

Analytische Chemie im Femtoliter

Hans H. Gorris* und David R. Walt*

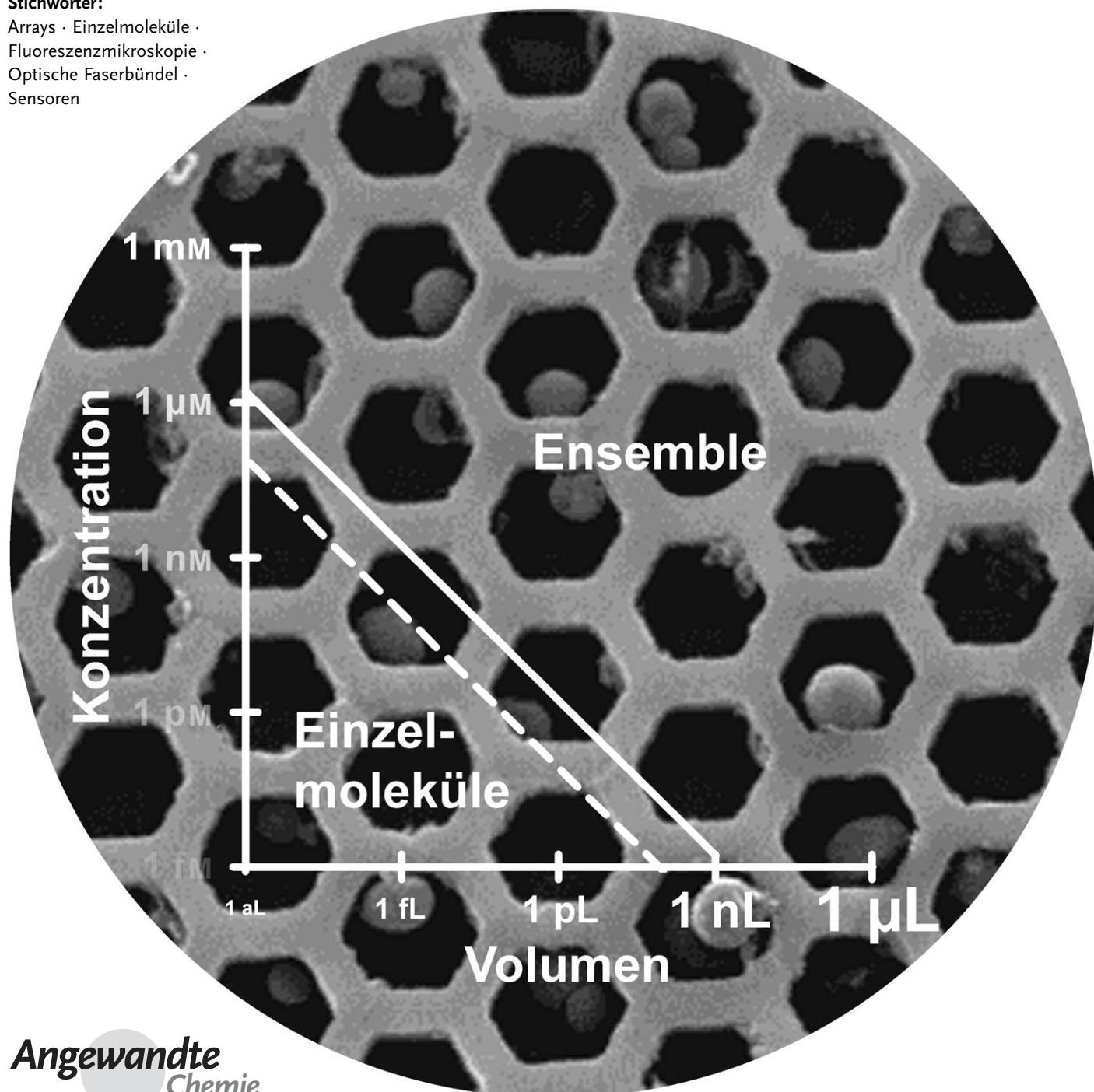
Stichwörter:

Arrays · Einzelmoleküle ·

Fluoreszenzmikroskopie ·

Optische Faserbündel ·

Sensoren



Die Kompartimentierung von Reaktionen in Femtoliter(fL)-Gefäßen und die Integration von fL-Gefäßen in Arrays verstärkt und beschleunigt nicht nur die chemische und biochemische Analyse, sondern führt auch zu neuen wissenschaftlichen Methoden und Erkenntnissen. Dieser Aufsatz stellt die verschiedenen fL-Gefäße und Array-Formate vor und lotet ihre Anwendungen für den Nachweis und die Charakterisierung von biologisch bedeutsamen Analyten aus. Wenn fL-Arrays mit Analyten, Sonden oder Zellen bestückt werden, können tausende analytischer Messungen parallel durchgeführt werden. Der Einschluss einzelner Enzymmoleküle in fL-Arrays ermöglicht die gleichzeitige Analyse einer Vielzahl individueller Enzymmoleküle. Neue Nanofabrikationstechniken und immer empfindlichere Nachweismethoden sind die treibende Kraft auf dem Gebiet der analytischen Chemie „im Femtoliter“. Unsere Übersicht befasst sich insbesondere mit dem Fortschritt und den Herausforderungen auf dem Gebiet der analytischen Chemie im fL mit Beispielen sowohl aus der Grundlagenforschung als auch aus der angewandten Forschung.

1. Einleitung

Ein Femtoliter ist ein Volumen mit den Abmessungen von $1 \mu\text{m}^3$, was dem ungefähren Volumen der bakteriellen Zelle *Escherichia coli* entspricht.^[1] Daher liegen fL-Gefäße im Größenbereich von lebenden Zellen, wobei sogar einzelne Zellen als miniaturisierte Gefäße zum Einsatz kommen.^[2] Ein freistehendes Tröpfchen von einem fL würde an der Luft innerhalb von 5 ms verdunsten.^[3] Deshalb ist es notwendig, fL-Volumina in Gefäßen einzuschließen, um Verdunstung zu verhindern. Neue Werkzeuge und Methoden sind für das Design von fL- und sub-fL-Gefäßen verfügbar, die daraufhin für die Durchführung von analytischer Chemie in äußerst kleinen Volumina verwendet werden können.

Abschnitt 2 behandelt die Herstellung und analytische Anwendungen von fL-Gefäßen. Weil der Durchmesser von fL-Gefäßen nur wenige Mikrometer beträgt, können tausende von räumlich angeordneten Gefäßarrays mit sehr hoher Dichte bilden.^[4] Solche Arrays können mit einer großen Zahl von Sonden gefüllt werden, die parallel abgefragt und somit für Mehrkanalmessungen verwendet werden können.^[5] Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine der empfindlichsten Techniken, um Analyte in äußerst kleinen Reaktionsgefäßchen nachzuweisen. In den letzten Jahren haben Fortschritte z.B. bei CCD- und CMOS-Detektoren (CCD: charge-coupled device; CMOS: complementary metal-oxide semiconductor) die schnelle und empfindliche Aufnahme von hochauflösten Fluoreszenzbildern ermöglicht. Analytische Messungen im großen Maßstab sind eine Voraussetzung, um große Datensätze zu erfassen, wie etwa die gesamte DNA-Sequenz des menschlichen Genoms. Diese Datensätze bilden beispielsweise die Grundlage für das neue Feld der Systemmedizin, welche die mit den neuen analytischen Techniken erfassten Informationen integriert. Das Ziel der Systemmedizin besteht darin, die komplexen Ursachen von Krank-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	3971
2. Von fL-Gefäßen zu fL-Arrays	3972
3. Einzelzellen in fL-Volumina	3977
4. Einzelmolekünachweis in fL-Volumina	3978
5. Zusammenfassung und Ausblick	3984

heiten aufzudecken und diagnostische Biomarker für Krankheiten zu finden.^[6]

Femtoliter-Gefäße und -Arrays sind besonders wichtig für die aufkommenden Arbeitsgebiete der Einzelzell- und Einzelmoleküldetektion, die getrennt in den Abschnitten 3 und 4 erörtert werden. Konventionelle Ensemble- oder Massen-Experimente können nur das durchschnittliche Verhalten einer Population, aber nicht den Beitrag der individuellen Mitglieder analysieren. Um die Unterschiede in einer Population zu beobachten, müssen Zellen oder Moleküle individuell analysiert werden. Individuelle lebende Zellen können in Arrays eingesortiert werden, indem die Gefäßgröße an die Größe eines gegebenen Zelltyps angepasst wird. Die direkte Einstellung individueller Moleküle eines Analyten in fL-Gefäßen ist dagegen nicht möglich. Eine alternative Strategie besteht darin, große Arrays aus fL-Gefäßen zufällig mit einer verdünnten Analytlösung zu füllen. Die erwartete Zahl von Molekülen in einem gegebenen Volumen bei einer be-

Tabelle 1: Erwartete Zahl von Molekülen in einem gegebenen Volumen bei einer bestimmten Konzentration.

Volumen		$1 \mu\text{M}$	1nM	1pM
$(1 \text{ mm})^3$	1 Mikroliter (μL)	10^{-6} L	6×10^{11}	6×10^8
$(100 \mu\text{m})^3$	1 Nanoliter (nL)	10^{-9} L	6×10^8	6×10^5
$(10 \mu\text{m})^3$	1 Pikoliter (pL)	10^{-12} L	6×10^5	6×10^2
$(1 \mu\text{m})^3$	1 Femtoliter (fL)	10^{-15} L	6×10^2	< 1
$(100 \text{ nm})^3$	1 Attoliter (aL)	10^{-18} L	< 1	

[*] Dr. H. H. Gorris

Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik
Universität Regensburg
Universitätsstraße 31, 93040 Regensburg (Deutschland)
Fax: (+49) 941-943-4064
E-Mail: hans-heiner.gorris@chemie.uni-regensburg.de
Prof. Dr. D. R. Walt
Department of Chemistry, Tufts University
62 Talbot Avenue, Medford, Massachusetts 02155 (USA)
Fax: (+1) 617-627-3443
E-Mail: david.walt@tufts.edu

stimmten Konzentration ist in Tabelle 1 aufgeführt. Wenn das Gefäßvolumen auf 1 fL verkleinert wird, führt dies zu weniger als einem Molekül pro Gefäß bei einer Konzentration von 1 nm. Um sicherzustellen, dass maximal ein einzelnes Molekül pro Gefäß vorliegt, werden noch niedrigere Konzentrationen verwendet. Infolgedessen liegt statistisch weniger als ein Molekül pro fL-Gefäß vor, und die meisten Gefäße bleiben leer. Große Arrays aus fL-Gefäßen ermöglichen es dennoch, eine Vielzahl individueller Moleküle gleichzeitig mit Fluoreszenzmikroskopie zu beobachten. In einer bahnbrechenden Arbeit von 1961 hat Rotman die Anreicherung eines fluoreszierenden Produkts durch einzelne Enzymmoleküle in Wasser-in-Öl-Tröpfchen nachgewiesen.^[7] Mit der Entwicklung sehr homogener fL-Arrays und moderner CCD-Detektoren ist es jetzt möglich geworden, die Kinetik von einzelnen Enzymmolekülen in Echtzeit zu analysieren.

2. Von fL-Gefäßen zu fL-Arrays

Obwohl es verschiedene Methoden zum Einschluss von fL- und sub-fL-Volumina gibt, lassen sich zwei generelle Ansätze zur Herstellung von äußerst kleinen Gefäßen unterscheiden. Der erste Ansatz (von unten nach oben, „bottom up“) besteht in der Selbstorganisation miniaturisierter Gefäße, beispielsweise von Emulsionen, Vesikeln oder Viruspartikeln. Ein umfassender Überblick über selbstorganisierte Nanogefäße, einschließlich solcher Gefäße, deren Volumen weit unterhalb von 1 fL liegt, würde den Rahmen dieses Aufsatzes sprengen und kann woanders gefunden werden.^[8] Andererseits können ultrakleine Gefäße durch Oberflächenstrukturierung, wie beispielsweise Ätztechniken hergestellt werden (von oben nach unten, „top down“). Beide Vorgehensweisen wurden für die Herstellung großer Arrays verwendet. Die Oberflächenstrukturierung ermöglicht die Herstellung von offenen Mikrokavitäten, die wiederholt gefüllt werden können. Dieser Abschnitt gibt eine Einführung in verschiedene fL-Gefäße und -Arrays und erörtert unterschiedliche Aspekte der analytischen Chemie im fL. Weitere Gefäßformate, die nur im Zusammenhang von Einzelzell- und Einzelmolekülstudien wichtig sind, werden in den Abschnitten 3 und 4 beschrieben.



Hans-Heiner Gorris studierte Biologie an der Universität Münster und der Universität von York, England. Er entwickelte einen Hochdurchsatz-Proteolyse-Assay in der Arbeitsgruppe von Dr. Andreas Frey am Institut für Infektiologie in Münster und am Forschungszentrum Borstel. 2005 promovierte er an der Universität Lübeck und arbeitete anschließend mit Prof. David Walt an der Tufts Universität an der Einzelmolekülkinetik von Enzymen in optischen Faserbündel-Arrays. Seit 2009 ist er Mitglied der Fakultät für Chemie und Pharmazie an der Universität Regensburg. Seine Forschungsinteressen umfassen die Einzelmolekül-Enzymologie, insbesondere im Hinblick auf Anwendungen für die Biomedizin, und die Entwicklung von miniaturisierten Assays.

2.1. Durch Emulsionen definierte Gefäße

2.1.1. Standardemulsionen

Ein einfacher Weg, um fL-Gefäße herzustellen, ist die Verwendung von Wasser-in-Öl-Emulsionen. Standardmethoden zur Emulsionsbildung bestehen darin, zwei unmischbare Flüssigkeiten, wie beispielsweise Wasser und Öl, in Gegenwart eines Detergents zu rühren.^[9] Die Größe der Wasser-in-Öl-Tröpfchen lässt sich durch die Intensität des Rührens einstellen. Solche Standardmethoden erlauben jedoch nur eine geringe Kontrolle über die Bildung individueller Tröpfchen, die normalerweise eine breite Größenverteilung aufweisen.^[10]

Wasser-in-Öl-Tröpfchen dienten als Reaktionsgefäße für die Polymeraskettenreaktion (PCR), um DNA ausgehend von sehr geringen Konzentrationen spezifisch zu vervielfältigen. Wenn sehr verdünnte Lösungen von Ausgangs-DNA über viele Tröpfchen verteilt werden, dann ist die wahrscheinlichste Zahl von DNA-Molekülen pro Tröpfchen null, aber einige der Tröpfchen enthalten eine einzelne Kopie des DNA-Moleküls. In Wasser-in-Öl-Tröpfchen mit einem Durchmesser von 2 bis 10 µm ist es möglich, die PCR mit nur einer einzigen Kopie eines DNA-Ausgangsmoleküls durchzuführen.^[11] Die Vervielfältigung von komplexen Genbibliotheken durch PCR in emulgierten Tröpfchen verhindert eine Rekombination zwischen homologen oder teilweise homologen Genfragmenten während der PCR, weil nur ein oder höchstens zwei DNA-Ausgangsmoleküle pro Tröpfchen vorhanden sind (Abbildung 1).^[12] Auf diese Weise kann die Synthese von kurzen, chimären PCR-Produkten und anderen Artefakten verhindert werden. Eine Emulsions-PCR wurde auch für die Festphasensequenzierung von DNA auf Mikrosphären verwendet.^[13] Ein DNA-Ausgangsmolekül wurde pro Mikrosphäre gebunden, und die Mikrosphären wurden anschließend mit einer PCR-Reaktionsmischung in emulgierten Tröpfchen eingeschlossen. Weil die PCR-Reaktionsmischung in jedem Tröpfchen eingeschlossen war, wurden Millionen identischer Kopien von einem DNA-Ausgangsmolekül auf den einzelnen Mikrosphären synthetisiert. Anschließend wurde die Emulsion aufgelöst und die Mikrosphären wurden automatisch sequenziert. Wasser-in-Öl-Tröpfchen mit einem mittleren Durchmesser von 2.6 µm (9 fL) wurden außerdem für die In-vitro-Transkription und -Translation in einem Zell-



David R. Walt ist Robinson-Professor für Chemie und Howard Hughes Medical Institute-Professor an der Tufts University. Seine Arbeitsgruppe nutzt Mikro- und Nanotechnologien zur Lösung biologischer Fragestellungen, wie die Analyse von genetischer Variation und das Verhalten einzelner Zellen. In der praktischen Analytik werden Arrays zum Nachweis verschiedener Substanzen eingesetzt, einschließlich Sprengstoffe, chemischer Kampfstoffe und Krankheitserreger im Essen oder Trinkwasser. Er ist Gründer, Direktor und Beiratsvorsitzender der Firmen Illumina und Quanterix.

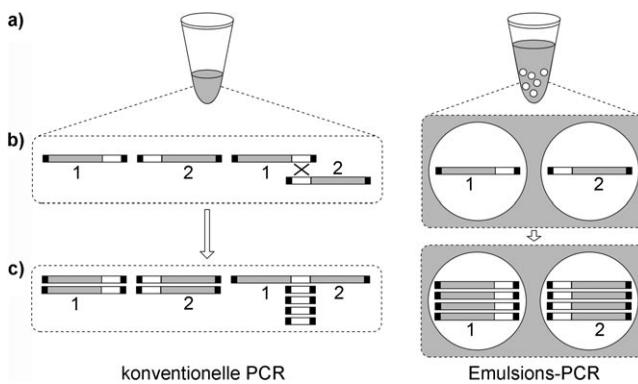


Abbildung 1. Vervielfältigung von komplexen Genbibliotheken durch konventionelle PCR und Emulsions-PCR. a) DNA-Fragmente werden bei der konventionellen PCR (links) zusammen vervielfältigt, während in emulgierten Wassertropfen ein oder höchstens ein paar DNA-Ausgangsmoleküle vorliegen (rechts). b) Ein identisches Verbindungsstück (schwarz) ligiert mit dem Ende jedes DNA-Moleküls zur Vervielfältigung mit einem PCR-Primer. Bei der konventionellen PCR können zwei DNA-Moleküle mit nicht homologen (grau, 1 und 2) und homologen Regionen (weiß) rekombinieren, was zur Bildung von chimären Produkten führt. Demgegenüber verhindert die Trennung der DNA-Ausgangsmoleküle in emulgierten Tropfen die Bildung chimärischer Produkte. c) Bei der konventionellen PCR werden die kurzen, chimären Produkte effizienter vervielfältigt als die DNA-Ausgangsmoleküle, weshalb sich artifizielle DNA gehäuft bildet. Die artifizielle DNA entsteht jedoch nicht bei der Emulsions-PCR. Wiedergabe in modifizierter Form mit Genehmigung von Lit. [12].

ähnlichen Volumen verwendet. Die Tropfen enthielten eine Transkriptions-/Translations-Reaktionsmischung zur Expression einzelner *HaeIII*-Methyltransferase-Gene.^[14] Vor kurzem wurde das verstärkt grün-fluoreszierende Protein (eGFP) durch zellfreie Proteinexpression in Wasser-in-Öl-Tropfen mit einem Durchmesser von 1 bis 100 µm synthetisiert.^[15]

2.1.2. Durch Mikrofluidik hergestellte Tropfen

Homogenere Wasser-in-Öl-Tropfen können mit mikrofluidischen Werkzeugen hergestellt werden. Die häufigsten mikrofluidischen Anordnungen zur Erzeugung von Wasser-in-Öl-Tropfen sind Fluss-fokussierende Kanäle und T-Kreuzungs-Kanäle.^[16] In Fluss-fokussierenden Kanälen fließt Öl durch zwei äußere Kanäle und eine wässrige Lösung durch einen zentralen Kanal. Die vereinten Flüssigkeiten werden durch eine enge Düse gepresst, um monodisperse wässrige Tropfen in Öl zu bilden.^[17] Auf diese Weise kann eine große Zahl monodisperser pL-Tropfen in Hexadecan^[16] oder Fluorkohlenstoffölen^[18] hergestellt werden. Durch Fluss-Fokussierung hergestellte Tropfen mit einem Volumen von 65 pL wurden als Reaktionsgefäß für PCR verwendet.^[19] Vor kurzem wurden einzelne DNA-Ausgangsmoleküle in 2-pL-Tropfen durch isothermische DNA-Amplifikation am rollenden Kreis (rolling circle amplification) vervielfältigt.^[20] Eine andere mikrofluidische Anordnung sind T-Kreuzungen, die aus einem Hauptkanal, der Öl enthält, und einem zweiten dazu senkrechten Kanal, der eine wässrige Lösung in den Ölstrom injiziert, bestehen. Monodisperse

Wasser-in-Öl-Tropfen entstehen durch die Scherkräfte an der T-Kreuzung.^[21] Eine kombinierte Anordnung aus T-Kreuzung und optischen Pinzetten erlaubt es, einzelne Mikrosphären, Zellen oder subzellulären Strukturen direkt in Wasser-in-Öl-Tropfen mit einem Volumen von etwa 90 fL einzufügen.^[22] Die Partikel können mit optischen Pinzetten von der wässrigen Lösung zu der Grenzfläche zwischen wässriger und Öl-Phase an der mikrofluidischen T-Kreuzung bewegt werden. Dann wird ein Druckimpuls auf die wässrige Phase übertragen, um ein Tropfen mit einer einzelnen Mikrosphäre aus Polystyrol, einer Zelle oder einem Mitochondrium abzuscheren. Alternativ kann die wässrige Lösung durch eine enge Mündung in eine nicht-mischbare Phase gepresst werden. Durch einen plötzlichen Sog löst sich sodann ein Tropfen ab.^[23] Tropfen mit einem Volumen von wenigen fL wurden mithilfe von optischen Pinzetten verschmolzen, um chemische Reaktionen einzuleiten. Optisch gehaltene Tropfen in Öl konnten zudem verkleinert und vergrößert werden.^[24] Mit einer piezoelektrischen Vorrichtung wurden Tropfen mit einem Durchmesser von 1 bis 2 µm (0.5–4 fL), die eGFP enthielten, in einer perfluorierten nicht-mischbaren Phase hergestellt.^[25] Diese Tropfen wurden anschließend mit einer optischen Pinzette an einem konfokalen Mikroskop in den Brennpunkt des Anregungslasers gehalten. In solch kleinen Volumina war das Photobleichen einzelner GFP-Moleküle schrittweise zu beobachten. Schließlich wurde ein gepulstes elektrisches Feld anstelle von Druck angelegt, um fL- bis pL-Tropfen in Öl herzustellen.^[26]

2.1.3. Tropfen in mikrofluidischen Kanälen

In mikrofluidischen Vorrichtungen können wässrige Tropfen durch Einführung eines wechselnden Stroms aus Wasser und einer zweiten nicht-mischbaren Flüssigkeit in einem mikrofluidischen Kanal kompartimentiert werden. Über die Reaktionen in mikrofluidischen Tropfen und ihre Anwendungen gibt es bereits Übersichtsartikel.^[27] Der Transport von Tropfen durch die Kanäle ist analog zu einem Flüssigkeitsstrom, und das kleinste Volumen dieser Tropfen wird von dem minimalen Kanaldurchmesser vorgegeben, der noch einen effektiven mikrofluidischen Transport erlaubt. Die Fließgeschwindigkeit durch einen Kanal ist linear proportional zum Druckabfall (ΔP), der durch die Hagen-Poiseuille-Gleichung (1) definiert ist.^[28]

$$\Delta P = \frac{128\mu VL}{\pi d^4} \quad (1)$$

μ ist die Viskosität der Flüssigkeit, V die volumetrische Fließgeschwindigkeit, l die Länge und d der Durchmesser des Kanals. Die Hagen-Poiseuille-Gleichung gilt für einphasige Strömung. Bei kleinen Tropfen treten jedoch signifikante Grenzflächeneffekte und mehrphasige Strömungen auf, was den Druckabfall weiter verstärkt. Der Druckabfall hängt hauptsächlich vom Kanaldurchmesser ab. Infolgedessen ist der Durchmesser von mikrofluidischen Kanälen im Allgemeinen breiter als 10 µm,^[29] sodass Tropfen in mikrofluidischen Kanälen den Größenbereich von fL überragen.

Tröpfchen in mikrofluidischen Vorrichtungen haben Anwendungen für PCR^[30] oder In-vitro-Transkription und -Translation von Proteinen^[31] gefunden. Die In-vitro-Expression von GFP wurde in einer großen Zahl von mikrofluidischen Tröpfchen mit fL-Volumen durchgeführt. Die Tröpfchen wurden in integrierten mikrofluidischen Bauteilen, die über ein Reservoir von etwa 10^6 Tröpfchen verfügen, hergestellt, inkubiert und durch Fluoreszenzmikroskopie ausgelesen. Ein einzelnes DNA-Ausgangsmolekül in den mikrofluidischen Tröpfchen reichte aus für die In-vitro-Expression von 30 000 GFP-Molekülen. Eine In-vitro-Expression von GFP wurde ebenfalls in fL-Tröpfchen durchgeführt (Abbildung 2).^[32] Durch eine kurze Verengung in einem mikrofluidischen Kanal wurde der Durchmesser der Tröpfchen auf ungefähr 5 µm (65 fL) verringert.

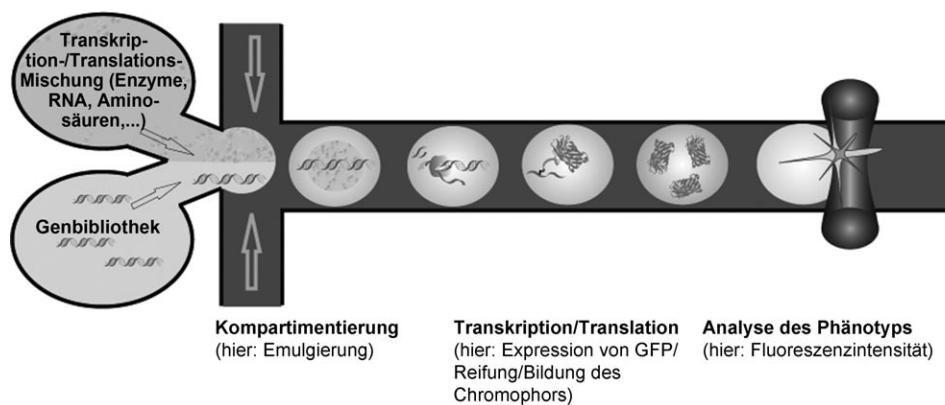


Abbildung 2. Wasser-in-Öl-Tröpfchen in einem mikrofluidischen Kanal. Die Komponenten für eine zellfreie Expression von Proteinen werden zusammen mit GFP-codierender DNA eingeschlossen. DNA wird in vitro exprimiert, während die Tröpfchen durch den Kanal wandern. Nachdem sich in den Tröpfchen der GFP-Chromophor autokatalytisch gebildet hat, lässt sich GFP durch Fluoreszenzspektroskopie nachweisen. Wiedergabe mit Genehmigung von Lit. [32].

2.1.4. Im Flüssigkeitsstrahl hergestellte Tröpfchen

Aerosole aus monodispersen fL-Wassertröpfchen, eingehüllt in Olivenöl, können aus nicht-mischbaren Flüssigkeiten durch elektrohydrodynamische Kräfte im koaxialen Flüssigkeitsstrahl erzeugt werden.^[33] Der elektrifizierte Strahl zerfällt und bildet ein Spray aus monodispersen Wassertröpfchen, die von Olivenöl umhüllt sind. Sowohl die Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeiten als auch die angelegte Spannung erlauben eine genaue Kontrolle über das Volumen der Wassertröpfchen und die Dicke der Ölöhle. Die bekannteste Anwendung für Elektrosprays ist die Massenspektrometrie, bei der geladene Ionen von Biomolekülen in den Flüssigkeitströpfchen enthalten sind.^[34] Für die Massenspektrometrie ist es jedoch unabdingbar, dass diese Tröpfchen im Vakuum verdunsten, während die Verdunstung bei den meisten anderen analytischen Anwendungen verhindert werden muss, sodass das Volumen der wässrigen Tröpfchen konstant bleibt.

2.2. Lipidvesikel

Anders als bei Emulsionen ist das Volumen von Lipidvesikeln oder Liposomen durch eine Lipiddoppelschicht begrenzt, sodass sowohl der Vesikelinhalt als auch die Umgebungslösung wässrig sind. Die Herstellungsmethoden und Anwendungen von Lipidvesikeln sind bereits in Übersichtsartikeln beschrieben.^[35] Ein Lipidvesikel mit einem fL-Volumen und eine biologische Zelle sind beide durch eine ähnliche Größe und eine Lipiddoppelschicht zur Begrenzung charakterisiert. Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten eignen sich Lipidvesikel gut, um die Reaktionsdynamik von biologischen Molekülen zu untersuchen.

Um chemische Reaktionen in einer biomimetischen Umgebung zu analysieren, wurden Lipidvesikel mit einem

Durchmesser von 1 bis 5 µm (0.5–65 fL) mit einer optischen Pinzette aus einem Infrarotlaser positioniert oder an einer modifizierten Glasoberfläche angeheftet.^[36] Chemische Reaktionen in diesen fL-Gefäßen wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Reaktionen wurden durch einen kurzen, intensiven elektrischen Impuls, der über Ultramikroelektroden angelegt wurde, eingeleitet. Dieser Impuls bewirkte entweder eine Elektroporation oder Elektrofusion der Lipidvesikel. Die Elektroporation führte zu einem Zustrom von Protonen. Infolge des sinkenden pH-Werts kam es in den Lipidvesikeln, die Fluorescein enthielten, zu einer Fluoreszenzlösung. Durch Elektrofusion zweier Vesikel ließen sich Reagentien quantitativ mischen. Zwei ausgewählte Vesikel, die jeweils einen anderen Fluoreszenzfarbstoff enthielten, wurden durch optische Pinzetten zusammengeführt und elektrofusioniert. Zur Analyse wurde der gemischte Inhalt des fusionierten Vesikels bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt.

In einem anderen Ansatz zur Immobilisierung wurden biotinylierte Lipidvesikel an die Oberfläche einer mit Neutravidin beschichteten Glasplatte gebunden (Abbildung 3).^[37] Der Durchmesser der Lipidvesikel variierte zwischen 1 und 10 µm (0.5–500 fL). Diese größeren fL-Reaktionsvesikel schlossen kleinere aL-Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 100 nm (0.5 aL) ein. Die Phasenübergangstemperaturen der aL-Vesikelmembranen legten die Temperatur fest, bei der die aL-Vesikel ihren Inhalt in die fL-Reaktionsvesikel abgaben. Unterschiedliche Reaktanten wurden bei den jeweiligen Phasenübergangstemperaturen nacheinander in das fL-Reaktionsgefäß entlassen. Durch die aufeinander folgende Mischung von zwei nicht-fluoreszierenden Substraten mit einem Enzym in dem fL-Reaktionsgefäß bildeten sich verschiedene fluoreszierende Produkte, was durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie beobachtet wurde.

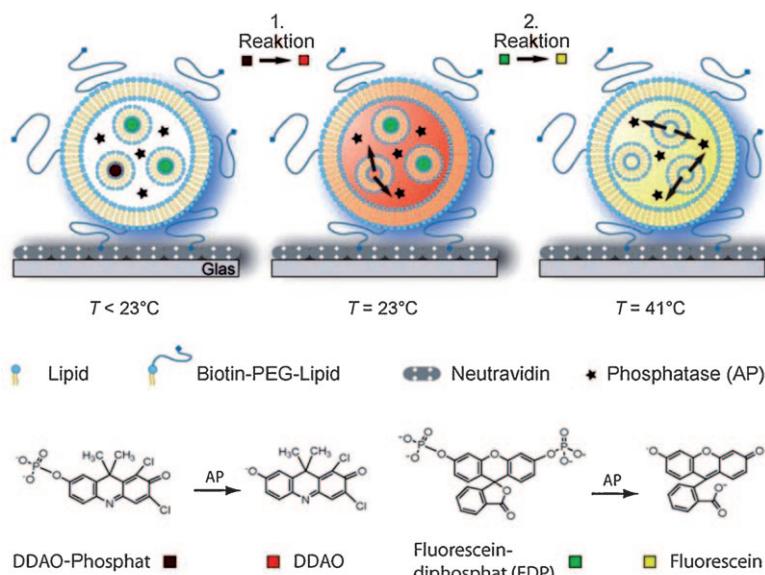


Abbildung 3. Aufeinander folgende Enzymreaktionen in einem oberflächengebundenen Lipidvesikel. Alkalische Phosphatase (AP, Sternchen) wird zusammen mit zwei Arten von kleineren Lipidvesikeln, die entweder mit Dichlordimethylacridinon (DDAO)-Phosphat (dunkelrot) oder mit Fluoresceindiphosphat (FDP, dunkelgrün) beladen sind, in ein größeres Vesikel eingebracht. Bei den Phasenübergangstemperaturen werden die Substrate in das Reaktionsvesikel abgegeben, wo sie durch das Enzym in ihre fluoreszierenden Produkte DDAO (hellrot) oder Fluorescein (hellgrün) umgewandelt werden. Wiedergabe mit Genehmigung von Lit. [37].

Biotinylierte Lipidvesikel wurden auch zur Selbstorganisation von Arrays aus oberflächengebundenen Gefäßen mit einem mittleren Durchmesser von 100 nm (0.5 aL) verwendet.^[38] Die auf der Vesikeloberfläche angebrachten Biotinliganden banden spezifisch an definierte Areale eines Glassubstrats, auf denen Streptavidin immobilisiert war. Diese Oberflächenareale wurden von Arealen umgeben, die unspezifische Anheftung verhinderten, sodass die Selbstorganisation des Arrays durch die gemusterte Oberflächenfunktionalisierung gesteuert wurde. Der Array hatte eine Größe von $0.4 \times 0.4 \text{ mm}^2$ mit einer Dichte von ca. 10^6 mm^{-2} . Die Autoren dieser Studie haben vorgeschlagen, dass Arrays aus Lipidvesikeln als Bibliotheken für das gleichzeitige Auslesen von Millionen von Analyten oder molekularen Funktionen verwendet werden könnten, für die man nur pL-Volumina an Reagentien benötigen würde.

Lipidvesikel mit einem Durchmesser von 10 bis 20 μm (520–4200 fL) wurden durch ein Netzwerk freihängender Nanokanäle verbunden (ca. 100 nm Durchmesser und 20–30 μm Länge).^[39] Diese nanofluidischen Schalter erlaubten es, fL-Volumina in ausgewählte Vesikel zu pumpen, indem der Energiezustand der Lipiddoppelschicht beeinflusst wurde. Die nanometergroßen Netzwerke aus Detergentien wurden für verschiedene Analysen verwendet, wie beispielsweise den Transport einzelner Nanopartikel, einzelner DNA-Moleküle, oder um Exozytose nachzuahmen.^[40]

2.3. Nanofaser-Kreuzungen

Elektrogesponnene Polymer-Nanofasern, die in einem rechtwinkligen Netz angeordnet sind, lassen sich zur Herstellung von Arrays mit fL- bis aL-Volumina verwenden (Abbildung 4).^[41] Nanofasern mit einem Durchmesser von 200 nm wurden durch Erwärmen oder durch Einwirkung von Lösungsmitteldämpfen miteinander verschmolzen, sodass sich Gefäße mit einem Volumen von 5 aL an den Faser-Kreuzungen bildeten. Durch die Fusion zweier Arten von Nanofasern, die mit verschiedenen fluorogenen Reaktanten beladen waren, bildete sich ein fluoreszierendes Reaktionsprodukt in den aL-Gefäßen, was durch Fluroreszenzmikroskopie beobachtet werden konnte. 1000 Fluorophormoleküle waren ausreichend, um ein Signal in diesen aL-Gefäßen nachzuweisen. Nicht-fluoreszierende Reaktionsprodukte wurden aus den Faser-Kreuzungen extrahiert und anschließend durch Massenspektrometrie analysiert.

2.4. Optische Faserbündel

Die gezielte Oberflächenstrukturierung mithilfe von Ätztechniken erlaubt es, eine große Zahl von fL-Gefäßen räumlich anzurichten. Diese maßgeschneiderten fL-Gefäße bilden einen Array, in dem jedes einzelne fL-Gefäß eine genau definierte Position hat. Bei solchen Arrays stellen schwankende Gefäßgrößen und Verschiebungen von Gefäßen kein Problem dar. Ein weiterer Vorteil für analytische Anwendungen ist das offene Gefäßformat, weshalb die individuellen Gefäße auch als Mikrokavitäten bezeichnet werden. Die Mikrokavitäten können mit Analytlösungen gefüllt werden, nachdem die Herstellung der

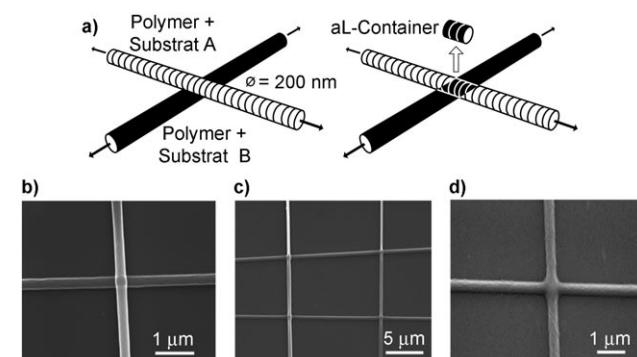


Abbildung 4. Nanofaser-Kreuzungen. a) Polymere Nanofasern, die unterschiedliche Reagentien enthalten, werden in einem rechtwinkligen Netz angeordnet. Die Reagentien werden durch ein Verschmelzen der Nanofasern gemischt. An den Kreuzungen bilden sich aL-Gefäße, in denen weniger als 1000 Moleküle nachweisbar sind. Rasterelektronenmikroskopische (SEM) Aufnahme der Nanofasern vor (b,c) und nach der Verschmelzung (d). Wiedergabe in modifizierter Form mit Genehmigung von Lit. [41].

Arrays abgeschlossen ist. Zudem kann ein Array mehrfach verwendet werden, indem die Mikrokavitäten gespült und wieder gefüllt werden.

Unsere Gruppe hat bei der Verwendung von optischen Faserbündeln zur Herstellung von Arrays mit einer hohen Dichte richtungweisende Arbeiten geleistet (Abbildung 5).^[42] Optische Faserbündel bestehen aus einigen 1000

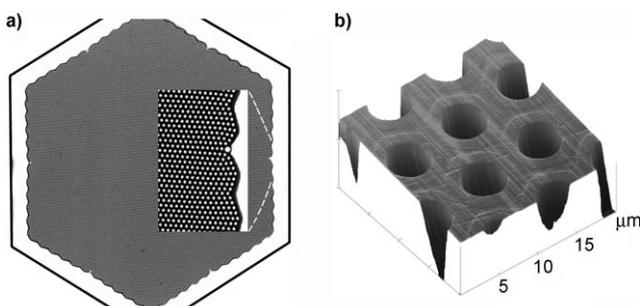


Abbildung 5. Femtoliter-Array auf einem optischen Faserbündel. a) Mikroskopische Abbildung des gesamten Faser-Arrays mit einem vergrößerten Ausschnitt. b) Die rasterkraftmikroskopische Aufnahme eines Teils der geätzten Oberfläche zeigt die homogenen Mikrokavitäten, die mit HCl geätzt wurden. Wiedergabe in modifizierter Form mit Genehmigung von Lit. [93].

bis 100 000 individuellen optischen Faserkernen mit Durchmessern von 2 bis 20 µm, die in einem gemeinsamen Matrixmaterial eingebettet sind, das einen geringeren Brechungsindex aufweist als das Kernmaterial. Die Faserkern-Wellenleiter übertragen optische Signale durch totale interne Reflexion über weite Entfernung bei geringer Signalabschwächung. Das Kernmaterial kann durch Säure selektiv geätzt werden, um einen Array aus gleichmäßigen fL-Kavitäten mit einer Dichte von rund 25 000 mm⁻² auf einem Ende des optischen Faserbündels herzustellen. Die Mikrokavitäten werden mit Fluoreszenzsonden beladen. Das andere Ende des Bündels ist an ein Epifluoreszenzmikroskop angeschlossen. Um die Kavitäten auszulesen, wird Anregungslicht in den gesamten Array gestrahlt. Das daraus resultierende Emissionslicht wird durch die einzelnen Faserkerne eingefangen, die den Boden jeder Kammer bilden. Jeder Faserkern leitet nur das Signal aus der Kavität weiter, mit der er verbunden ist. Auf diese Weise können zehntausende Reaktionsgefäße individuell ausgelesen werden. Das zurückkommande Emissionslicht wird gefiltert, um Streulicht zu entfernen, und dann durch eine CCD-Kamera aufgenommen.

Mikrosphären, deren Größe den Mikrokavitäten angepasst ist, ordnen sich durch Kapillarkräfte in zufälliger Weise in dem optischen Faserbündel an. Eine große Zahl von Mikrosphären kann auf der Oberfläche z.B. mit DNA oder mit Antikörpern modifiziert werden, bevor sie in den Array aufgenommen werden. Zur DNA-Analyse wurden mehr als 10¹¹ Mikrosphären pro Gramm homogen mit Oligonukleotiden functionalisiert und anschließend sehr gut reproduzierbar zu hunderten bis tausenden Arrays zusammengesetzt.^[43] Die zufällige Anordnung solcher Arrays erfordert, dass jede Mikrosphäre einen Erkennungscode zur Identifizierung ent-

halten muss, um die jeweiligen analytischen Elemente zu ordnen zu können.^[44] Im einfachsten Fall können die Mikrosphären mit einem oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen optisch codiert werden. Die relativen Konzentrationen der fluoreszierenden Markierungen können zur weiteren Unterscheidung dienen, sodass weitere Codes aus einem Satz an Fluoreszenzfarbstoffen abgeleitet werden können.^[45] Die codierenden Markierungen müssen sich von den Markierungen unterscheiden, die für die analytische Messung gebraucht werden. Eine direkte Fluoreszenz-Codierung ist begrenzt durch die Zahl der Farbstoffe und die Konzentrationen, die sich noch zuverlässig voneinander unterscheiden lassen. Eine alternative Codierungsstrategie wurde für Mikrosphären entwickelt, die mit Oligonukleotiden funktionalisiert waren. Die Nukleotidsequenz auf jeder Mikrosphäre wurde schrittweise durch einen kombinatorischen Fluoreszenz-Code entschlüsselt, indem in aufeinander folgenden Hybridisierungs- und Dehybridisierungs-Schritten komplementäre Oligonukleotide verwendet wurden, die bei jedem Schritt unterschiedliche Fluorophore trugen.^[46] Auf diese Weise lässt sich eine viel höhere Anzahl von Mikrosphären in zufälligen Arrays verwenden. Dieses System zur Entschlüsselung Oligonukleotid-funktionalisierter Mikrosphären sowohl in optischen Faserbündeln als auch in planaren Siliciumsubstraten wird von Illumina Inc. (San Diego, USA) kommerziell eingesetzt, um Genexpression zu analysieren und den Genotyp einzelner Nukleotidpolymorphismen (SNPs) im gesamten Genom zu bestimmen.

Optisch codierte Mikrosphären in optischen Faserbündeln wurden zum parallelen Nachweis von sechs biologischen Kampfstoffen verwendet.^[47] Mikrosphären wurden mit pathogenpezifischer DNA funktionalisiert und in dem Faserbündel angeordnet. DNA autoklavierter bakterieller Pathogene wurde daraufhin isoliert und durch PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern vervielfältigt. Die DNA in biologischen Kampfstoffen war innerhalb von 30 min mit einer Nachweisgrenze von 10 fm nachweisbar. Ein Sandwich-Assay wurde mit dem optischen Faserbündel-Array entwickelt, um Nahrungsmittelvergiftung durch *Salmonella* spp. nachzuweisen.^[48] Bakterielle Ziel-DNA wurde mit Fänger-Oligonukleotiden auf codierten Mikrosphären hybridisiert. Eine zweite fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonde wurde daraufhin mit der Ziel-DNA hybridisiert. Der Nachweis von Ziel-DNA in zwei aufeinander folgenden Erkennungsschritten erhöhte die Spezifität des Tests. In Gegenwart eines weiteren Enterobakteriums, *E. coli*, das eine hohe DNA-Sequenzähnlichkeit aufweist, wurde ausschließlich *Salmonella* spp. nachgewiesen. In ähnlicher Weise wurden drei toxinproduzierende Algenarten gleichzeitig mit einem Sandwich-Assay für ribosomale RNA (rRNA) nachgewiesen.^[49] Von rRNA existieren mehr als eine Millionen Kopien pro Zelle. Daher sind keine Vervielfältigungsschritte notwendig, um eine Nachweisgrenze von nur fünf Algenzellen zu erreichen. Der Sandwich-Assay ließ sich auch zum Proteinnachweis verwenden.^[50] In diesem Fall wurden Mikrosphären mit Fängerantikörpern funktionalisiert, die spezifisch für Immunglobulin A (IgA) und Lactoferrin waren. Ein zweiter fluoreszenzmarkierter Antikörper wurde zum Nachweis der Zielproteine mit geringer Kreuzreakтивität eingesetzt.

Schließlich wurden DNA- und Protein-Nachweis in einem gemeinsamen Test kombiniert.^[51] Mikrosphären wurden mit Antikörpern gegen die proinflammatorischen Zielproteine IL-6 und IL-8 funktionalisiert. Dann band ein mit Biotin markierter Sekundärantikörper an die Zielproteine. Biotinylierte Fänger-Oligonukleotide wurden über Avidin mit dem Sekundärantikörper verbunden. Das Fänger-Oligonukleotid hybridisierte mit einer sogenannten „Padlock“-DNA. Die Padlock-DNA ligierte an ein zirkuläres DNA-Molekül nur dann, wenn ein komplementärer DNA-Strang vorhanden war. Die zirkuläre DNA-Sonde wurde für eine DNA-Amplifikation am rollenden Kreis verwendet und die vervielfältigten Sequenzen wurden mit komplementären fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden hybridisiert. Eine Ziel-DNA des Atemwegserregers *Haemophilus influenzae* wurde ausgewählt, die für das äußere Membranprotein P6 codiert. Ein starkes Fluoreszenzsignal entstand nur dann, wenn die proinflammatorischen Proteine zusammen mit *H. influenzae* vorhanden waren.

Mit einem anderen Sensorformat, der „künstlichen Nase“, wurden die Prinzipien der Geruchswahrnehmung von Säugetieren nachgeahmt. Hierfür wurden die Mikrokavitäten von optischen Faserbündeln mit kreuzreaktiven Sensor-mikrosphären gefüllt,^[52] die im Gegensatz zu spezifischen Erkennungselementen auf mehrere Analyte ansprechen. Die Mikrosphären bestanden aus verschiedenen Polymeren, Oberflächenfunktionalitäten und solvatochromen Fluoreszenzfarbstoffen.^[53] Jeder Typ von Mikrosphären erzeugte ein einzigartiges Fluoreszenzmuster bei Kontakt mit einer bestimmten flüchtigen Substanz. Die kombinierten Fluoreszenzmuster verschiedener Mikrosphären in dem Array wurden dann zum „Trainieren“ eines Mustererkennungsalgorithmus verwendet, der die jeweilige Substanz identifizieren konnte, sogar in Gegenwart komplexer Dampfmischungen.^[54] Solche künstlichen Nasen waren in der Lage, sowohl verschiedene Typen von Kaffeebohnen aufgrund des Geruchs zu erkennen als auch explosive Dämpfe.^[55] Vor kurzem wurde eine tragbare künstliche Nase zum Nachweis von Brandstiftung am Tatort entwickelt.^[56]

3. Einzelzellen in fL-Volumina

Lebende Zellen werden normalerweise in Mikrotiterplatten untersucht, z.B. um die Wirksamkeit oder Toxizität von Medikamenten zu testen, für zelluläre Sensorik oder für zellbiologische Studien. Während Assays in Mikrotiterplatten nur die durchschnittliche Reaktion einer ganzen Zellpopulation verfolgen können, lassen sich mit Einzelzellexperimenten die Reaktionen individueller Zellen beobachten. Es gibt eine Vielzahl an Techniken, um Einzelzellen zu analysieren. Hier werden drei grundsätzliche Typen von Einzelzellexperimenten in fL-Volumina mit Beispielen aus der neueren Literatur vorgestellt.

3.1. Zellsortierung in mikrofluidischen Tröpfchen

Lebende Zellen können in mikrofluidischen Tröpfchen eingeschlossen werden. In einem 33-pL-Tröpfchen waren einzelne Hybridomazellen mehr als 6 h überlebensfähig und sezernierten Antikörper, die sich zu hohen Konzentrationen anreicherten.^[57] Nach Auflösung der Emulsion wurden die Antikörper durch ELISA-Verfahren (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) nachgewiesen. Obwohl es möglich war, das Tröpfchenvolumen auf 500 fL zu reduzieren, führte dieses kleine Zellkultivierungsvolumen zu einer schnell sinkenden Nährstoffversorgung und einer steigenden Abfallmenge, sodass das Überleben der Zellen beeinträchtigt war. Die Handhabung lebender Zellen in mikrofluidischen Tröpfchen ermöglichte eine miniaturisierte Art von Flusszytometrie und fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS). Eine weitere Voraussetzung für automatische Zellsortierung mit mikrofluidischen Vorrichtungen ist der Nachweis von fluoreszierenden Zellmarkern in einem Tröpfchen. Zwei Stämme von *E. coli*, die sich in der Expression von β-Galactosidase unterschieden, wurden mit dem fluorogenen Substrat Fluorescein-di-β-D-galactopyranosid in 12-pL-Tröpfchen eingeschlossen.^[58] Die bakteriellen Zellen ließen sich aufgrund ihrer enzymatischen Produktion von fluoreszierendem Fluorescein sortieren. Eine ähnliche Vorgehensweise wurde verwendet, um die Oberflächenproteine auf einzelnen menschlichen Monozyten zu analysieren (Abbildung 6).^[59]

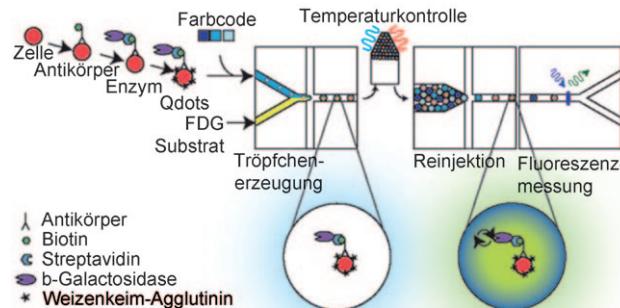


Abbildung 6. Mikrofluidische Zellsortierung. Proteine auf der Zelloberfläche werden zunächst sowohl mit einem Konjugat aus spezifischem Antikörper und β-Galactosidase als auch mit einem Lectin-markierten Antikörper markiert. Die Zellen werden daraufhin zusammen mit einem spezifischen Farocode und dem fluorogenen Substrat Fluorescein-di-β-D-galactopyranosid (FDG) in mikrofluidischen Tröpfchen eingeschlossen. Die Anhäufung von Fluorescein in jedem Tröpfchen wird nach einer bestimmten Inkubationszeit gemessen. Wiedergabe mit Genehmigung von Lit. [59].

Die Oberflächenproteine wurden mit Antikörper-gekoppelten Enzymen markiert. Die markierten Zellen wurden mit Fluorescein-di-β-D-galactopyranosid in mikrofluidischen Tröpfchen mit einem Durchmesser von 40 µm (33 pL) eingeschlossen. Die Anwesenheit der Markierungen auf der Zelloberfläche wurde daraufhin durch die Ansammlung von Fluorescein in individuellen Tröpfchen sichtbar. Schließlich wurden einzelne bakterielle Zellen in mikrofluidischen

Tröpfchen von 4 nL auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika untersucht.^[60]

3.2. Räumlich angeordnete Zellabscheidung

Lebende Bakterien,^[61] Hefe,^[62] oder Säugerzellen^[63,64] lassen sich durch Sedimentation einzeln in den Mikrokavitäten eines optischen Faserbündels ansiedeln. Hierfür muss die Größe der Mikrokavitäten an die Größe der jeweiligen Zelltypen angepasst werden, indem Fasern mit unterschiedlichen Durchmessern verwendet werden. Säugerzellen siedeln sich in Mikrokavitäten mit einem Durchmesser von 7 µm und einer Tiefe von 3 µm (ca. 85 fL) an.^[63] Mit einem Nährstoffvorrat versehen waren Säugerzellen mehr als 24 h in dem Faserbündel-Array lebensfähig. Zellen wurden mit lipophilen Fluorophoren,^[63] fluoreszenzmakierten Lectinen^[65] oder genetisch codierten fluoreszierenden Proteinen^[61,66] markiert, um sie durch Fluoreszenzmikroskopie zu identifizieren. Auf diese Weise ließen sich auf der Einzelzell-Ebene sowohl biologisch aktive Substanzen auf mögliche Funktionen in der Zelle hin testen als auch zelluläre Ereignisse analysieren. In praktisch allen Fällen fiel die Reaktion der Zellen individuell unterschiedlich aus – sogar bei Zellen, die den gleichen Genotyp aufwiesen, was die Bedeutung von Einzelzell-Messungen noch einmal betont. Andere Arrays für Einzelzell-Experimente wurden indirekt durch Lithographie und Gießtechniken hergestellt. Die indirekte Herstellung hat den Vorteil, dass mit einer Formvorlage viele Replikate produziert werden können. Ein großer Array mit über 30000 Mikrokavitäten mit 10 µm Durchmesser und 12 µm Tiefe (ca. 940 fL) wurde in Polystyrol gegossen, um einzelne Lymphozyten zu beherbergen.^[67] Die Stimulation von B-Zellen im Array durch ein Antigen führte zu einer individuellen Antwort jeder einzelnen Zelle. Die Aktivierung von Antigen-spezifischen B-Zellen wurde durch den fluoreszierenden Ca²⁺-Indikator Fluo-4 nachgewiesen. Die Antigen-spezifischen B-Zellen wurden daraufhin mithilfe einer Mikropipette aus dem Array zurückgewonnen.

Weichlithographie ist eine weitere indirekte Methode zur Herstellung von Arrays mit fL-Kavitäten, bei der eine Form als Vorlage zum Gießen von komplementären Strukturen in einem elastomeren Polymer, meistens Poly(dimethylsiloxan) (PDMS), verwendet wird.^[68] PDMS ist ungiftig und O₂-durchlässig. PDMS-Arrays mit ca. 10000 Mikrokavitäten unterschiedlicher pL-Volumina wurden verwendet, um sowohl adhärente Fibroblasten als auch nicht-adhärente Leukämiezellen einzuschließen.^[69] Zum Fluoreszenznachweis wurde Calcein AM, das die Zellwände durchqueren kann, zu den Zellen in den Mikrokavitäten gegeben. Esterasen im Zytoplasma katalysieren die Reaktion von nicht-fluoreszierendem Calcein AM zu einem fluoreszierenden Produkt. Diese Reaktion ist spezifisch für lebende Zellen, weil tote Zellen keine aktiven Esterasen mehr enthalten. PDMS-Arrays aus ca. 20000 Mikrokavitäten mit pL-Volumina wurden zur Isolierung von einzelnen Pheochromcytomazellen aus Ratten verwendet.^[70] Diese Zellen wurden einzeln in den Mikrokavitäten lysiert, um intrazelluläre Proteinkonzentrationen und Enzymaktivitäten zu bestimmen. Zellen,

die das rekombinante Fusionsprotein FLAG-GST exprimierten, wurden in den PDMS-Gefäßen in Gegenwart von antikörpermarkierten Mikrosphären lysiert. In diesem Sandwich-Assay banden die Antikörper das freigesetzte FLAG-GST. Anschließend wurde der PDMS-Array geöffnet, um FLAG-GST auf den Mikrosphären durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper nachzuweisen. Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten der intrazellulären Proteasen Calpain und Caspase 3 wurden Zellen in Gegenwart der entsprechenden fluorogenen Substrate lysiert. Anschließend wurde der Substratumsatz durch die Bildung eines fluoreszierenden Produkts beobachtet. Damit wurde gezeigt, dass solche einfachen Arrays aus PDMS ohne komplexe mikrofluidische Vorrichtungen zur Untersuchung der biochemischen Eigenschaften einzelner Zellen geeignet sind.

Durch Lithographie hergestellte Arrays aus Mikrokavitäten (50 µm Durchmesser, 10 µm Tiefe) wurden in einem Polymer aus SU-8 hergestellt und durch einen mikrofluidischen PDMS-Kanal abgedeckt, um Quorum sensing zu untersuchen.^[71] Das Quorum sensing hilft Bakterien, ihr Verhalten aufeinander abzustimmen, und wird aktiviert, wenn ein chemisches Signal eine Schwellenkonzentration überschreitet. Dies geschieht unter natürlichen Umständen dann, wenn Bakterien in einer hohen Dichte auftreten. Das Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* wird durch das Gen *lasB* kontrolliert, dessen Aktivität durch die rekombinante Expression von GFP nachgewiesen wurde. Eine bakterielle Zellkultur einer geringen Dichte wurde durch den PDMS-Kanal geleitet. Durch die anschließende Einleitung von Luft wurden ein bis drei Bakterienzellen in 100-fL-Tröpfchen isoliert. In solch kleinen Volumina baute eine einzelne bakterielle Zelle eine chemische Konzentration schnell genug auf, um Quorum sensing auszulösen.

3.3. Einzelzellen als Reaktionsgefäß

Lebende Zellen können als fL-Reaktionsgefäß angesehen werden.^[2] Zellen werden durch eine Lipiddoppelschicht begrenzt und sind in dieser Hinsicht ähnlich wie Lipidvesikel. In lebenden Zellen kann das Verhalten einzelner Biomoleküle in ihrem physiologischen Zusammenhang studiert werden. Diese Eigenschaft ist wichtig, weil biochemische Reaktionen in der Zelle sich häufig nicht im Gleichgewicht befinden und in komplexen Netzwerken interagieren. Einzmolekülstudien in lebenden bakteriellen Zellen haben neue Einblicke in Genregulation, Transkription, Translation und Replikation ermöglicht.^[72]

4. Einzmolekül-nachweis in fL-Volumina

Das Aufkommen neuer Techniken und immer empfindlicherer Detektionsmethoden zur Analyse von Enzymen und anderen Biomolekülen auf der Einzmolekül-Ebene hat unser Verständnis biochemischer Mechanismen, die vorher in Ensemble-Reaktionen verborgen waren, grundlegend erweitert. Für EinzmolekülExperimente muss das Detektionsvolumen mit dem zu analysierenden Einzmolekül minimiert werden,

sodass es mit einem hohen Vertrauensniveau lokalisiert werden kann. Bei der Durchführung von Einzelmolekülstudien zur Enzymkatalyse mittels Fluoreszenzmikroskopie kommen zwei grundlegende Formate zum Einsatz. Einzelne Enzymmoleküle können entweder auf einer Oberfläche immobilisiert oder in fL- und sub-fL-Gefäßen kompartimentiert werden, wie beispielsweise in emulgierten Tröpfchen, Lipidvesikeln, Viruskapsiden oder in Oberflächen-geätzten fL-Gefäßen. Beide Einzelmolekülformate lassen sich miteinander kombinieren. Einzelne Enzymmoleküle können beispielsweise auf der Oberfläche oder am Boden von fL-Gefäßen immobilisiert werden.

Dieser Aufsatz schließt Techniken ein, bei denen Enzyme auf der Oberfläche ultrakleiner Gefäße immobilisiert sind, wohingegen andere Einzelmolekülexperimente nur kurz abgehendelt werden. Weil in Experimenten mit immobilisierten Enzymmolekülen nur eine kleine Zahl von Fluorophormolekülen beobachtet wird, muss das Anregungsvolumen klein sein, um das Hintergrundsignal aufgrund von fluoreszierenden Unreinheiten und Raman-Streuung zu reduzieren. In einem abnehmenden Anregungsvolumen bleibt das Signal eines einzelnen Fluorophors konstant, während der Hintergrund linear sinkt.^[73] Konfokale und Totale-Interne-Reflexions(TIRF)-Mikroskopie werden am häufigsten zur Reduzierung des Anregungsvolumens eingesetzt. Individuelle Moleküle der Meerrettichperoxidase, β -Galactosidase, λ -Exonuklease und Lipase wurden jeweils auf einer Oberfläche immobilisiert.^[74] Alternativ wurden Cholesteroloxydase in einem Agarose-Gel^[75] und GFP in einem Polyacrylamid-Gel^[76] immobilisiert, sodass sie nicht diffundieren konnten. Einzelmolekülexperimente mit immobilisierten Enzymen erlauben es, aufeinander folgende katalytische Zyklen in Echtzeit aufzunehmen und die Wartezeiten bis zur Beendigung der jeweiligen Zyklen zu analysieren. Während die individuellen Wartezeiten stochastische Ereignisse sind, werden die statistischen Eigenschaften von dem zugrundeliegenden katalytischen Mechanismus bestimmt. Solche Einzelmolekülanalysen haben dynamische Schwankungen in aufeinander folgenden katalytischen Zyklen enthüllt, die sich auf Konformationsänderungen im Enzym zurückführen lassen.^[75,77]

Bei der zweiten Art von Einzelmolekülexperimenten werden Enzymmoleküle in Gefäßen räumlich kompartimentiert, was den Vorteil hat, dass sterische Hinderung, partielle Inaktivierung oder Störung der Enzymstruktur aufgrund von Oberflächenimmobilisierung vermieden werden.^[78] Eine Reduzierung des Gefäßvolumens führt zu einer Grenze, bei der statistisch gesehen ein Enzymmolekül pro Gefäß vorhanden ist (Abbildung 7). Für fL-Gefäße liegt die Grenze zum Erhalt einer Einzelmolekül-Konzentration im pikomolaren Bereich. Obwohl einzelne Enzymmoleküle nicht direkt in jedes fL-Gefäß abgelegt werden können, lassen sich große Arrays mit fL-Gefäßen zufallsbasiert mit einer verdünnten Enzymlösung füllen. Bei der Einzelmolekül-Konzentrationsgrenze enthält ein Gefäß wegen statistischer Schwankungen allerdings nicht unbedingt genau ein Enzymmolekül. Die Poisson-Verteilung beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass ein seltenes Ereignis bei einer großen Zahl von Versuchswiederholungen eintritt. Die Wahrscheinlichkeit $P_\mu(x)$, dass ein Gefäß genau x En-

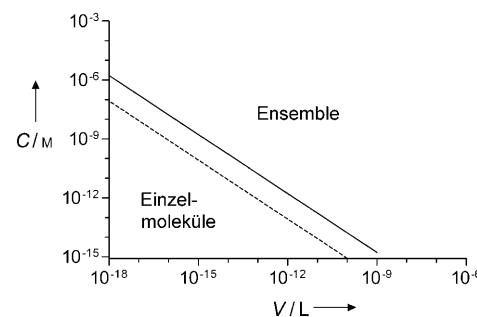


Abbildung 7. Die Einzelmolekül-Konzentrationsgrenze. Die Konzentration (C), die im Durchschnitt ein Molekül pro Gefäß erzielt (durchgehende Linie), ist umgekehrt proportional zum Gefäßvolumen (V). Die tatsächliche Belegung mit Molekülen ist durch die Poisson-Verteilung [Gl. (2)] gegeben. Ein 1:20-Verhältnis von Molekülen zu Gefäßen (gestrichelte Linie) erzielt 95 % leere Gefäße, 5 % mit einem einzelnen und nur 0.1 % mit zwei oder mehr Molekülen.

zymmoleküle enthält, ist durch Gleichung (2) gegeben, in der μ die durchschnittliche Zahl der Enzymmoleküle pro Gefäß ist:

$$P_\mu(x) = \frac{e^{-\mu} \mu^x}{x!} \quad (2)$$

Die Poisson-Verteilung ist ein einfaches statistisches Mittel, um zu bestimmen, wie die Zahl von fL-Gefäßen mit einem einzelnen Enzymmolekül maximiert werden kann. Bei einem 1:20-Verhältnis von Molekülen zu Gefäßen sind z.B. 95 % der Gefäße leer, 5 % enthalten ein einzelnes Molekül und nur 0.1 % enthalten mehr als ein einzelnes Molekül. Eine weitere Konzentrationssenkung, um die Wahrscheinlichkeit einer Mehrfachbelegung der Gefäße zu verringern, geht immer mit einer größeren Zahl von leeren Gefäßen einher. Daher ist dieser Ansatz nur sinnvoll, wenn Arrays mit einer großen Zahl von fL-Gefäßen zur Verfügung stehen.

Ein fluorogenes Substrat kann einfach zusammen mit der verdünnten Enzymlösung in dem Array eingeschlossen werden. Die Substratkonzentration ist viel höher als die Enzymkonzentration, und der Ausdruck „Einzelmolekülexperiment“ bezieht sich daher nur auf das Enzym. Die Substratkonzentration kann variiert werden, um verschiedene Reaktionsbedingungen zu untersuchen. Während jedes fL-Gefäß die gleiche Substratmenge enthält, wird das fluoreszierende Produkt nur in denjenigen Gefäßen beobachtet, die mit einem einzelnen Enzymmolekül belegt sind. Weil die Aktivität eines einzelnen Enzymmoleküls beobachtet wird, ist es nicht notwendig, die exakte Konzentration der Enzymlösung zu kennen, die in konventionellen Ensemble-Reaktionen ein kritischer Parameter für die genaue Berechnung der Wechselzahl k_{cat} ist. Beim Einzelmolekül-Ansatz werden ausschließlich aktive Enzyme beobachtet, sodass sich solche Kompromisse wie die Angabe von Enzym-Units erübrigen. Zudem ist es komfortabel, die Molarität der Substrat- und Produktlösung durch die Gesamtzahl der Moleküle im eingeschlossenen fL-Volumen anzugeben, um eine direkte Maß für die Wechselzahl zu erhalten. Eine typische Substratkonzentration von 100 μM in einem fL-Volumen entspricht ein paar Millionen Molekülen.

4.1. Durch Emulsionen definierte Tröpfchen

Das erste Experiment mit einzelnen Enzymmolekülen wurde 1961 von Rotman durchgeführt.^[7] Eine Lösung des Enzyms β-Galactosidase wurde zusammen mit dem fluorogenen Substrat 6-Hydroxyfluoran-β-D-galactopyranosid in Silikonöl gesprührt. Der Durchmesser der daraus resultierenden Wasser-in-Öl-Tröpfchen war breit verteilt zwischen 0.1 und 40 µm, aber es wurden nur Tröpfchen mit einem Durchmesser von 14 bis 15 µm (1400 fL) ausgewählt. Die Zahl der Enzymmoleküle in den Tröpfchen wurde mithilfe der Poisson-Verteilung berechnet. Die Reaktionsgeschwindigkeiten in den emulgierten Tröpfchen ergaben sich aus dem Vergleich des angesammelten fluoreszierenden Produkts 6-Hydroxyfluoran mit gleichgroßen Tröpfchen, die nur eine Standardkonzentration von 6-Hydroxyfluoran enthielten. Diese Studie zeigte, dass Inaktivierung durch Hitze zu einer Mischung aus aktiven und inaktiven Enzymmolekülen führte statt zu einer Tealinaktivierung aller Enzymmoleküle – ein Ergebnis, das bei vorherigen Ensemble-Experimenten verborgen geblieben war. Zum damaligen Zeitpunkt dieser Experimente schränkte die Empfindlichkeit der Methoden die zeitliche Auflösung allerdings stark ein, sodass es nur möglich war, die Produktansammlung nach 15 h zu messen.

Die Verfügbarkeit moderner CCD-Kameras ermöglichte es, den Substratumsatz einzelner Chymotrypsinmoleküle in Wasser-in-Öl-Tröpfchen parallel mit einer Zeitauflösung von 8 min zu messen.^[79] Es wurde eine Konzentration verwendet, die maximal ein Enzymmolekül in einem Tröpfchen mit 1 µm Durchmesser erzielte. Weil die Tröpfchengröße wieder breit verteilt war, wurden größere Tröpfchen von der Software nicht berücksichtigt. Kleinere Tröpfchen wurden dagegen ausgewertet, da die Wahrscheinlichkeit, dass sie mehr als ein Enzymmolekül enthielten, noch geringer war. Chymotrypsin setzt das fluorogene Substrat (SucAAPF)₂-Rhodamin 110 zu fluoreszierendem Rhodamin 110 um. Eine Einschränkung dieses Substrats ist jedoch seine komplizierte Reaktionskinetik, da jedes Substratmolekül zwei Spaltungsstellen für Chymotrypsin besitzt. Die Bildung von Rhodamin 110 in Wasser-in-Öl-Tröpfchen war nicht konstant über den Veruchsverlauf, sondern wies Unterschiede zwischen unterschiedlichen Chymotrypsinmolekülen auf.

4.2. Lipidvesikel

Biotinylierte Lipidvesikel mit 100 nm Durchmesser (0.5 aL) und einer homogenen Größenverteilung wurden über eine Avidin-Brücke an die Oberfläche von Glas, das mit einer biotinylierten Lipiddoppelschicht bedeckt war, gebunden.^[80] In diesen Lipidvesikeln wurden einzelne Moleküle der Adenylatkinase, die mit Texas Red markiert war, oder des Rinderserumalbumins (BSA), das mit Tetramethylrhodamin markiert war, analysiert. Ein Photobleichen dieser Fluorophormarkierungen erfolgte schrittweise, wodurch sich die Proteinmoleküle in einem Vesikel zählen ließen. Nur diejenigen Vesikel, bei denen das Photobleichen in einem einzigen Schritt erfolgte, enthielten ein einzelnes Proteinmolekül und wurden für Einzelmolekülexperimente verwendet. Durch

Polarisationsmikroskopie wurde gezeigt, dass Proteinmoleküle in den Lipidvesikeln und in Lösung ähnliche Bewegungsfreiheit haben. Diese Einschlusstechnik in Vesikeln wurde verwendet, um Konformationsschwankungen einzelner Adenylatkinase-Moleküle durch resonanten Fluoreszenzenergietransfer (FRET) zwischen zwei Markierungen in der Kerndomäne des Proteins in Echtzeit zu messen.^[81] Die Übergänge bei der Faltung ließen sich als korrelierte Schritte in der Donor- und Akzeptor-Intensität beobachten. Die Größe dieser Schritte und die Dauer der Übergänge waren breit verteilt.

Ein Austausch der Lösung in oberflächengebundenen Vesikeln mit 200 nm Durchmesser erfolgte durch Membranperforierung mit dem bakteriellen Toxin α-Hämolysin oder durch Inkubation der Vesikel in der Nähe der Phasenübergangstemperatur, um Defekte in der Lipiddoppelschicht zu erzeugen.^[82] Diese Technik wurde zur Untersuchung des Proteins RecA aus *E. coli* verwendet, das einzelsträngige DNA (ssDNA) stabilisiert. Beide Enden der ssDNA wurden mit komplementären FRET-Donor- und -Akzeptorfarbstoffen markiert. RecA-Monomere lagern sich rund um die ssDNA zu einem Filament zusammen, sodass ssDNA, die im natürlichen Zustand gewunden ist, gestreckt wird und die FRET-Farbstoffe auseinandergedrückt werden. Infolgedessen sinkt die FRET-Effizienz. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass im Durchschnitt ein ssDNA-Molekül und sieben RecA-Moleküle pro Vesikel vorhanden waren. Bei der Dissoziation von RecA und ssDNA wird ATP hydrolysiert. ATP wurde durch die Membranporen ausgetauscht, wohingegen ssDNA und RecA nicht passieren konnten. Auf diese Weise ließ sich wiederholt die Bindung und Dissoziation des gleichen RecA-Filaments an einem ssDNA-Molekül beobachten.

Mit optischen Pinzetten gehaltene Lipidvesikel mit 3.3 bis 11 µm Durchmesser (20–700 fL) wurden verwendet, um einzelne Moleküle der alkalischen Phosphatase einzuschließen.^[83] Um nur Vesikel mit einem einzelnen Enzymmolekül auszuwählen, wurde alkalische Phosphatase mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, sodass die eingeschlossenen Enzymmoleküle in einem Vesikel gezählt werden konnten. Das fluorogene Substrat Fluoresceindiphosphat wurde in einem anderen Lipidvesikel eingeschlossen. Die Inhalte der unterschiedlichen Vesikel wurden daraufhin durch Elektrofusion gemischt. Das Reaktionsprodukt Fluorescein wurde durch Fluoreszenzmikroskopie gemessen, und die enzymatischen Umsätze wurden mit Fluorescein-beladenen Vesikeln standardisiert. Individuelle Moleküle der alkalischen Phosphatase zeigten langlebige (1 h) und breit verteilte Aktivitäten, die auf unterschiedliche Konformationen zurückgeführt wurden.

4.3. Viruskapside

Ein weiteres biomimetisches Gefäßformat für Einzelmolekülstudien ist das Viruskapsid (Abbildung 8).^[84] Viele Viren sind von einem ikosaedrischen Proteinkapsid mit Durchmessern von 12 bis 500 nm bedeckt.^[85] Das Kapsid des Pflanzenvirus CCMV (cowpea chlorotic mottle virus) hat einen inneren Durchmesser von 18 nm und legt dadurch ein

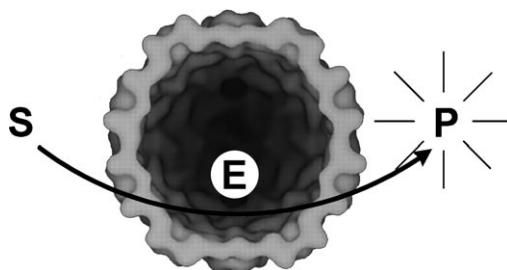


Abbildung 8. Ein einzelnes HRP-Molekül (E) eingeschlossen in einem Viruskapsid. Das Substrat Dihydrorhodamin (S) diffundiert in das Kapsid, wo es zum fluoreszierenden Produkt Rhodamin (P) umgesetzt wird. Das fluoreszierende Produkt häuft sich an, bevor es schließlich durch die Kapsidporen hinausdiffundiert. Wiedergabe in modifizierter Form mit Genehmigung von Lit. [84] und [103].

Gefäßvolumen von 3 zL fest. Einzelne Moleküle der Meerrettichperoxidase (HRP) ließen sich kompartimentieren, indem die Kapsidproteine des CCMV um die HRP-Moleküle ein selbstorganisiertes Gefäß bildeten. Eingeschlossene HRP-Moleküle oxidierten das fluorogene Substrat Dihydrorhodamin zum flureszierenden Produkt Rhodamin, das mit Fluoreszenzmikroskopie detektiert wurde. Ein abgeschlossenes Volumen von 3 zL mit einer 0.5 µM Substratkonzentration würde nur ein einzelnes Substratmolekül in jedem tausenden Kapsid zu Folge haben. Daher sind Enzymreaktionen in abgeschlossenen zL-Volumina nicht durchführbar. Diese Einschränkung von abgeschlossenen zL-Gefäßen wurde dadurch vermieden, dass die Durchlässigkeit der Proteinhülle gröszenabhängig war, sodass zwar das Enzym im Kapsid eingeschlossen war, aber Substrat und Produkt passieren konnten. Außerdem war die Durchlässigkeit der Kapsidporen pH-abhängig, wodurch sich der Zugang des Substrats zum Enzym steuern ließ.

4.4. Kapillarelektrophorese

Kapillarelektrophorese lässt sich ebenfalls für Einzelmolekülstudien verwenden. Im Unterschied zu anderen fL-Gefäßformaten begrenzt eine Kapillare ein Volumen nur in zwei Richtungen, ist aber in Fließrichtung offen. Frei bewegliche Einzelmoleküle der Lactatdehydrogenase,^[86] alkalischen Phosphatase^[87] oder β-Galactosidase^[88] wurden elektrophoretisch entlang einer Kapillar mit 10 bis 20 µm Durchmesser, die ein fluorogenes Substrat enthielt, getrennt. Der Abstand der individuellen Enzymmoleküle wurde so eingestellt, dass sich die Diffusionszonen des fluoreszierenden Produkts nicht überlappten. Nach einer bestimmten Zeit wurde das fluoreszierende Produkt durch Elektrophorese zu einem Fluoreszenzdetektor bewegt, wo das angesammelte Produkt jedes einzelnen Enzymmoleküls quantitativ bestimmt wurde. Obwohl diese Endpunktbestimmung nicht die Kinetik individueller Enzymmoleküle in Echtzeit verfolgen kann, haben diese Experimente einen anderen Vorteil: Weil Produkt und Enzym aufgrund unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilitäten getrennt werden können, kann dasselbe Enzymmolekül noch einmal mit frischem Substrat oder einem anderen Substrat inkubiert werden. Während individuelle Enzymmo-

leküle bei wiederholter Inkubation dieselbe Aktivität aufwiesen, unterschied sich die Aktivität zwischen den Enzymmolekülen – im Fall der Lactatdehydrogenase um einen Faktor 4. Diese Unterschiede wurden unterschiedlichen, langlebigen Konformationen der Lactatdehydrogenase zugeschrieben. β-Galactosidase von *E. coli* wies ebenfalls eine breite, zwanzigfache Aktivitätsverteilung auf, wobei der Großteil der Moleküle innerhalb einer vierfachen Verteilung fiel. Kristallisierung von β-Galactosidase zur Reinigung beeinflusste diese breite Aktivitätsverteilung nicht, aber sie reduzierte die durchschnittliche Aktivität. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der alkalischen Phosphatase hingegen waren nur bei Verwendung eines Säugerenzymes heterogen, aber homogen als das gut gereinigte bakterielle Enzym untersucht wurde. Diese Ergebnisse wurden durch posttranskriptionale Modifikationen erklärt (z.B. Glycosylierungen), die häufig bei Säugerenzymen auftreten, jedoch nicht bei Bakterien.

4.5. Lithographisch hergestellte Arrays

Homogene Arrays mit fL- und sub-fL-Gefäßen können durch lithographische Techniken direkt in Oberflächen hergestellt werden.^[89] Arrays aus Löchern mit einem Durchmesser von 50 nm wurden durch Elektronenstrahl-Lithographie in einem 100 nm dicken Metallfilm auf einem Deckglas hergestellt.^[90] Der Durchmesser der Löcher war kleiner als die Wellenlänge von Licht, sodass diese „Nullmodus“-Wellenleiter Licht nicht weiterleiteten und Fluorophore nur im evaneszenten Feld an der Grenzschicht von Glas und Metall angeregt wurden. In diesen Nullmodus-Wellenleitern wurde DNA-Polymerasen so immobilisiert, dass maximal ein Molekül pro Wellenleiter vorlag. Um die enzymatische Synthese doppelsträngiger DNA zu starten, wurden verschiedene fluoreszenzmarkierte Nukleotidtriphosphate zugesetzt. Diese Nukleotidanaloga ließen sich nacheinander bei jedem Bindungschnitt an die Polymerase nachweisen. Jedesmal wenn ein fluoreszierendes Nukleotid in den DNA-Strang eingebaut wurde, konnte für eine kurze Zeit ein starkes Fluoreszenzsignal gemessen werden, bis der Fluoreszenzfarbstoff entweder ausbleichte oder aus dem evaneszenten Feld diffundierte. Weil das evaneszente Feld effektiv ein zL-Beobachtungsvolumen definierte, wurde der Fluoreszenzhintergrund stark verringert. Daher ließen sich relativ hohe mikromolare Konzentrationen der fluoreszierenden Nukleotide verwenden, wie sie für eine effiziente Funktion der meisten Polymerasen erforderlich sind. Die Löcher im Metallfilm blieben offen, sodass eine Substratverschöpfung in solch kleinen sub-fL-Reaktionsvolumina vermieden wurde. Diese Technik wurde von Pacific Biosciences Inc. (Menlo Park, USA) zur DNA-Sequenzierung in Echtzeit kommerzialisiert.^[91]

Arrays mit fL-Kavitäten wurden durch Photolithographie in der Oberfläche von Quarzglas hergestellt.^[92] Die halbrunden Kavitäten mit 8 µm Durchmesser und 4 µm Tiefe besaßen ein Volumen von 135 fL. Die Gefäße wurden durch Anlegen von Ultraschall und Vakuum gefüllt und mit einem Deckglas verschlossen. Einzelne Moleküle der Lactatedehydrogenase (LDH-1) in den Gefäßen katalysierten die Redoxreaktion von NAD⁺ und Lactat zu fluoreszierendem NADH und

Pyruvat. Diese enzymatische Reaktion wurde mit einer durch Metallionen katalysierten Redoxreaktion verglichen. Einzelne Os^{VIII}-Ionen katalysierten die Redoxreaktion von Ce^{IV} und As^{III} zu fluoreszierendem Ce^{III} und As^V. Beide Reaktionen wurden durch Weitfeld-Mikroskopie verfolgt. Die Aktivitäten individueller LDH-1-Moleküle unterschieden sich um den Faktor 3, während die Reaktionsgeschwindigkeiten individueller Metallionen ähnlicher waren. Die breitere Aktivitätsverteilung der Enzymmoleküle wurde durch unterschiedliche Konformationen erklärt, die bei individuellen Metallionen nicht vorkommen.

4.6. Optische Faserbündel

Wir haben individuelle Moleküle der β -Galactosidase aus *E. coli* in einem homogenen Array aus 46-fL-Gefäßchen, die in die Oberfläche von optischen Faserbündeln geätzt wurden, eingeschlossen.^[93] β -Galactosidase setzte das Substrat Resorufin- β -D-galactopyranosid in einem einfachen hydrolytischen Schritt zu stark fluoreszierendem Resorufin um (Abbildung 9). Resorufin wurde über das Faserbündel durch Weitfeld-Mikroskopie sowohl angeregt als auch gemessen. Die genauen Reaktionsgeschwindigkeiten hunderter Enzymmoleküle ließen sich individuell bestimmen. Die fL-Gefäßchen hatten die optimale Größe, damit sich eine relativ

kleine Zahl von Produktmolekülen zu einer nachweisbaren Konzentration aufbauen konnte, aber gleichzeitig eine ausreichende Zahl von Substratmolekülen vorhanden war, um Substratverschöpfung zu vermeiden. Ein Photobleichen des Produkts Resorufin ließ sich durch die Bestimmung der Ausbleichgeschwindigkeit mit einer Standard-Resorufinlösung korrigieren. Die Beobachtung einer großen Population individueller β -Galactosidase-Moleküle im optischen Faserbündel offenbarte breite verteilte und langlebige Substratumsätze.^[94] Diese statische Heterogenität ließ sich auf unterschiedliche Konformationen der β -Galactosidase zurückführen. Diese Ergebnisse bestätigten vorherige Einzelmolekülstudien und gingen über diese hinaus,^[88,92] weil die Aktivitätsverteilungen bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen wurden. Die normalisierte Geschwindigkeitsverteilung war unabhängig von der Substratkonzentration. Daher konnten wir darauf schließen, dass Unterschiede im katalytischen Schritt k_{cat} die Ursache für die breite Aktivitätsverteilung sind. Während die Substratumsätze von β -Galactosidase in den fL-Gefäßchen ähnlich wie in freier Lösung waren, zeigte sich bei Meerrettichperoxidase (HRP) eine zehnfach langsamere Produktbildung auf der Einzelmolekülebene als in freier Lösung.^[95] Diese Verlangsamung in den fL-Gefäßchen lässt sich durch den besonderen Redoxmechanismus von HRP erklären: Zuerst wird das fluorogene Substrat Amplex Red durch den Transfer eines Elektrons zu einem nicht-fluoreszierenden Amplex Red-Radikal oxidiert. Danach dismutieren zwei Moleküle der radikalischen Zwischenstufe unabhängig vom Enzym zum fluoreszierenden Produkt Resorufin. Wenn HRP in einem fL-Gefäß eingeschlossen ist, dann ist die Dismutationsrate geringer und weniger Produkt wird gebildet.

β -Galactosidase wurde zum ersten Mal verwendet, um kompetitive Enzyminhibition auf der Einzelmolekülebene zu untersuchen (Abbildung 9).^[96] Wenn der langsam bindende Inhibitor D-Galactal zu der Lösung mit Enzym und Substrat im optischen Faserbündel gegeben wurde, ließ sich der Komplex aus Enzym und Inhibitor als Phase ohne Substratumsatz identifizieren, wohingegen das freie Enzym durch Substratumsatz gekennzeichnet war. In einem „pre-steady-state“-Experiment wurde β -Galactosidase zunächst mit einer D-Galactal-Konzentration inkubiert, die wesentlich höher war als die Inhibitionskonstante K_i , anschließend stark verdünnt und in dem fL-Array eingeschlossen. Durch einen zeitversetzten Beginn des Substratumsatzes in den fL-Gefäßchen wurden die stochastischen Ereignisse der Freisetzung von D-Galactal sichtbar. Obwohl β -Galactosidase ein Tetramer mit vier Untereinheiten ist, schalteten individuelle β -Galactosidase-Moleküle bei der Aktivierung direkt von keiner auf die höchste Aktivität um. Diese Beobachtung kann durch eine kooperative Freisetzung von D-Galactal von allen vier Untereinheiten erklärt werden. Außerdem wurde die Inhibitionskinetik unter Gleichgewichtsbedingungen („steady-state“) untersucht, indem β -Galactosidase über einen längeren Zeitraum mit einer D-Galactal-Konzentration inkubiert wurde, die K_i entsprach. Dabei konnte beobachtet werden, wie D-Galactal mehrmals an β -Galactosidase band und anschließend wieder freigesetzt wurde. Der Substratumsatz individueller Enzymmoleküle änderte sich nach der Inhibitor-

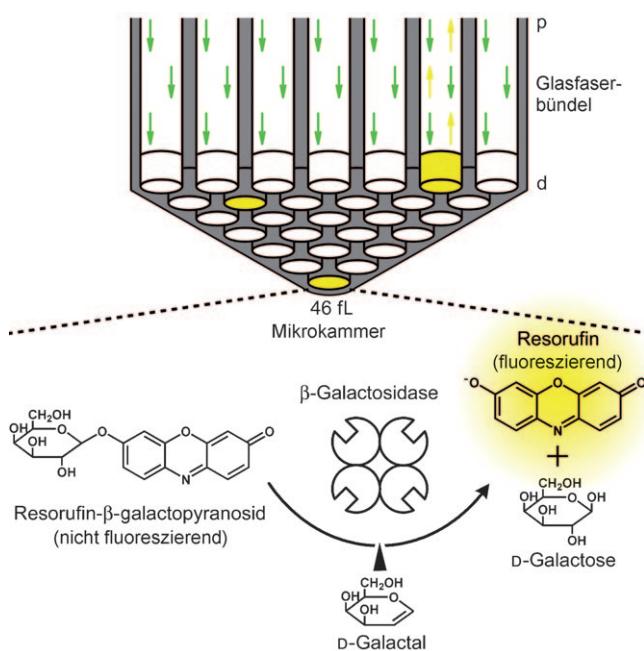


Abbildung 9. Einzelmolekülexperiment in einem optischen Faserbündel-Array mit 50 000 Fasern. Gefäße mit einem Volumen von 46 fL werden gleichmäßig in das distale Ende (d) der einzelnen Fasern geätzt (Faserkern: weiß, Matrixmaterial: grau). Die Gefäße werden mit einer Silicondichtung (nicht gezeigt) verschlossen, und das Fortschreiten der Reaktion wird durch das proximale Ende (p) des Faserbündels mit Fluoreszenzmikroskopie beobachtet. Individuelle Enzymmoleküle setzen das fluorogene Substrat Resorufin- β -D-galactopyranosid zu fluoreszierendem Resorufin (gelbe Gefäße) um. Dieser Prozess wird inhibiert, sobald ein Inhibitor an das Enzym bindet. Wiedergabe mit Genehmigung von Lit. [96].

freisetzung, was andeutete, dass die Bindung und Freisetzung von D-Galactal mit Konformationsänderungen der katalytischen Zentren einhergeht. Die Geschwindigkeitskonstanten, die sich aus den stochastischen Ereignissen der Inhibitorbindung und -freisetzung ableiten ließen, stimmten mit der entsprechenden Ensemble-Reaktionskinetik überein.

Schließlich wurden einzelne β -Galactosidase-Moleküle als Reporter für verschiedene einzelne Analytmoleküle verwendet, die an die Oberfläche der fL-Gefäße gebunden waren. Hierbei wurde das Bindungereignis eines einzelnen Analytmoleküls durch seine Enzymmarkierung, die zur Signalverstärkung diente, nachgewiesen. Um das Prinzip dieser Methode zu demonstrieren, wurden einzelne β -Galactosidase-Moleküle, die mit Streptavidin markiert waren, auf einer biotinylierten Gefäßoberfläche eingefangen.^[97] Das Enzym ließ sich nach dem Verschließen der fL-Gefäße durch die Ansammlung von fluoreszierendem Resorufin nachweisen. Diese Technik wird von Quanterix Inc. (Cambridge, USA) für diagnostische Anwendungen weiterentwickelt. Proteine aus menschlichem Serum werden an die Gefäßoberfläche gebunden und durch β -Galactosidase markiert. Die daraus folgende hohe Empfindlichkeit ist wichtig, weil die Konzentration vieler Proteine unterhalb der Nachweisgrenze herkömmlicher Nachweisverfahren liegt. Alternativ ließen sich ssDNA-Moleküle auf der Gefäßoberfläche eines optischen Faserbündels befestigen.^[98] Die ssDNA hybridisierte mit einem biotinylierten komplementären DNA-Strang, der daraufhin Streptavidin-markierte β -Galactosidase band. Durch die enzymatische Signalverstärkung waren einzelne DNA-Moleküle in femtomolaren Konzentrationen nachweisbar.

4.7. Arrays in PDMS

Identische PDMS-Folien mit Arrays aus 30-fL-Gefäßen wurden wiederholt mittels einer lithographisch hergestellten Siliconvorlage gebildet.^[99] Eine Lösung aus Enzym und Substrat wurde zwischen dem PDMS-Array und einer Glasplatte gefüllt. Gasblasen und überschüssige Lösung wurden durch mechanischen Druck aus den fL-Gefäßen entfernt, und die Adhäsion von PDMS an Glas war ausreichend, um die Gefäße zu verschließen. Einzelne β -Galactosidase-Moleküle wurden untersucht, indem die Hydrolyse des Substrats Fluorescein-di- β -D-galactopyranosid zum fluoreszierenden Produkt Fluorescein mit Weitfeld-Mikroskopie beobachtet wurde. Weil ein 1:1-Verhältnis zwischen Enzymmolekülen und fL-Gefäßen verwendet wurde, enthielten einige Gefäße mehr als ein einzelnes β -Galactosidase-Molekül. Die Verteilung der Enzymaktivitäten in den fL-Gefäßen wurde der unterschiedlichen Zahl von Enzymmolekülen zugeschrieben, die in jedem Gefäß vorhanden waren. Dieser Ansatz verdeckte jedoch die breiten Aktivitätsunterschiede individueller β -Galactosidase-Moleküle, wie sie von anderen Gruppen beobachtet wurden.^[88, 92, 94] Ein fL-Array in PDMS wurde später mit einer mikrofluidischen Vorrichtung kombiniert, um Reaktanten innerhalb von etwa 100 ms zu mischen, bevor sie mittels eines Deckglases in den fL-Gefäßen eingeschlossen wurden.^[100] Die Aktivität einzelner β -Galactosidase-Moleküle wurde durch die Hydrolyse von Resorufin- β -D-ga-

lactopyranosid zu fluoreszierendem Resorufin gemessen. Die kurze Vorlaufzeit ermöglichte es, die Enzymkinetik einzelner Enzymmoleküle sowohl zu einem frühen Zeitpunkt als auch im Fließgleichgewicht zu beobachten. In einem anderen PDMS-Array aus 4-fL-Gefäßen wurden einzelne α -Chymotrypsin-Moleküle mit einem Fluorophor-Protein-Substrat, dessen Fluoreszenz nach der enzymatischen Spaltung stark anstieg, untersucht.^[101]

F_1 -ATPase ist ein weitverbreitetes biologisches Motorenzym, dessen Drehung mechanochemisch an ATP-Hydrolyse oder -Synthese gekoppelt ist. Mit einer ausgefächerten Kombination aus einem PDMS-Array mit 6-fL-Gefäßen und F_1 -ATP-Synthetase, die an einer Glasoberfläche befestigt war, wurde die ATP-Hydrolyse und -Synthese auf der Einzelmolekülebene untersucht (Abbildung 10).^[102] F_1 -ATPase

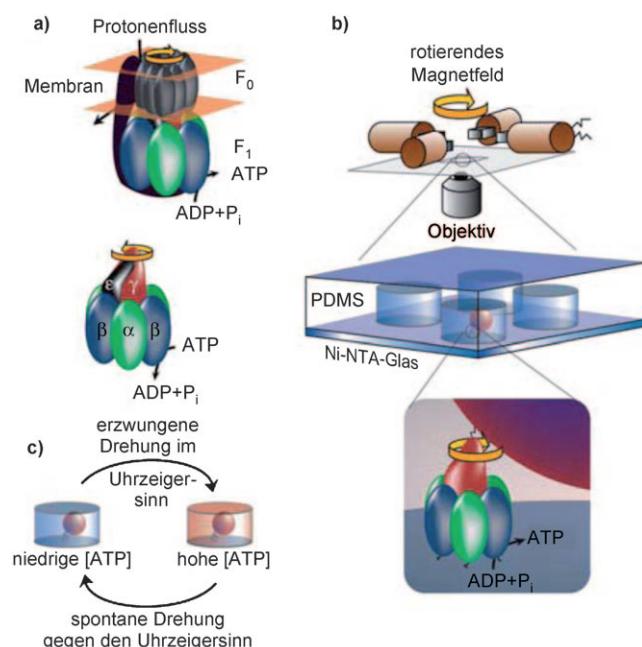


Abbildung 10. Einzelmolekülexperiment mit F_1 -ATP-Synthase in einem fL-Gefäß. a) In der membranintegrierten F_0F_1 -ATP-Synthase dreht F_0 , das seinerseits durch Protonen angetrieben wird, F_1 im Uhrzeigersinn zur Synthese von ATP. b) Eine magnetische Mikrosphäre ist mit der oberflächengebundenen F_1 -ATPase verbunden und wird mithilfe von magnetischen Pinzetten gedreht, um ATP gegen ein chemisches Potential zu synthetisieren. Der PDMS-Array bedeckt das Glas so, dass nur ein einzelnes F_1 -ATPase-Molekül in einem fL-Gefäß vorhanden ist. c) Sobald das Magnetfeld entfernt wird, dreht sich der molekulare Motor entsprechend dem ATP-Gradienten gegen den Uhrzeigersinn mit einer Geschwindigkeit, die proportional zur synthetisierten ATP-Menge in einem Gefäß ist. Wiedergabe mit Genehmigung von Lit. [102].

wurde mit einer magnetischen Mikrosphäre markiert und an die Oberfläche einer Glasplatte gebunden. Daraufhin wurde das Glas mit einem PDMS-Array so bedeckt, dass ein fL-Gefäß maximal ein einzelnes F_1 -ATPase-Molekül enthielt. Die magnetische Mikrosphäre auf der F_1 -ATPase wurde mittels magnetischer Pinzetten im Uhrzeigersinn gedreht, um gegen ein chemisches Potential ATP-Synthese in den fL-Gefäßen anzutreiben. Die Gefäße waren groß genug, um eine

physikalische Behinderung der rotierenden Mikrosphäre zu vermeiden. Als das Magnetfeld abgeschaltet wurde, drehte sich der molekulare Motor mit dem chemischen Gradienten gegen den Uhrzeigersinn. Die Geschwindigkeit war proportional zur Menge des synthetisierten ATP. Dieses Einzelmolekülexperiment bestätigte eine sehr hohe mechanochemische Kopplung der F₁-ATPase, da eine Umdrehung des molekularen Motors jeweils mit drei katalytischen Ereignissen einherging.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Aufsatz haben wir die analytischen Anwendungen verschiedener fL- und sub-fL-Gefäßformate erörtert. Solche Gefäße lassen sich entweder durch Selbstorganisation bilden („von unten nach oben“) oder durch Oberflächenstrukturierung, wie z. B. durch Ätztechniken („von oben nach unten“). Diese Unterscheidung ist jedoch nicht allumfassend, denn Nanofaser-Kreuzungen fallen beispielsweise in keine der beiden Gruppen. Gefäße, die sich durch Selbstorganisation bilden, sind emulierte Tröpfchen, Lipidvesikel oder Viruspartikel. Durch Ätztechniken lassen sich offene fL-Gefäße (bzw. Kavitäten) auf Oberflächen mithilfe von lithographischen Masken herstellen oder auf optischen Faserbündeln, bei denen die Anordnung der fL-Kavitäten durch das Material definiert ist. Alternativ lässt sich die geätzte Oberfläche als Vorlage für den Abdruck von fL-Kavitäten in PDMS verwenden. In eine Oberfläche geätzte oder gegossene Kavitäten können wiederholt mit Analyten, Sensoren oder Zellen gefüllt werden. Wegen ihrer kleinen Abmessungen können fL-Gefäße Arrays mit einer sehr hohen Dichte bilden. Arrays auf optischen Faserbündeln haben beispielsweise eine Dichte von rund 25 000 mm⁻². Die für die parallele Durchführung tausender analytischer Messungen benötigte Array-Fläche ist somit kleiner als ein Stecknadelkopf.

Einzmolekülstudien mit Enzymen und anderen Biomolekülen sind wichtige Anwendungen für fL-Gefäße. Einzmolekülexperimente ermöglichen neue Sichtweisen auf Enzymkinetik und Enzymmechanismen, die in Ensemble-Experimenten verborgen bleiben. Das Einschließen einzelner Enzymmoleküle in fL-Gefäßen erfordert keine Oberflächenimmobilisierung der Enzyme. Daher werden sterische Hinderung, partielle Inaktivierung oder Störung der Enzymstruktur vermieden. Femtoliter-Gefäße haben eine ideale Größe für Einzmolekülstudien mit Enzymen, denn sie sind klein genug für die Isolierung einzelner Enzymmoleküle und häufen schnell eine hohe Produktkonzentration an, sind dabei aber groß genug, um eine ausreichende Zahl von Substratmolekülen zu enthalten und Substraterschöpfung zu vermeiden. Einzmolekülexperimente in fL-Gefäßen beruhen auf der Verfügbarkeit von großen Arrays mit einer hohen Dichte, weil man nur bei Verwendung eines Bruchteils der Gefäße ausschließen kann, dass ein gegebenes Gefäß von mehr als einem einzelnen Molekül belegt wird. Trotz der spärlichen Belegung der Gefäße lassen sich in großen Arrays gleichzeitig hunderte oder tausende individueller Enzymmoleküle beobachten.

Femtoliter-Arrays wurden sowohl für analytische Messungen als auch zur Grundlagenforschung in der Einzmolekülkinetik verwendet. Diese beiden Felder fließen zusammen im Bereich der Einzmolekülsensorik, die ein digitales Auslesen eines Analyten ermöglicht. Diese Techniken umfassen DNA-Sequenzierung mit einzelnen DNA-Polymerase-Molekülen in Nullmodus-Wellenleitern^[91] oder die Verstärkung eines Einzmolekül-Bindungsereignisses durch eine Enzymmarkierung in optischen Faserbündeln.^[97] Während Standardinstrumente die Konzentration eines Analyten analog messen, erhält man durch Einzmolekümlemessungen ein digitales Signal eines Analyten. Bei einem digitalen Signal besteht die Perspektive, die Empfindlichkeit zu erhöhen, da es wegen seiner binären Natur resistent gegen Hintergrundrauschen ist.

Femtoliter-Arrays bieten die Aussicht, die analytische Chemie in punkto Empfindlichkeit zum höchsten Ziel zu tragen: dem Einzmolekülnachweis. Neue Techniken zur Herstellung von homogenen, ultrakleinen Gefäßen versprechen einen raschen Fortschritt der analytischen Chemie im Femtoliter. Wir gehen davon aus, dass die analytische Chemie im fL einige analytische Standardmethoden sowohl in Forschungslaboratorien als auch in verschiedenen kommerziellen Anwendungen verdrängen wird.

Eingegangen am 13. November 2009
Online veröffentlicht am 23. April 2010

- [1] D. S. Goodsell, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 203–206.
- [2] X. S. Xie, J. Yu, W. Y. Yang, *Science* **2006**, *312*, 228–230.
- [3] D. T. Chiu, R. M. Lorenz, G. D. Jeffries, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5111–5118.
- [4] C. N. LaFratta, D. R. Walt, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 614–637.
- [5] K. D. Bake, D. R. Walt, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 515–547.
- [6] C. Auffray, Z. Chen, L. Hood, *Genome Med.* **2009**, *1*, 2.
- [7] B. Rotman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1961**, *47*, 1981–1991.
- [8] D. M. Vriezema, M. C. Aragones, J. A. A. W. Elemans, J. J. L. M. Cornelissen, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1445–1489.
- [9] J. Bibette, F. L. Calderon, P. Poulin, *Rep. Prog. Phys.* **1999**, *62*, 969–1033.
- [10] P. Becher, *Emulsions: Theory and Practice*, Oxford University Press, Oxford, **2001**.
- [11] M. Nakano, J. Komatsu, S. Matsuura, K. Takashima, S. Katsura, A. Mizuno, *J. Biotechnol.* **2003**, *102*, 117–124.
- [12] R. Williams, S. G. Peisajovich, O. J. Miller, S. Magdassi, D. S. Tawfik, A. D. Griffiths, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 545–550.
- [13] a) M. Margulies, M. Egholm, W. E. Altman, S. Attiya, J. S. Bader, L. A. Bemben, J. Berka, M. S. Braverman, Y. J. Chen, Z. T. Chen, S. B. Dewell, L. Du, J. M. Fierro, X. V. Gomes, B. C. Godwin, W. He, S. Helgesen, C. H. Ho, G. P. Irzyk, S. C. Jando, M. L. I. Alenquer, T. P. Jarvie, K. B. Jirage, J. B. Kim, J. R. Knight, J. R. Lanza, J. H. Leamon, S. M. Lefkowitz, M. Lei, J. Li, K. L. Lohman, H. Lu, V. B. Makhijani, K. E. McDade, M. P. McKenna, E. W. Myers, E. Nickerson, J. R. Nobile, R. Plant, B. P. Puc, M. T. Ronan, G. T. Roth, G. J. Sarkis, J. F. Simons, J. W. Simpson, M. Srinivasan, K. R. Tartaro, A. Tomasz, K. A. Vogt, G. A. Volkmer, S. H. Wang, Y. Wang, M. P. Weiner, P. G. Yu, R. F. Begley, J. M. Rothberg, *Nature* **2005**, *437*, 376–380;
b) J. Shendure, G. J. Porreca, N. B. Reppas, X. X. Lin, J. P.

- McCutcheon, A. M. Rosenbaum, M. D. Wang, K. Zhang, R. D. Mitra, G. M. Church, *Science* **2005**, *309*, 1728–1732.
- [14] D. S. Tawfik, A. D. Griffiths, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 652–656.
- [15] A. V. Pietrini, P. L. Luisi, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1055–1062.
- [16] M. Hashimoto, S. S. Shevkoplyas, B. Zasonska, T. Szymborski, P. Garstecki, G. M. Whitesides, *Small* **2008**, *4*, 1795–1805.
- [17] S. L. Anna, N. Bontoux, H. A. Stone, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *82*, 364–366.
- [18] C. Holtze, A. C. Rowat, J. J. Agresti, J. B. Hutchison, F. E. Angile, C. H. J. Schmitz, S. Koster, H. Duan, K. J. Humphry, R. A. Scanga, J. S. Johnson, D. Pisignano, D. A. Weitz, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1632–1639.
- [19] M. M. Kiss, L. Ortoleva-Donnelly, N. R. Beer, J. Warner, C. G. Bailey, B. W. Colston, J. M. Rothberg, D. R. Link, J. H. Leamon, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8975–8981.
- [20] L. Mazutis, A. F. Araghi, O. J. Miller, J. C. Baret, L. Frenz, A. Janoshazi, V. Taly, B. J. Miller, J. B. Hutchison, D. Link, A. D. Griffiths, M. Ryckelynck, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 4813–4821.
- [21] P. Garstecki, M. J. Fuerstman, H. A. Stone, G. M. Whitesides, *Lab Chip* **2006**, *6*, 437–446.
- [22] M. Y. He, J. S. Edgar, G. D. M. Jeffries, R. M. Lorenz, J. P. Shelby, D. T. Chiu, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1539–1544.
- [23] R. M. Lorenz, J. S. Edgar, G. D. M. Jeffries, D. T. Chiu, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6433–6439.
- [24] G. D. M. Jeffries, J. S. Kuo, D. T. Chiu, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1348–1350; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1326–1328.
- [25] J. Tang, A. M. Jofre, G. M. Lowman, R. B. Kishore, J. E. Reiner, K. Helmerson, L. S. Goldner, M. E. Greene, *Langmuir* **2008**, *24*, 4975–4978.
- [26] M. Y. He, J. S. Kuo, D. T. Chiu, *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *87*, 031916.
- [27] a) S. Y. Teh, R. Lin, L. H. Hung, A. P. Lee, *Lab Chip* **2008**, *8*, 198–220; b) H. Song, D. L. Chen, R. F. Ismagilov, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7494–7516; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7336–7356; c) A. Huebner, S. Sharma, M. Srivastava, F. Hollfelder, J. B. Edel, A. J. Demello, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1244–1254.
- [28] S. Prakash, A. Piruska, E. N. Gatimu, P. W. Bohn, J. V. Sweedler, M. A. Shannon, *IEEE Sens. J.* **2008**, *8*, 441–450.
- [29] G. M. Whitesides, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1161–1165.
- [30] Y. H. Zhang, P. Ozdemir, *Anal. Chim. Acta* **2009**, *638*, 115–125.
- [31] F. Courtois, L. F. Olgun, G. Whyte, D. Bratton, W. T. S. Huck, C. Abell, F. Hollfelder, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 439–446.
- [32] P. S. Dittrich, M. Jahnz, P. Schwille, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 811–814.
- [33] I. G. Loscertales, A. Barrero, I. Guerrero, R. Cortijo, M. Marquez, A. M. Ganan-Calvo, *Science* **2002**, *295*, 1695–1698.
- [34] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*, 64–71.
- [35] A. Jesorka, O. Orwar, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 801–832.
- [36] D. T. Chiu, C. F. Wilson, F. Ryttse, A. Stromberg, C. Farre, A. Karlsson, S. Nordholm, A. Gaggar, B. P. Modi, A. Moscho, R. A. Garza-Lopez, O. Orwar, R. N. Zare, *Science* **1999**, *283*, 1892–1895.
- [37] P. Y. Bolinger, D. Stamou, H. Vogel, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5626–5631; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5544–5549.
- [38] D. Stamou, C. Duschl, E. Delamarche, H. Vogel, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5738–5741; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5580–5583.
- [39] R. Karlsson, A. Karlsson, O. Orwar, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8442–8443.
- [40] R. Karlsson, A. Karlsson, A. Ewing, P. Dommersnes, J. F. Joanny, A. Jesorka, O. Orwar, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5960–5968.
- [41] P. Anzenbacher, M. A. Palacios, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 80–86.
- [42] a) P. Pantano, D. R. Walt, *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 2832–2835; b) H. H. Gorris, T. M. Blicharz, D. R. Walt, *FEBS J.* **2007**, *274*, 5462–5470; c) D. R. Walt, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 38–50.
- [43] a) S. Brenner, M. Johnson, J. Bridgeman, G. Golda, D. H. Lloyd, D. Johnson, S. Luo, S. McCurdy, M. Foy, M. Ewan, R. Roth, D. George, S. Eletr, G. Albrecht, E. Vermaas, S. R. Williams, K. Moon, T. Burcham, M. Pallas, R. B. DuBridge, J. Kirchner, K. Fearon, J. Mao, K. Corcoran, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 630–634; b) J. M. Yeakley, J. B. Fan, D. Doucet, L. Luo, E. Wickham, Z. Ye, M. S. Chee, X. D. Fu, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 353–358; c) D. R. Walt, *Science* **2000**, *287*, 451–452.
- [44] R. Wilson, A. R. Cossins, D. G. Spiller, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6250–6263; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6104–6117.
- [45] J. A. Ferguson, F. J. Steemers, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5618–5624.
- [46] K. L. Gunderson, S. Kruglyak, M. S. Graige, F. Garcia, B. G. Kermani, C. Zhao, D. Che, T. Dickinson, E. Wickham, J. Bierle, D. Doucet, M. Milewski, R. Yang, C. Siegmund, J. Haas, L. Zhou, A. Oliphant, J. B. Fan, S. Barnard, M. S. Chee, *Genome Res.* **2004**, *14*, 870–877.
- [47] L. N. Song, S. Ahn, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1023–1033.
- [48] S. Ahn, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5041–5047.
- [49] S. Ahn, D. M. Kulis, D. L. Erdner, D. M. Anderson, D. R. Walt, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 5742–5749.
- [50] D. M. Rissin, D. R. Walt, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *564*, 34–39.
- [51] T. Konry, R. B. Hayman, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5777–5782.
- [52] a) V. M. Mirsky, T. Hirsch, S. A. Piletsky, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1179–1181; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1108–1110; b) T. Hirsch, H. Kettenberger, O. S. Wolfbeis, V. M. Mirsky, *Chem. Commun.* **2003**, 432–433.
- [53] T. A. Dickinson, K. L. Michael, J. S. Kauer, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2192–2198.
- [54] S. E. Stitzel, L. J. Cowen, K. J. Albert, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5266–5271.
- [55] a) K. J. Albert, D. R. Walt, D. S. Gill, T. C. Pearce, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2501–2508; b) K. J. Albert, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1947–1955.
- [56] M. J. Aernecke, J. Guo, S. Sonkusale, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5281–5290.
- [57] S. Köster, F. E. Angile, H. Duan, J. J. Agresti, A. Wintner, C. Schmitz, A. C. Rowat, C. A. Merten, D. Pisignano, A. D. Griffiths, D. A. Weitz, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1110–1115.
- [58] J. C. Baret, O. J. Miller, V. Taly, M. Ryckelynck, A. El-Harrak, L. Frenz, C. Rick, M. L. Samuels, J. B. Hutchison, J. J. Agresti, D. R. Link, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, *Lab Chip* **2009**, *9*, 1850–1858.
- [59] H. N. Joensson, M. L. Samuels, E. R. Brouzes, M. Medkova, M. Uhlen, D. R. Link, H. Andersson-Svahn, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2556–2559; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2518–2521.
- [60] J. Q. Boedicker, L. Li, T. R. Kline, R. F. Ismagilov, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1265–1272.
- [61] a) Y. Kuang, I. Biran, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2902–2909; b) Y. Kuang, I. Biran, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6282–6286.
- [62] R. D. Whitaker, D. R. Walt, *Anal. Biochem.* **2007**, *360*, 63–74.
- [63] L. C. Taylor, D. R. Walt, *Anal. Biochem.* **2000**, *278*, 132–142.
- [64] R. D. Whitaker, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9045–9053.
- [65] I. Biran, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3046–3054.
- [66] Y. Kuang, I. Biran, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6282–6286.
- [67] S. Yamamura, H. Kishi, Y. Tokimitsu, S. Kondo, R. Honda, S. R. Rao, M. Omori, E. Tamiya, A. Muraguchi, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 8050–8056.

- [68] a) Y. N. Xia, G. M. Whitesides, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, *28*, 153–184; b) Y. N. Xia, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 568–594; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 550–575.
- [69] J. R. Rettig, A. Folch, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5628–5634.
- [70] Y. Sasuga, T. Iwasawa, K. Terada, Y. Oe, H. Sorimachi, O. Ohara, Y. Harada, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9141–9149.
- [71] J. Q. Boedicker, M. E. Vincent, R. F. Ismagilov, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6022–6025; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5908–5911.
- [72] a) X. S. Xie, P. J. Choi, G. W. Li, N. K. Lee, G. Lia, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 417–444; b) J. Elf, G. W. Li, X. S. Xie, *Science* **2007**, *316*, 1191–1194; c) I. Golding, J. Paulsson, S. M. Zawilski, E. C. Cox, *Cell* **2005**, *123*, 1025–1036; d) J. Yu, J. Xiao, X. J. Ren, K. Q. Lao, X. S. Xie, *Science* **2006**, *311*, 1600–1603; e) K. P. Lemon, A. D. Grossman, *Science* **1998**, *282*, 1516–1519.
- [73] M. Böhmer, J. Enderlein, *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 792–808.
- [74] a) L. Edman, Z. Földes-Papp, S. Wennmalm, R. Rigler, *Chem. Phys.* **1999**, *247*, 11–22; b) B. P. English, W. Min, A. M. van Oijen, K. T. Lee, G. Luo, H. Sun, B. J. Cherayil, S. C. Kou, X. S. Xie, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 87–94; c) A. M. van Oijen, P. C. Blainey, D. J. Crampton, C. C. Richardson, T. Ellenberger, X. S. Xie, *Science* **2003**, *301*, 1235–1238; d) K. Velonia, O. Flomenbom, D. Loos, S. Masuo, M. Cotlet, Y. Engelborghs, J. Hofkens, A. E. Rowan, J. Klafter, R. J. M. Nolte, F. C. de Schryver, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 566–570; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 560–564.
- [75] H. P. Lu, L. Xun, X. S. Xie, *Science* **1998**, *282*, 1877–1882.
- [76] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, W. E. Moerner, *Nature* **1997**, *388*, 355–358.
- [77] W. L. Xu, J. S. Kong, P. Chen, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 2393–2404.
- [78] X. Michalet, S. Weiss, M. Jager, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1785–1813.
- [79] A. I. Lee, J. P. Brody, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 4303–4311.
- [80] E. Boukobza, A. Sonnenfeld, G. Haran, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 12165–12170.
- [81] E. Rhoades, E. Gussakovskiy, G. Haran, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3197–3202.
- [82] I. Cisse, B. Okumus, C. Joo, T. J. Ha, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12646–12650.
- [83] T. M. Hsin, E. S. Yeung, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8178–8181; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8032–8035.
- [84] M. Comellas-Aragonès, H. Engelkamp, V. I. Claessen, N. A. J. M. Sommerdijk, A. E. Rowan, P. C. M. Christianen, J. C. Maan, B. J. M. Verduin, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 635–639.
- [85] A. de La Escosura, R. J. M. Nolte, J. J. L. M. Cornelissen, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 2274–2278.
- [86] a) Q. F. Xue, E. S. Yeung, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1175–1178; b) Q. Xue, E. S. Yeung, *Nature* **1995**, *373*, 681–683.
- [87] a) D. B. Craig, E. A. Arriaga, J. C. Y. Wong, H. Lu, N. J. Dovichi, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5245–5253; b) R. Polakowski, D. B. Craig, A. Skelley, N. J. Dovichi, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4853–4855.
- [88] a) D. Craig, E. A. Arriaga, P. Banks, Y. Zhang, A. Renborg, M. M. Palcic, N. J. Dovichi, *Anal. Biochem.* **1995**, *226*, 147–153; b) D. B. Craig, N. J. Dovichi, *Can. J. Chem.* **1998**, *76*, 623–626; c) D. B. Craig, J. T. Nachtigall, H. L. Ash, G. K. Shoemaker, A. C. Dyck, T. M. Wawrykow, H. L. Gudbjartson, *J. Protein Chem.* **2003**, *22*, 555–561; d) G. K. Shoemaker, D. H. Juers, J. M. L. Coombs, B. W. Matthews, D. B. Craig, *Biochemistry* **2003**, *42*, 1707–1710.
- [89] B. D. Gates, Q. Xu, M. Stewart, D. Ryan, C. G. Willson, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1171–1196.
- [90] M. J. Levene, J. Korlach, S. W. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead, W. W. Webb, *Science* **2003**, *299*, 682–686.
- [91] J. Eid, A. Fehr, J. Gray, K. Luong, J. Lyle, G. Otto, P. Peluso, D. Rank, P. Baybayan, B. Bettman, A. Bibillo, K. Bjornson, B. Chaudhuri, F. Christians, R. Cicero, S. Clark, R. Dalal, A. Dewinter, J. Dixon, M. Foquet, A. Gaertner, P. Hardenbol, C. Heiner, K. Hester, D. Holden, G. Kearns, X. Kong, R. Kuse, Y. Lacroix, S. Lin, P. Lundquist, C. Ma, P. Marks, M. Maxham, D. Murphy, I. Park, T. Pham, M. Phillips, J. Roy, R. Sebra, G. Shen, J. Sorenson, A. Tomaney, K. Travers, M. Trulson, J. Vieceli, J. Wegener, D. Wu, A. Yang, D. Zaccarin, P. Zhao, F. Zhong, J. Korlach, S. Turner, *Science* **2009**, *323*, 133–138.
- [92] W. H. Tan, E. S. Yeung, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4242–4248.
- [93] D. M. Rissin, D. R. Walt, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 520–523.
- [94] D. M. Rissin, H. H. Gorris, D. R. Walt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5349–5353.
- [95] H. H. Gorris, D. R. Walt, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6277–6282.
- [96] H. H. Gorris, D. M. Rissin, D. R. Walt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17680–17685.
- [97] D. M. Rissin, D. R. Walt, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6286–6287.
- [98] Z. Li, R. B. Hayman, D. R. Walt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12622–12623.
- [99] Y. Rondelez, G. Tresset, K. V. Tabata, H. Arata, H. Fujita, S. Takeuchi, H. Noji, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 361–365.
- [100] S. Y. Jung, Y. Liu, C. P. Collier, *Langmuir* **2008**, *24*, 4439–4442.
- [101] A. Y. Chen, A. S. Jani, L. Zheng, P. J. Burke, J. P. Brody, *Biotechnol. Prog.* **2009**, *25*, 929–937.
- [102] Y. Rondelez, G. Tresset, T. Nakashima, Y. Kato-Yamada, H. Fujita, S. Takeuchi, H. Noji, *Nature* **2005**, *433*, 773–777.
- [103] T. Douglas, M. Young, *Science* **2006**, *312*, 873–875.