
- [202] P. L. A. M. Corstjens, M. Zuiderwijk, H. J. Tanke, J. J. V. V. Schip, T. H. M. Ottenhoff, A. Geluk, *Clin. Biochem.* **2008**, *41*, 440–444.
- [203] J. Hampl, M. Hall, N. A. Mufti, Y. M. M. Yao, D. B. MacQueen, W. H. Wright, D. E. Cooper, *Anal. Biochem.* **2001**, *288*, 176–187.
- [204] R. S. Niedbala, H. Feindt, K. Kardos, T. Vail, J. Burton, B. Bielska, S. Li, D. Milunic, P. Bourdelle, R. Vallejo, *Anal. Biochem.* **2001**, *293*, 22–30.
- [205] P. L. A. M. Corstjens, Z. Y. Chen, M. Zuiderwijk, H. H. Bau, W. R. Abrams, D. Malamud, R. S. Niedbala, H. J. Tanke, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1098*, 437–445.
- [206] K. Kuningas, T. Rantanen, U. Karhunen, T. Lövgren, T. Soukka, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2826–2834.
- [207] K. Kuningas, T. Rantanen, T. Lövgren, T. Soukka, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *543*, 130–136.
- [208] T. Ukonaho, T. Rantanen, L. Jämsen, K. Kuningas, H. Päkkilä, T. Lövgren, T. Soukka, *Anal. Chim. Acta* **2007**, *596*, 106–115.
- [209] M. Ylihäräsilä, T. Valta, M. Karp, L. Hattara, E. Harju, J. Hölsä, P. Saviranta, M. Waris, T. Soukka, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1456–1461.
- [210] D. E. Cooper, A. D'Andrea, G. W. Faris, D. B. MacQueen, W. H. Wright, *Immunoassays and other bioanalytical techniques* (Hrsg.: J. M. Van Emon), CRC, Boca Raton, **2007**.
- [211] K. Kuningas, T. Rantanen, T. Ukonaho, T. Lövgren, T. Soukka, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7348–7355.
- [212] T. Rantanen, H. Päkkilä, L. Jämsen, K. Kuningas, T. Ukonaho, T. Lövgren, T. Soukka, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6312–6318.
- [213] K. Kuningas, T. Ukonaho, H. Päkkilä, T. Rantanen, J. Rosenberg, T. Lövgren, T. Soukka, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4690–4696.
- [214] T. Soukka, T. Rantanen, K. Kuningas, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1130*, 188–200.
- [215] L. Y. Wang, R. X. Yan, Z. Y. Hao, L. Wang, J. H. Zeng, H. Bao, X. Wang, Q. Peng, Y. D. Li, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6208–6211; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6054–6057.
- [216] J. H. Peng, Y. H. Wang, J. L. Wang, X. Zhou, Z. H. Liu, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *28*, 414–420.
- [217] A. Bednarkiewicz, M. Nyk, M. Samoc, W. Strek, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 17535–17541.
- [218] Y. H. Wang, L. Bao, Z. H. Liu, D. W. Pang, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8130–8137.
- [219] Y. H. Wang, P. Shen, C. Y. Li, Y. Y. Wang, Z. H. Liu, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1466–1473.

- [220] C. L. Zhang, Y. X. Yuan, S. M. Zhang, Y. H. Wang, Z. H. Liu, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6983–6986; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6851–6854.
- [221] R. R. Deng, X. J. Xie, M. Vendrell, Y. T. Chang, X. G. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20168–20171.
- [222] F. Vetrone, R. Naccache, C. G. Morgan, J. A. Capobianco, *Nanoscale* **2010**, *2*, 1185–1189.
- [223] P. R. Selvin, T. M. Rana, J. E. Hearst, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6029–6030.
- [224] T. Rantanen, M. L. Jarvenpaa, J. Vuojola, K. Kuningas, T. Soukka, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3871–3873; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3811–3813.
- [225] Y. X. Yuan, Z. H. Liu, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 7510–7512.
- [226] P. Zhang, S. Rogelj, K. Nguyen, D. Wheeler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12410–12411.
- [227] M. Kumar, Y. Guo, P. Zhang, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1522–1526.
- [228] M. Kumar, P. Zhang, *Langmuir* **2009**, *25*, 6024–6027.
- [229] T. Rantanen, M. L. Järvenpää, J. Vuojola, R. Arppe, K. Kuningas, T. Soukka, *Analyst* **2009**, *134*, 1713–1716.
- [230] K. Kuningas, H. Päkkilä, T. Ukonaho, T. Rantanen, T. Lövgren, T. Soukka, *Clin. Chem.* **2007**, *53*, 145–146.
- [231] N. Bogdan, F. Vetrone, R. Roy, J. A. Capobianco, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 7543–7550.
- [232] K. Song, X. G. Kong, X. M. Liu, Y. L. Zhang, Q. H. Zeng, L. P. Tu, Z. Shi, H. Zhang, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1156–1158.
- [233] H. H. Gorris, S. Bade, N. Röckendorf, E. Albers, M. A. Schmidt, M. Franek, A. Frey, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1580–1586.
- [234] J. Vuojola, T. Riuttamaki, E. Kulta, R. Arppe, T. Soukka, *Anal. Chim. Acta* **2012**, *725*, 67–73.
- [235] H. S. Mader, O. S. Wolfbeis, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 5002–5004.
- [236] R. Ali, S. M. Saleh, R. J. Meier, H. A. Azab, I. I. Abdalgawad, O. S. Wolfbeis, *Sens. Actuators B* **2010**, *150*, 126–131.
- [237] D. E. Achatz, R. J. Meier, L. H. Fischer, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 274–277; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 260–263.
- [238] L. N. Sun, H. S. Peng, M. I. J. Stich, D. Achatz, O. S. Wolfbeis, *Chem. Commun.* **2009**, 5000–5002.
- [239] M. Kumar, P. Zhang, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2431–2435.
- [240] W. J. Kim, M. Nyk, P. N. Prasad, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 185301.
- [241] Y. L. Liu, K. L. Ai, L. H. Lu, *Nanoscale* **2011**, *3*, 4804–4810.
- [242] J. M. Meruga, W. M. Cross, P. S. May, Q. Luu, G. A. Crawford, J. J. Kellar, *Nanotechnology* **2012**, *23*, 395201.
- [243] A. L. Ouellette, J. J. Li, D. E. Cooper, A. J. Ricco, G. T. A. Kovacs, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3216–3221.