



Kumulative Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock

Detektion organischer Moleküle mit Hilfe von heizbaren Elektroden im negativen Potentialbereich

vorgelegt von

Martin Jacobsen aus Rostock, geb. am 02.08.1982 in Uelzen

Rostock, 24.01.2013

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2008 bis September 2012 am Institut für Chemie in der Abteilung Technische und Analytische Chemie an der Universität Rostock.

Gutachter der Dissertation: PD Dr. Gerd-Uwe Flechsig
Universität Rostock
Institut für Chemie
Abteilung Analytische Chemie
Dr. Lorenzweg 1
18059 Rostock

Prof. Dr. Frank-Michael Matysik
Universität Regensburg
Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosenso-
rik
Universitätsstraße 31
93053 Regensburg

Datum der Abgabe: 30.01.2013
Datum der öffentlichen Verteidigung: 02.07.2013

Für meine Familie

Danksagung

Als erstes möchte ich mich für die gute Aufnahme in die Arbeitsgruppe bei Herrn PD Dr. Gerd-Uwe Flechsig bedanken, der mir dieses interessante Thema ermöglichte und mir mit wissenschaftlichen Anregungen stets zur Seite stand. Er ermöglichte mir zudem zwei Forschungsaufenthalte im Ausland, die mir wissenschaftlich und kulturell sehr viel gebracht haben.

In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank auch Prof. Miroslav Fojta in Brünn/Tschechien und Prof. Eric Bakker in Perth/Australien für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitsgruppen und die lehrreiche Zeit.

Außerdem möchte ich meinen Kollegen Maren Mix, Sven Ehlert und Anne Walter für die stets freundliche Atmosphäre im Labor und auch außerhalb danken. Eure fachlichen aber auch nichtfachlichen Diskussionen waren sehr hilfreich und auch eine gute Ablenkung.

Weiterhin möchte ich einigen ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, namentlich Dr. Heiko Duwensee, Dr. Falko Wachholz, Dr. Thomas Reske und Hanna Sopha, für den tollen und freundschaftlichen Umgang im Labor und auch außerhalb danken.

Großer Dank gebührt auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Elektrochemie, Christoph Herz, Simone Krüger, Gelaneh Woldemichael Kebede, Xiaoqi Ni und Katarzyna Biala, sowie allen Mitgliedern der Analytischen Chemie für das gute Arbeitsklima und die schöne Zeit.

Weiterhin möchte ich Frau Dr. Sabine Haack und Frau Petra Sattler für die gute Zusammenarbeit während der betreuenden Praktika aber auch darüber hinaus danken.

Ein ganz großer Dank gilt meinen Freunden, insbesondere Kristian und Konny Kiersch, die mir während meiner Arbeit immer zur Seite standen und für die die Arbeit nicht im Mittelpunkt stand.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Rainer und Christine Jacobsen bedanken. Ihr habt mich immer unterstützt und wart immer für mich da. Ohne euch wäre mein Studium bis hier hin nicht möglich gewesen.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Frau Katrin ganz besonders bedanken. Du hast mich während meiner Arbeit abgelenkt und aufgemuntert und meine Launen nicht nur während der Promotion ertragen. Du gibst mir Kraft und bist immer für mich da. Vielen Dank!

Publikationsliste

a) Artikel

- I. M. Jacobsen, G.-U. Flechsig; Temperature control in electrochemical DNA sensing; *Current Physical Chemistry* 1; 2011; 292 – 298
- II. M. Jacobsen, F. Wachholz, M. Adamovski, G.-U. Flechsig; Directly Heated Bismuth Film Electrodes Based on Gold Microwires; *Electroanalysis* 22; 2010; 1483 – 1488
- III. H. Duwensee, M. Jacobsen, G.-U. Flechsig; Electrochemical competitive hybridization assay for DNA detection using osmium tetroxidelabelled signaling strands; *Analyst* 134; 2009; 899 – 903
- IV. M. Jacobsen, G.-U. Flechsig; Hybridization detection of osmium tetroxide bipyridine labeled DNA and RNA on heated gold wire electrodes; *Electroanalysis* 25; 2013; 373 - 379
- V. G.-U. Flechsig, A. Walter, M. Jacobsen; Elektrochemischer Sensor; Patentanmeldung DE 10 2011 109 402.8 (2011)

I.	<ul style="list-style-type: none">- Literaturrecherche- Mitwirkung beim Verfassen des Manuskriptes
II.	<ul style="list-style-type: none">- Planung und Durchführung der Experimente zu den verschiedenen Elektroden im Basischen- Produktion der entsprechenden Elektroden- Erstellen der zugehörigen Grafiken- Mitwirken bei Diskussionen und beim Erstellen des Manuskriptes
III.	<ul style="list-style-type: none">- Durchführung aller Experimente- Auswertung und Diskussion der Ergebnisse- Erstellen zugehöriger Abbildungen

IV.	<ul style="list-style-type: none"> - Produktion der heizbaren Elektroden - Planung und Durchführung der Experimente - Auswertung der Experimente - Erstellen der zugehörigen Grafiken - Mitwirken in Diskussionen und bei dem Erstellen des Manuskriptes
V.	<ul style="list-style-type: none"> - Theoretische Überlegungen zum besseren Aufbau der Elektroden - Mitarbeit in der Literaturrecherche - Herstellung der bisherigen Elektroden (zum Vergleich) - Mitwirken in Diskussionen und beim Verfassen des Manuskriptes

b) Vorträge

1. G.-U. Flechsig, M. Mix, M. Jacobsen, H. Duwensee, Reactivity of Osmium Tetroxide Labels in Electrochemical DNA and RNA Detection, ESEAC 2010, Gijon, Spanien
2. M. Jacobsen, G.-U. Flechsig, Elektrochemische DNA-Detektion mit Hilfe eines Verdrängungsassays, 3. Doktorandentagung, 2009, Attendorn
3. M. Jacobsen, G.-U. Flechsig, Einfluss der Temperatur auf die Hybridisierung von Nukleinsäuren an geheizten Gold-Elektroden, 6. Interdisziplinäres Doktorandenseminar, 2012, Berlin

c) Poster

1. M. Jacobsen, H. Duwensee, M. Mix, G.-U. Flechsig, Influence of the temperature upon DNA-hybridization on heated gold-electrodes, ELECTROCHEM 2009, Manchester, Großbritannien
2. M. Jacobsen, G.-U. Flechsig, Controlling the temperature during DNA hybridization at heated gold wire electrodes, 61st ISE Annual Meeting 2010, Nizza, Frankreich
3. M. Jacobsen, G.-U. Flechsig, Directly Heated Bismuth Film Electrodes Based on Gold Microwires, Electrochemical Horizons 2011, Bath, Großbritannien

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungen	VIII
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	4
3 Theoretischer Teil	6
3.1 Nukleinsäuren	6
3.2 Chemische Sensoren	8
3.3 Hybridisierungssensoren	10
3.4 Temperatureinfluss auf DNA-Sensoren (Pub. 8.1)	12
3.4.1 Denaturierung und Hybridisierung der DNA	13
3.5 Geheizte Elektroden	14
3.5.1 Temperaturkalibrierung	15
3.6 Anwendung gepulster Heiztechniken auf elektrochemische Messungen	18
4 Ergebnisse und Diskussion	20
4.1 Einfluss der Temperatur auf die Detektion organischer Moleküle (Pub. 8.2)	20
4.2 Temperatureffekte auf Verdrängungsreaktionen von hybridisierten DNA-Strängen (Pub. 8.3)	23
4.3 Hybridisierungsreaktionen von Nukleinsäuren bei verschiedenen Temperaturen (Pub. 8.4)	26
4.4 Aufbau der heizbaren Elektroden und Anwendung der Elektroden in Arrays	29
5 Zusammenfassung	31
6 Ausblick	33
7 Literatur	35
8 Publikationen	38
8.1 Temperature control in electrochemical DNA sensing	38

8.2	Directly Heated Bismuth Film Electrodes Based on Gold Microwires.....	46
8.3	Electrochemical competitive hybridization assay for DNA detection using osmium tetroxide-labelled signalling strands	53
8.4	Hybridization detection of osmium tetroxide bipyridine labelled DNA and RNA on heated gold wire electrodes.....	59
8.5	Elektrochemischer Sensor (Patentanmeldung).....	67

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema eines DNA-Doppelstranges	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung von DNA und RNA	7
Abbildung 3: Schema eines Biosensors	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Hybridisierungssensors	10
Abbildung 5: Schema des verwendeten Heizstromkreises	15
Abbildung 6: Temperaturkalibrierung eines Golddrahtes.....	16
Abbildung 7: Schematische Darstellung der TPV mit Messpunkten am Ende des Heizpulses	19
Abbildung 8: Struktur der Pikrinsäure	20
Abbildung 9: TPA-Signale an verschiedenen Elektroden mit verschiedenen Konzentrationen der Pikrinsäure	22
Abbildung 10: Schema einer Verdrängungsreaktion	23
Abbildung 11: SWV-Signale der Verdrängung bei verschiedenen Temperaturen	24
Abbildung 12: Vergleich der SWV-Signale verschiedener Targets	27
Abbildung 13: Schematische Darstellung einer heizbaren Elektrode	29
Abbildung 14: Schematische Darstellung eines benetzten Drahtes	29

Abkürzungen

°C	Temperatur in Grad Celsius
µm	Mikrometer
A	Arrheniusfaktor
AdSV	Adsorptive-Stripping-Voltammetrie
b	Temperaturkoeffizient
bp	Basenpaare (base pairs)
CPE	Kohlepaste-Elektrode (carbon-paste electrode)
ΔE	Potentialänderung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPV	Differenz-Puls-Voltammetrie
ΔRG	Änderung der freien Reaktionsenthalpie
ΔRS	Änderung der freien Reaktionsenthropie
ΔT	Temperaturänderung
E	Potential
E _A	Aktivierungsenergie
F	Faradaykonstante
HDME	Hängende Quecksilbertropfen-Elektrode (hanging drop mercury electrode)
I	Stromstärke
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
k	Geschwindigkeitskonstante
K	Temperatur in Kelvin
LTCC	Low temperature co-fired ceramics
M	Molar (mol pro Liter)
mM	Millimolar (millimol pro Liter)
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
mV/K	Millivolt pro Kelvin
n	Anzahl der Basen
nA	Nanoampere

NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
p	Druck
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
ppm	Teile pro Million Teile (parts per million)
R	allgemeine Gaskonstante
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SAM	Selbstorganisierende Monoschicht (self-assembled monolayer)
ss	single-stranded (einzelsträngig)
SWV	Square-Wave-Voltammetry
T	Temperatur
t	Zeit
TPA	Temperatur-Puls-Amperometrie
TPV	Temperatur-Puls-Voltammetrie
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV-Vis	Spektroskopie bei ultravioletten und sichtbaren (visible) Licht
V	Volt
z	Ladungszahl

1 Einleitung

Die Temperatur spielt in der analytischen Chemie eine immer bedeutendere Rolle und ist neben Konzentration, Zeit, Potential und Stromstärke ein wichtiger Parameter in der Elektrochemie. Durch erhöhte Temperaturen werden thermodynamisch gehemmte Reaktionen ermöglicht oder es werden Reaktionen beschleunigt. Um mit erhöhter Temperatur zu arbeiten, wird üblicherweise die gesamte Messzelle inklusive aller darin befindlichen Teile, wie Elektroden und Analyten, geheizt. Dafür werden temperierbare Messzellen benötigt, die durch einen Thermostaten auf die gewünschte Temperatur gebracht werden. Allerdings ist es oft von Vorteil, nicht die komplette Lösung zu temperieren, weil dabei zum Beispiel thermodynamisch instabile Analyten beschädigt werden können, sondern nur bestimmte Regionen der Messzelle zu heizen. Dafür wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene Techniken zum Heizen von Elektroden entwickelt [1]. Grundsätzlich sind dabei zwei Vorgehensweisen zu unterscheiden. Die Arbeitselektrode kann indirekt geheizt werden, wie zum Beispiel bei Goldfilm- und im Siebdruckverfahren produzierten Platinelektroden [2]. Bei dieser Art des Heizens ist der Heizstromkreis galvanisch von der polarisierbaren elektrochemisch aktiven Elektrodenoberfläche getrennt, wodurch sowohl Gleichstrom als auch Wechselstrom zum Heizen in Frage kommen. Außerdem kann die Elektrodenoberfläche mit Hilfe von Mikrowellen erhitzt werden [3]. Baranski und seine Mitarbeiter beschreiben das Heizen der elektrodennahen Lösungsschicht mittels Hochfrequenz (bis zu 2 GHz) mit geringer Intensität. Sie erreichen mit diesem Verfahren Temperaturen weit oberhalb des Siedepunktes (225 °C) [4]. Weiterhin ist die Aktivierung der Elektrodenoberfläche mittels Laserstrahlung, zum Beispiel bei Glaskohle-Elektroden, zu erwähnen [5].

Des Weiteren gibt es neben den genannten Methoden des indirekten Heizens von Elektroden auch Möglichkeiten, diese direkt zu heizen. 1966 führten Ducret et al. Experimente zum Heizen von Platindrähten mittels Wechselstrom im Radiofrequenzbereich durch [6]. Erste Versuche zum gepulsten Heizen wurden von Gabrielli et al. an Platindrähten mit einer Wechselstromfrequenz von 250 kHz durchgeführt [7, 8].

Gründler und seine Mitarbeiter entwickelten einen symmetrischen Aufbau von Drahtelektroden [9], mit denen auch während der Messung direkt geheizt werden konnte. Mit dieser Methode war es später auch möglich, *low temperature co-fired ceramics* (LTCC) [10] zu heizen. Der Aufbau der Elektroden und die Technik für das Heizen (vom Messkreis getrennter Stromkreis) wurden von Wachholz et al. weiterentwickelt, indem sie den kompliziert herzu-

stellenden symmetrischen Aufbau der Elektroden durch eine Reihe verschiedener Bauteile im Heiz-Stromkreis erweitert haben und es dadurch ermöglichen, die Elektroden leicht im Labor herzustellen [11]. Dabei werden dünne Golddrähte als Arbeitselektroden eingesetzt. Diese haben den Vorteil, dass sie die Temperatur sehr schnell erreichen und relativ genau zu kalibrieren sind. Neben Gold sind aber auch andere Elektrodenmaterialien wie Platin [12], Bismut [13] oder Kohlenstoff [14] denkbar.

Mit diesen heizbaren Elektroden ist die Detektion verschiedener organische Moleküle oder auch Schwermetalle realisierbar [15]. So konnten Gründler et al. 1998 unter anderem Methanol und Oxalsäure mit heizbaren Platindrähten nachweisen [16]. Auch die Detektion von Biomolekülen, wie dem Koenzym NAD oder auch der *Desoxyribonukleinsäure* (DNA), ist mit heizbaren Elektroden möglich [17, 18].

Die DNA ist als Träger der Erbinformationen eines der wichtigsten Biomoleküle überhaupt. Seit sie 1869 von Friedrich Miescher entdeckt und 1943 von Oswald Avery als Erbsubstanz identifiziert wurde, ist sie auch für die analytische Chemie interessant geworden. Die DNA weist als strukturelles Merkmal eine Doppelhelix aus zwei komplementären Einzelsträngen auf [19]. Der Vorgang des Zusammenlagerns dieser Stränge wird dabei als Hybridisierung bezeichnet und es gibt verschiedene Möglichkeiten, diese zu detektieren. Man kann zum Beispiel einen Einzelstrang mit radioaktivem Phosphor ^{32}P [20] oder mit fluoreszierenden Farbstoffen [21] markieren. Nachteilig ist, dass die Entsorgung des radioaktiven Materials zum Teil sehr aufwendig und teuer ist.

Als gute Alternative hat sich die elektrochemische Detektion von Nukleinsäuren bewährt. Dabei können zum einen die Nukleobasen Guanin und Cytosin direkt oxidiert und detektiert werden [22-24], zum anderen wird der Strang mit redoxaktiven Substanzen markiert, die kovalent an die DNA gebunden sein können [25, 26] oder als Interkalator in den Doppelstrang eingebunden werden [27, 28]. Die Markierung der Stränge macht man sich in Hybridisierungssensoren zu Nutze. Der Gruppe um Palecek ist es 1958 als erste gelungen, DNA elektrochemisch nachzuweisen [29, 30].

All diese Detektionsmethoden können auch an geheizten Elektroden durchgeführt werden. Gründler et al. konnten beispielsweise nicht markierte DNA an geheizten Kohlepaste-Elektroden (*carbon-paste electrode*, CPE) durch Oxidation des Guanins nachweisen [18]. Auch die Hybridisierung von DNA an geheizten Elektroden wurde untersucht [31].

Üblicherweise wird bei der Detektion von DNA bei konstanter Temperatur (meist Raumtemperatur) gearbeitet, obwohl die Temperatur bei chemischen Reaktionen eine wichtige Rolle spielt. So wird zum Beispiel die Vervielfältigung von DNA mit der Polymerase-

Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) erst durch die Kontrolle der Temperatur möglich, da sowohl das Schmelzen des Doppelstranges als auch das Anlagern des Primers (*annealing*) durch verschiedene Temperaturen gesteuert werden. Durch erhöhte Temperaturen beschleunigen sich die meisten Reaktionen und die Hybridisierung von Einzelsträngen wird erleichtert, da der Massentransport auf Grund von Diffusion und Konvektion schneller abläuft. Aus diesem Grund werden bei Temperaturerhöhung deutlich größere Messsignale erhalten [14, 32]. Außerdem lassen sich unspezifische Adsorptionen auf Elektrodenoberflächen durch erhöhte Temperaturen minimieren. Auch enzymatisch katalysierte Reaktionen zeigen oft eine starke Temperaturabhängigkeit. Ein weiterer wichtiger Vorteil erhöhter Temperaturen ist eine mögliche Detektion von Fehlpaarungen bei DNA-Einzelsträngen [28, 33, 34]. Allerdings darf die Temperatur nicht zu hoch gewählt werden, da sonst thermodynamisch instabile Analyte zerstört werden können.

2 Zielsetzung

Viele der bisher beschriebenen Methoden nutzen die Oxidation der organischen Analyten für die Signalgewinnung. Bei diesen Methoden wird meist im positiven oder nur schwach negativen Potentialbereich gearbeitet. Doch auch bei stärker negativen Potentialen sind organische Analyte sehr gut durch Reduktion nachweisbar. So wurde die Pikrinsäure, die auch als Sprengstoff fungieren kann, beispielsweise an geheizten Goldelektroden durch Reduktion detektiert [35]. Der negative Potentialbereich ist allerdings auf Grund der Wasserstoffbildung mit Goldelektroden nicht nutzbar. Daher wurden Möglichkeiten gesucht, diesen Potentialbereich mit heizbaren Elektroden aus anderen Materialien abzudecken. Eine Variante dazu bietet der Einsatz von Bismutfilmelektroden, die auf einer CPE aufgetragen werden [13]. Deren Handhabung bedarf allerdings einer gewissen Erfahrung, da die Carbon-Paste-Elektrode nicht stabil genug sind und es auch nicht ohne weiteres möglich ist, diese zu reinigen. Ziel dieser Arbeit war es daher, stabile direkt heizbare Bismutelektroden herzustellen, mit denen auch im negativen Potentialbereich organische Moleküle detektiert werden können. Dafür wurden Bismutfilme galvanisch auf Golddrähte aufgebracht, mit dem Vorteil, diese durch Glühen des Drahtes einfach reinigen zu können. Dadurch können organische Moleküle, wie zum Beispiel die Pikrinsäure, detektiert werden, die an Gold nicht erfasst werden können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, das optimale Elektrodenmaterial, ausgehend von Golddrähten, für die Detektion von Pikrinsäure an geheizten Elektroden zu finden. Es wurden Gold- und Bismutdrähte sowie eine Mischlegierung aus beiden Metallen untersucht. Es wurde betrachtet, welchen Einfluss das gepulste Heizen auf die Analyten hat. Darüber hinaus wurden Parameter wie das Arbeitspotential und die Temperatur optimiert.

An den verschiedenen Elektroden sollte getestet werden, ob man mit Osmium markierte Biomoleküle wie DNA detektiert werden können, wie es bereits an der HDME (*hanging drop mercury electrode*) praktiziert worden war [36]. Durch die Modifikation mit Bismut sollte der messbare Potentialbereich deutlich ins Negative erweitert werden, um so den durch den Komplex $[OsO_4(bipy)]$ verursachten katalytischen Wasserstoffpeak zu detektieren [37].

Darüber hinaus bestand eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit in der Optimierung der Hybridisierungstemperatur und der Konzentration für die Detektion markierter DNA. Dabei wurden sowohl die Parameter für die eigentliche Hybridisierung als auch für die Verdrängungsreaktionen optimiert. Die Verdrängung von DNA wurde dabei ausführlich während meiner Diplo-

marbeit untersucht und die Ergebnisse als Voruntersuchungen zu den Hybridisierungsexperimenten genutzt.

In dieser Arbeit wurde außerdem untersucht, inwieweit es möglich ist, Fehlpaarungen in DNA-Strängen durch Temperaturunterschiede zu detektieren. Dafür wurden die Hybridisierungstemperatur optimiert und die Effizienz der Hybridisierung anhand der voltammetrischen Signale an den geheizten Elektroden mit denen aus der ungeheizten Lösung verglichen.

Auch Hybridisierungen von *Ribonukleinsäure* (RNA) wurden untersucht. Dabei wurde zunächst die ideale Temperatur für die Markierungsreaktion von RNA mit dem Komplex Osmiumtetroxidbipyridin [OsO₄(bipy)] bestimmt. Anschließend wurden mit RNA Hybridisierungsversuche an geheizten Elektroden durchgeführt, um auch hier die ideale Temperatur zu finden.

3 Theoretischer Teil

3.1 Nukleinsäuren

Der Begriff Nukleinsäure leitet sich vom lateinischen Wort *nucleus* (= Kern) ab und wurden 1869 erstmals von Friedrich Miescher (er nannte sie nuclein) entdeckt. Zu den Nukleinsäuren gehören die DNA sowie die RNA, welche für die Speicherung der Erbinformationen sowie deren Umsetzung in Proteine verantwortlich sind. Nukleinsäuren sind aus jeweils vier Nukleobasen zusammengesetzt, welche mit einer Pentose über N-glykosidische Bindungen zu Nukleosiden werden. Die verschiedenen Nukleoside sind über Phosphatgruppen zu einem polymeren Strang verbunden. Bei der DNA werden Thymin, Adenin, Guanin und Cytosin eingebunden, bei der RNA findet sich anstelle des Thymins das Uracil. Die Zucker sind die Desoxyribose in der DNA und die Ribose in der RNA.

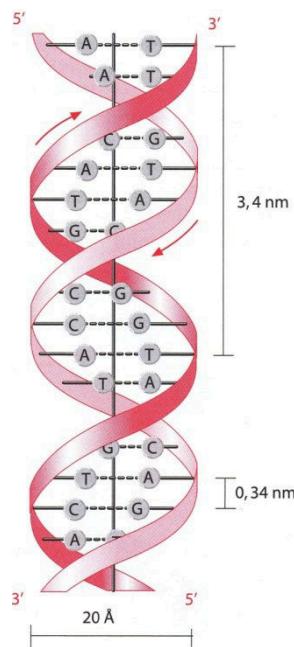


Abbildung 1: Schema eines DNA-Doppelstranges
(entnommen aus [38])

Die DNA liegt im Unterschied zur RNA doppelsträngig vor. Das heißt, dass zwei zueinander komplementäre Einzelstränge über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin verbunden sind. Der Doppelstrang wird zusätzlich durch ionische Wechselwirkungen der geladenen Phosphatreste sowie die hydropho-

ben Wechselwirkungen durch Basenstapelung stabilisiert. Durch diese Wechselwirkungen hat die DNA die Struktur einer Doppelhelix.

Die RNA nutzt zur Stabilisierung intramolekulare Sekundärstrukturen, welche zum Beispiel Doppelstränge mit Hairpin-Loop sind. Die RNA ist deutlich instabiler als die DNA und wird beispielsweise durch das Enzym RNase abgebaut [39]. Dieses spaltet die Bindungen im Zuckergerüst der RNA und zerlegt diese dabei in ihre Monomere.

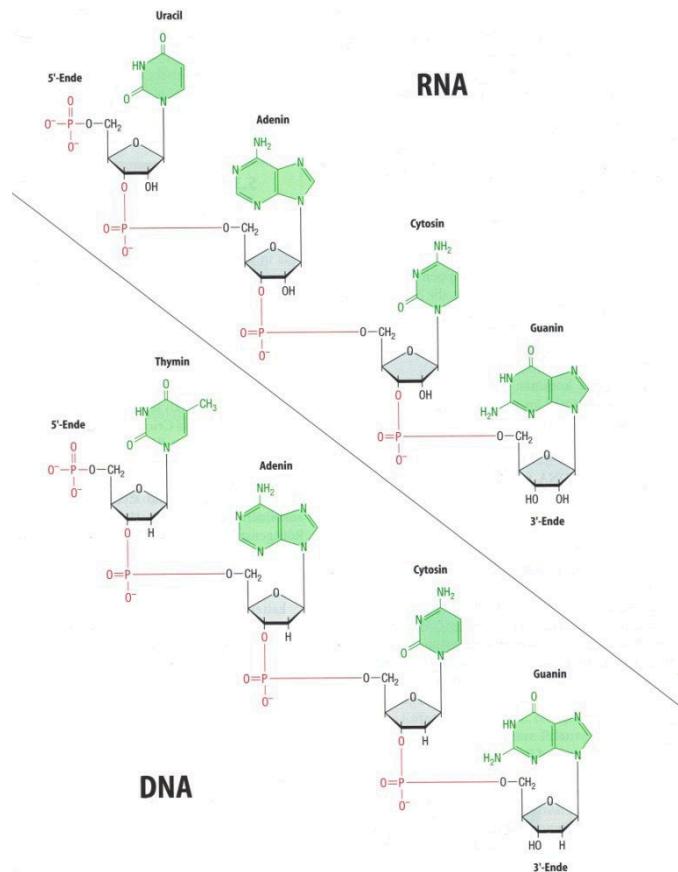


Abbildung 2: Schematische Darstellung von DNA und RNA

(entnommen aus [40])

3.2 Chemische Sensoren

„Ein chemischer Sensor ist eine Anordnung, die chemische Informationen (diese reichen von der Konzentration eines einzelnen Probenbestandteils bis zur Gesamtanalyse der Zusammensetzung) in ein analytisch nutzbares Signal umwandelt. Die erwähnten chemischen Informationen können von einer chemischen Reaktion der Probe oder von einer physikalischen Eigenschaft des untersuchten Systems herrühren“

(International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC, 1991).

Die Sensoren sollen dabei

- möglichst „[...] schnell ansprechen“
- [...] lange Zeit einsatzbereit sein
- [...] klein bzw. miniaturisierbar sein
- [...] preisgünstig sein
- [...] spezifisch sein (d.h. auf einzelne Analyten ansprechen oder [...] selektiv auf eine Gruppe von Analyten reagieren)“

Diese Definition wurde 1999 durch die IUPAC ergänzt:

„Chemische Sensoren enthalten gewöhnlich zwei Basiskomponenten in Serienanordnung: Ein chemisches (molekulares) Erkennungssystem (Rezeptor) und einen physiko-chemischen Transduktor“ ([41]¹).

Es gibt dabei verschiedene Varianten, die Sensoren einzuteilen. Eine Art der Einteilung richtet sich nach der Art der Transduktion, wie es die IUPAC 1991 vorschlägt. Dort gibt es zum Beispiel optische oder elektrochemische Sensoren. Eine andere Variante der Einteilung richtet sich nach den Anwendungsbereichen der Sensoren. Unter diese Kategorie fallen zum Beispiel die Biosensoren. In einer Ergänzung der IUPAC zu den chemischen Sensoren heißt es 1999:

„Biosensoren sind chemische Sensoren, in denen das Erkennungssystem einen biochemischen Mechanismus nutzt“ [41].

¹ Alle Definitionen der IUPAC wurden aus [41] P. Gründler, *Chemische Sensoren - Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Ingenieure*. 2004, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag. 6. entnommen und vom Verfasser P. Gründler aus dem Englischen übersetzt

Der Rezeptor ist dabei ein biologisches Erkennungssystem, das seine physikochemischen Eigenschaften ändert, wenn eine Erkennungsreaktion stattgefunden hat. Der Transduktork wandelt diese Veränderungen in ein elektrisch auswertbares Signal um, wie zum Beispiel Spannung oder Strom, welches vom Detektor registriert und ausgewertet werden kann.

Die Rezeptoren können beim Biosensor Enzyme, Antikörper, Zellen oder Oligonukleotide sein. Das Erkennen der Analyten erfolgt sterisch oder molekular, wobei beide Möglichkeiten sehr selektiv sind, da nur bestimmte Analyten zu einem Rezeptor passen. Dieses Prinzip wird auch Schlüssel-Schloss-Prinzip genannt und ist in

Abbildung 3 schematisch dargestellt. Dabei sind und verschiedene Analyten, von denen nur der schwarze an den Rezeptor binden kann.

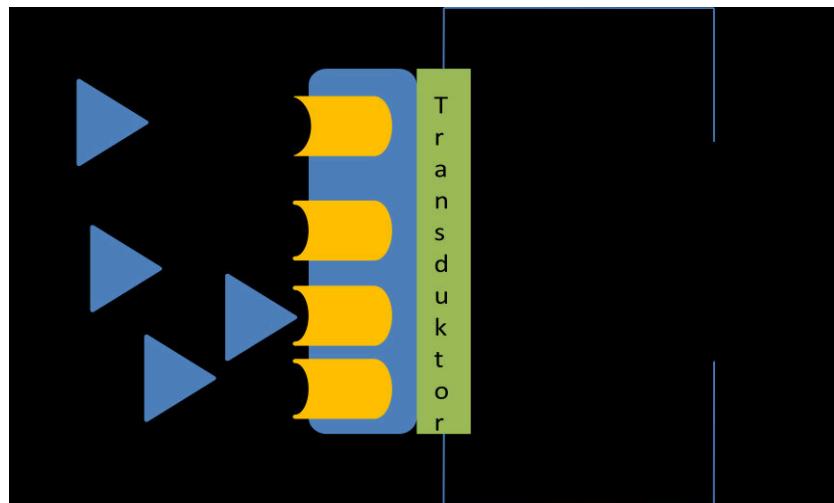


Abbildung 3: Schema eines Biosensors

3.3 Hybridisierungssensoren

Eine besondere Form der Biosensoren sind die Hybridisierungssensoren. Hierbei wird ein Einzelstrang (die so genannte Sonde) als Rezeptor auf einer Oberfläche immobilisiert während sich ein zweiter Strang (das Target) in der Lösung befindet und durch Hybridisierung detektiert wird.

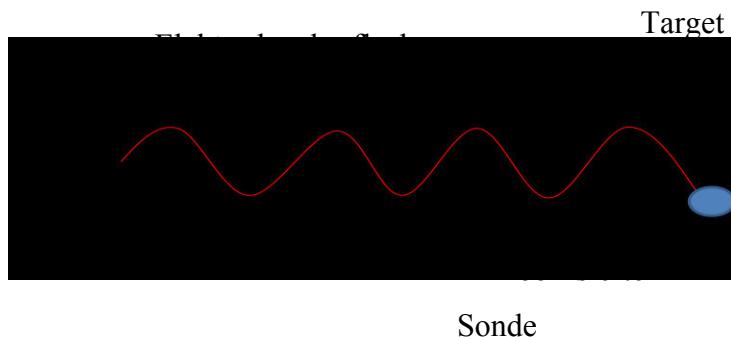


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Hybridisierungssensors

Die Sonde ist dabei oft ein Oligonukleotid mit einer Länge zwischen 10 und 100 Basen. Hybridisierungssensoren haben den Vorteil, dass sie sequenzspezifisch sind, da nur komplementäre Targetstränge an die Sonde binden. Auf diesem Gebiet waren Mikkelsen und seine Mitarbeiter eine der ersten Arbeitsgruppen, die entsprechende Publikationen hervorbrachten [42].

Die Immobilisierung der Sonde kann auf verschiedene Arten erfolgen. So kann die Sonde durch Adsorption an die Elektrode gebunden werden, jedoch ist diese Methode nicht weit verbreitet, da sie relativ instabil ist. Als wesentlich stabiler erweist sich eine kovalente Bindung der Sonde an die Oberfläche. Der Sondenstrang wird dafür entsprechend der Oberfläche, an der er binden soll, modifiziert, sodass das Oligonukleotid an der Oberfläche gebunden werden kann. Die Sonde ragt dann in die zu untersuchende Lösung und ermöglicht dadurch eine Hybridisierung des Targets.

Eine Möglichkeit der kovalenten Bindung ist die Avidin-Biotin-Bindung, bei der das Avidin auf der Oberfläche gebunden ist. Dieses Protein ist in der Lage, bis zu vier Biotin-Moleküle zu binden, welche ihrerseits mit DNA reagieren können [43].

Eine andere Art, die Sonde kovalent auf der Oberfläche zu binden, sind die selbstorganisierenden Monoschichten (*self-assembled monolayers, SAM*) [28, 33, 34, 44]. Diese haben ein Grundgerüst aus Alkylketten, die mit einem Ende über bestimmte funktionelle Gruppen an die Oberfläche gebunden sind. Für Goldoberflächen eignen sich zum Beispiel Alkanthiole [44]

oder Diazoniumverbindungen [45] sehr gut. Die zu untersuchenden Moleküle binden dann am anderen Ende der Alkylketten und können so detektiert werden. Für die Ausbildung einer SAM muss die Elektrode für einige Zeit in Kontakt mit den entsprechenden Alkylketten gebracht werden, zum Beispiel durch Eintauchen in eine Lösung oder durch Auftröpfen auf die Elektrode. Durch eine Nachbelegung mit einer zweiten SAM mit kürzeren Alkylketten lassen sich eventuell aufgetretene Lücken in der Sondenschicht füllen und die Elektrodenoberfläche dadurch schließen, sodass kein Analyt direkten Kontakt zur Elektrodenoberfläche hat. Des Weiteren wird durch die zusätzlichen Moleküle verhindert, dass die Sondenmoleküle zu dicht zusammenstehen und die DNA-Bindung sterisch behindern. Die zweite SAM verhindert zudem die unspezifische Adsorption der Sonde und des Targets und sorgt dafür, dass sich die Sonde aufrichtet. Außerdem wird durch die SAM die Kapazität der Doppelschicht erhöht [44].

Eine gelungene Hybridisierung lässt sich elektrochemisch, optisch und massensensitiv detektieren, wobei die optische Detektion am häufigsten Anwendung findet. Dafür wird der Targetstrang mit fluoreszierenden oder lumineszierenden Stoffen wie Fluorescein [46] oder Rhodamin markiert. Auch Ethidiumbromid eignet sich als optischer Marker, der sich auf Grund seiner planaren Struktur in den Doppelstrang interkaliert.

In jüngster Vergangenheit gewannen allerdings die elektrochemischen Hybridisierungssensoren an Bedeutung. Ihr Vorteil besteht im geringen Preis sowie der geringen Größe, wodurch eine mobile Analytik möglich wird. Die erfolgreiche Hybridisierung wird dabei mit redoxaktiven Substanzen, wie zum Beispiel Ferrocen [31] oder Osmiumtetroxidkomplexen [47, 48], detektiert. Auch Substanzen, die mit dem Doppelstrang interkalieren können, wie Daunomycin [27] oder $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{2+}$ [42] kommen dafür in Frage. Darüber hinaus ist aber auch eine markierungsfreie Detektion, basierend auf der Oxidation des Guanins [22] möglich. Dabei werden in der Sonde sämtliche Guaninbasen durch Inosin substituiert, welches erst bei wesentlich höheren Potentialen als das Guanin oxidiert wird. Lagert sich ein komplementärer Strang an, der Guanin enthält, ist ein Oxidationsstrom messbar. Auch eine Kombination von optischer und elektrochemischer Detektion ist denkbar [49]. In diesem Fall werden die Nukleinsäuren mit dem Osmiumtetroxidkomplex $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ markiert.

Osmiumtetroxid wird in der Elektronenmikroskopie als Fixier- und Färbemittel verwendet. In der chemischen Synthese dient es als Oxidationsmittel für Doppelbindungen von Alkenen. Diese Oxidation wird auch in der Reaktion mit Nukleinsäuren genutzt. Zu Beginn der 1980er Jahre markierte Emil Palecek erstmals DNA mit dem Komplex $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ und detektierte das Produkt voltammetrisch [47, 50], wobei sich die C-C-Doppelbindung der Pyrimidinbasen

hierfür besonders gut eignet [51]. Durch die Reaktion mit dem Osmiumkomplex bildet sich der entsprechende Osmatester mit der Oxidationsstufe +VI des Osmiums. Die Reaktion läuft in Anwesenheit von Stickstoffliganden wie Pyridin beschleunigt ab. Außerdem verhindern diese Liganden die Hydrolyse der Osmatester, sodass er für elektrochemische Analysen in Frage kommt [52]. Thymin reagiert dabei 10 mal schneller als Cytosin und 2-3 mal schneller als Uracil [53].

Diese Markierungsreaktion ist allerdings nur an Einzelsträngen möglich, da in helikaler DNA die C-C-Doppelbindung des Thymins sterisch für den relativ großen Osmium-Komplex nicht zugänglich ist [54]. Die markierten Nukleobasen sind nach der Reaktion nicht mehr in der Lage, mit dem komplementären Gegenstück zu hybridisieren.

3.4 Temperatureinfluss auf DNA-Sensoren (Pub. 8.1)

Die Temperatur ist ein wichtiger Einflussfaktor auf chemische Reaktionen und hat daher auch für die analytische Chemie eine große Bedeutung. Ein großer Vorteil erhöhter Temperaturen ist in der Kinetik von Reaktionen zu sehen. Erhöhte Temperaturen führen zur Beschleunigung von Reaktionsprozessen (Gleichung 3.1) und zu erhöhten Diffusionsgeschwindigkeiten.

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}} \quad (3.1)$$

Dabei sind k die Geschwindigkeitskonstante, A der Arrheniusfaktor, E_A die Aktivierungsenergie, R die allgemeine Gaskonstante und T die Temperatur.

Der Temperatureinfluss ist auch bei der Hybridisierung von Nukleinsäuren zu beobachten. Die Reaktion der Hybridisierung wird bei erhöhten Temperaturen beschleunigt, da eventuell vorhandene Sekundärstrukturen aufgebrochen werden und der Analyt (ein DNA-Target) leichter zu detektieren ist. Die Reaktionen laufen schneller ab und die Bildung des Doppelstranges wird bevorzugt stattfinden.

Daneben ist bei erhöhten Temperaturen die Hybridisierung deutlich effektiver. Dies lässt sich durch höhere elektrochemische Signale feststellen, die auftreten, wenn man die Hybridisierung bei höheren Temperaturen durchführt [31, 55, 56]. Diese Vorgehensweise funktioniert sowohl bei künstlichen Oligonukleotiden als auch bei PCR-Produkten [57, 58]. Auch Ver-

drängungsreaktionen lassen sich bei erhöhten Temperaturen leichter detektieren [59]. Wird die Temperatur allerdings zu hoch gewählt, beginnt der Doppelstrang zu denaturieren.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, sich die Temperatur während der DNA-Detektion zu Nutze zu machen. Man kann die Temperatur erhöhen und damit die Denaturierung des DNA-Doppelstranges detektieren. Bei bekannter Sequenz der DNA kann man mit Formel 3.2 den Schmelzpunkt berechnen. Die Bestimmung des Schmelzpunktes kann dabei konventionell (z.B. durch UV-Vis-Messungen) erfolgen [60, 61] oder durch elektrochemische Detektion des Schmelzens, z.B. an Quecksilberelektroden [62, 63]. Dabei kann ein so genanntes „*premelting*“, also das vermeintliche Schmelzen der DNA unterhalb der eigentlichen Schmelztemperatur, auftreten. Dieser Effekt ist von der Sequenz (vor allem dem Guanin-Cytosin-Anteil), der Länge des Doppelstranges und der Ionenstärke des Lösungsmittels abhängig und kann sehr gut elektrochemisch [64] detektiert werden. Das Schmelzen der DNA kann sowohl bei adsorbierten Strängen als auch bei an Elektroden gebundenen Strängen detektiert werden. Bei gebundenen (immobilisierten) Sonden ist es durch Temperaturerhöhung sogar möglich, Fehlpaarungen in den zu untersuchenden Targetsträngen zu detektieren.

Eine Erhöhung der Temperatur kann aber auch eine deutliche Signalerhöhung nach sich ziehen [14]. Dies liegt zum einen an der besseren Adsorption (bei der AdSV), zum anderen an der effektiveren Hybridisierung. Dabei kann entweder die gesamte Lösung oder nur die Elektrodenoberfläche geheizt werden, um die gewünschte Temperatur zu erhalten. Durch schnellere Reaktionen und schnellere Diffusionen der DNA-Targetstränge kann bei höheren Temperaturen eine deutliche Steigerung der Hybridisierungssignale erhalten werden.

3.4.1 Denaturierung und Hybridisierung der DNA

Der DNA-Doppelstrang lässt sich bei höheren Temperaturen oder unter milden alkalischen Bedingungen [65] in seine Einzelstränge spalten. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen der komplementären Basenpaare gespalten. Dieser Vorgang wird Denaturierung, Schmelzen oder Dehybridisierung genannt und ist mit Änderungen der physikalischen Eigenschaften der Lösung verbunden. Er kann beispielsweise mittels UV-Vis-Spektroskopie detektiert werden [60]. Die Einzelstränge (*single-stranded*, ss-DNA) adsorbieren mehr UV-Licht als der Doppelstrang, da in ss-DNA die internen Wechselwirkungen der Elektronen, die bei komplementären Basenpaaren auftreten, nicht von Bedeutung sind. Die Temperatur, bei der die Hälfte der maximalen Adsorptionsänderung erfolgt, nennt man Schmelztemperatur. Sie ist

von verschiedenen Parametern, wie dem pH-Wert, der Polarität und der Ionenstärke des Lösungsmittels, vor allem aber von dem Guanin-Cytosin-Gehalt des Doppelstranges, abhängig, da diese Nukleobasen jeweils drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können.

Mit der Gleichung 3.2 ist eine gute Näherungslösung für die Schmelztemperatur berechenbar [66]:

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \cdot (\log_{10} [\text{Na}^+] + 0,41 \cdot (\% \cdot [\text{G} + \text{C}]) - \left(\frac{500}{n} \right)) \quad (3.2)$$

Dabei ist (G+C) die Summe der Guanin- und Cytosin-Paarungen, $[\text{Na}^+]$ ein Maß für die Ionenstärke und n die Gesamtzahl der Basenpaare.

Der Schmelzpunkt eines DNA-Doppelstranges lässt sich in Lösung bestimmen, kann aber auch elektrochemisch (zum Beispiel an Quecksilberelektroden) [64, 67] detektiert werden. Man kann allerdings auch die Hybridisierung eines Einzelstranges an einen anderen, beispielsweise an einer Goldoberfläche gebundenen Einzelstrang detektieren [68]. Auch der Einsatz direkt geheizter Elektroden für die Temperatureinstellung ist hier denkbar [60]. Um die Schmelzkurven zu bestimmen, können auch spektroskopische [69] oder markierungsfreie [70, 71] Methoden sowie andere Oberflächen [72] verwendet werden.

3.5 Geheizte Elektroden

Wie bereits in Kapitel 1 beschrieben wurde, ist es nicht immer vorteilhaft, die komplette Lösung inklusive aller darin eintauchenden Elektroden zu heizen. Dabei können zum Beispiel thermodynamisch instabile Analyten beschädigt und für die weitere Detektion nicht mehr nutzbar werden. Es empfiehlt sich daher, die erhöhte Temperatur nur in bestimmten Regionen der Messzelle einzubringen. Zu diesem Zweck wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene Techniken zum Heizen von Elektroden entwickelt [1]. Grundsätzlich sind dabei zwei Vorgehensweisen zu unterscheiden. Zum einen kann die Arbeitselektrode indirekt geheizt werden, zum anderen kann die Temperatur direkt über die Elektrode eingebracht werden. Bei der indirekten Art des Heizens ist der Heizstromkreis galvanisch von der polarisierbaren elektrochemisch aktiven Elektrodoberfläche getrennt, wodurch sowohl Gleichstrom als auch Wechselstrom zum Heizen der Elektrode in Frage kommen. Weiterhin gibt es die bereits erwähnten Möglichkeiten, die Elektrode mit Mikrowellen [4] oder mittels Laserstrahlen [5] zu erhitzen.

Neben der indirekten Heizung gibt es auch die Möglichkeit, die Elektroden direkt zu heizen. Ducret und seine Mitarbeiter waren die ersten, die Platindrähte mit Wechselstrom heizten [6], Gabrielli et al. gelang es als erste, Elektroden mit gepulsten Methoden zu heizen [7, 8]. Gründler und seinen Mitarbeitern ist es gelungen, durch einen symmetrischen Aufbau der heizbaren Drahtelektroden auch während der Messungen heizen [9]. Der Aufbau der Elektroden und die Technik für das Heizen (vom Messkreis getrennter Stromkreis) wurden von Wachholz während seiner Promotion weiterentwickelt [11] und in dieser Arbeit angewendet. Es werden dünne Drahtelektroden mit $25\text{ }\mu\text{m}$ im Durchmesser als Arbeitselektroden eingesetzt.

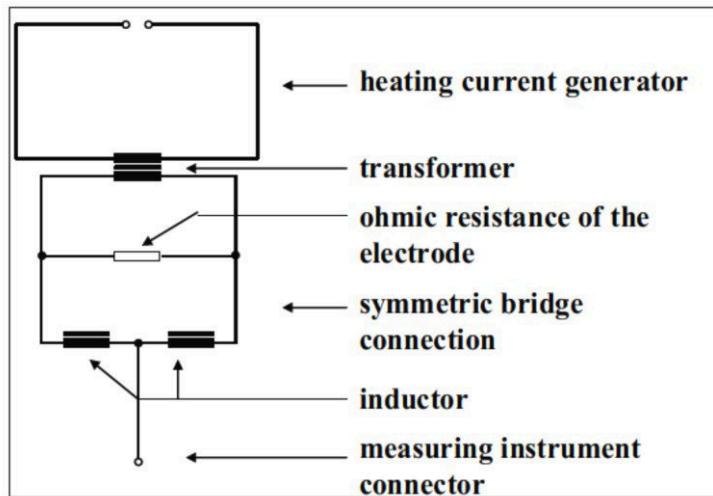


Abbildung 5: Schema des verwendeten Heizstromkreises

(entnommen aus [11])

3.5.1 Temperaturkalibrierung

Für die Durchführung der Experimente bei erhöhten Temperaturen ist es unerlässlich, die genaue Temperatur in der Lösung oder in der Umgebung der Elektroden zu kennen. Beim konventionellen Heizen der gesamten Messzelle kann ein gewöhnliches Thermometer für die Messung verwendet werden. Sobald aber nur die Arbeitselektrode geheizt wird, ist das Thermometer kein geeignetes Messgerät, da beim Heizen der Elektrode lediglich eine sehr dünne Schicht um diese herum erwärmt wird. Daher muss eine Möglichkeit gefunden werden, die Temperatur der Elektrode selbst zu bestimmen. Hier ist die Nutzung des spezifischen Widerstandes des Elektrodenmaterials zu nennen, aus dem man die Temperatur errechnen kann. Für

Drahtelektroden muss allerdings beachtet werden, dass die gesamte Elektrodenlänge in die Widerstandsmessung einzubeziehen ist. Da Drähte aber an Lötpunkten befestigt und dort isoliert sein müssen, kommt eine Verfälschung der berechneten Temperaturen zustande. Für Elektroden, in denen der isolierte Bereich klein im Vergleich zu der gesamten geheizten Länge ist, ist die Methode aber anwendbar. Für diese Berechnungen muss der Draht an allen Punkten möglichst die gleiche Temperatur haben. Es dürfen keine Temperatursenken in den isolierten Lötpunkten auftreten.

Eine weitere Methode, die Temperatur einer Elektrode zu bestimmen, ist die numerische Berechnung der Wärmeverteilung, wie sie von Mahnke und Wachholz angewendet wurde [73]. Außerdem ist das direkte Messen der Infrarotstrahlung einer geheizten Elektrode durch eine Infrarotkamera zu nennen [74].

Eine vierte wichtige Methode besteht in der Nutzung der Temperaturabhängigkeit des elektrochemischen Potentials eines reversiblen Redoxpaars, welche im Folgenden näher beschrieben wird. Das Redoxpaar Kaliumhexacyanoferrat (II/III) ($K_{3/4}[Fe(CN)_6]$) hat sich hierbei als besonders geeignet erwiesen. Bei dieser Methode der Temperaturbestimmung wird eine stromlose Potentiometrie (*open-circuit potentiometry; zero-current potentiometry*) unter Zuhilfenahme eines reversiblen Redoxpaars mit genau bekanntem Temperaturkoeffizienten durchgeführt. Da das $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ bereits sehr häufig studiert wurde [15, 75], ist bekannt, dass dieses Redoxpaar äquimolar in 0,1 M KCl gelöst einen Temperaturkoeffizienten von -1,56 mV/K [15, 76] besitzt. Abbildung 6 zeigt eine entsprechende Temperaturkalibrierung an einem dünnen Golddraht mit 25 μm Durchmesser.

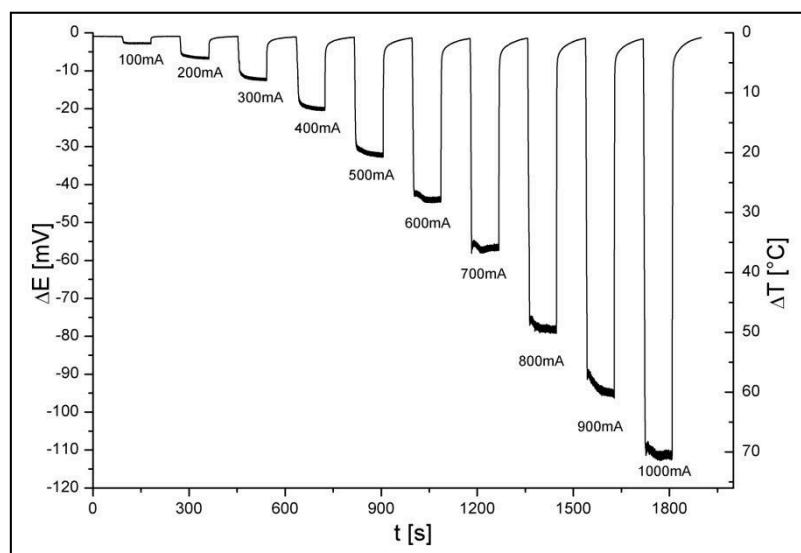


Abbildung 6: Temperaturkalibrierung eines Golddrahtes

Bei dieser Methode fließen außer dem für die Potentialeinstellung nach dem Nernst'schen Gleichgewicht auftretenden Strom keine Faraday'schen Ströme. Das sich bei einer gegebenen Temperatur einstellende charakteristische Potential beider Redoxpartner an der Arbeitselektrode wird nur gegen das Potential der Referenzelektrode gemessen. Da zwischen den beiden Redoxpartnern im Gleichgewicht eine Temperaturabhängigkeit herrscht (beschrieben durch den Temperaturkoeffizienten), kommt es bei einer Temperaturänderung an der Arbeitselektrode auch zu einer Änderung des Arbeitselektrodenpotentials. Diese Potentialverschiebung ΔE kann mittels Temperaturkoeffizienten β in eine Temperaturänderung ΔT umgerechnet und damit die Temperatur der Elektrode bestimmt werden.

Die Temperaturabhängigkeit des elektrochemischen Gleichgewichtes kann durch folgende Zusammenhänge erklärt werden.

Im Gleichgewicht gilt für das Elektrodenpotential die Gleichung:

$$\Delta_R G = zFE \quad (3.3)$$

Dabei ist E das Potential, F die Faradaykonstante, z die Ladungszahl und G die freie Reaktionsenthalpie.

Die Temperaturabhängigkeit der freien Reaktionsenthalpie ist über die freie Reaktionsentropie gegeben:

$$\frac{\partial \Delta_R G}{\partial T} = \Delta_R S \quad (3.4)$$

wobei T für die Temperatur steht.

Für den Temperaturkoeffizienten β ergibt sich bei konstantem Druck p durch Einsetzen von (3.3) in (3.4) und Umformen:

$$\beta = \left(\frac{\partial E}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta_R S}{zF} \quad (3.5)$$

Integration unter der Voraussetzung der Temperaturunabhängigkeit der freien Reaktionsentropie und Umstellen ergibt:

$$\Delta T = \frac{E_{T_1} - E_{T_2}}{\beta} \quad (3.6)$$

$$T = T_{Lösung} + \Delta T \quad (3.7)$$

Die Technik der Temperaturbestimmung mit Hilfe des Temperaturkoeffizienten des reversiblen Redoxpaars $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ist ausreichend schnell, liefert gute Ergebnisse für in Milli- [2], Mikro- [77] und Nanosekunden [78] aufgelöste Experimente und kann für nahezu alle geheizten Elektroden verwendet werden.

3.6 Anwendung gepulster Heiztechniken auf elektrochemische Messungen

Die temperaturmodulierte Voltammetrie wurde im Jahr 1983 von Miller eingeführt [79]. Mit dieser Methode wurden bereits das Verhalten reversibler Redoxsysteme [80] untersucht sowie die Aktivierungsenergie für Elektrodenprozesse bestimmt [81]. Eine Variante der temperaturmodulierten Voltammetrie, die so genannte *Temperatur-Puls-Voltammetrie* (TPV), wurde von Gründler et al. entwickelt [10, 82]. Die TPV kann als eine von Heizpulsen überlagerte Potentialtreppe angesehen werden, sodass das entstehende Voltammogramm als eine Überlagerung eines gewöhnlichen Voltammogramms mit einem temperaturabhängigen Anteil anzusehen ist. Es wird eine Potentialtreppe vorgegeben und kurz vor Ende einer Stufe ein Messwert aufgenommen, da hier der kapazitive Strom am niedrigsten ist. Zusätzlich dazu werden synchronisierte Heizpulse auf das System gegeben. Es wird kurz vor Beginn des Heizpulses, sowie kurz vor dem Ende desselben gemessen und die Differenz der beiden Werte aufgetragen. Als Resultat dieser Methode werden peakförmige Signale erhalten, die den Resultaten aus einer *Differenz-Puls-Voltammetrie* (DPV) ähneln (Abbildung 7). Mit dieser Methode können Temperaturen oberhalb des Siedepunktes der Lösung erreicht werden. Um die gewünschten Temperaturen während der kurzen Pulse (zum Beispiel 100 ms) zu erreichen, sind Heizleistungen in der Größenordnung von mehreren Ampere nötig.

In einer abgewandelten Variante der TPV, der so genannten *Temperatur-Puls-Amperometrie* (TPA), wird die gepulste Heiztechnik auf amperometrische Signale angewendet. In dieser Arbeit werden dabei peakförmige Signale des organischen Analyten Pikrinsäure erhalten und an verschiedenen Elektrodenmaterialien untersucht. Diese Methode bietet die Vorteile der TPV und kann ein eventuell driftendes Hintergrundsignal kompensieren [83].

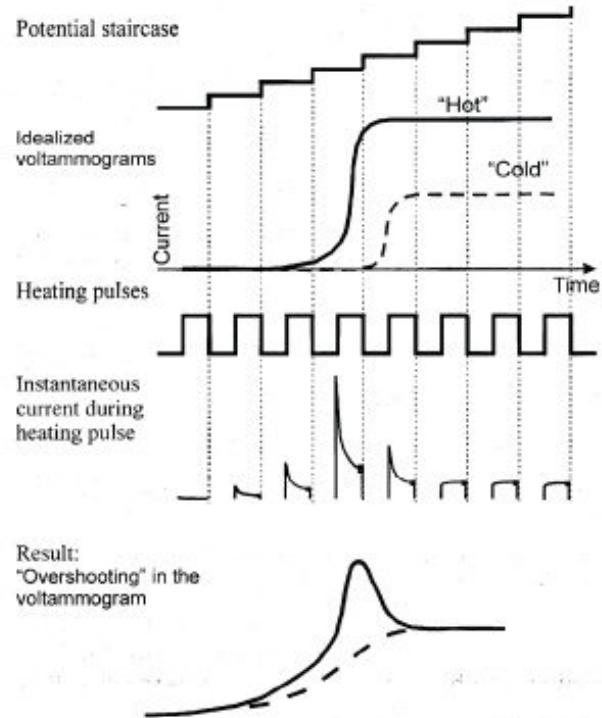


Abbildung 7: Schematische Darstellung der TPV mit Messpunkten am Ende des Heizpulses
(entnommen aus [10])

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Einfluss der Temperatur auf die Detektion organischer Moleküle (Pub. 8.2)

Wie bereits in Kapitel 3.6 beschrieben, besteht neben kontinuierlichen Heizmethoden auch die Möglichkeit, in kurzen Pulsen zu heizen. Dafür wurde ein Aufbau verwendet, der schon früher von unserer Gruppe beschrieben wurde [35, 76]. Es wurde neben der gepulsten Heiztechnik auch die kontinuierliche Heizung verwendet und diese an unterschiedlichen Materialien getestet. Alle Messungen wurden mit dünnen Drähten ($25\text{ }\mu\text{m}$ im Durchmesser), die mit Hilfe von Wechselstrom auf unterschiedliche Temperaturen geheizt wurden [9], durchgeführt. Analysiert wurde das organische Molekül Pikrinsäure, das auf Grund der explosiven Eigenschaften auch als Sprengstoff verwendet werden kann. Die Pikrinsäure besitzt drei Nitrogruppen (Abbildung 8), die elektrochemisch reduziert werden können.

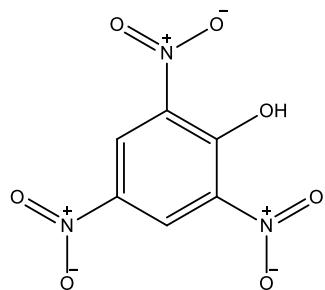


Abbildung 8: Struktur der Pikrinsäure

In früheren Untersuchungen wurde Pikrinsäure bereits an geheizten Goldelektroden untersucht [35]. Diese haben allerdings den Nachteil, dass sie nicht im stark negativen Potentialbereich eingesetzt werden können. Daher wurde mit anderen Elektrodenmaterialien versucht, diesen Potentialbereich zu erfassen. Es wurden neben der Goldelektrode eine Bismutelektrode sowie eine Gold-Bismut-Elektrode verwendet. Diese können auch bei Potentialen von $-1,4\text{ V}$ genutzt werden. Weiterhin wurden direkt heizbare Elektroden verwendet.

In der zyklischen Voltammetrie erkennt man einen deutlichen Unterschied der verschiedenen Elektrodenmaterialien (*Figure 1*). Während der Endanstieg im Acetatpuffer, das heißt, die Reduktion von Wasserstoffionen zu Wasserstoff, bei der reinen Goldelektrode bereits bei ca. $-0,8\text{ V}$ begann, trat dies bei der Bismutelektrode erst bei ca. $-1,2\text{ V}$ auf. Dadurch hat man

einen deutlich größeren Anwendungsbereich bei negativen Potentialen für die Bismutelektroden, da die Wasserstoffentwicklung der limitierende Faktor im messbaren Potentialfenster ist. Gab man zu dem Acetatpuffer Pikrinsäure (1 mM, 229 ppm), wurde der Unterschied zwischen den Elektroden noch deutlicher (*Figure 2*). Während man bei der Goldelektrode lediglich bei höheren Temperaturen ein Signal messen konnte, war selbiges für die Bismutelektrode bereits bei Raumtemperatur möglich. Hier wurde auch das erweiterte Potentialfenster dieser Elektrode deutlich, da diese erlaubte, beide detektierbaren Reduktionsstufen der Pikrinsäure (die dritte ist in diesem Potentialbereich nicht messbar) zu detektieren. Man kann sehr gut sehen, dass das zweite Reduktionssignal (bei - 1,35 V bei der Bismutelektrode) bei höheren Temperaturen nicht mehr so deutlich ausgeprägt und dadurch nicht mehr so leicht auswertbar ist. Jedoch werden beide Reduktionssignale mit steigender Temperatur größer, was auf den erhöhten Massentransport durch gesteigerte Diffusion zurückzuführen ist.

Variierte man den pH-Wert des Grundeletrolyten in den basischen Bereich, so konnte man ebenfalls deutliche Unterschiede im Verhalten der Elektrodenmaterialien erkennen (*Figure 3*). Da Bismut(III) im Basischen meist unlösliche Oxide oder Hydroxide bildet, wurde es bisher weitestgehend vermieden, unter diesen Bedingungen zu arbeiten. Setzte man der Lösung allerdings einen Komplexbildner, in diesem Fall Weinsäure bzw. im alkalischen Milieu deren Tartrate, zu, konnte auch unter diesen Bedingungen mit stabilen Bismutfilmen gearbeitet werden. In *Figure 3* ist erkennbar, dass der Potentialbereich der Goldelektrode bis auf - 1,9 V ausgeweitet wurde, dort jedoch bereits die Wasserstoffbildung einsetzte. Bismut und Gold-Bismut sind in diesem Bereich allerdings einsetzbar. In dem vergrößerten Ausschnitt (*Figure 3 B*) erkennt man an der Bismutelektrode einen sehr gut ausgeprägten Reduktionspeak der Pikrinsäure (30 ppm). Ein weiterer Reduktionspeak ist zu erkennen, es ist jedoch nicht eindeutig auswertbar, da Bismut unter diesen Bedingungen bei Potentialen oberhalb von - 0,6 V oxidiert werden würde.

Um auch Spuren von Pikrinsäure unterhalb von 30 ppm zu detektieren, wurde die Methode der Temperatur-Puls-Amperometrie gewählt. Bei dieser Methode werden auf das amperometrische Signal 100 ms Heizpulse gegeben, sodass peakförmige Signale erhalten werden. Das Arbeitspotential wurde mit - 1,6 V so gewählt, dass beide detektierbaren Reduktionspeaks erfasst werden. Auch hier erkennt man deutlich, dass sich die Elektroden unterscheiden (*Figure 4*). Während die Signale der Goldelektroden sehr klein sind und man bei der kleinsten Konzentration (1 ppm) der Pikrinsäure bereits an die Grenzen der Methode gerät, stellt die gleiche Konzentration mit der Gold-Bismut-Elektrode kein Problem dar. Dass diese Oberfläche und nicht die reine Bismutelektrode die höchsten Signale liefert, liegt vermutlich am Pro-

duktionsprozess der Gold-Bismut-Elektroden. Diese Elektroden wurden unter Argon geeglüht, nachdem ein Bismutfilm auf Golddraht elektrochemisch abgeschieden wurde. Dadurch entstand eine besonders glatte Oberfläche. Die TPA-Signale zeigten bei allen Materialien den typischen Temperatur-Zeit-Verlauf, der bei kurzen Heizpulsen bereits in früheren Publikationen gefunden wurde [82]. Die Signale dieser Messung an den verschiedenen Elektroden sind in Abbildung 9 dargestellt. Es sind dabei die Konzentrationen von 1 ppm (A), 5 ppm (B) und 10 ppm (C) an Pikrinsäure dargestellt. Es wurde in 10 mM NaOH mit 5 mM Natrium-Tartrat als Komplexbildner bei einem Potential von - 1,6 V gemessen. Die Heizpulse waren 100 ms lang, darauf folgte über 900 ms eine Abkühlung der Elektroden.

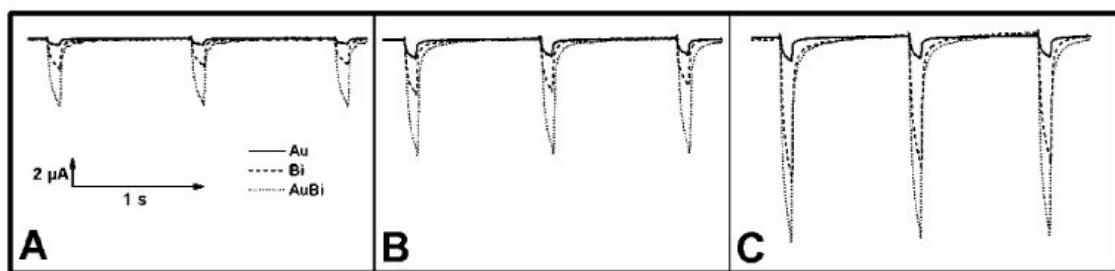


Abbildung 9: TPA-Signale an verschiedenen Elektroden mit verschiedenen Konzentrationen der Pikrinsäure

Es wurde an Golddrähten (durchgezogene Linie), an Gold-Bismutdrähten (gestrichelte Linie) und an Bismutdrähten (gepunktete Linie) mit jeweils 1 ppm Pikrinsäure (A), 5 ppm Pikrinsäure (B) und 10 ppm Pikrinsäure (C) in einer 10 mM NaOH-Lösung mit 5 mM Weinsäuregehalt gemessen. Es wurden Heizpulse von 100 ms auf die jeweiligen Elektroden gegeben.

Ein Vergleich der Konzentrationskalibrierungen macht deutlich, dass die Signale der Gold-Bismut-Elektrode bis zu siebenfach höher sind als die der Goldelektrode (*Figure 5*). Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen [35] waren bei allen Elektroden sehr gut ausgeprägte Signale zu detektieren, was auf die basischen Bedingungen zurückzuführen ist. In allen drei Fällen sind zwei lineare Abschnitte in der Kalibrierung erkennbar. Dabei ist die Empfindlichkeit im Bereich zwischen 1 ppm und 5 ppm deutlich höher als im Bereich bis 50 ppm, was auf Adsorption an den Elektroden hindeutet. Das könnte bedeuten, dass die Elektroden bei einer Konzentration von 5 ppm an Pikrinsäure mit einer Monoschicht gesättigt sind. Die Zeit zwischen den Heizpulsen ist zu kurz, um eine neue Schicht aufzubauen. Die Gründe für dieses Verhalten sind jedoch noch nicht vollständig geklärt.

4.2 Temperatureffekte auf Verdrängungsreaktionen von hybridisierten DNA-Strängen (Pub. 8.3)

Bisher wurden Hybridisierungssensoren meist folgendermaßen aufgebaut: Eine Sonde wurde auf eine Elektrode immobilisiert und ein entsprechend markiertes komplementäres Target daran gebunden. Dadurch konnte ein elektrochemisches Signal gemessen werden, welches zum Beispiel durch die *Square-Wave-Voltammetry* (SWV) ausgewertet wurde [55, 84]. Man kann diese Art von Sensoren jedoch auch derart aufbauen, dass nicht die Zunahme des Signals nach erfolgreicher Hybridisierung registriert wird, sondern die Abnahme nach einer Verdrängung des markierten Stranges durch einen nicht markierten. Dafür wurde der Sensor zunächst aus allen Bestandteilen inklusive markiertem Signalstrang aufgebaut (wie z.B. in Publikationen [55, 58, 84] beschrieben) und anschließend in Kontakt mit den zu untersuchenden nicht markierten Targets gebracht. Da diese Targets etwas stabiler an die komplementäre Sonde binden konnten, wurden die Signalstränge verdrängt (Abbildung 10) und infolgedessen kam es zu einer Signalabnahme (*Figure 2*).

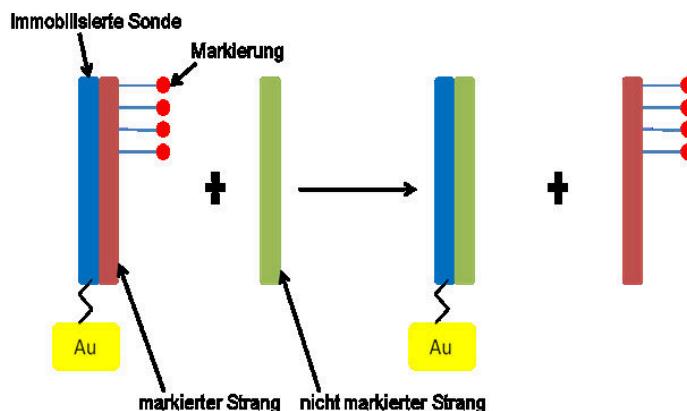


Abbildung 10: Schema einer Verdrängungsreaktion

Die Signalabnahme variierte in Abhängigkeit von der Zeit, die zwischen zwei Messungen verging, also entsprechend der Beanspruchung des Sensors. Hier wurden jeweils Messungen im Zeitraum von 90 Minuten vorgenommen und es gab deutliche Unterschiede in den Signalverlusten zwischen Messungen, die im Minutentakt stattfanden, und solchen, bei denen alle 30 Minuten Messpunkte aufgenommen wurden (*Figure 3*). Wurde zwischen den Aufnahmen der Signalhöhen ein Potential von - 0,5 V angelegt, beschleunigte das den Prozess des Signalverlustes. Das lag daran, dass der durch dieses Potential gebildete Osmium-(IV)-Komplex

nicht stabil war und auf Grund von Hydrolysereaktionen die Bindung zum Signalstrang verlor.

Einen weiteren Einfluss auf die Stärke des Signalabfalls übte die Zeit aus, in der das nicht markierte Target auf den Sensor einwirken konnte. Das Signal war nach 90 Minuten deutlich kleiner als nach 30 Minuten (*Figure 4*) und man sah, dass sich das Gleichgewicht erst nach ca. 90 Minuten neu eingestellt hat. Anhand *Figure 4* wird zudem deutlich, dass bei optimierten Bedingungen sehr gut zwischen komplementären Strängen und solchen mit Fehlpaarungen unterschieden werden konnte. Nach 90 Minuten war das Signal eines komplementären, und damit stabileren, Targets um 40 % gesunken, während das Signal des Stranges mit einer Fehlpaarung lediglich 30 % verloren hat.

Zusätzlich wurde die Temperatur optimiert, denn der Signalverlust war bei höheren Temperaturen deutlich größer als bei niedrigeren im selben Zeitraum (Abbildung 11). Während bei 5 °C so gut wie keine Verdrängung stattfand, wurden bei 35 °C bereits 50 % des Signalstranges verdrängt. Diese Beobachtung deckte sich mit früheren Studien, in denen gezeigt wurde, dass die Hybridisierung im großen Maß von der Temperatur abhängt [31, 84].

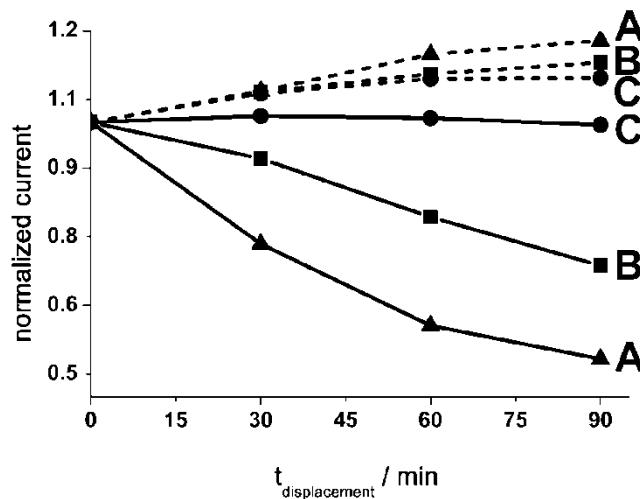


Abbildung 11: SWV-Signale der Verdrängung bei verschiedenen Temperaturen

Die gestrichelten Linien zeigen dabei die Blindwertmessungen ohne Verdrängungtarget, die durchgezogenen Linien zeigen die Verdrängungsreaktionen mit 100 nM Target und 100 nM Signaloligo. Alle Messungen wurden in TRIS-Puffer (10 mM TRIS, pH = 7,5) + 0,5 M Na₂SO₄ bei folgenden Temperaturen durchgeführt: A: 35 °C; B: 20 °C; C: 5 °C

Auch die Konzentration des Targets hatte großen Einfluss auf die Verdrängungsreaktion (*Figure 6*). Bei größeren Konzentrationen lief die Verdrängungsreaktion deutlich schneller ab und das Signal fiel um bis zu 40 % des Ausgangswertes, während bei kleineren Konzentrationen lediglich ein Signalverlust von 10 % im selben Zeitraum detektiert wurde. Bei größeren Konzentrationen sind mehr Targetmoleküle vorhanden, sodass diese die Elektrode leichter erreichen und den Signalstrang daher schneller verdrängen können.

4.3 Hybridisierungsreaktionen von Nukleinsäuren bei verschiedenen Temperaturen (Pub. 8.4)

Bei allen Reaktionen ist eine gute Durchmischung der Reaktionslösung sehr wichtig. Dies trifft auch auf Hybridisierungsreaktionen zu, da die zu detektierenden Stränge zunächst zum Detektor, in unserem Fall der Elektrode, gelangen müssen. Man kann dafür die komplette Lösung mit allen darin befindlichen Analyten rühren. Als Alternative dazu hat sich das Durchmischen mittels thermischer Konvektion, die zum während des Heizens von Elektroden auftritt, angeboten. Diese Konvektion wird durch den sogenannten Mikro-Rühreffekt erreicht, der für eine starke konvektive Strömung in unmittelbarer Nähe zur Elektrode sorgt und dadurch einen erhöhten Massentransport zur Elektrode gewährleistet und dadurch für eine sehr gute Durchmischung der Lösung sorgt [85]. In *Figure 1* kann man den Unterschied der Signalhöhen und damit der Durchmischung zwischen einer gerührten Lösung und einer geheizten Elektrode sehen. In *Figure 1 A* wurde eine geheizte Lösung verwendet, in *Figure 1 B* eine geheizte Elektrode. Es sind jeweils die Unterschiede zwischen gerührter (Quadrate) und nicht gerührter Lösung (Kreise) während der Hybridisierung dargestellt. Für die Markierung der DNA-Stränge wurde der Komplex $[OsO_4(\text{bipy})]$ genutzt. Man kann deutlich erkennen, dass in der geheizten Lösung das Rühren während der Hybridisierung besonders bei höheren Temperaturen einen sehr großen Effekt hat. Die Signale sind bis zu vier Mal höher, wenn während der Hybridisierung gerührt wird. Dieser Effekt wird allerdings minimiert, wenn man die geheizte Elektrode nutzt (*Figure 1 B*). Dort wird durch den Mikro-Rühreffekt der geheizten Elektrode die Lösung so gut durchmischt, dass weiteres Rühren keinen großen Einfluss hat. Mittels des Temperaturunterschiedes ist es also möglich, die Lösung zu durchmischen. Dies deckt sich mit früheren Ergebnissen aus unserer Arbeitsgruppe [84].

Temperaturunterschiede können auch für die Detektion von Fehlpaarungen eingesetzt werden. In Abbildung 12 ist der Unterschied eines komplementären Targets zu einem Target, das Fehlpaarungen enthält, zu erkennen. Das komplementäre Target liefert auf Grund der höheren Stabilität des Doppelstranges Target-Sonde und durch den höheren Schmelzpunkt dieses Doppelstranges deutlich höhere Signale als das nicht vollständig komplementäre. Hier sind die Signale an der geheizten Elektrode ca. ein Drittel kleiner als beim komplementären. Durch Temperaturerhöhung ist es also möglich, komplementäre Stränge von nicht komplementären zu unterscheiden.

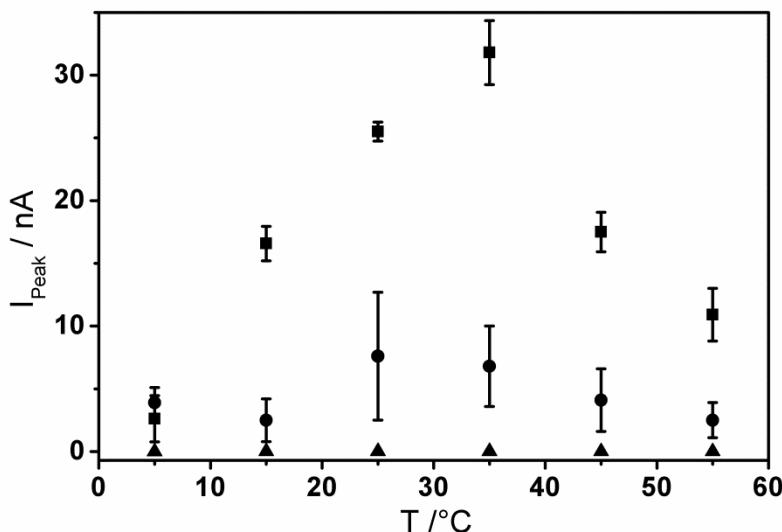


Abbildung 12: Vergleich der SWV-Signale verschiedener Targets

Es wurden die Signalhöhen der Hybridisierungsreaktionen von jeweils 100 nM DNA-Target (Quadrat: komplementäres Target; Kreis: Target mit einer Fehlpaarung; Dreieck: nicht-komplementäres Target) an einer geheizten Elektrode verglichen. Gemessen wurde hier in 10 mM TRIS-Puffer ($\text{pH} = 7,5$) + 0,5 M Na_2SO_4 mit einem step potential von 1,95 mV und einer Amplitude von 40 mV. Die Frequenz betrug 55 Hz und die scanrate lag bei 107 mV/s.

Mit dem Komplex $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ kann man nicht nur das Thymin und das Cytosin in DNA-Strängen markieren, sondern auch das Uracil in RNA-Strängen. Diese Reaktion verläuft zwar deutlich langsamer als die Reaktionen in der DNA, aber sie ist dennoch für die elektrochemische Detektion einsetzbar. Um zu untersuchen, ob sich die markierten RNA-Stränge auch für die Hybridisierung eignen, wurde in einem Vorversuch getestet, ob ein DNA-Strang, der am 5'-Ende fünf markierte Uracilbasen enthielt, den Doppelstrang mit einer DNA-Sonde bilden konnte. In *Figure 3 B* sind die Hybridisierungsergebnisse eines nicht komplementären Stranges mit markierten Uracilbasen dargestellt. Im Vergleich der geheizten Lösung (Quadrat) und der geheizten Elektrode (Kreise) erkennt man wieder deutlich, dass die Signale an der geheizten Elektrode höher sind als die bei der geheizten Lösung. Die gemessenen Signale waren zwar deutlich kleiner als die von reinen, markierten DNA-Strängen, allerdings zeigten die entstandenen Signale, dass eine Hybridisierung auch mit markierten Uracilbasen möglich war.

Des Weiteren wurde getestet, ob ein RNA-Strang ebenfalls an eine DNA-Sonde hybridisieren kann. In *Figure 4* ist die Hybridisierung eines markierten RNA-Stranges an geheizter Elektrode (Kreise) und in geheizter Lösung (Quadrat) zu sehen. Die resultierenden Signale zeigen, dass eine Hybridisierung mit einem RNA-Strang durchgeführt werden kann. Es war allerdings

noch nicht möglich, den komplementären Strang (*Figure 4 A*) von einem nicht komplementären (*Figure 4 B*) zu unterscheiden, da die Signale einerseits zu niedrig waren und sich andererseits nicht deutlich genug unterschieden. Mit optimierten Parametern, wie Markierungs-temperatur, Hybridisierungszeit oder Lösungsmittel bzw. Salzgehalt, sollte eine Differenzierung möglich werden.

Die deutlichen Unterschiede der Signalhöhen sind auch in *Figure 5* gut zu sehen. In dieser Abbildung sind die basislinienkorrigierten Square-Wave-Voltammogramme der Hybridisierungsreaktionen dargestellt. In *Figure 5 A* ist der Vergleich der Signale eines komplementären DNA-Stranges (durchgezogene Linie) mit denen eines Stranges mit einer Fehlpaarung (gestrichelte Linie) und eines nichtkomplementären (gepunktete Linie) zu sehen, in *Figure 5 B* der entsprechende Vergleich eines DNA-Stranges mit markierten Uracilbasen sowie in *Figure 5 C* das entsprechende RNA-Target. Man kann deutlich erkennen, dass die Peaks der Targets mit Fehlpaarungen kleiner sind als die der komplementären Targets. Besonders deutlich wird das bei der DNA. Auch bei den uracilmarkierten Targets ist dieser Unterschied deutlich, allerdings ist das Signal des komplementären Targets erheblich kleiner. Betrachtet man die markierte RNA (*Figure 5 C*), so sieht man deutlich, dass die Hybridisierung funktionierte. Da allerdings die Signale der komplementären RNA-Targets annähernd genauso hoch waren wie die der Targets mit einer Fehlpaarung, war keine Unterscheidung möglich. Hier kann es hilfreich sein, bei höheren Temperaturen zu messen, um gegebenenfalls auftretende Sekundärstrukturen der RNA aufzubrechen und dadurch einen Selbstschutz des RNA-Stranges zu verhindern. Das gemessene Potential der entstandenen Peaks resultierte aus dem Redoxpaar Os(IV)/Os(VI), das durch die kovalente Bindung des Osmiuntetroxidbipyridins an die Pyrimidinbasen Thymin, Cytosin und Uracil entstand [55].

4.4 Aufbau der heizbaren Elektroden und Anwendung der Elektroden in Arrays (Pub. 8.5)

Patentanmeldung DE 10 2011 109 402.8

Alle Messungen mit geheizten Elektroden wurden mit selbstgebauten Drahtelektroden durchgeführt. Diese besitzen zwei Anschlüsse für den Heizstromkreis, sowie einen daran angelöten Draht als Arbeitselektrode (Abbildung 13). Die Anschlüsse des Heizstromkreises sind durch ein Gemisch aus Parafin/Polyethylen oder andere Materialien gegen die zu untersuchende Lösung isoliert.

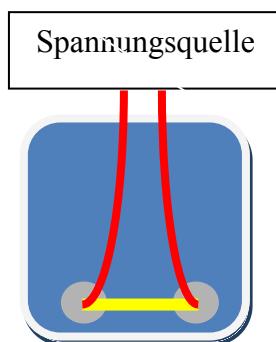


Abbildung 13: Schematische Darstellung einer heizbaren Elektrode

Um mit diesen Aufbau der Elektrode DNA-Targets zu detektieren, muss die Oberfläche der Elektrode mit der Sonde vorbehandelt werden. Damit ein ausreichend großes Volumen der Sondenlösung auf die Elektrode gebracht werden kann, ist es notwendig, unterhalb des Drahtes einen Steg anzubringen, auf den man einen Tropfen der Lösung geben kann. Dieser Steg kann auch eine Vertiefung sein, in die der Tropfen eingebracht wird (Abbildung 14).

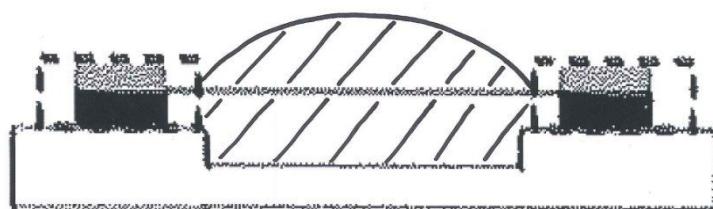


Abbildung 14: Schematische Darstellung eines benetzten Drahtes

Diese Vertiefung ist so zu konstruieren, dass sie ausreichend groß ist, um genügend Flüssigkeit aufzunehmen. Dabei muss der Tropfen die Elektrode (den Draht) aber ausreichend benetzen. Mit diesem Aufbau ist auch möglich, ein Sensorarray zu entwickeln. Dafür werden mehrere heizbare Elektroden nebeneinander oder eng hintereinander angeordnet und verbunden. Dieser Aufbau erlaubt es, verschiedene Sonden gleichzeitig bei verschiedenen Temperaturen zu messen (*Figure 3*). Die Elektroden dieses Arrays können aus gleichen Materialien bestehen, um dadurch zum Beispiel verschiedene DNA-Sequenzen gleichzeitig nachzuweisen, oder aus verschiedenen Materialien bestehen, um zum Beispiel zu testen, wie sich ein bestimmter Analyt am besten nachweisen lässt.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neuartige, heizbare Bismutelektroden entwickelt, die auch im negativen Potentialbereich eingesetzt werden können. Bei negativen Potentialen sind Goldelektroden nicht mehr einsatzfähig, da dort die Wasserstoffbildung einsetzt. Es ist gelungen, direktheizbare Bismutdrähte herzustellen und mit diesen das organische Molekül Pikrinsäure bei Potentialen von -1,6 V zu detektieren. Durch den Einsatz des Natrium-Tartrates als Komplexbildner war das Arbeiten in diesem Bereich möglich, ohne dass sich Bismutoxide bildeten. Auch die Temperatur wurde während der Detektion variiert. Es wurde dabei zwischen kontinuierlichen und gepulsten Heizmethoden unterschieden und die von unserer Arbeitsgruppe erstmals angewandte Methode der TPA wurde weiter etabliert. Durch die gepulste Technik kann die Lösung kurzzeitig über den Siedepunkt erhitzt werden. Da Temperaturerhöhung meistens zu Signalvergrößerung führte, war es mit dieser Methode möglich, auch kleine Konzentrationen von Analyten zu detektieren. Dadurch konnten für die Pikrinsäuredetektion Konzentrationsbereiche von wenigen ppm erreicht werden. Es war allerdings nicht möglich, die Bismutelektroden für die DNA-Detektion einzusetzen.

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte auch der Effekt der erhöhten Temperatur auf DNA-Verdrängungsreaktionen gezeigt werden. Die Verdrängung eines an einer Sonde gebundenen DNA-Stranges lief bei höheren Temperaturen deutlich schneller ab als bei niedrigeren. Bei erhöhten Temperaturen fiel das Signal deutlich stärker und es war bereits nach kurzer Zeit kaum noch markierter Strang feststellbar. Durch die erhöhten Temperaturen konnten auch niedrigere Konzentrationen an markierter Target-DNA detektiert werden. Weiterhin war es möglich, zwischen einem komplementären und einem Target mit einer Fehlpaarung zu unterscheiden. Das komplementäre Target hatte einen höheren Schmelzpunkt als das Target mit einer Fehlpaarung und lieferte bei höheren Temperaturen größere Signale. Die Methode der Verdrängung in Kombination mit erhöhten Temperaturen eignet sich daher sehr gut für medizinische Anwendungen, in denen zum Beispiel Krankheitserreger schnell und zuverlässig detektiert werden sollen.

Es wurde in dieser Arbeit des Weiteren gezeigt, dass die Hybridisierung nicht nur mit DNA sondern auch mit RNA funktioniert. Es wurde in einem Zwischenschritt getestet, wie gut ein DNA-Target an eine DNA-Sonde bindet, in dem anstelle von endständigen Thymin-Uracilbasen markiert wurden. Anschließend wurde ein reines RNA-Target markiert und an eine DNA-Sonde gebunden. Die markierte RNA lieferte zwar im Vergleich zur DNA kleinere Signale,

aber es konnte nachgewiesen werden, dass ein mit einem Osmiumkomplex markierter RNA-Strang an eine DNA-Sonde bindet und sich somit detektieren lies. Durch weitere Optimierung der Parameter, wie zum Beispiel Hybridisierungstemperatur, Lösungsmittel und Ionenstärke, ist anzunehmen, dass zum einen bessere und größere Signale durch die Hybridisierung erhalten werden und zum anderen RNA mit Fehlpaarungen von komplementären Strängen unterscheidbar sein werden.

Die Versuche zeigten außerdem, dass die Signale an den geheizten Drähten in den meisten Fällen höher lagen als die vergleichbaren Signale, die mit der gesamten geheizten Lösung erhalten wurden. Das zeigt, dass die geheizten Elektroden sehr gut einsetzbar sind und großes Potential haben, sich als zu verwendende Arbeitselektroden durchzusetzen.

6 Ausblick

Die Temperatur ist in der Analytik und auch in der Elektrochemie ein sehr wichtiger Faktor. Durch die Erhöhung der Temperatur können organische Moleküle im Spurenbereich detektiert, die Hybridisierung der Nukleinsäuren verfolgt und beschleunigt, die Markierung der Nukleinsäuren verbessert und Stränge mit Fehlpaarungen von vollkomplementären Strängen unterschieden werden. Ein nächster Schritt wäre die Verwendung von weiteren Elektrodenmaterialien, wie zum Beispiel Kohle oder Platin. An anderen Elektrodenoberflächen könnte die Detektion von Biomolekülen weiter verbessert werden. Weiterhin kann man auch den Osmiumkomplex verändern und an das Osmiumtetroxid andere Liganden binden, die alle im Strang vorkommenden Pyrimidinbasen markieren, ohne dass die Stabilität beeinflusst wird. Des Weiteren ist zu prüfen, ob die hier angewandte Pulstechnik auch für die Detektion von Nukleinsäuren geeignet ist, und inwieweit das zu einer Verkleinerung der Nachweisgrenzen führt. Ein sehr wichtiger Aspekt ist die Übertragung der Ergebnisse mit künstlichen Oligonukleotiden auf reale Proben. Hier kann zum Beispiel eine Verdrängungsreaktion angewendet werden, um bestimmte Krankheiten zu detektieren oder um transgene (gentechnisch veränderte) von den isogenen Pflanzen zu unterscheiden.

Darüber hinaus ist der Gebrauch von Sensorarrays denkbar. Man kann zum Beispiel mehrere heizbare Elektroden auf einem Chip zusammenfügen und damit entweder verschiedene DNA-Stränge (zum Beispiel von verschiedenen Krankheitserregern) gleichzeitig detektieren oder durch die Temperaturkontrolle PCR-Chips entwickeln. Dann bräuchte man keinen Thermocycler für die Vervielfältigung der DNA mehr, sondern könnte diese auf einem miniaturisierten Elektrodenarray durchführen. Die gebildete DNA könnte im nächsten Schritt auf dem Chip direkt detektiert werden.

Außerdem muss die Hybridisierung der RNA optimiert werden, um eine Unterscheidung komplementärer von nichtkomplementärer RNA vorzunehmen. Man kann ebenfalls untersuchen, ob die Hybridisierung bessere Signale liefert, wenn die Anzahl der Basen im zu detektierenden Strang erhöht wird oder ob die Vergrößerung der Oberfläche der Drahtelektroden mit Nanostrukturen zur Erhöhung der Signale beiträgt.

Weiterhin muss die Stabilität der RNA untersucht werden. Ohne Modifizierung ist die RNA durch überall vorkommende RNase sehr instabil, da dieses Enzym die RNA sehr schnell in einzelne Nukleotide zerlegt. Wird die RNA zum Beispiel durch einen Osmiumkomplex bei erhöhten Temperaturen vollständig markiert, kann der Angriff der RNase reduziert werden.

Dies muss mit verschiedenen Liganden am Osmiumtetroxid untersucht und optimiert werden. Außerdem kann man untersuchen, ob sich die RNase selbst mit einem Osmiumtetroxidkomplex markieren lässt. Sollte das der Fall sein, könnte die Aktivität der RNase gehemmt werden. Auch hier müssen die Markierungsparameter optimiert werden. Sollte die RNase gehemmt oder sogar inaktiviert werden, wäre das eine deutliche Arbeitserleichterung in Bezug auf die Forschung und das Arbeiten mit RNA.

Auch der Aufbau des Messsystems kann weiter vereinfacht werden. So kann der Heizstrom- und Messstromkreis in einem Gerät untergebracht werden, um die Störungen aus der Umwelt zu minimieren und das System einfacher in der Handhabung zu gestalten.

7 Literatur

- [1] G. U. Flechsig and A. Walter, *Electroanalysis* **2011**, *24*, 23.
- [2] Y. Harima and S. Aoyagi, *J. Electroanal. Chem.* **1976**, *69*, 419.
- [3] M. A. Ghanem, R. G. Compton, B. A. Coles, E. Psillakis, M. A. Kulandainathan, and F. Marken, *Electrochim. Acta* **2007**, *53*, 1092.
- [4] A. S. Baranski, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1294.
- [5] P. H. Chen and R. L. McCreery, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3958.
- [6] L. Ducret and C. Cornet, *J. Electroanal. Chem.* **1966**, *11*, 317.
- [7] C. Gabrielli, M. Keddam, and J. F. Lizée, *J. Electroanal. Chem.* **1983**, *148*, 293.
- [8] C. Gabrielli, M. Keddam, and J. F. Lizée, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *359*, 1.
- [9] P. Grundler, T. Zerihun, A. Kirbs, and H. Grabow, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *305*, 232.
- [10] T. Voss, P. Grundler, A. Kirbs, and G. U. Flechsig, *Electrochem. Commun.* **1999**, *1*, 383.
- [11] F. Wachholz, *Geheizte elektrochemische Sensoren mit neuartigen Arbeitselektroden und Heizgeneratoren (Dissertation)*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*. 2009, Universität Rostock: Rostock.
- [12] R. T. Zhong, X. Y. Pan, L. Jiang, Z. P. Dai, J. H. Qin, and B. C. Lin, *Electrophoresis* **2009**, *30*, 1297.
- [13] G. U. Flechsig, O. Korbut, S. B. Hocevar, S. Thongngamdee, B. Ogorevc, P. Grundler, and J. Wang, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 192.
- [14] J. Wang, P. Grundler, G.-U. Flechsig, M. Jasinski, G. Rivas, E. Sahlin, and J. L. L. Paz, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3752.
- [15] T. Zerihun and P. Grundler, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *415*, 85.
- [16] T. Zerihun and P. Grundler, *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *441*, 57.
- [17] C. Lau, G. U. Flechsig, P. Grundler, and J. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *554*, 74.
- [18] O. Korbut, M. Buckova, P. Tarapcik, J. Labuda, and P. Grundler, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *506*, 143.
- [19] J. D. Watson and F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737.
- [20] J. C. Alwine, D. J. Kemp, and G. R. Stark, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 5350.
- [21] Y. Xiao, K. J. I. Plakos, X. H. Lou, R. J. White, J. R. Qian, K. W. Plaxco, and H. T. Soh, *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2009**, *48*, 4354.
- [22] J. Wang, G. Rivas, J. R. Fernandes, J. L. L. Paz, M. Jiang, and R. Waymire, *Anal. Chim. Acta* **1998**, *375*, 197.
- [23] J. Wang and A. N. Kawde, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *431*, 219.
- [24] J. Wang, A. N. Kawde, A. Erdem, and M. Salazar, *Analyst* **2001**, *126*, 2020.
- [25] S. Takenaka, Y. Uto, H. Kondo, T. Ihara, and M. Takagi, *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 436.
- [26] G. U. Flechsig, J. Peter, K. Voss, and P. Grundler, *Electrochem. Commun.* **2005**, *7*, 1059.
- [27] X. Y. Sun, P. G. He, S. H. Liu, J. N. Ye, and Y. Z. Fang, *Talanta* **1998**, *47*, 487.
- [28] S. O. Kelley, E. M. Boon, J. K. Barton, N. M. Jackson, and M. G. Hill, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 4830.
- [29] E. Palecek, *Naturwissenschaften* **1958**, *45*, 186.
- [30] E. Palecek, *Nature* **1960**, *188*, 656.

- [31] G.-U. Flechsig, J. Peter, G. Hartwich, J. Wang, and P. Grundler, *Langmuir* **2005**, *21*, 7848.
- [32] J. Wang, G.-U. Flechsig, A. Erdem, O. Korbut, and P. Grundler, *Electroanalysis* **2004**, *16*, 928.
- [33] E. M. Boon, D. M. Ceres, T. G. Drummond, M. G. Hill, and J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1096.
- [34] E. M. Boon and J. K. Barton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 320.
- [35] F. Wachholz, K. Biala, M. Piekarz, and G.-U. Flechsig, *Electrochim. Commun.* **2007**, *9*, 2346.
- [36] H. Sopha, F. Wachhoz, and G.-U. Flechsig, *Electrochim. Commun.* **2008**, *10*, 1614.
- [37] H. Duwensee, *Towards Electrochemical PCR-Chips - Contributions to Couple Enzymatic Amplification and Electrochemical Detection of DNA*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*. 2009, Universität Rostock: Rostock. p. 33.
- [38] P. Christen and R. Jaussi, *Biochemie - Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten*. 2995, Berlin, Heidelberg: Springer. 105.
- [39] V. G. Metelev, G. V. Zayakina, I. L. Ryabushenko, N. F. Krynetskaya, E. A. Romanova, T. S. Oretskaya, and Z. A. Shabarova, *FEBS Lett.* **1988**, *226*, 232.
- [40] G. Löffler, *Biochemie & Pathobiochemie*. 7 ed, ed. P. E. Petrides. 1998, Berlin, Heidelberg, New York: Springer. 147.
- [41] P. Gründler, *Chemische Sensoren - Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Ingenieure*. 2004, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag. 6.
- [42] K. M. Millan and S. R. Mikkelsen, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2317.
- [43] A. Dupont-Filliard, A. Roget, T. Livache, and M. Billon, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *449*, 45.
- [44] K. A. Peterlinz, R. M. Georgiadis, T. M. Herne, and M. J. Tarlov, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3401.
- [45] A. Laforgue, T. Addou, and D. Belanger, *Langmuir* **2005**, *21*, 6855.
- [46] J. Mineno, Y. Ishino, T. Ohminami, and I. Kato, *DNA Seq.* **1993**, *4*, 135.
- [47] E. Palecek, E. Lukasova, F. Jelen, and M. Vojtiskova, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1981**, *8*, 497.
- [48] E. Palecek and M. A. Hung, *Anal. Biochem.* **1983**, *132*, 236.
- [49] R. G. Sosnowski, E. Tu, W. F. Butler, J. P. OConnell, and M. J. Heller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 1119.
- [50] E. Lukasova, F. Jelen, and E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.* **1982**, *1*, 53.
- [51] M. Beer, S. Stern, D. Carmalt, and Mohlhenr.Kh, *Biochemistry* **1966**, *5*, 2283.
- [52] F. B. Daniel and E. J. Behrman, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 7352.
- [53] T. Reske, A. E. Surkus, H. Duwensee, and G.-U. Flechsig, *Microchim. Acta* **2009**, *166*, 197.
- [54] E. Lukasova, M. Vojtiskova, F. Jelen, T. Sticzay, and E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.* **1984**, *3*, 175.
- [55] G.-U. Flechsig and T. Reske, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2125.
- [56] P. D. Tam, M. A. Tuan, N. Van Hieu, and N. D. Chien, *Physica E* **2009**, *41*, 1567.
- [57] M. Mix, T. Reske, H. Duwensee, and G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 826.
- [58] T. Reske, M. Mix, H. Bahl, and G.-U. Flechsig, *Talanta* **2007**, *74*, 393.
- [59] P. Liepold, T. Kratzmueller, N. Persike, M. Bandilla, M. Hinz, H. Wieder, H. Hillebrandt, E. Ferrer, and G. Hartwich, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1759.
- [60] A. E. Surkus and G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1119.
- [61] C. Schildkraut and S. Lifson, *Biopolymers* **1965**, *3*, 195.
- [62] E. Palecek, *J. Mol. Biol.* **1965**, *11*, 839.
- [63] E. Palecek, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1965**, *94*, 293.
- [64] E. Palecek, *J. Mol. Biol.* **1966**, *20*, 263.

- [65] M. Ageno, E. Dore, and C. Frontali, *Biophys. J.* **1969**, *9*, 1281.
- [66] J. Sambrook and D. W. Russel, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 3 ed. Vol. 2. 2001, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 10.9.
- [67] E. Palecek, *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *125*, 142.
- [68] R. Meunier-Prest, S. Raveau, E. Finot, G. Legay, M. Cherkaoui-Malki, and N. Latruffe, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 8.
- [69] E. Zabost, A. M. Nowicka, M. Donten, and Z. Stojek, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 8933.
- [70] H. Nasef, V. Beni, and C. K. O'Sullivan, *Electrochem. Commun.*, **12**, 1030.
- [71] H. Nasef, V. Beni, and C. K. O'Sullivan, *Anal. Methods*, **2**, 1461.
- [72] X. Luo and I. M. Hsing, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1557.
- [73] N. Mahnke, A. Markovic, H. Duwensee, F. Wachholz, G. U. Flechsig, and U. van Rienen, *Sens. Actuator B-Chem.* **2009**, *137*, 363.
- [74] A. Schneider, G. U. Flechsig, and P. Grundler, *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 3768.
- [75] P. Grundler and G. U. Flechsig, *Microchim. Acta* **2006**, *154*, 175.
- [76] F. Wachholz, J. Gimsa, H. Duwensee, H. Grabow, P. Gründler, and G. U. Flechsig, *Electroanalysis* **2007**, *19*, 535.
- [77] J. F. Smalley, C. V. Krishnan, M. Goldman, S. W. Feldberg, and I. Ruzic, *J. Electroanal. Chem.* **1988**, *248*, 255.
- [78] J. F. Smalley, L. Geng, S. W. Feldberg, L. C. Rogers, and J. Leddy, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *356*, 181.
- [79] B. Miller, *J. Electrochem. Soc.* **1983**, *130*, 1639.
- [80] J. L. Valdes and B. Miller, *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 7275.
- [81] Z. A. Rotenberg, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *345*, 469.
- [82] P. Grundler, A. Kirbs, and T. Zerihun, *Analyst* **1996**, *121*, 1805.
- [83] J. Wang, M. Jasinski, G. U. Flechsig, P. Grundler, and B. M. Tian, *Talanta* **2000**, *50*, 1205.
- [84] J. Peter, T. Reske, and G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1356.
- [85] A. Beckmann, B. A. Coles, R. G. Compton, P. Grundler, F. Marken and A. Neudeck, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 764

8 Publikationen

8.1 Temperature control in electrochemical DNA sensing

Current Physical Chemistry 1, 2011, 292 – 298

Martin Jacobsen, Gerd-Uwe Flechsig

<http://dx.doi.org/10.1039/B819283A>

Temperature Control in Electrochemical DNA Sensing

Martin Jacobsen^a and Gerd-Uwe Flehsig^{a,b,*}

^aUniversity of Rostock, Department of Chemistry, Dr.-Lorenz-Weg 1, 18059 Rostock, Germany; ^bGensoric GmbH, Schillingallee 68, 18057 Rostock, Germany

Abstract: This paper reviews reports that have considered temperature as an important parameter in electrochemical DNA detection. Only a couple of years after the electrochemical activity of DNA had been discovered in 1958, oscillopolarography in a thermostated cell was applied to study thermal behavior of DNA double strands. DNA premelting was discovered and denaturation curve analysis established. Later it was found that heated electrodes allow simple and easy control over temperature during accumulation, hybridization, dehybridization, and detection. Electrochemical melting curve analysis has been reported recently as an alternative to the classic UV-spectrophotometric counterpart. Most recent developments include electrochemical real time PCR.

Keyword: DNA, electrochemical sensor, temperature.

1. INTRODUCTION

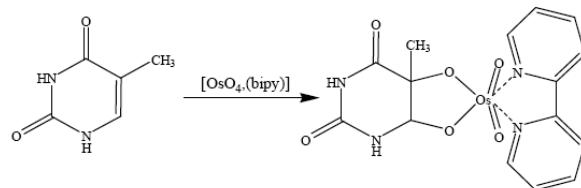
During the last decades electrochemical DNA detection has gained more and more attention and is now a good alternative to established optical methods. This can be attributed to much simpler equipment and analytical protocols coupled with lower costs as well as easier handling. Today's optical approaches for sequence-specific DNA analysis include Southern blotting, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), and Sanger sequencing in which labeling and detection are performed by using fluorescent dyes. Gene expression in cells is often screened using optical microarrays with fluorescent markers. In many steps of these classic protocols, temperature plays a critical role and is carefully controlled.

Emil Palecek was the first researcher who published on the possibility of electrochemical DNA detection in 1958 [1] and 1960 [2]. He also introduced the covalent label osmium tetroxidebipyridine [$\text{OsO}_4(\text{bipy})$] as a powerful tool to analyze the DNA structure (Scheme 1).

Sequence-selective electrochemical detection of DNA was first reported by Mikkelsen *et al.* [3]. They used the cobalt trisphenanthroline complex $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ as an electroactive intercalator to detect hybridization on glassy carbon electrodes between adsorptively immobilized DNA probes and target strands.

In the following years, many authors reported on various immobilization methods on gold electrodes. Tarlov *et al.* used radioactive labeling and surface plasmon resonance to detect the hybridization between an immobilized capture probe and a target strand on gold electrodes [4]. They used thiol linkers for the immobilization of the capture probes. It was even possible to detect base pair mismatches [5-7]. Laforgue *et al.* studied covalently attachment to gold [8]. They used an aniline derivative to form an aryl diazonium ion

by a diazotization reaction, which can be electrochemically reduced to an aryl radical. This immobilization is more robust against elevated temperatures [9] and reductive or oxidative attacks [10]. Sequence specific detection has become very sensitive with detection limits down to the femtomolar level when using enzymatically amplified detection schemes [11].



Scheme 1. Labeling reaction of thymine with osmium tetroxide-bipyridine.

Over the last years several reviews have been published considering electrochemical detection of nucleic acids [12-18].

Most of these previous electrochemical studies were conducted at one constant temperature, usually room temperature. However, in the detection of DNA, temperature plays an important role. During the reproduction of DNA strands by polymerase chain reaction (PCR), both melting and annealing of the primers are precisely controlled by temperature. At elevated temperatures most reactions accelerate and the hybridization reaction is easier because the mass transport (due to diffusion and convection) is faster. Furthermore, any unspecific adsorption will be minimized and the specific binding accelerates. It is well known that adsorption in general decreases with rising temperature. On the other hand, thermal stringent conditions are achieved in most DNA hybridization assays by applying a proper temperature.

The frequently published review articles on electrochemical DNA sensors usually care about new labeling

*Address correspondence to this author at the University of Rostock, Department of Chemistry, Dr.-Lorenz-Weg 1, 18059 Rostock, Germany; Tel: +49-381-4986470; Fax: +49-381-4986461; E-mail: gerd-uwe.flehsig@uni-rostock.de

schemes, label-free approaches, nanoparticles or application to real samples. Temperature has not yet been a frequent matter of concern. In most electrochemical studies, the authors still choose conditions (ionic strength, strand length, guanine-cytosine content), so that hybridization and detection will work fine at room temperature.

In this selective review, we will therefore focus on different temperature effects in electrochemical DNA detection that go beyond mere thermal regeneration of recognition layers, denaturation as a means for preparation of ssDNA, or common thermal cycling in PCR amplification. Instead, we will consider studies where temperature plays a major or central role such as experiments with in-situ thermal control during hybridization or electrochemical measurements. This will also include novel electrochemical real time PCR.

2. GENERAL TEMPERATURE EFFECTS UPON DNA DETECTION AT ELECTRODE SURFACES

The earliest reports on temperature effects during polarographic detection of DNA were published by E. Palecek in the 1960s [19-23]. Here, he applied oscillographic-polarography at elevated temperatures to record “denaturation curves” which can be understood as electrochemical melting curves of DNA denaturation taking place in the heated bulk solution (Fig. 1). A major finding of these studies was so-called “DNA premelting” behavior of DNA double strands,

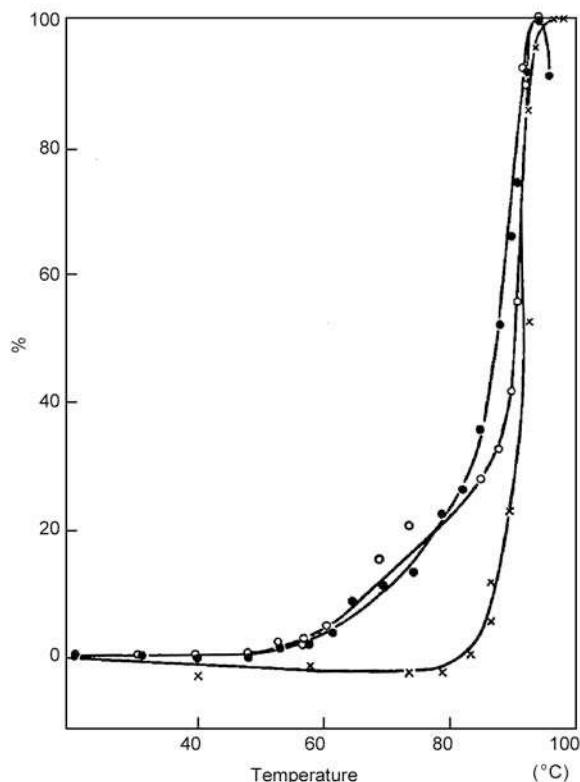


Fig. (1). Oscillopolarographic (bullets) and spectrophotometric (crosses) denaturation curves of *E. coli* DNA recorded by means of a jacket-heated polarographic cell. With permission from [21].

i.e. partial opening in the middle of the double strands at temperatures below the actual DNA melting. Such DNA premelting was found to be sequence-selective in contrast to the complete DNA melting, which depends merely upon guanine/cytosine content, length and ionic strength of the solution [24]. Later it was found by means of adsorptive transfer stripping voltammetry that it is the elevated temperature during the adsorption step, which is critical for detection of DNA premelting [25]. It might thus be the strong adsorption at the mercury surface that conserves the premelted state of the double strands.

Detecting the denaturation of DNA double-strands can be a label-free method. Schildkraut *et al.* used the UV-absorbance in 1965 for detecting the melting-temperature of DNA-double strands [26]. They reported that the melting temperatures depend upon the salt concentration. At higher salt-concentrations they found an increase in melting temperature.

Wang *et al.* demonstrated how to enhance the detection of traces of nucleic acids such as ssDNA, dsDNA, and even tRNA by means of a heated carbon paste electrode. Stripping signals could be enhanced 34-fold for dsDNA, 20-fold for ssDNA and 13-fold for tRNA, if the electrode temperature was increased to 43 °C during adsorptive accumulation [27] (Fig. 2). Wang *et al.* [28] applied this principle of increased guanine oxidation signals at higher temperatures for the detection of hybridization performed in before on magnetic beads. The chronopotentiometric stripping signals at 45 °C were five times higher compared to 5 °C. They could also discriminate full complementary and non-complementary strands with this method, because of the reduction of unspecific adsorption at higher temperatures.

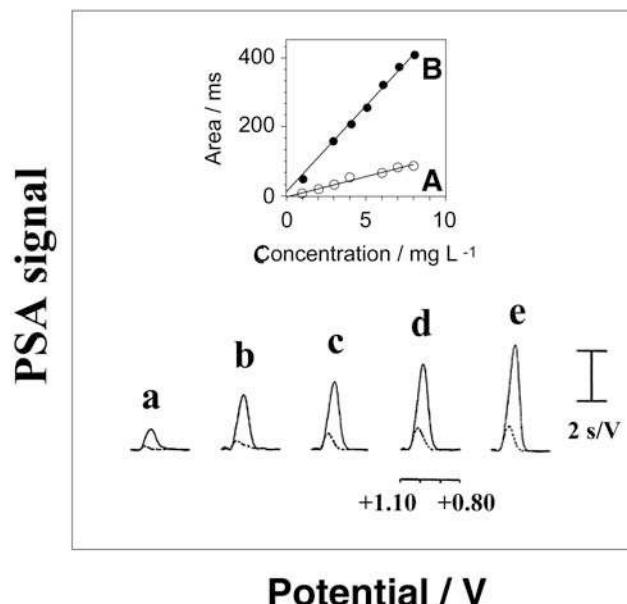


Fig. (2). Stripping chronopotentiometric response of ssDNA at (a) 1 (b) 2, (c) 3, (d) 4 and (e) 5 ppm. Accumulation step was conducted using a directly heated carbon paste electrode at 20 (dotted line) and 32 °C (solid line). The inset depicts calibration plots for ssDNA with accumulation at (A) 20 and (B) 32 °C. From [27] with permission.

3. TEMPERATURE EFFECTS UPON DNA HYBRIDIZATION WITH ELECTRODE SURFACE-CONFINED CAPTURE PROBES

Temperature has a big influence upon many processes that occur in the course of DNA hybridization detection. Besides the hybridization reaction of DNA itself is accelerated, also the detection step can be enhanced providing an optimal temperature. At elevated temperatures the reactions are faster and the formation of a double-strand is easier.

Sosnowski *et al.* combined electrically enhanced DNA hybridization with optical detection. Positive effects of a max. 1.5 μ A DC flowing through the electrochemical double layer and an immobilized agarose gel were addressed to influences of weak electric fields, pH changes and small temperature increase [29]. Caillat *et al.* proposed an indirectly heated electrochemical DNA array [30]. In 1999, we proposed a directly heated DNA-modified electrode [31]. Later, we reported on how to design and control an electrochemical DNA array with directly and selectively heated electrodes that provide a uniform temperature on each electrode surface as needed for precise DNA hybridization and detection [32]. We also proposed to combine such an array with thermoconvective PCR [33].

In 2005, we reported on the use of a directly heated gold wire electrode to enhance hybridization between immobilized capture probes and ferrocene-labelled target strands [34]. Fig. (3) depicts the effects of temperature upon hybridization at a capture probe-modified heated gold electrode. Temperature has a major influence in the range between 3 and 72 °C. The observed decrease in voltammetric signals at temperatures above 55 °C could be attributed partially to beginning melting of the immobilized double strands. However, the effect was probably superimposed by thermal desorption of the thiol-linked DNA-SAM.

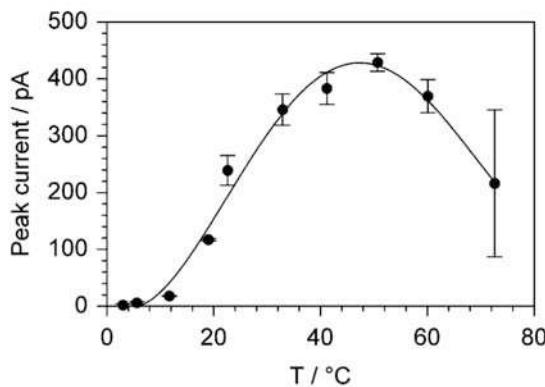


Fig. (3). Hybridization at a directly heated capture probe-modified gold microwire electrode. Effect of electrode temperature upon AC-voltammetric peak currents during a 4 min hybridization period with 80 nM ferrocene-labeled target. Bulk hybridization solution was held at constant 3 °C. From [34] with permission.

Lipold *et al.* used elevated temperature to accelerate hybridization in a competitive assay. The resulting curves looked similar to melting curves of capture probe-target duplexes [35].

Using [OsO₄(bipy)]-labeled DNA-strands (Scheme 1), Flechsig *et al.* found a significant increase of hybridization signals at higher temperatures compared to room temperature [36]. The electrochemical signals were up to 5 times higher at 50 °C compared to 23 °C. The hybridization was more efficient at higher temperatures, because it took just about 15 minutes of hybridization time at 50 °C for reaching the maximum signal.

Even the detection of PCR products on gold electrodes could be achieved with this complex [37]. The authors compared the square-wave-voltammetric signals of labeled PCR-products at different hybridization temperatures. The peaks were two times higher at 50 °C compared to 23 °C and the hybridization was more efficient and selective at elevated temperature, because the maximum height of the peaks was reached faster.

Mix *et al.* used higher temperatures to detect real samples by means of covalent [OsO₄(bipy)]-labels at the targets [38]. They compared the electrochemical signals at different hybridization temperatures between 20 °C and 60 °C. The signals doubled at the higher temperatures compared to room temperature. Tam *et al.* used conductometric sensors for detecting the DNA-hybridization [39]. They observed higher signals at increased temperatures up to 70 °C.

All PCR-products for electrochemical detection are usually generated in a conventional thermocycler followed by thermal denaturation and rapid cooling in order to obtain ssDNA, which is able to quickly hybridize with probe strands. Duwensee *et al.* used heated microwires to induce asymmetric thermoconvective PCR leading immediately to single-stranded amplicons [40]. They labeled the products with the [OsO₄(bipy)] complex and compared the results with a conventional thermocycler. The electrochemical signals of the resulting DNA-single strands were lower than the ones generated by a classic thermocycler, but they showed still a good signal-to-noise ratio. The reasons for the lower PCR-product yield of the thermo-convective PCR were the suboptimal thermal quasi-cycling in the convective mass-flow and wake spaces that were largely excluded from the convection.

It is also possible to use competitive hybridization assays at higher temperatures [41]. We used non-labeled target strands for the displacement of [OsO₄(bipy)]-labeled signaling probestrands. This displacement reaction was found to be more effective at higher temperatures; the decrease of the signal was larger. We could discriminate between full complementary strands and strands containing single mismatches using this method, because the mismatched targets were less stable, the displacement was easier, and the signals decreased more than those of a fully complementary strand.

Mao *et al.* investigated the temperature-dependence of hybridization of DNA-PNA-double-strands [42]. They used a hairpin loop forming oligonucleotide as a capture probe and the targets were modified with thionine as a redox active marker. Upon hybridization the loop opened and the doublestrand was formed. When the hybridization was successful, the electrochemical signal decreased because the

flow of electrons to the gold electrode was inhibited. They detected the voltammetric peak current as a function of the hybridization temperature. At higher temperatures the normalized peak current of the double strand decreased. It was possible to discriminate between a complementary target and targets containing one mismatch, because they observed a plateau in the height of the signals between 20 °C and 40 °C in the curves of the complementary target.

4. ELECTROCHEMICAL DNA MELTING CURVES

Whereas Palecek *et al.* recorded early “DNA denaturation curves” by means of mercury electrodes with in-situ or ex-situ adsorptive accumulation of the DNA (s. above, section 2), the DNA melting can also be performed on gold electrodes modified with SAMs of capture probes [43]. Here, usually intercalating or covalently attached redox labels are applied in order to obtain electrochemical response in the potential range available on gold.

Surkus *et al.* [44] used UV-spectroscopy and heated gold electrodes for measuring the melting temperature of short double-stranded DNA (Fig. 4). They investigated the effect of the salt concentration on the melting temperature of the double strand and compared the UV measurement with the electrochemical melting curve. The complex $[OsO_4(bipy)]$ was used for labeling the DNA target. They obtained the electrochemical melting curves by heating either the bulk solution or only the working electrode and detecting the voltammetric signal of $[OsO_4(bipy)]$ at around -320 mV (reversible peak of Os(VI/IV)). Heating just the working electrode has the advantage that thermally sensitive substances would remain unaffected. Also, the temperature changes can be completed within a few seconds. Zabost *et al.* [45] compared melting points of dsDNA by using spectroscopy and electrochemistry. They got oxidation signals from adenine and guanine at elevated temperatures (Fig. 5). At temperatures below 20 °C, the normalized absorbance of the UV-measurement and the normalized

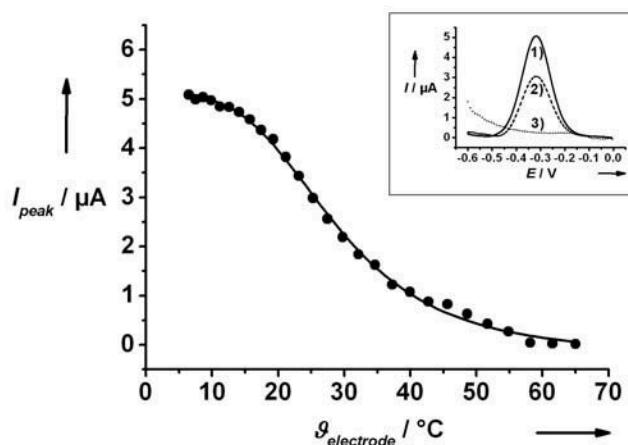


Fig. (4). Electrochemical DNA melting curve obtained at a heated gold electrode with capture probe-SAM and $[OsO_4(bipy)]$ as covalent redox label. From [44] with permission.

electrochemical signals were on the same level, at higher temperatures the electrochemical signals were two times higher. This difference resulted in a higher sensitivity of voltammetry for small changes (“pre-denaturation”) in dsDNA helix structure. Again, pre-melting-like processes could be better resolved by electrochemical means, as was the case for adsorptive stripping at mercury drop electrodes (s. above).

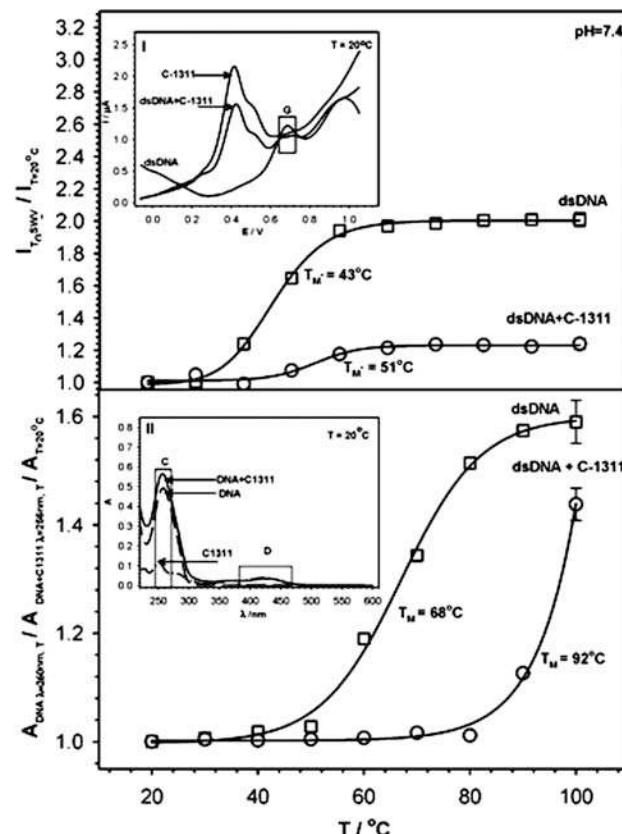


Fig. (5). “Normalized voltammetric response of guanine in dsDNA from calf thymus and in mixture of C-1311 intercalator and dsDNA (above), and temperature with normalized absorbance of dsDNA and mixture of C-1311 and dsDNA vs. temperature (below). The insets depict (I) Example SWV voltammograms of dsDNA and mixture of dsDNA and C-1311, and (II) Example spectra of dsDNA and mixture of dsDNA and C-1311. C: band reflecting intercalated C-1311. D: band for unbound C-1311.” With permission from [45].

Nasef *et al.* worked with methylene blue as a label-free but not indicator-free method [46]. Methylene blue intercalates into a DNA double strand and can be used as an electrochemical indicator for analyzing the melting temperatures of double strands. They used two different target strands, a complementary wild type sequence and a mutant sequence containing 3 mismatches. The resulting melting curves (Fig. 6) showed a very good differentiation of the two strands, the complementary wild type had a melting temperature of 57 °C, compared with 35 °C for the mutant type. Nasef *et al.* reported also on melting curve analysis based on ferrocene-labelled target strands [47].

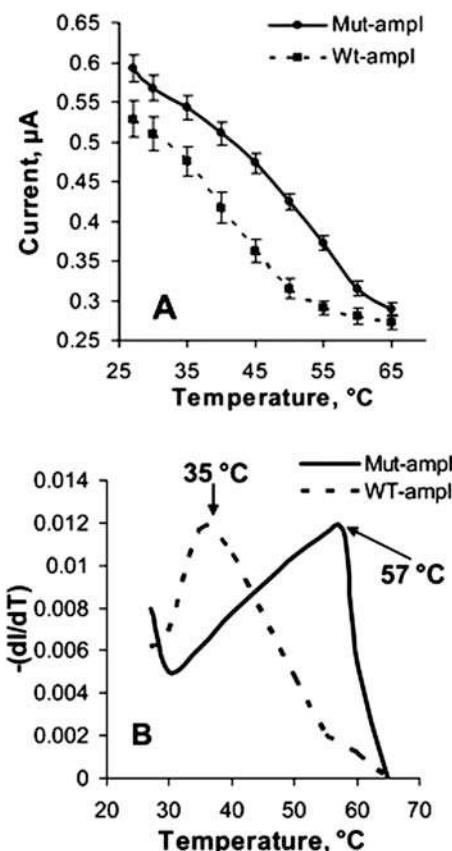


Fig. (6). “Melting curves (A) of the mutant and wild type PCR products having the mutant complementary probe immobilized at the electrode surface. Heating was performed for 10 minutes in a thermostated cell. The methylene blue voltammograms represented at each temperature is a result of the measurement of the pre-heated electrode surface separately in a buffer solution (0.5 M NaCl and 20 mM Trizma, pH 7.4) and then cooled to room temperature. Measurement solution: 20 mM MB in 0.5 M NaCl and 20 mM Trizma, pH 7.4. Also depicted are the first derivatives of the electrochemical melting curves (B).” From [46] with permission.

Luo *et al.* [48] used ferrocene labeled PNA (peptide nucleic acid) for detecting the melting temperature of a PNA-DNA double strand. The single stranded PNA gave a signal of the ferrocene on an ITO (indium tin oxide) electrode, the double strand inhibited the flow of the electrons and there was no electrochemical signal observed. When they increased the temperature, the electrochemical signal increased as well. At the melting temperature of the double strand the DPV signal reached a constant value. It was also possible to separate mismatched targets from complementary ones (Fig. 7).

5. ELECTROCHEMICAL REAL TIME PCR

Recent studies have revealed different approaches on how to design electrochemical real time PCR assays. In contrast to common PCR, real time PCR allows to quantify the amount of DNA template in the sample solution. In 2005 Flechsig *et al.* proposed a device and method how to achieve electrochemical real-time PCR based on thermal convection [33]. Main advantages of electrochemical detection over fluorescence measurements include smaller and simpler

instrumentation (no light source, monochromators and photodetectors needed) as well as better opportunities for miniaturization and parallelization (no limitation to 4 or 6 dye labels in one vial).

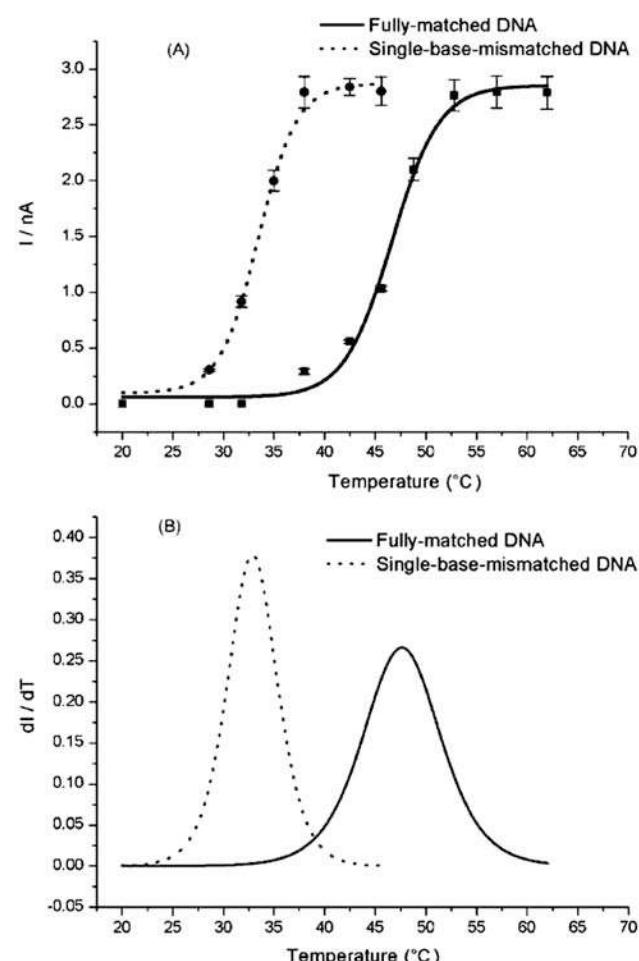


Fig. (7). (A) The intensity of the ferrocene label response vs. temperature. (B) First derivative of both melting curves. With permission from [48].

Hsing *et al.* were there the first to report experimental results on electrochemical real time PCR. Their approach based upon surface-confined primers at an ITO electrode capturing single stranded PCR products, and getting elongated at the surface. Covalent ferrocene labels were included during PCR and delivered voltammetric response upon presence of a DNA template [49]. In another version, Hsing *et al.* used immobilized capture probes on ITO electrodes to detect the ferrocene-labelled PCR amplicons [50]. In both cases, signals increased linearly rather than exponentially with PCR cycle number. Sensitivity of the assay was therefore limited.

The advantage of electrochemical detection compared with fluorescent techniques is a higher sensitivity due to higher electrochemical signals. Furthermore, instrumentation is far simpler, because there is no need for light source, monochromators and photodetectors. Also, no expensive

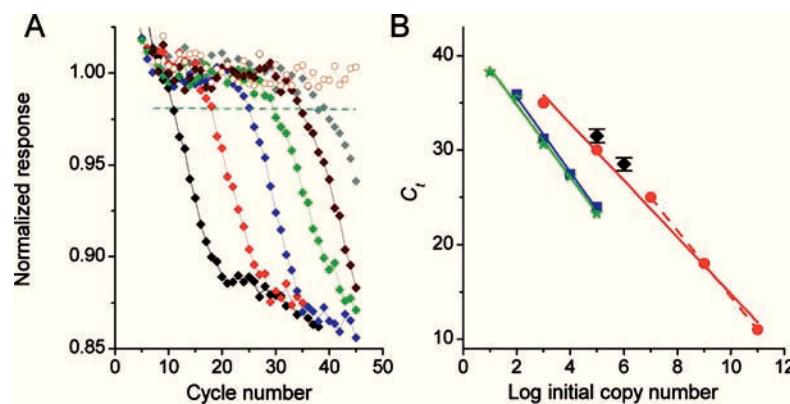


Fig. (8). Electrochemical real-time PCR based on $[(\text{Ru}(\text{bipy})_3)_3]^{3+}$ -mediated cyclic voltammetric monitoring of dGTP consumption. As in optical real-time PCR, the quantification is possible by plotting cycle number after which the fixed normalized threshold response (dashed light blue line in A) is reached versus template concentration. In B) the diamonds and bullets represent electrochemical detection, whereas stars and squares depict classic fluorescent (TaqMan) comparison experiments. From [55] with permission.

proprietary dye labels are needed. The number of dyes (4 to 6) that can be detected simultaneously in one vial limits parallelization in optical detection.

Hsing *et al.* also used the intercalator anthraquinone monosulfonic acid to realize quasi-real-time PCR with electrochemical detection [51]. In their recent work, the group coupled exonuclease cleavage activity of polymerase with electrochemical real-time PCR detection [52-54].

Defever *et al.* monitored consumption of dGMP during PCR by cyclic voltammetry of guanine oxidation in the bulk solution [55]. The resulting curves were similar to those obtained with fluorescence detection (Fig. 8). Using the intercalating redox-label Os $[(\text{bipy})_2\text{DPPZ}]^{2+}$ (with bipy = 2,2'-bipyridine and DPPZ = dipyrido[3,2-a:20,30-c]phenazine), the authors were able to considerably improve their assay [56]. This special redoxintercalator was not only very selective to double stranded DNA, but also delivered large reversible voltammetric signals and seemingly withstood the high temperatures during PCR cycling.

6. CONCLUSIONS

Since the early days of DNA electrochemistry, scientists have been considering effects of temperature upon electrochemical response of the different DNA species. Most often, thermal denaturation of the DNA double strand has been studied for fundamental insight, or denaturation followed by rapid cooling has been applied to enable further hybridization with nucleic acids probes. Electrochemical melting curve analysis is now possible in the bulk solution or directly at the electrode surface. Temperature control during the hybridization with probe strands allows discriminating single base mismatches almost independently from the GC content or ionic strength. A major recent development is electrochemical real time PCR enabling quantification of the DNA template in the sample solution. Temperature control in electrochemical DNA sensing holds great promise for all practical applications as it allows for thermal stringent and accelerated hybridization as well as easy after-hybridization melting curve analysis. Using heated electrodes for flexible temperature control will lead to fast and sensitive sequence-selective biosensors for nucleic acids.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to the German Research Foundation for financial support (DFG, Heisenberg Fellowship FL 384/7-1, and research grant FL 384/11-1).

REFERENCES

- [1] Palecek, E., Oszillographische Polarographie Der Nucleinsäuren Und Ihrer Bestandteile. *Naturwissenschaften*, **1958**, *45*, 186-187.
- [2] Palecek, E., Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid. *Nature*, **1960**, *188*, 656-657.
- [3] Millan, K.M.; Mikkelsen, S.R., Sequence-Selective Biosensor for DNA-Based on Electroactive Hybridization Indicators. *Anal. Chem.*, **1993**, *65*, 2317-2323.
- [4] Peterlinz, K.A.; Georgiadis, R.M.; Herne, T.M.; Tarlov, M.J., Observation of hybridization and dehybridization of thiol-tethered DNA using two-color surface plasmon resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 3401-3402.
- [5] Kelley, S.O.; Boon, E.M.; Barton, J.K.; Jackson, N.M.; Hill, M.G., Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA. *Nucleic Acids Res.*, **1999**, *27*, 4830-4837.
- [6] Boon, E.M.; Ceres, D.M.; Drummond, T.G.; Hill, M.G.; Barton, J.K., Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes. *Nat. Biotechnol.*, **2000**, *18*, 1096-1100
- [7] Boon, E.M.; Barton, J.K., Charge transport in DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2002**, *12*, 320-329.
- [8] Laforgue, A.; Addou, T.; Belanger, D., Characterization of the deposition of organic molecules at the surface of gold by the electrochemical reduction of aryl diazonium cations. *Langmuir*, **2005**, *21*, 6855-6865.
- [9] Liu, G.Z.; Bocking, T.; Gooding, J.J., Diazonium salts: Stable monolayers on gold electrodes for sensing applications. *J. Electroanal. Chem.*, **2007**, *600*, 335-344.
- [10] Harper, J.C.; Polksy, R.; Wheeler, D.R.; Dirk, S.M.; Brozik, S.M., Selective immobilization of DNA and antibody probes on electrode arrays: Simultaneous electrochemical detection of DNA and protein on a single platform. *Langmuir*, **2007**, *23*, 8285-8287.
- [11] Caruana, D.J.; Heller, A., Enzyme-amplified amperometric detection of hybridization and of a single base pair mutation in an 18-base oligonucleotide on a 7-mu m-diameter microelectrode. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 769-774.
- [12] Palecek, E., Past, present and future of nucleic acids electrochemistry. *Talanta*, **2002**, *56*, 809-819.
- [13] Wang, J., Electrochemical nucleic acid biosensors. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, *469*, 63-71
- [14] Drummond, T.G.; Hill, M.G.; Barton, J.K., Electrochemical DNA sensors. *Nat. Biotechnol.*, **2003**, *21*, 1192-1199.
- [15] Lucarelli, F.; Tombelli, S.; Minunni, M.; Marrazza, G.; Mascini, M., Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, *609*, 139-159.

- [16] Cagnin, S.; Caraballo, M.; Guiducci, C.; Martini, P.; Ross, M.; SantaAna, M.; Danley, D.; West, T.; Lanfranchi, G., Overview of Electrochemical DNA Biosensors: New Approaches to Detect the Expression of Life. *Sensors*, **2009**, *9*, 3122-3148.
- [17] Batchelor-McAuley, C.; Wildgoose, G.G.; Compton, R.G., The physicochemical aspects of DNA sensing using electrochemical methods. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *24*, 3183-3190.
- [18] Duwensee, H.; Mix, M.; Flechsig, G.-U., Sequence-specific electrochemical detection of nucleic acids in real samples. *Bioanalytical Reviews*, **2010**, *2*, 103-114.
- [19] Palecek, E., *Zeitschrift für Chemie*, **1962**, *2*, 260.
- [20] Palecek, E., Abhandlungen der Deutschen Akademie der Wissenschaften, **1964**, 270
- [21] Palecek, E., Changes in Oscillopolarographic Behaviour of Deoxyribonucleic Acids at Temperatures below Denaturation Temperature. *J. Mol. Biol.*, **1965**, *11*, 839-841.
- [22] Palecek, E., A Simple Oscillopolarographic Technique for Recognition and Estimation of Denatured Deoxyribonucleic Acids. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1965**, *94*, 293-301.
- [23] Palecek, E., Deoxyribonucleic Acid Conformational Changes at Temperatures below Melting Temperature. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1968**, *125*, 142-150.
- [24] Palecek, E., Polarographic Behaviour of Native and Denatured Deoxyribonucleic Acids. *J. Mol. Biol.*, **1966**, *20*, 263-281.
- [25] Palecek, E., New trends in electrochemical analysis of nucleic acids. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1988**, *20*, 179-194.
- [26] Schildkraut, C.; Lifson, S., Dependence of Melting Temperature of DNA on Salt Concentration. *Biopolymers*, **1965**, *3*, 195-208.
- [27] Wang, J.; Gründler, P.; Flechsig, G.-U.; Jasinski, M.; Rivas, G.; Sahlin, E.; Paz, J.L.L., Stripping analysis of nucleic acids at a heated carbon paste electrode. *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 3752-3756.
- [28] Wang, J.; Flechsig, G.-U.; Erdem, A.; Korbut, O.; Gründler, P., Label-free DNA hybridization based on coupling of a heated carbon paste electrode with magnetic separations. *Electroanalysis*, **2004**, *16*, 928-931.
- [29] Sosnowski, R.; Tu, E.; Butler, W.F.; Et.al., Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1997**, *94*, 1119-1123.
- [30] Caillat, P.; Peltie, P.; Livache, T., Chip-based Analysis Device Comprising Electrodes with Localized Heating, *US Patent* 6,255,677 B1 (1998).
- [31] Gründler, P.; Flechsig, G.-U.; Jasinski, M.; Korbut, O.; Wang, J., Method and Electrochemical Sensor with heated Electrodes for Biochemical Analysis, in Particular for Studying Hybridization Processes of Nucleic Acids, *DE Patent* 199 60 398 B4 (1999).
- [32] Flechsig, G.-U.; Gründler, P.; Wang, J., Analysis Array with heatable Electrodes, and Methods for Chemical and Biochemical Analysis, *DE Patent* 10 2004 017 750 B4 (2004) and *WO 2005/098438*.
- [33] Flechsig, G.-U.; Peter, J., Method and Array for the Replication and Analysis of Nucleic Acids. *Patent DE* 10 2005 007 148 B4, *Patent Application US* 2008/0269066 A1
- [34] Flechsig, G.-U.; Peter, J.; Hartwich, G.; Wang, J.; Grundler, P., DNA hybridization detection at heated electrodes. *Langmuir*, **2005**, *21*, 7848-7853.
- [35] Liepold, P.; Kratzmueller, T.; Persike, N.; Bandilla, M.; Hinz, M.; Wieder, H.; Hillebrandt, H.; Ferrer, E.; Hartwich, G., Electrically detected displacement assay (EDDA): a practical approach to nucleic acid testing in clinical or medical diagnosis. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, *391*, 1759-1772.
- [36] 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.
- [37] 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
- [38] 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.
- [39] Tam, P.D.; Tuan, M.A.; Van Hieu, N.; Chien, N.D., Impact parameters on hybridization process in detecting influenza virus (type A) using conductimetric-based DNA sensor. *Physica E*, **2009**, *41*, 1567-1571.
- [40] Duwensee, H.; Mix, M.; Stubbe, M.; Gimbsa, J.; Adler, M.; Flechsig, G.-U., Electrochemical product detection of an asymmetric convective polymerase chain reaction. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *25*, 400-405.
- [41] Duwensee, H.; Jacobsen, M.; Flechsig, G.-U., Electrochemical competitive hybridization assay for DNA detection using osmium tetroxide-labelled signalling strands. *Analyst*, **2009**, *134*, 899-903.
- [42] Mao, Y.D.; Luo, C.X.; Ouyang, Q., Studies of temperature-dependent electronic transduction on DNA hairpin loop sensor. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*.
- [43] Meunier-Prest, R.; Raveau, S.; Finot, E.; Legay, G.; Cherkaoui-Malki, M.; Latruffe, N., Direct measurement of the melting temperature of supported DNA by electrochemical method. *Nucleic Acids Research*, **2003**, *31*, e150.
- [44] Surkus, A.E.; Flechsig, G.-U., Electrochemical Detection of DNA Melting Curves by Means of Heated Biosensors. *Electroanalysis*, **2009**, *21*, 1119-1123
- [45] Zabost, E.; Nowicka, A.M.; Donten, M.; Stojek, Z., Substantial difference between temperature dependencies of dsDNA predenaturation process obtained by voltammetry and spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, *11*, 8933-8938.
- [46] Nasef, H.; Beni, V.; O'Sullivan, C.K., Labelless electrochemical melting curve analysis for rapid mutation detection. *Anal. Methods*, **2010**, *2*, 1461-1466.
- [47] Nasef, H.; Beni, V.; O'Sullivan, C.K., Electrochemical melting-curve analysis. *Electrochim. Commun.*, **2010**, *12*, 1030-1033.
- [48] Luo, X.; Hsing, I.M., Real Time Electrochemical Monitoring of DNA/PNA Dissociation by Melting Curve Analysis. *Electroanalysis*, **2009**, *21*, 1557-1561
- [49] Yeung, S.S.W.; Lee, T.M.H.; Hsing, I.M., Electrochemical real-time polymerase chain reaction. *Journal of the American Chemical Society*, **2006**, *128*, 13374-13375
- [50] Yeung, S.S.W.; Lee, T.M.H.; Hsing, I.M., Electrochemistry-based real-time PCR on a microchip. *Analytical Chemistry*, **2008**, *80*, 363-368.
- [51] Luo, X.T.; Xu, J.J.; Barford, J.; Hsing, I.M., Magnetic particle based electrochemical sensing platform for PCR amplicon detection. *Electrochemistry Communications*, **2010**, *12*, 531-534.
- [52] Luo, X.T.; Hsing, I.M., Immobilization-free multiplex electrochemical DNA and SNP detection. *Biosensors & Bioelectronics*, **2009**, *25*, 803-808.
- [53] Luo, X.T.; Xuan, F.; Hsing, I.M., Real time electrochemical monitoring of PCR amplicons using electroactive hydrolysis probe. *Electrochemistry Communications*, **2011**, *13*, 742-745.
- [54] Luo, X.T.; Hsing, I.M., Immobilization-Free Electrochemical DNA Polymerase Assay, *Electroanalysis*, **2011**, *23*, 923-926
- [55] Defever, T.; Druet, M.; Rochelet-Dequaire, M.; Joannes, M.; Grossiord, C.; Limoges, B.; Marchal, D., Real-Time Electrochemical Monitoring of the Polymerase Chain Reaction by Mediated Redox Catalysis. *Journal of the American Chemical Society*, **2009**, *131*, 11433-11441.
- [56] Defever, T.; Druet, M.; Evrard, D.; Marchal, D.; Limoges, B., Real-Time Electrochemical PCR with a DNA Intercalating Redox Probe. *Analytical Chemistry*, **2011**, *83*, 1815-1821.

8.3 Directly Heated Bismuth Film Electrodes Based on Gold Microwires

Electroanalysis 22, 2010, 1483 – 1488

Martin Jacobsen Heiko Duwensee, Falko Wachholz, Miriam Adamovski, Gerd-Uwe Flechsig

DOI: 10.1039/b819283a

Directly Heated Bismuth Film Electrodes Based on Gold Microwires

Martin Jacobsen,^a Heiko Duwensee,^{a,b} Falko Wachholz,^a Miriam Adamovski,^a Gerd-Uwe Flechsig^{a,b*}

^a University of Rostock, Department of Chemistry, Dr.-Lorenz-Weg 1, D-18051 Rostock, Germany
fax: +49-381-4986461, phone: +49-381-4986470

^b Gensoric GmbH, Schillingallee 68, D-18057 Rostock, Germany
*e-mail: gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de

Received: October 1, 2009

Accepted: March 19, 2010

Abstract

As a nontoxic substitute for mercury electrodes, bismuth electrodes attained a lot of attention during the last years. In this report we describe for the first time the preparation of two different directly heatable bismuth-modified microwire electrodes. We characterized the electrochemical behaviour using cyclic voltammetry in acetate buffer and alkaline tartrate solution. The bismuth electrodes show a significantly wider potential window compared with bare gold wires. In the presence of picric acid as one example for the detection of explosives, the bismuth electrodes deliver higher signals. By applying heat during the measurements, the signals can be enhanced further. We used the temperature pulse amperometry (TPA) technique to improve the electrochemical response at the different types of electrodes. In this preliminary study, we were able to detect 3 ppm traces of picric acid.

Keywords: Bismuth film electrode, Heated electrode, Temperature pulse amperometry (TPA), Picric acid, Alkaline medium, Tartrate, Bismuth

DOI: 10.1002/elan.200900486

Dedicated to a Decade of Bismuth Electrodes in Modern Electroanalysis

1. Introduction

Since about 10 years, bismuth has become an attractive electrode material in electroanalysis in particular for voltammetric and also amperometric sensors. Long time ago, Schwabe used bismuth films for pH-sensitive potentiometric sensors [1]. In another earlier work, compounds of Bi(III) were immobilized on platinum electrodes to catalyze the oxidation of glucose [2]. Wang et al. [3] introduced stripping-analysis with bismuth film electrodes (BiFE) representing an attractive alternative to mercury film electrodes. Such bismuth films (on various substrates) offer well-defined and highly reproducible stripping signals for many metals. A favourable signal-to-background ratio in the negative potential range coupled with excellent resolution and reproducibility often makes BiFE superior to mercury electrodes. Besides, bismuth is known as a nontoxic element. Anodic stripping determination of various metals such as zinc, cadmium and lead is possible at the BiFE [3–8]. Adsorptive stripping voltammetry has been demonstrated for many other metals such as nickel [9], uranium [10], aluminium [11], and cobalt [12, 13]. Organic compounds containing nitro groups can also be determined [14]. Nafion films have been proposed to minimize the interferences of surfactants in real samples [15]. Compared to mercury,

bismuth electrodes are less prone to interferences caused by dissolved oxygen [3, 9].

Furthermore, the carbon paste electrode (CPE) can be used as a substrate for the preparation of heated BiFE [5]. AFM studies of a bismuth-modified carbon paste electrode revealed nonideal properties of this substrate for preplated Bi films [16]. The carbon paste itself can also be modified with Bi_2O_3 , which is very efficient and useful for the determination of cadmium and lead [17]. Although most authors reported on studies with bismuth electrodes in acetate buffer (pH 4.5) and at even stronger acidic conditions, little has been published about electrochemistry with bismuth electrodes in alkaline solutions such as ammonia buffer, as well as KOH and NaOH solutions [18–21]. Švancara et al. reported about heavy metal stripping detection in NaOH. They also observed a potential shift of the bismuth oxidation peak into negative direction upon increasing pH [21]. EDTA was used in this paper to depress response of cadmium and lead in order to detect thallium. Electroanalysis on bismuth electrodes has been reviewed several times [22–24].

A small percentage of bismuth (about 4%) enhances the analytical applicability of electrode materials such as gold [25, 26] and silver [27, 28] by increasing the hydrogen overvoltage. Such alloy electrode materials combine advantages of both bismuth and noble metal electrodes. They are

far less prone to corrosion. An alloy of gold and small percentages of bismuth can be used for the detection of metals and organic compounds in both the negative and positive potential range [29–31].

Electrically heated electrodes provide various advantages. Heated platinum electrodes prevent electrode fouling e.g. during the detection of NADH [32] or during the detection of dopamine in the presence of gelatine [33]. Directly heated wire electrodes have been used as amperometric detectors in flow systems [34]. We also found a dramatic effect of elevated temperature during DNA hybridization at a directly heated probe-modified gold electrode [35]. This approach allows electrochemical DNA melting curve analysis [36].

In 1996 Gründler et al. introduced an electrochemical technique known as “temperature pulse voltammetry” (TPV) [37–39]. This approach enables one to record complete, sampled voltammograms at temperatures far above the boiling point of the electrolyte. Practical limitations, however, prevent measurements at the critical state of the used solution [40, 41]. In a simplified version called “temperature pulse amperometry” (TPA), we proposed application of heat pulses to modulate amperometric signals in order to obtain peak-shaped signals, which can also compensate a shifting background [34, 42, 43].

Two years ago, we introduced a compact heating instrument comprising a filtering bridge for direct electric heating even of carbon electrodes while performing undisturbed electrochemical measurements [44]. Lin et al. studied electrochemiluminescence at directly heated Pt wire electrodes [45, 46]. Unusual directly heated electrodes have been proposed recently including a graphite cylinder [47] and a copper wire electrode [48]. Literature on high temperature electrochemistry has been reviewed several times [49–52].

Until now, almost all authors have been using bismuth electrodes in acidic media. Little has been published about heated bismuth electrodes. However, it would be useful to combine the advantages of bismuth and heated electrodes as well as to extent the pH range towards strongly alkaline conditions. The latter would open new opportunities to study organic compounds.

Here we introduce a directly pulse-heated bismuth-modified electrode based upon gold microwires as a substrate. Applied within strongly alkaline solution containing tartrate as a complex-forming agent, we were able to detect picric acid at trace levels.

2. Experimental

2.1. Apparatus

The used working electrodes consisting of a 25 µm gold wire were described in detail earlier [35]. The gold wire was received from Advent (Great Britain). Cleaning the gold wire was achieved by glowing (dark red, approximately 600 °C) the electrode in air for 60 s. The bismuth film

electrode (BiFE) was prepared by galvanic deposition onto the gold wire at –0.9 V for 600 s in 0.2 M acetate buffer solution (pH 5.0) containing 100 mg/L bismuth(III). To prepare the gold-bismuth-alloy electrode (AuBiFE), the freshly formed and dried bismuth film electrode was glowed under an atmosphere of argon for 60 s.

All electrochemical measurements were conducted by means of a µAUTOLAB III (ECO CHEMIE, The Netherlands), which was controlled by a PC using the GPES 4.9 software. A faraday cage with an electrode stand and a glass cell comprising a glassy carbon counter electrode and a Ag/AgCl (3 M KCl) reference electrode (all from Metrohm AG, Switzerland) were used for all voltammetric and amperometric measurements.

The heating AC was generated by means of a laboratory-made 50 kHz power generator [44]. A LOGO! 24RC logic module (Siemens AG, Germany) was used as a programmable relay to excite the 100 ms temperature pulses. The used relay closed the heating circuit for a pulse of 100 ms and then opened the circuit for a 900 ms cooling period.

2.2. Material

All chemicals were of analytical grade or better and were used as received. NaOH (trace select), sodium acetate, the bismuth atomic spectroscopy standard and the picric acid (2,4,6-trinitrophenol, 13 g/L aqueous solution) were purchased from Fluka (Germany), the tartaric acid was purchased from Lachema (Czech Republic). All solutions were prepared with ultra pure water (18 MΩ, TOC < 2 ppb) obtained by means of an SG Ultra Clear water system (SG Water GmbH, Germany). Argon (purity 99.99996%) was delivered by Air Liquide.

2.3. Temperature Pulse Amperometric Experiments

All TPA measurements were carried out in a 10 mM sodium hydroxide solution containing 5 mM tartaric acid for 8 s with a sampling time of 0.001 s. During the measurements the wire electrode was heated by applying AC pulses of 100 ms duration separated by rest periods of 900 ms. The heating current was adjusted to reach a temperature of max. 50 °C during the pulses. The resulting graphs of the measurements were all Savitzky/Golay smoothed at level 4 using the GPES 4.9 software.

2.4. Temperature Calibration

The temperature calibration was conducted in a 50 mM equimolar potassium ferro-/ferricyanide solution in 0.1 M KCl by open circuit potentiometry as described earlier [37]. The electrode temperature during application of heat pulses has been calculated based upon EMF changes between the reference and the working electrode as reported before [42].

3. Results and Discussion

3.1. Acidic Electrolyte

Figure 1 displays the electrochemical characterization of three different directly heated wire electrodes in the negative potential range. The bare gold wire electrode (solid lines) is useful only at potentials above -0.9 V. A gold wire modified with a bismuth film (BiFE, dotted lines) provides a dramatically improved potential range in negative direction (-1.2 V). Even after tempering the Au-Bi-wire at 600°C under argon, the potential range of this gold bismuth alloy (AuBiFE, broken lines) is wider than on pure gold. The cathodic background increases on all three types of electrodes, if the wire temperature is elevated. However, the BiFE still provides the best potential window followed by the AuBiFE and the bare Au wire.

We chose picric acid as a model analyte. The nitro groups can be reduced in two steps at moderately and strongly negative potentials, respectively. This can be used for explosives detection. Bismuth electrodes would be a useful alternative for this purpose. Figure 2 exhibits also a significant temperature effect. At 60°C (Fig. 2B) the peak at -1.35 V turns into a wave in case of the BiFE. Both reduction signals (-0.37 and -1.35 V) increase with temperature indicating enhanced mass transport (thermal microstirring and diffusion). The AuBiFE exhibits similar

behavior compared to the bare Au wire; however, the second reduction signal appears at a less negative potential and is well defined at all temperatures studied here. Bismuth tends to adsorb many organic compounds and has been used for adsorptive stripping analysis. However, in case of picric acid we are not sure if this is the case. A hint for adsorption might be the large peak observed at room temperature that disappears at elevated temperature. Nevertheless, this behavior can also be caused by the strong microstirring effect found at heated electrodes. Further studies are needed to clarify this question. For the quantitative determination of picric acid traces, the second reduction signal seems more interesting since it is not only larger, but also differs more from the bismuth oxidation potential. The latter should be avoided for bismuth sensors that are to be used many times.

3.2. Alkaline Electrolyte

The favorite acidic pH range as used by most authors unfortunately limits the applicability of bismuth electrodes for many organic compounds. This applies also to picric acid and other nitro compounds. The reason why so many authors prefer low pH can be found in the insoluble basic oxides and salts which are easily formed in Bi^{3+} containing solutions and on bismuth surfaces at pH values above 6,

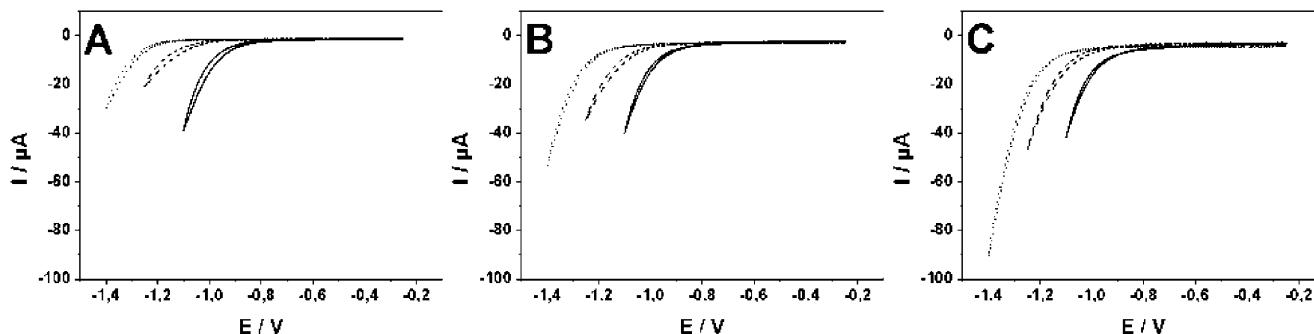


Fig. 1. Cyclic voltammetric measurements in a 0.2 M acetate buffer solution at different wire temperatures: A) 20°C , B) 30°C and C) 60°C . Solid line: gold electrode, dotted line: bismuth film electrode (BiFE), broken line: tempered gold-bismuth-alloy electrode (AuBiFE).

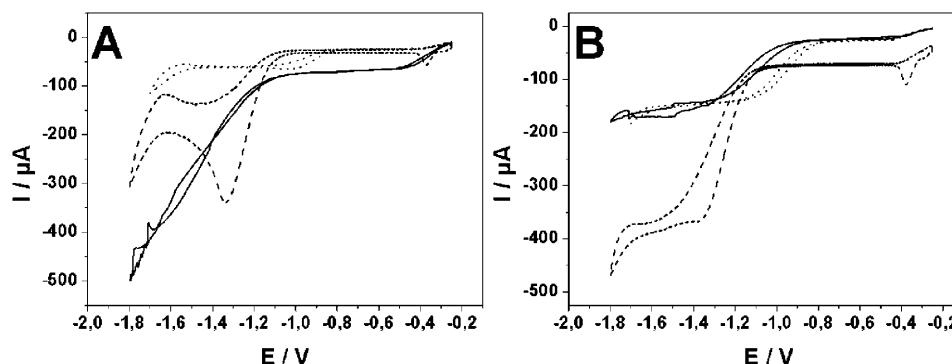


Fig. 2. Cyclic voltammograms of 1 mM (229 ppm) picric acid in 0.2 M acetate buffer (pH 5) at the gold wire electrode (solid) the BiFE (broken) and the tempered AuBiFE (dotted); $v = 100$ mV/s, wire temperature was A) 20 and B) 60°C .

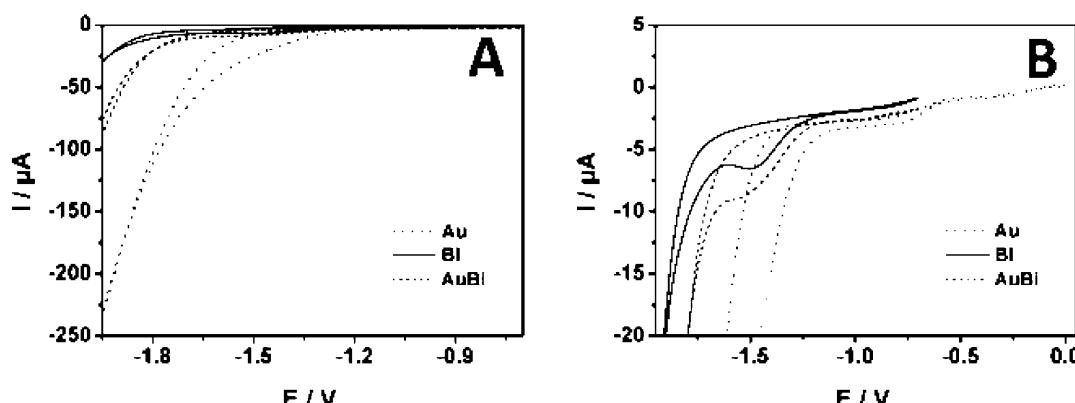


Fig. 3. Cyclic voltammograms of 30 ppm picric acid in 10 mM NaOH solution containing 5 mM tartaric acid in two current ranges: A) 250 μ A and B) 20 μ A; potential range from -1.9 to 0 V (Au) and -1.9 to -0.7 V (Bi and AuBi); scan rate 0.1 V/s; step potential 3 mV.

although formation of soluble hydroxo complexes at very high pH has been reported [21]. Therefore, we tried to extend the pH range towards strongly alkaline conditions while avoiding such formation of insoluble Bi compounds by means of strong complex forming ligands. Figures 3A and 3B depict CVs of 30 ppm picric acid recorded in a 10 mM NaOH containing also 5 mM tartrate. The region between 0 and -20 μ A has been magnified in Fig. 3B, whereas Fig. 3A displays the complete 250 μ A current range. Figure 3B also exhibits response of the bare Au electrode at more positive potentials, where bismuth is already oxidized under these conditions. We found that picric acid yields indeed better defined voltammetric signals at strongly alkaline pH. As expected, the background is again dramatically higher on the bare Au wire compared with the AuBiFE and in particular the BiFE. A solution containing NaOH, tartrate and bismuth ions has been known for more than 100 years as "Nylander's reagent" [53]. The tartrate forms a stable complex with bismuth ions preventing the formation of oxides and hydroxides even at very high pH values.

The CVs in Fig. 3B also demonstrate that there are still two reduction signals of picric acid. However, the small more positive signal appears at potentials that are too positive for the bismuth electrode, since its oxidation potential shifted by approximately 300 mV into negative direction. This behavior can be attributed to the complexing agents hydroxide [21] and tartrate, which otherwise prevent

formation of solid oxide and hydroxide layers on bismuth as mentioned above. The useful potential window is still about 1 V. Other complexing agents such as EDTA might be useful as well. However, one has to keep in mind that the stronger the complex, the lower will be the oxidation potential of bismuth narrowing the useful potential range. Thus, the bismuth complex has to be well tailored in order to fit the specific electroanalytical needs. Such systems of bismuth electrodes and alkaline electrolyte containing complexing agents open new opportunities for reductive measurements at very high pH.

3.3. Temperature Pulse Amperometric Measurements

Since both voltammetric reduction signals of picric acid are very close to either bismuth oxidation or reductive background potentials, well-defined voltammetric peaks are difficult to obtain at trace levels. Therefore, we decided to apply our method of temperature pulse amperometry in order to detect even traces of picric acid. This method yields peak-shaped signals arising from modulation with 100 ms temperature pulses being applied during an otherwise common amperometric protocol.

Figure 4 exhibits such TPA signals at 3 different picric acid levels in the lowest ppm range obtained at Au wire, BiFE, and AuBiFE. The AuBiFE yielded the highest signals

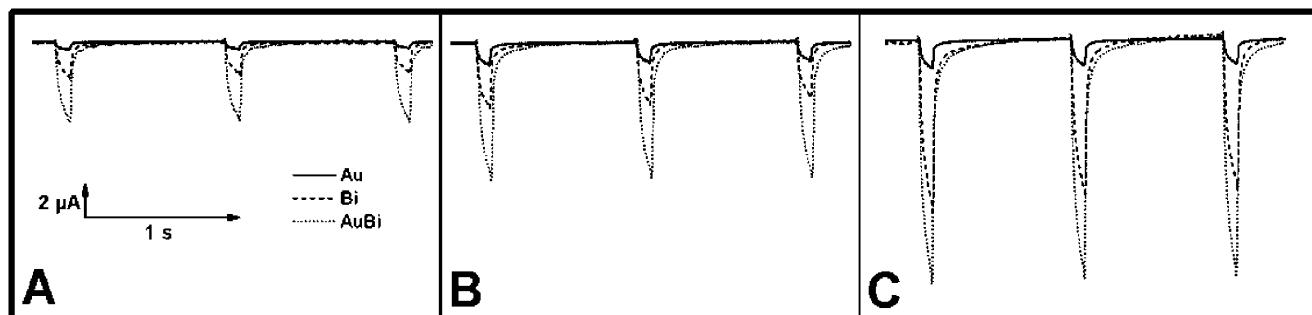


Fig. 4. TPA signals of 1 ppm (A), 5 ppm (B) and 10 ppm (C) picric acid in 10 mM NaOH solution containing 5 mM tartaric acid at gold (solid), bismuth- (dashed) and gold-bismuth electrode (dotted); electrode potential -1.6 V; heating pulses of 100 ms

followed by the BiFE, which has been a little surprising since the lowest reductive background is always found on pure bismuth surfaces. The AuBiFE, however, has been glowed under argon and has therefore a very smooth surface compared with the electrochemically deposited Bi film of the BiFE. The plain Au wire electrode yields the smallest TPA signals. TPA signals of picric acid in alkaline solution obviously follow the typical temperature-time-profile of short heating pulses as described earlier by Gründler et al. [37, Fig. 3]. The -1.6 V working potential has been chosen in order to utilize also the second reduction step of picric acid. Here, the reductive background affects the signals on the Au wire electrode considerably.

Figure 5 displays calibration data obtained with all three kinds of wire electrodes. Here, we lowered the working potential to -1.3 V in order to limit the effect of the background onto the signals obtained with the bare Au electrode. Again, the best sensitivity is observed on the AuBiFE, and the lowest on the Au wire. The BiFE lies in between. Sensitivity is 7 times better for the AuBiFE in comparison with the bare Au wire. Signals obtained in alkaline solution containing tartrate are also better defined than those in acetate buffer according to our earlier findings [42]. We also observed that the electrodeposited bismuth film (in contrast to the AuBiFE) provides limited mechanical stability. These calibration data (Fig. 5) indicate two linear ranges for all three electrodes. The sensitivity up to 5 ppm is considerably higher compared with the range between 5 and 50 ppm. This might be another hint for adsorption. In this case the 5 ppm level would indicate such as saturation of the picrate monolayer on each kind of wire electrode. However, the time between the heat pulses seems very short to allow renewal of such adsorptive layers, and the critical concentration level should be different for the three kinds of wire electrodes, in particular for the BiFE with a significantly larger active electrode area (due to electrodeposition without thermal treatment). On the other hand, adsorption is also well known in polarography, where the

short life time of the mercury drop still allows for significant adsorption of many organic compounds [54]. We think further studies are needed to answer this question profoundly.

4. Conclusions

In conclusion, we modified Au microwires with bismuth films, which lead to a new sort of directly heated electrodes. Freshly deposited Bi films provide a wide potential window in negative direction. Elevated wire temperature results in significantly higher voltammetric signals of the analyte picric acid. Addition of tartrate as a complexing agent allows measurements with bismuth electrodes even in strongly alkaline solutions. Temperature pulse amperometry allows to detect even 3 ppm traces of picric acid. The gold bismuth alloy modified wire electrode provided the highest sensitivity compared with both plain Au wire and bismuth film electrode. Heated bismuth-gold wire electrodes in alkaline media containing complexing agents will provide new opportunities for the determination of reducible organic analytes. Temperature pulse amperometry yields peak-shaped signals even for difficult conditions where voltammetric peaks cannot be processed.

Acknowledgement

We are grateful to the *Deutsche Forschungsgemeinschaft* for financial support (FL 384/2-3, 4-2, 8-1, and 7-1 (Heisenberg Fellowship)).

References

- [1] K. Schwabe, *Pharmazie* **1948**, 3, 449.
- [2] G. Wittstock, A. Strübing, R. Szargan, G. Werner, *J. Electroanal. Chem.* **1998**, 444, 61.
- [3] J. Wang, J. Lu, S. B. Hočevá, P. A. M. Farias, B. Ogorevc, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3218.
- [4] J. Wang, J. Lu, S. B. Hočevá, B. Ogorevc, *Electroanalysis* **2000**, 13, 13.
- [5] G.-U. Flechsig, O. Korbut, S. B. Hočevá, S. Thongngamdee, B. Ogorevc, P. Gründler, J. Wang, *Electroanalysis* **2002**, 14, 192.
- [6] R. Pauliukaite, C. M. A. Brett, *Electroanalysis* **2005**, 17, 1354.
- [7] I. Švancara, L. Baldrianová, E. Tesařová, S. B. Hočevá, S. A. A. Elsucary, A. Economou, S. Sotiropoulos, B. Ogorevc, K. Vytřas, *Electroanalysis* **2006**, 18, 177.
- [8] C. Prior, G. S. Walker, *Electroanalysis* **2006**, 18, 823.
- [9] J. Wang, J. Lu, *Electrochim. Commun.* **2000**, 2, 390.
- [10] G. Kefala, A. Economou, A. Voulgaropoulos, *Electroanalysis* **2006**, 18, 223.
- [11] G. Kefala, A. Economou, M. Sofoniou, *Talanta* **2006**, 68, 1013.
- [12] A. Krolicka, A. Bobrowski, K. Kalcher, J. Mocak, I. Švancara, K. Vytřas, *Electroanalysis* **2003**, 15, 1859.
- [13] A. Krolicka, A. Bobrowski, *Electrochim. Commun.* **2004**, 6, 99.
- [14] E. A. Hutton, B. Ogorevc, S. B. Hočevá, F. Weldon, M. R. Smyth, J. Wang, *Electrochim. Commun.* **2001**, 3, 707.

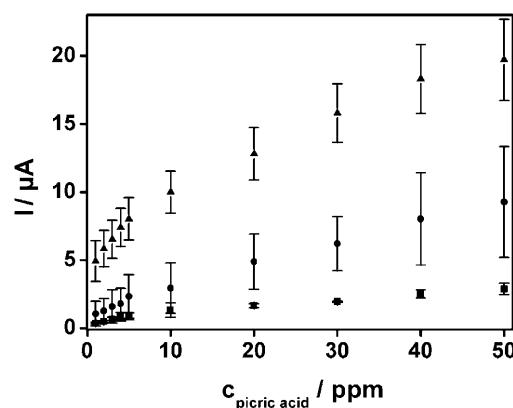


Fig. 5. Concentration calibration of picric acid in 10 mM NaOH solution containing 5 mM tartaric acid at gold- (square), bismuth- (circle) and gold-bismuth-electrode (triangle) at a potential of -1.3 V; heating pulses of 100 ms. Error bars represent standard deviation of repetitive measurements obtained with 3 different electrodes of the regarding kind.

- [15] J. Wang, R. P. Deo, S. Thongngamdee, B. Ogorevc, *Electroanalysis* **2001**, *13*, 1153.
- [16] G.-U. Flechsig, M. Kienbaum, P. Gründler, *Electrochim. Commun.* **2005**, *7*, 1091.
- [17] R. Pauliukaite, R. Metelka, I. Švancara, A. Krolicka, A. Bobrowski, K. Vytrás, E. Norkus, K. Kalcher, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *374*, 1155.
- [18] I. Švancara, L. Baldrianová, E. Tesařová, T. Mikysek, K. Vytrás, *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A* **2006**, *12*, 5.
- [19] S. A. A. Elsucrary, I. Švancara, R. Metelka, L. Baldrianová, M. E. M. Hassouna, K. Vytrás, *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A* **2003**, *9*, 5.
- [20] I. Švancara, M. Fairouz, Kh. Ismail, R. Metelka, K. Vytrás, *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A* **2003**, *9*, 31.
- [21] I. Švancara, L. Baldrianová, E. Tesařová, S. B. Hocevar, S. A. A. Elsucrary, A. Economou, S. Sotiropoulos, B. Ogorevc, K. Vytrás, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 177.
- [22] J. Wang, *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1341.
- [23] A. Economou, *Trac – Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 334.
- [24] I. Švancara, K. Vytrás, *Chem. Listy* **2006**, *100*, 90.
- [25] Ø. Mikkelsen, K. H. Schrøder, *Poster contribution, 10th International Conference on Electroanalysis (ESEAC 2004)*, June **2004**, Galway, Ireland.
- [26] Ø. Mikkelsen, S. M. Skogvold, K. H. Schrøder, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 322.
- [27] Ø. Mikkelsen, K. H. Schrøder, *Analyst* **2000**, *125*, 2163.
- [28] S. M. Skogvold, Ø. Mikkelsen, K. H. Schrøder, *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1938.
- [29] Ø. Mikkelsen, K. H. Schrøder **2002**, <http://www.nt.ntnu.no/users/knusch/voltammetry.ppt>
- [30] H. Duwensee, M. Adamovski, G.-U. Flechsig, *Int. J. Electrochem. Sci.* **2007**, *2*, 498.
- [31] S. M. Skogvold, Ø. Mikkelsen, *Electroanalysis* **2008**, *20*, 1738.
- [32] C. Lau, G.-U. Flechsig, P. Gründler, J. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *554*, 74.
- [33] H. Duwensee, T. Vázquez-Alvarez, G.-U. Flechsig, J. Wang, *Talanta* **2009**, *77*, 1757.
- [34] J. Wang, M. Jasinski, G.-U. Flechsig, P. Gründler, B. Tian, *Talanta* **2000**, *50*, 1205.
- [35] G.-U. Flechsig, J. Peter, G. Hartwich, J. Wang, P. Gründler, *Langmuir* **2005**, *21*, 7848.
- [36] A.-E. Surkus, G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1119.
- [37] P. Gründler, A. Kirbs, T. Zerihun, *Analyst* **1996**, *121*, 1805.
- [38] T. Voss, P. Gründler, A. Kirbs, G.-U. Flechsig, *Electrochim. Commun.* **1999**, *1*, 383.
- [39] T. Voss, A. Kirbs, P. Gründler, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, *367*, 320.
- [40] P. Gründler, D. Degenring, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *512*, 74.
- [41] P. Gründler, D. Degenring, *Electroanalysis* **2001**, *13*, 755.
- [42] F. Wachholz, K. Biala, M. Piekarz, G.-U. Flechsig, *Electrochim. Commun.* **2007**, *9*, 2346.
- [43] T.-F. Tseng, Y.-L. Yang, M.-C. Chuang, S.-L. Lou, M. Galik, G.-U. Flechsig, J. Wang, *Electrochim. Commun.* **2009**, *11*, 1819.
- [44] F. Wachholz, J. Gimza, H. Duwensee, H. Grabow, P. Gründler, G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* **2007**, *19*, 535.
- [45] Z. Y. Lin, J. J. Sun, J. H. Chen, L. Guo, G. N. Chen, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *564*, 226.
- [46] Z. Y. Lin, J. J. Sun, J. H. Chen, L. Guo, G. N. Chen, *Electrochim. Commun.* **2007**, *9*, 269.
- [47] J. J. Sun, L. Guo, D. F. Zhang, W. H. Yin, G. N. Chen, *Electrochim. Commun.* **2007**, *9*, 283.
- [48] H. Wei, J. J. Sun, L. Guo, X. Li, G. N. Chen, *Chem. Commun.* **2009**, 2842.
- [49] G. G. Wildgoose, D. Giovanelli, N. S. Lawrence, R. G. Compton, *Electroanalysis* **2004**, *16*, 421.
- [50] P. Gründler, G.-U. Flechsig, *Microchim. Acta* **2006**, *154*, 175.
- [51] P. Gründler, *Curr. Anal. Chem.* **2008**, *4*, 263.
- [52] P. Gründler, A. Kirbs, L. Dunsch, *Chem. Phys. Chem.* **2009**, *10*, 1722.
- [53] M. E. Rehfuss, P. B. Hawk, *J. Biol. Chem.* **1910**, *7*, 273.
- [54] J. Heyrovský, J. Kůta, *Grundlagen der Polarographie*, Akademie-Verlag, Berlin **1965**, pp. 252–306.

8.3 Electrochemical competitive hybridization assay for DNA detection using osmium tetroxide-labelled signalling strands

Analyst 134, 2009, 899 – 903

Heiko Duwensee, Martin Jacobsen, Gerd-Uwe Flechsig

DOI: 10.1039/b819283a

Electrochemical competitive hybridization assay for DNA detection using osmium tetroxide-labelled signalling strands

Heiko Duwensee, Martin Jacobsen and Gerd-Uwe Flechsig*

Received 30th October 2008, Accepted 17th February 2009

First published as an Advance Article on the web 4th March 2009

DOI: 10.1039/b819283a

In this report, we present sequence-specific DNA detection by means of a competitive hybridization assay with osmium tetroxide-labelled signalling strands. The labelling of the signalling strands has been performed using protective strands to preserve the recognition site of these single strands for hybridization with the immobilized capture probes. At optimized measuring conditions and especially assay temperature, we could detect the presence of 25 nM target DNA within 30 minutes, whereas the non-complementary target sequence did not yield any signal. The latter was observed as a decrease in square-wave voltammetric response of the signalling probes. Single base mismatches could be detected at a stringent 35 °C electrolyte temperature. Moreover, the concentration dependency of the signal was investigated. A time-consuming labelling procedure of the target, as typically used before, is not necessary. Upon application of the new protocol, there is no need for handling osmium(VIII) compounds during sample treatment. The signalling strands containing Os(VI) are prepared separately and can be stored over several months.

Introduction

Nucleic acids can be detected electrochemically in several ways. One possibility is to modify target nucleic acids with covalent labels such as osmium tetroxide complexes and ferrocene that deliver large reversible electrochemical signals. Palecek *et al.* demonstrated that osmium tetroxide complexes with organic ligands such as bipyridine could be utilized as versatile tools for studying nucleic acid electrochemistry.^{1–4} The complex [OsO₄(bipy)] oxidizes the C=C double bond in the pyrimidine bases thymine, uracil and cytosine forming a glycol diester of osmotic(VI) acid.^{5,6} This reaction can be utilized for fast and easy labelling of DNA strands in the laboratory. Osmium tetroxide bipyridine-modified DNA single strands are unable to form double strands. Therefore, sequence-specific DNA detection by means of osmium tetroxide labels has been conducted in two steps at separate surfaces, including (a) hybridization at magnetic beads and (b) adsorptive stripping on mercury, carbon or amalgam electrodes. This approach is called a ‘two surface strategy’.^{7–11}

Another possibility is to use protective oligonucleotide strands for labelling thymine-containing nucleic acids with [OsO₄(bipy)] while preserving their ability for hybridization with immobilized probes.^{12,13} Protective oligonucleotides coupled with magnetic separation have also been used for the preparation of osmium tetroxide-labelled reporter strands.¹⁴ We have recently demonstrated that [OsO₄(bipy)] and protective strands can also be applied to detect the products of polymerase chain reactions (PCR).^{15,16} Furthermore, we demonstrated that tRNA can be labelled with osmium tetroxide complexes.¹⁷

It is generally desirable to avoid additional steps during sample preparation. Signalling probes covalently modified with electroactive moieties have been introduced to avoid modification of the target strands. Such competitive assays are widely used in immunoassays with antibodies or aptamers. This approach also works with nucleic acids. The unlabelled target strand, which is complementary to the probe strand, will displace the electroactive signalling strand (Fig. 1), and hence, a decrease of voltammetric response is detected and taken as the analytical signal.^{18–23} Oligonucleotides with electroactive labels²⁴ or enzyme labels producing electroactive substances²⁵ can also be used as reporter probes in a sandwich-like assay. In this case, two recognition sites at the target strand are needed, one for the capture probe, and the other for the reporter probe. Hence, two hybridization events have to take place in order to observe any electrochemical response. The different approaches of

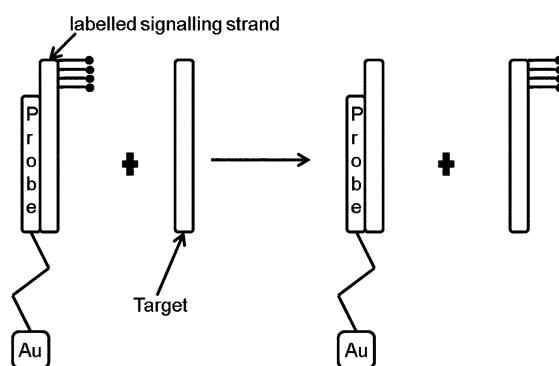


Fig. 1 Scheme of the competitive assay at the surface of a gold electrode. The thiol-linked capture probes form a self-assembled monolayer (SAM). Only the surface-confined signalling strands yield the observed square-wave voltammetric peaks.

University of Rostock, Department of Chemistry, Dr.-Lorenz-Weg 1, D-18051 Rostock, Germany. E-mail: gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de; Fax: +49 381 4986461

electrochemical sequence-selective DNA detection including commercial solutions have been carefully reviewed by Mascini and co-workers.²⁶

Here, we show how osmium tetroxide-labelled signalling probes can be used for the sequence-specific detection of DNA on capture probe-modified gold electrodes by means of a competitive assay without the need to modify the target strands.

Experimental

Reagents and instrumentation

Most of the chemicals were obtained from Fluka (Germany, Taufkirchen). Only sodium sulfate was purchased from Riedel-de-Haën (Germany, Taufkirchen) and ethanol was delivered by AppliChem (Germany, Darmstadt). The used oligonucleotides (HPLC-purified) were obtained from Friz Biochem (Germany, Neuried):

Target/signalling oligo: 5'-TTTTTAATACAGTAAAATCA-GCTCAAGGACTT-3';

Target with 1 mismatch: 5'-TTTTTAATACAGTAAAAT-CACCTCAAGGACTT-3';

Capture probe: 5'-AAGTCCTTGAGCTGATTTACTG-TATTttttttttttt[Dithio]3-3';

Protective strand: 5'-CAGTGTGACCTGATTTACTG-TCTT-3'.

The probe strand contained 15 thymine bases as a spacer to allow high hybridization efficiency on the electrode surface.

All electrochemical measurements were performed in a 3-electrode system using a μ -Autolab (Metrohm AG, Filderstadt, Germany). The used reference electrode was a Ag/AgCl-(3 M KCl) reference electrode (Metrohm) and the counter electrode was self-made using a platinum wire (1 mm in diameter). A modified (see below) gold disc electrode (Metrohm, 3 mm in diameter, 7.07 mm² area) has been used as the working electrode. All measurements have been performed in a thermostated jacket electrochemical cell (Metrohm). Temperature was controlled by means of a cryostat type CC2 (Huber, Offenburg, Germany)

Preparation of the signalling oligo. The labelling of a single DNA strand with [OsO₄(bipy)] by means of protective strands has been described in detail earlier.^{12,15,27} To label the signalling oligo, we used the following procedure. In the first step, 100 μ l unlabelled signalling oligo solution and 100 μ l protective strand solution (each 100 μ M in 'Tris-buffer' (10 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer solution containing 0.5 M Na₂SO₄ at pH 7.5)) were mixed together. After shaking the solution vigorously for 10 s, it was kept at room temperature for 3 hours. Then, 137 μ l 10 mM [OsO₄(bipy)] were added to label the five unprotected 5'-terminal thymine bases and left again for 3 hours at room temperature. This way, the recognition site of the signalling strand remained unmodified. To remove the excess of [OsO₄(bipy)], the solution was divided into 4 fractions and each fraction was given into a dialysis cell (Slide-A-Lyser Mini Dialysis Units, USA, Rockford). Dialysis was performed against 500 ml Tris-buffer overnight. In the last step, the purified solution from the dialysis cells was filled up to 1600 μ l with Tris-buffer.

Preparation of the electrode. Before each measurement, the electrode was firstly polished carefully for 60 seconds using alumina powder (Buehler, Germany, Düsseldorf) and rinsed thoroughly with deionised water (18 M Ω cm, TOC < 2 ppb, prepared with a system from SG Water, Germany, Barsbüttel). Secondly the electrode was cleaned electrochemically by using cyclic voltammetry (25 scans, -0.3 to 1.6 V, scan rate 100 mV/s) in 0.5 M sulfuric acid. After rinsing the electrode with water and ethanol, the electrode was dried under a stream of argon. In the next step, a 4 μ l drop of the probe solution (30 μ M in Tris-buffer) was pipetted onto the top of the cleaned electrode. This volume was sufficient to ensure complete coverage. After 3 h at room temperature in a water-saturated atmosphere, the electrode was dipped into a solution of 1 mM 11-mercaptop-1-undecanol in ethanol overnight to minimize both non-specific adsorption and double layer capacity. After rinsing the electrode with ethanol and water, the electrode was dipped into deionised 50 °C water for 60 s for removing non-specifically adsorbed DNA. Afterwards, the electrode was dipped into a solution of 1 mM 6-mercaptop-1-hexanol in water to completely erect the probe strands, which had partially folded in the alcoholic medium. After 1 hour in the 1 mM 6-mercaptop-1-hexanol solution, the electrode was removed, rinsed with water and ethanol, dried under a stream of argon and then placed in a 100 nM signalling oligo solution in Tris-buffer overnight. These working electrodes modified with a dsDNA-SAM of capture probes and labelled signalling strands were used for hybridization experiments with the target strands. A similar protocol has been reported earlier by Hartwich and co-workers.²²

Measurements. The electrochemical measurements were performed using square-wave voltammetry (SWV) with the following parameters, unless otherwise stated: start potential -0.6 V, end potential 0 V, step potential 15 mV, amplitude 45 mV, frequency 20 Hz, scan rate 290 mV/s. For the blank measurements, the electrodes were used in the blank solution containing the signalling oligo. The competitive hybridization assay was conducted by adding a variable amount of target to the solution containing the signalling oligo and the measurements were started immediately. The signalling oligo had to be present in the sample solutions in order to prevent non-specific signal decrease. All modified electrodes were used only once to investigate the process of the competitive replacement of the signalling oligo by the target. After the voltammetric measurements, the electrode was dipped into 50 °C water for 60 s to dehybridize the signalling oligo/target. Then the electrode was cleaned as described above.

Results and discussion

Fig. 2 displays the square-wave voltammetric response of a gold electrode modified with a SAM of capture and signalling probes before and after target hybridization. No signals are observed on bare gold electrodes and SAMs of mercaptohexanol or capture probes alone. The maximal voltammetric response is obtained after hybridization with an [OsO₄(bipy)]-modified signalling strand (Fig. 2D). The peak at *ca.* -0.28 V can be addressed to osmium(IV/VI) in the complex with bipyridine and thymine glycol. In the presence of the target strand (*i.e.* the analyte), the

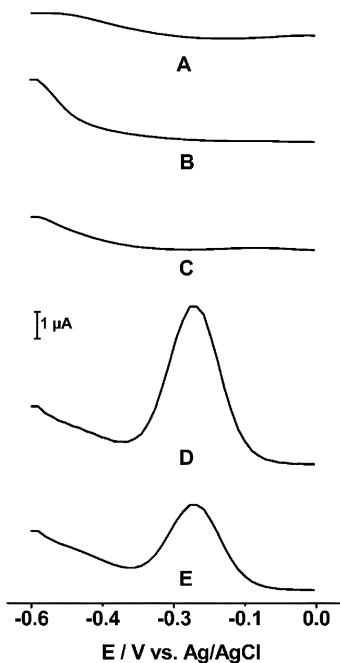


Fig. 2 SWV signals at a (A) bare gold electrode, (B) gold electrode with SAM (6-mercaptop-1-hexanol), (C) gold electrode with immobilized probe SAM, (D) gold electrode with SAM of immobilized probe and 6-mercaptop-1-hexanol after hybridization with the signalling oligo, (E) gold electrode with immobilized probe and hybridized signalling oligo after 90 min displacement in 100 nM target solution. All measurements were conducted at room temperature in Tris-buffer containing 100 nM signalling oligo.

signalling strand is replaced to a certain degree and hence the response is declining. This way, any modification of the target is not necessary. This permits fast, cheap and easy sequence-specific DNA detection.

Fig. 3 exhibits the effect of assay time and repetitive square-wave voltammetric scans upon the response of the $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -modified signalling strands hybridized with the immobilized capture probes. A decline is observed whenever a potential of

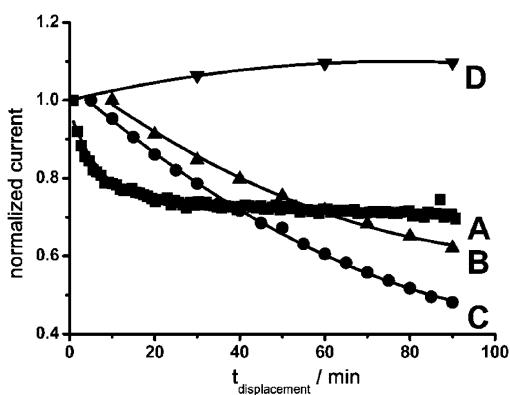


Fig. 3 Normalized SWV response of the probe-modified gold electrode in Tris-buffer containing 100 nM signalling oligo. The measurements were performed at 20 °C in (A) 1 min, (B) 10 min, (C) 5 min and (D) 30 min intervals. Between the measurements, a standby potential of -0.5 V was applied, except for (D).

-0.5 V is applied between the measurements (Fig. 3A–C). The complex with osmium(IV) does not seem to be stable. We assume that the osmium(IV) complex is prone to hydrolysis, which leads to loss of the covalent label. In contrast, if no potential is applied after each scan, the voltammetric response stabilizes slightly above the initial value (Fig. 3D). This indicates that the osmium(VI) complexes are stable over a long time, which corresponds with the previous experiences. After leaving the probe-modified electrode in the signalling oligo solution overnight, we expected the hybridization process to reach a steady state. Nevertheless you can see a small increase of the signal (Fig. 3D). We suppose that this is due to a small movement of the SAM structure as described before²⁸ caused by the first electrochemical measurements. Such movement permits more signalling oligos to hybridize with the immobilized probe leading to the small observed increase. DNA modified with the complex $[\text{Os}^{\text{VI}}\text{O}_4(\text{bipy})]$ can be stored for months in the fridge without losing the covalent labels.

Fig. 4 demonstrates the displacement effect at the capture probe-modified gold electrode if 100 nM of the complementary target is added to 100 nM signalling probe solution (Fig. 4D). A 50% equilibrium response can be expected due to equal occupancy of both signalling probe and unmodified target. This state is seemingly approached after a 90 min assay time. In contrast, 100 nM non-complementary strands lead to only 10% decrease of the voltammetric signal after 90 min (Fig. 4B). Even 30 min suffice for a significant discrimination between fully and non-complementary DNA. A strand with a single base mismatch yields a 30% decreased response, which makes it distinguishable from both non-complementary and target strand (Fig. 4C). However, the discrimination between the target and 1-base-mismatch is more affected by the comparably large standard deviation. Only repetitive measurements allow observation of a statistically significant difference. These relatively large standard deviations result from the manual preparation of the probe SAMs. Whereas measurements within a single series are well reproducible, we find a considerable statistical deviation between series measured in repetition with newly prepared probe SAMs. We expect a great improvement of this situation, if the working

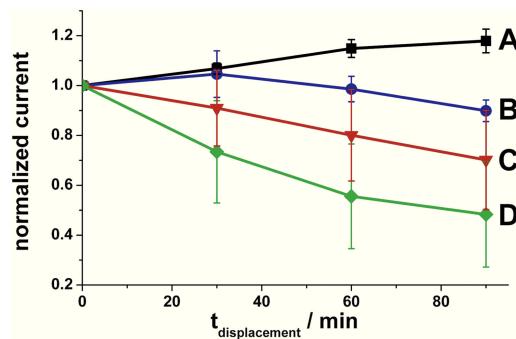


Fig. 4 Effect of displacement time upon the normalized SWV response of blank (A), 100 nM non-complementary target (B), 100 nM 1-base-mismatched target (C), and 100 nM complementary target (D). All measurements have been performed in 10 mM Tris-buffer with 100 nM signalling oligo at 35 °C. The error bars represent the standard deviation of measurements obtained in 3 independent series, each with a freshly prepared probe SAM.

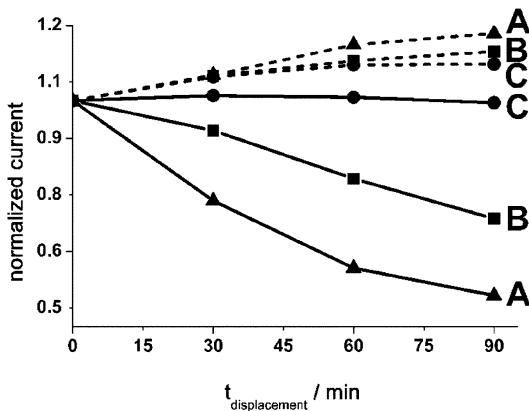


Fig. 5 Effect of displacement time upon the normalized SWV response of blank (dashed lines) and 100 nM target (solid lines) at (A) 35 °C, (B) 20 °C and (C) 5 °C. All measurements were performed in Tris-buffer containing 100 nM signalling oligo.

electrodes are automatically cleaned and modified (*e.g.* spotter device, electrode array).

These results show that unmodified target DNA sequences can be detected specifically on gold electrodes by means of immobilized capture probes under the displacement of [OsO₄(bipy)]-modified signalling probes.

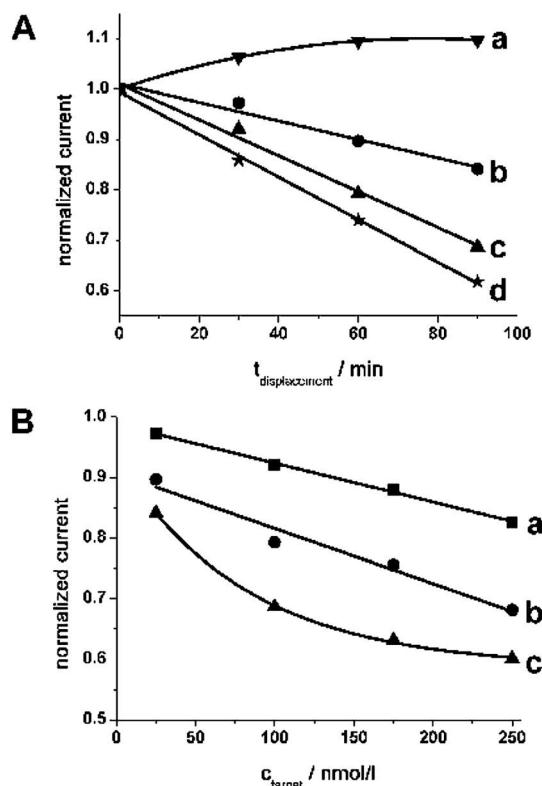


Fig. 6 Effect of (A) displacement time upon the normalized SWV signals of blank (a), 25 nM (b), 100 nM (c), and 250 nM (d) target, and (B) target concentration upon the normalized SWV signals following 30 min (a), 60 min (b) and 90 min (c) hybridization with the capture probe. All measurements were performed at 20 °C in Tris-buffer with 100 nM signalling oligo.

Fig. 5 shows how temperature affects the displacement process. The 50% equilibrium is reached faster if the experiment is performed at 35 instead of 20 °C bulk electrolyte temperature. At 5 °C, however, no significant displacement is observed (Fig. 5C). This corresponds to earlier findings where the normal hybridization of capture probes and covalently labelled target strands was dramatically affected by temperature.²⁹

Fig. 6 exhibits the effect of target concentration upon the voltammetric response of the [OsO₄(bipy)]-modified signalling strand. The signal decrease at 3 different target concentrations is displayed in Fig. 6A. Whereas a 50% equilibrium can be expected at 100 nM, which is equimolar to the signalling probe, 25 nM target should lead to a smaller and 250 nM to a higher decrease, respectively. However, the final state could not be reached at room temperature within the 90 min assay time. Linear calibration plots can be obtained if the displacement time is 60 min or less (Fig. 6B).

Conclusions

Signalling probe strands which are covalently labelled with the complex [OsO₄(bipy)] allow the detection of low concentrations of target DNA. Discrimination of single base mismatches is possible. We think that this approach of sequence-specific DNA detection is very useful for several reasons. Firstly, the modification of the signalling oligo can be performed in every laboratory. No expensive instruments are needed and additionally, the chemicals are cheap. Secondly, the prepared electrodes can be stored in the fridge for weeks. As soon as the sample with the target DNA is available, the electrodes can be used directly and without any further preparation (*e.g.* labelling of the target DNA). Thirdly, we think it is advantageous if the end user does not need to handle osmium(VIII) compounds in the millimolar concentration range. The labelled signalling strands, and thus, the ready-to-use biosensors contain only trace amounts of osmium(VI).

Acknowledgements

The authors are grateful to the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for financial support (projects FL 384/7-1 and 8-1)

References

- E. Palecek, E. Lukasova, F. Jelen and M. Vojtiskova, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1981, **8**, 497.
- E. Lukasova, F. Jelen and E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.*, 1982, **1**, 53.
- E. Palecek and M. A. Hung, *Anal. Biochem.*, 1983, **132**, 236.
- E. Lukasova, M. Vojtiskova, F. Jelen, T. Sticzay and E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.*, 1984, **3**, 175.
- E. Palecek and M. Fojta, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 74A.
- E. Palecek, *Methods Enzymol.*, 1992, **212**, 139.
- E. Palecek, M. Fojta and F. Jelen, *Bioelectrochemistry*, 2002, **56**, 85.
- M. Fojta, L. Havran, S. Billova, P. Kostecka, M. Masarik and R. Kizek, *Electroanalysis*, 2003, **15**, 431.
- M. Fojta, L. Havran, M. Vojtiskova and E. Palecek, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 6532.
- P. Kostecka, L. Havran, H. Pivonkova and M. Fojta, *Bioelectrochemistry*, 2004, **63**, 245.
- B. Yosypchuk, M. Fojta, L. Havran, M. Heyrovsky and E. Palecek, *Electroanalysis*, 2006, **18**, 186.
- G.-U. Flechsig and T. Reske, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 2125.
- J. Peter, T. Reske and G.-U. Flechsig, *Electroanalysis*, 2007, **19**, 1356.

- 14 M. Fojta, P. Kostecka, M. Trefulka, L. Havran and E. Palecek, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 1022.
- 15 T. Reske, M. Mix, H. Bahl and G.-U. Flechsig, *Talanta*, 2007, **74**, 393.
- 16 M. Mix, T. Reske, H. Duwensee and G.-U. Flechsig, *Electroanalysis*, 2009, DOI: 10.1002/elan.200804493.
- 17 H. Sopha, F. Wachholz and G.-U. Flechsig, *Electrochem. Commun.*, 2008, **10**, 1614.
- 18 P. Liepold, H. Wieder and H. Hillebrandt, *Bioelectrochemistry*, 2005, **67**, 143.
- 19 M. Mir and I. Katakis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **381**, 1033.
- 20 Q. Q. Li, G. Y. Luan and Q. P. Guo, *Nucleic Acids Res.*, 2002, **30**, e5.
- 21 M. Mir, P. Lozano-Sánchez and I. Katakis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **391**, 2145.
- 22 P. Liepold, T. Kratzmüller, N. Persike, M. Bandilla, M. Hinz, H. Wieder, H. Hillebrandt, E. Ferrer and G. Hartwich, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **391**, 1759.
- 23 M. Shoaib, S. Baconnais, U. Mechold, E. Le Cam, M. Lipinski and V. Ogryzko, *BMC Geomics*, 2008, **9**, 415.
- 24 C. J. Yu, Y. Wan, H. Yowanto, J. Li, C. Tao, M. D. James, C. L. Tan, G. F. Blackburn and T. J. Maede, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 11155.
- 25 B. Elsholz, R. Worl, L. Blohm, J. Albers, H. Feucht, T. Grunwald, B. Jurgen, T. Schweder and R. Hintsche, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 4794.
- 26 F. Lucarelli, S. Tombelli, M. Minunni, G. Marrazza and M. Mascini, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **609**, 139.
- 27 G.-U. Flechsig and T. Reske, *DE-Pat.*, 10 2005 039 726 B3, 2005.
- 28 S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson, L. D. McPherson, A. B. Potter, E. M. Spain, M. J. Allen and M. G Hill, *Langmuir*, 1998, **14**, 6781.
- 29 G.-U. Flechsig, J. Peter, G. Hartwich, J. Wang and P. Gründler, *Langmuir*, 2005, **21**, 7848.

8.4 Hybridization detection of osmium tetroxide bipyridine labelled DNA and RNA on heated gold wire electrodes

Electroanalysis 25, 2013, 373 – 379

Martin Jacobsen, Gerd-Uwe Flechsig

DOI: 10.1002/elan.201200460

Hybridization Detection of Osmium Tetroxide Bipyridine-Labeled DNA and RNA on Heated Gold Wire Electrodes

Martin Jacobsen,^a Gerd-Uwe Flechsig^{*a, b}

^a University of Rostock, Department of Chemistry, D-18051 Rostock, Germany

^b Gensoric GmbH, Schillingallee 68, D-18057 Rostock, Germany

phone +49-381-4986470, fax +49-381-4986461

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

Received: August 23, 2012

Accepted: November 7, 2012

Published online: December 23, 2012

Abstract

We report about hybridization detection of different nucleic acids on capture probe-modified heated gold wire electrodes. We have compared three kinds of nucleic acid targets: DNA, uracil-conjugated DNA, and RNA. All three sorts of nucleic acids targets could be labeled with osmium tetroxide bipyridine, hybridized with immobilized DNA capture probes and then detected by square-wave voltammetry. Heating the gold electrode instead of the entire bulk hybridization solution leads to improved hybridization efficiency in most cases. The reason could be found in a thermal micro-stirring effect around the heated wire electrode. Also selectivity was improved. Mismatches could be discriminated for DNA and uracil-conjugated DNA targets. Mismatches in RNA strands, however, are more difficult to detect due to relatively stable secondary structures.

Keywords: DNA, RNA, Hybridization detection, Heated gold electrode, Square-wave voltammetry, SWV, Osmium tetroxide bipyridine

DOI: 10.1002/elan.201200460

Supporting Information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/elan.201200460>

1 Introduction

Electrochemical detection of the hybridization of nucleic acids strands is a promising alternative to optical techniques. The instrumentation needed is cheaper, less sophisticated and easier to handle. The whole analytical process is more elegant and directly provides electronic signals, which can be interpreted easily. Recent activity in this area has been frequently reviewed [1–7]. Much work has been conducted to find optimum strategies for the detection step itself. One promising approach is the use of redox labels, which are covalently attached to the target or reporter strand. To minimize undesired adsorption of nonspecific DNA or indicator molecules, the use of gold electrodes with thiol-linked probe self-assembled monolayers (SAMs) is a proven technology. Herne and Tarlov et al. started with surface Plasmon resonance, XPS, and radiolabeling studies of DNA immobilization and hybridization, where the probe strands were tethered onto gold using thiol linkers [8,9]. Applying DNA redox intercalators together with a DNA-SAM on gold electrodes, Barton et al. discuss direct charge transport through the DNA-double strand, and they have used this effect for the detection of base pair mismatches. The current flows between the electrode surface and indicator molecules, while it depends on number, type and position of the mismatches [10–12].

Electrochemical detection of DNA hybridization provides high sensitivity, especially if amplifying platforms based on enzyme labels [13] or nanoparticle tracers [14] are used. Lowest detection limits of 0.5 and 1.5 fM target were obtained using these methods [15,16].

Another amplifying technique applies conducting nanoparticles, which grow when treated with silver developing solution, tend to come into contact with one another, and close an electric contact. The latter is detected by conductivity measurements, yielding detection limits of 500 fM target [14]. Another key challenge to DNA chip technology is the acceleration of the hybridization process. One study of this topic uses so-called acoustic micromixing, where hybridization can be accelerated 5-fold [17].

The complex $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ has been utilized as an electrochemically reversible covalent DNA-label [18,19]. It reacts rapidly with the pyrimidine base thymine and less quickly with cytosine and uracil in the RNA [20,21]. 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 and RNA strands of any length with electrochemically active labels can thus be easily performed in the laboratory.

However, only single strands can be labeled this way. Furthermore, such modified nucleotides are unable to hybridize with matching strands such as probe oligos. Palecek et al. have studied these principles for some 30 years. 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 has been possible [22–25]. The steps of Os(VIII)-labeling, probe hybridization and electrochemical detection have in most cases been conducted in solution and separated surfaces, especially by means of magnetic beads [26–29].

Recently, we found that $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ can be utilized to label any thymine- or uracil-containing target strands without affecting their hybridization capability, if they had been protected by shorter oligonucleotides during the modification step [30]. Most recently, we were able to detect less than 0.9 % of maize MON810 in real flour samples [31].

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 [17]. 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 [32].

To manipulate DNA hybridization thermally, we have applied a probe-SAM-modified heated gold wire electrode. We saw a dramatic increase of the hybridization signals, if the hybridization was performed at higher temperatures [33]. In former studies, this technique of directly heated electrodes had been applied for the enhancement of heavy metal stripping analysis [34,35] and DNA adsorptive stripping analysis [36,37]. The mass transport as the limiting parameter for fast reactions like metal deposition is intensified up to 10-fold [34,35]. Furthermore, we could accelerate reaction or adsorption rates of kinetically inhibited processes like reduction of arsenic (V) or adsorption of dsDNA at carbon electrodes 30-fold and more, if we performed the accumulation step at elevated temperatures [36]. Fundamental and basic studies of heated electrodes have been reviewed recently [38]. Our heating device allows direct and indirect heating of a broad variety of electrode designs [39].

In this work we compare the hybridization reactions of DNA- and RNA-oligonucleotides at elevated hybridization temperatures. We have performed the reaction at heated gold-wire electrodes and compared the results with the heated bulk solution. Osmium tetroxide bipyridine has been used for the first time as a label covalently attached to the target RNA oligonucleotide for hybridization on gold-confined capture probes.

2 Experimental

2.1 Reagents and Instrumentation

Most of the chemicals were obtained from Fluka (Germany, Taufkirchen). Only sodium sulfate was purchased from Riedel de-Haën (Germany, Taufkirchen). The used DNA oligonucleotides (HPLC-purified) were obtained from Friz Biochem (Germany, Neuried), the RNA oligonucleotides were obtained from Microsynth (Balgach, Switzerland):

Capture probe

5'-AAGTCCTTGAGCTGATTTACTG-TATTTTTTTTTTTTTT [Dithio]₃-3'

DNA-target

5'-TTTTAATACAGTAAAATCAGCTCAAGGACTT-3'

DNA-target with one mismatch

5'-TTTTAATACAGTAAAATC**A**CTCAAGGACTT-3'

Protective strand

5'-AAGTGTGACCTGATTTACTGCATT-3'

Non complementary target

5'-TTTTGCTGGCAATGGCAAAGGATGTT-3'

DNA target with deoxyuridine

5'-UUUUUAATACAGTAAAATC**A**CTCAAG-GACTT-3'

DNA deoxyuridine-target with one mismatch

5'-UUUUUAATACAGTAAAATC**A**CTCAAG-GACTT-3'

Noncomplementary DNA deoxyuridine target

5'-UUUUGCTGGCAATGGCAAAGGATGTT-3'

RNA-target

5'-UUUUUAUACAGUAAAUAUGAGCUAAGGA-CUU-3'

RNA-target with one mismatch

5'-UUUUUAUACAGUAAA**A**UCAGCUAAAGA-CUU-3'

The probe strand contained 15 thymine bases as a spacer to allow high hybridization efficiency on the electrode surface. All electrochemical measurements were performed in a 3-electrode system using a μ -Autolab (Metrohm AG, Filderstadt, Germany). The used reference electrode was an Ag/AgCl-(3 M KCl) reference electrode (Metrohm) and the counter electrode was a glassy carbon electrode (Metrohm). A modified gold wire (ca. 5 mm long, 25 μm in diameter) has been used as the working electrode. All measurements have been performed in a glass cell from Metrohm. The bulk solution

temperature during the hybridization process was controlled by means of a thermostat type 9105 (Thermo Scientific, Waltham, USA). A lab-made electrode heating generator (as described earlier [39]) was used to heat the gold wire electrode as stated below.

2.2 Preparation of the Labeled Targets

The labeling procedure with $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ by means of protective strands has been described in detail in earlier publications such as in [30] (and also in this paper: Scheme S1 in Supporting Information), and in [40,41]. We used the following procedure for DNA and RNA nucleotides to label the strands. In the first step, 100 μL unlabeled target oligo solution and 100 μL protective strand solution (each 100 μM dissolved in 10 mM Tris-buffer (Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer solution, pH 7.5) containing 0.5 M Na_2SO_4) were mixed together. After shaking the solution vigorously for 10 s, it was kept at room temperature for 3 hours. Then 20 μL 10 mM $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ were added to label the five unprotected 5'-terminal thymine-bases and left again for 3 hours at room temperature. In case of the RNA oligonucleotides the unprotected uracil-bases were labeled and the solution was kept for four hours, because the reaction of the uracil with the $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ is slower [21]. To remove the excess of $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$, the solution was divided into 4 fractions and each fraction was given into a dialysis cell (Slide-A-Lyser Mini Dialysis Units, USA, Rockford). Dialysis was performed against 500 mL Tris buffer for one hour, and again overnight after refreshing the Tris buffer. In the last step, the purified solution from dialysis cells was filled up to 1 mL with Tris buffer.

2.3 Preparation of the Electrode

Before each measurement the electrode was glowed in the air for one minute to clean the surface. Secondly, the electrode was cleaned electrochemically by using cyclic voltammetry (25 scans, -0.3 V to 1.65 V, scan rate

100 mV/s) in 0.5 M sulfuric acid. After rinsing the electrode with water and drying it in air, a 10 μL drop of the probe solution (containing 30 mM in Tris-buffer) was pipetted on the electrode, so that the whole wire surface was covered. The electrode was kept overnight in a water-saturated atmosphere. In the next step the electrode was dipped into a solution of 1 mM 6-mercaptop-1-hexanol for 1 hour to minimize non-specific adsorption. After rinsing it with water, the working electrodes modified with a ssDNA-SAM were used for hybridization experiments with the target strands. The counter and the reference electrodes were rinsed with RNase away (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in case of detecting RNA-targets.

2.4 Measurements

The electrochemical measurements were performed using square-wave voltammetry (SWV) with the following parameters: start potential -0.5 V, end potential 0 V, step potential 1.95 mV, amplitude 40 mV, frequency 55 Hz, scan rate 107 mV/s. For the blank measurements the prepared electrodes were used in the Tris buffer. For the hybridization the electrode was dipped in a target (DNA or RNA) solution containing 100 nM of the labeled DNA or RNA target for 30 min. After measuring the hybridization signals, the electrode was dipped into 50 °C water for 60 s to dehybridize the labeled target. After detecting the dehybridization signal, the electrode was used again for another hybridization reaction at a different temperature. After the last dehybridization the electrode was cleaned as described above.

3 Results and Discussion

Heated wire-electrodes enhance mass transport because of thermal convection. The resulting micro stirring effect was described earlier [35]. Figure 1 illustrates a comparison of a hybridization reaction of DNA in a stirred solu-

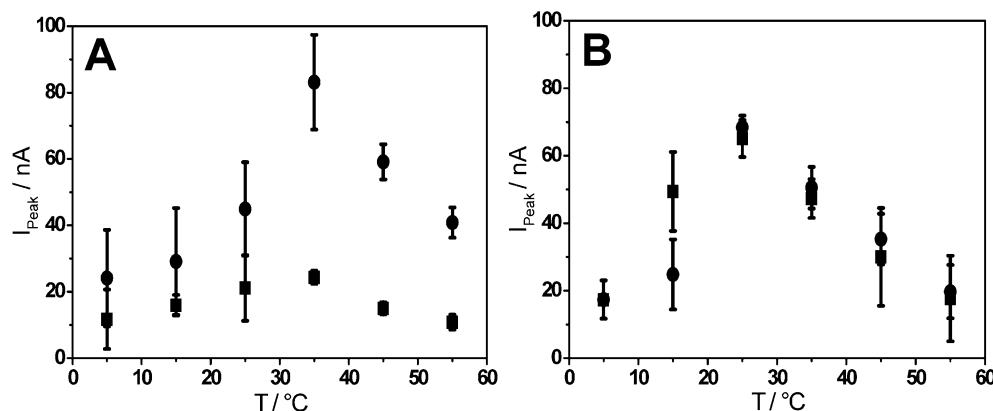


Fig. 1. Effect of not stirring the solution (square) and stirring (circle) during the hybridization of 100 nM DNA at different hybridization temperatures in a heated solution (A) and at heated electrodes (B). SWV-signals in 10 mM Tris + 0.5 M Na_2SO_4 ; step potential 1.95 mV; amplitude 40 mV; frequency 55 Hz; scan rate 107 mV/s.

tion and a non-stirred solution using a cold wire electrode with a heated hybridization solution (Figure 1A) and a heated electrode inside a cold hybridization solution (Figure 1B). The markers and error bars in this Figure represent the average of 5 different measurements series and according standard deviations. We can see a significant effect of the stirring in the heated solution (Figure 1A). The hybridization signals are up to 4-fold higher in the case of a stirred solution (circles) compared with a non-stirred solution (squares). This effect is much smaller in the case of a heated bulk solution (Figure 1B). Here, the signal height is almost at the same level. We get a two-fold higher signal at 15 °C hybridization temperature; however, at higher temperatures there is no difference between stirring and non-stirring conditions. We had found similar effects of a stirred solution and rotating disk electrode earlier [42]. The optimum temperature for these hybridization reactions is between 25 °C and 35 °C. In this temperature range the hybridization is most effective, because the interactions between the target strands are at a minimum. The immobilized probe strands are erected so that there are no folded strands on the electrode and the binding of the target strands is most effective at this temperature. At higher temperatures the double strand of probe and target starts to melt and the signal decreases. The melting points of DNA-targets like these were detected in our group earlier [43]. At temperatures higher than 70 °C, the SAM on the electrode will be damaged [33]. At temperatures below 15 °C, there are secondary structures in the oligonucleotides, which had to be broken to allow successful binding.

In Figure 2 we can see the difference in the hybridization signals on a heated wire electrode with a fully complementary target (squares), a target containing one mismatch (circles), and a fully non-complementary target (triangles). The signal of the complementary target is up

to 4 times higher compared with the mismatched target. The signal maximum is again between 25 °C and 35 °C. The difference in the signal height results from the different melting temperatures. The double strand of probe and full complementary target has a higher melting temperature than the double strand with the mismatched target. The binding of the complementary target to the probe is more stable and the hybridization is more effective compared with the mismatch-containing target. It is possible to separate complementary targets from those containing mismatches just by increasing the hybridization temperature. At higher temperatures even the double strand of the probe and the full complementary target melts and the signals decrease again. The fully non-complementary target strand did not yield any response in the temperature range tested. This demonstrates the excellent selectivity of the proposed heated DNA sensor coupled with the osmium tetroxide bipyridine labeling procedure.

This method can be used as a DNA-assay for detecting unknown targets. The sensor can be easily prepared in the lab just by immobilization of a capture-probe strand with a well-known base-pair sequence. The complementary target strand can bind to that probe. This process is much easier at elevated temperatures and it is more gentle for the analytes to achieve this temperature non-isothermally, i.e. with a heated electrode. Because of the well-known length of the probe strand it is possible to calculate the melting temperatures of a fully complementary double strand of probe and target compared to one containing mismatches. The chosen temperature should be higher than the melting point of a miss match double strand but lower than the complementary one and with these conditions it is possible to separate them even in an unknown solution. We have compared the large differences in melting temperatures between homogenous and surface-confined hybridization, and even between bulk heating and electrode heating earlier [43]. There we described that melting temperatures of surface-confined double strands are much lower than in homogeneous solution. They are lowest at heated electrodes.

The complex $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ can not only bind to DNA but also to RNA. It also reacts with the nucleobase uracil. To check if it is possible with such an RNA target to do hybridization experiments we firstly tested a DNA target with 5 uracil bases at the 5'-end of the strand, which were modified with the osmium label. Figure 3 displays hybridization studies with several DNA targets containing such modified uracils. It demonstrates the effect of different temperatures during the hybridization process with a heated solution (squares) and a heated electrode (circles). The fully non-complementary targets again did not yield SWV signals (triangles). We compared a full complementary target (Figure 3A) with a target containing one mismatch (Figure 3B). Although hybridization experiments were successful with a uracil-modified target, the signals were much smaller compared to usual DNA (10 nA for U-DNA compared to 35 nA in a DNA

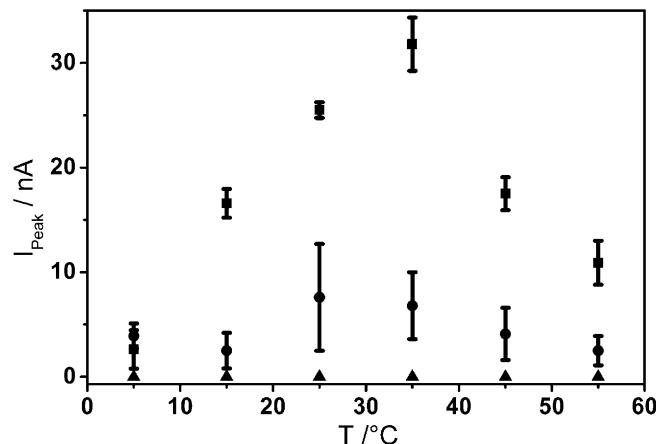


Fig. 2. Hybridization of a DNA target at different temperatures at a heated electrode with a fully complementary target (square), a target containing one mismatch (circle), and a fully non-complementary target (triangle). SWV-signals recorded in 10 mM Tris + 0.5 M Na_2SO_4 ; step potential 1.95 mV; amplitude 40 mV; frequency 55 Hz; scan rate 107 mV/s.

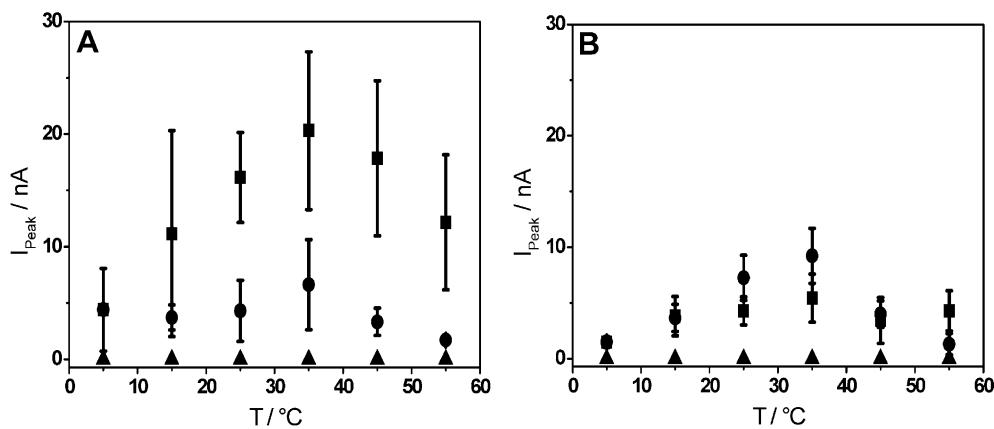


Fig. 3. DNA-target with labeled uracil. Hybridization of a fully complementary target (A) and a target containing one mismatch (B) at different temperatures with a heated solution (square) and heated electrode (circle). SWV-signals in 10 mM Tris + 0.5 M Na₂SO₄; step potential 1.95 mV; amplitude 40 mV; frequency 55 Hz; scan rate 107 mV/s.

target). We found higher signals in the case of using a heated wire compared to the heated solution because of the micro stirring effect of a heated electrode and the resulted higher mass transport to the electrode. Even in the case with a uracil-modified target it was possible to discriminate a complementary strand from a mismatched strand.

We also tried to hybridize DNA capture probes with RNA target-strands. Figure 4 exhibits the SWV hybridization signals of an osmium-modified RNA-strand. It compares the results on a heated hybridization solution (squares) and a heated electrode (circles). We found voltammetric signals of about 7 nA. A non-labeled RNA-strand does not yield any signal (data not shown). That means that it is possible to do hybridization experiments with modified RNA. The substantial error bars resulted from the instability of the RNA. The signals of the heated electrode are similar compared to the heated hybridization solution. Figure 4B illustrates the results of a single-base-mismatched RNA-target hybridization ex-

periment shown. It was not possible to discriminate the complementary RNA-strand (Figure 4A) from the mismatched strand. In both cases we got signals at about 8 nA in the maximum. Most probably, the secondary structures of RNA made it difficult to obtain best selectivity at this stage of investigation. In general, RNA is more prone to secondary structure formation compared with DNA, due to additional OH-groups of the ribose units that lead to an increased H-bonding ability.

It seems also possible, that the RNA was degraded during the process. Even if we worked with autoclaved cells and RNase-free electrodes (the electrodes were rinsed with RNase-away) it is really difficult to work 100% RNase-free.

Figure 5 displays SWV signals of the different sorts of targets investigated in this paper. The DNA strands with modified thymine bases yielded the highest responses. Both kinds of uracil-containing nucleic acids targets yielded significantly lower SWV response. Also selectivity against mismatched and fully noncomplementary targets

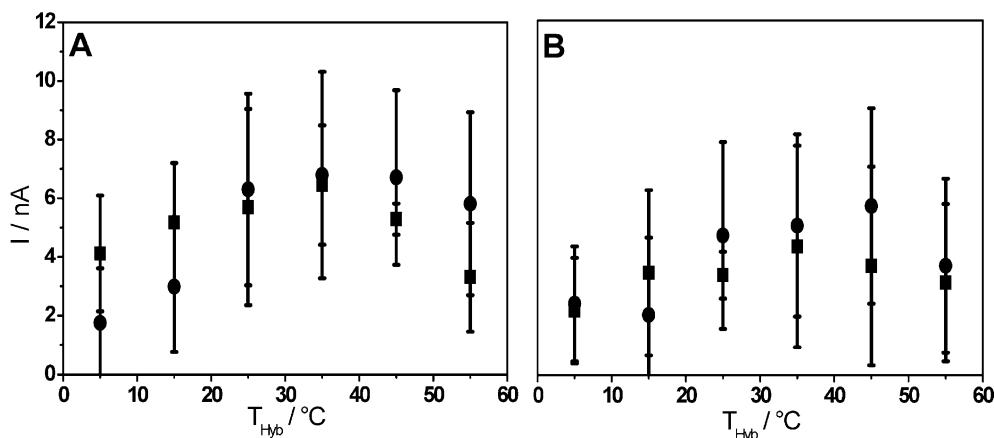


Fig. 4. Hybridization of 100 nM RNA at different hybridization temperatures with a heated solution (square) and a heated electrode (circle) compared fully complementary (A) and 1 mismatch (B). SWV-signals in 10 mM Tris + 0.5 M Na₂SO₄; step potential 1.95 mV; amplitude 40 mV; frequency 55 Hz; scan rate 107 mV/s.

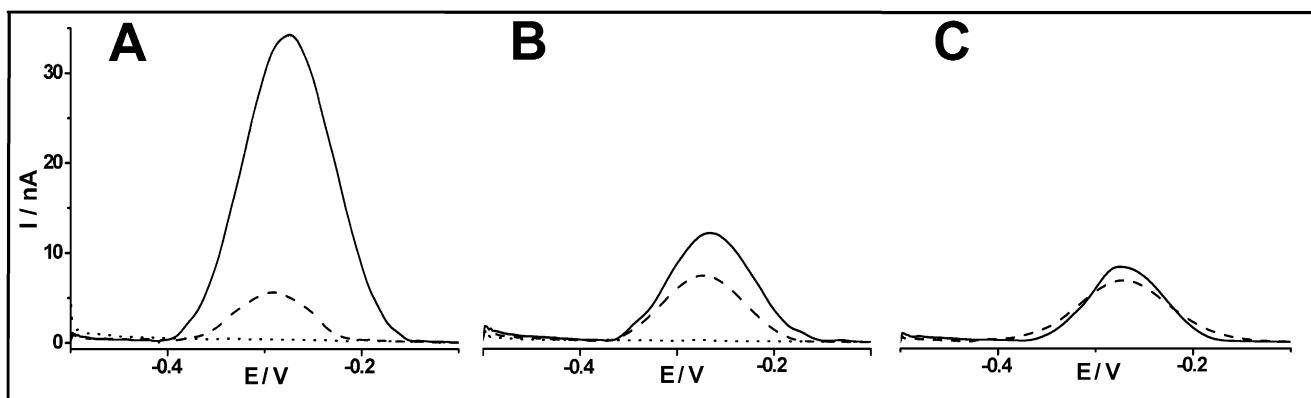


Fig. 5. SWV-Signals of the hybridization reactions at heated electrodes of DNA-target (A), DNA target with labeled uracil bases (B) and RNA-target (C). The signals show the complementary target (solid-line), a target containing 1 mismatch (dashed) and a non complementary target (dotted). In 10 mM Tris-buffer + 0.5 M Na₂SO₄; step potential 1.95 mV; amplitude 40 mV; frequency 55 Hz; scan rate 107 mV/s. All signals were baseline corrected with a moving average (peak width of 0.005) and smoothed acc. to Savitzky-Golay (level 4).

was lower compared to DNA. In case of RNA, it might be helpful to perform modification reactions at higher temperatures to avoid self-protection of the strands due to secondary structures. The potential of the SWV response, as well, is very similar for all sorts of nucleic acids tested here. The values also correspond to earlier findings [30]. This signal is caused by the redox couple Os(IV)/Os(VI) of the covalently attached osmium tetroxide bipyridine label.

4 Conclusions

We found that hybridization in a stirred solution leads to an increase of the voltammetric signals. This effect was minimized by using a heated electrode due to the thermoconvective microstirring effect, and therefore, a higher mass transport to the electrode. We found an optimal 35 °C hybridization temperature. At higher temperatures, the double strand of probe and target starts melting, at lower temperatures there will be secondary structures and the target cannot bind quick and completely. We could, for the first time, label the nucleobase uracil with the complex [OsO₄(bipy)] and perform hybridization with an immobilized DNA probe at a gold electrode. These hybridization signals are smaller compared to the modified thymine but it is still possible to perform hybridization experiments with Au-surface-confined DNA capture probes. In both cases we could discriminate complementary targets from those containing one mismatch. Even RNA-strands can be labeled with that complex and then specifically hybridized with a DNA capture probe. Thus, target labeling with osmium tetroxide bipyridine using protective strands proved useful also for RNA detection on gold electrodes. Heated electrodes allow to choose the target length and ionic strength you want. It is not longer necessary to design capture probes in order to be able to attain stringency at room temperature. Temperature is

now a degree of freedom rather than a compromised hybridization parameter.

Supporting Information available: Scheme S1 depicting the labeling approach using protective strands.

Acknowledgment

The authors are grateful to the *Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)* for financial support (DFG FL 384/11-1, FL 384/7-1 Heisenberg Fellowship).

References

- [1] J. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *469*, 63.
- [2] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1192.
- [3] E. Palecek, M. Bartosik, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3427.
- [4] T. S. Dhahi, U. B. Hashim, N. M. Ahmed, A. M. Taib, *J. Optoelectron. Adv. Mater.* **2010**, *12*, 1857.
- [5] J. Wang, *Microchim. Acta* **2012**, *177*, 245.
- [6] T. Gan, S. S. Hu, *Microchim. Acta* **2011**, *175*, 1.
- [7] D. Mandler, S. Kraus-Ophir, *J. Solid State Electrochem.* **2011**, *15*, 1535.
- [8] K. A. Peterlinz, R. M. Georgiadis, T. M. Herne, M. J. Tarlov, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3401.
- [9] T. M. Herne, M. J. Tarlov, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8916.
- [10] S. O. Kelley, E. M. Boon, J. K. Barton, N. M. Jackson, M. G. Hill, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 4830.
- [11] E. M. Boon, D. M. Ceres, T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1096.
- [12] E. M. Boon, J. K. Barton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 320.
- [13] D. J. Caruana, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 769.
- [14] S. J. Park, T. A. Taton, C. A. Mirkin, *Science* **2002**, *295*, 1503.
- [15] Y. C. Zhang, H. H. Kim, A. Heller, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3267.

- [16] J. Wang, D. K. Xu, R. Polksy, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4208.
- [17] R. H. Liu, R. Lenigk, R. L. Druyor-Sanchez, J. N. Yang, P. Grodzinski, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1911.
- [18] E. Palecek, M. Fojta, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 74A.
- [19] M. Fojta, L. Havran, R. Kizek, S. Billova, *Talanta* **2002**, *56*, 867.
- [20] E. Palecek, *Methods Enzymol.* **1992**, *212*, 139.
- [21] T. Reske, A. E. Surkus, H. Duwensee, G.-U. Flechsig, *Microchim. Acta* **2009**, *166*, 197.
- [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] B. Yosypchuk, M. Fojta, L. Havran, M. Heyrovsky, E. Palecek, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 186.
- [30] G.-U. Flechsig, T. Reske, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2125.
- [31] M. Mix, J. Rüger, S. Krüger, I. Broer, G.-U. Flechsig, *Electrochim. Commun.* **2012**, *22*, 137.
- [32] R. G. Sosnowski, E. Tu, W. F. Butler, J. P. O'Connell, M. J. Heller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 1119.
- [33] G.-U. Flechsig, J. Peter, G. Hartwich, J. Wang, P. Grundler, *Langmuir* **2005**, *21*, 7848.
- [34] T. Zerihun, P. Grundler, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *415*, 85.
- [35] G. U. Flechsig, O. Korbut, S. B. Hocevar, S. Thongngamdee, B. Ogorevc, P. Grundler, J. Wang, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 192.
- [36] J. Wang, P. Grundler, G.-U. Flechsig, M. Jasinski, G. Rivas, E. Sahlin, J. L. L. Paz, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3752.
- [37] J. Wang, G.-U. Flechsig, A. Erdem, O. Korbut, P. Grundler, *Electroanalysis* **2004**, *16*, 928.
- [38] P. Grundler, G. U. Flechsig, *Microchim. Acta* **2006**, *154*, 175.
- [39] F. Wachholz, J. Gimsa, H. Duwensee, H. Grabow, P. Grundler, G. U. Flechsig, *Electroanalysis* **2007**, *19*, 535.
- [40] T. Reske, M. Mix, H. Bahl, G.-U. Flechsig, *Talanta* **2007**, *74*, 393.
- [41] M. Mix, T. Reske, H. Duwensee, G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 826.
- [42] J. Peter, T. Reske, G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1356.
- [43] A. E. Surkus, G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1119.

8.4 Elektrochemischer Sensor

Patentanmeldung DE102011109402-A1; WO2013017635-A1

Gerd-Uwe Flechsig, Anne Walter, Martin Jacobsen

(19)



Deutsches
Patent- und Markenamt



(10) DE 10 2011 109 402 A1 2013.02.07

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 10 2011 109 402.8

(51) Int Cl.: G01N 27/30 (2011.01)

(22) Anmeldetag: 04.08.2011

(43) Offenlegungstag: 07.02.2013

(71) Anmelder:

Universität Rostock, 18055, Rostock, DE

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

(74) Vertreter:

Uexküll & Stolberg, 22607, Hamburg, DE

FLECHSIG, G.-U. [et al.]: DNA Hybridization
Detection at Heated Electrodes. In: Langmuir Vol.
21, 2005, S. 7848-7853.

(72) Erfinder:

Flechsig, Gerd-Uwe, Dr. rer. nat., 17166, Teterow,
DE; Walter, Anne, Dipl.-Chem., 18182, Bentwisch,
DE; Jacobsen, Martin, Dipl.-Chem., 18057,
Rostock, DE

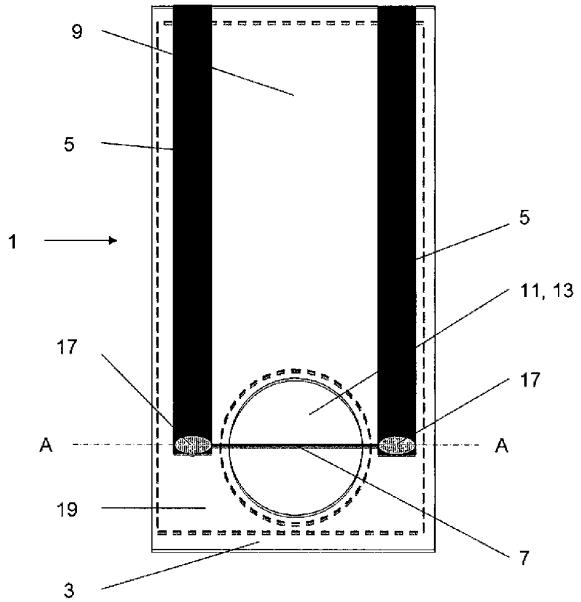
JACOBSEN, M. [et al.]: Directly Heated
Bismuth Film Electrodes Based on Gold
Microwires. In: Electroanalysis, Vol. 22, 2010,
Issue 13, S. 1483-1488.

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: Elektrochemischer Sensor

(57) Zusammenfassung: Dargestellt und beschrieben ist ein elektrochemischer Sensor (1) mit einem Basiselement (3) aus elektrisch isolierendem Material mit einer planaren Oberfläche (9), und einem Paar von Leitern (5), die auf dieser planaren Oberfläche (9) des Basiselements (3) aufgebracht sind, wobei die beiden Leiter (5) des Paares durch mindestens eine drahtförmige elektrochemische Arbeitselektrode (7) verbunden sind. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Sensor-Array (21), das mehrere zuvor beschriebene Sensoren (1) aufweist, und ein Verfahren zur Beschichtung einer Arbeitselektrode (7) eines zuvor beschriebenen Sensors (1).



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft einen elektrochemischen Sensor mit einem Basiselement aus elektrisch isolierendem Material mit einer planaren Oberfläche, und einem Paar von Leitern, die auf dieser planaren Oberfläche des Basiselements aufgebracht sind, wobei die beiden Leiter des Paares durch mindestens eine drahtförmige elektrochemische Arbeitselektrode verbunden sind. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Sensor-Array, das mehrere zuvor beschriebene Sensoren aufweist, und ein Verfahren zur Beschichtung einer Arbeitselektrode eines zuvor beschriebenen Sensors.

[0002] Sensoren dieser Art können zur Analyse unterschiedlicher Flüssigkeiten verwendet werden. Durch eine elektrochemische Reaktion bestimmter Inhaltsstoffe der Flüssigkeit an der Oberfläche der Arbeitselektrode bzw. deren Beschichtung ändert sich der durch die Oberfläche der Arbeitselektrode fließende Elektrolysestrom, welcher im Rahmen der Voltammetrie oder Amperometrie gemessen werden kann, wodurch Rückschlüsse auf die erfolgte Reaktion und somit auf einen bestimmten Inhaltsstoff der Flüssigkeit erlaubt sind. Solche Inhaltsstoffe können beispielsweise DNA, RNA, aber auch Quecksilber, Arsen, Cadmium oder Phenolderivate oder viele andere elektrochemisch aktive Stoffe sein.

[0003] WO 2007/020093 lehrt Grundlagen des elektrochemischen Nachweises der DNA-Hybridisierung an einer Goldelektroden-Oberfläche z. B. mit Hilfe von Osmiumverbindungen. DE 10 2005 007 148 A1 beschreibt ein Analyseverfahren für Nukleinsäuren, welches die klassische Polymerasekettenreaktion (PCR) dahingehend modifiziert, dass die verschiedenen Schritte an unterschiedlichen beheizten Reaktionsflächen durchgeführt werden, wodurch eine gleichzeitige Analyse und Vervielfältigung möglich wird.

[0004] Vorrichtungen zur DNA-Hybridisierung an direkt geheizten Elektroden werden in Flechsig et al., 2005, Langmuir 21, 7848–7843 beschrieben. Insbesondere zeigt **Fig. 1** dieser Veröffentlichung einen Sensor nach dem Stand der Technik, bei dem eine Arbeitselektrode mit Hilfe eines Plastikstegs mit wenigen Mikrolitern einer Nukleinsäure-Lösung beschichtet werden kann, um anschließend eine Hybridisierung von komplementären Nukleinsäuren zu ermöglichen. Typischerweise stehen insbesondere bei der Nukleinsäureanalytik keine großen Mengen der Beschichtungslösung zur Verfügung, so dass ein freies Eintauchen der Elektrode in eine solche Lösung ausscheidet.

[0005] Die in Flechsig et al., 2005, geleherte Lösung hat jedoch den Nachteil, dass ein Plastiksteg in die Vorrichtung eingebracht werden muss, um den Trop-

fen der Beschichtungslösung darauf abzusetzen, so dass dieser die ganze Oberfläche der drahtförmigen Elektrode benetzt. Dem Fachmann stellt sich dem gegenüber die Aufgabe, bei Erhaltung der Vorteile des Sensors eine konstruktiv einfachere Lösung zu finden, die dennoch eine gleichmäßige Beschichtung der Elektrode auch mit einem geringen Volumen einer Beschichtungslösung ermöglicht.

[0006] Dieses Problem wird durch die vorliegende Erfindung gelöst, insbesondere durch den Gegenstand der Ansprüche. Die Erfindung stellt insbesondere einen elektrochemischen Sensor (1) zur Verfügung, enthaltend:

- ein Basiselement (3) aus elektrisch isolierendem Material mit einer planaren Oberfläche (9), und
 - ein Paar von Leitern (5), die auf dieser planaren Oberfläche (9) des Basiselements (3) aufgebracht sind, wobei die beiden Leiter (5) des Paares durch mindestens eine bevorzugt drahtförmige Arbeitselektrode (7) verbunden sind,
- wobei in dieser planaren Oberfläche (9) des Basiselements (3) unter der Arbeitselektrode (7) eine Vertiefung (11) ausgebildet ist, wobei der Boden (13) der Vertiefung (11) von der Arbeitselektrode (7) beabstandet ist.

[0007] Bevorzugt ist die Vertiefung so ausgestaltet, dass bei Einbringung eines Flüssigkeitstropfens in die Vertiefung die Arbeitselektrode von der Flüssigkeit benetzt werden kann, wobei bevorzugt die gesamte Oberfläche der Arbeitselektrode benetzt werden kann. Eine gleichmäßige Benetzung ist vorteilhaft für die Analyse, denn es kann die gesamte Oberfläche der Elektrode beschichtet werden.

[0008] Dabei wird ausgenutzt, dass der Flüssigkeitstropfen aufgrund der Oberflächenspannung der Flüssigkeit bogenförmig aus der Vertiefung hinaus, d. h. über die Ebene, in der die Oberfläche des Basiselements liegt, hinweg ragt. Auf diese Weise kann z. B. eine drahtförmige Arbeitselektrode, die sich etwa auf der Höhe der Oberfläche des Basiselements erstreckt, vollständig von der Flüssigkeit umgeben werden. Die Vertiefung kann zusätzlich dazu dienen, den Flüssigkeitstropfen an einem festen Ort auf dem Basiselement zu fixieren.

[0009] Ein Flüssigkeitstropfen, der in die Vertiefung eingebracht wird und der die Arbeitselektrode vollständig umgibt, kann dazu verwendet werden, um die Arbeitselektrode z. B. mit Sonden oder Mikrostrukturen zu beschichten. Dieser Beschichtungsvorgang findet im Allgemeinen vor der eigentlichen Analyse einer Flüssigkeit statt. Dabei binden die Beschichtungsstoffe als Inhaltsstoffe der Beschichtungsflüssigkeit des Flüssigkeitstropfens an der Oberfläche der Arbeitselektrode an und bilden eine ggf. strukturierte Schicht z. B. von Sondenmolekülen. Nach-

dem der Flüssigkeitstropfen von der Arbeitselektrode wieder entfernt wurde, kann die Analyse einer Analyseflüssigkeit, welche die Zielmoleküle umfasst, erfolgen. Verfahren zur Beschichtung und Analyse sind z. B. aus WO 2007/020093 oder DE 10 2005 007 148 bekannt.

[0010] Bevorzugt ist es, wenn der Flüssigkeitstropfen ein Volumen von 5 bis 50 µL, vorzugsweise von 10 bis 30 µL oder 15 bis 20 µL aufweist. Diese Tropfengröße ermöglicht einen äußerst effektiven Beschichtungsvorgang. Es wird eine möglichst geringe Menge an Beschichtungsflüssigkeit benötigt, wobei dennoch ausreichend Beschichtungsstoffe, wie z. B. Sondenmoleküle oder Mikrostrukturen auf die Arbeitselektrode aufgebracht werden können. Es ist bevorzugt, wenn die Vertiefung so ausgestaltet ist, dass der Flüssigkeitstropfen die Oberfläche der Arbeitselektrode über deren gesamte Länge umgibt.

[0011] In einer Ausführungsform der Erfindung umfasst der Sensor einen Flüssigkeitstropfen, welcher Kontakt zu der Arbeitselektrode und zu dem Boden der Vertiefung aufweist. Dieser Flüssigkeitstropfen umfasst bevorzugt Nukleinsäuren, z. B. eine DNAsonde, welche zumindest teilweise einzelsträngig sein kann. Alternative Sondenmoleküle für einen immunchemischen Sensor können Antikörper sein.

[0012] Der erfindungsgemäße Aufbau des Sensors hat ferner den Vorteil, dass im Verlauf späterer Messungen die Flüssigkeit zwischen der Arbeitselektrode und dem Boden der Vertiefung strömen und somit frei um den vollen Umfang der drahtförmige Arbeitselektrode zirkulieren kann, so dass deren gesamte Oberfläche als Reaktionsfläche zur Verfügung steht.

[0013] Unter der Oberfläche der Arbeitselektrode wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Mantelfläche der Arbeitselektrode von dem Kontaktspurke der Arbeitselektrode mit einem der Leiter eines Paares bis zu dem gegenüberliegenden Kontaktspurke der Arbeitselektrode mit dem anderen Leiter eines Paares von Leitern verstanden. Die Kontaktspurke der Arbeitselektrode mit den Leitern sind so ausgeführt, dass eine elektrisch leitfähige Verbindung zwischen der Arbeitselektrode und den Leitern besteht. Erfindungsgemäß kommt z. B. eine Löt-, Klebe- oder Klemmverbindung in Betracht.

[0014] Die Leiter sind bevorzugt bis einschließlich zu den Kontaktstellen gegenüber der Umgebung isoliert, so dass auf dem Basiselement nur die Arbeitselektrode zur Umgebung frei ist, wobei deren Oberfläche somit mit einer Flüssigkeit direkt in Kontakt kommen kann.

[0015] Die Arbeitselektrode erstreckt sich bevorzugt im Wesentlichen geradlinig und in einer Ebene parallel zur Oberfläche des Basiselements, bevorzugt

im Wesentlichen in einer Ebene mit der Oberfläche des Basiselements. Die Vertiefung in dem Basiselement befindet sich im Wesentlichen unter der Arbeitselektrode, so dass diese von dem Basiselement beabstandet ist. Die Vertiefung kann eine runde oder auch eine längliche Ausdehnung aufweisen, welche im Wesentlichen parallel zu der Arbeitselektrode verlaufen kann. Dabei liegt die Projektion der Arbeitselektrode auf das Basiselement vorzugsweise auf der Mittellinie der Vertiefung.

[0016] Die Arbeitselektrode ist in einer bevorzugten Ausführungsform beheizbar, insbesondere direkt beheizbar. Um elektrochemische Messungen bei erhöhten Temperaturen durchführen zu können, kann durch Wasser bzw. den Elektrolyten als Wärmeüberträger die Elektrode beheizt werden. Dabei wird die gesamte Elektrolytmenge mit aufgeheizt. Das ist nachteilig, da erstens eine große Elektrolytmenge nötig ist, zweitens Temperaturwechsel sehr langsam erfolgen und drittens empfindliche Stoffe in der Elektrolytlösung in Mitleidenschaft gezogen werden können. Es können auch beheizte Elektroden zum Einsatz kommen, die z. B. mit Wechselstrom direkt oder mittels Wechsel- oder Gleichstrom indirekt zu heizen sind.

[0017] Bei einer indirekten Heizung kann die Arbeitselektrode aus mehreren galvanisch voneinander getrennten konzentrischen Schichten aufgebaut sein, wobei die äußerste Schicht als Elektrode und eine innere Schicht als Heizdraht dient. Eine indirekte Heizung mittels galvanisch von der Elektrode getrennten Heizern ist nachteilig, weil der Aufbau der Sensoren komplizierter ist, die Temperaturwechsel wegen der thermischen Trägheit meistens langsamer erfolgen und die Möglichkeiten der Miniaturisierung eingeschränkt sind. Unterschiedliche direkt beheizbare Arbeitselektroden, bei denen der Heizstrom sowie der Strom für das elektrochemische Messsignal gemeinsam denselben Leiter durchfließen, sind aus dem Stand der Technik bekannt.

[0018] Eine direkte elektrische Heizung der Arbeitselektrode und gleichzeitig störungsfreie elektrochemische Messung kann nach dem Stand der Technik durch eine sogenannte symmetrische Anordnung oder spezielle Filterschaltungen ermöglicht werden. Eine Variante der direkt beheizten Arbeitselektrode besitzt genau in der Mitte zwischen den beiden Kontaktspuren für die Zuleitung des Heizstroms einen dritten Kontakt für die Verbindung mit dem elektrochemischen Messgerät. Durch diese Anordnung werden störende Einflüsse des Heizstromes auf die Messsignale unterbunden. Nachteilig ist hier vor allem der komplexe Aufbau mit drei Kontaktspuren je Arbeitselektrode, die thermische Störung durch den Wärme ableitenden dritten Kontakt und die erschwerte Miniaturisierung. In einer erfindungsgemäß bevorzugten Variante erfolgt daher eine symmetrische Kontaktie-

rung durch eine Brückenschaltung, welche eine direkte Beheizung ermöglicht (Wachholz et al., 2007, *Electroanalysis* 19, 535–540, insbesondere Fig. 3; Dissertation Wachholz 2009).

[0019] Dabei ist der Sensor bevorzugt so ausgestaltet, dass die Temperaturverteilung an der Oberfläche der Arbeitselektrode gleichmäßig ist. DE 10 2004 017 750 lehrt z. B. ein Array mit mindestens einer auf einen Träger aufgebrachten Arbeitselektrode, die auf eine eigene Temperatur gebracht werden kann, wobei es möglich ist, die Temperaturverteilung der Elektrodenoberfläche gleichmäßig zu halten. Dies hat wesentliche Vorteile bei der Analytik z. B. von DNA-Sequenzen. Die in dieser Publikation genutzten Methoden können auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung genutzt werden. Insbesondere ist es bevorzugt, dass die Leiter und die Kontaktstellen zwischen Leitern und Arbeitselektrode elektrisch gegenüber der Umgebung isoliert sind.

[0020] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Leiter und die Kontaktpunkte des Leiters mit der Arbeitselektrode auf den nicht auf dem Basiselement aufgebrachten Seiten durch eine elektrisch isolierende Schicht abgedeckt. Bevorzugt ist diese Schicht mindestens in einem Temperaturbereich von 0°C bis 97°C, insbesondere von 20°C bis 93°C stabil. Die Schicht kann insbesondere eine Laminierfolie sein. Laminierfolien sind üblicherweise in dem genannten Temperaturbereich stabil.

[0021] Auf diese Weise kann auf dem Basiselement nur die Arbeitselektrode mit der Flüssigkeit in elektrischen Kontakt kommen. Das Basiselement kann also, z. B. bei der Analyse einer Flüssigkeit, vollständig von der Flüssigkeit bedeckt sein, ohne dass es zu ungewolltem elektrischen Kontakt der Flüssigkeit z. B. mit dem Leiter kommt. Nur die Arbeitselektrode selbst tritt mit der Flüssigkeit in Kontakt, so dass auch nur die Reaktionen an der Oberfläche der Arbeitselektrode elektrochemisch gemessen werden.

[0022] Statt Laminierfolie können auch Heißsiegelkleber, Epoxidharz, Polyesterharz, Siliconkleber, Lötklebstoff, Spannlack, Paraffin, Kautschuk, PVC, Duraplast, PU-Harz, PTFE, PE, PS, Polycarbonat, Glas, Oxide, Nitride oder andere organische oder anorganische Polymere, lackartige, kristalline oder amorphe Materialien als isolierende Schicht eingesetzt werden. Wichtig ist, dass das Material der isolierenden Schicht zwischen 0°C und 97°C temperaturstabil ist, insbesondere zwischen 20°C und 95°C oder zwischen 25°C und 93°C, da die Temperatur der Flüssigkeit sich während der Analyse bevorzugt in diesem Bereich bewegt. Stabil bedeutet, dass Form und Isolationseigenschaften im Wesentlichen konstant sind. Eine geringfügige Ausdehnung oder ähnliches ist möglich, sollte aber bei einem Temperaturwechsel reversibel sein.

[0023] Ein überraschender Vorteil der erfindungsgemäßen Anordnung der Arbeitselektrode über einer Vertiefung in dem Basiselement ohne direkten Kontakt zu diesem entlang der Vertiefung betrifft den Fall, dass die Arbeitselektrode beheizt wird. Die Erfinder haben erkannt, dass sowohl ein Energieverlust an das Basiselement als auch eine hohe thermische Trägheit der Arbeitselektrode ansonsten zu einem ungleichmäßigen Temperaturfeld der Arbeitselektrode und unpräzisen Messergebnissen bei der Analyse der Flüssigkeit führen. Die Vertiefung verhindert, dass Wärme an das Basiselement abgegeben wird und somit zum einen der Arbeitselektrode verloren geht und zum anderen eine verlangsamte Aufheizung und Abkühlung zur Folge hat.

[0024] Beheizt wird die Arbeitselektrode zum einen, um je nach Inhaltsstoff der Flüssigkeit, welcher nachgewiesen werden soll, eine optimale Reaktionstemperatur zu erzeugen, wobei der Analysevorgang effektiver und/oder selektiver wird. Soll z. B. eine Hybridisierung von Nukleinsäuren stattfinden, so gibt es – wie im Stand der Technik bekannt – eine optimale Temperatur für eine spezifische Anlagerung komplementärer Nukleinsäuren. Eine Denaturierung in Einzelstränge, welche z. B. eine Abtrennung der Analyten und damit eine Regenerierung der Sensoren ermöglicht, findet typischerweise bei hohen Temperaturen, z. B. bei 93°–97°C statt. Ferner führt eine Beheizung der Arbeitselektrode zu thermischen Konvektionsströmungen in der die Arbeitselektrode umgebenden Flüssigkeit, welche ebenfalls den Analysevorgang effektiver macht.

[0025] Das Basiselement ist in einer bevorzugten Ausführungsform eine Leiterplatte und die Leiter sind als Leiterbahnen ausgestaltet, wobei die Leiter und die Kontaktpunkte des Leiters mit der Arbeitselektrode auf den nicht auf dem Basiselement aufgebrachten Seiten durch eine isolierende Laminierfolie abgedeckt sind. Die Leiterplatte kann aus Silizium gefertigt sein und z. B. eine Dicke von 1–2 mm aufweisen. Die Leiterbahnen sind dabei vorzugsweise in die Leiterplatte eindotiert oder aufgedampft. Die Leiterbahnen können Kupfer enthalten oder daraus bestehen. Als Befestigungsmethode für die Arbeitselektrode kommt etwa Bänder, Löten, Kleben oder Schweißen in Frage. Die Arbeitselektrode kann z. B. durch aufgedampfte Goldplättchen mit den Leiterbahnen in Kontakt gebracht und an diesen befestigt werden.

[0026] Die Arbeitselektrode ist im Rahmen der Erfindung bevorzugt eine drahtförmige Elektrode. Diese weist bevorzugt einen kreisförmigen Querschnitt auf. Jedoch sind auch andere Querschnittsformen, wie z. B. dreieckige, viereckige, sechseckige Querschnittsformen oder auch verschiedene Helixquerschnitte denkbar. Der Querschnitt kann über die Länge der Elektrode konstant sein. Ebenso sind Querschnittsänderungen über die Länge der Arbeitselek-

trode in Bezug auf Durchmesser oder Querschnittsform denkbar. Auch drahtförmige Elektroden in Form einzelner Fasern können im Sinne der vorliegenden Erfindung zum Einsatz kommen, genauso wie andere aus dem Stand der Technik bekannten Querschnitte. Ein bevorzugter Querschnitt ist rund, bevorzugt bei einem Durchmesser von ca. 10–50 µm, bevorzugt ca. 20–30 µm oder insbesondere 25 µm. Der Widerstand der Arbeitselektrode liegt bei mindestens 0,5 Ohm, bevorzugt ca. 1 Ohm, jedoch kleiner als 20 Ohm, vorzugsweise kleiner als 10 Ohm.

[0027] Die Arbeitselektrode kann z. B. aus Gold, Silber, Kupfer, Platin, Iridium, Palladium, Bismut, Antimon und/oder Kohlenstoff, insbesondere aus Gold, Platin und/oder Silber bestehen. Bevorzugt ist die Arbeitselektrode ein Golddraht. Zum Beispiel kann ein thermisch robuster Platindraht mit einem relativ hohen Widerstand mit einer dünnen Goldschicht versehen sein, um Thiolverlinkte SAMs (self assembling monolayers) abzuscheiden. Die Arbeitselektrode kann mit einem Quecksilber- oder Amalgamfilm oder mit einem festen Metallfilm, z. B. aus Bismut, Silber, Gold oder einer Legierung daraus, beschichtet sein. Eine Beschichtung mit Bismut oder Quecksilber (insbesondere einem Amalgamfi1m) kann verwendet werden, um die Wasserstoffüberspannung herabzusetzen.

[0028] Es können auch Mikro- und/oder Nanostrukturen auf der Oberfläche der Arbeitselektrode vorhanden sein, um die aktive Elektrodenoberfläche zu erhöhen und/oder den Zutritt des Analyten zu verbessern. Bevorzugt werden dazu galvanische Silber- oder Goldstrukturen, Kohlenstoff-Nanoröhrchen, Fullerene oder Graphene eingesetzt. Verfahren zur Beschichtung mit Nanostrukturen sind z. B. in Wachholz et al., 2009, *Electroanalysis* 21, 2153) beschrieben.

[0029] Eine der genannten Beschichtungen kann mit einer Modifikation der Oberfläche z. B. mit Nukleinsäuren wie DNA-Sonden kombiniert werden, dies ist aber je nach Anwendungsgebiet nicht notwendig. Eine Modifikation mit Nukleinsäuren kann, wie im Stand der Technik beschrieben, kovalent oder nicht-kovalent sein. Insbesondere können über Thiolgruppen verlinkte DNA-Sonden auf die Oberfläche der Arbeitselektrode(n), z. B. aus Gold, aufgebracht sein.

[0030] Die Arbeitselektrode weist in einer bevorzugten Ausführungsform eine Länge von etwa 3 bis etwa 7 mm, vorzugsweise von etwa 5 mm, und einen Durchmesser von 10 bis 50 µm, bevorzugt 20 bis 30 µm oder von etwa 25 µm auf. Diese Ausmaße der Arbeitselektrode erlauben einerseits bei der Beschichtung der Arbeitselektrode mit Hilfe eines Flüssigkeitstropfens mit einem Volumen von 5 bis 50 µl, vorzugsweise von 10 bis 30 µl, oder von 15 bis 20 µl eine ideale Verteilung der Beschichtungsflüssigkeit um die Oberfläche der Arbeitselektrode und somit einen ef-

fektiven Beschichtungsvorgang. Andererseits bietet eine Arbeitselektrode dieser Abmessungen eine ausreichende Anzahl und Genauigkeit von Messergebnissen bei gleichzeitig möglichst geringer Baugröße, was eine Array-Anordnung des Sensors begünstigt.

[0031] In einer Ausführungsform ist der Boden der Vertiefung planar und parallel zu der planaren Oberfläche des Basiselements ausgestaltet. Der Rand der Vertiefung kann z. B. quadratisch, rechteckig, rund oder ellipsoid sein. Die Form der Vertiefung kann eine gleichmäßige, mittige Position des Flüssigkeitstropfens gewährleisten. In einer anderen Ausführungsform ist der Boden der Vertiefung abgerundet, z. B. in einer Form, die einen gleichmäßigen Abstand des Bodens zu der Arbeitselektrode gewährleistet. Es ist somit auch eine runde, z. B. sphärische oder zylindrischabschnittsförmige Gestalt der Vertiefung denkbar.

[0032] Bei der Herstellung des Sensors kann die Vertiefung z. B. unter der Arbeitselektrode ausgefräst werden, was eine einfache und automatisierbare Herstellung ermöglicht.

[0033] In einer bevorzugten Ausführungsform beträgt der Abstand der Arbeitselektrode von dem Boden der Vertiefung an mindestens einem Punkt, z. B. bei einem planaren Boden, oder an allen Punkten, eine Tiefe von 0,2 mm bis 0,8 mm, vorzugsweise von 0,5 mm, wobei sich die Vertiefung vorzugsweise über die ganze Länge der Arbeitselektrode erstreckt. Ein solcher Abstand der Arbeitselektrode von dem Boden der Vertiefung lässt bei minimaler Baugröße eine ausreichende Umströmung der Arbeitselektrode zu. Ideal ist der Abstand auch für die Beschichtung einer Arbeitselektrode mit einer Länge von 3 bis 7 mm, vorzugsweise von 5 mm, und einem Durchmesser von 20 bis 30 µm, vorzugsweise von 25 µm mit einem Flüssigkeitstropfen von 5 bis 30 µl, vorzugsweise von 10 bis 20 µl, da der Flüssigkeitstropfen die Arbeitselektrode in optimaler Gestalt umgibt.

[0034] Der Sensor oder das Sensorarray kann ferner mindestens eine gemeinsame Gegenelektrode und/oder mindestens eine gemeinsame Pseudoreferenzelektrode zum sequenziellen elektrochemischen Auslesen umfassen. Alternativ kann zum parallelen (simultanen) elektrochemischen Auslesen für jede Arbeitselektrode ihre jeweils eigene Referenz- und Gegenelektrode vorgesehen werden. Als Gegenelektrode wird vorzugsweise eine beliebig gestaltete ungeheizte Kohle-, Gold- oder Platinelektrode vorgesehen. Als Pseudoreferenzelektrode wird eine ungeheizte Silber-, Gold- oder Platinelektrode bevorzugt. Referenz- und/oder Gegenelektrode können auf dem gleichen Basiselement angeordnet sein oder separat.

[0035] Die bevorzugte Position der Pseudoreferenzelektrode befindet sich auf dem Boden der Vertiefung, (jeweils) unterhalb der geheizten Arbeitselek-

trode(n), weil dieser Bereich von der thermischen Konvektion am wenigsten beeinflusst wird und am ehesten eine konstante Temperatur behält, welche für ein konstantes Potential der Referenzelektrode wichtig ist. Auch die Gegenelektrode kann auf dem Boden der Vertiefung angeordnet sein.

[0036] Um den Effekt der thermischen Konvektionsströmung zu fördern, umfasst der Sensor vorzugsweise eine Kühlvorrichtung, welche gegenüber der Arbeitselektrode abseits des Basiselements angeordnet ist und welche die von der beheizten Arbeitselektrode erwärme Flüssigkeit während des Analysevorgangs wieder abkühlt und somit eine Zirkulationsströmung der Flüssigkeit hervorruft, die wiederum eine Reaktion der Zielmoleküle mit den Sondenmolekülen unterstützt. Die Kühlvorrichtung umfasst vorzugsweise einen passiven Kühlkörper oder einen aktiven Peltierkühler, der die Flüssigkeit gegenüber des Basiselements bedeckt und auf diese Weise zwischen Basiselement und Kühler einschließt. Die Unterseite des Kühlers kann dabei mit Gold oder Platin oder einem anderen elektrochemisch inertem Material beschichtet sein und dient vorzugsweise als gemeinsame Gegenelektrode.

[0037] Ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Sensors gegenüber der in Flechsig et al., 2005, gelehrt Lösung ist es, dass sich die Sensoranordnung leicht und mit geringem Raumbedarf zu einem Array aus einer Vielzahl von ggf. selektiv heizbaren drahtförmigen Arbeitselektroden erweitern lässt.

[0038] Noch ein weiterer Vorteil besteht darin, dass zur Unterbringung der Referenz- und Gegenelektrode der elektrochemischen Messzelle eine relativ geringe Elektrolytmenge erforderlich ist. Außerdem lassen sich Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode gemeinsam und platzsparend auf solch einem Array unterbringen.

[0039] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft daher ein Sensoren-Array, welches zwei oder mehr erfindungsgemäße Sensoren aufweist, wobei die Sensoren bevorzugt auf einem gemeinsamen Basiselement angeordnet sind. Durch die möglichst geringe Baugröße der Sensoren können eine Vielzahl von Sensoren eng hintereinander und/oder nebeneinander auf einem gemeinsamen Basiselement angeordnet werden. Die Leiterbahnen sind bevorzugt parallel und/oder symmetrisch eng nebeneinander liegend angeordnet und sind gemeinsam unter einer isolierenden Schicht versiegelt. Bei Analyse einer Flüssigkeit wird die gesamte Oberfläche des Basiselements mit allen darauf angebrachten Arbeitselektroden von der Flüssigkeit umgeben.

[0040] In einer Ausführungsform sind die Vertiefungen unter mindestens 2 Arbeitselektroden des Sensoren-Arrays miteinander zu einem gemeinsamen

Graben verbunden. Alternativ oder zusätzlich können die Vertiefungen unter mindestens 2 Arbeitselektroden voneinander getrennt sein.

[0041] Ein gemeinsamer Graben ist insbesondere dann nützlich, wenn die Arbeitselektroden über diesem Graben mit der gleichen Beschichtung, z. B. mit der gleichen Nukleinsäuresonde, versehen werden sollen. Dann kann ein Flüssigkeitstropfen, der entsprechend den Ausmaßen des Grabens und der Anzahl der Arbeitselektroden über diesem dimensioniert sein sollte, zur Beschichtung verwendet werden. Bei einer späteren Analyse können so z. B. parallele Kontrollmessungen durchgeführt werden, oder es können bei der gleichen Beschichtung bzw. Sonde unterschiedliche Temperaturen, auf die die Arbeitselektroden geheizt werden, verwendet werden, und/oder unterschiedliche Materialien der Arbeitselektroden verwendet werden.

[0042] Auch wenn Arbeitselektroden eines Sensoren-Arrays aber separaten Vertiefungen angeordnet sind, können sie selbstverständlich mit der gleichen Beschichtung, z. B. mit der gleichen Nukleinsäure-Sequenz, versehen werden. Alternativ können unterschiedliche Beschichtungen gewählt werden, z. B. unterschiedliche Nukleinsäure-Sequenzen. Bevorzugt sind die Arbeitselektroden eines Sensoren-Arrays parallel zueinander angeordnet, insbesondere Arbeitselektroden über einem gemeinsamen Graben. Es sind jedoch auch andere Ausrichtungen denkbar.

[0043] In einer Ausführungsform weisen die Arbeitselektroden des Sensoren-Arrays jeweils dasselbe oder mehr als ein unterschiedliches Material auf, wobei das Material ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Gold, Silber, Quecksilber, Kupfer, Platin, Iridium, Palladium, Bismut, Antimon, Kohlenstoff oder Kombinationen davon. Der Einsatz unterschiedlicher Materialien für verschiedene Arbeitselektroden kann es z. B. erlauben, mehrere Inhaltsstoffe gleichzeitig in einer Flüssigkeit nachzuweisen.

[0044] In einer Ausführungsform umfasst das Sensoren-Array mehrere Gruppen von Arbeitselektroden, wobei jede Gruppe ein unterschiedliches Material aufweist, die einzelnen Arbeitselektroden einer Gruppe jedoch dasselbe Material aufweisen. In einer anderen Ausführungsform umfasst das Sensoren-Array mehrere Gruppen von Arbeitselektroden, wobei die einzelnen Arbeitselektroden einer Gruppe verschiedene Materialien aufweisen, jede Gruppe aber die jeweils gleichen Materialien aufweist.

[0045] Das Sensor-Array weist in einer Ausführungsform mindestens einen Sensor mit einer beheizten Arbeitselektrode auf, wobei es bevorzugt mehrere Sensoren mit jeweils unabhängig voneinander beheizbaren Arbeitselektroden aufweist.

[0046] Abhängig von dem Material der jeweiligen Arbeitselektrode bzw. aufgebrachten Sonden und dem spezifischen nachzuweisenden Inhaltsstoff der Flüssigkeit (dem Analyten bzw. dem Zielmolekül), kann mit einem solchen Sensor-Array mit selektiv beheizbaren Arbeitselektroden z. B. die individuell optimale Temperatur einer jeden Arbeitselektrode für eine Reaktion der spezifischen Zielmoleküle der Flüssigkeit mit bestimmten Sondenmolekülen an der Oberfläche der Arbeitselektrode bereitgestellt werden.

[0047] Das Sensoren-Array umfasst ferner bevorzugt mindestens eine unbeheizte Gegenelektrode und/oder optional mindestens eine ungeheizte Pseudoreferenzelektrode.

[0048] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Beschichten einer Arbeitselektrode, das Schritte umfasst, bei denen man einen Flüssigkeitstropfen einer Beschichtungsflüssigkeit in mindestens eine Vertiefung eines Sensors oder Sensorarrays nach einem der vorhergehenden Aspekte der Erfindung einbringt.

[0049] Dabei wird vorzugsweise ein Flüssigkeitstropfen mit einem Volumen von 5 bis 30 µL, besonders bevorzugt von 10 bis 20 µL, in eine Vertiefung eingebracht, die so gestaltet ist, dass die Oberfläche einer Arbeitselektrode mit einer Länge von vorzugsweise 3 bis 7 mm, besonders bevorzugt von 5 mm, und einen Durchmesser von 10 bis 30 µm, besonders bevorzugt von 25 µm, vollständig von dem Flüssigkeitstropfen umgeben ist. Bevorzugt ist es dabei auch, wenn der Abstand der Arbeitselektrode von dem Boden der Vertiefung an mindestens einem Punkt eine Tiefe von 0,2 mm bis 0,8 mm, vorzugsweise von 0,5 mm beträgt und sich die Vertiefung über die ganze Länge der Arbeitselektrode erstreckt.

[0050] Auf diese Weise können die Sondenmoleküle oder mikro- oder nanostrukturenbildende Inhaltstoffe oder andere Inhaltstoffe der Beschichtungsflüssigkeit, die zur Beschichtung der Arbeitselektrode vorgesehen sind, auf die gesamte Oberfläche der Arbeitselektrode gelangen und sich dort gleichmäßig anlagern. Nachdem diese Anlagerung erfolgt ist, kann der Rest der Beschichtungsflüssigkeit aus der Vertiefung entfernt werden, und die Arbeitselektrode kann zur Analyse einer Probelösung verwendet werden, wobei bestimmte Inhaltsstoffe der Flüssigkeit, sogenannte Zielmoleküle, an die Sondenmoleküle der Beschichtung der Arbeitselektrode binden können und dadurch eine messbare Strom- oder Spannungsänderung (je nach Methode: Voltammetrie, Amperometrie, Coulometrie, Potentiometrie) hervorrufen, die wiederum Rückschlüsse auf die Anwesenheit der jeweiligen Inhaltstoffe gewährt.

[0051] Sondenmoleküle sind aber nur bei immunchemischen Sensoren und Nukleinsäure, z. B. DNA-

Sensoren nötig. Schwermetallionen oder kleinere organische Moleküle werden direkt an der Arbeitselektrode umgesetzt, ggf. nach vorheriger Anreicherung (Stripping-Voltammetrie, Chronopotentiometrie, Chronocoulometrie).

[0052] „Ein“ bedeutet im Rahmen der Erfindung „mindestens ein“, bevorzugt „genau ein“. So können z. B. selbstverständlich auch mehrere Arbeitselektroden, z. B. gleichzeitig, mit dem Verfahren beschichtet werden.

[0053] Alle in der Beschreibung genannten Publikationen werden durch die Bezugnahme vollständig in die Beschreibung aufgenommen. Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand von Beispielen und Ausführungsbeispiele darstellenden Zeichnungen erläutert. Diese sollen zum Verständnis beitragen, den Schutzbereich jedoch nicht begrenzen. Die Zeichnungen zeigen in

[0054] Fig. 1a eine Draufsicht auf ein Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen Sensors,

[0055] Fig. 1b einen Schnitt entlang der Ebene A-A des Ausführungsbeispiels aus Fig. 1a,

[0056] Fig. 2 einen Schnitt entlang der Ebene A-A des Ausführungsbeispiels aus Fig. 1a mit einem Flüssigkeitstropfen in der Vertiefung,

[0057] Fig. 3a eine Draufsicht auf ein Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen Sensor-Arrays mit mehreren Arbeitselektroden, einer Gegenelektrode und einer Pseudoreferenzelektrode,

[0058] Fig. 3b einen Schnitt entlang der Ebene A-A des Ausführungsbeispiels aus Fig. 3a und

[0059] Fig. 4 einen Schnitt durch ein Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen Sensors mit einem Kühlkörper.

Beispiel 1

[0060] In Fig. 1 ist ein Ausführungsbeispiel eines erfindungsgemäßen elektrochemischen Sensors 1 dargestellt. Der elektrochemische Sensor 1 umfasst ein Basiselement 3, ein Paar von Leitern 5, und eine drahtförmige Arbeitselektrode 7. Ferner umfasst der Sensor optional eine Gegenelektrode 8a und eine Pseudoreferenzelektrode 8b, deren genauere Gestalt für das vorliegende Ausführungsbeispiel jedoch nicht wesentlich ist.

[0061] Das Basiselement 3 ist aus elektrisch isolierendem Material gefertigt und weist eine planare Oberfläche 9 auf. Die beiden Leiter 5 eines Paares sind auf der planaren Oberfläche 9 des Basiselements 3 aufgebracht und durch die drahtförmige Ar-

beitselektrode 7 miteinander verbunden. Unterhalb der Arbeitselektrode 7 weist das Basiselement 3 eine Vertiefung 11 in der sonst planaren Oberfläche 9 auf. Der Boden 13 dieser Vertiefung 11 ist von der Arbeitselektrode 7 beabstandet, so dass die Oberfläche der Arbeitselektrode 7 entlang ihres gesamten Umfangs zugänglich ist (siehe Fig. 2).

[0062] Die Vertiefung 11 in dem Basiselement 3 unterhalb der Arbeitselektrode 7 weist eine Form auf, die es ermöglicht, dass darin ein Flüssigkeitstropfen 15 aufgenommen werden kann, wobei die Arbeitselektrode 7 entlang ihrer gesamten Oberfläche von der Flüssigkeit des Flüssigkeitstropfens 15 umgeben und benetzt wird. Der Flüssigkeitstropfen 15 wird somit nicht mit seiner gesamten Abmessung in der Vertiefung 11 aufgenommen, sondern ragt begünstigt durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit über die Ebene der Oberfläche 9 des Basiselements 3 und über die Arbeitselektrode 7, welche sich im Wesentlichen in der Ebene der planaren Oberfläche 9 des Basiselements 3 erstreckt, hinaus, so dass die Arbeitselektrode 7 durch den Flüssigkeitstropfen 15 hindurch verläuft.

[0063] Der Flüssigkeitstropfen 15 weist in dem vorliegenden Ausführungsbeispiel ein Volumen von zwischen 10 und 20 µl auf und die Arbeitselektrode 7 weist eine Länge von 5 mm und einen Durchmesser von 25 µm auf. Die Vertiefung 11 hat vorliegend eine kreisförmige Gestalt (siehe Fig. 1) und der Boden 13 der Vertiefung 11 ist planar und parallel zu der planaren Oberfläche 9 des Basiselements 3 ausgestaltet. In dem beschriebenen Ausführungsbeispiel beträgt der Abstand der Arbeitselektrode 7 von dem Boden 13 der Vertiefung 11 über die gesamte Länge der Arbeitselektrode 7 0,5 mm.

[0064] Die Arbeitselektrode 7 kann vorliegend direkt beheizt werden, um eine ideale Temperatur zum Binden von Ziel-Molekülen z. B. an Sonden-Moleküle an der Oberfläche der Arbeitselektrode 7 zu gewährleisten. Unter direkt beheizt wird verstanden, dass sowohl der Heizstrom als auch der elektrochemische Elektrolysestrom, welcher das Messsignal darstellt (Voltammetrie, Amperometrie, Coulometrie) oder das Messsignal hervorruft (Chronopotentiometrie), durch die Arbeitselektrode 7 selbst fließen. Um dennoch ein ungestörtes Messsignal zu erhalten, wird eine symmetrische Brückenschaltung mit 2 Induktionsspulen, wie aus dem Stand der Technik bekannt, eingesetzt (nicht in den Figuren gezeigt). Die Arbeitselektrode 7 und/oder deren Kontakte zu den Leitern 5 sind so gestaltet, dass eine gleichmäßige Temperaturverteilung an der Oberfläche der Arbeitselektrode 7 erreicht wird.

[0065] Die Arbeitselektrode 7 ist vorliegend aus einem Draht mit einem im Wesentlichen kreisförmigen Querschnitt gebildet. Der Querschnitt kann je-

doch ebenso ein anderer, z. B. rechteckiger Gestalt sein. Die Arbeitselektrode 7 weist bevorzugt ein Material aus der Reihe Gold, Silber, Kupfer, Platin, Iridium, Palladium, Bismut, Antimon oder Kohlenstoff auf, insbesondere Gold oder Platin, bevorzugt Gold. Die Arbeitselektrode 7 kann beschichtet sein. Als Beschichtungsmaterial kommen z. B. Quecksilber, Amalgam, Bismut, Silber, Gold oder eine Legierung dieser in Frage. Außerdem kann die Arbeitselektrode 7 mit Mikro- und/oder Nanostrukturen beschichtet sein. Dafür kommen vorliegend galvanische Silber- oder Goldstrukturen, Kohlenstoff, Nanoröhrchen, Fullerene oder Graphene in Betracht.

[0066] Die Arbeitselektrode 7 ist über Kontaktpunkte 17 mit den Leitern 5 verbunden. Diese Kontaktpunkte 17 weisen ein elektrisch leitendes Material auf und sind vorliegend durch Lötverbindungen realisiert. Das Basiselement 3 ist gemäß dem vorliegenden Ausführungsbeispiel als gewöhnliche einseitig bedruckte Leiterplatte gestaltet und die Leiter 5 sind wie üblich als Leiterbahnen aus Kupfer ausgeführt.

[0067] Leiter 5 und Basiselement 3 bzw. Leiterbahnen und Leiterplatte, einschließlich der Kontaktpunkte 17 der Leiter 5 mit der Arbeitselektrode 7, sind vorliegend mit einer isolierenden Schicht 19 abgedeckt, so dass nur die Arbeitselektrode 7 selbst zur Umgebung frei ist. Von den beschriebenen Bauteilen kann bei Kontakt des Basiselements 3 mit einer Flüssigkeit nur die Arbeitselektrode 7 von der Flüssigkeit benetzt werden. Dies schließt nicht aus, dass auch die Gegenelektrode 8a und ggf. die Pseudoreferenzelektrode 8b von der Flüssigkeit benetzt werden können. Die isolierende Schicht 19 ist vorliegend eine Laminierfolie, die in einem Temperaturbereich von 25°C bis 93°C, bevorzugt bis 97°C bzgl. ihrer Gestalt und Isolationseigenschaften stabil ist, kann jedoch auch durch Heißsigelkleber, Epoxidharz, Polyesterharz, Silikonkleber, Lötstopplack, Spannlack, Paraffin, Kautschuk, PVC, Duroplast, PU-Harz, PTFE, PE, PS, Polycarbonat, Glasoxiden, Nitriden oder anderen organischen oder anorganischen Polymeren, lackartigen, kristallinen oder amorphen Materialien ausgeführt sein.

Beispiel 2

[0068] In Fig. 3 ist ein Ausführungsbeispiel eines Sensor-Arrays 21 dargestellt, das einen weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft. Das Sensor-Array 21 weist mehrere, hintereinander angeordnete zuvor beschriebene erfundungsgemäße elektrochemische Sensoren 1 mit jeweils einem Paar von Leitern 5, die auf der planaren Oberfläche 9 eines gemeinsamen Basiselements 3 angeordnet sind und die durch eine drahtförmige Arbeitselektrode 7 miteinander verbunden sind, auf. Die einzelnen Sensoren 1 sind vorliegend parallel und eng hintereinander angeordnet, d. h. sowohl die Arbeitselektroden 7 als

auch die Leiter **5** verlaufen eng aneinander angrenzend, so dass eine möglichst geringe Baugröße des Sensor-Arrays **21** erreicht wird.

[0069] Die einzelnen Vertiefungen **11** der Sensoren **1** in dem Basiselement **3** unterhalb der Arbeitselektrode **7** sind vorliegend zu einem gemeinsamen Graben **23** verbunden. Die Arbeitselektroden **7** können im Sinne dieses Ausführungsbeispiels aus demselben Material oder jeweils aus unterschiedlichen Materialien gebildet sein. Auch die Beschichtung der Arbeitselektroden **7** kann bei allen Arbeitselektroden **7** aus demselben Material oder aus jeweils unterschiedlichen Materialien realisiert sein. Die Materialien der Arbeitselektrode **7** bzw. deren Beschichtung können aus der im Zusammenhang mit dem elektrochemischen Sensor **1** genannten Reihe von Materialien ausgewählt werden. Dasselbe trifft für das Material des Basiselements **3** und der Leiter **5** zu.

[0070] Das Sensor-Array **21** ist ähnlich wie der einzelne elektrochemische Sensor **1** gemeinsam von einer isolierenden Schicht **19** abgedeckt, so dass nur die einzelnen Arbeitselektroden **7** bzw. gegebenenfalls bei einer Analyse zusätzlich eine Gegen- und wenn vorhanden eine Pseudoreferenzelektrode **8a**, **8b** (siehe Fig. 3) direkt mit einer das Sensor-Array **21** benetzenden Flüssigkeit in Kontakt kommen können. Die isolierende Schicht **19** kann hier ebenso wie im Falle des einzelnen Sensors **1** zum Beispiel eine Laminierfolie sein, die zwischen 25°C und 93°C stabil ist. Gegenelektrode **8a** und ggf. Referenzelektrode **8b** können auf dem gleichen Basiselement **3** oder davon getrennt angeordnet sein.

[0071] Alle Arbeitselektroden **7** des beschriebenen Ausführungsbeispiels des Sensor-Arrays **21** können unabhängig voneinander direkt beheizt werden, so dass die verschiedenen Sensoren **1** des Arrays **21** die Flüssigkeit bei einer individuellen, z. B. einer für eine Reaktion optimalen Temperatur kontaktieren können. Die direkte Beheizung erfolgt wie zuvor beschrieben für den einzelnen Sensor **1** mit Hilfe einer symmetrischen Brückenschaltung.

Beispiel 3

[0072] Ein Sensorenarray **21** nach Beispiel 2, bei dem Arbeitselektroden **7** aus den Materialien Gold, Platin und Silber eingesetzt werden, wird verwendet, um in einer Probelösung gleichzeitig (a) Quecksilber am Golddraht, (b) Arsen (V) zusammen mit Arsen (III) am Golddraht, (c) Arsen (III) allein am Golddraht, (d) Cadmium am Silberdraht und (e) Phenolderivate am Platindraht bestimmen zu können. Hierbei wird ausgenutzt, dass das Sensor-Array **21** selektiv heizbar ist, so dass jede Arbeitselektrode **7** ihr eigenes zeitliches Temperaturprofil bekommt. Quecksilber und Arsen lassen sich am besten an Gold abscheiden und durch Stripping-Analyse bestimmen. Cadmium benötigt

tigt die relativ hohe Wasserstoffüberspannung am Silber. Phenolverbindungen lassen sich erst bei relativ hohen Potentialen oxidieren, außerdem ist hier gepulstes Heizen auf hohe Temperaturen zur Elektrodenreinigung nötig, wofür Platin am besten geeignet ist.

Beispiel 4

[0073] Der Sensor nach Beispiel 1 oder das Sensorarray nach Beispiel 2 oder 3 wird mit einer Pseudoreferenzelektrode **8b** dergestalt versehen, dass sich eine schmale Gold- oder Silberschicht auf dem Basiselement **3** unterhalb des Elektrodendrahtes **7** befindet (siehe Fig. 3). Auf diese Weise wird erreicht, dass sich die Pseudoreferenzelektrode **8b** an der kältesten Stelle der Messzelle befindet, wo außerdem auch die Temperatur und damit das Potential der Pseudoreferenzelektrode **8b** konstant bleiben. Bevorzugt ist der Abstand zwischen Arbeitselektrode **7** und Pseudoreferenzelektrode **8b** größer als 200 µm, und besonders bevorzugt größer als 400 µm. So wird erreicht, dass auch durch Wärmeleitung keine störende Aufheizung der Pseudoreferenzelektrode **8b** erfolgt. (vgl. Fig. 2 in J. Phys. Chem. B 2000, 104, 764–769).

[0074] Die Gegenelektrode **8a** wird in diesem Beispiel durch eine zweite metallische Schicht (Pt oder Au) oder eine Kohleschicht auf dem Basiselement **3** gebildet, die parallel zu der Pseudoreferenzelektrode **8b** verläuft. Platin und Gold können dabei durch Sputtern oder bedampfen aufgebracht werden.

[0075] Die Gegenelektrode **8a** kann auch in Gestalt der Unterseite eines metallischen Kühlkörpers **25** ausgeführt sein (siehe Fig. 4), der z. B. über eine umlaufende Dichtung **27** an der isolierenden Schicht **19** des Sensors **1** angeschlossen ist, wobei die besonderen Vorteile der Kühlwirkung und der großen Oberfläche verknüpft werden. (vgl. G.-U. Flechsig, J. Peter, DE 10 2005 007 148 B4, Ansprüche 17ff., Fig. 1).

[0076] Hierdurch wird auch die Flüssigkeitsmenge in der Vertiefung **11** vor Verdunstung geschützt und eingeschlossen.

Beispiel 5

[0077] Anstatt einer Leiterplatte mit gedruckten Kupferleiterbahnen wird in diesem Beispiel ein Siliciumchip als Basiselement **3** verwendet. Die metallenen Leiterbahnen können entweder durch Sputtern oder Bedampfen aufgebracht werden. Alternativ werden Leiterbahnen durch n- oder p-Dotierung direkt in das Silicium-Basiselement **3** eingebracht. Die Arbeitselektroden **7** werden durch Bonden oder Löten auf den Leiterbahnen befestigt. Die Vertiefung erfolgt durch Ätzen mit HF. Isolierende Schichten **19** sind insbe-

sondere mittels Siliciumnitriden und Siliciumoxiden
zu verwirklichen.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- WO 2007/020093 [0003, 0009]
- DE 102005007148 A1 [0003]
- DE 102005007148 [0009]
- DE 102004017750 [0019]
- DE 102005007148 B4 [0075]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Flechsig et al., 2005, Langmuir 21, 7848–7843 [0004]
- Flechsig et al., 2005 [0005]
- Wachholz et al., 2007, Electroanalysis 19, 535–540, insbesondere Fig. 3 [0018]
- Dissertation Wachholz 2009 [0018]
- Wachholz et al., 2009, Electroanalysis 21, 2153 [0028]
- Flechsig et al., 2005 [0037]
- J. Phys. Chem. B 2000, 104, 764–769 [0073]

Patentansprüche

1. Ein elektrochemischer Sensor (1) mit einem Basiselement (3) aus elektrisch isolierendem Material mit einer planaren Oberfläche (9), und einem Paar von Leitern (5), die auf dieser planaren Oberfläche (9) des Basiselements (3) aufgebracht sind, wobei die beiden Leiter (5) des Paares durch mindestens eine drahtförmige Arbeitselektrode (7) verbunden sind, wobei in dieser planaren Oberfläche (9) des Basiselements (3) unter der Arbeitselektrode (7) eine Vertiefung (11) ausgebildet ist, wobei der Boden (13) der Vertiefung (11) von der Arbeitselektrode (7) beabstandet ist.
2. Der Sensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Vertiefung (11) so ausgestaltet ist, dass bei Einbringung eines Flüssigkeitstropfens (15) in die Vertiefung (11) die Arbeitselektrode (7) von der Flüssigkeit benetzt werden kann, wobei bevorzugt die gesamte Oberfläche der Arbeitselektrode (7) benetzt werden kann.
3. Der Sensor nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass er einen Flüssigkeitstropfen (15) umfasst, welcher Kontakt zu der Arbeitselektrode (7) und zu dem Boden (13) der Vertiefung (11) aufweist.
4. Der Sensor nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Flüssigkeitstropfen (15) ein Volumen von 5 bis 30 µL, vorzugsweise von 10 bis 20 µL aufweist.
5. Der Sensor nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Arbeitselektrode (7) direkt beheizbar ist, wobei der Sensor (1) bevorzugt so ausgestaltet ist, dass die Temperaturverteilung an der Oberfläche der Arbeitselektrode (7) gleichmäßig ist.
6. Der Sensor nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Leiter (5) und die Kontaktpunkte (17) des Leiters (5) mit der Arbeitselektrode (7) auf den nicht auf dem Basiselement (3) aufgebrachten Seiten durch eine isolierende Schicht (19) abgedeckt sind, wobei diese Schicht (19) bevorzugt mindestens in einem Temperaturbereich von 25°C bis 93°C stabil ist, und/oder wobei diese Schicht (19) bevorzugt eine Laminierfolie ist.
7. Der Sensor nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Basiselement (3) eine Leiterplatte ist und die Leiter (5) als Leiterbahnen ausgestaltet sind, wobei die Leiter (5) und die Kontaktpunkte (17) des Leiters (5) mit der Arbeitselektrode (7) auf den nicht auf dem Basisele-

ment (3) aufgebrachten Seiten durch eine isolierende Laminierfolie abgedeckt sind.

8. Der Sensor nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Arbeitselektrode (7) eine Länge von 3 bis 10 mm, vorzugsweise von 5 mm, und einen Durchmesser von 10 bis 30 µm, vorzugsweise von 25 µm, aufweist.
9. Der Sensor nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Boden (13) der Vertiefung (11) planar und parallel zu der planaren Oberfläche (9) des Basiselements (3) ausgestaltet ist.
10. Der Sensor nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand der Arbeitselektrode (7) von dem Boden (13) der Vertiefung (11) an mindestens einem Punkt 0,2 mm bis 0,8 mm, vorzugsweise von 0,5 mm beträgt, wobei sich die Vertiefung (11) vorzugsweise über die ganze Länge der Arbeitselektrode (7) erstreckt.
11. Ein Sensoren-Array (21), welches zwei oder mehr Sensoren (1) nach einem der vorherigen Ansprüche aufweist, wobei die Sensoren (1) gemeinsam auf einem Basiselement (3) angeordnet sind.
12. Das Sensoren-Array nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Vertiefungen (11) unter mindestens 2 Arbeitselektroden (7) miteinander zu einem gemeinsamen Graben (23) verbunden sind und/oder dass die Vertiefungen (11) unter mindestens 2 Arbeitselektroden (7) voneinander getrennt sind.
13. Das Sensoren-Array nach einem der Ansprüche 11–12, dadurch gekennzeichnet, dass die Arbeitselektroden (7) jeweils aus demselben oder aus unterschiedlichen Materialien bestehen, wobei das Material ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Gold, Silber, Kupfer, Platin, Iridium, Palladium, Bismut, Antimon, Quecksilber, Kohlenstoff oder Kombinationen davon.
14. Das Sensoren-Array nach einem der Ansprüche 11–13, dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens einen Sensor (1) mit einer beheizten Arbeitselektrode (7) aufweist, wobei es bevorzugt mehrere Sensoren (1) mit jeweils unabhängig voneinander beheizbaren Arbeitselektroden (7) aufweist, wobei das Sensoren-Array (21) ferner eine unbeheizte Gegenelektrode **8a** und optional eine ungeheizte Pseudoreferenzelektrode **8b** umfasst.
15. Ein Verfahren zum Beschichten einer Arbeitselektrode (7), Schritte umfassend, bei denen man einen Flüssigkeitstropfen (15) einer Beschichtungsflüssigkeit in eine Vertiefung (11) eines Sensors (1) oder

DE 10 2011 109 402 A1 2013.02.07

Sensorarrays (**21**) nach einem der vorhergehenden
Ansprüche einbringt.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

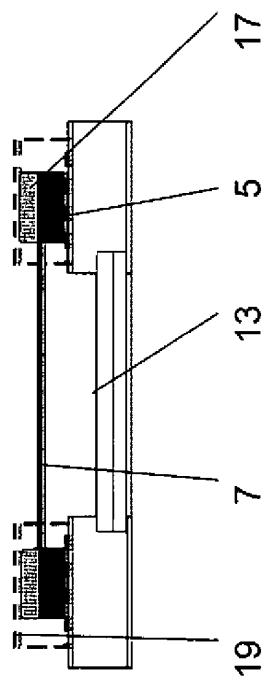


Fig. 1b

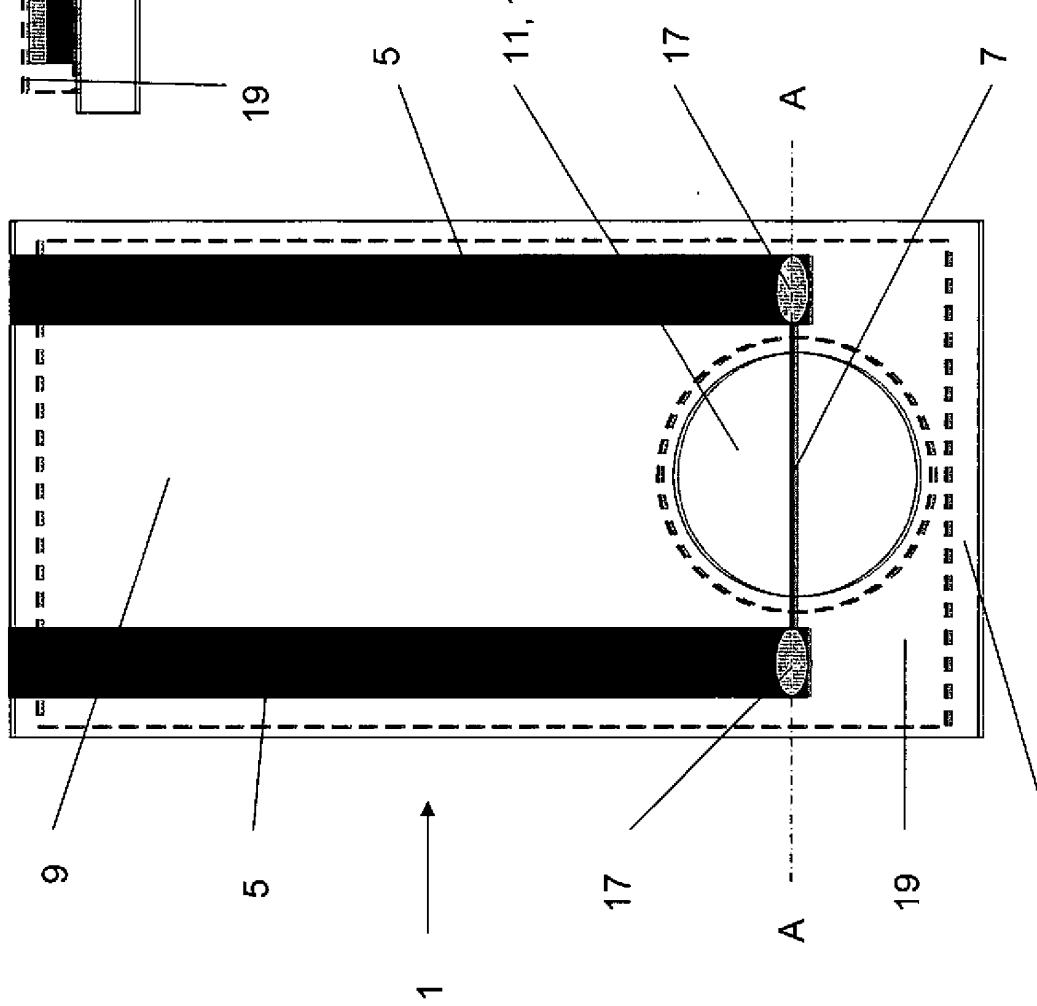


Fig. 1a

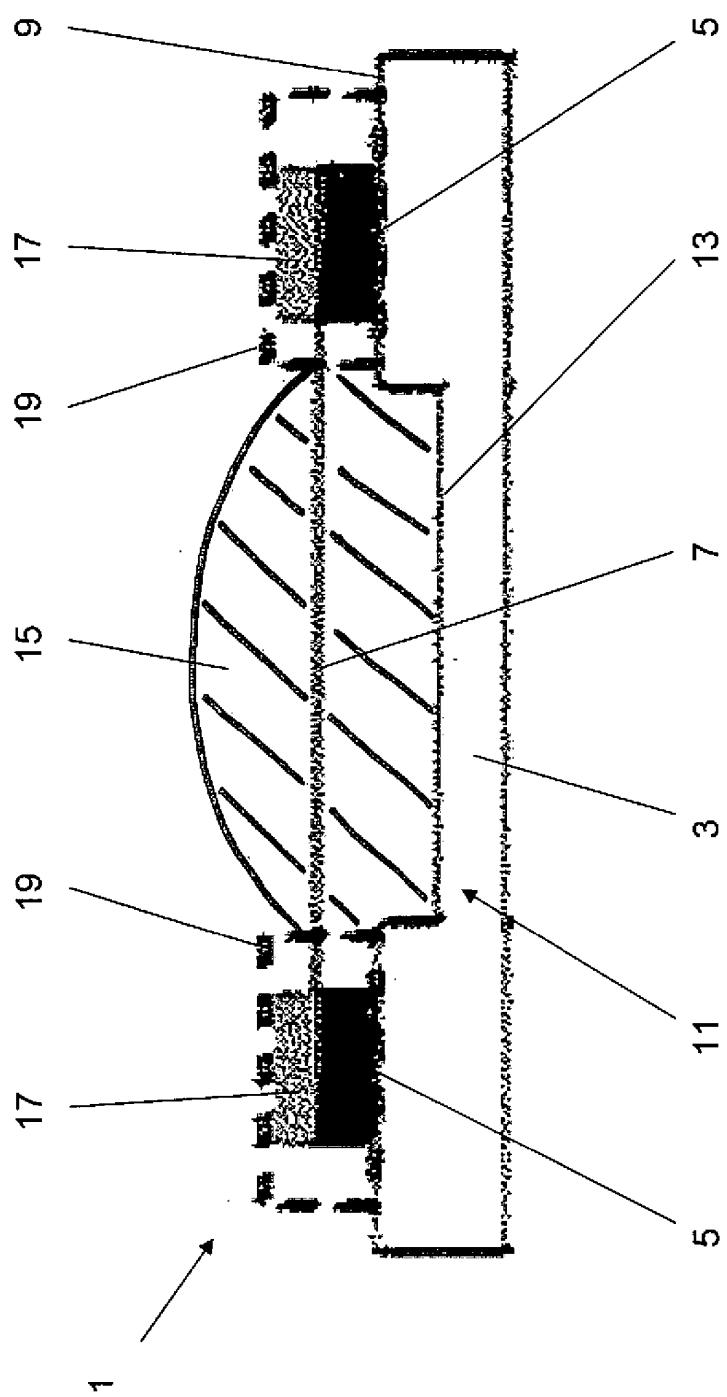
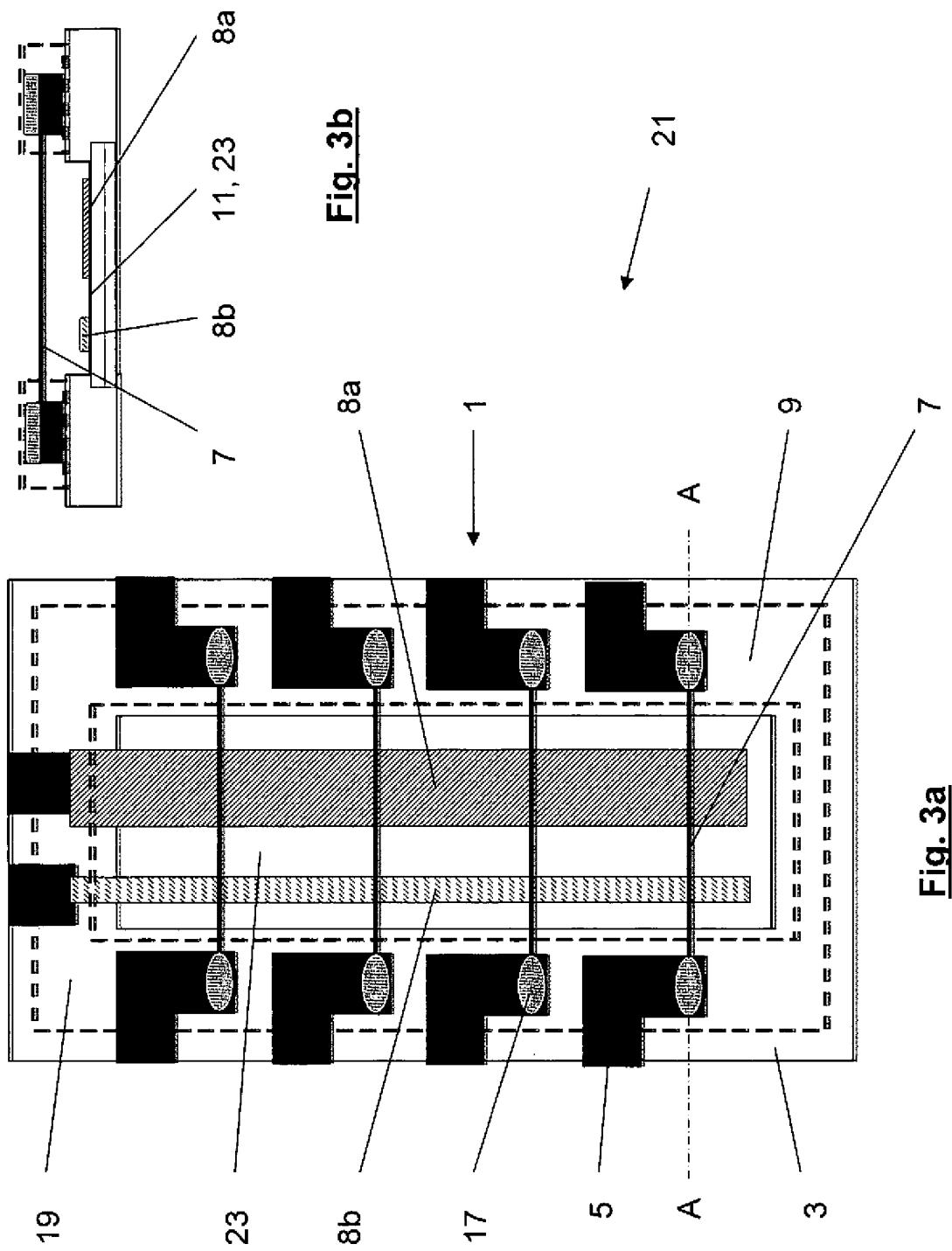


Fig. 2



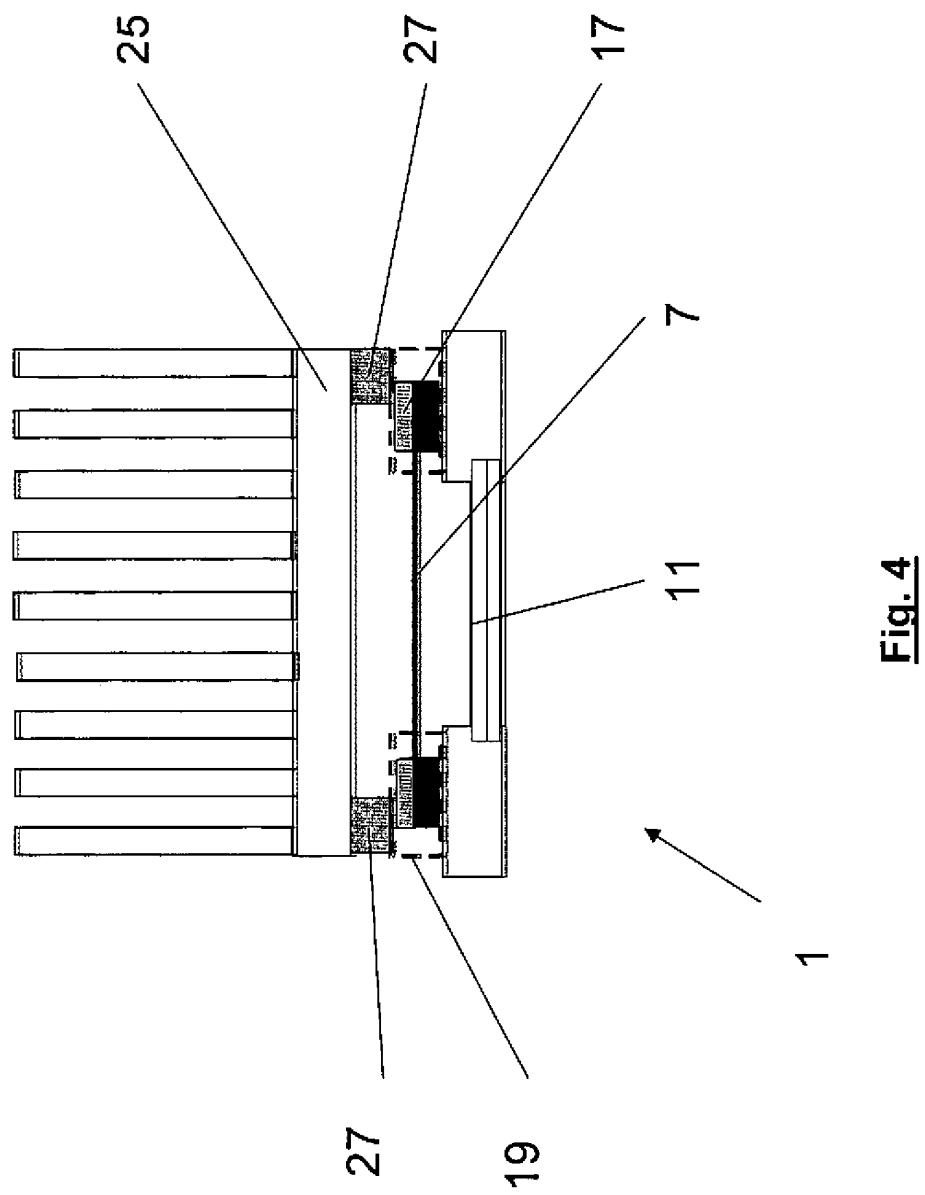


Fig. 4

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 02.08.1982
Geburtsort: Uelzen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Ausbildung:

- 06/2003 Abitur am Lessing-Gymnasium in Uelzen
- 10/2003 – 09/2007 Chemiestudium an der Universität Rostock
- 10/2007 – 09/2008 Diplomarbeit in der AG von PD Dr. Gerd-Uwe Flechsig
Titel der Diplomarbeit: „Elektrochemische Detektion der DNA-Hybridisierung mit Osmiumtetroxidmarkern ohne Modifizierung der Target-DNA“
- 10/2008 – 05/2012 Doktorand in der Analytischen Chemie in der AG von PD Dr. Gerd-Uwe Flechsig
Titel der Dissertation: „Detektion organischer Moleküle mit Hilfe von heizbaren Elektroden im negativen Potentialbereich“
- 03/2012 – 04/2012 Forschungsaufenthalt am Biophysikalischen Institut in Brünn (Tschechien) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Miroslav Fojta
- 03/2010 – 05/2010 Forschungsaufenthalt an der Curtin University in Perth (Australien) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eric Bakker

Ich, Martin Jacobsen, 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.

Kiel, 05.07.2013

Martin Jacobsen