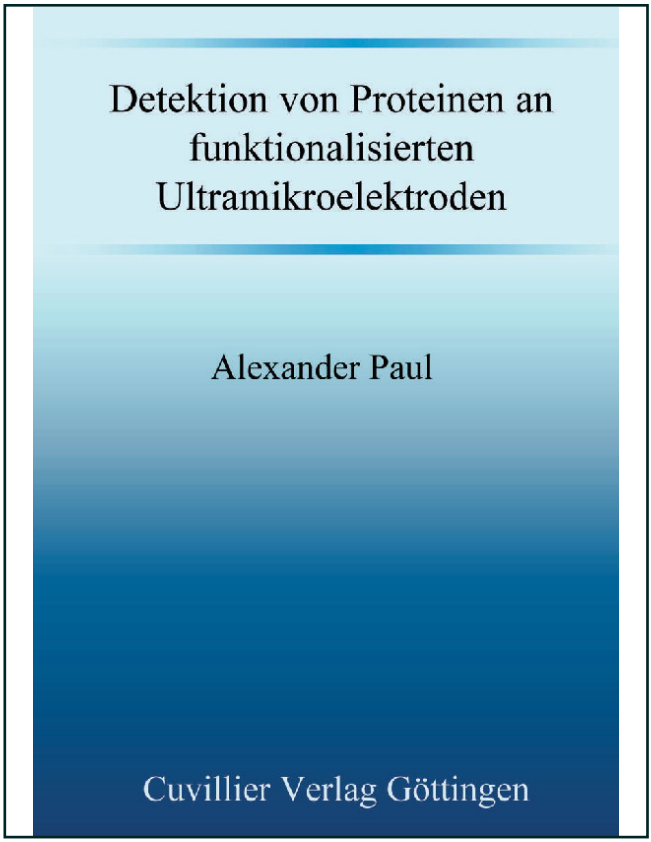
Alexander Paul (Autor)

Detektion von Proteinen an funktionalisierten Ultramikroelektroden



https://cuvillier.de/de/shop/publications/3394

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: https://cuvillier.de

I. Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten unterschiedliche Aspekte der Modifizierung von Oberflächen elektrochemischer Biosensoren bearbeitet werden. Die einleitenden Worte beschreiben Hintergründe und Methoden der mit dieser Arbeit umfaßten Bereiche. Thematisch wird ein Überblick über aktuelle Biosensorforschungen gegeben und detaillierter auf die chipbasierte elektrochemische Detektion eingegangen. Ferner findet eine Betrachtung der gängigen Modifikationen von unpolaren Oberflächen zur kovalenten Immobilisierung von Affinitätsmolekülen statt. Nach einer kurzen Übersicht über Antikörper und einer Einführung in die Phagen-Display-Technologie, einem *in vitro*-Verfahren zur Generierung von Antikörpern, werden in diesem Kapitel zusätzlich zwei verwendete Zielproteine mit Relevanz bei Lebensmittelvergiftungen, Staphylokokken Enterotoxin B und Botulinum Neurotoxin A, dargestellt.

I.1 Biosensoren

Die Biosensorforschung hat seit ihren Anfängen Ende der 60er Jahre besonders im Laufe der letzten Jahre durch die Entwicklung neuartiger Meßtechniken an Interesse gewonnen. Spezifische Erkennungsprozesse zwischen biologischen Makromolekülen nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip bilden die Grundlage bei allen biochemischen Vorgängen von der Zellkommunikation über den Metabolismus bis zur Replikation inner- und außerhalb lebender Zellen. Die Kontrolle von und Reaktion auf Bedingungsänderungen beruht auf der Signalregistrierung und -weitergabe, die durch biologische Interaktionen ausgelöst werden.
Durch Kombination der erkennenden Eigenschaften biologischer Komponenten mit signalverarbeitenden elektronischen Bauteilen sind auf dem Gebiet der Analytik Biosensoren entstanden. Grundsätzlich wandelt ein Biosensor ein molekulares Bindungsereignis von zwei Interaktionspartnern, von denen mindestens einer biologischen Ursprungs sein muß, in ein sichtbares Signal um (Scheller und Schubert 1989, Mattiasson 1991, Clarke *et al.* 1985) (Abb. 1). Als Erkennungselemente sind eine Vielzahl von Bindungspartnern mit Affinitäten zueinander geeignet: Protein-Protein wie z.B. Rezeptor-Ligand, Antikörper-Antigen, Antikörper-niedermolekulare Verbindung, Enzym-Substrat oder Inhibitor, Protein-DNA, DNA-Nukleinsäure, PNA-Nukleinsäure, Zellen- oder Zellbestandteile-Protein, Lektin-

Kohlenhydratstruktur, und Avidin-Biotin (Nielsen *et al.* 1991, Boon *et al.* 2002, Hubbard und Gohn 1976, Green 1963).

Eine der Komponenten ist dabei an einer festen Phase immobilisiert, die andere wird in flüssiger oder gasförmiger Phase daran vorbeigeleitet. Eine stattfindende Wechselwirkung wird über einen physikochemischen Transduktor in ein physikalisch messbares Signal umgewandelt. Der gesamte Ablauf des analytischen Meßverfahrens gliedert sich in:

1. die Probenvorbereitung, meistens Verdünnung, Änderung der Pufferbedingungen oder Filtration,
2. die gezielte lokale Anreicherung der Zielsubstanz durch Verwendung von heterogenen Systemen (Fest-/Flüssigphase, Fest-/Gasphase) und
3. entweder die vorgeschaltete Markierung und anschließende biochemische Reaktion zur Detektion oder den direkten Nachweis der Bildung des Affinitätskomplexes.

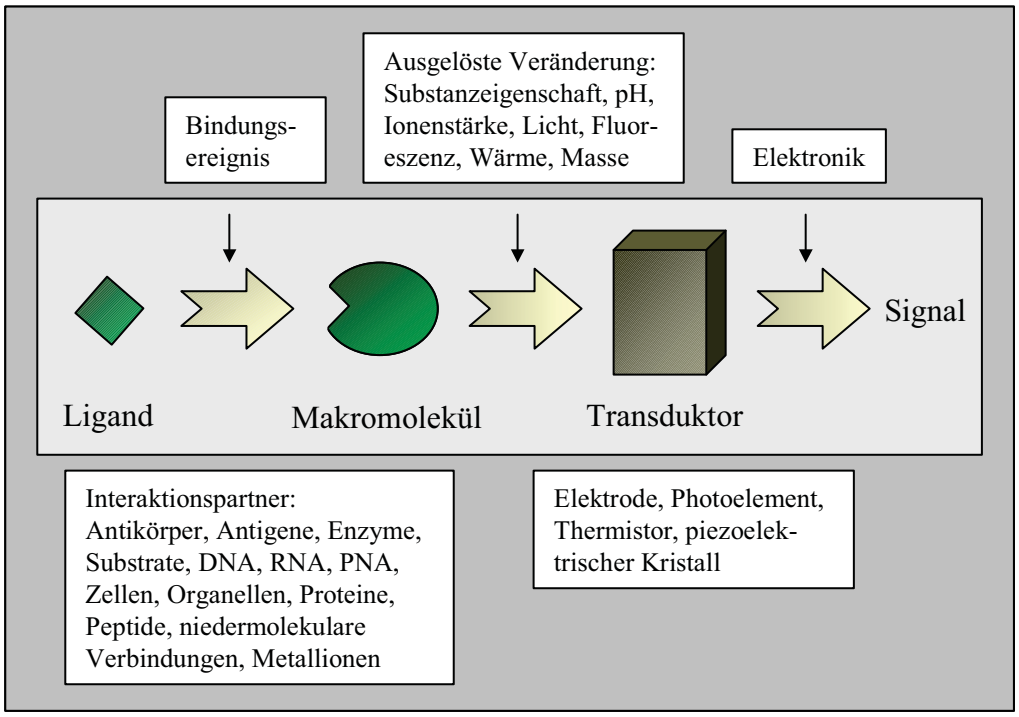


Abb. 1: Aufbau und Meßprinzip eines Biosensors

Als ersten Biosensor läßt sich die Clark-Enzymelektrode (Clark und Lyons 1962) bezeichnen, mit der der enzymatische Umsatz von Glukose an Sauerstoff-Platinelektroden erfaßt wurde.

Biosensoren können prinzipiell in zwei übergeordnete Kategorien, direkt und indirekt messende, unterteilt werden. Direkt detektierende Biosensoren messen die durch die Affinitätsreaktion hervorgerufene physikalische Änderung eines Parameters ohne Zeitverlust.

Bei indirekter Detektion findet nach der Bindung eine biochemische Reaktion statt, deren Reaktionsprodukte durch den Biosensor nachgewiesen werden. Eine detailliertere Klassifizierung von Biosensoren ist nach der jeweiligen Detektionsart in optische, piezoelektrische, elektrochemische oder thermische möglich (Tab. 1). Die meisten Arbeiten auf dem Gebiet sind mit elektrochemischen Transduktoren durchgeführt worden, die heutzutage mit optischen Systemen vergleichbare Nachweisgrenzen erreichen.

Seit Anfang der 80er Jahre ist das Feld der optischen Biosensoren revolutioniert worden (Nylander *et al.* 1982). Die vielfältigen Methoden reichen von der klassischen photometrischen Messung von Frequenzabsorptionen oder -emissionen durch Fluoreszenzeigenschaften und nach kolorimetrischen Reaktionen bis hin zur Änderung von Lichteigenschaften wie Brechungsindex, Streuung, Polarisierung und evaneszentes Feld zugrunde (Welin *et al.* 1984, Schneider *et al.* 1997, Piehler *et al.* 1996).

Die fluoreszenzbasierte Detektion ist davon das gängigste optische Verfahren. Durch die Markierung mit fluorophoren Molekülen oder Enzymen, die zuvor inaktive in fluoreszenzaktive Substanzen umsetzen, können diese nachgewiesen werden. Bei einigen Anwendungen wird gezielt die Fluoreszenzinhibition eingesetzt (Green 1964, Livak *et al.* 1995), so daß erst bei Bindung die fluoreszente Signalgebung möglich wird. Mit dieser Methode wird das Ziel verfolgt, das Hintergrundsignal zu minimieren.

Bio- oder Chemilumineszenz-Sensoren messen enzymatisch oder chemisch erzeugte Photonen. Dabei werden etablierte Systeme wie die ATP-abhängige Luciferase (Ulitzur und Kuhn 1987, Miller *et al.* 1992) zur Detektion von Mikroorganismen und antikörpergebundene Meerrettichperoxidase (Arakawa *et al.* 1979) mit entsprechenden Substraten oder induzierbare lichtemittierende Übergangsmetallkomplexe (Ege *et al.* 1984, Rodriguez und Bard 1990) eingesetzt.

Die Detektion von Veränderungen des evaneszenten Feldes des auf eine distinkte Bindungsposition gestrahlten Lichtes nutzen reflektrometrische, SAW-, und SPR-basierende faseroptische Sensoren (Brecht *et al.* 1991, Weisch *et al.* 1996, Welin *et al.* 1984, Piehler *et al.* 1996, Watts *et al.* 1994, Schneider *et al.* 1997). Dabei dringt das elektromagnetische evaneszente Feld bis zu 20-400 nm in das umgebende Medium ein (Homola *et al.* 1999) und wird durch den Brechungsindex und nach dem Grad der Oberflächenbeladung verändert. Es wurden Nachweisgrenzen bis in den unteren nanomolaren Bereich erreicht (Rowe-Taitt *et al.* 2000).

An Silizium-Kantilevern wird nach der Bindung von Liganden über den Massenzuwachs und eventuelle Wärmeentwicklung eine Oberflächenspannung durch Verbiegung von 100 µm

breiten Siliziumfühlern hervorgerufen, die über eine Resonanzfrequenzänderung meßbar wird (Fritz *et al*. 2000, Berger *et al.* 1997).

Zu den piezoelektrischen Sensoren gehören die Quarzkristallmikrowaagen (Roederer und Bastiaans 1983, Chou *et al.* 2002, Koenig und Gratzel 1993), deren massenabhängige Schwingungsresonanzfrequenz sich durch die Bindung einer Komponente ändert.

Methode	**Prinzip**	**Meßgröße**	**Kat.**	**Bez.**	**Detek-tionslimit**	**Literatur**
Potentiometrie	Potentialänderung	Spannung	D	E	pM	Pergel *et al.* 2001
Amperometrie	Stromflußänderung	Strom	I	E	pM	Liu *et al.* 2000
Impedanz	Änderung des Wechsel-stromwiderstands	Widerstand	D	E	aM	Dijksma *et al.* 2001
Oberflächenplas-monenresonanz (SPR)	Energieänderung eines Plasmons	Brechungs-index	D	O	fM	Naimushin *et al.* 2002
Quarzkristall-mikrowaage (QCM)	Energieänderung von piezoelektrischen Kristallen	Resonanz-Frequenz	D	P	pM	Chou *et al.* 2002
Fluoreszenz	Farbänderung	UV/VIS-Frequenz	I	O	pM	Rowe-Taitt *et al.* 2000
Kolorimetrie	Farb- oder Intensitäts-änderung des emittierten Lichts	VIS-Frequenz	I	O	µM	Xu und Dong 2000
Kalorimetrie	Widerstandsänderung durch Wärme	Widerstand	D	E	µM	Danielsson und Xie 1997
Kantilever	Änderung der Silizium-oberflächenspannung	Resonanz-Frequenz	D	O	nM	Fritz *et al.* 2000
Oberflächenaku-stikresonanz (SAW)	Energieänderung von Oberflächenwellen	Resonanz-Frequenz	D	O	nM	Weisch *et al.* 1996
Prismenkoppler (RM)	Änderung der Oberflächenreflektivität	Brechungs-index	D	O	nM	Cush *et al.* 1993, Watts *et al.* 1994

Tab. 1: Übersicht einiger Sensoren für die biomolekulare Interaktionsanalyse; I: indirekt, D: direkt, O: optisch, E: elektrochemisch, P: piezoelektrisch, T: thermisch, VIS: visueller Frequenzbereich, UV: ultravioletter Frequenzbereich

Elektrochemische Biosensoren sind vielseitig einsetzbar, da sie analog den optischen Systemen Parameter wie Massenzuwachs, markierte Komponenten oder enzymatisch generierte Mediatoren über die Messung von Strom, Spannung, Kapazität oder Widerstand detektieren. Metabolische Parameter wie Sauerstoffgehalt, Ionenkonzentrationen oder pH-Werte werden standardmäßig über Potentialänderungen gemessen. Eine Besonderheit ist dabei der lichtadressierbare potentiometrische Sensor LAPS (Tiefenthaler 1993), in dem optische und elektrochemische Detektion kombiniert wurden. Die biospezifische Reaktion findet dabei an einer Kondensatoroberfläche statt. Blinkende Photodioden lösen durch die

Potentialänderung an dieser Kondensatoroberfläche einen Wechselstrom aus, der massen- und pH-abhängig ist.

Biosensoren basierend auf Voltammetrie stellen die größte Gruppe der elektrochemischen Detektoren dar. Die Messungen finden bei konstant eingestellter Spannung statt und detektieren den fließenden Strom in Form von Leitfähigkeiten oder Redox-Aktivitäten entsprechender Mediatoren. Kürzlich wurde eine gezielte Kurzschlußhervorrufung in einem DNA-Sensor über die Nutzung von goldpartikelmarkierten Oligonukleotiden und Elektroden mit geringem Abstand gezeigt (Park *et al.* 2002).

Thermistoren sind in der Lage, Wärmeänderungen bis zu 0,01 °C über den Widerstand zu messen (Mattiasson 1991).

Mit der Impedanz-Spektroskopie lassen sich frequenzabhängig Wechselstromwiderstände messen und damit einzelne Phasen der Elektrodenteilreaktionen (Diffusion der aktiven Substanz zur Elektrode, Elektronenübertragung an der Elektrodenoberfläche, Entfernung der Reaktionsprodukte durch Diffusion) untersuchen. Mit dieser Methode sind Detektionsgrenzen im attomolaren Bereich für die Erkennung eines 15,5 kDa Proteins in einem Immunosensor erreicht worden (Dijksma *et al.* 2001).

Immunosensoren sind Systeme, die die natürlichen Affinitätskonstanten von Antikörper-Antigen-Paaren im Bereich von 10^{-5}-10^{-11} M zur hochspezifischen Erkennung nutzen. Die gängigste Standardprozedur für indirekte Systeme ist die enzymgekoppelte Immunodetektion an fester Phase (ELISA) im Sandwich-Format, die seit Anfang der 70er Jahre angewandt wird (Engvall und Perlman 1971). Ein festphasengebundener Antikörper dient dabei als Fängermolekül für das zu detektierende Zielprotein, das wiederum von einem Detektionsantikörper erkannt wird. Durch eine Markierung des Detektionsantikörpers kann das Zielprotein direkt oder über die enzymatische Generierung optisch bzw. elektrochemisch aktiver Substanzen nachgewiesen werden. Direkte Systeme verzichten auf den Einsatz des Detektionsantikörpers.

Das Bindungsereignis bei DNA-Sensoren ist die Hybridisierung von zwei komplementären DNA-Strängen. Die Detektion des spezifisch gebildeten Doppelstranges kann über einen Massenzuwachs, eine Markierung des zweiten Stranges oder durch den Einsatz von aromatischen Interkalatoren optisch oder elektrochemisch durchgeführt werden.. Interkalatoren können als Markierung dienen, da sie sich an die große oder kleine Furche der DNA-Doppelhelix anlagern oder aufgrund ihrer planaren Struktur mit den aromatischen Ringsystemen der gestapelten DNA-Basen (Friedman *et al.* 1991, Takenaka *et al.* 1992) interagieren.