

einstimmung der Ergebnisse aus konventionellen Versuchen und aus dem Hochdurchsatzverfahren bewiesen. Verschiedene neue, mit sichtbarem Licht aktive Photokatalysatoren auf der Basis von dotiertem TiO_2 , SnO_2 und WO_3 wurden entdeckt. In ausgedehnten Versuchen wurde die Aktivität in konventionellen Versuchen bestätigt. Wie die vorliegende Studie zeigt, können Katalysatoren, die bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht aktiv sind, durch den pragmatischen Einsatz von Hochdurchsatzverfahren entdeckt werden.

Die Effizienz eines Photokatalysators ist nicht nur von seinen intrinsischen elektronischen Eigenschaften abhängig. Physikochemische Eigenschaften wie die spezifische Oberfläche, die Geschwindigkeit der Adsorption von Schadstoffen und Sauerstoff, die Konzentration der Oberflächen-Hydroxygruppen, die Geschwindigkeit der Rekombination der Elektronen-Loch-Paare, die Kristallinität etc. sind ebenfalls von großer Bedeutung. Die Komplexität des Ursprungs effektiver photokatalytischer Aktivität in Verbindung mit unseren mangelnden Kenntnissen über die vielschichtigen Auswirkungen von Dotierungen in Oxiden unterstreicht die Schwierigkeit bei der Vorhersage der Zusammensetzung der aktivsten Katalysatoren. Der Erfolg dieser einfachen Studie macht deutlich, dass es vermutlich viele weitere photokatalytisch aktive Materialien gibt, nur existierte in der Vergangenheit keine effektive Strategie, um sie aufzufinden.

Eingegangen am 22. Februar 2001 [Z16667]

- [1] A. Mills, S. Le Hunte, *J. Photochem. Photobiol. A* **1997**, *108*, 1–35.
- [2] D. Bahnemann in *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2, Part L* (Hrsg.: P. Boule), Springer, Berlin, **1999**, S. 285–351.
- [3] L. Zang, W. Macyk, C. Lange, W. F. Maier, C. Antonius, D. Meissner, H. Kisch, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 379–384.
- [4] B. Jandeleit, D. J. Schaefer, T. S. Powers, H. W. Turner, W. H. Weinberg, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2648–2689; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2494–2532.
- [5] R. Reisfeld, M. Zayat, H. Minti, A. Zastrow, *Sol. Energy Mater.* **1998**, *54*, 109–120.
- [6] H. Kisch, L. Zang, C. Lange, W. F. Maier, C. Antonius, D. Meissner, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3201–3203; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3034–3036.
- [7] L. Zang, C. Lange, I. Abraham, S. Storck, W. F. Maier, H. Kisch, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 10765–10771.
- [8] H. Yamashita, Y. Ichihashi, M. Takeuchi, S. Kishiguchi, M. Anpo, *J. Synchrotron Rad.* **1999**, *6*, 451–452.
- [9] M. Iwasaki, M. Hara, H. Kawada, H. Tada, S. Ito, *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *224*, 202–204.
- [10] H. Tada, A. Hattori, Y. Tokihisa, K. Imai, N. Tohge, S. Ito, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 4585–4587.
- [11] A. Scalfani, L. Palmisano, G. Marci, A. M. Venezia, *Sol. Energy Mater.* **1998**, *51*, 203–219.
- [12] C. Lettmann, K. Hildenbrand, H. Kisch, W. Macyk, W. F. Maier, *Appl. Catal. B*, im Druck.

Hapten-funktionalisierte DNA-Streptavidin-Nanoringe als supramolekulare Reagentien für einen kompetitiven Immuno-PCR-Nachweis**

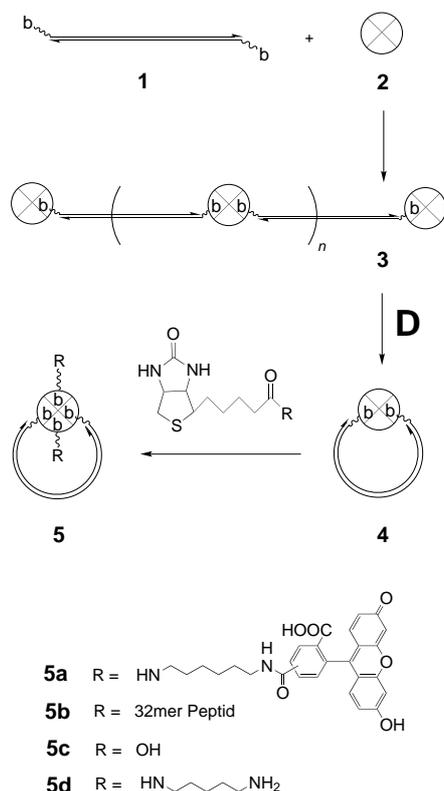
Christof M. Niemeyer,* Ron Wacker und Michael Adler

Der selbstorganisierte Aufbau von Struktur- und Funktionselementen aus kleinen Bausteinen ist ein wichtiges Ziel der molekularen Nanotechnologie.^[1] DNA ist in dieser Hinsicht ein viel versprechender Werkstoff und wurde bereits eingesetzt, um Nanometer-dimensionierte Gerüstmoleküle und Oberflächen-Architekturen aufzubauen,^[2] Proteine^[3] oder Nanocluster^[4] selektiv zu positionieren oder mechanische Funktionseinheiten zu konstruieren.^[2] Wir haben kürzlich über nanostrukturierte, oligomere Konjugate **3** berichtet, die durch Selbstorganisation aus bisbiotinylierter DNA **1** und dem Biotin-Bindungsprotein Streptavidin (STV) **2** entstehen (Schema 1). Die Oligomere **3**, in denen Streptavidin trotz seiner vier Bindungsstellen für Biotin hauptsächlich als zwei- und dreiwertiges Bindeglied zwischen Doppelstrang-DNA(dsDNA)-Fragmenten vorliegt, lassen sich wegen ihrer verbleibenden Biotin-Bindungsplätze als Reagentien in der Immuno-PCR (IPCR; PCR = Polymerasekettenreaktion) einsetzen,^[5] einer hochsensitiven Spurenanalyse für Proteine und andere Antigene.^[6] Aus den Oligomeren **3** lassen sich durch thermische Behandlung wohldefinierte supramolekulare Nanoringe **4** herstellen, die noch zwei freie Biotin-Bindungsstellen aufweisen.^[7] Wir berichten hier über die Funktionalisierung von **4** mit biotinylierten Haptenen und über den Einsatz der Konjugate **5** als Reagentien in einem neuartigen kompetitiven Immuno-PCR(cIPCR)-Nachweis für die ultrasensitive Detektion niedermolekularer Substanzen.

Zum spezifischen Nachweis niedermolekularer Analyte, wie Hormone, Toxine, Pestizide und andere Wirkstoffe, werden neben Methoden die auf Chromatographie, Massenspektrometrie und Biosensoren beruhen, insbesondere Antikörper-basierte Techniken wie der Radioimmunoassay (RIA) oder der competition enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) eingesetzt.^[8] Ein kompetitiver Nachweis ist erforderlich, da niedermolekulare Analyte aus sterischen Gründen nur an einen einzelnen Antikörper binden. So wird im cELISA ein Konjugat aus dem nachzuweisenden Hapten und einem signalerzeugenden Enzym verwendet, das mit dem Analyten um Bindungsstellen auf einer Oberfläche konkurriert.^[8d] Vor dem Hintergrund unserer Erfahrungen zur ultrasensitiven Proteindetektion mittels IPCR^[5] wollten wir prüfen, ob diese auf der PCR-Vervielfältigung einer Marker-

[*] Priv.-Doz. Dr. C. M. Niemeyer, Dipl.-Biol. R. Wacker, Dr. M. Adler
Universität Bremen, FB2-UFT
Biotechnologie und Molekulare Genetik
Leobener Straße, 28359 Bremen (Deutschland)
Fax: (+49)421-218-7578
E-mail: cmn@uni-bremen.de

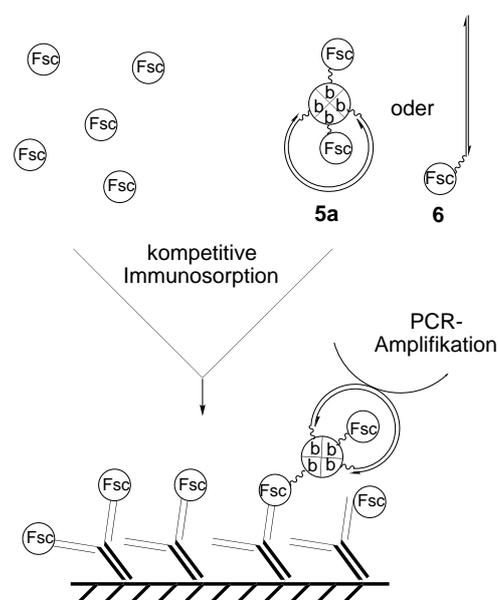
[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Dr. Lifeng Chi und Song Gao für die kraftmikroskopischen Analysen sowie Prof. Dietmar Blohm für zahlreiche Diskussionen und seine großzügige Unterstützung.



Scheme 1. Synthese der Hapten-funktionalisierten DNA-STV-Nanoringe **5** aus einem 5',5'-bisbiotinylierten 169-Basenpaar(bp)-dsDNA-Fragment (b = Biotinyl) und STV **2**. Die zunächst entstehenden oligomeren Konjugate **3** werden durch Erhitzen in die Nanoringe **4** überführt, und die Rohprodukte werden mit biotinyliertem Fluorescein (Calbiochem) (**5a**), biotinyliertem 32mer Peptid β -Endorphin (EGKKYANKIIANKFLWVLPWQSKESWMFGGYK-Biotin, Sigma) (**5b**), D-Biotin (**5c**) oder Amino-biotin^[15] (**5d**) im Überschuss versetzt und elektrophoretisch gereinigt. Komplementäre DNA-Stränge sind als parallele Linien dargestellt, deren 3'-Enden durch Pfeilspitzen markiert sind.

DNA beruhende Methode auch auf den kompetitiven Nachweis niedermolekularer Verbindungen übertragbar ist (Schema 2). In einer solchen kompetitiven Immuno-PCR (cIPCR) kann als signalerzeugendes Konjugat beispielsweise ein Hapten-funktionalisiertes dsDNA-Fragment **6** verwendet werden, das durch chemische Oligonucleotidsynthese und präparative PCR zugänglich ist. Trotz der Leistungsfähigkeit der DNA-Festphasensynthese wäre dieses Vorgehen aufwändig, da z. B. stets die entsprechenden Hapten-Phosphoramidit-Vorstufen synthetisiert werden müssten. Dagegen ist die Kupplung eines Biotinylsubstituenten an ein Haptengerüst vergleichsweise einfach.^[9] Deshalb erschien es uns attraktiv, Hapten-DNA-Konjugate modular über die hochspezifische Biotin-STV-Bindung aufzubauen. Wegen ihrer einfachen Zugänglichkeit und definierten Stöchiometrie und Struktur wählten wir die DNA-STV-Nanoringe **4** als Basis für ein supramolekulares Konjugatsystem.

Zur experimentellen Überprüfung unseres Ansatzes wurde zunächst der mit dem Modellhapten Fluorescein (Fsc) funktionalisierte Nanoring **5a** hergestellt. Hierzu wurden analog dem beschriebenen Verfahren^[7] aus einem 5',5'-bisbiotinylierten 169bp-dsDNA-Fragment und STV die Oligomere **3**



Schema 2. Nachweis niedermolekularer Verbindungen durch einen kompetitiven Immuno-PCR (cIPCR)-Assay, gezeigt am Beispiel des Modell-Haptens Fluorescein (Fsc). Die immunosorptive Bindung des signalerzeugenden Hapten-DNA-Konjugates an eine Antikörper-modifizierte Oberfläche wird durch den nachzuweisenden freien Analyten unterdrückt. Als DNA-Hapten-Konjugat wurden kovalent Fsc-funktionalisierte dsDNA **6** oder Hapten-funktionalisierte Nanoringe **5a** verwendet. Das nach Bindung und Waschen an der Oberfläche verbleibende DNA-Hapten-Konjugat wird nach PCR-Vervielfältigung detektiert.

aufgebaut und thermisch denaturiert. Das Rohprodukt wurde mit einem Überschuss an biotinyliertem Fluorescein versetzt und **5a** anschließend elektrophoretisch gereinigt. Die intakte Ringstruktur von Hapten-funktionalisiertem **5** ließ sich anhand der charakteristischen elektrophoretischen Mobilität nachweisen, die sich nicht von der von **4** unterscheidet. Die Anwesenheit der Fluoresceingruppe in **5a** wurde durch Antikörper-induzierten Gelshift nachgewiesen. Da die Hapten-funktionalisierten Nanoringe als lagerfähige Reagentien in der cIPCR verwendet werden sollten, wurde zunächst die thermische Stabilität von **5a** untersucht, indem Proben des gereinigten Nanorings 90 Sekunden auf verschiedene Temperaturen erhitzt und anschließend elektrophoretisch untersucht wurden (Abbildung 1). Die densitometrisch bestimmte Reinheit von isoliertem **5a** betrug ca. 93% (Position c in Abbildung 1). Das kurze Erhitzen des Nanorings führte zur temperaturabhängigen Bildung von Zersetzungsprodukten, die elektrophoretisch als freie DNA (Position a), als Einzelstrang-haltiges STV-Konjugat (Position b), als geöffneten dsDNA-STV-Nanoring (Position d) sowie als (dsDNA)₂-STV-Konjugat (Position e) identifiziert wurden. Zur Unterscheidung des geschlossenen und geöffneten Nanorings, die nahezu gleiche elektrophoretische Mobilitäten aufweisen (Positionen c bzw. d in Abbildung 1), wurde zu einem Aliquot des Denaturierungsproduktes STV im Überschuss gegeben, um den geöffneten Ring abzutrennen und die Bandenintensität des verbleibenden, intakten Nanorings zu quantifizieren. Mit steigender Temperatur nimmt der Anteil an Zersetzungsprodukten zu, wobei eine besonders charakteristische Änderung der Produktverteilung im Bereich zwischen 75

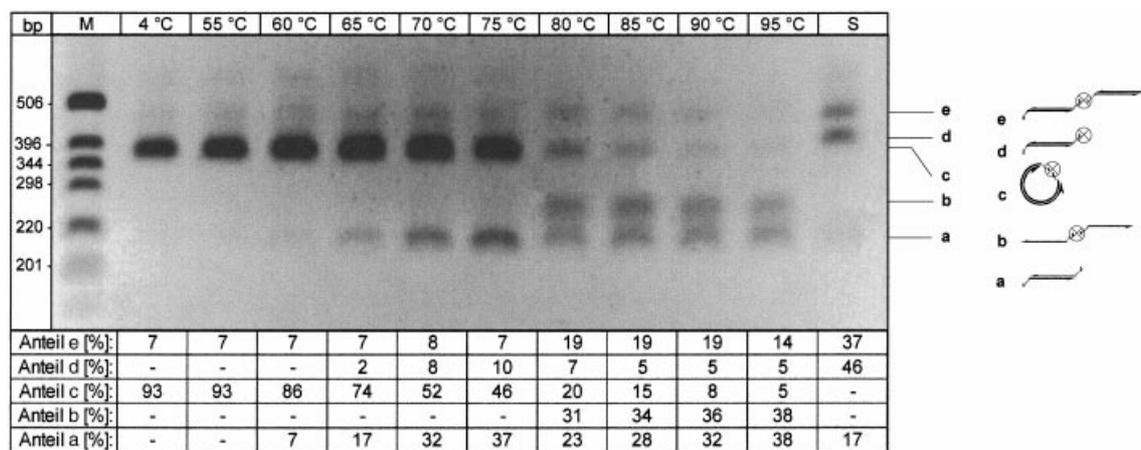


Abbildung 1. Thermische Stabilität des Fluorescein-funktionalisierten Nanorings **5a**. Gezeigt ist ein nichtdenaturierendes 1,5%-Agarose-Gel nach Ethidiumbromid-Färbung. Proben von gereinigtem **5a** wurden kurz auf die über den Gelspuren angegebenen Temperaturen erhitzt. Die durch densitometrische Analyse der Bandenintensitäten bestimmte, prozentuale Produktverteilung ist unter den Spuren angegeben. Die Produkte in den Positionen a–e wurden über den Vergleich der elektrophoretischen Mobilität mit Standards, wie den in Spur S aufgetragenen Konjugaten aus STV und monobiotinylierter dsDNA, zugeordnet. Spur M enthält einen DNA-Molekulargewichtsmarker, die Länge ist in Basenpaaren (bp) angegeben.

und 80 °C zu beobachten ist. So wird ab 80 °C eine annähernd konstante Menge des Einzelstrang-haltigen Konjugates gebildet.^[10] Die Erwärmung auf Temperaturen oberhalb 90 °C führt zur nahezu vollständigen Zersetzung des Nanorings **5a**.

Analoge Untersuchungen wurden mit den Nanoringen **5b–d** durchgeführt. Ausgehend von den densitometrisch bestimmten Produktverteilungen wurden Zersetzungskurven erstellt, in denen der verbleibende Anteil an intaktem Nanoring **5** gegen die Temperatur aufgetragen ist (Abbildung 2). Zum Vergleich der relativen Stabilitäten von **5a–d**

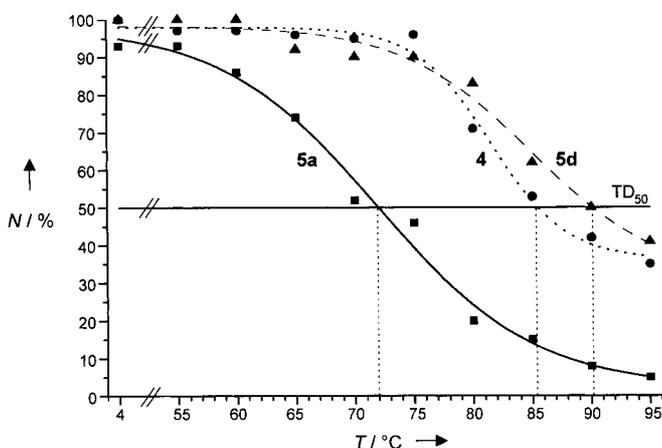


Abbildung 2. Thermische Stabilität der Nanoringe **4** und **5**. Aus den densitometrisch bestimmten Produktverteilungen der Abbildung 1 wurde der verbleibende prozentuale Anteil (*N*) an intaktem Nanoring **4** bzw. **5** gegen die Temperatur aufgetragen. Die durch Extrapolation bestimmte Temperatur, bei der noch 50% der Nanoringe intakt sind (TD_{50} -Wert), beträgt für **4** 85 ± 3 °C. Die TD_{50} -Werte der Hapten-funktionalisierten Nanoringe **5a–d** betragen 73 ± 3 , 77 ± 3 , 80 ± 3 bzw. 90 ± 3 °C.

wurde die Temperatur, bei der noch 50% der Nanoringe intakt sind (TD_{50} -Wert), durch Extrapolation bestimmt. Die in der Legende zu Abbildung 2 aufgelisteten TD_{50} -Werte zeigen, dass die thermische Stabilität von **5a–d** kontinuierlich abnimmt. Hierbei lässt sich abschätzen, dass der Fluorescein-

modifizierte Nanoring **5a** ca. 100 J mol^{-1} weniger stabil und der Aminobiotin-modifizierte Nanoring **5d** ca. 40 J mol^{-1} stabiler ist als nichtmodifiziertes **4**. Die Funktionalisierung mit dem biotinylierten 32mer-Neuropeptid β -Endorphin^[11] in **5b** und die Anknüpfung von D-Biotin in **5c** führen zu einer Destabilisierung von $40\text{--}50 \text{ J mol}^{-1}$ gegenüber **4**. Die beobachtete Destabilisierung von **5a** durch biotinyliertes Fluorescein und die leichte Stabilisierung von **5d** durch Aminobiotin könnten auf Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Fluorescein-Einheiten in **5a** bzw. den positiv geladenen Aminogruppen in **5d** und dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der dsDNA zurückzuführen sein.^[12]

Um die Aktivität der Hapten-modifizierten Nanoringe **5** in einem modellhaften cIPCR-Assay zu demonstrieren, wurden Proben einer konstanten Menge an **5a** mit zunehmenden Mengen an freiem Fluorescein versetzt. Diese Mischungen wurden zur Immunosorption in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben, die zuvor mit einem gegen Fluorescein gerichteten Antikörper beschichtet worden waren (siehe Schema 2). Im Anschluss an die Inkubation wurde die Mikrotiterplatte gewaschen, die immunosorptiv gebundene dsDNA durch PCR vervielfältigt und die PCR-Amplifikate quantifiziert.^[13] Zum Vergleich wurde ein analoger Ansatz mit dem DNA-Konjugat **6** durchgeführt, das eine kovalent gebundene Fluoresceingruppe enthält. Der in Abbildung 3 dargestellte Verlauf der Signalintensitäten des cIPCR-Assays zeigt deutlich, dass mit dem neuartigen Immunoassay geringste Mengen des Modell-Haptens nachweisbar sind. Der direkte Vergleich von **5a** mit **6** ergibt, dass **6** zwar intensivere Signale liefert, die Verwendung von **5a** aber klar zu geringeren Fehlerbreiten und besseren Nachweisgrenzen führt, wodurch Konzentrationen des Haptens von etwa 10 pM detektierbar sind. Weiteren Untersuchungen zufolge hängen die Nachweisgrenze und die Signalintensitäten der cIPCR, wie nicht anders erwartet, von der Menge des immobilisierten Antikörpers und des eingesetzten Hapten-DNA-Konjugates ab. Zwar sind keine Literaturdaten für den ELISA-Nachweis von Fluorescein verfügbar, jedoch liegen typische Grenzen

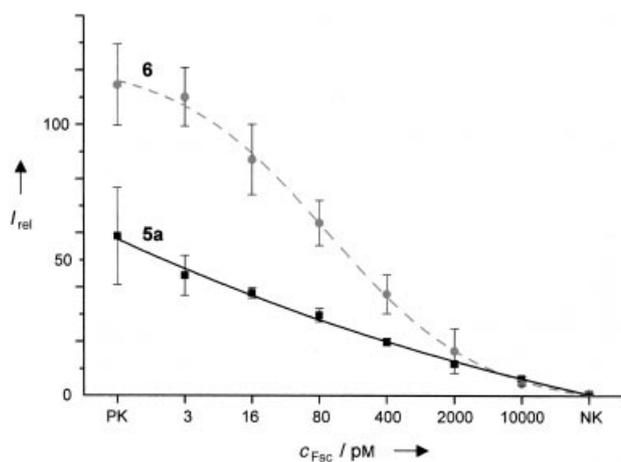


Abbildung 3. Aktivität der Fluorescein-DNA-Konjugate **5a** und **6** im cIPCR-Assay (siehe Schema 2). Eine konstante Menge an **5a** bzw. **6** wurde mit zunehmenden Mengen an freiem Fluorescein (c_{Fsc}) versetzt, die Mischungen wurden in den Vertiefungen einer Antikörper-beschichteten Mikrotiterplatte immobilisiert, und das immunosorptiv gebundene DNA-Konjugat wurde mittels PCR vervielfältigt. Die durch Quantifizierung des PCR-Amplifikates erhaltenen Signalintensitäten wurden auf eine PCR-Negativkontrolle (NK) ohne Konjugat normiert (I_{rel}). PK = Positivkontrolle ($c_{Fsc} = 0$).

für den Nachweis niedermolekularer Haptene mittels massenspektrometrischer Methoden bei ≥ 10 nM und mittels ELISA und RIA bei ≥ 100 pM.^[14] Die im nichtoptimierten Fluorescein-Modell erzielte Nachweisgrenze der cIPCR von ca. 10 pM entspricht damit einer 10- bis 1000-fachen Verbesserung der Nachweisgrenze, wie sie üblicherweise mit dem Übergang vom ELISA zum analogen IPCR-Nachweis erzielt wird.^[5]

Wir haben hier über den einfachen und effizienten Zugang zu wohldefinierten funktionalen DNA-Protein-Konjugaten berichtet, die durch nichtkovalenten Aufbau aus biotinylierter Doppelstrang-DNA, biotinylierten Haptengruppen und Streptavidin zugänglich sind. Die supramolekularen Komplexe lassen sich vorteilhaft als Reagentien in einem neuartigen auf PCR beruhenden Immunoassay einsetzen, den wir als kompetitive Immuno-PCR (cIPCR) bezeichnen. Die Modellstudien legen nahe, dass mit der cIPCR eine 10- bis 1000-fache Verbesserung der Nachweisgrenze im Vergleich zu konventionellen Antikörper-Tests erreicht werden kann. Arbeiten zur weiteren Optimierung des cIPCR-Assays und dessen Anwendung für den Nachweis biologisch und medizinisch relevanter Analyte sind im Gange. So ergaben Vorexperimente, dass das Modellsystem **5a** auf den β -Endorphin-Peptid-Nanoring **5b** und analoge mit biotinyliertem Testosteron^[9] funktionalisierte Konjugate übertragbar ist.

Eingegangen am 15. Januar 2001,
veränderte Fassung am 30. Mai 2001 [Z16424]

- [1] a) K. E. Drexler, *Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing, and Computation*, Wiley, New York, **1992**; b) D. Philp, J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1242–1286; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1154–1196.
 [2] N. C. Seeman, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 437–443.
 [3] C. M. Niemeyer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 609–618.
 [4] J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1849–1862.

- [5] C. M. Niemeyer, M. Adler, B. Pignataro, S. Lenhart, S. Gao, L. F. Chi, H. Fuchs, D. Blohm, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 4553–4561.
 [6] T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Science* **1992**, *258*, 120–122.
 [7] C. M. Niemeyer, M. Adler, S. Gao, L. F. Chi, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3183–3187; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3055–3059.
 [8] Übersichten: a) Flüssigkeitschromatographie in der forensischen Toxikologie: J. F. Van Bocxlaer, K. M. Clauwaert, W. E. Lambert, D. L. Deforce, E. G. Van den Eeckhout, A. P. De Leenheer, *Mass Spectrom. Rev.* **2000**, *19*, 165–214; b) zur Verwendung von Biosensoren siehe: C. Ziegler, W. Göpel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 585–591; siehe auch Lit. [9]; c) elektrochemische Immunoassays: A. Warsinke, A. Benkert, F. W. Scheller, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 622–634; d) ELISA-Verfahren: J. R. Crowther, *ELISA: Theory and Practice*, Humana, Totowa, NJ, **1995**.
 [9] T. Kaiser, P. Gudat, W. Stock, G. Pappert, M. Grol, D. Neumeier, P. B. Lippa, *Anal. Biochem.* **2000**, *282*, 173–185.
 [10] Die Denaturierungstemperatur der 169bp-dsDNA liegt bei ca. 80 °C. Die Bildung einzelsträngiger Spezies ist auf die hohe Abkühlgeschwindigkeit zurückzuführen, die eine quantitative intermolekulare Rehybridisierung verhindert. Der Nachweis, dass freie Einzelstrang-DNA und deren Konjugate mit STV aus den Nanoringen gebildet werden, wurde durch Zugabe von Einzelstrang-Bindungsprotein zum Produktgemisch des Denaturierungsansatzes und elektrophoretische Analyse erbracht.
 [11] F. W. Bach, *Acta Anaesthesiol. Scand.* **1997**, *41*, 133–140.
 [12] Ein ähnlicher Trend wurde bei der Hybridisierungsfähigkeit von Konjugaten aus einzelsträngigen Oligonucleotiden und STV beobachtet, die durch die Kupplung des biotinylierten Fluoresceins verringert und durch die Kupplung des Aminobiotins erhöht wird: C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, D. Blohm, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 708–719.
 [13] 30 μ L einer 10 pM Lösung des Anti-Fluorescein-Antikörpers (Sigma) wurden in TopYield-Modulen (Nunc) immobilisiert. In die einzelnen Vertiefungen wurden je 30 μ L einer Mischung aus freiem Fluorescein (Sigma, 10^{-21} bis 10^{-12} mol μ L⁻¹) und dem Nanoring **5a** (5 nM) bzw. dem DNA-Konjugat **6** (0.5 nM) in 10 mM Tris-Puffer (pH 7.3; Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan), der 1 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) und 0.05 % Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat) enthielt, gegeben und 30 min inkubiert. Nach Waschen der Module wurde die PCR-Amplifikation durchgeführt und das Amplifikat durch einen PCR-ELISA (C. M. Niemeyer, M. Adler, D. Blohm, *Anal. Biochem.* **1997**, *246*, 140–145) detektiert. Eine ausführliche Beschreibung der cIPCR wird an anderer Stelle publiziert werden.
 [14] In einigen Fällen wurden Nachweisgrenzen von 10 pM erreicht: M. Winkelmaier, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, *358*, 614–622.
 [15] K. Sutoh, K. Yamamoto, T. Wakabayashi, *J. Mol. Biol.* **1984**, *178*, 323–339.