

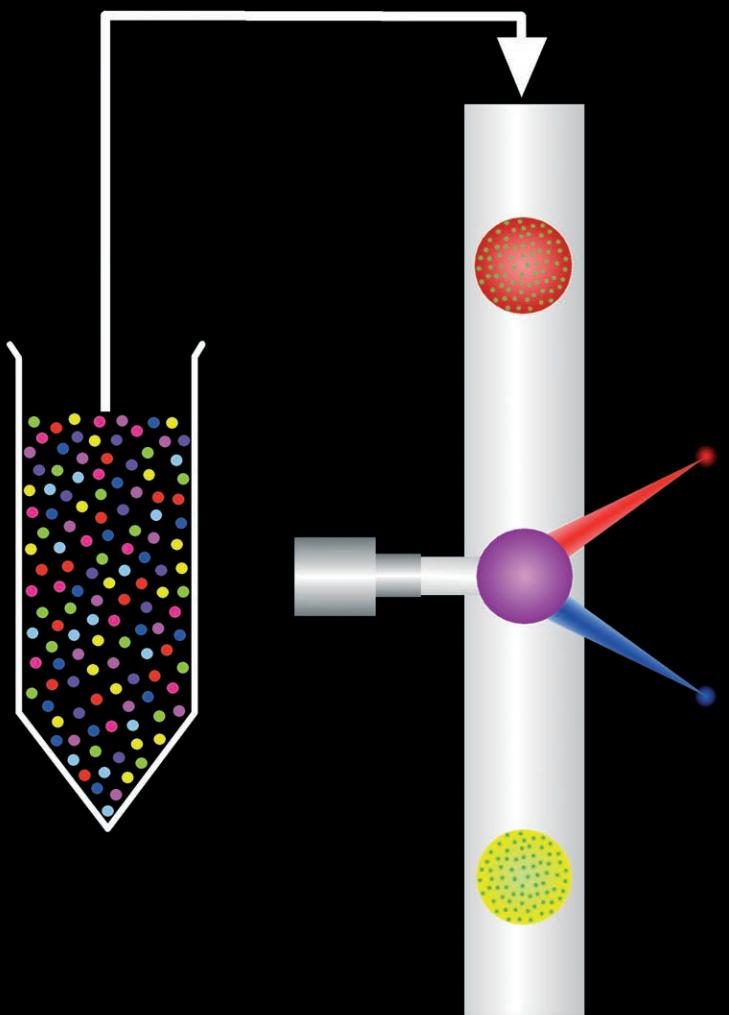
# Codierte Mikropartikel für Hochdurchsatz-Mehrfachanalysen

Robert Wilson,\* Andrew R. Cossins und David G. Spiller

**Stichwörter:**

Kombinatorische Chemie ·  
Mikrokügelchen · Nanopartikel ·  
Strichcodes ·  
Suspensionssysteme

## Flusscytometer



**Angewandte**  
*Chemie*

**N**ach der Entschlüsselung des Genoms wächst nun der Wunsch, mehr molekulare Information aus immer kleineren Proben zu gewinnen. Derzeit vertraut man auf planare Testanordnungen, doch die Qualität der Ergebnisse variiert von Versuchssystem zu Versuchssystem. Suspensionen codierter Mikrokügelchen ergeben höherwertige Daten, allerdings ist die auf diese Weise erhältliche molekulare Information durch die Zahl unterscheidbarer Codes in einer Probe beschränkt. Neue Synthesemethoden für codierte Partikel könnten hier Abhilfe schaffen, aber bei der wachsenden Vielfalt an neuen Technologien fällt die Auswahl nicht leicht. Dieser Aufsatz wägt kritisch ab, ob die neuartigen codierten Partikel gut in Mehrfachanalysen abschneiden werden.

## 1. Einleitung

Die 2001 verkündete vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms durch das Humangenomprojekt vergrößerte drastisch die Menge der für klinische Zielsetzungen verfügbaren biomolekularen Information. Planare Testanordnungen sind derzeit wohl das populärste Verfahren, um Tausende von Analyten einzeln zu quantifizieren. Zu diesem Zweck werden zweidimensionale Gitter von Sondenmolekülen (Antikörper, Oligonucleotide, Wirkstoff-Kandidaten usw.) auf Trägern abgeschieden, und jede Gitterposition zeigt als Sonde das Vorliegen eines bestimmten Moleküls an. Zwar eignet sich diese Methode gut für das Screening von Probenanordnungen mit hoher Dichte, die Qualität der Ergebnisse und die Analysegeschwindigkeit werden aber stark von den Eigenschaften der planaren Oberfläche eingeschränkt. Dagegen gelingt mit automatisierten Immunassays schon heute die schnelle Detektion kleiner wie großer Moleküle in verschiedenen Konzentrationsbereichen, wobei kompetitive und nichtkompetitive Varianten eingesetzt werden. Diese Systeme nutzen moderne Stofftrennungsmethoden, um zwischen gebundenen und freien Antigenen zu unterscheiden. In vielen Systemen kommen dabei Latexmikrokügelchen zum Einsatz, mit denen Bindung und Abspaltung schnell verlaufen und die Trennschritte einfach sind.<sup>[1]</sup> In diesem Aufsatz wägen wir ab, ob der Einsatz mikrometergroßer Partikel auch in Genomik, Proteomik und Wirkstoffentwicklung von Nutzen ist.

Mikrokügelchen bringen sowohl bei der Herstellung als auch im Einsatz klare Vorteile gegenüber planaren Testanordnungen mit sich. Gleich ob man planare Gitter photolithographisch oder automatisiert erzeugt – es können immer nur vergleichsweise wenige Anordnungen gleichzeitig aufgebaut werden, da jedes Sondenmolekül einzeln an seiner Position in der Anordnung befestigt werden muss. Dagegen sind Millionen von Mikrokügelchen-Molekül-Konjugaten auf einmal erhältlich – und das mit einer Reproduzierbarkeit, die bei der Produktion von Mikroanordnungen undenkbar ist. Viele Probleme planarer Testanordnungen ergeben sich daraus, dass alle Sondenmoleküle unter denselben Bedingungen aufgebracht werden müssen, obwohl die verwendeten oberflächenchemischen Methoden nicht für alle gleicherma-

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	6251
<b>2. Die Aufgabe</b>	6252
<b>3. Optisches Codieren</b>	6252
<b>4. Chemisches Codieren</b>	6256
<b>5. Graphisches Codieren</b>	6257
<b>6. Elektronisches Codieren</b>	6258
<b>7. Physikalisches Codieren</b>	6259
<b>8. Lesen des Codes</b>	6259
<b>9. Zweidimensionale Anordnungen optisch codierter Mikrokügelchen</b>	6260
<b>10. Perspektiven von Suspensionssystemen</b>	6261

ßen geeignet sind. Dagegen können unterschiedliche Sondenmoleküle an verschiedene Chargen von Mikrokügelchen gebunden werden, sodass die Bedingungen für jede Sonde individuell optimierbar sind.

Eine bestimmte planare Testanordnung gibt oft die Art der damit durchführbaren Analysen bereits vor. Mikrokügelchen sind flexibler: Das Testspektrum wird problemlos variiert, indem man Mikrokügelchen entfernt oder solche mit anderen Sonden zusetzt. Die Geschwindigkeiten von Hybridisierung und Bindung an planare Testanordnungen sind durch die Diffusion zur Oberfläche begrenzt, die Bindung an Mikrokügelchen kann dagegen durch effizientes Mischen beschleunigt werden. Die Empfindlichkeit planarer Testanordnungen ist durch Variationen in den Eigenschaften verschiedener Anordnungen oder sogar innerhalb ein und derselben Anordnung eingeschränkt;<sup>[2]</sup> dieses Problem kann durch den Einsatz von Mikrokügelchen minimiert werden. Mikrokügelchen erleichtern die Trenn- und Waschschritte oder machen diese gar überflüssig. Sie sind billig in großer Zahl erhältlich und eignen sich zur Untersuchung kleinsten Probenvolumina. Durch Einsatz vieler Mikrokügelchen für jedes Zielmolekül eines Testsystems gelingt eine genaue sta-

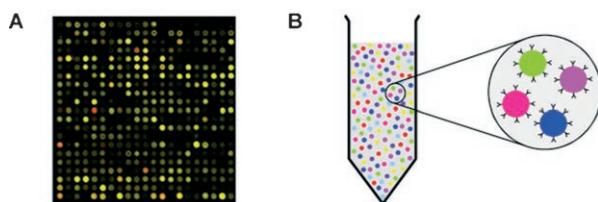
[\*] Dr. R. Wilson  
Department of Chemistry  
Liverpool University  
Liverpool L69 7ZD (Großbritannien)  
Fax: (+44) 151-794-3588  
E-Mail: r.wilson@liv.ac.uk  
Prof. Dr. A. R. Cossins, Dr. D. G. Spiller  
School of Biological Sciences  
Liverpool University  
Liverpool L69 7ZD (Großbritannien)

tistische Datenerhebung, die zu präzisen Ergebnissen führt. Der Hauptvorteil planarer Testanordnungen liegt darin, dass Tausende einzelner Tests parallel ablaufen, doch seit einigen Jahren bieten Suspensionen codierter Mikropartikel eine Alternative.<sup>[3–7]</sup>

In unserem Aufsatz teilen wir die codierten Mikropartikel zunächst nach dem Codierungsmodus in Gruppen ein. Wo es angebracht erscheint, gehen wir auf das Herstellungsverfahren ein, denn dieses entscheidet darüber, ob die Partikel für Hochdurchsatzanwendungen infrage kommen. Anschließend beschreiben wir die verschiedenen Verfahren zur Entschlüsselung codierter Mikropartikel. Im letzten Abschnitt fassen wir zusammen, welche Eigenschaften zum Erfolg herkömmlicher Mikrokügelchen beigetragen haben, und geben einen Ausblick auf zukünftige Entwicklungen bei codierten Mikropartikeln. Der englische Ausdruck „multiplex“ wurde in jüngster Zeit schwammig verwendet; hier bezeichnet er mehrfache Analysen im selben, ungeteilten Probenvolumen zur selben Zeit.

## 2. Die Aufgabe

Werden zweidimensionale Testanordnungen (Abbildung 1 A) bei Mehrfachanalysen (multiplexed assays) eingesetzt, so sind die einzelnen Sondenmoleküle anhand ihrer Position auf dem Gitter gekennzeichnet. Diese Identifizierungsmethode wird als Positionscodierung bezeichnet. Mi-



**Abbildung 1.** A) Eine herkömmliche Mikroanordnung aus einem zweidimensionalen Gitter von Erkennungsmolekülen (Antikörper, Peptide, Oligonukleotide etc.). Die Identität der Moleküle ist durch ihre jeweilige Position im Gitter bestimmt. B) In einem Suspensionssystem sind die Erkennungsmoleküle an codierte Partikel gebunden (im Bild farblich unterschieden). Die Identität eines Erkennungsmoleküls wird durch Lesen des Codes auf dem Partikel ermittelt.

krokügelchen in Suspension können sich dagegen frei bewegen, sodass eine Positionscodierung ausgeschlossen ist. Stattdessen muss jedes Mikrokügelchen einen Code tragen, der zeigt, welches Sondenmolekül gebunden ist (Abbildung 1 B). Sind die Sonden eindeutig identifizierbar, so können gebundene Zielmoleküle in der gleichen Weise identifiziert werden, als wären sie an zweidimensionale Anordnungen gebunden. Codierte Mikropartikel können auch als Festphase zum Aufbau kombinatorischer Bibliotheken eingesetzt werden, bei dem vielfältige Produkte durch Verknüpfung einzelner Bausteine in vergleichsweise kurzen Reaktionssequenzen erzeugt werden. In einer Mehrfachanalyse ist der Codetyp festgeschrieben, doch für kombinatorisch-

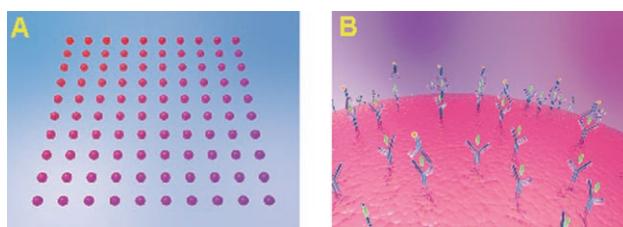
chemische Anwendungen ist gelegentlich eine aktive Codierungsmethode vorzuziehen. Bei einer Split-and-mix-Synthese folgen einzelne Partikel unabhängigen Wegen durch eine Serie von Reaktionsbehältern. Am Ende der Synthese ist an jeden Partikel ein Produkt gebunden, dessen Identifizierung aber zeitaufwändig und technisch schwierig sein kann. Durch aktives Codieren der Partikel in jedem Syntheseschritt wird ihr Reaktionsweg erfasst, und so werden die gebundenen Produkte ohne weitere Analyse identifiziert. Beispiele für festes und aktives Codieren sind im Folgenden beschrieben.

## 3. Optisches Codieren

### 3.1. Optisches Codieren mit organischen Farbstoffen

Die meisten bekannten Suspensionssysteme bestehen aus Polymermikrokügelchen, die mit einem oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen dotiert sind. Polystyrolmikrokügelchen quellen in organischen Lösungsmitteln, sodass die Farbstoffmoleküle eindiffundieren können. Transferiert man die Mikrokügelchen anschließend in eine wässrige Lösung, so schrumpfen sie, und die Farbstoffmoleküle bleiben eingeschlossen. Durch Einschluss von Farbstoffen mit unterschiedlichen Emissionsspektren und in unterschiedlichen Konzentrationen (und damit Intensitäten) erhält man Mikrokügelchen mit eindeutigen spektralen Codes. Wie viele Codes erzeugt werden können, ergibt sich aus der Zahl an Farbstoffen und Intensitäten nach der Formel  $C = N^{m-1}$  ( $C$  = Anzahl der Codes,  $N$  = Anzahl der Intensitätsniveaus und  $m$  = Farbanzahl), aber in der Praxis begrenzen weitere Faktoren die Zahl an unterscheidbaren spektralen Codes. So müssen die Farbstoffe mit dem Quellsolvans verträglich sein, und der Dotierungsprozess muss reproduzierbar gelingen; dies wird umso schwieriger, je mehr Farbstoffe und Konzentrationen beteiligt sind. Auch kleine Unterschiede in Durchmesser und Zusammensetzung der Mikrokügelchen wirken sich auf den Dotierungsprozess aus. Unterscheiden sich die Anregungswellenlängen der Farbstoffe, so werden mehrere Laser zur Anregung benötigt. Dadurch wird das Decodierungsgerät teurer, und Energieübertragungsphänomene (durch Strahlung oder auf anderen Wegen) können das Decodieren erschweren, falls die Spektren überlappen. Für eine Mehrfachdetektion benötigt man einen Reporterfarbstoff, dessen Emissionsprofil einen Teil des Spektrums überdeckt, der dadurch nicht für das Codieren zur Verfügung steht.

Mit organischen Farbstoffen codierte Mikrokügelchen sind Teil des xMAP-Flüssiganalysesystems von Luminex Corp. (Austin, USA).<sup>[8,9]</sup> Die 5.5-μm-Kügelchen sind mit zwei Farbstoffen in zehn Konzentrationen codiert, sodass maximal 100 unterschiedliche Mikrokügelchenvarianten erhältlich sind (Abbildung 2 A). Jeder Satz ist mit einem speziellen Sondenmolekül verknüpft, das die Spezifität der Mikrokügelchen bei Mehrfachanalysen bedingt (Abbildung 2 B). Zwar konnte dieses System den vollmundigen Versprechungen zu Suspensionssystemen nicht annähernd gerecht werden, doch es war in vielfältigen Mehrfachanalysen erfolgreich, z. B. für humane Cytokine,<sup>[10]</sup> HIV- und Hepatitis-B-Serokonversion,<sup>[11]</sup> Einzelnukleotidpolymorphismen

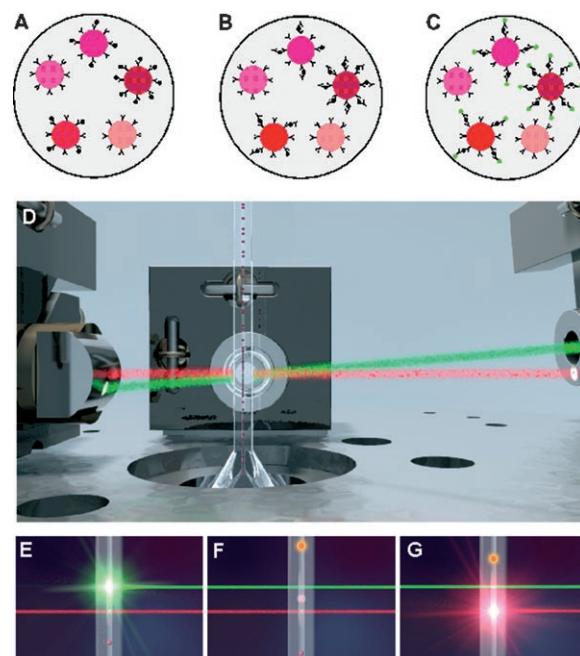


**Abbildung 2.** A) Ein Suspensionssystem aus 100 Sätzen optisch codierter Mikrokügelchen. Im Bild sind die einzelnen Mikrokügelchensätze in Form eines zweidimensionalen Gitters dargestellt, um Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen Suspensionssystemen und planaren Testanordnungen zu verdeutlichen. Jeder Mikrokügelchensatz des Suspensionssystems entspricht einem Sondenmolekül in einer planaren Testanordnung. Während im zweiten Fall die Position ermittelt wird, bestimmt man die Identität des Sondenmoleküls im ersten Fall durch Lesen des Codes seines Mikrokügelchens. B) Jeder Mikrokügelchensatz eines Suspensionssystems trägt ein anderes Sondenmolekül. Die Momentaufnahme aus einem Immunassay zeigt die Oberfläche eines einzigen Mikrokügelchens: Detektor-Antikörper mit einer orange fluoreszierenden Markierung binden an Zielmoleküle (grün), die wiederum von Sondenmolekülen (Abfang-Antikörpern) auf der Mikrokügelchenoberfläche festgehalten werden. (Mit freundlicher Genehmigung von Luminex Corp.)

(single nucleotide polymorphisms, SNPs),<sup>[12]</sup> Thyroidkonzentrationen,<sup>[13]</sup> Kinasetests,<sup>[14]</sup> Prüfung auf zystische Fibrose,<sup>[15]</sup> Allergietests,<sup>[16]</sup> Infektionsdiagnose<sup>[17]</sup> und die Detektion von biologischen Kampfstoffen.<sup>[18]</sup> Ein ähnliches System von Becton Dickinson Biosciences (San Diego, USA) beruht auf 7.5- $\mu\text{m}$ -Kügelchen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Fluoreszenzfarbstoffs dotiert sind.<sup>[19,20]</sup> Ihr BD Cytometric Array wurde für FACScan- und FACalibur-Flusscytometer ausgelegt, es lässt sich aber auch mit jedem anderen Cytometer kombinieren, das mit einem 488-nm-Laser arbeitet und Emissionen bei 576 und 670 nm unterscheidet. Die Firma bietet viele Mehrfach-Immunassays an, die aber sämtlich auf weniger als zehn gleichzeitige Analysen beschränkt sind.

### 3.2. Mehrfachdetektion mit codierten Suspensionssystemen

Die Funktionsweise von Mehrfachanalysen in Suspension sei anhand eines Beispiels aufgezeigt (Abbildung 3). Zwar unterscheiden sich einige der im Folgenden vorgestellten codierten Partikel deutlich von den hier verwendeten fluoreszierenden Polymermikrokügelchen, in Hinblick auf praktische Anwendungen müssen sie aber für einen ähnlichen Versuchsaufbau geeignet sein. Kellar und Douglass<sup>[10]</sup> nutzten das Luminex-System bei Immunassays für acht unterschiedliche Cytokine im Serum (8fach-Analyse). A) Unterschiedliche Sätze von Mikrokügelchen mit verschiedenen Abfang-Antikörpern und Codes wurden in den Vertiefungen einer Filterplatte zusammen mit der Probe suspendiert, sodass jede Vertiefung etwa 2000 Mikrokügelchen jedes Satzes enthielt. Nach Inkubieren von Mikrokügelchen und Probe auf einem Schüttelapparat wurden die Vertiefungen durch Anlegen eines Vakuums gewaschen, um nicht gebundene Cytokine zu



**Abbildung 3.** Praktische Ausführung von Mehrfachanalysen mit einem Suspensionssystem. Als Beispiel dient ein Immunassay von Kellar und Douglas für acht Cytokine mit Luminex-Mikrokügelchen.<sup>[10]</sup> A) Codierte Mikrokügelchen, die mit Abfang-Antikörpern konjugiert sind, werden mit einer Probe gemischt, die unterschiedliche Cytokine enthält. B) Die Cytokine werden zwischen Abfang-Antikörpern und entsprechenden biotinylierten Detektor-Antikörpern gebunden. C) Gebundene Detektor-Antikörper werden mit Fluoreszenzreporter-Molekülen verknüpft. D) Die einzelnen Mikrokügelchen passieren nacheinander die Sensoren eines Cytometers. E-G) Ein codiertes Mikrokügelchen mit Reportermolekülen passiert E) einen grünen Laser, der die Reportermoleküle anregt, und G) einen roten Laser, der den Code anregt. (Mit freundlicher Genehmigung von Luminex Corp.)

entfernen. Anschließend wurde B) mit biotinylierten Reporter-Antikörpern und C) mit fluoreszierenden Streptavidin-Konjugaten inkubiert. Nach erneutem Waschen und Fixieren wurde die Inhalt der Vertiefungen in ein Luminex-100-Cytometer überführt, das die einzelnen Mikrokügelchen nacheinander mithilfe von zwei Lasern analysierte (Abbildung 3D). Dabei wurden wenigstens 100 Exemplare aus jedem Mikrokügelchensatz untersucht. Bei ähnlicher Reproduzierbarkeit und Spezifität war diese Mehrfachanalyse schneller als ein ELISA-Test für eine einzige Substanz; darüber hinaus konnte eine größere Spanne von Cytokin-Konzentrationen erfasst werden. Die Vorteile bezüglich Empfindlichkeit und/oder Konzentrationsbandbreite gegenüber ELISA wurden von anderen Arbeitsgruppen bestätigt.<sup>[19,21]</sup>

Vor dem routinemäßigen Einsatz muss die Mehrfachanalyse allerdings noch weiter entwickelt werden. Typische Probleme ergeben sich aus Kreuzreaktivität und unspezifischer Bindung; sie fallen umso schwerer ins Gewicht, je mehr Analysen parallel ausgeführt werden. Mögliche Anwender sollten sich daher bewusst sein, dass Mehrfachanalysen nicht nur einer hinreichenden Codierungsfähigkeit bedürfen, sondern dass es auch darauf ankommt, mehrere Sondenmoleküle in ein und demselben System aufzunehmen.

### 3.3. Optisches Codieren mit photolumineszierenden Nanopartikeln

Halbleiter-Quantenpunkte (quantum dots, QDs)<sup>[22,23]</sup> sind photolumineszierende Nanopartikel, deren Abmessungen den Bohrschen Radius des Excitons im entsprechenden Mengenmaterial unterschreiten. Für sphärische CdS-Nanopartikel liegt diese Grenze bei einem Durchmesser von weniger als 10 nm. Die Quanteneinschränkung (quantum confinement) führt zu einzigartigen optischen und elektronischen Eigenschaften, durch die sich QDs von den entsprechenden Atomen und Mengenmaterialien abheben, z. B. enge, über die QD-Größe abstimmbare Emissionsspektren (20–30 nm Halbwertsbreite) und die Möglichkeit, alle Farben mit einer Wellenlänge anzuregen. Dank der schmalen Emissionsbänder sind im sichtbaren Bereich (400–800 nm) 10–12 unterschiedliche Farben mit akzeptabler Überlappung auflösbar. Überdies sind QDs leuchtkräftiger als Fluoreszenzfarbstoffe und beständiger gegen Photozerstörung – und dadurch ideal für das Codieren geeignet. Sie können während der Synthese in die Mikrokügelchen eingebracht werden<sup>[24,25]</sup> oder wie Fluoreszenzfarbstoffe beim Quellen in Lösungsmitteln ein-diffundieren.<sup>[26–28]</sup> Theoretisch wären mit sechs Farben in sechs Intensitäten ungefähr 40000 unterscheidbare Codes möglich, aber die Überlappung bei den unterschiedlichen Intensitäten mindert diese Zahl erheblich. Auch diese Mehrfachanalysen benötigen einen Reporter, dessen Spektralbereich beim Codieren ausgespart bleiben muss.

Kürzlich erhöhten Gao und Nie die Porosität käuflicher Mikrokügelchen in einem organischen Solvens und lagerten dann hydrophobe QDs in die Poren ein. Diese Methode lieferte codierte Mikrokügelchen mit zwei QDs unterschiedlicher Farbe in variablen Verhältnissen. Insgesamt wurden elf unterscheidbare Codes erhalten, die schnell in einem Flusscytometer detektiert werden konnten.<sup>[28]</sup>

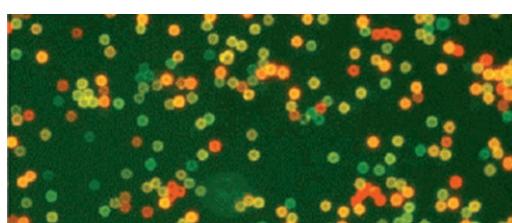
Bei Quantum Dot Corp. wurde eine einfache Codierungsmethode für Suspensionssysteme entwickelt (Abbildung 4). Hydrophobe Trioctylphosphoran(TOP)/Trioctylphosphinoxid(TOPO)-QDs wurden direkt auf der Oberfläche von oligonukleotidfunktionalisierten Mikrokügelchen adsorbiert.<sup>[29]</sup> Zwei Farben in drei Intensitäten lieferten neun ver-

schiedene Spektralcodes, mit deren Hilfe bis zu zehn unterschiedliche SNPs identifiziert werden konnten. Entschlüsselung und Detektion erfolgten noch in einem Flusscytometer, aber Quantum Dot Corp. setzt für zukünftige quantitative Hochdurchsatz-Mehrfachanalysen auf Bildgebungssysteme wie Mosaic Q1000, das in Zusammenarbeit mit Matsushita/Panasonic entwickelt wurde (siehe Abschnitt 8.2).

### 3.4. Mikrokügelchen mit Gedächtnis

Mikrokügelchen können auch durch Abscheiden von Fluoreszenzfarbstoffen oder fluoreszierenden Nanopartikeln auf ihrer Oberfläche codiert werden. Codierungsmethoden für Split-and-mix-Bibliotheken beruhen oft auf dem kovalenten Anknüpfen einer detektierbaren Gruppe an die Mikrokügelchen in jedem Syntheseschritt (chemisches Codieren). Beispiele für chemische Markierungen sind Fluoreszenzfarbstoffe,<sup>[30]</sup> Nucleinsäuren,<sup>[31]</sup> sekundäre Aminogruppen<sup>[32]</sup> und Halogenarene.<sup>[33]</sup> Leider wirken sich viele codierende Gruppen auf die Synthese der Verbindungen aus, und die Entschlüsselungsverfahren sind oft teuer, aufwändig und kaum automatisierbar. Gallop und Mitarbeiter<sup>[31]</sup> erzeugten eine Bibliothek aus ungefähr einer Million Heptapeptidsequenzen auf 10-μm-Kügelchen, die sie mit Oligonukleotiden codierten. Für jede zusätzliche Aminosäure in der Peptidsequenz wurden zwei weitere Basen an die codierenden Oligonukleotide angefügt. Die Bibliothek wurde mit markierten Antikörpern durchmustert; stark fluoreszierende Mikrokügelchen wurden daraufhin mit einem Flusscytometer erkannt, in PCR-Röhrchen überführt, und die Oligonukleotide, die an die einzelnen Mikrokügelchen gebunden waren, wurden durch die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) vervielfältigt. Die folgende Sequenzierung zeigte, welche Peptide über hohe Affinitäten für die Antikörper verfügten. Diese Methode empfiehlt sich nur, wenn wenige Treffer zu erwarten sind, denn es ist aufwändig, die Mikrokügelchen in einzelne PCR-Röhrchen zu überführen, und die Vervielfältigung und Sequenzierung der Oligonukleotide kosten Zeit.

Peptide können mit Oligonukleotiden codiert werden, da sich die Synthesemethoden für beide Verbindungsklassen nicht überschneiden, aber bei anderen Polymeren könnte dies komplizierter sein. Trau und Mitarbeiter erdachten eine viel einfachere aktive Codierungsmethode, um Mikrokügelchen in einer kombinatorischen Split-and-mix-Synthese zu verfolgen.<sup>[34–37]</sup> Sie synthetisierten ihre Verbindungen auf ungefähr 100 μm großen Träger-Mikrokügelchen und codierten diese wiederum mit kleineren Mikrokügelchen (0.2–5.0 μm Durchmesser), die mit Fluoreszenzfarbstoffen dotiert waren. Bei jedem Reaktionsschritt wurden die Träger-Mikrokügelchen mit den kleinen Mikrokügelchen gemischt, die für den jeweiligen Reaktionsschritt codierten. Die codierenden Mikrokügelchen waren mit Polyelektrolyten überzogen, um ihre Haftung auf den Träger-Mikrokügelchen zu verbessern. In jedem Schritt wurden zwischen 50 und 400 codierende Mikrokügelchen angelagert, und am Ende der Synthese konnte aus diesem Code abgelesen werden, welche Reaktionen an den einzelnen Träger-Mikrokügelchen abgelaufen waren.



**Abbildung 4.** Mit Halbleiter-QDs verschiedener Farbe in unterschiedlichem Verhältnis codierte Mikrokügelchen. QDs sind photolumineszierende Nanopartikel, die gegenüber Fluoreszenzfarbstoffen einige Vorteile haben: Alle Farben können mit derselben Wellenlänge angeregt werden, die Emissionsspektren können beeinflusst werden, und da die Emissionsbänder schmal sind, werden mehr Farben im gleichen Spektralbereich aufgelöst. Zudem sind QDs leuchtkräftiger als die meisten Fluoreszenzfarbstoffe und weniger empfindlich gegen Photozerstörung. (Mit freundlicher Genehmigung von Quantum Dot Corp.)

Ein Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, dass durch effizienten Einsatz vergleichsweise weniger Fluoreszenzfarbstoffe eine große Menge an Information auf die Mikrokügelchen übertragen wird. Um dies aber nutzbar zu machen, müssten die Position und das Spektrum der codierenden Mikrokügelchen auf den Träger-Mikrokügelchen bekannt sein. Trau und Mitarbeiter adsorbierten dafür in jedem Syntheseschritt einer kombinatorischen Bibliothek aus 100 Tripeptiden verschiedene Kombinationen von 20 unterschiedlichen codierenden Mikrokügelchen auf Träger-Mikrokügelchen.<sup>[35]</sup> Nach drei Schritten waren die Träger-Mikrokügelchen mit Mikrokügelchen unterschiedlicher Farbe in verschiedenen Verhältnissen codiert, sodass die gebundenen Produkte ohne weitere Analyse identifiziert werden konnten.

Allein dadurch, dass ein geeignetes Codierungsverfahren gefunden wurde, ändert sich freilich nichts an der Vorgehensweise beim Durchmustern kombinatorischer Bibliotheken. Bei der Festphasensynthese der Verbindungen einer Bibliothek kann es immer noch zu Artefakten kommen, die falsche Treffer zur Folge haben. Dieses Problem wird mit zunehmender Bibliotheksgröße immer gravierender. Nicht einmal Standardverfahren der Peptidchemie liefern reine Produkte, und weniger spezielle Methoden können noch weit schlechtere Ergebnisse zeitigen.

### 3.5. Mikrokügelchen mit Nanostruktur

Van Blaaderen und Vrij entwarfen Mikrokügelchen, deren Siliciumoxidkerne von konzentrischen Schalen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) umgeben waren.<sup>[38]</sup> Später erhielten Trau und Mitarbeiter ähnliche Mikrokügelchen, in denen sich bis zu sechs Schalen verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe mit nichtfluoreszierenden Siliciumoxidschalen abwechselten (siehe Abschnitt 7, „physikalisches Codieren“).<sup>[39]</sup> Befinden sich Farbstoffmoleküle mit überlappenden Anregungs- und Emissionsspektren in räumlicher Nähe zueinander, so kann ein resonanter Energietransfer zu komplizierten Emissionsspektren führen. Man könnte versuchen, zusätzliche Informationen aus diesem Effekt zu gewinnen, es ist aber auch denkbar, dass er die Entschlüsselung des Mikrokügelchencodes schlicht erschwert. Der resonante Energietransfer nimmt mit der sechsten Potenz des Abstands ab, und daher wird er unterdrückt, wenn man die verschiedenen Farbstoffmoleküle in separate Schalen platziert.

Die Mikrokügelchen von Van Blaaderen und Vrij wurden zwar mit zunehmender Schalenzahl instabiler, aber Farbstoffe können auch mit anderen Methoden in separaten Schalen angeordnet werden. Caruso und Mitarbeiter erhielten codierte Mikrokügelchen mit konzentrischen Schalen aus bis zu drei Fluoreszenzfarbstoffen,<sup>[40]</sup> indem sie entgegengesetzt geladene Polymere (Polyelektrolyte) schichtweise auf Mikrokügelchen abschieden; die Farbstoffe waren dabei kovalent an eines der Polymere gebunden. Abschließend wurden Antikörper auf der Oberfläche adsorbiert, sodass die Mikrokügelchen als Markierungen in Festphasen-Immunassays einsetzbar waren. Mit derselben Vorgehensweise erhielten die Autoren Mikrokügelchen mit Halbleiter-QDs<sup>[41]</sup> und

Lanthanphosphat-Nanopartikeln (LPNPs) an der Oberfläche.<sup>[42]</sup> LPNPs sind ähnlich groß wie QDs, aber ihre Photolumineszenz wird durch die Materialeigenschaften bestimmt, und nicht durch eine größenabhängige Bandlücke. Sie zeichnen sich durch hohe Quantenausbeuten und Beständigkeit gegen Photozerstörung aus. Dotieren mit unterschiedlichen Seltenerdmetallionen ändert ihre Emissionswellenlänge; außerdem kann mit derselben Wellenlänge mehr als eine Farbe angeregt werden. Caruso und Mitarbeiter überzogen Mikrokügelchen mit Schichten aus Zweifarbenmischungen und brachten diese als Markierungen in Bioerkennungstests ins Gespräch.

### 3.6. Zeitauf lösende Entschlüsselung optischer Codes

Wenn das Anregungsspektrum eines Lumineszenzfarbstoffs (des Acceptors) mit dem Emissionsspektrum eines weiteren Lumineszenzfarbstoffs (des Donors) überlappt, kann der resonante Energietransfer auch zum Verlust codierter Information führen. Bei überlappenden Spektren mit unterschiedlichen Lumineszenzabklingdauern kann eine Änderung des Acceptor-Donor-Verhältnisses aber die Abklingdauern beider Farbstoffe modulieren. Dieses Phänomen kann zum Codieren von Mikrokügelchen oder Nanopartikeln genutzt werden. Als Erste nutzten es Keij und Steinkamp, als sie Luminex-Mikrokügelchen mit einem orangefarbenen und einem roten Farbstoff in variierendem Verhältnis dotierten.<sup>[43]</sup> Die Luminex-Mikrokügelchen waren nicht ideal für diese Aufgabe, doch die Forscher konnten immerhin 13 ihrer 20 Mikrokügelchen durch Messung der Gesamtemissionsintensität und der durchschnittlichen Lumineszenzabklingdauer unterscheiden. Eine wohl bessere Dotierungsmethode für Mikrokügelchen geht von zwei Farbstoffen mit ähnlichen Spektren, aber deutlich abweichenden Lumineszenzabklingdauern aus. Kürner et al. synthetisierten Nanopartikel mit einem Rutheniumkomplex als Donor und Cyaninfarbstoffen als Acceptoren.<sup>[44]</sup> Erhöhen der relativen Acceptor-Konzentration verkürzte die Lumineszenzabklingzeit des Donors und verlängerte diejenige des Acceptors. Mithilfe dieser Variationsmethode konnten Nanopartikel, die mit dem Metallkomplex und vier verschiedenen Cyaninfarbstoffen dotiert waren, anhand ihrer Emissionswellenlänge und der Fluoreszenzabklingdauer des jeweiligen Acceptors unterschieden werden. Ein Vorteil der Methode besteht darin, dass alle Farben des Cyaninfarbstoffs bei derselben Wellenlänge anregbar sind. Auf diese Weise codierte Suspensionssysteme sollten an Bedeutung gewinnen, denn CompuCyte Corp. (Cambridge, USA) hat Laserscan-Cytometer auf den Markt gebracht, die Fluoreszenzabklingdauern ermitteln können.

### 3.7. Weitere optische Codierungsmethoden

Zum Codieren von Mikrokügelchen in Suspensionssystemen sind Lumineszenzfarbstoffe und Nanopartikel derzeit am beliebtesten, doch auch Alternativen werden erforscht. Fenniri und Mitarbeiter synthetisierten Harze mit 24 unterschiedbaren IR- und Raman-Codes durch Copolymerisation

von Styrol- mit Alkylstyrol-Monomeren.<sup>[45]</sup> Da sich diese Harze chemisch ähnlich wie Träger in Festphasensynthesen verhielten, eigneten sie sich zum Codieren kombinatorischer Bibliotheken.

Die Raman-Spektroskopie diente bislang vorrangig zur Strukturanalyse, während ihr Wert für hochempfindliche Detektion eher gering eingeschätzt wurde. Doch die Signalintensität kann sich um viele Größenordnungen erhöhen, wenn 1) sich ein Molekül nahe einer rauen Metalloberfläche befindet (z. B. kolloidalem Silber) und 2) die Einstrahlwellenlänge mit dem Molekül und dem Metallplasmon rezoniert. Leider ist die oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Spektroskopie (surface-enhanced resonant Raman spectroscopy, SERRS) empfindlich gegen jegliche Störung der Anlagerung der Moleküle an die Metalloberfläche. Doering und Nie lösten dieses Problem, indem sie Farbstoffmoleküle in eine Siliciumoxidschale einbetteten, die ein Goldnanopartikel umschloss. Die Raman-Spektren wurden dadurch um das  $10^{13}$ – $10^{14}$ fache verstärkt.<sup>[46]</sup> Sie schlugen vor, dass durch Einsatz mehrerer Farbstoffe eine Codierung möglich sei, doch He et al. wiesen darauf hin, dass ein Raman-Spektrum mit Anteilen vieler Farbstoffe infolge Überlappung schwer zu entschlüsseln sein dürfe.<sup>[5]</sup>

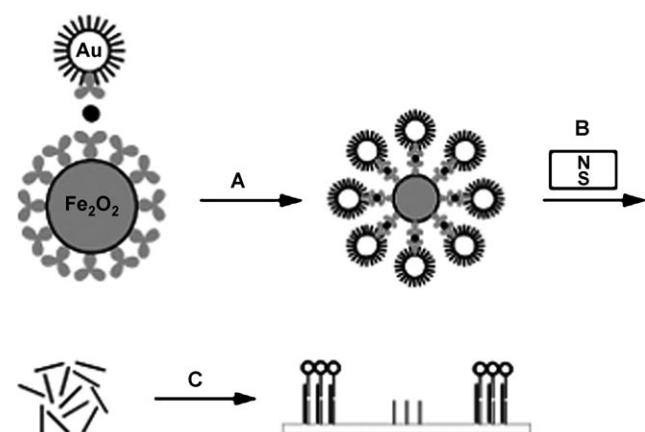
Auch Mirkin und Mitarbeiter nutzten die Raman-Spektroskopie zur Mehrfachdetektion.<sup>[47]</sup> Sie verknüpften farbstoffmarkierte Oligonukleotide mit Goldnanopartikeln und setzten diese in Mikrokügelchen-Analysesystemen ein. Jeder Goldnanopartikel-Satz trug eine unterschiedliche Oligonukleotidsequenz und war anhand einer bestimmten Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen erkennbar. In Mehrfachanalysen wurden die Zielsequenzen zwischen Auffang-Oligonukleotiden, die an  $300\text{-}\mu\text{m}$ -Siliciumoxidmikrokügelchen gebunden waren, und den codierten Goldnanopartikeln „eingeklebt“. Um die Raman-Spektren der gebundenen Markierungen zu verstärken, wurde Silber – katalysiert durch die Goldnanopartikel – auf den Mikrokügelchen abgeschieden.

Oxonica plc (Kidlington, Großbritannien) entwickelt einen ähnlichen Ansatz mit Benzotriazol-Farbstoffen und Silbernanopartikeln, die in Polymermikrokügelchen eingeschlossen sind. Die Mikrokügelchen könnten als empfindliche Markierungen, aber möglicherweise auch als Trägermaterial in Mehrfachanalysen Einsatz finden. Photonische Kristalle mit gut ausgeprägten optischen Eigenschaften entstehen durch elektrochemisches Ätzen von Silicium. Auf einer Siliciumoberfläche erzeugten Sailor und Mitarbeiter photolithographisch erhabene quadratische Strukturen, die sie durch periodisches elektrochemisches Ätzen in photonische Kristalle umwandeln.<sup>[48]</sup> Die Strukturen wurden mithilfe eines Strompulses vom Substrat abgelöst und mechanisch oder durch Ultraschallbehandlung in Partikel zerteilt, die überaus scharfe Reflexionslinien (ca. 11 nm Halbwertsbreite) im Sichtbaren und im IR-Bereich zeigen. Die Linienlage lässt sich über die Bedingungen des Ätzprozesses einstellen, und ein Partikel kann mehr als eine Linie ergeben. Theoretisch lassen sich auf diese Weise Tausende von Codes erzeugen, doch dies würde voraussetzen, dass alle Ätzbedingungen exakt kontrollierbar sind. Mithilfe dieser Partikel konnte zwischen den Albuminen zweier verschiedener Spezies in einem Mehrfach-Immunassay unterschieden werden.

Die elastische Streuung an Mikrokügelchen kann verstärkt werden, indem man diese mit Metallnanopartikeln überzieht. Siiman et al. codierten Mikrokügelchen mit Gold- oder Silbernanopartikeln; anschließend bildeten sie Konjugate aus den Kügelchen und Antikörpern, die spezifisch auf verschiedene Untergruppen weißer Blutkörperchen reagieren.<sup>[49]</sup> In Vollblut banden mehrere Mikrokügelchen an die einzelnen Zellen, die daraufhin in einem Flusscytometer identifiziert und gezählt werden konnten.

## 4. Chemisches Codieren

Schon im vorigen Abschnitt wurde eine Codierungsme thode für kombinatorische Bibliotheken beschrieben, die sich der hohen Informationsspeicherkapazität von Nucleinsäuren bedient. Mirkin und Mitarbeiter nutzten Nucleinsäurecodes für Mehrfachanalysen von Biomolekülen. Ihre Bio-Strichcodes sind Nano- oder Mikropartikel, die Erkennungsmoleküle wie Antikörper oder Oligonukleotide tragen, als Code dienen DNA-Oligonukleotide. Zielmoleküle werden zwischen Sondenmolekülen an magnetischen Mikrokügelchen und den Bio-Strichcodes eingeklebt (Abbildung 5). Die magnetischen Mikrokügelchen werden samt den angeknüpften Bio-Strichcodes mithilfe eines Magnetfelds von der Lösung getrennt und gewaschen; anschließend werden die Oligonukleotidcodes freigesetzt und detektiert. Dieses Verfahren hat seine hohe Empfindlichkeit in Immunassays mit einzelnen Analyten unter Beweis gestellt,<sup>[50]</sup> es kann aber auch zur Mehrfachdetektion verwendet werden, wenn die Oligonukleotidcodes an einer planaren Testanordnung analysiert werden.<sup>[51]</sup> Bio-Strichcodes sind in großem Maßstab zugänglich, und ihre Leistungsfähigkeit für die Analyse von Biomolekülen steht außer Frage, doch die Entschlüsselung mit



**Abbildung 5.** Als Biocodes bezeichnet man Nano- oder Mikropartikel, die mit Erkennungsmolekülen konjugiert und mit Oligonukleotiden codiert sind. A) „Sandwich“-Immunassay von Biocodes (Au) und magnetischen Mikrokügelchen ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). B) Die magnetischen Mikrokügelchen und die angebundenen Biocodes werden abgetrennt und gewaschen; anschließend werden die codierenden Oligonukleotide freigesetzt. C) Die freien Oligonukleotide werden mit einer planaren Testanordnung analysiert. Die Konzentrationen der Zielmoleküle in der ursprünglichen Probe ergeben sich aus den Positionen und Punktdichten nach der Bindung der Oligonukleotide durch Hybridisierung.

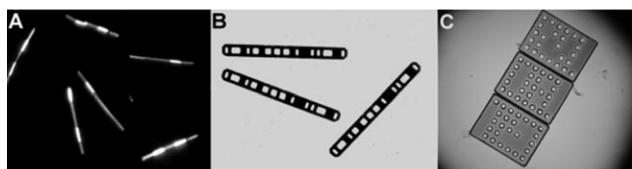
einer planaren Testanordnung ist schwieriger und zeitintensiver als die Hochdurchsatzdetektion in einem Flusscytometer. Es können ungefähr so viele Codes identifiziert werden wie Zip-Codes mit einem universellen Analysesystem.<sup>[52]</sup> Sind Goldnanopartikel die Reporter, so kann man die Anordnungen mit Silber anfärben und mit billiger Ausrüstung analysieren, aber diese Vorgehensweise verspricht bestenfalls qualitative Ergebnisse.

## 5. Graphisches Codieren

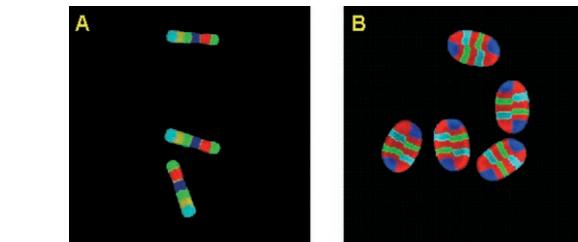
Bei den in Abschnitt 3 beschriebenen Decodierungsmethoden wird ein komplexes optisches Signal in seine Komponenten zerlegt. Beim Entschlüsseln eines graphischen Codes wird dagegen ein zweidimensionales Muster gelesen. Supermarkt-Strichcodes sind ebenso ein Beispiel hierfür wie der Text auf dieser Seite. In Gläsern eingeschlossene Seltenerdmetallionen haben enge Emissionsspektren im sichtbaren Bereich (Banden mit 10–20 nm Halbwertsbreite). Mehrere Farben können mit derselben UV-Wellenlänge angeregt werden, und die Proben sind unempfindlich gegen Photozerstörung. Mikrostrichcodes (Abbildung 6A) können er-

werden. In einer Mehrfachanalyse wurden bereits Human- und Mikroben-DNA erkannt, und in der Folge wurden Mikrostrichcodes mit größerem Codierungspotenzial entworfen (Abbildung 6B).

Eine zweite graphische Codierungsmethode nutzt gestreifte Metallnanostäbe (Nanostrichcodes), die durch stufenweise elektrochemische Abscheidung von Metallen wie Gold und Silber in mesoporösen Aluminiumoxidtemplaten zugänglich sind.<sup>[54–57]</sup> Pro Quadratzentimeter Templat können auf diese Weise binnen weniger Stunden ebensoviele Nanostäbe produziert werden, wie Mikrokügelchen in 10 mL einer kommerziell erhältlichen Suspension enthalten sind. Die mikrometergroßen Streifen können anhand des unterschiedlichen Reflexionsgrades der Metalle unterschieden werden. Werden Gold-Silber-Nanostäbe bei 405 nm bestrahlt, so erscheinen die Silberstreifen deutlich heller als die Goldstreifen (Abbildung 7 A). Die Gesamtzahl möglicher Codes berech-



**Abbildung 7.** Graphische Codes: A) Gestreifte Metallnanostäbe (Nanostrichcodes) aus abwechselnden Gold- und Silberstreifen nach Anregung bei 405 nm. Der scheinbar unterschiedliche Durchmesser erklärt sich dadurch, dass die Silbersegmente stark reflektieren, die Goldsegmente dagegen nur schwach. Metallnanostäbe sind etwa so groß wie Mikrokügelchen und können in ausreichender Menge für Suspensionssysteme erhalten werden. Ihre sehr hohe Dichte würde aber ein starkes Rühren erforderlich machen, um sie bei Biomolekulanalysen in Suspension zu halten, was empfindliche Biomoleküle und/oder die Nanostäbe beschädigen könnte. (Mit freundlicher Genehmigung von Nanoplex Technologies.) B) Aluminiumstäbchen mit Lochmustern unter einem Lichtmikroskop. Die Stäbchen sind größer als übliche Mikrokügelchen, aber wegen der nur etwa 2.5-mal höheren Dichte muss weniger stark gerührt werden als für Gold-Silber-Nanostäbe. SmartBead Technologies bietet derzeit das einzige Mehrfachanalysesystem mit graphischem Code an. (Mit freundlicher Genehmigung von SmartBead Technologies Ltd.) C) „ImageCodes“: Bei ähnlicher Dichte sind diese Polymerplättchen mit Lochmuster-Codes etwa zehnmal so groß wie gewöhnliche Mikrokügelchen, sie können aber wohl noch verkleinert werden. Die L-förmige Lochanordnung am Rand dient als Koordinatensystem beim Decodieren, das innere Muster identifiziert die einzelnen Plättchen.



**Abbildung 6.** Glasstäbchen mit Streifen aus photolumineszierenden Seltenerdmetallionen. Alle Farben dieser Mikrostrichcodes können bei derselben Wellenlänge angeregt werden, und ihr Material ist robust und oberflächenchemisch manipulierbar. Allerdings sind sie etwa zehnmal so groß wie gewöhnliche Mikrokügelchen, und ihre Dichte ist 2.5-mal so hoch. Mit den bislang beschriebenen Herstellungsverfahren würde es etwa einen Monat dauern, so viele Mikrostrichcodes zu fertigen wie Mikrokügelchen in einem Milliliter einer kommerziell erhältlichen Suspension enthalten sind. (Mit freundlicher Genehmigung von Corning, Inc.)

halten werden, indem man mit Seltenerdmetallionen dotierte Glasblöcke in der gewünschten Reihenfolge aneinanderfügt, schmilzt und das Produkt als 100 µm breites und 20 µm hohes Faserband auszieht.<sup>[53]</sup> Das Faserband wird mit einer Geschwindigkeit von 5 mm s<sup>-1</sup> in 20-µm-Segmente zerteilt. Bei dieser Geschwindigkeit würde man etwa einen Monat benötigen, um ebensoviele Mikrostrichcodes zu erhalten, wie Mikrokügelchen in einem Milliliter einer kommerziell erhältlichen Suspension vorliegen. Die Zahl an Codes C berechnet sich nach  $C = N^s/2$ ; N bezeichnet die Zahl der Farben, s die Streifenzahl. Mindestens vier Farben können voneinander und von Fluoreszenzreportern unterschieden werden. Die Mikrostrichcodes haben eine relative Dichte von 2.5 in Bezug auf Wasser, sie sind chemisch beständig und können mithilfe von Silanchemie mit Sondenmolekülen funktionalisiert

net sich analog wie für die Mikrostrichcodes (siehe oben). Die Streifen müssen für eine ausreichende Auflösung etwa 500 nm breit sein (siehe aber auch Lit. [57]), und daher können 5-µm-Stäbchen aus maximal 10 Streifen bestehen, was bei zwei Metallen einer Gesamtzahl von 528 Codes entspricht. Verlängern der Stäbchen oder die Einführung weiterer Metalle (Pt, Pd, Ni, Co, Cu) sollte die Codezahl vergrößern, doch einige Metalle sind in Reflexionsmessungen nicht detektierbar, und nicht alle Metalle lassen sich so leicht mit Sondenmolekülen funktionalisieren wie Gold und Silber. Die Stäbchen können lichtmikroskopisch mithilfe von Mustererkennungssoftware<sup>[56]</sup> unterschieden werden, und gebundene Zielmoleküle werden durch einen Fluoreszenzfarbstoff

angezeigt. Die relativen Dichten von Gold und Silber gegenüber Wasser betragen 19.3 bzw. 10.5, sodass kräftig gerührt werden muss, um die Metallnanostäbe in Suspension zu halten, doch unter diesen Bedingungen können sich die Stäbchen verbiegen oder an den Metall-Metall-Grenzflächen auseinanderbrechen. Zwar ist jedes Templat bei einer Synthese auf einen bestimmten Code festgelegt, nichts spricht jedoch gegen die Synthese mehrerer unterschiedlicher Stäbchen in parallelen galvanischen Bädern. Gestreifte Metallnanostäbe von Nanoplex Technologies, Inc. wurden in einem Mehrfach-Immunassay mit zwei Analyten eingesetzt,<sup>[54]</sup> und sie könnten sich auch als versteckte Markierungen bewähren, die authentische von gefälschten Produkten unterscheiden.<sup>[57]</sup>

Bei SmartBead Technologies Ltd (Cambridge, Großbritannien) wurde ein graphisches System mit codierten Aluminiumstäbchen entwickelt (relative Dichte 2.7), die mithilfe von Standardtechniken der Halbleitermikroproduktion hergestellt werden.<sup>[58]</sup> Pro 7.6-cm-Scheibe erhält man ungefähr zwei Millionen  $100 \times 10 \times 1\text{-}\mu\text{m}$ -Stäbchen – genug für 1000 Analysen. Der Code liegt in Form eines Lochmusters vor (siehe Abbildung 6B), sodass theoretisch Millionen unterschiedlicher Codes möglich sind. Durch oberflächenchemische Methoden werden Sondenmoleküle an den Stäbchen befestigt, und gebundene Zielmoleküle werden durch Fluoreszenzfarbstoffe angezeigt. Die Mehrfachanalysen werden auf 96er-Filterplatten mit vollautomatischem Flüssigkeitstransport- und Bildgebungssystem ausgeführt. UltraPlex wurde von SmartBead mit Blick auf Großkunden wie Krankenhäuser am Autoimmundiagnostik-Markt eingeführt. Eine Version, die als Grundlage für die Entwicklung ähnlicher Mehrfachanalysen genutzt werden kann, ist nicht geplant, doch Lizenzen für nichtkonkurrierende Anwendungen sind erhältlich. De Smedt und Mitarbeiter vermieden Probleme der hohen Dichte von Metallpartikeln durch den Einsatz fluoreszierender Polymermikrokügelchen, auf denen sie mithilfe von konfokaler Rastermikroskopie Muster erzeugten.<sup>[59]</sup> Einige ihrer Codes waren wie makroskopische Strichcodes aus Reihen von Strichen und Leerräumen aufgebaut, doch der Codierungsprozess ist extrem langsam, und zum Decodieren müssen die Mikrokügelchen genau in eine bestimmte Anordnung gebracht werden.

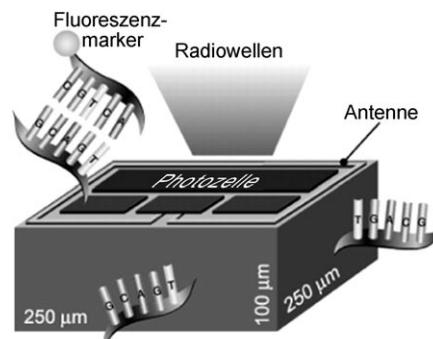
3D Molecular Sciences Ltd (Cambridge, Großbritannien) entwickelten ein System aus Polymerpartikeln, die durch Lochmuster codiert wurden (Abbildung 7C).<sup>[60]</sup> Sie erhielten diese „ImageCodes“ durch optisches Brennen eines Musters in Scheiben eines negativen Photoresists mithilfe von UV-Licht und einer Maske. Die ImageCodes maßen  $500 \times 300 \times 25\text{ }\mu\text{m}$  bei einer vergleichbaren Dichte wie bekannte Mikrokügelchen. Die Zielmoleküle wurden durch einen Fluoreszenzfarbstoff angezeigt. Mithilfe von Mustererkennungssoftware könnten einige Tausend Partikel gleichzeitig decodiert werden.

## 6. Elektronisches Codieren

Radiofrequenzsignale wurden von zwei Arbeitsgruppen ungefähr zeitgleich zum Codieren kombinatorischer Bibliotheken eingeführt.<sup>[61,62]</sup> In einem Fall wurde eine  $8 \times 1 \times 1\text{ mm}$

große Halbleiter-Speichereinheit, die das Aufzeichnen, Speichern und Wiedergeben von Radiofrequenzsignalen ermöglicht, in einen chemisch inerten porösen Behälter eingeschlossen, der daneben Polymermikrokügelchen als Träger für die Festphasenreaktionen enthielt.<sup>[62]</sup> Die Behälter wurden zunächst in Gruppen aufgeteilt, und jede Gruppe wurde durch ein Radiofrequenzsignal für denjenigen Baustein codiert, der an die Mikrokügelchen gekuppelt werden sollte. Nach der Zugabe des Bausteins wurden die Gruppen für gemeinsame Operationen wie Waschen, Trocknen und Entschützen vereinigt. Anschließend wurde wieder in Gruppen gespalten und für den folgenden Baustein codiert. Nach der Synthese wurden die Produkte an den Mikrokügelchen identifiziert, indem der Reaktionsverlauf mithilfe der Halbleiter-Speichereinheit nachvollzogen wurde. Die Erinnerungskapazität dieser Speichereinheiten ist so hoch, dass zusätzlich weitere wichtige Informationen wie die Reaktionsbedingungen gespeichert werden können. Sie sind chemisch inert, und der Codierungsprozess ist nichtinvasiv, doch wegen ihrer Größe eignen sie sich nicht für Mehrfachanalysen.

Vor kurzem wurde bei PharmaSeq, Inc. (Princeton, USA) ein deutlich kleinerer 64-Bit-Lesespeicher entwickelt; dieser Mikrotransponder misst  $250 \times 250 \times 100\text{ }\mu\text{m}$ .<sup>[63]</sup> Jeder Transponder besteht aus einem integrierten Stromkreis, der mit einer Photovoltaikzelle und einer Antenne verbunden ist (Abbildung 8). Die Transponder werden decodiert, während



**Abbildung 8.** Mikrotransponder sind mikroskopische Lesespeicher. Laserbestrahlung regt gleichzeitig die Fluoreszenzreporter an der Oberfläche des Lesespeichers an und löst die Übermittlung eines 40-Bit-Radiofrequenzcodes aus. Potenziell können so deutlich mehr Codes hergestellt werden als durch jede andere hier vorgestellte Methode, und Transponder sind in großer Menge durch industrielle Halbleiterproduktionsverfahren erhältlich. Gegen ihren Einsatz in Biomolekülanalysen spricht, dass sie etwa fünfundzwanzigmal so groß sind wie übliche Mikrokügelchen. Nach Fortschritten in Mikro- und Nanofabrikationsmethoden könnten sich diese Systeme aber durchsetzen. (Mit freundlicher Genehmigung von Pharmaseq, Inc.)

sie in einer Kapillare an einem Laser vorüberfließen, der gleichzeitig fluoreszierende Reportermoleküle anregt und die Übertragung eines Radiofrequenzcodes veranlasst. Mit diesem System sind etwa  $2^{40}$  Codes zugänglich, aber die Transponder sind deutlich größer als gewöhnliche Mikrokügelchen.

## 7. Physikalisches Codieren

Physikalische Charakteristika wie die Größe und der Brechungsindex beziehen sich oft auf ganze Partikel und bringen daher keinen Nutzen für die Mehrfachdetektion. Das Copalis-System von DiaSorin (Saluggia, Italien) beruht auf der Partikelgröße.<sup>[64]</sup> Ihr Spezialflusscytometer kann Unterschiede von 0.1  $\mu\text{m}$  im Kugelchendurchmesser durch Kleinwinkellichtstreuung auflösen. In Mehrfachanalysen für drei Substanzen wurden Mikrokügelchen mit 1.1, 1.4, 1.7 und 1.9  $\mu\text{m}$  Durchmesser eingesetzt. Die drei größeren Mikrokügelchen wurden dabei mit unterschiedlichen Abfang-Antigenen überzogen, während die kleinsten Mikrokügelchen als Standard fungierten. Lagen die entsprechenden Antikörper in den Proben vor, so bildeten die Mikrokügelchen Aggregate, die im Flusscytometer detektiert wurden.

Bei 3D Molecular Sciences wurde eine Methode mit optisch lesbaren Polymerpartikeln entworfen, die durch unterschiedliche Formen codiert waren (FloCodes).<sup>[60]</sup> Zur Analyse sollte ein umgebautes Flusscytometer beim Durchgang gleichzeitig die Fluoreszenz der Reportermoleküle und das Streuungsmuster messen. Wie viele Analyte dieses Mehrfachdetektionssystem unterscheidet, wurde aber nicht mitgeteilt.

Einzelne physikalische Eigenschaften eignen sich kaum für die Mehrfachanalyse, Kombinationen eröffnen allerdings neue Codierungsstrategien. Moderne Flusscytometer unterscheiden Partikel bezüglich ihrer Größe, ihres Brechungsin- dexes und ihrer Photolumineszenz. Trau und Mitarbeiter stellten Mikrokügelchen her, die bis zu sechs Fluoreszenzfarbstoffe in getrennten Schalen enthielten. Abwechselnd mit nichtfluoreszierenden Abstandshinterschalen umgaben diese Schalen einen Siliciumoxidkern.<sup>[39]</sup> Diese Mikrokügelchen sind anhand ihrer optischen Signaturen unterscheidbar, die sich aus einer Kombination von Fluoreszenzwellenlänge und -intensität, Größe und Brechungsindex ergeben. Da unverwechselbare optische Signaturen für kombinatorische Anwendungen unerlässlich sind, werden die Mikrokügelchen durch ein Flusscytometer geleitet, das Duplikate aussortiert. Zur Synthese einer Oligonucleotidbibliothek wurden die optisch unterscheidbaren Mikrokügelchen in vier Gruppen aufgeteilt, die mit jeweils einer Nucleotidbase umgesetzt wurden. Jede Teilmenge wurde dann durch das Flusscytometer geleitet, um die optischen Signaturen der Mikrokügelchen mit der entsprechenden Base zu ermitteln. Die Mikrokügelchen wurden anschließend so oft gemischt, erneut in vier Gruppen geteilt, umgesetzt und analysiert, bis die Oligonucleotide die gewünschte Länge hatten.

## 8. Lesen des Codes

### 8.1. Lesen des Codes in einem Flusscytometer

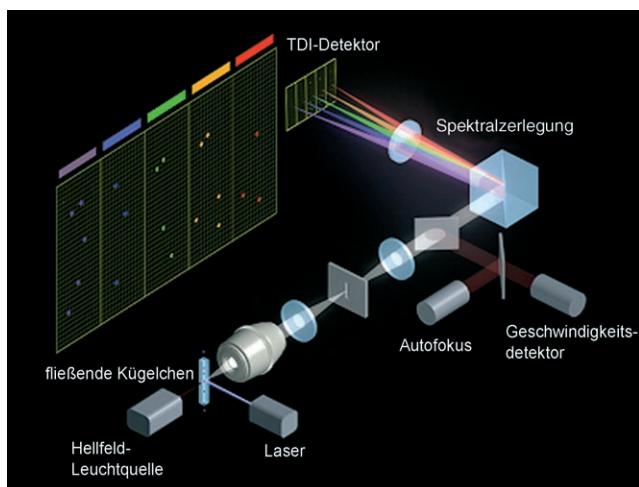
Flusscytometer<sup>[9,65]</sup> messen die Fluoreszenz von suspendierten Zellen oder Partikeln, die an einem Sensor vorüberfliessen. Daher eignen sie sich zum Decodieren von Suspensionssystemen aus photolumineszierenden Mikrokügelchen und zur Detektion der Fluoreszenzreporter-Moleküle an

ihrer Oberfläche. Sie bestehen aus einer Lichtquelle, einem Strömungssystem, einer Sammelloptik, Detektoren und einem Computer, der die Signale in Daten umwandelt. Die meisten Flusscytometer enthalten einen Laser, der kohärentes Licht einer bestimmten Wellenlänge aussendet, das auf den Ort der Analyse fokussiert ist. Das Strömungssystem ist so ausgelegt, dass die Partikel den Sensor einzeln mit maximal  $\pm 1 \mu\text{m}$  Abweichung passieren. Dies gelingt durch Injektion der Probe in die Mitte eines geschlossenen Kanals, durch den eine Flüssigkeitssäule fließt (der Hülstrom). Die Partikel in der Probe werden hydrodynamisch in die Mitte der Säule dirigiert. Nach der Anregung werden Streulicht und Fluoreszenz durch zwei Linsen gebündelt (eine befindet sich gegenüber der Lichtquelle, die andere senkrecht zur Richtung des einfallenden Lichts) und durch eine Anordnung von Strahlenteilern und Filtern aufgetrennt. Dies ermöglicht die Bestimmung der Photolumineszenz bei mehreren Wellenlängen und von physikalischen Eigenschaften wie der Partikelgröße und -form. Der Laser ist auf ein sehr kleines Lösungsvolumen um das Partikel fokussiert, sodass der Hintergrund minimiert wird und Analysen ohne Trennschritte möglich sind. Als Detektoren werden gewöhnlich Photovervielfacher-Röhren (photomultiplier tubes, PMTs) eingesetzt, die schon 100 Reportermoleküle pro Partikel wahrnehmen. Die besten Instrumente nutzen mehrere Anregungslaser und Detektoren, die bis zu 18 Farben im Streulicht von Tausenden von Partikeln pro Sekunde registrieren können. An die meisten Flusscytometer sind zudem stromabwärts Trennsysteme angeschlossen, die gezielt Partikel für weitere Arbeitsschritte aussortieren können.

Luminex entwarfen ihre codierten Mikrokügelchen zunächst für ein Becton-Dickinson-Labcytometer mit 488-nm-Argonlaser, doch dieses „FlowMetrix“-System hatte den Nachteil, dass Überlappungen der Fluoreszenz von Reporterfarbstoff und Mikrokügelchen ausgeglichen werden mussten. Daher entwickelten sie ein eigenes Laborinstrument (Model 100), in dem ein grüner YAG-Frequenzverdopplungslaser bei 532 nm die Reporterverbindung R-Phycoerythrin anregt, die bei 580 nm emittiert, während ein 635-nm-Diodenlaser die Farbstoffe in den Mikrokügelchen anregt, die bei 658 und 712 nm emittieren und nicht mit den Phycoerythrin-Banden überlappen. Fluoreszenz und Streustrahlung werden durch Lawinenphotodioden detektiert. Model 100 hat anderen kommerziellen Flusscytometern eine Hochgeschwindigkeits-Digitalpulsverarbeitung voraus, und sein Strömungssystem ist für Kugelchen mit 5.5  $\mu\text{m}$  Durchmesser optimiert. Das Gilson-215-Mehrsondenströmungssystem des Cytometers nutzt 96er- oder 384er-Filterplatten für Mehrfachanalysen an codierten Mikrokügelchen. Der Inhalt der einzelnen Vertiefungen wird anschließend in ein Cytometer überführt, und jedes Kugelchen wird beim Passieren der beiden Laserstrahlen einzeln analysiert (Abbildung 3). Die Software erfasst alle Mikrokügelchen statistisch und berechnet die durchschnittliche Reporterintensität für jeden Code. Die wichtigsten Nachteile von Flusscytometern sind ihre Größe und ihr Preis, aber kürzlich wurde von der Partec GmbH (Münster) ein tragbares Flusscytometer für Mehrfachanalysen eingeführt, das mit einer Autobatterie oder mit Solarzellen betrieben werden kann; mit zukünftigen Mikro-

strömungssystemen sollten die Geräte noch kleiner und billiger werden.

Ein weiterer wichtiger Schritt ist die Kombination von Flusscytometrie und Bildgebungsmethoden. Im Image-Stream-100-Flusscytometer (Amnis Corp., Seattle, USA) wurden die sonst üblichen Detektoren durch eine empfindliche CCD-Kamera ersetzt, die bei einem Fluss von 100 Partikeln pro Sekunde bis zu sechs unabhängige Bilder aufnehmen kann (Hellfeld, Dunkelfeld und vier Farben; Abbildung 9). Das Instrument meistert einige der Probleme, die beim Sichtbarmachen von Partikeln auf planaren Oberflächen auftreten, und es eignet sich zum Lesen graphischer Codes.



**Abbildung 9.** Als erstes kommerzielles Instrument vereinigt Image-Stream 100 das Strömungssystem eines Flusscytometers mit einer Methode zur Bildgebung einzelner Zellen oder Partikel, die einen Detektor passieren. Mögliche Anwendungen sind das Lesen graphischer Codes und die Detektion von Fluoreszenzreporter-Molekülen an ihrer Oberfläche. Anstelle üblicher Detektoren ist das Flusscytometer mit einer empfindlichen CCD-Kamera ausgestattet, die bis zu sechs unabhängige Bilder aufnimmt (Hellfeld, Dunkelfeld und vier Farben), während 100 Partikel pro Sekunde den Detektor passieren. (Mit freundlicher Genehmigung von Amnis Corp.)

## 8.2. Lesen des Codes mit Bildgebungssystemen

Optisch codierte Mikrokügelchen können z.B. mit dem Mosaic-Q1000-Bildgebungs- und Datenverarbeitungssystem von Quantum Dot Corp. und Matsushita/Panasonic analysiert werden, das aus einem invertierten Epifluoreszenzmikroskop mit 405-nm-Anregungslaser und einer CCD-Kamera besteht. Die Mehrfachanalysen für QD-codierte Mikrokügelchen werden auf partitionierten Platten ausgeführt. Die Abscheidung mithilfe eines Magnetfelds erleichtert die Wasch- und Trennschritte, und Decodierung und Detektion erfolgen in den Vertiefungen der Platte. Mehrfarbenbilder der Mikrokügelchen werden mit dem Mikroskop aufgenommen; eine Bilderkennungssoftware ordnet dann den einzelnen Pixeln Zahlenwerte zu, die ihren Intensitäten entsprechen. CCD-Kameras sind deutlich weniger empfindlich als die sonst in

Flusscytometern verwendeten Detektoren, und daher ist es schwierig, mit ihnen Reportermoleküle in geringer Zahl zu erkennen. Hier können Rasterlasercytometer Abhilfe schaffen,<sup>[66,67]</sup> die mit einem oder mehreren Lasern die Oberfläche abtasten. Lichtemissionen werden mit wellenlängenspezifischen Photovervielfacher-Röhren detektiert. Für diese Instrumente ist die Scharfstellung weniger entscheidend als für Fluoreszenzmikroskope. Bei optisch codierten Mikrokügelchen bieten sich Bildgebungsmethoden als Alternative zur Flusscytometrie an, doch für die meisten graphisch codierten Partikel ist diese unersetztbar. Die Methoden sind komplizierter, da die Orientierung der Partikel vor dem Decodieren bestimmt werden muss, und langsamer, da nur wenige Partikel gleichzeitig analysiert werden können. Der Decodierungsprozess wird zusätzlich dadurch erschwert, dass die Mikrokügelchen sich durch Konvektion bewegen oder aggregieren können. Schon geringfügige Unebenheiten der Oberfläche führen dazu, dass sich einige Partikel der Beobachtung entziehen, und um dies auszugleichen, müssen Bilder mehrfach aufgenommen werden. Auf viele dieser Hindernisse stießen Coleman und Mitarbeiter, als sie versuchten, Luminex-Mikrokügelchen auf einer planaren Oberfläche zu analysieren.<sup>[2]</sup> Die meisten graphischen Methoden detektieren Reportermoleküle noch über die Photolumineszenz, sodass Bildgebungssysteme mehr kosten als einfache Photolumineszenzsysteme. Für einige dieser Probleme ist derzeit keine Lösung in Sicht, aber die erforderliche Technologie entspricht derjenigen, die gerade für die biometrische Erkennung und ähnliche Anwendungen entwickelt wird. In dieses Gebiet werden Milliarden Dollar investiert, sodass für die kommenden Jahre deutliche Fortschritte zu erwarten sind.

## 9. Zweidimensionale Anordnungen optisch codierter Mikrokügelchen

Oligonukleotid-Mikroanordnungen können durch lichtgesteuerte kombinatorische Synthese (Affymetrix, Inc., Santa Clara, USA)<sup>[68]</sup> oder schnelles automatisiertes Prägen aufgebaut werden.<sup>[69]</sup> Bei einer Alternativmethode von Illumina, Inc. (San Diego, USA) werden oligonukleotidfunktionalisierte Mikrokügelchen zufällig in Mikrovertiefungen verteilt, die in Mustern auf die Spitzen optischer Fasern geätzt sind.<sup>[70–72]</sup> Bilder können nicht durch übliche optische Fasern übertragen werden, da so die räumliche Auflösung verloren geht. Für Bildgebungsanwendungen werden Bündel von großen optischen Fasern verschmolzen und zu einem Faserstrang ausgezogen, der genau so organisiert ist wie das ursprüngliche Bündel, aber einen deutlich geringeren Durchmesser hat. Ein typischer Strang besteht aus 50000 einzelnen Fasern von etwa 5 µm Durchmesser. Jede einzelne Faser überträgt ein eigenes Signal, sodass das Bild Pixel für Pixel aufgebaut werden kann, wenn der Strang mit einem Mikroskop oder einer CCD-Kamera verbunden ist. Die einzelnen Fasern bestehen aus zwei unterschiedlichen Glasarten, was die selektive Entfernung des Faserkerns mit gepufferter Fluorwasserstoffsäure ermöglicht. Unter bestimmten Ätzbedingungen können Mikrovertiefungen definierter Größe erzeugt werden.

Pipettiert man oligonucleotidfunktionalisierte Mikrokügelchen als Ethanoluspension auf einen geätzten Faserstrang, dann sammeln sie sich in den Vertiefungen. Nach Abwischen der überzähligen Mikrokügelchen erhält man Oligonucleotidanordnungen, die viel dichter sind als automatisch getüpfelte Gitter. Dank ihrer Gesamtgröße von etwa 1.4 mm eignen sie sich für sehr kleine Probenvolumina. Das Hauptproblem besteht in der zufälligen Verteilung der oligonucleotidfunktionalisierten Mikrokügelchen, wegen der die Anordnung vor dem Einsatz zunächst decodiert werden muss. Zuerst wurden die Mikrokügelchen dafür optisch codiert, doch dieser Ansatz scheiterte an Schwankungen in der Kügelchenqualität.<sup>[70,71]</sup> Ein neues Codierungsschema beruht auf der sequenziellen Hybridisierung fluoreszierender Oligonukleotide mit der Mikroanordnung.<sup>[73]</sup> Diese zeitaufwändige Methode benötigt große Mengen synthetischer Oligonukleotide, dafür kann allerdings eine einmal decodierte Mikroanordnung oft wieder verwendet werden. Auf einer planaren Oberfläche erzeugte Zufallsanordnungen optisch codierter Mikrokügelchen mit Erkennungsmolekülen finden sich noch immer im BeadChip-System (BioArray Solutions Ltd., USA).<sup>[74]</sup> Die Mikrokügelchen werden decodiert, während die an sie gebundenen Zielmoleküle detektiert werden.

## 10. Perspektiven von Suspensionssystemen

Zu Beginn dieses Aufsatzes haben wir als Ziel für den Einsatz codierter Suspensionssysteme vorgegeben, die Vorteile von Mikrokügelchen in Mehrfachanalysen nutzbar zu machen. Viele Vorteile gegenüber planaren Testanordnungen resultieren aus dem Herstellungsverfahren. Die Synthese in vergleichsweise großem Maßstab gewährt eine Reproduzierbarkeit, die mit planaren Testanordnungen nicht möglich ist. Die erste Frage bei der Bewertung eines Suspensionssystems betrifft daher die Reproduzierbarkeit der Synthese großer Mengen an Mikrokügelchen – ist diese nicht erreichbar, so scheiden die betrachteten Partikel für die Mehrfachdetektion aus.

Die Wechselwirkung zwischen Mikrokügelchen und Zielmolekülen folgt nahezu der Kinetik einer Flüssigphasenreaktion; dies erleichtert auch die Trenn- und Waschschritte. Weil die Mikrokügelchen für eine effiziente Reaktion mit der Probe suspendiert bleiben müssen, sind auch ihre Absitzdauern zu berücksichtigen (Tabelle 1). Große Partikel und/oder Partikel mit hoher Dichte setzen sich binnen Sekunden oder Minuten ab und müssen durch kräftiges Rühren in Suspension gehalten werden, was aber die Sonden- und Zielmoleküle – oder gar die Partikel selbst – beschädigen kann. Bei der Bewertung eines Suspensionssystems ist stets die Reaktionskinetik einzubeziehen. Mikrokügelchenkonjugate sind nach spätestens 30 Minuten mit ihren Zielmolekü-

**Tabelle 1:** Physikalische Parameter für unterschiedliche Mikropartikel.

Durchmesser [μm]	Material	Absitzdauer <sup>[a]</sup>	Platzbedarf für 20000 Mikrokügelchen [μL]	Zentrifugierdauer
0.1	Polystyrol	1 Jahr	0.00000002	4 Stunden
1	Polystyrol	4 Tage	0.00002	144 Sekunden
10	Polystyrol	1 Stunde	0.02	<1 Sekunde
100	Polystyrol	1 Minute	20	–
1000	Polystyrol	0.5 Sekunden	20 000	–
10	Gold	10 Sekunden	–	–
10	Aluminium	2 Minuten	–	–
10	Siliciumoxid	3 Minuten	–	–

[a] Über einen Abstand von 1 cm unter Einfluss der Schwerkraft.

len im Gleichgewicht, und für Partikel in einem Suspensionssystem sollte dies als Richtwert gelten.

Der Trend zur Miniaturisierung hat die Entwicklung von Testsystemen vorangetrieben, die immer mehr molekulare Information aus immer kleineren Probenvolumina gewinnen sollen. Mehrfachanalysen mit dem Luminex-System werden gewöhnlich auf 384er-Filterplatten ausgeführt. Eine 100fach-Analyse benötigt etwa 20000 Mikrokügelchen pro Vertiefung bei einem Arbeitsvolumen von etwa 20 μL. Tabelle 1 zeigt, wie das Minimalvolumen für 20000 Mikrokügelchen mit deren Durchmesser ansteigt. Beträgt der Durchmesser 10 μm, so besetzen sie 0.1 % des Arbeitsvolumens in der Vertiefung, 100-μm-Mikrokügelchen füllen aber bereits das gesamte Arbeitsvolumen aus. Auch wenn man nur ein Zehntel der 100-μm-Mikrokügelchen einsetzt, so werden immer noch 10 % des Arbeitsvolumens beansprucht, und die Mikrokügelchen könnten unter diesen Bedingungen nicht effizient mit der Probe wechselwirken.

Aufgrund der bisherigen Überlegungen sollten ideale Partikel für Mikrokügelchensystem aus einem Material niedriger Dichte bestehen und so klein wie nötig sein, um Sondenmoleküle zu tragen. Für praktische Anwendungen muss die Dichte etwas oberhalb derjenigen von Wasser liegen, damit die Kügelchen nicht auf der Lösung schwimmen, und die Mindestgröße ergibt sich aus den Anforderungen der Trenn- und Waschschritte, die bei den meisten Mikrokügelchenanalysen durchlaufen werden. Der Trennprozess sollte idealerweise schnell und effizient sein und unter milden Bedingungen ablaufen, um keine Mikrokügelchen einzubüßen. Die wichtigsten Methoden sind Zentrifugieren, Filtrieren und magnetische Trennverfahren. Tabelle 1 zeigt den Einfluss des Mikrokügelchendurchmessers auf die Zeit, die zum Zentrifugieren bei 10 000 g benötigt wird. (Der Prozess kann durch höhere Zentrifugiergeschwindigkeiten beschleunigt werden, doch riskiert man dadurch eine irreversible Verklumpung der Mikrokügelchen.) Insbesondere sehr kleine Partikel setzen sich beim Zentrifugieren nur schwer ab. Bei Filtrationen sollte der Filter alle Mikrokügelchen zurückhalten und alle weiteren Moleküle schnell und effizient mit der Lösung entfernen. Dies setzt voraus, dass die Mikrokügelchen deutlich größer sind als Reportermoleküle wie Antikörper, deren hydrodynamisches Volumen demjenigen eines 10-nm-Partikels entspricht. Magnetische Trennverfahren beruhen auf der Anziehung zwischen paramagnetischen

Nanopartikeln und einem Magnet. Einzelne paramagnetische Nanopartikel benötigen zwar starke Felder zur schnellen Abtrennung, aber käufliche magnetische Mikrokügelchen können mit billigen Magnetfallen binnen Minuten abgetrennt werden, da jedes Mikrokügelchen viele Nanopartikel enthält. Die Mindestgröße für magnetische Mikrokügelchen ergibt sich aus dem minimalen Platzbedarf der Zahl an paramagnetischen Nanopartikeln, die für eine schnelle Trennung erforderlich ist.

Mikrokügelchen für Mehrfachanalysen sollten also aus einem Material bestehen, dessen Dichte etwas oberhalb derjenigen von Wasser liegt, und ihre Größe sollte ungefähr einen Mikrometer betragen; einerseits könnten sie so effizient mit kleinen Probenvolumina wechselwirken, andererseits wären sie unter relativ milden Bedingungen abtrennbar und waschbar. Die meisten Mikrokügelchen für Biomolekülanalysen bestehen gemäß Herstellerangaben aus Polystyrol (relative Dichte 1.05) und haben 0.3–10 µm Durchmesser. Vielversprechende Partikel für Mehrfachanalysen sollten die Eigenschaften bewährter Mikrokügelchen aufweisen, sie müssen jedoch auch groß genug sein, um einen Code zu tragen. Einige codierte Partikel – etwa die 5.5-µm-Polystyrolkügelchen von Luminex – verfügen über diese Eigenschaften, viele andere sind aber zu groß und/oder zu schwer für erfolgreiche Mehrfachanalysen. Dazu kommt die Frage der Herstellung: Mikrokügelchen können in großer Menge und reproduzierbar erhalten und mit Sondenmolekülen verknüpft werden. Alternative Mikropartikel dürfen in diesen Punkten nicht nachstehen, aber die Reproduzierbarkeit bei der Herstellung in großem Maßstab wurde oft zu wenig beachtet, und diesbezügliche Verbesserungen bereiten oft Probleme. Für absehbare Zeit werden Suspensionssysteme daher vermutlich auf optisch codierte Latexmikrokügelchen setzen. Die wichtigste Aufgabe ist nun, die Zahl codierter Mikrokügelchen zu erhöhen, die unter Hochdurchsatzbedingungen unterschieden werden können.

Mit Photolumineszenzfarbstoffen oder Nanopartikeln können  $C = N^{m-1}$  unterschiedliche optische Codes erhalten werden (siehe Abschnitt 3, „Optisches Codieren“). Fünf Farben in sechs Intensitäten ergäben theoretisch nahezu 8000 Codes, praktisch ist eine solche Vielfalt aber nicht annähernd zugänglich. Die größten Probleme bereiten die reproduzierbare Synthese von Mikrokügelchen mit mehreren Farben in verschiedenen Intensitäten und der Preis von Decodierungssystemen, die schon geringe Intensitätsunterschiede schnell genug für eine Hochdurchsatzdetektion auflösen können.

Realistischer erscheint ein Ansatz, der sich ausschließlich auf unterschiedliche Farben beschränkt, die jeweils für eine Stelle eines Binärcodes stehen. Insgesamt ergäben sich  $2^n$  Codes für  $n$  Farben, und mit zwölf Farben wäre man bereits bei 4000 Codes. Diese Zahl könnte sich bereits mit einigen Mikroanordnungen messen, doch müssen zunächst die entsprechenden Codierungselemente gefunden werden, und ein Herstellungsverfahren für große Mengen so vieler verschiedener codierter Mikrokügelchen fehlt auch noch. Es ist wahrscheinlicher, dass Suspensionssysteme zunächst zur Untersuchung kleiner Untergruppen von Zielmolekülen eingesetzt werden, die zuvor mithilfe zweidimensionaler Anordnungen identifiziert wurden, da Mikrokügelchen flexibler und

billiger sind und bessere quantitative Ergebnisse liefern. Für solche Mehrfachanalysen genügt es, wenn einige Hundert, und nicht mehrere Tausend, Analyten getrennt werden können. Suspensionssysteme, die diese Anforderungen erfüllen, werden wahrscheinlich schon in wenigen Jahren zur Verfügung stehen.

Eingegangen am 23. Januar 2006  
Online veröffentlicht am 29. August 2006

Übersetzt von Dr. Volker Jacob, Mannheim

- [1] M. B. Meza, *Drug Discovery Today* **2000**, 1 (HTS Suppl.), 38–41.
- [2] R. S. Rao, S. R. Visuri, M. T. McBride, J. S. Albala, D. L. Matthews, M. A. Coleman, *J. Proteome Res.* **2004**, 3, 736–742.
- [3] M. C. O. Probst, G. Rothe, G. Schmitz, *J. Lab. Med.* **2003**, 27, 182–187.
- [4] K. Braeckmans, S. C. De Smedt, M. Leblans, R. Pauwels, J. Demeester, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, 1, 447–456.
- [5] N. H. Finkel, X. H. Lou, C. Y. Wang, L. He, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 353 A–359 A.
- [6] P. Fortina, L. J. Kricka, S. Surrey, P. Grodzinski, *Trends Biotechnol.* **2005**, 23, 168–173.
- [7] K. Braeckmans, *Mod. Drug Discovery* **2003**, 6, 28–32.
- [8] D. A. A. Vignali, *J. Immunol. Methods* **2000**, 243, 243–255.
- [9] K. L. Kellar, M. A. Iannone, *Exp. Hematol.* **2002**, 30, 1227–1237.
- [10] K. L. Kellar, J. P. Douglass, *J. Immunol. Methods* **2003**, 279, 277–285.
- [11] Z. Lukacs, A. Dietrich, R. Ganschow, A. Kohlschutter, R. Kruithof, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2005**, 43, 141–145.
- [12] J. D. Hurley, L. J. Engle, J. T. Davis, A. M. Welsh, J. E. Landers, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, e186.
- [13] R. Bellisario, R. J. Colinas, K. A. Pass, *Clin. Chem.* **2000**, 46, 1422–1424.
- [14] Y. Luo, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2005**, 7, 251–255.
- [15] L. Edelmann, G. Hashmi, Y. H. Song, Y. Han, R. Kornreich, R. J. Desnick, *Genet. Med.* **2004**, 6, 431–438.
- [16] G. S. Whitehead, J. K. L. Walker, K. G. Berman, W. M. Foster, D. A. Schwartz, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2003**, 285, L32–L42.
- [17] X. Yan, W. Zhong, A. Tang, E. G. Schielke, W. Hang, J. P. Nolan, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 7673–7678.
- [18] M. T. McBride, S. Gammon, M. Pitesky, T. W. O'Brien, T. Smith, J. Aldrich, R. G. Langlois, B. Colston, K. S. Venkateswaran, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 1924–1930.
- [19] E. Morgan, R. Varro, H. Sepulveda, J. A. Ember, J. Apgar, J. Wilson, L. Lowe, R. Chen, L. Shivraj, A. Agadir, R. Campos, D. Ernst, A. Gaur, *Clin. Immunol.* **2004**, 110, 252–266.
- [20] A. Tarnok, J. Hambisch, R. Chen, R. Varro, *Clin. Chem.* **2003**, 49, 1000–1002.
- [21] J. Dasso, J. Lee, H. Bach, R. G. Mage, *J. Immunol. Methods* **2002**, 263, 23–33.
- [22] A. J. Sutherland, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2002**, 6, 365–370.
- [23] W. C. W. Chan, D. J. Maxwell, X. H. Gao, R. E. Bailey, M. Y. Han, S. M. Nie, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 40–46.
- [24] P. O'Brien, S. S. Cummins, D. Darcy, A. Dearden, O. Masala, N. L. Pickett, S. Ryley, A. J. Sutherland, *Chem. Commun.* **2003**, 2532–2533.
- [25] Y. Li, E. C. Y. Liu, N. Pickett, P. J. Skabara, S. S. Cummins, S. Ryley, A. J. Sutherland, P. O'Brien, *J. Mater. Chem.* **2005**, 15, 1238–1243.
- [26] X. H. Gao, W. C. W. Chan, S. M. Nie, *J. Biomed. Opt.* **2002**, 7, 532–537.

- [27] M. Y. Han, X. H. Gao, J. Z. Su, S. Nie, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 631–635.
- [28] X. H. Gao, S. M. Nie, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2406–2410.
- [29] H. X. Xu, M. Y. Sha, E. Y. Wong, J. Uphoff, Y. H. Xu, J. A. Treadway, A. Truong, E. O'Brien, S. Asquith, M. Stubbins, N. K. Spurr, E. H. Lai, W. Mahoney, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, e43.
- [30] B. J. Egner, S. Rana, H. Smith, N. Bouloc, J. G. Frey, W. S. Brocklesby, M. Bradley, *Chem. Commun.* **1997**, 735–736.
- [31] M. C. Needels, D. G. Jones, E. H. Tate, G. L. Heinkel, L. M. Kochersperger, M. M. Dower, R. W. Barrett, M. A. Gallop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10700–10704.
- [32] Z. J. Ni, D. Maclean, C. P. Holmes, M. M. Murphy, B. Ruhland, J. W. Jacobs, E. M. Gordon, M. A. Gallop, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1601–1608.
- [33] M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asoline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10922–10926.
- [34] L. Grøndahl, B. J. Battersby, D. Bryant, M. Trau, *Langmuir* **2000**, *16*, 9709–9715.
- [35] B. J. Battersby, D. Bryant, W. Meutermans, D. Mathews, M. L. Smythe, M. Trau, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2138–2139.
- [36] M. Trau, B. J. Battersby, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 975–979.
- [37] B. J. Battersby, G. A. Lawrie, M. Trau, *Drug Discovery Today* **2001**, *6* (HTS Suppl.), S19–S26.
- [38] A. Van Blaaderen, A. Vrij, *Langmuir* **1992**, *8*, 2921–2931.
- [39] G. A. Lawrie, B. J. Battersby, M. Trau, *Adv. Funct. Mater.* **2003**, *13*, 887–896.
- [40] W. Yang, D. Trau, R. Renneberg, N. T. Yu, F. J. Caruso, *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *234*, 356–362.
- [41] D. Y. Wang, A. L. Rogach, F. Caruso, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 857–861.
- [42] P. Schuetz, F. Caruso, *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 4509–4516.
- [43] J. F. Keij, J. A. Steinkamp, *Cytometry* **1998**, *33*, 318–323.
- [44] J. M. Kürner, I. Klimant, C. Krause, E. Pringsheim, O. S. Wolfbeis, *Anal. Biochem.* **2001**, *297*, 32–41.
- [45] H. Fenniri, L. H. Ding, A. E. Ribbe, Y. Zyrianov, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8151–8152.
- [46] W. E. Doering, S. M. Nie, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6171–6176.
- [47] R. Jin, Y. C. Cao, C. S. Thaxton, C. A. Mirkin, *Small* **2006**, *2*, 375–380.
- [48] F. Cunin, T. A. Schmedake, J. R. Link, Y. Y. Li, J. Koh, S. N. Bhatia, M. J. Sailor, *Nat. Mater.* **2002**, *1*, 39–41.
- [49] O. Siiman, K. Gordon, A. Burshteyn, J. A. Maples, J. K. White-sell, *Cytometry* **2000**, *41*, 298–307.
- [50] J.-M. Nam, C. S. Thaxton, C. A. Mirkin, *Science* **2003**, *301*, 1884–1886.
- [51] B.-K. Oh, J.-M. Nam, S. W. Lee, C. A. Mirkin, *Small* **2006**, *2*, 103–108.
- [52] N. P. Gerry, N. E. Witowski, J. Day, R. P. Hammer, G. Barany, F. Barany, *J. Mol. Biol.* **1999**, *292*, 251–262.
- [53] M. J. Dejneca, A. Streltsov, S. Pal, A. G. Frutos, K. Yost, P. K. Yuen, U. Muller, J. Lahiri, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 389–393.
- [54] S. R. Nicewarner-Peña, R. G. Freeman, B. D. Reiss, L. He, D. J. Peña, I. D. Walton, R. Cromer, C. D. Keating, M. J. Natan, *Science* **2001**, *294*, 137–141.
- [55] B. D. Reiss, R. G. Freeman, I. D. Walton, S. M. Norton, P. C. Smith, W. G. Stonas, C. D. Keating, M. J. Natan, *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *522*, 95–103.
- [56] I. D. Walton, S. M. Norton, A. Balasingham, L. He, D. F. Oviso, D. Gupta, P. A. Raju, M. J. Natan, R. G. Freeman, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2240–2247.
- [57] C. D. Keating, M. J. Natan, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 451–454.
- [58] A. Dames, J. England, E. Colby, WO Patent 00/16893, **2000**.
- [59] K. Braeckmans, S. C. De Smedt, C. Roelant, M. Leblans, R. Pauwels, J. Demeester, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 169–173.
- [60] M. Evans, C. Sewter, E. Hill, *Assay Drug Dev. Technol.* **2003**, *1*, 199–207.
- [61] E. J. Moran, S. Sarshar, J. F. Cargill, M. M. Shahbaz, A. Lio, A. M. M. Mjalli, R. W. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10787–10788.
- [62] K. C. Nicolaou, X. Y. Xiao, Z. Parandoosh, A. Senyei, M. P. Nova, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2476–2479; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2289–2291.
- [63] W. Mandecki, M. G. Pappas, N. Kogan, Z. Y. Wang, B. Zalimlynny, *ACS Symp. Ser.* **2002**, *815*, 57–69.
- [64] M. J. Benecky, D. R. Post, S. M. Schmitt, M. S. Kochar, *Clin. Chem.* **1997**, *43*, 1764–1770.
- [65] L. Bonetta, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 785–794.
- [66] L. Reeve, D. A. Rew, *Eur. J. Surg. Oncol.* **1997**, *23*, 98–108.
- [67] G. Woltmann, A. J. Wardlaw, D. A. Rew, *Cytometry* **1998**, *33*, 362–365.
- [68] S. P. A. Fodor, *Science* **1997**, *277*, 393–395.
- [69] R. P. Auburn, D. P. Kreil, L. A. Meadows, B. Fischer, S. S. Maitta, S. Russell, *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 374–379.
- [70] J. A. Ferguson, F. J. Steemers, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5618–5624.
- [71] D. R. Walt, *Science* **2000**, *287*, 451–452.
- [72] D. R. Walt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 689–695.
- [73] K. L. Gunderson, M. S. Graige, F. Garcia, B. G. Kermani, C. F. Zhao, D. P. Che, T. Dickinson, E. Wickam, J. Bierle, D. Doucet, M. Milewski, R. Yang, C. Siegmund, J. Haas, L. X. Zhou, A. Oliphant, J. B. Fan, M. S. Chee, *Genome Res.* **2004**, *14*, 870–877.
- [74] G. Hashmi, T. Shariff, M. Seul, P. Vissavajjhala, K. Hue-Roye, C. Lomas-Francis, A. Chaudhuri, M. E. Reid, *Transfusion* **2005**, *45*, 680–688.