

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Biologische Erkennungselemente in elektrochemischen Biosensoren - eine Übersicht

Dr. Ulla Wollenberger

Universität Potsdam, Institut für Biologie und Biochemie

Lehrstuhl für Analytische Biochemie, Karl-Liebknechtstr. 24-25, 14476 Golm

Email: muwollen@rz.uni-potsdam.de

Tutorial

Bereits Anfang der sechziger Jahre wurde erstmals das Prinzip von Enzymelektroden als Anordnung von Enzymen direkt auf einen Messfühler patentiert. Leland C. Clark Jr. beschrieb eine Enzymelektrode zur Bestimmung von Blutzucker, bei der Glucoseoxidase mit einer semipermeablen Membran vor einer Sauerstoffelektrode fixiert wurde [1].

Seit dieser Zeit ist eine große Zahl von Enzymen verwendet worden. Aber auch andere Biokomponenten, wie Organellen, intakte Zellen, Antikörper und Rezeptoren werden als Erkennungselemente eingesetzt [2]. Diese traditionell verwendeten Erkennungssysteme werden in neuerer Zeit durch Nukleinsäuren, synthetische und semisynthetische (biomimetische) Erkennungssubstanzen erweitert [3, 4]. Hier sind besonders DNA, RNA, PNA, Synzyme und ‚Molecular Imprints‘ zu nennen. Durch Nutzung des Protein-Engineering werden gezielt veränderte Proteine, Antikörper und Enzyme erhalten. Die Erzeugung von optimalen Bindungsmolekülen auf Aminosäure- und Nukleinsäurebasis wird durch Kombination von Synthese großer kombinatorischer Peptid- und RNA-Bibliotheken, Selektion nach Bindungsstärke zum Analyten und enzymatischer Verstärkung realisiert. Der Nachweis der biospezifischen Erkennung erfolgt mit vorwiegend mit optischen und elektrochemischen Transduktoren. Im vorliegenden Beitrag werden Biomoleküle in ihrer Kombination mit amperometrischen Elektroden beschrieben.

Die besondere Bedeutung der *Enzyme* ergibt sich aus ihrer hohen chemischen Spezifität und der inherenten biokatalytischen Signalverstärkung [5]. Prinzipiell kann der Nachweis der Enzymreaktion auf zwei Wegen erfolgen:

über die Messung der Veränderung der Konzentration der beteiligten natürlichen oder künstlichen Elektronendonatoren oder –akzeptoren oder

durch eine direkte elektronische Kommunikation zwischen dem Enzymprotein und der Elektrode.

Der direkte Elektronentransfer gelingt durch geeignete Funktionalisierung der Elektrodenoberfläche zur optimalen Orientierung des Enzymmoleküls an der Grenzfläche oder durch gezieltes Einbringen

von Bindungsstellen in das Enzymmolekül für die Kopplung von Elektronenüberträgern oder direkte Verdrahtung (wiring) der Enzyme (eine Übersicht findet man beispielsweise in [6, 7]).

Durch Kombination verschiedener Enzymen lassen sich das Spektrum erfassbarer Analyte erweitern oder die Sensoreigenschaften insbesondere Empfindlichkeit und Selektivität gezielt beeinflussen [8]. Fortschritte sind zu erwarten bei der Suche nach neuen Enzymen und der evolutiven Veränderung von Enzymeigenschaften, wie Substratspezifität oder Thermostabilität.

Antikörper besitzen eine für analytische Anwendungen besonders wichtige Eigenschaft - die Fähigkeit Antigene über nichtkovalente Wechselwirkungen hochspezifisch mit Affinitäten bis zu 10^{11} M^{-1} zu binden. Sie sind bei geeigneter Verfahrensweise für nahezu jede Substanz generierbar [9, 10]. Auch hier können mittels Protein-Engineering die Struktur der Antikörperproteine variiert, Bindungsstellen eingebaut, oder rekombinante Fusionsproteine zwischen Antikörpern (Antikörperfragmenten) und Markerenzym produziert werden.

Der Nachweis der Immunreaktion erfolgt häufig über Enzymmarker, wie β -Galactosidase, alkalischer Phosphatase, Peroxidase oder Glucoseoxidase. Daneben wurden Verfahren zu pseudohomogenen elektrochemischen Immunoassays mit redoxaktiven Markersubstanzen entwickelt [11]. Die Marker werden direkt elektrochemisch oder mit enzymmodifizierten Elektroden gemessen.

Gegenwärtig wird besonders intensiv an der Kombination von *Nukleinsäuretechnologien* und Biosensorik gearbeitet. Die spezifische Wechselwirkung ist hier die Doppelstrangbildung mit einer komplementären Basensequenz (Hybridisierung) [12], wobei ein Partner auf der Sensoroberfläche immobilisiert ist. Neben den vorherrschenden optischen Transduktionsprinzipien wurden verschiedene elektrochemische Methoden entwickelt. Mit Hilfe von redoxaktive Interkalatoren oder Enzymmarkern sind Hybridisierungen nachweisbar. Außerdem ist Guanidin oxidierbar. Besonderes Interesse findet auch die Möglichkeit Elektronen über die DNA-Duplex zu transportieren [13]. Einzelne mismatches führen zu einer Verminderung der Elektronenübertragungsrate und sind daher erkennbar. Diese Verfahren sind nicht auf DNA beschränkt.

Literatur:

- [1] L.C. Clark Jr., C. Lyons; Ann. NY Acad. Sci. 102 (1962) 29
- [2] F. Scheller, F. Schubert; Biosensoren; Birkhäuser Verlag 1991;
- [3] F. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz (Ed.), Frontiers in Biosensorics I and II, Birkhäuser Verlag, Basel 1997
- [4] F.W. Scheller, F. Kleinjung, F.F. Bier, A. Makower, B. Neumann, U. Wollenberger, I. Kurochkin, A. Eremenko, A. Barmin, S. Klußmann, J.-P. Fürste, V.A. Erdmann, D. Mansuy, Ann. NY Acad. Sci. 864 (1998) 37
- [5] P.D. Boyer (Ed.) The Enzymes, Acad. Press 1970
- [6] F. A. Armstrong, G. S. Wilson, Electrochim. Acta 45 (2000) 2623
- [7] I. Willner, E. Katz, Angew. Chem. Int. Ed. 39 (2000) 1180
- [8] U. Wollenberger, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 13 (1995) 237
- [9] C.A.K. Borrebaeck, Immunol. Today 21 (2000) 379
- [10] C.P. Price, Clin. Chem. Lab. Med 36 (1998) 341
- [11] A. Warsinke, A. Benkert, F.W. Scheller, Fres. J. Anal. Chem. 366 (2000) 622
- [12] W. Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer Verlag 1984
- [13] S.O. Kelly, J. K. Barton, Science. 283 (1999) 375