

## **Elektrochemische Rastermikroskopie**

### **Ein SECM-Detektionsmodus mit verbesserter Empfindlichkeit und lateraler Auflösung: Detektion von Galactosidaseaktivität mit Signal-verstärkung durch Glucosedehydrogenase\*\***

*Chuan Zhao und Gunther Wittstock\**

Die elektrochemische Rastermikroskopie (SECM, scanning electrochemical microscopy) hat sich zu einer effizienten Untersuchungsmethode für heterogene Elektronentransferreaktionen, den Ladungstransfer an Flüssig-flüssig-Grenzflächen, und den molekularen Transport durch Membranen entwickelt.<sup>[1]</sup> SECM wird insbesondere bei der Untersuchung biologischer Systeme, z.B. der metabolischen Aktivität von ganzen Organismen, Zellen, subzellulären Einheiten und Enzymen, eingesetzt.<sup>[1a,2]</sup> Besonderes Interesse gilt der Aktivitätsabbildung immobilisierter Enzyme auf gemusterten Grenzflächen; Grund ist die Bedeutung solcher Strukturen für die Herstellung von Prototypen integrierter und miniaturisierter Biosensoren und chipbasierter Assays.<sup>[3]</sup> SECM kann im Feedback(FB)- und Generator-Kollektor(GC)-Modus betrieben werden. Beide Modi wurden bereits erfolg-

[\*] Dr. C. Zhao, Prof. Dr. G. Wittstock  
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg  
Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften  
26111 Oldenburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 441-798-3684  
E-mail: gunther.wittstock@uni-oldenburg.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Wi1617/1-4) unterstützt. SECM = elektrochemische Rastermikroskopie

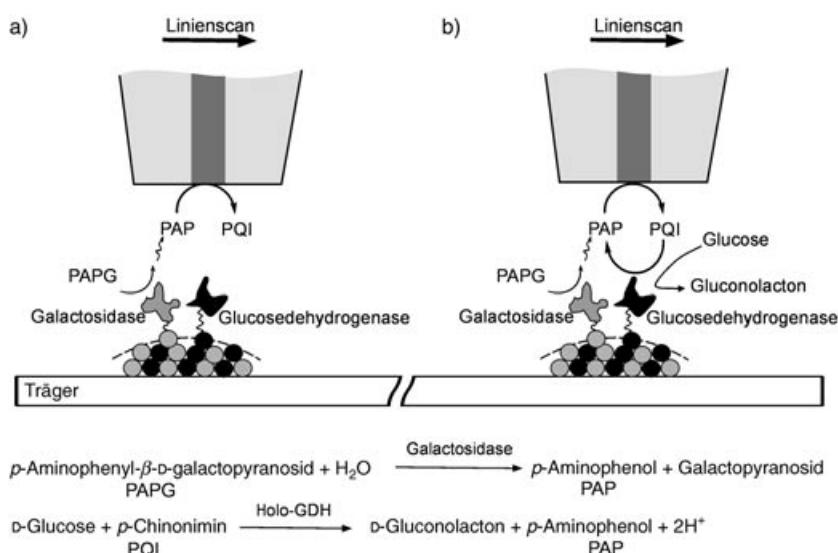
reich zur Abbildung von Enzymaktivitäten an Grenzflächen eingesetzt.

Im FB-Modus wird eine Ultramikroelektrode (UME) zur Oxidation oder Reduktion eines gelösten reversiblen Redoxmediators genutzt. Der Feedback-Prozess wird eingeleitet, wenn der Mediator zur Probe diffundiert und dort mit dieser unter Rückbildung seines ursprünglichen Oxidationszustands reagiert. Der FB-Modus ermöglicht eine bessere laterale Auflösung als der GC-Modus, weil die Rückbildung des Mediators nur in unmittelbarer Nähe der UME stattfindet. Der FB-Modus ist jedoch nicht sehr empfindlich, weil die Geschwindigkeit der Bildung des Mediators durch die enzymatische Reaktion an der Oberfläche auf einem starken Hintergrundsignal bestimmt werden muss, das durch die Diffusion des Mediators aus der Volumenphase der Lösung zur UME entsteht. Bei der Abbildung von Enzymaktivitäten kann der FB-Modus nur für Oxidoreduktasen eingesetzt werden, da das immobilisierte Enzym den Mediator als redoxaktiven Cofaktor umsetzen muss.

Im GC-Modus zeichnet die UME die Konzentration einer Teilchensorte auf, die an der Oberfläche der Probe erzeugt wird. Im Idealfall wirkt die UME nur als passiver Sensor und liefert die Konzentrationsverteilung einer Teilchensorte in der Nähe der Probenoberfläche. Der GC-Modus ist empfindlicher, weil nur ein sehr schwaches Hintergrundsignal existiert. Jedoch ist die laterale Auflösung gering, weil sich die Teilchen von der Quelle an der Probenoberfläche durch Diffusion in alle Raumrichtungen ausbreiten können. Der GC-Modus lässt sich auch für andere Enzyme als Oxidoreduktasen verwenden, wenn das Enzym ein Substrat zu einem redoxaktiven Produkt umsetzt, das dann an der UME detektiert wird.<sup>[4]</sup>

Hier stellen wir einen neuen Detektionsmodus mit hoher Empfindlichkeit und hoher lateraler Auflösung vor, der bei einem Multienzymsystem aus immobilisierter Galactosidase (Gal) und Pyrrolochinolinchinon(PQQ)-abhängiger Glucosedehydrogenase (GDH) eingesetzt wurde. Gal, eines der am häufigsten verwendeten Markierungsenzyme,<sup>[5]</sup> ist keine Oxidoreduktase und kann im konventionellen FB-Modus nicht untersucht werden. Das Chinoprotein GDH ist wegen seiner Unempfindlichkeit gegen gelösten Sauerstoff und seiner sehr hohen Aktivität besonders interessant für Biosensoranwendungen.<sup>[6]</sup> Beide Enzyme wurden bereits separat im GC-Modus und GDH zusätzlich im FB-Modus untersucht.<sup>[7]</sup> Abbildungen der Gal-Aktivität im konventionellen GC-Modus erreicht man durch Versetzen der Lösung mit *p*-Aminophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (PAPG), wobei *p*-Aminophenol (PAP) entsteht (Abbildung 1a). Das Potential der UME beträgt  $E_T = 400$  mV (Ag|AgCl), sodass PAP, aber nicht PAPG, unter diffusionskontrollierten Bedingungen an der UME zu *p*-Chinonimin (PQI) oxidiert werden kann.<sup>[7a]</sup>

Beim neuen Detektionsmodus diffundiert das elektrochemisch erzeugte PQI, ein effizienter Cofaktor für GDH,<sup>[8]</sup> zum Mikrospot, wo es in Gegenwart von D-Glucose durch immobilisierte GDH wieder zu PAP umgesetzt wird (Abbildung 1b). PAP diffundiert nun zurück zur UME und schließt

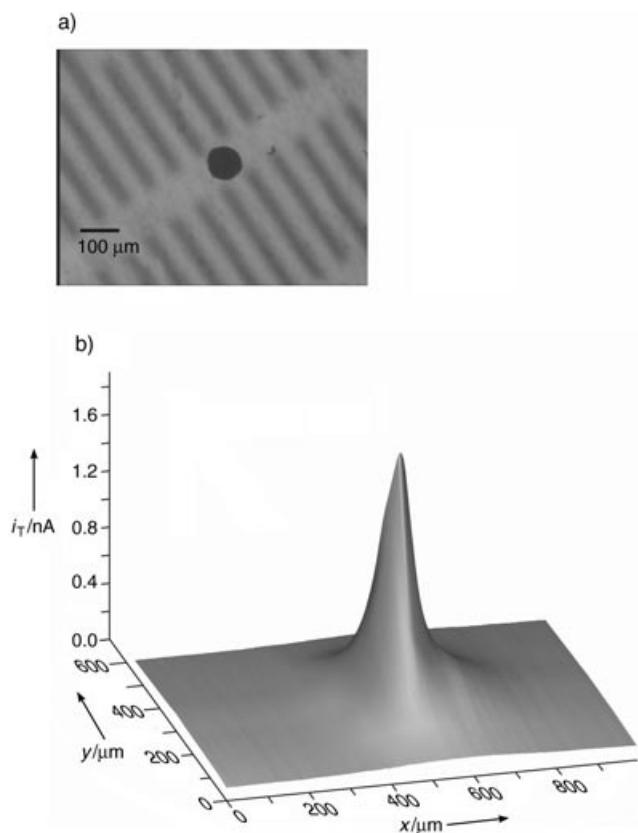


**Abbildung 1.** Kombinierter SECM-Modus im immobilisierten Multienzymsystem mit Gal und GDH; a) konventioneller GC-Modus für Gal in Abwesenheit von Glucose; b) Signalverstärkung in Gegenwart von Glucose. PAPG = *p*-Aminophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid, PAP = *p*-Aminophenol, PQI = *p*-Chinonimin. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

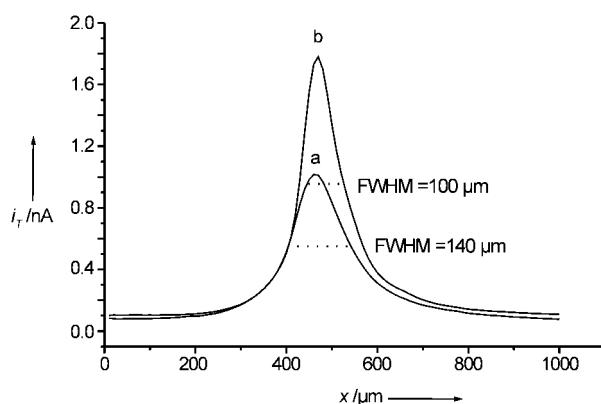
so die Feedback-Schleife. Der Strom an der UME,  $i_T$ , ergibt sich daher aus der Oxidation von PAP, das an Gal-modifizierten Oberflächen aus PAPG (GC-Modus) oder aus PQI gebildet wurde (FB-Modus). Eine Verstärkung tritt nur in der kleinen Region auf, die durch die lokale Ankopplung von GDH an die Probenoberfläche definiert ist. Dieser Detektionsmodus ist eine Kombination von GC- und FB-Modus und vereint deren Vorteile.

Für die SECM-Messungen wurden zunächst Gal und GDH in separaten Ansätzen an paramagnetischen Mikropartikeln immobilisiert. Eine Mischung beider Ansätze mit einem 1:1-Verhältnis von Gal- und GDH-modifizierten Partikeln wurde dann verwendet, um ein Partikelagglomerat auf einer hydrophoben Oberfläche nach einer in unserem Labor entwickelten Methode abzusetzen.<sup>[4]</sup> Die lichtmikroskopische Darstellung in Abbildung 2a zeigt den Partikelspot mit einem Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$ . In der SECM-Abbildung im kombinierten Detektionsmodus ist ein wohldefinierter steiler Peak über dem Spot mit dem immobilisierten Gal-GDH-System zu sehen (Abbildung 2b). Der Peak zeichnet sich durch einen äußerst geringen Hintergrundstrom und einen sehr steilen Anstieg des Signals über dem Agglomerat aus (verursacht durch die enzymatische Signalverstärkung). Solch ein scharf begrenztes Signal kann mit konventionellen GC-Experimenten prinzipiell nicht erhalten werden.

Zur Unterscheidung der Beiträge von Gal und GDH zum Elektrodenstrom wurden getrennte Linienscans über das Zentrum des Partikelagglomerats mit aktiver und mit deaktivierter GDH-Katalyse durchgeführt. Die GDH-Katalyse wurde dabei durch Verwendung einer glucosefreien Lösung deaktiviert (Peak a in Abbildung 3). Das Signal entspricht dem Peak für das durch Gal-Katalyse freigesetzte PAP im konventionellen GC-Modus (Abbildung 1a). Nach Zugabe von Glucose zur Arbeitslösung wird eine deutliche Zunahme der Stromstärke über dem Agglomerat beobachtet



**Abbildung 2.** a) Lichtmikroskopische Abbildung und b) SECM-Abbildung des Partikelagglomerats. Die unscharfen Linien in (a) stammen von einem Glasmaßstab mit einer Periodizität von 100 µm; SECM-Bedingungen: 20 mM HEPES-Puffer mit 30 mM KCl, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.0 mM PAPG und 50 mM Glucose;  $r_{UME} = 25$  µm,  $r_{Spot} = 50$  µm,  $E_T = 400$  mV,  $d = 40$  µm, Translationsgeschwindigkeit = 10 µm s<sup>-1</sup>.



**Abbildung 3.** SECM-Linienscan über das Zentrum des Agglomerats; a: konventioneller GC-Modus; b: kombinierter Modus (Kurve a wurde in der Arbeitslösung ohne Glucose aufgezeichnet, Kurve b wurde nach Zugabe von 50 mM Glucose erhalten). Die Bedingungen sind ansonsten identisch zu den in Abbildung 2 beschriebenen.

(Peak b in Abbildung 3), da jetzt der GDH-vermittelte Feedback-Kreislauf geschlossen wird. Im kombinierten Modus setzt sich  $i_T$  aus dem GC-Beitrag von Gal und der Feedback-Verstärkung durch GDH zusammen. Die Peak-

ströme sind im kombinierten Modus ungefähr 1.8-mal stärker als im konventionellen GC-Modus, wobei sich der Verstärkungsfaktor mit abnehmendem Arbeitsabstand erhöht. Ein noch geringerer Arbeitsabstand wurde wegen der Gefahr einer mechanischen Verschiebung des Partikelagglomerats durch die UME nicht angewendet.

Die laterale Ausdehnung des Signals, gemessen als Halbwertsbreite (FWHM), beträgt bei Peak a etwa 140 µm (Abbildung 3), dagegen erreicht sie bei Peak b nur ca. 100 µm – offensichtlich ist im kombinierten Modus auch die laterale Auflösung besser. Die FWHM von Peak b in Abbildung 3 stimmt genau mit dem Agglomeratdurchmesser in der lichtmikroskopischen Aufnahme (Abbildung 2a) überein. Durch den kombinierten Modus kann Gal mit einer Auflösung nachgewiesen werden, die im Allgemeinen nur mit dem FB-Modus (der aber bei Gal nicht verwendet werden kann) möglich ist. Dies ist ein wesentlicher Vorteil der neuen Methode. Das Prinzip lässt sich direkt auf alle Enzyme anwenden, die PAP freisetzen. So wurde die Aktivität von alkalischer Phosphatase, einem weiteren häufig verwendeten Markierungsenzym, bereits im konventionellen GC-Modus über die Detektion von PAP abgebildet<sup>[9]</sup> – auch hier wurde mithilfe des neuen Detektionsmodus die Empfindlichkeit verbessert und das Hintergrundsignal stark verringert.

Zusammenfassend haben wir einen neuen, kombinierten Detektionsmodus für SECM vorgestellt und mit dem Multi-enzymesystem Gal-GDH getestet. Dieser Ansatz ist eine neue SECM-Methode für die Untersuchung und Steuerung von Wechselwirkungen zwischen mikrostrukturierten Enzymschichten. Der neue Modus kann beim Entwurf und der Charakterisierung enzymbasierter Biochips/Biosensoren und Immunoassays, der Detektion von Enzymmarkierungen und anderen SECM-Experimenten verwendet werden. Derzeitige Untersuchungen widmen sich der quantitativen Beschreibung durch digitale Simulationen und der Entwicklung zu einem allgemeinen Detektionsprinzip für die SECM.

## Experimentelles

Biotinylierte Gal wurde wie zuvor beschrieben an Streptavidin-beschichtete Mikropartikel gebunden.<sup>[7]</sup> Apo-GDH (PQQ-abhängig, aus *Escherichia coli*, EC 1.1.99.17) wurde biotinyliert mit einer anschließenden Proteinbestimmung nach Lowry (Messung der Enzymkonzentration).<sup>[10]</sup> Biotinylierte GDH wurde analog behandelt.<sup>[7]</sup> Zur Rekonstitution des Holo-GDH aus Apo-GDH wurden 50 µL einer PQQ-Lösung (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) und 10 µL einer 0.1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung zu 40 µL Partikelsuspension gegeben und die Mischung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden Gal-beschichtete Partikel mit GDH-beschichteten Partikeln im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Mischung wurde in 100 µL HEPES-Puffer (20 mM, pH 7.5) resuspendiert. Ein Agglomerat aus den Gal-GDH-beschichteten Mikropartikeln wurde auf Parafilm-beschichteten Glasobjekträgern entsprechend einer zuvor beschriebenen Methode abgesetzt (Abbildung 2a)<sup>[4]</sup> und anschließend in einer gepufferten Arbeitslösung aus 20 mM HEPES mit 30 mM KCl, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM D-Glucose und 2.0 mM PAPG aufgenommen.

Die SECM-Messungen wurden mit einer zuvor beschriebenen Apparatur (Eigenbau) durchgeführt.<sup>[3]</sup> Eine UME mit einem Durchmesser von 50 µm (RG ~ 5) wurde nach einer Methode von Kranz et al. hergestellt und in allen SECM-Experimenten bei einem Arbeitsabstand von  $d = 40$  µm eingesetzt.<sup>[11]</sup>

Eingegangen am 14. März 2004 [Z54261]

**Stichwörter:** Elektrochemie · Enzymkatalyse · Grenzflächen · Rastersondenverfahren · SECM

- 
- [1] a) *Scanning Electrochemical Microscopy* (Hrsg.: A. J. Bard, M. V. Mirkin) Marcel Dekker, New York, **2001**, S. 445–519; 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) A. L. Barker, M. Gonsalves, J. V. Macpherson, C. J. Slevin, P. R. Unwin, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *385*, 223–240.
  - [2] a) B. R. Horrocks, G. Wittstock in Lit. [1a], S. 445–519; b) D. T. Pierce, P. R. Unwin, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1795–1804; c) G. Wittstock, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 5059–5066; d) S. Gaspar, M. Mosbach, L. Wallman, T. Laurell, E. Csöregi, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4254–4255.
  - [3] a) T. Wilhelm, G. Wittstock, *Langmuir* **2002**, *18*, 9485–9493; b) T. Wilhelm, G. Wittstock, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2350–2353; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2247–2250.
  - [4] C. A. Wijayawardhana, G. Wittstock, H. B. Halsall, W. R. Heineman, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 333–338.
  - [5] E. Burestedt, C. Nistor, U. Schagerlöf, J. Emneus, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4171–4177.
  - [6] a) J. A. Duine, *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *88*, 231–236; b) C. Anthony, *Biochem. J.* **1996**, *320*, 697–711; c) A. Oubrie, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, A. J. J. Olsthoorn, J. A. Duine, B. W. Dijkstra, *EMBO J.* **1999**, *18*, 5187–5194; d) L. Ye, M. Hämmmerle, A. J. J. Olsthoorn, W. Schuhmann, H. L. Schmidt, J. A. Duine, A. Heller, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 238–241.
  - [7] a) C. Zhao, J. K. Sinha, C. A. Wijayawardhana, G. Wittstock, *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *561*, 83–91; b) C. Zhao, G. Wittstock, *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 3145–3154.
  - [8] A. Rose, F. W. Scheller, U. Wollenberger, D. Pfeiffer, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, *369*, 145–152.
  - [9] G. Wittstock, K. Yu, H. B. Halsall, T. H. Ridgway, W. R. Heineman, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3578–3582.
  - [10] a) D. J. Hnatowich, F. Virzi, *J. Nucl. Med.* **1987**, *28*, 1294–1302; b) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
  - [11] C. Kranz, M. Ludwig, H. E. Gaub, W. Schuhmann, *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 38–40.
-