

Markerfreie elektrochemische Detektion von DNA-Hybridisierung durch Modulation des Feedbackstroms in der elektrochemischen Rastermikroskopie**

Florin Turcu, Albert Schulte, Gerhard Hartwich und Wolfgang Schuhmann*

DNA-Mikroarrays („DNA-Chips“) sind mikroanalytische Messsysteme, auf denen Bibliotheken einzelsträngiger DNA-Bruchstücke mit genspezifischen Nucleinsäuresequenzen auf Trägeroberflächen fixiert sind. Mithilfe solcher DNA-Chips kann die Aktivität einer Vielzahl von Genen gleichzeitig nachgewiesen werden; dies macht sie zu wertvollen Instrumenten für eine schnelle Genexpressions- und Sequenzanalyse, die Genotypisierung von Mutationen und Polymorphismen sowie für die Pharmakogenomik.^[1] Die Hybridisierung immobilisierter einzelsträngiger DNA-Fängersequenzen mit komplementären DNA-Fragmenten in Lösung (Zielsequenzen, „Targets“) muss für eine erfolgreiche Anwendung von DNA-Chips effizient in ein detektierbares Signal überführt werden. Elektrochemische Detektionsmethoden^[2] sind eine kostengünstige Alternative zu den etablierten Fluoreszenzverfahren, da sie hochsensitiv und kompatibel mit Mikrofabrikationstechniken sind und die Verwendung unkomplizierter Messgeräte ermöglichen. Elektrochemische Detektionsmethoden nutzen effektiv die elektrochemischen Eigenschaften einzelsträngiger (ss) und doppelsträngiger (ds) DNA und/oder elektrochemisch aktiver Hybridisierungsindikatoren, Intercalatoren und Redoxmarker.^[3]

Wir berichten hier über ein Verfahren, das elektrostatische Wechselwirkungen nutzt, um den Zustand oberflächengebundener DNA-Sequenzen zu visualisieren. Die Detektion der Hybridisierung komplementärer DNA-Sequenzen beruht auf Coulomb-Wechselwirkungen zwischen einem negativ geladenen, frei diffundierenden Redoxmediator und den Phosphatgruppen am Rückgrat der immobilisierten DNA-Stränge. Auf DNA-haltigen Bereichen des Mikroarrays moduliert die elektrostatische Abstoßung zwischen beiden

Spezies den Transfer von Mediatormolekülen zur Elektrodenoberfläche. Die resultierende Modulation des Stromsignals wurde genutzt, um eine einfache und markerfreie Analyse in Form einer Visualisierung einzelsträngiger DNA-Fängersequenzen und ihrer Aggregate mit komplementären Zielsequenzen zu entwickeln.

Ein DNA-Mikroarray hat sehr unterschiedliche lokale Redoxaktivitäten auf der Oberfläche, besonders bei Verwendung anionischer, redoxaktiver Spezies. Zur Prüfung, ob der Nachweis von Hybridisierungsvorgängen auf der Basis elektrostatischer Effekte funktioniert, wurde die elektrochemische Rastermikroskopie (SECM)^[4] gewählt. SECM kann Regionen mit unterschiedlichen Redoxaktivitäten sichtbar machen, d. h., sie kann mikroskopisch kleine lokale Variationen elektrochemischer Reaktivität mit hoher lateraler Auflösung visualisieren. SECM wurde bereits früher erfolgreich zur Untersuchung immobilisierter Biomoleküle und biologischer Prozesse an Grenzflächen zwischen festen und flüssigen Phasen eingesetzt.^[5] Bei der SECM wird eine scheibenförmige Ultramikroelektrode (SECM-Sonde) exakt positioniert, sodass eine elektrochemische Wechselwirkung mit der Oberfläche stattfinden kann; der Abstand zwischen Sonde und Probenoberfläche entspricht dann lediglich einigen Elektrodenradien. Im einfachsten SECM-Abbildungsmodus wird die SECM-Sonde in konstanter Höhe über die Probe gefahren, wobei simultan der durch die Sonde fließende Strom I als Funktion der x/y -Position der Sonde über der Probenoberfläche registriert wird. Die Abhängigkeit von I vom Abstand d zwischen Sonde und Probe einerseits und von den spezifischen Probeneigenschaften andererseits liefert Informationen über lokale elektrochemische Eigenschaften und die Morphologie der Probenoberfläche.

Abbildung 1 zeigt den postulierten elektrostatischen Abstoßungsmodus des SECM, wie er zum Nachweis von Bereichen mit immobilisierter DNA und zur Charakterisie-

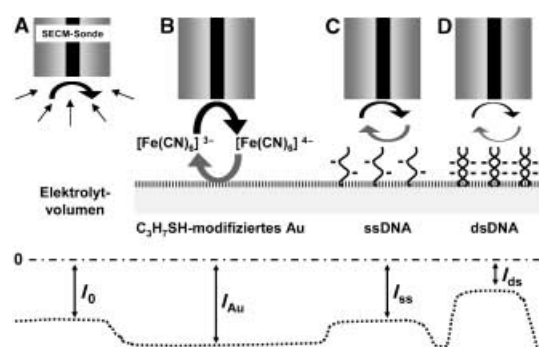


Abbildung 1. Abstoßungsmodus des SECM: A) diffusionslimitierter Reduktionsstrom in einer $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ -Lösung bei einem Sondenpotential von 0 mV vs. Ag/AgCl/3 m KCl; B) Positionierung der Sonde im Nahfeldbereich des elektrochemischen Feedbacks über der Oberfläche führt zum Recycling von $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ zu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (Anstieg des Sondenstroms); C) Coulomb-Wechselwirkung von $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ mit dem Oligonucleotidrückgrat über einem DNA-Spot (gehinderte Mediatordiffusion, Modulation der Massentransferrate und verminderter Sondenstrom); D) höhere Dichte der Phosphatgruppen durch Hybridisierung (weiterer Abfall des Sondenstroms als Folge der verstärkten Abstoßung der negativ geladenen Redoxmediatormoleküle).

[*] Dipl.-Chem. F. Turcu, Dr. A. Schulte, Prof. Dr. W. Schuhmann
Analytische Chemie – Elektroanalytik & Sensorik
Ruhr-Universität Bochum
44780 Bochum (Deutschland)
Fax: (+49) 234-321-4683
E-mail: wolfgang.schuhmann@rub.de

Dr. G. Hartwich
FRIZ Biochem
Staffelseestraße 6
81477 München (Deutschland)

[**] Die Autoren danken Dr. Thomas Kratzmüller, FRIZ Biochem (München), für die Bereitstellung der DNA-Chips und vergleichende Fluoreszenzmessungen sowie Dr. Herbert Wieder, FRIZ Biochem (München), für hilfreiche Diskussionen. Die Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt (DFG Schu929/6-1).

rung des Zustands der DNA (ss oder ds) angewendet wurde. Die als SECM-Sonde eingesetzte Pt-Ultramikroelektrode wird dabei auf ein Potential polarisiert, das hinreichend niedrig für die diffusionskontrollierte Reduktion von $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ist. Bei einem großen Abstand der Sonde von der Probe ist die gemessene stationäre Stromstärke lediglich durch das Ausmaß der $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ -Diffusion zur Sondenoberfläche limitiert (I_0 , Abbildung 1 A). Bei Positionierung der Sonde im Bereich der Nahfeldwechselwirkung mit der leitfähigen Oberfläche (Propanthiolmonoschicht auf Au) werden die an der Sonde reduzierten Mediatormoleküle an der Probenoberfläche reoxidiert, was zu einem abstandsabhängigen Anstieg der Sondenstromstärke ($I_{\text{Au}} > I_0$, Abbildung 1 B) führt (elektrochemisches Recycling, positives Feedback).^[4]

Über einem mit DNA-Molekülen bedeckten Bereich jedoch stoßen die anionischen Phosphatgruppen die an der Sondenspitze generierten $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ -Moleküle ab, sodass ihre Diffusion zur Au-Oberfläche behindert wird. Dadurch wird das Ausmaß des Redoxrecyclings und damit der Stromfluss durch die SECM-Sonde verringert ($I_{\text{ss}} < I_{\text{Au}}$, Abbildung 1 C). Die Hybridisierung der immobilisierten DNA-Fängersequenzen mit dem komplementären DNA-Einzelstrang unter Bildung der Doppelhelix vergrößert signifikant die Anzahl negativer Ladungen an der Oberfläche und führt somit zu einer weiteren Verringerung des Sondenstroms ($I_{\text{ds}} < I_{\text{ss}}$, Abbildung 1 D).

Die SECM-Experimente wurden an Bereichen („Spots“ mit \varnothing 150 μm), die mit bifunktionellen synthetischen Oligonucleotiden (20 Basen) modifiziert waren, und einer Pt-Mikroscheibenelektrode (\varnothing 10 μm) als SECM-Sonde durchgeführt. Die am 3'-Ende mit einer $\text{C}_3\text{-S-S-C}_3\text{-OH}$ -Gruppe modifizierten Oligonucleotide hatten am 5'-Ende einen zusätzlichen Fluoreszenzmarker für Kontrollmessungen und wurden auf mit Au bedampften Glasplättchen unter Bildung selbstaggregierender Thiolmonoschichten immobilisiert. Um unspezifische Adsorption zu vermeiden und um die Hybridisierungseffizienz zu steigern, wurden die DNA-Chips nach der Bildung der oligonucleotidbedeckten Bereiche (Spotting) sofort mit Propanthiol nachbehandelt. Die SECM-Messungen erfolgten in einer Elektrolytlösung aus 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 3 M NaCl und 0.1 M Phosphatpuffer (1:1 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$; pH 5.7).

In großem Abstand von der DNA-Chipoberfläche fließt durch die Mikroelektrode (0 mV vs. Ag/AgCl/3 M KCl) ein stationärer Reduktionsstrom I_0 von ca. -6 nA als Folge der diffusionskontrollierten Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} . Die SECM-Sonde wurde durch einen z -Scan nahe der DNA-modifizierten Bereiche hin zur Probenoberfläche bewegt und die Stärke des Reduktionsstroms als Funktion des Abstands aufgenommen. Der gemessene positive Feedbackstrom ist wie oben gezeigt mit dem Sonden-Proben-Abstand korreliert, sodass mithilfe theoretisch abgeleiteter Annäherungskurven^[6] die SECM-Sonde reproduzierbar positioniert und somit in einem einstellbaren Abstand über die Probe gefahren werden konnte. Linienscans (I als Funktion der zurückgelegten Distanz in x -Richtung) wurden aufgenommen, um Informationen über die ortsabhängigen Eigenschaften der DNA-modifizierten Oberfläche zu erhalten.

In Abbildung 2 ist in Kurve 1 ein repräsentativer Linienscan über einen Oligonucleotidspot dargestellt. Die Stromstärken, die rechts und links dieses Spots gemessen wurden, sind charakteristisch für das ungestörte positive Feedback

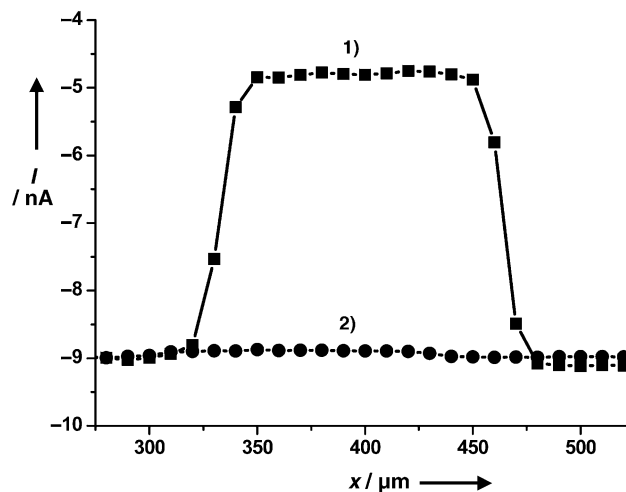


Abbildung 2. Linienscans mit einer 10- μm -Pt-Mikroelektrode in konstantem Abstand (10 μm) über den Spot eines einzelsträngigen Fängeroligonucleotids. 1) Mediator $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (5 mM in 3 M NaCl; 0.1 M Phosphatpuffer, pH 5.7), SECM-Sonde: 0 mV vs. Ag/AgCl/3 M KCl. 2) Mediator $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (5 mM in 3 M NaCl; 0.1 M Phosphatpuffer, pH 5.7), SECM-Sonde: -400 mV vs. Ag/AgCl/3 M KCl.

durch die propanthiolmodifizierte Au-Oberfläche. Der Stromfluss ist – wie aufgrund des postulierten Modells erwartet – über dem DNA-haltigen Spot stark vermindert; dies resultiert aus dem niedrigeren Ausmaß des Redoxrecyclings, was eine Folge der durch elektrostatische Wechselwirkungen behinderten Diffusion ist. Erwartungsgemäß verringert sich der Sondenstrom kaum, wenn anstatt des negativ geladenen Redoxmediators eine positiv geladene redoxaktive Spezies wie $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ verwendet wird. In diesem Fall wird lediglich eine vernachlässigbare Verringerung des Sondenstroms beobachtet (Abbildung 2, Kurve 2), die möglicherweise durch einen rein sterischen Einfluss der DNA-Fängersequenzen auf den Transfer des Mediators bedingt ist. Dies beweist, dass die Modulation des Sondenstroms in Gegenwart eines negativ geladenen Redoxmediators tatsächlich auf elektrostatischen Abstoßungskräften beruht.

3D-SECM-Abbildungen (I - x/y -Diagramme) von DNA-modifizierten Spots wurden durch mehrfache Linienscans erhalten (Abbildung 3). Die Abbildungen 2 und 3 belegen das Potenzial des SECM-Abstoßungsmodus zur Visualisierung immobilisierter Nucleinsäurestränge. Solche Abbildungen können prinzipiell verwendet werden, um die Qualität des Spottingprozesses und die laterale Homogenität der Oberflächenkonzentration der DNA-Fängersequenzen innerhalb des Spots zu überprüfen. Um zu testen, ob sich das Verfahren für die Detektion von Hybridisierungen eignet, wurden Spots einzelsträngiger DNA-Fängersequenzen mit den komplementären Targetsequenzen vor der Aufnahme des SECM-Bildes hybridisiert. Einer von zwei benachbarten Spots wurde mit einer verdünnten Lösung des komplementären

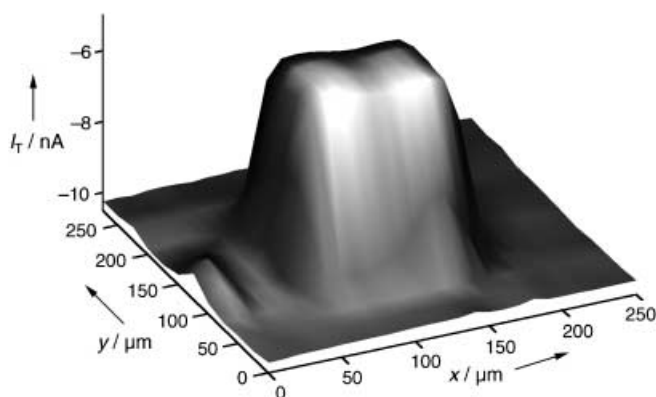


Abbildung 3. Dreidimensionale SECM-Visualisierung des Spots eines einzelsträngigen 20-mer Oligonucleotids im Abstoßungsmodus des SECM. (5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ in 3 M NaCl; 0.1 M Phosphatpuffer, pH 5.7; 0 mV vs. Ag/AgCl/3 M KCl).

tären DNA-Targets inkubiert, während der zweite Spot zur Kontrolle mit einer DNA-freien „Hybridisierungslösung“ bedeckt wurde. Nach Erreichen einer vollständigen Hybridisierung^[7] wurden die Glasplättchen sorgfältig mit Spülpuffer (3 M NaCl; 0.1 M Phosphatpuffer, pH 5.7) gewaschen, und die beiden Spots wurden im Abstoßungsmodus untersucht.

Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse und belegt, dass die Hybridisierung als deutlich sichtbare Differenz zwischen dem Sondenstrom über dem hybridisierten Spot und über dem Kontrollspot detektiert werden kann. In Übereinstimmung mit unserer Hypothese ist der kathodische Sondenstrom über dem hybridisierten Spot wesentlich geringer, da die Duplexbildung die Zahl der abstoßenden Ladungen vergrößert. Der hier verwendete SECM-Aufbau ist zwar für eine einfache Anwendung in der medizinischen Diagnostik zu komplex,

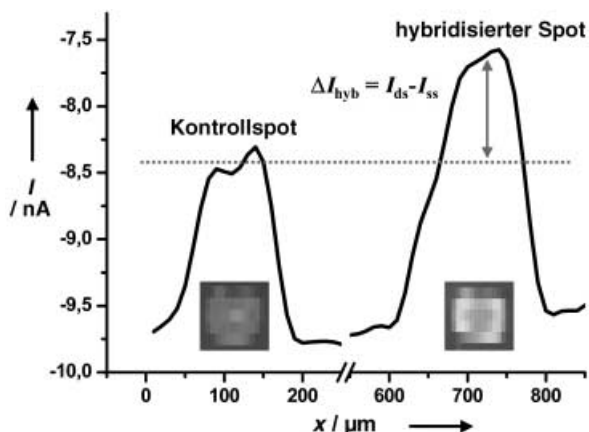


Abbildung 4. Detektion der Hybridisierung durch elektrostatische Abstoßung und Visualisierung der Duplexbildung im Abstoßungsmodus des SECM: Inkubation eines ausgewählten Spots einer 20-mer Oligonucleotidfängersequenz mit Hybridisierungspuffer (1 M NaCl; 0.1 M Phosphatpuffer, pH 6.3) und 2 µM der komplementären Oligonucleotidtargetsequenz; entsprechende Inkubation eines benachbarten Kontrollspots mit dem targetfreien Hybridisierungspuffer; Aufnahme der SECM-Linienscans nach Ende der Hybridisierung (ca. 2 h) und intensiven Spülen (10-µm-Pt-Mikroelektrode; 0 mV vs. Ag/AgCl/3 M KCl; 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ in 3 M NaCl; 0.1 M Phosphatpuffer, pH 5.7).

doch sollte es möglich sein, ein einfaches elektrochemisches Instrument auf der Basis von Mikrofabrikationstechniken zu entwickeln. Ein solches Instrument könnte z. B. aus einem Array immobilisierter DNA-Fängersequenzen auf einem Basischip und einem Array individuell ansteuerbarer Pt-Mikroelektroden in einer Deckelplatte bestehen. Mithilfe eines speziell angepassten Spacer- und Ausrichtungselementes könnten die Mikroelektroden und die DNA-Spots so angeordnet werden, dass beim Zusammenklappen der Basis- und Deckelplatte die Mikroelektroden und die DNA-Spots in geeignetem Arbeitsabstand zueinander fixiert werden. Die unterschiedlichen Stromstärken an den einzelnen Pt-Elektroden nach Kontakt mit einer Lösung, die den komplementären Halbstrang enthält, wären ein Indiz für den Zustand des gegenüberliegenden, mit DNA-Fängersequenzen modifizierten Bereichs.

Wir konnten nachweisen, dass die einfache Coulomb-Wechselwirkung zwischen immobilisierter DNA und $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ effizient die Diffusion des gelösten Redoxmediators zur Au-Oberfläche moduliert. Dies hat einen großen Einfluss auf den lokalen amperometrischen Feedbackstrom und erlaubt die Visualisierung von DNA-modifizierten Oberflächenbereichen. Der Anstieg der negativen Ladungsdichte nach Duplexbildung ermöglicht die vollständig markerfreie Detektion von DNA-Hybridisierungen durch Analyse der elektrostatischen Abstoßung. Die Optimierung der Methode erfolgt derzeit durch Untersuchung einer Vielzahl von Parametern wie der Oberflächenbelegung mit DNA-Fängersequenzen, der Länge der DNA-Fängersequenzen, der Temperatur, der Ionenstärke und des pH-Wertes.

Experimentelles

Die durch Spotting erzeugten DNA-Mikroarrays sowie die Oligonucleotidfängersequenzen und -targetsequenzen wurden von FRIZ Biochem bereitgestellt. Als Fängersequenz diente ein 3'-modifiziertes 20-mer Oligonucleotid ($[\text{Fluo-HN-C}_{12}]$ -TGCGGATAACACAGT-CACCT-[C₃-S-S-C₃-OH]), als Targetsequenz ein unmodifiziertes komplementäres Oligonucleotid (ACGCCTATTGTGTCA-GTGGA). Das Spotting der Fängersequenzen erfolgte auf mit Au bedampften Glasplättchen mithilfe eines Mikroarrays (Cartesian Technologies) der mit einem Druckkopf (ChipMaker) und Mikrospotting-Nadeln (120 µm Durchmesser; Telechem International) ausgestattet war. Die Fängersequenzen wurden in einem Spotarray mit einem Spotdurchmesser von 150 µm in zwei Reihen angeordnet, wobei ein feiner Kratzer in der Goldoberfläche den Kontrollbereich vom Hybridisierungsbereich trennte. Ein O-Ring definierte den für die SECM-Messungen zugänglichen Bereich.

Die verwendeten Lösungen wurden mit dreifach destilliertem Wasser hergestellt. KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $3\text{H}_2\text{O}$, NaCl, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ und $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ wurden von Sigma, Natriumdodecylsulfat von Merck bezogen.

Glasisolierte Pt-Mikroscheibenelektroden (\varnothing 10 µm, RG-Werte 10–20) wurden als SECM-Sonden eingesetzt. Sie wurden mit Aluminiumoxidpasten (Partikelgröße: 3, 1 und 0.3 µm) auf einem weichen Poliertuch poliert und cyclovoltammetrisch in 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -Lösung charakterisiert. Die SECM-Experimente wurden mit einem selbstentwickelten SECM in einer ungeteilten Messzelle in Zweielektrodenkonfiguration (SECM-Sonde und miniaturisierte Ag/AgCl/3 M-KCl-Referenzelektrode) durchgeführt. Der Aufbau war in einen Faraday-Käfig integriert, und ein rauscharmer Potentiostat (VA10, npi electronic) wurde für die elektrochemischen

Messungen eingesetzt. Die elektrochemische Messzelle war auf der Grundplatte eines Zweiachsen-Translationssystems montiert, das mit computergesteuerten Schrittmotoren (Owis) ausgestattet war, die eine Probenbewegung in x/y -Richtung mit einer nominalen Auflösung von $0.625\ \mu\text{m}$ pro Halbschritt ermöglichen. Die Annäherung der SECM-Sonde (z -Scan) wurde mit einem dritten Schrittmotor erreicht, der senkrecht zur Probenebene angebracht war. Eine in Microsoft Visual Basic 3.0 programmierte Software steuerte alle Systemparameter und ermöglichte die Datenaufnahme über eine 16 Bit-AD/DA-Karte (Plug-In).

Sondenannäherungskurven (z -Scans) wurden zur Positionierung der Sonde im Nahfeldbereich des elektrochemischen Feedbacks verwendet. Die Arbeitsdistanz wurde so gewählt, dass der amperometrische Sondenstrom 50 % über dem Wert bei großem Probenabstand lag (im Allgemeinen $10\ \mu\text{m}$). SECM-Abbildungen wurden durch rasternde Bewegung des DNA-Chips in x/y -Richtung bei festem Sonden-Proben-Abstand und simultaner Aufnahme des Sondenstroms als Funktion des Ortes erhalten.

Eingegangen am 10. März 2004 [Z54228]

Online veröffentlicht am 8. Juni 2004

Stichwörter: DNA-Erkennung · Elektrostatische Wechselwirkungen · Oberflächenanalyse · Rastersondenverfahren · SECM

Csőregi, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4254–4261; c) A. Hengstenberg, A. Blöchl, I. D. Dietzel, W. Schuhmann, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 942–946; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 905–908; d) W. B. Nowall, D. O. Wipf, W. G. Kuhr, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2601–2606; e) H. Shiku, T. Matsue, I. Uchida, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1276–1278; f) K. Yamashita, M. Takagi, K. Uchida, H. Kondo, S. Takenaka, *Analyst* **2001**, 126, 1210–1211; g) J. Wang, F. Song, F. Zhou, *Langmuir* **2002**, 18, 6653–6658.

- [6] a) J. Kwak, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 1221–1227; b) A. J. Bard, F.-R. F. Fan, M. V. Mirkin in *Electroanalytical Chemistry*, (Hrsg.: A. J. Bard), Marcel Dekker, New York, **1994**, S. 243–373.
[7] Die effiziente Hybridisierung unter den gegebenen experimentellen Bedingungen (Temperatur, Pufferzusammensetzung, Targetkonzentration, Hybridisierungszeit) wurde durch Fluoreszenzvergleichsmessungen analog hergestellter DNA-Chips belegt.

- [1] a) R. C. McGlennen, *Clin. Chem.* **2001**, 47, 393–402; b) S. A. Greenberg, *Neurology* **2001**, 57, 755–761; c) J. G. Hacia, S. C. Collins, *J. Med. Genet.* **1999**, 36, 730–736; d) D. Gerhold, T. Rushmore, C. T. Caskey, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, 24, 168–173; e) M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, *Science* **1995**, 270, 467–470.
[2] a) T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 10, 1192–1199; b) E. Palecek, F. Jelen, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2002**, 33, 261–270; c) J. J. Gooding, *Electroanalysis* **2002**, 13, 1149–1156.
[3] a) G. Hartwich, D. J. Caruana, T. de Lumley-Woodyear, Y. B. Wu, C. N. Campbell, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10803–10812; b) R. E. Holmlin, P. J. Dandliker, J. K. Barton, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2830–2848; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2714–2730; c) S. O. Kelly, N. M. Jackson, M. G. Hill, J. K. Barton, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 991–996; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 941–945; d) K. M. Millan, S. R. Mikkelsen, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2317–2323; e) J. Wang, G. Rivas, C. Parrado, X. H. Chai, M. N. Flair, *Talanta* **1997**, 40, 2003–2010; f) M. Minunni, S. Tombelli, E. Mariotti, M. Mascini, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, 369, 589–593; g) A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, M. Ozsoz, *Electroanalysis* **2001**, 12, 219–223; h) P. M. Armistead, H. H. Thorp, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3764–3777; i) S. O. Kelly, E. M. Boon, J. K. Barton, N. M. Jackson, M. G. Hill, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 4830–4837; j) D. J. Caruana, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 769–774; k) J. Wang, A.-N. Kawde, *Anal. Chim. Acta* **2001**, 431, 219–224; l) M. Gheorghe, A. Guiseppi-Elie, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, 19, 95–102; m) J. J. Gooding, A. Chou, F. J. Mearns, E. Wong, K. L. Jericho, *Chem. Commun.* **2003**, 15, 1938–1939.
[4] a) A. J. Bard, F.-R. F. Fan, J. Kwak, O. Lev, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 132–138; b) A. J. Bard, F.-R. F. Fan, D. T. Pierce, P. R. Unwin, D. O. Wipf, F. Zhou, *Science* **1991**, 254, 68–74; c) M. V. Mirkin, *Mikrochim. Acta* **1999**, 130, 127–153; d) A. L. Barker, M. Gonsalves, J. V. Macpherson, C. J. Slevin, P. R. Unwin, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 385, 223–240; e) G. Nagy, L. Nagy, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 366, 735–744.
[5] a) G. Wittstock, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 5059–5066; b) S. Gaspar, M. Mosbach, L. Wallman, T. Laurell, E.