

## Sensoren

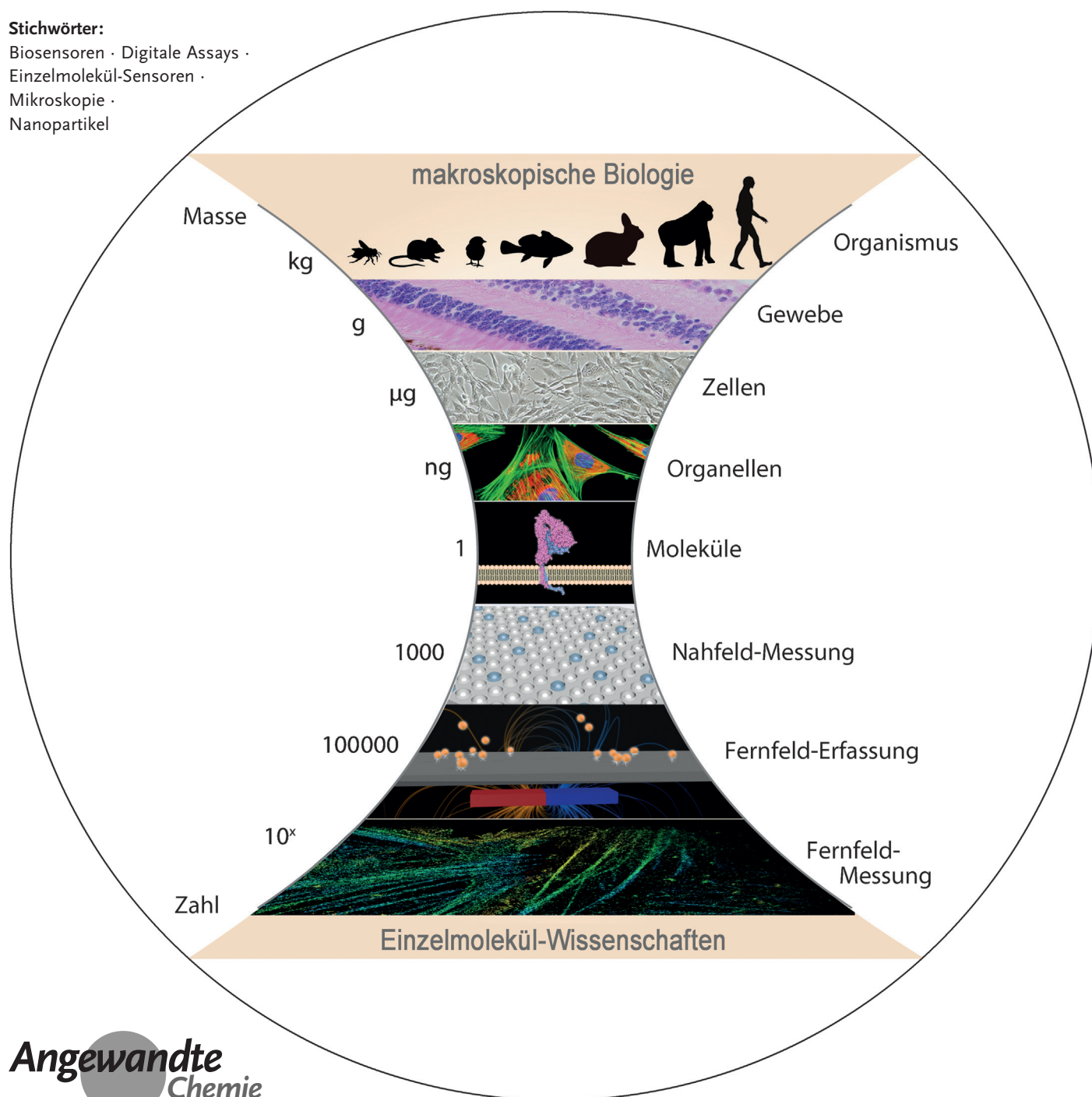
Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201600495  
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201600495

# Einzelmolekül-Sensoren: Herausforderungen und Möglichkeiten für die quantitative Analyse

J. Justin Gooding\* und Katharina Gaus\*

**Stichwörter:**

Biosensoren · Digitale Assays ·  
Einzelmolekül-Sensoren ·  
Mikroskopie ·  
Nanopartikel



**F**ortschritte in der Messtechnik ermöglichen immer kleinere Probenmengen, sodass mittlerweile der Nachweis einzelner Moleküle möglich ist. Schwerpunkt dieses Aufsatzes ist die nächste Generation von Analysewerkzeugen, die die Einzelmolekül-Detektion mit der simultanen Messung vieler Einzelmoleküle kombinieren und/oder größere und komplexere Probenmengen bearbeiten können. Solche Einzelmolekül-Sensoren sind eine neue Art quantitativer Analysewerkzeuge, da die Untersuchung durch Molekülzählung erfolgt und dadurch die Heterogenität der Probe bestimmt werden kann. Der Aufsatz gibt eine Übersicht über die Vorteile und das Potential dieser neuen, quantitativen Einzelmolekül-Sensoren, die messtechnischen Herausforderungen bei der Herstellung von Einzelmolekül-Instrumenten für die Analyse, die Anregungen aus der Biologie zur Bewältigung dieser Herausforderungen sowie einige der derzeit untersuchten Lösungsansätze.

## 1. Einleitung

Die enge Verknüpfung von Entwicklungen in der Messtechnik mit Erkenntnisfortschritten kann kaum deutlicher veranschaulicht werden als in der Mikroskopie und Biologie. Die Anwendung des Mikroskops in der Biologie durch Leeuwenhoek im 17. Jahrhundert war der Beginn der modernen Biologie und stieß technische Entwicklungen in der Optik an, die in der Erfindung der superauflösenden Fluoreszenzmikroskopie unserer Zeit gipfelten.<sup>[1]</sup> Die Mikroskopie ist jedoch nicht das einzige analytische Verfahren zur Auflösung und Detektion immer kleinerer Stoffmengen. Bei elektrochemischen Methoden, Massenspektrometrie, Mikrofluidik und Spektroskopie gab es ähnliche Fortschritte bei der Verringerung der Probenmenge, wenn auch in einem kürzeren Zeitraum. Historisch betrachtet haben Analyseverfahren nun die Ebene von Einzelzellen und Einzelmolekülen erreicht (Abbildung 1). Gegenüber der Ensemble-Messung (die Tausende oder Millionen von Einheiten umfasst) liefern Einzelmolekül- und Einzelzell-Messungen detailliertere Informationen, da sie Heterogenitäten und stochastische Prozesse in den biologischen Systemen aufzeigen können.<sup>[2]</sup> Ein äußerst wichtiger Aspekt dieser wertvollen analytischen Informationen ist die Möglichkeit zum Nachweis und zur Quantifizierung seltener aberranter Spezies, die andernfalls im Rauschen eines Analysengeräts während einer Ensemble-Messung verloren gehen würden. Messungen von einzelnen Entitäten in komplexen Systemen sind jedoch sowohl aus technischer Sicht als auch für die Datenauswertung anspruchsvoll. Kann ein biologisches System durch die Messung nur weniger Komponenten als „gesund“ oder „krank“ bewertet werden? Wie können wir garantieren, dass der nachgewiesene Ausreißer in einem Assay für einzelne Entitäten biologisch relevant ist? Werden jemals „intelligente“ Sensoren entwickelt werden, die anzeigen, ob eine Mutation oder ein verändertes Molekül die Ursache für oder Reaktion auf eine Erkrankung ist? Letztlich ist ein Umdenken nötig und muss die Beziehung der einzelnen Komponenten zur Reaktion des gesamten Systems betrachtet werden, sowohl in der

Sensortechnologie als auch in biologischen Systemen. Tatsächlich gibt es viele Analogien zwischen einzelnen biologischen Bausteinen/Analyten und Reaktionen des Systems/Sensors, was am Ende dieses Aufsatzes diskutiert werden soll.

Der erste Schritt dabei, die Antwort eines einzelnen Moleküls für die quantitative Analyse zu nutzen, ist die massive Erhöhung der Anzahl der Detektionsereignisse (Abbildung 1). Anstelle der Detektion beispielsweise eines Moleküls in einer Zelle müssen alle oder zumindest die meisten seiner Kopien in einer Zelle gemessen werden oder muss das gleiche Molekül in vielen Zellen identifiziert oder müssen viele verschiedene Moleküle in der gleichen Zelle analysiert werden. Dies bedeutet, dass Einzelmolekül-Sensorik nicht automatisch kleinere Proben oder weniger Proben umfasst. Vielmehr kann bei der Einzelmolekül-Sensorik schnell ein ähnliches Problem von „großen Datenmengen“ auftreten, wie in der Systembiologie beobachtet.<sup>[3]</sup> Der Versuch zur Lösung dieser Probleme wird motiviert durch die Molekularbiologie, in der neue molekulare und mechanistische Erkenntnisse gewonnen werden sollen, und durch die Diagnostik, für die leistungsfähigere Analyseinstrumente benötigt werden.

Aus analytischer Sicht ist die Frage verständlich, warum ein Analyseverfahren durch Strategien zur Quantifizierung

## Aus dem Inhalt


1. Einleitung	11527
2. Entwicklung quantitativer Einzelmolekül-Sensoren	11529
3. Die Natur als Vorbild zur Lösung von Problemen in der Einzelmolekül-Sensorik	11530
4. Neue Ansätze für Einzelmolekül-Sensoren	11531
5. Zusammenfassung und Ausblick	11536

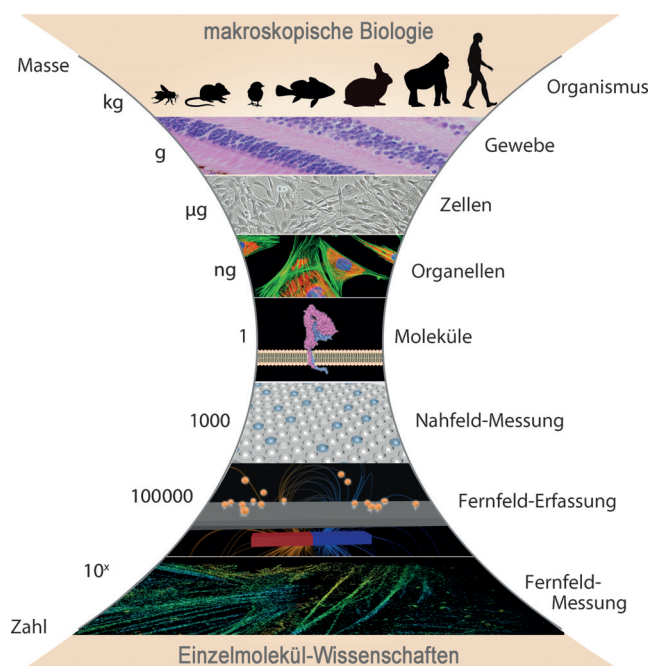
[\*] Prof. J. J. Gooding

The University of New South Wales  
School of Chemistry, Australian Centre for NanoMedicine and  
ARC Centre of Excellence in Convergent Bio-Nano Science and  
Technology, UNSW  
Sydney, 2052 (Australien)  
E-Mail: justin.gooding@unsw.edu.au

K. Gaus

The University of New South Wales  
EMBL Australia Node in Single Molecule Science and  
ARC Centre of Excellence in Advanced Molecular Imaging, UNSW  
Sydney, 2052 (Australien)  
E-Mail: k.gaus@unsw.edu.au

 Die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors ist unter <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201600495> zu finden.



**Abbildung 1.** Die Entwicklung der Messtechnik vom ganzen Körper zu einzelnen Zellen und einzelnen Molekülen. Für die Detektion immer kleinerer Einheiten hat sich die Probengröße drastisch reduziert. Die Messtechnik ist nun an dem Punkt angelangt, dass Einzelmolekül-Messungen in einer quantitativen Wissenschaft eingesetzt werden, und man tendiert wieder zu größeren Proben, um viele einzelne Moleküle zu erfassen. Dies wird zu einer Annäherung von Messtechnik und Molekularbiologie führen. Die in der Abbildung gezeigten Strategien beruhen auf der Eingrenzung von Einzelmolekül-Messungen auf viele einzelne Volumina (Nahfeld-Messung), dem Einfangen der Moleküle in einer Volumenprobe vor der Messung in Nahfeld-Konfiguration (Fernfeld-Erfassung) und zukünftigen Fernfeld-Messungen, in denen viele Einzelmolekül-Messungen simultan verfolgt werden.

vieler Einzelmolekül-Ereignisse verkompliziert werden soll. Darauf gibt es mehrere Antworten. Die offensichtliche Antwort ist, dass dank unserer Fähigkeit zur Detektion von Einzelmolekülen Sensoren entwickelt werden können, die die höchstmögliche Nachweisgrenze aufweisen und deren Signal-Rausch-Verhältnis mit abnehmenden Konzentrationen des Analyten nicht abnimmt. Ein weiterer Gewinn ist die erzielbare Informationstiefe der Analyse. Normalerweise werden Sensoren angestrebt, die nur auf eine Art Spezies reagieren, und somit sind alle Wechselwirkungen anderer Spezies mit dem Sensor unerwünscht oder werden als unspezifisch be-

wertet. Doch für Einzelmolekül-Sensoren, die beispielsweise detektieren, wie ein Molekül mit einer Oberfläche wechselwirkt, entfällt eine solche Bewertung, da der Zielanalyt einzigartige Wechselwirkungseigenschaften aufweisen wird. Dies verlagert den Schwerpunkt von der Einzelmolekül-Detektion (mit digitaler Ausgabe) zur Quantifizierung von Einzelmolekül-Wechselwirkungen (mit differenzierteren und somit informationsreicheren Ausgaben). Einzelmolekül-Sensoren, die über ein breites Spektrum an Interaktionseigenschaften molekulare Wechselwirkungen messen könnten, könnten auch seltene Ereignisse, wie anomales Verhalten, messen. Bei einer traditionellen Ensemble-Messung, bei der nur der Mittelwert der Reaktion gemessen wird, gehen solche seltenen Ereignisse im Rauschen verloren. In der Einzelmolekül-Technik ist die Verteilung der Wechselwirkungseigenschaften tatsächlich informativer als der Durchschnittswert. Zu guter Letzt könnte durch Untersuchung vieler einzelner Moleküle auch die Anzahl der Analytmoleküle direkt gezählt werden, was eine Kalibrierung vereinfachen oder sogar unnötig machen würde.

Wie aus diesem Aufsatz ersichtlich werden wird, ist die Entwicklung von Einzelmolekül-Sensoren für die quantitative Analyse nicht unkompliziert; zudem umfasst die Lösung nicht zwangsläufig konventionelle Paradigmen der Sensorik. Grund dafür ist, dass die meisten aktuellen Sensorgeräte zwei wesentliche Merkmale aufweisen, die sie ungeeignet für die Einzelmolekül-Sensorik machen: Erstens umfasst die Funktionsweise der meisten Sensoren Ensemble-Messungen, d. h., es erfolgt eine einzige Datenausgabe gemäß dem Mittelwert vieler Einzelmolekül-Reaktionen oder -Wechselwirkungen. Zweitens streben konventionelle Sensoren hohe Selektivität und/oder Affinität an, da diese Eigenschaften die Grundlage für eine Reaktion auf nur eine Spezies bilden, auch wenn der Sensor mit der komplexen Mischung einer biologischen Probe in Berührung kommt.

Dieser Aufsatz soll zeigen, warum sich Einzelmolekülstark von Ensemble-Messungen unterscheiden und wie das Sensordesign verändert werden muss. Außerdem werden Strategien vorgestellt, die derzeit zur Entwicklung von Einzelmolekül-Sensoren für die quantitative Analyse genutzt werden, und ihre Vor- und Nachteile aufgezeigt. Anschließend werden neuere Strategien betrachtet und zum Schluss Beispiele aus der Biologie für die quantitative Einzelmolekül-Sensorik aufgeführt. Dieser Aufsatz soll keine umfassende Übersicht über alle bekannten Methoden und Techniken zur Detektion eines einzelnen Moleküls bieten; vielmehr werden



Justin Gooding promovierte an der Oxford University bei Prof. Richard Compton und war Postdoktorand an der University of Cambridge bei Prof. Elizabeth Hall. Er ist ein Australian Research Council Laureate Fellow, Co-Direktor des Australian Centre for NanoMedicine und Chefredakteur von ACS Sensors. Er leitet eine Arbeitsgruppe von 40 Mitarbeitern, und sein Forschungsinteresse umfasst Oberflächenmodifikationen und Nanotechnologie für Biosensoren, Biomaterialien, Elektronentransfer und medizinische Anwendungen.



Katharina Gaus promovierte an der University of Cambridge bei Prof. Elizabeth Hall. Sie ist derzeit ein NHMRC Senior Research Fellow an der University of New South Wales und Head des EMBL Australia Node in Single Molecule Science. Ihre Arbeitsgruppe untersucht Signaltransduktionsprozesse in T-Lymphozyten mit hochentwickelten Fluoreszenzmikroskopischen Methoden.



ausgewählte Beispiele beschrieben, die konzeptionelle Fortschritte für die Entwicklung verbesserter quantitativer Einzelmolekül-Sensoren repräsentieren. Zudem muss zwischen den hierin diskutierten, quantitativen Einzelmolekül-Sensoren und dem deutlich weiter entwickelten und ausführlich besprochenen<sup>[2b,4]</sup> Gebiet der Einzelmolekül-Messung unterschieden werden, auf dem die Eigenschaften von einzelnen Molekülen oder Einzelmolekül-Bindungspaaren untersucht werden.

## 2. Entwicklung quantitativer Einzelmolekül-Sensoren

Der Zugang zur Welt einzelner Moleküle ist das Ergebnis unglaublicher Fortschritte in der Messtechnik. Durch die optische Falle für einzelne Kinesinmoleküle gewannen 1993 Svoboda et al. erste Einblicke in die Biophysik molekularer Motoren.<sup>[5]</sup> Andere Methoden folgten, wie Kraftmessungen durch Rasterkraftmikroskopie für Protein-Liganden-Bindungen<sup>[6]</sup> und DNA-DNA-Duplexe,<sup>[7]</sup> Einzelmolekül-Fluoreszenzmessungen der Umsetzung einzelner ATP-Moleküle durch ein einziges Myosinmolekül<sup>[8]</sup> und die Translokation von DNA durch  $\alpha$ -Hämolysin-Nanoporen.<sup>[9]</sup> Seitdem haben sich Einzelmolekül-Messungen erstaunlich schnell weiterentwickelt, und jetzt ist ein Punkt erreicht, an dem feine Details enzymatischer Reaktionen auf der Einzelmolekül-Ebene beobachtet und somit mechanistische Informationen erhalten werden können, die andernfalls unzugänglich wären. Beispielsweise konnten Experimente zur Wechselwirkung von Enzymen (NS3-Helikasen) mit RNA mithilfe einer optischen Pinzette kinetische Effekte, wie Pausieren, Umkehrung von Enzymreaktionen und Aufwicklung von abgewinkelten Teilen der doppelsträngigen RNA, aufdecken.<sup>[10]</sup> Ähnlich wurden in Einzelmolekül-Studien neue mögliche Antibiotika identifiziert, indem Moleküle durchmustert wurden, die den Ionentransport über Einzelionenkanäle in einer Lipiddoppelschicht blockieren.<sup>[11]</sup>

Diese Beispiele für Einzelmolekül-Studien haben drei wesentliche Aspekte gemein: Erstens können die Methoden nur ein einzelnes oder wenige Moleküle zur gleichen Zeit detektieren, was die Untersuchung der Anzahl der wechselwirkenden Spezies in der Probe begrenzt. Zweitens erfordern diese Methoden normalerweise aufgereinigte Komponenten und einen Ex-vivo-Aufbau der zu untersuchenden Struktur. Drittens wird für die Einzelmolekül-Detektion in den meisten Fällen der Messraum auf sehr kleine Volumina oder Flächen reduziert. Folglich waren Einzelmolekül-Messungen bislang eine „Nahfeld“-Wissenschaft.

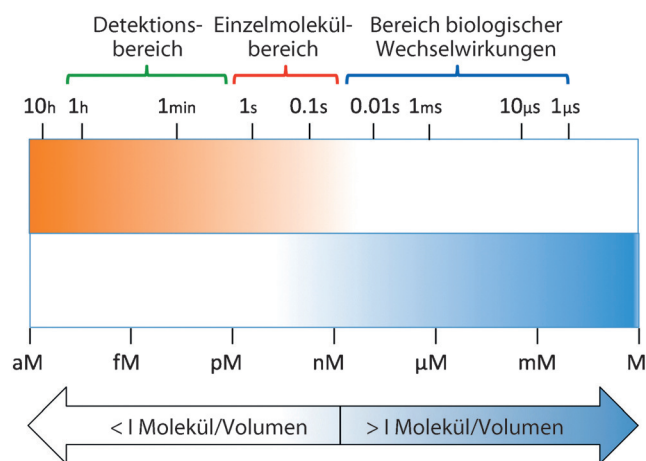
Der Hauptvorteil von Einzelmolekül-Messungen liegt in der Möglichkeit, Heterogenität in einer Population von Molekülen zu untersuchen. Da die Wechselwirkung von Biomolekülen normalerweise stochastisch erfolgt, können die Feinheiten von dynamischem Verhalten durch Ensemble-Durchschnittsmessungen nicht wahrgenommen werden, auch wenn alle Reaktionen gleichzeitig initiiert würden. Beispielsweise untersuchten Xie et al. die Michaelis-Menten-Enzymkinetik auf der Einzelmolekül-Ebene.<sup>[12]</sup> Auch wenn dieser klassische Enzymmechanismus auf der Einzelmolekül-

Ebene nach wie vor gültig ist, zeichnete sich der Enzymumsatz durch Anhäufungen von Ereignissen aus, die durch Zeiträume niedriger Aktivität voneinander getrennt waren – Schwankungen, die auf der Ensemble-Ebene nicht beobachtet werden konnten.

Stochastisches Verhalten bedingt, dass eine Population von Molekülen auf der Einzelmolekül-Ebene untersucht werden muss, um das Verhaltensspektrum, das in der Ensemble-Messung einen Mittelwert ergibt, zu untersuchen. Dies impliziert entweder Serienmessung vieler Einzelmoleküle oder zahlreiche parallele Einzelmolekül-Messungen. Einzelmolekül-Elektronentransfer-Messungen mithilfe eines Rastertunnelmikroskops zeigten, dass eine zeitliche Trennung vieler Einzelmolekül-Messungen für statische Systeme möglich ist, wenn die Messung schnell abläuft.<sup>[13]</sup> Für biomolekulare Wechselwirkungen weisen die Nahfeld-Ansätze, die in der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie und anderen biophysikalischen Methoden Anwendung finden, allerdings einige wesentliche Einschränkungen auf.

Die Reduzierung des Messvolumens auf wenige Femtoliter, wie es häufig bei Nahfeld-Einzelmolekül-Messungen erfolgt, schränkt die Breite der zu untersuchenden biomolekularen Wechselwirkungen auf zweierlei Weise ein: in Form einer Konzentrationsgrenze und in der einer thermodynamischen Grenze, wie von Tinnefeld et al. im Zusammenhang mit Einzelmolekül-Fluoreszenzmessungen auf elegante Weise diskutiert wurde; jedoch betrifft dies in gleicher Weise alle Methoden, die den Nahfeld-Ansatz nutzen.<sup>[2a]</sup> Die Konzentrationsgrenze ergibt sich aus Nahfeld-Einzelmolekül-Messungen, bei denen nur ein Molekül im Detektionsvolumen zu jedem Zeitpunkt vorhanden sein soll. Beträgt das Volumen 1 fL, entspricht dies einer Konzentration von ca. 2 nM im Detektionsvolumen. Messlösungen mit höheren Konzentrationen führen zu einer größeren Wahrscheinlichkeit, dass mehr als ein Molekül im Detektionsvolumen vorliegt und dass dementsprechend unzuverlässige Daten erhalten werden. Andererseits erfordern niedrigere Konzentrationen übermäßig lange Messzeiten (Abbildung 2). Für die Quantifizierung in biologischen Medien liegt diese niedrigere Konzentrationsgrenze über den Werten, die normalerweise detektiert werden sollen. Für eine typische Analyse von Serum werden gewöhnlich Konzentrationen von  $10^{-16}$ – $10^{-12}$  M benötigt, oder sogar noch niedriger. Rissin et al.<sup>[14]</sup> erläuterten dies anhand eines Beispiels eines 1 mm<sup>3</sup> Tumors aus einer Million Zellen, die 5000 Proteine in den Blutkreislauf eines Volumens von 5 L absondern, was zu einer Konzentration von ca. 2 fM führt. Mit Einzelmolekül-Messmethoden benötigte man zwischen Einzelmolekül-Aufnahmen bei einer Konzentration von 1 fM nahezu 10 min, unter der Annahme eines typischen Protein-Diffusionskoeffizienten von  $1 \times 10^{-7}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>.

Dieser lange Zeitraum zwischen den Messungen wird bei einer quantitativen Analyse noch länger. Grund dafür ist, dass die zur Analyse bestimmten Proben die gesamte Population repräsentieren müssen. Bei niedrigen Konzentrationen wird die Probenstatistik nicht durch eine Gauß-Verteilung, sondern durch eine Poisson-Verteilung bestimmt. Diese Verteilung wird zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit des Auftretens seltener Ereignisse in einer großen Anzahl von Ver-



**Abbildung 2.** Konzentrationsbereiche, in denen Detektion, Einzelmoleküle und biologische Wechselwirkungen üblicherweise auftreten. Der Einzelmolekül-Bereich bezieht sich auf ein klassisches Einzelmolekül-Experiment, in dem Messungen durch Verringerung des Messvolumens (1 fL) durchgeführt werden, sodass sich nur ein Einzelmolekül oder weniger in diesem Volumen befindet. Dies entspricht einer Konzentration von 2 nM. Bei höheren Konzentrationen, bei denen normalerweise Wechselwirkungen zwischen biologischen Molekülen in lebenden Systemen auftreten, wird mehr als ein Molekül pro Messvolumen vorliegen, und daher sind solche Konzentrationsbereiche für Einzelmolekül-Messungen ungeeignet. Andererseits sind die typischen Konzentrationen für eine Detektion wesentlich niedriger als dieser Bereich. Die Einschränkung des Detektionsbereichs beruht auf der möglicherweise sehr langen Zeitspanne zwischen den Messungen. So wird die Messung nicht nur bezüglich der Messzeit erschwert, sondern auch, weil die Lebenszeit des biologischen wechselwirkenden Komplexes auf der Einzelmolekül-Ebene kürzer sein kann als die Zeit zwischen den Messungen. Es wird angenommen, dass das Messvolumen 1 fL und der Diffusionskoeffizient eines typischen Biomoleküls  $1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  betragen.

suchen verwendet. Für das beschriebene Beispiel mit einer Konzentration von 1 fM muss ein Volumen von über 50 nL bearbeitet werden, um ein Konfidenzniveau von 95 % zu erreichen, damit die Analyse die Probe widerspiegelt. Bei einem Zeitraum von 10 min zwischen Einzelmolekül-Aufnahmen würde die Messung aller Moleküle in der Probe mindestens sechs Stunden dauern. Wie in Abschnitt 4.1 erläutert werden wird, ist diese Einschränkung der Grund dafür, dass die Nanoporensensoren, die eine Pore passierende Einzelmoleküle detektieren können, normalerweise im nanomolaren bis mikromolaren Bereich angewendet werden.<sup>[9b]</sup> Folglich werden diese Poren häufiger zur DNA-Sequenzierung<sup>[15]</sup> genutzt, bei der eine Identifizierung statt einer Quantifizierung das Ziel ist.

Eine Folge der „Maßstabsverkleinerung“ auf das Niveau des Einzelmoleküls ist, dass die Kinetik biomolekularer Wechselwirkungen nicht länger ignoriert werden kann; dies stellt die thermodynamische Beschränkung dar. Die statische Sichtweise auf biologische Bindungsereignisse, die aus Ensemble-Messungen resultiert, sollte mit zunehmendem Verstehen der Dynamik von Bindungsprozessen überdacht werden. Wechselwirkungen mit hoher Affinität verlaufen normalerweise mit Dissoziationskonstanten im mikromolaren bis nanomolaren Bereich. Dies bedeutet, dass beispiels-

weise in Enzymimmunoassays (ELISA) die Reversibilität des Bindungsgleichgewichts nicht nachgewiesen wird, da die Änderung der Anzahl von Bindungsereignissen zu einer bestimmten Zeit zu gering ist, um von konventionellen Messwertaufnehmern erfasst zu werden. Dagegen wird mit Einzelmolekül-Messungen – oder mit Messmethoden, die fast eine entsprechende Auflösung erreichen – die Reversibilität von Affinitätsreaktionen während der Messung erkennbar.<sup>[16]</sup> Dies ist wichtig, da die Lebenszeit des Komplexes mit der Dissoziationsgleichgewichtskonstante und Assoziationsgeschwindigkeitskonstante verknüpft ist. Daher muss die Messung ausreichend schnell ablaufen, um den Komplex zu detektieren. Erwartungsgemäß beträgt die Lebenszeit eines Komplexes mit einer typischen Dissoziationskonstante im mikromolaren Bereich etwa 1 s, wenn die diffusionsbegrenzte Assoziationskonstante bei ca.  $5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Lit. [2a]) liegt, und über 3 min für hochaffine Antikörper mit einer Dissoziationskonstante im nM-Bereich.<sup>[17]</sup> Bei einer Zeitdauer von 10 min zwischen den Messungen können solche Lebenszeiten die Qualität erhaltener analytischer Informationen beeinträchtigen.

Die Suche nach Lösungen für diese Probleme in der Einzelmolekül-Messtechnik aufgrund der konzentrationsbezogenen und thermodynamischen Grenzen eröffnet neue Möglichkeiten für das Messdesign zur Beeinflussung von Gleichgewichten und zur Auslösung von Bindungsreaktionen, beispielsweise durch Kompartimentierung und Immobilisierung.

### 3. Die Natur als Vorbild zur Lösung von Problemen in der Einzelmolekül-Sensorik

Eine Zelle kann Signale in ihrer Umgebung wahrnehmen, auf diese reagieren und entsprechend ihre Morphologie und ihr Verhalten anpassen, um so ihr weiteres Schicksal zu beeinflussen. Tatsächlich sind in der Biologie Beispiele bekannt, in denen ein einzelnes Molekül Einfluss auf das Gesamtergebnis ausüben kann. Ein einzelnes Peptidantigen kann beispielsweise den T-Zell-Rezeptor aktivieren und ein Aktivierungsprogramm auslösen, das zu einer Immunreaktion führen kann.<sup>[18]</sup> Um dies zu verstehen, muss man wissen, dass die T-Zelle nicht nur spezifische Peptide in äußerst niedrigen Konzentrationen detektieren und identifizieren können muss, sondern auch eine schicksalbestimmende Entscheidung treffen muss: Ist eine bestimmte Peptidsequenz ein gutartiges oder ein immunogenes Peptid? Prinzipiell gibt es zwei Strategien für das Design von Sensoren für entsprechende Messungen: Erstens könnte eine große Peptid-Datenbank aufgebaut werden, die Peptidsequenzen von allen bekannten Pathogenen, von Krebs sowie von körpereigenen Proteinen enthält, und dann die nachgewiesene Peptidsequenz mit der Datenbank abgeglichen werden. Zweitens könnte man von T-Zellen lernen: Diese nutzen variierende Bindungseigenschaften zwischen Peptidantigen und T-Zell-Rezeptor, um Peptide zu detektieren und zu bewerten.

Die Bindungsaffinitäten des T-Zell-Rezeptors zu seinen Peptidliganden sind relativ niedrig ( $K_d = 1\text{--}100 \text{ } \mu\text{M}$ ), und die Bindungsaffinität entspricht nicht zwangsläufig den T-Zell-

Reaktionen.<sup>[19]</sup> Daher kann das erstaunliche Unterscheidungsvermögen von T-Zellen zwischen gutartigen und immunogenen Peptiden nicht nur von der Spezifität einer einzigen Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung abgeleitet werden. Tatsächlich verwenden Zellen Tricks, um bei niedrigen Affinitäten reagieren zu können, beispielsweise durch Beschränken der wechselwirkenden Spezies auf kleine Volumina. Dies verändert die erkennbare Wechselwirkungskinetik, die von der Zelle wahrgenommen wird.<sup>[20]</sup> Beispielsweise wird der T-Zell-Rezeptor auf der Zelloberfläche in nanogroße Domänen gruppiert, was nicht nur die Konzentration des Rezeptors in diesem Volumen erhöht, sondern auch die Mobilität von jedem Rezeptor einschränkt.<sup>[21]</sup> Auf diese Weise kann ein Ligand an den gleichen Rezeptor oder benachbarte Rezeptoren fortlaufend binden.<sup>[20,22]</sup> Dies ist ein Beispiel dafür, dass vielzählige Einzelmolekül-Wechselwirkungen die geringe Affinität einer einzigen solchen Wechselwirkung kompensieren können.

Weitere Zellstrukturen, die Moleküle eingrenzen und somit die Geschwindigkeit der „Detektion“ verändern können, sind Vesikel, zweidimensionale Membranen oder eindimensionale Fasern. Die Dimensionalität dieser Strukturen beeinflusst wesentlich die Reaktionskinetik zwischen den Molekülen, die in diesen Räumen eingeeengt werden. Hierbei könnte der Entwurf von Sensorgeometrien Anregungen aus biologischen Strategien der Eingrenzung erhalten. Während Zellen Volumina verkleinern, um Konzentrationsgrenzen zu überwinden, wirken andere Elemente, wie Poren und Rezeptoren, überwiegend durch Einzelmoleküle und fungieren als „Torwächter“ für diese Kompartimente. Eine solche selektive Einengung in kleine Volumina würde Einzelmolekül-Messungen erheblich vereinfachen.

Eine andere Strategie der Zelle ist die Kombination von Kompartimentierung mit „Multiplexing“. Viele Proteine, insbesondere Signalmoleküle, haben mehrere Wechselwirkungspartner.<sup>[23]</sup> Dementsprechend sind biologische Systeme nicht nur bezüglich Wechselwirkungen und Reaktionen unter Beteiligung der gleichen Moleküle heterogen, sondern auch in Bezug auf Wechselwirkungen oder Reaktionspartner. Ein Molekül, das mit unterschiedlichen Partnern unter verschiedenen Bedingungen wechselwirken kann, ist, biologisch gesehen, wertvoller und könnte somit evolutionär selektiert worden sein, im Unterschied zu einem Molekül, das nur einen anderen Partner binden kann.<sup>[23]</sup> Die Vielfältigkeit der Bindungspartner ist jedoch nur funktionell nützlich, wenn verschiedene Wechselwirkungen kommuniziert werden können. Es ist wahrscheinlicher, dass vielmehr Eigenschaften der Bindungsereignisse, statt der Identität der Bindungspartner, durch Signalnetzwerke übermittelt werden. Beispielsweise ist letztlich für die Auslösung einer Immunreaktion durch die T-Zelle nicht wichtig, welches antigene Peptid an den T-Zell-Rezeptor gebunden ist. Es gibt also einen gemeinsamen Signalmechanismus, der die Lebenszeit der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung übermittelt, und diese Bindungseigenschaft dient letztlich der Unterscheidung der Liganden. Diese ist auch die biologisch entscheidende Information, während die eigentliche Sequenz der antigenen Peptide unerheblich ist. Für Einzelmolekül-Sensoren können daraus folgende Schlussfolgerungen gezogen werden: Eine Reduzierung der

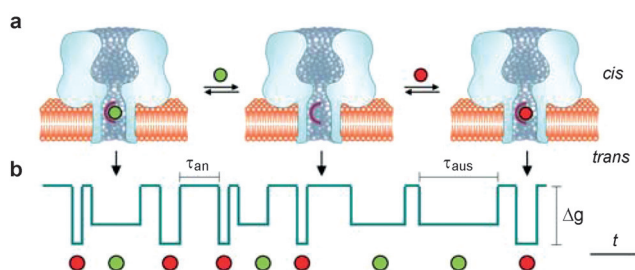
Wechselwirkungsspezifität kann einen höheren Informationswert per Einzelmolekül-Bindungsereignis bedeuten (d.h., Quantifizierung der Lebenszeit von Komplexen auf Kosten der Identifizierung des Bindungspartners) und dadurch neue Möglichkeiten für die Multiplex-Erkennung eröffnen, die wertvolle Einblicke in komplexe Systeme geben kann. Sensoren, die Einzelmolekül-Bindungsereignisse quantifizieren, würden die gleiche Zuverlässigkeit für seltene Bindungsereignisse aufweisen wie für häufige. Somit sind die Eigenschaften, die einen guten Ensemble-Sensor definieren (z.B. Spezifität, hohe Bindungsaffinität), nicht unbedingt die gleichen wie für Einzelmolekül-Sensoren.

#### 4. Neue Ansätze für Einzelmolekül-Sensoren

Wie könnten sich die genannten Einschränkungen bei Einzelmolekül-Messungen überwinden lassen und so Messungen mit hinreichender Geschwindigkeit und statistischer Genauigkeit durchführbar werden? Die neuen Strategien können eingeteilt werden in: 1) schnelle Nahfeld-Messungen, 2) massiv parallele Nahfeld-Messungen, 3) Fernfeld-Sampling/Nahfeld-Detektions-Messungen und 4) Fernfeld-Messungen. Die letzten drei Strategien sind in den unteren drei Feldern in Abbildung 1 dargestellt.

##### 4.1. Schnelle Nahfeld-Messungen

Vermutlich bestanden die ersten Einzelmolekül-Messungs-Strategien für eine quantitative Analyse in den von Bayley et al. entwickelten Nanoporen-Strategien,<sup>[9b,24]</sup> mit denen Metallionen und organische Moleküle detektiert werden sollten. Die entsprechenden Sensoren beruhen auf modifizierten  $\alpha$ -Hämolysin-Nanoporen in einer Lipiddoppelschicht, die zwei Seiten einer Lösung trennte, sodass Spezies nur durch die Pore übertreten konnten. Dieses Design ähnelt stark den Poren und Kanälen in Zellmembranen. Durch Elektroden an jeder Seite der Pore konnte die Leitfähigkeit quer durch die Membran gemessen werden.



**Abbildung 3.** Ein Einzelmolekül-Nanoporensensor. a) Reversible Bindung von unterschiedlichen Analytmolekülen (durch rote und grüne Kreise dargestellt) an einen Rezeptor in der Nanopore. b) Die Größenordnung der damit verbundenen Widerstandspulse (als Änderung der Leitfähigkeit,  $\Delta g$ , angezeigt) gibt die Art des Analyten wieder und ermöglicht eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Analyten. Wiedergabe aus Lit. [28] mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. Copyright 2010.



Wenn sich eine Spezies durch die Pore bewegt und diese teilweise blockiert, nimmt die Leitfähigkeit ab (Abbildung 3). Die Selektivität wird dadurch erzielt, dass der Analyt von Interesse eine Affinität für die modifizierte Pore aufweist. Daher wird der Analyt durch einen Widerstandspuls erkannt, und jeder Widerstandspuls ist mit einer einzelnen Spezies verbunden, die durch die Pore gelangt. Somit entspricht die Anzahl der Pulse der Menge der durch die Poren hindurchtretenden Spezies. In den frühen Studien wurden Detektionsgrenzen im Größenbereich von nm für Ionen<sup>[24]</sup> und  $\mu\text{m}$  für organische Spezies<sup>[25]</sup> bestimmt. Seit diesen Anfängen wurde der Einsatz von sowohl proteinbasierten als auch Festphasen-Nanoporen als Sensoren intensiv erforscht, wobei die Detektion und Sequenzierung von DNA im Mittelpunkt stand. Bei der DNA-Sequenzierung bestand das Hauptproblem häufig darin, dass die Diffusion des DNA-Moleküls durch die Nanopore schneller ist als das Ablesen durch das System (oder Gerät) und dadurch die Transfargeschwindigkeit der Moleküle zur Pore irrelevant ist.<sup>[26]</sup> Der an dieser außergewöhnlichen Arbeit interessierte Leser sei auf einige der vielen Übersichtsartikel<sup>[25,27]</sup> zu diesem Thema verwiesen. Nanoporen sind ein ausgezeichnetes Beispiel dafür, wie Detektionsgrenzen von Einzelmolekül-Sensoren gesenkt werden können, indem die Geschwindigkeit, mit der der untersuchte Analyt das Nahfeld-Messvolumen erreicht, erhöht wird.

In einem Nanoporen-Experiment würde die Zeit bis zum Aufeinandertreffen von Analyt und Pore durch die gleichen zeitlichen Regeln bestimmt sein wie in einem Fluoreszenz-Experiment (siehe Abschnitt 2), d.h. ca. 10 min zwischen Widerstandspulsen für ein Protein in einer 1 fM Lösung. Nanoporen sind jedoch nicht rein diffusionsbestimmte Systeme. Bei der Messung wird ein elektrisches Feld zwischen den beiden Elektroden angelegt. Trägt der Analyt eine Ladung, kann die Wanderung des Analyten zur Pore die Zeit bis zum Aufeinandertreffen bei einer bestimmten Konzentration deutlich erhöhen. Höfler und Gyurcsányi<sup>[29]</sup> untersuchten dieses Problem theoretisch mit einem Zufallsbewegungsmodell und zeigten, dass die Zeit bis zum Aufeinandertreffen von Analyt und Pore mit zunehmendem elektrischem Feld um bis zu zwei Größenordnungen abnimmt, bei gleichzeitiger Abnahme der Detektionsgrenze. Auch wenn das elektrische Feld die Zeit bis zum Aufeinandertreffen des Analyten mit der Pore verringert, zeigt sich, dass aufgrund der für die Messungen erforderlichen Elektrolytlösung das elektrische Feld nicht weit von der Pore vordringt. Somit verläuft in der Realität der Massentransport vom Analyten zu einer Nanopore in großer Entfernung von der Pore normalerweise durch Diffusion, während eine Migration im elektrischen Feld nur in der näheren Umgebung der Pore bedeutsam wird.

Freedman et al.<sup>[30]</sup> legten auf elegante Weise die Auswirkungen des Elektrolyten auf das elektrische Feld beim Transfer von Spezies zur Nanopore dar. Sie postulieren, dass bei einem Einfangradius der Pore von 3  $\mu\text{m}$  aufgrund des elektrischen Felds nur 34 Moleküle im Einfangvolumen einer 1 nM Lösung vorliegen. Bei einer Lösungskonzentration im subpikomolaren Bereich würden sich nur 0.03 Moleküle im Einfangvolumen befinden, und somit könnte der Sensor wieder nur mit übermäßig langen Messzeiten betrieben

werden. Meller et al.<sup>[31]</sup> begegneten diesem Problem mit der Verwendung von Salzkonzentrationsgradienten. Sie zeigten, dass, anstelle von 1M KCl auf jeder Seite der Pore, durch Verringerung der Konzentration auf 0.2M auf der Seite mit der DNA (der *cis*-Seite) und Aufrechterhaltung von 1M auf der *trans*-Seite ein Ionengradient erzeugt wird, der von der Pore in die *cis*-Seite übergeht. Die Folge war ein 30-facher Anstieg der Detektionsgeschwindigkeit für 3.8 pM DNA-Lösungen. Ein steiler Konzentrationsgradient von 0.2M auf der *cis*-Seite und 4M auf der *trans*-Seite führte zu etwa einem Widerstandspuls pro Sekunde, gegenüber mehreren Sekunden zwischen Widerstandspulsen mit 1M KCl auf jeder Seite.

Aufbauend auf die Ideen von Meller et al.<sup>[31]</sup> zur Vergrößerung des Einflussvolumens des elektrischen Felds ausgehend von der Nanopore wendeten Freedman et al.<sup>[30]</sup> die Wechselstromtechnik von Dielektrophoresen an. Mithilfe einer Metallbeschichtung auf einer Nanopipette für die Widerstandspulsmessung von DNA wurde gezeigt, dass die Spitze-Spitze-Spannung die Einfanggeschwindigkeit und somit das Einfangvolumen beeinflusste. Eine Verdopplung der Spitze-Spitze-Spannung von 10 auf 20 V führte zu einem 10-fachen Anstieg der Einfanggeschwindigkeit. Mithilfe dieses Ansatzes konnten Freedman et al.<sup>[30]</sup> 5 fM DNA mit 315 Ereignissen pro Minute detektieren; dies ist eine erstaunliche Verbesserung gegenüber der Messung ohne Dielektrophoresenfälle.

Ein alternativer Ansatz zur elektrophoretischen Methode, um das Einfangvolumen zu erhöhen, ist die bewährte magnetische Einfangstrategie. Bisher wurden solche Strategien zur Aufkonzentration des Analyten<sup>[32]</sup> vor der Nanoporen-Messung angewendet, im Unterschied zur Verwendung magnetischer Nanopartikel, die den Analyten zu den Poren transportieren.

Die Einschränkung dieser allgemeinen Strategie schneller Nahfeld-Messung liegt unseres Erachtens darin, dass sie sich auf Messmethoden beschränkt, bei denen sich der Analyt durch das Nahfeld-Messvolumen bewegt. Für Einzelmolekül-Techniken, bei denen die Moleküle im Messvolumen verbleiben müssen, sind dann Alternativen erforderlich.

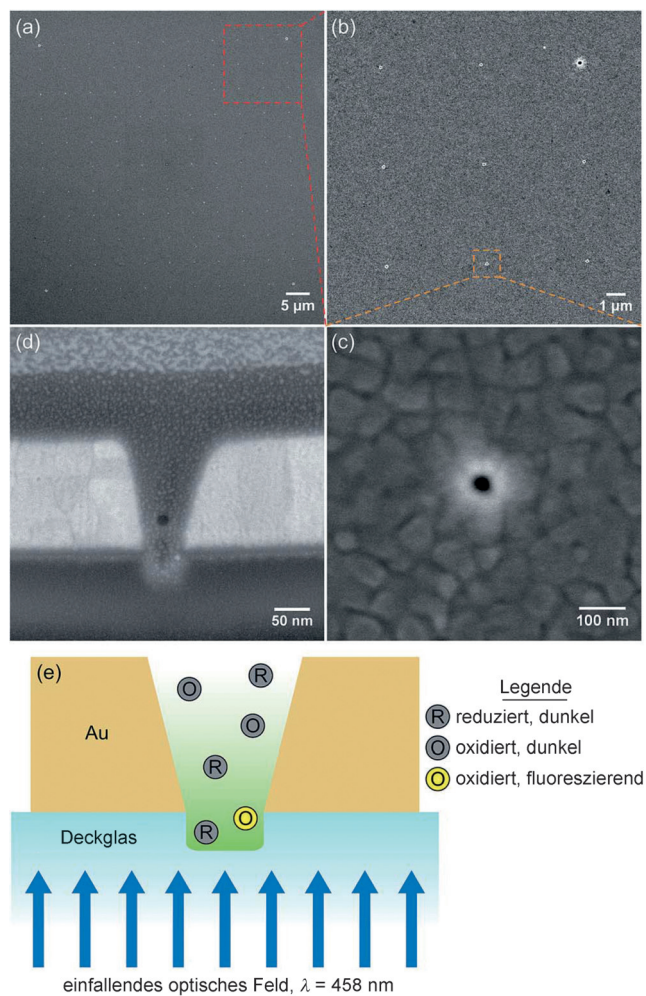
#### 4.2. Massiv parallele Nahfeld-Messungen

Massiv parallele Nahfeld-Messungen zahlreicher Einzelmolekül-Ereignisse können in vielen kleinen isolierten Probenvolumina durchgeführt werden. Auf diese Weise verfahren Walt et al. unter Nutzung einer Lichtfaserbündeltechnik.<sup>[33]</sup> Die Enden der Faserbündel werden geätzt, sodass jede Faser eine Vertiefung von 46 fL enthält. Ein 1-mm-Bündel weist 24000 dieser Vertiefungen auf, die jeweils räumlich voneinander getrennt sind. Die erste Anwendung dieser Technik war ein Assay für ein einzelnes Enzym ( $\beta$ -Galactosidase), in dem bei niedrigen Konzentrationen von  $\beta$ -Galactosidase entweder 1 oder 0 Enzymmoleküle in den Vertiefungen vorlagen, deren Aktivität mit einem fluoreszierenden Substrat beobachtet wurde.<sup>[34]</sup> Dementsprechend ist das Grundprinzip dieses Einzelmolekül-Assayformats die Einengung der zu analysierenden Spezies in kleinen Volumina, sodass die Konzentration des fluoreszierenden Substrats pro

Vertiefung für die Messung ausreichend hoch ist. Kürzlich wurde eine interessante Variante dieses Experiments beschrieben, bei der das Enzym an paramagnetischen Kügelchen immobilisiert war, sodass Tröpfchen mit diesen Kugeln magnetisch in die Vertiefungen überführt werden konnten.<sup>[35]</sup> Mithilfe dieser Technik können einzelne Nukleinsäuremoleküle amplifiziert werden.<sup>[36]</sup> Eine weitere Variante ist die so genannte Slip-Chip-Methode von Ismagilov et al.<sup>[37]</sup> Der Slip-Chip ist ein Mikrofluidiksystem, in dem eine Flüssigkeitssäule mechanisch über nL-große Vertiefungen bewegt wird, in denen ein einzelnes Molekül eine Reaktion eingehen kann. Auf diese Weise gelang eine Einzelmolekül-DNA-Amplifikation.<sup>[38]</sup>

Die vielen Varianten dieser Art Experiment für die Beobachtung der Enzymkinetik wurden kürzlich in einem Übersichtsartikel beschrieben.<sup>[39]</sup> Kleine Volumina wurden auch zur Verfolgung von Protein-Protein-Bindung in einem Nullmoden-Wellenleiter (Zero-Mode-Waveguide) verwendet.<sup>[40]</sup> Eine besonders beeindruckende Neuheit auf diesem Gebiet ist die Entwicklung von Arrays von Nullmoden-Wellenleitern zur spektroelektrochemischen Untersuchung eines einzelnen Flavinmononukleotids (FMN), das in einem Fernfeld-Format von Bohn et al.<sup>[41]</sup> visualisiert wurde. FMN ist ein Redoxenzym-Cofaktor sowie elektrochemisch und optisch nahe verwandt mit dem weit verbreiteten Enzym-Cofaktor Flavin-Adenin-Dinukleotid. Bei einer Anregung ist die oxidierte Form fluoreszierend, die reduzierte Form hingegen weniger. Ein Merkmal der Nullmoden-Wellenleiter ist eine goldene optische Plattierschicht (Abbildung 4). Das heißt, dass nur die oxidierten FMN-Moleküle, die den unteren Abschnitt des Nullmoden-Wellenleiters erreichen, stimuliert werden. Die goldene Beschichtung dient auch der Oxidation und Reduktion des FMN in jedem Nullmoden-Wellenleiter. Das Volumen der Nullmoden-Wellenleiter wird auf 200 zL geschätzt, sodass bei Konzentrationen unter 10  $\mu\text{M}$  eine Beladung pro Wellenleiter von 1 oder 0 FMN-Molekülen erwartet wird. Somit resultiert eine Änderung des Potentials – ausgehend von FMN in seiner reduzierten Form hin zu einem Oxidationspotential – in einer FMN-Fluoreszenz in den FMN-haltigen Nullmoden-Wellenleitern. Diese Studie eröffnet neue Möglichkeiten für die spektroelektrochemische Untersuchung von Einzelenzymmolekülen und weiterreichend für Bioassays. Vorteile dieser Methode bestehen darin, dass sie elektrochemisch ist, was sie gut kompatibel mit Sensoruntersuchungen macht, dass die Ablesung in einem Fernfeld-Format erfolgt, sodass die Reaktionen einfach optisch gezählt werden, und dass die Spezies in jedem Nullmoden-Wellenleiter frei diffundieren.

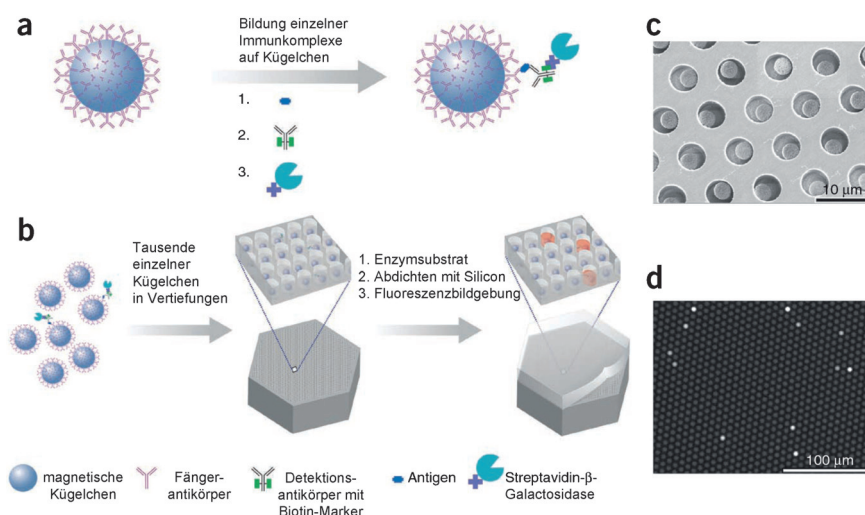
Ein wesentlicher Aspekt der in diesem Abschnitt beschriebenen Techniken ist ihre Eignung für digitale Assays,<sup>[42]</sup> da die Zählung der Vertiefungen mit Aktivität eine Quantifizierung ermöglicht. Zur Bestimmung der Konzentration aus einer digitalen Zählung muss die Poisson-Statistik angewendet werden.<sup>[34]</sup> Ist die Konzentration ausreichend gering, sodass lediglich die Beobachtung von 0 oder 1 Ereignis sehr wahrscheinlich ist, ist das Verhältnis zwischen dem Prozentanteil an „aktiven“ Vertiefungen und der Enzymkonzentration der gesamten Menge annähernd linear. Die Grenze dieser Technik, selbst bei einer Detektion von bis zu 24000



**Abbildung 4.** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Nullmoden-Wellenleiter von Bohn et al.<sup>[41]</sup> a) Draufsicht einer Anordnung von 11 × 11-Wellenleitern; vergrößerte Ansicht b) von neun Wellenleitern und c) eines einzelnen Nullmoden-Wellenleiters; d) Aufnahme eines Querschnitts eines einzelnen Nullmoden-Wellenleiters mit dem Rasterelektronenmikroskop; e) schematische Darstellung des spektroelektrochemischen Aufbaus eines einzelnen Wellenleiters, in dem Gold sowohl als Elektrode zur Oxidation und Reduktion von FMN als auch als optische Beschichtung dient, sodass nur oxidiertes FMN im unteren Bereich zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Wiedergabe aus Lit. [41] mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. Copyright 2015.

Einzelmolekülen im Fall der Arbeit von Rissin und Walt,<sup>[34]</sup> liegt für die Quantifizierung in der noch immer sehr kleinen Probengröße (ca. 1 nL). Das heißt, dass seltene Zielspezies, für die große Proben erforderlich sind, mit diesem Ansatz nicht detektiert werden können. Außerdem sollte angemerkt werden, dass dieses Untersuchungsformat das zu erforschende biologische System vor der Analyse kompartimentiert, was die Messung von Wechselwirkungen zwischen Molekülen in einer Probe verhindern könnte.





**Abbildung 5.** Digitaler ELISA von Rissin et al.: a) magnetische Kügelchen, die mit Antikörpern modifiziert sind, um den Analyten einzufangen sowie einen zweiten Antikörper zu binden, der mit einem Enzym markiert ist. b) Die Kügelchen fangen den Analyten ein und werden anschließend in fL-Lochplatten überführt, worauf das Enzymsubstrat zugegeben wird. Es wird nur in den Vertiefungen eine Farbe sichtbar, in denen sich ein Kügelchen mit dem abgefangenen Analyten befindet. c) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der fL-Vertiefungen, von denen einige ein Kügelchen enthalten. d) Fluoreszenzbild eines Abschnitts der Lochplatte, in dem die hellen Punkte Signale des Enzyms darstellen, das mit einem Kügelchen mit Analyt verbunden ist. Wiedergabe aus Lit. [14] mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd. Nature Biotechnology. Copyright 2010.

### 4.3. Fernfeld-Sampling/Nahfeld-Detektion

Rissin et al.<sup>[14]</sup> entwickelten die Idee massiver paralleler Nahfeld-Messungen weiter und nutzten das gleiche Prinzip für das Design eines digitalen Einzelmolekül-ELISA, mit dem große Probenmengen und daher niedrige Analytkonzentrationen analysiert werden können (Abbildung 5). Dies gelingt mithilfe von Antikörper-modifizierten magnetischen Kügelchen, die den Analyten in der Lösung einfangen und anschließend einen sekundären Antikörper mit einer Biotin-Markierung binden, an die ein Streptavidin-β-Galactosidase-Konjugat gebunden wird. Erst dann werden die magnetischen Nanopartikel in die Probenvertiefungen zur Einzelmolekül-Quantifizierung der Anzahl „aktiver“ Vertiefungen gegeben. Dementsprechend erfolgt die Einengung nur während der digitalen Ablesung. Dieses Assayformat wird hier als Fernfeld-Sampling/Nahfeld-Detektions-Messung bezeichnet. Die erzielten Detektionsgrenzen sind ausgezeichnet; für Biotin-Streptavidin betrugen sie 350 zM, was 10–20 Enzymmarkierungen in einer Probe von 100 µL entspricht.<sup>[14]</sup> Diese Technik wird als Einzelmolekül-Analyse oder SiMoA („Single Molecule Analysis“) bezeichnet und bildete die Grundlage für die Gründung der Firma Quanterix. Die Walt-Gruppe zeigte das Potential dieser Technik für verschiedene Assays, wie für den Krebs-Biomarker „prostataspezifisches Antigen“,<sup>[43]</sup> das Toxin Ricin,<sup>[44]</sup> Cytokine,<sup>[45]</sup> Dengue-Fieber<sup>[46]</sup> und genomische bakterielle DNA.<sup>[47]</sup> Die Vielfalt der unterschiedlichen Analyten belegt die allgemeine Anwendbarkeit dieser Methode, und in allen Fällen sind die Detektionsgrenzen im subfemtomolaren Bereich außerordentlich niedrig.

In Assayformaten mit Partikeln (Kügelchen) als Vermittler des Samplings sind sowohl die Anzahl der Kügelchen als auch die Anzahl der Biomoleküle pro Kügelchen entscheidend. Wie bereits erläutert, ist der biomolekulare Komplex auf der Einzelmolekülebene reversibel, und daher wird die Lebenszeit des Komplexes durch die Affinitätskonstante bestimmt. Bei Assays mit Partikeln wird jedoch wegen der Gegenwart vieler Antikörper auf dem Kügelchen (ca. 80000 im Fall von Rissin et al.<sup>[14]</sup>) das Gleichgewicht zum Komplex hin verschoben. Dies bedeutet, dass in einer Probe von 100 µL mit 200000 Kügelchen die Konzentration des eingefangenen Moleküls etwa 0.3 nM beträgt und ein hoher Prozentsatz der Zielspezies eingefangen werden wird (ca. 70 %). Die Verringerung der Antikörperkonzentration auf den Kügelchen reduziert die Einfangeffizienz. Zudem muss in dem digitalen ELISA-Assay von Rissin et al.<sup>[14]</sup> die Anzahl der Kügelchen ausreichend groß sein, sodass genügend Kügelchen in den 50000 Vertiefungen eingefangen

werden, doch andererseits wird mit zu vielen Kügelchen das Verhältnis von Zielspezies zum Fängeragens verringert. Folglich würden möglicherweise viele Kügelchen, die ein Zielmolekül eingefangen haben, nicht in eine der Vertiefungen überführt werden und so analytische Informationen verloren gehen. Grund dafür ist, dass von den 200000 Kügelchen nur 20000–30000 erfasst werden.

Wesentlich für digitale Ableseverfahren ist die Kalibrierung. Die Kalibrierung stimmt die Reaktion eines Geräts auf die Menge oder Aktivität des Analyten in der Probe ab. Ein Problem bei der Kalibrierung ist die Verwendung von Standardlösungen, die selten Probenlösungen ähneln. Daher sind Analysemethoden ohne Kalibrierung vorteilhaft. Prinzipiell ist für Analysemethoden, die die Menge eines Stoffs zählen, wie bei der Gravimetrie (Bestimmung der Masse) oder Coulometrie<sup>[48]</sup> (Messung der elektrischen Ladung), keine Kalibrierung erforderlich. Parallele Einzelmolekül-Messungen mit digitaler Ablesung könnten möglicherweise ohne Kalibrierung erfolgen.

Es sind auch zahlreiche andere Strategien für Fernfeld-Sampling/Nahfeld-Messung bekannt, die andere Übertragungsmethoden einsetzen. Eine Strategie, die Fernfeld-Sampling/Nahfeld-Messung ermöglicht, jedoch die Kompartimentierung der Probe während der Erfassung und Messung vermeidet, nutzt die optischen Eigenschaften einzelner Nanopartikel, die auf einer Oberfläche immobilisiert sind. Es sind etliche neue Assayformate bekannt, die der Empfindlichkeit von Einzelmolekül-Messungen nahe kommen und sich für die massive parallele Ausführung und kontinuierliche Erfassung vieler einzelner Nanopartikel eignen können. Häufig werden plasmonische oberflächengebundene Nano-

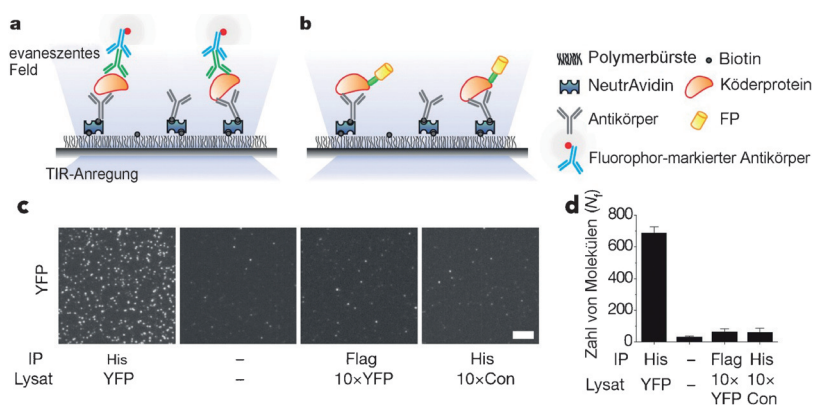
partikel verwendet. Beispielsweise entwickelten wir Anordnungen von plasmonischen Nanopartikeln auf Goldoberflächen für oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS), in der die SERS-Hotspots mithilfe thermoresponsiver Polymere reversibel für das Einfangen von Analyten geöffnet und für die Messung wieder geschlossen wurden.<sup>[49]</sup> Wie auch mit anderen SERS-Methoden gelang mithilfe dieser Technik der Nachweis von Einzelmolekülen, und durch Untersuchung einzelner Partikel konnten viele Einzelmolekül-Ereignisse detektiert werden. Mayer et al.<sup>[50]</sup> stellten einen Einzelmolekül-Immunassay vor, in dem ein Dunkelfeldmikroskop und Antikörper-modifizierte, oberflächengebundene Gold-Bipyramiden verwendet wurden. Die Antikörper fingen ein Zielprotein in Lösung ein, und die Dissoziation eines einzelnen Antikörpers von der Pyramidenoberfläche bewirkte eine wahrnehmbare Verschiebung der plasmonischen Merkmale der Nanopartikel. Auf ähnliche Weise entwickelten Sannomiya et al.<sup>[51]</sup> einen Einzelmolekül-DNA-Hybridisierungssassay unter Verwendung von DNA-modifizierten Gold-Nanopartikeln. Dabei wurde ein Marker für die optische Reaktion verwendet. Die DNA-Hybridisierung ermöglichte die Bindung eines zweiten, kleineren Gold-Nanopartikels an den Hauptpartikel und bewirkte so eine Änderung der plasmonischen Signatur des oberflächengebundenen Partikels. In diesem Beispiel wurden die Spektren von neun Nanopartikeln nacheinander aufgenommen, um Informationen zur DNA-Hybridisierung zu erhalten. Kürzlich wurde jedoch von Zijlstra et al.<sup>[52]</sup> und Ament et al.<sup>[53]</sup> über Einzelprotein-Bindung an Gold-Nanostäbchen ohne Marker berichtet. Keines dieser Beispiele wurde bisher jedoch in massiv paralleler Messweise durchgeführt. Indes zeigt eine nicht-biologische Anwendung der plasmonischen Bildgebung vieler einzelner Nanopartikel für das Verständnis der Elektrokatalyse das Potential fernfeldmikroskopischer Ansätze auf.<sup>[54]</sup>

Es wurden Ansätze mit plasmonischen Nanopartikeln auf Oberflächen entwickelt, die Fernfeld-Messungen ermöglichen. Käll et al.<sup>[55]</sup> beschrieben ein interessantes Beispiel für die Abbildung von Anordnungen biotinylierter Nanopartikel auf einer Oberfläche mithilfe eines Dunkelfeld-Kondensors, der einen durchstimmbaren, vor einer CCD-Kamera platzierten Flüssigkristallfilter nutzt, der den Spektralbereich mit Inkrementen von 1 nm scannt. Auf diese Weise kann durch Umschichten der Abbildungen das Spektrum für jeden Partikel verfolgt werden. Der Nutzen dieses Ansatzes wurde unter Verwendung von Meerrettichperoxidase-Streptavidin-Biokonjugaten belegt. Das Enzym bindet an die Nanopartikel, wobei die Enzymreaktion von einem einzelnen oder einigen wenigen Enzymen die Bildung eines Niederschlags auf den Nanopartikeln unter gleichzeitiger spektraler Verschiebung bewirkt. In einem weiteren Beispiel wurde auf Nanoporen zurückgegriffen. Der Grund für die Verwendung einzelner oder weniger Nanoporen besteht darin, dass bei Widerstandsmessungen mit zu vielen Poren

ein einziger Widerstandspuls den Widerstand nicht ausreichend verändert, um eine wahrnehmbare digitale Antwort zu erhalten. Im Wesentlichen bedeutet dies, dass die Einzelmolekül-Kapazität verloren geht, da eine große Menge an Poren ein analoges Signal wiedergibt. Wallace et al.<sup>[56]</sup> lösten dieses Problem kürzlich auf raffinierte Weise mit einer biomimetischen Strategie. Anstelle der Leitfähigkeit zur Erfassung des Ionenflusses durch die Nanoporen verwendeten sie den als Calciumsignal fungierenden Fluorophor Fluo-8. Analog zur Widerstandsmessung ist die Fluoreszenz aufgrund des Calciumflusses durch die Pore hoch, bis eine DNA-Sequenz durch die Pore tritt, woraufhin ein Abfall der Fluoreszenz beobachtet wird. Somit sind Translokationen durch die Poren durch lokalisierte Abnahmen der Fluoreszenzsignale gekennzeichnet. Oh et al.<sup>[57]</sup> zeigten, dass auch eine plasmonische Variante dieser Messung möglich ist, denn ihnen gelang die Messung von geringen Analytmengen infolge des Passierens durch Anordnungen plasmonischer Nanolöcher unter Verwendung der in Abschnitt 4.1 beschriebenen Dielektrophoresefallen, da der Abstand zwischen den Löchern größer ist als die Beugungsgrenze.

#### 4.4. Fernfeld-Messungen

Die am Ende des letzten Abschnitts beschriebenen Ansätze nähern sich vollständigen Fernfeld-Messungen. Die optische Mikroskopie ermöglicht Fernfeld-Messungen und wird häufig zur Detektion von Reaktionen auf Partikeloberflächen eingesetzt. Das Prinzip wird auch in Einzelmolekül-Pulldown-Assays zur Charakterisierung und Quantifizierung der Anzahl gleicher Proteinkomplexe in Zellen angewendet (Abbildung 6).<sup>[58]</sup> Dazu werden eine Antikörper-modifizierte Glasoberfläche als Einfangvermittler und Immunfluoreszenz sowie interne Totalreflexionsfluoreszenz (TIRF) zur Able-



**Abbildung 6.** Einzelmolekül-Pulldown-Assays, in denen eine Antikörper-modifizierte Oberfläche zum Einfangen eines Köderproteins verwendet wird, das entweder a) durch einen sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper sichtbar gemacht wird oder b) genetisch mit einem Fluoreszenzprotein (FP) fusioniert wurde. Die Visualisierung erfolgt mithilfe von TIRF-Mikroskopie, in der die eingefangenen Marker weiter auseinander liegen müssen als die Beugungsgrenze. c,d) TIRF-Aufnahmen und Quantifizierung für gelb fluoreszierendes Protein (YFP), das aus Zellen eingefangen wurde, die His<sub>6</sub>-YFP exprimieren, sowie negative Kontrolloberflächen (–), Marker (Flag) und Zellen (Con). Wiedergabe aus Lit. [58] mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd. Nature Biotechnology. Copyright 2011.

sung eingesetzt. Die zeitliche Trennung des Einfangens und der Messung begrenzt jedoch die Anwendungsbreite der Methode, da Bindungen über Minuten oder Stunden stabil sein müssten, was die Methode, wie in Abschnitt 2 beschrieben, aus kinetischer Sicht einschränkt. Lee et al.<sup>[59]</sup> modifizierten den Einzelmolekül-Coimmunpräzipitationsassay für Echtzeitmessungen, sodass Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Lebenszeiten von wenigen hundert Millisekunden in Zellrohextrakten beobachtet werden konnten. Gambin et al. kehrten das Format um und nutzten Fluoreszenzfluktuationen in einem konfokalen Detektionsvolumen, anstelle von Oberflächenimmobilisierung und TIRF-Mikroskopie, um die Stöchiometrie von Proteinkomplexen in lysierten Zellen zu analysieren.<sup>[60]</sup> Während mit diesen Methoden sogar transiente einzelne Bindungsereignisse nachgewiesen werden können, erfordern die Strategien normalerweise eine Zelltransfektion und niedrige Protein-Expressionsniveaus.

Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie [SMLM, auch photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (PALM),<sup>[61]</sup> (direkte) stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie ((d)STORM),<sup>[62]</sup> GSD-Mikroskopie (Entvölkerung des Grundzustands)]<sup>[63]</sup> könnte eine Methode der Wahl für die Fernfeld-Detektion werden. Bei dieser supraauflösenden Fluoreszenzmikroskopie wird eine zeitliche Trennung von Fluoreszenzereignissen zur Identifizierung von Einzelmolekülen in sehr dichten Proben und in einem Fernfeld-Format genutzt. Bisher wurde die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie hauptsächlich zur Bildgebung in der Zellbiologie verwendet.<sup>[64]</sup> Die Photoschaltung und -aktivierung der Fluorophore führt eine zeitliche Auflösungsgrenze ein, und die Zählung von Molekülen erfordert, selbst in festgelegten Proben, eine sorgfältige Kalibrierung.<sup>[65]</sup> Daher besteht die Hürde für eine Quantifizierung darin, Einzelmolekül-Ereignisse von Rauschen zu unterscheiden. Hinzu kommt, dass aus technischer Sicht die Detektionswahrscheinlichkeit des Signals berücksichtigt werden muss. Dieses Problem ist für die SMLM besonders akut, wo Photoaktivierung/-schaltung von Fluorophoren das Molekül vor der Aufnahme seines Signals zerstören kann. Eine neuere Studie schätzte die Detektionswahrscheinlichkeit von häufig verwendeten Fluoreszenzproteinen in der SMLM auf 50–70 %.<sup>[66]</sup> Allerdings ist die Identifizierung seltener Ereignisse in der Biologie ebenfalls problematisch. Beispielsweise wurde in einem rekombinanten System gezeigt, dass die Aktivierung der kleinen GTPase Ras durch den Austauschfaktor Son of Sevenless (SOS) ausschließlich durch seltene, jedoch langlebige Zustände hoher Aktivität angetrieben wird, die sehr wenig zur mittleren Katalysegeschwindigkeit beitragen.<sup>[67]</sup> In diesem Beispiel kann der Großteil der Austauschreaktion als Rauschen betrachtet werden. Somit ist die Zuverlässigkeit der Detektion problematisch, besonders bei einer Diagnose, bei der nach seltenen Ereignissen gesucht wird.

Eine interessante Nicht-Fluoreszenz-Methode zur Fernfeld-Messung entstammt der Charakterisierung von Dotierstoffen in Graphen über Raman-Spektroskopie.<sup>[68]</sup> Strano et al.<sup>[69]</sup> nutzten die Empfindlichkeit von Graphen gegen kleine Veränderungen bezüglich der Dotierstoffe zur bildlichen Darstellung lokalisierter Veränderungen der Dotierstoffmenge. Die Forscher nahmen dabei praktisch an, dass

eine Graphenschicht eine unabhängig ansprechbare Anordnung optischer Sensoren darstellt. Sie verwendeten die Methode zur Bildgebung des pH-Werts mit räumlicher Sub-20-nm-Auflösung sowie zur Demonstration der Messung lokalisierter pH-Veränderungen in einer Zelle auf der Graphenoberfläche als Maß für den Zellmetabolismus.

Zu diesem Zeitpunkt sind wir der Meinung, dass massiv parallele Nahfeld-Strategien gut zur Quantifizierung geeignet sind, während Fernfeld-Strategien in biologischen Experimenten erfolgreicher sind, in denen die Probe dem Assayformat zum Teil angepasst werden kann. Dennoch fand die Fernfeld-Mikroskopie auch Anwendung, um die Hybridisierungskinetik von DNA-Duplexen auf einer Oberfläche zu quantifizieren sowie um die tatsächlich an die Oberfläche bindenden, fluoreszenzmarkierten Zielstränge bis zu 1 pm zu zählen.<sup>[70]</sup> Die Bedingungen sind hier jedoch, dass die zeitliche Trennung der Zielsequenzen, die die Fluorophore enthalten, gewährleistet ist, eine Bindung an die Oberfläche erfolgt oder eine niedrige Dichte vorliegt, um eine spektrale Überlagerung zu vermeiden.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Der Übergang von Einzelmolekül-Detektoren zu Einzelmolekül-Sensoren für die quantitative Analyse befindet sich erst in einer frühen Phase. Die Entwicklung entsprechender Techniken ist für die Analytik und Biologie unverzichtbar. Aus analytischer Sicht bieten quantitative Einzelmolekül-Sensoren die ultimative Auflösung bis zum Einzelmolekül zusammen mit der Fähigkeit zur kalibrierungsfreien Zählung von Molekülen. Allerdings könnten – jenseits der Leistungsfähigkeit gegenwärtiger Sensorikstrategien – Einzelmolekül-Sensoren über die digitale Zählung von Molekülen hinausgehen und Einzelmolekül-Wechselwirkungsereignisse selbst parametrieren. Diese Fähigkeit zur Quantifizierung von Einzelmolekül-Wechselwirkungen führt uns zum dringenden Bedarf an quantitativen Einzelmolekül-Sensoren in der Biologie. Biologische Systeme sind durch Heterogenitäten in der Reaktions-/Wechselwirkungskinetik der gleichen Spezies wie auch der Reaktions-/Wechselwirkungspartner gekennzeichnet. Letztlich gibt es für das Verständnis biologischer Systeme keine Alternative zur Abbildung dieser Heterogenitäten, und nur Einzelmolekül-Sensoren können Heterogenitäten auf molekularer Ebene messen.

Für die Entwicklung quantitativer Einzelmolekül-Sensoren müssen im Wesentlichen zwei Hürden überwunden werden: Erstens muss ein ausreichend starkes Signal von einem Einzelmolekül erhalten werden. Diese Aufgabe wurde in den letzten 20 Jahren infolge der erstaunlichen Fortschritte bei Systemen zur Einzelmolekül-Detektion und -Verfolgung bewältigt. Ohne die Schwierigkeiten bei der Durchführung solcher Messungen trivialisieren zu wollen, kann die Einzelmolekül-Detektion dank dieses neuen Forschungsgebiets heutzutage nahezu als Routine betrachtet werden. Ein ausreichend starkes Signal wird überwiegend durch Einengung des Messvolumens auf den Nanobereich erhalten. Die zweite Hürde besteht in der Messung vieler Einzelmolekül-Ereignisse, um ausreichend Informationen für eine quantitative



Analyse zu erhalten. Die Reduzierung des Messraums auf sehr kleine Volumina bedeutet folglich, dass ein Massentransport von ausreichend vielen Einzelmolekülen in das Messvolumen innerhalb eines praktikablen Zeitrahmens gelingen muss.

Seit den ersten Einzelmolekül-Sensoren zur quantitativen Analyse vor etwas mehr als zehn Jahren wurden erstaunliche Fortschritte erzielt, und es ist nun der Punkt erreicht, dass Unternehmen Einzelmolekül-Sensoren für die quantitative Analyse entwickeln. In diesem Aufsatz wurden die veröffentlichten Ansätze für quantitative Einzelmolekül-Sensoren, die sich der Herausforderung des Massentransports stellen, in vier Gruppen unterteilt. Diese sind:

- 1) schnellere Überführung der Moleküle zum Messvolumen für schnelle Nahfeld-Messungen,
- 2) Konstruktion massiv paralleler Nahfeld-Messvolumina,
- 3) Sammeln der Einzelmoleküle aus dem Lösungsraum in Verbindung mit massiv parallelen Nahfeld-Messvolumina,
- 4) Durchführung von Fernfeld-Messungen auf Einzelmolekül-Ebene.

Die ersten drei dieser Ansätze etablieren sich gerade, wobei für jeden davon verschiedene Strategien entwickelt wurden. Beispielsweise wurde in Abschnitt 3 deutlich, dass die Idee der Einengung in kleinen Volumina oder auf zweidimensionalen Oberflächen und eindimensionalen Fasern breite Anwendung findet. Die andere Gemeinsamkeit der bisherigen Konzepte für die Einzelmolekül-Sensorik ist, dass sie mehrheitlich Endpunkt-Assays sind. Das heißt, die einzelnen Moleküle werden in die Messvolumina eingebracht, und anschließend erfolgt die Messung. Die Strategie der Natur, die Zeitskalen und anderen Bindungseigenschaften von Wechselwirkungen unterschiedlicher Moleküle mit einem gemeinsamen Rezeptor als Unterscheidungsmittel zu nutzen, muss dagegen erst noch auf Sensoren übertragen werden. In nur wenigen Fällen, wie bei einigen Nanoporen-Methoden,<sup>[24b]</sup> werden Wechselwirkungseigenschaften einzelner Spezies zur Identifizierung genutzt. Dies ist faktisch ein noch unerforschtes Gebiet für zukünftige Untersuchungen.

Der vierte Ansatz, bei dem Einzelmoleküle auf einer Oberfläche in einem Fernfeld-Format untersucht werden, ist ebenfalls kaum erforscht. Diese letzte Kategorie ähnelt einem traditionellen Sensor darin, dass viele Moleküle mit der Oberfläche wechselwirken und ein Signal erzeugen. Während Signale bei einem traditionellen Sensor jedoch einen Durchschnitt der Wechselwirkung vieler Moleküle mit einer Oberfläche darstellen, wird beim Einzelmolekül-Sensor ein Signal von jedem einzelnen Molekül erhalten. Die Gewinnung von Informationen von jedem einzelnen Molekül, während es mit einer Oberfläche wechselwirkt, ist ein offensichtlicher Weg zur Entwicklung von Einzelmolekül-Sensoren als Antwort auf die zweite Herausforderung der Natur: das Quantifizieren von Einzelmolekül-Wechselwirkungen und Erkennen von Heterogenitäten in Bindungseigenschaften und Bindungspartnern. Auf diese Weise könnten Einzelmolekül-Sensoren weit mehr als nur digitale Informationen liefern und dabei die gegenwärtige Denkweise im Bereich der Sensorik vollständig verändern. Diese besteht darin, die sensorischen Berüh-

rungsflächen hochspezifisch für die interessierende Zielspezies zu präparieren, da bei traditionellen Sensoren nur eine einzige Information erhalten wird. Zur Quantifizierung von Einzelmolekül-Wechselwirkungen muss diese Denkweise jedoch verändert werden: Es müssen sensorische Berührungsflächen hergestellt werden, die für eine Reihe von Spezies moderat selektiv sind. Eine Quantifizierung von Einzelmolekül-Wechselwirkungen hat enorme Vorteile, von der einfachen Unterscheidung spezifischer von nichtspezifischen Wechselwirkungen bis hin zur Entwicklung wichtiger Werkzeuge für das bessere Verständnis der Bedeutung von Einzelmolekül-Wechselwirkungen in der Biologie.

Die Quantifizierung von Einzelmolekül-Wechselwirkungen wird allerdings riesige Mengen an Daten erzeugen, die intrinsisch heterogen sind. Es muss daher überlegt werden, wie Heterogenitäten beschrieben und quantifiziert werden sollen. Die üblichen statistischen Hilfsmittel, wie Mittelwerte und Standardabweichungen, sind schlicht unzureichend. Dank neu entwickelter Methoden, wie Conditional-Density Resampled Estimate of Mutual Information (DREMI), kann die Stärke der zugrundeliegenden, komplexen Beziehungen zwischen Parametern unter den verrauschten Daten quantifiziert werden.<sup>[71]</sup>

Zu guter Letzt werden für die Bestätigung der Zuverlässigkeit von Einzelmolekül-Sensoren Testproben benötigt, die möglicherweise noch nicht vorhanden sind. Beispielsweise erfordert ein Gerät, das die absolute Zahl an Molekülen einer bestimmten Spezies in einer Probe angeben könnte, einen Standard mit einer bekannten Zahl an Molekülen. Trotz aller Hindernisse könnte die Zusammenarbeit von Analytikern und Biologen noch überraschende Entwicklungen hervorbringen und uns so den Eintritt in die Welt der Einzelmoleküle gewähren – für eine wirkliche „Bottom-up-Perspektive“ des Lebens selbst.

## Danksagung

Wir danken für die großzügige finanzielle Unterstützung durch das Australian Research Council Centre of Excellence in Convergent Bio-Nano Science and Technology (CE140100036; J.J.G.), das ARC Australian Laureate Fellowship (FL150100060; J.J.G.), das ARC Centre of Excellence in Advanced Molecular Imaging (CE140100011; K.G.) und das Senior Research Fellowship des National Health and Medical Research Council of Australia (APP1059278; K.G.).

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 11354–11366  
*Angew. Chem.* **2016**, 128, 11526–11539

- [1] T. Ha, *Nat. Methods* **2014**, 11, 1015–1018.
- [2] a) P. Holzmeister, G. P. Acuna, D. Grohmann, P. Tinnefeld, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 1014–1028; b) A. Ishijima, T. Yanagida, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, 26, 438–444.
- [3] H. Y. Chuang, M. Hofree, T. Ideker, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, 26, 721–744.
- [4] F. Ritort, *J. Phys. Condens. Matter* **2006**, 18, R531–R583.
- [5] K. Svoboda, C. F. Schmidt, B. J. Schnapp, S. M. Block, *Nature* **1993**, 365, 721–727.
- [6] E. L. Florin, V. T. Moy, H. E. Gaub, *Science* **1994**, 264, 415–417.

- [7] G. U. Lee, L. A. Chrisey, R. J. Colton, *Science* **1994**, 266, 771–773.
- [8] T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, T. Yanagida, *Nature* **1995**, 374, 555–559.
- [9] a) J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, D. W. Deamer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 13770–13773; b) L. Q. Gu, O. Braha, S. Conlan, S. Cheley, H. Bayley, *Nature* **1999**, 398, 686–690.
- [10] S. Dumont, W. Cheng, V. Serebrov, R. K. Beran, I. Tinoco, A. M. Pyle, C. Bustamante, *Nature* **2006**, 439, 105–108.
- [11] L. B. Kong, L. Harrington, Q. H. Li, S. Cheley, B. G. Davis, H. Bayley, *Nat. Chem.* **2013**, 5, 651–659.
- [12] B. P. English, W. Min, A. M. van Oijen, K. T. Lee, G. B. Luo, H. Y. Sun, B. J. Cherayil, S. C. Kou, X. S. Xie, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 87–94.
- [13] a) B. Q. Xu, N. J. J. Tao, *Science* **2003**, 301, 1221–1223; b) N. Darwish, I. Diez-Perez, P. Da Silva, N. J. Tao, J. J. Gooding, M. N. Paddon-Row, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 3203–3206; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 3257–3260.
- [14] D. M. Rissin, C. W. Kan, T. G. Campbell, S. C. Howes, D. R. Fournier, L. Song, T. Piech, P. P. Patel, L. Chang, A. J. Rivnak, E. P. Ferrell, J. D. Randall, G. K. Provuncher, D. R. Walt, D. C. Duffy, *Nat. Biotechnol.* **2010**, 28, 595–599.
- [15] S. Howorka, S. Cheley, H. Bayley, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 636–639.
- [16] J. J. Gooding, *Small* **2006**, 2, 313–315.
- [17] J. Foote, H. N. Eisen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 1254–1256.
- [18] D. J. Irvine, M. A. Purbhoo, M. Krogsgaard, M. M. Davis, *Nature* **2002**, 419, 845–849.
- [19] a) A. K. Chakraborty, A. Weiss, *Nat. Immunol.* **2014**, 15, 798–807; b) M. Aleksic, O. Dushek, H. Zhang, E. Shenderov, J.-L. Chen, V. Cerundolo, D. Coombs, P. A. van der Merwe, *Immunity* **2010**, 32, 163–174; c) C. S. Guy, K. M. Vignali, J. Temirov, M. L. Bettini, A. E. Overacre, M. Smeltzer, H. Zhang, J. B. Huppa, Y. H. Tsai, C. Lobry, J. M. Xie, P. J. Dempsey, H. C. Crawford, I. Aifantis, M. M. Davis, D. A. A. Vignali, *Nat. Immunol.* **2013**, 14, 262–270.
- [20] J. B. Huppa, M. Axmann, M. A. Moertelmaier, B. F. Lillemeier, E. W. Newell, M. Brameshuber, L. O. Klein, G. J. Schuetz, M. M. Davis, *Nature* **2010**, 463, 963–U143.
- [21] B. F. Lillemeier, M. A. Moertelmaier, M. B. Forstner, J. B. Huppa, J. T. Groves, M. M. Davis, *Nat. Immunol.* **2010**, 11, 90–U106.
- [22] S. Valitutti, S. Muller, M. Cella, E. Padovan, A. Lanzavecchia, *Nature* **1995**, 375, 148–151.
- [23] T. Rolland, M. Tasan, B. Charlotteaux, S. J. Pevzner, Q. Zhong, N. Sahni, S. Yi, I. Lemmens, C. Fontanillo, R. Mosca, A. Kamburov, S. D. Ghiassian, X. Yang, L. Ghamsari, D. Balcha, B. E. Begg, P. Braun, M. Brehme, M. P. Broly, A.-R. Carvunis, D. Convery-Zupan, R. Corominas, J. Coulombe-Huntington, E. Dann, M. Dreze, A. Dricot, C. Fan, E. Franzosa, F. Gebreab, B. J. Gutierrez, M. F. Hardy, M. Jin, S. Kang, R. Kiros, G. N. Lin, K. Luck, A. MacWilliams, J. Menche, R. R. Murray, A. Palagi, M. M. Poulin, X. Rambout, J. Rasla, P. Reichert, V. Romero, E. Ruyssinck, J. M. Sahalie, A. Scholz, A. A. Shah, A. Sharma, Y. Shen, K. Spirohn, S. Tam, A. O. Tejada, S. A. Trigg, J.-C. Twizere, K. Vega, J. Walsh, M. E. Cusick, Y. Xia, A.-L. Barabasi, L. M. Iakoucheva, P. Aloy, J. De Las Rivas, J. Tavernier, M. A. Calderwood, D. E. Hill, T. Hao, F. P. Roth, M. Vidal, *Cell* **2014**, 159, 1212–1226.
- [24] a) O. Braha, B. Walker, S. Cheley, J. J. Kasianowicz, L. Z. Song, J. E. Gouaux, H. Bayley, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 497–505; b) O. Braha, L. Q. Gu, L. Zhou, X. F. Lu, S. Cheley, H. Bayley, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 1005–1007.
- [25] H. Bayley, P. S. Cremer, *Nature* **2001**, 413, 226–230.
- [26] J. K. Rosenstein, M. Wanunu, C. A. Merchant, M. Drndic, K. L. Shepard, *Nat. Methods* **2012**, 9, 487–492.
- [27] a) J. Schmidt, *J. Mater. Chem.* **2005**, 15, 831–840; b) B. N. Miles, A. P. Ivanov, K. A. Wilson, F. Dogan, D. Japrun, J. B. Edel, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 15–28; c) R. E. Gyurcsányi, *TrAC-Trends Anal. Chem.* **2008**, 27, 627–639.
- [28] L. Q. Gu, J. W. Shim, *Analyst* **2010**, 135, 441–451.
- [29] L. Höfler, R. E. Gyurcsányi, *Anal. Chim. Acta* **2012**, 722, 119–126.
- [30] K. J. Freedman, L. M. Otto, A. P. Ivanov, A. Barik, S. H. Oh, J. B. Edel, *Nat. Commun.* **2016**, 7, 10217.
- [31] M. Wanunu, W. Morrison, Y. Rabin, A. Y. Grosberg, A. Meller, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, 5, 160–165.
- [32] a) M. A. Booth, R. Vogel, J. M. Curran, S. Harbison, J. Travas-Sejdic, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 45, 136–140; b) T. Li, L. Liu, Y. R. Li, J. N. Xie, H. C. Wu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 7568–7571; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 7678–7681.
- [33] a) T. A. Dickinson, J. White, J. S. Kauer, D. R. Walt, *Nature* **1996**, 382, 697–700; b) K. L. Michael, L. C. Taylor, S. L. Schultz, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 1242–1248.
- [34] D. M. Rissin, D. R. Walt, *Nano Lett.* **2006**, 6, 520–523.
- [35] D. Witters, K. Knez, F. Ceyssens, R. Puers, J. Lammertyn, *Lab Chip* **2013**, 13, 2047–2054.
- [36] M. Kühnemund, D. Witters, M. Nilsson, J. Lammertyn, *Lab Chip* **2014**, 14, 2983–2992.
- [37] W. Du, L. Li, K. P. Nichols, R. F. Ismagilov, *Lab Chip* **2009**, 9, 2286–2292.
- [38] a) F. Shen, E. K. Davydova, W. Du, J. E. Kreutz, O. Piepenburg, R. F. Ismagilov, *Anal. Chem.* **2011**, 83, 3533–3540; b) D. A. Selck, M. A. Karymov, B. Sun, R. F. Ismagilov, *Anal. Chem.* **2013**, 85, 11129–11136.
- [39] R. B. Liebherr, H. H. Gorris, *Molecules* **2014**, 19, 14417–14445.
- [40] T. Miyake, T. Tani, H. Sonobe, R. Akahori, N. Shimamoto, T. Ueno, T. Funatsu, I. Ohdomari, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 6018–6022.
- [41] L. P. Zaino, D. A. Grismer, D. Han, G. M. Crouch, P. W. Bohn, *Faraday Discuss.* **2015**, 184, 101–115.
- [42] D. Witters, B. Sun, S. Begolo, J. Rodriguez-Manzano, W. Robles, R. F. Ismagilov, *Lab Chip* **2014**, 14, 3225–3232.
- [43] S. M. Schubert, L. M. Arendt, W. H. Zhou, S. Baig, S. R. Walter, R. J. Buchsbaum, C. Kuperwasser, D. R. Walt, *Sci. Rep.* **2015**, 5, 11034.
- [44] S. T. Gaylord, T. L. Dinh, E. R. Goldman, G. P. Anderson, K. C. Ngan, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2015**, 87, 6570–6577.
- [45] D. L. Wu, M. D. Milutinovic, D. R. Walt, *Analyst* **2015**, 140, 6277–6282.
- [46] S. T. Gaylord, S. Abdul-Aziz, D. R. Walt, *J. Clin. Microbiol.* **2015**, 53, 1722–1724.
- [47] L. A. Song, D. D. Shan, M. W. Zhao, B. A. Pink, K. A. Minnehan, L. York, M. Gardel, S. Sullivan, A. F. Phillips, R. B. Hayman, D. R. Walt, D. C. Duffy, *Anal. Chem.* **2013**, 85, 1932–1939.
- [48] E. Grygoliowicz-Pawlak, E. Bakker, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 4537–4542.
- [49] Y. Zheng, A. H. Soeriyadi, L. Rosa, S. H. Ng, U. Bach, J. J. Gooding, *Nat. Commun.* **2015**, 6, 8797.
- [50] K. M. Mayer, F. Hao, S. Lee, P. Nordlander, H. H. Hafner, *Nanotechnology* **2010**, 21, 255503.
- [51] T. Sannomiya, C. Hafner, J. Voros, *Nano Lett.* **2008**, 8, 3450–3455.
- [52] P. Zijlstra, P. M. R. Paulo, M. Orrit, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, 7, 379–382.
- [53] I. Ament, J. Prasad, A. Henkel, S. Schmachtel, C. Soennichsen, *Nano Lett.* **2012**, 12, 1092–1095.
- [54] X. N. Shan, I. Diez-Perez, L. J. Wang, P. Wiktor, Y. Gu, L. H. Zhang, W. Wang, J. Lu, S. P. Wang, Q. H. Gong, J. H. Li, N. J. Tao, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, 7, 668–672.

- [55] S. Chen, M. Svedendahl, R. P. Van Duyne, M. Käll, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 1826–1830.
- [56] S. Huang, M. Romero-Ruiz, O. K. Castell, H. Bayley, M. I. Wallace, *Nat. Nanotechnol.* **2015**, *10*, 986–U996.
- [57] A. Barik, L. M. Otto, D. Yoo, J. Jose, T. W. Johnson, S. H. Oh, *Nano Lett.* **2014**, *14*, 2006–2012.
- [58] A. Jain, R. J. Liu, B. Ramani, E. Arauz, Y. Ishitsuka, K. Rangunathan, J. Park, J. Chen, Y. K. Xiang, T. Ha, *Nature* **2011**, *473*, 484–488.
- [59] H. W. Lee, T. Kyung, J. Yoo, T. Kim, C. Chung, J. Y. Ryu, H. Lee, K. Park, S. Lee, W. D. Jones, D. S. Lim, C. Hyeon, W. D. Heo, T. Y. Yoon, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1505.
- [60] Y. Gambin, N. Ariotti, K. A. McMahon, M. Bastiani, E. Sieracki, O. Kovtun, M. E. Polinkovsky, A. Magenau, W. Jung, S. Okano, Y. Zhou, N. Leneva, S. Mureev, W. Johnston, K. Gaus, J. F. Hancock, B. M. Collins, K. Alexandrov, R. G. Parton, *eLife* **2014**, *3*, e01434.
- [61] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642–1645.
- [62] a) M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–795; b) S. van de Linde, A. Loschberger, T. Klein, M. Heidebreder, S. Wolter, M. Heilemann, M. Sauer, *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 991–1009.
- [63] J. Fölling, M. Bossi, H. Bock, R. Medda, C. A. Wurm, B. Hein, S. Jakobs, C. Eggeling, S. W. Hell, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 943–945.
- [64] a) B. F. Lillemeier, M. A. Mortelmaier, M. B. Forstner, J. B. Huppa, J. T. Groves, M. M. Davis, *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 90–96; b) J. Rossy, D. M. Owen, D. J. Williamson, Z. Yang, K. Gaus, *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 82–89; c) D. J. Williamson, D. M. Owen, J. Rossy, A. Magenau, M. Wehrmann, J. J. Gooding, K. Gaus, *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 655–662; d) V. Récamier, I. Izeddin, L. Bosanac, M. Dahan, F. Proux, X. Darzacq, *Nucleus* **2014**, *5*, 75–84.
- [65] N. Ehmann, S. van de Linde, A. Alon, D. Ljaschenko, X. Z. Keung, T. Holm, A. Rings, A. DiAntonio, S. Hallermann, U. Ashery, M. Heckmann, M. Sauer, R. J. Kittel, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4650.
- [66] N. Durisic, L. Laparra-Cuervo, Á. Sandoval-Álvarez, J. S. Borbely, M. Lakadamyali, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 156–162.
- [67] L. Iversen, H. L. Tu, W. C. Lin, S. M. Christensen, S. M. Abel, J. Iwig, H. J. Wu, J. Gureasko, C. Rhodes, R. S. Petit, S. D. Hansen, P. Thill, C. H. Yu, D. Stamou, A. K. Chakraborty, J. Kuriyan, J. T. Groves, *Science* **2014**, *345*, 50–54.
- [68] A. Das, S. Pisana, B. Chakraborty, S. Piscanec, S. K. Saha, U. V. Waghmare, K. S. Novoselov, H. R. Krishnamurthy, A. K. Geim, A. C. Ferrari, A. K. Sood, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 210–215.
- [69] G. L. C. Paulus, J. T. Nelson, K. Y. Lee, Q. H. Wang, N. F. Reuel, B. R. Grassbaugh, S. Kruss, M. P. Landry, J. W. Kang, E. V. Ende, J. Q. Zhang, B. Mu, R. R. Dasari, C. F. Opel, K. D. Wittrup, M. S. Strano, *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 6865.
- [70] a) E. M. Peterson, M. W. Manhart, J. M. Harris, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 1345–1354; b) E. M. Peterson, J. M. Harris, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 189–196.
- [71] S. Krishnaswamy, M. H. Spitzer, M. Mingueneau, S. C. Bendall, O. Litvin, E. Stone, D. Pe’Er, G. P. Nolan, *Science* **2014**, *346*, 1079.

Eingegangen am 16. Januar 2016,  
veränderte Fassung am 17. April 2016  
Online veröffentlicht am 22. Juli 2016  
Übersetzt von Dr. Ines Sprung, Edinburgh