

**Voltammetrische Detektierung der DNA-Hybridisierung von
Oligonukleotiden und PCR-Produkten an Goldelektroden mit
Osmiumtetroxid als kovalentem Marker**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock

von:
Dipl.-Chem. Thomas Reske
geb. am 20.08.1979 in Bergen auf Rügen

Betreuer: PD Dr. Gerd-Uwe Flechsig

Rostock, März 2009

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0098-6

1. Gutachter: PD Dr. Gerd-Uwe Flechsig, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. Frank-Michael Matysik, Universität Regensburg

Datum des Rigorosums: 12. Mai 2009

Datum der Verteidigung: 26. Mai 2009

Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei PD Dr. Gerd-Uwe Flechsig für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und das sehr interessante Thema, sowie für die vielen hilfreichen Anregungen bedanken. Er ermöglichte mir zudem einen dreimonatigen Forschungsaufenthalt bei Assoc. Prof. RNDr. Miroslav Fojta, Ph.D. in Brno (Tschechische Republik), bei dem und dessen Arbeitsgruppe ich mich ebenfalls für diese wertvolle und lehrreiche Zeit bedanken möchte.

Weiterhin danke ich der Arbeitsgruppe Flechsig für die sehr angenehme Atmosphäre und die vielen interessanten Diskussionen auch außerhalb des Labors. Insbesondere gilt dieser Dank Miriam Adamovski, Ph.D., Dr. Annette-Enrica Surkus, Dr. Sabine Haack, Dr. Jörg Peter, Harald Grabow, den Doktoranden Maren Mix, Heiko Duwensee, Falko Wachholz, Anne Walter und Martin Jacobsen, sowie Simone Krüger, Petra Sattler und Margrit Bartenwerfer. Ferner danke ich den Kollegen der Arbeitsgruppe von Prof. Zimmermann für interessante Gespräche und Ideen.

Für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion danke ich der DFG.

Nicht zuletzt gilt mein Dank denjenigen, die mit mir in der Freizeit und an den Wochenenden das Leben außerhalb der Universität bestreiten: meinen Freunden, meinen Eltern und Geschwistern und meiner Freundin Paulina.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
B-DNA	B-Konformation der DNA, häufigste in der Natur vorkommende DNA-Form
bipy	2,2'-Bipyridin
bp	base pair (Basenpaar)
C	Cytosin, auch Kohlenstoff
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ds-DNA	double stranded DNA (doppelsträngige DNA)
E	Potenzial
G	Guanin
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LTCC	low temperature co-fired ceramics (Ausführungsform einer indirekt heizbaren Elektrode)
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
P	statistische Sicherheit, auch Phosphor
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RDE	rotating disc electrode (rotierende Scheibenelektrode)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
SAM	self-assembled monolayer (selbstorganisierende Monoschicht)
s_B	Standardabweichung des Blindwertes
ss-DNA	single stranded DNA (einzelsträngige DNA)
SWV	square-wave-voltammetry
T	Thymin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T_m	melting temperature (Schmelzpunkt der DNA)
tRNA	transfer ribonucleic acid (Transfer-Ribonukleinsäure)
U	Uracil
UV	ultraviolet
x_E	Erfassungsgrenze
x_N	Nachweisgrenze

Inhaltsverzeichnis

Teil A

1. Aufgabenstellung	1
2. Einleitung	2
3. Theoretischer Teil	4
3.1. Desoxyribonukleinsäure (DNA)	4
3.2. Denaturierung und Renaturierung von DNA	5
3.3. Die Polymerase-Kettenreaktion	6
3.4. Der elektrochemische Biosensor	6
3.4.1. Elektrochemische DNA-Hybridisierungssensoren	7
3.4.2. $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ als Marker für Hybridisierungssensoren	10
3.5. Voltammetrie.	11
3.5.1. Square-Wave-Voltammetrie	11
3.6. Ladungstransport in der DNA	12
3.7. Nachweis- und Erfassungsgrenze	13
4. Resultate und Diskussion	14
4.1. Publikation I: Elektrochemische Detektierung der Hybridisierung von mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ markierten synthetischen Oligonukleotiden	14
4.1.1. Markierung mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ unter Zuhilfenahme eines Schutz-Stranges	14
4.1.2. Selektivität	14
4.1.3. Signalstabilität	15
4.1.4. Markierung und Detektierung langerkettiger (synthetischer) Einzelstränge	15
4.2. Publikation II: Nähere Untersuchungen der DNA-Hybridisierung	16
4.2.1. Einfluss der Konvektion	16
4.2.2. Bestimmung der Erfassungsgrenzen	17
4.3. Publikation III: Elektrochemische Detektierung der Hybridisierung von mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ markierten PCR-Produkten / Exonukleaseabbau	18
4.3.1. Erzeugung einzelsträngiger DNA durch Exonukleaseabbau	18
4.3.2. Einfluss von Temperatur und Hybridisierungsdauer	18
4.4. Publikation IV: Elektrochemische Detektierung der Hybridisierung von mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ markierten PCR-Produkten / Asymmetrische PCR	19
4.4.1. Erzeugung einzelsträngiger DNA durch asymmetrische PCR	19
4.4.2. Einfluss von Temperatur und Hybridisierungsdauer	19
4.5. Kinetische Untersuchungen der Markierungsreaktion	20
5. Zusammenfassung	25
6. Ausblick	26
6.1. DNA-Chips	26
6.2. Markierung von Reportersträngen (Publikation V)	26
6.3. Markierung von RNA	27
6.4. Aptamere	27
6.5. Weitere Marker	28
7. Literatur	29

Teil B

Diese Dissertation ist eine Zusammenfassung der Erkenntnisse verschiedener Untersuchungen rund um das Thema „Voltammetrische Detektierung der DNA-Hybridisierung von mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ markierten Oligonukleotiden und PCR-Produkten“, die von 2005 bis 2008 durchgeführt wurden, und deren Ergebnisse in folgenden Publikationen veröffentlicht worden sind:

- I. Flechsig G.U., Reske T., Electrochemical Detection of DNA-Hybridization by Means of Osmium Tetroxide Complexes and Protective Oligonucleotides, *Anal. Chem.* 2007, 79, 2125-2130
- II. Peter J., Reske T., Flechsig G.U., Comparison of DNA Hybridization at Heated and Rotating Gold Disk Electrodes, *Electroanalysis* 2007, 19, 1356-1361
- III. Reske T., Mix M., Bahl H., Flechsig G.U., Electrochemical Detection of Osmium Tetroxide Labeled PCR Products by means of Protective Strands, *Talanta* 2007, 74, 393-397
- IV. Mix M., Reske T., Duwensee H., Flechsig G.U., Electrochemical Detection of Asymmetric PCR Products by Labeling with Osmium Tetroxide, *Electroanalysis* 2009, 21, 826-830
- V G.-U. Flechsig, T. Reske, Verfahren zur Markierung und Analyse von Nukleinsäuren, DE-Patent 10 2005 039 726 B3 (2005), PCT-Anmeldung 2006

Publikation	Anteil
I	Durchführung aller Versuche, Beteiligung an Planung und Auswertung
II	Beteiligung an Durchführung und Auswertung der Versuche zum Einfluss der Rührgeschwindigkeit und zur Bestimmung der Nachweisgrenze, graphische Beiträge
III	Durchführung der meisten elektrochemischen Messungen und Auswertung dieser Versuche, schriftliche und graphische Beiträge
IV	Beteiligung an Durchführung und Auswertung der Versuche sowie an Probenvorbereitung (PCR), graphische Beiträge
V	Durchführung aller Versuche, Beteiligung an Planung und Auswertung

Teil A

1. Aufgabenstellung

Elektrochemische Untersuchungen der DNA-Hybridisierung, d.h. der Zusammenlagerung zweier komplementärer DNA-Abschnitte, können u.a. mit Hilfe verschiedenster kovalent gebundener Redoxmarker durchgeführt werden. Dazu gehören z.B. das Osmiumtetroxid und dessen Komplexe mit Pyridin, Bipyridin o.ä. heterocyclischen Verbindungen.

Es ist möglich, sich hierbei den DNA-Doppelstrang als einen Biosensor nutzbar zu machen, indem ein Einzelstrang als Rezeptor auf einer Elektrode immobilisiert wird, während der andere (komplementäre) als Analyt zu detektieren ist. In der dieser Arbeit vorangehenden Diplomarbeit wurde die Hybridisierung von mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ markierten DNA-Oligonukleotiden an verschiedenen Goldelektroden untersucht. Dabei wurde eine neue Methode entwickelt, die auf dem Signalerhalt durch die Verdrängung eines DNA-Stranges durch einen anderen beruht. Oligonukleotide haben nur eine sehr geringe Länge, verglichen mit echten DNA-Proben. Daher bestand die Hauptaufgabe dieser Arbeit darin, im Hinblick auf eine spätere Anwendung, diese neue Methode auf ihre Wirksamkeit bei DNA-Produkten, die einem biologischen Prozess entnommen wurden, zu überprüfen und hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Selektivität zu optimieren. Die einzelsträngig vorliegenden Proben wurden auf zwei verschiedene Arten gewonnen. Zum einen wurde im Anschluss an eine herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ein Einzelstrang des Produktes enzymatisch wieder abgebaut, zum anderen wurde eine asymmetrische PCR, deren Produkt ein Einzelstrang im Überschuss ist, durchgeführt. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Hybridisierung war der Einfluss der Temperatur während der Hybridisierung eingehend zu untersuchen.

2. Einleitung

DNA gehört als Träger der Erbinformation zu den wichtigsten und interessantesten Biomolekülen überhaupt. Ein besonders auffälliges strukturelles Merkmal ist die Doppelhelix, welche die DNA aus zwei komplementären Einzelsträngen im Normalzustand aufbaut¹. Der Vorgang der Zusammenlagerung dieser beiden Einzelstränge wird Hybridisierung genannt und ist reversibel (Dehybridisierung). Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Hybridisierung zu detektieren, der z.B. die Markierung eines Einzelstranges mit dem radioaktiven Phosphor² ³²P oder mit fluoreszierenden Farbstoffen (allein oder in Kombination mit einem Quencher)³ zu Grunde liegt. Diese Techniken haben allerdings verschiedene Nachteile, so etwa die kurze Halbwertszeit von ³²P (etwa zwei Wochen)⁴, die Entsorgung des radioaktiven Abfalls, der Bedarf nach einem speziellen Sichherheitslabor und ein z.T. recht hoher apparativer Aufwand. Eine gute Alternative dazu bietet hier die elektrochemische Detektierung. Sie beruht auf redoxaktiven Substanzen, die z.B. kovalent gebunden sind^{5, 6}, mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat interagieren⁷ oder in den Doppelstrang interkalieren können^{8, 9} oder (indikatorlos) auf der Oxidation des Guanins^{10, 11, 12}.

Bei einem elektrochemischen Hybridisierungssensor wird ein Einzelstrang (die Sonde) auf einer Elektrode immobilisiert. Nach erfolgreicher Hybridisierung mit dem komplementären Einzelstrang (dem Target) kann ein elektrisches Signal gemessen werden. Hierin liegt ein weiterer Vorteil, denn für die Auswertung braucht keine Signalwandlung mehr zu erfolgen. Die Immobilisierung kann dabei u.a. mittels magnetischer Beads^{13, 14} oder selbst organisierender Monoschichten (self-assembled monolayers, SAMs)^{15, 16, 17, 18, 19, 20, 21} erfolgen, welche die Elektrodenoberfläche bedecken und so vor unspezifischer Adsorption schützen. Auf Goldelektroden lassen sich Oligonukleotide mittels eines Thiollinkers¹⁵ immobilisieren.

Die ersten kovalenten Marker für Nukleinsäuren (DNA, RNA) basieren auf Osmiumtetroxidkomplexen mit Stickstoffliganden und wurden zu Beginn der 1980er Jahre von E. Palecek eingeführt^{22, 23, 24, 25}. Der Komplex [OsO₄(bipy)] reagiert mit den Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin (sowie Uracil in RNA) und bildet dabei die entsprechenden Osmat(VI)ester unter Oxidation der C-C-Doppelbindung des Pyrimidinringes^{26, 27, 28}. Ein Vorteil dieser Markierung ist, dass sie in jedem Labor durchgeführt werden kann. Zwar ist OsO₄ ein starkes Oxidationsmittel und Gift, doch wird es hier nur in geringen Konzentrationen (wenige mmol/L) verwendet. Allerdings reagiert der Komplex nur mit den Pyrimidinbasen in einzelsträngigen DNA-Abschnitten, welche nach erfolgter Reaktion nicht

mehr zur Hybridisierung befähigt sind. In der dieser Arbeit vorangehenden Diplomarbeit wurde eine neue Methode gefunden, die eine Markierung und anschließende Detektierung von Oligonukleotiden trotz dieser Einschränkungen möglich macht. Hierbei wird zunächst ein Abschnitt der zu markierenden einzelsträngig vorliegenden Nukleinsäure mit einem (nahezu komplementären) Schutzstrang hybridisiert, welcher nach Osmiummarkierung und Reinigung von der auf einer Elektrode immobilisierten Sonde verdrängt wird. Die Ergebnisse dazu wurden während meiner Promotionszeit (gemeinsam mit weiteren, später gewonnenen Erkenntnissen) veröffentlicht (Publikationen I und V).

In dieser Arbeit sollen verschiedene Parameter näher untersucht werden, welche einen Einfluss auf die Hybridisierung haben. Dazu gehören zum einen äußere Einflüsse wie das Rühren der Lösung, Hybridisierungstemperatur und –dauer, zum anderen aber auch die Sequenz der DNA-Stränge und die damit verbundene Anzahl der markierbaren Basen. Weiterhin werden ergänzende Informationen über die Kinetik der Markierungsreaktion der verschiedenen Pyrimidinbasen dargelegt.

Hauptsächlich soll jedoch davon berichtet werden, wie diese Methode auf längere DNA-Proben (PCR-Produkte) übertragen werden kann. Um die hierfür benötigte einzelsträngige DNA herzustellen, wurden zwei verschiedene Methoden genutzt. Zum einen wurde sie aus einem PCR-Produkt durch Nukleaseabbau gewonnen und zum anderen wurde eine asymmetrische PCR durchgeführt, um einen Einzelstrang im Überschuss zu erhalten.

In den Ausblicken soll gezeigt werden, wie die Methode für weitere vielversprechende Anwendungen in der Elektroanalytik genutzt werden könnte.

3. Theoretischer Teil

3.1. Desoxyribonukleinsäure (DNA)

DNA gehört wie auch RNA (Ribonukleinsäure) zu den Nukleinsäuren. Sie ist Trägerin der Erbinformation und kommt in fast allen lebenden Organismen (mit Ausnahme einiger Viren) vor. Sie ist ein Polymer, das aus verschiedenen Nukleosiden aufgebaut ist, die miteinander über Phosphatgruppen am dritten bzw. fünften C-Atom der Desoxyribose verknüpft sind. Die Enden der Stränge, an deren C-Atomen Hydroxylgruppen vorliegen, werden dementsprechend als 3'- bzw. 5'-Ende bezeichnet.

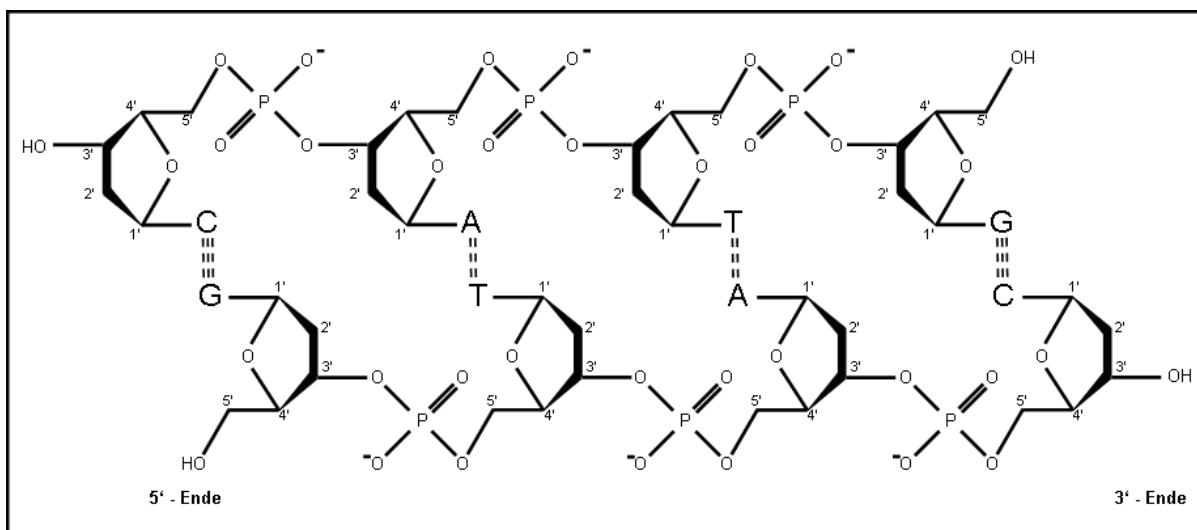


Abbildung 3-1 Schematische Darstellung eines DNA-Ausschnittes; zwischen den komplementären Basen sind die Wasserstoffbrücken angedeutet

DNA liegt doppelsträngig vor, d. h. zwei zueinander komplementäre Einzelstränge sind miteinander über Wasserstoffbrücken, die sich jeweils zwischen den Basenpaaren Guanin und Cytosin bzw. Adenin und Thymin ausbilden, verbunden. Der Doppelstrang ist weiterhin aufgrund hydrophober Wechselwirkungen durch Basenstapelung und durch ionische Wechselwirkungen der geladenen Phosphatgruppen stabilisiert²⁹.

Die in der Natur am häufigsten vorkommende Form der DNA, die sogenannte B-DNA, ähnelt in ihrer Struktur einer rechtsläufigen Spirale aus zwei Bändern.

Die Länge der DNA kann von einigen tausend Basenpaaren (bp) bei Viren (z.B. ca. 6400 bp bei dem Bakteriophagen M13) bis zu mehreren Milliarden Basenpaaren bei höheren Lebewesen (Mensch, etwa 3 Mrd. bp) variieren.

3.2. Denaturierung und Renaturierung von DNA

Der DNA-Doppelstrang lässt sich durch Erhitzen oder mild alkalische Behandlung in seine beiden Einzelstränge auftrennen. Dabei werden die Wasserstoffbrücken zwischen komplementären Basenpaaren gelöst. Dieser Prozess wird Denaturierung (auch Schmelzen oder Dehybridisierung) genannt und ist mit der Änderung verschiedener physikalischer Eigenschaften der Lösung verbunden. Er lässt sich beispielsweise unter Beobachtung der UV-Absorption in Form einer Schmelzkurve aufnehmen.

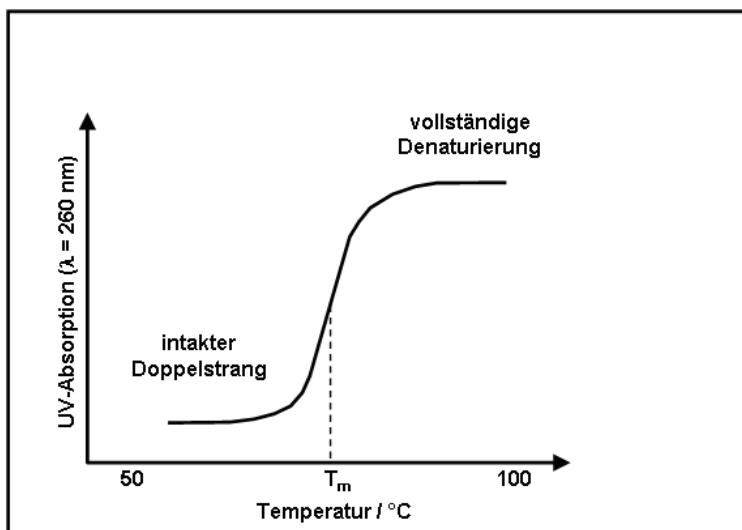


Abbildung 3-2 Schmelzkurve einer typischen DNA

Der Doppelstrang absorbiert aufgrund von Wechselwirkungen zwischen den Elektronen der komplementären Basen weniger UV-Licht. Die Temperatur, bei der die Hälfte der maximalen Absorptionsänderung erfolgt, wird Schmelztemperatur genannt. Sie ist vom GC-Gehalt (Anteil der komplementären Basen Guanin und Cytosin im Doppelstrang), vom pH-Wert, von der Polarität des Lösungsmittels und der Ionenstärke der Lösung abhängig. Nach der empirischen Formel 3.1.³⁰ lässt sich die Schmelztemperatur in guter Näherung bestimmen.

$$T_m = 81,5 \text{ } ^\circ\text{C} + 16,6 \text{ } ^\circ\text{C} \cdot \lg [\text{Na}^+] + 41 \text{ } ^\circ\text{C} \cdot (\text{G}+\text{C}) \cdot \text{L}^{-1} - 500 \text{ } ^\circ\text{C} \cdot \text{L}^{-1} \quad (3.1.)$$

Hierbei ist G+C die Summe der Guanin- und Cytosinbasen und L die Gesamtzahl der Basen.

3.3. Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA. Sie wurde von Kary Mullis erfunden, der dafür 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde.

Im Prinzip ist die Vervielfältigung ein in mehreren Zyklen stattfindender Prozess. Zunächst wird die zu amplifizierende DNA-Probe bei Temperaturen knapp unter 100 °C dehybridisiert. Im nächsten Schritt werden kurze einzelsträngige DNA-Oligonukleotide (Primer) dazugegeben. Deren Sequenz wird so gewählt, dass sie sich an den Enden des Bereiches, der vervielfältigt werden soll, gegenläufig anlagern. Eine spezielle, hitzebeständige DNA-Polymerase synthetisiert dann, ausgehend von den Primern, den kompletten DNA-Strang. Die dafür benötigten einzelnen Nukleotide liegen in der Lösung vor.

Diese Schritte werden ca. 25mal wiederholt, so dass am Ende die Menge der ursprünglichen Probe um ein Millionenfaches vervielfältigt wurde³¹.

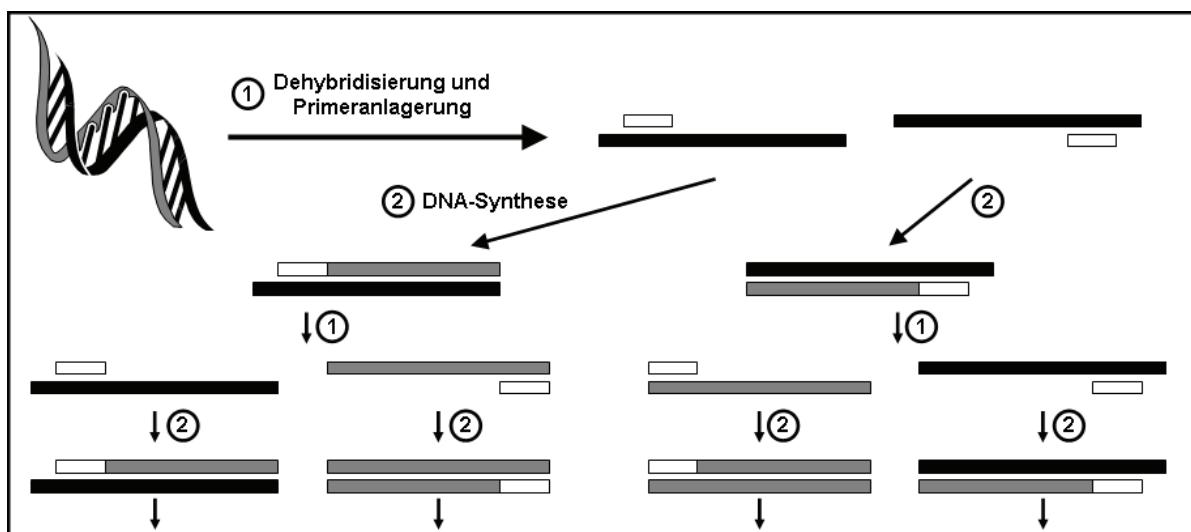


Abbildung 3-3 Schematischer Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion

3.4. Der elektrochemische Biosensor

Laut IUPAC-Definition ist ein elektrochemischer Biosensor eine ganzheitliche, eigenständige Vorrichtung, die imstande ist, unter Benutzung eines biologischen Erkennungselementes (Biochemischer Rezeptor), das sich in direktem räumlichen Kontakt mit einem elektrochemischen Transduktionselement befindet, spezifische quantitative oder halbquantitative analytische Informationen zu liefern³².

Wegen ihrer Fähigkeit, wiederholt kalibriert zu werden, unterscheiden sich Biosensoren von einem bioanalytischen System, das zusätzlicher Prozessschritte wie z.B. der Zugabe von Reagenzien bedarf³³.

Weiterhin werden Sensoren nach der Art des Rezeptors in biokatalytische (Sensor basiert auf einer Reaktion, die durch Makromoleküle katalysiert wird) bzw. Bioaffinitätssensoren (Sensor basiert auf Wechselwirkung des Analyten mit Makromolekülen) unterteilt.

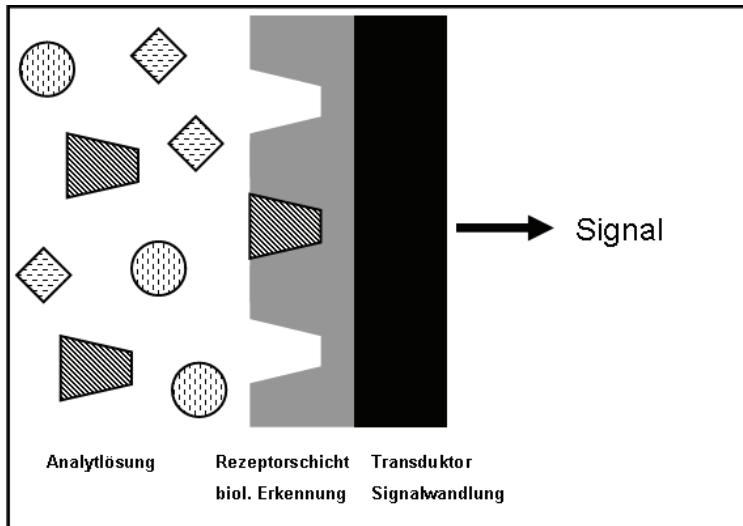


Abbildung 3-4 Schematische Darstellung eines Biosensors; die Wechselwirkung des passenden Analytmoleküls mit der Rezeptorschicht erzeugt ein Signal, welches zunächst gewandelt und dann messbar wird

3.4.1. Elektrochemische DNA-Hybridisierungssensoren

Eine Ausführungsform der Bioaffinitätssensoren sind die sogenannten Hybridisierungssensoren. Hier wird ein Einzelstrang als Rezeptor auf einer Elektrode immobilisiert (die sogenannte Sonde), während der zweite, komplementäre Strang (das Target) als Analyt nach erfolgreicher Hybridisierung detektiert wird. Die Sonde ist dabei meist ein Oligonukleotid mit einer Länge von 10 bis 100 Basen. Sie ist in der Regel kürzer als der Targetstrang, dessen Länge über den zur Sonde komplementären Teil weit hinaus gehen kann.

Die Immobilisierung der Sonde kann auf verschiedene Arten erfolgen. Von geringerer Bedeutung ist hier die Adsorption, die den Nachteil einer relativ starren Fixierung der Sonde auf der Oberfläche hat.

Als stabiler erweist sich eine kovalente Bindung des Oligonukleotids an die Elektrodenoberfläche. Diese erfordert zwar eine Modifizierung der Sonde und somit einen weiteren Arbeitsschritt, jedoch bietet sie den Vorteil, dass das Oligonukleotid über ein Kettenende fixiert werden kann. Wenn sich dann der Hauptabschnitt des Oligonukleotids von der

Elektrodenoberfläche aufrichtet, so dass er frei in die Lösung hineinragt, ist eine Hybridisierung mit dem komplementären Targetstrang erleichtert.

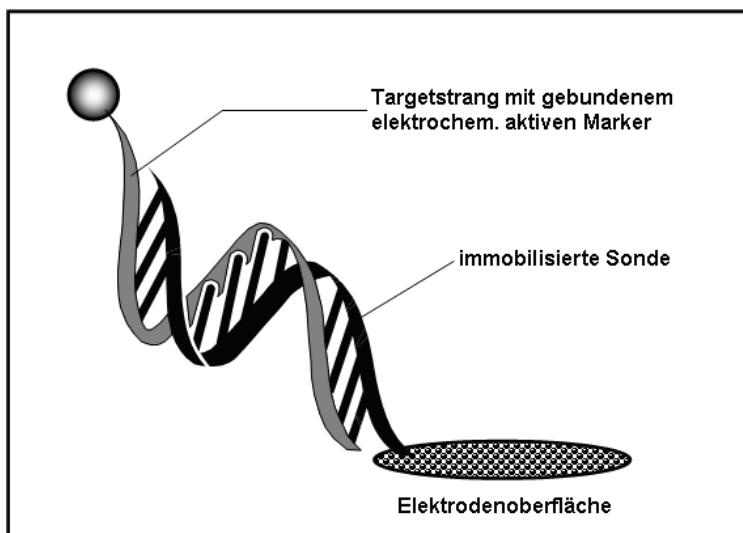


Abbildung 3-5 Schematische Darstellung eines elektrochemischen Hybridisierungssensors

Eine Möglichkeit zur kovalenten Bindung bietet die Avidin-Biotin-Reaktion., bei der das Avidin auf einer Oberfläche fixiert wird. Dieses Protein kann bis zu vier Biotinmoleküle binden, welche wiederum in der Lage sind, mit DNA zu reagieren³⁴. Durch Fixierung des Avidins auf kleinen magnetischen Kugelchen, den sogenannten „magnetic beads“, ergibt sich eine gute Methode, um z.B. Trenn- und Reinigungsprozeduren ohne großen Substanzverlust durchzuführen¹².

Eine andere Möglichkeit, die Sonde kovalent auf einer Oberfläche zu fixieren, bieten die selbstorganisierenden Monoschichten (SAM, self-assembled monolayers). Diese bestehen aus einem Grundgerüst aus Alkylketten, an deren Ende mittels einer funktionellen Gruppe die kovalente Bindung zur Elektrodenoberfläche hergestellt wird. Für Goldoberflächen haben sich Alkanthiole¹⁵ als sehr gut geeignet erwiesen, für Glas Alkyltrichlorsilane³⁵ und für Metalloxide Carbonsäuren³⁶. Am anderen Ende der Alkylkette befindet sich eine weitere funktionelle Gruppe, über die dann die verschiedensten Moleküle (beispielsweise Nukleinsäuren) gebunden werden können.

Für die Ausbildung einer solchen SAM muss die Elektrode lediglich für eine kurze Zeit in die entsprechende Lösung getaucht beziehungsweise eine geringe Menge der Lösung auf die Elektrode gegeben werden. Eventuelle Löcher (unbedeckte Stellen) in der Schicht lassen sich durch Nachbelegung mit einer zweiten SAM schließen. Dies unterbindet außerdem eine unspezifische Adsorption der Sonde über die Stickstoffatome der Basen und führt zu dem o.g.

Aufrichten der Sondenstränge¹⁵. Letztlich ist die SAM so kompakt, dass die Leitfähigkeit der Elektrode hier auf einen Wert in der Größenordnung von Polyethylen reduziert wird³⁵.

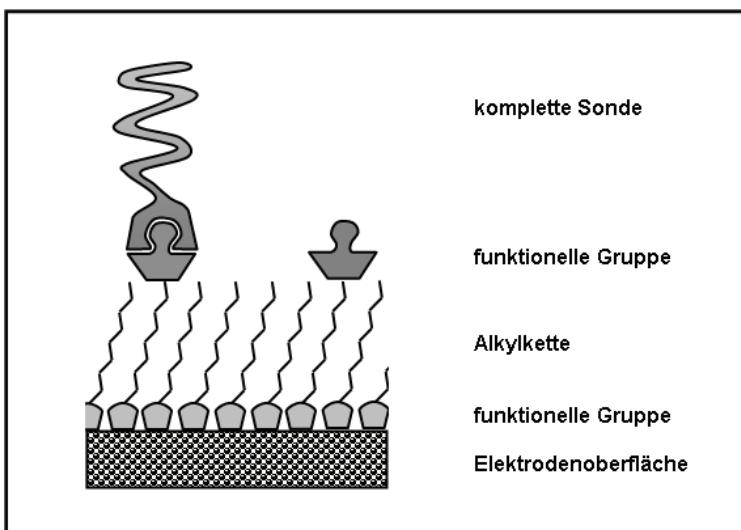


Abbildung 3-6 Schematische Darstellung einer selbstorganisierenden Monoschicht (SAM); einzelne Moleküle der schichtbildenden Substanz sind mit einer zweiten funktionellen Gruppe versehen, an die beispielsweise ein DNA-Einzelstrang gebunden werden kann (in diesem Fall die Sonde)

Eine gelungene Hybridisierung lässt sich elektrochemisch, optisch und massensensitiv detektieren, wobei sich bis heute in der Molekularbiologie weitgehend die optische Detektierung durchgesetzt hat. Sie beruht in erster Linie auf der Markierung des Targetstranges mit fluoreszierenden oder lumineszierenden Stoffen wie Fluorescein oder Rhodamin. Ethidiumbromid ist ein weiterer bedeutender Marker, der sich aufgrund seiner planaren Struktur jedoch in den Doppelstrang interkaliert, was die Markierungsprozedur vereinfacht. Es hat jedoch mutagene Eigenschaften und ist daher nur unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen zu verwenden.

Elektrochemische Hybridisierungssensoren haben den Vorteil, preiswerter und vor allem klein zu sein, wodurch auch eine Vor-Ort-Analytik ermöglicht wird. Außerdem lässt sich das analytische Signal direkt (d.h. ohne zusätzliche Signalwandlung) auswerten.

So kann die Hybridisierung mit Hilfe redoxaktiver Substanzen detektiert werden, die beispielsweise kovalent gebunden sind (Ferrocen und einige seiner Derivate^{37, 38} oder Osmiumtetroxidkomplexe mit Stickstoffliganden^{22, 39}), die mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat interagieren⁴⁰ oder in den Doppelstrang interkalieren können (Daunomycin⁴¹, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{2+}$, ⁴²). Sie ist aber auch indikatorlos nachweisbar, basierend auf der Oxidation des Guanins¹⁰. Hierzu werden in der Sonde sämtliche Guaninbasen gegen Inosin ausgetauscht, welches erst bei wesentlich höheren Potentialen (als Guanin) oxidiert wird.

Lagert sich der komplementäre Strang (dieser muss Guanin enthalten) an, ist ein Oxidationsstrom messbar.

3.4.2. **[OsO₄(bipy)] als Marker für Hybridisierungssensoren**

Osmiumtetroxid wird in der Elektronenmikroskopie als Fixier- und Färbemittel verwendet. In der chemischen Synthese dient es zur Oxidation der Doppelbindung von Alkenen. Eine anschließende Hydrolyse liefert dann als Reaktionsprodukt cis-Diole. Aufgrund ihrer Struktur sind auch Nukleinsäuren zur Reaktion mit Osmiumtetroxid geeignet. Emil Palecek nutzte zu Beginn der 1980er Jahre dieses Molekül erstmals als kovalenten Marker für die elektrochemische Detektierung von DNA^{22, 23}. Die C-C-Doppelbindung aller Pyrimidinbasen ist hierbei im Gegensatz zu den Purinbasen für die Oxidation geeignet^{26, 27}. Es bildet sich der jeweilige Osmatester mit der Oxidationsstufe +VI des Osmiums. Die Reaktion läuft in Anwesenheit von Stickstoffliganden wie Pyridin beschleunigt ab. 2,2'-Bipyridin erhöht die Geschwindigkeit sogar noch einmal (im Falle des Thymins beispielsweise um das 100fache). Außerdem verhindern die Liganden die Hydrolyse der Osmatester, so dass die elektrochemische Messung überhaupt durchführbar wird^{43, 44}.

Im Allgemeinen reagiert Thymin mit [OsO₄(bipy)] etwa um das 10fache schneller als Cytosin⁴⁵. Diese Reaktion ist jedoch nur am Einzelstrang (und an fehlgepaarten Doppelstrangabschnitten) möglich. Die Ursache hierfür ist, dass sich in helikaler B-DNA die C-C-Doppelbindung des Thymins in der großen Furche befindet, wo sie für den relativ großen Osmiumtetroxidkomplex nicht zugänglich ist²⁵. Die Einzelstränge bzw. Einzelstrangabschnitte sind nach der Markierung jedoch nicht mehr in der Lage mit ihren komplementären Gegenstücken zu hybridisieren.

Der große Vorteil der Osmiumtetroxidmarkierung ist, dass sie in jedem Labor selbst durchgeführt werden kann, also keine markierten Targetstränge gekauft werden müssen.

3.5. Voltammetrie

Die Voltammetrie ist das hier zur Detektierung der Hybridisierung genutzte elektrochemische Verfahren. Sie beruht darauf, dass einem System eine ansteigende Spannung vorgegeben und der Strom gemessen wird. Sobald das System eine elektrochemisch aktive Substanz enthält und das Potential, bei dem diese Substanz oxidiert bzw. reduziert wird, erreicht wird, ist ein Stromfluss messbar. Die Auswertung dieses Stromflusses mit Hilfe von Strom-Spannungs-Kurven (Voltammogrammen) erlaubt dann qualitative (über das Potential) und quantitative Rückschlüsse (über die Höhe des Stroms) auf den Analyten.

Während der elektrochemischen Umsetzung an der Elektrodenoberfläche ändert sich die Konzentration der redoxaktiven Spezies, die dann durch Diffusion nachgeliefert wird. Dabei bildet sich vor der Elektrode eine Diffusionsschicht aus. In bewegter Lösung ist deren Schichtdicke konstant, bei ruhender Lösung nimmt sie mit der Zeit zu. Dabei kommt es zu einem Stromabfall, der über die Cottrell-Gleichung beschrieben wird:

$$i = n \cdot F \cdot A \cdot c_0 \cdot \sqrt{\frac{D}{\pi \cdot t}} \quad (3.2.)$$

Hierbei ist D der Diffusionskoeffizient, A die Elektrodenoberfläche, F die Faradaykonstante und c_0 die Analytkonzentration in der Lösung⁴⁶.

3.5.1. Square-Wave-Voltammetrie (SWV)⁴⁷

Bei der SWV, einer Pulsmethode, steigt die angelegte Spannung treppenförmig an. Sie wird dabei jedoch von einer rechteckigen Wechselspannung überlagert. Diese rechteckförmige Wechselspannung kann auch als Abfolge von positiven und negativen Spannungspulsen angesehen werden, welche der Basisspannung überlagert sind. Die Anzahl der Rechteckschwingungen pro Stufe kann Eins oder auch wesentlich größer als Eins sein.

Der resultierende Strom setzt sich aus einem kapazitiven und einem faradayschen Anteil zusammen. Die SWV nutzt nun den Effekt der Zunahme des Verhältnisses von faradayschem (entsteht bei Stoffumsatz) zum kapazitiven Strom (ändert die Ladung der elektrochemischen Doppelschicht auf der Elektrodenoberfläche; Störkomponente). Beide Ströme nehmen im Laufe eines Pulses ab, jedoch mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Die Strommessung erfolgt dann jeweils am Ende des positiven und des negativen Pulses, weil dort fast nur Faradaysche Ströme erfasst werden. Das aufgezeichnete Stromsignal ist im Allgemeinen die

Differenz der Signale der beiden Strommessungen. Durch den Wegfall der störenden kapazitiven Ströme wird ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis erhalten.

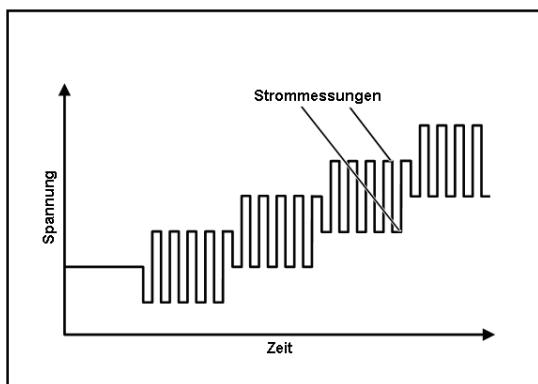


Abbildung 3-7 Spannungs-Zeit-Funktion der SWV

Das Resultat ist ein glockenförmiges Voltammogramm, dessen Höhe der Analytkonzentration direkt proportional ist. Ein großer Vorteil der SWV ist die relativ kurze Messzeit, die in der Regel nur wenige Sekunden beträgt.

3.6. Ladungstransport in der DNA

Der elektrochemische DNA-Sensor besteht aus Sonden- und markiertem Targetstrang. Dabei befinden sich nicht alle kovalent gebundenen elektrochemischen Marker in unmittelbarer Nähe der Elektrodenoberfläche und es muss geklärt werden, auf welche Weise der Ladungstransport in der DNA möglich ist. Allerdings sind die Erkenntnisse heute noch nicht in jedem Detail gesichert.

Über DNA-vermittelte Ladungstransportprozesse ist bekannt, dass sie in schnellen und ultraschnellen Zeitabständen auftreten können, dass sie verschiedenen Mechanismen folgen (abhängig vom untersuchten DNA-Assay und von der Entfernung) und dass sie chemische Reaktionen über Entfernungen im nm-Bereich erzeugen können⁴⁸.

Es ist weiterhin bekannt, dass der Transport über die Basen und nicht über das Zuckerkohlenstoffrückgrat erfolgt⁴⁹. Dabei werden bis zu 20 nm⁵⁰ (eine Windung von B-DNA hat eine Länge von etwa 3,4 nm und entspricht 10 bp³¹) überwunden.

Allerdings ist die mechanistische Beschreibung des Ladungstransports in DNA noch nicht vollständig geklärt und eine komplette und klare Beschreibung der elektronischen Eigenschaften innerhalb der Basenstapel fehlt noch.

Prinzipiell wird zwischen oxidativem Elektronenlückentransport und reduktivem Elektronentransport unterschieden. So gibt es beispielsweise das Modell des Elektronenspringens (electron hopping) im Anschluss an eine Oxidation des Guanins⁵¹. Ein Beispielmodell für den bisher weniger erforschten reduktiven Transport basiert auf der Reduktion von Thymin und einen anschließenden hopping-Mechanismus⁵².

3.7. Nachweis- und Erfassungsgrenze⁵³

Die Nachweisgrenze x_N ist die kleinste Menge oder Konzentration eines Stoffes, die mit einer geforderten statistischen Sicherheit (meist $P = 95\%$) bei einmaliger Analyse qualitativ nachgewiesen werden kann.

Ihre Bestimmung wird durch die DIN 32645 geregelt. Sie kann auf rechnerischem Weg ermittelt werden:

$$x_N = 3 \frac{s_B}{b} \quad (3.3.)$$

Hierbei ist s_B die Standardabweichung des Blindwertes und b die Empfindlichkeit der entsprechenden Kalibriergeraden. Das statistische Fehlerrisiko beträgt dabei 50 %. Mit hinreichender Sicherheit nachweisbar ist der Stoff, wenn das Signal der Probe das Signal des Blindwertes um das sechsfache der Standardabweichung übersteigt. Diesen Wert wird als Erfassungsgrenze x_E bezeichnet:

$$x_E \approx 6 \frac{s_B}{b} \quad (3.4.)$$

Die IUPAC definiert als „detection limit“ die Erfassungsgrenze⁵⁴.

Die graphische Ermittlung der Nachweis- und Erfassungsgrenze ist nach dem sogenannten Kalibrierkurvenverfahren möglich⁴⁶. Hierzu werden die normal verteilten, in einem linearen Bereich liegenden, ermittelten Messwerte mit der dazugehörigen Regressionsgeraden aufgetragen. Dabei sollte die höchste Konzentration die erwartete Nachweisgrenze maximal um das Zehnfache übertreffen. Mit der Regressionsgeraden sollen auch die zugehörigen Vertrauensbereichfunktionen aufgetragen werden. Der Schnittpunkt der oberen Vertrauensbereichsgrenze mit der y-Achse ist die obere Prognoseintervallsgrenze. Der diesem Wert entsprechende x-Wert der Regressionsfunktion ist die Nachweisgrenze, der entsprechende Wert auf der unteren Vertrauensbereichsfunktion die Erfassungsgrenze.

4. Resultate und Diskussion

4.1. Publikation I: Elektrochemische Detektierung der Hybridisierung von mit [OsO₄(bipy)] markierten synthetischen Oligonukleotiden

4.1.1. Markierung mit [OsO₄(bipy)] unter Zuhilfenahme eines Schutzstranges

Bisher war es nur möglich, einzelsträngige Nukleinsäuren mit [OsO₄(py)₂] bzw. [OsO₄(bipy)] zu markieren, da die reaktionsfähige C-C-Doppelbindung in doppelsträngigen DNA-Abschnitten abgeschirmt wird²⁵. Die Tatsache, dass zudem einmal markierte Pyrimidinbasen nicht mehr mit der dazugehörigen komplementären Purinbase hybridisieren können, ließ uns nach einem Ausweg suchen. Die Lösung war die Einführung eines Schutzstranges, der gerade so lang ist wie die Sonde und dessen Struktur der der Sonde nahezu (bis auf - je nach Länge und Zusammensetzung der Sonde - ein bis fünf Fehlpaarungen) identisch ist. Zunächst ist der Targetstrang so konstruiert worden, dass er fünf Basen mehr enthielt als die Sonde. Bei diesen handelte es sich ausschließlich um das sehr gut markierbare Thymin (Publikation I, Schema 2).

Nach der Hybridisierung von Target- und Schutzstrang ist dann die Markierungsprozedur (mit anschließender Dialyse) durchgeführt worden. Erst danach wird die Sonde mit dem geschützten Targetstrang zusammengeführt, wobei sie den Schutzstrang infolge dessen Fehlpaarungen verdrängt. Daraufhin wird ein voltammetrisches Signal messbar, dass auf der Reduktion des Osmiumkomplexes beruht.

4.1.2. Selektivität

Die erfolgreiche Hybridisierung lieferte einen Peak bei $E = -0,35$ V, der dem reversiblen Redoxpaar Osmium (+IV/+VI) zuzuordnen ist⁵⁵. Um zu garantieren, dass nur der komplementäre Targetstrang dieses Signal liefert, wurden Messungen mit einem nicht komplementären Targetstrang, der unter gleichen Bedingungen markiert wurde, durchgeführt. Hier konnte tatsächlich kein Peak gefunden werden (Abb.1b). Es wurden weiterhin Hybridisierungsversuche mit einem markierten Schutzstrang durchgeführt (da dieser während der Markierungsprozedur im großen Überschuss vorliegt und aus der Analytlösung nicht entferbar ist). Erwartungsgemäß lieferte dieser jedoch kein Signal (Abb. 1c), denn einmal markierte Einzelstränge sind zu keiner Hybridisierung mehr im Stande.

4.1.3. Signalstabilität

In Abbildung 4 wird gezeigt, dass wiederholtes Hybridisieren und Dehybridisieren bei verschiedenen Temperaturen (23, 50 und 70 °C) an einer Sonden-SAM ein gleichbleibend hohes Signal liefert. Der Dehybridisierungsschritt bestand darin, dass die Elektrode mit der immobilisierten Sonde für eine Minute in 50 °C warmes entionisiertes Wasser getaucht wurde. Durch die verhältnismäßig hohe Temperatur bei gleichzeitigem Fehlen von stabilisierend wirkenden Ionen konnten 95 bis 100 % des Targetstranges wieder von der Sonde abgelöst werden.

Es ist also eine sehr gute Reproduzierbarkeit gewährleistet. Allerdings ist bei Verwendung mehrerer unter gleichen Bedingungen vorbehandelter Elektroden die Messung von verschiedenen hohen Signalen nicht ungewöhnlich. So können sich die Signalhöhen zweier Elektroden um bis zu 20 % voneinander unterscheiden. Ursache hierfür ist zum einen, dass durch mechanisches Polieren nie eine identisch große Elektrodenoberfläche hergestellt werden kann, zum anderen adsorbieren sich bei jedem Auftragen der Sonde unterschiedlich viele Sondenmoleküle in verschiedenen Abständen zueinander (auf der Elektrodenoberfläche).

4.1.4. Markierung und Detektierung langerkettiger (synthetischer) Einzelstränge

Bisher wurde lediglich über Erkenntnisse berichtet, die mit kurzkettigen DNA-Oligonukleotiden (Kettenlänge = 20 bis 25 bp) gewonnen wurden. Ob die Markierungsprozedur ebenso bei langerkettigen DNA-Einzelsträngen funktionieren würde (Kettenlänge > 100 Basen), war nicht bekannt. Einzelstränge dieser Länge werden beispielsweise bei Restriktionsexperimenten mit chromosomaler DNA erhalten und können mit der PCR vervielfältigt werden.

Es zeigte sich, dass es unter Beibehaltung aller Parameter der Prozedur möglich ist, auch längere Einzelstränge (120 Basen; hier noch synthetisch hergestellt) zu markieren und Hybridisierungsergebnisse derselben zu detektieren (Abbildung 6). Durch die größere Länge des Targetstranges und die damit verbundene erhöhte Anzahl an zu markierenden Basen (38mal Thymin), konnte im Vergleich zu den kurzen Oligonukleotiden schon bei den ersten Versuchen eine Signalverdoppelung erreicht werden (Abbildung 6c). Bei späteren Experimenten mit langerkettigen Einzelsträngen konnte dieses Ergebnis dann noch weiter vervielfacht werden (s.u.).

Um die Selektivität der Markierungsmethode zu bestätigen, wurde untersucht, ob mit einer nicht komplementären Sonde die Anwesenheit von markierten Targetsträngen nachweisbar ist. Dies ergab jedoch kein Hybridisierungssignal (Abbildung 6b). Ebenso konnte kein Signal bei der Hybridisierung eines markierten Schutzstranges (dieser entsteht bei jeder Markierung aufgrund des Schutzstrang-Überschusses in großer Zahl) mit der zum Targetstrang komplementären Sonde detektiert werden (Abbildung 6d).

4.2. Publikation II: Nähere Untersuchungen der DNA-Hybridisierung

4.2.1. Einfluss der Konvektion

Die Bewegung der Teilchen in Lösung wird von den drei Transportprozessen Konvektion, Diffusion und Migration bestimmt. In sämtlichen für diese Arbeit durchgeführten Versuchen ist die Migration jedoch durch den Einsatz eines Grundelektrolyten nahezu bedeutungslos. Durch die Verwendung eines Rührers wird die Diffusionsschicht an der Elektrode konstant gehalten, so dass letztlich allein die Diffusion verantwortlich für das Heranbringen der Teilchen ist.

Um hier nun den Einfluss der Konvektion zu untersuchen, wurden Messungen in ungerührter Lösung, jeweils bei Temperaturen von 7 °C und 23 °C, durchgeführt. Die ermittelten Werte wurden dann mit Werten verglichen, die mit einer rotierenden Scheibenelektrode bei verschiedenen Rührgeschwindigkeiten bestimmt wurden (Abbildung 2).

Während bei 7 °C kein bedeutender Unterschied in der Signalhöhe gefunden wurde, konnte bei Raumtemperatur bei der geringstmöglichen Umdrehungszahl (500 U / min) immerhin eine Verstärkung um das 2,7 fache beobachtet werden. Eine weitere Erhöhung bei zunehmender Rührgeschwindigkeit ließ sich jedoch nicht beobachten. Der Bereich zwischen 0 und 500 U / min konnte nicht genauer bestimmt werden, da die rotierende Elektrode nicht in kleineren Schritten regulierbar war.

Insgesamt lässt sich also sagen, dass auch die Konvektion hier eher von geringer Bedeutung ist und damit die Transportprozesse nicht der limitierende Faktor für die Hybridisierung sind. Vielmehr scheinen die Bedeckung der Elektrodenoberfläche und das Austauschen des Schutzstranges gegen die Sonde eine entscheidende Rolle zu spielen.

Dieses Ergebnis wird von früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe Flechsig gestützt³⁷. Dabei wurde die Hybridisierung an einer Golddrahtelektrode die in einer 3 °C kalten Umgebung direkt elektrisch auf Temperaturen bis 50 °C geheizt wurde, untersucht. Trotz des

hier recht großen Einflusses der Konvektion zeigte der Vergleich mit Werten, die mit derselben Elektrode in einer bis 50 °C erwärmten Umgebung (keine zusätzliche thermische Konvektion) ermittelt wurden, dass die Geschwindigkeit der Hybridisierung nicht erhöht werden konnte.

4.2.2. Bestimmung der Erfassungsgrenzen

Die Erfassungsgrenzen für die komplementären Targetstränge wurden über das Kalibrierkurvenverfahren (s.o.) graphisch bestimmt. Dabei wurden mit der rotierenden Goldscheibenelektrode sowie mit einer heizbaren Gold-LTCC (low temperature co-fired ceramics)-Elektrode Werte um 3 bis 4 nmol/L ermittelt (Abbildung 6). Im Vergleich mit anderen Verfahren liegt diese Erfassungsgrenze hier noch verhältnismäßig hoch. Andere elektrochemische Hybridisierungssensoren liefern weit geringere Erfassungsgrenzen im pico- bis femtomolaren Bereich. So fanden beispielsweise Niu et al. unter Verwendung des Interkalators $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{IP}]^{2+}$ (IP steht hierbei für Imidazo(f)1,10-Phenanthrolin) eine Erfassungsgrenze von 27 pmol/L⁵⁶ oder Fan et al. 10 pmol/L mit kovalent gebundenem Ferrocen⁵⁷. Die Kombination von Strippingtechniken mit Metallnanopartikeln⁵⁸ aber auch enzymbasierte amperometrische Untersuchungen mit Mikroelektroden⁵⁹ zeigen Erfassungsgrenzen sogar im femtomolaren Bereich.

Es ist jedoch zu bedenken, dass o.g. Versuche mit lediglich fünf markierten Thyminbasen durchgeführt wurden. Bei späteren Experimenten (Publikationen III und IV) wurde die Zahl der markierten Basen auf 55 (36mal Thymine und 19mal Cytosine) erhöht, womit die Erfassungsgrenze auch im picomolaren Bereich liegen sollte.

4.3. Publikation III: Elektrochemische Detektierung der Hybridisierung von mit [OsO₄(bipy)] markierten PCR-Produkten / Exonukleaseabbau

4.3.1. Erzeugung einzelsträngiger DNA durch Exonukleaseabbau

Um einzelsträngige DNA-Proben aus diesem PCR-Ansatz gewinnen zu können, wurde einer der beiden Primer am 5'-Ende phosphoryliert. Nach dem vollständigen Ablauf der PCR wurde eine Lambda-Exonuklease zum Ansatz gegeben, die in der Lage ist eben diese Markierung zu erkennen und den so gekennzeichneten Einzelstrang vollständig abzubauen. Abschließend wird das Enzym durch Erhitzen auf 75 °C inaktiviert.

Zuvor hatte sich die Methode, einen Doppelstrang auf 95 °C zu erhitzen und diesen anschließend sofort in einem Eisbad abzuschrecken, um so Einzelstränge zu erhalten, als untauglich erwiesen. Ein Nachteil dieses Verfahrens, der durch den Exonukleaseabbau abgestellt werden konnte, war zudem, dass der zweite Einzelstrang immer gegenwärtig wäre und so die Hybridisierung von Target- und Schutzstrang behindern könnte.

4.3.2. Einfluss von Temperatur und Hybridisierungsdauer

Über die Temperatur lässt sich die Hybridisierung gut steuern. Sie ist verantwortlich für eine Aufspaltung von Schutz- und Targetstrang (auf Fehlpaarungen und einen damit erniedrigten Schmelzpunkt wurde bereits oben hingewiesen), aber auch für eine schnellere Bewegung der Teilchen aus der Lösung zur Sonde hin.

In Abbildung 3 ist deutlich zu erkennen, dass der entscheidende Temperaturbereich hier zwischen 35 und 50 °C liegt. Die Signalhöhe wird immerhin verdreifacht. Gleichzeitig lässt sich feststellen, dass die vorliegenden fünf Fehlpaarungen eine Schmelztemperaturniedrigung von etwa 15 °C hervorrufen, denn unterhalb 35 °C und oberhalb 50 °C verändert sich die Signalhöhe nicht. Bei einer weiteren Temperaturerhöhung über 60 °C ist dann ein beginnender Signalabfall zu erwarten, weil dort sämtliche Basenpaarungen aufgespaltet würden (mit Hilfe eines Computerprogramms zur Schmelzpunktberechnung von Oligonukleotiden ist eine Schmelztemperatur von 55 °C ermittelt worden). Dies konnte jedoch nicht mehr gezeigt werden, da sich in diesem Temperaturbereich ebenfalls die SAM von der Goldoberfläche abzulösen beginnt, was den Effekt überdecken würde.

Die bedeutsamste Vergrößerung des Messsignals lässt sich allerdings durch Verlängerung der Hybridisierungszeit erlangen. So wird schon bei Raumtemperatur durch Erweiterung der

Hybridisierungsdauer von einer Minute auf 30 eine Verzehnfachung des Signals erreicht. Wird zusätzlich die Temperatur während der Hybridisierung auf 50 °C erhöht, ist in dieser Zeitspanne sogar eine Verfünfzehnfachung erkennbar (Abb.4). Das maximale Signal ist nach etwa einer Stunde messbar, jedoch ist die Änderung des Peakstromes im Zeitbereich zwischen 30 und 60 Minuten eher gering. Im Hinblick auf eine Anwendung dieses Biosensors ist es jedoch wünschenswert, die Hybridisierungszeit kurz zu halten, so dass 15 bis 30 Minuten hier durchaus zu empfehlen sind.

4.4. Publikation IV: Elektrochemische Detektierung der Hybridisierung von mit [OsO₄(bipy)] markierten PCR-Produkten / Asymmetrische PCR

4.4.1. Erzeugung einzelsträngiger DNA durch asymmetrische PCR

Eine weitere Möglichkeit einzelsträngige DNA zu erhalten, ist die asymmetrische PCR, eine Variation der herkömmlichen PCR, bei der ein Primer im Überschuss zum anderen, hier als ein Zehnfaches, zum Reaktionsansatz gegeben wird. Dabei ist der Primer im Übermaß zu wählen, der zu dem gewünschten Einzelstrang komplementär ist. Wird der Überschuss jedoch zu groß gewählt, kann sich der exponentielle Verlauf der PCR in ein lineares Verhalten umwandeln, d.h. die DNA-Amplifikation wird stark verlangsamt. Die Parameter für die PCR sind demnach genau abzuwägen.

4.4.2. Einfluss von Temperatur und Hybridisierungsdauer

Die Sequenzen der hier verwendeten DNA-Proben sind identisch mit denen aus Publikation III, lediglich die Sequenz des Schutzstranges wurde leicht verändert. Die Anzahl der Fehlpaarungen wurde beibehalten, lediglich die Stellen und die Arten der Fehlpaarung wurden variiert.

Daraus resultieren leichte Änderungen des Temperaturverlaufs (Abb. 4). Der entscheidende Temperaturbereich liegt im Vergleich mit Publikation III leicht erhöht zwischen 40 und 50 °C. Das bedeutet, dass der hier gewählte Schutzstrang von der Sonde schwerer zu verdrängen ist, als der in Publikation III. Somit wird bestätigt, dass bei gleicher Anzahl von Fehlpaarungen deren Art und Ort einen entscheidenden Einfluss auf die Schmelztemperatur haben¹⁷.

Bei Betrachtung des Einflusses der Hybridisierungsdauer auf die Signalhöhe, lässt sich erkennen dass eine Verlängerung zu einem deutlichen Signalanstieg führt (Abbildung 3). Verglichen mit Publikation III, Abb.4 fällt dieser jedoch deutlich geringer aus. So liegt die Vervielfachung im Bereich zwischen einer und 30 Minuten jeweils nur bei einem 6- bis 8fachen. Die Ursache liegt vermutlich in der Anwesenheit eines zusätzlichen DNA-Stranges. So wurde der dem Targetstrang komplementäre Strang (in Publikation III) von der Lambda-Exonuklease vollständig abgebaut, während dieser Strang bei der asymmetrischen PCR, wenn auch in Unterzahl, weiterhin vorliegt. Es ist daher möglich, dass dieser mit Schutz- und Sondenstrang um die Hybridisierung mit dem Targetstrang konkurriert.

In der Konsequenz bedeutet das nicht nur eine geringere Vervielfachung des Signals mit zunehmender Zeit, sondern auch, dass das absolute Messsignal niedriger ausfällt. Bei 50 °C ist weiterhin zu erkennen, dass das maximale Messsignal nach einer Stunde noch nicht erreicht ist.

Letztendlich ist aber bereits nach wenigen Minuten sicher zu erkennen, dass eine Hybridisierung zwischen dem komplementären Targetstrang und der Sonde stattfindet. Durch die Wahl einer Temperatur von 50 °C kann ganz klar gegenüber einer nicht komplementären Sequenz unterschieden werden. Somit wurde gezeigt, dass mit Hilfe der asymmetrischen PCR vervielfältigte DNA-Einzelstränge markiert und detektiert werden können.

4.5. Kinetische Untersuchungen der Markierungsreaktion

Im gesamten hier ablaufenden analytischen Prozess ist die Probenvorbereitung, insbesondere die Markierung der DNA-Einzelstränge, einer der zeitaufwändigsten Schritte. Um die Markierungsprozedur zeitlich zu optimieren, wurden die Reaktionen der einzelnen Pyrimidinbasen mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ spektrophotometrisch untersucht.

Dafür wurden UV/VIS-Spektren im Bereich von 200 bis 400 nm aufgenommen. Jeweils bei einer Wellenlänge von 325 nm wurde für alle Pyrimidinbasen (Thymin, Uracil und Cytosin) bei 10, 20, 40 und 60 °C eine Zunahme der Absorption gefunden. In Abbildung 4-1 werden exemplarisch die UV-Spektren bei einer Temperatur von 40°C gezeigt. Die Absorptionszunahme wird durch die Bildung der Osmatester bewirkt. Diese sind stabilisiert, weil 2,2'-Bipyridin die Hydrolyse des Osmiumtetroxides unterbindet^{43, 44}.

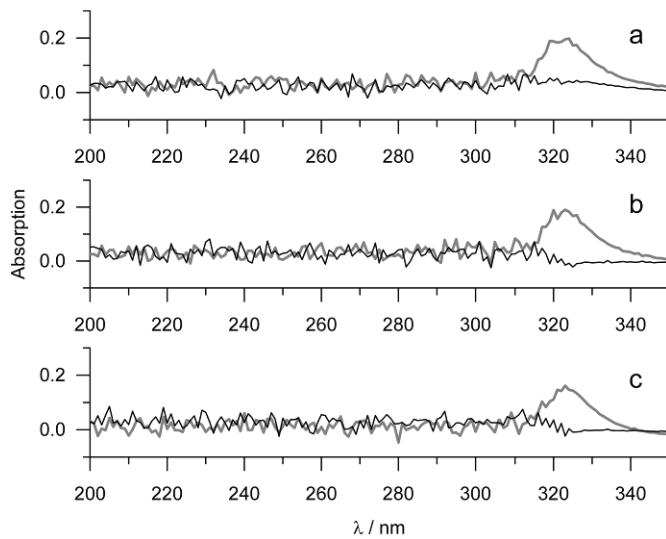


Abbildung 4-1 UV-Spektren einer Lösung von 6 mmol/L $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ vor (schwarz) und nach (grau) Zugabe und Reaktion mit 40 $\mu\text{mol/L}$ der Nukleoside Thymin (a), Uracil (b) und Cytosin (c). Die Messungen wurden in einem Cary 100 Bio UV/VIS-Spektrophotometer (Varian) im Zwei-Strahlen-Modus gegen 6 mmol/L $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ bei 40 °C durchgeführt. Die Reaktionszeiten betrugen jeweils 60, 240 und 350 Minuten.

Der Reaktionsverlauf lässt sich durch die Auftragung der Absorption gegen die Zeit nachverfolgen. Dies ist in den Abbildungen 4-2 bis 4-4 dargestellt. Wie erwartet, läuft die Reaktion des Thymins am schnellsten ab, gefolgt von Uracil und Cytosin. Eine Temperaturerhöhung beschleunigt die Bildung der Osmatester. Bei einer Temperatur von 20 °C dauert es ungefähr 6 Stunden bis sämtliche Pyrimidinbasen vollständig mit dem $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ reagiert haben. Eine Temperaturerhöhung auf 60 °C verkürzt diese Zeit auf die Hälfte (Tabelle 4-1).

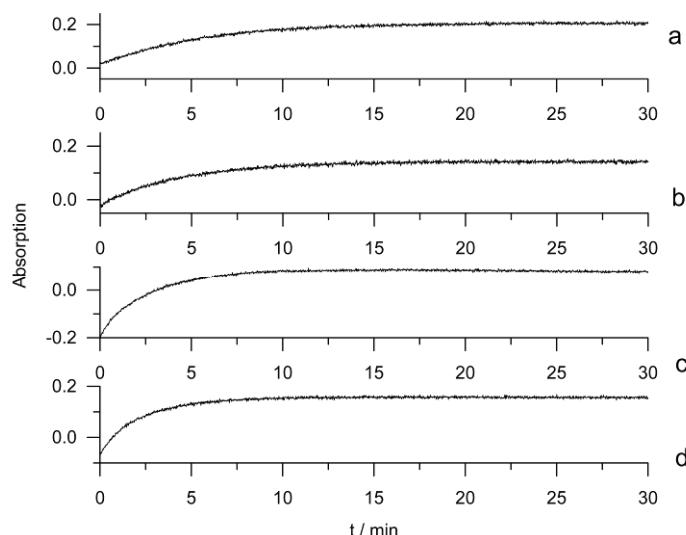


Abbildung 4-2 Reaktion von 40 $\mu\text{mol/L}$ Thymin mit 6 mmol/L $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ bei 10 (a), 20 (b), 40 (c) und 60 °C (d). Alle Messungen wurden in einem Cary 100 Bio UV/VIS-Spektrophotometer (Varian) im Zwei-Strahlen-Modus gegen 6 mmol/L $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ bei $\lambda = 325$ nm durchgeführt.

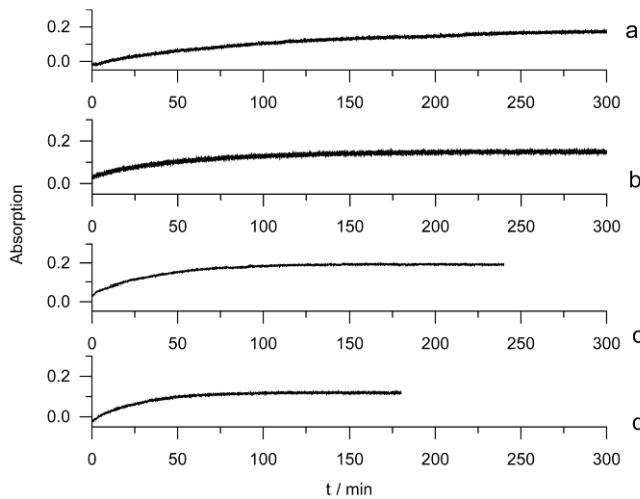


Abbildung 4-3 Reaktion von 40 $\mu\text{mol/L}$ Uracil mit 6 mmol/L $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ bei 10 (a), 20 (b), 40 (c) und 60 $^{\circ}\text{C}$ (d). Weitere Bedingungen siehe Abbildung 4-2.

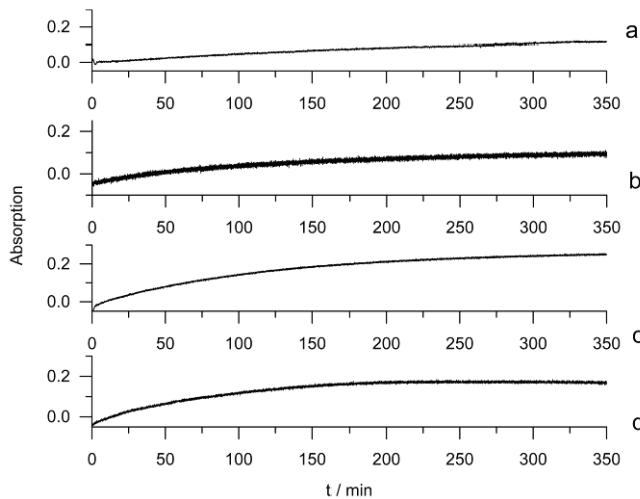


Abbildung 4-4 Reaktion von 40 $\mu\text{mol/L}$ Cytosin mit 6 mmol/L $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ bei 10 (a), 20 (b), 40 (c) und 60 $^{\circ}\text{C}$ (d). Weitere Bedingungen siehe Abbildung 4-2.

Für die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Reaktionen muss zunächst die Reaktionsordnung bestimmt werden. Da der Komplex $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ in einem Mengenverhältnis von 150:1 gegenüber den Nukleosiden vorliegt, kann eine Reaktionsordnung pseudo-erster Ordnung angenommen werden. Die Kurven lassen sich dann mathematisch auswerten. Dafür wird zunächst eine passende Regressionsfunktion (nicht-linearer Fit nach Marquardt) über die Messwerte gelegt. Nach Schwartz et al. lässt sich die Reaktionsordnung bestimmen⁶⁰:

$$Abs_t = Abs_{\infty} + (Abs_0 - Abs_{\infty}) \cdot e^{-kt} \quad (4.1.)$$

In Tabelle 4-1 sind die daraus resultierenden Werte für k angegeben.

Nukleosid	$\vartheta / ^\circ\text{C}$	T / K	Zeitdauer bis zum vollständigen Ablauf der Reaktion / min	k / min^{-1}
Thymin	10	283,15	25	0,1838
	20	293,15	16	0,2472
	40	313,15	12	0,3620
	60	333,15	8	0,5293
Uracil	10	283,15	300	0,0110
	20	293,15	180	0,0154
	40	313,15	130	0,0293
	60	333,15	100	0,0387
Cytosin	10	283,15	> 350	0,0041
	20	293,15	> 350	0,0059
	40	313,15	300	0,0105
	60	333,15	180	0,0133

Tabelle 4-1 Zeitdauer bis zum vollständigen Ablauf der einzelnen Reaktionen der Pyrimidinbasen mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ (aus den Abbildungen 4-2, 4-3 und 4-4) und dazugehörige errechnete Geschwindigkeitskonstanten für verschiedene Temperaturen.

Mit dem Datensatz aus Temperaturen und ihren dazugehörigen Geschwindigkeitskonstanten lässt sich eine Arrhenius-Auftragung (Arrheniusplot) nach Gleichung 4.2. durchführen.

Daraus lassen sich wiederum die Aktivierungsenergien für die einzelnen Reaktionen ermitteln, die in Tabelle 4-2 zusammengefasst sind.

$$\ln(k) = -\frac{E_A}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln(A) \quad (4.2.)$$

Hierbei steht k für die Geschwindigkeitskonstante, E_A für die Aktivierungsenergie, R ist die universelle Gaskonstante, T die Temperatur und A der präexponentielle Faktor der Arrheniusgleichung.

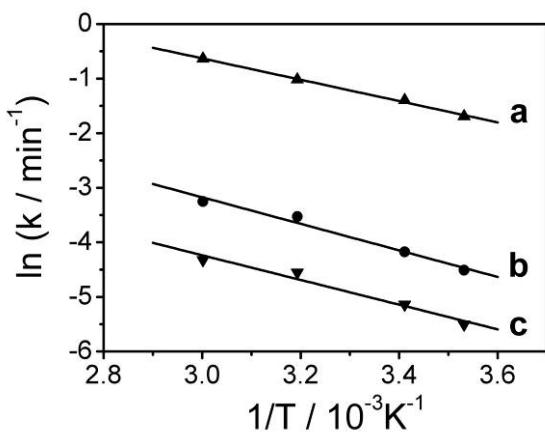


Abbildung 4-5 Arrheniusplot für die Reaktion der Pyrimidinbasen Thymin (a), Uracil (b) und Cytosin (c) mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$.

Nukleosid	$-E_A \cdot R^{-1} / K$	$\ln (A / \text{min}^{-1})$	A / min^{-1}	$E_A / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
Thymin	-1954,3184	5,2330	187,3	16,3 ± 0,7
Uracil	-2433,0435	4,1246	61,9	20,2 ± 2,1
Cytosin	-2263,0608	2,5523	12,9	18,8 ± 2,4

Tabelle 4-2 Aktivierungsenergien und präexponentielle Faktoren für die Reaktion der Pyrimidinbasen mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$. Weiterhin sind die zu deren Berechnung benötigten Parameter aus dem Arrheniusplot aufgeführt.

Es wurden Aktivierungsenergien in der Größenordnung von ca. $15 - 20 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ bestimmt. Diese Werte sind verhältnismäßig niedrig. Üblicherweise liegen die Aktivierungsenergien chemischer Reaktionen in einer Größenordnung von etwa $100 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ⁶¹. Andererseits sind $10 - 15 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ typisch für die Diffusion in flüssiger Phase⁶². Die Anstiege der Geraden im Arrheniusplot liegen dicht beisammen. Dagegen weisen die präexperimentellen Faktoren deutlich auf die unterschiedlichen Reaktionsraten hin. Ihr Verhältnis von 1:3:14,5 (Cytosin:Uracil:Thymin) bestätigt die früheren Erkenntnisse, dass Thymin etwa 10 mal schneller als Cytosin reagiert^{27, 45}.

Für die Markierungsprozedur lässt sich zusammenfassen:

Soll nur Thymin markiert werden, kann die Reaktion mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ in 30 Minuten vollständig ablaufen. Eine Temperaturerhöhung über 20°C ist dabei nicht notwendig. Sollen jedoch alle Pyrimidinbasen markiert werden, ist bei Raumtemperatur mindestens eine 7stündige Reaktionszeit einzuhalten. Dies gilt für DNA und RNA. Durch Temperaturerhöhung lässt sich die Markierung jedoch deutlich beschleunigen. Bei 60°C ist sie bereits nach 3 Stunden abgeschlossen.

5. Zusammenfassung

Die Publikationen I bis IV zeigen, dass die Methode zur Markierung von Oligonukleotiden mit dem elektrochemisch aktiven $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ unter Zuhilfenahme eines Schutzstranges auch bei längerkettigen Nukleinsäuren und PCR-Produkten sehr gut funktioniert.

Die wichtigste Voraussetzung, um überhaupt eine Markierung durchführen zu können, ist das Vorliegen von einzelsträngigen DNA-Abschnitten. Diese lassen sich aus Doppelsträngen durch den enzymatischen Abbau eines im Laufe der PCR speziell markierten Einzelstranges mit einer Lambda-Exonuklease erhalten. Eine weitere Methode zur Erzeugung einzelsträngiger DNA ist die asymmetrische PCR, bei der ein Einzelstrang im Überschuss amplifiziert wird. Beide Methoden liefern gute Ausbeuten an einzelsträngiger DNA.

Die Hybridisierung der Einzelstränge mit der auf einer Goldelektrode immobilisierten Sonde wurde voltammetrisch detektiert.

Für Messungen an kurzkettigen Oligonukleotiden (25 bp) wurde eine Erfassungsgrenze von etwa 3 nmol / L ermittelt. Um diese zu verringern, wurden verschiedene Einflüsse, wie Konvektion, Temperatur und Hybridisierungsdauer untersucht und die jeweiligen Systeme dementsprechend optimiert. Ein erhoffter großer Effekt der Konvektion ist nicht zu beobachten. Zwar führt der Einsatz einer rotierenden Scheibenelektrode zu einer Verdoppelung der Höhe des elektrischen Signals, doch spielen andere Effekte, wie die Bedeckung der Elektrodenoberfläche mit der Sonde und das über die Temperatur steuerbare Austauschen des Schutzstranges gegen die Sonde eine weitaus wichtigere Rolle.

Die Schutzstränge lösen sich verstärkt ab Temperaturen von etwa 35 °C von den Targetsträngen, woraufhin diese zur Hybridisierung mit der Sonde im Stande sind. Bei ca. 50 °C ist jeweils ein maximales Hybridisierungssignal messbar.

Die größte Signalerhöhung lässt sich durch eine Vergrößerung der Hybridisierungsdauer erreichen. Bei der asymmetrischen PCR ist bei einer Verlängerung dieser Zeit von einer auf 30 Minuten eine Verachtfachung, bei enzymatisch hergestellten Einzelsträngen eine Verfünfzehnfachung des Messsignals zu beobachten (bei 50 °C). Die Signalverstärkung ist hier größer, da durch den vollständigen enzymatischen Strangabbau keine zusätzlichen mit Sonde und Schutzstrang um die Hybridisierung mit dem Target konkurrierenden Stränge entstehen. Jedoch ist dadurch ein zusätzlicher Arbeitsschritt notwendig.

Letztlich haben sich beide Methoden zur Erzeugung von Einzelsträngen bewährt und bieten so eine solide Grundlage für die Anwendung von $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ als elektrochemisch aktiver Marker und dessen Nutzung für Hybridisierungssensoren.

6. Ausblick

6.1. DNA-Chips

Ein Anwendungsbereich für DNA-Hybridisierungssensoren sind die sogenannten DNA-Chips, mit deren Hilfe Gene und deren Sequenzen identifiziert werden. Dazu werden jeweils verschiedene DNA-Sonden auf vielen tausend Spots (freiliegende Teile der Oberfläche des Chips, auch Elektrodenfläche) immobilisiert. Üblicherweise erfolgt dann die Detektierung bestimmter Sequenzen mit Hilfe verschiedenfarbiger Fluoreszenzfarbstoffe. (Auf die Vorteile elektrochemischer gegenüber optischen Analysemethoden wurden bereits weiter oben eingegangen.) Untersuchungen von H. Duwensee und M. Mix zeigen bereits, dass bei Vorliegen eines Gemisches verschiedener mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ markierter Targetstränge auf einem Microarray diese der jeweils komplementären Sonde zuzuordnen und voltammetrisch zu detektieren sind⁶³. Weiterhin soll erprobt werden, wie sich die DNA-Amplifikation durch PCR auf einem Chip umsetzen lässt. Am Rande dieser Versuche wurde eine Möglichkeit gefunden, die Markierungsprozedur weiter zu beschleunigen, indem nach der Markierung überschüssiges $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ statt durch zeitaufwändige Dialyse nun durch Zentrifugation von den markierten Targetsträngen getrennt wurde.

6.2. Markierung von Reportersträngen (Publikation V)

Es müssen nicht zwangsläufig die Targetstränge für eine elektrochemische Detektierung mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ markiert werden. Stattdessen können dafür Reporterstränge benutzt werden. Diese müssen dann - wie die Sonde - ebenfalls mit dem Targetstrang hybridisieren können. Der Targetstrang sollte dazu eine Mindestlänge von 40 Basen haben, damit jeweils 20 davon mit der Sonde und dem Reporterstrang hybridisieren können. Der Reporterstrang besteht aus zwei Abschnitten, von denen einer für die Hybridisierung mit dem Targetstrang und der andere für die Markierung vorgesehen ist. Der Teil des Reporterstranges, der markiert wird, kann dabei mit beliebig vielen Thyminbasen versehen werden.

Zur Markierung des Reporterstranges wird auch hier ein Schutzstrang mit einigen Fehlpaarungen benötigt. Dieser muss nun jedoch nicht mehr von der Sonde, sondern vom Targetstrang verdrängt werden. Bei dieser Vielfalt verschiedener DNA-Stränge ist wieder die Temperatur der entscheidende Parameter, über den sich der Verlauf von Verdrängungs- und

Hybridisierungsreaktionen genau steuern lässt. Um den Verlauf der gewünschten Reaktionen zu begünstigen, ist der Schutzstrang entsprechend zu konstruieren.

Die Verwendung von Reportersträngen ist besonders bei kurzen Targetsträngen (40-100 bp) empfehlenswert, weil dort die Zahl an markierbaren Basen deutlich erhöht werden kann. Enthält der Reporterstrang genügend Thymin, ist sogar ein Verzicht auf die Vervielfältigung der vorliegenden DNA-Probe durch die PCR denkbar.

6.3. Markierung von RNA

Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit der Markierung von DNA. Doch auch RNA ist aufgrund seiner vielfältigen Funktionen in der Zelle eine sehr wichtige und interessante Nukleinsäure. Sie dient dort nicht nur der Informationsweitergabe (in Form von mRNA), sondern transportiert auch einzelne Aminosäuren (als tRNA) oder ist am katalytischen Geschehen bei der Genexpression beteiligt (rRNA)⁴. Es gibt also einige Ansatzpunkte, um elektrochemische Untersuchungen durchzuführen. Dass RNA ebenso wie DNA mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ markierbar ist, wurde bereits mehrfach gezeigt^{64, 65}. Hier ist Thymin durch Uracil ersetzt, womit die am schnellsten zu markierende Base wegfällt. Die durchgeführten kinetischen Untersuchungen der Markierung zeigen jedoch, dass die Markierung des Uracils immer noch schneller abläuft als die des Cytosins.

Ein Problem liegt hierbei in der Instabilität der RNA, die durch die ubiquitäre Anwesenheit von RNAsen (RNA-abbauende Enzyme) hervorgerufen wird. Es müssen also sämtliche Arbeitsschritte in RNase-freier Umgebung durchgeführt werden, was einen speziellen Laborarbeitsplatz erfordert.

6.4. Aptamere

Ein weiteres vielversprechendes Forschungsobjekt sind sie sogenannten Aptamere. Diese kurzen Nukleinsäuren (20-60 bp) wirken durch die Ausbildung komplexer dreidimensionaler Strukturen als äußerst spezifische Rezeptoren beispielsweise für Nukleotide, Aminosäuren, Zucker, Farbstoffe und andere Moleküle. Liegt in diesen Molekülen eine freie C-C-Doppelbindung vor, und gelingt es diese mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ zu markieren, vergrößert sich dessen Anwendungsbereich enorm.

6.5. Weitere Marker

Bei einigen Untersuchungen von Nukleinsäuren ist es erwünscht, mehrere Informationen gleichzeitig zu erhalten. Dafür bietet es sich an, mehrere verschiedenartige Marker an die entsprechende Nukleinsäure zu binden. Diese sollen dabei unterschiedliche Potentialbereiche abdecken, so dass eine Überlagerung der von den einzelnen Markern hervorgerufenen Signale vermieden wird.

Dafür können die Liganden variiert (Phenanthrolin und TEMED stabilisieren beispielsweise ebenfalls die Osmatester⁶⁶) oder komplett andere Systeme gewählt werden. Die Giftigkeit des Osmiumtetroxids - auch wenn es hier nur in sehr geringen Konzentrationen verwendet wird – wird noch immer als Argument gegen die Nutzung dieser Verbindung angeführt.

7. Literatur

-
- [1] Watson, J.D., Crick F.H., *Nature* 1953, 171, 737–738
- [2] Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977, 74, 5350-5354
- [3] Urdea M.S., Warner B.D., Running J.A., Stempien M., Clyne J., Horn T., *Nucleic Acids Res.* 1988, 16, 4937-4956
- [4] F. Lottspeich, J.W. Engels, *Bioanalytik* 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag 2006
- [5] Takenaka S., Uto Y., Kondo H., Ihara T., Takagi M., *Anal. Biochem.* 1994, 218, 436-443
- [6] Flechsig, G.U., Peter J., Voss K., Gründler P., *Electrochem. Commun.* 2005, 7, 1059-1065
- [7] Steel A.B., Herne T.M., Tarlov M.J., *Anal. Chem.* 1998, 70, 4670-4677
- [8] Carter M.T., Bard A.J., *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 7528-7530
- [9] Meric B., Kerman K., Ozkan D., Kara P., Erensoy S., Akarca U.S., Mascini M., Ozsoz M., *Talanta* 2002, 56, 837-846
- [10] Wang J., Rivas G., Fernandes J.R., Paz J.L.L., Jiang M., Waymire R., *Anal. Chim. Acta*, 1998, 375, 197-203
- [11] Wang J., Kawde A.N., *Anal. Chim. Acta* 2001, 431, 219-224
- [12] Wang J., Kawde A. N., Erdem A., Salazar M., *Analyst* 2001, 126, 2020-2024
- [13] Wang J., Polsky R., Xu D.K., *Langmuir* 2001, 17, 5739-5741
- [14] Wang J., Xu D.K., Kawde A.N., Polsky R., *Anal. Chem.* 2001, 73, 5576-5581
- [15] Herne T.M., Tarlov M.J., *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 8916-8920
- [16] Kelley S.O., Jackson N.M., Hill M.G., Barton J.K., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1999, 38, 941-945
- [17] Kelley S.O., Boon E.M., Barton J.K., Jackson N.M., Hill M.G., *Nucleic Acids Res.* 1999, 27, 4830-4837
- [18] Boon E.M., Ceres D.M., Drummond T.G., Hill M.G., Barton J.K., *Nat. Biotechnol.* 2000, 18, 1096-1100
- [19] Boon E.M., Barton J.K., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002, 12, 320-329
- [20] Wong E.L.S., Mearns F.J., Gooding J. J., *Sens. Actuators, B: Chem.* 2005, 111, 515-521
- [21] Wong E.L.S., Gooding J.J., *Anal. Chem.* 2006, 78, 2138-2144
- [22] Palecek E., Lukasova E., Jelen F., Vojtiskova M., *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1981, 8, 497-506
- [23] Lukasova E., Jelen F., Palecek E., *Gen. Physiol. Biophys.* 1982, 1, 53-70
- [24] Palecek E., Hung M. A., *Anal. Biochem.* 1983, 132, 236-242
- [25] Lukasova E., Vojtiskova M., Jelen F., Sticzay T., Palecek E., *Gen. Physiol. Biophys.* 1984, 3, 175-191
- [26] Beer M., Stern. S., Carmalt D., Mohlhenrich K.H., *Biochemistry* 1966, 5, 2283-2288
- [27] Chang C.-H., Beer M., Marzilli L.G., *Biochemistry* 1977, 16, 33-38
- [28] Palecek E., *Methods Enzymol.* 212 (1992) 139
- [29] G. Löffler, P.E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag 1997
- [30] T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1982
- [31] R. Knippers, *Molekulare Genetik*, Thieme 2005
- [32] Nagel B., Dellweg H., Giersch L.M., *Pure Appl. Chem.* 1992, 64, 143-168
- [33] Thévenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S., *Pure Appl. Chem.* 1999, 71, 2333-2348

-
- [34] Dupont-Filliard A., Roget A., Livache T., Billon M., *Anal. Chim. Acta* 2001, 449, 45-50
 - [35] Boulas C., Davidovits J.V., Rondelez F., Vuillaume D., *Phys. Rev. Lett.* 1996, 76, 4797-4800
 - [36] Allara D.L., Nuzzo R.G., *Langmuir* 1985, 1, 45-52
 - [37] Flechsig G.U., Peter J., Hartwich G., Wang J., Gründler P., *Langmuir* 2005, 21, 7848-7853
 - [38] Mukumoto K., Nojima T., Takenaka S., *Tetrahedron*, 2005, 61, 11705-11715
 - [39] Palecek E., Boublíkova P., Karlovský P., *Gen. Physiol. Biophys.*, 1987, 6, 593-608
 - [40] Kara P., Kerman K., Ozkan D., Meric B., Erdem A., Nielsen P.E., Ozsoz M., *Electroanalysis*, 2002, 14, 1685-1690
 - [41] Hashimoto K., Ito K., Ishimori Y., *Anal. Chim. Acta*, 1994, 286, 219-224
 - [42] Millan K.M., Mikkelsen S.R., *Anal. Chem.*, 1993, 65, 2317-2323
 - [43] Daniel F.B., Behrman E.J., *J. Am. Chem. Soc.* 1975, 97, 7352-7358
 - [44] Daniel F.B., Behrman E.J., *Biochemistry* 1976, 15, 565-568
 - [45] Jelen F., Karlovský P., Makaturova E., Pecinka P., Palecek E., *Gen. Physiol. Biophys.*, 1991, 10, 461-473
 - [46] K. Cammann, *Instrumentelle Analytische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag 2001
 - [47] W. Buchberger, *Elektrochemische Analysenverfahren, Grundlagen, Instrumentation, Anwendungen*, Spektrum Akademischer Verlag 1998
 - [48] Wagenknecht H.A., *Nat. Prod. Rep.* 2006, 23, 973-1006
 - [49] Liu T., Barton J.K., *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 10160-10161
 - [50] Osakada Y., Kawai K., Fujitsuka M., Majima T., *Chem. Commun.* 2008, 23, 2656-2658
 - [51] Meggers E., Michel-Beyerle M.E., Giese B., *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 12950-12955
 - [52] Giese B., *Annu. Rev. Biochem.* 2002, 71, 51-70
 - [53] DIN 32 645 *Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze*
 - [54] S. Kromidas, *Handbuch Validierung in der Analytik*, WILEY-VCH-Verlag, 2000
 - [55] Crowell W.R., Heyrovský J., Engelkemeir D.W., *J. Am. Chem. Soc.* 1941, 63, 2888-2890
 - [56] Niu S.Y., Zhang S.S., Wang L., Li X.M., *J. Electroanal. Chem.*, 2006, 597, 111–118
 - [57] Fan C.H., Plaxco K.W., Heeger A.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, 100, 9134–9137
 - [58] Wang J., *Anal. Chim. Acta*, 2003, 500, 247–257.
 - [59] Zhang Y., Kim H.H., Heller A., *Anal. Chem.* 2003, 75, 3267-3269
 - [60] Schwartz L.M., Gelb R.I., *Anal. Chem.* 1978, 50, 1592-1594
 - [61] W.J. Moore, *Grundlagen der physikalischen Chemie*, Walter de Gruyter Verlag Berlin-New York 1990
 - [62] Beckmann A., Coles B.A., Compton R.G., Gründler P., Marken F., Neudeck A., *J. Phys. Chem. B* 2000, 104, 764-769
 - [63] Duwensee H., Mix M., Broer I., Flechsig G.U., in *Vorbereitung*
 - [64] Sophia H., Wachholz F., Flechsig G.U., *Electrochim. Commun.* 2008, 10, 1614-1616
 - [65] Trefulka M., Ostatna V., Havran L., Fojta M., Palecek E., *Electroanalysis* 2007, 19, 1281-1287
 - [66] Fojta M., Kostecka P., Trefulka M., Havran L., Palecek E., *Anal. Chem.* 2007, 79, 1022-1029

Teil B

Publikation I

Electrochemical Detection of DNA Hybridization by Means of Osmium Tetroxide Complexes and Protective Oligonucleotides

Gerd-Uwe Flechsig* and Thomas Reske

Department of Chemistry, University of Rostock, Dr.-Lorenz-Weg 1, D-18059 Rostock, Germany

We have utilized protective oligonucleotides to modify DNA fragments with osmium tetroxide complexes without compromising their ability to hybridize with immobilized thiol-linked probe-SAMs on gold electrodes. Due to reversible voltammetric signals of Os(VI/IV), this method allowed sensitive electrochemical hybridization detection of short (25 bases) and long (120 bases) thymine-containing DNA targets. The detection limit was 3.2 nM for the long target. We found an optimum 40 °C hybridization temperature for the short target. No interference by noncomplementary DNA was observed. At least 10 repetitive hybridization experiments at the same probe-SAM were possible with thermal denaturation in between. Such use of protective strands could be useful also for other types of DNA recognition and even for other DNA-modifying agents. Moreover, it is possible to produce electrochemically active oligonucleotides (targets and reporter probes) in ones own laboratory in a simple way.

Nucleic acid-modified electrodes used as biosensors can detect the hybridization of two complementary DNA single strands (probe and target). This electrochemical transduction can be performed by means of molecules that are covalently attached to the target, interacting with the negatively charged phosphate groups or intercalating into the base stack. It is also possible to make use of the intrinsic electrochemical activity of the DNA, e.g., the oxidation of guanine.^{1–3} Magnetic beads^{4,5} and self-assembled monolayers^{6–12} are proven approaches to immobilize the probe strands.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de. Phone: +49-381-4986465. fax: +49-381-4986461.

- (1) Wang, J.; Rivas, G.; Fernandes, J. R.; Paz, J. L. L.; Jiang, M.; Waymire, R. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *375*, 197–203.
- (2) Wang, J.; Kawde, A. N. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *431*, 219–224.
- (3) Wang, J.; Kawde, A. N.; Erdem, A.; Salazar, M. *Analyst* **2001**, *126*, 2020–2024.
- (4) Wang, J.; Polksy, R.; Xu, D. K. *Langmuir* **2001**, *17*, 5739–5741.
- (5) Wang, J.; Xu, D. K.; Kawde, A. N.; Polksy, R. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5576–5581.
- (6) Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8916–8920.
- (7) Kelley, S. O.; Jackson, N. M.; Hill, M. G.; Barton, J. K. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 941–945.
- (8) Kelley, S. O.; Boon, E. M.; Barton, J. K.; Jackson, N. M.; Hill, M. G. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 4830–4837.
- (9) Boon, E. M.; Ceres, D. M.; Drummond, T. G.; Hill, M. G.; Barton, J. K. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1096–1100.
- (10) Boon, E. M.; Barton, J. K. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 320–329.
- (11) Wong, E. L. S.; Mearns, F. J.; Gooding, J. J. *Sens. Actuators, B: Chem.* **2005**, *111*, 515–521.
- (12) Wong, E. L. S.; Gooding, J. J. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2138–2144.

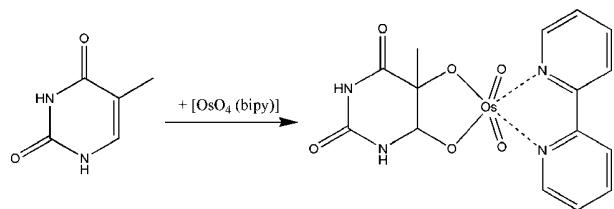
We recently reported about the application of the covalently attached redox markers together with thiol-linked probe oligonucleotides on heated gold electrodes.^{13,14} The methods of electrochemical hybridization detection have been reviewed several times.^{15–20}

The complex [OsO₄(bipy)] can be utilized as an electrochemically reversible covalent DNA label.²¹ It reacts with the pyrimidine bases thymine and cytosine²² forming a diester of osmium(VI) acid in well-known manner under oxidation of the C–C-double bond in the pyrimidine ring (Scheme 1).

Labeling of DNA strands of any length can be easily performed in the laboratory, which is an important advantage of this approach. However, only pyrimidine bases of single strands can be labeled this way. Such Os-modified DNA strands on the other hand are unable to form double strands; i.e., hybridization with probe oligos is not possible any longer. These reactions have been investigated for about 25 years by Palecek et al. They showed that osmium tetroxide complexes can be utilized as strand-selective probes, which allow not only discriminating between single- and double-stranded DNA but also studying the structure of double strands as well as sensitive detection of nucleic acids.^{23–26} Until now, the steps of Os(VIII) labeling, probe hybridization, and electrochemical detection have been conducted in solution and at separate surfaces, respectively, especially, especially by means of magnetic beads.^{27–31} Fojta et al. labeled DNA strands with multiple thymines this way.³²

- (13) Flechsig, G.-U.; Peter, J.; Hartwich, G.; Wang, J.; Gründler, P. *Langmuir* **2005**, *21*, 7848–7853.
- (14) Flechsig, G.-U.; Peter, J.; Voss, K.; Gründler, P. *Electrochem. Commun.* **2005**, *7*, 1059–1065.
- (15) Wang, J. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *469*, 63–71.
- (16) Palecek, E.; Scheller, F.; Wang, J., Eds. *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics*. Elsevier: Amsterdam, 2005.
- (17) Palecek, E.; Jelen, F. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2002**, *32*, 261–270.
- (18) Gooding, J. J. *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1149–1156.
- (19) Drummond, T. G.; Hill, M. G.; Barton, J. K. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1192–1199.
- (20) de-los-Santos-Álvarez, P.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 104–118.
- (21) Palecek, E.; Fojta, M. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 74A–83A.
- (22) Palecek, E. *Methods Enzymol.* **1992**, *212*, 139–155.
- (23) Palecek, E.; Lukasova, E.; Jelen, F.; Vojtiskova M. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1981**, *8*, 497–506.
- (24) Lukasova, E.; Jelen, F.; Palecek, E. *Gen. Physiol. Biophys.* **1982**, *1*, 53–70.
- (25) Palecek, E.; Hung, M. A. *Anal. Biochem.* **1983**, *132*, 236–242.
- (26) Lukasova, E.; Vojtiskova, M.; Jelen, F.; Sticzay, T.; Palecek, E. *Gen. Physiol. Biophys.* **1984**, *3*, 175–191.
- (27) Palecek, E.; Fojta, M.; Jelen, F. *Bioelectrochemistry* **2002**, *56*, 85–90.

Scheme 1. Oxidative Labeling of Thymine with [OsO₄(bipy)]



Protective oligonucleotides are known from biochemical applications where, for example, DNA strands have to be protected against cleavage by nucleases.³³

Here, we describe how one can utilize protective oligonucleotide strands for easily labeling thymine-containing nucleic acids by means of [OsO₄(bipy)] without losing their ability for hybridization reactions with immobilized oligonucleotide probes.

EXPERIMENTAL SECTION

Material. 2,2'-Bipyridine was received from Merck, and osmium tetroxide, as a 2% aqueous solution, was from Fluka. Solid osmium tetroxide tends to evaporate and can cause severe damage, for example, to the eyes. Hence, we recommend buying the aqueous solution. All short DNA oligonucleotides were delivered by Operon. The Tris-HCl buffer contained 10 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (from Fluka) and 0.5 M sodium sulfate and was adjusted to pH 7.5. The sequences of all DNA strands together with their length are given in Table 1. While Probe and Target strands matched perfectly, four mismatches were included into the Protector strand. The NC-target was a noncomplementary strand to the Probe. NC-target and NC-protector were noncomplementary as well. The F-probe oligonucleotide fitted to a 20-base site at the 3'-end of the 120-bases-long Fragment (the latter received from Microsynth). The F-protector contained three mismatches. FNC-probe was noncomplementary to the Fragment.

Modification of Target, NC-target, and Fragment Oligonucleotides. Protector and (NC)-Target (30.3 μ mol/L each) were mixed and left for 2 h at room temperature to allow hybridization. A Tris-HCl buffer solution containing 10 mM osmium tetroxide and 10 mM 2,2'-bipyridine (forming [OsO₄(bipy)]) was then added and left at room temperature for 22 h. After this period, the excess of the osmium complex was removed by dialysis against pure Tris-HCl buffer by means of Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units, 3500 MWCO (Rockford, IL) at 4 °C for 19 h. At the end, the retentive solution was heated to 80 °C for 1 min in a water bath. This solution (containing osmium-labeled target or noncomplementary strands) was used for the hybridization experiments. The 120-

- (28) Fojta, M.; Havran, L.; Billova, S.; Kostecka, P.; Masarik, M.; Kizek, R. *Electroanalysis* 2003, 15, 431–440.
- (29) Fojta, M.; Havran, L.; Vojtiskova, M.; Palecek, E. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 6532–6533.
- (30) Kostecka, P.; Havran, L.; Pivonkova, H.; Fojta, M. *Bioelectrochemistry* 2004, 63, 245–248.
- (31) Yosypchuk, B.; Fojta, M.; Havran, L.; Heyrovsky, M.; Palecek, E. *Electroanalysis* 2006, 18, 186–194.
- (32) Fojta, J.; Havran, L.; Kizek, R.; Billova, S.; Palecek, E. *Biosens. Bioelectron.* 2004, 20, 985–994.
- (33) Wang, G.; Wu, L.; Wang, X.; Cheng, J.; Yang, W. Int. Patent Application WO 02/16647 A1, 2000.

base-long Fragment (16.5 μ L 30 μ M) strands was partially protected with the 20-base F-protector strands (20 μ L 50 μ M) during a 2-h hybridization period. Afterward, 10 mM [OsO₄(bipy)] was added and left for another 2 h. A dialysis step of 19 h at 4 °C was finally conducted.

Preparation of SAM-Modified Gold Electrodes. The gold disk electrode (Metrohm) was first polished using 0.3- μ m corundum and then electrochemically treated by means of 25 voltammetric cycles between –0.2 and +1.8 V at 100 mV/s in 0.5 M sulfuric acid. After rinsing with water, one droplet of 30.3 μ L of Probe, F-probe, or FNC-probe solution was given onto the dried electrode and left overnight (16 h) at 10 °C in a water-saturated atmosphere allowing the formation of the probe-SAM. Finally the electrode was immersed in 1 mM aqueous mercaptohexanol solution to close holes in the DNA-SAM and to straighten up the single strands from the Au surface according to the literature.⁶

Hybridization and Dehybridization Procedure. During the hybridization step, the gold disk electrode was immersed in a beaker containing the stirred target solution at given concentration and temperature. After this, the electrode was rinsed with Tris-HCl buffer. To regenerate the probe-SAM by dehybridization, the electrode was immersed in 50 °C water for 30 s.

Electrochemical Measurements. All measurements were performed by means of an Autolab PSTAT10 potentiostat (Eco-chemie, Utrecht, The Netherlands) controlled by a PC with the GPES 4.8 software. An electrode stand inside a Faraday cage comprising a glass cell, a Ag/AgCl (3 M KCl) reference electrode, and a glassy carbon counter electrode (all from Metrohm) was used for all electrochemical procedures. The square wave voltammetric scans were performed from –0.65 to 0.0 V at 40-mV amplitude and 200-Hz frequency. All measurements were conducted at room temperature in Tris-HCl buffer. The peak-shaped signals were smoothed and baseline-corrected. Automatic peak search was applied.

RESULTS AND DISCUSSION

Use of Protective Strands during the Target Modification with [OsO₄(bipy)]. To reserve the hybridization capability, we propose to hybridize one part of the target strand (at least 15–20 bases) with a protective strand. The latter contains a few mismatches and can thus be replaced effortlessly later on by the immobilized probe. The remaining nonhybridized thymines (here exemplary 5 bases) are then labeled with [OsO₄(bipy)] (Scheme 2).

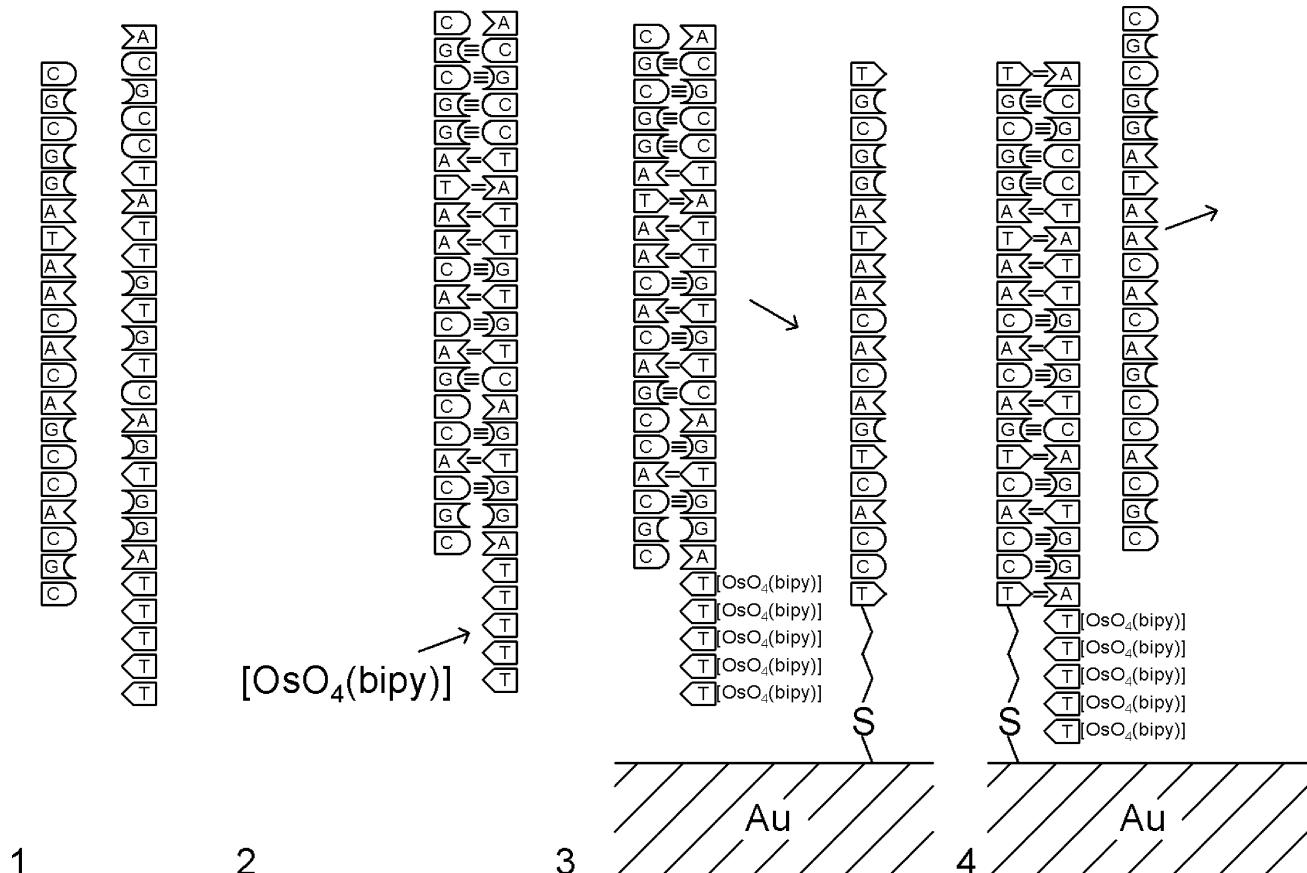
The excess of the osmium complex is removed using dialysis. Upon immersing the probe-modified gold electrode into the solution of the labeled and still partially protected target strands, the protective strand is replaced by the probe strands. The latter had been immobilized before on a gold electrode, forming a thiol-linked self-assembled monolayer.

Such hybridized target oligos yield square wave voltammetric signals at –0.35 V (vs Ag/AgCl, 3 M KCl). According to the experiments of Lukasova et al. as well as earlier results of Crowell et al. and Meites, this can most probably be attributed to the redox couple Os(VI)/(IV), while the reduction of Os(VIII) happens at 0 V and the reduction of Os(IV) to Os(III) at \sim –1.1 V.^{34–36}

- (34) Lukasova, E.; Jelen, F.; Palecek, E. *Gen. Physiol. Biophys.* 1982, 1, 53–70.
- (35) Crowell, W. R.; Heyrovsky, J.; Engelkemeir, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1941, 63, 2888–2890.

Table 1. DNA Sequences

designation	length	sequence
Probe	20	5'-TGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-(CH ₂) ₃ -S-S-(CH ₂) ₂ -CH ₃
Target	25	5'-TTT TTA GGT GAC TGT GTT ATC CGC A-3'
Protector	20	5'-CGC GGA TAA CAC AGC CAC GC-3'
NC-target	25	5'-TTT TTG AGG TAT CGG TTA TTG CCC A-3'
NC-protector	20	5'-CGG GCA ATA ACC GAC ACC GG-3'
Fragment	120	5'-TTA AAA ATG GAT CCT GTT AAC TGT AAA GAG GAG AGG AAC CTA GTT ATT AGG TTT TGA ATT TAG TTA CCA ATC TAT ATA TCT ATA CTT TGG AGG TAT TTT AAA TGA AAG T G ACA AAA TCA-3'
F-protector	20	5'-CGA TTT TGT CGA CTC TCA TC-3'
F-probe	20	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -SS-(CH ₂) ₃ -TGA TTT TGT CGA CTT TCA TT-3'
FNC-probe	20	5'-ATT GGC CCG TAA GGC GAA TT-(CH ₂) ₃ -S-S-(CH ₂) ₂ -CH ₃

Scheme 2. Labeling of the Target Strands^a

^a (1) Target and protective strand approaching, (2) reaction of [OsO₄(bipy)] with the exposed thymine bases after the protective hybridization, (3) after dialysis the solution with labeled double strands comes into contact with the immobilized probe strands on the gold electrode, and (4) a new double strand of target and probe strand is formed. The four mismatches between target and protective strand are shown as well.

Modification and Hybridization of Model Target Strands

Containing 25 Bases. Even the short model oligonucleotide Target (comprising 5 unprotected and thus Os-modified thymine bases) yields relatively high peak-shaped hybridization signals compared to the covalently attached labels ferrocene and dabocyl.^{13,14} Two electrons are transferred to each Os-thymine unit, and five of them are located at one end of the Target strand.

The square wave signal occurs only if a complementary [OsO₄(bipy)]-labeled target has been present in the hybridization solution. On the other hand, a labeled but noncomplementary

strand (NC) does not yield any signal nor does the labeled protective strand alone, and hence, hybridization with the immobilized probe oligos does not take place (Figure 1). This illustrates also one important advantage of DNA-SAM probes: Nonspecific adsorption of NC strands or indicator molecules is widely depressed according to earlier results.^{13,14}

Figure 2 displays the effect of the hybridization temperature upon the voltammetric signal. Hybridization (while heating or cooling the stirred Target solution), electrochemical measurements in pure Tris-HCl buffer, and dehybridization at 50 °C in highly purified water were performed alternating. We found very

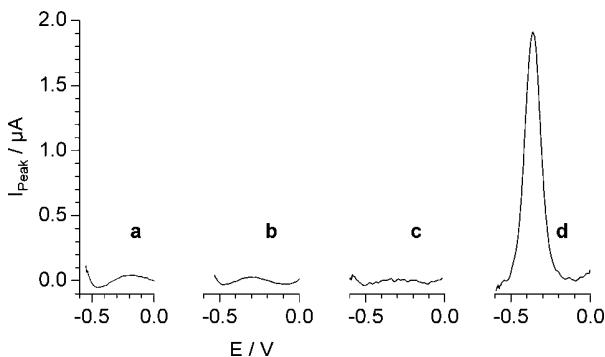


Figure 1. Square wave voltammograms at gold disk electrodes in Tris-HCl buffer with immobilized Probe strands, (a) not hybridized, (b) 15 min hybridized with 163 nM NC-Target at 23 °C, (c) 20 min hybridized with 163 nM Os-labeled Protector strands at 40 °C, and (d) 15 min hybridized with 163 nM Os-labeled Target at 23 °C; frequency 200 Hz; amplitude 40 mV.

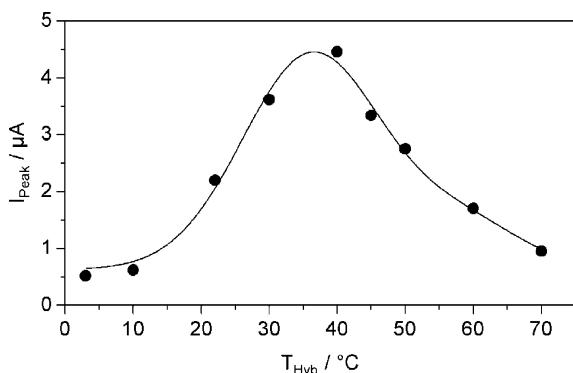


Figure 2. Dependence of the square wave voltammetric signals on the hybridization temperature, Probe-SAM 15 min hybridized with 163 nM Target. Other conditions as in Figure 1.

small hybridization signals up to 10 °C and a maximum signal at ~40 °C. The latter was ~9-fold higher than the signal obtained at 3 °C hybridization temperature. Beginning dehybridization leads to decreasing voltammetric peaks at higher temperatures. Elevated temperature generally causes an improved mass transport (increasing diffusion coefficient) as well as accelerated kinetics. While the diffusion coefficient changes only slightly in the temperature range studied, we have to consider especially the kinetics of the target-protective double-strand denaturation, the surface diffusion, and the formation of probe-target double strands. We did not observe any disruption of the probe-SAM at temperatures up to 70 °C.

We investigated the effect of hybridization time at 23 and 50 °C (Figure 3). A linear rise was found at 23 °C up to 15 min. At longer hybridization time, the slope levels off approaching a maximum signal after 60 min. This value was obtained after 15 min, if the hybridization was conducted at 50 °C. This indicates the accelerating temperature effect as described above.

Both studies about the effects of hybridization time and temperature have been performed each at one and the same probe-SAM. The protocol included regeneration steps of the probe strands after every voltammetric measurement in 50 °C water for 60 s. Figure 4 depicts square wave voltammetric peak current signals, which had been recorded following the hybridization of the Os-labeled Target and the immobilized Probe SAM. We

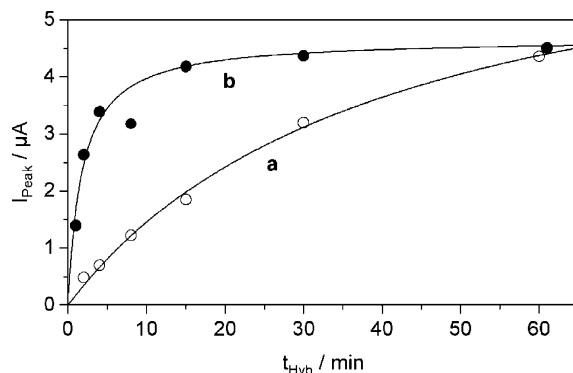


Figure 3. Effect of the hybridization time of immobilized Probe with 163 nM Target at (a) 23 and (b) 50 °C hybridization temperature. Other conditions as in Figure 1.

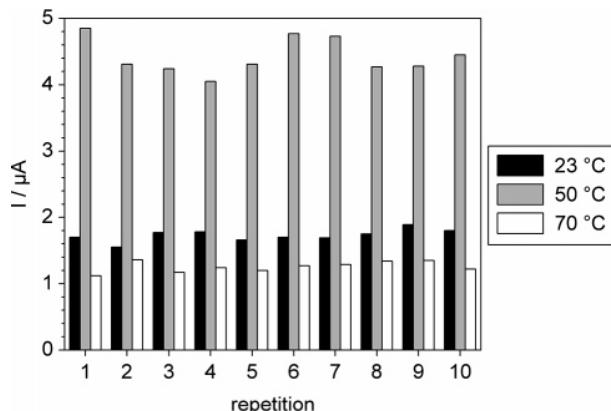


Figure 4. Stability of the SWV hybridization signals upon 10 repetitions at 23, 50, and 70 °C hybridization temperature, each series at one and the same probe-SAM on a gold disk electrode. 10 mM Tris + 0.5 M Na₂SO₄ (pH 7.5), $c_{\text{Target}} = 163.4$ nM; $t_{\text{hyb}} = 10$ min.

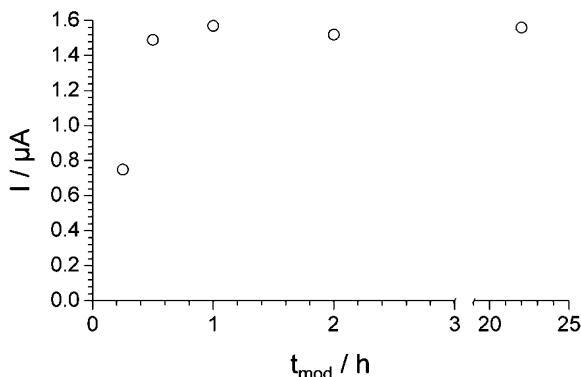


Figure 5. Effect of the [OsO₄(bipy)] modification time upon the square wave hybridization signals; 15-min hybridization of immobilized Probe with 160 nM Target at 23 °C. Other conditions as in Figure 1.

studied the stability of the hybridization signals during 10 cycles of hybridization and dehybridization (in water at 50 °C) at one and the same probe-SAM. Three hybridization temperatures had been explored, each yielding a fairly stable signal and no overall trend of rise or decrease. Such regeneration capability is an important requirement of biosensors.

Figure 5 exhibits the effect of [OsO₄(bipy)] modification time upon the square wave hybridization signals of 160 nM Os-modified Target. Although most experiments in this report include longer

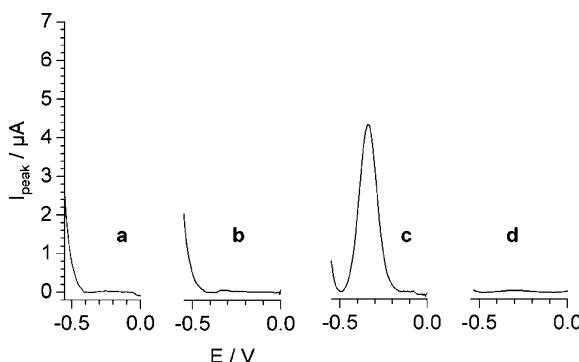


Figure 6. Square wave voltammetric signals of the partially protected and osmium-labeled 120-base-long Fragment with the immobilized (b) FNC-probe, and (c) F-probe. (d) Represents a control experiment with F-probe hybridized with osmium-labeled F-protector. (a) A control with the immobilized F-probe alone; frequency 200 Hz; amplitude 40 mV. c(Fragment) 165 nmol/L, 15 min hybridization at 23 °C.

modification times overnight up to 22 h, it is possible to yield maximal hybridization signals following a short modification period of 30 min. This will be important for direct target modifications in bioanalytical applications. Similar holds true for the dialysis step. Here, a minimum 2-h period is needed (data not shown).

Such multiple modification of oligonucleotides by osmium tetroxide bipyridine and protective strands opens a simple way to produce electrochemically active targets or reporter probes in the laboratory.

Modification and Hybridization of Long DNA Fragments Containing 120 Nucleotides. We tested the new method also with long DNA strands comprising 120 bases. Target strands of this length are often obtained in restriction experiments with chromosomal DNA or as cDNA from RT-PCR of mRNA and can be replicated by means of PCR. The Fragment contained 38 exposed (unprotected) thymine bases. A recognition site of 20 bases at the 3'-end was protected by the F-protector oligonucleotide during the modification step.

Figure 6 depicts voltammetric signals measured after hybridization of the long Fragment with the SAM-immobilized non-complementary FNC-probe (b) and full complementary F-probe (c). The F-probe-SAM alone (a) as well as the F-probe with the F-protector strand (d) did not yield any signal. This indicates that even longer target strands can be modified by means of $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ without losing their capability to hybridize with immobilized oligonucleotide probes, if the hybridization location on the target is protected during the modification step. The irregular distributed (and unprotected) thymine bases react with the osmium(VIII) complex and yield large voltammetric signals upon the hybridization with the immobilized matching probe. Compared to the signal obtained with the short Target (Figure 1d), the voltammetric peak of the long Fragment (Figure 6c) was twice as high. One should expect a multifold increased Os signal, since the Fragment contains 38 thymine bases (vs 5 in the Target). However, the long distance between the electrode surface and most of the Os-modified bases in the Fragment seems to diminish the electrochemical signals.

Figure 7a illustrates the effect of the Fragment concentration on the hybridization signals. In the range between 0 and 175 nmol/L, a calibration function was found showing a slightly decreasing

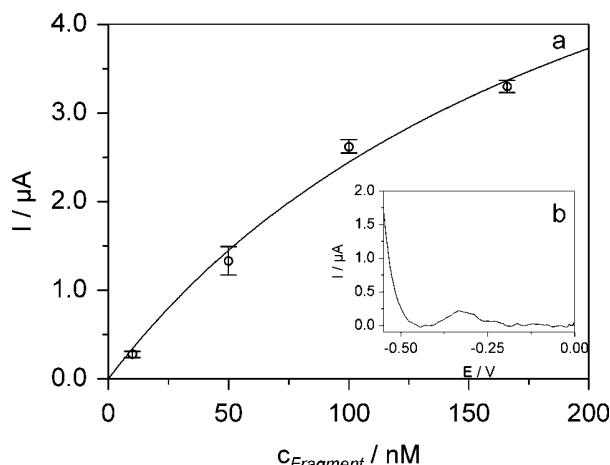


Figure 7. Dependence of the square wave voltammetric hybridization signals at the F-probe-modified gold disk electrode upon the Fragment concentration. Hybridization 15 min at 23 °C, Inset: square wave voltammetric hybridization signal of 10 nM Os-labeled Fragment; frequency 200 Hz; amplitude 40 mV.

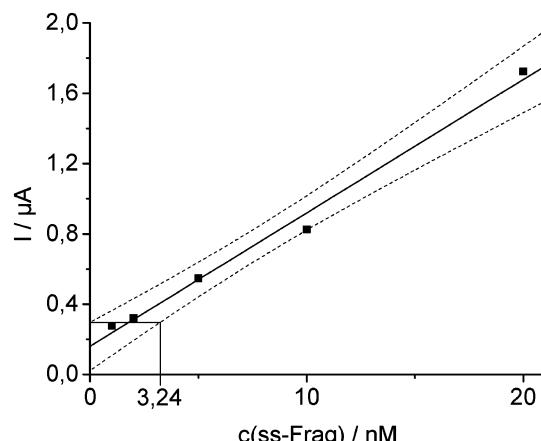


Figure 8. Calibration plot of the square wave voltammetric hybridization signals at the F-probe-modified gold disk electrode at the lowest Fragment concentrations; hybridization 15 min at 23 °C; frequency 200 Hz; amplitude 40 mV.

slope toward higher concentrations. The lowest concentration in this range was 10 nmol/L (Figure 7b).

Figure 8 displays a calibration plot at the lowest detectable Fragment concentrations including the prediction bands to find out the detection limit. On the basis of five calibration points, we found a 3.24 nM detection limit. In this concentration range, the calibration function is linear. The plots were calculated using Microcal Origin 7.5 software.

CONCLUSIONS

A simple protocol has been demonstrated on how to modify any thymine-containing DNA with $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ without losing the capability to hybridize with probe oligonucleotides that are immobilized as a SAM on gold electrodes. This way, hybridization can be detected, obtaining well-shaped square wave voltammetric signals. Protective oligonucleotides allow for modification of target DNA thymine bases with osmium complexes while leaving the recognition site unaffected. Due to its reduction potential, this DNA redox marker is well suited for use at thiol-based SAM on

gold electrodes. The probe layer can easily be renewed by simple dehybridization in hot water and can thus be used for hybridization with new targets at least 10 times. All steps of target preparation including protection, modification, and dialysis can be completed in less than 5 h. Since natural DNA fragments often contain several hundreds to thousands of bases, many more thymine bases would be modified, and hence, the protocol described here could facilitate highly sensitive electrochemical DNA hybridization detection. With its 3.2 nM detection limit, our approach does not compete with ultrasensitive methods such as catalytic (Palecek et al.^{24,31,37}) or biocatalytic (Heller et al.^{38–40}) assays. However, it opens a new opportunity to easily modify target DNA. Moreover, the osmium tetroxide marker yields a large catalytic hydrogen

reduction signal at ~ -1.2 V. We think that one day this signal can be used at probe-SAM-based DNA sensors. Gold thiol-based SAMs, however, do not provide a sufficient electrochemical stability at highly negative potentials. Protective strands could be useful for other types of DNA recognition and even for other DNA-modifying agents. Moreover, it is possible to produce reversible electrochemically active oligonucleotides (targets and reporter probes) in ones own laboratory in a simple way.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Peter Gründler for valuable hints and discussion and to the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for financial support (FL 384/2-3, FL 384/3-1, FL 384/4-1).

- (37) Jelen, F.; Karlovsky, P.; Peconka, P.; Makaturova, E.; Palecek, E. *Gen. Physiol. Biophys.* **1991**, *10*, 461–473.
(38) Caruana, D. J.; Heller, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 769–774.
(39) Zhang, Y.; Kim, H.-H.; Dequaire, N. M. M.; Heller, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *374*, 1050–1055.
(40) Zhang, Y.; Kim, H.-H.; Heller, A. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3267–3269.

Received for review November 5, 2006. Accepted November 21, 2006.

AC062075C

Publikation II

Comparison of DNA Hybridization at Rotating and Heated Gold Disk Electrodes

Jörg Peter, Thomas Reske, Gerd-Uwe Flechsig*

University of Rostock, Department of Chemistry, Dr.-Lorenz-Weg 1, D-18051 Rostock, Germany

*e-mail: gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de

Received: February 22, 2007

Accepted: April 17, 2007

Abstract

This paper reports about the influence of temperature, hybridization time and convection upon the detection of osmium tetroxide bipyridine-labeled target oligonucleotides at rotating gold disk (RDE) and heated low temperature co-fired ceramics (LTCC) gold disk electrodes. We used mixed self-assembled monolayers of hexathiol-linked probe oligonucleotides and mercaptohexanol on the gold surface of the electrodes for the hybridization detection of the labeled targets by means of square-wave voltammetry. Due to protective strands, the osmium tetroxide-modified target strands were still able to hybridize with the immobilized probe strands. The hybridization of such osmium tetroxide bipyridine-modified target strands with thiol-linked probe strands immobilized on gold yielded large reversible square-wave-voltammetric signals. Rotation speed and, hence, mass transport due to convection has only marginal effects. On the other hand, temperature affects greatly the hybridization step as indicated by both heated LTCC electrode in cold and RDE in warm hybridization solution. Calculated detection limits of 3.6 and 3.1 nM targets at the RDE and the LTCC electrode, respectively, have been almost the same at both types of electrodes. Applying an appropriate temperature during hybridization is more important than mechanically enhanced mass transport.

Keywords: Heated electrode, DNA hybridization, Voltammetry, Rotating disk electrode, Protective strands, Osmium tetroxide bipyridine

DOI: 10.1002/elan.200703881

1. Introduction

The importance of DNA analysis in clinical diagnostics and drug development has rapidly increased during the last two decades. This development leads to an increasing demand for simple, rapid and inexpensive methods of DNA analysis. The most common methods of DNA hybridization detection base upon labeling of the target DNA with radioactive ^{32}P or fluorescent dyes and quenchers. Both methods involve complex read-out techniques. Specially trained personnel as well as expensive instrumentation and material are required for such analytical techniques.

Electrochemical hybridization detection is an attractive alternative to those methods. Recent activities in this area have been reviewed [1–5]. One promising approach is the use of targets or other small nucleic acids (so-called reporter strands) which are covalently labeled with redox-active markers. In addition, the use of gold electrodes with mixed self-assembled monolayers (SAM) of thiol-linked probes and mercaptoalkanes is a good way to minimize undesired adsorption of noncomplementary DNA or indicator molecules. Herne and Tarlov et al. [6, 7] reported about first studies of DNA immobilization and hybridization on gold surfaces by means of surface plasmon resonance, XPS and radiolabeling. In these experiments, the probe strands had been tethered onto gold using a thiol linker. Rant et al.

studied the structures of probe SAM's on gold by means of fluorescence measurements [8]. Electrochemical detection of DNA-hybridization in general provides high sensitivity due to the accumulation of the analyte on the electrode surface. This can be compared with the deposition step in stripping analysis. The signal-to-noise ratio can be further enhanced by means of amplifying platforms such as enzyme labels [9–11], dendritic-like enzyme labels [12] or nanoparticle tracers [13–15]. Very low detection limits of 0.5 fM and 1.5 fM target have been reported using enzyme labels [16] or metal nanoparticles [17]. Recently, we have demonstrated that the covalently attached fluorescent quencher dabcyl can be applied also for electrochemical hybridization detection [18].

The complex $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ has been utilized as an electrochemically reversible covalent DNA-label [19, 20]. It reacts rapidly with the pyrimidine base thymine and less quickly with cytosine [21]. In this reaction, a diester of osmium(VI) acid is formed in a well-known manner under oxidation of the C–C-double bond in the pyrimidine ring. This product yields both reversible and huge catalytic signals during voltammetric scans. Labeling of DNA-strands of any length with electrochemically active markers can thus be easily performed in the laboratory. However, only single strands can be labeled this way. On the other hand, such osmium tetroxide-modified DNA strands are

unable to hybridize with matching strands such as probe oligos. These principles have been studied for more than 25 years by Palecek et al. They found that osmium tetroxide complexes can be utilized as probes which allow discriminating between single and double stranded DNA. Moreover, the structure of double strands could be investigated, and sensitive detection of nucleic acids [22–25] has been possible. Until now, the steps of Os(VIII)-labeling, probe hybridization, and electrochemical detection have in most cases been conducted in solution and at separate surfaces, respectively, especially by means of magnetic beads [26–30]. Recently, we found that $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ can be utilized to label any thymine-containing target strands without affecting their hybridization capability, if they had been protected by shorter oligonucleotides during the modification step [31, 32].

There are only a few studies about acceleration of the hybridization process on DNA sensors. One approach uses so called “acoustic micromixing”, where hybridization can be accelerated 5-fold by treatment with low frequency acoustic waves [33]. Alternatively, both November AG (Erlangen, Germany) and Nanogen Inc. (San Diego, California) have used a potential-induced accelerated hybridization. Sosnowski et al. (Nanogen Inc.) applied constant electrical fields on agarose-streptavidin modified electrode arrays coupled with optical hybridization detection [34].

To manipulate DNA hybridization thermally, we have applied a probe-SAM-modified heated gold wire electrode. We found a dramatic increase of the hybridization signals, if the hybridization was performed at elevated electrode temperature [35]. In former studies, this technique of directly heated electrodes had been applied for the enhancement of heavy metal stripping analysis [36–39] and DNA adsorptive stripping analysis [40, 41]. We found that mass transport (as the limiting parameter for fast reactions like metal deposition) is intensified typically up to 10-fold [36, 38, 39]. Furthermore, we could accelerate reaction or adsorption rates of kinetically inhibited processes (reduction of arsenic(V) or adsorption of dsDNA at carbon) 30-fold and more, if we performed the accumulation step at elevated electrode temperature [37, 40]. Fundamental and basic studies of heated electrodes have been reviewed recently [42]. Our new heating device allows direct or indirect heating of a broad variety of electrode designs [43].

Vanderhoeven and co-workers studied the influence of the rotation speed of a pivoted chamber covering an optical DNA microarray [44]. The effect of such mechanical stirring was a 5-fold enhancement of hybridization signals and, hence, can be compared with the acoustic micromixing [33]. A DNA-modified rotating gold disk electrode had been found useful during the voltammetric detection step following a quiescent hybridization period [45]. However, nothing has been reported about hybridization at a rotating electrode.

Here, we report about comparison studies of DNA hybridization at indirectly heated gold disk and rotating gold disk electrodes to obtain more information about the effect of both convection and elevated electrode temper-

ature. Osmium tetroxide bipyridine has been used as a label covalently attached to the target oligonucleotide.

2. Experimental

2.1. Apparatus

A rotating gold disk electrode (RDE) with a diameter of 3 mm (Metrohm AG, Herisau, Switzerland) and an LTCC electrode (low temperature cofired ceramic) with a gold disk of 2 mm diameter (TETEKERA GmbH, Ilmenau, Germany) served as the working electrodes in the square-wave voltammetric experiments. The LTCC electrode had the same design as described earlier [46, 47], except that this time, the substrate carried a gold electrode on its surface. Briefly, a multi-layer ceramic substrate comprised a galvanically separated electric heating meander inside below the electrode spot. Temperature calibration experiments with the LTCC electrodes have been performed by means of zero current chronopotentiometry following earlier protocols [47]. These electrodes had a 0.0314 cm^2 geometric and a 0.092 cm^2 active area. Furthermore, the RDE had a 0.0707 cm^2 geometric and a 0.214 cm^2 active area. We calculated the electrochemically active area from cyclic voltammetric measurements of the gold oxide reduction peak in 0.5 M sulfuric acid. Several repetitive scans yielded $102.9 \pm 18.6 \mu\text{C}$ and $44.2 \pm 5.8 \mu\text{C}$ for the RDE and the LTCC electrode, respectively. Both electrodes provided a ca. 3-fold larger active area compared to the geometric dimensions. A $480 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ conversion factor had been used for these calculations [48]. All electrochemical measurements have been conducted by means of a μ AUTOLAB potentiostat (ECO CHEMIE, Utrecht, The Netherlands). The instrument was controlled by a PC using the GPES 4.8 Software. A Faraday cage with stand, glass cell, Ag/AgCl (3 M KCl) reference and a glassy carbon counter electrode (all from Metrohm, Switzerland) were utilized during all measurements.

The hybridization step was carried out in 5 mL beaker. The temperature of the beaker has been controlled by a cryostat model #9105 from Fisher Scientific (Pittsburgh, Pennsylvania). The heating current of the LTCC electrode was adjusted by means of a TSX 1820 power supply (Thurlby Thandar Instruments, Huntingdon, UK). At any time, both the rotating disk electrode and the analyte solution have been at the same temperature. During all hybridization experiments with the LTCC electrode, the analyte solution was kept at constant 7 °C by means of the cryostat. A heating voltage between 0 and 8.2 V at the LTCC electrode's internal heater allowed adjusting an electrode temperature in the range between 7 and 63 °C.

2.2. Material

Probe oligonucleotides have been purchased from FRIZ Biochem GmbH (Munich, Germany) and the targets from

Operon GmbH (Cologne, Germany). All probe strands comprised a hexathiol linker (3 DTPA units) and the following base sequence: 5'-TGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-hexathiol. FRIZ Biochem's proprietary DTPA is a dithiol-phosphoramidite that contains one disulfide group in a ring with four carbon atoms. This 6-ring opens upon reaction with the gold surface yielding two gold sulfide bonds. The probe strand was dissolved in 0.25 M phosphate buffer (PB) solution at pH 7.0. The target strand had the following sequence: 5'-TTT TTA GGT GAC TGT GTT ATC CGC A-3'. The protection strand for the target contained 4 mismatches and had the following sequence: 5'-CGC GGA TAA CAC AGC CAC GC-3'. Both the target and its protection strand have been dissolved in sterilized distilled water. All nucleotides were stored at -18°C . Sodium hydrogen phosphate, sodium dihydrogen phosphate, potassium chloride, tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), 2,2'-bipyridine and osmium tetroxide, as a 2% aqueous solution, were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Solid osmium tetroxide tends to evaporate and can cause severe damage, for example, to the eyes. Therefore, we recommend buying the aqueous solution. Sodium sulfate was delivered by Riedel de Haën (Seelze, Germany). Ultra pure water (18.2 MΩ cm, TOC $< 2 \text{ ppb}$) has been obtained using an Ultra Clear UV plus system (SG GmbH, Barsbüttel, Germany), and has been used throughout. Water, buffer, electrolyte solutions and pipette tips have been sterilized by autoclaving.

2.3. Preparation of DNA-SAM Modified Electrodes

First, the gold disk electrode was polished with slurry of 0.3 μm alumina and water, then rinsed with water and finally polished on wet filter paper. The polished gold disk and the LTCC electrodes were treated electrochemically in 0.5 M sulfuric acid by performing 25 cyclic voltammetric scans (at 100 mV/s) between -0.2 and $+1.6 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl (3 M KCl). In the next step, the electrodes were rinsed with water and then with ethanol. After drying, 5 μL-droplets of a mixture containing 27 μM probe and 225 μM mercaptohexanol were placed on top of the electrodes. These assemblies were kept overnight (18 h) in a vapor-saturated atmosphere at 5°C . Finally, the electrodes have been rinsed with 0.25 M phosphate buffer (pH 7.0) and then with water. This procedure of coimmobilization yielded the best probe layer regarding stability and reproducibility. The surface coverage has been determined following the chronocoulometric procedure of Steel et al. [49]. We found a range between 5.3 and 7.9 pmol/mm², which provides good hybridization efficiency.

2.4. Preparation of the [OsO₄(bipy)]-Labeled Target

At first, 16.5 μL 30 μM target and 16.5 μL 30 μM protection strands were mixed and then incubated for 2 h at room temperature to form the protected target. Thereafter, 12 μL

10 mM Tris with 0.5 M sodium sulfate at pH 7.5 (Tris buffer) and 15 μL 10 mM of the osmium tetroxide bipyridine complex were added to this tube, mixed and incubated for 2 h at room temperature to label the target with the osmium tetroxide bipyridine. In the last step, this mixture has been transferred in a dialysis cell (Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units, 3500 MWCO; Rockford, IL, USA) and dialyzed for 19 h against Tris buffer at 4°C . More detail on this procedure can be found in our earlier publications [31, 32]. Briefly, the protective strand hybridizes with the target forming a partial duplex. Thymine bases in such duplex strands are unable to react with [OsO₄(bipy)] [22–25].

2.5. Hybridization, Electrochemical Measurements, Dehybridization

For hybridization, the probe-modified electrodes were placed in a 10 mL beaker containing 3 mL of Tris buffer and the given concentration of target strands. The hybridization on the RDE was carried out at room temperature (23°C), unless otherwise specified. The hybridization at the heated LTCC electrode was carried out in a 7°C hybridization solution at 3.2 V heating voltage (equivalent to 23°C surface temperature), unless otherwise specified. All square-wave-voltammetric scans have been recorded at room temperature (23°C) in a cell containing 20 mL of Tris buffer. Unless otherwise specified, all voltammetric peaks have been baseline-corrected, followed by automatic peak search as provided by the GPES software. The prediction bands in Figure 6 have been calculated using the Origin 7.5 software (OriginLab Corp., Northampton, Massachusetts, USA). For thermal regeneration of the immobilized probe layer, the RDE was rinsed with water and immersed in a beaker with 50°C water for 30 s to denaturize the double strands. For regeneration, the LTCC electrode was rinsed with water and immersed in a beaker with water at room temperature, while the dehybridization of these type of electrodes was conducted by applying a 5.5 V heating voltage (50°C) for 1 min. Our experiments have shown that such short heating to 50°C in pure water is sufficient to dehybridize the duplex with more than 90% efficiency as indicated by the remaining electrochemical activity of the osmium complex (data not shown). At even higher temperature (particular over 60°C), there is a danger to damage the probe layer.

3. Results and Discussion

Figure 1 displays two typical square-wave voltammograms obtained on probe-modified gold electrodes following a hybridization with the osmium-modified target. The signals measured at the rotating gold electrode (a) were higher than at the indirectly heated LTCC electrode (b). However, the noise level at the RDE has been higher as well. Therefore, the LTCC electrode is not compromised by a generally worse signal-to-noise ratio. It has been shown earlier that

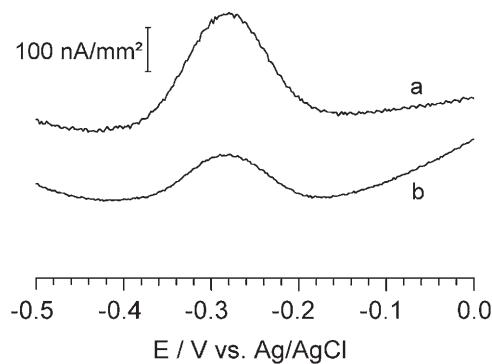


Fig. 1. Square-wave-voltammetric signals of $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -modified targets following an 8 min hybridization period at 23°C on a) gold RDE, 1000/min, and b) heated gold LTCC electrode. Hybridization has been performed in a solution containing Tris buffer and 80 nM $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -modified target solution. Square-wave voltammetry has been conducted at 200 Hz and 40 mV amplitude in Tris buffer. Current densities have been calculated using the geometric electrode areas. Both voltammograms are displayed without any filtering.

noncomplementary strands did not yield any significant signal and, hence, did not disturb the detection of target strands [32].

3.1. Influence of the Rotation Speed

Figure 2 illustrates the influence of the rotation speed during a 4 min-hybridization period upon the square-wave-voltammetric osmium tetroxide bipyridine signals at the probe-modified RDE at two different temperatures. No effect of the rotation speed has been found at 7°C hybridization temperature, whereas at 23°C , an initial (almost 2-fold) increase of the SWV signal was observed when going from 0 to 500 rpm. However, at even faster rotation rates, no further rise of the hybridization signals has been visible. At all rotation rates equal to or higher than 500/min, an increase of hybridization temperature from 7 to 23°C lead to a 2.7-fold enhanced signal. These findings indicate that convection has no significant effect under these conditions, and hence, mass transport is not the limiting factor during these hybridization experiments. Another limiting process has to be considered such as surface coverage with probe strands or kinetic hindrance.

3.2. Effect of the Hybridization Time

Figure 3 depicts the effect of the hybridization time upon the voltammetric signals of the osmium-modified targets at a LTCC electrode and a rotating disk electrode at 1000 min^{-1} . Both have been held at 23°C hybridization temperature. All data points and their error bars represent measurements of 3 reproduced series at the given electrode type (each series with a newly prepared probe SAM) and the regarding

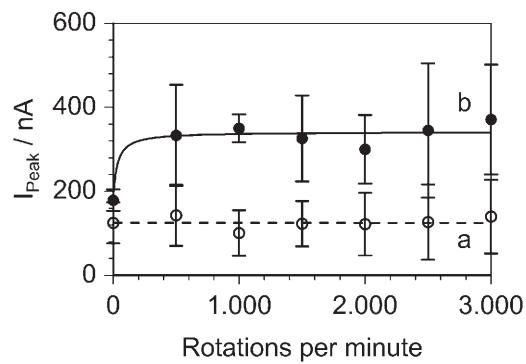


Fig. 2. Effect of rotation speed during a 4 min hybridization step upon square-wave-voltammetric signals at a) 7°C and b) 23°C ; hybridization performed in a solution containing Tris buffer and 160 nM $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -modified targets. Square-wave voltammetry has been conducted at 200 Hz and 40 mV amplitude in Tris buffer. The data points and their error bars represent average values of regarding measurements of 3 repetitive series (each series at a newly prepared SAM) and the regarding standard deviation, respectively.

standard deviation, respectively. The graph of the heated LTCC electrode (23°C electrode temperature in a 7°C hybridization solution) displays a small linear range between 0 and 4 min. Thereafter the slope significantly declines. One reason of this effect is probably an increasing saturation of the probe layer on the electrode with the target indicating fast hybridization or low surface coverage with probe strands. In contrast, the plot obtained with the rotating disk electrode was found to be almost linear in the whole range. In addition to the different geometric and active area, both the RDE and the LTCC gold electrode do not comprise the same type of gold surface as indicated by the different hybridization behavior. Although we have polycrystalline gold in both cases, the coverage with probe strands is apparently different.

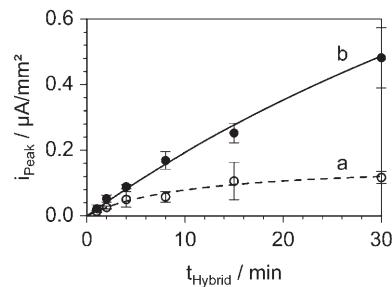


Fig. 3. Effect of the hybridization time upon square-wave-voltammetric signals at 23°C , a) heated LTCC electrode, and b) rotating disk electrode at 1000 min^{-1} . The LTCC electrode has been heated to 23°C during hybridization, while keeping the solution at constant 7°C . Current densities have been calculated using the geometric electrode areas. Other conditions have been the same as in Figure 2.

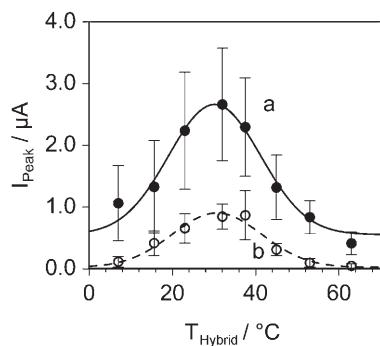


Fig. 4. Temperature effect during an 8 min-hybridization step at a) a rotating disk electrode at 1000/min inside a heated solution and b) a heated LTCC electrode inside a solution of constant 7 °C. Other conditions have been the same as in Figure 2.

3.3. Effect of the Hybridization Temperature

In our former study of DNA hybridization on a heated gold wire electrode, we found a dramatic effect of hybridization temperature upon the voltammetric signals of ferrocene-labeled target strands with a maximum at 48 °C [35]. Figure 4 depicts the effect of hybridization temperature at both heated LTCC (b) and rotating gold disk electrode (a). Again, a considerable temperature effect has been found. However, under the conditions applied here (disk electrodes, protected and osmium-modified targets), the temperatures of maximum signals are significantly lower (ca. 30 °C). Furthermore, the signals at 63 °C had been significantly lower than at 7 °C hybridization temperature. All in all, the characteristics of both the LTCC and the RDE plots are similar. Up to this point, we can say that the hybridization at the electrode surface is controlled by temperature rather than convection. This can be attributed to slow hybridization kinetics at the electrode surface. These findings suggest that mass transport due to convection has only a minor impact on the hybridization signals. At even higher temperature, the signals decrease, indicating the beginning melting of the probe-target-duplexes. We already investigated the thermal stability of a probe layer immobilized on a gold electrode in an earlier study and found it to be stable up to ca. 70 °C [35]. A stability test in the study presented here yielded a 20% signal loss upon repeating the hybridization-dehybridization-cycle 12 times at one and the same probe layer (data not shown).

3.4. Calibration Experiments

Figure 5 exhibits the results of calibration experiments performed in the range between 1 and 80 nM of osmium-modified targets at both the rotating gold disk electrode (a) and the heated LTCC electrode (b). Whereas the LTCC electrode plot starts to level off at low concentrations, we find a fairly linear part up to 20 nM for the RDE. This again can be attributed to a lower surface coverage with probe

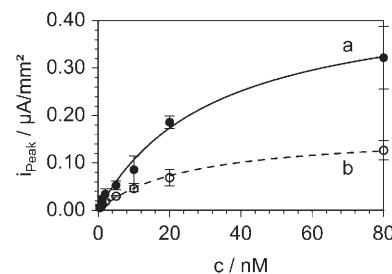


Fig. 5. Calibration plots (2nd order polynomials) at a) a rotating gold disk and b) heated LTCC gold electrodes. All square-wave voltammograms have been recorded following an 8 min-hybridization step at the given target concentration. The RDE was set to 1000/min at 32 °C solution temperature during hybridization, whereas the LTCC electrode was heated electrically to 32 °C inside the 7 °C hybridization solution. Current densities have been calculated using the geometric electrode areas. Other conditions have been the same as in Figure 2.

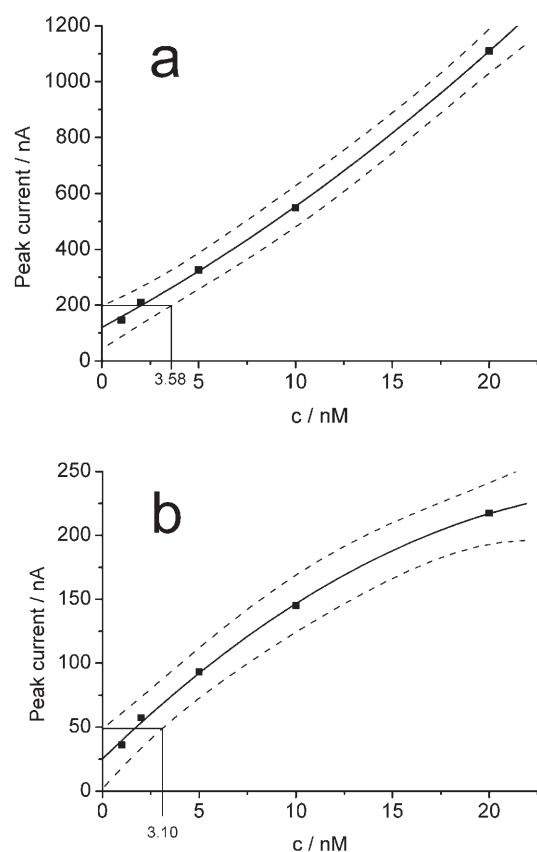


Fig. 6. Calibration plots (2nd order polynomials) at a) gold RDE and b) heated LTCC gold electrodes including the prediction bands (95%) for the graphical determination of the detection limits. All square-wave voltammograms have been measured following an 8 min-hybridization step at the given target concentration. The RDE was set to 1000/min at 32 °C, whereas the LTCC electrode was heated electrically to 32 °C inside the 7 °C hybridization solution. Other conditions have been the same as in Figure 1.

strands at the LTCC electrode leading to saturation even at low concentrations.

Figure 6 displays a data subset of Figure 5, now providing the 95% prediction bands for the lowest concentrations in order to estimate the detection limits. The latter have found to be comparable (3.6 and 3.1 nM for the RDE and the LTCC electrode, respectively). Although the sensitivity at the RDE is about 3 times higher than at the LTCC, we found that the prediction band is 4-fold wider. This yields the slightly better analytical performance of the heated LTCC electrode. However, even between 1 and 20 nM, we could not find a linear calibration plot for the heated electrode.

4. Conclusions

We have investigated DNA hybridization at both rotating disk and heated disk electrodes in order to obtain information about the effects of rotation speed, temperature, and target concentration during the hybridization step. By means of protective oligonucleotides, it has been possible to modify the target strands with $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ while preserving their hybridization capabilities. The hybridization of such osmium tetroxide bipyridine-modified target strands with thiol-linked probe strands immobilized on gold yielded large reversible square-wave-voltammetric signals. It can be concluded that the rotation speed and, hence, the mass transport due to convection has marginal influence under these conditions. On the other hand, the temperature affects greatly the hybridization step as indicated by measurements with both heated electrodes in cold and rotating electrodes in warm hybridization solution. Adjusting the optimal temperature such as by means of heated electrodes is thus more important than trying to improve mass transport by mechanical devices.

5. Acknowledgement

The authors are grateful to the Deutsche Forschungsgemeinschaft for financial Support (FL 384/3-1, 3-3, and 2-3).

6. References

- [1] J. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *469*, 63.
- [2] E. Palecek, F. Jelen, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2002**, *32*, 261.
- [3] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1192.
- [4] P. de-los-Santos-Alverez, M. J. Lobo-Castanon, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tunon-Blanco, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 104.
- [5] J. J. Gooding, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1149.
- [6] K. A. Peterlinz, R. M. Georgiadis, T. M. Herne, M. J. Tarlov, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3401.
- [7] T. M. Herne, M. J. Tarlov, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8916.
- [8] U. Rant, K. Arinaga, S. Fujita, N. Yokoyama, G. Abstreiter, M. Tornow, *Langmuir* **2004**, *20*, 10086.
- [9] D. J. Caruana, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 769.
- [10] Y. Zhang, H.-H. Kim, N. M. M. Dequaire, A. Heller, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *374*, 1050.
- [11] J. Wang, A.-N. Kawde, M. Musameh, G. Rivas, *Analyst* **2002**, *127*, 1279.
- [12] F. Lucarelli, G. Marrazza, M. Mascini, *Langmuir* **2006**, *22*, 4305.
- [13] S.-J. Park, T. A. Taton, C. A. Mirkin, *Science* **2002**, *295*, 1503.
- [14] M. Rochelet-Dequaire, B. Limoges, P. Brossier, *Analyst* **2006**, *131*, 923.
- [15] N. Zhu, A. Zhang, Q. Wang, P. He, Y. Fang, *Electroanalysis* **2004**, *16*, 577.
- [16] Y. Zhang, H.-H. Kim, A. Heller, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3267.
- [17] J. Wang, J. D. K. Xu, R. Polksky, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4208.
- [18] G.-U. Flechsig, J. Peter, K. Voss, P. Gründler, *Electrochem. Commun.* **2005**, *7*, 1059.
- [19] E. Palecek, M. Fojta, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 74A.
- [20] M. Fojta, L. Havran, Kizek, S. Billova, *Talanta* **2002**, *56*, 867.
- [21] E. Palecek, *Meth. Enzymol.* **1992**, *212*, 139.
- [22] E. Palecek, E. Lukasova, F. Jelen, M. Vojtiskova, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1981**, *8*, 497.
- [23] E. Lukasova, F. Jelen, E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.* **1982**, *1*, 53.
- [24] E. Palecek, M. A. Hung, *Anal. Biochem.* **1983**, *132*, 236.
- [25] E. Lukasova, M. Vojtiskova, F. Jelen, T. Sticzay, E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.* **1984**, *3*, 175.
- [26] E. Palecek, M. Fojta, F. Jelen, *Bioelectrochemistry* **2002**, *56*, 85.
- [27] M. Fojta, L. Havran, S. Billova, P. Kostecka, M. Masarik, R. Kizek, *Electroanalysis* **2003**, *15*, 431.
- [28] M. Fojta, L. Havran, M. Vojtiskova, E. Palecek, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6532.
- [29] P. Kostecka, L. Havran, H. Pivonkova, M. Fojta, *Bioelectrochemistry* **2004**, *63*, 245.
- [30] B. Yosypchuk, M. Fojta, L. Havran, M. Heyrovsky, E. Palecek, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 186.
- [31] G.-U. Flechsig, T. Reske, *DE Patent 10 2005 039 726 B3*, **2005**.
- [32] G.-U. Flechsig, T. Reske, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2125.
- [33] R. H. Liu, R. Lenigk, J. Yang, R. Druyor-Sanchez, P. Grodzinski, *P. Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1911.
- [34] R. G. Sosnowski, E. Tu, W. F. Butler, J. P. O'Connell, M. J. Heller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 1119.
- [35] G.-U. Flechsig, J. Peter, G. Hartwich, J. Wang, P. Gründler, *Langmuir* **2005**, *21*, 7848.
- [36] T. Zerihun, P. Gründler, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *415*, 85.
- [37] P. Gründler, G.-U. Flechsig, *Electrochim. Acta* **1998**, *43*, 3451.
- [38] J. Wang, P. Gründler, G.-U. Flechsig, M. Jasinski, J. Lu, J. Wang, Z. Zhao, B. Tian, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *396*, 33.
- [39] G.-U. Flechsig, O. Korbut, S. B. Hocevar, S. Thongngamdee, B. Ogorevc, P. Gründler, J. Wang, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 192.
- [40] J. Wang, P. Gründler, G.-U. Flechsig, M. Jasinski, G. Rivas, E. Sahlin, J. L. L. Paz, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3752.
- [41] J. Wang, G.-U. Flechsig, A. Erdem, O. Korbut, P. Gründler, *Electroanalysis* **2004**, *16*, 928.
- [42] P. Gründler, G.-U. Flechsig, *Microchim. Acta* **2006**, *154*, 175.
- [43] F. Wachholz, J. Gimsa, H. Duwensee, H. Grabow, P. Gründler, G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* **2007**, *19*, 535.
- [44] J. Vanderhoeven, K. Pappaert, B. Dutta, P. V. Hummelen, G. Desmet, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4474.
- [45] E. M. Boon, J. K. Barton, V. Bhagat, M. Nersessian, W. Wang, M. G. Hill, *Langmuir* **2003**, *19*, 9255.
- [46] C. Lau, S. Reiter, W. Schuhmann, P. Gründler, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *379*, 255.
- [47] C. Lau, G.-U. Flechsig, P. Gründler, J. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *554*, 74.
- [48] J.-F. Huang, I.-W. Sun, *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 989.
- [49] B. A. Steel, T. M. Herne, M. J. Tarlov, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4670.

Publikation III

Electrochemical detection of osmium tetroxide-labeled PCR-products by means of protective strands

Thomas Reske^a, Maren Mix^{a,b}, Hubert Bahl^b, Gerd-Uwe Flechsig^{a,*}

^a University of Rostock, Department of Chemistry, Dr. -Lorenz-Weg 1, D-18051 Rostock, Germany

^b University of Rostock, Department of Biological Sciences, A.-Einstein-Str. 3, D-18051 Rostock, Germany

Received 1 June 2007; received in revised form 8 September 2007; accepted 10 September 2007

Available online 15 September 2007

Published in honor of Professor Joseph Wang's 60th birthday.

Abstract

This communication reports about how single-stranded 136 base polymerase chain reaction (PCR) products labeled with electrochemically active osmium tetroxide bipyridine can be detected voltammetrically by hybridization with probe strands immobilized on gold electrodes. These electroactive ssDNA targets have been obtained by means of Lambda Exonuclease treatment of the double-stranded PCR products followed by hybridization of the remaining single strands with short protective strands and covalent labeling with osmium tetroxide bipyridine. Square-wave voltammetric signals of these osmium labels have been obtained only upon hybridization with the immobilized probe strands. An optimal 50 °C hybridization temperature has been found with a saturation of the probe layer at 30 min hybridization time and 7.5 nmol/l target concentration. The blank capture probe layer alone did not yield any signal. Unprotected strands produced almost no interference. Such double-selective switch-on electrochemical hybridization assays hold great promise for the specific detection of PCR products.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: PCR product; Protective strand; Osmium tetroxide bipyridine; Gold electrode; Probe SAM; DNA hybridization

1. Introduction

Nucleic acid-modified electrodes used as biosensors can detect the hybridization of two complementary DNA single strands (probe and target). This electrochemical transduction can be performed by means of molecules that are (a) covalently attached to the target, (b) interacting with the negatively charged phosphate groups or (c) intercalating into the base stack. It is also possible to make use of the intrinsic electrochemical activity of the DNA, e.g. the oxidation of guanine [1–3]. Magnetic beads [4,5] and self-assembled monolayers [6–12] are proven approaches to immobilize the probe strands. We recently reported about the application of covalently attached redox markers together with thiol-linked probe oligonucleotides on heated gold electrodes [13,14].

A few studies about the electrochemical detection of polymerase chain reaction (PCR) products have been published.

Methylene blue intercalates stronger into ssDNA (single-stranded DNA) than into dsDNA (double-stranded DNA). This has been used to detect the hybridization of PCR products with capture probes immobilized on carbon paste electrodes [15]. Upon successful hybridization, a diminished voltammetric methylene blue signal has been observed. In similar approaches, daunomycin [16,17] and Meldola's blue [18] have been used to detect PCR products electrochemically. Hybridization detection assays basing on intercalators and alike often suffer from small differences in the electrochemical signals obtained before and after target binding. Yet, this difference has to be taken as the hybridization indication.

The methods of electrochemical hybridization detection have been reviewed several times [19–23].

The complex $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ can be utilized as an electrochemically reversible covalent DNA-label [24]. It reacts with the pyrimidine bases thymine and cytosine [25] forming a diester of osmium(VI) acid in well-known manner under oxidation of the C–C-double bond in the pyrimidine ring. Labeling of DNA-strands of any length can be easily performed in the laboratory, which is an important advantage of this approach. However,

* Corresponding author. Tel.: +49 381 4986470; fax: +49 381 4986461.
E-mail address: gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de (G.-U. Flechsig).

only pyrimidine bases of single strands can be labeled this way. Such Os-modified DNA strands on the other hand are unable to form double strands, i.e. hybridization with probe oligos is no longer possible. These reactions have been investigated for about 25 years by Palecek et al. They showed that osmium tetroxide complexes could be utilized as strand selective probes which allow not only discriminating between single and double-stranded DNA but also studying the structure of double strands as well as sensitive detection of nucleic acids [26–29]. Until now, the steps of Os(VIII)-labeling, probe hybridization and electrochemical detection have been conducted in solution and at separate surfaces, respectively, especially by means of magnetic beads [30–34]. Such osmium tetroxide labeling had also been applied to detect oligo(dA)_n-containing PCR products by means of thermal denaturation and magnetic separation [31,32].

Protective oligonucleotides are known from biochemical applications, where, e.g. DNA strands have to be protected against cleavage by nucleases [35]. Recently, we reported on how protective oligonucleotide strands can be utilized for labeling thymine-containing nucleic acids by means of [OsO₄(bipy)] without losing their ability for hybridization reactions with immobilized oligonucleotide probes [36,37]. We applied this technique to compare the DNA hybridization on both heated ceramic-based and rotating gold disk electrodes [38]. Fojta et al. have (independently from us) reported about the use of protective oligonucleotides for the preparation of osmium tetroxide-labeled reporter strands by means of magnetic separation [39]. Here, we demonstrate that this new method can also be applied to detect the products of polymerase chain reactions (PCR). Such amplicons are generally obtained in the form of double strands. To ease the hybridization with the immobilized probe oligonucleotides, we removed one of the product strands by nuclease cleavage.

2. Experimental

2.1. Material

2,2'-Bipyridine was delivered by Merck and osmium tetroxide as a 2% aqueous solution from Fluka. The dithiol-modified DNA probe (*F-probe*) containing a (dT)₁₅-spacer was delivered by Friz Biochem GmbH (Munich, Germany). The 136 mer *Fragment* was prepared as described below. The “Tris-buffer” contained 10 mmol/l Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane and 0.5 mol/l sodium sulfate and was adjusted to pH 7.5 using sulfuric acid. The sequences of all DNA-strands together with their length and designations are given in Table 1. The *F-probe* oligonucleotide fits to a 27-base recognition site (underlined in Table 1) of the 136 base *Fragment*. The *F-protector* oligonucleotide contains 5 mismatches (underlined and bold in Table 1) to ease its later displacement by the immobilized *F-probe*.

2.2. PCR and Exonuclease treatment conditions

A synthetic 136-base-DNA (sequence from the genome of *Clostridium acetobutylicum* [1855609–1855744]) was used as template. The standard PCR reaction was performed with

Table 1
DNA sequences

Designation	Length	Sequence
<i>Fragment</i>	136	5'- CTTACAGGAATTGTTTGGGACTTGCAA GGGCTTTGGAGAGGCATTAGCAGTTCAA ATGGTAATAGGTAATACAGTAAATCAG CTCAAGGACTTTTCTCCTAC- TACCACTTGACAAGCGTACTTACAATGG- 3'
<i>F-protector</i>	27	5'- CAG TGT TTG ACC TGA TTT TAC TGT CTT-3'
<i>F-probe</i>	27	5'-AAG TCC TTG AGC TGA TTT TAC TGT ATT- ttttttttttttt-[Dithio]3-3'

100 ng of template DNA, 0.4 μ M dNTPs, 0.5 μ M of the primers C.aceto F and C.aceto Rp (Table 2) and 2.5 U Sawady-Taq-DNA-Polymerase (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) in 50 μ l reaction volume according to the manufacturer's instructions. While synthetic primers are normally not phosphorylated on their 5'-end (according to natural DNA), the primer C.aceto Rp was 5'-phosphorylated for later recognition by the exonuclease to allow cleavage of only this strand. The enzymatic hydrolysis of the phosphorylated strand of the DNA was performed using 15 U of Lambda Exonuclease (NEB GmbH, Frankfurt a.M., Germany), which has the highest selectivity for 5'-end phosphorylated DNA, in 1 \times Lambda Exonuclease buffer for 1 h at 37 °C. During this step, the phosphorylated strand was recognized by the exonuclease and (at least in theory) completely removed from the PCR product's double strand releasing a single strand. We will show in the next section that the yield of this process was not 100%. The enzyme was heat-inactivated after the reaction for 10 min at 75 °C. Best results in the voltammetric experiments were achieved when the DNA was purified after that using the NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) with 4 volumes of NTC buffer or the innuPREP DOUBLEpure Kit (Analytik Jena AG, Jena, Germany) according to the manufacturer's instructions. This purified mainly single-stranded PCR product called *Fragment* has been used in the following steps. All DNA concentrations were evaluated visually in the agarose gel (2%, w/v) using the DNA-marker (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, Germany) as a comparison.

2.3. Modification of *Fragment* oligonucleotide

The *Fragment* at its maximum concentration (between 25 and 250 nmol/l) and the protective strand *F-protector* (10 μ mol/l) in at least ten-fold excess were mixed and left for 2 h at room temperature to allow hybridization. In one control experiment, the protective strand has not been added. A Tris-buffer solution

Table 2
Primers

Sequence: 5'-3'		
C.aceto F	CTTACAGGAATTGTTTGGGAA	Forward primer
C.aceto Rp	p CCATTGTAAGTACGCTTGTCA	Reverse primer

containing 10 mmol/l osmium tetroxide and 10 mmol/l 2,2'-bipyridine (forming $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$) was then added and left at room temperature for 2 h. After this period, the excess of the osmium complex was removed by dialysis against pure Tris-buffer by means of Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units, 3500 MWCO (Rockford, IL, USA) at 4 °C for 19 h. This solution (containing the osmium-labeled target *Fragment*) was used for the hybridization experiments.

2.4. Preparation of SAM-modified gold electrodes

The gold disk electrode (Metrohm, Switzerland) was first polished using corundum 0.3 µm and then electrochemically treated by means of 25 voltammetric cycles between –0.2 and +1.65 V at 100 mV/s in 0.5 M sulfuric acid. After rinsing with water, one droplet of 15 µl *F-probe* (30.3 µmol/l) solution was given onto the dried electrode and left overnight (16 h) at 10 °C in a water-saturated atmosphere allowing the formation of the probe-SAM. After this, the electrode was soaked for 1 h in 1 mmol/l aqueous mercaptohexanol solution.

2.5. Hybridization and dehybridization procedure

During the hybridization step, the rotating gold disk electrode was dipped in a beaker containing the target (*Fragment*) solution and adjusted to 1000 rpm. After this the electrode was rinsed with Tris-buffer. To regenerate the probe-SAM by dehybridization, the electrode was immersed in 50 °C water for 60 s.

2.6. Electrochemical measurements

For all electrochemical procedures, an Autolab PSTAT10 (ecochemie, Utrecht, The Netherlands) controlled by a PC with GPES 4.8 software and an electrode stand inside a Faraday cage together with a Ag/AgCl (3 mol/l KCl) reference electrode and a glassy carbon counter electrode (all from Metrohm AG, Herisau, Switzerland) was used. The parameters for square-wave voltammetry were 200 Hz, 40 mV amplitude. The scan was performed from –0.55 to 0.0 V. All measurements were conducted at room temperature in Tris-buffer. The peak-shaped signals were smoothed and baseline-corrected. Automatic peak search was applied.

3. Results and discussion

The PCR and Lambda Exonuclease treatment were performed as described above. For a successful electrochemical detection without disturbances of hybridization of probe and target, we chose a sequence with a low ability to form stable secondary structures. The results of PCR and Lambda Exonuclease treatment are displayed in Fig. 1. In lane 1, the molecular marker was applied, in lane 2, the product of the PCR before Lambda Exonuclease treatment and in lane 3, the PCR-product after Lambda Exonuclease treatment is shown. It can be seen that the PCR resulted in a single band, which is then partially digested after the Lambda Exonuclease treatment. The ssDNA shows a different running behavior in the gel. Such changed

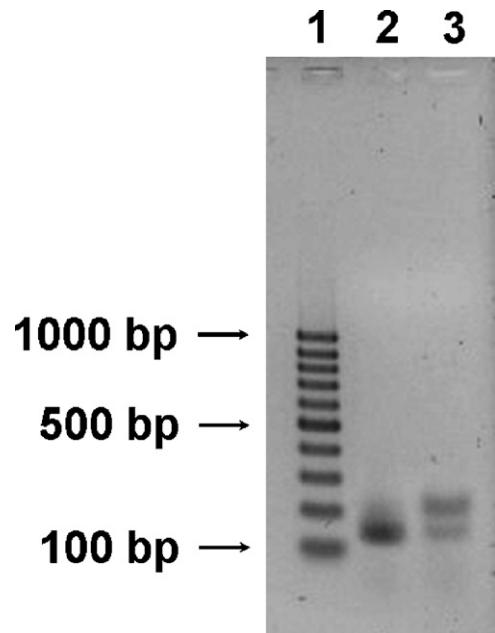


Fig. 1. Two percent (w/v) agarose gel stained with Gelred (Cambridge Bio-Science, UK): lane 1, Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder (0.3 µg); lane 2, 2 µl PCR-product (136 bp-*Fragment*); lane 3, 5 µl PCR-product after Lambda Exonuclease treatment.

interactions with the agarose gel can be attributed to a different ternary structure of ssDNA, which is bulkier compared to dsDNA, which is more stretched. A major fraction of the PCR product has been digested to the single-stranded form; however, the yield of this process was not 100%. We found the same pattern of ssDNA and dsDNA bands in PCR-products obtained by asymmetric PCR without any exonuclease being involved. These results will be the subject of a follow-up paper.

Fig. 2 depicts square-wave voltammograms representing the detection of the single-stranded PCR product together with different controls. The large voltammetric signal of the osmium tetroxide bipyridine-labeled PCR product (Fig. 2c) indicates not

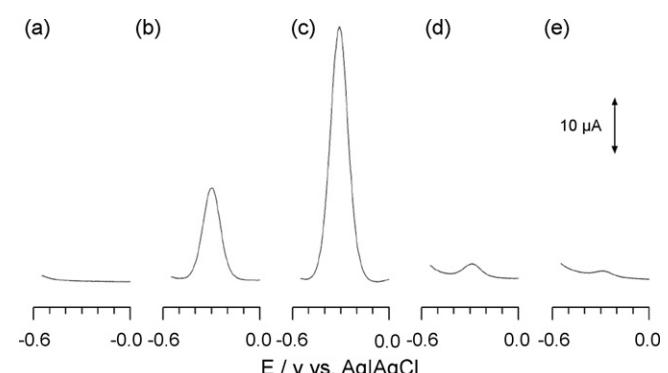


Fig. 2. Square-wave voltammograms at gold disk electrodes in Tris-buffer with immobilized probe strands, (a) *F-probe* not hybridized, (b) *F-probe* 15 min hybridized with 7.5 nmol/l $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -labeled *Fragment* at 23 °C, (c) *F-probe* 15 min hybridized with 7.5 nmol/l $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -labeled *Fragment* at 50 °C, (d) *F-probe* 15 min hybridized with 7.5 nmol/l $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -labeled *Fragment* at 23 °C, modification and hybridization without protecting strand and (e) *F-probe* 15 min hybridized with 7.5 nmol/l $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -labeled *Fragment* at 50 °C, modification and hybridization without protecting strand; frequency 200 Hz; amplitude 40 mV; stirring at 1000 rpm during hybridization.

only good hybridization efficiency with the immobilized capture probe at 50 °C, but also effective signal amplification due to multiple labeling. Each unprotected thymine base is able to react with one [OsO₄(bipy)], each delivering two electrons during the voltammetric scan. At 23 °C hybridization temperature (Fig. 2b), the signal attains less than half the value compared to 50 °C. This can probably be addressed to hindered exchange of the protective strand by the immobilized capture probe.

Fojta et al. did not include base mismatches into the protective strand, since it had been magnetically separated from the target strand after the osmium tetroxide modification [39]. However, immobilization of the target or protective strand is required instead. Future investigations will reveal how many mismatches between protective and target strand are necessary to allow easy in situ replacement of the protective strand by the immobilized probe.

The capture probe (*F-probe*) alone (Fig. 2a) did not yield any signal. Although, the unprotected and, hence, thoroughly [OsO₄(bipy)]-modified *Fragment* gave a very small signal at room temperature (Fig. 2d), this response could be significantly suppressed by applying an elevated hybridization temperature of 50 °C (Fig. 2e). Such minimal electrochemical response can probably be attributed to either unspecific adsorption of the target to the electrode surface or weak hybridization interactions between probe and target strands. In both cases, elevated temperature is expected to diminish the binding.

We further investigated the effect of hybridization temperature. Fig. 3 illustrates that elevated hybridization temperature has a positive effect up to 50 °C. At even higher temperature, the signal levels off.

In contrast, earlier investigations resulted in an optimal hybridization temperature between 30 and 40 °C [36–38]. The different behavior found in this study can probably be attributed to longer protective strands and capture probes (27 bases each, compared to 20 in the earlier studies). At temperatures higher than 70 °C, we expect disruption of the probe layer resulting at least in a loss of hybridization capability, as we observed earlier [13].

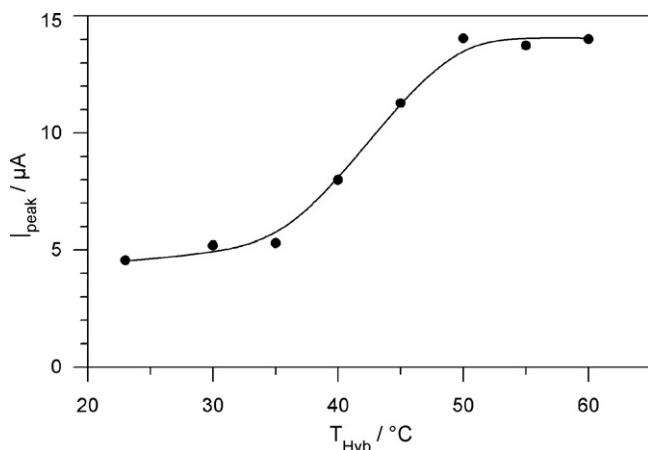


Fig. 3. Dependence of the square-wave voltammetric signals on the hybridization temperature, *F-probe*-SAM 15 min hybridized with 7.5 nmol/l target (*Fragment*). Other conditions as in Fig. 2.

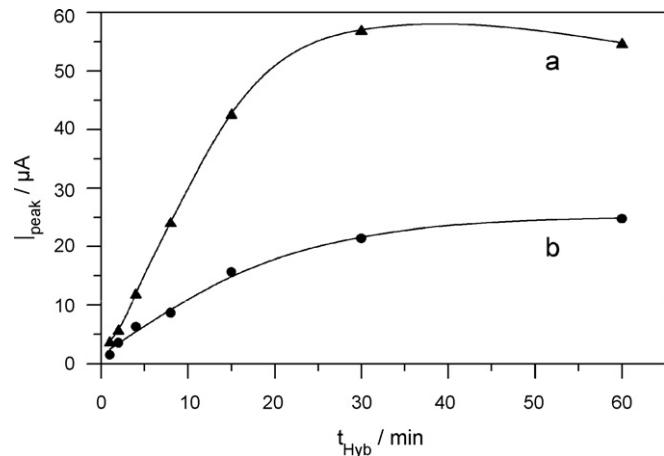


Fig. 4. Effect of the hybridization time of immobilized *F-probe* with 7.5 nmol/l target (*Fragment*) at (a) 50 and (b) 23 °C hybridization temperature. Other conditions as in Fig. 2.

Fig. 4 exhibits the effect of hybridization time upon the voltammetric signals at two different temperatures. According to Fig. 2b and c, we observed better hybridization efficiency at elevated temperature. This leads to a faster saturation of the immobilized probe layer. Even at 60 min hybridization at 23 °C, we obtained only half of the maximum signal compared to 30 min at 50 °C. Such thermal hybridization acceleration is more effective than mechanical treatment alone [38].

4. Conclusions

Single-stranded PCR products labeled with electrochemically active osmium tetroxide bipyridine can be detected voltammetrically by hybridization with probe strands immobilized at gold electrodes. Such ssDNA targets can be obtained by means of Lambda Exonuclease treatment followed by hybridization with short protective strands and covalent labeling with osmium tetroxide bipyridine. Square-wave voltammetric signals of these osmium labels are obtained only upon hybridization. An optimal 50 °C hybridization temperature has been found with a saturation of the probe layer after 30 min hybridization time at 7.5 nmol/l target concentration. The blank capture probe layer alone did not yield any signal. Unprotected strands produced almost no interference. Such double-selective switch-on electrochemical hybridization assays hold great promise for the specific detection of PCR products.

Congratulation

Gerd-Uwe Flechsig likes to congratulate Professor Joseph Wang in the occasion of his 60th birthday wishing him all the best.



Acknowledgement

The authors are grateful to the Deutsche Forschungsgemeinschaft for financial support (Fl 384/2-1, 2-3).

References

- [1] J. Wang, G. Rivas, J.R. Fernandes, J.L.L. Paz, M. Jiang, R. Waymire, *Anal. Chim. Acta* 375 (1998) 197.
- [2] J. Wang, A.N. Kawde, *Anal. Chim. Acta* 431 (2001) 219.
- [3] J. Wang, A.N. Kawde, A. Erdem, M. Salazar, *Analyst* 126 (2001) 2020.
- [4] J. Wang, R. Polksky, D.K. Xu, *Langmuir* 17 (2001) 5739.
- [5] J. Wang, D.K. Xu, A.N. Kawde, R. Polksky, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5576.
- [6] T.M. Herne, M.J. Tarlov, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 8916.
- [7] S.O. Kelley, N.M. Jackson, M.G. Hill, J.K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 38 (1999) 941.
- [8] S.O. Kelley, E.M. Boon, J.K. Barton, N.M. Jackson, M.G. Hill, *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 4830.
- [9] E.M. Boon, D.M. Ceres, T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton, *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 1096.
- [10] E.M. Boon, J.K. Barton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12 (2002) 320.
- [11] E.L.S. Wong, F.J. Mearns, J.J. Gooding, *Sens. Actuator B: Chem.* 111 (2005) 515.
- [12] E.L.S. Wong, J.J. Gooding, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2138.
- [13] G.-U. Flechsig, J. Peter, G. Hartwich, J. Wang, P. Gründler, *Langmuir* 21 (2005) 7848.
- [14] G.-U. Flechsig, J. Peter, K. Voss, P. Gründler, *Electrochem. Commun.* 7 (2005) 1059.
- [15] B. Meric, K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, S. Erensoy, U.S. Akarca, M. Mascini, M. Ozsoz, *Talanta* 56 (2002) 837.
- [16] G. Marrazza, G. Chiti, M. Mascini, M. Anichini, *Clin. Chem.* 46 (2000) 31.
- [17] M. Minunni, S. Tombelli, E. Mariotti, M. Mascini, *Fresenius J. Anal. Chem.* 369 (2001) 589.
- [18] K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, H. Karadeniz, Z. Ozkan, A. Erdem, F. Jelen, M. Ozsoz, *Turk. J. Chem.* 28 (2004) 523.
- [19] J. Wang, *Anal. Chim. Acta* 469 (2002) 63.
- [20] E. Palecek, F. Jelen, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32 (2002) 261.
- [21] J.J. Gooding, *Electroanalysis* 14 (2002) 1149.
- [22] T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 1192.
- [23] P. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 104.
- [24] E. Palecek, M. Fojta, *Anal. Chem.* 73 (2001) 74A.
- [25] E. Palecek, *Methods Enzymol.* 212 (1992) 139.
- [26] E. Palecek, E. Lukasova, F. Jelen, M. Vojtiskova, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 8 (1981) 497.
- [27] E. Lukasova, F. Jelen, E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.* 1 (1982) 53.
- [28] E. Palecek, M.A. Hung, *Anal. Biochem.* 132 (1983) 236.
- [29] E. Lukasova, M. Vojtiskova, F. Jelen, T. Sticzay, E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.* 3 (1984) 175.
- [30] E. Palecek, M. Fojta, F. Jelen, *Bioelectrochemistry* 56 (2002) 85.
- [31] M. Fojta, L. Havran, S. Billova, P. Kostecka, M. Masarik, R. Kizek, *Electroanalysis* 15 (2003) 431.
- [32] M. Fojta, L. Havran, M. Vojtiskova, E. Palecek, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 6532.
- [33] P. Kostecka, L. Havran, H. Pivonkova, M. Fojta, *Bioelectrochemistry* 63 (2004) 245.
- [34] B. Yosypchuk, M. Fojta, L. Havran, M. Heyrovsky, E. Palecek, *Electroanalysis* 18 (2006) 186.
- [35] G. Wang, L. Wu, X. Wang, J. Cheng, W. Yang, *Int. Patent Application WO 02/16647 A1* (2000).
- [36] G.-U. Flechsig, T. Reske, *Patent DE 10 2005 039 726 B3* (2005).
- [37] G.-U. Flechsig, T. Reske, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2125.
- [38] J. Peter, T. Reske, G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* 19 (2007) 1356.
- [39] M. Fojta, P. Kostecka, M. Trefulka, L. Havran, E. Palecek, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1022.

Publikation IV

Electrochemical Detection of Asymmetric PCR Products by Labeling with Osmium Tetroxide

Maren Mix, Thomas Reske, Heiko Duwensee, Gerd-Uwe Flechsig*

University of Rostock, Department of Chemistry, Dr.-Lorenz-Weg 1, D-18059 Rostock, Germany

*e-mail: gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de

Received: October 13, 2008

Accepted: December 25, 2008

Abstract

Single stranded DNA-targets from asymmetric polymerase chain reaction (PCR) of a sequence of the gram positive, spore forming bacterium *Clostridium acetobutylicum* were detected by square-wave voltammetry after labeling with osmium tetroxide bipyridine and hybridization with DNA capture probes immobilized on gold electrodes. The asymmetric PCR, performed with a 10-fold excess of the forward-primer, was used without any further purification for hybridization with protective strands and covalent labeling with osmium tetroxide bipyridine. Square-wave voltammetric signals of 20 nmol/L targets were significantly higher at 50 °C compared with 23 °C hybridization temperature. A fully noncomplementary protective strand yielded thoroughly modified targets unable for further hybridization. Coupling this with thermal discrimination opens new opportunities for sequence specific DNA detection.

Keywords: Asymmetric polymerase chain reaction, PCR, Square-wave voltammetry (SWV), Osmium tetroxide bipyridine, Covalent DNA label, Electrochemical hybridization detection

DOI: 10.1002/elan.200804493

1. Introduction

In the recent decade one could observe a dramatically increased publishing activity in the area of electrochemical DNA detection. It was shown that the detection of hybridization of two complementary DNA single strands (probe and target) could not only be achieved by classic molecular biological methods such as Northern or Southern Blots or optical microarrays but also by nucleic acid-modified electrochemical biosensors. The electrochemical transduction can be performed by molecules that are either covalently attached to the target, interacting with the negatively charged phosphate groups or intercalating into the base stack. It is also possible to make use of the intrinsic electrochemical activity of the DNA, e.g., the oxidation of guanine [1].

Most common for the immobilization of probe strands are magnetic beads and self-assembled monolayers [2]. We recently reported about the application of covalently attached redox markers together with thiol-linked probe oligonucleotides on heated gold electrodes [3].

In other publications the electrochemical detection of PCR-products was performed with methylene blue [4, 5] or sandwich hybridization with an alkaline phosphatase conjugate on biotinylated signaling probes [6]. One of the problems of hybridization detection basing on intercalators is that only the (often small) difference of the electrochemical response before and after target binding has to be taken as the hybridization signal. The methods of electro-

chemical hybridization detection have been reviewed many times [7–15].

The complex $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ can be utilized as an electrochemically reversible covalent DNA-label. It reacts rapidly with the pyrimidine base thymine and less quickly with cytosine [16] forming a diester of osmic(VI) acid in well-known manner under oxidation of the C-C-double bond in the pyrimidine ring. These reactions have been investigated for about 25 years by Palecek et al. [17–20]. One of the main advantages of this approach is that the labeling of DNA-strands of any length can be easily performed in the laboratory. However, only pyrimidine bases of single strands can be labeled this way. Such Os-modified DNA strands on the other hand are unable to form double strands, i.e. hybridization with probe oligos is no longer possible. Until now, the steps of Os(VIII)-labeling, probe hybridization, and electrochemical detection have been conducted in solution and at separate surfaces, respectively, especially by means of magnetic beads [21–25]. Since only ss-DNA can be labeled by means of $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$, protective partially complementary oligonucleotides (which can be replaced later by the fully complementary capture probe) have to be used for the labeling process. Protective oligonucleotides are known from biochemical applications, where, e.g., DNA strands have to be protected against cleavage by nucleases [26]. Recently, we reported about how protective oligonucleotide strands can be utilized for labeling thymine-containing nucleic acids by means of $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ without losing their ability for

Table 1. DNA sequences, the mismatches in the protective strand are highlighted.

Designation	Length	Sequence
Fragment	136	5'-CTTACAGGAATTGTTTGGGACTTGCAAGGGCTT-TTGGAGAGGCATTAGCAGTT-CAAATGGTAATAGGTA-ATACAGTAAATCAGCTCAAGGACTTTTCTCCTAC-TAC-CACTTGACAAGCGTACTTACAATGG -3'
<i>F-protector</i>	27	5'-AAG <u>AGC</u> ATGAGCTGATT <u>TAG</u> TG <u>ATT</u> -3'
<i>F-probe</i>	27	5'-AAGTCCTTGAGCTGATTACTGTATT-TTTTTTTTTTTT[Dithio] ₃ -3'
<i>P1-protector</i>	32	5'-GCCTCTTATAGTTATCAGGATCCATTGG-3'

hybridization reactions with immobilized oligonucleotide capture probes [27–29].

The electrochemical detection of DNA-sequences amplified by PCR (polymerase chain reaction) has been described in a couple of publications in the last few years. In most cases the template is amplified by symmetric PCR. Before any electrochemical hybridization measurement with the PCR product can be performed, a denaturation step is necessary to separate the double strand (produced during the PCR) into two single strands. We recently reported on the treatment of symmetric PCR products with Lambda Exonuclease to remove one DNA strand [29].

We think it is favorable if electrochemical signals are only obtained upon positive detection, and especially if a blank sample does not yield any response. This seems to be much more reliable than other procedures described earlier delivering either a decrease of the signal in case of a positive detection [30], or an increase of a signal which is already present without any target DNA [31]. Furthermore, time-consuming cleaning steps are often needed [32, 33]. Cost is another concern to be considered. Expensive, though frequently used, materials include magnetic beads, biotinylated primers, digoxigenin-labeled sequences or antibodies [34–36]. A promising detection protocol is symmetric PCR with ferrocene-labeled dUTP as suggested by Hsing et al. [37]. However, the synthesis of the ferrocene-labeled dUTP seems to be time-consuming and complicated. Another possibility is the detection of hybridization based on an enzyme-linked assay [38].

There are only a few reports on the electrochemical detection of asymmetric PCR-products [39, 40]. To our knowledge, these methods suffer from some of the problems mentioned above or do not have desirable detection limits. The main problem here is limited efficiency of asymmetric PCR.

Here, we demonstrate that osmium tetroxide bipyridine can also be applied to detect the products of asymmetric polymerase chain reactions on gold electrodes modified with capture probes. The used model sequence was randomly chosen from a bacterium used in molecular biology as a model organism for non human-pathogenic Clostridia. Usually, PCR amplicons are obtained in form of double strands. By raising the concentration of one primer, the (now asymmetric) PCR yields ssDNA besides dsDNA. This mixed product was used in the experiments without further purification.

2. Experimental

2,2'-Bipyridine was delivered by Merck and osmium tetroxide as a 2% aqueous solution was obtained from Fluka. All DNA oligo nucleotides (*probes, targets and protector strands*) were delivered by Friz Biochem GmbH (Munich, Germany). The “Tris-buffer” (containing 10 mmol/L tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Fluka) and 0.5 mol/L sodium sulfate (Fluka)) was adjusted to pH 7.5 using sulfuric acid. The latter was used instead of HCl to avoid chloride, which is suspected to form various gold chlorides on the working electrode’s surface disturbing formation/durability of SAMs. Table 1 lists the sequences of all DNA-strands together with their length and designations used in this paper. The *F-protector* oligonucleotides were designed to have 5 mismatches (underlined in Table 1) to facilitate their later displacement by the immobilized *F-probe*. Highly purified water (18 MΩ cm, TOC < 2 ppb) prepared by means of a system from SG Water (Barsbüttel, Germany) was used throughout.

2.1. Preparation of SAM-Modified Gold Electrodes

First, the gold disk electrode (Metrohm, Switzerland) was polished using corundum 0.3 μm (Buehler) and rinsed thoroughly with water. It was then electrochemically treated by means of 25 voltammetric cycles between –0.2 und +1.65 V at 100 mV/s in 0.5 M sulfuric acid. The electrode was rinsed with water before one droplet of 15 μL *F-probe* solution (30.3 μmol/L) was placed onto the electrode surface in order to form the capture probe SAM. After 16 h at 10°C in a water-saturated atmosphere, the electrode was rinsed and immersed in 1 mmol/L aqueous mercaptohexanol solution for one hour.

2.2. Hybridization and Dehybridization Procedure

For the hybridization step, the probe-SAM-modified gold disk electrode was dipped into a beaker containing the target solution. The solution was stirred constantly using a magnetic stirrer. Heating of the sample solution was conducted by means of a water bath. After the hybridization, the electrode was rinsed with Tris-buffer.

Following the electrochemical measurement, the electrode was regenerated by a dehybridization step. To retrieve the probe-SAM back, the electrode was immersed in 50 °C deionized water for 60 s.

2.3. Electrochemical Measurements

For all electrochemical procedures, an Autolab PSTAT10 (Ecochemie, Utrecht, The Netherlands) controlled by a PC with GPES 4.8 software and an electrode stand inside a Faraday cage was used together with a Ag/AgCl (3 mol/L KCl) reference electrode and a glassy carbon counter electrode (all from Metrohm AG, Herisau, Switzerland). The parameters for square-wave voltammetry were 200 Hz and 40 mV amplitude. The scan was performed from –0.55 to 0.0 V. All measurements were performed at room temperature in Tris-buffer. The peak-shaped signals were smoothed by means of a Savitzky and Golay filter (level 3) and baseline-corrected (moving average, peak width 0.03).

2.4. PCR Conditions

A synthetic 136-base-DNA strand (sequence from the genome of *Clostridium acetobutylicum* [1855609–1855744]) was used as the template. The asymmetric PCR was performed with 100 ng of template DNA, 0.4 μM dNTPs, 1 μM of the primer C.aceto F and 0.1 μM C.aceto R (Table 2), and 2.5 U Sawady-Taq-DNA-Polymerase (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) in 50 μL reaction volume according to the manufacturer's instructions. In case of the symmetric PCR an equal amount of the primers was used (0.5 μM). The PCR was performed with the following parameters: 1 × 94 °C, 2 min; 30 × (94 °C, 30 s, 57 °C, 45 s, 72 °C, 30 s); 1 × 72 °C, 7 min. The agarose gelelectrophoresis was performed with a 2% [w/v] agarose gel in 1 × TAE-buffer (40 mM tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, 20 mM glacial acetic acid, 1 mM EDTA) for 45 min at 80 V. The gels were stained with Gelred (Cambridge BioScience, UK) for 30 min and visualized on a Transilluminator UST-20M-8PC (Biostep, Jahnsdorf, Germany) under a Darkhood DH-40/50 (Biostep, Jahnsdorf, Germany) and photographed with an Olympus C-7070 digital camera with an Ethidiumbromide-filter (540–640 nm). All DNA-concentrations were evaluated visually in the agarose gel (2% [w/v]) using the DNA-ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, Germany) as a comparison.

Table 2. Primers.

Sequence: 5'-3'

C.aceto F CTTACAGGAATTGTTTGGGA forward primer
C.aceto R CCATTGTAAGTACGCTTGTCA reverse primer

2.5. Modification of Fragment Oligonucleotide (Target)

For the modification, 200 μL of PCR-solution (containing the single target strand *Fragment*) were used without further purification. The *Fragment* at its maximum concentration (ca. 20 nmol/L) and the protective strand *F-Protector* (10 μmol/L in the hybridization solution) were mixed and left for two hours at room temperature to allow hybridization. A solution containing 10 mmol/L osmium tetroxide and 10 mmol/L 2,2'-bipyridine (forming [OsO₄(bipy)]) was then added and left at room temperature for 2 hours. After this period the excess of the osmium complex was removed by dialysis against pure Tris-buffer by means of Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units, 3500 MWCO (Rockford, IL, USA) at 4 °C for 19 hours. After the dialysis, the purified solution (containing the osmium-labeled target *Fragment*) was used for the hybridization experiments.

3. Results and Discussion

Figure 1 displays gel electrophoretic analysis of symmetric (lanes 2 and 3) and asymmetric (lanes 4 and 5) PCR products. While classic symmetric PCR provides an optimal yield of the double stranded amplicon, asymmetric PCR is usually prone to limited efficiency. However, this variant also yields ssDNA, which is visible on the gel above the dsDNA. Excess primers can be found right below the dsDNA bands. The DNA ladder can be applied only for dsDNA, since ssDNA (primers and products) shows a different running behavior in the gel. The single strands can be used directly for further modification or hybridization steps. Here, we used the asymmetric PCR products for labeling with osmium tetroxide bipyridine. As described earlier [27], the single stranded target DNA is first hybridized with a protective strand in order to preserve an unmodified recognition site for later capturing by immobilized probes. The latter event has been detected by square-wave voltammetry as depicted in Figure 2. While a blank capture probe layer does not show any voltammetric response (Fig. 2a), we found a large reversible peak at –0.29 V (vs. Ag/AgCl | 3 mol/L KCl) for the hybridization of the immobilized capture probe with the [OsO₄(bipy)]-modified asymmetric PCR product (Fig. 2b, c). This peak is caused by the reversible redox couple osmium (IV/VI) according to earlier findings of Lukasova et al. [18], as well as results of Crowell et al. and Meites [41, 42]. The reduction of Os(VIII) happens at 0 V and the reduction of Os(IV) to Os(III) at ca. –1.1 V. We found that the voltammetric response can be doubled if hybridization solution temperature is increased from 23 to 50 °C. In contrast, we observed a much smaller peak upon hybridization of the same PCR product after protection with the noncomplementary *P1-protector* (Fig. 2d, e). In this case, a stringent hybridization temperature (50 °C) leads to a diminished contribution of the thoroughly labeled and, hence, nonspecific DNA. The latter is discriminated only during hybridization with the protective strand. By using a noncomplementary protective

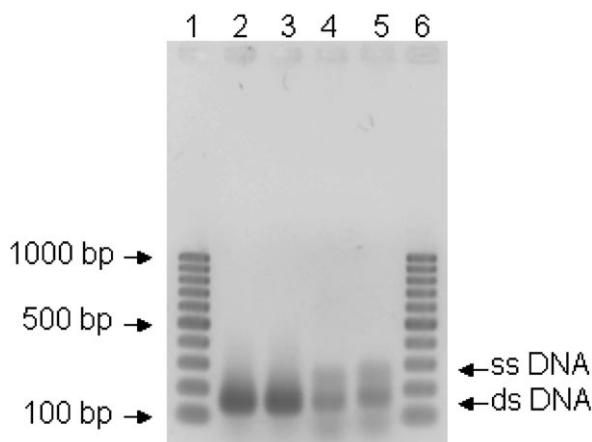


Fig. 1. 2% [w/v] agarose gel stained with Gelred (Cambridge BioScience, UK); lane 1 + 6: Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (0.3 μ g), lane 2 + 3: 2 μ L symmetric PCR-product (136 bp-fragment), lane 4 + 5: 5 μ L asymmetric PCR-product (136 bp-fragment in lower band and 136 bp-fragment in higher band)

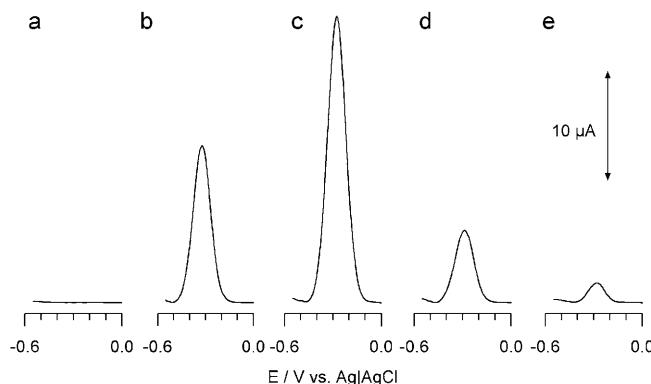


Fig. 2. Square-wave voltammetric signals at gold disk electrodes in Tris-buffer with immobilized probe strands, a) *F*-probe not hybridized at 23°C, b) *F*-probe 15 min hybridized with 20 nmol/L [OsO₄(bipy)]-labeled *Fragment* at 23°C, c) *F*-probe 15 min hybridized with 20 nmol/L [OsO₄(bipy)]-labeled *Fragment* at 50°C, d) *F*-probe 15 min hybridized with 20 nmol/L [OsO₄(bipy)]-labeled *Fragment* at 23°C, modification of the *Fragment* with noncomplementary protecting strand *P1-protector* and (e) *F*-probe 15 min hybridized with 20 nmol/L [OsO₄(bipy)]-labeled *Fragment* at 50°C, modification of the *Fragment* with noncomplementary protecting strand *P1-protector*; frequency 200 Hz; amplitude 40 mV; stirring during the hybridization step at 1000 rpm.

strand, the protection widely fails and causes labeling of the entire target strands (i.e. pyrimidine bases therein) leaving no intact recognition sites.

Figure 3 displays the effect of hybridization time upon the square-wave voltammetric response of the [OsO₄(bipy)]-label at 23 and 50 °C. Whereas a beginning saturation of the capture probe layer can be observed after 30 min. at 23 °C, the hybridization process does not appear finished at 50 °C, even after 60 min. Capture probe availability and hence, hybridization efficiency seems significantly better at elevated hybridization temperature due to dissolving of

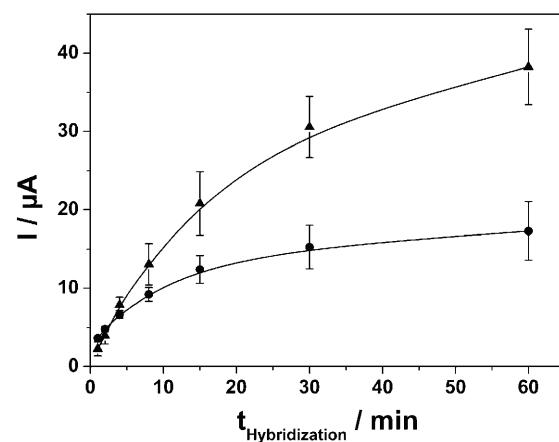


Fig. 3. Effect of the hybridization time of immobilized *F*-Probe with 20 nmol/L target (*Fragment*) at a) 50 and b) 23°C hybridization temperature. The error bars indicate the standard deviation of 3 independent hybridization-dehybridization series, each performed with a newly prepared probe-SAM. Other conditions were the same as in Figure 2.

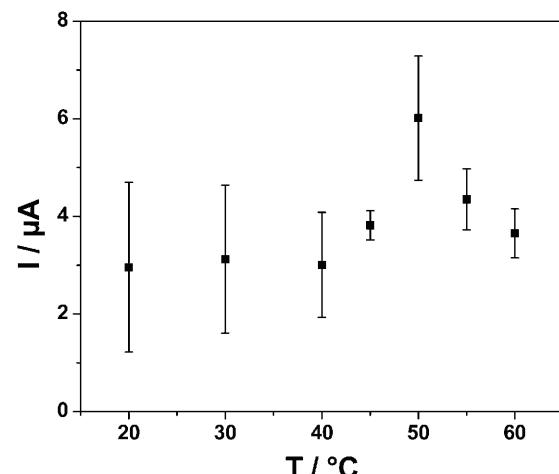


Fig. 4. Dependence of the square-wave voltammetric signals on the hybridization temperature, *F*-Probe-SAM 5 min hybridized with 20 nmol/L target (*Fragment*). The error bars indicate the standard deviation of 3 independent PCR runs and hybridization-dehybridization series, each performed with a newly prepared probe-SAM. Other conditions were the same as in Figure 2.

secondary structures of the capture probe and an accelerated reaction between capture probe and target. Obviously, the saturation level is at least twice as high comparing 50 and 23 °C hybridization experiments. The effect is similar to what we have found earlier when we treated symmetric PCR products with Lambda Exonuclease to remove one DNA strand [29].

Figure 4 exhibits the effect of hybridization temperature upon the voltammetric signals of the [OsO₄(bipy)]-label following a 5 min. hybridization period. Even after this short hybridization time, good signal height of several μ A is achieved. The observed temperature effect is comparable to

longer hybridization periods (Fig. 3). Above 50 °C, a signal decrease is observed, presumably due to double strand melting (the melting temperature is 55 °C according to oligonucleotide calculation programs). This indicates that 50 °C is indeed the optimal stringent hybridization temperature. Although the absolute signal level of different PCR runs and different hybridization–dehybridization series is subject to fluctuations as indicated by the error bars in Figure 4, the average signals as well as the trend in each series are well reproducible. The reason for these fluctuations can be found in variations of the surface coverage with probe strands. This can be compensated by calibration. Furthermore, the simple symmetric and asymmetric PCR protocols are known as qualitative amplification methods. They are not well suited for quantification. Future development will lead to quantitative real-time PCR with electrochemical detection.

4. Conclusions

Asymmetric PCR products contain single stranded target strands, which can easily be modified using covalent [OsO₄(bipy)]-labels. Protective strands preserve a recognition site of the target for later hybridization with immobilized capture probes on gold electrodes. The redox couple osmium (IV/VI) of the [OsO₄(bipy)]-labels yields large reversible square-wave voltammetric signals. Discrimination of noncomplementary DNA is possible even by hybridization with the protective strand. This opens a route towards double discrimination by consecutive stringent hybridization with both protective and capture probes allowing selective determination of DNA sequences even in presence of a large excess of fully noncomplementary or mismatched DNA.

5. Acknowledgements

The authors are grateful to the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG projects FL 384/4-2, 7-1, and 8-1) and to the State of Mecklenburg-Vorpommern (Excellence Funding Program) for financial support.

6. References

- [1] M. Ravera, G. Bagni, M. Mascini, D. Osella, *Bioinorg. Chem. Appl.* **2007**, Article ID 91078
- [2] E. Palecek, M. Fojta, *Talanta* **2007**, 74, 276.
- [3] J. Peter, T. Reske, G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* **2007**, 19, 1356.
- [4] R. Lai, E. T. Lagally, S.-H. Lee, K. W. Plaxco, A. L. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, 103, 4017.
- [5] O. Paenke, A. Kirbs, F. Lisdat, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2656.
- [6] F. Bettazzi, F. Lucarelli, I. Palchetti, F. Berti, G. Marrazza, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta* **2008**, 614, 93.
- [7] J. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 469, 63.
- [8] E. Palecek, F. Jelen, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2002**, 32, 261.
- [9] J. J. Gooding, *Electroanalysis* **2002**, 14, 1149.
- [10] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1192.
- [11] P. de-los-Santos-Alvarez, M. J. Lobo-Castanon, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tunon-Blanco, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 378, 104.
- [12] E. Palecek, M. Fojta, *Talanta* **2007**, 74, 276.
- [13] F. Lucarelli, S. Tombelli, M. Minunni, G. Marrazza, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta* **2008**, 609, 139.
- [14] B. J. Privett, J. H. Shin, M. H. Schoenfisch, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 4499.
- [15] S. Cosnier, P. Mailley, *Analyst* **2008**, 133, 984.
- [16] E. Palecek, *Meth. Enzymol.* **1992**, 212, 139.
- [17] E. Palecek, E. Lukasova, F. Jelen, M. Vojtiskova, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1981**, 8, 497.
- [18] E. Lukasova, F. Jelen, E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.* **1982**, 1, 53.
- [19] E. Palecek, M. A. Hung, *Anal. Biochem.* **1983**, 132, 236.
- [20] E. Lukasova, M. Vojtiskova, F. Jelen, T. Sticzay, E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.* **1984**, 3, 175.
- [21] E. Palecek, M. Fojta, F. Jelen, *Bioelectrochemistry* **2002**, 56, 85.
- [22] M. Fojta, L. Havran, S. Billova, P. Kostecka, M. Masarik, R. Kizek, *Electroanalysis* **2003**, 15, 431.
- [23] M. Fojta, L. Havran, M. Vojtiskova, E. Palecek, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 6532.
- [24] P. Kostecka, L. Havran, H. Pivonkova, M. Fojta, *Bioelectrochemistry* **2004**, 63, 245.
- [25] B. Yosypchuk, M. Fojta, L. Havran, M. Heyrovsky, E. Palecek, *Electroanalysis* **2006**, 18, 186.
- [26] G. Wang, L. Wu, X. Wang, J. Cheng, W. Yang, *Int. Patent Application WO 02/16647 A1* **2000**.
- [27] G.-U. Flechsig, T. Reske, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 2125.
- [28] G.-U. Flechsig, T. Reske, *Patent DE 10 2005 039 726 B3* **2005**.
- [29] T. Reske, M. Mix, H. Bahl, G.-U. Flechsig, *Talanta* **2007**, 74, 393.
- [30] Y. Ren, K. Jiao, G. Xu, W. Sun, H. Gao, *Electroanalysis* **2005**, 17, 2182.
- [31] P. Kara, S. Cavdar, A. Berdeli, M. Ozsoz, *Electroanalysis* **2007**, 19, 1875.
- [32] P. Kara, B. Meric, A. Zeytinoglu, M. Ozsoz, *Anal. Chim. Acta* **2004**, 518, 69.
- [33] K. Kerman, D. Özkan, P. Kara, H. Karadeniz, Z. Özkan, A. Erdem, F. Jelen, M. Özsöz, *Turk. J. Chem.* **2004**, 28, 523.
- [34] T. M.-H. Lee, M. C. Carles, I.-M. Hsing, *Lab Chip* **2003**, 3, 100.
- [35] L.-L. Li, H. Cai, T. M.-H. Lee, J. Barford, I.-M. Hsing, *Electroanalysis* **2004**, 16, 81.
- [36] A. Lermo, S. Campoy, J. Barbé, S. Hernández, S. Alegret, M. I. Pividori, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2010.
- [37] S. S. W. Yeung, T. M. H. Lee, I.-M. Hsing, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 363.
- [38] P. Horakova-Brazdilova, M. Fojtova, K. Vytras, M. Fojta, *Sensors* **2008**, 8, 193.
- [39] R. Y. Lai, E. T. Lagally, S.-H. Lee, H. T. Soh, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, 103, 4017.
- [40] T. M.-H. Lee, I.-M. Hsing, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 5057.
- [41] W. R. Crowell, J. Heyrovsky, D. W. Engelkemeir, *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, 63, 2888.
- [42] Meites, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 4631.

Publikation V



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 10 2005 039 726 B3 2007.01.11

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: 10 2005 039 726.3

(51) Int Cl.⁸: C12Q 1/68 (2006.01)

(22) Anmelddatum: 19.08.2005

(43) Offenlegungstag: –

(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 11.01.2007

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
Universität Rostock, 18055 Rostock, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

DE 101 06 654 A1

WO 02/16 647 A1

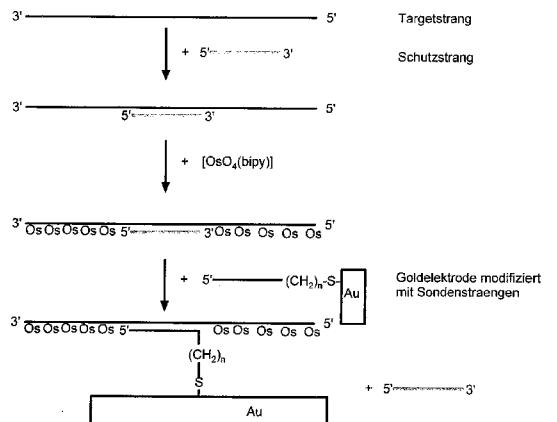
FOJTA, M. u.a.: Multiply osmium-labeled reporter
probes for electrochemical DNA hybridization
assays: detection of trinucleotide repeats.
Biosens. Bioelectron., (2004) 20 (5) 985-94;
FLECHSIG, G.U. u.a.: DNA hybridization detection
at heated electrodes. Langmuir (16.08.2005) 21
(17) 7848-53;

(74) Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(72) Erfinder:
Flechsig, Gerd-Uwe, 17166 Teterow, DE; Reske,
Thomas, 18107 Rostock, DE

(54) Bezeichnung: Verfahren zur Markierung und Analyse von Nukleinsäuren

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Markierung und Analyse von Nukleinsäuren. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Analyse von Nukleinsäuren, bei dem man die nachzuweisenden Nukleinsäuren in Form einzelsträngiger Nukleinsäurestränge, die partiell (d. h. über einen Teil der Gesamtlänge der Nukleinsäurestränge) mit Schutzsträngen hybridisiert sind, mit Substanzen in Kontakt bringt, die spezifisch mit Nukleobasen der einzelsträngigen Abschnitte der Nukleinsäurestränge reagieren und die anschließend in dem Fachmann bekannten elektroanalytischen Verfahren eine reversible Redoxreaktion eingehen können.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Markierung und Analyse von Nukleinsäuren. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Analyse von Nukleinsäuren, bei dem man die nachzuweisenden Nukleinsäuren in Form einzelsträngiger Nukleinsäurestränge, die partiell (d.h. über einen Teil der Gesamtlänge der Nukleinsäurestränge) mit Schutzsträngen hybridisiert sind, mit Substanzen in Kontakt bringt, die spezifisch mit Nukleobasen der einzelsträngigen Abschnitte der Nukleinsäurestränge reagieren und die anschließend in dem Fachmann bekannten elektroanalytischen Verfahren eine reversible Redoxreaktion eingehen können.

Stand der Technik

[0002] Um eine elektrochemische Detektierung von Hybridisierungseignissen der Nukleinsäuren zu ermöglichen, werden häufig redoxaktive Moleküle eingesetzt, die entweder an den Target- oder an einen Reporterstrang kovalent gebunden sind, sich elektrostatisch an die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren binden oder sich als Interkalatoren in den Doppelstrang einlagern. Die kovalent fixierten so genannten Redoxmarker werden bei der Herstellung der Target,- oder Reporterstränge angebunden.

[0003] Alternativ kann Osmium(VIII)oxid in Form von Komplexen mit 2,2'-Bipyridin, [OsO₄(bipy)], eingesetzt werden. Diese Komplexverbindungen reagieren spezifisch mit den Pyrimidinbasen Thymin, Uracil und, in weit- aus geringerem Maße, mit Cytosin, wobei die Doppelbindung im Pyrimidinring angegriffen wird. Diese Reaktion findet in einem intakten Doppelstrang nicht statt. Andererseits können Einzelstränge, deren Pyrimidinbasen mit Osmiumkomplexen reagiert haben, keine Doppelstränge mehr bilden. Diese Zusammenhänge wurden seit Anfang der 80er Jahre von Palecek, Jelen und Foita untersucht und in Form zahlreicher Beispiele zur Detektion der Hybridisierung verwendet. Es wird auf folgende Publikationen verwiesen, die hiermit ausdrücklich in Bezug genommen werden: M. Foita et al. J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 6532; P. Kostecka et al. Bioelectrochemistry 63 (2004) 245; M. Foita et al. Electroanalysis 15 (2003) 431.

[0004] DE 101 06 654 beschreibt die Behandlung einer Ziel-DNA mit Osmiumtetroxid-Bipyridin und die elektrochemische Detektion der DNA. Auch in Foja, M. et al. (Biosens. Bioelectron., 2004, 20(5): 985-94) werden Osmium-markierte Reportersonden offenbart.

[0005] Im Stand der Technik sind ferner Schutz-Oligonukleotide aus Nuklease-Protection-Assays bekannt, wie aus WO 02/16647, wo Wildtyp-ssDNA-Sonden zum Schutz eines DNA-Hybrids vor nukleolytischer Osmiumtetroxid-Spaltung eingesetzt werden.

[0006] Die Modifikation von DNA mittels Osmium(VIII)-Komplexen kann sehr einfach durch Zugeben des Osmiumreagenzes zur Analysenlösung erfolgen. Nach der Modifizierung wird das überschüssige Reagenz durch Dialyse in handelsüblichen einfachen Dialysegefäßen abgetrennt. Dazu wird optimalerweise die Hybridisierung von Target und Sonde an unterschiedlichen Oberflächen durchgeführt.

[0007] Besonders geeignet sind so genannte Magnetic Beads, welche oberflächlich immobilisierte Sondenstränge tragen und mittels Magnetfeld von der Analyselösung (und damit von nicht komplementären Strängen und Analysereagenzien) getrennt werden können. Nach diesem Prinzip könnte man beliebige Nukleinsäurestränge markieren. Nachteilig ist aber, dass unterschiedliche Reaktionsflächen verwendet werden müssen, um sowohl Hybridisierung als auch elektrochemische Detektierung zu verwirklichen. Das Problem, dass osmium-modifizierte Nukleinsäureeinzelstränge nicht mehr zur Doppelstrangbildung fähig sind und andererseits intakte Doppelstränge nicht mit dem [OsO₄(bipy)] reagieren, ist bisher nicht zufriedenstellend gelöst. Wünschenswert wäre die Markierung von PCR-Produkten oder nativen Nukleinsäureproben mit Osmiumverbindungen, ohne dass die Fähigkeit zur Hybridisierung verloren ginge. Die große Zahl der an die Targetstränge gebundenen Osmiumeinheiten würde eine sehr hohe Empfindlichkeit bei der anschließenden elektrochemischen Analyse bewirken. Nachteilig ist auch die Toxizität der Osmiumverbindungen, so dass es wünschenswert wäre, sie durch weniger giftige Substanzen zu ersetzen, welche in analoger Weise mit Nukleinsäuren reagieren.

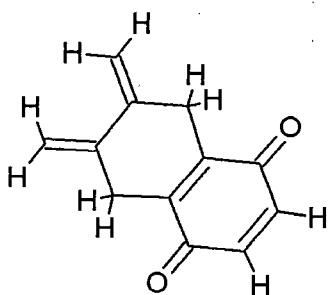
Aufgabenstellung

[0008] Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Verfahren bereitzustellen, das die schnelle und einfache Markierung beliebiger Nukleinsäurestränge sowie direkt anschließend die elektrochemische Detektierung an einer Arbeitselektrode ermöglicht.

Beschreibung der Erfindung

[0009] Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren, bei dem man die nachzuweisende Nukleinsäure in Form einzelsträngiger Nukleinsäurestränge, die partiell (d.h. über einen Teil der Gesamtlänge der Nukleinsäurestränge) mit Schutzsträngen hybridisiert sind, mit Substanzen in Kontakt bringt, die spezifisch mit Nukleobasen (Pyrimidinringen) der einzelsträngigen Abschnitte der Nukleinsäurestränge reagieren und die anschließend in dem Fachmann bekannten elektroanalytischen Verfahren eine reversible Redoxreaktion eingehen können.

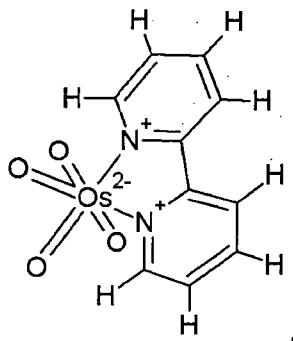
[0010] Dabei kommen vorzugsweise Verbindungen zum Einsatz, die einer der beiden folgenden Substanzklassen angehören: 1. Osmiumtetroxid-Komplexe und 2. Verbindungen, die sowohl eine 1,3-Dien-Struktur als auch mindestens eine elektrochemisch reversibel reagierende Gruppe enthalten. Diese beiden Substanzklassen ermöglichen sowohl eine selektive Reaktion mit der Doppelbindung des Pyrimidinringes als auch elektroanalytisch nutzbare reversible Redoxreaktionen an Arbeitselektroden. Zur Substanzklasse 1 gehören insbesondere $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$, und $[\text{OsO}_4(\text{py})_2]$. Zur Substanzklasse 2 gehören insbesondere 7,8-bis(methylen)-6,9-Dihydronephthochinon.



und deren heteroanaloge Abkömmlinge.

[0011] Als Beispiel seien hier ferner organische Verbindungen genannt, welche sowohl über eine 1,3-Dienkomponente als auch über einen Chinon-Ring verfügen. Die 1,3-Dienkomponente ermöglicht eine Diels-Alder-Reaktion mit der Doppelbindung des Pyrimidinringes, während Chinon (1,4-Dihydroxobenzol) reversibel elektrochemisch aktiv ist.

[0012] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung verwendet man als Redoxmarker Osmium(VIII)-Verbindungen, wie zum Beispiel $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ und $[\text{OsO}_4(\text{py})_2]$. Erfindungsgemäß bevorzugt ist der Komplex von Osmiumtetroxid mit 2,2'-Bipyridin, $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$



[0013] Das erfindungsgemäße Verfahren ist an einem konkreten Beispiel in **Abb. 1** schematisch dargestellt.

[0014] Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuresträngen durch Markierung mit Redoxmarkern und elektrochemischer Detektierung von Hybridisierungereignissen, bei dem man

- einzelsträngige Nukleinsäurestränge (Targetstränge) mit einem oder mehreren Nukleinsäuresträngen (Schutzsträngen A) hybridisiert, die kürzer als die Targetstränge sind, um partielle Doppelstrangabschnitte auszubilden, man
- die verbliebenen Einzelstrangabschnitte der Targetstränge durch Reaktion mit Redoxmarkern markiert, die entweder Osmiumtetroxid oder 1,3-Dien-Strukturen enthalten, so dass sie selektiv mit der Doppelbindung der Pyrimidinringe der Nukleinsäurestränge reagieren und aufgrund der entstehenden Osmi-

um(VI)verbindungen oder von zusätzlich im Redoxmarkermolekül befindlichen redoxaktiven Strukturen bzw. deren Heteroanaloga (Chinone, Naphthachinone, Diaminonaphthaline, Diaminobenzole, Anthrachinone, Phenothiazone, Dihydroxybenzole, Phenylendiamine, Tetrathiazane, Tetraphiafulvalenen oder deren korrespondierende Redoxpartner) eine elektroanalytisch nutzbare (reversible) Redoxreaktion an Arbeitselektroden (insbesondere an Metall-, Kohle-, Polymer-, Halbleiter-, Indiumzinnoxid-Arbeitselektroden), auf welchen die Sondenstränge immobilisiert sind, ermöglichen, man

- c) die so markierten Nukleinsäurestränge an der Oberfläche einer Elektrode mit dort immobilisierten Sondensträngen unter Verdrängung der Schutzstränge A hybridisiert und man
- d) die an den Sondensträngen hybridisierten Nukleinsäurestränge anschließend elektroanalytisch nachweist.

[0015] Unter "partielle Doppelstrangabschnitte" versteht man vorliegend, dass die einzelsträngigen Targetstränge nur über einen Teil ihrer Gesamtlänge mit Schutzsträngen A) hybridisieren und sich dadurch doppelsträngige Abschnitte bilden, d.h., die Länge der Schutzstränge A) so gewählt wird, dass noch ausreichend lange einzelsträngige Abschnitte der Targetsequenz für die nachfolgende Reaktion mit den Redoxmarkern zur Verfügung stehen. Diese verbleibenden einzelsträngigen Abschnitte der Targetsequenz müssen mindestens eine Thyminbase enthalten. Je mehr Thyminbasen im Einzelstrangabschnitt vorliegen, desto mehr können im anschließenden Schritt mit dem Redoxmarker markiert werden und desto höher werden zum Schluss die elektroanalytischen Signale und damit die Empfindlichkeit des ganzen Verfahrens sein.

[0016] Die Hybridisierung erfolgt mit Schutzsträngen A), die kürzer als die Targetstränge sind. Die Länge der Schutzstränge A) muss dabei ausreichend sein, um eine ausreichend feste Doppelstrangbildung zu ermöglichen. Andererseits erfolgt in Schritt c) eine Hybridisierung mit Sondensträngen, die an der Oberfläche einer Elektrode immobilisiert sind. Da diese Hybridisierung unter Verdrängung der Schutzstränge A erfolgt, ist folgendes zu beachten: Die Sondenstränge sollten genauso lang sein wie die Schutzstränge oder nur geringfügig länger. Es ist von Vorteil, wenn im Target-Schutzstrang-Duplex Fehlpaarungen auftreten. Dieser Vorteil kommt insbesondere zum Tragen, wenn die Sondenstränge etwas kürzer als die Schutzstränge sind. Die Fehlpaarungen dürfen nicht an Stellen des Targetstranges auftreten, an denen Thymin-Basen sitzen, da diese sonst markiert werden könnten, was eine spätere Hybridisierung mit den Sondensträngen beeinflussen würde.

[0017] So wird gewährleistet, dass der Targetstrang-Schutzstrang-Duplex nicht stabiler als der Targetstrang-Sondenstrang-Duplex ist, und dass ein Tausch der Schutzstränge gegen die Sondenstränge stattfindet.

[0018] Gemäß einer besonderen Ausführungsform führt man bei dem o.g. Verfahren Schritt c), d.h. die Verdrängung der Schutzstränge durch die Sondenstränge, bei einer Temperatur durch, die optimal für die thermisch stringente Hybridisierung von Sonden- und Targetsträngen ist. Dadurch wird einerseits der Strangtausch an der Elektrodenoberfläche beschleunigt und andererseits die Anbindung von nicht hundertprozentig komplementären Strängen an die Sondenstränge erschwert. Die optimale Temperatur liegt unterhalb der so genannten Schmelztemperatur. Bei letzterer liegen die beiden komplementären Stränge zu 50% als Doppelstrang vor. Zur Ermittlung der optimalen Temperatur eines jeden Sondenstranges bedient man sich der Schmelzkurvenanalyse. Dabei wird ein Analysensignal, welches vom Hybridisierungszustand abhängt, gegen die Temperatur aufgetragen. In homogener Lösung werden dazu üblicherweise die UV-Absorption oder die Fluoreszenz der DNA gemessen.

[0019] Der elektroanalytische Nachweis der Targetstränge, welche an die immobilisierten Sondenstränge angebunden sind, erfolgt im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens vorzugsweise mittels Chronopotentiometrie, Coulometrie, Amperometrie oder Voltammetrie, vorzugsweise mittels Square-Wave-Voltammetrie (SWV), Wechselstromvoltammetrie (ACV) oder cyclischer Voltammetrie (CV). Als Elektrode verwendet man Metall-, Kohle-, Polymer- oder Halbleiterelektroden, vorzugsweise Draht- oder Schichtelektroden, welche aus Gold, Kupfer, Bismut, Quecksilber, Silber, Blei, Zinn bzw. deren Legierungen bestehen. Bevorzugt kommen Elektroden zum Einsatz, welche mittels elektrischen Stromes direkt oder mittels eines Widerstandsheizers indirekt heizbar sind.

[0020] Die Immobilisierung der Sondenstränge auf der Oberfläche der Elektroden erfolgt nach dem Fachmann bekannten Verfahren.

[0021] Dabei ist es erfindungsgemäß bevorzugt, die Sondenstränge auf Metallelektroden vorzugsweise mittels Thiolgruppen zu chemisorbieren (vgl. z.B. Steel, B.A.; Herne, T.M.; Tarlov, M.J. Anal. Chem. 1998, 70, 4670-4677).

[0022] In einer besonderen Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens weisen die Doppelstrangabschnitte aus den Schutzsträngen A und den Targetsträngen eine oder mehrere Fehlpaarungen auf, zur leichteren Verdrängung durch die besser passenden, d.h. weniger Fehlpaarungen aufweisenden, Sondenstränge.

[0023] Vorteilhafterweise verwendet man in dem Verfahren als Redoxmarker einen Osmium(VIII)-Komplex, insbesondere aus der Gruppe, bestehend aus $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ und $[\text{OsO}_4(\text{py})_2]$. Besonders bevorzugt ist als Osmium(VIII)-Komplex $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$.

[0024] Alternativ kann der Redoxmarker, wie oben beschrieben, auch ein Molekül sein, das aus einer 1,3-Dienkomponente und einer elektrochemisch aktiven Komponente besteht und das über eine Diels-Alder-Reaktion mit der Doppelbindung der Pyrimidinringe reagiert. Bei der anschließenden elektroanalytischen Reaktion kann die reversible Redoxreaktion für den Nachweis des Hybridisierungsergebnisses genutzt werden.

[0025] In einer Ausführungsform der Erfindung, ist die elektrochemisch aktive Komponente aus der Gruppe, bestehend aus Chinonen, Diaminobenzolen, Naphthachinonen, Diaminonaphthalinen, Anthrachinonen, Phenothiazonen, Dihydroxybenzolen, Phenylendiaminen, Tetrathiazanen, Tetrathiafulvalenen und den jeweils korrespondierenden Redoxpartnern ausgewählt.

[0026] Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung führt man das Verfahren durch, indem man vor Durchführung des Schrittes c), also nach der Markierungsreaktion zwischen partiell geschützten Targetsträngen und Redoxmarkern, überschüssige Redoxmarkermoleküle durch Dialyse aus der Analysenlösung entfernt.

[0027] Gemäß einer weiteren Ausführungsform liegen die Sondenstränge in Schritt c) in hybridisierter Form vor, d.h. sie sind mit einem oder mehreren Nukleinsäuresträngen (Schutzsträngen B) hybridisiert. In diesem Fall hybridisiert man in Schritt c) die markierten Nukleinsäurestränge an der Oberfläche einer Elektrode mit den dort immobilisierten Sondensträngen unter Verdrängung der Schutzstränge A und Schutzstränge B.

[0028] Die vorstehend beschriebene Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens ist an einem konkreten Beispiel in Abb. 2 schematisch dargestellt.

[0029] Gemäß einer weiteren Verfahrensvariante verbleiben die überschüssigen Redoxmarker nach Schritt b) in der Analysenlösung, und man trennt die elektrochemischen Signale der an der Oberfläche der Elektrode gebundenen Redoxmarker von den Signalen des in Lösung befindlichen Redoxmarker bei der Detektierung durch geeignete elektrochemische Analyseverfahren voneinander. Bei dieser Verfahrensvariante ist die Chronocoulometrie als elektrochemisches Analyseverfahren bevorzugt. Die Chronocoulometrie gestattet die Unterscheidung zwischen elektrochemischen Diffusionsströmen, welche von der Umsetzung gelöster Substanzen stammen und elektrochemischen Strömen, die von oberflächlich fixierten Substanzen verursacht werden. Auf, diese Weise lässt sich z.B. die Menge immobilisierter DNA auf Goldelektroden bestimmen, indem man Rutheniumhexamminchlorid zur Lösung dazu setzt. Dieses bindet sich an die Phosphatgruppen der DNA-Stränge. (vgl. z.B. Steel, B.A.; Herne, T.M.; Tarlov, M.J. Anal. Chem. 1998, 70, 4670-4677).

[0030] Das erfindungsgemäße Verfahren hat den Vorteil, dass es leicht durchführbar ist und die schnelle und einfache Markierung beliebiger Nukleinsäurestränge ermöglicht, die sich anschließend direkt elektrochemisch detektieren lassen.

[0031] Der Vorteil, einer Markierung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Osmiumtetroxidkomplexen besteht in der einfachen Durchführung. Man muss lediglich die DNA-haltige Lösung mit dem Komplex, z.B. $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ versetzen, dann reagiert diese Verbindung spontan mit allen Thymin-Basen in der Lösung, die nicht in DNA-Doppelsträngen, d.h. in DNA-Einzelsträngen oder in einzelsträngigen DNA-Abschnitten vorliegen. Auch andere Pyrimidinbasen werden auf diese Weise angegriffen. Cytosin reagiert allerdings etwa 10-mal langsamer als Thymin. In der RNA tritt die Pyrimidinbase Uracil an die Stelle des Thymins. Sie unterscheidet sich vom Thymin lediglich durch eine fehlende Methylgruppe.

[0032] Der zweite Vorteil ist die hohe Empfindlichkeit, die erreicht wird, wenn der Targetstrang viele Thymin- bzw. Uracilbasen enthält. Denn der größte Teil hiervon wird stets im Einzelstrangabschnitt auftreten und damit vom $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ angegriffen werden. Im Schnitt kann man bei einem PCR-Produkt mit 50 bis 200 Thyminbasen pro Strang rechnen. mRNA kann über 500 Uracilbasen enthalten. Dies führt zu einem mehr als hundertfach verstärkten Signal verglichen mit herkömmlichen kovalent gebundenen Redoxmarkern wie z.B. Ferrocen, weil pro Targetstrang über 100 Elektronen umgesetzt werden. Eine solche hochempfindliche, selektive und direkte Bestimmung von mRNA kommt ohne einen für gewöhnlich vorangehenden PCR-Schritt aus und ermög-

licht so eine schnelle und einfache Analyse der Genexpression von Zellen.

[0033] Die erfindungsgemäße Verfahrensmaßnahme, einen oder mehrere Abschnitte der Targetstränge mit einem dazu passenden Schutzstrang zu hybridisieren, hat den Vorteil, dass der oder die so gebildete(n) Doppelstrangabschnitt(e) gegenüber $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ unempfindlich ist. Im Hybridisierungsschritt mit der immobilisierten Sonde wird der Schutzstrang am Targetstrang durch den Sondenstrang ersetzt. Im Ergebnis erhält man einen an der Elektrodenoberfläche gebundenen Targetstrang mit sehr vielen Osmium-markierten Pyrimidinbasen. Organische Moleküle können das Verhalten von $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ imitieren.

[0034] Dazu enthalten sie eine 1,3-Dien-Komponente, um mit der Doppelbindung der Pyrimidinbasen im Sinne einer Diels-Alder-Reaktion zu reagieren, wobei sich ein neuer Ring bildet. Außerdem enthalten diese Moleküle eine Komponente, die in der Lage ist, elektrochemisch reversibel zu reagieren. Dazu gehören Chinone, Naphthachinone, 1,4-Diaminonaphthaline, Diaminobenzole, Anthrachinone, Phenothiazine, Tetrathiafulvalen. Beide Komponenten sind derart verbunden, dass keine Beeinträchtigung ihrer Funktion durch mesomere Effekte gegeben ist. Sterisch sind diese Moleküle so ausgelegt, dass sie den Osmiumkomplexen ähneln und analog zu den Osmiumverbindungen $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ und $[\text{OsO}_4(\text{py})_2]$ nur mit dem Nukleinsäureeinzelstrang aber nicht mit dem Nukleinsäuredoppelstrang reagieren, und so markierte Einzelstrangabschnitte keine Doppelstränge mit einem komplementären Strang mehr ausbilden.

[0035] Ein großer Vorteil ist außerdem, dass sämtliche ungeschützte Einzelstrang-Nukleinsäuren durch $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ angegriffen werden und anschließend keine Doppelstränge mehr ausbilden. Hierdurch wird die unspezifische Anlagerung von nicht komplementären Nukleinsäuresträngen an die Sondenstränge erschwert. Die Erkennung der Targetstränge in einem Überschuss an nicht-komplementären Nukleinsäuresträngen wird daher erleichtert.

[0036] Diese Vorteile zusammen können im Falle von zu detektierender mRNA die Notwendigkeit einer Vervielfältigung mittels PCR überflüssig machen, da die Nachweis-Empfindlichkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens auch für sehr kleine RNA-Mengen ausreichend ist.

[0037] Im Schnitt kann man bei einem PCR-Produkt mit 50 bis 200 Thyminbasen pro Strang rechnen. mRNA kann über 500 Uracilbasen enthalten. Dies führt zu einem mehr als hundertfach verstärkten Signal verglichen mit herkömmlichen kovalent gebundenen Redoxmarkern wie z.B. Ferrocen, weil pro Targetstrang über 100 Elektronen umgesetzt werden.

[0038] Eine solche hochempfindliche, selektive und direkte Bestimmung von mRNA kommt ohne einen für gewöhnlich vorangehenden PCR-Schritt aus und ermöglicht so eine schnelle und einfache Analyse der Genexpression von Zellen.

[0039] Das erfindungsgemäße Verfahren hat darüber hinaus einen wesentlichen wirtschaftlichen Nutzen, da die Analytik von DNA und RNA erheblich vereinfacht wird. Es kommen elektrochemische DNA-Chips zum Einsatz, welche im Verlaufe der elektroanalytischen Methoden (Chronopotentiometrie, Amperometrie, Coulometrie, Voltammetrie) direkt auslesbare digitale Analysendaten liefern, und es sind keine teuren, speziell markierten Oligonukleotide mehr nötig. Im Falle der Genexpressionsanalysen könnte im besten Falle die teure und langwierige PCR-Vervielfältigung entfallen.

[0040] Insbesondere eröffnen sich drei wirtschaftlich interessante Anwendungen des erfindungsgemäßen Prinzips:

- Kostengünstige Herstellung von markierten Nukleinsäuresträngen zur Verwendung als elektrochemisch aktive Reportersonden, welche komplementäre Abschnitte zu Abschnitten auf den Targetsträngen enthalten und diese molekular erkennen sowie daran anschließend eine Oligothymidinsequenz, welche mit Osmium(VIII)-Komplexen (vorzugsweise $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$) oder den o.g. organischen Surrogaten reagiert.
- Schnelle, einfache, kostengünstige elektrochemische Analytik von mRNA-Strängen aus der Genexpression ohne vorherige PCR;
- Schnelle, einfache, kostengünstige elektrochemische Detektierung von PCR-Produkten.

[0041] Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch Verfahren zur Genexpressionsanalyse und zum Nachweis von PCR-Produkten, d.h. die Verwendung der oben genannten Verfahren zur Genexpressionsanalyse und zum Nachweis von PCR-Produkten.

[0042] Ferner sind Gegenstand der Erfindung Kits zur Durchführung eines Verfahrens zur Genexpressionsa-

nalyse und zum Nachweis von PCR-Produkten, umfassend ein oder mehrere Nukleinsäuren (Schutzstränge A), Redoxmarker und Elektroden mit auf ihrer Oberfläche immobilisierten Sonden, wobei die Nukleinsäuresequenzen der Schutzstränge und Sonden komplementär zu den nachzuweisenden Targetsträngen und kürzer als dieselben sind und die Nukleinsäuresequenzen der Schutzstränge auch eine oder mehrere Fehlpaarungen aufweisen können.

[0043] Die Erfindung betrifft ferner Elektroden zur Verwendung in einem hierin genannten Verfahren, auf deren Oberfläche Sondenstränge immobilisiert sind, wobei die Nukleinsäuresequenzen der Sondenstränge komplementär zu den nachzuweisenden Targetsträngen und kürzer als dieselben sind.

[0044] Die Erfindung wird nachfolgend auch anhand von Beispielen erläutert, wobei die Erfindung keineswegs auf diese konkreten Ausführungsbeispiele beschränkt ist.

Ausführungsbeispiel

[0045] Die Abkürzungen „M“, „mM“ und „nM“ stehen im Folgenden für die Einheiten mol/l, mmol/l bzw. nmol/l.“

Beispiel 1:

Markierung eines PCR-Produktes mit [OsO₄(bipy)] und elektrochemische Analyse.

[0046] Die Vorgehensweise zur Bestimmung von PCR-Produkten entsprach Beispiel 2, wobei die PCR-Produkte die gesuchte Targetsequenz enthalten.

[0047] Vor der Markierung wurde die PCR in der Reaktionsmischung mittels Protease abgebrochen. Anschließend wurde zur Denaturierung aller Doppelstränge nochmals auf 95°C aufgeheizt. Dann wurde der Schutzstrang im großen Überschuss (verglichen mit den PCR-Produkten) zugesetzt. Anschließend wurde der Schutzstrang thermisch stringent an die PCR-Produkte angelagert, auf 35°C abgekühlt, und es wurden 1 mM [Oso₄(bipy)] zugesetzt.

[0048] Nach Ablauf der Reaktion konnte das überschüssige [OsO₄(bipy)] durch Dialyse abgetrennt werden. Zum Schluss erfolgte Hybridisierung mit an Gold immobilisierten Sondensträngen unter Verdrängung der Schutzstränge und die elektrochemische Detektierung mittels Square-wave Voltammetrie.

Beispiel 2:

Markierung eines Targetstranges mit [OsO₄(bipy)] und elektrochemische Analyse.

[0049] Es wurden äquimolare Mengen Osmiumtetroxid (dieses ist als 2%ige Lösung in Wasser z.B. bei der Firma Fluka erhältlich) und 2,2'-Bipyridyl zu einer 10 mM Lösung des Komplexes [OsO₄(bipy)] zusammengegeben. Diese lässt sich bei -18°C lagern.

[0050] Nachdem je 16,5 µL (500 pmol) des Schutzstranges mit der Sequenz 5'-CGC GGA TAA CAC AGC CAC GC-3' (alle Oligos von der Firma Operon, Köln) und des Targetstranges mit der Sequenz 5'-TTT TTA GGT GAC TGT GTT ATC CGC A-3' für zwei Stunden bei Raumtemperatur zusammengegeben wurden, wurden 15 µl des Komplexes und 12 µl 10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) + 0,5 M Na₂SO₄ pH 7,5 dazugegeben. Das Ganze wurde dann nach kurzem Schütteln 22 Stunden bei Raumtemperatur reagieren gelassen.

[0051] Zum Abbruch der Reaktion und zur Abtrennung von restlichem [OsO₄(bipy)], wurde eine 19-stündige Dialyse in etwa 50 ml 10 mM Trispuffer + 0,5 M Na₂SO₄ pH 7,5 bei 10°C mit Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units von der Firma Rockford (IL, USA) mit einem MWCO (Molekulargewicht-Durchlass) von 3500 kDa durchgeführt.

[0052] Zur Herstellung der Sonde wurden zunächst die Elektroden vorbehandelt. Die Goldscheibenelektrode wurde mit Aluminiumoxidpulver poliert. Die Golddrahtelektrode wurde durch einen 0,65 A Wechselstrom an der Luft geheizt. Dann erfolgte an beiden Elektroden eine elektrochemische Vorbehandlung, bei der 25mal ein Cyclicvoltammogramm zwischen -0,2 und +1,85 V gegen eine Ag/AgCl (3 M KCl)-Referenzelektrode in 0,5 M Schwefelsäure durchlaufen wurde. Daraufhin wurden die Elektroden erst mit Wasser und dann mit Ethanol abgespült. Nach dem Trocknen wurde ein Tropfen (16,5 µL) der Sondenstranglösung (enthält 500 pmol Sondenstrang) auf die Goldoberfläche bzw. auf den Plastiksteg der Drahtelektrode gegeben. Der Sondenstrang hat die Sequenz 5'-TGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' und ist mit einem CH₃-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₃-Disulfidlinker am

3' -Ende verbunden, über den die Anbindung an die Goldoberfläche erfolgt. Dann wurde die Elektrode über Nacht in gesättigter Wasserdampfatmosphäre bei 5°C stehen gelassen. Als nächstes wurde sie erst mit 0,25 M Phosphatpuffer pH 7,0 dann mit Wasser abgespült und zur Nachbelegung für eine Stunde in eine 1 mM wässrige Lösung von 6-Mercapto-1-Hexanol (MCH) gegeben (T.M. Herne, M.J. Tarlov, J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 8916-8920). Schließlich wurde sie mit Ethanol und Wasser abgespült.

[0053] Zur Hybridisierung von Sonden- und Targetstrang wurde zunächst die Lösung mit dem Doppelstrang aus markiertem Targetstrang und Schutzstrang in einem 10-ml-Becherglas auf eine Konzentration von etwa 160 nM mit 10 mM Trispuffer + 0,5 M Na₂SO₄ pH 7,5 verdünnt. Dann wurde diese Lösung 1 Minute lang im Wasserbad auf 80°C erhitzt, um den Doppelstrang aufzutrennen und die folgende Hybridisierung mit dem Sondenstrang zu erleichtern.

[0054] Daraufhin ließ man die Lösung auf eine Temperatur von 35°C abkühlen. Diese wurde mit einem Wasserbad eingestellt. Bei der Drahtelektrode wurde in einer 3°C kalten Lösung gearbeitet (hier wurde die Temperatur dann über die Heizung des Drahtes eingestellt).

[0055] Schließlich wurde die Hybridisierung eingeleitet, indem die Elektrode mit dem immobilisierten Sondenstrang in die Targetstranglösung eingetaucht wurde. Nach dem Ablauf einer bestimmten Zeit, vorzugsweise 15 Minuten, wurde dann die Elektrode mitsamt dem Doppelstrang in die Messzelle überführt.

[0056] Die Messungen wurden bei Raumtemperatur in einer Messzelle mit 20 ml 10 mM Trispuffer + 0,5 M Na₂SO₄ pH 7,5 durchgeführt.

[0057] Vor jeder weiteren Messung wurde der Doppelstrang in 50°C warmen Wasser für 30 Sekunden dehybridisiert.

[0058] Für die voltammetrischen Messungen (Square Wave Voltammetrie) wurde ein AUTOLAB® der Firma Eco Chemie (Utrecht, NL) benutzt, das mit einem Potentiostaten des Typs PSTAT 10 ausgerüstet war. Gesteuert wurden die Messungen mit der Software GPES 3. Dabei betrug die Pulsamplitude 40 mV und die Frequenz 200 Hz bei einer Potentialstufe von 2 mV.

[0059] Es wurde eine 3-Elektrodenanordnung mit Ag/AgCl-Elektrode (3 M KCl) als Referenz- und einer Glaskohleelektrode als Gegenelektrode benutzt.

[0060] Als Arbeitselektrode kamen eine Goldscheibenelektrode (Durchmesser 3 mm) und eine heizbare Golddrahtelektrode zum Einsatz (Länge des Drahtes 4 mm bei einem Durchmesser von 25 µm). Glaskohle-, Goldscheiben- und Ag/AgCl-Elektrode waren von der Firma Metrohm. Die Golddrahtelektrode wurde selbst gebaut (G.-U. Flechsig, J. Peter, G. Hartwich, J. Wang, P. Gründler, Langmuir 2005, 21, 7848-7853).

[0061] Zur Beheizung der Drahtelektrode wurde ein 100 kHz Wechselstrom benötigt. Dieser wurde mittels einer Stromquelle FPS 15A DC von VOLTCRAFT®, eines Funktionsgenerators MXG-9802 von VOLTCRAFT® und eines Verstärkers CA2100 (Concord Car Audio, Woodbury, NY, USA) erzeugt. Am Ende der Anordnung befand sich ein Hochfrequenztransformator. Mit Hilfe eines Multimeters VOLTCRAFT® M-4660A wurden die Heizströme abgelesen.

[0062] Die Beziehung zwischen Temperatur der Golddrahtelektrode und Heizstrom wurde in einem anderen Experiment bestimmt. Dabei wurden die Drahtelektrode und eine Gegenelektrode, in diesem Fall eine aus Glaskohle in eine Messzelle mit 50 mM Kaliumhexacyanoferrat (II) und 50 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) in 0,1 M Kaliumchlorid gegeben. Die Temperatur dieser Lösung betrug 3°C. Nun wurde die Drahtelektrode beheizt und die Potentialdifferenz zwischen beiden Elektroden (potentiometrisch) gemessen. Mit Kenntnis des Temperaturkoeffizienten ($\beta = 1.6 \text{ mV/K}$) ließ sich eine Kalibrierkurve ableiten, aus der hervorgeht, bei welchem Strom welche Temperatur erzeugt wird (T. Zerihun, P. Gründler, J. Electroanal. Chem. 1996, 415, 85-88; Zerihun, P. Gründler, J. Electroanal. Chem. 1996, 404, 243-248).

[0063] Die Signalhöhe des Peakstromes hängt von Hybridisierungsdauer, Hybridisierungstemperatur und Konzentration des Targetstranges ab. Eine weitere entscheidende Rolle spielt die Anzahl der markierten Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin. In diesem Fall wurden 5 Thyminbasen markiert.

[0064] In Abb. 3 sind die Voltammogramme von Sondenstrang, Sondenstrang und markiertem nicht komplementären Targetstrang (NC-Target) ($t_H = 15 \text{ min}$, $T = 23^\circ\text{C}$, $c_{\text{NC-Target}} = 163,4 \text{ nM}$), Sondenstrang und markiertem

Schutzstrang ($t_H = 20$ min, $T = 40^\circ\text{C}$, $c_{\text{Target}} = 163,4$ nM) und Sondenstrang und markiertem Targetstrang ($t_H = 15$ min, $T = 23^\circ\text{C}$, $c_{\text{Target}} = 163,4$ nM) dargestellt. Messungen in 10 mM Trispuffer + 0,5 M Na_2SO_4 (pH = 7,5). Messungen mit der Goldscheibenelektrode (Durchmesser 3 mm). Während der Hybridisierung wurde die Lösung gerührt.

[0065] Abb. 4 zeigt die Abhängigkeit der Peakhöhe von der Hybridisierungsdauer bei 23°C . Messungen in 10 mM Trispuffer + 0,5 M Na_2SO_4 (pH = 7,5). Targetstrangkonzentration $c = 163,4$ nM. Messungen mit der Goldscheibenelektrode (Durchmesser 3 mm). Während der Hybridisierung wurde die Lösung gerührt. Es sind die Mittelwerte aus drei Messungen und die maximalen Abweichungen vom Mittelwert aufgetragen.

[0066] Abb. 5 beschreibt die Abhängigkeit der Peakhöhe von der Temperatur. Messungen in 10 mM Trispuffer + 0,5 M Na_2SO_4 (pH = 7,5). Targetstrangkonzentration 163,4 nM, Hybridisierungsdauer 15 min. Messungen mit der Goldscheibenelektrode (Durchmesser 3 mm). Während der Hybridisierung wurde die Lösung gerührt. Es sind die Mittelwerte aus 3 Messungen und die maximalen Abweichungen vom Mittelwert aufgetragen.

[0067] Abb. 6 zeigt die Abhängigkeit der Peakhöhe von der Konzentration des Targetstranges. Messungen in 10 mM Trispuffer + 0,5 M Na_2SO_4 (pH = 7,5). Temperatur $T = 40^\circ\text{C}$, Hybridisierungsdauer $t_H = 15$ min. Messungen mit der Goldscheibenelektrode (Durchmesser 3 mm). Während der Hybridisierung wurde die Lösung gerührt.

Targetstrang:

5'-TTT TTA GGT GAC TGT GTT ATC CGC A-3'

Schutzstrang:

5'-CGC GGA TAA CAC AGC CAC GC-3'

Sondenstrang:

5'-TGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' mit einem $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{S-S-(CH}_2)_3$ -Disulfidlinker am 3' -Ende

Beispiel 3:

Herstellung und Verwendung von Reportersträngen, die mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ markiert sind.

[0068] Die Vorgehensweise entsprach Beispiel 2, nur dass anstelle des Targetstranges der Reporterstrang markiert wurde, und zum Nachweis der Targetsequenz die Targetstränge mit den markierten Reportersträngen und den immobilisierten Sondensträngen hybridisiert wurden.

[0069] Die Reporterstränge enthielten außer der komplementären Sequenz eine Vielzahl von Thyminbasen an einem oder an beiden Enden. Die Reporterstränge wurden mit dem Schutzstrang hybridisiert, anschließend mit 1 mM $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ versetzt, und dann wurde die Lösung durch Dialyse vom überschüssigen $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ gereinigt. Die so erhaltene Lösung wurde zur Targetlösung zugesetzt, und anschließend wurden die Targetstränge mit den an der Goldelektrode immobilisierten Sondensträngen hybridisiert.

[0070] Zum Schluss erfolgte die elektrochemische Analyse durch Square-wave Voltammetrie. Auf diese Weise kam man sehr preisgünstig zu mehrfach markierten Reportersträngen, welche sehr große reversible elektrochemische Signale liefern.

Markierung eines Reporterstranges mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ und elektrochemische Analyse.

[0071] Es wurden äquimolare Mengen Osmiumtetroxid (dieses ist als 2%ige Lösung in Wasser z.B. bei der Firma Fluka erhältlich) und 2,2'-Bipyridyl zu einer 10 mM Lösung des Komplexes $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ zusammengegeben. Diese lässt sich bei -18°C lagern.

[0072] Nachdem je 16,5 μl (500 pmol) des Schutzstranges mit der Sequenz 5'-CGG AGG TAC GGT AAC CGG-3' (alle Oligos von der Firma Operon, Köln) und des Reporterstranges mit der Sequenz 5'-TTT TTG CAG TTA CCG TAC CTC GA-3' für zwei Stunden bei Raumtemperatur zusammen gegeben wurden, wurden 15 μl des Komplexes und 12 μl 10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) + 0,5 M Na_2SO_4 pH 7,5 dazugegeben. Das Ganze wurde dann nach kurzem Schütteln 22 Stunden bei Raumtemperatur reagieren gelassen.

[0073] Zum Abbruch der Reaktion und zur Abtrennung von restlichem $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ wurde eine 19-stündige Dialyse in etwa 50 ml 10 mM Trispuffer + 0,5 M Na_2SO_4 pH 7,5 bei 10°C mit Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units von der Firma Rockford (IL, USA) mit einem MWCO (Molekulargewicht-Durchlass) von 3500 kDa durchgeführt.

[0074] Zur Herstellung der Sonde wurden zunächst die Elektroden vorbehandelt. Die Goldscheibenelektrode

wurde mit Aluminiumoxidpulver poliert. Die Golddrahtelektrode wurde durch einen 0,65 A Wechselstrom an der Luft geglüht. Dann erfolgte an beiden Elektroden eine elektrochemische Vorbehandlung, bei der 25mal ein Cyclicvoltammogramm zwischen -0,2 und +1,85 V gegen eine Ag/AgCl (3 M KCl)-Referenzelektrode in 0,5 M Schwefelsäure durchlaufen wurde. Daraufhin wurden die Elektroden erst mit Wasser und dann mit Ethanol abgespült. Nach dem Trocknen wurde ein Tropfen (16,5 μ l) der Sondenstranglösung (enthielt 500 pmol Sondenstrang) auf die Goldoberfläche bzw. auf den Plastiksteg der Drahtelektrode gegeben. Der Sondenstrang hatte die Sequenz 5'-TGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' und war mit einem CH_3 -(CH_2)₂-S-S-(CH_2)₃-Disulfidlinker am 3' -Ende verbunden, über den die Anbindung an die Goldoberfläche erfolgte. Dann wurde die Elektrode über Nacht in gesättigter Wasserdampfumosphäre bei 5°C stehen gelassen. Als nächstes wurde sie erst mit 0,25 M Phosphatpuffer (pH 7,0), dann mit Wasser abgespült und zur Nachbelegung für eine Stunde in eine 1 mM wässrige Lösung von 6-Mercapto-1-hexanol (MCH) gegeben (T.M. Herne, M.J. Tarlov., J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 8916-8920). Schließlich wurde sie mit Ethanol und Wasser abgespült.

[0075] Zur Hybridisierung von Reporter- und Targetstrang (Sequenz: 5'-AGG TGA CTG TGT TAT CCG CAC CCC CCT CGA GGT ACG GTA ACT GC-3') wurde zunächst die Lösung mit dem Doppelstrang aus markiertem Reporterstrang und Schutzstrang in ein 10-ml-Becherglas mit der Lösung einer gewünschten Konzentration (z.B. 163,4 nM) des Targetstranges in 10 mM Trispuffer + 0,5 M Na_2SO_4 pH 7,5 gegeben. Dann wurde diese Lösung 1 Minute lang im Wasserbad auf 80°C erhitzt, um den Doppelstrang aufzutrennen und die folgende Hybridisierung mit dem Targetstrang zu erleichtern.

[0076] Nach dem Einstellen einer gewünschten Temperatur (abhängig vom Schmelzpunkt des Doppelstranges) des Wasserbades wurde die Elektrode mitsamt dem immobilisierten Sondenstrang (bei Messungen mit dem beheizten Draht 3°C; hier wurde die Temperatur dann über die Heizung des Drahtes eingestellt) in die Lösung mit dem über den Reporterstrang markierten Targetstrang eingetaucht. Nach Ablauf von 15 Minuten wurde dann die Elektrode mitsamt dem Doppelstrang in die Messzelle überführt.

[0077] Die Messungen wurden bei Raumtemperatur in einer Messzelle mit 20 ml 10 mM Trispuffer + 0,5 M Na_2SO_4 pH 7,5 durchgeführt.

[0078] Vor jeder weiteren Messung wurde der Doppelstrang in 50°C warmen Wasser für 30 Sekunden dehybridisiert.

[0079] Für die voltammetrischen Messungen (Square Wave Voltammetrie) wurde ein AUTOLAB® der Firma Eco Chemie (Utrecht, NL) benutzt, das mit einem Potentiostaten des Typs PSTAT 10 ausgerüstet war. Gesteuert wurden die Messungen mit der Software GPES 3. Dabei betrug die Pulsamplitude 40 mV und die Frequenz 200 Hz bei einer Potentialstufe von 2 mV.

[0080] Es wurde eine 3-Elektrodenanordnung mit Ag/AgCl-Elektrode (3 M KCl) als Referenz- und einer Glaskohleelektrode als Gegenelektrode benutzt.

[0081] Als Arbeitselektrode kamen eine Goldscheibenelektrode (Durchmesser 3 mm) und eine heizbare Golddrahtelektrode zum Einsatz (Länge des Drahtes 4 mm bei einem Durchmesser von 25 μm). Glaskohle-, Goldscheiben- und Ag/AgCl-Elektrode waren von der Firma Metrohm. Die Golddrahtelektrode wurde selbst gebaut (G.-U. Flechsig, J. Peter, G. Hartwich, J. Wang, P. Gründler; Langmuir 2005, 21, 7848-7853).

[0082] Zur Beheizung der Drahtelektrode wurde ein 100 kHz Wechselstrom benötigt. Dieser wurde mittels einer Stromquelle FPS 15A DC von VOLTCRAFT®, eines Funktionsgenerators MXG-9802 von VOLTCRAFT® und eines Verstärkers CA2100 (Concord Car Audio, Woodbury, NY, USA) erzeugt. Am Ende der Anordnung befand sich ein Hochfrequenztransformator. Mit Hilfe eines Multimeters VOLTCRAFT® M-4660A wurden die Heizströme abgelesen.

[0083] Die Beziehung zwischen Temperatur der Golddrahtelektrode und Heizstrom wurde in einem anderen Experiment bestimmt. Dabei wurden die Drahtelektrode und eine Gegenelektrode, in diesem Fall eine aus Glaskohle in eine Messzelle mit 50 mM Kaliumhexacyanoferrat (II) und 50 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) in 0,1 M Kaliumchlorid gegeben. Die Temperatur dieser Lösung betrug 3°C. Nun wurde die Drahtelektrode beheizt und die Potentialdifferenz zwischen beiden Elektroden (potentiometrisch) gemessen. Mit Kenntnis des Temperaturkoeffizienten ($\beta = 1,6 \text{ mV/K}$) ließ sich eine Kalibrierkurve ableiten, aus der hervorging, bei welchem Strom welche Temperatur erzeugt wurde (T. Zerihun, P. Gründler, J. Electroanal. Chem. 1996, 415, 85-88; T. Zerihun, P. Gründler, J. Electroanal. Chem. 1996, 404, 243-248).

Reporterstrang: 5'-TTT TTG CAG TTA CCG TAC CTC GA-3'
 Targetstrang: 5'- AGG TGA CTG TGT TAT CCG CAC CCC CCT
 Schutzstrang: 5'-CGG AGG TAC GGT AAC CGG-3'
 Sondenstrang: 5'-TGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' mit einem
 CH₃-(CH₂)₂-S-S-(CH₂) 3-Disulfidlinker am 3'-Ende

Beispiel 4:

Untersuchung der Genexpression durch Markierung der mRNA-Kopien mit [OsO₄(bipy)]

[0084] Das Verfahren lief analog zu Beispiel 2, wobei als Targetstränge die mRNA auftrat.

[0085] Die Nukleinsäureextrakte einer Zell- oder Gewebeprobe wurden mit den Schutzsträngen hybridisiert, welche einem Sequenzabschnitt des gesuchten exprimierten Gens entsprachen. Dann wurde 1 mM [OsO₄(bipy)] zugesetzt. Der größte Teil der Nukleinsäurestränge wurde dabei mit Osmium modifiziert und war nicht mehr zur Bildung von Doppelsträngen in der Lage. Nur die geschützten Abschnitte der mRNA-Kopien, konnten anschließend mit den an Gold immobilisierten Sondensträngen unter Verdrängung der Schutzstränge hybridisieren. Dadurch wurden einerseits eine hohe Selektivität und andererseits eine sehr hohe Empfindlichkeit bei der anschließenden elektrochemischen Analyse durch Chronopotentiometrie erreicht. Eine Vervielfältigung der mRNA-Kopien durch RT-PCR und PCR konnte daher entfallen.

Beispiel 5:

Elektrochemische Analyse der Osmium-markierten Nukleinsäuren direkt im Anschluss an die Markierungsreaktion ohne vorherige Entfernung des überschüssigen gelösten [OsO₄(bipy)].

[0086] Das Verfahren läuft analog zu Beispiel 2 ab, allerdings wird nach der Markierungsreaktion keine Dialyse durchgeführt, so dass das überschüssige Markierungsreagenz in der Probelösung bleibt. Diese Lösung bringt man zur Hybridisierung mit der Sondenstrangmodifizierten Arbeitselektrode in Kontakt.

[0087] Durch Anwendung der Chronocoulometrie (A. B. Steel, T. M. Herne, M. J. Tarlov, Anal. Chem. 1998, 70, 4670-4677) konnte man zwischen den elektrochemischen Signalen der immobilisierten Osmiumverbindungen und denen der gelösten [OsO₄(bipy)]-Moleküle unterscheiden.

[0088] Dazu wird ein Potentialsprungexperiment durchgeführt. Das Potential wird von -0,2 auf -0,4 V geändert. Dieser Zeitpunkt wird gleich Null gesetzt und im Folgenden die gemessene Ladung gegen $\text{sqrt}(t)$ aufgetragen. Die chronocoulometrischen Schnittpunkte der verlängerten linearen Abschnitte mit der y-Achse (bei $t=0$) zeigen die Ladungen verursacht durch kapazitive Ströme und faradaysche Ströme immobilisierter Substanzen, hier durch Umsatz der immobilisierten und markierten Nukleinsäuren an.

Beispiel 6:

Markierung und Nachweis von Nukleinsäuresträngen mit Hilfe einer Dien-Chinon-Verbindung.

[0089] Die Modifikation der Pyrimidinbasen erfolgte durch Diels-Alder-Reaktion mit der 1,3-Dienkomponente dieser organischen Verbindung. Die elektrochemische Detektion dieses Markers geschah über die reversibel redoxaktive Chinonkomponente.

[0090] Das Verfahren läuft analog zu Beispiel 2 ab, allerdings wird anstelle der Osmiumverbindung 7,8-bis(methylen)-6,9-Dihydroneaphthochinon zur Markierung der Nukleinsäuren eingesetzt.

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25.

Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuresträngen durch Markierung mit Redoxmarkern und elektro-

chemischer Detektierung von Hybridisierungereignissen, **dadurch gekennzeichnet**, dass man

- a) einzelsträngige Nukleinsäurestränge (Targetstränge) mit einem oder mehreren Nukleinsäuresträngen (Schutzsträngen A) hybridisiert, die kürzer als die Targetstränge sind, um partielle Doppelstrangabschnitte auszubilden, man
- b) die verbliebenen Einzelstrangabschnitte der Targetstränge durch Reaktion mit Redoxmarkern markiert, die selektiv mit der Doppelbindung der Pyrimidinringe der Nukleinsäurestränge reagieren und eine elektroanalytisch nutzbare Redoxreaktion an Arbeitselektroden ermöglichen, man
- c) die so markierten Nukleinsäurestränge an der Oberfläche einer Elektrode mit dort immobilisierten Sondensträngen unter Verdrängung der Schutzstränge A hybridisiert und man
- d) die an den Sondensträngen hybridisierten Nukleinsäurestränge anschließend elektroanalytisch nachweist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Verdrängung der Schutzstränge durch die Sondenstränge in Schritt c) bei einer Temperatur durchführt, die optimal für die thermisch stringente Hybridisierung von Sonden- und Targetsträngen ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektrode eine geheizte Elektrode ist.

4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Doppelstrangabschnitte aus Schutzsträngen A und Targetsträngen eine oder mehrere Fehlpaarungen aufweisen.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Redoxmarker ein Osmium(VIII)-Komplex ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Osmium(VIII)-Komplex $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ ist.

7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Redoxmarker ein Molekül bestehend aus einer 1,3-Dienkomponente und einer elektrochemisch aktiven Komponente ist, das über eine Diels-Alder-Reaktion mit der Doppelbindung der Pyrimidinringe reagiert.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die elektrochemisch aktive Komponente aus der Gruppe, bestehend aus Chinonen, Diaminobenzolen, Naphthachinonen, Diaminonaphthalinen, Anthrachinonen, Phenothiazonen, Dihydroxybenzolen, Phenylendiaminen, Tetrathiazanen, Tetrathiafulvalenen und den jeweils korrespondierenden Redoxpartnern ausgewählt ist.

9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man vor Durchführung des Schrittes c) überschüssige Redoxmarkermoleküle durch Dialyse aus der Analysenlösung entfernt.

10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Sondenstränge in Schritt c) mit einem oder mehreren Nukleinsäuresträngen (Schutzsträngen B) hybridisiert sind und man in Schritt c) die markierten Targetstränge an der Oberfläche einer Elektrode mit dort immobilisierten Sondensträngen unter Verdrängung der Schutzstränge A und Schutzstränge B hybridisiert.

11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die überschüssigen Redoxmarker nach Schritt b) in der Analysenlösung verbleiben und man die elektrochemischen Signale der an der Oberfläche der Elektrode gebundenen Redoxmarker von den Signalen der in Lösung befindlichen Redoxmarker bei der Detektierung durch geeignete elektrochemische Analyseverfahren voneinander trennt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das elektrochemische Analyseverfahren Chronocoulometrie ist.

13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das elektrochemische Analyseverfahren Chronopotentiometrie ist.

14. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 13 zur Genexpressionsanalyse.

15. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 14 zum Nachweis von PCR-Produkten.

16. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach Anspruch 14 oder 15, umfassend eine oder mehrere Nukleinsäuren (Schutzstränge A), Redoxmarker und Elektroden mit auf ihrer Oberfläche immobilisierten Sonden,

wobei die Nukleinsäuresequenzen der Schutzstränge und Sonden komplementär zu den nachzuweisenden Targetsträngen und kürzer als dieselben sind, und die Nukleinsäuresequenzen der Schutzstränge auch eine oder mehrere Fehlpaarungen aufweisen können.

17. Elektrode zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass auf ihrer Oberfläche Sondenstränge immobilisiert sind, wobei die Nukleinsäuresequenzen der Sondenstränge komplementär zu den nachzuweisenden Targetsträngen und kürzer als dieselben sind.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

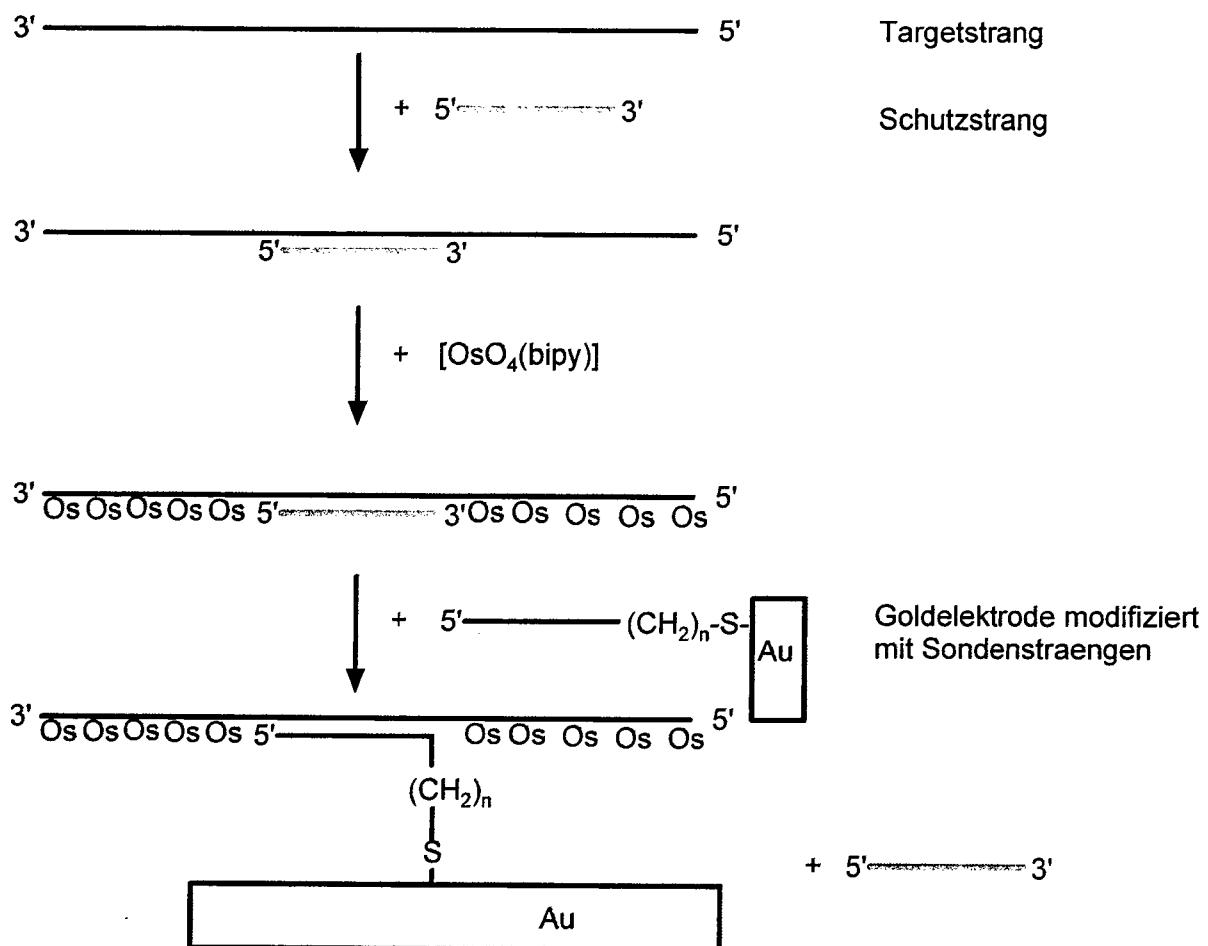


Abbildung 1

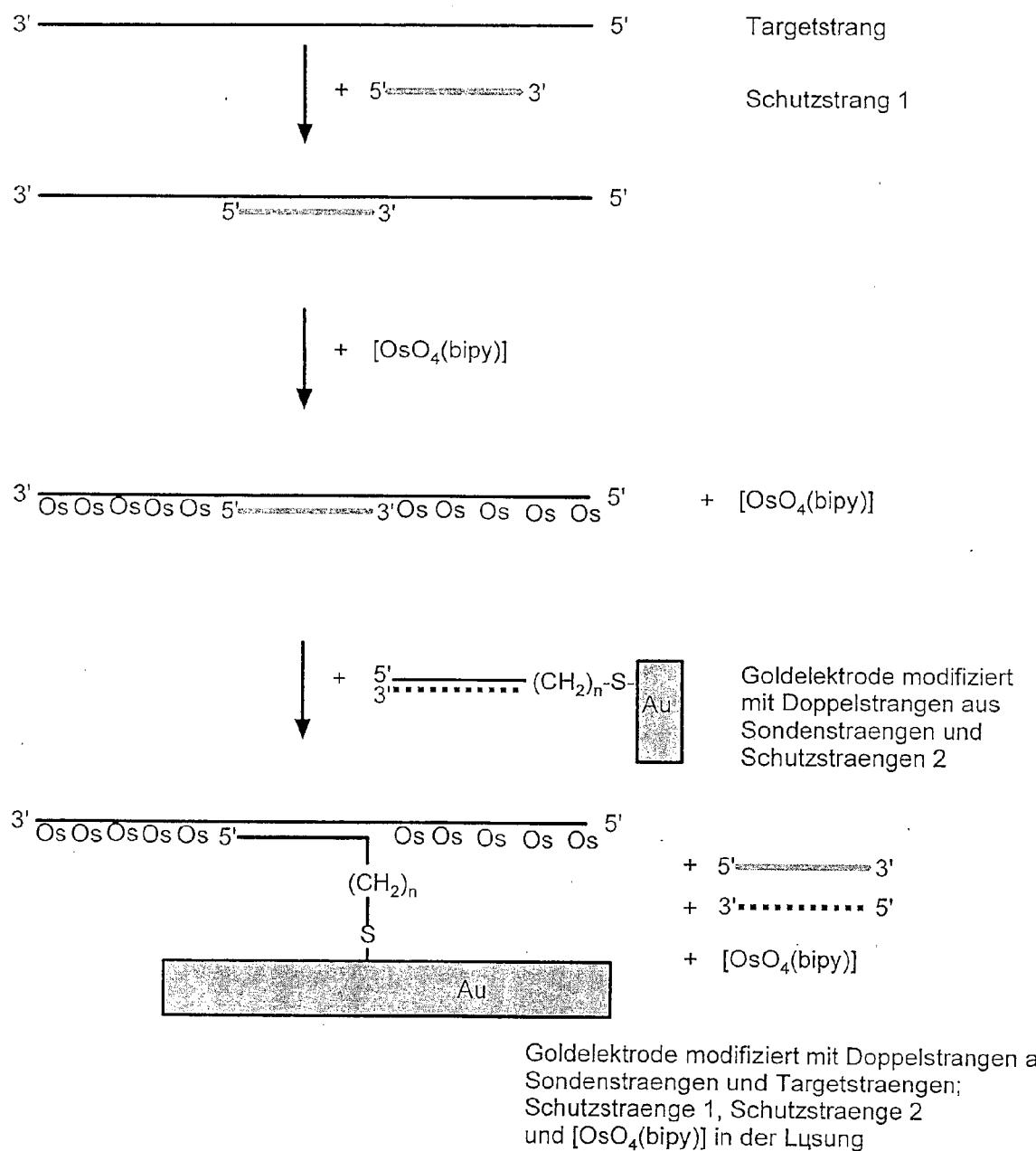


Abbildung 2

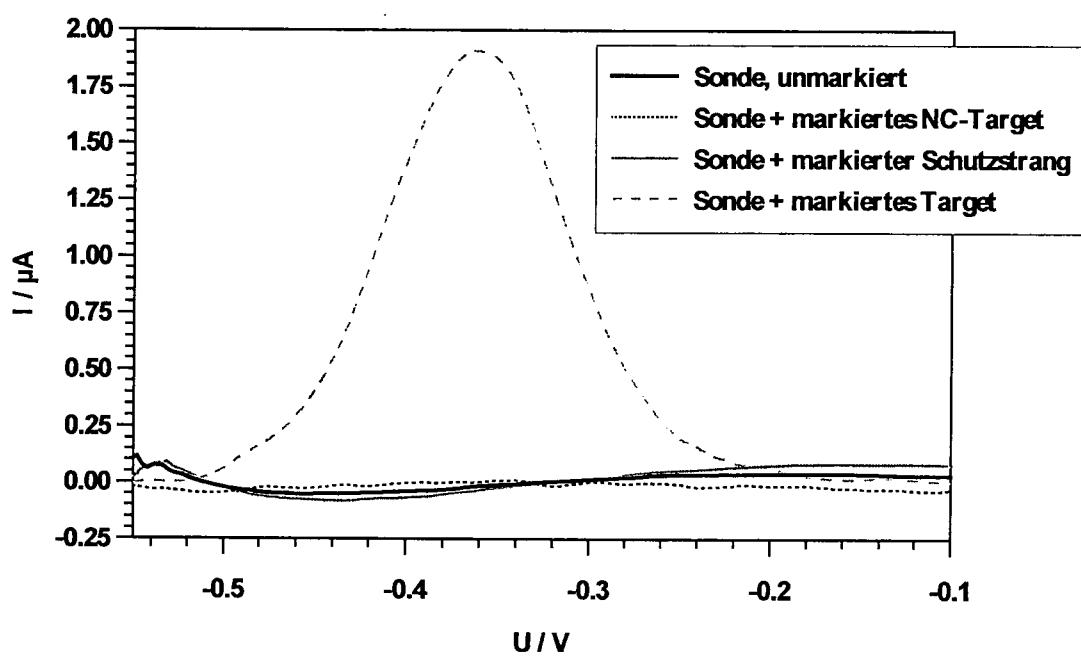


Abbildung 3

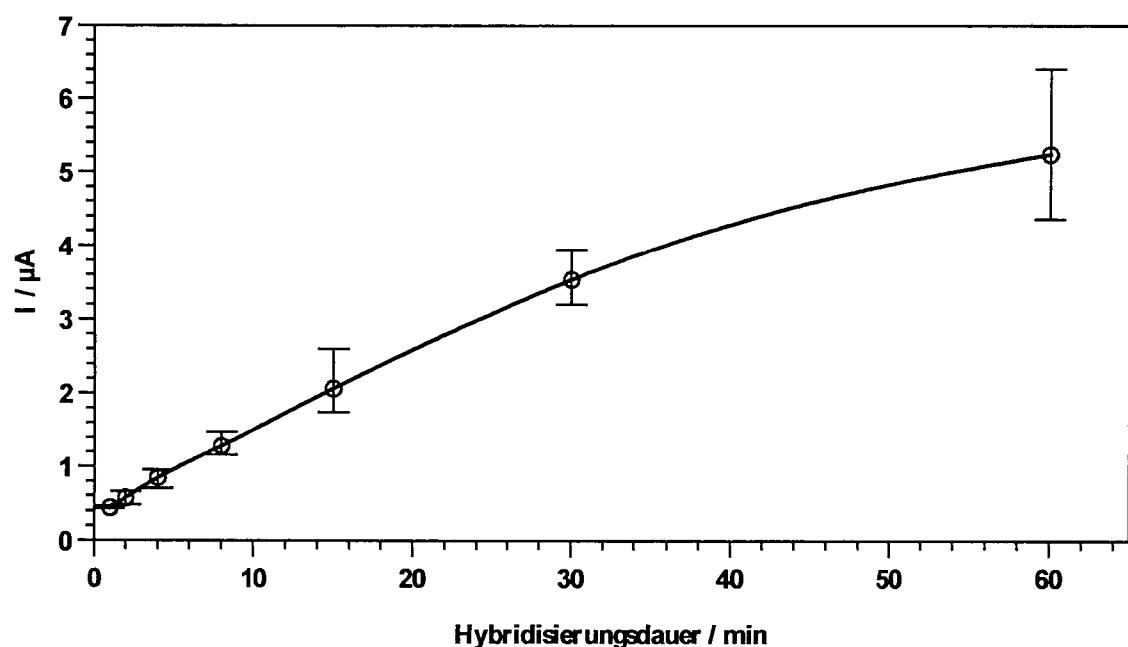


Abbildung 4

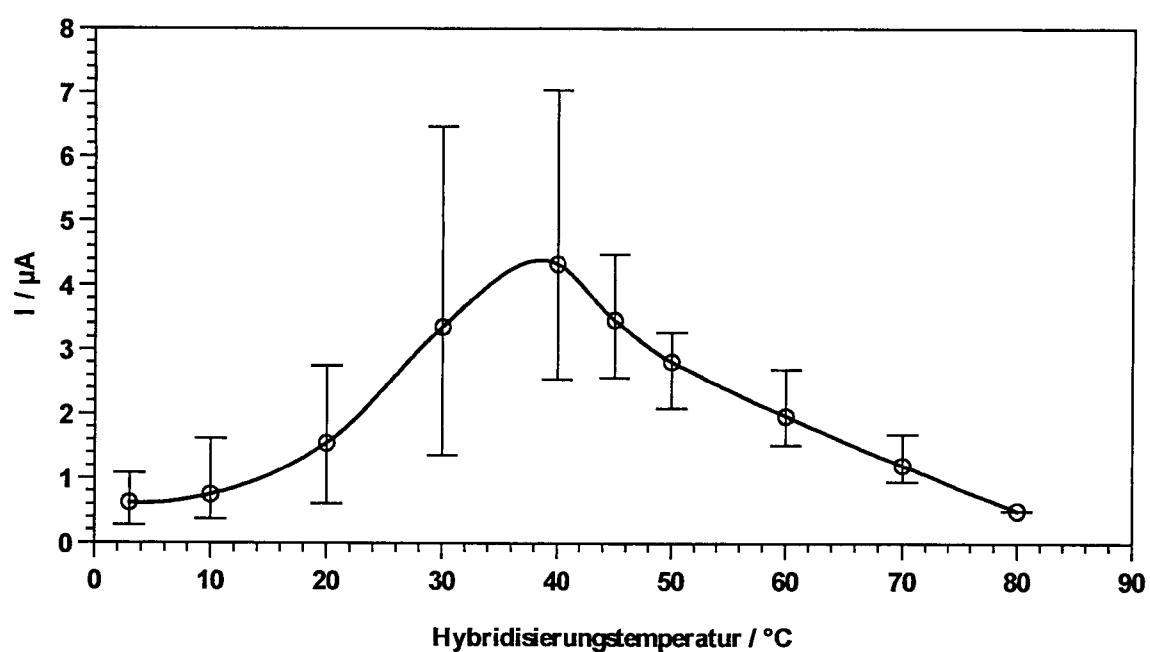


Abbildung 5

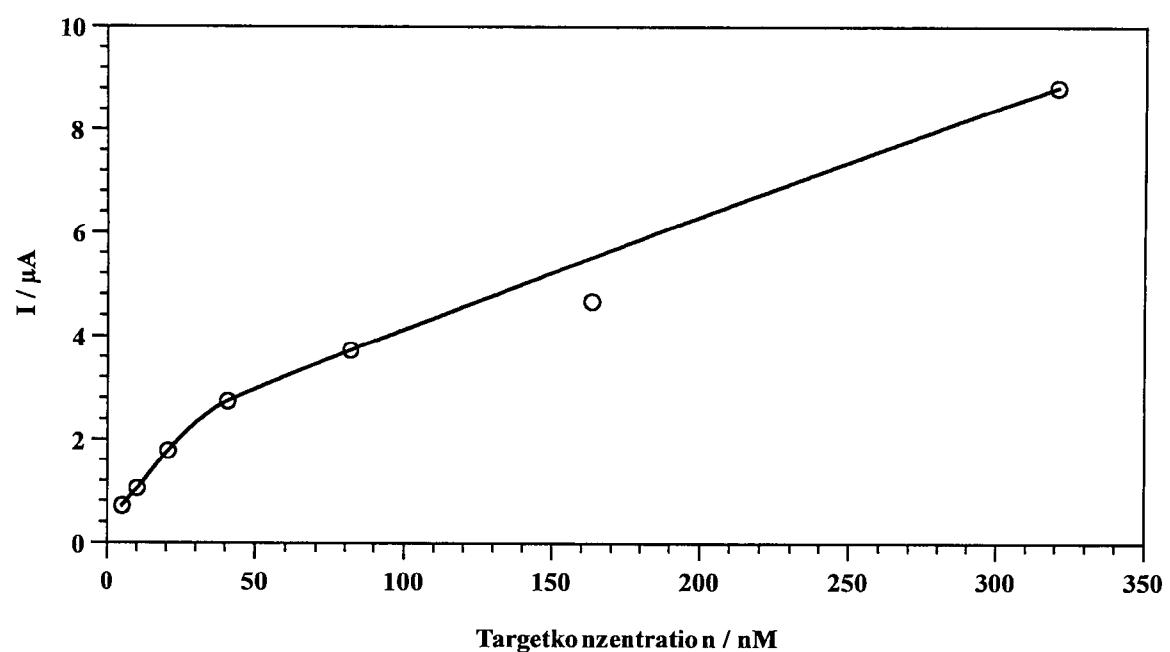


Abbildung 6

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Thomas Reske
Anschrift	Am Kabutzenhof 17, 18057 Rostock
Geburtsdatum	20.08.1979
Geburtsort	Bergen auf Rügen

Ausbildung

07/1998	Abitur am Ostseegymnasium Sassnitz
09/1998 bis 06/1999	Wehrdienst
10/1999 bis 09/2000	Studium der Informationstechnik an der Universität Rostock
10/2000 bis 08/2005	Chemiestudium an der Universität Rostock
10/2004 bis 08/2005	Diplomarbeit bei PD Dr. Gerd-Uwe Flechsig zum Thema „Detektierung der DNA-Hybridisierung an Gold-elektroden mit Hilfe von Osmiumverbindungen“
Seit 10/2005	Promotion bei PD Dr. Gerd-Uwe Flechsig
06/2007 bis 08/2007	Forschungsaufenthalt am Institut für Biophysikalische Chemie bei Assoc. Prof. RNDr. Miroslav Fojta, Ph.D. in Brno, Tschechische Republik

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 01.03.2009