

# Thermophorese in Nanoliter-Tropfen zur Quantifizierung von Aptamer-Bindungen\*\*

Susanne A. I. Seidel, Niklas A. Markwardt, Simon A. Lanzmich und Dieter Braun\*

**Abstract:** Biomolekulare Interaktionen, die von zentraler Bedeutung für Pharmakologie und Diagnostik sind, können durch Thermophorese quantifiziert werden. Diese reagiert empfindlich auf bindungsinduzierte Größen-, Ladungs- oder Konformationsänderungen. Etablierte Kapillarmessungen verbrauchen mindestens 0.5  $\mu\text{L}$  pro Probe. Wir reduzierten den Probenverbrauch um den Faktor 50, indem wir 10-nL-Tropfen verwendeten, die mit akustischer Flüssigkeitsübertragung (Labcyte) hergestellt wurden. Die Tropfen wurden in einem Öl-Tensid-Gemisch stabilisiert und mit einem Infrarotlaser lokal erwärmt. Temperaturerhöhung, Marangoni-Fluss und Konzentrationsverteilung wurden mit Fluoreszenzmikroskopie und numerischer Simulation analysiert. In 10-nL-Tropfen quantifizierten wir Affinität, Kooperativität und Pufferabhängigkeit des AMP-Aptamers. Die Miniaturisierung und das 1536-Well-Platten-Format machen die Methode hochdurchsatzfähig und automatisierbar. Dies forciert innovative Anwendungen in der serologischen Diagnostik und markierungsfreien Wirkstoffsuche.

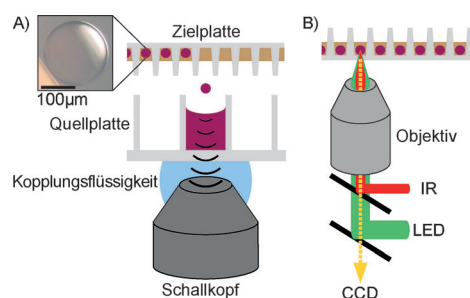
Die molekulare Erkennung ist nicht nur von zentraler Bedeutung für die zelluläre Signaltransduktion, sondern stellt auch das Funktionsprinzip von Pharmazeutika und der Labordiagnostik dar. Vielerlei Chancen gehen daher mit einem detaillierten Verständnis biologischer Bindungsprozesse einher. Vor diesem Hintergrund überrascht es nicht, dass das Interesse an quantitativen biomolekularen Interaktionsanalysen ständig wächst. Für diese Analysen wurde in den letzten Jahren die gerichtete Molekülbewegung entlang eines Temperaturgradienten, genannt Thermophorese,<sup>[1]</sup> nutzbar gemacht.<sup>[2,3]</sup> Sie ist hochempfindlich gegenüber Molekülgröße, -ladung und -konformation. Auf Basis bindungsinduzierter

Änderungen in wenigstens einem dieser Parameter können Affinität und Konzentration selbst in komplexen biologischen Flüssigkeiten bestimmt werden.<sup>[4]</sup>

Bei der gut etablierten mikroskaligen Thermophorese (microscale thermophoresis, MST) werden die Proben in Glaskapillaren gemessen. Kapillarmessungen wurden bereits für Ionen, niedermolekulare Verbindungen, Nukleinsäuren, Peptide, Proteine, rohes Zelllysate und unbehandeltes humanes Blutserum verwendet.<sup>[4–6]</sup> Mit ca. 0.5  $\mu\text{L}$  pro Kapillarfüllung ist der Probenverbrauch etwa gegenüber der isothermen Titrationskalorimetrie (isothermal titration calorimetry, ITC) relativ gering.<sup>[7]</sup> Das eigentliche Messvolumen ist aber noch bedeutend kleiner: Es liegt im Bereich von 2 nL.<sup>[2]</sup> Das zusätzlich verbrauchte Volumen ist von entscheidender Bedeutung, sobald mit teurem oder seltenem Material gearbeitet wird, z. B. mit Patientenproben. Dies gilt besonders, wenn Hochdurchsatzanalysen nötig sind, etwa in der Diagnostik oder Wirkstoffsuche. Durchsatz und Automatisierbarkeit der konventionellen MST sind durch die komplizierte Handhabung von Glaskapillaren zusätzlich begrenzt.

Daher haben wir eine kapillarfremde Methode entwickelt, bei der Thermophorese in nL-Tropfen unter einer Öl-Tensid-Schicht in 1536-Well-Platten gemessen wird (Abbildung 1). Temperaturinduzierte Effekte in diesem Wasser-in-Öl-System wurden experimentell untersucht. Die Ergebnisse wurden durch numerische Simulationen bestätigt.

Die Anwendbarkeit der Methode für biomolekulare Interaktionsanalysen wurde mithilfe eines gut beschriebenen Aptamers bewertet. Aptamere wurden vor über 20 Jahren



**Abbildung 1.** A) Tropfenproduktion. Der Liquid-Handler positioniert eine Zielplatte über einer Quellplatte mit einer Stammlösung (violett). Ein Schallkopf gibt einen akustischen Puls ab, der auf die Oberfläche der Lösung fokussiert ist; dadurch fliegt ein 2.5-nL-Tropfen in die Zielplatte. Zum Schutz vor Verdunstung wurden die Tropfen in ein Öl-Tensid-Gemisch (braun) übertragen. Einschub: Die Tropfen waren über mehrere Stunden stabil. 5 nL, humanes Serum/PBS 1:1. B) Invertierter mikroskopischer Messaufbau. Die Tropfenmitte wird mit einem Infrarotlaser (IR) erwärmt. Die Thermophorese wird mithilfe der Fluoreszenz verfolgt. LED: Leuchtdiode; CCD: Kamera mit ladungsgekoppeltem Sensor.

[\*] S. A. I. Seidel, N. A. Markwardt, S. A. Lanzmich, Prof. D. Braun  
Systems Biophysics, Physics Department, NanoSystems Initiative  
Munich and Center for Nanoscience  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Amalienstraße 54, 80799 München (Deutschland)  
E-Mail: dieter.braun@lmu.de  
Homepage: <http://www.biosystems.physik.lmu.de>

[\*\*] Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung durch den Gemeinschaftsantrag BR2152/2-1 und den SFB 1032, Teilprojekt A4, von der DFG, durch das Center for NanoScience (CeNS) und durch die Nanosystems Initiative Munich (NIM). Außerdem danken wir Maximilian Weitz aus der Gruppe von Friedrich C. Simmel für die Informationen zu Mikroemulsionen, Georg C. Urtel für Unterstützung beim Messaufbau und Christof B. Mast für die Programmierunterstützung.

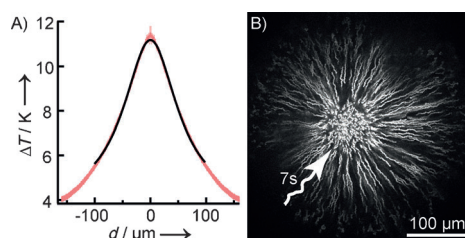
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (experimentelle Details siehe Kapitel 1) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201402514> zu finden.

entdeckt.<sup>[8]</sup> Dank ihrer dreidimensionalen Konformation binden diese einzelsträngigen Oligonukleotide an diverse biomedizinisch relevante Zielstrukturen, darunter Proteine und niedermolekulare Verbindungen.<sup>[9,10]</sup> Genau wie Antikörper zeigen Aptamere eine hohe Spezifität und Affinität. Gleichzeitig sind diese Nukleinsäure-basierten Liganden den Protein-basierten überlegen, was ihre Produktionskosten, Lagerungsbedingungen und chemische Modifizierbarkeit angeht.<sup>[10]</sup> In vivo führt ihre geringe Größe zu einer guten Aufnahme ins Zielgewebe, wohingegen keinerlei Immunogenität und eine geringe Toxizität beobachtet wurden.<sup>[10,11]</sup> Diese Vorteile und die Markteinführung des ersten Aptamer-Medikaments belegen das große Potenzial von Aptameren.<sup>[12]</sup>

Um die Aptamer-Bindungsstudien zu miniaturisieren, kam ein kommerziell erhältliches, kontaktfreies Liquid-Handling-System (Labcyte) zum Einsatz. Das System überträgt mithilfe akustischer Tropfenproduktion 2.5 nL große Flüssigkeitsportionen aus einer Multi-Well-Quellplatte in eine Zielplatte (Abbildung 1A).<sup>[13]</sup> Die Abweichung vom Sollvolumen ist kleiner als 2 % (siehe Kapitel 3a der Hintergrundinformationen). Zum Schutz vor Verdunstung wurden die Tropfen in eine Schicht aus Mikrobiologie-Mineralöl übertragen, das mit einem Tensidgemisch nach Tawfik und Griffiths versetzt war.<sup>[14]</sup> Für die hier gezeigten Experimente transferierten wir vier oder acht 2.5-nL-Portionen, um 10 nL (270  $\mu\text{m}$ ) oder 20 nL (340  $\mu\text{m}$ ) große Proben zu erhalten. Die Positionsgenauigkeit des Transfers wurde durch die Ablenkung im Öl verringert. Um einzelne Flüssigkeitsportionen zu vereinigen, wurden die Zielplatten mit trichterförmigen Wells zentrifugiert. Dabei wurden 500 g nicht überschritten, um Schäden an den Tropfen zu vermeiden. Mit unserem optimierten Verfahren erhielten wir reproduzierbar nL-Proben, die über mehrere Stunden stabil waren (Abbildung 1A, Einschub). In dieser Zeitspanne konnten mehrere thermophoretische Bindungstests durchgeführt werden (je ca. 10 min).

Die Tropfen wurden auf einem neu konstruierten, mikroskopischen Messaufbau untersucht (Abbildung 1B). Ähnlich wie beim bereits beschriebenen Kapillarinstrument wurde die Thermophorese rein optisch induziert und gemessen.<sup>[2,5]</sup> Als entscheidende Neuerung gegenüber dem Kapillaraufbau wurde eine invertierte Konfiguration gewählt, sodass die Probenplatte aufrecht stand, um ein Heraustropfen des Öls auszuschließen. Die Fixierung der Platte garantierte, dass die Tropfen ihre exakte Position im Well beibehielten. Gleichzeitig konnten die optischen Teile bewegt werden, was sequenzielle Tropfenmessungen ermöglichte.

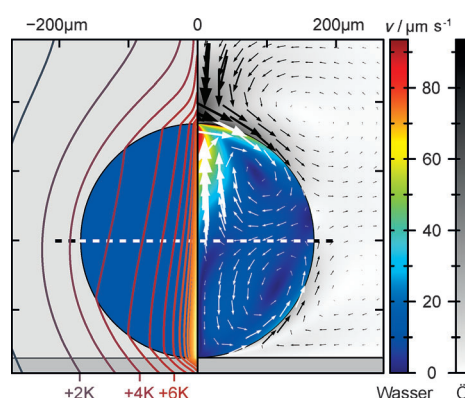
Vor den Bindungsstudien untersuchten wir, welche Auswirkungen lokales Heizen auf wässrige Tropfen unter Öl hat. Leicht asymmetrisches Heizen führte mitunter zu Konvektionsflüssen, die so stark waren, dass sie den gesamten Tropfen aus dem Laserspot trieben. Dies konnten wir durch die Verwendung von Platten mit einer kleinen Wellbodenfläche ( $r = 0.45 \text{ mm}$ ) verhindern. Mithilfe der Temperaturabhängigkeit des Fluoreszenzfarbstoffes Alexa 647 wurde das radiale Temperaturprofil eines 20-nL-Tropfens 0.2 s nach Einschalten des IR-Lasers dargestellt (Abbildung 2A). Bei einem Temperaturanstieg von  $\Delta T_c = 11 \text{ K}$  in der Tropfenmitte erwärmte sich der äußere Tropfenbereich um  $\Delta T_p = 4 \text{ K}$ . Eine Anglei-



**Abbildung 2.** Lokales Heizen von 20-nL-Tropfen. A) Radiales Temperaturprofil in der zentralen Horizontalebene (rot). Die Temperatur stieg um  $\Delta T_c = 11 \text{ K}$  im Zentrum und um  $\Delta T_p = 4 \text{ K}$  im Außenbereich des Tropfens. Eine Lorentz-Angleichung (schwarz) ergab eine Halbwertsbreite von  $120 \mu\text{m}$ . B) Flussprofil fluoreszierender Polystyrolkugeln ( $d = 1.0 \mu\text{m}$ ), über 7 s Heizzeit integriert ( $\Delta T = 15 \text{ K}$ ). Die Kugeln bewegten sich mit einer Höchstgeschwindigkeit von  $15 \mu\text{m s}^{-1}$  zum Hitzespot und aus dem Fokus.

chung an die Lorentzfunktion ergab eine Halbwertsbreite von  $120 \mu\text{m}$ . Im Folgenden bezeichnet  $\Delta T$  die mittlere Temperaturerhöhung der zentralen  $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ -Fläche.

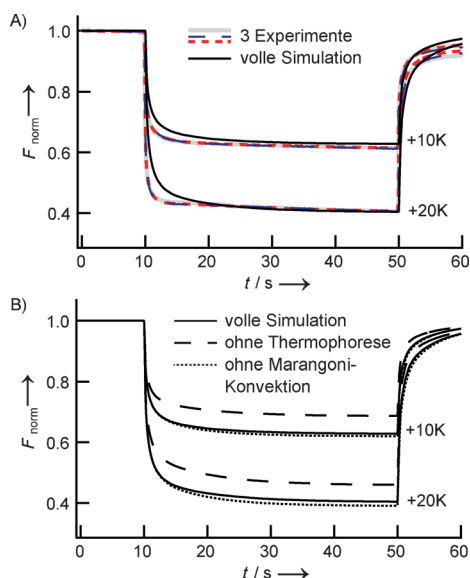
Die Konvektionsflüsse in 20-nL-Proben wurden mithilfe fluoreszierender Polystyrolkugeln visualisiert. Abbildung 2B ist über eine Heizzeit von 7 s integriert. Die Kugeln bewegten sich zum Wärmespot und aus dem Fokus, wobei die Höchstgeschwindigkeiten  $5\text{--}10 \mu\text{m s}^{-1}$  für  $\Delta T = 6 \text{ K}$  und  $15 \mu\text{m s}^{-1}$  für  $\Delta T = 15 \text{ K}$  betrugen. Um diese Flüsse genauer zu untersuchen, führten wir vollständige numerische Simulationen durch, bei denen Diffusion, Konvektion, Thermophorese und Temperaturabhängigkeit des Farbstoffs einbezogen wurden. Simulationen von 20-nL- (Abbildung 3) und 10-nL-Tropfen (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen) bestätigten, dass der beobachtete, nach innen gerichtete Fluss auf Marangoni-Konvektion an der Wasser-Öl-Grenzfläche zurückzuführen ist. Diese Art von Konvektion wird durch temperaturinduzierte Unterschiede der Grenzflächenspannung hervorgerufen. In unserem Fall verringerte das lokale Heizen die Grenzflächenspannung am Scheitel- und Fußpunkt des Tropfens, was zu einem Marangoni-Fluss ent-



**Abbildung 3.** Numerische Simulation der Temperatur- und Flussfelder in einem vertikalen Schnitt durch einen 20-nL-Tropfen nach 0.2 s Heizen. Links: Isotherme kennzeichnen den Temperaturanstieg. Rechts: Die zentrale Horizontalebene (gestrichelt) bildet die Grenze zweier toroidaler Vortices. Diese werden durch Marangoni-Konvektion an der Wasser-Öl-Grenzfläche angetrieben und haben den Gleichgewichtszustand bereits erreicht.

lang der Grenzfläche führte. Wegen der Zylindersymmetrie ergaben sich in der oberen und unteren Tropfenhalbkugel toroidale Vortices. Abbildung 3 zeigt einen vertikalen Schnitt durch diese Tori. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die Horizontalebene. Hier ist der Fluss im oberen und unteren Vortex nach innen gerichtet, was mit der experimentellen Beobachtung in dieser Ebene übereinstimmt (Abbildung 2).

Nach der Flussfeldanalyse nahmen wir in 20-nL-Alexa-647-Proben den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz auf (Abbildung 4A), die Grundlage für unsere späteren Bindungs-



**Abbildung 4.** Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz in 20-nL-Tropfen. A) Messungen von drei Alexa-647-Proben (grau, blau, rot) überlappen mit minimalen Abweichungen, was die hohe Reproduzierbarkeit belegt. Experiment und Simulation (schwarz) stimmen gut überein. IR-Heizen ( $t = 10$  s) führte zur Abnahme der Fluoreszenz durch TAF und Thermophorese. Thermophorese und Rückdiffusion äquilibrierten innerhalb von Sekunden. Nach dem Heizen ( $t = 50$  s) erholte sich  $F_{\text{norm}}$  durch TAF und isotherme Rückdiffusion. Ein größerer  $\Delta T$ -Wert verstärkte TAF und Thermophorese. B) Simulierte Beiträge zur Abnahme von  $F_{\text{norm}}$ . Weglassen der Marangoni-Konvektion führt zu einer vernachlässigbaren Änderung um 0.008 (punktiert); Weglassen der Thermophorese ändert das Signal um 0.06 (gestrichelt).

analysen. Die experimentellen Kurven waren in höchstem Maße reproduzierbar und wurden durch die Simulation bestätigt. Eine Abfolge verschiedener Ereignisse ließ sich erkennen, die mit Standard-Kapillarmessungen übereinstimmen. Sobald der Laser eingeschaltet wurde, nahm die Fluoreszenz wegen der Temperaturabhängigkeit des Farbstoffs (TAF) und der thermophoretischen Moleküldepletion ab. Thermophorese und Rückdiffusion äquilibrierten innerhalb weniger Sekunden. Eine nachfolgende leichte Erwärmung der gesamten Probe verringerte die Fluoreszenzintensität geringfügig, hatte aber keinen Einfluss auf die Messung. Nach dem Heizen stellte sich die ursprüngliche Fluoreszenz durch TAF und Rückdiffusion wieder ein. Ein größerer  $\Delta T$ -Wert verstärkte TAF und Thermophorese in Experiment und Simulation (Abbildung 4A). Um die Beiträge von Marangoni-Konvektion und Thermophorese zu beurteilen, wurden Si-

mulationen ohne diese Effekte durchgeführt (Abbildung 4B). Details dazu sind Kapitel 2a der Hintergrundinformationen zu entnehmen. Wurde die Marangoni-Konvektion weggelassen, so unterschieden sich die Flussfelder deutlich, wohingegen das Fluoreszenzsignal kaum beeinflusst wurde. Die Simulation ohne Thermophorese ergab dagegen starke Abweichungen in den Zeitverläufen der Fluoreszenz. Dies zeigt, dass sich die Thermophorese gegen die Konvektionsflüsse durchsetzt.

Nach der Charakterisierung der Thermophorese in nL-Tropfen unter Öl bewerteten wir die Anwendbarkeit für biomolekulare Interaktionsstudien. Wir analysierten ein 25-mer-DNA-Aptamer, das Adenosin und dessen phosphorylierte Analoga bindet.<sup>[15]</sup> Dieses Aptamer wurde bereits ausführlich untersucht.<sup>[2,16]</sup> Für die nL-Interaktionsstudien wurde eine konstante Menge eines fluoreszenzmarkierten Aptamers ( $c = 2 \mu\text{M}$ ) zu einer AMP-Verdünnungsreihe (AMP = Adenosin-5'-monophosphat) gegeben. Wie erwähnt führte langsames Zentrifugieren in den trichterförmigen Wells zu einer zuverlässigen Vereinigung einzelner AMP- und Aptamer-Tropfen. Nach der Vereinigung äquilibrierten AMP- und Aptamer-Konzentration durch Diffusion. In den kleinen 10-nL- oder 20-nL-Tropfen reichten Diffusionszeiten von wenigen Minuten aus, um eine vollständige Durchmischung zu erreichen. Diffusives Mischen und manuelles Vormischen erwiesen sich als gleichermaßen wirkungsvoll.

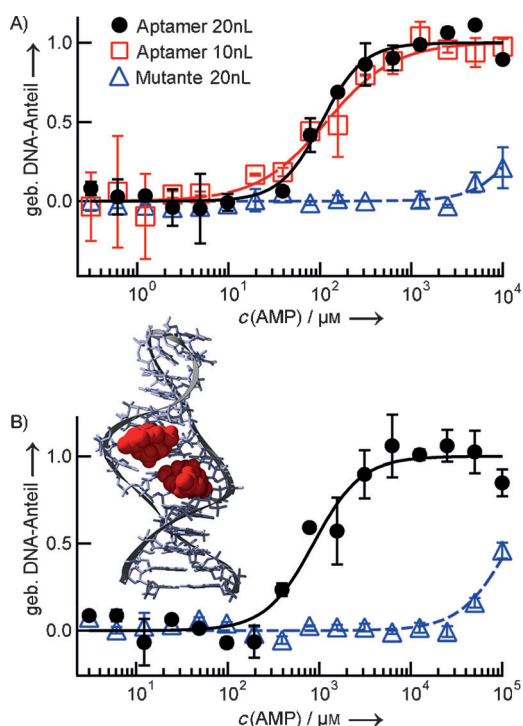
Die durchmischten Proben wurden lokal um  $\Delta T = 6$  K erwärmt. Die resultierende thermophoretische Depletion unterschied sich für das freie Aptamer und dessen gebundenen Komplex mit AMP (Abbildung S2 der Hintergrundinformationen). Außerdem veränderte die AMP-Bindung die Temperaturabhängigkeit des Farbstoffs (TAF).

Die Fluoreszenz nach TAF und Thermophorese wurde durch die Kaltfluoreszenz geteilt wie in Abbildung S2 der Hintergrundinformationen und bereits zuvor beschrieben.<sup>[6]</sup> Da diese relative Fluoreszenz näherungsweise linear zur gebundenen Aptamer-Fraktion ist, wurde eine direkte Anpassung mithilfe der Hill-Gleichung durchgeführt (siehe Kapitel 3c der Hintergrundinformationen).

Im ursprünglichen Selektionspuffer nach Huizenga und Szostak fanden wir  $EC_{50} = (116 \pm 14) \mu\text{M}$  in 10-nL-Proben und  $EC_{50} = (104 \pm 10) \mu\text{M}$  in 20-nL-Proben (Abbildung 5A).<sup>[15]</sup> Beide Werte stimmen miteinander und mit dem Kapillarthermophorese-Literaturwert von  $(87 \pm 5) \mu\text{M}$  überein.<sup>[2]</sup> Die bestimmten Hill-Koeffizienten von  $n = 1.2 \pm 0.1$  (10 nL) und  $n = 1.9 \pm 0.3$  (20 nL) lassen auf eine kooperative Bindung mehrerer AMP-Moleküle schließen, was mit der bereits bekannten Tertiärstruktur harmonisiert (Abbildung 5, Einschub).<sup>[17]</sup> Des Weiteren weichen diese Werte nur geringfügig voneinander ab und bestätigen den Literaturwert ( $n = 1.4$ ).<sup>[2]</sup> Zur Kontrolle wurde ein DNA-Oligonukleotid gleicher Länge, aber mit zwei Punktmutationen gemessen. Die Dinukleotidmutante zeigte eine 200-mal geringere Affinität ( $EC_{50} \approx 20 \text{ mM}$ ). Dies belegt die Spezifität des Bindungssignals.

Um die beschriebene Pufferabhängigkeit des AMP-Aptamers zu quantifizieren,<sup>[2]</sup> wurde die Bindung in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gemessen (Abbildung 5B). Es ergab sich  $EC_{50} = (0.90 \pm 0.13) \text{ mM}$ , was einer





**Abbildung 5.** Die spezifische Signaländerung in TAF und Thermophorese bei AMP-Titration zu markiertem Aptamer wurde mithilfe der Hill-Gleichung angepasst. Mittelwerte von mindestens zwei nL-Proben; Fehlerbalken: Standardabweichung. A) Selektionspuffer. Die Anpassung ergab  $EC_{50} = (116 \pm 14) \mu\text{M}$  und  $n = 1.9 \pm 0.3$  in 10 nL (rote Quadrate) und  $EC_{50} = (104 \pm 10) \mu\text{M}$  und  $n = 1.2 \pm 0.1$  in 20 nL (schwarze Kreise). Eine Dinukleotidmutante zeigte einen 200-fach erhöhten  $EC_{50}$ -Wert von ca. 20 mM (blaue Dreiecke). B) PBS;  $EC_{50} = (0.90 \pm 0.13) \text{ mM}$  wurde gemessen (schwarze Kreise), was die Pufferabhängigkeit des Aptamers belegt ( $n = 1.6 \pm 0.4$ ). Die Mutante zeigte einen 130-fach erhöhten  $EC_{50}$ -Wert von ca. 0.12 M (blaue Dreiecke). Einschub: Die bestimmten Hill-Koeffizienten stimmen mit der beschriebenen Tertiärstruktur überein (NDB-Code: 1AW4): ein Aptamer (grau) bindet zwei AMP-Moleküle (rot).<sup>[17]</sup>

10-fachen Verringerung der Affinität gegenüber der im Selektionspuffer entspricht. Diese Verringerung war zu erwarten, da das Aptamer ursprünglich im Selektionspuffer entwickelt und so für diesen Puffer optimiert wurde.<sup>[15,18]</sup> Eine zentrale Rolle kommt wahrscheinlich den Magnesium-Ionen zu: Während der Selektionspuffer 5 mM  $\text{MgCl}_2$  enthielt, verwendeten wir PBS ohne  $\text{Mg}^{2+}$ .  $\text{Mg}^{2+}$  stabilisiert nicht nur DNA, sondern kann auch die Phosphatgruppe von AMP neutralisieren und so die Abstoßung durch Phosphate im Aptamer-Rückgrat verringern.<sup>[19]</sup> Es wurde beschrieben, dass eine Reduktion der  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration von 5 auf 0 mM zu einer deutlichen Verringerung der AMP-Aptamer-Retention in der Affinitätschromatographie führt.<sup>[16]</sup> Dies entspricht den von uns gefundenen  $EC_{50}$ -Unterschieden. Der Hill-Koeffizient wurde vom Puffer kaum beeinflusst; er betrug in PBS  $n = 1.6 \pm 0.4$ . Die Affinität der Kontrollmutante war 130 mal geringer als jene des Aptamers ( $EC_{50} \approx 0.12 \text{ M}$ ).

Die erfolgreiche Quantifizierung der Affinität, Kooperativität und Pufferabhängigkeit belegt die Anwendbarkeit der vorgestellten Methode für die Aptameranalyse. Derlei Analysen werden zukünftig wohl an Bedeutung gewinnen. Im-

merhin beginnt das umfassende Patentportfolio rund um Aptamere, das bisher viele kommerzielle Anwendungen verhindert haben dürfte, nun auszulaufen.<sup>[20]</sup> Überdies ist die nL-Thermophorese ein vielversprechendes Hilfsmittel zur Untersuchung anderer Biomoleküle, etwa Peptide oder Proteine, und auch zur Analyse komplexer biologischer Flüssigkeiten wie Blut. Die Eignung für diese Studien muss noch getestet werden, kann – nach der Anwendungsbreite der Kapillarthermophorese zu urteilen – aber erwartet werden.<sup>[4–6]</sup> Die Probenvorbereitung wird wahrscheinlich nicht zu Einschränkungen führen, da der Liquid-Handler für sehr viele verschiedene Arten von Flüssigkeiten verwendet werden kann. So stellten wir etwa nL-Tropfen aus 50 % humanem Blutserum her (Abbildung 1 A, Einschub), die für die Thermophorese-Diagnostik verwendet werden könnten.

Das diffusive Mischen nach dem nL-Transfer war erfolgreich. Daher scheint ein Versuchsdesign, bei dem eine Stammverdünnungsreihe eines Zielmoleküls gegen eine hohe Zahl an Liganden getestet wird, sehr praktikabel zu sein, etwa für die Wirkstoffsuche. Dieses Design könnte auch mit unserem bereits publizierten, diagnostischen Autokompetitionsverfahren kombiniert werden.<sup>[4]</sup> Die Stammverdünnung eines nichtmarkierten Tracermoleküls für den gesuchten Biomarker würde dann parallel gegen viele Patientenseren getestet werden, die mit einer konstanten Menge des markierten Tracers versetzt wurden.

Gegenüber der konventionellen Kapillarthermophorese wurde das Volumen 50-fach verringert. Daraus ergibt sich ein enormes Potenzial für Hochdurchsatz-Screens, die durch die leichte Handhabung der Multi-Well-Platten zusätzlich begünstigt werden. Als weiterer Vorteil ist der nL-Transfer kontaktfrei, was von Waschschritten befreit und Kreuzkontaminationen minimiert. Nach dem Transfer bilden die Proben von Tensid umhüllte Tropfen im Öl, sodass sie die Well-Oberfläche nicht direkt berühren. Dies sollte die unspezifische Oberflächenadhäsion der Biomoleküle („Kleben“) erheblich verhindern. Kleben ist ein häufiges Problem bei der Kapillarthermophorese,<sup>[6]</sup> und seine Beseitigung wäre ein großer Fortschritt, selbst wenn dafür Tenside und Öl für verschiedene Probenotypen neu optimiert werden müssten.

Angeichts dieser Vorteile, der Miniaturisierung und der umfangreichen Charakterisierung in Experiment und Simulation verspricht die nL-Tropfen-Thermophorese vielfältige Anwendungen überall in den Lebenswissenschaften.

Eingegangen am 17. Februar 2014,  
veränderte Fassung am 11. April 2014  
Online veröffentlicht am 4. Juni 2014

**Stichwörter:** Analytische Methoden · Bindungsaffinität · Hochdurchsatz-Screening · Nanoliter-Thermophorese · Numerische Simulation

[1] a) C. Ludwig, *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien Math.-Naturwiss. Kl.* **1856**, 539; b) S. Duhr, D. Braun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 19678–19682.

- [2] P. Baaske, C. J. Wienken, P. Reineck, S. Duhr, D. Braun, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 2286–2290; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 2238–2241.
- [3] a) C. J. Wienken, P. Baaske, U. Rothbauer, D. Braun, S. Duhr, *Nat. Commun.* **2010**, 1, 100; b) L. C. Hinkofer, S. A. I. Seidel, B. Korkmaz, F. Silva, A. M. Hummel, D. Braun, D. E. Jenne, U. Specks, *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 26635–26648.
- [4] S. Lippok, S. A. I. Seidel, S. Duhr, K. Uhland, H.-P. Holthoff, D. Jenne, D. Braun, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 3523–3530.
- [5] S. A. I. Seidel, C. J. Wienken, S. Geissler, M. Jerabek-Willemsen, S. Duhr, A. Reiter, D. Trauner, D. Braun, P. Baaske, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 10810–10814; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 10656–10659.
- [6] S. A. I. Seidel, P. M. Dijkman, W. A. Lea, G. van den Bogaart, M. Jerabek-Willemsen, A. Lazic, J. S. Joseph, P. Srinivasan, P. Baaske, A. Simeonov, I. Katritch, F. A. Melo, J. E. Ladbury, G. Schreiber, A. Watts, D. Braun, S. Duhr, *Methods* **2013**, 59, 301–315.
- [7] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, L.-N. Lin, *Anal. Biochem.* **1989**, 179, 131–137.
- [8] a) C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, 249, 505–510; b) A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, 346, 818–822.
- [9] A. D. Keefe, S. Pai, A. Ellington, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, 9, 537–550.
- [10] A. Wochner, M. Menger, M. Rimmele, *Expert Opin. Drug Discovery* **2007**, 2, 1205–1224.
- [11] R. S. Apte, M. Modi, H. Masonson, M. Patel, L. Whitfield, A. P. Adamis, *Ophthalmology* **2007**, 114, 1702–1712.
- [12] E. S. Gragoudas, A. P. Adamis, E. T. Cunningham, M. Feinsod, D. R. Guyer, *N. Engl. J. Med.* **2004**, 351, 2805–2816.
- [13] R. Ellson, M. Mutz, B. Browning, L. Lee, Jr., M. Miller, R. Papen, *JALA* **2003**, 8, 29–34.
- [14] D. S. Tawfik, A. D. Griffiths, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 652–656.
- [15] D. E. Huizenga, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1995**, 34, 656–665.
- [16] Q. Deng, I. German, D. Buchanan, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5415–5421.
- [17] C. H. Lin, D. J. Patel, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 817–832.
- [18] E. J. Cho, J.-W. Lee, A. D. Ellington, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, 2, 241–264.
- [19] H. Sigel, *Chem. Soc. Rev.* **1993**, 22, 255.
- [20] P. Dua, S. Kim, D.-K. Lee, *Recent Pat. DNA Gene Sequences* **2008**, 2, 172–186.