

von Dielektrika geht, ist aber dann streng genommen keine elektrochemische Methode mehr.

Tatsächlich gibt es aber auch impedimetrische Sensoren, die zu den elektrochemischen Sensoren gehören, weil bei ihnen Elektrodenvorgänge zur Quelle des Signals werden. Dazu gehören insbesondere Biosensoren mit selbstorganisierenden Monolagen, die im folgenden Kapitel ausführlicher betrachtet werden (Knichel et al. 1995 und Rickert et al. 1996).

7.4 Elektrochemische Biosensoren

7.4.1 Grundlagen

Biologische Erkennung als Selektivitätsprinzip

Biosensoren sind nach der gültigen Definition (Kap. 1, Abschn. 1.2) dadurch gekennzeichnet, daß die Rezeptorfunktion von biologisch aktiven Stoffen übernommen wird, die andere Stoffe *selektiv biologisch* zu erkennen vermögen. Dieser *biologischen Erkennung* liegt fast immer das *Schloß-Schlüssel-Prinzip* zugrunde, d.h. Moleküle werden im wesentlichen nach ihrer Form identifiziert.

Die Selektivität von Biosensoren ist erstaunlich. Bioaktive Stoffe können eine ganz bestimmte Substanz in einer Matrix aus Millionen anderer Stoffe zuverlässig erkennen.

Biosensoren arbeiten entweder als *biokatalytische Sensoren* oder als *Bioaffinitäts-Sensoren*. Bei den biokatalytischen Sensoren werden in den meisten Fällen *Enzyme* als selektive Katalysatoren an einer Elektrodenoberfläche fixiert. Das Enzym katalysiert eine langsame Reaktion. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist ein Maß für die Konzentration des *Substrates* (der in der Reaktion umgesetzten Probesubstanz). Man kann die Reaktionsgeschwindigkeit in Form eines Elektrolysestroms in den *amperometrischen Biosensoren* messen. Ein anderer Weg besteht darin, das in der katalysierten Reaktion entstehende Produkt anzuzeigen, wie dies in den *potentiometrischen Biosensoren* getan wird. Die Bioaffinitäts-Sensoren binden meist sehr fest die Probemoleküle, d.h. es bildet sich ein Komplex, der an der Sensoroberfläche fixiert bleibt. Das Ausmaß dieser Komplexbildung ist ein Maß für die Probekonzentration. Es kann indirekt gemessen werden, weil durch die Bildung des Komplexes viele Eigenschaften der Elektrode verändert werden. In Bioaffinitätssensoren wird z.B. die Antikörper-Antigen-Reaktion genutzt. Ein anderes Beispiel sind Sensoren mit Nucleinsäuren.

Immobilisierung bioaktiver Substanzen

Biologisch aktive Substanzen, die als Rezeptoren dienen sollen, müssen an der Elektrodenoberfläche immobilisiert werden. Es gibt gewisse Unterschiede, je nachdem, ob Bioaffinitätssensoren oder biokatalytische Sensoren realisiert werden sollen. Unterschiedlich sind auch die Anforderungen an potentiometrische und an

amperometrische Sensoren. Potentiometrische Sensoren dürfen hochohmiger sein als amperometrische, bei denen die Leitfähigkeit der Rezeptorschicht eine wichtige Rolle spielt. Dennoch haben sich einige gemeinsame Strategien als besonders geeignet erwiesen.

Adsorption ist die einfachste Möglichkeit, bioaktive Substanzen an Elektrodenoberflächen zu fixieren. An der Bindung sind in den meisten Fällen nur schwache Kräfte beteiligt, daher entstehen wenig beständige Sensoren. Adsorption eignet sich für die Immobilisierung von Enzymen, Antikörpern und Nucleinsäuren.

Oftmals genügt ein einfacher Kontakt der Elektrodenoberfläche mit der Lösung der aktiven Substanz, um eine brauchbare Adsorptivschicht zu erzeugen. Dies gilt besonders für kohlehaltige Oberflächen. Es kommt allerdings auch vor, daß die sich mit Kohlenstoff ausbildende adsorptive Bindung die Funktion des Enzyms beeinträchtigt, so daß es deaktiviert wird. In einigen Fällen kommt es zur Denaturierung. Adsorption hat den Vorteil, daß keine weiteren Reagenzien notwendig sind. Locker adsorbierte Moleküle gehen nach und nach durch Desorption verloren. Elektroden mit Adsorptivschichten haben meist nur experimentellen Charakter. Sie eignen sich gut für schnelle Tests.

Enzyme, Antikörper, Nucleinsäuren und andere bioaktive Substanzen können über *kovalente chemische Bindungen* an Festkörperoberflächen geknüpft werden. Eine solche Kopplung führt, ähnlich wie die Adsorption, zu Monoschichten, die unmittelbar an der Elektrodenoberfläche anliegen. Im Gegensatz zur Adsorption wird aber eine sehr feste Bindung erreicht. Elektroden mit chemisch gebundenen Molekülen gehören daher zu den stabilsten. Die Bindung erfolgt in zwei Schritten. Zunächst muß die Elektrodenoberfläche so vorbereitet werden, daß geeignete Ankergruppen vorhanden sind. Meist werden nucleophile Gruppen erzeugt, also Carboxyl-, Aminosäure-, Hydroxyl-, Thiol- und phenolische Gruppen. Nach dem chemischen Aktivierungsschritt wird die aktive Substanz an die Oberflächengruppe gebunden. Metallische Oberflächen verlangen andere Schritte als Kohleoberflächen.

Die synthetischen Möglichkeiten zur kovalenten Bindung von Enzymen sind begrenzt. Wegen des hohen synthetischen Aufwandes sind bisher nur wenige kommerzielle Anwendungen bekannt.

Eine besondere Möglichkeit zur kovalenten Bindung von Enzymen ergibt sich aus der inzwischen hochentwickelten Technologie der *selbstorganisierenden Monolagen* (*Self Assembled Monolayers; SAM*), deren Grundlagen im Kap. 2, Abschn. 2.3. behandelt wurden. Ursprünglich wurden in einer komplizierten Reaktionsfolge (Willner et al. 1993) Goldelektroden funktionalisiert. Eine Alkylkette, die über ihre SH-Gruppe an die Goldoberfläche gebunden war, trug am anderen Ende eine Aminogruppe, die über Kopplungsreagenzien mit einem Enzym verknüpft wurde. Darüber konnten Mehrfachlagen aus weiteren Enzymmolekülen errichtet werden, mit denen zudem noch der Mediator Ferrocen kovalent verknüpft wurde.

Obwohl der erste Schritt bei der Bildung von SAMs meist als Adsorption bezeichnet wird, handelt es sich tatsächlich um die Ausbildung einer sehr stabilen kovalenten Bindung. Dementsprechend sind Enzymelektroden auf der Basis

selbstorganisierender Monolagen recht belastbar. Sensoren basieren oft auf Goldschichten, die in Dünnschichttechnik hergestellt wurden.

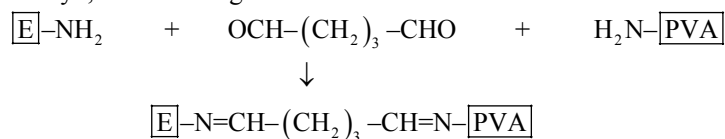
Die *Einbettung in Kohlepasten* oder *leitfähige organische Salze* eignet sich als Immobilisierungsmethode für viele bioaktive Substanzen. Die meisten dieser Moleküle, wie etwa die Enzyme und die Antikörper, sind Eiweißstoffe. Diese Substanzen, aber ebenso auch ganze biologische Zellen und Mikroorganismen, sind hinreichend hydrophob, um sie als Beimengungen in Kohlepasten einzubringen. Solche Pasten werden aus Kohlepulvern (Graphit-, Spektralkohle- und Glaskohlepartikel) mit einem organischen nicht wasserlöslichen Bindemittel (Paraffinöl, Silikonöl u.a.) gemischt und zum Gebrauch in ein Rohr gepreßt, das an der Rückseite mit einem metallischen Kontakt versehen ist. Kohlepasten sind universell für die verschiedensten biologisch aktiven Partikel und Substanzen verwendbar, sogar kleine tierische *Organe* können damit an Elektroden fixiert werden. Die Wirkungsweise ist ähnlich wie bei kompakten Kohleelektroden, die mit einer Adsorptionsschicht bedeckt sind, denn man kann auch bei den Partikeln in der Paste davon ausgehen, daß zwischen der aktiven Substanz und der Kohleoberfläche eine adsorptive Bindung aufgebaut wird. Die Wirkung der Kohlepartikel kann selektiver gestaltet werden, wenn man sie vorher metallisiert (Wang et al, 1995).

Alternativ zu Kohlepasten wurden auch leitende organische Salze zum Einschluß bioaktiver Komponenten, insbesondere zur Bindung von Enzymen verwendet. Der Redoxmediator Tetrathiafulvalen (TTF) wirkt als Elektronendonator und bildet mit dem Akzeptor Tetracyanochinodimethan (TCNQ) ein festes, leicht schmelzbares Salz, das sich mit Proteinen und anderen Stoffen zu einer Paste vernetzen läßt. Dieses „Bindemittel“ erfüllt zugleich die Funktion eines Mediators (Bartlett 1990).

Der *Einschluß in Polymere oder Hydrogele* wird häufig zur Fixierung von biologisch aktiven Molekülen oder von Mikroorganismen verwendet. Polymerschichten lassen sich leicht auf Festkörperoberflächen aufbringen. Auf Grund ihrer Eigenschaften können sie als Lösungsmittel für aktive Substanzen wirken, ebenso können sie aber auch große Moleküle, Zellen und Mikroorganismen einhüllen und so gewissermaßen auf der Oberfläche festkleben. Nachteilig ist ihre geringe Leitfähigkeit, die aber durch den Zusatz leitfähiger Partikel u.ä. gemildert werden kann. Ein weiterer Nachteil ist, daß sie relativ wenig Wasser aufnehmen können. Dieses Problem wirkt sich besonders bei amperometrischen Enzymelektroden aus. Enzyme brauchen grundsätzlich Wasser, um ihre Wirkung entfalten zu können.

Zur Fixierung von Enzymen sind Hydrogele sehr gut geeignet. Sie können bis zu 98% Wasser enthalten. Diese Art der Immobilisierung ist eine der ältesten und wurde zuerst bei potentiometrischen Enzymelektroden angewandt. Gele aus Gelatine und Alginaten (letztere besonders mit calciumhaltigen Seitenketten) wurden verwendet, sehr häufig auch die synthetischen Gele Polyacrylamid und Polyvinylalkohol (PVA). Für amperometrische Elektroden gibt es außer der geringen Leitfähigkeit das Problem, daß die Diffusion des Substrates (der Probe) innerhalb der Gelmatrix sehr langsam ist, so daß hohe Ansprechzeiten zustandekommen. Ein weiteres Problem ist der ständige Verlust an Enzym durch Auswaschung. Durch *Quervernetzung* des Enzyms mit der Matrix läßt sich dieser Verlust minimieren. Die entstehenden Aggregate werden dann unlöslich und bleiben in der Matrix, oh-

ne daß die Wirksamkeit leidet. Ein viel verwendetes Vernetzungsreagens ist Glutaraldehyd, das nach folgendem Schema funktioniert:



Es ist sogar möglich, eine Schicht aus quervernetzten Enzymmolekülen allein, ohne zusätzliche Bindemittel, auf einer Elektrodenoberfläche zu erzeugen.

Als Mittel gegen das Auswaschen der Enzyme ist es auch üblich, permselektive Membranen über die Gelschicht zu spannen. Dialysemembranen (meist Folien aus Celluloseacetat) sind prädestiniert für diesen Zweck. Sie lassen kleine Moleküle und Ionen fast ungehindert passieren, halten aber die voluminösen Eiweißmoleküle, also auch Enzyme, zurück.

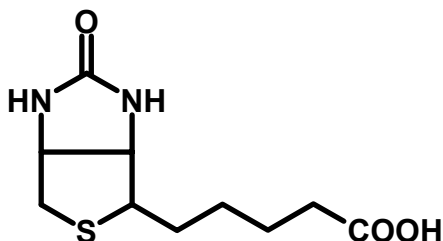


Abb. 7.27 Biotin

Selbstverständlich sind auch *Elektropolymerisate* sehr häufig für Biosensoren eingesetzt worden. Tatsächlich hat die Entwicklung derartiger Schichten besonders im Zusammenhang mit amperometrischen Biosensoren ihren entscheidenden Anstoß bekommen. In erster Linie sind Enzyme auf diesem Wege gebunden worden, und zwar entweder durch Einbetten in die Polymermatrix oder durch Ankopplung an zuvor mit Aminogruppen funktionalisierte Polymeroberflächen. Durch Quervernetzung mit Glutaraldehyd wird bei den eingebetteten Molekülen eine weitere Verbesserung der Stabilität erreicht.

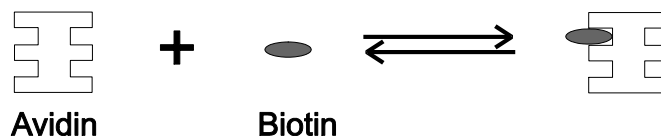


Abb. 7.28 Prinzip der Avidin-Biotin-Reaktion

Eine besondere Art der kovalenten Fixierung, die ausschließlich für Biosensoren Verwendung findet, ist die *Avidin-Biotin-Reaktion*. Bei dieser Reaktion wird

ein niedermolekularer Stoff von einem hochmolekularen gewissermaßen eingeschlossen.

Avidin ist ein hochmolekulares Protein aus dem Weißei (Albumin). Alternativ kann *Streptavidin* aus *Streptomyces* verwendet werden. Ein Avidin-Molekül kann bis zu 4 Biotinmoleküle (Abb. 7.27) binden. Die Bindung ist stark und auch gegen extreme pH-Werte unempfindlich. Avidin braucht nur das bicyclische Ringsystem des Biotins, deshalb kann dessen Carboxyl-Seitengruppe für andere Verknüpfungen genutzt werden. Normalerweise wird die Transduktoroberfläche mit Avidin modifiziert. Das „biotinylierte“ Sondenmolekül wird dann mit der Oberfläche verknüpft. Eiweißmoleküle (Enzyme), aber auch Nucleinsäuren, lassen sich leicht biotinylieren.

Die Avidin-Biotin-Reaktion kann zur Verknüpfung mehrerer Moleküllagen übereinander ausgenutzt werden, indem sich Avidin und Biotin alternierend anordnen. Die Vielfalt der Möglichkeiten entsteht aus Kombinationen der in Abb. 7.28 schematisch angedeuteten einfachen Reaktion. Die Stabilität des gebildeten Avidin-Biotin-Komplexes ist sehr hoch.

7.4.2 Arten elektrochemischer Biosensoren

Enzymsensoren

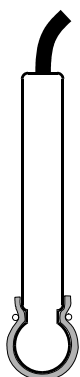
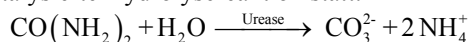


Abb. 7.29 Potentiometrischer Biosensor für Harnstoff mit Gel-gebundenem Enzym. Die Gelschicht befindet sich, gestützt durch Nylongewebe, an der Oberfläche einer ammoniumsensitiven Glaselektrode

Die ersten Biosensoren waren potentiometrische Enzymelektroden. Eine ionenselektive Elektrode wurde mit einer Enzymschicht versehen, die als Biokatalysator für die Umsetzung einer bestimmten Substanz diente. Das entstehende Reaktionsprodukt wurde von der ISE indiziert. Das Prinzip wurde sehr bald auf ISFETs übertragen. Gelegentlich wird für den enzymmodifizierten ISFET sogar ein eigener Begriff, ENFET, gebraucht. Es wurde versucht, auch andere biologische Wechselwirkungen, wie z.B. die *Antigen-Antikörper-Reaktion*, zur selektiven Erkennung von Analyten und zum Bau von potentiometrischen Sensoren nutzbar zu machen. Diese *immunologischen Sensoren* kann man IMFETs nennen. Es hat sich aber gezeigt, daß sich diese Wechselwirkungen besser im Zusammenwirken mit

anderen Wandlerprinzipien nutzen lassen. Potentiometrische Biosensoren sind daher auf einige wenige enzymatische Reaktionen beschränkt geblieben.

Einer der ältesten bekannten Biosensoren überhaupt war ein Harnstoffsensor (Guilbault u. Montalvo 1969). Wie Abb. 7.29 zeigt, wurde das Enzym Urease in einer Hydrogelschicht aus Polyacrylamid-Gel fixiert. Die Schicht befindet sich, gestützt von einem Nylonnetz, in Kontakt mit einer Glaselektrode. Harnstoff diffundiert aus der Probelösung in das Gel. Dort findet eine vom Enzym katalysierte Hydrolysereaktion statt:



Die Produkte Carbonat und Ammonium verändern den pH-Wert, so daß aus der Potentialänderung der Glaselektrode auf den Gehalt an Harnstoff geschlossen werden kann. Besser ist die von den Erfindern vorgeschlagene spezielle ammoniumsensitive Glaselektrode, deren Signal linear vom Logarithmus der Harnstoffkonzentration abhängt.

Potentiometrische Enzymsensoren werden in der Gegenwart hauptsächlich auf der Basis von ISFETs, also als ENFETs, hergestellt. Bei modernen Sensoren ist der Einschluß in Hydrogele nicht mehr gebräuchlich. Bevorzugt wird die kovalente Bindung, besonders an Kohleoberflächen, und die Einbettung in Polymerschichten, neuerdings vorzugsweise in elektrochemisch erzeugte Polymere. Weit verbreitet sind noch immer Schichten aus PVC mit speziellen Weichmachern (als Lösungsmittel für die aktiven Substanzen) sowie aus Silikongummi oder Polyurethan.

Tabelle 7.5 Potentiometrische Enzym-Biosensoren

Probe	Enzym	Reaktion	angez. Produkt
Harnstoff	Urease	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Urease}} \text{CO}_3^{2-} + 2 \text{NH}_4^+$	NH_4^+
Glucose	Glucoseoxidase	$\text{Glucose} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Glucoseoxidase}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Gluconolacton}$	H_2O_2
Glucose	Glucoseoxidase; Peroxidase	$\text{Glucose} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Glucoseoxidase}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Gluconolacton}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-Fluoranilin} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{F}^- + \text{Polymerprodukte}$	F^-
Neutrale Lipide	Lipase	$\text{Lipid} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Lipase}} \text{Glycerin} + \text{Fettsäuren} + \text{H}^+$	H_3O^+
Lactat	Lactoxidase	$\text{Lactat} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Lactoxidase}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Pyruvat}$	H_2O_2

Tabelle 7.5 gibt einige Beispiele für praktisch nutzbare potentiometrische Enzymsensoren. Es ist kein Zufall, daß besonders viele Typen für die Bestimmung von Glucose entwickelt wurden. Der medizinische Bedarf ist groß, weil man nach unkomplizierten Kontrollmöglichkeiten für den Blutzucker bei Zuckerkranken

sucht. In einem der Beispiele werden zwei Enzyme benutzt, die es am Ende gestatten, freigesetztes Fluorid an der Oberfläche eines fluoridsensitiven Lanthanfluorid-Einkristalls zu detektieren. H_3O^+ als Produkt wird mit pH-Elektroden, H_2O_2 mit Redoxelektroden (Edelmetalle oder Kohle) detektiert.

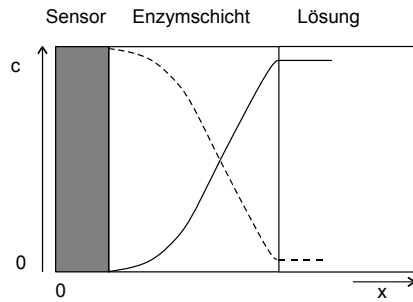


Abb. 7.30 Konzentrationsprofile im stationären Zustand an einem potentiometrischen Enzymsensor

Damit potentiometrische Enzymsensoren funktionieren können, muß sich bei der Messung eine stationäre Konzentration des gebildeten Reaktionsproduktes an der Elektrodenoberfläche ausbilden. Nach einer gewissen Einstellzeit (als *Ansprechzeit* meßbar) stellt sich ein stabiler Zustand ein, bei dem die Reaktionsgeschwindigkeit gleich dem Antransport des Analyten durch Diffusion geworden ist (Abb. 7.30) Die Konzentration des Reaktionsproduktes ist dann maximal an der Elektrodenoberfläche (Vadgama 1990). Die Konzentrationsverhältnisse in der Enzymschicht müssen so gestaltet werden, daß sich dieser Optimalzustand auch nach einem Wechsel der Probezusammensetzung wieder einstellen kann. Die Ansprechzeiten potentiometrischer Enzymsensoren sind sehr unterschiedlich. Sie liegen meist im Bereich einiger Minuten.

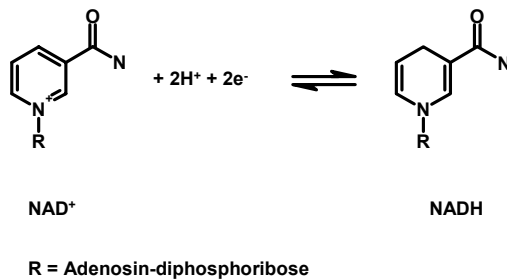
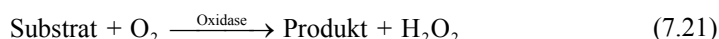


Abb. 7.31 Redoxgleichgewicht des Nicotinamid-Adenin-Dinucleotids

Amperometrische Enzymsensoren sind gegenwärtig die größte und wichtigste Gruppe unter den Biosensoren. Gegenüber den potentiometrischen Sensoren zeichnen sie sich durch eine meist wesentlich kürzere Ansprechzeit aus.

Die extreme Selektivität enzymatischer Reaktionen läßt sich amperometrisch am besten mit solchen Enzymen nutzen, die den Elektronenaustausch katalysieren. Dafür kommen die *Oxidasen* und die *Dehydrogenasen* in Betracht. Erstere katalysieren Redoxreaktionen unter Beteiligung von Sauerstoff (Gl. (7.21)), letztere Reaktionen, an denen der Kofaktor *Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD)* beteiligt ist (Abb. 7.31). Mit dessen oxidierten Form NAD^+ bzw. der reduzierten Form NADH ergibt sich die verallgemeinerte Reaktion nach Gl. (7.22).



Das Substrat (d.h. der Analyt) und die aus ihm entstehenden Produkte sind gewöhnlich nicht elektrodenaktiv. Da zu jedem umgesetzten Mol des Substrates eine genau definierte Menge verbrauchten Oxydationsmittels bzw. entstandenen Nebenprodukts gehört, folgt man dem Reaktionsverlauf über die Redoxpaare $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ bzw. NAD^+/NADH . Das Elektrodenpotential wird so eingestellt, daß der Elektrolysestrom entweder den Verbrauch an Oxydationsmittel oder den Zuwachs an Nebenprodukt wiedergibt. Weit verbreitet ist die Verwendung einer modifizierten Clark-Elektrode, um den Verlust an Sauerstoff zu bestimmen. Ebenso häufig werden Redoxelektroden verwendet, die das gebildete H_2O_2 oder das NADH indizieren. Alle zugehörigen Redoxelektroden erfordern nur mittlere Potentiale. Das Redoxpotential des NAD^+/NADH liegt bei etwa 0,8 V gegen die gesättigte Silber/Silberchlorid-Elektrode, so daß man auch bei Sensoren mit diesem Kofaktor in luftgesättigter Lösung arbeiten kann.

Tabelle 7.6 Amperometrische Enzymsensoren

Probe	Enzym	Reaktion	Anzeige
Polyphenole	Polyphenoloxidase	$\text{Polyphenol} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{PPO}} \text{o-Chinone}$	o-Chinon
Cholesterol	Cholesteroloxidase	$\text{Cholesterol} + \text{O}_2 \xrightarrow[\text{Ferrocen}]{\text{ChOx}} \text{Cholestenon} + \text{H}_2\text{O}_2$	$\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fc}$
Ethanol	Alkoholdehydrogenase	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{EDH}} \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH}^+ + \text{H}^+$	NADH^+
Lactat	Lactatmonoxygenase	$\text{Lactat} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{LMOx}} \text{Essigsre.} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	H_2O_2
Pestizide ^{a)}	Acetylcholinesterase	$\text{Acetylcholin} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{ACE}} \text{Cholin} + \text{Essigsr.}$ $\text{Cholin} + 2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Betain} + \text{H}_2\text{O}_2$	H_2O_2

^{a)} durch Hemmung der Enzymaktivität von Acetylcholinesterase

Alle Enzyme, die bereits bei den potentiometrischen Enzymsensoren erwähnt wurden (Tabelle 7.1), sind auch für amperometrische Sensoren brauchbar. Da für die amperometrischer Betriebsweise eine wesentlich größere Vielfalt an verwert-

baren Reaktionen zur Verfügung steht, sind in Tabelle 7.6 einige weitere Beispiele angegeben.

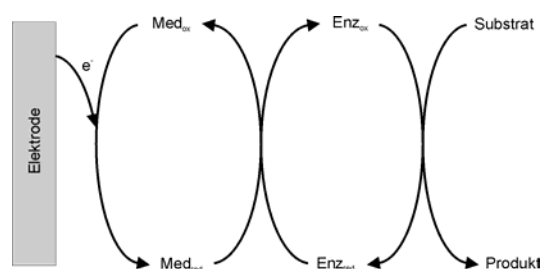


Abb. 7.32 Reaktionsfolge in einer Enzymelektrode mit Mediator. Med_{ox} und Med_{red}: Oxydierte bzw. reduzierte Form des Mediator

Einfache amperometrische Enzymsensoren (*Sensoren der ersten Generation*) arbeiten nach folgendem (vereinfachten) Schema: Diffusion des Substrates zur Elektrode; Reaktion mit dem immobilisierten Enzym; Regenerierung des Enzyms in seine ursprüngliche Form durch Sauerstoff bzw. NADH⁺. In Wirklichkeit ist die Reaktionsfolge komplizierter. Eine lineare Abhängigkeit des Elektrolysestroms von der Substratkonzentration läßt sich nur erreichen, wenn die Diffusion des Substrates zum langsamsten und so zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt gemacht wird. Dies wäre z.B. dann nicht gewährleistet, wenn die Lösung an Sauerstoff verarmt, so daß das Enzym nicht mehr regeneriert werden kann. Enzyme sind Eiweißstoffe, deren Selektivität auf dem Schloß-Schlüssel-Prinzip beruht, d.h. die Moleküle des Substrates werden von einer genau passenden Vertiefung im Enzymmolekül eingeschlossen. Daher ist das redoxaktive Zentrum des Enzyms tief im Inneren gelegen und einem Kontakt mit der Elektrode entzogen. Der Regenerierungsschritt kann also auch nicht durch direkte Elektronenübertragung vollzogen werden. Selbst bei direkter Berührung mit der Elektrodenoberfläche werden kaum Elektronen übertragen. Ein entscheidender Schritt zur Behebung dieser Probleme war die Einführung von *Redoxmediatoren*.

Amperometrische Enzymsensoren der zweiten Generation beruhen darauf, daß reversible, lösliche Redoxsysteme (*Mediatoren*) in die Sensor-Matrix eingebaut werden. Diese Substanzen lassen sich leicht (d.h. erstens bei moderaten Potentialen und zweitens mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit) an der Elektrode oxydieren oder reduzieren. Sie bewegen sich in der Matrix und reagieren mit den verbrauchten Enzymen unter Rückbildung deren ursprünglicher Form. Insgesamt wirken die Mediatoren als Elektronenübertrager nach dem in Abb. 7.32 angegebenen Schema. Das Schema ist vereinfacht. Unklar ist bisher, welche Vorgänge im Enzymmolekül während der Elektronenübertragung ablaufen. Nach einer der Theorien könnte es im Enzym zwei verschiedene Kontaktstellen, d.h. eine oxydierende und eine reduzierende Seite geben, die untereinander mit einem leitenden Pfad ver-

bunden sind. Dies würde erklären, warum Enzyme an Redoxreaktionen teilnehmen können, ohne insgesamt Ladungen aufzunehmen oder abzugeben.

Hin und wieder wird auch von einer *dritten Generation* von Biosensoren gesprochen. Gemeint ist damit die Integration von Sensor und Signalverarbeitungs-Elektronik auf einem gemeinsamen Halbleiterchip, dem sog. *Biochip*.

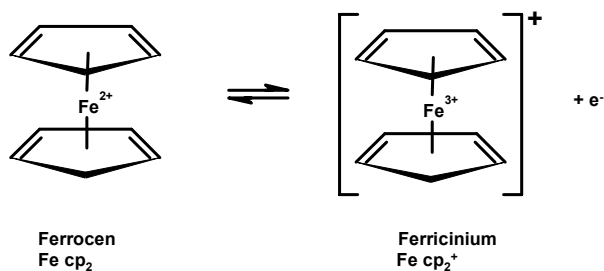


Abb. 7.33 Redoxgleichgewicht des Ferrocens (Dicyclopentadienyl-Eisen^{2+/3+})

Mediatoren müssen nicht nur reversible Redoxpaare sein, sondern auch schnell mit den Enzymen reagieren. Häufig verwendete Mediatoren sind in Tabelle 7.7 aufgelistet. Abb. 7.33 gibt die Struktur des besonders wichtigen Mediator-Redoxpaars-Ferricinium/Ferrocen an.

Tabelle 7.7 Gebräuchliche Mediatoren mit ihren Redoxpotentialen. E* : Potential einer äquimolaren Mischung des Redoxpaars bei pH 7 gegen die Standard-Wasserstoffelektrode

Mediator	E* / V
$\text{Os}(\text{bpy})_3^{3+} / \text{Os}(\text{bpy})_3^{2+}$	0,84
Ferricinium/Ferrocen	0,44
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	0,36
Chinon/Hydrochinon	0,28
Methylenblau	0,01
Methylviologen	-0,44
Tetracyanochinodimethan (TCNQ)	0,252
Tetrathiafulvalen (TTF)	0,216

Ein Problem aller löslichen Mediatoren ist, daß sie die Tendenz zeigen, nach und nach aus der Matrix ausgewaschen zu werden. Ideal wäre es, wenn auch der Mediator immobilisiert werden könnte. Obwohl dies auf den ersten Blick der angestrebten Funktion zuwiderläuft, scheint eine solche Möglichkeit mit den *Redoxpolymeren* realisierbar zu sein. Besonders erfolgreich sind Elektroden, bei denen der Osmium-Bipyridyl-Komplex, selbst ein Redox-Mediator, an ein Polymergerüst angehängt ist, so daß ein dreidimensionales Redox-Netzwerk entsteht (Abb. 7.34). Das Enzym wird dann seinerseits an der Oberfläche des Polymerkörpers

immobilisiert (Heller 1990). Enzymsensoren mit Redoxpolymeren haben einen hohen Entwicklungsstand erreicht. Bis zu 4 Schichten mit verschiedenartiger Funktionalität sind an einem Sensor beteiligt (Kenausis et al. 1997).

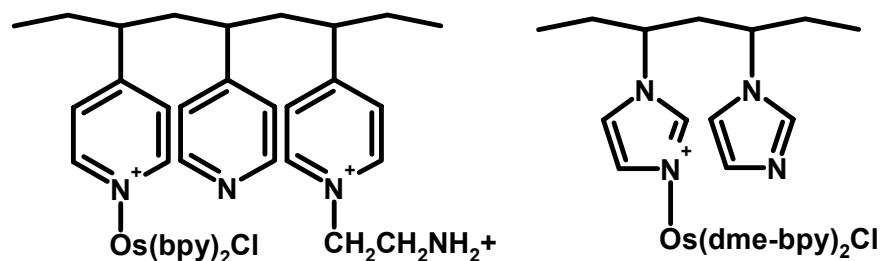


Abb. 7.34 Struktur von Redoxpolymeren mit Osmium-Spezies

Von allen Biosensoren sind die amperometrischen Glucosensoren die wichtigsten und weitaus am weitesten verbreiteten. Mit einigem Abstand folgen Laktatsensoren. Die Vielfalt an Bauformen ist sehr groß, aber typisch für amperometrische Biosensoren ist das Streben nach Miniaturisierung und nach Massenfertigung. Die Sensoren, bei denen der enzymatisch gebildete Sauerstoff amperometrisch verfolgt wird, basieren alle auf Miniaturformen des Clark-Sensors (Abschn. 7.2.2). Verbreitet sind einstichfähige, schmale Formen (Abb. 7.35). Dort ist eine kleine Platinanode von einem zylindrischen Silberkörper als Kathode umgeben. Darüber befindet sich ein dünner Film aus Celluloseacetat, in dem das Enzym enthalten ist. Als äußere Schutzschicht dient eine Folie aus Dialysemembranmaterial oder Kollodium (Wilson u. Thévenot 1990). Diese Form, obwohl der *ersten Generation* zugehörig, ist noch immer weit verbreitet und in vielerlei Varianten handelsüblich.

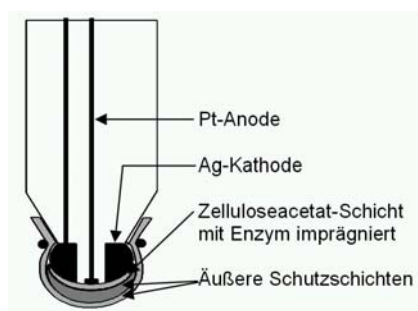


Abb. 7.35 Enzymsensor auf der Basis des Clark-Sensors

Einen sehr großen Anteil an den handelsüblichen amperometrischen Enzymsensoren haben solche, die in Dickschichttechnik auf Keramik- oder Kunststoffplättchen aufgebracht wurden. Fast immer folgt die Konstruktion dem Schema in Abb. 7.36. Als Referenzelektrode dient eine Schicht aus Silber- und

Silberchloridpartikeln. Sie wirkt gemeinsam mit den in den Membranschichten enthaltenen Chloridionen und stellt ein konstantes Referenzpotential zur Verfügung. Als Arbeits- und Gegenelektrode dienen Schichten aus Glaskohlepartikeln oder Edelmetallen. Neuerdings wird auch das Rutheniumdioxid als Material für die Arbeitselektrode eingesetzt. Ursprünglich war dieses Oxid ein weit verbreiteter Werkstoff für elektrische Widerstände in Elektronikschaltungen, die in Dickschichttechnik gefertigt wurden. Es stellte sich heraus, daß es gut als Material für Redoxelektroden geeignet ist, da es Redoxreaktionen katalysiert. Glucoseoxidase läßt sich direkt als Lösung auf das Substrat mit den gedruckten Elektroden aufbringen und dann mit Glutaraldehyd vernetzen. Darüber wird stets eine Schutzschicht (Diffusionsmembran) aufgebracht.

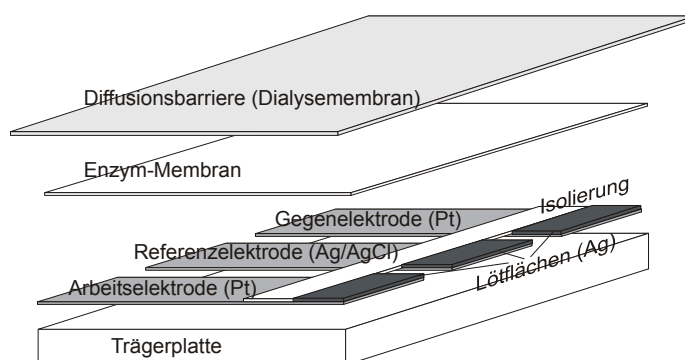


Abb. 7.36 Amperometrischer Enzymsensor in Dickschichttechnik. Für Arbeits- und Gegenelektrode werden auch Schichten aus RuO_2 verwendet

Enzymsensoren in Dickschichttechnik entsprechend Abb. 7.36 sind, insbesondere als Glucosesensoren, in großer Stückzahl im Handel. Die obere Schutzschicht macht die Sensoren so robust, daß man mit ihnen ohne Probenvorbereitung den Blutzuckergehalt direkt im Vollblut bestimmen kann.

Enzymelektroden mit direkter Bindung an kompakte Festkörperoberflächen sind noch relativ selten. Ein Beispiel ist ein amperometrischer Sensor mit Meerrettich-Peroxidase, die an eine mit Cyanurchlorid (CC) funktionalisierte Graphitoberfläche gebunden wurde (Cardosi 1994).

Selbstorganisierende Monolagen (SAMs) werden immer häufiger zur Immobilisierung von Enzymen verwendet. Ein relativ einfaches Beispiel ist in Abb. 7.37 skizziert (Darder et al. 1999).

Ein spezielles Problem aller Enzymsensoren ist ihre begrenzte Lagerfähigkeit, die aus der schlechten Haltbarkeit der Enzyme resultiert. Im trockenen Zustand halten sich die Substanzen einige Zeit. Wegwerfsensoren werden, nachdem sie mit der wäßrigen Probelösung in Berührung gekommen sind und ihre Aufgabe erfüllt haben, nicht mehr verwendet. Es gibt aber auch Bemühungen, die Lagerfähigkeit durch chemische Behandlung zu verbessern. Eine Möglichkeit ist die Immobilisie-

rung in Polyelektrolyten mit Polyolzuckern (Gibson u. Hulbert 1993). Der gebildete Enzym-Polyelektrolyt-Komplex scheint durch eine Art Faraday-Käfig elektrostatisch stabilisiert zu sein, so daß die Funktionsfähigkeit des Enzyms länger erhalten bleibt.

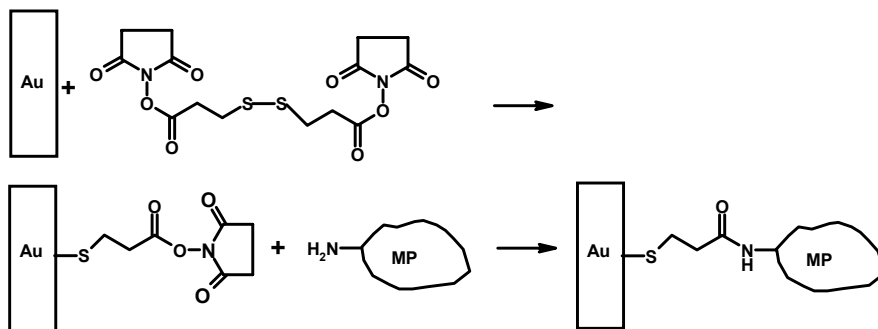


Abb. 7.37 Adsorption von DTSP (Dithiobis[*N*-succinimidylpropionat]) an einer Goldelektrode und kovalente Kopplung von Meerrettichperoxidase (MP) an die aktiven Estergruppen der entstehenden selbstorganisierenden Monolage

Immunosensoren

Mit elektrochemischen Immunosensoren wird versucht, die extreme Selektivität der Antikörper-Antigen-Reaktion zur quantitativen Bestimmung von Antigenen zu nutzen. Als Antigen kann nahezu jede existierende Substanz auftreten. Den dazu passenden Antikörper läßt man durch einen lebenden Organismus produzieren. Nach Reinigung und Immobilisierung an einer Elektrodenoberfläche hat man die gewünschte Sonde, die in der Lage sein sollte, das Probemolekül unter Millionen anderer Substanzen selektiv an sich zu binden. Zwar wird dieser Vorgang durch die stets parallel laufenden unselektiven Adsorptionsvorgänge verfälscht, dennoch haben aber Immunosensoren eine sehr beachtliche Selektivität. Die Frage ist, wie sich aus der Reaktion ein elektrochemisches Signal gewinnen läßt.

Immunosensoren sind immer Bioaffinitätssensoren, d.h. ein Antikörper bildet selektiv mit dem passenden Antigen einen Komplex, ohne daß Substanzen verbraucht oder Produkte gebildet werden. Im Unterschied zu den biokatalytischen Sensoren kann daher die analytische Information nicht ohne Umwege aus einer Reaktionsgeschwindigkeit, also auch nicht aus einem faradayschen Strom, gewonnen werden. Um das Prinzip auch zum Bau amperometrischer Sensoren verwenden zu können, ist es notwendig, das zu bestimmende Antigen vorher chemisch zu modifizieren (zu *markieren*), indem man z.B. eine elektrochemisch oxydierbare bzw. reduzierbare Gruppe anhängt, oder indem man eine Verbindung mit einem Enzym herstellt, das nach vollzogener Komplexbildung mit dem Antikörper an den Produkten der von ihm katalysierten Reaktion erkannt werden kann.

Elektrochemische Immunosensoren müssen die Eigenschaftsänderungen einer Antikörperschicht, die durch die Bildung des Komplexes bewirkt werden, in ein elektrisches Signal umsetzen. Eine Möglichkeit ist, die entstehende Ladungsver-schiebung als Spannungsänderung, also potentiometrisch, zu messen. Eine zweite Möglichkeit ist die Bestimmung der Leitfähigkeitsänderung durch Impedanzmes-sung.

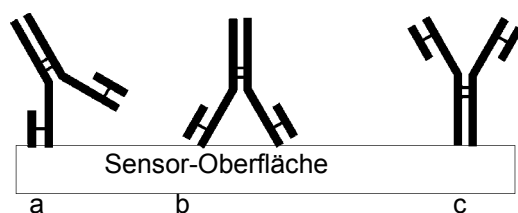


Abb. 7.38 Mögliche Orientierungen eines Antikörper-Moleküls auf einer Oberfläche. Nur Position c ist für Sensoren brauchbar

Die von einem Organismus produzierten und dann gereinigten Antikörper können nach ähnlichen Methoden auf einer Elektrodenoberfläche immobilisiert werden wie dies im Kap. 2, Abschn. 2.3 beschrieben wurde. Hierbei gibt es aber eine Besonderheit. Wegen der Y-förmigen Struktur (siehe Kap. 2, Abschn. 2.2.8) müssen die Moleküle in einer bestimmten Position auf der Oberfläche fixiert werden. Die Antigen-bindenden Stellen müssen zum Lösungsinnen zeigen (Abb. 7.38).

Am sichersten erreicht man die richtige Orientierung, wenn man das Antigen kovalent über eine Gruppe bindet, die der Antigen-bindenden Stelle abgewandt ist. Dies ist gelungen durch Bindung reaktiver Gruppen an Kohlehydratgruppen in der Region des „Scharniers“ im Molekül, oder durch Modifizierung der Moleküle mit dem Eiweiß *Protein G*, das spezifisch am „Fuß“ vieler Antikörper bindet und vorher leicht auf einer Elektrodenoberfläche immobilisiert werden kann. Sehr vorteilhaft ist die Bindung von Antikörpermolekülen als selbstorganisierende Monolage (SAM). Dazu muß beachtet werden, daß Antikörper sehr große Moleküle sind, die Platz brauchen. Es ist daher üblich, zunächst eine Monolage zu bilden, die nur zum Teil aus bifunktionellen Molekülen besteht, d.h. aus solchen, die an einer Seite eine Gruppe für die Bindung an die Oberfläche tragen, an der anderen Seite eine Gruppe für die Bindung an das Eiweiß der Antikörper. Außer den bifunktionellen Molekülen werden kürzere, monofunktionelle Moleküle an der Oberfläche fixiert, die die bifunktionelle Schicht „verdünnen“. Alternativ dazu wurde auch das Antikörper-Molekül selbst durch einen „Linker“ modifiziert, der am freien Ende mit einer Thiolgruppe versehen war, die sich zur Kopplung an Goldoberflächen eignet. Trotz der Vorteile der Fixierung durch kovalente Bindung oder durch selbstorganisierende Monolagen ist auch die Immobilisierung von Antikörpern durch einfache Adsorption üblich.

Potentiometrische Immunosensoren wurden mit einer halbleitenden dünnen Schicht aus Titandioxid realisiert. Diese war mit einer aktivierten Polymermembran überzogen, an die ein Antikörper kovalent gebunden wurde. Die Komplexbildung mit dem Antigen führt zu einer Potentialverschiebung, die ein Maß für den Antigengehalt in der Lösung ist (Yamamoto et al. 1983).

Wirkliche Bedeutung haben nur solche elektrochemischen Immunosensoren erlangt, bei denen das Signal durch Impedanzmessungen gewonnen wird. Ein erstes Beispiel war ein Sensor für Methamphetamin im Urin (Yagiuda et al. 1996). Der Antikörper *Anti-Methamphetamin* wurde an zwei benachbarten Platinelektroden immobilisiert und mit Glutaraldehyd quervernetzt. Kontakt mit der Probe führte zu einer Verringerung der Leitfähigkeit der Antikörperschicht zwischen den Elektroden als Folge der Bindung des Antigens. Ein solcher Sensor gehört zur Gruppe der Chemoresistoren.

Ein eindrucksvolles Beispiel für einen impedimetrischen Biosensor auf SAM-Basis sind Schichten aus synthetischen Peptiden (Molmasse etwa 3000 Da), die eine bestimmte Stelle des Antigens repräsentieren und über „Linker“ bzw. „Spacer“ an eine Goldoberfläche gebunden wurden (Rickert et al. 1996). In diesem Falle wird das Signal aus dem Impedanzspektrum gewonnen, das in Anwesenheit des reversiblen Redoxsystems Hexacyanoferrat(II/III) aufgenommen wird. Die Redoxreaktion dieses „Indikators“ wird blockiert, wenn das Antikörper-Peptid mit dem Antigen bindet. Der Ausdruck „impedimetrischer Sensor“ ist in diesem Falle gerechtfertigt. Der Sensor wurde benutzt, um den Erreger der Maul- und Klauenseuche zu identifizieren. Diese Anwendung rechtfertigt den hohen Aufwand für die Herstellung der synthetischen Peptide.

Sensoren mit ganzen Zellen, Mikroorganismen und Organteilen

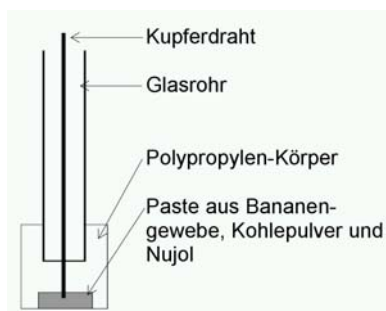


Abb. 7.39 Die "Bananatrode", ein amperometrischer Biosensor mit Bananenmasse

Lebende Organismen sind seit jeher zur Beobachtung von Umweltveränderungen, also als Biomonitoren benutzt worden. Biosensoren entstehen, wenn Lebewesen mit Wandlern so gekoppelt werden, daß ein meßbares Sensorsignal entsteht. In den meisten Fällen ist auch bei Sensoren mit ganzen Organismen, Zellen oder Organen die Wirkung der Enzyme die entscheidende Signalquelle. Es ist durchaus manchmal sinnvoll, Enzyme in ihrer natürlichen Umgebung zu lassen. Man er-

reicht so eine höhere Stabilität der Biokatalysatoren und der Kostenaufwand wird geringer. Nachteile sind die meist längere Ansprechzeit, die geringere Selektivität und die schlechtere Reproduzierbarkeit.

Besonders einfach, und daher gut als Demonstrationsversuch geeignet, ist die Verarbeitung von Gewebeschnitten oder Gewebemogenisaten zu elektrochemischen Sensoren. Ein bekanntes Beispiel ist die „Banatrode“ (Wang u. Lin 1988), bei der eine Paste aus Bananenmasse mit Kohlepulver und Nujol gemischt und in ein Glasröhrchen mit dem Anschlußdraht gepreßt wird (Abb. 7.39). Das in der Masse enthaltene Enzym Polyphenolase katalysiert die Oxydation von Polyphenolen, von denen einige, wie etwa das Dopamin, wichtige Botenstoffe in Organismen sind. Zum Testen der Elektrode eignen sich auch einfache Verbindungen wie das Brenzcatechin, das auf diesem Wege z.B. im Bier nachgewiesen werden kann. Als Resultat der Oxydation entsteht *o*-Chinon, das elektrochemisch aktiv ist. Man kann es leicht mittels Differenzpuls-Voltammetrie nachweisen.

Ähnliche Effekte wie mit Bananenmasse sind auch mit Homogenisaten aus Auberginen, Äpfeln und Kartoffeln erzielt worden. In diesen Fällen ist das Enzym Polyphenoloxidase wirksam. Auch hier entstehen als elektroaktive Produkte *o*-Chinone.

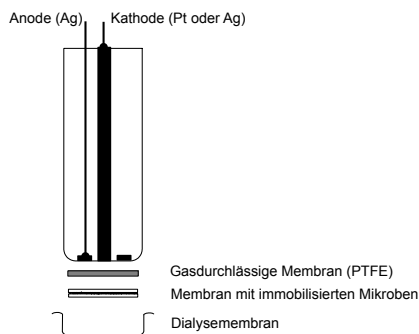


Abb. 7.40 Mikrobieller Biosensor auf der Basis der Clark-Elektrode

Statt Homogenisaten sind Sensoren auch aus Gewebeschnitten aufgebaut worden. Ein Beispiel ist ein mit Glucoseoxidase versetzter Kartoffel-Schnitt, der auf Phosphate und Fluoride anspricht (Schubert et al. 1984).

Isolierte biologische Zellen oder Zellfragmente (Membranpartikel u.ä.) sind als Rezeptorschicht für Biosensoren verwendet worden. Solche Versuche gehen über die rein experimentelle Verwendung von frisch zubereiteten Gewebe-Sensoren hinaus, sind aber noch nicht zuverlässig genug für den Bau kommerzieller Sensoren.

Biosensoren mit lebenden Mikroorganismen können mit Bakterien, Algen, Pilzen und Protozoen aufgebaut werden. Im allgemeinen geht es auch hier um die Wirkung der in den Organismen enthaltenen Enzyme. Oft ist es einfacher und billiger, eine Bakterien- oder Pilzkultur zu züchten und als Ganzes zu immobilisieren, als mühsam das Enzym zu isolieren. In sofern ist die Mikrobe kaum mehr als ein Gefäß für Enzyme.

Mikroorganismen können mit den gleichen Methoden immobilisiert werden wie sie für biologisch aktive Substanzen gebräuchlich sind. Üblich sind der Einschluß der Organismen in Gele oder Polymere, oder die Unterbringung hinter Membranen. Sehr weit verbreitet sind modifizierte Clark-Elektroden (siehe 7.2.2). Die biologische Aktivität sehr vieler Mikroorganismen hat etwas mit dem Verbrauch oder der Bildung von Sauerstoff zu tun. Bei Bakterien ist es die Atmung, die zum Verbrauch von molekularem Sauerstoff führt, bei einigen Mikroalgen wird Sauerstoff im Prozeß der Photosynthese produziert. Schadstoffe in der Probe beeinflussen diese Aktivität und werden durch das Sensorsignal meßbar gemacht. Das Schema einer typischen Anordnung zeigt Abb. 7.40. Die Mikroben werden auf einer Membran immobilisiert, die zwischen der sauerstoffpermeablen Membran des Clark-Sensors (meist makroporöses PTFE) und einer Dialysemembran angeordnet ist.

Beispiele für mikrobielle Biosensoren auf der Basis der Clark-Elektrode sind Sensoren mit der Mikroalge *Chlorella vulgaris*, die mit einer Membran aus Aluminiumoxid abgedeckt wurden (Pandard et al. 1993) oder mit Bakterenkulturen aus *Bacillus subtilis* und *Bacillus licheniformis* hinter Polycarbonatmembranen (Li u. Tan 1994).

Biosensoren mit Mikroorganismen sind gute Monitoren für die Toxizität von Gewässern. Auch der biologische Sauerstoffbedarf (BOD) kann mit ihrer Hilfe bestimmt werden.

Zellen mit Organellen oder ganzen Organen höherer Organismen zeigen sehr eindrucksvoll die Leistungsfähigkeit biologischer Erkennungsmechanismen. Bekannt geworden ist ein Sensor, der mit einer immobilisierten Antenne des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata* Say) arbeitet (Schroth et al. 2001). Über eine Elektrolytlösung wurde die Verbindung zum Gate eines Feldeffekttransistors hergestellt. Spurenkonzentrationen von Guajakol in der Luftatmosphäre verursachten eine meßbare Änderung der Gatespannung. Spuren dieser und ähnlicher Verbindungen werden von verletzten Blättern der Kartoffelpflanze freigesetzt und vom Kartoffelkäfer über viele Kilometer wahrgenommen. Ein „Bio-FET“ konnte sogar mit einem intakten lebenden Käfer hergestellt werden.

Nach dem gleichen Schema wurde auch ein Biosensor mit der Antenne von Kleinkrebsen aufgebaut. Diese Sensoren sprechen auf Spuren von Trimethylaminoxid an.

Nucleinsäure-Sensoren

Nucleinsäure-Moleküle verfügen über außergewöhnliche Eigenschaften. Sie sind elektroaktiv dank der Oxydierbarkeit der Base Guanin und sie können als Liganden wirken und auf diese Weise zahlreiche fremde Stoffe binden. Dies macht sie interessant als Material für chemische Sensoren. Ebenso ist es auch wichtig, Sensoren für die analytische Bestimmung der Nucleinsäuren zu entwickeln. Die wichtigsten Sensoren im Zusammenhang mit Nucleinsäuren sind aber zweifellos die *Hybridisierungssensoren*. Dies sind Sensoren, die es gestatten, in einer Lösung nach einer ganz bestimmten DNA-Sorte zu suchen und damit eine biologische Spezies, eine Gruppe von Individuen oder gar ein einzelnes Individuum zu identi-

fizieren. Mit Hybridisierungssensoren wird eine bestimmte Form des *Genetischen Fingerabdrucks* realisiert.

Sensoren für DNA und mit DNA. Elektrochemische Bestimmungsverfahren für Nucleinsäuren, insbesondere für die t-RNA (Transfer-Ribonucleinsäure) und die DNA (Desoxyribonucleinsäure) arbeiten fast ausnahmslos nach der voltammetrischen Stripping-Methode. Die Nucleinsäure wird an einer Kohlelektrode adsorptiv angereichert, indem man unter Rühren der Lösung ein konstantes Potential für eine definierte Zeit anlegt. Danach wird die angereicherte Substanz oxydiert, wobei das analytische Signal entsteht. Diese Verfahren sind unselektiv, erfordern umfangreiche Probenvorbereitung und zahlreiche Reagenzien. Es ist also nicht sinnvoll, hier den Begriff des chemischen Sensors anzuwenden.

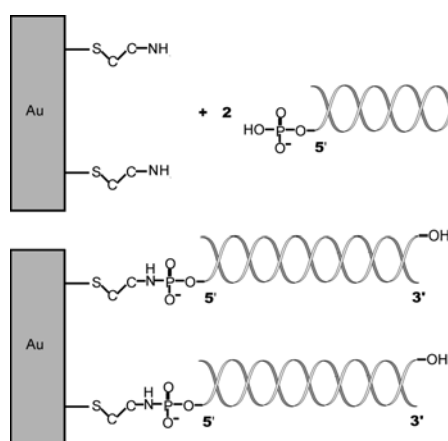


Abb. 7.41 Kovalente Immobilisierung von dsDNA an Goldoberflächen über selbstorganisierende Monolagen (SAM)

DNA läßt sich adsorptiv relativ fest an Kohleoberflächen binden. Die DNA-Moleküle in den entstehenden Monoschichten wirken als Liganden für Schwermetalle und andere Substanzen, die dann voltammetrisch bestimmt werden können.

DNA-Diagnostik und „Genetischer Fingerabdruck“. Mit den rasch wachsenden Erkenntnisse über das menschliche Genom steigt das Interesse an der DNA-Diagnostik. Fortschritte in der Mikrotechnologie haben dazu beigetragen, daß allmählich eine breitere Anwendung der Methoden möglich wird. Wichtigste Anwendungen der DNA-Diagnostik sind bisher die Erkennung von Polymorphismus und von genetischen Mutationen. Dazu ist es notwendig, eine einzige Fehlpaarung in der DNA-Doppelhelix zuverlässig zu erkennen. Mit den gleichen Methoden läßt sich auch das Ziel des „Genetischen Fingerabdrucks“ verfolgen, d.h. die Identifizierung eines bestimmten Individuums an Hand seiner DNA.

Am Anfang des diagnostischen Prozesses steht normalerweise die Gewinnung eines ausreichenden Vorrats an DNA-Material. Dazu wird die meist nur spurenmäßig vorhandene DNA der Probe mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Po-

lymerase Chain Reaction,) vervielfältigt. Anschließend muß man sich mittels diagnostischer Kriterien vergewissern, daß die gewünschte Sequenz im entstandenen Material vorhanden ist. Tatsächlich ist für eine ausreichende Erkennung der Defektstelle bzw. des bestimmten Individuums nur ein winziger Ausschnitt aus dem gesamten Molekül notwendig.

Bisher gebräuchliche Varianten der DNA-Diagnostik sind:

- *Elektrophorese* auf Agarose-Gel. Die DNA wird enzymatisch in kleine Bruchstücke zerlegt, die anschließend elektrophoretisch getrennt werden. Dabei entsteht ein charakteristisches „Bild“, das eine Identifizierung zuläßt
- *Hybridisierung*. Dazu wird ein *Oligonucleotid*, d.h. ein Molekül, das einen kleinen, aber charakteristischen Teil des großen einsträngigen DNA-Moleküls nachbildet, auf einer Oberfläche immobilisiert und als *Sonde* verwendet. In der Probelösung befindet sich die gesuchte DNA-Probe, die vorher thermisch in Einzelstränge zerlegt („geschmolzen“) worden ist. Im Kontakt mit der Sonde bilden die genau zu den immobilisierten Sonden-Molekülen passenden komplementären Stränge einen *Duplex* (Doppelstrang) mit letzteren. Dieser Vorgang, die *Hybridisierung*, muß sich durch eine Eigenschaftsänderung manifestieren, so daß ein Signal gewonnen werden kann. Häufig wird dieses Signal *optisch*, durch Messung einer *Fluoreszenz* oder *Chemilumineszenz*, gewonnen. Das ist aufwendig, weil vorher die Proben-DNA *markiert* werden muß, indem z.B. eine fluoreszenzfähige Gruppe angehängt wird. Im Gegensatz dazu erlauben elektrochemische Methoden die Detektion des Hybridisierungsvorgangs ohne chemische Veränderung der Probe.

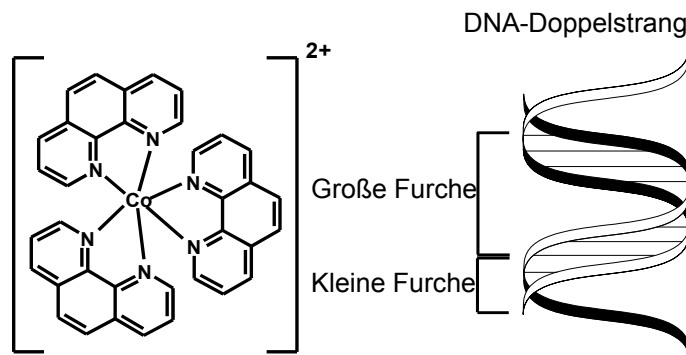


Abb. 7.42 Cobalt-Phenanthrolin $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$ (links), Einlagerung in die *Kleine Furche* der DNA (rechts)

Immobilisierung der DNA. Für die Immobilisierung der Nucleinsäuren lassen sich die gleichen Immobilisierungsmethoden anwenden wie sie bei Eiweißmolekülen gebräuchlich sind, also Adsorption, Quervernetzung, Einschluß in Gele bzw. Polymere, kovalente chemische Bindung mit Bildung von selbstorganisierenden Monolagen (SAMs) und schließlich auch die Avidin-Biotin-

Komplexbildung (7.4.1.2). Nucleinsäure-SAMs sind auch auf Silicium hergestellt und photolithographisch strukturiert worden. Die Immobilisierung von DNA oder Oligonucleotiden auf Glas- oder Nylon-Oberflächen ist die Grundlage der DNA-Chips, die zahlreiche Einzelsonden vereinigen und zu Simultanmessungen geeignet sind (Ramsay 1998).

Typisch für die Immobilisierung von dsDNA oder entsprechenden Oligonucleotiden ist das Verfahren, das in Abb. 7.41 schematisch dargestellt ist (Zhao et al. 1999). Die vorher erzeugte SAM auf der Goldoberfläche läßt man mit der DNA in Anwesenheit des Reagenses 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDAC) reagieren.

Elektrochemische Hybridisierungssensoren. Zur elektrochemischen Detektion der Hybridisierung, d.h. zum Nachweis, ob und in welchem Umfange der immobilisierte Einzelstrang mit dem gesuchten komplementären Gegenstück Hybride (Duplexe) gebildet hat, sind bisher die folgenden Methoden bekannt:

- *Detektion der Hybridisierung mit Reporter-Molekülen*

Reporter-Moleküle (Indikatoren) sind elektrochemisch aktive Substanzen, die reversibel reduziert oder oxydiert werden können. Am häufigsten wird der Kobalt-Phenanthrolin-Komplex $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$ verwendet. Das Molekül lagert sich in die *kleine Furche* der doppelsträngigen DNA ein (Abb. 7.42). Auch andere Redoxsysteme sind zu dieser Einlagerung (Interkalation) befähigt, wobei eine positive Ladung Voraussetzung ist (Millan et al. 1992 u. 1994; Millan u. Mikkelsen 1993). Polynucleotide wurden als Sonden-Moleküle an der Oberfläche von Glaskohle- und Kohlepaste-Elektroden durch kovalente chemische Bindung immobilisiert. Vor und nach Behandlung mit der Probelösung wurden Cyclovoltammogramme aufgenommen.

Setzt man voraus, daß die Elektrodenoberfläche zunächst dicht mit ssDNA-Molekülen bedeckt ist, dann wird der Transport der Reporter-Moleküle zur Elektrodenoberfläche stark verlangsamt, das elektrochemische Signal ist klein. Nach Hybridisierung wird das Signal größer, weil der Doppelstrang insgesamt eine stärker negative Oberflächenladung trägt, wodurch das Indikator-Kation stärker mit der DNA in Wechselwirkung tritt, auf diese Weise angereichert wird und leichter zur Elektrodenoberfläche gelangen kann. Die Differenz der beiden Signale sagt etwas über das Ausmaß der Hybridisierung aus. Abb. 7.43 veranschaulicht den Vorgang

- *Indikatorlose und katalytische Detektion der Hybridisierung mit DNA-ähnlichen Polynucleotiden*

Ohne Reporter-Moleküle kommt man aus, wenn man die elektrochemische Aktivität der DNA selbst ausnutzt. Bekanntlich kann die Guanin-Base der DNA bei nicht allzu positiven Potentialwerten oxydiert werden. Eine Ausnutzung dieser Eigenschaft ist natürlich nur möglich, wenn die als Sonde verwendeten Moleküle selbst nicht oxydierbar sind. Dies wird möglich mit speziell synthetisierten Oligonucleotiden, bei denen die Base Guanin durch Inosin ersetzt ist. Inosin ist erst bei im Vergleich zu Guanin wesentlich höheren Potentialwerten oxydierbar. Bindet das Ziel-Molekül im Verlaufe der Hybridisierung an die synthetische Sonde, dann kann dank des Guaningehaltes der Probelmoleküle ein Oxydationsstrom gemessen

werden (Wang et al. 1998). Die Methode wurde weiterentwickelt durch Verwendung von katalytisch wirkenden Metallkomplexen wie den Bipyridyl-Komplex des Rutheniums (II/III). In diesem Fall transportiert der lösliche Komplex die Elektronen vom Guanin des DNA-Doppelstranges zur Elektrodenoberfläche (Thorp 1998).

- *Detektion der Hybridisierung durch Ladungstransport entlang der Längsachse von dsDNA*

Bestimmte Befunde deuten darauf hin, daß sich Elektronen entlang der Längsachse eines intakten doppelsträngigen DNA-Moleküls bewegen können. Ein Einzelstrang zeigt wesentlich geringere Leitfähigkeit. Besonders gestört wird der Ladungstransport, wenn anstatt der Bildung des perfekten Doppelstranges eine unvollständige Hybridisierung mit nicht genau passenden komplementären Strängen eintritt. Bereits eine einzige Basen-Fehlpaarung stört den Ladungstransport empfindlich. Diese Eigenschaft läßt sich zu einer Detektionsmöglichkeit für die Hybridisierung ausbauen (Kelley et al. 1999).

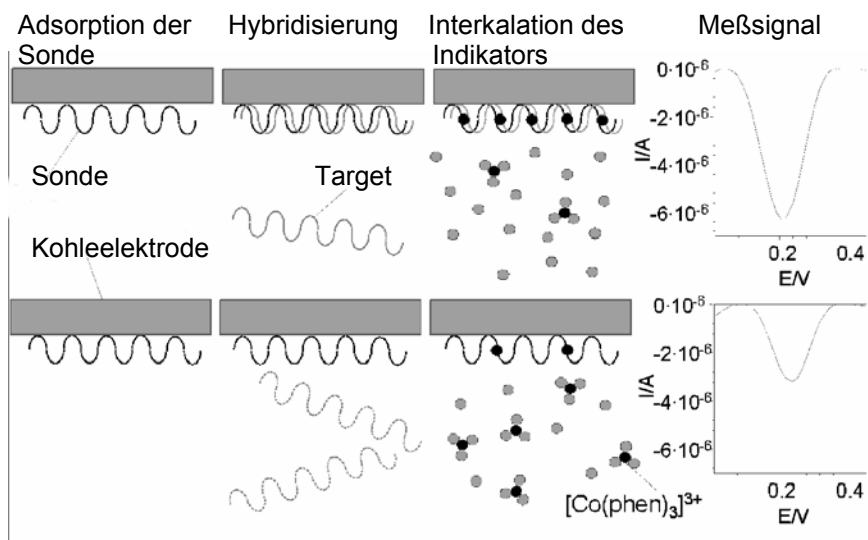


Abb. 7.43 Schema der Hybridisierungs-Indikation mit dem Reporter-Molekül Cobalt-Phenanthrolin

Ein elektrochemischer Hybridisierungssensor läßt sich mit Hilfe spezieller Interkalatoren aufbauen. Dies sind elektrodenaktive, reversibel reduzierbare bzw. oxydierbare Substanzen, die in den Doppelstrang der DNA eingeschoben (interkaliert) werden, und zwar in den sog. π -Stapel. Interkalatoren sind planar aufgebaute „flache“ Moleküle wie z.B. das Methyleneblau. Methyleneblau kann in einer rever-

siblen Redoxreaktion zum Leukomethylenblau reduziert und wieder oxydiert werden (Abb. 7.44).

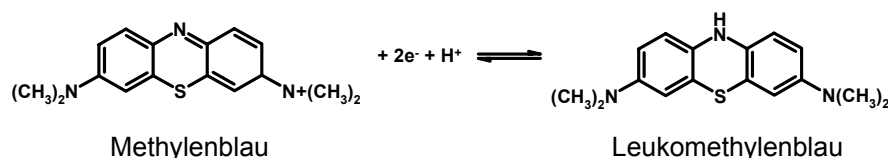


Abb. 7.44 Redoxgleichgewicht Methylenblau-Leukomethylenblau

Bei der Nutzung der Leitfähigkeit des Doppelstrangs zur Detektion der Hybridisierung ist es wichtig, eine wohlgeordnete selbstorganisierende Monolage aus DNA-Doppelsträngen zu bilden. Dies gelingt am besten mit Oligonucleotiden nicht zu großer Länge, die einem Ausschnitt aus dem Molekül der natürlichen Nucleinsäure entsprechen. Besonders häufig wurde ein Oligonucleotid aus 15 Basenpaaren angewendet, an dessen 5'-Ende als Abstandshalter (Linker) eine Alkylkette angehängt wurde, die am Ende eine SH-Gruppe trug. Eine solche Gruppe läßt sich leicht an eine vorbereitete Goldoberfläche kovalent binden. Es entsteht eine selbstorganisierende Monolage (SAM) aus aufrecht stehenden Oligonucleotiden (Kelley et al. 1997). In diese Monolage wird der Interkalator stets weit „oben“, d.h. abgewandt von der Elektrodenoberfläche, eingelagert (Abb. 7.45).

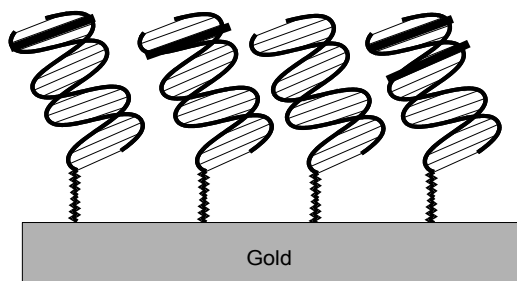


Abb. 7.45 Interkalation von planaren redoxaktiven Molekülen in den Doppelstrang der DNA

Die Elektronen müssen den gesamten Weg zwischen Elektrodenoberfläche und Interkalator zurücklegen, um einen Redoxprozeß zu bewirken. Eine einzige Basenfehlpaarung unterbricht den Elektronentransport und verkleinert das elektrochemische Signal drastisch. Als elektrochemische Meßmethoden wurden Cyclovoltammetrie und Chronocoulometrie verwendet. Die interkalierten Moleküle des Methylenblaus werden reduziert. Fehlpaarungen im nach der Hybridisierung gebildeten Duplex ergeben wesentlich geringere Signale im Vergleich zum perfekten Doppelstrang.

Ein Problem bei allen elektrochemischen Detektionsmethoden der Hybridisierung ist die unspezifische Adsorption anderer Nucleinsäure-Moleküle an freien Stellen der Elektrodenoberfläche, z.B. in den sog. Pinholes (Löcher in der DNA-

Monoschicht). Unspezifisch adsorbierte Moleküle tragen zum elektrochemischen Signal bei, täuschen also Hybridisierungs-Ereignisse vor.

7.5 Literatur

- Afromowitz MA, Yee SS (1977), *J Bioeng* 1:55
- Ammann D, Bissig R, Guggi M, Pretsch E, Simon W, Borowitz IJ, Weiss L (1975), *Helv. Chim. Acta* 58:1535
- Bartlett PN (1990) in: Cass AEG (ed.) *Biosensors: A practical approach*. Oxford: IRL Press, pp 47–97
- Bates PS, Katakly R, Parker D (1994) *J Chem Soc, Perkin Trans 2*: 669
- Cadogan A, Gao Z, Lewenstam A, Ivaska A, Diamond D (1992), *Anal Chem* 64:2496–2501
- Cardosi MF (1994), *Electroanalysis* 6:89–96
- Chen Q, Wang J, Rayson G, Tian B, Lin Y (1993) *Anal Chem* 65:251–254
- D'Annibale A, Regoli R, Sangiorgio P, Ferri T (1999) *Electroanalysis* 11:505
- Darder M, Takada K, Pariente F, Lorenzo E, Abruña HD (1999), *Anal Chem* 71:5530–5537
- Diamond D, Svehla G, Seward EM, McKervey MA (1988), *Anal Chim Acta* 204:223–231
- Freiser H (1980) Coated wire ion-selective electrodes, in: Freiser H (ed.) *Ion-Selective Electrodes in Analytical Chemistry*. New York: Plenum Press, vol. 2, pp 85 – 105
- Gibson TD, Hulbert JN (1993) *Anal Chim Acta* 279:185–192
- Guilbault GG, Montalvo JG (1969), *Anal Lett* 2:283–293
- Heller A (1990), *Accounts Chem Res* 23:128–134
- Kelley SO, Boon EM, Barton JK, Jackson NM, Hill MG (1999) *Nucl Acids Res* 27:4830–4837
- Kelley SO, Jackson NM, Barton JK, Hill MG (1997) *Bioconjugate Chem* 8:31–37
- Kenausis G, Chen Q, Heller A (1997), *Anal Chem* 69:1054–1060
- Knichel M, Heiduschka P, Beck W, Jung G, Göpel W (1995) *Sens Actuators B* 28:85–94
- Li F, Tan TC (1994), *Biosens Bioelectronics* 9:445–455
- Millan KM, Mikkelsen SR (1993), *Anal. Chem.* 65:2317–2323
- Millan KM, Saraullo A, Mikkelsen SR (1994), *Anal. Chem.* 66:2943–2948
- Millan KM, Spurmanis AJ, Mikkelsen SR (1992) *Electroanalysis* 4:929–932
- Morf WE, de Rooij NF (1995), *Sens. Actuat.* A51:89–95
- Pandard P, Vasseur P, Rawson DM (1993), *Water Research* 27:427–431
- Ramsay G (1998) *Nature Biotechnol* 16:40–44
- Rickert J, Göpel W, Beck W, Jung G, Heiduschka P (1996) *Biosens Bioelectronics* 11:757–768
- Schroth P, Schöning MJ, Lüth H, Weißbecker B, Hummel HE, Schütz S (2001) *Sens Actaut B* 78:1–5