

Elektrochemische Detektion der DNA-Hybridisierung an heizbaren Goldelektroden

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock



vorgelegt von

Jörg Peter, geb. am 15.05.1972 in Dresden

Rostock, 16. Oktober 2007

urn:nbn:de:gbv:28-diss2008-0035-6

1. Gutachter: PD Dr. G.-U. Flechsig
(Universität Rostock)

2. Gutachter: PD Dr. F.-M. Matysik
(Universität Leipzig)

Eingereicht am: 16.10.2007
Datum der Rigorosumsprüfung: 01.02.2008
Datum der Verteidigung: 03.04.2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2004 bis Oktober 2007 am Institut für Chemie Abteilung Analytische, Technische und Umweltchemie unter der Leitung von PD Dr. Gerd-Uwe Flechsig angefertigt.

Während dieser Arbeit wurden ein Patent und 3 Publikationen veröffentlicht.

Publikationen:

DNA hybridization detection at heated electrodes ;
Flechsig, G.-U.; Peter, J.; Hartwich, G.; Wang, J.; Gründler, P. (2005);
Langmuir 21: 7848-7853

Electrochemical DNA hybridization detection using fluorescence quenching label
dabcyl;
Flechsig, G.-U.; Peter, J.; Voss, K.; Gründler, P. (2005)
Electrochem. Comm. 7: 1059-1065

Comparision of DNA hybridization at rotating and heated gold disk electrodes
Pcter, J.; Reske, T.; Flechsig, G.-U. (2007)
Electroanalysis 19 (13): 1356-1361

Patent:

Verfahren und Array zur Replizierung und Analytik von Nukleinsäuren
Flechsig, G.-U.; Peter, J. (2005)
DE patent application 10 2005 007 148.1, PCT/EP2006/008131

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Gerd-Uwe Flechsig für die interessante Aufgabenstellung und Betreuung meiner Arbeit.

Den Mitarbeitern der Deutschen Metrohm GmbH, insbesondere Hr. Haug und Hr. Vogt, danke ich für die Beratung und Unterstützung in technischen Fragen zum Messsystem.

Mein Dank gilt auch unserem Patentanwalt Hr. Göbel für die Unterstützung bei der Anmeldung unseres Patentes.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung durch das Projekt FL 384/3-1 bedanken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit. Vor allem möchte ich Hr. PD Dr. Flechsig und Hr. Karsten Voss für die Zusammenarbeit an dem Artikel über das Dabcyl-markierte Target und die Bereitstellung der polarographischen Messungen mit dem reinen Dabcyl danken. Hr. Thomas Reske danke ich für die Unterstützung bei den Messungen zu meinem letzten Artikel.

Bei Prof. Dr. Peter Gründler möchte ich mich für die wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.

Formelzeichen

A	Elektrodenoberfläche
β	Temperaturkoeffizient
c	Konzentration
c_0	Ausgangskonzentration
D	Diffusionskoeffizient
D_0	Diffusionskoeffizient
E	Elektrodenpotential
E_0	Standartelektrodenpotential
ΔE	Amplitude
F	Faraday-Konstante
Γ_0	Oberflächenkonzentration
Γ_{DNA}	DNA-Oberflächenkonzentration
$\Delta_R G$	freie Reaktionsenthalpie
I	Strom
I_p	Peakstrom
L	Anzahl der Nukleotide je Nukleinsäurestrang
m	Anzahl der Basen je Sonde
n	Anzahl der ausgetauschten Ladungen
N_A	Avogadro-Konstante
Q	Ladung
Q_{total}	Gesamtladung
Q_{dl}	kapazitive Ladung
Q_{ads}	adsorbierte Ladung
Q_{diff}	Diffusionsladung
R	allgemeine Gaskonstante
$\Delta_R S$	freie Reaktionsentropie
T	Temperatur
T_m	Schmelzpunkt
ΔT	Temperaturdifferenz
t	Zeit
ω	Kreisfrequenz

Abkürzungen

ACV	Wechselstromvoltammetrie
AdSV	Adsorptive Stripping Voltammetrie
AE	Arbeitselektrode
Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid-Referenz (in 3 M KCl)
AuNP	Goldnanopartikel
C	Cytosin
CeNA	Cyclohexenylnukleinsäure
DCT	Tast-Polarographie
DPP	Differential Puls Polarographie
DME	tropfende Quecksilberelektrode
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
ssDNA	einzelsträngige DNA
G	Guanin
GE	Gegenelektrode
GPES	Auswertungssoftware
HCPE	heizbare Kohlepastelektrode
HMDE	hängende Quecksilberelektrode
HRP	Meerrettichperoxidase
LNA	locked Nukleinsäure
LTCC	low temperature co-fired ceramic- Elektrode
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure-Monohydrat
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NP	Nanopartikel
PB	Phosphatpuffer
PC	Personalcomputer
PSA	potentiometrische Stripping Analyse
PNA	Peptidenukleinsäure
PQQ	Pyrrol-quinolin-quinon
PTFE	Teflon
RDE	rotierende Scheibenelektrode
RE	Referenzelektrode
RI	Redoxindikator
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messengerRNA
tRNA	transferRNA
SAM	selbstanordnende Monoschichten
SCE	gesättigte Calomelelektrode
SWV	Square Wave Voltammetric
TNA	Threosenukleinsäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan - Puffer
UV	ultraviolettes Licht
UV/VIS	ultraviolettes/sichtbares Licht
WE	Drahtelektrode
X	Redoxindikator (allgemein)
X _{red}	reduzierter Redoxindikator
X _{ox}	oxidierter Redoxindikator

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Entwicklung der DNA-Analytik.....	1
1.2 Entwicklung der heizbaren Elektroden.....	8
2. Aufgabe	12
3. Allgemeine Grundlagen	13
3.1 Aufbau und Funktion eines Biosensors.....	13
3.2 Die Nukleinsäuren.....	15
3.2.1 Aufbau und Funktion.....	15
3.2.2 Hybridisierung und Dehybridisierung.....	17
3.2.3 Aufbau der Sonde und Immobilisierung.....	20
3.3 Reaktion der Redoxmarkierung.....	22
3.4 Vorteile und Nachteile von Gold als Elektrodenmaterial.....	23
3.5 Messverfahren.....	24
3.5.1 Polarographische Methode – Messungen mit Quecksilber-	
elektroden.....	24
3.5.1.1 Tast-Polarographie.....	24
3.5.1.2 Differenz-Puls-Polarographie.....	25
3.5.2 Messungen mit Goldelektroden.....	25
3.5.2.1 Zyklische Voltammetrie.....	25
3.5.2.2 Wechselstromvoltammetrie (ACV).....	26
3.5.2.3 Square Wave Voltammetrie (SWV).....	27
3.5.2.4 Open-Circuit-Chronopotentiometrie und Tempera-	
turkalibrierung der heizbaren Elektrode.....	28
3.5.2.5 Adsorptive Stripping Voltammetrie (AdSV).....	31
3.5.2.6 Chronocoulometrie und Bestimmung der Ober-	
flächenbeladung.....	32
4. Experimentelles	36
4.1 Elektrodentypen.....	36
4.1.1 Die Scheibenelektrode.....	36

4.1.2 Heizbare Elektroden.....	37
4.2 Versuchsanordnungen.....	39
4.2.1 Versuchsaufbau für die photometrische Bestimmung der Schmelztemperatur der DNA.....	39
4.2.2 Aufbau des Messplatzes für den elektrochemischen Hybridisierungsnachweis.....	39
4.2.3 Messplatzaufbau für die polarographische Versuche.....	40
4.2.4 Messplatzaufbau für die Temperaturkalibrierung.....	41
4.3 Präparation der Elektroden und Versuchsdurchführung.....	42
4.3.1 Reinigung der Elektroden.....	42
4.3.2 Immobilisierung der Sonden.....	42
4.3.3 Hybridisierung, Messung und Dehybridisierung.....	43
4.4 Sequenzen der verwendeten Nukleinsäuren.....	45
4.4.1 Modifizierung des Targets mit Osmiumtetroxid-Bipyridin.....	46
4.5 Temperaturkalibrierung.....	47
4.6 Bestimmung der Oberflächenbelegung.....	48
 5. Ergebnisse und Diskussion	 50
5.1 Vorversuche zur Stabilität der dsDNA.....	51
5.1.1 Schmelzpunktbestimmung von dsDNA in Lösung.....	51
5.2 Vergleich der verwendeten Sonden und SAM's.....	54
5.2.1 Signalstabilität der Sonden.....	54
5.2.2 Optimierung.....	56
5.3 Untersuchte Targetmodifizierungen.....	60
5.3.1 Vorversuche zum elektrochemischen Verhalten von Dabcyl....	61
5.3.2 Weitere untersuchte Farbstoffe.....	65
5.3.3 Herkömmliche elektrochemisch aktive Marker.....	66
5.3.3.1 Ferrocen-Marker.....	66
5.3.3.2 Osmium-markierte Targets.....	68
5.3.4 Vergleich der Marker.....	70
5.4 Einfluss der Reaktionsparameter auf das Hybridisierungssignal.....	70
5.4.1 Konvektion an der Elektrodenoberfläche.....	70
5.4.2 Dauer der Hybridisierung.....	72
5.4.3 Temperatur während der Hybridisierung.....	74

5.4.4 Konzentration des Targets.....	75
5.5 Vergleich der Elektrodentypen.....	77
5.5.1 Empfindlichkeit.....	77
5.5.2 Sondenoberflächenbeladung und Einfluss der Hybridi- sierungstemperatur auf die SAM.....	81
5.5.3 Kalibrierkurven.....	83
5.5.4 Verhalten des Signals in Abhängigkeit von der Hybridi- sierungszeit.....	85
5.5.5 Temperatureinfluss während der Hybridisierung.....	86
5.5.6 Selektivität der Draht- und Scheibenelektrode.....	88
 6. Zusammenfassung	 90
 7. Ausblick	 92
Anhang	98
Abbildungsverzeichnis	98
Literatur	102

1. Einleitung

Seit Beginn der 80er Jahre gewinnt die DNA-Analytik, bedingt durch die Fortschritte in der Molekularbiologie, der Biotechnologie, der medizinischen Diagnostik und Therapie zunehmend an Bedeutung.

Auf Grund der Ereignisse des 11. Septembers 2001 wurde diese Entwicklung durch die Angst vor Terroranschlägen mit biologischen Waffen, wie z. B. Anthrax und Butox, zusätzlich beschleunigt.

Eine Möglichkeit effizientere und preiswertere Analyseverfahren für dieses Aufgabenfeld zu entwickeln, besteht unter anderem im Einsatz heizbarer Elektroden.

Diese Entwicklung in der DNA-Detektion zeichnet sich durch eine Reihe von Vorteilen, die die elektrochemische Detektion mit geheizten Elektroden gegenüber den optischen Verfahren besitzt, aus. Typisch für diese heizbaren elektrochemischen Messsysteme ist ein geringer Geräteaufwand. So kann z. B. auf den beim Nukleinsäure-Blotting eingesetzten Hybridisierungsöfen verzichtet werden.

In den folgenden beiden Teilabschnitten soll deshalb die bisherige Entwicklung in der Genanalyse und der Thermoelektrochemie dargestellt werden. Auf die theoretischen Grundlagen der Biosensoren und Nukleinsäuren wird in Kapitel 3 genauer eingegangen.

1.1 Entwicklung der DNA-Analyse

Eine Methode zur Bestimmung von Krankheitserregern besteht darin ihre DNA zu untersuchen und mit anderen Erregern zu vergleichen. Dazu ist allerdings eine Markierung der DNA notwendig.

Die älteste Technik zur Markierung von Nukleinsäuren ist der seit den 50er Jahren eingesetzte Einbau von radioaktivem Phosphor. Das nutzten unter anderem Hershey und Chase bereits 1952 zum Nachweis von DNA als Träger der genetischen Information in Viren¹. Dazu wurden *E. coli* - Bakterien mit einem mit radioaktiven Schwefel und Phosphor markierten T2-Phagen, einem für Bakterien typischen Virus, infiziert und die viralen Proteine von der Oberfläche der Bakterien entfernt. Nach der Vermehrung und Lyse der Bakterienkultur konnten nur noch mit Phosphor markierte Phagen gefunden werden. Das war der endgültige Beweis für die Rolle der DNA als infektiöses Reagenz und als Träger der genetischen Information in Viren.

11 Jahre später gelang Burgi und Hershey die Auftrennung von ^{32}P -markierten Phagen-DNA-Fragmenten mittels Glukose-Dichte-Gradientenzentrifugation². Durch diese Arbeit wurden die Grundlagen zur Bestimmung von Organismen mittels DNA-Fragmenten gelegt.

Durch die Einführung der Auftrennung mittels Gelelektrophorese konnte die Dichte-gradientenzentrugation umgangen werden. Die Kombination mit Restriktions-enzymen, die die DNA an definierten Stellen schneiden, ermöglicht eine genaue Bestimmung der Art eines Organismus.

Beim Nachweis mittels radioaktiver Markierung muss die Probe durch eine mehrere Stunden bis Tage dauernde Lagerung des Gels unter einem Röntgenfilm auf diesem abgebildet werden. Obwohl die Arbeit mit radioaktiven Isotopen durch die einzu-haltenden Sicherheitsmassnahmen relativ unhandlich ist, ist diese Markierungs-technik immer noch weit verbreitet^{3,4,5}. Die Ursache dafür besteht darin, dass durch die ^{32}P -Markierung mit einem sehr geringen technischen Aufwand eine sehr hohe Empfindlichkeit erreicht wird.

Mitte der 60er Jahre entwickelten LePecq und Paoletti den Fluoreszenznachweis von Nukleinsäuren mittels interkallierender, das heißt sich in die DNA einlagernden, Fluoreszenzfarbstoffen⁶. Dieses Verfahren begann sich in den 70er Jahren auf Grund seiner schnellen Auswertbarkeit im Labor durchzusetzen und hat sich bis heute als Standardmethode bei der Detektion von Nukleinsäurefragmenten etabliert^{7,8}.

Mitte der 70er Jahre wurden die Markierungstechniken durch die Einführung des Southern-Blots ergänzt. Dabei werden DNA-Fragmente, die zuvor in einem Gel aufgetrennt wurden, auf Nylon-Membranen transferiert⁹. Anschließend werden durch die Hybridisierung mit markierten Sonden, dass heißt Nukleinsäuren, die an eine be-stimmte Sequenz binden, diese Fragmente nachweisbar. Die Markierung der Sonde kann sowohl radioaktiv als auch optisch, dass heißt durch einen kovalent gebundenen Farbstoff, erfolgen. Durch die zeitgleich eingeführte Darstellung bestimmter Oligo-nukleotidsequenzen mittels Merrifield-Synthese war damit erstmals eine teilweise Bestimmung der DNA-Sequenz möglich.

In den 80er Jahren wurde in den USA von Mullis die Polymerase-Kettenreaktion oder PCR entwickelt und im Labor etabliert^{10,11}. Durch diese Methode wurde die Vervielfältigung der DNA und dadurch die Nutzung kleinster Mengen genetischen Materials, dass heißt ein Nachweis ab etwa 100 Molekülen, möglich. Der Einsatz von bestimmten kurzkettigen Nukleinsäuren, der für den Start der Reaktion

notwendigen *primer*, ermöglicht außerdem die selektive Vervielfältigung bestimmter Gensequenzen. Von dieser Amplifikationstechnik wurden in den letzten Jahren verschiedene Varianten entwickelt. So wurden zur Steigerung der Genauigkeit die Polymerase aus *Thermus aquaticus* mit einem für das aktive Zentrum spezifischen Antikörper¹² oder Adaptamer^{13,14} kombiniert. Dadurch wird das Enzym erst nach dem ersten Reaktionsschritt der PCR aktiv. Weitere Modifikationen zur Optimierung der PCR entstanden durch den Einsatz von Polymerasen aus anderen Organismen^{15,16} oder gentechnisch veränderten Polymerasen¹⁷.

Zu Beginn der 90er Jahre entwickelten Higuchi et al. die PCR, durch die Kombination mit den von LePecq und Paoletti entwickelten Nachweisverfahren, zur *real time* PCR weiter¹⁸. Dadurch konnte die Analysezeit für Genanalysen sehr stark verkürzt werden. In den letzten Jahren wurde die PCR-Technik durch verschiedene Arbeitsgruppen gerätetechnisch modifiziert. So wurde beispielsweise von Ahram Biosystems Inc. ein Patent für den Einsatz der Thermokonvektion bei der PCR angemeldet¹⁹. Ebenfalls beschrieben wurden der Einsatz einer *ultra fast real time* PCR²⁰, die die benötigte Analysenzeit auf wenige Minuten reduziert.

In den 90er Jahren entwickelte sich die DNA-Analyse mittels Microarray²¹. Die Detektion erfolgt dabei nach der Hybridisierung, dass heißt der Doppelstrangbildung, der nachzuweisenden DNA mit der Sonde. Die zu bestimmende Nukleinsäure wird vorher mit entsprechenden Markierungs-Kits direkt oder durch den Einsatz von markierten Oligonukleotiden, sogenannten Reportersträngen, indirekt markiert. Die Markierung erfolgt in der Regel mit optischen Markern, wie Fluorescein oder Texas Red. Aufgrund der Konstruktion der Arrays wird eine hohe Informationsdichte erhalten, die die Auswertung zusätzlich beschleunigt.

Im Gegensatz dazu erfolgt bei der 1977 von Sanger et al. vorgestellten automatisierten DNA-Sequenzierung die Bestimmung der DNA-Sequenz durch den Abbruch der Synthese des DNA-Stranges²².

Die bisher genannten Techniken haben sich als Standardmethoden in der Genanalyse etabliert. Nachteilig sind bei allen Methoden der hohe gerätetechnische Aufwand und eine damit verbundene spezielle Ausbildung der zur Bedienung notwendigen Fachkräfte.

Eine Alternative für die Nukleinsäureanalyse stellt die seit Ende der 50er Jahre von Palecek et al. entwickelte elektrochemische Detektion dar.

Ursprünglich erfolgte die elektrochemische Detektion der DNA durch die Reduktion der Guanin- und Adeninreste der Nukleinsäure an der hängenden Quecksilbertropfenelektrode (HMDE)^{23,24}. Diese direkte Detektion von Nukleinsäuren an Quecksilberelektroden wird seit dem von Palecek et al. und anderen Arbeitsgruppen angewandt. So setzten Palecek und seine Mitarbeiter in den letzten 5 Jahrzehnten neben der ursprünglich zur Detektion von Nukleinsäuren verwendeten oszillographischen Polarographie²³, auch die adsorptive Stripping Voltammetrie²⁵, die Differenz Puls Polarographie²⁶ und die zyklische Voltammetrie²⁷ ein. In den 70er Jahren untersuchten Valenta und Nürnberg das Verhalten von Polynukleotiden an HMDE und tropfenden Quecksilberelektroden (DME)²⁸. Allerdings besitzen die dafür eingesetzten Quecksilberelektroden einige Nachteile. So ist das als Elektrodenmaterial verwendete Quecksilber toxisch. Deshalb ist die Suche nach Alternativen zu diesem Material sinnvoll.

Aus diesen Gründen setzte Brabec bereits 1979 Graphitelektroden zur voltammetrischen DNA-Detektion ein²⁹. Mit diesem Elektrodenmaterial gelang ihm eine bessere Auftrennung der Oxidationspeaks des Guanins und Adenins. 1981 wiesen Hinnen et al. sowohl denaturierte als auch native DNA an HMDE und Goldelektroden mittels zyklischer Voltammetrie und Kapazitätsmessungen nach³⁰. Seit den 90er Jahren wurde der Einsatz von Elektroden auf der Basis von Kohlenstoff für die Analysemethode mit unmarkierter DNA von anderen Arbeitsgruppen verstärkt untersucht. So zeigten Brett et al. 1994 an einer Glasskohleelektrode, dass die Oxidation der beiden Purin-Basen irreversibel ist³¹. Cai et al. detektierten 1996 Plasmid-DNA an Kohlepastelektroden³². Dabei wurden Unterschiede zwischen den potentiometrischen Stripping Analysen (PSA) der nativen, linearen und denaturierten DNA erkennbar. So betrug die Nachweisgrenze der linearen DNA 15 ng/ml.

1999 nutzten Wang und Mitarbeiter eine Bleistiftelektrode zur Detektion von RNA und DNA³³. Die Arbeitsgruppe Rivas setzte 2006 mit Kohlenstoff-Nanotubes/Chitosan modifizierte Glaskohleelektroden bei Versuchen mit Doppelstrang- und Einzelstrang-DNA ein³⁴. Dabei konnte bereits durch die Immobilisierung des Chitosans mit Glutaraldehyd eine sehr starke Erhöhung des Signals erreicht werden. Durch die Zugabe der Nanotubes zu dem Chitosan konnte die Empfindlichkeit fast verdoppelt werden.

Neben den bisher genannten Elektrodentypen wurden auch andere Feststoffelektroden untersucht. So gelang es 1999 Fan et al. durch den Einsatz einer Silberelek-

trode das Oxidationspotential des Adenosinpeaks-Peaks auf etwa 0,15 V vs. SCE zu senken³⁵. Bei den Graphitelektroden lag dieses Potential bei fast 1 V. 2006 untersuchten Hason und Vetterl verschiedene Amalgamelektroden³⁶. Dabei erwies sich die Wechselstromvoltammetrie mit einer Platinamalgamelektrode als günstigste Methode für diese Anwendung.

Die bisher beschriebenen elektrochemischen Techniken beziehen sich allerdings nur auf die Detektion von Nukleinsäuren ohne Berücksichtigung der Sequenz.

Für die Detektion von Mutationen mit unmarkierten Nukleinsäuren sind einige Zwischenschritte notwendig.

Aus diesem Grund nutzten Wang et al. bereits 2001 und Palecek et al. 2002 magnetische Nanopartikel zur Isolierung der nachzuweisenden Gensequenz³⁷. Dabei wird die zu bestimmende Gensequenz vor der Nachweisreaktion an DNA-modifizierte Nanobeads gebunden. Anschließend erfolgt die Aufreinigung der zu bestimmenden DNA durch die magnetische Abtrennung der Partikel von der Probenlösung. Nach einer darauf folgenden Dehybridisierung, d. h. Aufschmelzen der Sonden-Target-Doppelstränge, erfolgt die jetzt spezifische Bestimmung der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz an der Kohleelektrode. Dadurch gelang erstmals die selektive DNA-Bestimmung durch direkte Oxidation der Nukleinsäure.

Eine andere Methode besteht darin, Reparaturenzyme einzusetzen. Diese Proteine binden an den Fehlpaarungen. In einen weiteren Schritt werden sie abgelöst und separat elektrochemisch bestimmt. So verwendeten Masarik et al. 2007 das MutS-Protein in Kombination mit Nanopartikeln zur Detektion von DNA-Fehlpaarungen³⁸. Bei diesen bisher genannten elektrochemischen Nachweisverfahren mit unmarkierten Proben wird, mit Ausnahme der von Masarik angewendeten Methode, die nachzuweisende Nukleinsäure zerstört.

Durch die Einführung chemisch modifizierter DNA in den letzten 2 Jahrzehnten ergab sich eine weitere Möglichkeit der Nukleinsäureanalyse.

Grundlage dafür ist ein an der Elektrode immobilisierbares, meist thiolmodifiziertes, Oligonukleotid. Die als Sonde bezeichnete Nukleinsäure dient als spezifische Erkennungssequenz für die nachzuweisende DNA-Sequenz, das Target. Die eigentliche Nachweisreaktion erfolgt erst nach der Bildung des Sonden-Target-Doppelstranges. Dafür kann z. B. die Einlagerung von Interkallatoren in den Nukleinsäurestrang genutzt werden.

So detektierten Millian und Mikkelsen bereits 1993 doppelsträngige Oligonukleotide mit tris(2,2'-Bipyridyl)Kobalt(III)- und tris(1,10-Phenanthrolin)Kobalt(III)-Komplexen an Glasskohleelektroden³⁹. Auf der Basis dieser Arbeit entwickelten Erdem et al. 1999 einen Hepatitis B-Sensor⁴⁰. Dadurch gelang erstmals die elektrochemische Bestimmung pathogener viraler DNA.

Während der letzten Jahre wurden auch andere organische Schwermetallkomplexe eingesetzt. So nutzt die Arbeitsgruppe um Barton seit 2000 Rhenium- und Rhodium-Komplexe als Interkallatoren^{41,42}. Li et al. demonstrierten 2007, dass ein Einsatz von Ruthenium-Porphyrin ebenfalls möglich ist⁴³. Rodriguez et al. setzten 2005 Molybdenocen-Derivate ein⁴⁴.

Einen anderen Mechanismus der Markierung der DNA mit Schwermetallkomplexen, nutzten Steel et al. 1998. In dieser Studie wurden die DNA-Oberflächenbelegung der Elektrode und die Hybridisierungseffizienz durch die Bindung von Ruthenium-hexammin(III) an dem negativ geladenen Rückgrat der Nukleinsäure bestimmt⁴⁵.

Neben den Metallkomplexen kamen aber auch verschiedene organische interkallierende Substanzen zum Einsatz. So untersuchten Barton et al. 1997 das elektrochemische Verhalten des Malariamittels Methylenblau an einer DNA-modifizierten Goldelektrode und nutzten dieses 2 Jahre später auch zum Nachweis von Basenfehlpaarungen⁴⁶. 2002 nutzten Meric et al. dieses Arzneimittel zur Bestimmung pathogener Viren⁴⁷. Wong et al. beschrieben 2004 mit Anthraquinon-2-sulfon- und Anthraquinon-2,6-disulfonsäure zwei weitere zuverlässige Redoxinterkallatoren⁴⁸. Ein anderer von Barton et al. und Chu et al. untersuchter Indikator ist Daunomycin^{46,49}. Durch den Einsatz der hier genannten Interkallatoren ist ein selektiver Nachweis der Doppelstrang-Nukleinsäuren möglich. Die dafür verwendeten Substanzen werden zum Teil in der Medizin oder chemischen Industrie eingesetzt und sind dadurch leicht verfügbar. Allerdings ist die Position in dem Duplex nicht genau festgelegt, wodurch auch falsch negative Analyseergebnisse möglich sind.

Eine ebenfalls weit verbreitete Markierungstechnik ist die chemische Modifizierung der nachzuweisenden Nukleinsäuren oder ihrer komplementären Sequenzen.

Dabei kann die DNA mit Hilfe von Nanopartikeln nachgewiesen werden. So setzten bereits 1996 Mirkin et al. Goldnanopartikel (AuNP) zur optischen Detektion von Oligonukleotiden ein⁵⁰. Bei diesem Nachweis nutzten sie die Aggregation der DNA-modifizierten Nanopartikel mit dem Target. 2001 beschrieben Wang et al. die Detektion des Krebsgens *BRAC1* mit AuNPs und nukleinsäuremodifizierten

magnetischen Nanopartikeln⁵¹. Der Nachweis erfolgte mittels potentiometrischer Stripping Analyse (PSA) des Au(III)-Ions nach Lösen der Goldpartikel. Im selben Jahr setzte diese Arbeitsgruppe die Messtechnik bei der Nukleinsäuredetektion mittels silberbeschichteter AuNPs ein⁵². Bei der Detektion bewirkte die Silberbeschichtung der NPs eine Verstärkung des Messsignals. 2006 verbesserten Rochelet-Dequair et al. die von Wang et al. für den *BRAC1*-Test eingesetzte Methode⁵³. Durch den Einsatz eines Abscheidungsschritts von Gold auf den AuNPs vor deren Auflösung gelang es die Nachweisgrenze von etwa 1 fM auf 0,6 fM zu senken.

Neben Gold wurden bei dieser Technik noch andere Materialien eingesetzt. So nutzten Cai und Mitarbeiter 2002 Silbernanopartikel zur Nukleinsäuredetektion⁵⁴.

2004 erreichten Zhu et al. durch den Einsatz von Bleisulfid-Nanopartikeln eine Detektionsgrenze von 300 fM eines 24-Basen Oligonukleotids⁵⁵. Der Nachweis der DNA geschah hier, wie bei den anderen Tests mit NP. Die Bestimmung der jeweils eingesetzten Metalle beziehungsweise Sulfide erfolgte mittels Stripping Voltammetrie nach Lösen der Markierung. Die Nukleinsäure wird dabei leider zerstört.

Zu Beginn der 80er Jahre begannen Palecek et al. mit der Entwicklung der DNA-Markierung mit bestimmten Osmiumtetroxid-Amin-Komplexen⁵⁶. Die Besonderheit dieser Markierung besteht darin, dass z. B. der Osmiumtetroxid-Bipyridin-Komplex, nur mit den Thymidin- und Cytosinresten der einzelsträngigen Nukleinsäuren eine kovalente Bindung eingeht⁵⁷. Dieser Komplex zeichnet sich durch eine sehr hohe elektrochemische Aktivität aus. Aus diesem Grund wurde in unserer Arbeitsgruppe diese Methode genauer untersucht, verbessert und patentiert⁵⁸.

Seit Mitte der 90er Jahre werden auch andere kovalent gebundene Markierungssubstanzen genutzt. Takenaka et al. setzten Ferrocen bereits 1994 als elektrochemischen Marker ein^{59,60}. 2003 erreichten Heeger et al. mit einer Ferrocen-markierten Sonde eine Nachweisgrenze von 10 pM⁶¹. Bei dieser Studie wurde eine teilweise mit sich selbst hybridisierte Sonde eingesetzt. Die Sonde verliert durch die Hybridisierung mit dem komplementären Target ihr Ferrocensignal. Seit Beginn dieses Jahrzehnts nutzt die Firma FRIZ BioChem GmbH in Deutschland einen Verdrängungsassay auf der Basis ferrocen-markierter Oligonukleotide um Mutationen nachzuweisen⁶².

Neben den Schwermetallkomplexen werden auch rein organische Substanzen kovalent an Nukleinsäuren gebunden. So nutzten 1999 Hartwich et al. Pyrrol-

quinolin-quinon (PQQ) als Markierungssubstanz für Nukleinsäuren⁶³. 2006 beschrieben Heeger und Mitarbeiter einen Verdrängungsassay bei dem ein Methylenblau-markierter Reporterstrang, das heißt eine markierte Hilfssequenz, teilweise von der Sonde verdrängt wurde⁶⁴. 2007 verwendeten Panke et al. das Prinzip der Strangverdrängung ebenfalls⁶⁵, indem sie eine mit Methylenblau markierte Sonde einsetzten.

Neben diesen niedermolekularen Redoxindikatoren werden für die Nukleinsäuremarkierung auch Enzyme genutzt. So wiesen Heller et al. bereits 1999 10^5 einfache mit Meerrettichperoxidase (HRP) markierte Oligonukleotide an einer Mikroelektrode nach⁶⁶. Ein Jahr später detektierten Brossier et al. mit HRP und Diaminobenzen die DNA des menschlichen Cytomegalovirus⁶⁷. Dieser Virus ist ein Herpesvirus, der bei Transplantationspatienten zur Organabstoßung oder sogar zum Tod führen kann⁶⁸. Die Detektionsgrenze dieses Testsystems lag bei 0,6 aM.

2002 setzten Wang et al. die alkalische Phosphatase zur Detektion des Krebsgens *BRCA1* ein⁶⁹. Im selben Jahr ergänzte diese Arbeitsgruppe das Detektionssystem durch den zusätzlichen Einsatz einer β -Galaktosidase⁷⁰. Durch den Einsatz der Chronopotentiometrie wurde die simultane Bestimmung der beiden Reaktionsprodukte von der alkalischen Phosphatase (α -Naphthol) und β -Galaktosidase (Phenol) an einer Elektrode möglich.

Die zur Markierung eingesetzten Enzyme ermöglichen eine sehr geringe Nachweisgrenze. Allerdings kann die Signalhöhe durch die Temperaturabhängigkeit des Enzyms negativ beeinflusst werden. Es ist also darauf zu achten, dass für die Enzymmarkierung möglichst Enzyme mit einem breiten Temperaturspektrum eingesetzt werden.

1.2 Entwicklung der heizbaren Elektroden

Bereits 1884 formulierte Van't Hoff seine Reaktionsisochore, die besagt, dass zwischen der Temperatur, der Geschwindigkeitskonstanten und dem Gleichgewicht einer chemischen Reaktion ein direkter Zusammenhang besteht⁷¹.

Diese Temperaturabhängigkeit der Reaktionsparameter führt bei der elektrochemischen Untersuchung von Temperatureinflüssen zu Problemen. So ändert sich in Abhängigkeit von der Temperatur nicht nur das elektrochemische Verhalten der Arbeitselektrode, sondern auch das der Gegen- und vor allem der Referenzelektrode.

Hinzu kommt, dass viele Referenzelektroden, wie zum Beispiel Kalomelelektroden, nur für bestimmte Temperaturbereiche einsetzbar sind.

Die Lösung dieses Problems besteht darin, die Referenzelektrode im Gegensatz zur Arbeitselektrode bei einer konstanten Temperatur einzusetzen. Dazu gibt es zwei Möglichkeiten:

- 1 Die Arbeitselektrode wird in einer Halbzelle, das heißt räumlich von der Referenzelektrode getrennt, eingesetzt. Die Halbzelle wird durch einen Elektrolytschlüssel, der ein Diaphragma enthalten kann, mit der zweiten verbunden. Die darin befindliche Referenzelektrode vervollständigt die Messanordnung. Anschließend wird nur der Elektrolyt in dem sich die Arbeitselektrode befindet temperiert.
- 2 Arbeits- und Referenzelektroden werden räumlich nicht getrennt. Dafür wird die Arbeitselektrode selbst separat geheizt.

Bei der Arbeit mit biologischem Material, wie Enzymen, Nukleinsäuren und Zellen, besteht bei 1 die Gefahr, dass die Temperaturänderung zu langsam erfolgt und die Probe unnötig gestresst wird.

Durch direkte oder indirekte Heizung der Arbeitselektrode bei 2 besteht dieses Problem nicht.

Das Heizen kann durch energiereiches Licht⁷², Induktion^{73,74}, Mikrowellen^{75,76,77}, Infrarotstrahlung⁷⁸ oder Wechselstrom^{79,80,81,82} geschehen. Die direkte Heizung beschreibt das Heizen der Analytlösung durch den Elektrodenkörper selbst. Wegen bei der indirekten Technik die Wärmequelle durch eine dünne Schicht aus Keramik oder einem anderen Material von der Elektrode getrennt ist.

Die ersten Versuche mit direkt geheizten Elektroden wurden von Barker und Gardner 1975 mit einer mittels Laserimpulsen bestrahlten Quecksilber-Elektrode durchgeführt⁷². Diese Technik wurde von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls eingesetzt. So wurden die elektrochemische Doppelschicht, die Adsorptionserscheinungen als auch die Kinetik an Elektrodenoberflächen untersucht. Die Quecksilberelektroden wurden in den folgenden Jahren durch verschiedene Feststoffelektroden ersetzt.

Zu Beginn der 80er Jahre entwickelten Gabrielli et al. eine weitere Methode der direkten Heizung⁷⁹. Dabei wird ein Draht, in diesem Fall ein 100 µM dicker

Platindraht, mit einem 250 kHz Wechselstrom beheizt. Für diese Studie wurden nur Temperaturunterschiede bis 6 °C genutzt.

Diese zur Ermittlung von kinetischen Daten eingesetzte Technik wurde in den 90er Jahren von Gründler et al. wieder aufgegriffen und weiterentwickelt^{80,81,82,86}. Allerdings werden von Gründler und Mitarbeitern 50 µM Platin- bzw. 25 µM dicke Golddrähte eingesetzt, die mit einem 100 kHz Wechselstrom beheizt werden^{83,84}.

Diese Drahtelektroden wurden unter anderem bereits zur Detektion von anorganischen Analyten⁸⁵, wie Sauerstoff⁸² und verschiedenen Schwermetallen^{83,86,87} verwendet.

Voß et al. entwickelten Mitte der 90er Jahre in Rostock eine weitere direkt heizbare Elektrode. Möglich wurde diese Entwicklung durch die Kombination der *low temperature co-fired ceramics* (LTCC)-Technologie, bei der Keramikschichten durch Sintern miteinander verbunden werden, und der Siebdrucktechnik⁸⁸. Die heizbaren Elektroden ermöglichten Gründler, Kirbs und Voß die Ausarbeitung und Etablierung einer neuen Messtechnik, der Temperatur-Puls-Voltammetrie (TPV)^{89,90}. Diese neue Technik ist dadurch gekennzeichnet, dass ein treppenförmiges Elektrodenpotential am Ende jeder Stufe von einem Heizspannungsimpuls überlagert wird. Das Messsignal wird dabei aus der Differenz der Ströme kurz vor Beginn und vor Ende des Impulses bestimmt. Dabei werden die Ströme bei der Grundtemperatur, das heißt nach Abkühlen der Flüssigkeit, und nach Erreichen der Höchsttemperatur gemessen. Das gestattet Messungen bei extrem hohen Temperaturen, die weit oberhalb des Siedepunktes liegen können.

Neben den genannten Edelmetallen wurden auch andere Materialien für diese Heizmethode untersucht.

So nutzten Sun et al. direkt heizbare zylinderförmige Kohleelektroden⁹¹. Seit 2000 setzten Wang et al. direkt heizbare Kohlepastenelektroden (HCPE) zur Detektion von Nukleinsäuren ein^{92,93} und entwickelte dadurch diesen bisher weit verbreiteten Elektrodentyp weiter.

1998 untersuchten Compton, Coles und Marken das elektrochemische Verhalten von Kaliumhexacyanoferrat(II) und Kaliumhexacyanoferrat(III) unter Mikrowellenstrahlung. Dabei nutzten sie die durch die Strahlung verursachte Erwärmung der Lösung vor einer Platinmikroelektrode⁷⁵. 2 Jahre später setzten sie dieselbe Heiztechnik bei der Bestimmung von Cd²⁺ mittels zyklischer Voltammetrie ein⁷⁶. Während dieser Versuchsreihe erreichten sie Temperaturen von über 200 °C. 2006 setzten Förster et

al. eine 25 μm Platinelektrode als Detektor bei einer Kapillarelektrophorese von Zitronensäure, Methanol und (Ferrocenylmethyl)-trimethylammoniumiodid ein⁷⁷. Durch die Mikrowellenheizung der Elektrode konnte hier eine selektive Steigerung des Zitronensäuresignals erhalten werden.

Seit 2000 nutzen Compton et al. auch die durch Radiofrequenzen induzierte Erwärmung der Elektrodenoberfläche⁷³. So untersuchte diese Arbeitsgruppe die Einsatzmöglichkeit einer 40 μm dicken Platinfolie mit dieser Heizmethode im wässrigen System mit Kaliumhexacyanoferrat(III) und Rutheniumhexammin(III). Im darauf folgenden Jahr setzten Coles et al. ebenfalls eine 40 μm Pt-Folie für elektrochemische Studien mit Ferrocen und anderen redoxaktiven Substanzen in Acetonitril ein⁷⁴.

Eine indirekt heizbare Goldfolienelektrode wurde bereits 1976 von Harima und Aoyagui beschrieben und zur Untersuchung des Temperatureinflusses auf das Redoxsystem Kaliumhexacyanoferrat(III)/Kaliumhexacyanoferrat(II) eingesetzt⁹⁴. 1992 zeigten Olivier et al. bei ihren Versuchen zur thermoelektrochemischen Impedanzbestimmung, dass der Einsatz von Infrarotlicht für die Temperierung von Elektroden ebenfalls möglich ist⁷⁸. Ein Jahr später stellten Sarac et al. eine indirekt geheizte zylindrische Elektrode⁹⁵ vor. Die Heizung erfolgte bei diesem Modell durch eine im Zylinder eingebaute Heizspirale.

Die so genannte *low temperature co-fired ceramics* (LTCC)-Technologie ermöglicht ebenfalls die Konstruktion von indirekt geheizten Elektroden. Allerdings sind diese planar und nicht zylindrisch. Elektroden dieser Bauweise wurden in den letzten Jahren von Lau et al.^{96,97} eingesetzt. Wobei auch der Einsatz dieses Typs bei der Konstruktion von Biosensoren untersucht wurde⁹⁸. Durch das gezielte Heizen der Elektrodenoberfläche konnte die Selektivität dieser Enzymelektroden gegenüber ungeheizten Elektroden deutlich verbessert werden.

2. Aufgabe

Wie aus Kapitel 1.1 zu entnehmen ist, entwickelten sich seit Beginn der 50er Jahre eine Vielzahl verschiedener Nachweismethoden von Nukleinsäuren. Anfang der 60er wurde erkennbar, dass die Bestimmung von Organismen durch Nukleinsäureanalysen durchführbar ist. Die seitdem entwickelten Methoden besitzen allerdings einige Nachteile. So sind die Blottingmethoden sehr zeit- und zum Teil geräteaufwendig. Die elektrochemischen Verfahren sind weniger zeitaufwendig, allerdings wird die DNA bei einigen Verfahren zerstört. Aufgrund des Verhaltens der DNA in Abhängigkeit von der Temperatur (s. Kapitel 3.2.2) ist die Genauigkeit der Analyse auch temperaturabhängig. So besteht bei allen genannten Analysemethoden die Gefahr von falsch negativen bzw. falsch positiven Befunden, wenn die Temperatur während der Analyse zu niedrig gewählt wurde. Hinzu kommt, dass die Temperierung während der Analyse einen relativ hohen Geräteaufwand erfordert, z.B. Wasserbad oder Hybridisierungsöfen.

Mitte der 70er Jahre wurde die Thermoelektrochemie entwickelt und teilweise in die Analytik eingeführt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass eine lokale Temperaturerhöhung an der Elektrode eine Vergrößerung des Messsignals zur Folge hat. Das ist darauf zurückzuführen, dass sich Transportvorgänge und Reaktionsgeschwindigkeit an der Elektrodenoberfläche erhöhen. Im Verlauf der Entwicklung in den letzten 3 Jahrzehnten wurden verschiedene Elektrodentypen und Heiztechniken entwickelt (s. Kapitel 1.2). Von diesen Elektroden wurden bisher in Rostock die direkt heizbare Draht- und die indirekt heizbare LTCC-Elektrode erfolgreich bei der Detektion von Sauerstoff, Schwermetallen und niedermolekularen organischen Substanzen eingesetzt. In Zusammenarbeit mit Wang et al. entstand 2000 eine direkt heizbare Kohlepastelektrode für die direkte DNA-Analyse. Dabei konnten bei geringen Temperaturänderungen starke Signalerhöhungen beobachtet werden. Diese Beobachtung und die Dehybridisierung von doppelsträngigen Nukleinsäuren bei Erreichen des Schmelzpunktes, einer sequenzspezifischen Temperatur (s. Kapitel 3.2.2), führten zu der Frage ob die Entwicklung regenerierbarer DNA-Sensoren möglich ist.

Inhalt der vorliegenden Arbeit ist deshalb die Untersuchung heizbarer Elektrodentypen und ihrer Einsatzmöglichkeiten in der DNA-Analytik mit redoxaktiv markierten DNA-Fragmenten.

Der Schwerpunkt dieser Studie lag dabei im Vergleich des Einflusses von Temperatur, Konvektion, Hybridisierungszeit, Regenerierbarkeit und DNA-Oberflächenbelegung von geheizten und ungeheizten Sensoren.

Um eine möglichst stabile Elektrodenmodifizierung zu erhalten, wurden auch die Bindungs- und Stabilitätseigenschaften verschiedener Sonden und Immobilisierungsmethoden untersucht.

Die daraus gewonnenen Erkenntnisse dienen als Grundlage für die Konstruktion und weitere Entwicklung von elektrochemischen DNA-Analyse-Chips.

3. Allgemeine Grundlagen

3.1 Aufbau und Funktion eines Biosensors

Als Sensor wird im Allgemeinen ein Bauelement oder eine Gruppe dieser bezeichnet, die zur Charakterisierung des physikalischen oder chemischen Zustands ihrer Umwelt eingesetzt werden können.

Für die chemischen Sensor wurde von der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) 1991 folgende Definition festgelegt:

„Ein chemischer Sensor ist eine Anordnung, die chemische Informationen in ein analytisch nutzbares Signal umwandelt. Die erwähnten chemischen Informationen können von einer chemischen Reaktion der Probe oder von einer physikalischen Eigenschaft des untersuchten Systems herrühren“⁹⁹.

Nach Gründler sollen chemische Sensoren folgende Bedingungen erfüllen¹⁰⁰:

- chemische Informationen in elektrische Signale umwandeln
- schnelle Ansprechzeiten besitzen
- lange Lebensdauer besitzen
- geringe Größe und Miniaturisierbarkeit besitzen
- spezifisch sein, das heißt auf einen oder eine Gruppe von Analyten reagieren
- geringe Herstellungskosten besitzen

Beispiele dafür sind Glukose- und Sauerstoffsensoren. Glukosesensoren werden in der Medizin zur Bestimmung des Blutzuckerspiegels eingesetzt. Das kann z. B. als Eigenkontrolle des Patienten erfolgen. In den 90 Jahren wurden diese Sensoren so

stark verkleinert, dass eine Implantation möglich ist^{101,102}, wodurch die auch mit miniaturisierten Insulinpumpen kombiniert werden können.

Die auch als Lambda-Sonde bekannten Sauerstoff-Sensoren werden in der Automobiltechnik zur Abgaskontrolle und Motorsteuerung eingesetzt. Dabei wird der Messwert nicht aus einem flüssigen sondern aus einem gasförmigen Medium ermittelt. Da die Messung bei extrem hohen Temperaturen erfolgt wird bei der Lambda-Sonde ein Feststoffelektrolyt (Zirkoniumoxid) eingesetzt¹⁰³. Im Gegensatz dazu dient bei Glukosesensoren beispielsweise das Blut des Patienten als Elektrolyt. Sensoren bestehen aus einem Erkennungs-, einem Übermittlungs- und einem Signalumwandlungselement (Abb.:3.1).

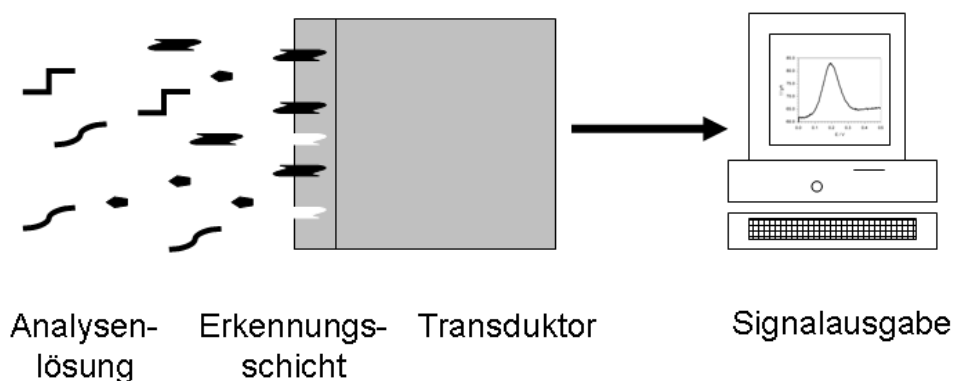


Abb. 3.1: Schematische Darstellung eines Biosensors

Eine besondere Gruppe stellen die Mitte des letzten Jahrhunderts entstandenen Biosensoren dar. Diese Sensoren setzen ein biologisch oder biochemisch aktives Erkennungselement ein. Bei diesem Element kann es sich um Mikroben, Zellen, Enzyme, Antikörper oder Nukleinsäuren handeln. Der bekannteste Biosensor ist der bereits erwähnte Glukosesensor.

Das erhaltene Signal kann hierbei sowohl auf optischem, mechanischem als auch elektronischem Weg übermittelt werden, je nach dem ob es sich z. B. um einen einfachen Teststreifen, einen piezoelektrischen Sensor oder um eine Enzymelektrode handelt. Von diesen Sensoren sind für diese Arbeit allerdings nur die elektrochemischen interessant. Das Signal wird bei den Sensoren durch die elektrochemische Umsetzung eines Produktes, Kofaktors oder Redoxindikators erhalten.

Die ersten elektrochemischen Biosensoren wurden zu Beginn der 70er Jahre durch Kombination einer mit Mikroben oder Enzymen modifizierten Membran und einer sauerstoffsensitiven Clark-Elektrode hergestellt¹⁰⁴. Wenige Jahre später gelang

Yarapolov et al. die Detektion von Wasserstoffperoxid mit Meerrettichperoxidase-modifizierten Kohleelektroden¹⁰⁵. In den folgenden Jahren wurden diese Sensoren weiterentwickelt^{106,107,108,109}. Dabei wurden zur Immobilisierung des biologischen Erkennungselementes neben adsorptiven Bindungsmethoden auch kovalente Bindungen mittels Linker, wie z. B. Diglycylether, eingesetzt. Seit Beginn der 90er Jahre wird auch die Bindung durch Bildung so genannter selbstorganisierender Monoschichten (SAM) genutzt¹¹⁰.

In dieser Arbeit wird ein elektrochemischer DNA-Sensor eingesetzt. Die Grundlage dieses Sensors bildet, wie bei den derzeit in der medizinischen Analytik eingesetzten optischen DNA-Chips, die Hybridisierung markierter Nukleinsäuren.

3.2 Die Nukleinsäuren

3.2.1. Aufbau und Funktion

Nukleinsäuren sind hochmolekulare, lineare, unverzweigte Moleküle. Sie dienen in der Natur zur Speicherung und Übersetzung genetischer Informationen. Somit bilden sie die Grundlage für alle biochemischen Prozesse und das äußere Erscheinungsbild eines Organismus.

Neben der als Informationsspeicher im Zellkern dienenden Desoxyribonukleinsäure (DNA) gibt es noch eine weitere natürliche Nukleinsäure, die ebenfalls in den Zellen vorkommende Ribonukleinsäure (RNA). Entsprechend der Aufgabe der RNA unterscheidet man zwischen messengerRNA oder mRNA und transferRNA oder tRNA.

Die mRNA transportiert die genetische Information zu den Ribosomen, dem Ort der Proteinsynthese. Dort wird der genetische Code der mRNA mit Hilfe der tRNA's in eine Aminosäuresequenz, also ein Protein, übersetzt.

In den letzten 20 Jahren gelang durch den Austausch der Desoxyribose und der Ribose gegen andere zyklische Substanzen die Synthese von verschiedenen Nukleinsäurederivaten. Zu diesen Nukleinsäuren gehören die Cyclohexenyl- (CeNA), die Threose- (TNA) und die locked Nukleinsäure (LNA). Eine Besonderheit bei den Nukleinsäurederivaten stellt die Peptidnukleinsäure (PNA) dar. Bei dieser wurde der gesamte hydrophile Teil gegen ein Aminoethylglycin-Polymer ausgetauscht. Dieses Polymer kann auch mit anderen Aminosäuren modifiziert sein¹¹¹.

Diese unnatürlichen Nukleinsäuren werden in der medizinischen und molekularbiologischen Forschung eingesetzt. Sie sollen hier allerdings nur der Vollständigkeit

halber erwähnt werden^{112,113,114,115}, da auf diese im folgendem nicht weiter eingegangen wird.

Wie in Abb. 3.2 zu erkennen ist, besitzt ein Nukleinsäureeinzelstrang einen hydrophilen, das polymere Ester-Rückgrat, und einen hydrophoben, die Basen enthaltenden, Teil.

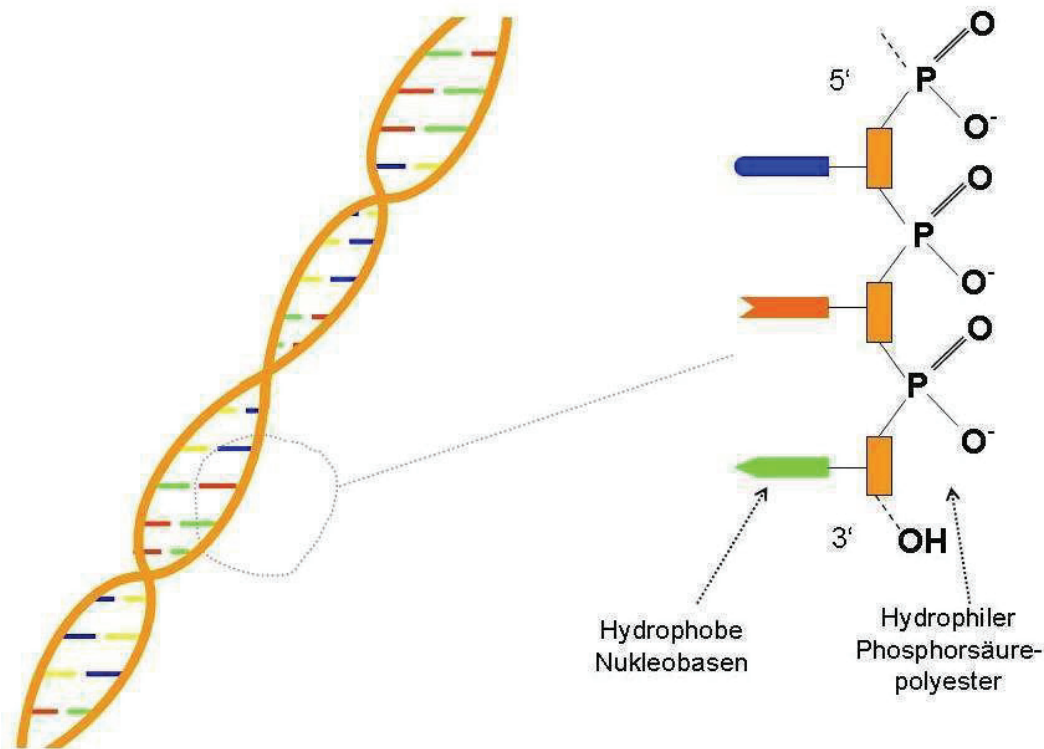


Abb. 3.2: Schematischer Aufbau von Nukleinsäuren

Der hydrophile Teil besteht bei den natürlichen Nukleinsäuren aus Ribose- (RNA) oder Desoxyribose-Molekülen (DNA), die durch Phosphorsäureesterbrücken über den Sauerstoff in der 3'- und 5'-Position miteinander verbunden sind. Bei den in der DNA enthaltenen Basen handelt es sich um Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin. In der RNA wird Thymin durch Uracil ersetzt. In den tRNA-Molekülen können zusätzlich noch andere Basen, wie Hypoxanthin, enthalten sein. Diese Basen bilden durch Verknüpfung mit den Zuckern in 1'-Stellung die Nukleoside. Die Nukleoside der Purin-Basen erhalten die Endung -osin während die der Pyrimidin-Basen auf -idin enden. Durch eine Veresterung der Hydroxy-Gruppe in der 5'-Stellung des Zuckers mit Phosphorsäure entstehen die Nukleotide (Abb.3.2).

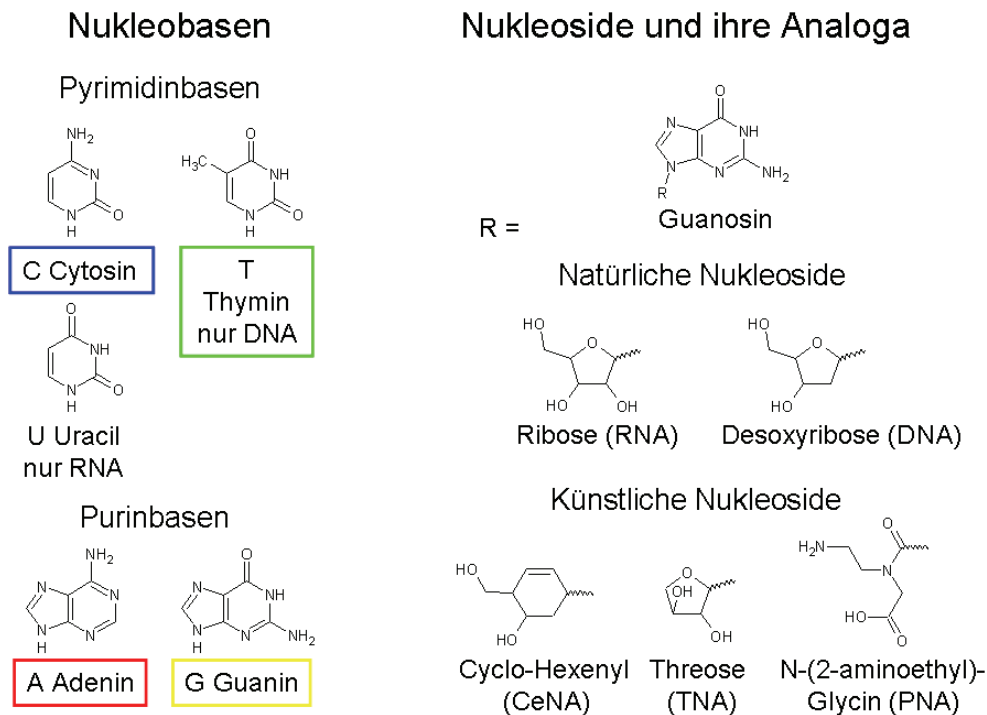


Abb. 3.3: Bestandteile der Nukleinsäuren

Jeweils 3 Basen der DNA bilden eine Kodierungseinheit, ein sogenanntes Codon. Ein Codon kodiert eine für diese Basenkombination typische Aminosäure, ein Start- oder Endsignal.

Die Reihenfolge der Nukleotide wird als Primär-, der Doppelstrang als Sekundär- und die räumliche Struktur als Tertiärstruktur bezeichnet. Die Tertiärstruktur entsteht unter anderem durch die Bildung intramolekularer Doppelstränge.

Die DNA liegt in den Zellen als intermolekularer Doppelstrang vor, während die RNA nur einzelsträngig vorkommt. Die tRNA kann intramolekulare Doppelstränge und Schleifenstrukturen, sogenannte *loops*, bilden. Die native DNA besitzt nur einen sehr geringen Anteil von diesen *loop*-Strukturen. Diese Strukturen dienen als Transkriptions-Endsignal.

3.2.2 Hybridisierung und Dehybridisierung

Als Hybridisierung bezeichnet man die Zusammenlagerung von zwei einzelsträngigen Nukleinsäuremolekülen zu einem Doppelstrang oder Duplex. Grundlage für diesen Vorgang ist die Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den Basen beider Nukleinsäuren. Dabei sind nur Basenpaarbildungen zwischen den Basen Thymin und Adenin bzw. Guanin und Cytosin möglich. Diese Basen-

kombination ermöglicht die Ausbildung von exakt definierten Wasserstoffbrückenbindungen. Nukleinsäurestränge, die die Bedingungen für die Ausbildung der vollständigen Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen pro Basenpaar erfüllen, werden als komplementär zueinander bezeichnet.

Die Stabilität des Nukleinsäuredoppelstrangs wird durch die Anwesenheit von Kationen, wie zum Beispiel Natrium-Ionen oder Kalium-Ionen, verstärkt. Diese Ionen kompensieren die negative Ladung des Nukleinsäurerückgrates und erhöhen dadurch den Einfluss der H-Brückenbindungen zwischen den Basen der beiden Teilstränge¹¹⁶.

Im Gegensatz dazu können einige Schwermetall-Ionen, beispielsweise Kupfer, Eisen und Chrom die Ausbildung der Duplexstrukturen erschweren oder sogar unterbinden. Die Ursache dafür besteht darin, dass diese Ionen sich zwischen den Einzelsträngen einlagern^{117,118}. Unter alkalischen Bedingungen ist sogar eine Zerstörung der Nukleinsäuren durch Schwermetalle nicht auszuschließen^{119,120}.

Die Ausbildung von Doppelsträngen ist unabhängig von der Art der beiden Einzelstränge. Neben den DNA/DNA- und RNA/RNA-Duplexen sind auch Nukleinsäureduplexe aus gemischten Nukleinsäuren bekannt. So treten bei der Vermehrung einiger RNA-Viren oder bei der Transkription von Genom-DNA RNA/DNA-Doppelstränge auf. In den letzten Jahren wurden in der molekularbiologischen und medizinischen Forschung auch Duplexe aus natürlichen und in der Natur nicht vorkommenden Nukleinsäuren eingesetzt und untersucht^{121,122,123}. Dabei sind insbesondere die Hybriden aus DNA und PNA zu erwähnen, da bei diesen eine sehr hohe Selektivität gegenüber Einzelbasenfehlpaarungen beobachtet werden kann¹²⁴. Eine Ursache für diesen Effekt besteht darin, dass durch das ungeladene Rückgrat der PNA keine abstoßenden elektrostatischen Kräfte zwischen den beiden Nukleinsäuremolekülen ausgebildet werden können. Das führt dazu, dass diese Duplexe durch die zwischen den Basen herrschenden Wechselwirkungen stärker stabilisiert werden. Aufgrund dessen ist der Effekt einer Basenfehlpaarung deutlicher ausgeprägt als bei DNA/DNA-Doppelsträngen.

Das Gegenteil der Hybridisierung ist die Dehybridisierung oder das Schmelzen der DNA. Darunter versteht man die Trennung eines doppelsträngigen DNA-Moleküls in zwei Einzelstränge (Abb.3.4).

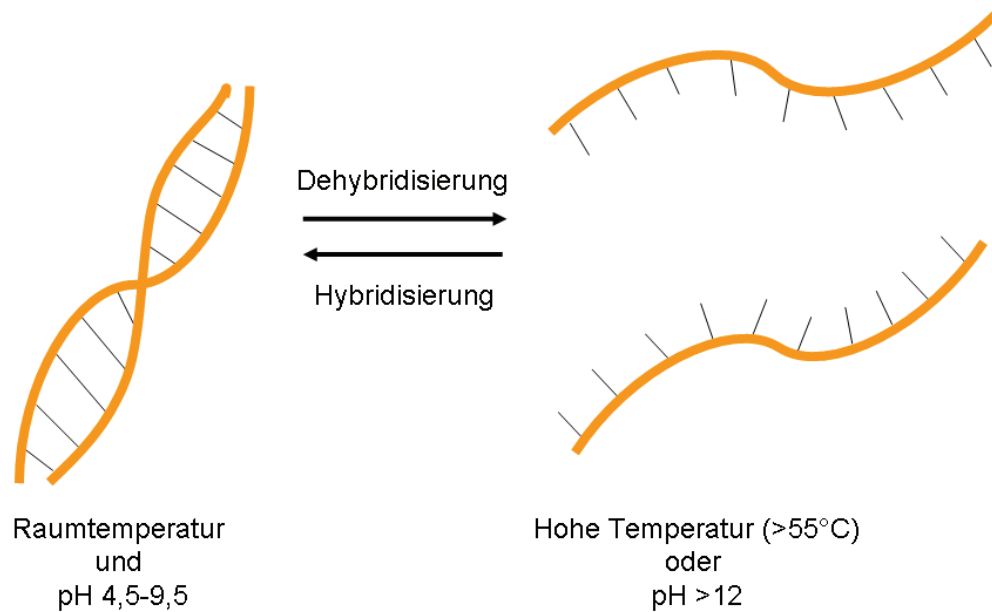


Abb. 3.4.: Darstellung von Hybridisierung und Dehybridisierung

Bei diesem Vorgang werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren des Doppelstranges gelöst. Das geschieht in stark alkalischen wässrigen Lösungen oder bei Erwärmen der DNA-Lösung über die Schmelztemperatur des Doppelstranges. Dieser Vorgang tritt natürlich auch bei anderen doppelsträngigen Nukleinsäuren auf. Der Schmelzpunkt der Nukleinsäure ist abhängig vom Gehalt an Guanin und Cytosin. Dieses Basenpaar besitzt mit 3 Wasserstoffbrückenbindungen die maximale Anzahl dieser möglichen Bindungen. Das bedeutet, dass zur Trennung dieses Paares mehr Energie notwendig ist als bei einem Adenin/Thymin-Basenpaar. In Gleichung 3.1 sind die Zusammenhänge zwischen Ionenstärke, Nukleinsäurestruktur und Schmelzpunkt für natürliche Nukleinsäuren mathematisch beschrieben.

$$T_m = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6^{\circ}\text{C} \cdot \lg\left(\frac{[\text{Na}^+]}{\text{mol/l}}\right) + 41^{\circ}\text{C} \frac{G+C}{L} - 500^{\circ}\text{C} \frac{1}{L} \quad \text{Gl. 3.1}$$

Dabei ist T_m der Schmelzpunkt in $^{\circ}\text{C}$, $(G+C)$ der Gehalt an Guanin und Cytosin und L die Länge des Moleküls als Anzahl der Nukleotide. Die Ionenstärke wird durch $[\text{Na}^+]$, der Konzentration der Natriumionen, repräsentiert.

Während der Hybridisierung der DNA ist auch die Kombination von anderen Basenpaaren, z. B. Adenin und Cytosin, möglich. Diese Basen-Fehlpaarungen, oder *mismatches*, werden als nichtkomplementär zueinander bezeichnet. Diese Fehl-

paarungen haben eine Absenkung des Schmelzpunktes zur Folge, wobei dieser Effekt von den Nachbarbasen und der Lage des entsprechenden Basenpaares ebenfalls beeinflusst wird. Die derzeit gängige Methode zur Bestimmung des Schmelzpunktes ist die Messung der Extinktionsänderung mittels UV-Vis-Spektroskopie bei 260 nm. Bei dieser Wellenlänge sind die Absorptionseigenschaften für die Basen der Einzelstrang-Nukleinsäuren am stärksten ausgeprägt.

3.2.3 Aufbau der Sonde und Immobilisierung

Als Erkennungselement für DNA oder RNA an Biosensoren dient eine sogenannte Sonde (englisch: *probe*). Die Sonde besteht aus 2 Teilen, der Nukleinsäure-Sequenz, vorzugsweise DNA oder PNA, und einem Linker an dem sich eine Kopplungsgruppe befindet. In der hier vorliegenden Arbeit besteht diese Gruppe aus einem organischen Rest mit mindestens einer reduzierten Dithiolgruppe. Bei der Detektion von gebloteten Nukleinsäuren wird die Kopplungsgruppe durch einen Farbstoff, z. B. Fluorescein, ersetzt. Der schematische Aufbau der hier verwendeten Sonde ist in Abb. 3.5 dargestellt.

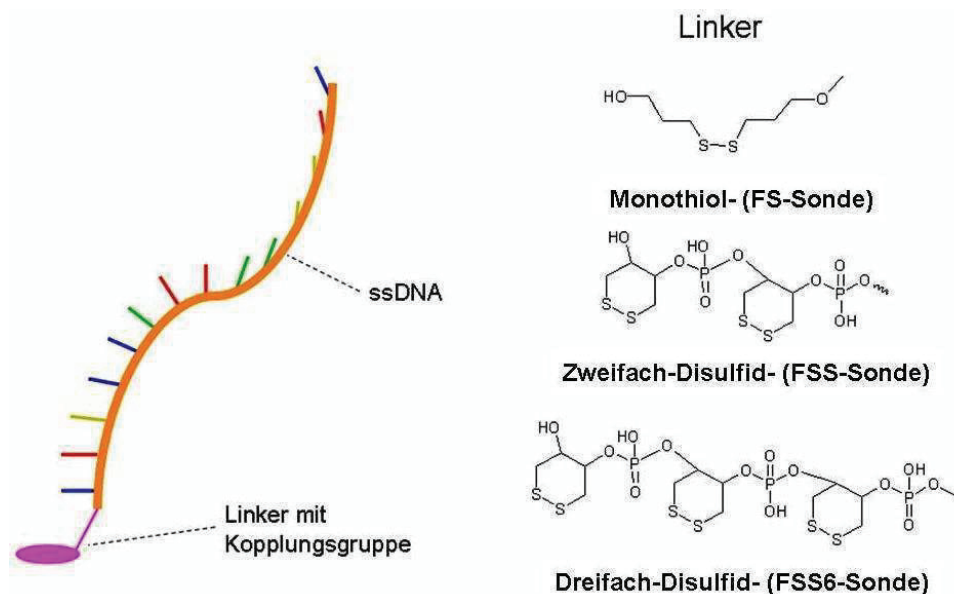


Abb. 3.5: Schematischer Aufbau der Sonde und ihre Linker

In dieser Arbeit wurden die Sonden mit Hilfe von Thiol-Linkern kovalent an einer Goldoberfläche gebunden. Die Fähigkeit von Thiolgruppen zur kovalenten Bindung an Gold wurde in den letzten 2 Jahrzehnten verstärkt zur Darstellung von so genannten selbst organisierenden Monoschichten (SAM) bei der Herstellung von

Sensoren genutzt und untersucht^{45,125,126}. Die Bildung von SAM's ist aber nicht nur auf die Reaktion von Thiolen mit Gold beschränkt. So ist auch der Einsatz anderer funktioneller Gruppen bei verschiedenen Metallen möglich^{127,128}. Dadurch ist der Einsatz solcher SAM's sehr vielfältig, so können diese Monoschichten unter anderem auch zum Korrosionsschutz¹²⁹ oder zur Oberflächenbehandlung von Implantaten eingesetzt werden. Durch den Einsatz in der Medizin können z. B. bei künstlichen Gelenken unerwünschte immunologische Abwehrreaktion von vornherein ausgeschlossen werden, wenn die SAM die entsprechenden Blutgruppenfaktoren enthält.

Allerdings besteht bei solchen komplexen biologisch aktiven Molekülen die Gefahr, dass diese unspezifische Wechselwirkungen mit dem Trägermaterial eingehen.

So beobachteten Hartwich et al.¹³⁰ bereits 1999 und Petrovykh et al.¹³¹ 2006, dass ein Teil ihrer immobilisierten DNA-Sonden auf der Goldelektrodenfläche auflagen, bzw. tertiäre Strukturen bildeten. Dadurch standen diese nicht mehr für die Hybridisierung zur Verfügung. Um die Sonden in eine für die Hybridisierung optimale Lage zu bringen und unerwünschte Reaktionen von freien redoxaktiven Molekülen mit der Elektrodenoberfläche zu unterdrücken, wird eine Nachbelegung durchgeführt. Dabei werden unspezifisch an der Elektrodenoberfläche gebunden Substanzen von Thioalkanen oder Thioalkoholen verdrängt. Gleichzeitig werden auf der Elektrode teilweise aufliegende Sondenmoleküle aufgerichtet.

Eine weitere Methode zur Darstellung von Sonden-SAM's besteht darin, die Nukleinsäuren nicht direkt an der Goldoberfläche zu binden, sondern über eine ein Streptavidin-Molekül enthaltende SAM zu immobilisieren. Streptavidin ist ein Protein, das mehrere Bindungsstellen für Biotin besitzt. Dadurch ist eine selektive Bindung von Biotin-modifizierten Molekülen, wie z. B. Nukleinsäuren, an der Oberfläche möglich.

Neben der SAM-Bildung gibt es allerdings noch weitere Immobilisierungsmethoden für Nukleinsäuren auf Glas, Keramik, Zellulose und verschiedene Kunststoffe. Dabei werden die schon in der Biotechnologie bewährten Methoden wie Bromcyan-, Diglycylether- und Azidkopplung eingesetzt.

3.3 Reaktion der Redoxmarkierung

In Kapitel 1.1 wurden bereits verschiedene Methoden zur DNA-Analytik vorgestellt. In diesem Abschnitt soll auf den Mechanismus der in der Elektroanalytik eingesetzten Markierungen genauer eingegangen werden (Abb. 3.6).

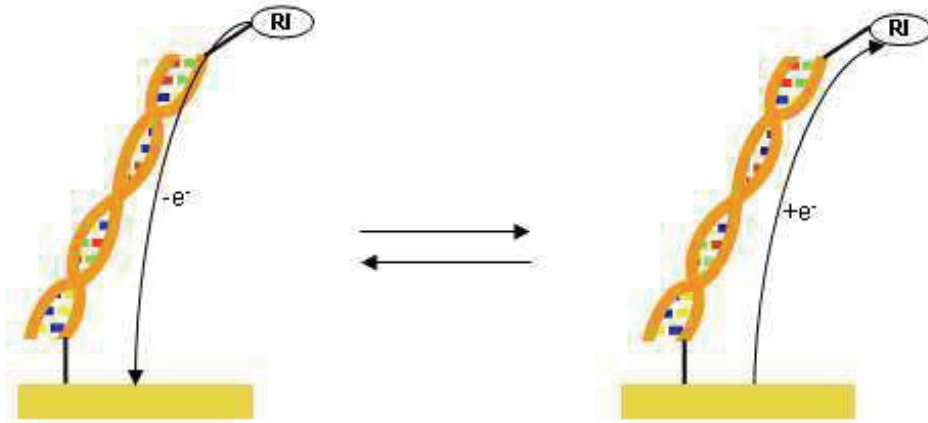


Abb. 3.6: Nachweisreaktion am Target mit Redoxindikator

In den 80er Jahren wurden erste Versuche zur elektrochemischen Detektion von mit Schwermetall-Phenanthrolin-Komplexen⁴³, markierter DNA durchgeführt. Im Verlauf der folgenden Jahre wurden auch andere Metallkomplexe, z. B. Metallocene^{132, 44} und redoxaktive organische Verbindungen^{133,134,135} erfolgreich eingesetzt. Eine Sonderstellung der redoxaktiven Markierungen nehmen Enzyme, hauptsächlich Oxidoreduktasen, ein, da bei diesem Markierungstyp nicht die Markierung sondern das von ihr gebildete Produkt an der Elektrodenoberfläche elektrochemisch detektiert wird.

Aufgrund der ablaufenden Reaktion des Redoxindikators X kann man 2 Reaktionstypen unterscheiden.

Zum einen gibt es die Redoxindikatoren, die nach Ablauf der Reaktion in ihren Ausgangszustand zurückkehren können. Für diese Indikatoren gilt



Zu diesem Typ gehören Metallkomplexe, wie Nickelocen, Ferrocen und Os-Bipyridin-Thymidin-Komplex, aber auch verschiedene organische Intercallatoren wie

Methylenblau und Daunomycin. Solche Marker werden auch als reversible Redox-indikatoren bezeichnet.

Zum anderen gibt es aber auch Indikatoren die keine Rückreaktion durchlaufen können. Für diese irreversiblen Redoxindikatoren gilt:



Oder



Die Tatsache, ob bestimmte Indikatoren reversibel oder irreversibel reagieren, kann von verschiedenen Faktoren abhängen. So ist z. B. bei DabcyI die Rückreaktion durch eine irreversible Folgereaktion mit hoher Geschwindigkeit so stark unterdrückt, dass diese nicht möglich ist. Diese Reaktion verläuft *pseudo*-irreversibel. Generell gilt allerdings, dass irreversible Indikatoren geringe Stromausbeuten und damit kleine Signale liefern, während reversible Indikatoren hohe Stromausbeuten und dadurch große Signale liefern. Die Ursache dafür liegt darin, dass die reversiblen Redoxindikatoren in Abhängigkeit von dem angelegten Potential eine Rückreaktion eingehen können und damit diese Ladung wieder dem System zur Verfügung stellen können.

3.4 Vorteile und Nachteile von Gold als Elektrodenmaterial

Gold besitzt für die Verwendung als Elektrodenmaterial einige besonders gute chemische und mechanische Eigenschaften. Als Edelmetall ist es gegen Säuren und Laugen, wenn man von dem so genannten Königswasser absieht, nicht reaktiv. Des Weiteren oxidiert Gold, im Gegensatz zu den meisten Metallen nicht an der Luft und ist aufgrund seiner Reaktionsträgheit gegenüber anderen Stoffen nicht giftig. Hinzu kommt, dass dieses Metall sich wegen seiner geringen Härte auch bei Raumtemperatur gut verarbeiten lässt.

Ebenfalls typisch für Goldelektroden ist ein großes Potentialfenster für die elektrochemische Detektion. Dieses Fenster reicht bei unmodifizierten Elektroden von der Wasserstoffentwicklung bei etwa -1V bis zur Sauerstoffentwicklung bei ca. +1V vs. Ag/AgCl bei pH 7.

In der Analytik wird in den letzten Jahren vermehrt die Reaktivität des Goldes gegenüber Thiolen zur Bildung von definierten Oberflächen, sogenannten selbstorganisierende Monoschichten oder SAM (engl.: *self assembly monolayers*), genutzt. Dieses Verfahren ermöglicht auch die Kopplung biochemischer Erkennungselemente an der Elektrodenoberfläche^{136,137}.

Als Nachteil bei diesen Elektroden muss allerdings der relativ hohe Preis des Goldes angesehen werden.

3.5 Messverfahren

In Abschnitt 1 wurden die bisherigen Entwicklungen sowohl in der Thermochemie als auch in der elektrochemischen Detektion von Nukleinsäuren beschrieben. In dieser Arbeit sollen kovalent gebundenen Redoxindikatoren und Thermochemie miteinander kombiniert werden. Die hierzu angewendeten Messverfahren sollen in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben werden.

3.5.1 Polarographische Methoden - Messungen mit Quecksilberelektroden

Die polarographischen Methoden wurden nur für die von Dr. Flechsig durchgeführten Versuche mit Dabcyl genutzt. Da seine Ergebnisse in diese Arbeit einfließen, werden die verwendeten Techniken kurz vorgestellt.

3.5.1.1 Tast-Polarographie

Bei dieser Technik handelt es sich um eine Gleichstrompolarographie an einer tropfenden Quecksilberelektrode (DME).

Die Messung des Stroms erfolgt dabei jeweils etwa 16ms lang kurz vor dem Abfallen des Tropfens. Durch dieses sich während der gesamten Messung wiederholende Messintervall können kapazitive Ströme unterdrückt und Störungen, die der Abfall des Tropfens verursacht, eliminiert werden¹³⁸.

Ein weiterer Vorteil der verwendeten tropfenden Quecksilberelektrode besteht darin, dass die Elektrodenoberfläche vor jedem Messpunkt regeneriert wird. Dadurch wird eine Blockierung der elektrochemisch aktiven Fläche durch noch vorhandene Reaktionsprodukte vermieden.

3.5.1.2 Differenz Puls Polarographie

Die Messung erfolgt mit dieser bereits in den 60er Jahren von Osteryoung et al. eingeführten Messmethode¹³⁹ analog zu der zuvor beschriebenen Technik. Allerdings wird die Potentialrampe hier von einer modifizierten Treppenfunktion überlagert. Diese Treppenfunktion ist dadurch gekennzeichnet, dass am Ende jeder Stufe ein kurzer etwa 50 ms langer Spannungsimpuls erfolgt. Die Stufe selbst ist um das 10-100fache länger. Die Zeit zwischen den Messungen, die in unserem Fall der Entstehungszeit des Tropfens entspricht, wird so gewählt, dass jeweils ein Messpunkt kurz vor dem Ende und einer vor dem Anfang des Pulses liegt. Die Oberfläche wird ebenfalls zwischen jeden Messpunkt regeneriert.

3.5.2 Messungen mit Goldelektroden

3.5.2.1 Cyclische Voltammetrie

Die zyklische Voltammetrie wurde zur Reinigung der Elektroden und zur Bestimmung des Redoxpotentials von Rutheniumhexammin verwendet.

Die Potential-Zeit-Funktion ist in Abb. 3.7 dargestellt.

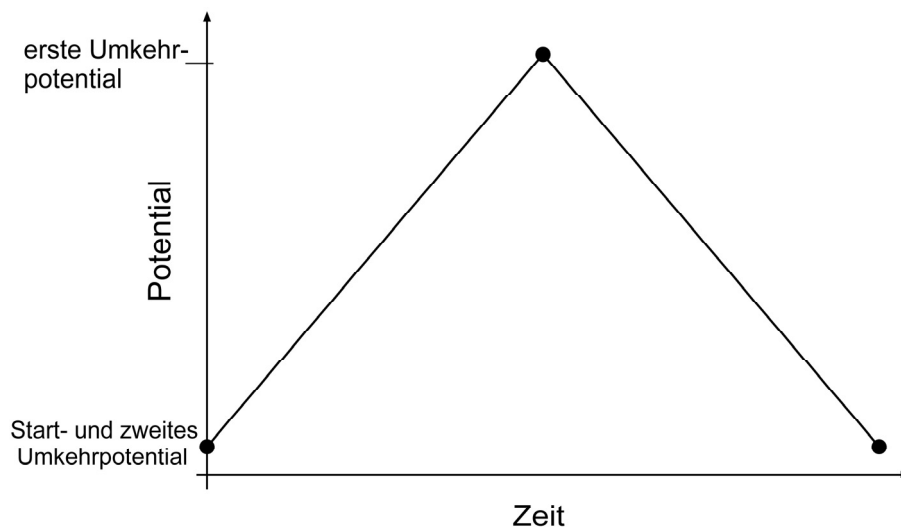


Abb. 3.7: Potential-Zeit-Funktion der CV

Dabei wird zwischen dem Start- und dem ersten Umkehrpunkt als auch dem ersten und dem zweiten Umkehrpunkt jeweils eine Potentialrampe angelegt. Die Potentiale am ersten und am zweiten Umkehrpunkt sind gleich.

Das Peakpotential kann nach Vanysek¹⁴⁰ durch folgende Gleichung berechnet werden:

$$I_p = 269cn^{3/2}A\sqrt{D}\sqrt{v} \quad \text{Gl. 3.5}$$

wobei v die Scanrate in V/sec, A die aktive Oberfläche in cm^2 , D der Diffusionskoeffizient in cm^2sec , n die Ladung des Ions und c die Konzentration des Analyten in mol/l ist.

3.5.2.2 Wechselstromvoltammetrie (ACV)

Die Wechselstromvoltammetrie oder ACV erwies sich in der vorliegenden Arbeit als ein sehr gutes Verfahren zur Detektion von Nukleinsäuren, die mit reversiblen und irreversiblen Redoxindikatoren markiert waren. Die Methode ist zwar zeitaufwendiger als die Square Wave Voltammetrie, allerdings ist sie besser geeignet für Messungen mit geringeren Stromausbeuten während der Detektion.

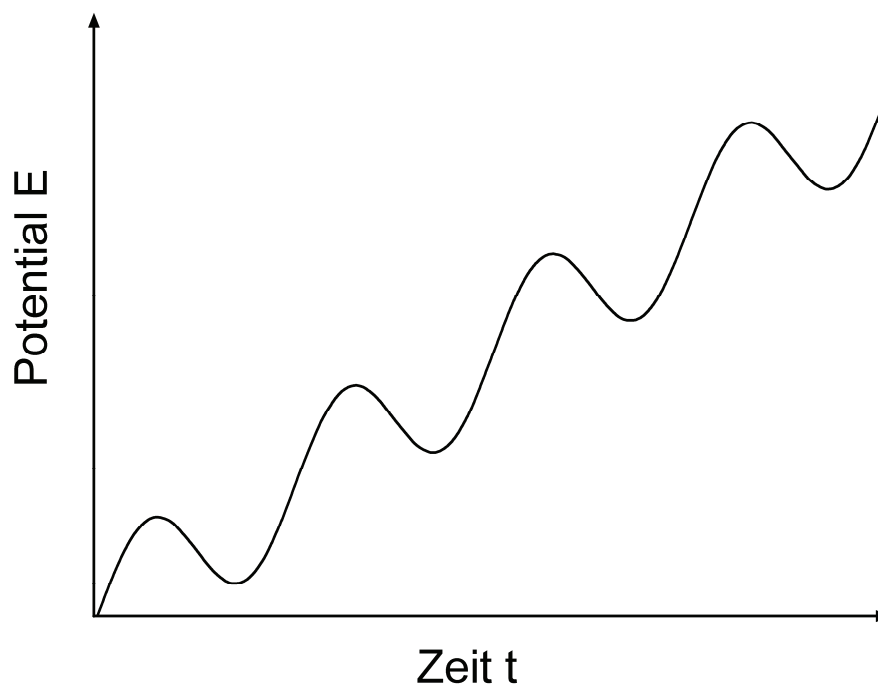


Abb. 3.8: Potential-Zeit-Funktion der ACV (nach Vanysek)

Während des Messvorgangs wird bei der ACV eine lineare Spannungs-Zeit-Rampe mit einer sinusförmigen Wechselspannung überlagert und der dabei fließende Wechselstromanteil aufgezeichnet. Die Amplitude dieser Wechselspannung beträgt

5 20 mV, die Frequenz liegt im Bereich von 10 bis 1000 Hz. Der sinusförmige Charakter der angelegten Spannung ermöglicht eine Trennung von faradayschen und kapazitiven Strom durch eine Verschiebung der Phase.

Der Peakstrom I_p bei den voltammetrischen Methoden kann mit der von Underkofler und Shain bereits 1965¹⁴¹ für eine Quecksilber-Elektrode aufgestellten Gleichung berechnet werden,

$$I_p = n^2 F^2 A c \sqrt{\omega D} \frac{\Delta E}{4RT} \quad \text{Gl. 3.6}$$

wobei n die Anzahl der ausgetauschten Elektronen, F die Faraday-Konstante, A die Elektrodenoberfläche, c die Konzentration des Analyten, ω die Kreisfrequenz, D der Diffusionskoeffizient, ΔE die Amplitude, R die allgemeine Gaskonstante und T die Temperatur ist.

Wie aus der Gleichung zu erkennen ist, wird der Peakstrom am stärksten durch die Anzahl der ausgetauschten Elektronen beeinflusst.

3.5.2.3 Square Wave Voltammetrie (SWV)

Eine weitere voltammetrische Messmethode ist die Ende der 50er Jahre von Barker eingeführte Square Wave Voltammetrie (SWV)¹⁴².

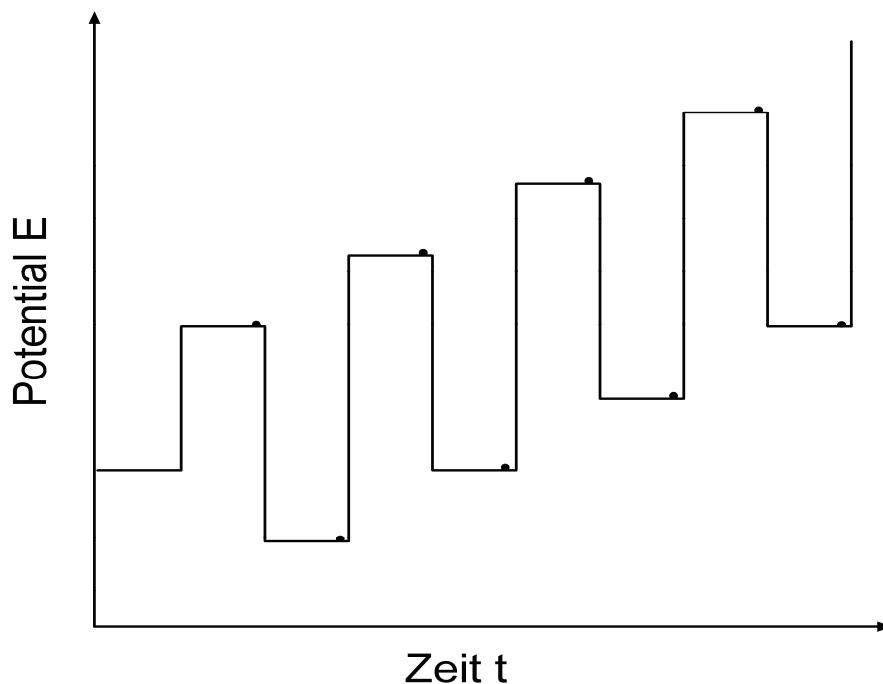


Abb. 3.9: Potential-Zeit-Funktion der SWV mit Messpunkten (nach Vanysek)

Diese Methode unterscheidet sich von der ACV dadurch, dass die lineare Potential-Zeit-Rampe nicht von einer Sinus-Funktion sondern von einer rechteckförmigen Wellenfunktion überlagert wird. Ein weiterer Unterschied zu der in 3.5.2.2 beschriebenen Methode besteht in der Lage der beiden Messpunkte auf dieser Potential-Zeit-Funktion(s. Abb. 3.8). So kann das Messsignal nicht durch eine Phasenverschiebung variiert werden. Der zu bestimmende Strom wird bei dieser Messmethode durch die Stromdifferenz zwischen dem Messpunkten vor und während des Potentialimpulses bestimmt.

Im Verhältnis zu der ACV ist für die Methode eine deutlich kürzere Messzeit notwendig. Allerdings ist die Empfindlichkeit deutlich geringer als bei der ACV. Aufgrund dieser Eigenschaft ist die SWV für irreversibel reagierende und Redox-indikatoren mit geringerer Stromausbeute weniger geeignet.

3.5.2.4 Open-Circuit-Chronopotentiometrie und Temperaturkalibrierung der heizbaren Elektroden

Bei der Chronopotentiometrie wird der Potentialverlauf in Bezug auf eine Referenzelektrode nach Anlegen eines Konstantstromes an der Arbeitselektrode in einer nicht gerührten Messzelle gemessen.

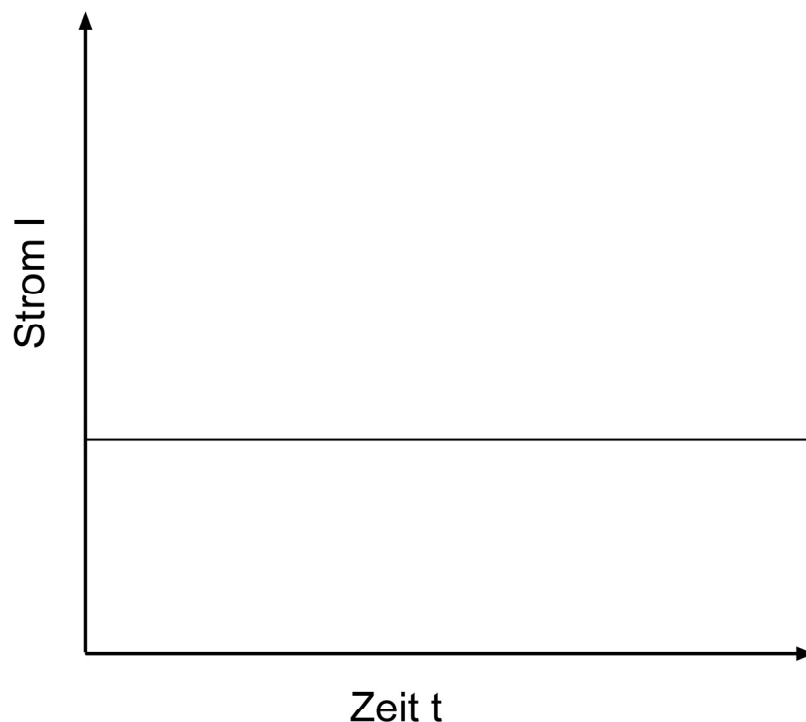


Abb. 3.10: Stromstärke-Zeit-Funktion der Chronopotentiometrie

Bei der vorliegenden Arbeit wurde die von Gründler et al. eingesetzte Methode zur Kalibrierung der Temperatur genutzt^{143,6}. Dabei wird die Open-Circuit-Chronopotentiometrie, ein Spezialfall der Chronopotentiometrie, verwendet. Diese früher auch als Null-Strom-Chronopotentiometrie bezeichnete Messtechnik ist dadurch gekennzeichnet, dass die Messung bei $I = 0$ A, also geöffneten Stromkreis, durchgeführt wird.

Grundlage für die Temperaturbestimmung bildet die Nernst'sche Gleichung

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{[Ox]}{[Red]} \quad \text{Gl. 3.7}$$

Wobei E das Redoxpotential des verwendeten Redoxpaares, E_0 das Standardredoxpotential für die ablaufende Redoxreaktion, R die allgemeine Gaskonstante, n die Anzahl der ausgetauschten Ladungen, F die Faraday-Konstante und T die Temperatur ist. Da das Verhältnis der Reaktionspartner äquimolar ist, ist das Standardredoxpotential temperaturabhängig.

Die freie Reaktionsenthalpie $\Delta_R G$ einer elektrochemischen Zelle ist durch die folgende Gleichung definiert.

$$\Delta_R G = -nF\Delta E \quad \text{Gl. 3.8}$$

Wie aus den Gleichungen 3.7 und 3.8 entnommen werden kann, sind diese Elektrodenpotentiale, die der freien Reaktionsenthalpie entsprechen, stets temperaturabhängig.

Eine weitere thermodynamische Größe, die zur Beschreibung von elektrochemischen Vorgängen benutzt werden kann, ist die Reaktionsentropie $\Delta_R S$. Diese Reaktionsgröße kann wie folgt definiert werden:

$$\left(\frac{\partial \Delta_R G}{\partial T} \right)_P = -\Delta_R S \quad \text{Gl. 3.9}$$

Unter Berücksichtigung der Gleichung 3.8 ergibt sich aus Gleichung 3.9 folgender Zusammenhang:

$$\left(\frac{\partial E}{\partial T}\right)_P = \frac{\Delta_R S}{nF} \quad \text{Gl. 3.10}$$

Aus Gleichung 3.10 ist zu erkennen, dass für die Ermittlung der Reaktionsentropie die Temperaturabhängigkeit des Potentials eines Redoxpaares genutzt werden kann. Da die Temperatur auf die partielle molare Reaktionsentropie nur einen sehr geringen Einfluss besitzt, ist es möglich die Änderung der Gleichgewichtszellspannung E_{eq} in kleinen linearen Bereichen näherungsweise abzuschätzen. Dadurch ergibt sich aus Gleichung 3.10 folgender Zusammenhang:

$$\frac{\Delta E_{eq}}{\Delta T} = \frac{E_{eq}(T_2) - E_{eq}(T_1)}{T_2 - T_1} = \frac{\Delta_R S}{nF} \quad \text{Gl. 3.11}$$

In der Regel ist diese Näherung ausreichend, allerdings kann für eine genauere Betrachtung von ΔE folgende Reihe entwickelt werden:

$$\Delta E = \frac{dE}{dT} \Delta T + \frac{1}{2} \cdot \frac{d^2 E}{dT^2} \Delta T^2 + \dots \quad \text{Gl.3.12}$$

Dabei stellt der Term 1. Ordnung den elektrochemischen Transport oder Entropietransport dar:

$$\left(\frac{dE}{dT}\right)_P = \frac{\Delta S}{nF} \quad \text{Gl.3.13}$$

Dieser meist als β bezeichnete Temperaturkoeffizient des Potentials liegt im Bereich von $\pm 2,4 \frac{mV}{K}$ und kann wie folgt definiert werden:

$$\beta = \left(\frac{dE}{dT}\right)_P = \frac{\Delta S}{nF} \quad \text{Gl.3.14}$$

Der Anteil des Temperaturkoeffizienten $\frac{d^2 E}{dT^2}$ an der Änderung des Potentials ist in der Regel so gering, dass die Reihenentwicklung in 3.12 bereits an der ersten Stelle abgebrochen werden kann.

Die hier gezeigten Zusammenhänge führen für die Berechnung der Temperatur an geheizten Elektroden zu folgender Gleichung:

$$\Delta T = \Delta E \cdot \beta \quad \text{Gl. 3.15}$$

Für die durchgeführten Temperaturkalibrierungen wurden Kaliumhexacyanoferrat(II) und Kaliumhexacyanoferrat(III) in einem äquimolaren Verhältnis mit einer Gesamtkonzentration von 50 mM verwendet. Bei früheren Arbeiten von Gründler et al. wurde für dieses System ein Temperaturkoeffizient β von -1,56 mV/K berechnet^{82,144,145}. Messungen mit diesem Redoxsystem von anderen Arbeitsgruppen mit verschiedenen Methoden bestätigen diesen Wert⁷⁵.

Durch schrittweise Erhöhung eines Wechselstromes an einer direkt geheizten Drahtelektrode bzw. einer Heizspannung an den indirekt geheizten LTCC-Elektroden wird eine durch den jeweiligen Heizstrom definierte Temperatur erreicht. Wie aus Gleichung 3.10 erkennbar ist, hat eine Temperaturänderung eine Änderung des an der Elektrode anliegenden Potentials zur Folge.

3.5.2.5 Adsorptive Stripping Voltammetrie (AdSV)

Diese bei den Vorversuchen mit DabcyI von Dr. Flechsig eingesetzte Methode ist eine der empfindlichsten Methoden zur voltammetrische Bestimmung eines Analyten. Da die Daten in dieser Arbeit genutzt werden, wird sie hier erläutert.

Diese Methode zeichnet sich durch eine über mehrere Minuten bei einem definierten Potential dauernde Adsorptionsphase des Analyten an der Elektrodenoberfläche aus. Deshalb ist diese Technik nur mit stationären Elektroden, wie z. B. Feststoff-, Quecksilberfilm- oder hängende Quecksilbertropfenelektroden (HMDE), durchführbar. Die verwendeten Feststoffelektroden können auch während der Adsorptionsphase rotieren. Durch den der eigentlichen Messung vorausgehenden Anreicherungsschritt kann die Nachweisgrenze bis in einen Bereich von 10^{-10} bis 10^{-12} M gesteigert werden.

Im nächsten Schritt wird durch Änderung des Potentials die entstandene Schicht des Analyten elektrochemisch entfernt, wodurch das Signal erhalten wird.

3.5.2.6 Chronocoulometrie und Bestimmung der Oberflächenbeladung

Die Bestimmung der Oberflächenbelegung mit der DNA-Sonde erfolgte durch die in den 60er Jahren eingeführte Chronocoulometrie¹⁴⁶. Bei dieser Methode wird die Änderung der Ladung nach einem Potentialsprung in Abhängigkeit von der Zeit gemessen.

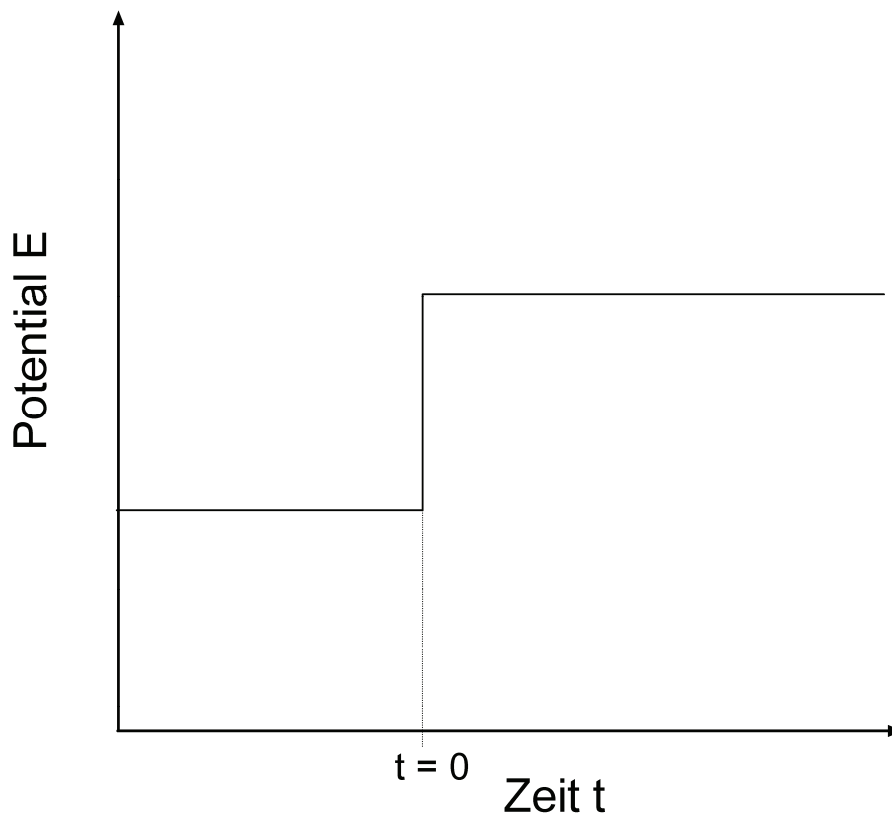


Abb. 3.11: Potential-Zeit-Funktion während der Chronocoulometrie

Da die Ladung Q das Integral des Stromes I über die Zeit t ist, erhält man durch Integration der Cottrell-Gleichung

$$I = nFAc_0 \sqrt{\frac{D_0}{t\pi}} \quad \text{Gl. 3.16}$$

über die Zeit t die Anson-Gleichung, welche die Grundlage dieser Methode darstellt.

$$Q = 2nFAc_0 \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \quad \text{Gl. 3.17}$$

Wobei n als die Anzahl der getauschten Ladungen, F als Faraday-Konstante, A die Elektrodenoberfläche, c_0 die Konzentration des Analyten, D_0 der Diffusionskoeffizient und t als Zeit definiert werden.

Aufgrund der Ausbildung einer Adsorptions- und kapazitiven Doppelschicht sowie der Diffusion des Analyten in der Lösung gilt:

$$Q_{\text{total}} = Q_{\text{dl}} + Q_{\text{ads}} + Q_{\text{diff}} \quad \text{Gl. 3.18}$$

wobei Q_{total} die Gesamtladung, Q_{dl} die Ladung der Doppelschicht auf der Elektrode, Q_{ads} durch die Elektrolyse des adsorbierten Redoxindikators und Q_{diff} durch die Elektrolyse des gelösten Redoxindikators entsteht. Q_{dl} ist vom Aufbau dieser Doppelschicht abhängig und wird in der Literatur auch als kapazitive Ladung bezeichnet.

Da die Elektrolyse des adsorbierten Analyten an der Oberfläche erfolgt, gilt:

$$Q_{\text{ads}} = nFA\Gamma_0 \quad \text{Gl. 3.19}$$

Wobei Γ_0 der Oberflächenbelegung entspricht.

Unter Berücksichtigung der Gleichungen 3.18 und 3.19 ergibt sich für die Ladung Q :

$$Q = 2nFA\sqrt{D_0} \cdot [O]_{\infty} \cdot \sqrt{\frac{t}{\pi}} - Q_{\text{dl}} \quad \text{Gl. 3.20}$$

Durch Umstellen der Gleichung 3.20 kann die Ladung des adsorbierten Redoxindikators bzw. Analyten wie folgt bestimmt werden

$$nFA\Gamma_0 = Q - 2nFA\sqrt{D_0} \cdot [O]_{\infty} \cdot \sqrt{\frac{t}{\pi}} - Q_{\text{dl}} \quad \text{Gl. 3.21}$$

Die Bestimmung der adsorbierten Ladung erfolgt in mehreren Schritten. Im ersten Schritt werden die Messungen mit und ohne Redoxindikator durchgeführt. Durch Auftragen der gemessenen Ladung gegen die Quadratwurzel der Zeit werden diese

Messkurven linearisiert. Aus den dadurch entstandenen Graphen kann für die Messung ohne Indikator die kapazitive Ladung bestimmt werden. Die Messwerte mit Redoxindikator hingegen liefern die Gesamtladung an der Elektrodenoberfläche. Da dabei der Zeitpunkt des Potentialsprungs als 0 definiert wird, gilt:

$$nFA\Gamma_0 = Q - Q_{dl} \quad \text{Gl. 3.22}$$

Die Diffusionsladung wird entsprechend der Anson-Gleichung durch Extrapolation auf $\sqrt{t} = 0$ als 0 definiert.

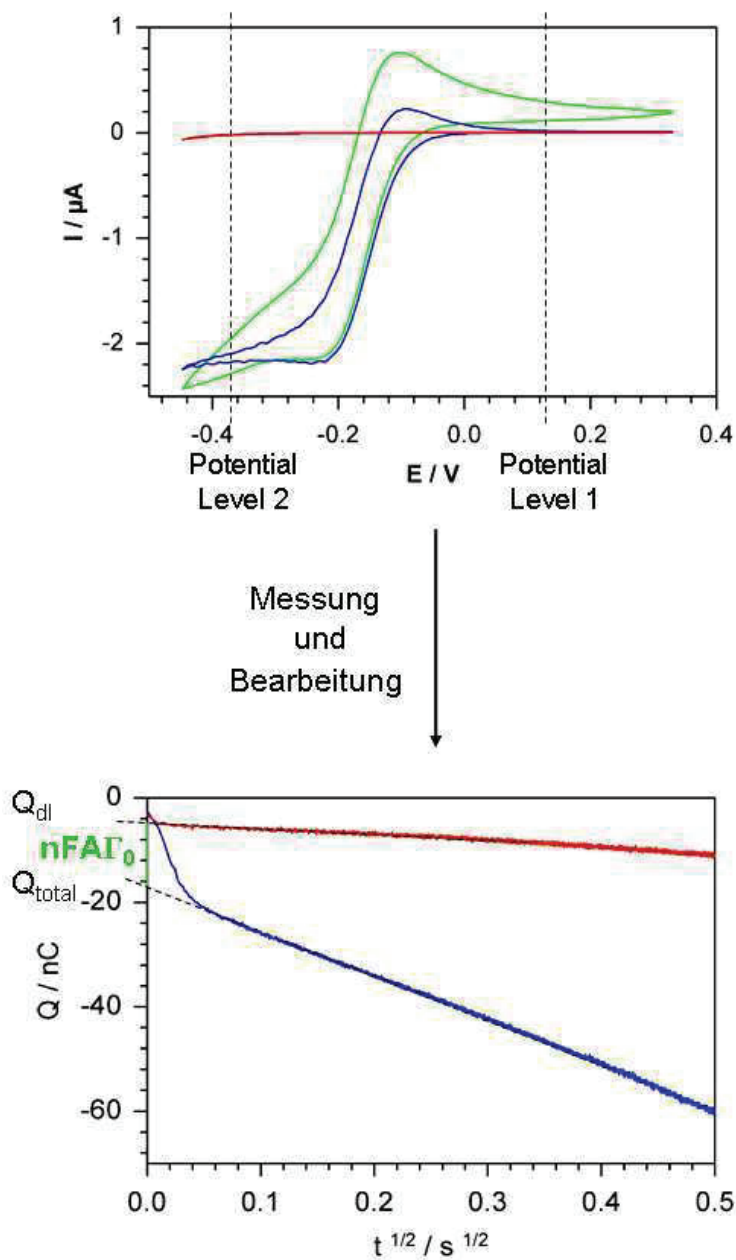


Abb. 3.12: Bestimmung der Oberflächenbeladung am Beispiel einer DNA-modifizierten Elektrode

Die Bestimmung der DNA-Oberflächenbelegung erfolgte nach einer von Steel et al. erarbeiteten Vorschrift mit Rutheniumhexammin(III)-Chlorid⁴⁵. Als Sprungpotential wurde das mittels zyklischer Voltammetrie von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ -Lösung ermittelte Redoxpotential genutzt.

Die Berechnung der Sondendichte Γ_{DNA} auf der Elektrodenoberfläche kann durch folgende Gleichung erfolgen

$$\Gamma_{\text{DNA}} = \Gamma_0 \left(\frac{n}{m} \right) \cdot (N_A) \quad \text{Gl. 3.23}$$

Wobei Γ_0 in diesem Fall die Menge des an der Oberfläche gebundenen Redoxindikators, hier Rutheniumhexammin, n die Anzahl der Ladungen des Redoxindikators, m die Anzahl der Basen der Sonde und N_A die Avogadro-Konstante ist. In Abb. 3.12 und 3.13 sind die Vorgänge und Zusammenhänge für dieses Verfahren noch einmal bildlich dargestellt.

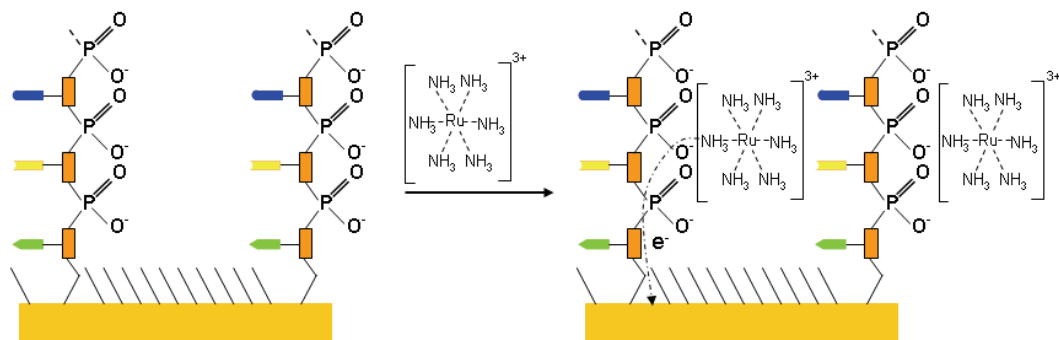


Abb. 3.13: Reaktion an der Elektrodenoberfläche im Verlauf der Bestimmung der Oberflächenbeladung

Unter Berücksichtigung der Gleichung 3.19. ergibt sich für die Sondendichte

$$\Gamma_{\text{DNA}} = \left(\frac{Q_{\text{ads.}}}{nFA} \right) \cdot \left(\frac{n}{m} \right) \cdot (N_A) \quad \text{Gl. 3.24}$$

Durch die Bestimmung der Sondendichte auf der Elektrodenoberfläche ist es möglich die verschiedenen Elektrodentypen miteinander zu vergleichen.

Diese Methode erlaubt auch Aussagen über die Qualität und Bindungsstabilität der gelieferten Sonde.

4. Experimentelles

4.1 Elektrodentypen

In Abb. 4.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Elektrodentypen dargestellt.

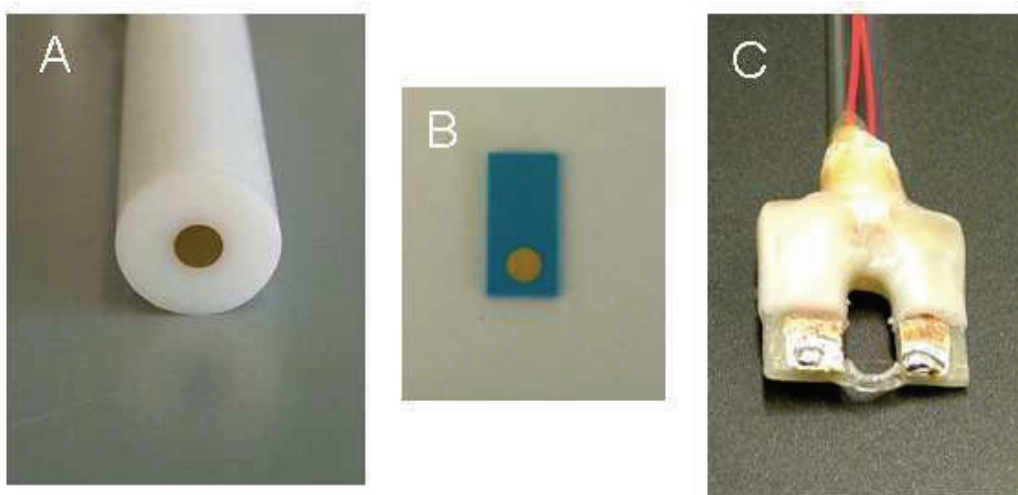


Abb. 4.1: Verwendete Elektrodentypen. (A) Scheiben-, (B) LTCC- und (C) teilweise isolierte Drahtelektrode

Dabei handelt es sich um die nicht heizbare Scheibenelektrode von Metrohm (Herisau, Schweiz), die von TETEKERA (Ilmenau, Deutschland) produzierte indirekt heizbare LTCC- (*low temperature co-fired ceramics*) und die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte direkt heizbare Drahtelektrode. Als Elektrodenmaterial wurde bei allen 3 Elektrodentypen Gold verwendet.

4.1.1 Die Scheibenelektrode

Die ersten Versuche während dieser Arbeit erfolgten mit der Gold-Scheibenelektrode von Metrohm (Herisau, Schweiz). Diese Elektrode besteht aus einem PTFE-Röhrchen in dem an einem Ende eine dünne Goldscheibe eingearbeitet ist. Das Gold

wird durch eine Edelstahl-Hülse mit innen liegendem Gewinde kontaktiert. Durch das Gewinde kann die Elektrode wahlweise auf einen Elektrodenhalter mit oder ohne integrierten Motor aufgeschraubt werden. Dadurch kann die Elektrode als rotierende Scheibenelektrode eingesetzt werden.

Der Einsatz der drehbaren Scheibenelektrode erlaubt somit auch Untersuchungen zum Einfluss der Konvektion auf die Adsorption des Analyten an der Elektrodenoberfläche.

4.1.2 Heizbare Elektroden

Im Verlauf dieser Arbeit wurden auch zwei heizbare Elektroden, die indirekt heizbare LTCC- und die direkt heizbare Drahtelektrode, eingesetzt.

Eine Besonderheit stellt dabei die in den 80er Jahren von Gabrielli et al. beschriebene Drahtelektrode dar⁷⁹. Dieser Elektrodentyp wurde in der Arbeitsgruppe Gründler in den 90er Jahren weiterentwickelt^{143,147,148}.

Die Heizung der Drahtelektroden erfolgt mit hochfrequenten Wechselstrom, in der vorliegenden Arbeit 100 kHz, was eine simultane Messung des Analyten, beziehungsweise in diesem Fall die Adsorption desselben an einer definiert temperierten Elektrodenoberfläche, ermöglicht. Der Einsatz von Gleichstrom ist nicht möglich, da dieser zu einer Polarisierung der Elektrodenoberfläche führen würde. Das hätte eine Zerstörung der Sonden auf der Elektrode zur Folge.

Die Herstellung der Drahtelektroden erfolgte durch Auflöten des Golddrahtes und der Kontakte für das Messgerät auf eine vorher zugeschnittene und geätzte Leiterplatte. Für den Einsatz der Drahtelektroden zur DNA-Detektion wurde zusätzlich ein Plastik-Steg unter dem Draht eingebaut. Dadurch kann der Draht in einem Tropfen Immobilisierungslösung positioniert werden. Diese Elektrodenhalterung wurde an einem Glasröhrchen, das auch als Führung für die Leitungen zu den Kontakten dient, mit Epoxydharz fixiert. Danach wurde die Leiterplatte mit einem Paraffin/Polyethylen-Gemisch isoliert (Abb. 4.2). Dadurch wurde erreicht, dass nur der freiliegende Golddraht in Kontakt mit den verwendeten Lösungen kam.

Um die Elektroden auch bei Temperaturen von mehr als 75 °C einsetzen zu können wurden verschiedene Mischungen von Polyethylen und SasolWax C105 untersucht. Dabei wurde allerdings festgestellt, dass die Isolierschicht bereits nach dem Auftragen Risse zeigte. Aus diesem Grund sind diese Mischungen nicht einsetzbar.

Die so hergestellten Elektroden dienten ursprünglich nur für die Analyse von niedermolekularen Substanzen, wie z. B. Sauerstoff⁸² und Schwermetallen¹⁴⁸. Die Nutzung bei der Analyse von Nukleinsäuren wird hier erstmals beschrieben.

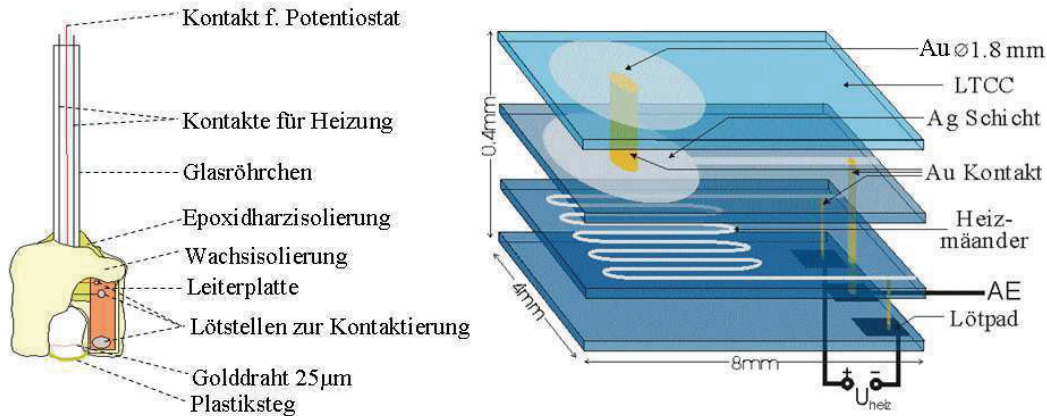


Abb. 4.2: Aufbau der direkt heizbaren Draht- (links) und der indirekt heizbaren LTCC-Elektrode nach Lau¹⁴⁹ (rechts)

Die indirekt heizbaren Elektroden bestehen wie aus Abb. 4.2 zu erkennen ist, aus 4 Keramiksichten, auf denen die einzelnen elektrischen Bauelemente und Kontakte aufgedruckt wurden. Diese 4 Schichten wurden durch Sintern miteinander verbunden.

Mit diesen Elektroden kann eine dünne Lösungsschicht, in diesem Fall eine Hybridisierungslösung, auf der Sensoroberfläche erwärmt werden. Durch den Einsatz dieser Elektrodentypen werden weder die Referenz- noch die Gegenelektrode thermisch gestresst. Die für die Analyse notwendigen Reaktionen können so zusätzlich beschleunigt werden. Lau et al. bewiesen sogar, dass mit dieser Technik bestimmte enzymatische Reaktionen an- bzw. abgeschaltet werden können⁹⁸.

Aufgrund der in Kapitel 3.2.2 erläuterten Zusammenhänge zwischen Schmelztemperatur und Sequenz der Nukleinsäuren kann durch eine genaue Temperatureinstellung bei der Analytik von Nukleinsäuren die Genauigkeit der Analyse zusätzlich gesteigert werden.

Die Bestimmung des für die einzustellende Temperatur notwendigen Heizstromes wird in dem Kapitel 4.5 genauer beschrieben.

Typisch für heizbare Elektroden ist die durch den Temperaturgradienten während des Heizens hervorgerufene Konvektion an der Elektrodenoberfläche. Das hat einen

Massentransport zur Folge, der eine Verarmung des Analyten an der Sensoroberfläche verhindert.

4.2 Versuchsanordnungen

4.2.1 Versuchsaufbau für die photometrische Bestimmung der Schmelztemperatur der dsDNA

Für die Vorversuche wurden ein Carry 1E UV/VIS-Spektrophotometer (Varian, Australien) mit temperierbarer Messzelle zur Bestimmung der UV-Absorption der DNA bei verschiedenen Temperaturen eingesetzt. Die Temperierung erfolgte mit einem CC2-K6-Kryostat (Huber, Deutschland) mit einem Pt100-Mikrotemperaturfühler. Für die Messung wurden in einer Glasküvette jeweils 2,5 ml Phosphat-Puffer pH 7,0 mit je 0,8 μM Target und Sonde vorgelegt, als Referenz diente eine Küvette mit reinem Puffer. Die Messung erfolgte durch schrittweise Temperaturerhöhung bei einer Wellenlänge von 260 nm

4.2.2 Aufbau des Messplatzes für den elektrochemischen Hybridisierungsnachweis

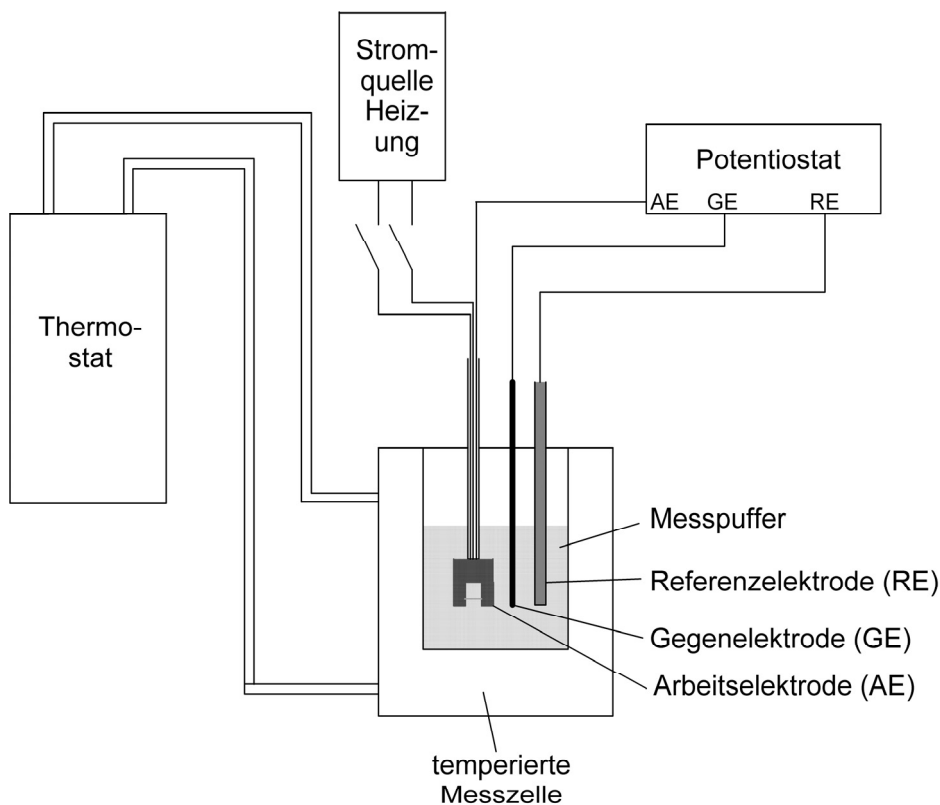


Abb. 4.3: Aufbau des Messplatzes für Hybridisierungsnachweis

Die elektrochemischen Messungen wurden, mit Ausnahme der Temperaturkalibrierung, in einer 20 ml-Messzelle von Metrohm mit einer 3 Elektrodenanordnung durchgeführt. Dabei diente eine Silber / Silberchlorid-Elektrode in 3 M KCl als Referenzelektrode, ein Glaskohlestab als Gegenelektrode und eine der in Abb. 4.1 dargestellten Elektroden als Arbeitselektrode. Die Messzelle wurde in einem Faraday-Käfig untergebracht um Störungen von außen während der Messung zu unterdrücken. Die Steuerung und Auswertung der einzelnen Messungen erfolgte mit einem μ AUTOLAB (ECO Chemie, Utrecht, Niederlande) welches von der GPES 4.8 Software gesteuert wurde. Die Hybridisierung und Dehybridisierung der Nukleinsäuren an den modifizierten Elektroden wurde in einem mittels Wasserbad temperierten Becherglas außerhalb der Messzelle durchgeführt.

Die Einstellung der Temperatur erfolgte mit einem CC2-K6 Kryostat von Huber. Bei den Versuchen mit der Scheibenelektrode wurde diese mit einer Halterung mit Elektromotor kombiniert (Metrohm).

Diese Grundanordnung wurde durch die für den jeweiligen Elektrodentyp notwendige Stromversorgungseinheit ergänzt. Den für das Heizen der indirekt geheizten LTCC-Elektroden eingesetzten Gleichstrom lieferte eine Stromversorgungseinheit Typ TSX 1820 von THURLBY THANDAR INSTRUMENTS (Huntington, Großbritannien).

Den für die Drahtelektrode notwendigen Wechselstrom lieferte eine Stromquelle mit 12 bis 15 A und 13.8 V, die mit einem HIFI-Verstärker, Überträger, einstellbaren Widerstand und einem Multimetermessgerät kombiniert wurde.

4.2.3 Messplatzaufbau für polarographische Versuche

Für die polarographischen Versuche mit der tropfenden Quecksilberelektrode wurde ein Polarograph Typ 663 VA Stand mit einem Laborschreiber Typ 626 Polarecord verwendet. Als Referenzelektrode diente eine Kalomel-Elektrode und als Gegenelektrode eine *Platin*-Elektrode. Für die an der hängenden Quecksilberelektrode durchgeführten Versuche der adsorptiven Stripping Voltammetrie (AdSV) wurde zusätzlich ein Timer Typ 621 VA verwendet (alle Geräte von Metrohm, Schweiz).

4.2.4 Meßplatzaufbau für die Temperaturkalibrierung

Der Aufbau des Messplatzes für die Temperaturkalibrierung beruht im Gegensatz zu den anderen elektrochemischen Verfahren auf einer Zweielektrodenanordnung. Die Heizstromversorgung erfolgt mit den bereits unter 4.2.2 beschriebenen Strom- und Spannungsquellen.

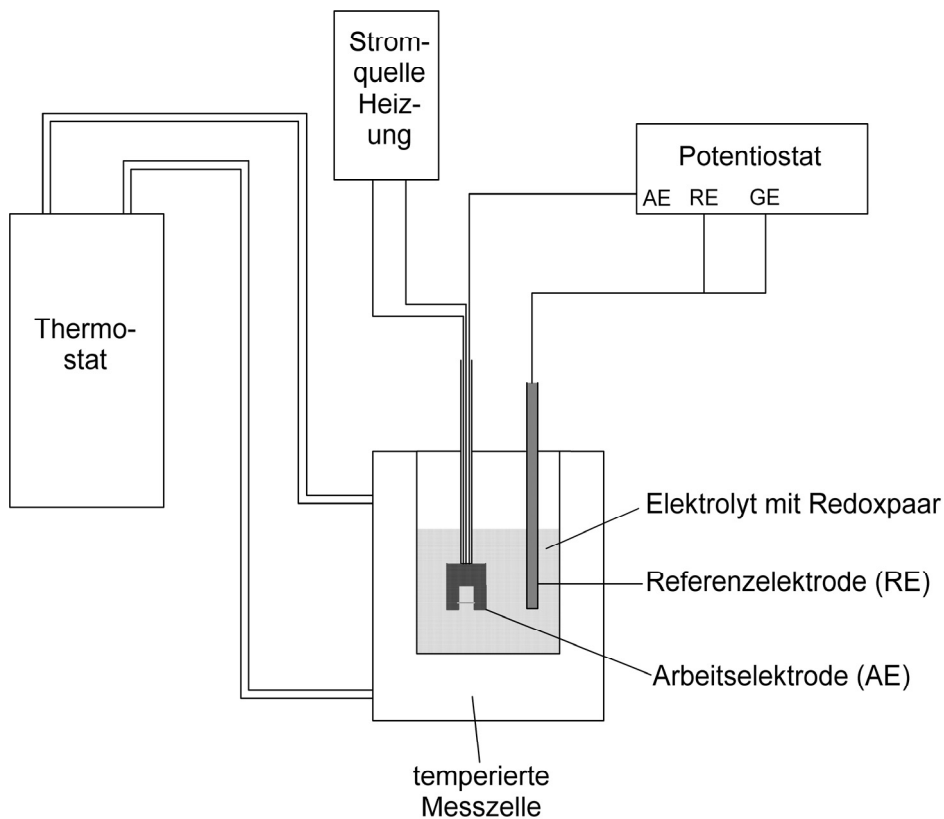


Abb. 4.4: Messplatzaufbau für die Temperaturkalibrierung

Als Elektrolyt diente hier eine 0,1 M Kaliumchlorid- Lösung, die das Redoxsystem Kaliumhexacyanoferrat(II) / Kaliumhexacyanoferrat(III) enthielt. Die beiden Komponenten des Redoxsystems wurden in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt. Bei der Temperaturkalibrierung der LTCC wurde zwischen die beiden Elektroden ein Multimeter zur Bestimmung des Elektrodenpotentials geschaltet.

Die Bestimmung des Elektrodenpotentials bei der Drahtelektrode erfolgte mittels μ AUTOLAB und PC mit GPES 4.8 Software.

4.3 Präparation der Elektroden und Versuchsdurchführung

4.3.1 Reinigung der Elektroden

Alle 3 verwendeten Elektrodentypen wurden vor der Herstellung der SAM durch 25faches zyklisches Anlegen einer Spannung im Bereich von -0,2 bis 1,6 V gegen Ag/AgCl in 3 M KCl in 0,5 M Schwefelsäure elektrochemisch gereinigt. Danach wurden die Elektroden mit Reinstwasser ($R = 18,2 \text{ M}\Omega$) und absolutem Ethanol gespült und getrocknet.

Die Scheibenelektroden wurden zusätzlich vorher mit einem Aluminiumoxid/Wasser-Gemisch auf einem Polierpad (Metrohm, Schweiz) poliert. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser gespült und mit Wasser auf einem Stück Filterpapier nachpoliert.

Die Drahtelektroden wurden vor der ersten elektrochemischen Reinigung an der Luft geglüht, um das bei der Isolierung der Halterung des Golddrahtes auf den Draht geflossene Wachs und sonstige organischen Reste zu entfernen.

4.3.2 Immobilisierung der Sonden

Für die Immobilisierung der Sonde auf der Elektrode wurden folgende Varianten untersucht:

Standard :

Auf den Elektroden wurden 16,5 μl Sondenlösung direkt auf die Elektrodenoberfläche bzw. bei der Drahtelektrode auf den Plastiksteg aufgetragen und bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 0,25 M Phosphatpuffer pH 7,0 (PB) und sterilem Wasser gespült. Danach erfolgte eine einstündige Nachbelegung in einer 1 mM Mercaptohexanol-Lösung. Durch diesen Reaktionsschritt wurden die auf der Oberfläche gebundenen Sonden vollständig aufgerichtet und die noch vorhandene freie Elektrodenoberfläche für unerwünschte elektrochemische Reaktionen blockiert. Dadurch werden die kapazitiven Ströme während der Messung unterdrückt. Die überschüssige Nachbelegungslösung wurde mit Ethanol und sterilem Wasser abgespült. Für die Selektivitätsuntersuchungen mit der Dabcyl-Markierung wurde anstelle des nichtkomplementären markierten Stranges die Sonde EcoR1 in Kombination mit dem FRIZ-Target verwendet.

Koimmobilisierung :

Um die Immobilisierung zu optimieren wurden Sonde und Mercaptohexanol sowohl auf der Scheiben- als auch auf der LTCC-Elektrode koimmobilisiert.

Dazu wurden jeweils 33 μ l Sondenlösung mit 3,3 μ l verdünnter Nachbelegungs-
lösung versetzt. Die Verdünnungsstufen wurden für die Optimierung dabei so
gewählt, dass die Endkonzentration des Mercaptohexanols bei 225, 400 bzw.
900 μ M lag.

Die Immobilisierung erfolgte über Nacht bei 4 °C mit 18,2 μ l Immobilisierungs-
lösung und ohne Nachbelegung. Zusätzlich zu dieser Modifizierung wurde das
Volumen der Lösung für die Immobilisierung später auf 4 μ l verkleinert, da sich in
unserer Arbeitsgruppe bestätigte, dass diese Menge ausreichend ist.

Zweifache Nachbelegung :

Ziel dieser, bei der FRIZ Biochem GmbH entwickelten, Immobilisierungsvariante ist
es die Elektrodenoberfläche hydrophober zu gestalten und dadurch die SAM zu-
sätzlich zu stabilisieren.

Zu diesem Zweck wurden 16,5 μ l Sondenlösung, wie bereits bei der Standard-
methode beschrieben, auf der Elektrodenoberfläche aufgetragen und inkubiert. Im
zweiten Schritt wurden die Elektroden mit 0,25 M PB pH 7,0 und absoluten Ethanol
gespült. Anschließend wurden die Elektroden in einer 1 mM ethanolischen Mer-
captoundecan-Lösung 8 h nachbelegt. Danach wurde mit Ethanol und destilliertem
Wasser gespült. Anschließend erfolgte noch eine zweite Nachbelegung über 3 h in
einer 1 mM Mercaptohexanol-Lösung in Puffer.

4.3.3 Hybridisierung, Messung und Dehybridisierung

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Hybridisierung durch Eintauchen der
Elektrode in ein 10 ml Becherglas mit 2-3 ml Elektrolyt mit dem in der angegebenen
Konzentration enthaltenen Target für 4 min.

Die Probenlösung wurde beim Einsatz der Scheibenelektrode mit einem Wasserbad
auf die angegebene Temperatur eingestellt. Im Gegensatz dazu wurde bei den
Messungen mit der Drahtelektrode die Proben temperatur mit einem Eisbad auf 3-
4 °C und bei der Nutzung der LTCC-Elektrode durch einen Kryostaten auf 7 °C
heruntergekühlt. Die Einstellung der Hybridisierungstemperatur erfolgte bei den
Drahtelektroden durch Anlegen eines Heizstromes bzw. bei den LTCC-Elektroden

durch Anlegen einer Heizspannung. Die dafür notwendigen Strom- bzw. Spannungswerte wurden vorher durch die in Kapitel 4.5 beschriebene Temperaturkalibrierung bestimmt.

Bei den Versuchen mit der Scheibenelektrode wurde dieser Elektrodentyp zusätzlich mit 1000 U/min gedreht. Im Gegensatz dazu ist ein Rühren bei den heizbaren Elektroden nicht notwendig, da diese beim Heizen die notwendige Konvektion selbst erzeugen.

Die Messung wurde nach Abspülen der Elektrode mit Messpuffer in einer Messzelle von Metrohm mit 20 ml Puffer bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Messverfahren wurde für die Versuche mit den Ferrocen- und die Dabcyl-markierten Targets die Wechselstromvoltammetrie verwendet. Bei den Os-modifizierten Oligonukleotiden hingegen kam die Square Wave Voltammetrie zum Einsatz. Die ACV-Messungen erfolgten bei einer Frequenz von 10 Hz in einem Potentialbereich von 0 bis 0,55V vs. Ag/AgCl für Ferrocen bzw. von -0,6 bis 0V vs. Ag/AgCl für Dabcyl. Die Bestimmung des Osmium-markierten Targets wurde mit 200 Hz in einem Bereich von -0,55 bis 0 V vs. Ag/AgCl durchgeführt.

Nach Bestimmung des Hybridisierungssignals wurde die Scheibenelektrode 30 sec. in 50-60 °C heißen destillierten Wasser dehybridisiert. Bei den geheizten Elektroden geschah das durch Anlegen eines Heizstromes von 670 mA für die Draht- bzw. 5,5 V Heizspannung für die LTCC-Elektrode in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur. Die auf diese Art eingestellte Temperatur entspricht der bei der Scheibenelektrode. Die Elektroden wurden nach der Dehybridisierung für die nächste Hybridisierung eingesetzt. Der Hybridisierungs-Dehybridisierungs-Zyklus konnte dabei mehrmals wiederholt werden bevor ein deutlicher Signalverlust eintrat. So konnten bei den SAM's mit der Monothiolsonde bis zu 6 Hybridisierungen, bei denen mit der Sonde mit 6 Schwefelatomen im Linker bis zu 15 Hybridisierungen bestimmt werden.

4.4 Sequenzen der verwendeten Nukleinsäuren

Name d. Oligomers	Kürzel	Nukleinsäure-Sequenz	Modifizierung	Lieferant
Sonde	FS	5`-TGC GGA TAA CAC AGT CAC CT- Thiol-3`	OH-(CH ₂) ₃ -S-S- (CH ₂) ₃ -	FRIZ Biochem GmbH Operon GmbH
Sonde EcoR	EcoR	5`-ATT GGC CCG TAA GGC GAA TT- Thiol-3`	OH-(CH ₂) ₃ -S-S- (CH ₂) ₃ -	Operon GmbH
Sonde-Disulfit	FSS	5`- TGC GGA TAA CAC AGT CAC CT- (Dithiol) ₂ -3`	Dithiol-Mono- mere durch PO ₄ - Ester verbunden a	FRIZ Biochem GmbH
Sonde-FSS6	FSS6	5`- TGC GGA TAA CAC AGT CAC CT- (Dithiol) ₃ -3`	Dithiol-Mono- mere durch PO ₄ - Ester verbunden a	FRIZ Biochem GmbH
Ferrocen-Target	FcT	5`-XAG GTG ACT GTG TTA TCC GCA-3`	Ferrocen- C6UniLink	FRIZ Biochem GmbH
Ferrocen-NC-Target	NC	5`-XGA GGT ATC GGT TAT TGC CCA-3`	Ferrocen- C6UniLink	FRIZ Biochem GmbH
Target-Dabcyl	TDT	5`-XAG GTG ACT GTG TTA TCC GCA-3`	5-Dabcyl	Operon GmbH
Target-T		5`-TTT TTA GGT GAC TGT GTT ATC CGC A-3`	T-Pentamer	Operon GmbH
Target-T-Os	TOs	5`-XAG GTG ACT GTG TTA TCC GCA-3`	[Os bpyT] Pentamer	- aus Target-T synthetisiert.

Tab. 4.1.: Verwendete Nukleinsäureoligomere mit Modifizierungen.

a s. Abb. 3.5

4.4.1 Modifizierung des Targets mit Osmiumtetroxid-Bipyridin

Grundlage dieser Markierung ist die Reaktion von Osmium(IV)-Komplexen tertiärer Amine, wie z. B. Pyridin, Bipyridin, Phenanthrolin oder TEMED, mit Thymin- oder Cytosinbasen¹⁵⁰. Von diesen Substanzen ist das Phenanthrolin nicht geeignet, da es für die Reaktion am Einzelstrang nicht spezifisch ist. Diese von Palecek entwickelte Markierungstechnik wurde in unsere Arbeitsgruppe von Dr. Flechsig und Hr. Reske verbessert, untersucht und patentiert^{58,151}.

Durch den Einsatz eines sogenannten Schutzstranges, das bedeutet eines Nukleinsäureoligomers mit einigen Basenfehlpaarungen, wurde nur der endständige Teil des nachzuweisenden Stranges markiert. In unserem Fall handelte es sich um eine Sequenz von fünf Thymidin-Resten hintereinander. Dadurch konnte eine Mehrfachmarkierung relativ leicht erreicht werden.

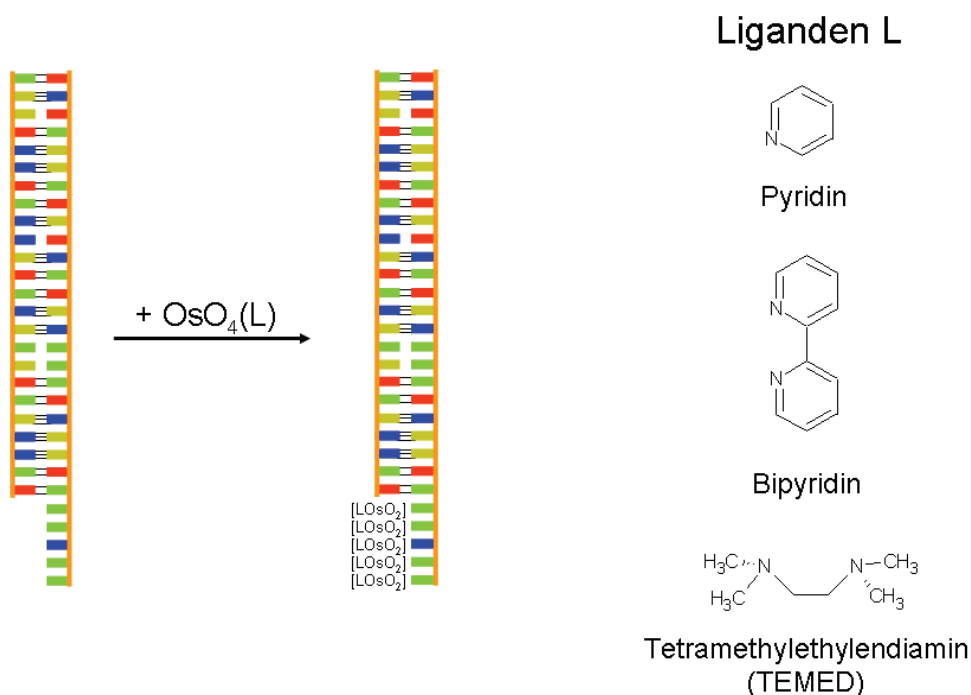


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der Markierung und für unsere Anwendung geeigneten Liganden.

Diese mehrfache Markierung wiederum führt zu einer sehr hohen Signalausbeute. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Versuche zum Vergleich von RDE und LTCC-Elektrode, sowie zum Einfluss der Konvektion auf das Signal diese Targets eingesetzt.

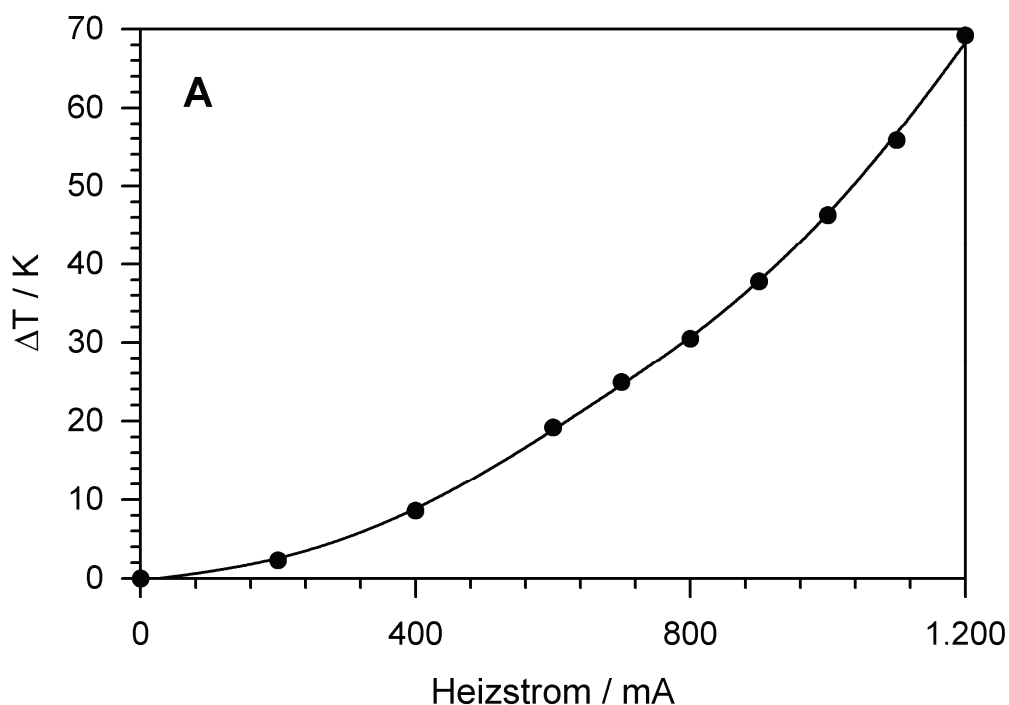
Die Modifizierung des Targets erfolgte wie folgt:

- je 16,5 μl 30 μM Target und Schutzstrang mischen und 2 h bei Raumtemperatur hybridisieren lassen
- Zugabe von 12 μl Hybridisierungspuffer und 15 μl 10 mM Os-Bipyridin-Komplex
- 2 h bei Raumtemperatur inkubieren
- 19 h Dialyse gegen 100 ml Hybridisierungspuffer bei 4 °C

Wie aus dieser Synthesevorschrift zu erkennen ist, ist die Darstellung der Markierung sehr leicht durchführbar.

4.5 Temperaturkalibrierung

Um die heizbaren Elektroden auf eine definierte Temperatur einzustellen, ist eine vorherige Temperaturkalibrierung erforderlich. Dafür wurden die Elektroden in der in Abb. 4.4 beschriebenen Messanordnung in einer äquimolaren Lösung mit 50 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) und Kaliumhexacyanoferrat (II) kalibriert. In Abb. 4.6 sind die Kalibrierkurven für die einzelnen Elektrodentypen dargestellt.



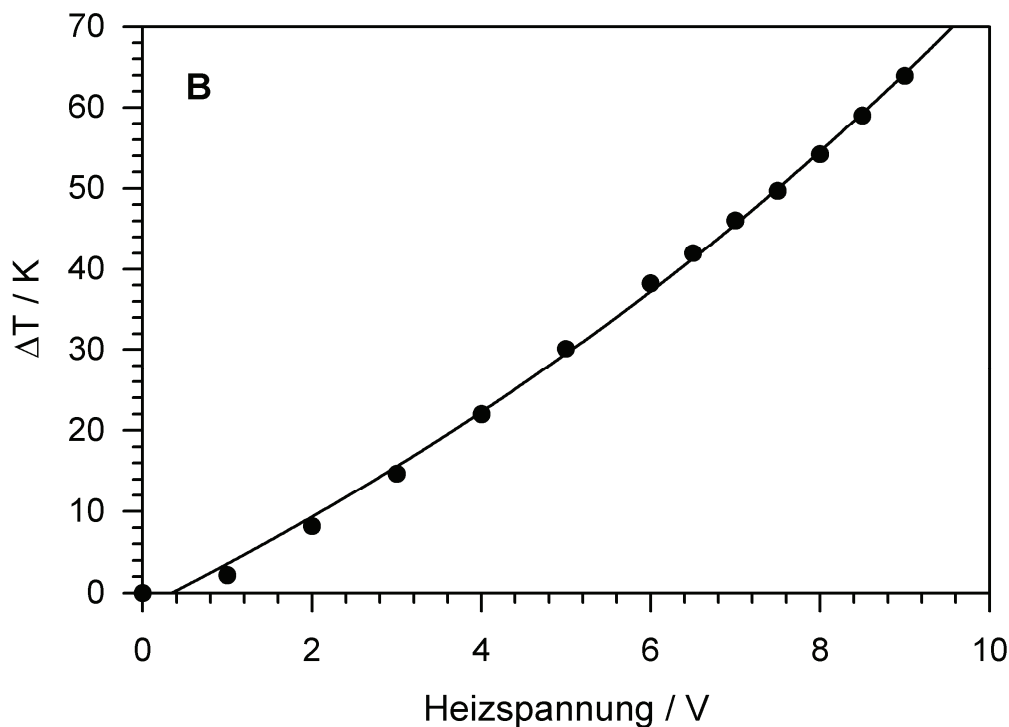


Abb. 4.6: Kalibrierkurven für direkt heizbare Draht- (A) und indirekt heizbare LTCC-Elektroden (B).

Die Temperaturkalibrierung erfolgte bei der Drahtelektrode bis zu einer Temperaturänderung von 69,2 °C bei der LTCC-Elektrode bis 64 °C. Diese Temperaturänderungen sind für unsere Zwecke ausreichend, da der Schmelzpunkt unserer dsDNA im Bereich von 70 bis 75 °C liegt. Ein Vergleich beider Typen bei mehr als 73 °C ist nicht möglich, da die Isolierung der Drahtelektrode diesen Temperaturen nur wenige Minuten standhält.

4.6 Bestimmung der Oberflächenbelegung

Die Bestimmung der Oberflächenbelegung erfolgte nach der in 3.5.2.6 beschriebenen Methode mit der Messapparatur nach Steel⁴⁵.

Dafür wurde als erstes die kapazitive Ladung der SAM bestimmt. Das geschah durch die Messung der adsorbierten Ladung in 10 mM TRIS-Puffer pH 7,4 ohne den Rutheniumhexammin(III)-Komplex. Anschließend wurde die Messung in Anwesenheit von 50 µM Rutheniumhexammin(III)-Chlorid wiederholt. Aus den von den beiden Messungen erhaltenen Werten wurden die DNA-Oberflächenbelegungen bezogen auf die graphische Oberfläche berechnet.

Die dabei gewonnenen Ergebnisse wurden für den Vergleich der Elektroden eingesetzt.

Auf eine Natriumsulfatzugabe wurde verzichtet, da Natrium-Ionen mit dem Rutheniumhexammin(III)-Ionen um die Phosphatgruppen des DNA-Rückgrates konkurrieren würden. Dadurch kann das Messsignal im Extremfall vollständig unterdrückt werden. Um einen Einfluss durch den in der Luft enthaltenen Sauerstoffs zu vermeiden, wurde die Lösung vor jeder Messung ca. 5 min mit Argon entgast.

5. Ergebnisse und Diskussion

Seit dem Jahr 2000 wurden von unserer Arbeitsgruppe mehrere Artikel zur DNA-Detektion an geheizten Elektroden veröffentlicht. Grundlage für diese Arbeiten bildete die in Zusammenarbeit mit Prof. Wang entwickelte heizbare Kohlepastelektrode⁸⁷. Diese Elektrode wurde ursprünglich zur Detektion von unmarkierten Nukleinsäuren eingesetzt. So wurde im Jahr 2000 der Einfluss der Temperatur auf den Anreicherungsschritt von Guanin-Oligomeren untersucht⁸⁷. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass bereits geringe Temperaturunterschiede Signalverbesserungen zur Folge haben. Im Jahr 2004 wurde die Methode durch eine vorherige Aufreinigung der nachzuweisenden Nukleinsäure an DNA-modifizierten magnetischen Nanobeads verbessert⁹³. Ein Nachteil der Methode ist allerdings, dass das Messsignal nach der Anreicherung nur einmal erhalten werden kann, da die DNA bei dieser Methode zerstört wird.

Aus diesem Grund wurden ab dem Jahr 2001 in Zusammenarbeit mit einer Arbeitsgruppe aus Bratislava Interkallatoren, das sind Substanzen, die sich in die DNA einlagern, eingesetzt. So wurde 2001 der Einfluss der Temperatur bei dem Nachweis von DNA-Schäden an Kalbsthymus-DNA mit Co-Phenanthrolin untersucht¹⁵². Andere Interkallatoren, die genutzt wurden, waren Flavonoide¹⁵³ als auch 1-Amino- und 1-Hydroxy-Pyren¹⁵⁴. Bei allen diesen Substanzen konnte ein Temperatureinfluss auf das Signal nachgewiesen werden. Besonders interessant sind die von Ferancova durchgeführten Versuche mit den beiden Pyrenen¹⁵⁴. Hier wurden keine Nukleinsäuren nachgewiesen, vielmehr diente die DNA als Erkennungselement für das Amino-Pyren. Das beweist, dass Nukleinsäure-modifizierte Elektroden auch zum Nachweis von Umweltgiften, beispielsweise 1-Amino-Pyren, eingesetzt werden können. Ein Nachteil von Interkallatoren besteht darin, dass diese sich mehrfach in die Nukleinsäuren einlagern können. Dadurch kann das Signal durch Basenfehlpaarungen nicht vollständig unterdrückt werden. Ein weiterer Nachteil ist das Verhalten der Redoxinterkallatoren. So wiesen Wang und Gründler 2003 an einer heizbaren Golddrahtelektrode nach, dass sich das Bindungsverhalten von Co-Phenanthrolin an DNA bei Temperaturerhöhung ändert¹⁵⁵.

Aus diesem Grund begann Flechsig 2003 mit den ersten Vorversuchen mit kovalent gebundenen Redoxindikatoren.

5.1 Vorversuche zur Stabilität der dsDNA

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der photometrischen Vorversuche beschrieben und diskutiert.

Dazu wurden der Einfluss von Ionenstärke, Basenfehlpaarungen und der Markierung auf den Schmelzpunkt untersucht. Die Parameter erlauben eine Einschätzung der Selektivität und des Einflusses der Hybridisierungstemperatur auf das Signal des Sensors.

5.1.1 Schmelzpunkt-Bestimmung von dsDNA in Lösung

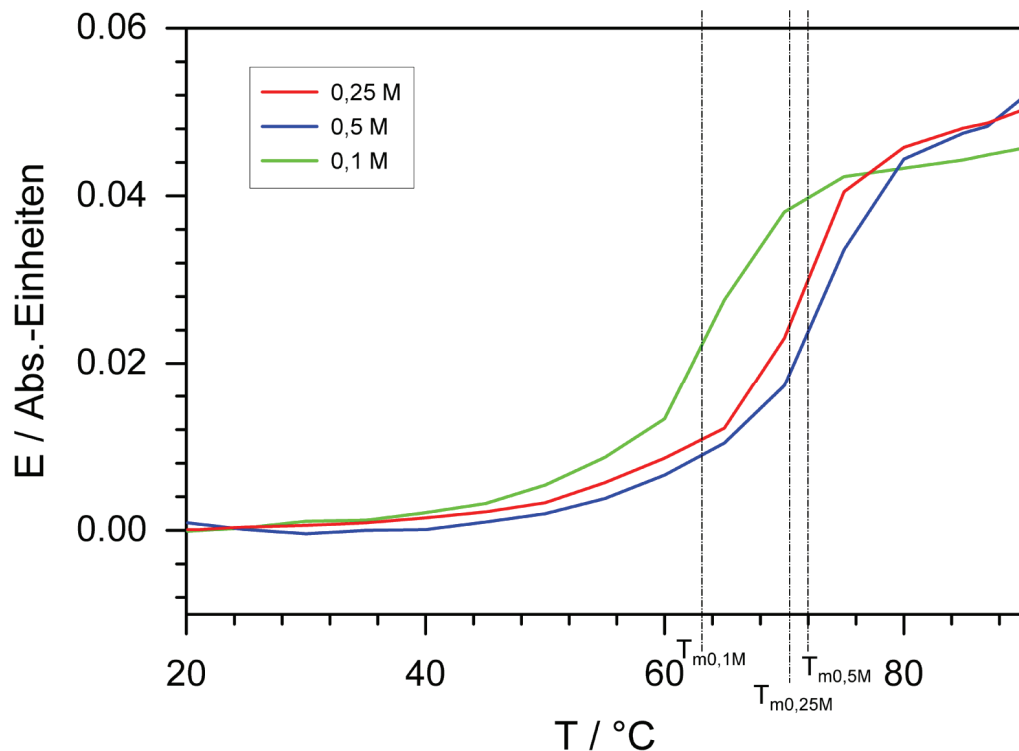


Abb. 5.1: DNA-Schmelzkurven bei verschiedenen Ionenstärken mit je 0,8 μ M Sonde FS und komplementären Target in Phosphatpuffer pH 7,0 bei verschiedenen Ionenstärken.

Wie aus Abb. 5.1 hervorgeht, besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Pufferkonzentration, und somit der Ionenstärke, und dem Schmelzpunkt der DNA. Bei dem Vergleich der Schmelzkurven der verschiedenen Phosphatpuffer fällt auf, dass eine Verringerung der Pufferkonzentration zu einer Abnahme des DNA-Schmelzpunktes führt. Der Effekt wurde bereits 1981 von Hillen et al. beschrieben¹¹⁶.

Ionenstärke / M	berechneter T_m / °C	gemessener T_m / °C
0,1	62,45	63,11
0,25	69,06	70,46
0,5	74,05	71,98

Tab.5.1: Theoretische und gemessene Schmelzpunkte für Sonde FS und komplementären Target

So ist der Schmelzpunkt bei 0,25 M Differenz um etwa 2 °C geringer. Während es bei 0,4 M Differenz ca. 8 °C weniger sind. Der Schmelzpunkt nimmt somit mit abnehmender Ionenstärke exponentiell ab. Dieser Zusammenhang wird durch Gleichung 3.1 auch bestätigt.

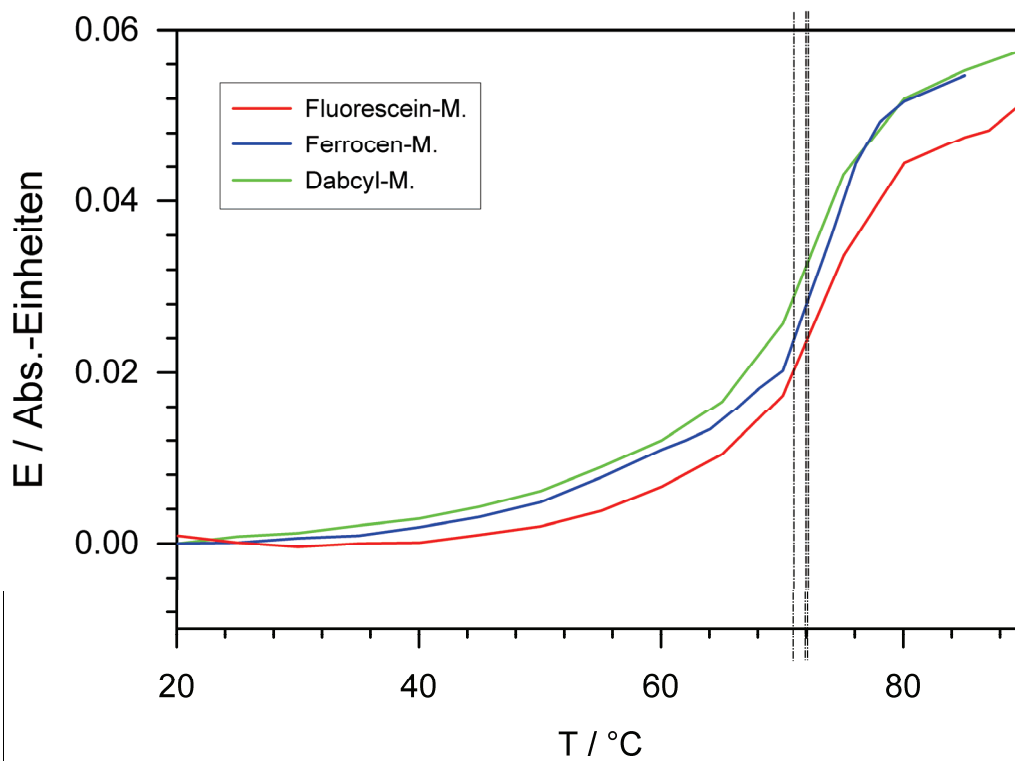


Abb. 5.2: DNA-Schmelzpunktkurven mit verschiedenen Targetmodifizierungen. Eingesetzt wurden je 0,8 µM Sonde und Target in 0,5 M PB pH 7,0

Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss der Targetmodifizierung auf den Schmelzpunkt. Die Messungen sollten klären wie stark der Einfluss der Markierung auf den Schmelzpunkt bei der einer Ionenstärke von 0,5 M ist. Dazu wurden für die mit Ferrocen, Fluorescein und Dabcyl markierten Targets die Schmelzkurven aufgenommen. Abb. 5.2 zeigt den Einfluss der Marker auf den Schmelzpunkt, welcher

sehr gering ist. So beträgt die Differenz zwischen den Schmelzpunkten von Fluorescein- und Ferrocen-markierten Target nur 0,3 °C, während zwischen Ferrocen- und Dabcyl-markierten Target ein Unterschied von 1 °C ermittelt wurde. Ein zum Teil wesentlich stärkerer Einfluss wurde 2005 von Biver et al. für interkallierende Farbstoffe¹²⁵ und 2004 von Narayanan et al. für kovalent gebundene Marker¹⁵⁶ beschrieben. So bestimmten Biver et al. für mit Proflavin gesättigte Kalbsthymus-DNA einen um 12 °C höheren Schmelzpunkt als bei reiner DNA. Als Puffer wurde dabei eine 3-10 mM Natriumcacodyl-Lösung mit 0,1 M NaCl pH 7,0 verwendet. Ähnliche Werte wurden von Narayanan et al. mit einigen an Dodekameran kovalent gebundenen Chromophoren in 1 M CH₃COONH₄-Lösung gemessen. Die Abweichung der in dieser Arbeit gemessenen Werte von dem berechneten Schmelzpunkt fällt deutlich geringer aus. Das liegt an den verwendeten Markern, den längeren Nukleinsäuren und dem verwendeten Puffersystem.

Ein weiterer Punkt der untersucht wurde, ist der Einfluss von Einzelbasenfehlpaarungen auf den Schmelzpunkt. Für diesen Versuch wurden je 0,8 µM Sonde und komplementäres Target in 2,5 ml 0,1 M Phosphat-Puffer pH 7,0 verwendet. Die dabei aufgenommene Schmelzpunktkurve wurde mit der von einem Doppelstrang mit einer Basenfehlpaarung verglichen.

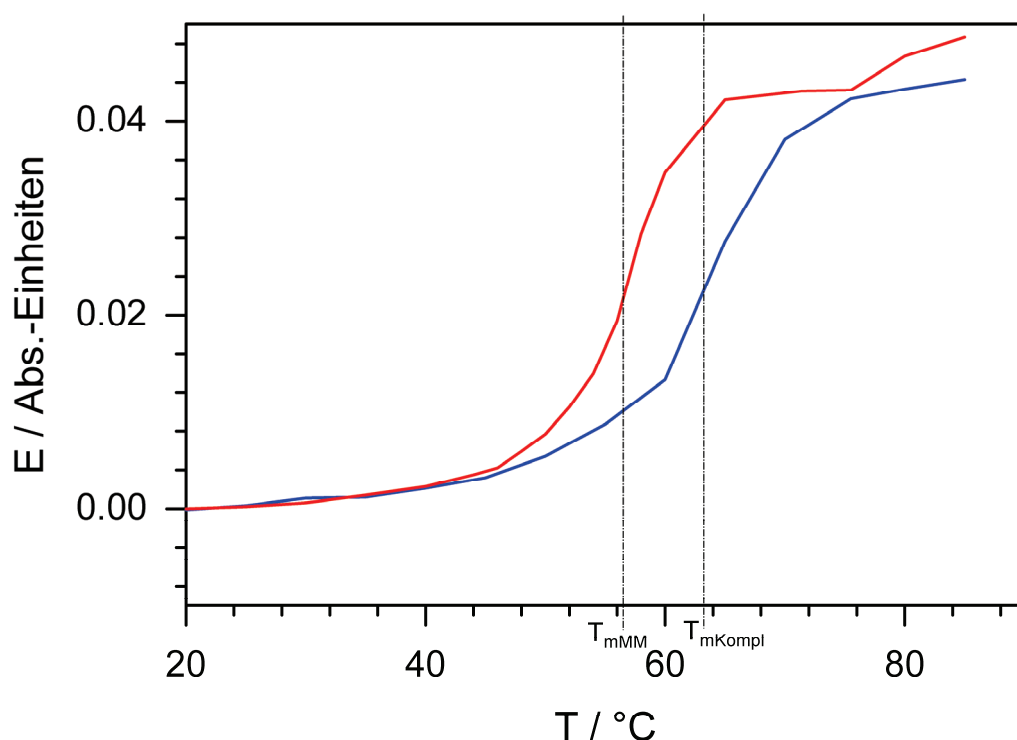


Abb. 5.3: Vergleich von je 0,8 µM komplementären Target-Sonde-Duplex (blau) und Einzelbasen-Mismatch-Sonden-Duplex (rot) in 0,1 M PB pH 7,0

Die Fehlpaarung wurde dadurch erreicht, dass ein Cytosin-Rest im Target durch einen Guanin-Rest ersetzt wurde. Als Referenz diente hierbei wiederum eine Küvette mit reinem Puffer. Dabei wurde eine Schmelzpunkterniedrigung von 7 °C ermittelt (Abb. 5.3). Eine Verstärkung der Schmelzpunkterniedrigung kann durch die Kombination mit künstlichen Nukleinsäuren, z. B. PNA oder LNA erreicht werden. Nach neuesten Erkenntnissen spielt dabei nicht nur die Ladung der Nukleinsäure, sondern auch die Lage der Basenpaare in der Helix eine Rolle¹²³.

5.2 Vergleich der verwendeten Sonden und SAM's

5.2.1 Signalstabilität der Sonden

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Sonden mit 3 verschiedene Linkern verwendet. Dabei handelt es sich um einen Monothiol-Linker, einen zweifach Dithiol-linker und einen dreifachen Dithiollinker. Diese Linker wurden bereits in Abb. 3.5 dargestellt. Ursprünglich wurden die Messungen in 0,5 M Natriumsulfat mit einer tetrathiolmodifizierten Sonde durchgeführt. Leider stand uns aufgrund von Lieferproblemen nur eine Charge zur Verfügung, die allerdings über 12 Messungen ein stabiles Signal mit einem Signalverlust von ca. 20 % lieferte.

Da diese Charge sehr schnell verbraucht wurde, musste auf die wesentlich leichter erhältliche Monothiol-Sonde ausgewichen werden.

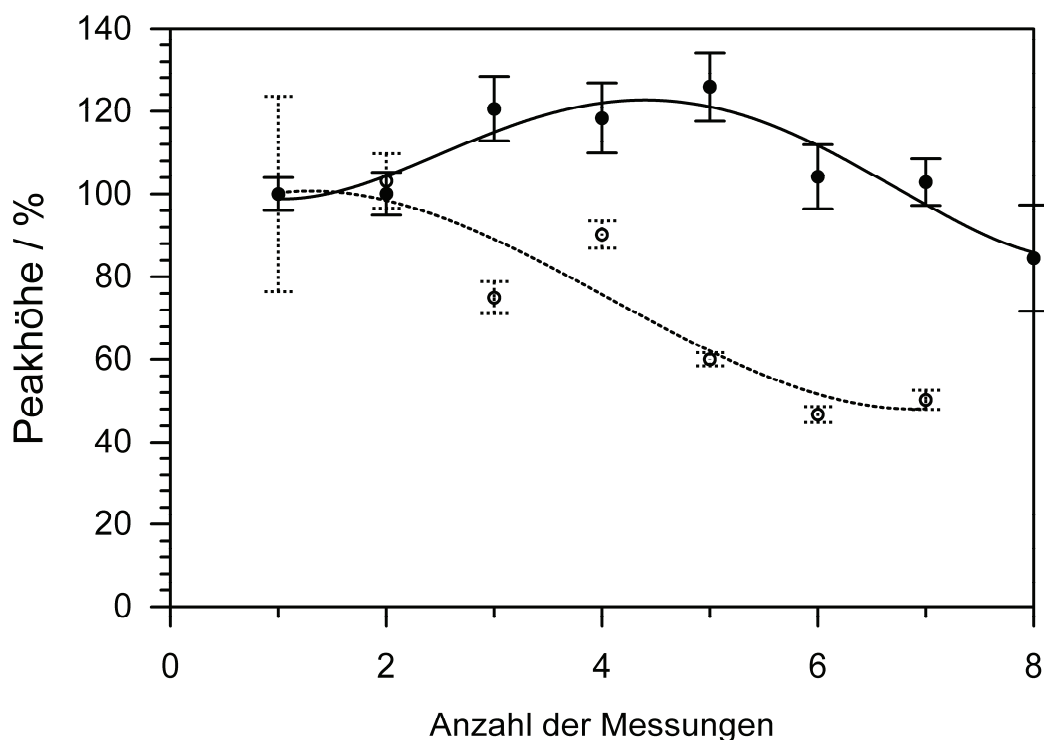


Abb. 5.4: Vergleich der Stabilität des Hybridisierungssignals der Tetrathiol- (durchgängige Linie) und Monothiol-Sonde (unterbrochene Linie). Hybridisierung 4 min in 80 nM Ferrocen-Target bei Raumtemperatur an einer Scheibenelektrode bei 1000 U/min.

Aus Abb. 5.4 ist zu erkennen, dass der Signalverlust der Monothiol-Sonde bei den ersten 7 Messungen etwa 3mal höher ist als nach der achten Messung mit der Tetrathiol-Sonde. Sakata et al. beobachteten bei ihren Untersuchungen zum Einfluss der Struktur der Kopplungsgruppen an Goldoberflächen einen ähnlichen Effekt. Sie führten diese Beobachtung auf eine geringere Bindungsstabilität der Linker mit nur einer Schwefelgruppe zurück, die sie auch bei Bestimmungen der Oberflächenbelegungen mittels XPS-Analyse nach Hitzestress nachwiesen¹⁵⁷.

Da für die Versuche mit den Ferrocen- und Dabcyl-markierten Targets nur 6 Hybridisierungen notwendig waren, war die Stabilität für diese Versuche ausreichend.

Die dritte eingesetzte Sonde, die mit dem dreifachen Dithiollinker (FSS6), wurde ab dem Sommer 2006 für die Untersuchungen des Konvektionseinflusses eingesetzt. Diese Sonde wurde durch Koimmobilisierung immobilisiert und zeigte bei über 20 Hybridisierungen ein stabiles und reproduzierbares Signal. Allerdings ließ sich diese Sonde nicht bei der Drahtelektrode einsetzen, da die Oberflächenbelegung der Sonde mit 1 pmol/cm² zu gering war um ein reproduzierbares Signal zu erzeugen.

5.2.2 Optimierung

Während der Arbeiten zum Einfluss von Konvektion und Temperatur auf das Hybridisierungssignal konnte ursprünglich keine reproduzierbare Signalstabilität erreicht werden. Aus diesem Grund wurden neben der zuerst eingesetzten Immobilisierungsmethode Standard zwei weitere Varianten mit der Monothiol-Sonde getestet.

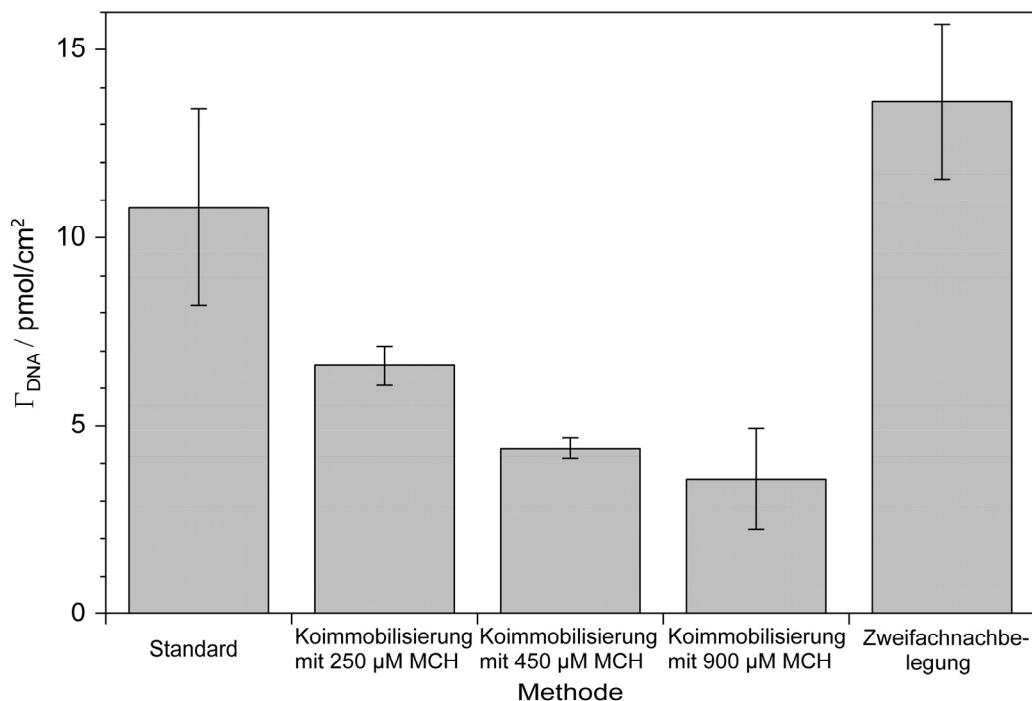


Abb. 5.5: Vergleich der Oberflächenbelegung der einzelnen Immobilisierungsmethoden.

Durch die chronocoulometrischen Bestimmungen der Oberflächenbelegung konnte gezeigt werden, dass die Standard-Immobilisierung und die Methode mit der zweifachen Nachbelegung die höchste Sonden-Belegung aufweisen. Durch den Einsatz der Koimmobilisierung konnte der Wert gesenkt werden. Abhängig von der Konzentration des Nachbelegungsmittels schwankt dieser Wert zwischen 7,5 und 3,5 pmol/cm² und liegt somit nahe dem von Steel et al.⁴⁵ ermittelten Optimum von 4 pmol/cm² für die Oberflächenkonzentration eines Monothiol-modifizierten Nukleotides von 20 Basen.

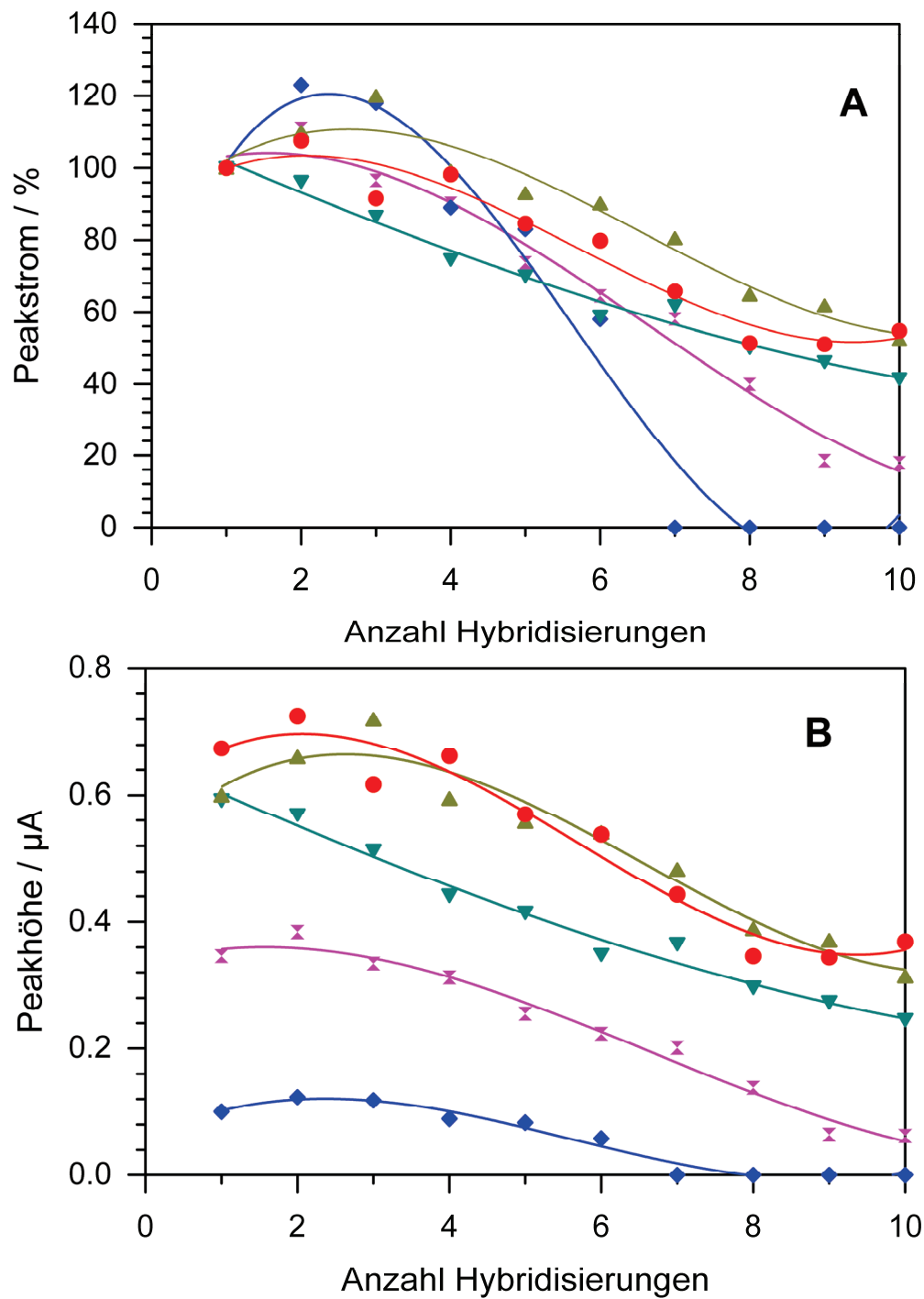


Abb. 5.6: Einfluss der Immobilisierungsmethode auf die Signalstabilität der Sonde mit Monothiol-Linker. (A) prozentualer Verlust, (B) unnormierte Messwerte. Immobilisierung bei 4 °C über Nacht (rot), Koimmobilisierung mit 225 μM (grün), 400 μM (türkis), 900 μM (blau) Mercaptohexanol, zweifache Nachbelegung mit Mercaptoundecan und Mercaptohexanol (violett). Messung nach 4 min Hybridisierung in 160 nM TOs-Target an RDE bei 1000 U/min und Raumtemperatur in 10 mM TRIS-Puffer pH 7,5

Bei der Bestimmung der Signalstabilität zeigte sich, dass bei der 2fachen Nachbelegung die niedrigsten Hybridisierungssignale gemessen wurden. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die anderen Methoden in der Signalthöhe, mit Ausnahme der Koimmobilisierung mit 900 μM Mercaptohexanol, kaum. Ein weiterer Vergleich der einzelnen Stabilitätskurven für die verschiedenen Immobilisierungsmethoden zeigte, dass bei der Koimmobilisierung mit 225 μM Mercaptohexanol bei den ersten 7 Messungen der geringste Signalverlust auftrat. Das Verhältnis Sonde:Nachbelegungssubstanz besitzt bei dieser Koimmobilisierung einen Wert von etwa 1:8. Bei Zugabe von 900 μM Mercaptohexanol verlor die Elektrode allerdings bereits nach der 7. Hybridisierung ihr Signal vollständig. Im Gegensatz zu den anderen Immobilisierungsmethoden wurden bei der 2fachen Nachbelegung mit Mercaptoundecan und Mercaptohexanol sehr kleine Signale gemessen.

Die Ursache dafür besteht darin, dass sich um die Sonde durch den relativ kleinen Linker und eine nicht vorhandene Spacersequenz keine ausreichend große Kavität bilden konnte, die die Hybridisierung von Sonde und Target erleichtert hätte.

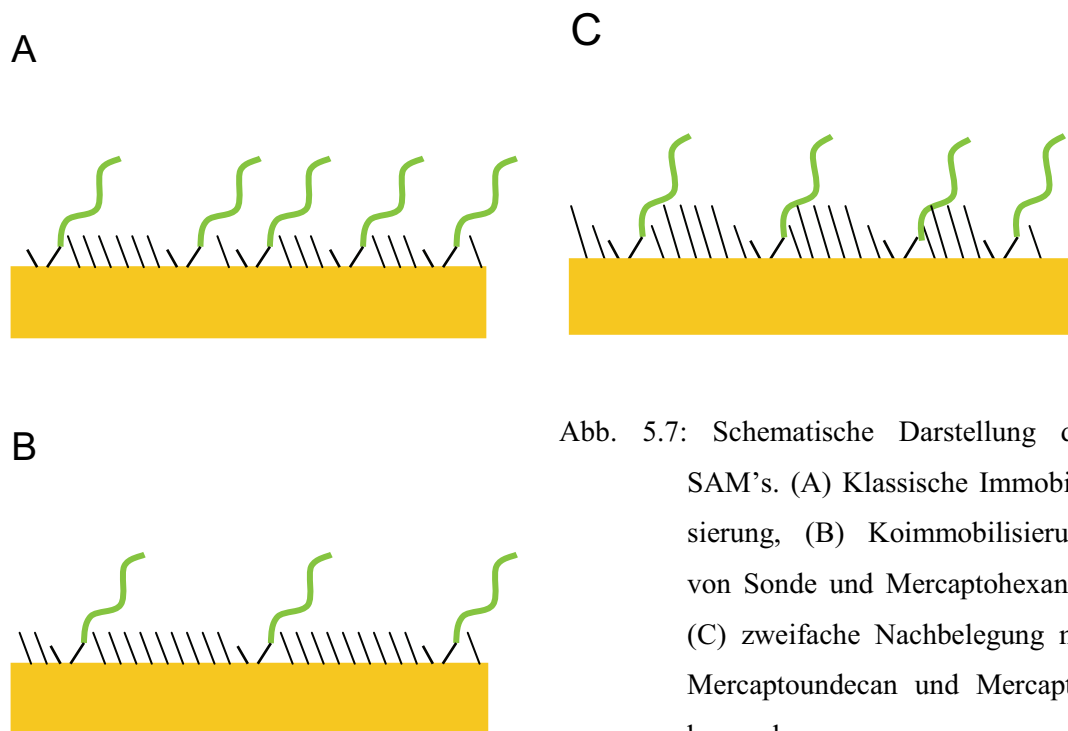


Abb. 5.7: Schematische Darstellung der SAM's. (A) Klassische Immobilisierung, (B) Koimmobilisierung von Sonde und Mercaptohexanol, (C) zweifache Nachbelegung mit Mercaptoundecan und Mercaptohexanol

Bei einem Einsatz einer Sonde mit Spacer würde diese bei der Behandlung in Ethanol einen größeren Raum für das langkettige Mercaptan blockieren. Das hätte

zur Folge, dass die für die Detektion notwendigen Sequenzen nach Fertigstellung der SAM deutlich über der Schicht der Nachbelegungssubstanzen liegen würde. Dadurch würde die Hybridisierung von Sonde und Target sterisch nicht gehemmt.

Eine Eigenschaft der SAM's besteht darin, dass es sich nicht um starre Gebilde sondern um adsorbierte Schichten mit einer gewissen Beweglichkeit handelt. So ist bekannt, dass unvollständige SAM's aus einem Alkanthiol zur Bildung hexagonaler Segmente auf der Immobilisierungsoberfläche neigen¹⁵⁸. Dieses Verhalten in Verbindung mit Qualitätsschwankungen der einzelnen Sondenchargen kann zur Bildung von Alkanthiol- und Sondensegmenten führen. In Kombination mit dem relativ kleinen Monothiol-Linker besteht außerdem die Gefahr, dass die Abstände zwischen den Sonden sehr klein werden. Dadurch können sich die Sonden bei der Hybridisierung gegenseitig blockieren. Bei den Sonden mit Mehrfachlinker wirkt die Kopplungsgruppe, wegen ihrer Größe, als eine Art Abstandshalter und minimiert dadurch das Risiko einer partiellen Überbelegung. Bei den Scheibenelektroden kommt noch hinzu, dass durch das langsame Abkühlen nach der Dehybridisierung oder nach Messungen bei hoher Temperatur die Bildung solcher Alkanthiol- und Sondensegmente zusätzlich gefördert wird. Wogegen bei den heizbaren Elektroden wegen der schnellen Reaktion auf Änderungen im Heizstrom diese Eigenschaft reduziert wird. Der Einfluss von Qualitätsschwankungen der Chemikalien bei der SAM-Präparation wurde von Dr. Adamovski während ihrer Arbeiten über Alkanthiol-SAMs auf Bismutelektroden bestätigt. Bei diesen Arbeiten zeigte sich, dass nicht jeder absolute Alkohol als Lösungsmittel für die zu immobilisierenden Alkanthiole geeignet ist. So waren die Chargen von einigen Herstellern dafür nicht geeignet.

Ein weiteres Problem das vor allem bei Monothiol-Sonden auftritt, ist die Desorption des Thiols bei hohen Temperaturen, hohen Salzkonzentrationen und stark negativen Potentialen von der Oberfläche. Das geschieht bei Potentialen unter -600 mV vs. Ag/AgCl oder hohen Pufferkonzentrationen. Der der Desorption zugrunde liegende Mechanismus wurde 2004 von Munakata et al. beschrieben¹⁵⁹. Dabei wird der am Gold gebundene Schwefel in Anwesenheit von Protonen zu einer Thiol-Gruppe reduziert. Dieses Thiol kann entweder von der Elektrodenoberfläche wegdiffundieren oder bei einem Potential nahe 0 V wieder adsorbiert werden. Wenn die SAM nicht vollständig ausgebildet ist wird der Vorgang zusätzlich begünstigt, da die Protonen besser zu der adsorbierten Thiolgruppe gelangen können. Mit zunehmender Anzahl

der Schwefelatome im Linker erfolgt eine stärkere Readsorption des gebildeten Thiols, da eine simultane Spaltung aller Schwefel-Gold-Bindungen unwahrscheinlich ist.

Das erklärt auch den 5-20%ige Verlust der Oberflächenbelegung der Monothiol-Sonden nach der ersten Dehybridisierung.

5.3 Untersuchte Targetmodifizierungen

Während dieser Arbeit wurden insgesamt 5 Targetmodifizierungen untersucht und miteinander verglichen. Ziel dieser Versuche war es mögliche Alternativen zu dem Ferrocen-Marker zu finden um eine Abhängigkeit von den wenigen Anbietern für solche Marker zu verhindern. Dabei handelte es sich um 2 reversible Markierungen, das Ferrocen und den Thymin-Os-bipyridin-Komplex, der bereits von Palecek beschrieben wurde, und die sehr weit verbreiteten optischen Marker wie Dabcyl, Fluorescein und Texas Red. Von diesen Farbstoffen ist allerdings nur das Dabcyl zur Detektion an Goldelektroden geeignet. Die Potentiale der anderen beiden Marker lagen bereits außerhalb des Potentialfensters für Gold.

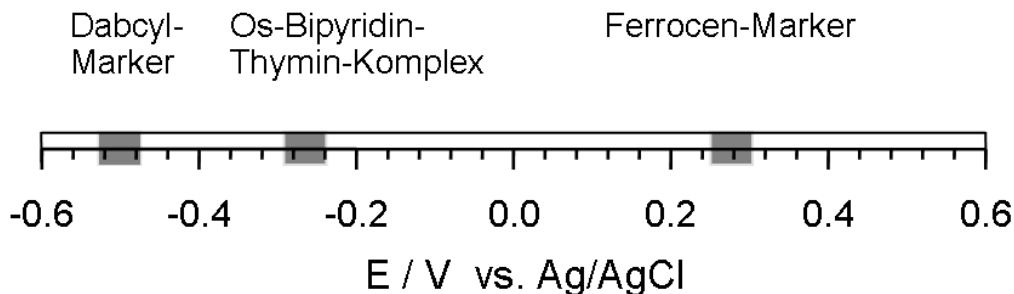


Abb. 5.8: Eingesetzte kovalent gebundene Marker und ihre Redoxpotentiale

In Abb. 5.8 sind die Redoxpotentiale für die einzelnen Marker dargestellt. Der Ferrocen-Marker reagiert als einziger im positiven Potentialbereich bei etwa 0,25 V vs. Ag/AgCl. Die anderen beiden Marker reagieren im Gegensatz dazu im negativen Bereich. Die im Bereich von etwa -0,5 V reagierende Dabcyl-Markierung zeigt ein sehr kleines irreversibles Hybridisierungssignal bei einer Targetkonzentration von 800 μ M. Die Signalhöhe betrug weniger als 25 nA. Die größten Hybridisierungssignale wurden mit der Osmium-Markierung gemessen. Die Signalhöhe lag dabei bei einer Konzentration von weniger als 200 nM im Bereich bis 1,5 μ A. Das Ferrocen lieferte in diesem Konzentrationsbereich deutlich kleiner Detektionssignale, die

allerdings noch im Bereich bis 300 nA lagen. Diese Werte beziehen sich alle auf die Messung mit der Scheibenelektrode bei 1000 U/min und Raumtemperatur.

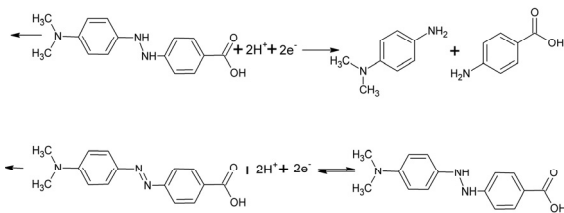
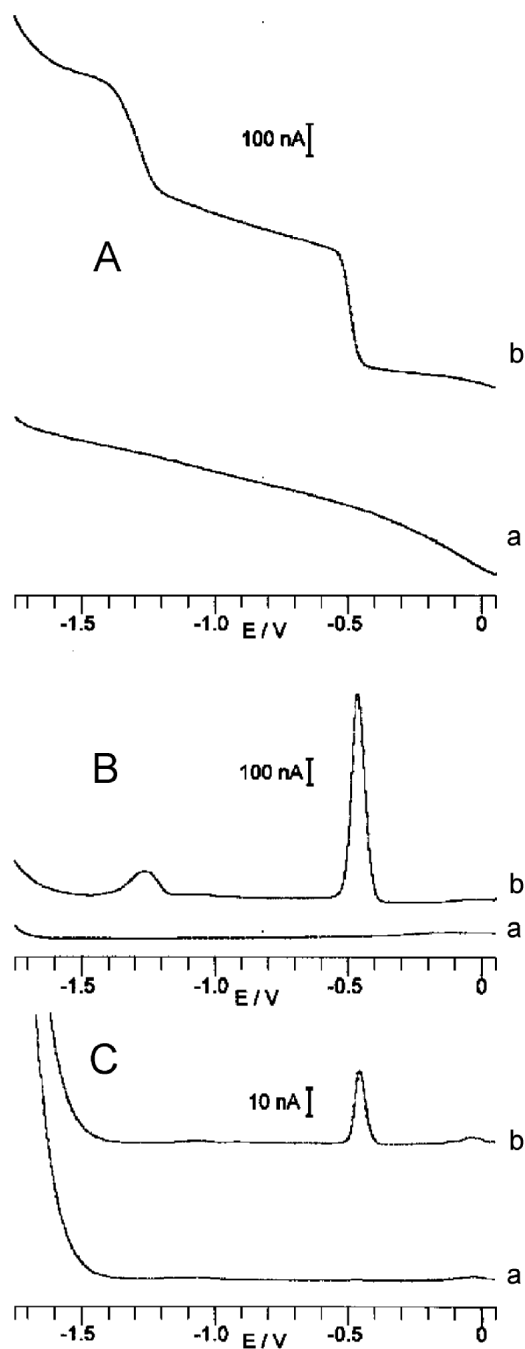
5.3.1 Vorversuche zum elektrochemischen Verhalten von Dabcyl

Im Verlauf dieser Arbeit wurde festgestellt, dass eine Alternative zum ferrocenmarkierten Target notwendig wurde. Bei einer Literaturrecherche über die chemische Detektion verschiedener Farbstoffe konnte festgestellt werden, dass der Einsatz einiger kommerziell erhältlicher optischer Markierungen für die elektrochemische Detektion von Nukleinsäuren durchaus möglich ist^{160,161,162,163,164}. Die Vermutung wurde durch die Bachelorarbeit von Hr. Voss über das elektrochemische Verhalten verschiedener Farbstoffe bestätigt.

Bei den anschließend durchgeführten Vorversuchen bestätigte sich diese Vermutung, wobei allerdings nur das Dabcyl in dem für Gold typischen Potentialfenster lag. Die voltammetrischen Vorversuche erfolgten in 10 mM TRIS-Puffer mit 0,5 M Na₂SO₄ bei pH 7,5 und Raumtemperatur bei einer Konzentration von 1 mM Dabcyl für die Versuche mit der Goldelektrode. Die Versuchsreihe wurde durch polarographische Messungen, die mir freundlicher Weise von Dr. Flechsig zur Verfügung gestellt wurden, ergänzt. Diese erfolgten mit einer Konzentration von 100 µM bei der Tast Polarographie (DCT) und Differential Puls Polarographie (DPP) bzw. 25 nM bei der adsorptiven Stripping Voltammetrie (AdSV). Der Elektrolyt wurde bei allen Vorversuchen 20 min mit Argon gespült. Im Gegensatz zu den voltammetrischen Versuchen erfolgten diese Messungen an Quecksilberelektroden. Als Referenz dienten Kalomелеlektroden und ein Platinstift als Gegenelektrode. Um die Messungen mit den eigenen vergleichen zu können, wurde die Potentialdifferenz zwischen den bei Referenzelektroden ermittelt. Mit Hilfe dieser Differenz konnten die Potentiale, bezogen auf die Ag/AgCl-Referenz berechnet werden.

In Abb. 5.9 sind die polarographischen Messungen und der Reaktionsmechanismus dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass nur an der DME der zweite Reaktionspeak deutlich zu erkennen ist. Bei der adsorptiven Stripping Voltammetrie an der HMDE ist nur ein Peak deutlich ausgebildet. Die Ursache dafür besteht darin, dass der Ausgangsstoff für die Reaktion bei der DME durch die Regeneration der Elektrode ständig nachgeliefert werden kann. An der HMDE ist das nicht der Fall. Bei der adsorptiven Stripping Voltammetrie kann nur der adsorbierte Analyt umgesetzt

werden. Da die zweite Reaktion irreversibel ist, führt das zu einer zusätzlichen Verkleinerung des Signals.



b Abb. 5.9: Charakterisierung von Dabcyl an Quecksilberelektroden bei Raumtemperatur in 10 mM TRIS-Puffer mit 0,5 M Na₂SO₄ bei pH 7,5. (A) Tact Polarographie und (B) Differenz Puls Polarographie an der tropfenden Quecksilberelektrode. (C) adsorptive Stripping Voltammetrie an einer hängenden Quecksilberelektrode. Aufgenommen wurden jeweils der reine Puffer (a) und Puffer mit Dabcyl (b), für A und B je 100 µM bei einer Tropfzeit von 0,5 sec, Scanrate 10mV/sec., für C 25 nM nach 5 min Anreicherungszeit Scanrate 10 mV/sec.

Bei den Versuchen mit den Quecksilberelektroden wurde erkennbar, dass ein Signal bei etwa -470 mV gegen Ag/AgCl zu erwarten war, da bei allen drei Messverfahren in der Nähe dieses Potentials eine Änderung des Messstromes zu beobachten war.

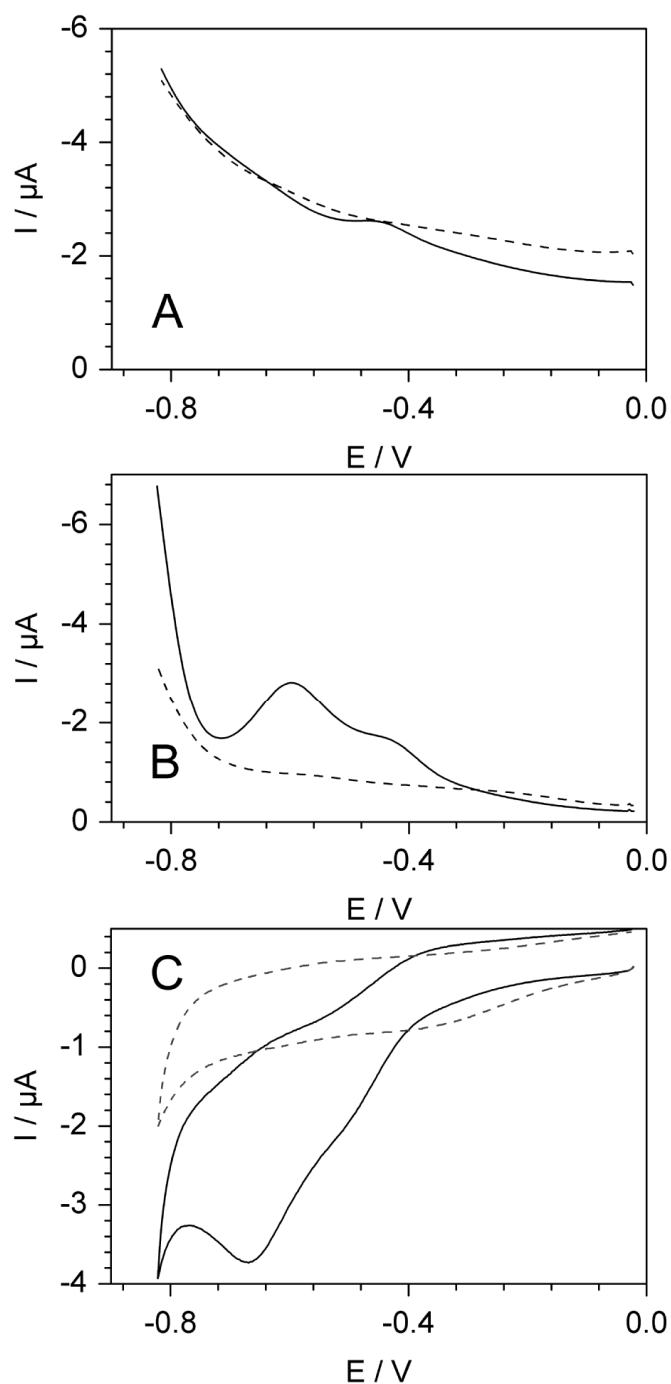


Abb. 5.10: Kurvenverlauf für 100 μM Dabcyl (durchgängige Linie) bei voltammetrischen Messungen an der Goldscheibenelektrode. A Wechselstromvoltammetrie (ACV), B Square-Wave-Voltammetrie (SWV) und C cyclische Voltammetrie (CV) unter denselben Bedingungen wie bei der Polarographie. Gestrichelte Linie ohne Dabcyl.

Wie aus Abb. 5.10 entnommen werden kann, ist das Signal für das Dabcyl bei der ACV am stärksten ausgeprägt, bei der SWV ist der Peak geringer und bei der CV ist

er stark verschwommen. Das zeigt, dass die ACV das am besten geeignete Verfahren für die Detektion von dabcyclmarkierten Targets ist.

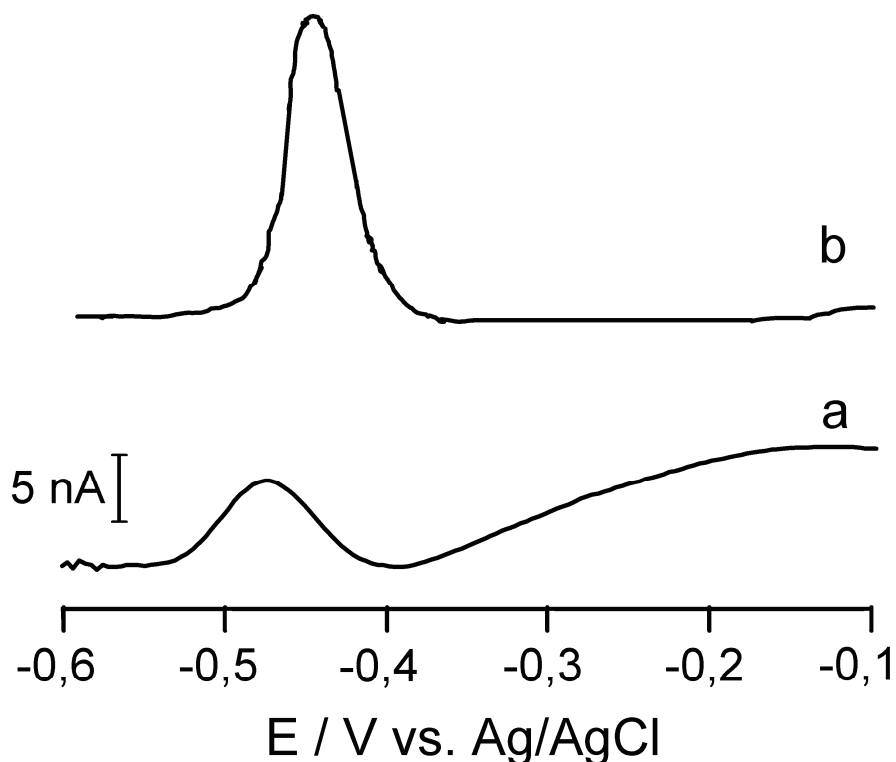


Abb. 5.11: Vergleich des Hybridisierungspicks von 0,8 μM dabcyclmarkierten Target an einer sondenmodifizierten Goldscheibenelektrode (a) und des AdSV-Peaks von reinen Dabcycl an einer HMDE (b) in TRIS-Puffer bei Raumtemperatur.

Abb. 5.11 zeigt, dass sich der Hybridisierungspick vom dabcyclmarkierten Target an der mit Sonde modifizierten Goldelektrode und der AdSV-Peak des reinen Dabcyls an einer hängenden Quecksilberelektrode in ihrem Potentialmaximum nur geringfügig unterscheiden.

Durch den Vergleich der Graphen von der adsorptiven Stripping Voltammetrie und den polarographischen Versuchen mit der tropfenden Quecksilberelektrode ist erkennbar, dass das adsorbierte Dabcycl im Gegensatz zu dem gelösten scheinbar irreversibel reagiert. Als Ursache dafür ist der zweite irreversible Reaktionsschritt bei der elektrochemischen Reaktion von Dabcycl anzusehen¹⁶⁵. Dieser Reaktionsschritt spaltet die Hydrazinbindung der zuvor gebildeten Hydrazoverbindung sehr schnell. Dadurch wird die Rückreaktion des an der Oberfläche adsorbierten Reaktionsproduktes zur Ausgangssubstanz verhindert. Da die Elektrodenoberfläche von mit DNA-Sonden modifizierten Elektroden bei dem Hybridisierungsnachweis von

Dabcyl-markierten DNA-Fragmenten nur ein einziges Mal mit dieser Markierung belegt wird, steht der Marker nur einmal für die irreversible Reaktion zur Verfügung. Dadurch sind nur sehr geringe Hybridisierungssignale zu erwarten.

Nach Angaben von Florence wird das elektrochemische Verhalten von Azo-Verbindungen, wie z. B. Dabcyl oder Methylorange, unter anderem von den jeweiligen Substituenten an den Benzolringen des Moleküls bestimmt¹⁶⁰, wodurch bei komplexeren Azofarbstoffen, wie den sogenannten black hole Quenchern (BHQ1-3), ein anderes Reaktionsverhalten nicht auszuschließen ist.

5.3.2 Weitere untersuchte Farbstoffe

Neben dem Dabcyl wurden außerdem noch voltammetrische Versuche mit Fluorescein und dem in der Molekularbiologie als Texas Red bezeichneten Sulforhodamin 101 durchgeführt (Abb. 5.12). Da für diese Farbstoffe bereits elektrochemische Nachweismethoden beschrieben wurden, lag hier ebenfalls die Vermutung der Einsatzmöglichkeit dieser Substanzen als redoxaktive Targetmarkierung nahe.

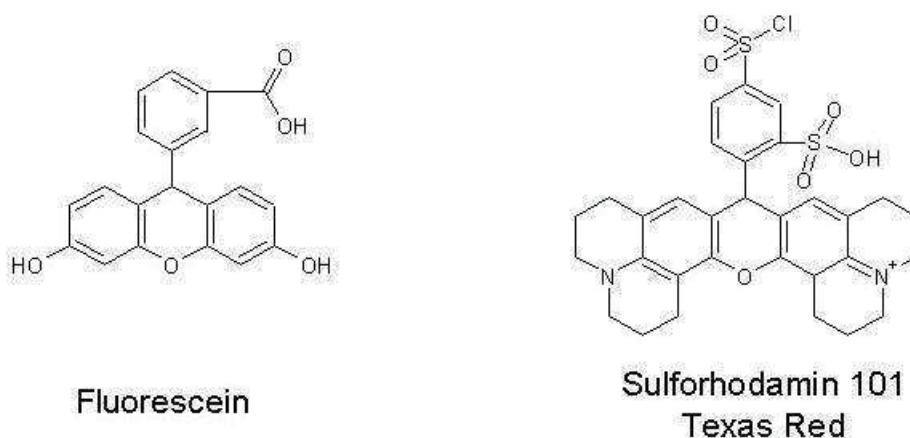


Abb. 5.12: Strukturen der beiden Farbstoffe

Bei beiden Fluoreszenzfarbstoffen konnte an der reinen Goldelektrode mittels ACV und CV bei sehr niedrigen Potentialen ein Signal ermittelt werden. Allerdings befanden sich diese Potentiale in einem Bereich von über -650 mV. In diesem Potentialbereich kommt es zur Desorption der für die DNA-Hybridisierung notwendigen SAM. Der sich daraus ergebende Anstieg überlagert das Messsignal und erschwert dadurch die Messung zusätzlich. (Abb. 5.13).

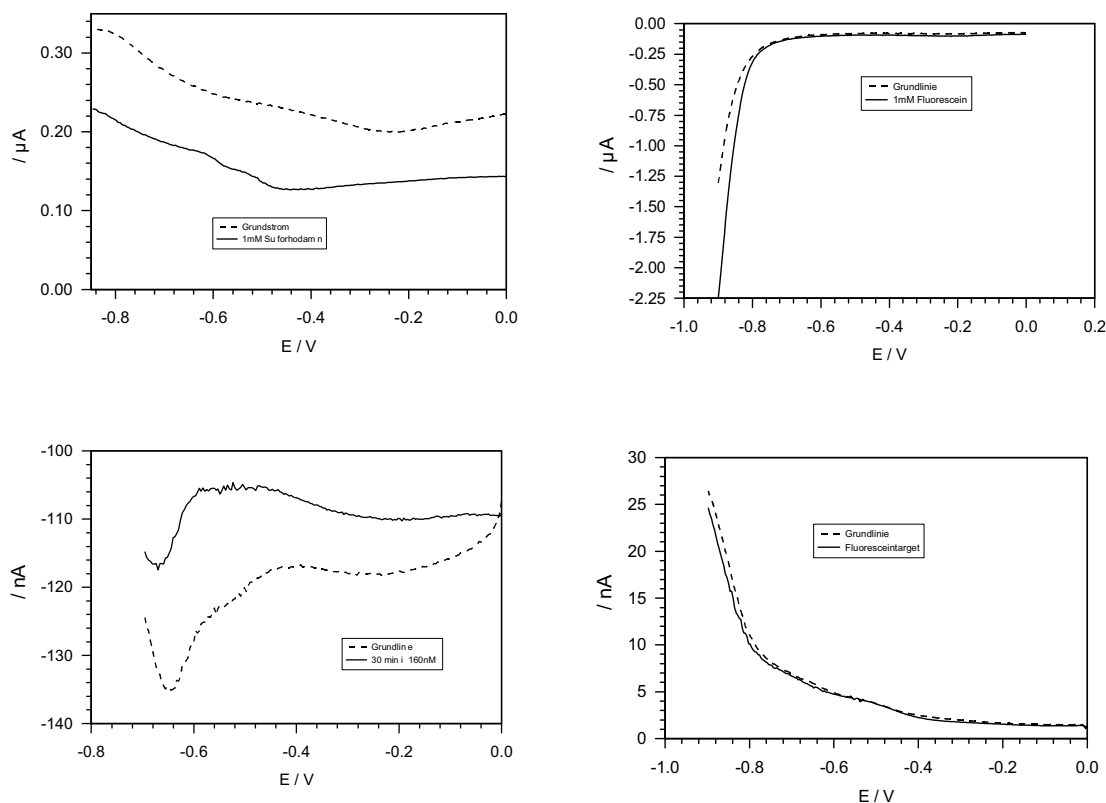


Abb. 5.13: ACV-Diagramme für 1 mM Sulforhodamin (oben links) und 1mM Fluorescein (oben rechts). Darunter die Diagramme für die markierten Targets. Sulforhodamin-Markierung links und Fluorescein-Markierung rechts. Messpuffer 10 mM TRIS mit 0,5 M Na_2SO_4 pH 7,5. Hybridisierung je 30min in 160 nM Target bei Raumtemperatur und 1000 U/min.

Aufgrund dieser Tatsache und der hohen Kosten für diese Targets wurden die Versuche vorläufig eingestellt.

5.3.3 Herkömmliche elektrochemisch aktive Marker

5.3.3.1 Ferrocen-Marker

Ein weit verbreiteter Redoxmarker ist das Ferrocen, dessen Reaktionsmechanismus gut untersucht ist. Dieser Marker und andere Metallocene kamen im letzten Jahrzehnt sowohl als Intercallatoren^{44,166} als auch als kovalent gebundene Variante an Nukleinsäuren^{132,167} und verschiedenen SAM's¹⁶⁸ zum Einsatz.

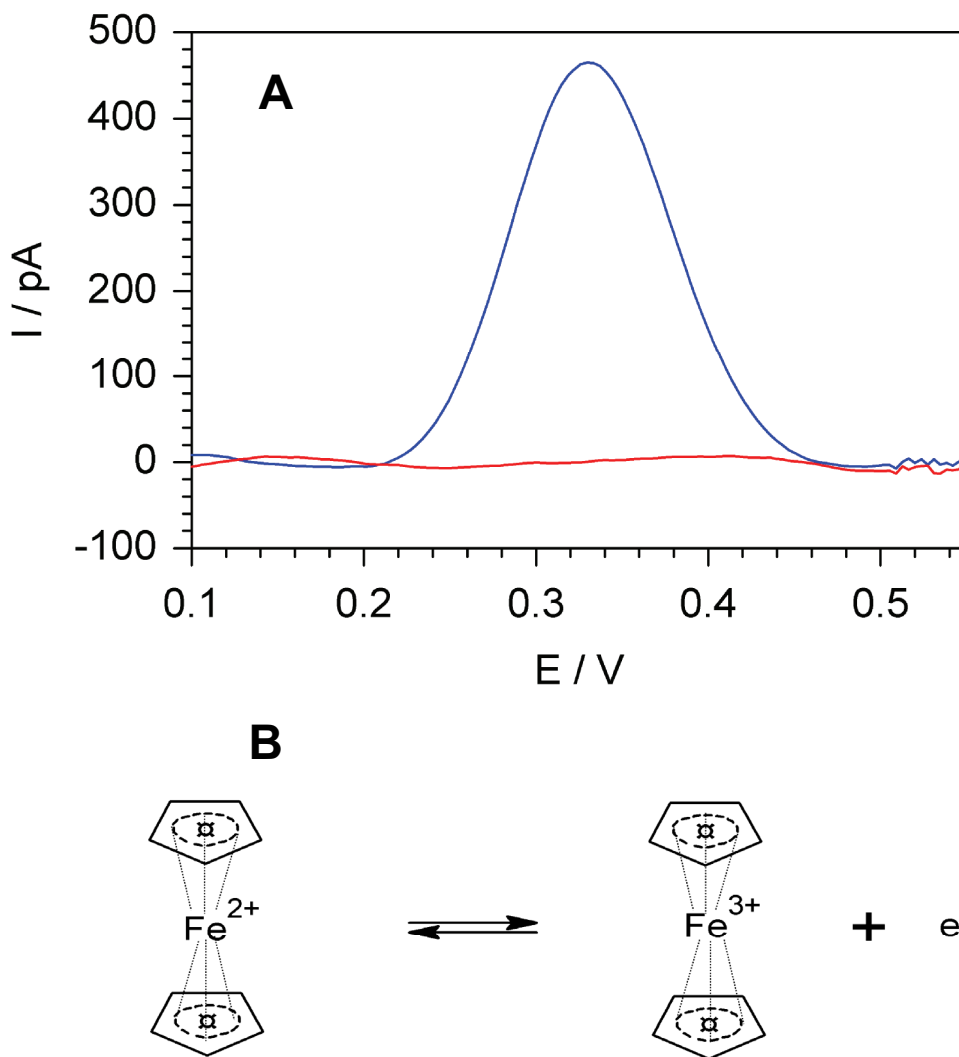


Abb. 5.14: ACV-Peak von 80 nM Ferrocen-Target nach 4 min Hybridisierung in 0,5 M PB pH 7,0(A) an einer Drahtelektrode bei 23 °C und der Reaktionsmechanismus von Ferrocen(B). In A Grundlinie rot, Hybridisierungsspeak blau.

Wie aus Abb. 5.14 erkennbar ist, handelt es sich bei Ferrocen um einen Sandwich-Komplex, der unter Elektronenabgabe zu dem 3wertigen Ferrocen oxidiert wird.

Das Signal dieser einfachen Markierung war für die SWV-Messung zu klein, lag aber bei der ACV-Messung nach 4 min Hybridisierung in 80 nM Target bei Raumtemperatur an der rotierenden Scheibe bei 1000 U/min immer noch im Bereich von 100-300 nA. Das bedeutet, dass bei einem Zehntel der Dabcykonzentration das Hybridisierungssignal um das 5-15fache höher ist. Allerdings neigte dieses Target bei den Wiederholungsmessungen nach einer Hybridisierung zu einem stärkeren Signalverlust. Die Ursache dafür besteht darin, dass der während der Messung gebildete Fe^{3+} -Komplex relativ schnell zerfällt. Dieses Problem kann umgangen werden, wenn die Messung mit einer sehr schnellen cyclischen Voltammetrie

durchgeführt oder das Potential unmittelbar nach der Messung zurückgesetzt wird. Bei Einsatz dieser Methoden wird die Rückreaktion beschleunigt und dadurch der Redoxindikator weniger gestresst.

5.3.3.2 Osmium-markierte Targets

Im Verlauf dieser Arbeit zeigte sich die Notwendigkeit, nach Alternativen zu den ursprünglich verwendeten Targets, welche mit Ferrocen markiert waren, zu suchen. Neben dem in Kapitel 5.3.1 beschriebenen und untersuchten Dabcyl, einem Azofarbstoff, erwies sich in unserer Arbeitsgruppe die von Palecek^{56,150,169} et al. in den 80er Jahren entwickelte Markierung von DNA mit tertiären Amin-Komplexen des Osmiumtetroxids als eine sehr gute Alternative.

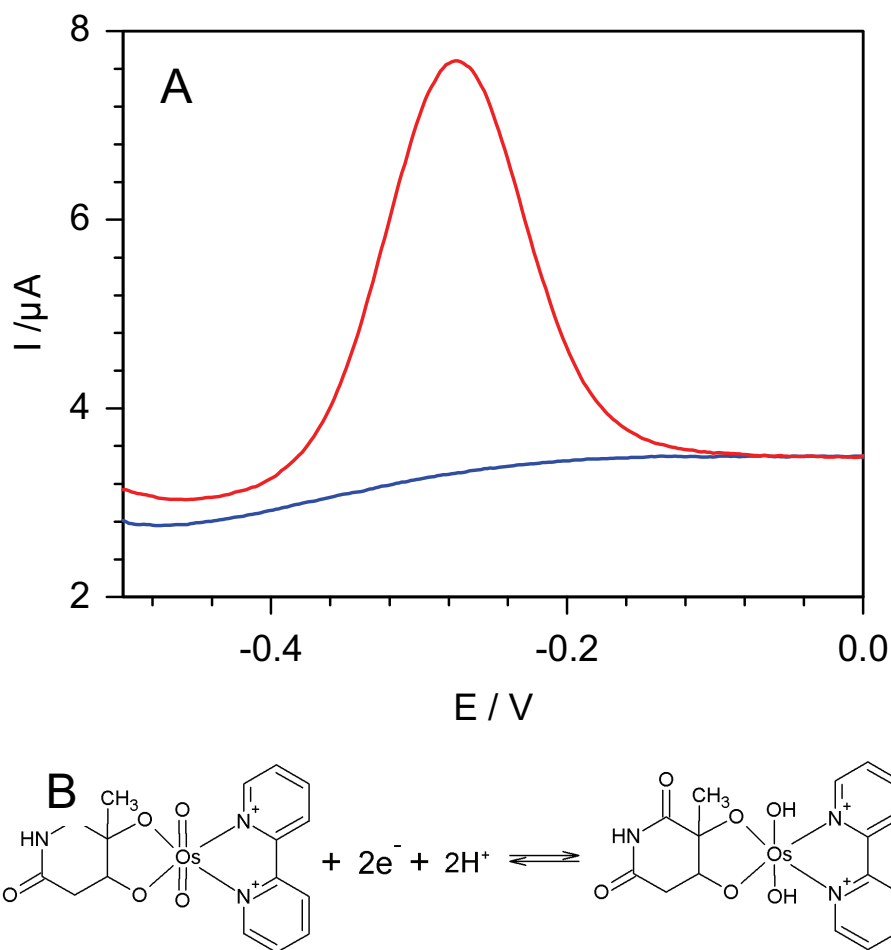


Abb. 5.15: SWV-Hybridisierungsspeak von 160 nM osmiummarkierten Target an einer rotierenden Scheibenelektrode in 10 mM Tris-Puffer pH 7,5 (A) und Reaktionsmechanismus des Os-Komplexes (B)

Diese hatte auch den Vorteil, dass die Darstellung dieser Markierung sehr einfach ist. Dadurch wurde außerdem die Abhängigkeit unserer Arbeitsgruppe von der ohnehin geringen Anzahl der Anbieter redoxaktiv markierter Targets verringert.

Bei der hier verwendeten Osmium-Markierung konnte wegen der mehrfachen Ausbildung des redoxaktiven Komplexes an den Thymidin-Resten der DNA ein besonders großes Signal beobachtet werden. Fojta et al. beobachteten bei einer adsorptiven Stripping Voltammetrie mit Os-markierten Targets an Elektroden aus pyrolytischen Graphit vergleichbare Signale⁵⁷. Allerdings erfolgte die Detektion nach einer Aufreinigung des Targets mit magnetischen Nanobeads und anschließender Dehybridisierung an unmodifizierten Elektroden. Nachteilig bei der Darstellung dieser Markierung ist die hohe Toxizität des Osmium(VIII)-Oxids, wobei die in unserem Labormaßstab eingesetzten geringen Mengen die Grenzwerte nicht überschreiten werden. Der Grenzwert, der sogenannter MAK-Wertes, von 2 mg/m³ am Tag wurde nicht erreicht. Das lag daran, dass die Arbeiten einerseits unter einem Abzug erfolgten und die stark verdünnten Lösungen andererseits in sehr geringen Mengen eingesetzt wurden.

Während des Einsatzes dieser Markierung wurde festgestellt, dass eine Qualitätskontrolle und verbesserte Reinigung des modifizierten Targets noch ausgearbeitet und eingeführt werden muss. Dadurch wäre auch der Erhalt vergleichbarer Targetchargen gewährleistet.

Der Einfluss von Sekundärstrukturen, das heißt der Ausbildung von intramolekularen Doppelsträngen, ist bei den hier verwendeten kurzen Oligomeren mit 25 Basen vernachlässigbar. Das zu modifizierende Thymidin-Pentamer besitzt eine endständige Lage, die weder durch das Target oder den Schutzstrang blockiert werden kann

5.3.4 Vergleich der Marker

Marker	Detektionsbereich
Dabcyl	$> 10^{-7} \text{ M}$
Fluoreszin	-
Texas Red	-
Ferrocen	$> 10^{-9} \text{ M}$
[OsO ₄ (bipy)]-Komplex	$> 10^{-9} \text{ M}$

Tab. 5.1.: Verwendete Marker und Detektionsbereich

Wie aus Tab. 5.1 zu erkennen ist, eignet sich von den optischen Markern das Dabcyl zur Detektion der Hybridisierung von Nukleinsäuren. Allerdings liegt der Detektionsbereich weit über dem der Ferrocen- und Osmium-markierten Targets. Die Ursache dafür liegt in dem irreversiblen Reaktionscharakter der Dabcyl-Markierung.

5.4 Einfluss der Reaktionsparameter auf das Hybridisierungssignal

In diesem Kapitel soll der Einfluss der Reaktionsparameter an der Scheibenelektrode beschrieben werden. Grundlage dafür bilden die nur mit dieser Elektrode durchgeführten Versuche.

5.4.1 Konvektion an der Elektrodenoberfläche

Um die für unsere Versuchsanordnung mit der rotierenden Scheibenelektrode optimale Drehzahl zu bestimmen, wurde das Hybridisierungssignal nach 4 min bei verschiedenen Drehzahlen ermittelt. Durch die Rotation der Scheibenelektrode wird eine drehzahlabhängige Konvektion der Probenlösung an der Elektrodenoberfläche verursacht. Dadurch ist es möglich mit dieser Versuchsreihe auch eine Aussage über den Einfluss der Konvektion während der Hybridisierung auf das Signal zu treffen.

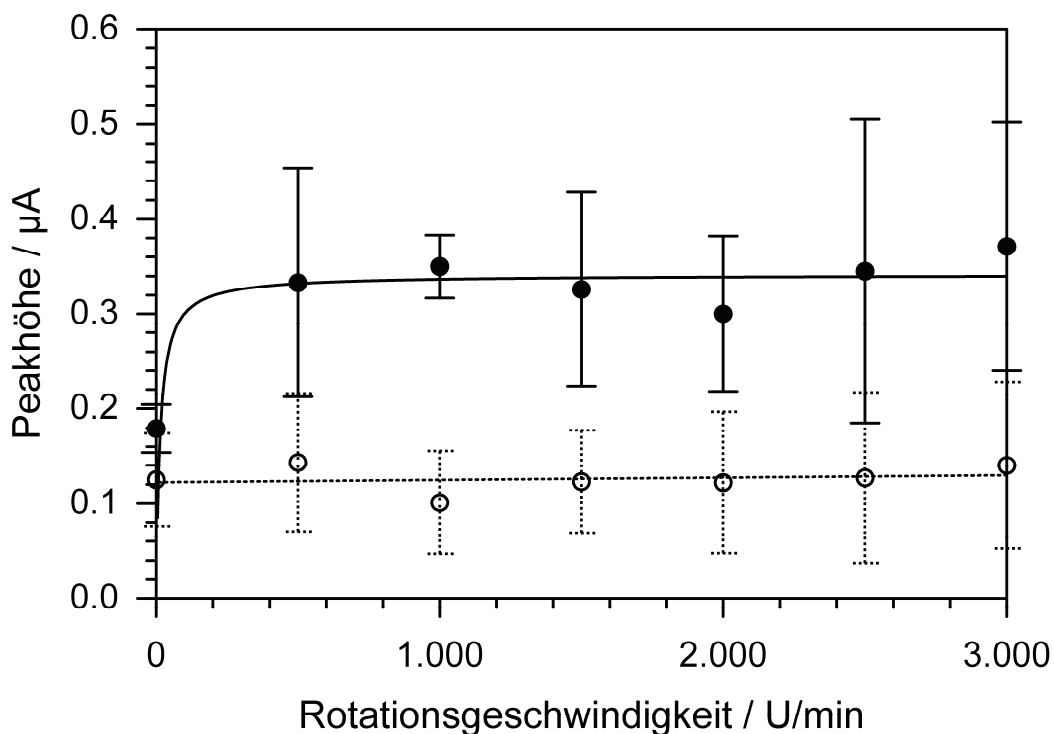


Abb. 5.16: Einfluß der Drehzahl auf das Hybridisierungssignal bei 7(leer) und 23°C(voll) in 10 mM TRIS

Wie aus der Abb. 5.16 zu erkennen ist, konnte bei Raumtemperatur im Bereich von 0-500 U/min ein sehr starker Anstieg des Signals nachgewiesen werden, dieser flachte bis 1000 U/min stark ab und ging mit zunehmender Drehzahl in ein Plateau über.

Dieses Verhalten bei der voltammetrischen Analyse kleinerer Analyten als Nukleinsäuren ist bereits seit den 60er Jahren bekannt. So beobachteten bereits 1962 Azim und Riddiford bei Versuchen mit einer Elektrode ähnlichen Typs mit Kaliumhexacyanoferrat im Bereich von 0 bis 559 U/min eine Sättigung des Reduktionssignals¹⁷⁰. Spätere Messungen mit anderen einfachen Ionen und niedermolekularen organischen Verbindungen bestätigten einen Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit auf das Messsignal. Der Einsatz dieser Technik bei der Detektion von Nukleinsäuren wurde bisher noch nicht untersucht. Lediglich Vanderhoeven et al. unternahmen 2005 einen ähnlichen Versuch mit einer drehbar gelagerten Hybridisierungskammer, allerdings nur in einem Drehzahlbereich von weniger als 150 U/min bei dem die Sättigung noch nicht erreicht wurde¹⁷¹.

Die Tatsache, dass es im Drehzahlbereich ab 1000 U/min zur Ausbildung eines Plateaus kommt, beweist, dass für das Signal nicht die Anströmgeschwindigkeit zur

Elektrodenoberfläche sondern die Diffusion zur und auf der Elektrodenoberfläche ausschlaggebend ist.

Durch eine zusätzliche Bestimmung der Signalabhängigkeit von der Drehzahl bei 7 °C konnte auch die Abhängigkeit von der Reaktionskinetik bestimmt werden. Bei den Messreihen in der Kälte wurden nur sehr geringe Signaländerungen bei geringer Höhe beobachtet.

5.4.2 Dauer der Hybridisierung

Ein weiterer Parameter, der untersucht wurde, ist die Hybridisierungszeit. In der folgenden Abbildung sind die bei der Messung bei 23 °C und einer Konzentration von 800 nM Dabcyl-markierten Targets erhaltenen Werte dargestellt.

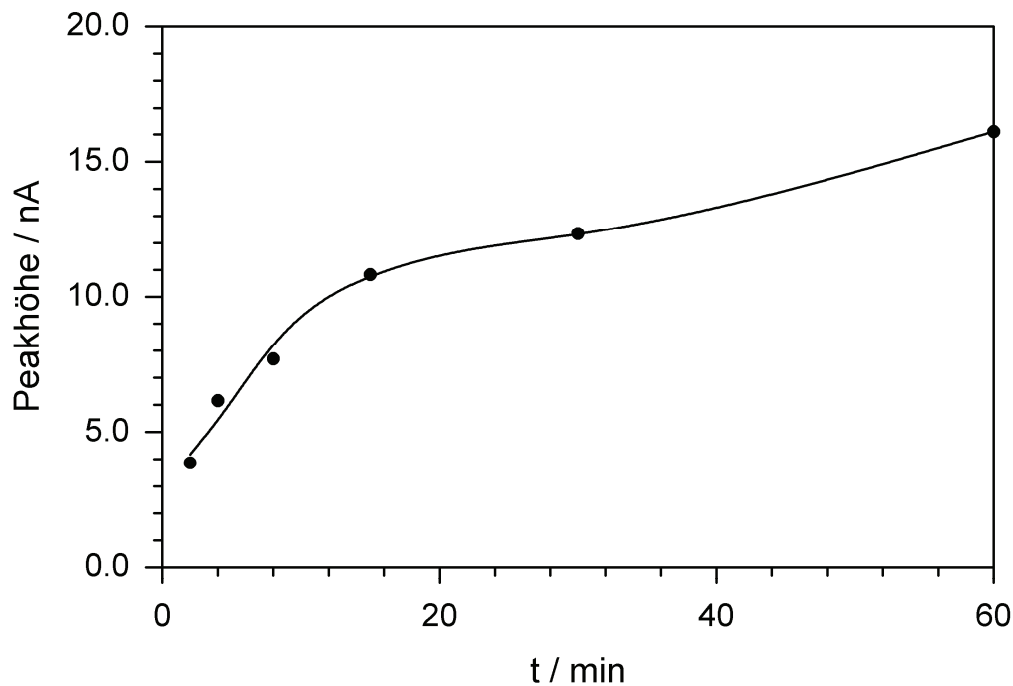


Abb. 5.17 : Zeiteinfluss auf das Hybridisierungssignal des Targets Dabcyl an einer Scheibenelektrode bei 1000 U/min und Raumtemperatur in 800 nM Target-Lösung

Wie zu erkennen ist, liegt der lineare Bereich der Hybridisierungszeit-Signal-Kurve unter 10 min, von 10-15 min erfolgt eine leichte Abflachung. Mit zunehmender Hybridisierungsdauer nimmt der Anstieg weiter ab. Die beschriebene Abflachung ist ebenfalls auf eine nach über 10 min einsetzende Sättigung der Sonden mit Targets zurückzuführen, die nach ca. 15 min zum größten Teil abgeschlossen ist.

In einem zweiten Versuch wurden mit einer Tetrathiol-modifizierten Sonde und 80 nM Ferrocen-markierten Target der Einfluss der Hybrisierungszeit bei der Scheibenelektrode bei 0 U/min und bei 2000 U/min bei 4 und 22 °C untersucht.

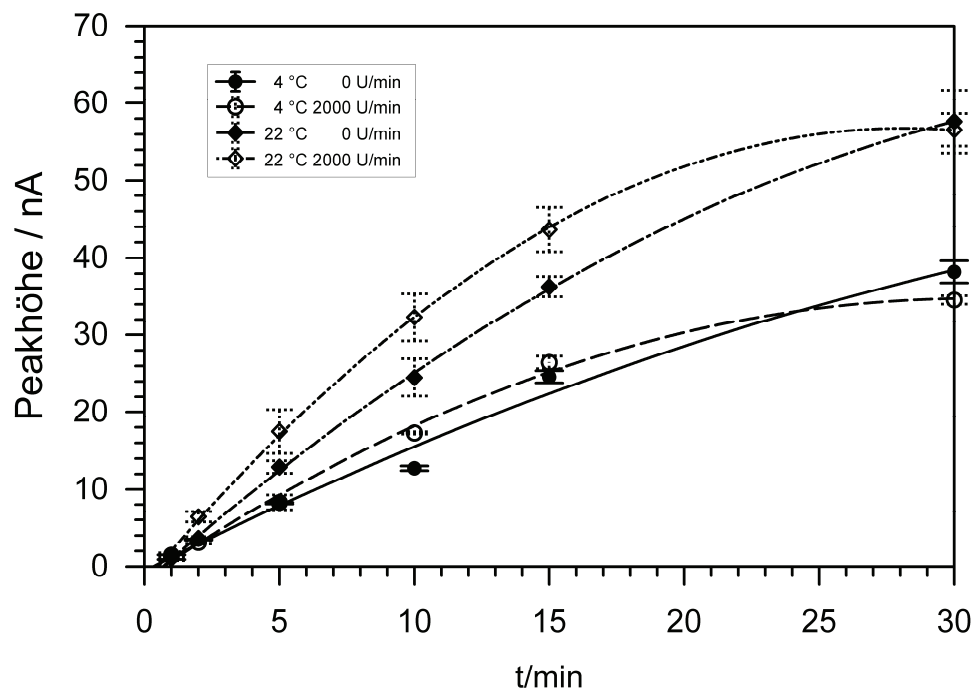


Abb. 5.18: Einfluss der Hybridisierungszeit bei 0 und 2000 U/min bei 4°C und Raumtemperatur an einer Scheibenelektrode mit Tetrathiol-Sonde und 80 nM Fc-Target in 0,5 M Na₂SO₄-Lösung mit jeweils einer SAM pro Temperatur.

Dabei zeigt sich bei den Scheibenelektroden bei 2000 U/min nach 30 min bereits bei 4 °C als auch bei 22 °C eine beginnende Sättigung, während bei der Effekt bei 0 U/min kaum ausgeprägt ist. Ebenfalls zu erkennen ist, dass die Signalhöhe bei Raumtemperatur und 2000 U/min bei einer Hybridisierungszeit unter 15 min etwa doppelt so hoch ist wie bei 4 °C, danach ändert sich die Differenz nur noch geringfügig. Dieser Versuch bestätigt dadurch auch die unter 5.4.1. erhaltenen Ergebnisse mit einem anderen Sonden/Target-System. Dadurch wird auch gezeigt, dass die durch Temperatur, Drehzahl und Zeit verursachten Veränderungen in der Höhe des Hybridisierungssignals unabhängig von der Markierung bzw. der für die Immobilisierung notwendigen aktiven Gruppe sind.

5.4.3 Temperatur während der Hybridisierung

Der Einfluss der Hybridisierungstemperatur ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

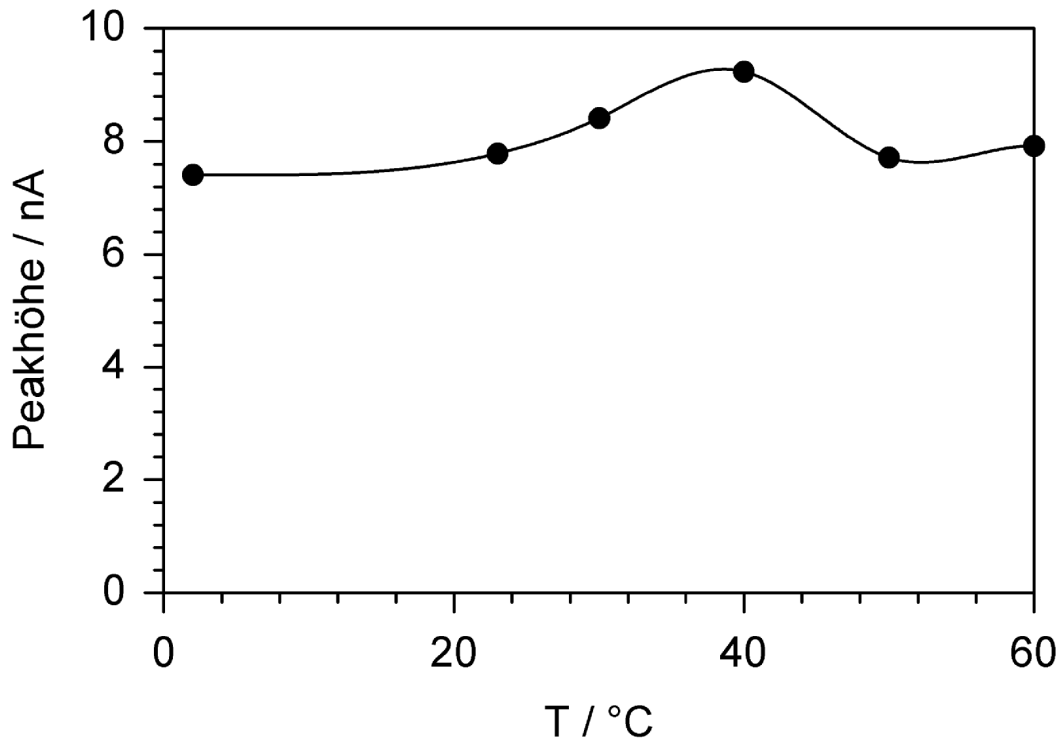


Abb. 5.19: Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf das Hybridisierungssignal von 800 nM Target-Dabcyl nach 8 min und 1000 U/min in 10 mM Tris pH 7,5

Die Messungen erfolgten nach einer 8 min langen Hybridisierung in einem temperierten Becherglas mit 3 ml 800 nM dabcylmarkierter Targetlösung unter Rühren. Dabei konnte nur eine geringe Erhöhung des Signals im Bereich von 23 bis 40 °C beobachtet werden, danach erfolgte ein Abfallen des Signals bis auf den Ausgangswert der Messung. Die Erhöhung des Hybridisierungssignals bis zu einem Optimum der Hybridisierungstemperatur wurde auch von Fojta et al.¹⁷² und von Flechsig et al.¹⁵¹ mit Osmium-markierten Targets beobachtet. Das Temperatur optimum für die Hybridisierung lag bei der Arbeitsgruppe Fojta bei etwa 27 °C. Die Abweichung lässt sich dadurch erklären, dass dafür eine andere Sequenz verwendet wurde. Flechsig hingegen konnte das Temperaturoptimum mit diesem Target an der Scheibenelektrode bestätigen. Die geringe Signalerhöhung lässt sich durch die irreversible Reaktion der Markierung und die durch die hohe Konzentration des

Targets hervorgerufene teilweise Sättigung erklären. Da die Elektrodenoberfläche mit den immobilisierten Sonden ein zweidimensionales System darstellt, kann die Zunahme des Hybridisierungssignals bis zum Temperaturoptimum durch eine von der zugeführten Wärme verursachte verstärkte Diffusion der Nukleinsäuren, vor allem des Targets, auf der Oberfläche erklärt werden. Durch das ab etwa 40 °C beginnende Aufschmelzen und dem damit verbundene Auseinanderdiffundieren der bereits gebildeten Sonde/Target-Duplexe kommt es zu einem mit zunehmender Temperatur stärkeren Signalverlust. Im Gegensatz dazu zeigt sich das Aufschmelzen der DNA in den Schmelzkurven durch einen Anstieg der Absorption ab 40 °C (s. Abb. 5.2).

5.4.4 Konzentration des Targets

In Abb. 5.20 ist der Einfluss der Konzentration auf das Hybridisierungssignal nach 15 min bei Raumtemperatur zu sehen.

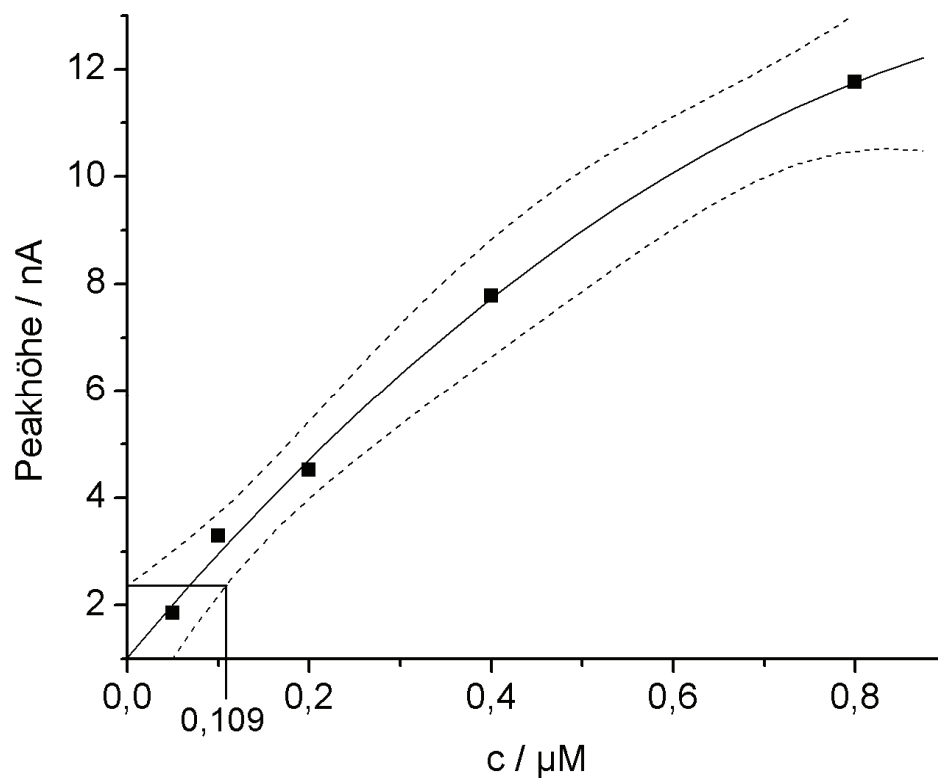


Abb. 5.20: Kalibrierkurve für das Target DabcyI. Messung nach 8 min bei 1000 U/min bei Raumtemperatur

Die Kalibrierung erfolgte dabei im Bereich von 50 bis 800 nM Target Dabcyl. Die Konzentration ist im Vergleich zu den Ferrocen- und Osmium-Markierungen sehr hoch. Wie zu erkennen ist, erstreckt sich der lineare Bereich von 50 bis etwa 400 nM, danach kommt es zu einer geringfügigen Abflachung des Signalanstieges. Die Abflachung ist auf eine fortschreitende Sättigung an der Elektrodenoberfläche während der Hybridisierung zurückzuführen. Die Nachweisgrenze für dieses System wurde mit 109 nM graphisch ermittelt.

Bei anderen Systemen, wie z. B. Ferrocen- und Os-Markierungen, ist das Abflachen der Signal-Konzentrationskurve bei geringeren Konzentrationen und kürzeren Hybridisierungszeiten stärker ausgeprägt¹⁵¹.

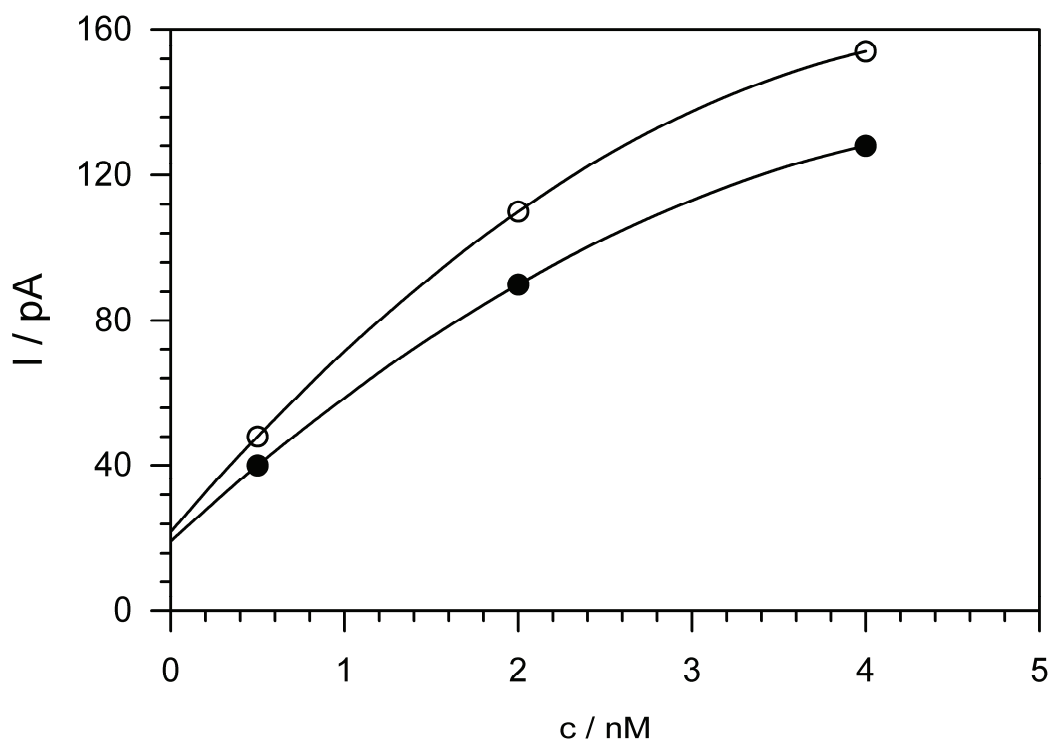


Abb. 5.21: Abhängigkeit des Hybridisierungssignals von der Konzentration des Ferrocen-Targets bei 2 verschiedenen SAMs an einer Drahtelektrode mit Monothiol-Sonde nach 8 min Hybridisierung bei 45 °C in 0,5 M PB bei pH 7,0

In Abb. 5.21 ist die Abhängigkeit des Hybridisierungssignals von der Konzentration des Fc-Targets an einer Drahtelektrode dargestellt. Wie zu erkennen ist, konnte bereits bei einer Konzentration von 0,5 nM ein Signal von etwa 40 pA gemessen werden, wobei das Hintergrundrauschen weniger als ein Drittel des Gesamtpeaks betrug. Da eine exaktere Auswertung bei den wenigen Messwerten dieser Ver-

suchsreihe nicht möglich war, wird in diesem Fall anstelle der Nachweisgrenze der kleinstmögliche auswertbare Messwert von 0,5 nM angegeben.

5.5 Vergleich der Elektrodentypen

In der hier vorliegenden Arbeit wurden 3 verschiedene Elektrodentypen verglichen, die sich im Aufbau und der Handhabung unterscheiden. Dabei handelte es sich um die von Metrohm erhältliche Scheibenelektrode, die durch das in ihrer Rückseite eingearbeitete Gewinde wahlweise auf einen einfachen oder mit einem Motor kombinierten Elektrodenhalter montiert werden kann, die durch eine in eine Keramikschicht eingelassene Heizung indirekt heizbare LTCC-Elektrode und die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte mit Wechselstrom direkt heizbare Drahtelektrode. Als Elektrodenmaterial diente bei allen 3 verwendeten Typen Gold.

Ziel des Vergleichs war es, den Einfluss von Elektrodenheizung und Konstruktion auf Stabilität der SAM, die Selektivität des Sensors und das Hybridisierungsverhalten der Sonden an der Elektrodenoberfläche zu untersuchen.

5.5.1 Empfindlichkeit

In dem folgenden Abschnitt werden die einzelnen Elektrodentypen in Bezug auf das Hybridisierungssignal miteinander verglichen. Zu diesem Zweck wurden die Stromdichten nach von der Draht- und Scheibenelektrode nach 4 min Hybridisierung in 80 nM Ferrocen-markierten Target bei Raumtemperatur in 0,5 M PB pH 7,0 und die der Scheiben- und LTCC-Elektrode nach 8 min Hybridisierung mit 160 nM Osmium-markierten Target in 10 mM TRIS-Puffer mit 0,5 M Na₂SO₄ pH 7,5 miteinander verglichen.

Wie aus Abb. 5.22A zu erkennen ist, besitzt die Scheibenelektrode bezogen auf die grafische Oberfläche die höchste Stromdichte, dieser Wert ist etwa 6-7mal höher als der Wert der Drahtelektrode unter vergleichbaren Bedingungen. In dem Teil B sind die Stromdichten von LTCC- und Scheibenelektrode dargestellt, dabei ist zu erkennen, dass die Stromdichte, bezogen auf die graphische Oberfläche der Scheibenelektrode etwa doppelt so hoch ist wie die der LTCC-Elektrode.

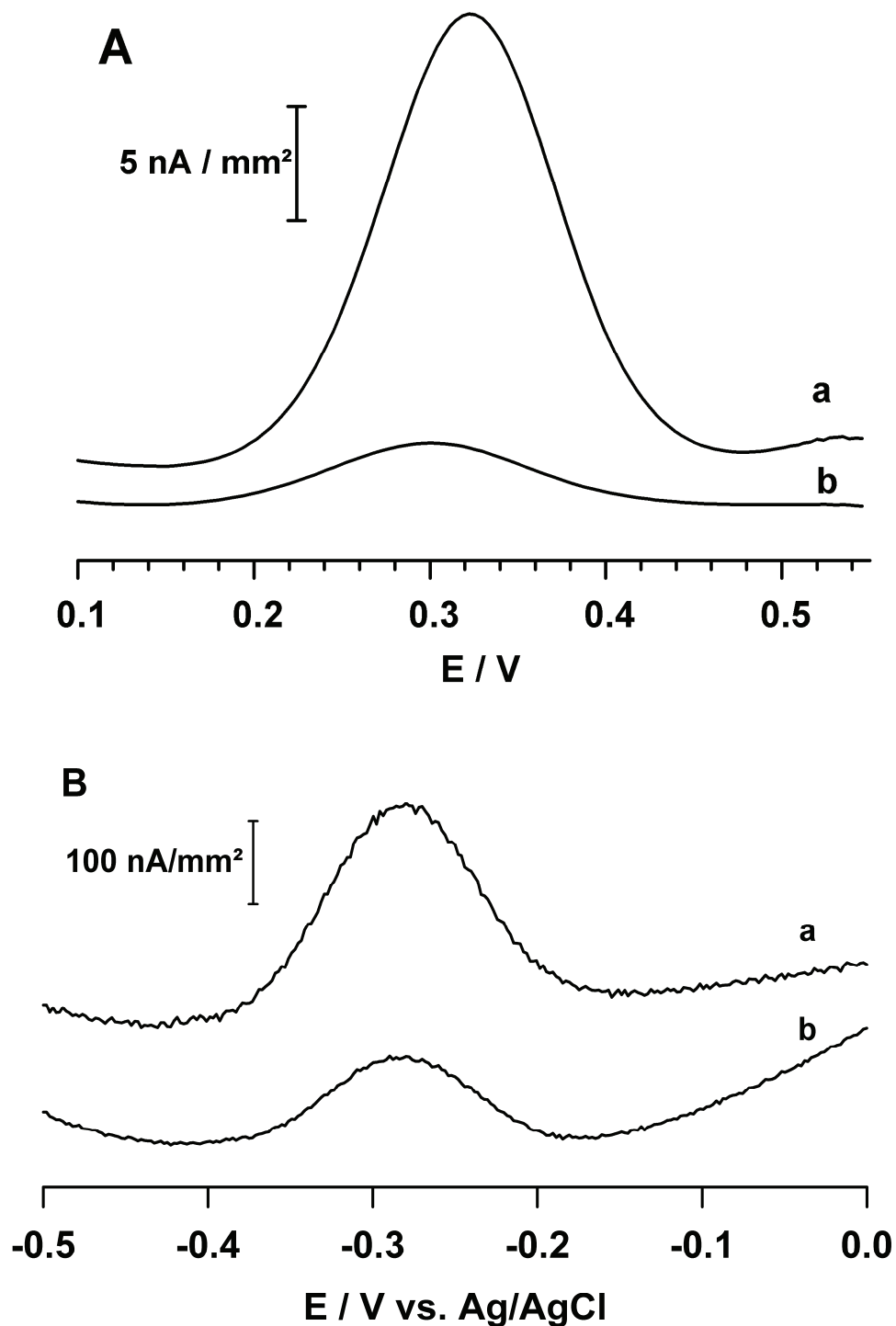


Abb. 5.22: Vergleich der Stromdichten, bezogen auf die graphischen Oberflächen, an nicht heizbaren(a) und heizbaren Elektroden(b) bei 24 °C. (A) RDE und Drahtelektrode nach 4 min Hybridisierung mit 80 nM FcT in TRIS-Puffer. (B) RDE und LTCC-Elektrode nach 8 min Hybridisierung mit 160 nM TOs in TRIS-Puffer. Scheibenelektrode mit 1000 U/min und Drahtelektrode bei 3 °C mit 600 mA und LTCC-Elektrode bei 7 °C mit 3,2 V Heizstrom geheizt.

Aufgrund dieser Beobachtungen lassen sich die einzelnen Elektrodentypen in Bezug auf die Stromdichte in folgender Reihenfolge ordnen.

rotierende Scheibenelektrode > LTCC Elektrode > Drahtelektrode

Vergleicht man die verwendeten Elektrodentypen in Bezug auf Aufbau des Elektrodenkörpers und der ihn umgebenden Diffusionsschicht, so wird man feststellen, dass diese sich in diesen beiden Punkten stark unterscheiden.

Davon ausgehend, dass die Diffusionsschicht, deren Dicke von Beckmann mit $8\text{ }\mu\text{m}$ ermittelt wurde¹⁷³, den Elektrodenkörper gleichmäßig überzieht, lassen sich die Elektroden und ihre Diffusionsschichten wie in Abb. 5.23 darstellen.

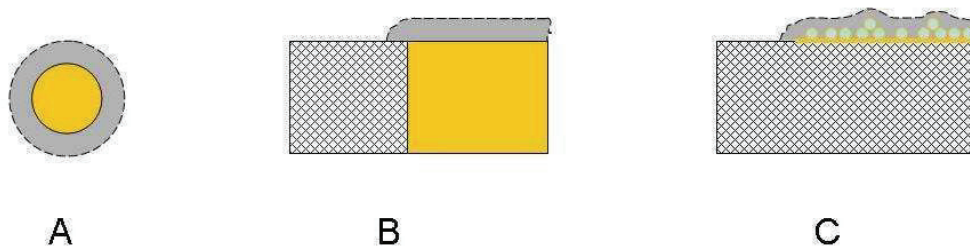


Abb. 5.23 : Darstellung von Elektroden und Diffusionsschichten. (A) Drahtelektrode (B) Scheibenelektrode (C) LTCC-Elektrode Darstellung A im Querschnitt, B und C Ausschnitt von der Elektrode. Gelb Elektrode, Grau Diffusionsschicht, Elektrodenhalter gemustert.

Die Drahtelektrode besitzt wegen ihres geringen Durchmessers von $25\text{ }\mu\text{m}$ das größte Verhältnis von den Oberflächen von Diffusionsschicht und Elektrode. Die Scheibenelektrode besitzt eine glatte Oberfläche und dadurch das kleinste Verhältnis dieser beiden Parameter.

Die LTCC-Elektrode besitzt eine hohe, durch das Herstellungsverfahren verursachte, Rauigkeit. Die führt dazu, dass die elektrochemisch aktiven Bereiche von der Grenze der Diffusionsschicht unterschiedlich weit entfernt sind, da auf der Oberfläche sowohl ebene als auch hervorstehende Elektrodenbereiche vorhanden sind.

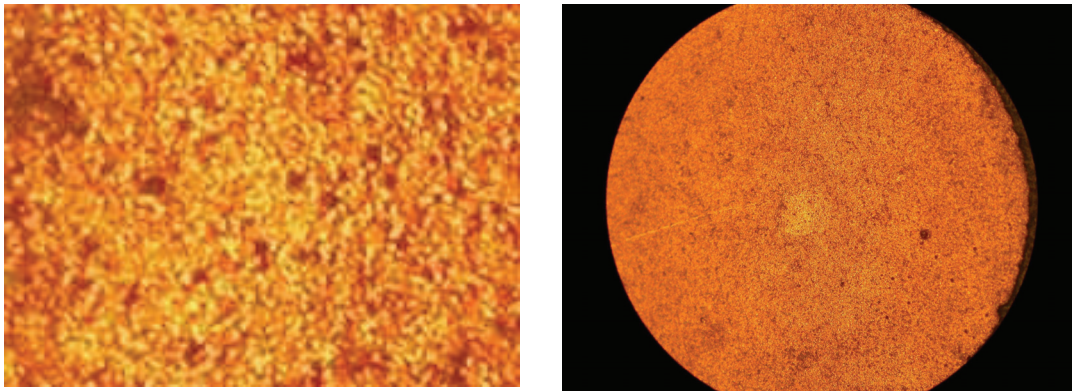


Abb. 5.24: Mikroskopische Aufnahme des Elektrodenkörpers einer LTCC. links mittlerer Bildausschnitt 10fach vergrößert.

Diese hier beschriebenen Verhältnisse führen dazu, dass sich bei den einzelnen Elektrodentypen die Geschwindigkeiten für die Sättigung der gesamten Elektrodenoberflächen unterscheiden. So erfolgt die Sättigung der Oberfläche der Drahtelektrode bedingt durch das deutliche größere Verhältnis der Oberflächen von Diffusionsschicht und Elektrodenoberfläche, schneller als bei der Scheibenelektrode. Die Ursache dafür besteht darin, dass die Eintrittsgeschwindigkeit in die Diffusionsschicht und die Diffusionsgeschwindigkeit konstant sind. Die Oberflächenstruktur der LTCC verhindert die Bildung von großflächigen Bereichen in denen sich nur die Sonde befindet. Das hat eine stabilere SAM zur Folge. Eine gegenseitige Behinderung der Sonden ist weniger stark ausgeprägt als bei der RDE. Dadurch lässt sich auch erklären, warum die beiden heizbaren Elektroden schneller die Sättigung erreichen als die rotierende Scheibenelektrode.

5.5.2 Sondenoberflächenbeladung und Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf die SAM

In Abb. 5.25 ist die Oberflächenbelegung der Drahtelektrode und der Scheibenelektrode von Metrohm dargestellt.

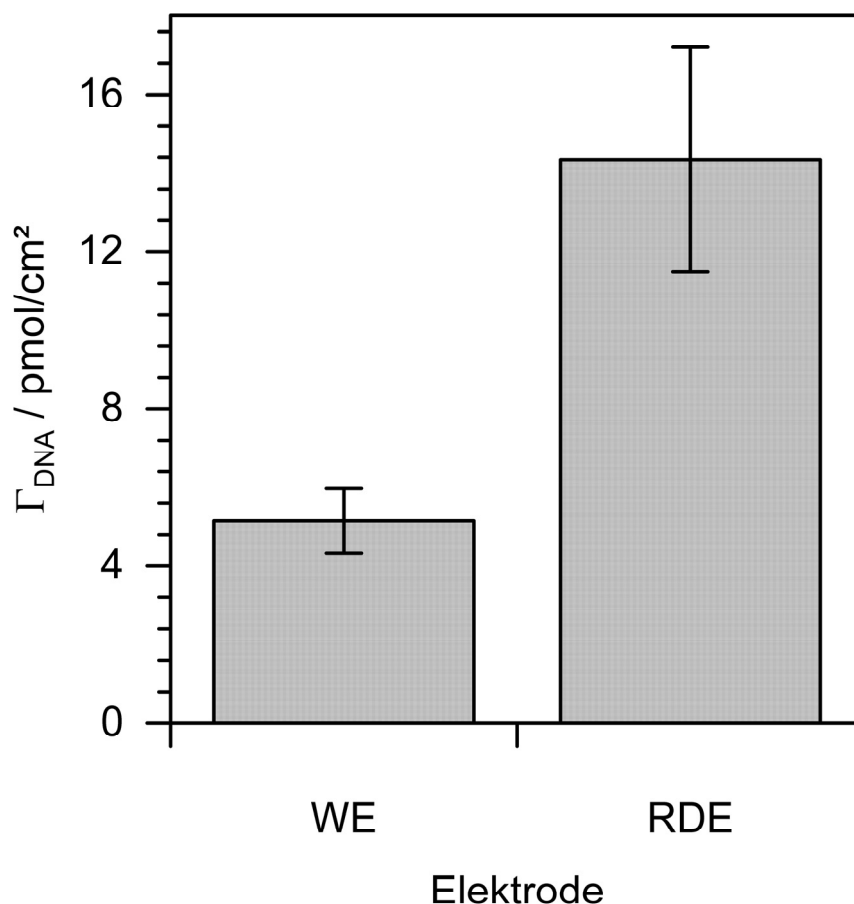


Abb. 5.25: Vergleich der Oberflächenbelegung von Draht- und Scheibenelektrode mit immobilisierter Monothiol-Sonde

Wie zu erkennen ist, ist die Oberflächenbelegung der Scheibenelektrode etwa 3mal größer als die der Drahtelektrode. Die Bestimmung der Oberflächenbelegung erfolgte mittels Chronocoulometrie mit Rutheniumhexamin(III)-Chlorid bei jeweils 3 verschiedenen SAM's. Als Bezugsgröße diente dabei die graphische Oberfläche. Die Oberflächenbelegung der Drahtelektrode mit dem Monothiol-Linker liegt mit einem Wert von 4,6 pmol/cm² nahe dem in der Literatur von Steel et al beschriebenen Optimum⁴⁵. Bei der Immobilisierung des Hexathiollinkers auf der Drahtelektrode ergab die Überprüfung der Oberflächenbelegung, dass nur ein geringer Teil der

Sonde auf der Oberfläche immobilisiert war. Außerdem konnte dabei kein stabiles Signal erzeugt werden, da die Oberflächenbelegung zu gering war.

Um den Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf die Sonde-SAM an der Draht- und Scheibenelektrode zu überprüfen wurden mittels Chronocoulometrie die Änderung der Oberflächenbelegung der Sonde nach jeweils 4 min bei 24, 70 und 24 °C überprüft. Nach jeder Messung wurden die Drahtelektroden in destilliertem Wasser 30 sec. bei Raumtemperatur mit 670 mA Heizstrom erhitzt, wogegen die Scheibenelektrode 10 sec. in 80 °C heißes Wasser getaucht wurde.

Die Messung erfolgte mit der bereits unter 4.2.2 beschriebenen Messanordnung.

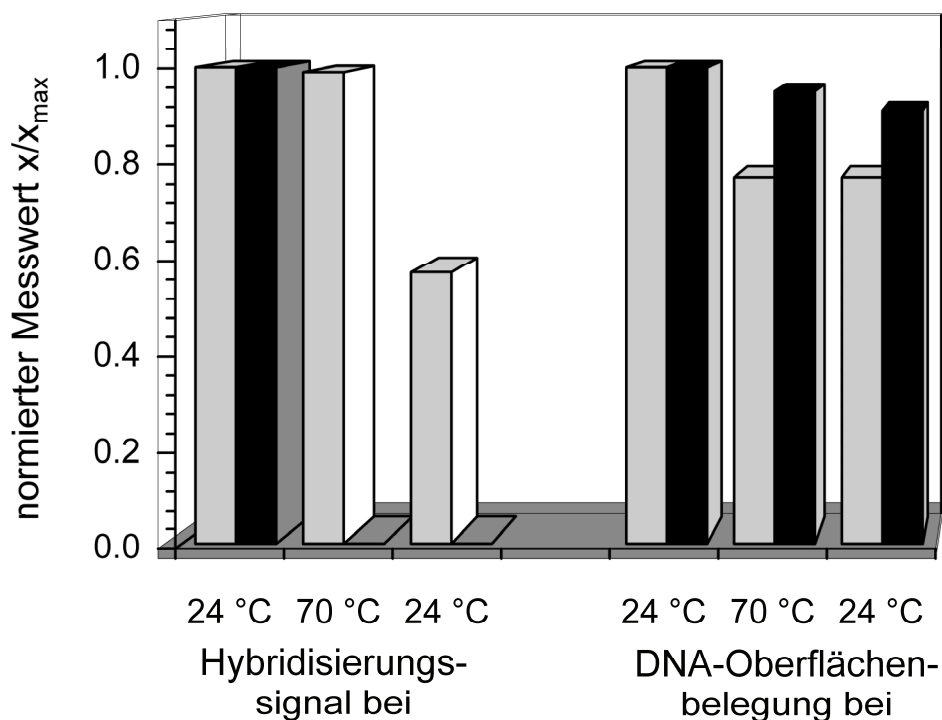


Abb. 5.26: Einfluß von Temperaturstress auf Hybridisierungssignal und Oberflächenbelegung an Draht-(grau) und Scheibenelektrode(schwarz).

In Abb. 5.26 ist die Änderung des Hybridisierungssignals bei denselben Temperaturen dargestellt. Dabei konnte bei der Drahtelektrode eine einmalige Abnahme der Oberflächenbelegung um 15-20 %, bei der Scheibenelektrode hingegen eine schrittweise Abnahme der Oberflächenbelegung um 2-5 % beobachtet werden. Interessant ist allerdings, dass der Verlust der Höhe des Detektionspeaks bei der Scheibenelektrode bei dem 70 °C-Signal bis zu 100% betrug. Wogegen bei der Drahtelektrode kaum eine Abnahme beobachtet wurde. Allerdings fiel das Signal bei der zweiten Messung bei 24 °C auf fast 60 %.

Durch die Desorption der Sonden von der Elektrodenoberfläche allein, kann diese Tatsache nicht erklärt werden, da die Abnahme der Oberflächenbelegung deutlich geringer ausfällt. Beide Elektrodentypen zeigten bei der dritten Messung, die bei 24 °C statt fand, keine vollständige Regenerierung des Hybridisierungssignals. Die Ursache für den starken Signalverlust kann nur durch die Umstrukturierung der SAM bei erhöhter Temperatur erklärt werden. So beschrieben Prathima et al. die Bildung hexagonaler Bereiche von Mercaptoalkanen bei unvollständigen Alkan-SAM's¹⁷⁴. Berücksichtigt man außerdem, dass SAM's keine starren Gebilde darstellen, ist es vorstellbar, dass sich die einzelnen Bestandteile der Sonden-SAM ebenfalls zu solchen hexagonalen Bereichen zusammenlagern. Das führt dazu, dass sich die Monothiol-Sonden bei der Hybridisierung mit dem Target gegenseitig behindern. Bei den Mehrfachlinkern tritt dieser Effekt nicht auf, da die im Vergleich zu den Monothiollinkern relativ großen Linker für einen größeren Mindestabstand zwischen den DNA-Einzelsträngen der Sonde sorgen und somit den für die Hybridisierung notwendigen Raum teilweise zur Verfügung stellen. Diese Tatsache wird durch Versuche von anderen Arbeitsgruppen mit anderen großvolumigen Koppelungsgruppen, sogenannten Dendrimeren bei optischen DNA-Chips bestätigt.¹⁷⁵

5.5.3 Kalibrierkurven

In Abb. 5.27 ist der Einfluss der Targetkonzentration auf die Signalthöhe dargestellt. Die Messung erfolgte bei beiden Elektrodentypen nach einer 8 min langen Hybridisierung in der jeweiligen Targetlösung bei 32 °C. Die Temperatur wurde bei der LTCC durch Heizen der Elektrode mit 4,4 V Gleichspannung in einem auf 7 °C temperierten Probengefäß und bei der RDE durch Einstellen der Temperatur der gesamten Probe erreicht. Um die Diffusionsbedingungen an der Elektrodenoberfläche konstant zu halten, wurde die Hybridisierung an der RDE bei 1000 U/min durchgeführt. Im Gegensatz dazu ist bei der LTCC die zusätzliche Erzeugung einer Konvektion nicht notwendig, da durch den Temperaturgradient, der beim Heizen entsteht, eine thermisch bedingte Konvektion entsteht.

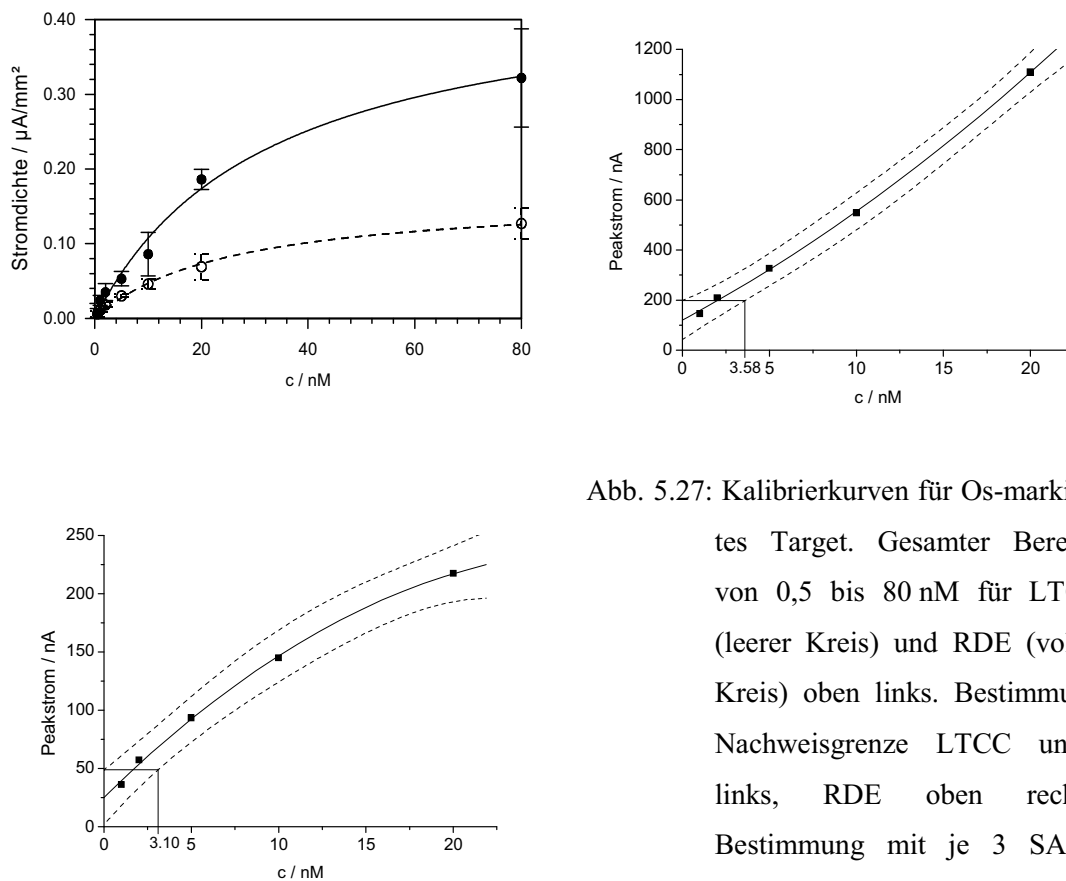


Abb. 5.27: Kalibrierkurven für Os-markiertes Target. Gesamter Bereich von 0,5 bis 80 nM für LTCC (leerer Kreis) und RDE (voller Kreis) oben links. Bestimmung Nachweisgrenze LTCC unten links, RDE oben rechts. Bestimmung mit je 3 SAMs nach 8 min Hybridisierung in TRIS-Puffer pH 7,5 bei 32 °C, bei RDE zusätzlich 1000 U/min.

Für die Ermittlung der Nachweisgrenzen wurden jeweils die Kalibrierreihen von 3 verschiedenen SAM's je Elektrodentyp eingesetzt. Durch die graphische Auswertung konnte für die LTCC eine Nachweisgrenze von 3,10 nM und für die RDE von 3,58 nM bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der Schwankungen der einzelnen SAM's je Elektrodentyp sind diese beiden Elektrodentypen in Bezug auf ihre Nachweisgrenzen sehr gut vergleichbar.

5.5.4 Verhalten des Signals in Abhängigkeit von der Hybridisierungszeit

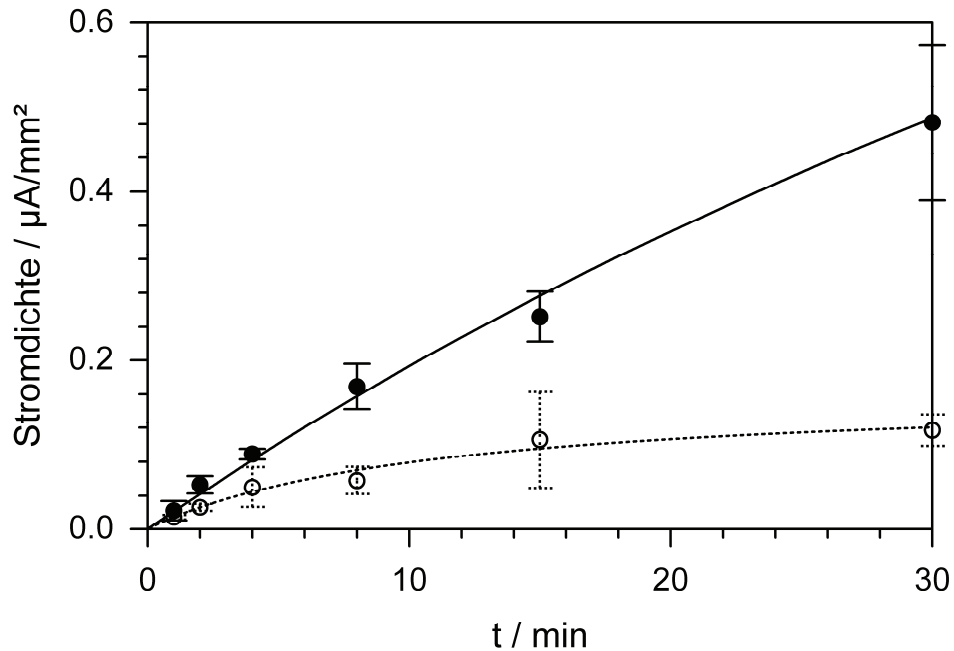


Abb. 5.28: Einfluß der Hybridisierungszeit auf die Signalhöhe. Rotierende Scheibenelektrode (gefüllt), LTCC (leer)

Abb. 5.28 zeigt die Abhängigkeit des Signals von der Hybridisierungszeit an einer geheizten LTCC-Elektrode und einer mit 1000 U/min rotierende Scheibenelektrode bei einer Hybridisierungstemperatur von 23 °C. Die Konzentration des verwendeten Targets betrug 160 nM.

Die Graphen beider Elektrodentypen zeigen mit zunehmender Hybridisierungszeit eine Abflachung des Signalstroms, die bei der LTCC sehr stark und bei der RDE sehr schwach ausgeprägt ist. Für die LTCC kann im Bereich bis 4 min ein starker, fast linearer, Anstieg beobachtet werden, wogegen dieser lineare Bereich bei der RDE bis auf 8 min ausgedehnt werden kann. Nach diesem Bereich kommt es zu einer Abflachung des Graphen, die bei der RDE nur gering ausgeprägt ist. Bei der LTCC ist dieser Effekt stärker ausgeprägt und geht nach 10 min deutlich erkennbar in die Sättigung über. Eine mögliche Erklärung dafür liefert die Oberflächenstruktur der beiden Elektrodentypen. An der LTCC sind, durch ihre raue Oberfläche bedingt, die Sonden unterschiedlich gut für das Target zugänglich. So ist die Hybridisierung des

Targets mit den Sonden auf einem Farbpartikel leichter, als mit denen auf der Goldschicht dazwischen. Dadurch ist auch zu erwarten, dass zuerst die Sonden auf den frei zugänglichen Farbpartikeln mit dem Target gesättigt werden. Im Gegensatz dazu ist die Scheibenelektrode eben. Deshalb ist hier der Weg zu den einzelnen Sonden auf der gesamten Elektrodenoberfläche gleich.

5.5.5 Temperatureinfluss während der Hybridisierung

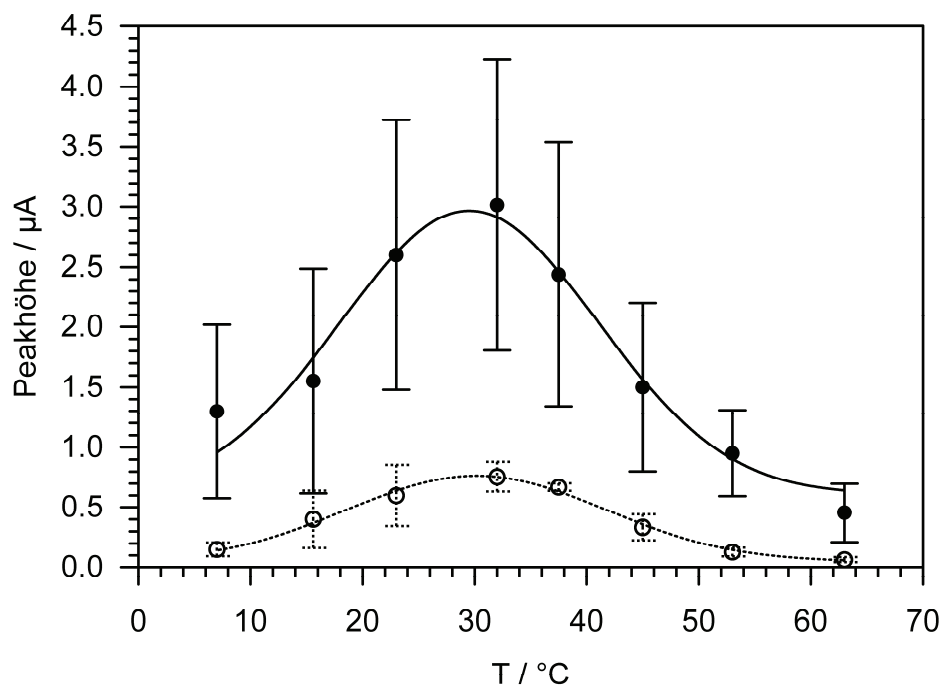


Abb. 5.29: Vergleich der Temperatur-Hybridisierungssignal-Kurven von LTCC (leer) und RDE (gefüllt)

In Abb. 5.29 ist der Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf das Signal dargestellt. Daraus ist zu erkennen, dass sich die Graphen der beiden Elektrodentypen für diese Messung nach 8 min Hybridisierung in 160 nM TOs in ihrem Verlauf deutlich unterscheiden. Besonders auffällig ist dabei, dass die Kurve von der RDE bei den ersten 3 Messpunkten exponentiell ansteigt, wogegen bei der LTCC ein fast linearer Anstieg in diesem Bereich zu beobachten ist. Anschließend kommt es zu einer Abflachung des Graphen bis zum Optimum, wobei sich die beiden Elektrodentypen in diesem Temperaturoptimum bei 8 min Hybridisierungszeit kaum voneinander unterscheiden. Der Abfall des Hybridisierungssignals nach dem Optimum verläuft bei beiden Elektrodentypen exponentiell.

Abb. 5.30 stellt denselben Zusammenhang für eine Draht- und eine Scheibenelektrode in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 mit ferrocen-markierten FRIZ-Target dar. Die Hybridisierungszeit betrug 4 min, wobei während der Hybridisierung die Scheibenelektrode mit 1000 U/min gedreht, die Drahtelektrode allerdings nicht bewegt wurde, da diese beim Heizen ihre Konvektion selbst erzeugte. Wie erkennbar ist, konnte bei beiden Elektrodentypen eine glockenförmige Temperatur-Signal-Kurve für den Temperaturbereich von 4 bis 70 °C ermittelt werden. Um den Verlauf der Temperatur-Signal-Kurven besser sichtbar darzustellen, wurde bei beiden Kurven eine Normierung mit dem für den jeweiligen Elektrodentyp erreichten Maximalstrom vorgenommen. Bei Verzicht dieser Maßnahme wäre das Temperatur-optimum der Drahtelektrode kaum zu erkennen, da es sich im Bereich von unter 10 % des Signals der Scheibenelektrode bewegen würde.

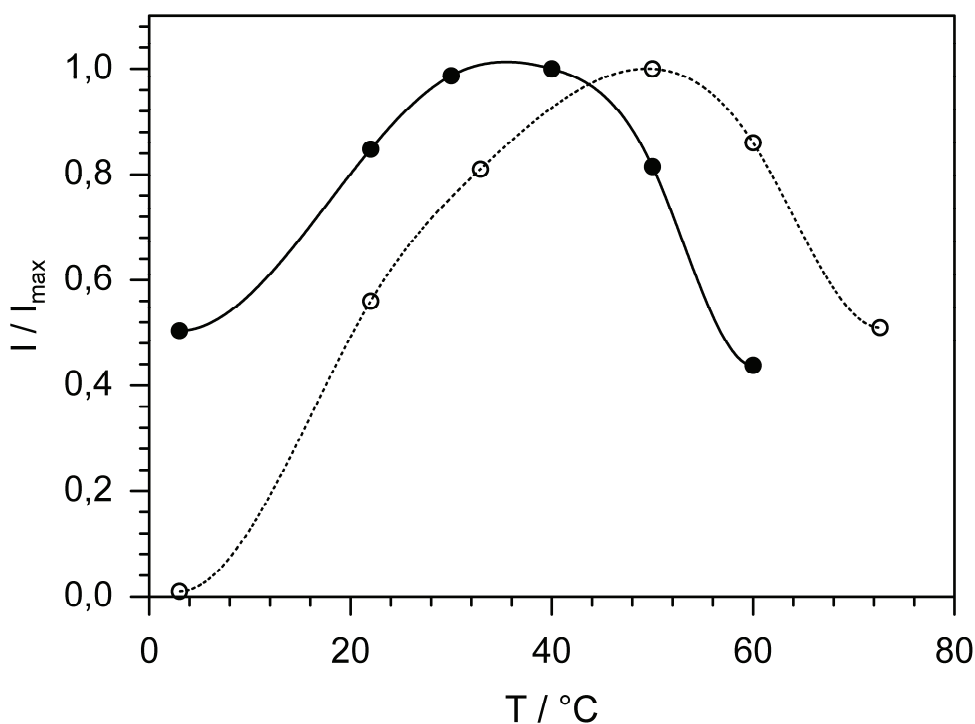


Abb. 5.30: Vergleich des Temperatureinflusses bei rotierender Scheiben- (gefüllt) und direkt geheizter Drahtelektrode (leer). Hybridisierungen erfolgten 4 min in 80 nM Ferrocen-Target in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0.

Ebenfalls zu erkennen ist, dass der Temperatursteigerungseffekt an der Drahtelektrode stärker ausgeprägt ist, und dass das Maximum bei dem Elektrodentyp um etwa 12 °C höher liegt als bei der Scheibe. Bei der Drahtelektrode wurde bei 4 °C das geringste Signal aufgezeichnet, während bei der Scheibenelektrode das Minimum bei

60 °C gefunden wurde. Diese beiden Effekte lassen sich darauf zurückführen, dass bei der Drahtelektrode die Konvektion durch den Temperaturgradienten an ihrer Oberfläche erzeugt wurde und dadurch mit zunehmender Temperatur gesteigert wurde, wogegen bei der Scheibenelektrode eine durch die Rotation verursachte gleichmäßige Konvektion vorhanden war.

5.5.6 Selektivität von Draht- und Scheibenelektrode

..

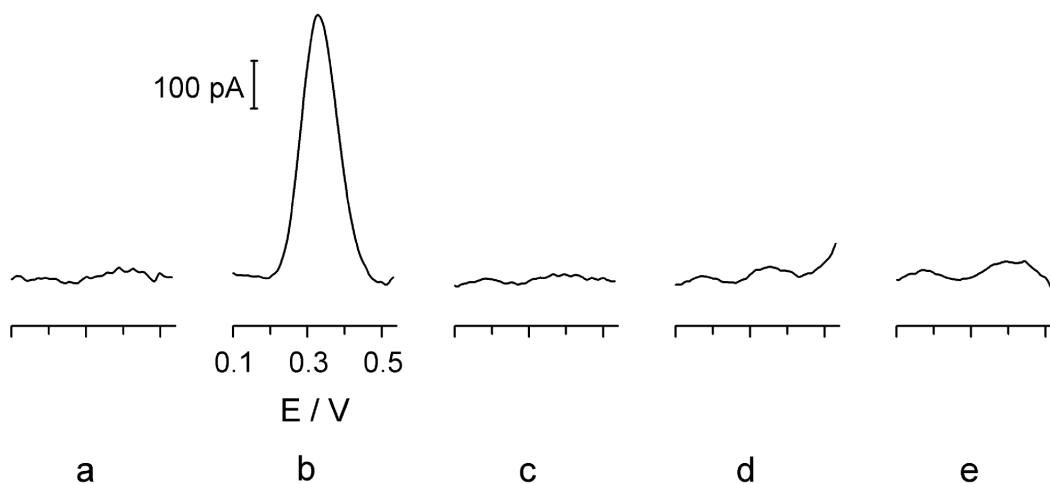


Abb. 5.31: Vergleich von komplementären und nichtkomplementären Ferrocen-Target in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0. Grundlinie (a), 80 nM komplementäres Target 4 min bei 42°C (b), 80 nM nichtkomplementäres Target 4 min bei 42°C (c), 80 nM Target 4min bei 3°C (d), 80 nM nichtkomplementäres Target bei 3°C (d)

In Abb. 5.30 ist der Einfluss der Targetsequenz auf das Hybridisierungssignal an einer direkt heizbaren Drahtelektrode dargestellt. Die Messungen erfolgten in 80 nM Ferrocen-Target bzw. nichtkomplementären Target in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0. Bei der ersten Messung nach 4 min Hybridisierung bei 42 °C mit dem nichtkomplementären Target konnte noch ein geringes Restsignal beobachtet werden, dass allerdings nach einer kurzen Behandlung der hybridisierten Elektrode für 1 min in 52 °C warmen Messpuffer verschwand. Im Gegensatz dazu konnte mit dem komplementären Target unter diesen Bedingungen mit fast 600 pA ein für die Drahtelektrode sehr gutes Signal erreicht werden, welches auch noch nach dem einminütigen Eintauchen in warmen Messpuffer bestand. Dieser Versuch wurde bei 3 °C mit derselben Elektrode wiederholt, wobei hier nur bei dem komplementären

Target ein sehr kleines Signal nachweisbar war. Das Signal unterschied sich vom Grundrauschen allerdings nur geringfügig.

Der Vergleich von komplementären und nicht komplementären Dabcyl-markierten Targets erfolgte durch den Einsatz von 2 Sonden mit verschiedenen Sequenzen und einem Target. Die Untersuchungen wurden nach einer 10 minütigen Hybridisierung in 800 nM Target bei der komplementären Sonde und 30 min Hybridisierung bei der nichtkomplementären Sonde durchgeführt. Die Oberflächenbelegung wurde vorher mittels Chronocoulometrie überprüft. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die beiden Sonden in diesem Punkt nicht voneinander unterscheiden.

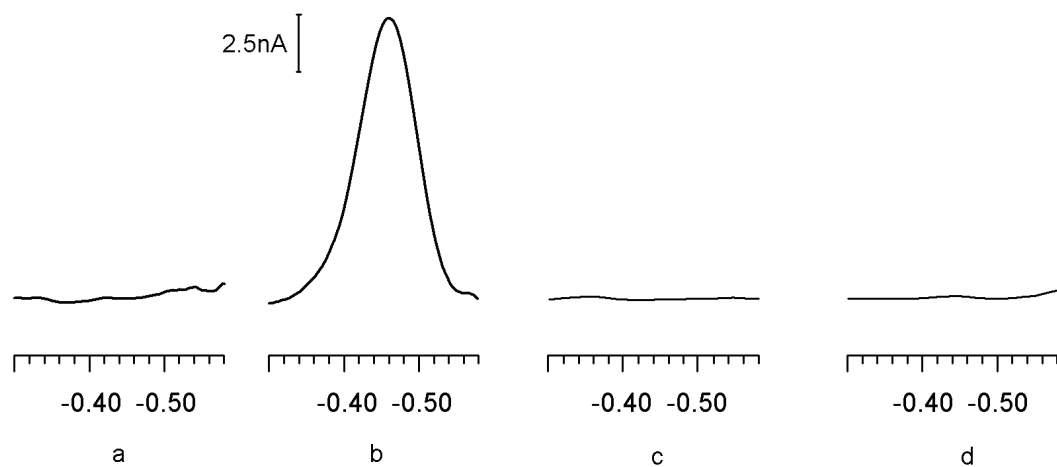


Abb. 5.32: Einfluß von komplementären und nichtkomplementären Nukleinsäuren auf Signal. Messungen bei Raumtemperatur in TRIS-Puffer pH 7,5. Grundlinie der FRIZ-Sonde (a), 15 min Hybridisierung mit 0,8 μ M komplementären Dabcyl-Target (b), Grundlinie der EcoR-Sonde (c), 30 min Hybridisierung von EcoR mit 0,8 μ M Dabcyl-Target (d)

In der Abbildung 5.31 sind die Grundlinie, das heißt das Signal in reinen 10 mM TRIS Puffer mit 0,5 M Natriumsulfat pH 7,5, der komplementären Sonde (a), das Hybridisierungssignal der komplementären Sonde mit 800 nM Dabcyltarget nach 15 min (b), die Grundlinie für die nichtkomplementäre Sonde (c) und das Signal nach 30 min Hybridisierung für das nichtkomplementäre Nukleinsäurepaar (d) dargestellt.

Diese Versuche zeigen, dass sowohl die direkt heizbare Drahtelektrode, als auch die verwendeten Sonden und Targets für einen selektiven Nachweis der komplementären Nukleinsäuren geeignet sind.

Wie zu erkennen ist, ist nur nach der Hybridisierung der mit Dabcyl-markierten komplementären Nukleinsäuren ein Signal zu erkennen. Das bedeutet, dass dieses System trotz der notwendigen hohen Konzentration eine sehr hohe Selektivität gegenüber komplementären Nukleinsäuren besitzt.

Wie aus den Versuchen zu erkennen ist, besitzen die heizbaren Elektroden den Vorteil, dass die Temperatur während der Hybridisierung auf einen Wert in der Nähe des Schmelzpunktes eingestellt werden kann, ohne die gesamte Hybridisierungslösung aufzuheizen. Dadurch kann die Selektivität für das Target auf einer Elektrodenoberfläche zusätzlich erhöht werden.

6. Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Verwendbarkeit von geheizten Elektroden für den Hybridisierungsnachweis von Nukleinsäuren untersucht. Dazu wurden 3 unterschiedlich markierte Targets und Sonden mit verschiedenen Linkern eingesetzt. Es wurde die direkt heizbare Draht- (WE) und die indirekt heizbare LTCC-Elektrode mit der nicht heizbaren rotierenden Scheibenelektrode (RDE) verglichen.

Die indirekt heizbare Elektrode basierte auf der *low temperature co-fired ceramics* - Technologie (LTCC), eine Methode bei der mit den Schaltelementen bedruckte Keramikschichten durch sintern miteinander verbunden werden.

Die Einstellung der Hybridisierungstemperatur erfolgte durch Anlegen eines definierten Heizstromes in gekühlter Targetlösung. Dieser wurde für die jeweilige Elektrode durch eine vorherige Kalibrierung in einem Gemisch aus Kaliumhexacyanoferrat (II) und Kaliumhexacyanoferrat (III) mittels Open Circuit Potentiometrie bestimmt. Bereits während der Kalibrierung zeigte sich, dass der Einsatz der heizbaren Elektroden ein sehr zügiges Arbeiten bei verschiedenen Temperaturen ermöglicht. Der Grund dafür besteht darin, dass die Aufheizphase der Sensoren wegen der sehr geringen zu erwärmenden Elektrodenmasse sehr kurz ist. Allerdings ist die maximale Temperatur der Drahtelektrode durch ihre Wachsisolierung bei längeren Heizphasen auf etwa 73 °C begrenzt, da sonst die Gefahr des Zerlaufens dieser Isolierung besteht.

Durch den Vergleich der Oberflächenbelegung von WE und RDE mit der einfachsten Sonde, das bedeutet dem Monothiolinker, konnte gezeigt werden, dass die Ober-

flächenbelegung der WE mit etwa 4 pmol/cm² fast optimal war. Bei der RDE wurde der 3-4fache Wert nachgewiesen. Die SAM an der Drahtelektrode verliert nur bei starkem Temperaturstress, beispielsweise 4 min bei 70 °C, einen Teil der Sonden. Im Gegensatz dazu sinkt die Oberflächenbelegung der Scheibenelektrode in 5 bis 10 %-Schritten je Hybridisierung. Nach starkem Hitzestress wurde bei diesem Elektrodentyp sogar ein fast vollständiger Verlust des Hybridisierungssignals beobachtet. Bei der WE wurde erst bei der auf den Hitzestress folgenden Hybridisierung bei Raumtemperatur dieser Verlust beobachtet.

Die Versuche zum Hybridisierungsnachweis an der Drahtelektrode wurden mit einem einfach Ferrocen-markierten Target durchgeführt. Dabei konnte unter anderem festgestellt werden, dass an der Drahtelektrode bei 40 °C und 8 min Hybridisierung in 0,5 M Phosphat-Puffer pH 7,0 der kleinste auswertbare Peak bei einer Konzentration von 0,5 nM Target lag. Die vollständige Selektivität gegenüber dem nichtkomplementären Target konnte mit dieser Markierung erst durch eine Nachbehandlung erreicht werden. Das geschah durch ein einminütiges Eintauchen der hybridisierten Elektrode in 52 °C warmem Messpuffer.

Im weiteren Verlauf der Arbeit zeigte sich, dass eine Alternative zu der Ferrocen-Markierung sinnvoll war. Aus diesem Grund wurden aus der optischen Detektion bekannte Markersubstanzen und mit diesen markierte Targets in Bezug auf ihre elektrochemischen Eigenschaften untersucht. Von den untersuchten Substanzen erwies sich nur das Dabcyl als geeignet.

Dieses zeigte bereits bei den voltammetrischen Versuchen an der Scheibenelektrode ein Detektionssignal innerhalb des Potentialfensters von Gold. Dieses Signal wurde in polarographischen Versuchen an Quecksilberelektroden bestätigt, wobei sich zeigte, dass an der Elektrodenoberfläche im Bereich bis 1,7 V vs. Ag/AgCl ein zweiter Reduktionspeaks beobachtet wurde. Die zweite irreversible Reaktion erfolgt sehr schnell und führt bei der Detektion der Dabcyl-markierten Targets zu einem scheinbar irreversiblen Hybridisierungssignal. Das elektrochemische Reaktionsverhalten dieser Markierung führt zu sehr kleinen ACV-Signalen. Dadurch ist die sehr hohe Nachweisgrenze von 109 nM bei 15 min Hybridisierung an der Scheibenelektrode bei 1000 U/min und Raumtemperatur erklärbar.

Es konnte auch gezeigt werden, dass sich die Potentiale des reinen Dabcyls und des kovalent gebundenen nur sehr geringfügig unterscheiden.

Für die Untersuchung des Einflusses der Konvektion und dem Vergleich von RDE und LTCC-Elektrode wurde die Markierung mittels Osmium-Bipyridin-Komplex eingesetzt. Diese Markierung, die im Labor mit sehr einfachen Mitteln durchführbar ist, hatte sich in unserer Arbeitsgruppe bewährt und zeichnete sich auch durch sehr hohe Hybridisierungssignale aus.

Durch eine Koimmobilisierung von Sonde und Mercaptohexanol konnte die Oberflächenbelegung der Scheibenelektrode weiter optimiert werden. Zusätzlich wurde die Signalstabilität durch den Einsatz einer Sonde mit einem Hexathiol-Linker gesteigert.

Die so präparierten Elektroden wurden als Scheibenelektrode für die Untersuchung des Drehzahleinflusses eingesetzt. Diese erfolgten bei Temperaturen von 7 und 23 °C. Dabei zeigte sich, dass in der Kälte keine Beeinflussung des Hybridisierungssignals durch die Drehzahl erfolgte, wogegen bei Raumtemperatur im Drehzahlbereich bis 1000 U/min eine Signalsteigerung um 100 bis 150 % erfolgte. Eine Steigerung des Signals bei höheren Drehzahlen konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Tatsache beweist, dass für das Hybridisierungssignal die Diffusion zu und auf der Elektrodenoberfläche entscheidend ist.

Bei weiteren Versuchen konnte festgestellt werden, dass der Unterschied im Temperatureinfluss in Bezug auf das Temperaturoptimum bei der RDE und LTCC gering ist. Ein Vergleich der Kalibrierkurven beider Elektrodentypen mit diesem Target zeigte, dass die Nachweisgrenzen sich mit 3,1 nM (LTCC) und 3,58 nM (RDE) kaum unterscheiden. Die maximale Stromdichte bezogen auf die graphische Oberfläche bei der Scheibenelektrode war etwa doppelt so hoch wie bei der LTCC. Im Gegensatz dazu konnte die Sättigung in Bezug auf Konzentration und Hybridisierungszeit an der LTCC-Elektrode schneller erreicht werden als bei der RDE.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in dieser Dissertationsarbeit erzielten Ergebnisse beweisen, dass der Einsatz heizbaren Elektroden eine effiziente Alternative zu den derzeit gängigen Analysemethoden in der DNA-Analyse darstellt.

7. Ausblick

Die hier vorliegende Arbeit diene auch der Grundlagenuntersuchung für die Entwicklung von DNA-Analyse-Chips. Wobei durch den Einsatz der heizbaren Elektroden eine fast simultane Vervielfältigung und Detektion von Nukleinsäuren er-

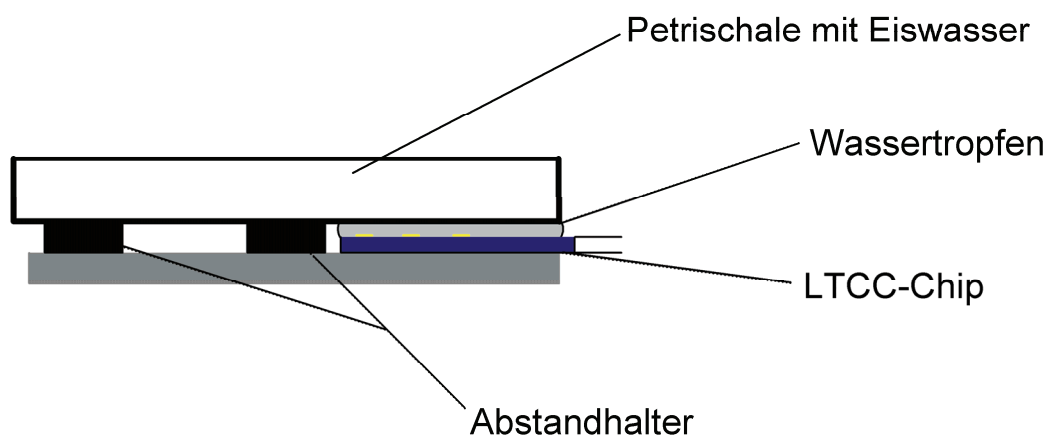
möglichst werden kann. Aus dem Grund wurde dafür im Verlauf der Arbeit ein Patent für den Einsatz eines Analyse-Chips mit DNA-Vervielfältigung erarbeitet.

Solche Chips sind in der medizinischen Analytik, der Lebensmittelüberwachung, der genetischen Untersuchung von Fossilien, der Biotechnologie und beim Militär, bei der Identifizierung von biologischen Waffen, einsetzbar. Die Vorteile bestehen in einer schnellen Analyse in Bezug auf mehrere Parameter oder genetische Markersequenzen. Durch die Kombination der Chiptechnologie mit der elektrochemischen Detektion können diese Systeme durch die Entwicklung der Mikroelektronik noch kompakter und leichter handhabbar gestaltet werden. Dadurch ist die Möglichkeit des „Feldeinsatzes“ gegeben.

In der Medizin und der B-Waffenabwehr ermöglichen diese Systeme die schnelle Identifizierung von Krankheitskeimen oder genetisch bedingte Arzneimittelunverträglichkeiten, so dass die entsprechenden Medikamente gezielt eingesetzt werden können. Aufgrund der in den letzten Jahren gehäuft auftretenden sogenannten multi-resistenten Stämmen von Krankheitserregern sind diese Maßnahmen sehr sinnvoll und besitzen ein extrem hohes Kosteneinsparungspotential. Dadurch kann sich ein speziell für den Einsatz in Arztpraxen konzipiertes Analysesystem schnell rentieren. Erste Vorversuche für ein solches System wurden bereits mit einem 6-Elektrodenarray auf LTCC-Basis durchgeführt.

Bei diesem Array lässt sich für jede Elektrode die dazugehörige Heizeinheit separat ansteuern. Das wird durch die Parallelschaltung der einzelnen elektrischen Elemente des Arrays ermöglicht (Abb. 7.1.).

A



B

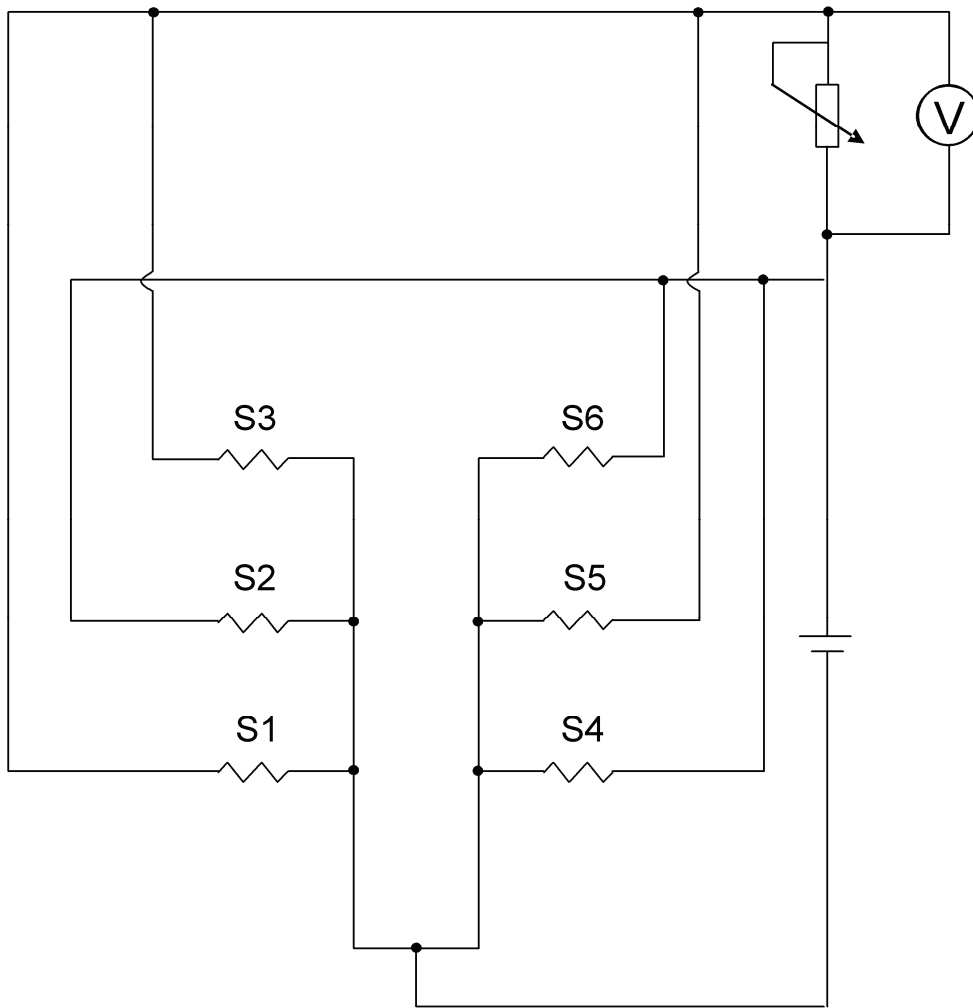


Abb. 7.1.: Versuchsaufbau (A) und Schaltbild (B) für den Strömungsversuch

Bei diesen Versuchen wurde erstmal nur das Strömungsverhalten in einem Wasserfilm über dem Array untersucht. Die Strömung wird in dem Fall wie bereits unter 4.3.3 erwähnt durch den Temperaturgradienten zwischen der geheizten Elektrodenoberfläche und dem gekühlten Medium erzeugt. Durch den Einsatz von festem Kaliumpermanganat, das sich unter einer Wachsschicht auf einer der geheizten Elektroden befand, konnte dieser Effekt nachgewiesen werden. Der Aufbau des Experiments und die Aufnahmen der Strömung sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

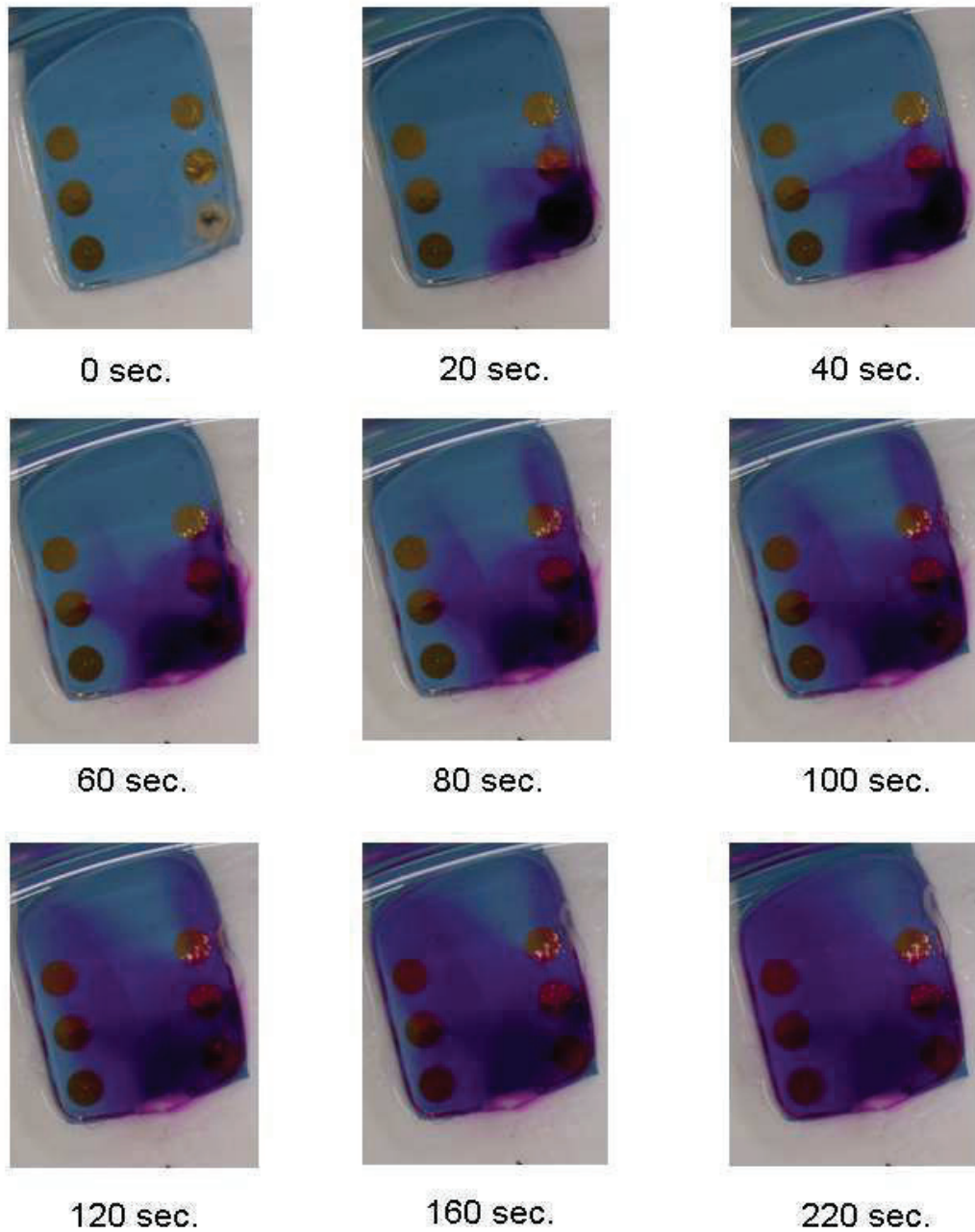


Abb. 7.2.: Strömungsversuche auf einem 6-Elektroden-LTCC-Array.

Der mögliche schematische Aufbau eines Analyse-Chips und der dazugehörigen Messzelle sind in Abb. 7.3 dargestellt.

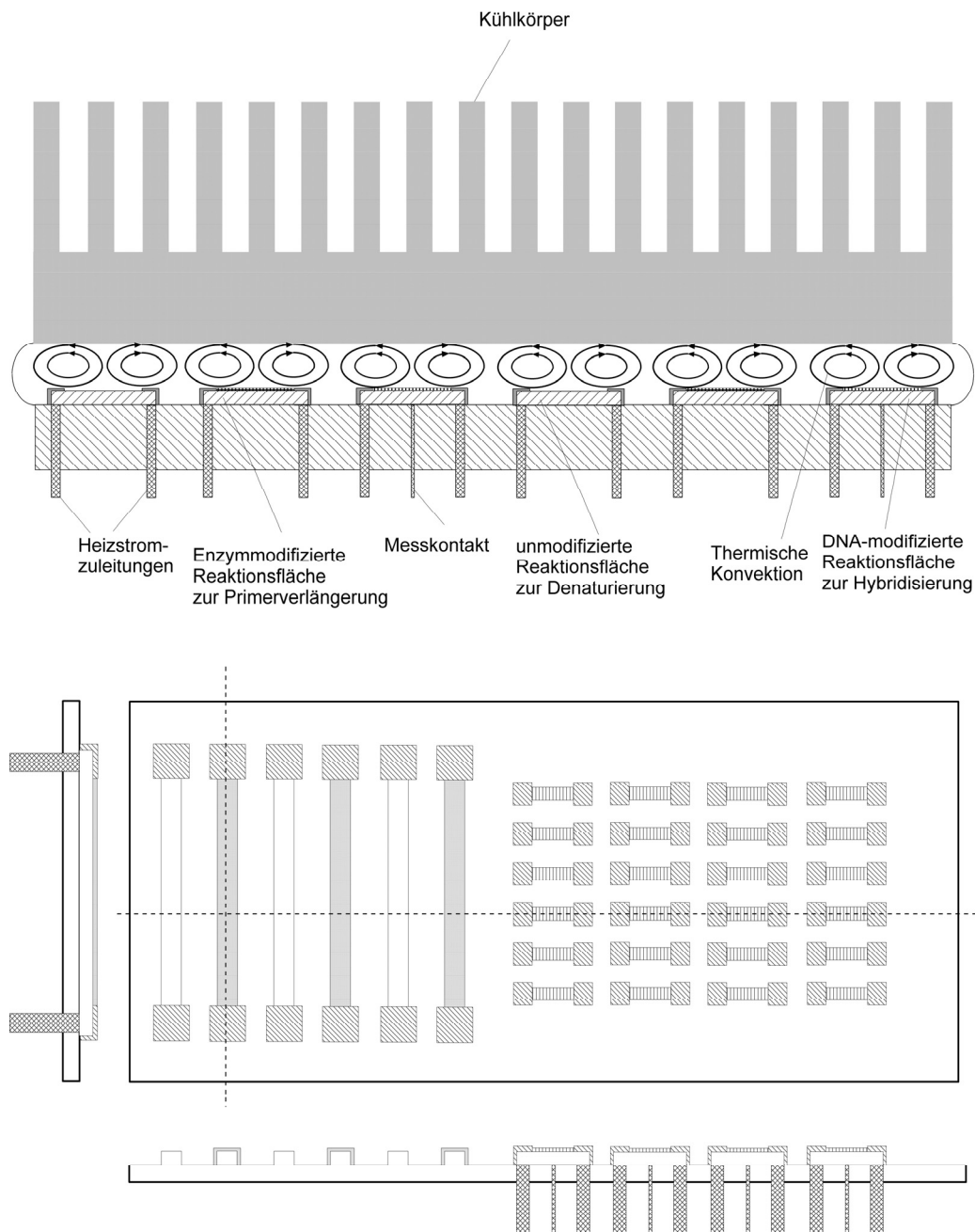


Abb. 7.3 : Schematische Darstellung eines DNA-Analysechips und der dazugehörigen Messzelle nach dem Patent von Peter und Flechsig. Obere Abb. Messzelle, untere Abb. möglicher Aufbau eines Analysen-Chips

Im Verlauf dieser Arbeit wurden mehrere kovalent gebundene Marker untersucht und charakterisiert. Die dabei gewonnen Erkenntnisse können in Kombination mit der von Wang et al. beschriebenen Simultandetektion von 2 Markern die Informationsdichte zusätzlich erhöhen. Voraussetzung dafür ist, dass die Redoxpotentiale der Markierungen nicht zu eng beieinander liegen.

Ein Problem, das während dieser Arbeit auftrat war die Stabilität der SAMs. Das konnte durch den Einsatz von Sonden mit einem 6fach-Linker (FSS6) behoben

werden. Neben der Verfügbarkeit der Sonde spielt auch ihr Preis eine Rolle, so ist die Sonde FSS6 etwa 3mal so teuer wie die Monothiol-Sonde. In den letzten Jahren wurden für die SAM auf Gold verschiedene andere Linker beschrieben, unter anderem wurde auch Cystein, eine Aminosäure, als Linker genutzt¹⁷⁶. Diese Entwicklung kann durchaus zu preiswerteren Linkern als die von uns eingesetzten führen.

Ein anderes Problem sind die Materialkosten bei der Chipentwicklung und Produktion, insbesondere durch die Verwendung von Gold als Elektrodenmaterial. Eine Alternative zu diesem Material wird in unserer Arbeitsgruppe bereits von Dr. Buckova und Hr. Duwensee untersucht, dabei handelte es sich um Bismut, Bismut- und andere Schwermetalllegierungen. Allerdings liegen hier noch keine Ergebnisse bei direkt geheizten Elektroden vor. Bismut ist hierbei besonders interessant, da es sich im reinen Zustand zur Bildung von SAMs eignet, und im alkalischen zur Bildung von Bismuthydroxid an der Oberfläche neigt. Die dabei entstehenden Hydroxy-Gruppen können auch zur klassischen Immobilisierung biologischer Erkennungselemente, z. B. mit Diglycylether oder der Bromcyan-Methode, genutzt werden.

Ebenfalls noch zu untersuchen ist der Einfluss verschiedener Puffersysteme (z. B. MES- oder MOPS-Puffer) mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen und Additiven. Das ermöglicht die optimale Abstimmung von Polymerase-Aktivität und Hybridisierung der Sonde.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: Schematische Darstellung eines Biosensors	14
Abb. 3.2: Schematischer Aufbau von Nukleinsäuren	16
Abb. 3.3: Bestandteile der Nukleinsäuren.....	17
Abb. 3.4: Darstellung von Hybridisierung und Dehybridisierung	19
Abb. 3.5: Schematischer Aufbau der Sonde und ihre Linker.....	20
Abb. 3.6: Nachweisreaktion am Target mit Redoxindikator	22
Abb. 3.7: Potential-Zeit-Funktion der CV	25
Abb. 3.8: Potential-Zeit-Funktion der ACV (nach Vanysek)	26
Abb. 3.9: Potential-Zeit-Funktion der SWV mit Messpunkten (nach Vanysek)	27
Abb. 3.10: Stromstärke-Zeit-Funktion der Chronopotentiometrie.....	28
Abb. 3.11: Potential-Zeit-Funktion während der Chronocoulometrie	32
Abb. 3.12: Bestimmung der Oberflächenbeladung am Beispiel einer DNA- modifizierten Elektrode	34
Abb. 3.13: Reaktion an der Elektrodenoberfläche im Verlauf der Bestimmung der Oberflächenbeladung.....	35
Abb. 4.1: Verwendete Elektrodentypen. (A) Scheiben-, (B) LTCC- und (C) teilweise isolierte Drahtelektrode	36
Abb. 4.2: Aufbau der direkt heizbaren Draht- (links) und der indirekt heizbaren LTCC-Elektrode nach Lau (rechts)	38
Abb. 4.3: Aufbau des Messplatzes für Hybridisierungsnachweis.....	39
Abb. 4.4: Messplatzaufbau für die Temperaturkalibrierung	41
Abb. 4.5: Schematische Darstellung der Markierung und für unsere Anwendung geeigneten Liganden.....	46
Abb. 4.6: Kalibrierkurven für direkt heizbare Draht- (A) und indirekt heizbare LTCC-Elektroden (B).....	48
Abb. 5.1: DNA-Schmelzkurven bei verschiedenen Ionenstärken mit je 0,8 μM Sonde FS und komplementären Target in Phosphatpuffer pH 7,0 bei verschiedenen Ionenstärken.....	51
Abb. 5.2: DNA-Schmelzpunktkurven mit verschiedenen Targetmodifizierungen. Eingesetzt wurden je 0,8 μM Sonde und Target in 0,5 M PB pH 7,0	52

Abb. 5.3: Vergleich von je 0,8 μM komplementären Target-Sonde-Duplex (blau) und Einzelbasen-Mismatch-Sonden-Duplex (rot) in 0,1 M PB pH 7,0.	53
Abb. 5.4: Vergleich der Stabilität des Hybridisierungssignals der Tetrathiol- (durchgängige Linie) und Monothiol-Sonde (unterbrochene Linie). Hybridisierung 4 min in 80 nM Ferrocen-Target bei Raumtemperatur an einer Scheibenelektrode bei 1000 U/min.....	55
Abb. 5.5: Vergleich der Oberflächenbelegung der einzelnen Immobilisierungsmethoden.	56
Abb. 5.7: Schematische Darstellung der SAM's. (A) Klassische Immobilisierung, (B) Koimmobilisierung von Sonde und Mercaptohexanol, (C) zweifache Nachbelegung mit Mercaptoundecan und Mercaptohexanol.....	58
Abb. 5.8: Eingesetzte kovalent gebundene Marker und ihre Redoxpotentiale	60
Abb. 5.9: Charakterisierung von Dabcyl an Quecksilberelektroden bei Raumtemperatur in 10 mM TRIS-Puffer mit 0,5 M Na_2SO_4 bei pH 7,5. (A) Tast Polarographie und (B) Differenz Puls Polarographie an der tropfenden Quecksilberelektrode. (C) adsorptive Stripping Voltammetrie an einer hängenden Quecksilberelektrode. Aufgenommen wurden jeweils der reine Puffer (a) und Puffer mit Dabcyl (b), für A und B je 100 μM bei einer Tropfzeit von 0,5 sec, Scanrate 10mV/sec., für C 25 nM nach 5 min Anreicherungszeit Scanrate 10 mV/sec.	62
Abb. 5.10: Kurvenverlauf für 100 μM Dabcyl (durchgängige Linie) bei voltammetrischen Messungen an der Goldscheibenelektrode.	63
Abb. 5.11: Vergleich des Hybridisierungspeaks von 0,8 μM dabcylmarkierten Target an einer sondenmodifizierten Goldscheibenelektrode (a) und des AdSV-Peaks von reinen Dabcyl an einer HMDE (b) in TRIS-Puffer bei Raumtemperatur	64
Abb. 5.12: Strukturen der beiden Farbstoffe.....	65
Abb. 5.13: ACV-Diagramme für 1 mM Sulforhodamin (oben links) und 1mM Fluorescein (oben rechts). Darunter die Diagramme für die markierten Targets. Sulforhodamin-Markierung links und Fluorescein-Markierung rechts. Messpuffer 10 mM TRIS mit 0,5 M Na_2SO_4 pH 7,5. Hybridisierung je 30min in 160 nM Target bei Raumtemperatur und 1000 U/min.....	66

Abb. 5.14: ACV-Peak von 80 nM Ferrocen-Target nach 4 min Hybridisierung in 0,5 M PB pH 7,0	67
Abb. 5.15: SWV-Hybridisierungsspeak von 160 nM osmiummarkierten Target an einer rotierenden Scheibenelektrode in 10 mM Tris-Puffer pH 7,5 (A) und Reaktionsmechanismus des Os-Komplexes (B).....	68
Abb. 5.16: Einfluß der Drehzahl auf das Hybridisierungssignal bei 7(leer) und 23°C(voll) in 10 mM TRIS.....	71
Abb. 5.17 : Zeiteinfluss auf das Hybridisierungssignal des Targets Dabcyl an einer Scheibenelektrode bei 1000 U/min und Raumtemperatur in 800 nM Target-Lösung	72
Abb. 5.18: Einfluss der Hybridisierungszeit bei 0 und 2000 U/min bei 4°C und Raumtemperatur an einer Scheibenelektrode mit Tetrathiol-Sonde und 80 nM Fc-Target in 0,5 M Na ₂ SO ₄ -Lösung mit jeweils einer SAM pro Temperatur.....	73
Abb. 5.19: Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf das Hybridisierungssignal von 800 nM Target-Dabcyl nach 8 min und 1000 U/min in 10 mM Tris pH 7,5	74
Abb. 5.20: Kalibrierkurve für das Target Dabcyl. Messung nach 8 min bei 1000 U/min bei Raumtemperatur	75
Abb. 5.21: Abhängigkeit des Hybridisierungssignals von der Konzentration des Ferrocen-Targets bei 2 verschiedenen SAMs an einer Drahtelektroden.	76
Abb. 5.22: Vergleich der Stromdichten, bezogen auf die graphischen Oberflächen, an nicht heizbaren(a) und heizbaren Elektroden(b) bei 24 °C. (A) RDE und Drahtelektrode nach 4 min Hybridisierung mit 80 nM FcT in TRIS-Puffer. (B) RDE und LTCC-Elektrode nach 8 min Hybridisierung mit 160 nM TOs in TRIS-Puffer. Scheibenelektrode mit 1000 U/min und Drahtelektrode bei 3 °C mit 600 mA und LTCC-Elektrode bei 7 °C mit 3,2 V Heizstrom geheizt.	78
Abb. 5.23 : Darstellung von Elektroden und Diffusionsschichten. (A) Drahtelektrode (B) Scheibenelektrode (C) LTCC-Elektrode Darstellung A im Querschnitt, B und C Ausschnitt von der Elektrode. Gelb Elektrode, Grau Diffusionsschicht, Elektrodenhalter gemustert.....	79
Abb. 5.24: Mikroskopische Aufnahme des Elektrodenkörpers einer LTCC. links mittlerer Bildausschnitt 10fach vergrößert.	80

Abb. 5.25: Vergleich der Oberflächenbelegung von Draht- und Scheibenelektrode mit immobilisierter Monothiol-Sonde.....	81
Abb. 5.26: Einfluß von Temperaturstress auf Hybridisierungssignal und Oberflächenbelegung an Draht-(grau) und Scheibenelektrode(schwarz).	82
Abb. 5.27: Kalibrierkurven für Os-markiertes Target. Gesamter Bereich von 0,5 bis 80 nM für LTCC (leerer Kreis) und RDE (voller Kreis) oben links. Bestimmung Nachweisgrenze LTCC unten links, RDE oben rechts. Bestimmung mit je 3 SAMs nach 8 min Hybridisierung in TRIS-Puffer pH 7,5 bei 32 °C, bei RDE zusätzlich 1000 U/min.	84
Abb. 5.28: Einfluß der Hybridisierungszeit auf die Signalthöhe. Rotierende Scheibenelektrode (gefüllt), LTCC (leer).....	85
Abb. 5.29: Vergleich der Temperatur-Hybridisierungssignal-Kurven von LTCC (leer) und RDE (gefüllt)	86
Abb. 5.30: Vergleich des Temperatureinflusses bei rotierender Scheiben- (gefüllt) und direkt geheizter Drahtelektrode (leer). Hybridisierungen erfolgten 4 min in 80 nM Ferrocen-Target in 0,5 M Posphatpuffer pH 7,0.	87
Abb. 5.31: Vergleich von komplementären und nichtkomplementären Ferrocen-Target in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0. Grundlinie (a), 80 nM komplementäres Target 4 min bei 42°C (b), 80 nM nichtkomplementäres Target 4 min bei 42°C (c), 80 nM Target 4min bei 3°C (d), 80 nM nichtkomplementäres Target bei 3°C (d)	88
Abb. 5.32: Einfluß von komplementären und nichtkomplementären Nukleinsäuren auf Signal. Messungen bei Raumtemperatur in TRIS-Puffer pH 7,5. Grundlinie der FRIZ-Sonde (a), 15 min Hybridisierung mit 0,8 µM komplementären Dabcyl-Target (b), Grundlinie der EcoR-Sonde (c), 30 min Hybridisierung von EcoR mit 0,8 µM Dabcyl-Target (d).....	89
Abb. 7.1.: Versuchsaufbau (A) und Schaltbild (B) für den Strömungsversuch.....	94
Abb. 7.2.: Strömungsversuche auf einem 6-Elektroden-LTCC-Array.	95

Literatur

- ¹ Hershey, A.D.; Chase, M.; (1952) J. Gen. Physiol. 36: 39-52
- ² Burgi, E.; Hershey, A.D.; (1963) Biophys. J. 3 (4): 309-321
- ³ Walker, G. T.; Fraiser, M.S.; Schram, J.L.; Little, M.C.; Nadeau, J.G.; Malinowski, D.P.; (1992) Nucl. Acids Res. Vol. 20 (7): 1691-1696
- ⁴ Oka, N.; Greenberg, M.M.; (2005) Nucl. Acids Res. Vol. 33 (5):1637-1643
- ⁵ Crey-Desbiolles, C.; Berthet, N.; Kotera, M.; Dumy, P.; (2005) Nucl. Acids Res. Vol. 33 (5):1532-1543
- ⁶ LePecq, J.B.; Yot, P.; Paoletti, C.; (1967) J. Mol. Biol. 27 (1): 87-97
- ⁷ Paoletti, C.; LePecq, J.B.; Lehman, I.R.; (1971) J. Mol. Biol. 55 (1): 75-100
- ⁸ Hodskinson, M.R.G.; Allen, L.M.; Thomson, D.P.; Sayers, J.R.; (2007) Nucl. Acids Res. 35 (12): 4094-4102
- ⁹ Southern, E.M.; (1975) J. Mol. Biol. 98 (3): 503-517
- ¹⁰ Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; Erlich, H.A.; (1988) Science 239: 487-491
- ¹¹ Mullis, K. M.; 1987 US-Patent 4,683,202
- ¹² Sharkey, D.J.; Scalice, E.R.; Christy, K.G.jr.; Atwood, SM.; Daiss, J.L.; (1994) Nature Bio/Technology 12: 506-509
- ¹³ Dang, Ch.; Jayasena, S.D.; (1996) J. Mol. Biol. 264 (2): 268-278
- ¹⁴ Lin, Y.; Jayasena, S.D.; (1997), J. Mol. Biol. 271 (1): 100-111

-
- ¹⁵ Yang, S.-W.; Astatke, M.; Potter, J.; Chatterjee, D.K.; (2002), Nucl. Acids Res. 30 (19): 4314-4320
- ¹⁶ Cline, J.; Braman, J.C.; Hogrefe, H.H; (1996) Nucl. Acids Res. 24 (18); 3546-3551
- ¹⁷ Villbrandt, B.; Sobek, H.; Frey, B.; Schomburg, D.; (2000) Protein Engineering 13 (9); 645-654
- ¹⁸ Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R.; (1993) Nature Bio/Technology 11;1026-1030
- ¹⁹ Ahram Biosystem Inc. (2003) Patent WO03/025226 A1
- ²⁰ Neuzil, P.; Zhang, C.Y.; Pipper, J.; Oh, S.; Zhuo, L.; (2006) Nucl. Acids Res. 34(11): e77
- ²¹ Ginot, F.; (1997) Human Mutation 10 (1): 1-10
- ²² Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R.; (1977) PNAS 74 (12): 5463-5467
- ²³ Palecek, E.; (1958) Die Naturwissenschaften 45 (8): 186-187
- ²⁴ Palecek, E.; (1960) Nature 188, 656-657
- ²⁵ Palacek, E.; (1992) Bioelectr. Bioenerg. 28 (1-2): 71-83
- ²⁶ Palecek, E.; Jelen, F.; (1977) Bioelectr. Bioenerg. 4 (4): 369-379
- ²⁷ Fojta, M.; Teijeriro, C; Palecek, E.; (1994) Bioelectr. Bioenerg. 34 (1): 69-79
- ²⁸ Valenta, P.; Nürnberg, H.W.; (1974) J. Electroanal. Chem. 49 (1): 55-75
- ²⁹ Brabec, V.; (1979) Biopolymers 18 (10): 2397-2404

-
- ³⁰ Hinnen, C.; Rousseau, A.; Parsons, R.(1981) *J. Electroanal. Chem.* 125 (1): 193-203
- ³¹ Brett, C.M.A.; Brett, A.M.O.; Serrano, S.H.P.; (1994) *J. Electroanal. Chem.* 366 (1-2): 225-231
- ³² Cai, X.H.; Rivas, G.; Farias, P.A.M.; Shiraishi, H.; Wang, J.; Fojta, M.; Palecek, E.; (1996) *Bioelectr. Bioenerg.* 40 (1): 41-47
- ³³ Wang, J.; Kawde, A.N.; Sahlin, E.; (1999) *The Analyst* 125 (1): 5-7
- ³⁴ Bollo, S.; Ferreyra, N.F.; Rivas, G.A.; (2007) *Electroanal.* 19 (7-8): 833-840
- ³⁵ Fan, C.H.; Song, H.Y.; Hu, X.F.; Li, G.X.; Zhu, J.Q.; Xu, X.X.; Zhu, D.X.; (1999) *Anal. Biochem.* 271 (1):1-7
- ³⁶ Hason, S.; Vetterl, V.; (2006) *Electrochim. Acta* 51 (24): 5199-5205
- ³⁷ Wang, J.; Kawde, A.N.; Erdem, A.; Salazar, M.; (2001) *The Analyst* 126 (11): 2020-2024
- ³⁸ Masarik, M.; Cahova, K.; Kizek, R.; Palecek, E.; Fojta, M.; (2007) *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (1): 259-270
- ³⁹ Millan, K.M.; Mikkelsen, S.R.; (1993) *Anal. Chem.* 65 (17): 2317-2323
- ⁴⁰ Erdem, A.; Kerman, K.; Meric, B.; Akarca, U.S.; Ozsoz, M.; (1999) *Electroanal.* 11 (8): 586-588
- ⁴¹ Kisko, J.L.; Barton, J.K.; (2000) *Inorg. Chem.* 39 (21): 4942-4949
- ⁴² Brunner, J.; Barton, J.K.; (2006) *Biochem.* 45 (40): 12295-12302

-
- 43 Li, X.-M.; Ju, H.-Q.; Ding, C.-F.; Zhang, S.-S.; (2007) *Anal. Chim. Acta* 582 (1): 158-163
- 44 Rodriguez, M.I.; Chavez-Gil, T.; Colon, Y.; Diaz, N.; Melendez, E.; (2005) *J. Electroanal. Chem.* 576 (2): 315-322
- 45 Steel, .B.; Herne, T.M.; Tarlov, M.J.; (1998) *Anal. Chem.* 70 (22): 4670-4677
- 46 Kelley, S.O.; Boon, E.M.; Barton, J.K.; Jackson, N.M.; Hill, M.G.; (1999) *Nucl. Acids Res.* 27 (24): 4830-4837
- 47 Meric, B.; Kerman, K.; Ozkan, D.; Kara, P.; Erensoy, S.; Akarca, U.S.; Mascini, M.; Ozsoz, M.; (2002) *Talanta* 56: 837-846
- 48 Wong, E.L.S.; Erohkin, P.; Gooding, J.J.; (2004) *Electrochem. Comm.* 6: 648-654
- 49 Chu, X.; Shen, G.-L.; Jiang, J.-H.; Kang, T.F.; Qiong, B.; Yu, R.-Q.; (1998) *Anal. Chim. Acta* 373:29-38
- 50 Mirkin, C.A.; Letsinger, R.T.; Mucic, R.C.; Storhoff, J.J.; (1996) *Nature* 328: 607-609
- 51 Wang, J.; Xu, D.; Kawde, A.-N.; Polsky, R.; (2001) *Anal. Chem.* 73 (22): 5576-5581
- 52 Wang, J.; Polsky, R.; Xu, D.; (2001) *Langmuir* 17 (19): 5739-5741
- 53 Rochelet-Dequaire, M.; Limoges, B.; Brossier, P.; (2006) *The Analyst* 131 (8): 923
- 54 Cai, H.; Xu, Y.; Zhu, N.; He, P.; Fang, Y.; (2002) *The Analyst* 127: 803-808

-
- ⁵⁵ Zhu, N.; Zhang, A.; Wang, Q.; He, Q.; Fang, Y.; (2004) *Elektroanal.* 16 (7): 577-581
- ⁵⁶ Palecek, E.; Lukasova, E.; Jelen, F.; Vojstiskova, M.; (1981) *Bioelectr. Bioenerg.* 497
- ⁵⁷ Fojta, M.; Havran, L.; Kizek, R.; Billova, S.; Palecek, E.; (2005) *Bios. Bioelectr.* 20 (5): 985-994
- ⁵⁸ Flechsig, G.-U.; Reske, T.; (2005) Patent DE 10 2005 039 726
- ⁵⁹ Takenaka, S.; Uto, Y.; Kondo, H.; Ihara, T.; Takagi, M.; (1994) *Anal. Biochem.* 218 (2): 436-443
- ⁶⁰ Mukumoto, K.; Nojima, T.; Sato, S.; Waki, M.; Takenaka, S.; (2007) *Anal. Science* 23: 115-119
- ⁶¹ Fan, C.; Plaxco, W.; Heeger, A.J.; (2003) *PNAS* 100 (16): 9134-9137
- ⁶² Hartwich, G.; Duntze, S.; (2003) *Laborwelt* 4 (2): 14-15
- ⁶³ Hartwich, G.; Caruana, D.J.; de Lumley-Woodyear, T.; Wu, Y.; Campbell, C.N.; Heller, A.; (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121 (46): 10803-10812
- ⁶⁴ Xiao, Y.; Lubin, A.A.; Baker, B. R.; Plaxco, K.W.; Heeger, A.J.; (2006) *PNAS* 103 (45):16677-16680
- ⁶⁵ Panke, O.; Kirbs, A.; Lisdat, F.; (2007) *Biosens. Bioelectr.* 22 (11): 2656-2662
- ⁶⁶ De Lumley-Woodyear, T.; Caruana, D.J.; Campbell, C.N.; Heller, A.; (1999) *Anal. Chem.* 71 (2): 394-398

-
- ⁶⁷ Azek, F.; Grossiord, C.; Joannes, M.; Limoges, B.; Brossier, P.; (2000) Anal. Biochem. 284 (1). 107-113
- ⁶⁸ [www. novatec-id.com/produktinfo/deutsch/CMV.pdf](http://www.novatec-id.com/produktinfo/deutsch/CMV.pdf)
- ⁶⁹ Wang, J.; Xu, D.; Erdem, A.; Polsky, R.; Salazar, M.S.; (2002) Talanta 56 (5): 931-938
- ⁷⁰ Wang, J.; Kawde, A.N.; Musameh, M.; Rivas, G.; (2002) The Analyst 121 (10): 1279-1282
- ⁷¹ Pötsch, W.R.; Fischer, A.; Müller, W.; Cassebaum, H.; (1988) Lexikon bedeutender Chemiker, VEB Bibliograph. Institut Leipzig 1. Aufl.: 434
- ⁷² Barker, G.C.; Gardner, A.W; (1975) J. Electroanal. Chem. 65 (1): 95-100
- ⁷³ Qiu, F.L.; Compton, R.G.; Coles, B.A.; Marken, F.; (2000) J. Electroanal. Chem. 492 (2): 150-155
- ⁷⁴ Coles, B.A.; Moorcroft, M.J.; Compton, R.G.; (2001) J. Electroanal. Chem. 513 (2): 87-93
- ⁷⁵ Compton, R.G.; Coles, B.A.; Marken, F.; (1998) Chem. Comm.: 2595
- ⁷⁶ Marken, F.; Matthews, S.L.; Compton, R.G.; Coles, B.A.; (2000) Electroanal. 12 (4): 267
- ⁷⁷ Förster, S.; Matysik, F.-M.; Ghanem, M.A.; Marken, F.; (2006) The Analyst 131 (11): 1210-1212
- ⁷⁸ Olivier, A.; Merienne, E.; Chopert, J.P.; Aaboubi, O.; (1992) Electrochim. Acta 37 (11): 1945-1950

-
- ⁷⁹ Gabrielli, C.; Keddah, M.; Lizee, J.-F.; (1983) *J. Electroanal. Chem.* 148 (2): 293-297
- ⁸⁰ Voß, T.; (1995) Universität Rostock, Diplomarbeit
- ⁸¹ Gründler, P.; Kirbs, A.; (1995) Patent DE 195 43 060 A1
- ⁸² Zerihun, T.; Gründler, P.; (1996) *J. Electroanal. Chem.* 404 (2):243-248
- ⁸³ Flechsig, G.-U.; Korbut, O.; Gründler, P.; (2001) *Electroanal.* 13: 786-788
- ⁸⁴ [www. hot-wire-electrochemistry.de](http://www.hot-wire-electrochemistry.de)
- ⁸⁵ Zerihun, T.; Gründler, P.; (1998) *J. Electroanal. Chem.* 441 (1-2): 57-63
- ⁸⁶ Gründler, P.; Flechsig, G.-U.; (1998) *Electrochim. Acta* 43(23): 3451
- ⁸⁷ Wang, J.; Gründler, P.; Flechsig, G.-U.; Jasinski, M.; Lu, J.; Wang, J.; Zhao, Zh.; Tian, B.; (1999) *Anal. Chim. Acta* 396 (1): 33-36
- ⁸⁸ Voß, T.; Thelemann, T.; (1998) Patent DE 198 42 735 A1
- ⁸⁹ Gründler, P.; Kirbs, A.; Zerihun, T.; (1996) *The Analyst* 121 (12):1805-1810
- ⁹⁰ Voß, T.; Kirbs, A.; Gründler, P.; (2000) *Fres. J. Anal. Chem.* 367: 320-323
- ⁹¹ Sun, J.J.; Guo, L.; Zhang, D.-F.; Yin, W.H.; Chen, G.-N.; (2007) *Electrochem. Comm.* 9: 283-288
- ⁹² Wang, J.; Gründler, P.; Flechsig, G.-U.; Jasinski, M.; Rivas, G.; Sahlin, E.; Paz, J.L.L.; (2000) *Anal. Chem.* 72 (16): 3752-3756
- ⁹³ Wang, J.; Flechsig, G.-U.; Erdem, A.; Korbut, O.; Gründler, P.; (2004) *Electroanal.* 16 (11): 928-931

-
- ⁹⁴ Harima, Y.; Aoyagui, S.; (1976) J. Electroanal. Chem. 69 (3): 419-422
- ⁹⁵ Sarac, H.; Wragg, A.A.; Patrick, M.A.; (1993) Electrochim.Acta 38 (17) 2589-2598
- ⁹⁶ Lau, C.; Reiter, S.; Schuhmann, W.; Gründler, P.; (2004) Anal. Bioanal. Chem. 379 (2): 255-260
- ⁹⁷ Lau, C.; Flechsig, G.-U.; Gründler, P.; Wang, J.; (2005) Anal. Chim. Acta 554 (1-2): 74-78
- ⁹⁸ Lau, C.; (2006) Universität Rostock; Dissertation
- ⁹⁹ IUPAC(1991) Pure Appl. Chem. 63: 1247-1250
- ¹⁰⁰ Gründler, P.; (2004) Chemische Sensoren 1. Aufl. Springer Verl. Berlin, Heidelberg, N.Y.; S. 6
- ¹⁰¹ Moussy, F.; Harrison, D.J.; (1994) Anal. Chem. 66 (5): 674-679
- ¹⁰² Csöregi, E.; Schmidtke, D.W.; Heller, A.; (1995) Anal. Chem. 67 (7): 1240-1244
- ¹⁰³ Gründler, P.; (2004) Chemische Sensoren 1. Aufl. Springer Verl. Berlin, Heidelberg, N.Y.; S. 162-164
- ¹⁰⁴ Riedel, K.; Neumann, B.; Scheller, F.; (1992) Chem.-Ing.-Tech. 64 (6): 518-528
- ¹⁰⁶ Yarapolov, A. I.; Malovik, W.; Varvolomeev, S. D.; Berezin, J. V.; (1979) Dokl. Akad. Nauk. 249: 1399 (russ.)

-
- ¹⁰⁶ Ruzgas, T.; Csöregi, E.; Emneus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; (1996) Anal. Chim. Acta 330 (2-3): 123
- ¹⁰⁷ Zhang, W. J.; Li, G. X.; (2004) Anal. Science 20 (4); 603-609
- ¹⁰⁸ Cosnier, S.; (2005) Electroanal. 17 (19): 1701-1715
- ¹⁰⁹ Willner, I.; Basnar, B.; Willner, B.; (2007) FEBS J. 247 (2): 302-309
- ¹¹⁰ Willner, I.; Riklin, A.; (1994) Anal. Chem. 66 (9): 1535-
- ¹¹¹ Sazani, P.; Kang, S.-H.; Maier, M. A.; Wie, C.; Dillman, J.; Summerton, J.; Manoharan, M.; Kole, R.; (2001) Nucl. Acids Res. 29 (19): 3965-3974
- ¹¹² Edman, C. F.; Raymond, D.E.; Wu, D.J.; Tu, E.; Sosnowski, R. G.; Butler, W.F.; Nerenberg, M.; Heller, M.J.; (1997) Nucl. Acids Res. 25 (24): 4907-4914
- ¹¹³ Kempeneers, V.; Renders, M.; Froeyen, M.; Herdewijn, P.; (2005) Nucl. Acids Res. 33 (12): 3828-3836
- ¹¹⁴ Nauwelearts, K.; Lescrinier, E.; Sclep, G.; Herdewijn, P.; (2005) Nucl. Acids Res., 33 (8): 2452-2463
- ¹¹⁵ Ichida, J. K.; Horhota, A.; Zou, K.; Laughlin, L. W.; Szostak, J. W.; (2005) Nucl. Acids Res. 33 (16): 5219-5225
- ¹¹⁶ Hillen, W.; Goodman, T.C.; Wells, R.D.; (1981) Nucl. Acids Res. 9 (2): 415-436
- ¹¹⁷ O'Brien, T. J.; Brooks, B. R.; Patierno, S. R.; (2005) Mol. Cell. Biochem. 279 (1-2): 85-95

-
- ¹¹⁸ Fornasaglio, J. L.; O'Brien, T. J.; Patierno, S. R.; (2005) *Mol. Cell. Biochem.* 279 (1-2): 149-155
- ¹¹⁹ Priyamvada, R.; Wemmer, D.E.; Linn, S.; (2005) *Nucl. Acids Res.* 33 (2): 497-510
- ¹²⁰ Hason, S.; Vetterl, V.; (2006) *Anal. Chem.* 78 (14): 5179-5183
- ¹²¹ Demidov, V. V.; Protozanova, E.; Izvolsky, K.J.; Price, C.; Nielsen, P.E.; Frank-Kamenetskii, M.D.; (2002) *PNAS* 99 (9): 5953-5958
- ¹²² Abibi, A.; Protozanova, E.; Demidov, V.V.; Frank-Kamenetskii, M.D.; (2004) *Biophys. J.* 86 (5): 3070-3078
- ¹²³ Ray, A.; Norden, B.; (2000) *FASEB J.* 14 (9):1041-1060
- ¹²⁴ Ørum, H.; Nielsen, P.E.; Engholm, M.; Berg, R.H.; Buchardt, O.; Stanley, C.; (1993) *Nucl. Acids Res.* 21 (23): 5332-5336
- ¹²⁵ Biver, T.; de Biasi, A.; Secco, F.; Venturini, M.; Yarmoluk, S.; (2005) *Biophys. J.* 89 (1): 374-383
- ¹²⁶ Prumera, M.; Castaneda, M. T.; Pividorri, M. I.; Eritja, R.; Merkoci, A.; Allegret, S.; (2005) *Langmuir* 21 (21): 9625-9626
- ¹²⁷ Yosypchuk, B.; Fojta, M.; Havran, L.; Heyrovsky, M.; Palacek, E.; (2006) *Electroanal.* 18 (2): 186
- ¹²⁸ Yan, C.; Zharnikov, M.; Götzhäuser, A.; Grunze, M.; (2000) *Langmuir* 16 (15): 6208-6215
- ¹²⁹ Raman, A.; Dubey, M.; Gouzman, I.; Gawalt, E.S.; (2006) *Langmuir* 22 (15): 6469-6472

-
- ¹³⁰ Hartwich, G.; Caruana, D.J.; de Lumley-Woodyear, T.; Wu, Y. B.; Campbell, C. N.; Heller, A.; (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121 (46): 10803-10812
- ¹³¹ Petrovykh, D. Y.; Perez-Dieste, V.; Opdahl, A.; Kimura-Suda, H.; Sullivan, J.M.; Tarlov, M.J.; Himpsel, F.J.; Whitman, L.J.; (2006) *J. Amer. Chem. Soc.* 128 (1): 2-3
- ¹³² Chahma, M.; Lee, J.S.; Kraatz, H.-B.; (2004) *J. Electroanal. Chem.* 567 (2): 283-287
- ¹³³ Jin, Y.; Yao, X.; Liu, Q.; Li, J.; (2007) *Biosens. Bioelectr.* 22 (6): 1126-1130
- ¹³⁴ Bergeron, F.; Houde, D.; Hunting, D.J.; Wagner, R.J.; (2004) *Nucl. Acids Res.* 32 (21): 6154-6163
- ¹³⁵ Hason, S.; Dvorak, J.; Jelen, F.; Vetterl, V.; (2002) *Talanta* 56 (5): 905-913
- ¹³⁶ Chaki, N.; Vijayamohanan, K.; (2002) *Bios. Bioelectr.* 17 (1-2): 1-17
- ¹³⁷ Boozer, C.; (2006) *Langmuir* 22 (10): 4694-4698
- ¹³⁸ Henze, G.; Neeb, R.; *Elektrochemische Analytik*; Springer Verl. Berlin 1986
- ¹³⁹ Parry, E.P.; Osteryoung, R.A.; (1965) *Anal. Chem.* 37 (13): 1634-1637
- ¹⁴⁰ Vanysek, P.; (1996) *Modern Techniques in Elektroanalysis* J.Wiley & Sons NY, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore; S.351
- ¹⁴¹ Underkofler, W. L.; Shain, I.; (1965) *Anal. Chem.* 37(2): 218-222
- ¹⁴² Barker, G. C.; Jenkins, I. L.; (1952) *The Analyst* 77 (920): 685
- ¹⁴³ Gründler, P.; (1998) *Fres. J. Anal. Chem.* 352:180

-
- ¹⁴⁴ Zerihun, T.; Gründler, P.; (1996) J. Elektroanal. Chem. 404: 243-
- ¹⁴⁵ Zerihun, T., (1997) Dissertation, Uni Rostock
- ¹⁴⁶ Anson, F.C.; (1966) Anal. Chem. 38 (1): 54-57
- ¹⁴⁷ Gründler, P. ; (2000) Fres. J. Anal.Chem. 367: 324-328
- ¹⁴⁸ Gründler, P.; Flechsig, G.-U.; (1998) Electrochim. Acta 43 (23): 3451
- ¹⁴⁹ Lau, C.; Gründler, P.; Poster ESEAG-Tagung 2004 Galway
- ¹⁵⁰ Palecek, E.; (1992) Methods in Enzym. 212: 139
- ¹⁵¹ Flechsig, G.-U.; Reske, T.; (2007) Anal. Chem. 79 (59): 2125-2130
- ¹⁵² Korbut, O.; Buckova, M.; Tarapcik, P.; Labuda, J.; Gründler, P.; (2001) J. Electroanal. Chem. 506 (2): 143-148
- ¹⁵³ Buckova, M.; Korbut, O.; Labuda, J.; Gründler, P.; (2003) Sensor 3(1):1-10
- ¹⁵⁴ Ferancova, A.; Buckova, M.; Korgova, E.;Korbut, O.; Gründler, P.; Wärnmark, I.; Stepan; R.; Barek; J.; Zima, J.; Labuda, J.; (2005) Bioelectrochem. 67 (2): 191-197
- ¹⁵⁵ Wang, J.; Gründler, P.; (2003) J. Electroanal. Chem. 540: 153-157
- ¹⁵⁶ Narayanan, S.; Gall, J.; Richter, C.; (2004) Nucl. Acid Res. 32 ,9; 2901-2911
- ¹⁵⁷ Sakata, T.; Maruyama, S.; Ueda, A.; Otsuka, H.; Miyahara, Y.; (2007) Langmuir 23 (5): 2269-2272
- ¹⁵⁸ Yang, X.; Perry, S.S.; (2003) Langmuir 19 (15): 6153-6139

-
- ¹⁵⁹ Munakata, H.; Oyamatsu, D.; Kuwabata, S.; (2004) *Langmuir* 20 (23): 10123-10128
- ¹⁶⁰ Florence, T. M.; (1965) *Austr. J. Chem.* 18: 609
- ¹⁶¹ Moreira, J.C.; Law, Ch.-F. J.; Fogg, A. G.; (1989) *The Analyst* 114 (12): 1607
- ¹⁶² Barek, J.; Cvacka, J.; Muck, A.; Quaiserova, V.; (2001) *Fres. J. Anal. Chem.* 369: 556
- ¹⁶³ Zima, J.; Barek, J.; Moreira, J.C.; Mejstrik, V.; Fogg, A.G.; (2001) *Fres. J. Anal. Chem.* 369: 567
- ¹⁶⁴ Barek, J.; Dodova, E.; Navratil, T.; Yosypchuk, B.; Novotny, L.; Zima, J.; (2003) *Electroanal.* 15 (2): 1778
- ¹⁶⁵ Flechsig, G.-U.; Peter, J.; Voß, K.; Gründler, P.; (2005) *Electrochem. Comm.* 7: 1059-1065
- ¹⁶⁶ Miyahara, H.; Yamashita, K.; Kanai, M.; Uchida, K.; Takagi, M.; Kondo, H.; Takenaka, S.; (2002) *Talanta* 56 (5): 825-839
- ¹⁶⁷ Nakayama, M.; Ihara, T.; Nakano, K.; Maeda, M.; (2002) *Talanta* 56 (5): 857-866
- ¹⁶⁸ Padeste, C.; Steiger, B.; Grubelnik, A.; Tiefenauer, L.; (2004) *Bios. Bioelectr.* 20 (3): 545
- ¹⁶⁹ Palecek, E.; Hung, M.A.; (1983) *Anal. Biochem.* 132 (2): 236-242
- ¹⁷⁰ Azim, S.; Riddiford, A. C.; (1962) *Anal. Chem.* 34 (8): 1023-1025
- ¹⁷¹ Vanderhoeven, J.; Pappaert, K.; Dutta, B.; Hummelen; P.V.; Desmet, G.; (2005) *Anal. Chem.* 77 (14): 4474-4480

-
- ¹⁷² Fojta, M.; Havran, L.; Billova, S.; Kostecka, P.; Masarik, M.; Kizek, R.; (2003) *Electroanal.* 15 (5-6): 431-440
- ¹⁷³ Beckmann, A.;(2005) Universität Rostock Dissertation
- ¹⁷⁴ Prathima, N.; Harini, M.; Rai, N.; Chandrashekara, R. H.; Ayappa, K.G.; Sampath, S.; Biswas, S.K.; (2005) *Langmuir* 21 (6): 2364-2374
- ¹⁷⁵ Caminade, A.-M.; Padie, C.; Laurent, R.; Maraval, A.;Majoral, J.-P.; (2006) *Sensors* 6: 901-914
- ¹⁷⁶ Streichen, M.; Dcrem, Y.; Godfroid, E.; Buess-Herman, C.; (2007) *Bios. Bioelectr.* 22 (8-9): 2237-2243

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Rostock, den 10.10.2007

Wissenschaftlicher Lebenslauf

Jörg Peter

Geboren am 15. Mai 1972 in Dresden

Schul Ausbildung

1979-1989	Polytechnische Oberschulen in Kamenz
1989-1991	Erweiterte Oberschule „Gotthold Ephraim Lessing“ in Kamenz

Wehrdienst

1991-1992	Wehrdienst
-----------	------------

Hochschulausbildung

1992-1997	Studium Biochemie an der „Martin-Luther- Universität“ Halle / Wittenberg
1996-1997	Diplomarbeit „Amperometrische Untersuchungen an unmodifizierten und enzymmodifizierten Kohlepastelelektroden“ bei PD Dr. Uwe Spohn
2004-2007	Promotionstudium Universität Rostock

Beruflicher Werdegang

1999-2001	wissenschaftlicher Mitarbeiter Firma ATEC GmbH Obrigheim(Baden) „Entwicklung und Einsatz von Bioadsorbentien bei der Abwasserreinigung“
2001-2002	wissenschaftlicher Mitarbeiter Firma Augustusburg Bio Tech GmbH „Entwicklung ionenspezifischer Bioadsorbentien“
2004-2007	wissenschaftlicher Mitarbeiter bei PD Dr. Gerd-Uwe Flechsig innerhalb des DFG-Forschungsprojektes „ DNA-Detektion an geheizten Elektroden“

Fremdsprachen

Grundkenntnisse Russisch

Englisch