

## Elektronische Aptasensoren

Itamar Willner\* und Maya Zayats

### Stichwörter:

Aptamere · Biosensoren · Elektrochemie ·

Nanostrukturen · Proteine

Die Selektion von Aptameren – Nucleinsäuren, die spezifisch niedermolekulare Substrate oder Proteine binden – mithilfe des SELEX-Verfahrens (systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung) ermöglicht die Suche nach neuen spezifischen Erkennungsstrukturen. Vor allem die Anwendung von Aptameren als vielseitige Materialien für Biosensoren wurde in jüngster Zeit intensiv untersucht. In diesem Kurzaufsatz werden die aktuellen Fortschritte bei der Entwicklung elektronischer Sensoren auf Aptamerbasis (Aptasensoren) zusammengefasst, darunter elektrochemische, ionenselektive Feldeffekttransistor- und Quarzkristallmikrowaage-Sensoren, und es werden Strategien zum Entwurf von signalverstärkenden und markierungsfreien Aptasensoren beschrieben.

### 1. Einleitung

Aptamere sind Nucleinsäuren (DNA, RNA), die selektiv an niedermolekulare organische und anorganische Substrate oder an Makromoleküle wie Proteine binden.<sup>[1]</sup> Die Affinitätskonstanten von Aptamer-Substrat-Komplexen liegen im mikro- bis nanomolaren Bereich und sind mit den Bindungskonstanten von Antikörper-Antigen-Komplexen vergleichbar.<sup>[2]</sup> Die Verwendung von Aptameren als spezifisch bindenden Reagentien ist vor allem wegen ihrer relativ einfachen Herstellung durch ein evolutionäres Selektionsverfahren interessant, das ein kompliziertes Design von Rezeptoreinheiten vermeidbar macht. Die Selektion der Aptamere für eine spezifische Zielstruktur erfolgt nach dem SELEX-Verfahren (systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung),<sup>[3]</sup> das in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist. Der Prozess wird mit einer Zufallsbibliothek von Oligonucleotiden (meist  $10^{15}$ – $10^{16}$  Komponenten) gestartet; diese besteht aus linearen Nucleinsäuren zufälliger Sequenz, die von zwei konstanten Sequenzen am 5'- und 3'-Ende flankiert wird. Zur Entwicklung eines RNA-Aptamers muss zunächst die DNA-Bibliothek in einen RNA-Pool transkribiert werden, der dann eine die Zielstruktur enthaltende Trennungsmatrix passiert. Die wenigen Nucleinsäuren,

die eine Affinität zum Substrat (oder einigen unspezifischen Nucleinsäure-adsorbaten) aufweisen, binden an die Matrix, während der Großteil der Bibliothek abgewaschen wird. Die matrixgebundenen Nucleinsäuren werden eluiert und durch Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert;

so entsteht eine Mischung aus Nucleinsäuren mit unterschiedlichen Affinitäten zum Zielmolekül (Target). Durch wiederholte Trennung der Mischung über der ligandenmodifizierten Matrixoberfläche lassen sich diejenigen Nucleinsäuren anreichern, die eine hohe Affinität für das Substrat haben. Gewöhnlich erhält man brauchbare Aptamere nach 8 bis 15 Trennungs-/Amplifikations-Zyklen.

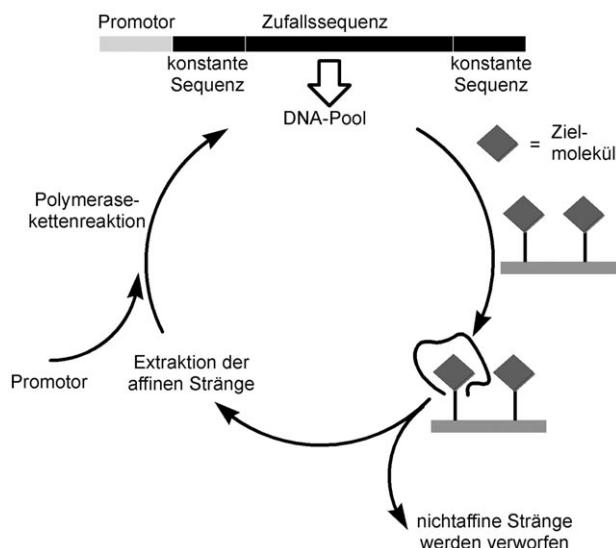


Abbildung 1. Herstellung eines Aptamers durch systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (SELEX-Verfahren).

[\*] Prof. I. Willner, M. Zayats

Institute of Chemistry, The Hebrew University of Jerusalem  
Jerusalem 91904 (Israel)  
Fax: (+972) 2-6527715  
E-Mail: willnea@vms.huji.ac.il

Die Selektion von DNA-Aptameren läuft genauso ab; es fehlt lediglich der einleitende Transkriptionsschritt. Die einzelsträngigen DNA- oder RNA-Aptamere binden an ihr Target, indem sie durch Ausbildung von Schleifen und hybridisierten Regionen (durch komplementäre Watson-Crick-Basenpaarung) eine dreidimensionale Struktur einnehmen.<sup>[4]</sup> Abgeschlossen wird der Entwicklungsprozess durch die Identifizierung der Aptamerzusammensetzung durch Sequenzierung und die Aufklärung der Tertiärstruktur des Aptamer-Substrat-Komplexes durch NMR-Spektroskopie.<sup>[5]</sup> Auf diese Weise gelangt man ausgehend von einer Zufallsbibliothek zu einer hochaffin bindenden Substanz, die durch PCR-Amplifikation praktisch unbegrenzt verfügbar ist.

Aptamere finden wachsendes Interesse als aktive Trennmedien für die Chromatographie<sup>[6]</sup> und Elektrophorese,<sup>[7]</sup> als therapeutische und diagnostische Verbindungen<sup>[8]</sup> und als aktive Materialien für Biosensoren.<sup>[9]</sup> Der Einsatz von Aptameren in Biosensoren ist besonders interessant, da sie hier Antikörper ersetzen können und mehrere Vorteile gegenüber Immunsensoren haben: 1) Die In-vitro-Selektion der Aptamere macht die In-vivo-Immunisierung von Tieren zur Antikörperfertigung überflüssig. Dies ermöglicht die Herstellung von Aptameren als Liganden für toxische Verbindungen, z.B. solchen, gegen die das Immunsystem keine Antikörper bilden kann. 2) Anders als bei Antikörpern, die während des Immunisierungsprozesses Mutationen und Strukturänderungen durchlaufen, liefert die chemische Synthese von Aptameren gewöhnlich hoch reproduzierbare Strukturen der bindenden Liganden. 3) Die chemische Modifikation von Aptameren mit optischen oder redoxaktiven Markierungen oder mit funktionellen Gruppen, die die Bindung an Überträger ermöglichen, ist meist einfacher als die Derivatisierung von Antikörpern. 4) Die direkte Modifikation der Aptamere mit bildgebenden Markierungen ermöglicht den direkten Nachweis des Aptamer-Substrat-Komplexes ohne einen komplexen Antigen-Antikörper-Sandwich-Assay. Dies ist vor allem für niedermolekulare Verbindungen wichtig, bei denen mit Immunsensoren nur kompetitive Tests möglich sind. 5) Unspezifische Adsorptionsphänomene an Kontaktflächen sind bei Nucleinsäuren meist weniger ausgeprägt als bei Proteinen. Ein weiterer Vorteil ist die thermische Stabilität von Nucleinsäuren im Vergleich zu Antikörpern.

Bei all den genannten Vorteilen von Aptameren gegenüber Antikörpern sollen auch die Nachteile nicht verschwie-

gen werden: DNA und besonders RNA sind sehr empfindlich gegen hydrolytische Spaltung durch Nucleasen, sodass sie nur in sehr reiner Umgebung eingesetzt werden können. Einige Ansätze wurden bisher vorgestellt, um Aptamere durch Modifikationen an der 2'-Position des Ribosering<sup>[10]</sup> oder durch die spezifische Modifikation der Pyrimidinnucleotide<sup>[11]</sup> in nucleaseresistente Verbindungen umzuwandeln.

Es gibt bereits zahlreiche Untersuchungen über optische Aptasensoren,<sup>[12,13]</sup> die auch schon in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst wurden.<sup>[9]</sup> Darüber hinaus erleben wir zurzeit eine rasante Entwicklung bei elektronischen (elektrochemischen, FET-, piezoelektronischen) Aptasensorsystemen. Dieser Kurzaufsatz fasst die Fortschritte zusammen und beleuchtet die Vorteile einer elektronischen Signalübertragung in Aptasensorsystemen.

## 2. Elektrochemische Aptasensoren

Die enormen Fortschritte bei der Entwicklung elektronischer Biosensoren und besonders der Signalverstärkung haben sich auch in den Konzepten für die Entwicklung und Herstellung von Aptasensoren niedergeschlagen. Für den Erkennungsvorgang werden oft katalytisch aktive Marker wie Enzyme, anorganische oder organische Katalysatoren oder Nanopartikel eingesetzt. Enzyme, insbesondere Redoxenzyme, werden an Antikörper oder Nucleinsäuren gekuppelt, und diese bewirken als biokatalytische Konjugate eine Verstärkung des elektronischen Messsignals der Immunkomplexe oder der DNA. So wird beispielsweise durch Hydrolyse von *p*-Aminophenylphosphat durch das Konjugat eines Antikörpers mit alkalischer Phosphatase *p*-Aminophenol als elektrochemisch nachweisbares Produkt erhalten.<sup>[14]</sup> Die elektrochemische Analyse von DNA gelang mit Nucleinsäuren, die mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) als Marker für die bioelektrokatalysierte Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konjugiert waren.<sup>[15]</sup> In ähnlicher Weise wurde die enzymkatalysierte Auffällung eines unlöslichen Produkts auf den Elektroden als verstärktes Messsignal für den elektrochemischen oder mikrogravimetrischen Nachweis von Bindungsereignissen genutzt. Beispielsweise dienten biotinmarkierte Meerrettich-Peroxidase und alkalische Phosphatase oder Nucleinsäuren, die mit alkalischer Phosphatase funktionalisiert waren, als Marker für die Analyse von Immunkomplexen,<sup>[16]</sup> DNA<sup>[17]</sup>



**Itamar Willner** ist Professor für Chemie an der Hebräischen Universität Jerusalem. Er promovierte 1978 an der H.U. und absolvierte ein Postdoktorat in Berkeley, bevor er 1982 nach Jerusalem an die dortige Chemie-Fakultät zurückkehrte. Seine Forschungen gelten der molekularen Elektronik, der Nanotechnologie, der Nanobiotechnologie und der supramolekularen Chemie. Er ist Träger des Israel Prize für Chemie (2002), des Israel Chemical Society Award (2001) und des Max-Planck-Forschungspreises für internationale Kooperation (1998) sowie

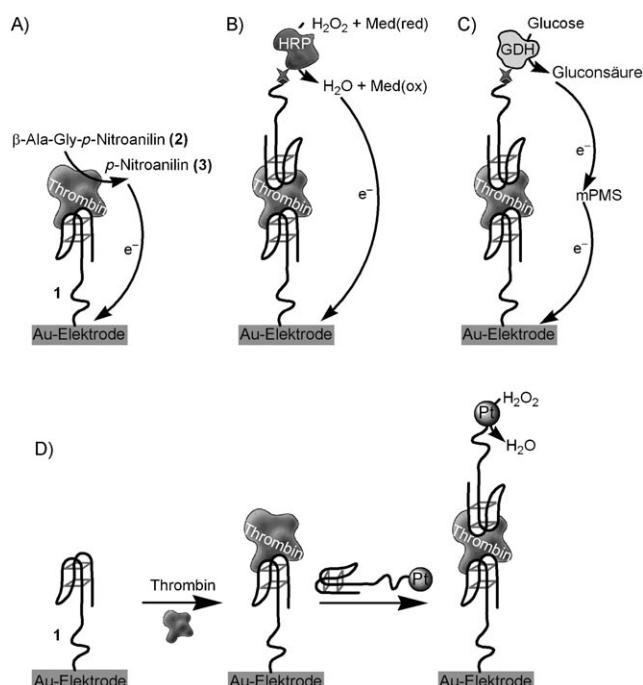
Mitglied der Israelischen Akademie der Wissenschaften und der Europäischen Akademie der Wissenschaften und Künste.



**Maya Zayats** studierte Chemie an der Hebräischen Universität Jerusalem (BSc 2001), wo sie zurzeit in der Arbeitsgruppe von I. Willner an ihrer Dissertation arbeitet. Sie ist Eshkol-Stipendiatin des israelischen Wissenschaftsministeriums und Trägerin des Yashinski Award. Ihre Forschungen gelten der Entwicklung enzymbasierter elektronischer Biosensoren und der Anwendung von Nanopartikeln für die Signaldetektion.

oder Fehlpaarungen einzelner Basen in der DNA.<sup>[18]</sup> Messsignal war die biokatalysierte Ausfällung unlöslicher Produkte (z.B. eines unlöslichen Indigoderivats) auf der Elektrode. Solche Konstrukte wurden auch zum Nachweis biologischer Erkennungsreaktionen genutzt, indem die Isolierung der Elektrode mit Faraday-Impedanzspektroskopie verfolgt oder die Masseveränderung auf piezoelektrischen Quarzkristallen gemessen wurde.

Zwei unterschiedliche Ansätze, die auf den biokatalytischen Eigenschaften von Enzymen beruhen, wurden zum Nachweis von Thrombin durch sein Aptamer und zur Signalverstärkung beschrieben (Abbildung 2).<sup>[19]</sup> Im einen Fall



**Abbildung 2.** Elektrochemischer Nachweis von Thrombin und Verstärkung des Messsignals. A) Die thiomerkaptoveresterte Aptamericone (1) auf einer Goldelektrode fixiert; dieses Konjugat reagierte dann als Sensoroberfläche auf die Bindung von Thrombin. Das gebundene Thrombin wurde als Protease aktiv und spaltete von einem Nitroanilin-funktionalisierten Peptid 2 p-Nitroanilin (3) hydrolytisch ab. Letzteres wurde dann elektrochemisch nachgewiesen. B, C) Enzymgekoppelte Antithrombin-Aptasensoren als verstärkende Marker (Meerrettich-Peroxidase (HRP) bzw. Glucosedehydrogenase (GDH)). Med: Mediator; mPMS: 1-Methoxy-5-methylphenaziniummethylsulfat. D) Mit Pt-Nanopartikeln markierte Aptamere als Elektrokatalysatoren.

(Abbildung 2A) wurde ein thiomerkaptoverestiertes Aptamer, **1**, auf einer Goldelektrode fixiert; dieses Konjugat reagierte dann als Sensoroberfläche auf die Bindung von Thrombin. Das gebundene Thrombin wurde als Protease aktiv und spaltete von einem Nitroanilin-funktionalisierten Peptid **2** p-Nitroanilin (**3**) hydrolytisch ab. Letzteres wurde dann elektrochemisch nachgewiesen. Im zweiten Ansatz (Abbildung 2B) wird die Eigenschaft genutzt, dass Thrombin zwei unterschiedliche Bindestellen für Aptamere aufweist.<sup>[20]</sup> In einem Sandwich-Assay wurde ein zweites Aptamer, das mit Meerrettich-Peroxidase gekuppelt ist, an den immobilisierten Aptamer-Thrombin-Komplex gebunden und so als Marker mit Verstärkungsfunktion eingesetzt. Das Enzym katalysiert über einen Zwischenschritt die Reduktion von  $H_2O_2$ . Anhand des amperometrischen Signals wurde dann die Konzentration

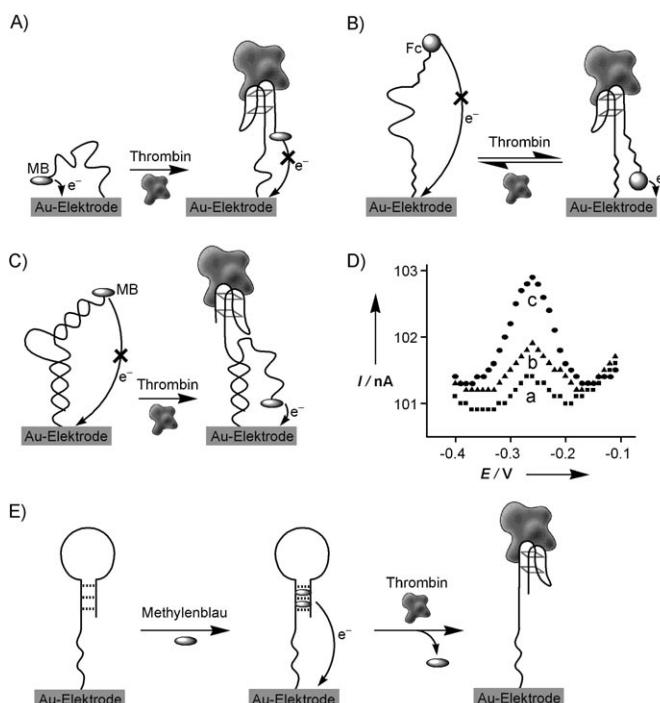
von Thrombin bestimmt; die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei  $8 \times 10^{-8} \text{ M}$ .

Auch die vom Pyrrolochinolinchinon abhängige Glucosedehydrogenase (GDH) wurde als biokatalytischer Marker für den signalverstärkten amperometrischen Nachweis von Thrombin eingesetzt (Abbildung 2C).<sup>[21]</sup> Erneut wurde der Umstand, dass zwei unterschiedliche DNA-Aptamere an Thrombin binden,<sup>[20]</sup> für die Entwicklung eines Aptasensors für Thrombin genutzt. Thrombin wurde über ein thiomerkaptoverestiertes, 15-gliedriges Aptamer an eine Goldelektrode gebunden. Über die zweite Bindestelle wurde ein biotinyliertes 29-mer Aptamer und daran ein GDH-Avidin-Konjugat konjugiert. Die bioelektrokatalysierte Oxidation von Glucose in Gegenwart von 1-Methoxy-5-methylphenaziniummethylsulfat (mPMS) als diffusiblem Mediator lieferte bei amperometrischem Nachweis ein lineares Signal im Bereich von  $4-10 \times 10^{-8} \text{ M}$  Thrombin.

In einem ähnlichen Ansatz wurden die Biokatalysatoren durch Pt-Nanopartikel (NPs) als katalytische Marker ersetzt (Abbildung 2D).<sup>[22]</sup> Die Pt-NPs wurden mit dem thiomerkaptoverestierten Aptamer **1** beladen. Die schrittweise Anlagerung von Aptamer **1** an die Oberfläche und die nachfolgende Bildung des Aptamer-Thrombin-Komplexes an der Oberfläche wurde durch die Assoziation des aptamerfunktionalisierten Pt-NP an den Aptamer-Thrombin-Komplex auf der Elektrode verfolgt. Die Nanopartikel katalysieren die elektrochemische Reduktion von  $H_2O_2$ , und der resultierende Kathodenstrom verstärkt das Bindungssignal, sodass Thrombin bis zu einer Nachweisgrenze von  $1 \times 10^{-9} \text{ M}$  gefunden werden kann. Dieses System ähnelt zwar dem biokatalytischen Sandwich-Nachweis von Thrombin mit HRP oder GDH als Biokatalysatoren (Abbildung 2B, C), doch der Pt-NP-Katalysator ist etwa 80-mal empfindlicher. Diese Verbesserung röhrt zum Teil wohl daher, dass, anders als bei den enzymatischen Systemen, kein diffusibler Elektronenmediator benötigt wird.

Man hat eine Reihe von elektrochemischen DNA-Sensoren entwickelt, deren Funktion auf der Konformationsänderung von Nucleinsäuren bei der Hybridisierung beruht.<sup>[23,24]</sup> Immobilisiert man beispielsweise eine pinzettenartige DNA-Haarnadelstruktur mit redoxaktivem Marker auf einer leitenden Oberfläche, kommt es aufgrund der räumlichen Nähe zwischen dem Redoxreporter und der Elektrode zur Elektronenübertragung. Hybridisiert die Haarnadelsequenz allerdings mit einer komplementären DNA, bildet sich eine gestreckte Doppelhelix, sodass der Redoxmarker von der Elektrode weg bewegt und der elektrische Kontakt unterbrochen wird. So lässt sich die DNA amperometrisch nachweisen, wobei durch die Hybridisierung der elektrische Kontakt zwischen Elektrode und Redoxmarker zusammenbricht.<sup>[23]</sup> Einzelsträngige flexible Nucleinsäuren als Aptamere für Proteine oder niedermolekulare Substanzen gehen in wohldefinierte dreidimensionale Strukturen über, wenn sie einen Komplex mit dem Wirtsubstrat eingehen. Dies ermöglicht es, redoxaktive Gruppen an die Aptamer-Nucleinsäuren zu binden, sodass sich die Bildung des Aptamer-Substrat-Komplexes durch die Messung der elektrischen Eigenschaften des Redoxmarkers im starren dreidimensionalen Komplex nachweisen lässt.

Das Thrombin-Aptamer geht bei der Bindung des Substrats in eine G-Quadruplex-Form über. Darauf aufbauend wurde ein elektrochemischer Aptasensor für Thrombin entwickelt, indem das Aptamer mit einem redoxaktiven Methylenblau-Marker versehen und auf einer Elektrode immobilisiert wurde (Abbildung 3 A).<sup>[25]</sup> Durch die flexible Kon-



**Abbildung 3.** Elektrochemische Thrombin-Aptasensoren, deren Funktion auf einer kontrollierten Elektronenübertragung zwischen redoxmarkierten Aptamern und der Elektrode beruht. A) Der elektrische Kontakt zwischen dem aptamergebundenen Methylenblau (MB) und der Elektrode wird durch die Bildung des Aptamer-Thrombin-Komplexes verhindert. B, C) Der elektrische Kontakt zwischen aptamergebundem Ferrocen (Fc; B) oder Methylenblau (C) wird durch die Bildung des jeweiligen Aptamer-Thrombin-Komplexes hergestellt. D) Die mit der Konfiguration in (C) aufgenommenen Voltammogramme: a) kein Thrombin, b) 10 nm Thrombin, c) 256 nm Thrombin. (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [27]. Copyright 2005. American Chemical Society.) E) Blockade des elektrischen Signals von Methylenblau, das in eine Haarnadelstruktur interkaliert ist, durch Bildung des Aptamer-Thrombin-Komplexes.

formation der Nucleinsäurekette kann ein elektrischer Kontakt zwischen Redoxgruppe und Elektrode hergestellt werden, sodass die Reaktion von Methylenblau voltammetrisch bestimmt werden kann. Die Selbstorganisation des Aptamers in eine G-Quadruplex-Struktur bei der Bindung von Thrombin schirmt den Redoxmarker von der Elektrode ab, sodass die Elektronenübertragung unterbrochen wird; Thrombin lässt sich elektrisch mit einer Nachweisgrenze von etwa  $2 \times 10^{-8}$  M detektieren. Die elektrochemischen Aptasensoren lassen sich durch Behandlung mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid regenerieren.

Ein Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass mit der Abnahme des amperometrischen Signals des Redoxmarkers durch die Assoziation von Thrombin ein negatives Messsignal

erzeugt wird. Zur Lösung dieses Problems wurden zwei alternative Ansätze vorgeschlagen. Im einen Fall wurde ein difunktionelles thrombinbindendes Aptamer als elektrochemischer molekularer Signalgeber genutzt. Der Aptamerstrang trägt, je über einen Hexamethylenspacer verbunden, eine elektroaktive Ferrocengruppe als Redoxmarker am einen und eine Thiolgruppe am anderen Ende. Wegen der Länge und Flexibilität der Aptamerkette kommt es zu keinem elektrischen Kontakt zwischen der Ferrocengruppe und der Elektrode (Abbildung 3 B). Bindet allerdings das Thrombin an die Aptamerdomäne, bildet sich die starre G-Quadruplex-Konfiguration des Aptamers, wodurch die Ferroceneinheit zur Elektrode hin orientiert wird. Dadurch kommt es zu einer Elektronenübertragung zwischen dem elektroaktiven Ferrocen und der Elektrode, wodurch ein positives amperometrisches Messsignal als Reaktion auf die Bindung von Thrombin ausgelöst wird.<sup>[26]</sup> Der Sensor erreichte eine Nachweisgrenze von etwa  $5 \times 10^{-9}$  M und ließ sich durch eine Entfaltung des Aptamers in 1 M HCl regenerieren.

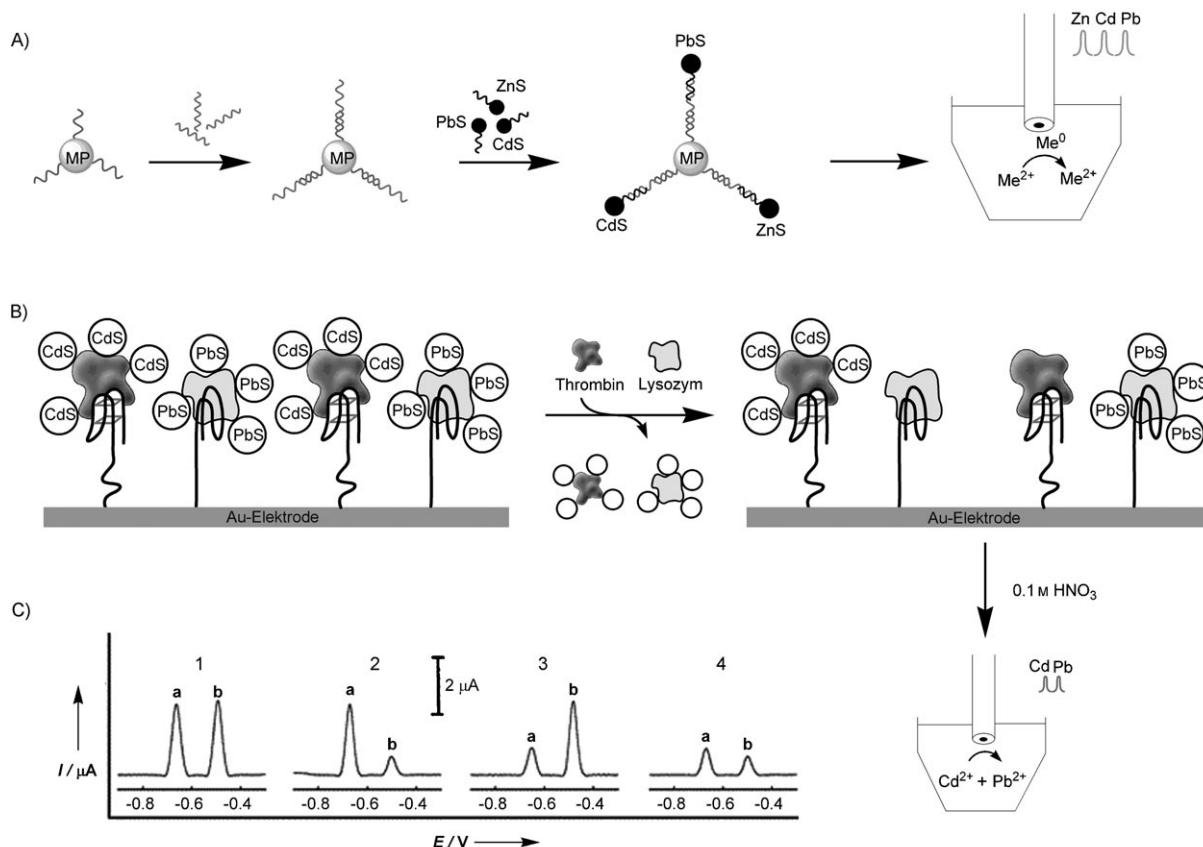
In einem verwandten Ansatz<sup>[27]</sup> (Abbildung 3 C) wurde ein Komplex mit einem DNA-Doppelstrang auf einer Goldelektrode fixiert. Er bestand aus zwei doppelsträngigen Domänen, die über eine nichtkomplementäre Nucleinsäurebrücke verbunden waren. Die elektrodenferne Domäne enthielt die Aptamersequenz und die komplementäre, am Ende mit Methylenblau funktionalisierte Sequenz als Gegenstrang. In Gegenwart von Thrombin dissoziert der thrombinbindende Doppelstrang und bildete den (G-Quadruplex)-Thrombin-Komplex. Dadurch kann der nun flexible Gegenstrang über die Methylenblau-Gruppe einen elektrischen Kontakt zur Elektrode aufnehmen. Das amperometrische Signal des Redoxmarkers ist der Messwert für den Thrombinnachweis (Abbildung 3 D). Auf diese Weise ließ sich Thrombin bis zu einer Konzentration von etwa  $3 \times 10^{-9}$  M nachweisen. Zum Nachweis des niedermolekularen Substrats Cocain wurde ein ähnlicher elektrochemischer Aptasensor entwickelt.<sup>[28]</sup> Das Cocain-bindende Aptamer wurde mit Methylenblau als Redoxmarker funktionalisiert und über eine Thiolgruppe auf einer Goldelektrode fixiert. Durch die Bildung des Aptamer-Cocain-Komplexes geht die Nucleinsäure in eine starre Konformation über, in der die redoxaktiven Einheiten in Elektrodennähe gelangen und ein voltammetrisches Signal auslösen. Eine weitere Methode, um die Wechselwirkung zwischen Aptamer und Substrat elektrochemisch zu verfolgen, besteht in der Verwendung redoxaktiver Reportergruppen, die in doppelsträngige DNA interkalieren anstatt kovalent an das Aptamer zu binden.<sup>[29]</sup> Eine Nucleinsäure in Haarnadelkonfiguration, die die Erkennungssequenz für Thrombin enthielt, wurde an eine Goldelektrode gekuppelt; Methylenblau interkalierte in den Doppelstrangbereich der haarnadelförmigen Sonde (Abbildung 3 E). Durch die Assoziation von Thrombin mit dem Aptamer wurde die Haarnadelstruktur geöffnet und die interkalierten redoxaktiven Gruppen freigesetzt. In der Folge wurde durch die Thrombinbindung das amperometrische Signal des Systems reduziert. Auf diese Weise konnte Thrombin bis zu einer Konzentration von  $11 \times 10^{-9}$  M nachgewiesen werden.

Eine andere Variante der indirekt signalverstärkten Analyse von Aptamer-Protein-Komplexen greift auf elek-

trochemische Aptasensoren zurück, bei denen Metallnanopartikel zum Nachweis der Nucleinsäurehybridisierung dienen.<sup>[30]</sup> Die Hybridisierung einer biotinylierten Zielnucleinsäure mit einem komplementären Strang, der mit Magnetpartikeln funktionalisiert war, wurde verfolgt, indem streptavidinbeschichtete Goldnanopartikel an die Ziel-DNA banden. Die magnetische Abtrennung der Magnetpartikel, die mit Metaltracer markiert waren, Auflösen der Metallnanopartikel und Identifizierung der freigesetzten Metallionen durch Inversvoltammetrie ermöglichte den indirekten, signalverstärkten Nachweis der DNA. Auf ähnliche Weise wurden Metallsulfid-Halbleiter-Quantenpunkte (QDs) für die parallele Analyse von DNAs eingesetzt.<sup>[31]</sup> Die magnetischen Nanopartikel wurden mit drei unterschiedlichen Nucleinsäuren modifiziert, die als Sonden für unterschiedliche DNA-Zielsequenzen dienten (Abbildung 4A). Die Magnetpartikel wurden einer Probe ausgesetzt, die die drei zu den Sonden-DNAs komplementären DNA-Ketten enthielt. Halbleiter-QDs wie ZnS, CdS und PbS, die an Nucleinsäuren mit zu den Analyt-DNAs komplementären Sequenzen gebunden waren, wurden durch Hybridisierung mit den an den Magnetpartikeln hängenden Doppelsträngen verbunden. Die Halbleiter-QDs fungieren als Sonde zum Nachweis der Hy-

bridisierung der Analyt-DNA, denn sie werden nur nach Hybridisierung der Ziel-DNA an die Magnetpartikel gebunden. Die Abtrennung der Magnetpartikel mit einem externen Magneten und die dann folgende Auflösung der Quantenpunkte ermöglichte eine quantitative Bestimmung der DNAs durch voltammetrischen Nachweis der Metalle bei ihren charakteristischen Potentialen.

Dieses Verfahren wurde in Folgestudien auf die parallele Analyse von Proteinen durch ihre spezifischen Aptamere übertragen.<sup>[32]</sup> Eine Goldelektrode wurde mit Aptameren funktionalisiert, die für Thrombin und Lysozym spezifisch waren (Abbildung 4B). Thrombin und Lysozym wurden mit CdS- bzw. PbS-QDs modifiziert und an die entsprechenden oberflächenfixierten Aptamere gebunden. Die QD-funktionalisierten Protein fungierten als Marker für die Analyse der nichtmarkierten Proteine. In Gegenwart dieser Analyte wurden die entsprechenden markierten Proteine zunächst verdrängt bzw. durch die jeweiligen unmarkierten Proteine ersetzt, dann wurden die an der Oberfläche verbliebenen Metallsulfide aufgelöst und die freigesetzten Ionen durch elektrochemische Stripping-Verfahren nachgewiesen. So ließen sich die beiden Proteine quantitativ nachweisen (Abbildung 4C).



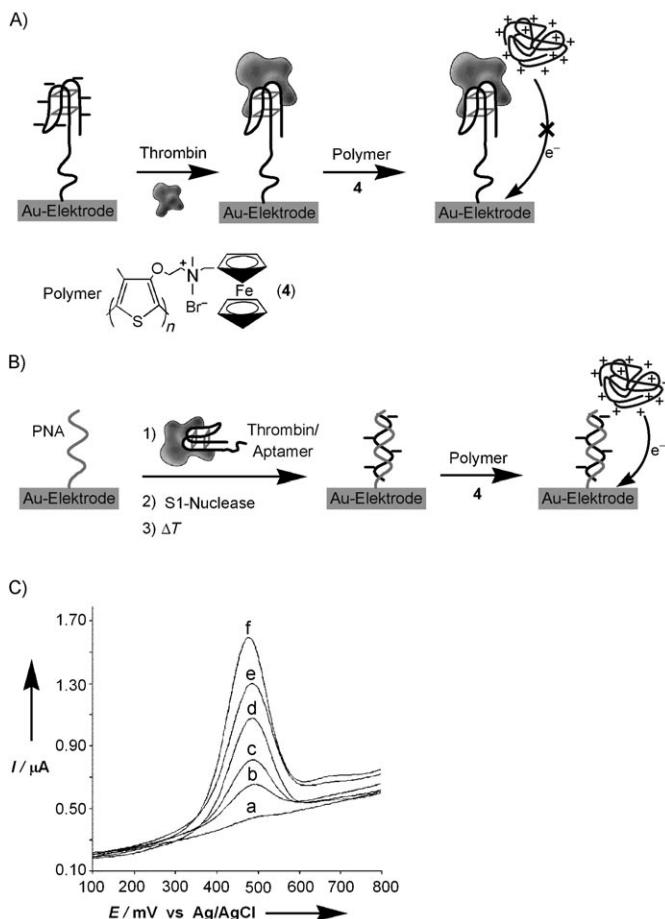
**Abbildung 4.** A) Parallele elektrochemische Analyse von DNA-Sequenzen mit Magnetpartikeln (MP), die mit Sonden für unterschiedliche Ziel-DNAs funktionalisiert sind, sowie mit Metallsulfiden, die mit spezifischen Nucleinsäuren als Tracer bestückt sind. B) Parallele elektrochemische Analyse der beiden Proteine Thrombin und Lysozym in einem Verdrängungstest, bei dem mit CdS-QDs modifiziertes Thrombin sowie mit PbS-QDs modifiziertes Lysozym als Sonden dienten. C) Square-Wave-Voltammogramme (Stripping-Verfahren) zur parallelen Detektion von Thrombin (a) und Lysozym (b): 1) kein Thrombin und Lysozym; 2) 1 µg L<sup>-1</sup> Lysozym, kein Thrombin; 3) kein Lysozym, 0.5 µg L<sup>-1</sup> Thrombin; 4) 0.5 µg L<sup>-1</sup> Thrombin; 1 µg L<sup>-1</sup> Lysozym. (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [32]. Copyright 2006, American Chemical Society.)

Es gibt interessante Berichte über elektrochemische Aptasensoren, die auf der Wechselwirkung des Ferrocen-funktionalisierten Polyelektrolyten Poly(3-alkoxy-4-methylthiophen) (**4**) mit DNA beruhen.<sup>[33]</sup> Diese Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Polythiophen-Polyelektrolyten und der doppelsträngigen DNA und die Entwicklung optischer Nucleinsäuresensoren wurden intensiv untersucht.<sup>[34]</sup> Die Verwendung des redoxmarkierten Polyelektrolyten **4** ermöglichte den voltammetrischen Nachweis eines Proteins (hier Thrombin) durch das entsprechende Aptamer. In einem Ansatz (Abbildung 5A) wurde das thiolfunktiona-

Signal der Ferroceneinheit von **4** ausgelöst. Die Assoziation mit Thrombin blockierte die Bindung des kationischen Polymers und schwächte die elektrochemische Antwort ab. Nachteil dieser Konfiguration ist das negative Messsignal bei der Bestimmung von Thrombin und die mangelnde Empfindlichkeit des Tests (ca.  $1 \times 10^{-6}$  M). Eine verbesserte, wenn auch kompliziertere Methode, in der **4** als elektrochemischer Tracer eingesetzt wird, ist in Abbildung 5B gezeigt. Bei dieser Methode stehen Thrombin und das zugehörige Aptamer in Lösung miteinander in Kontakt. Die Mischung wurde mit einer S1-Nuklease behandelt, die alle freien Nucleinsäuren verdaute und den Aptamer-Thrombin-Komplex unversehrt ließ. Zurück blieb das von der Proteinhülle abgeschirmte Aptamer. Die Nuklease wurde dann mit Ethyldiamintetraessigsäure inhibiert, und der Aptamer-Thrombin-Komplex wurde durch Hitzebehandlung abgetrennt. Bei der Hybridisierung des dissozierten Aptamers mit der komplementären, an einer Goldelektrode immobilisierten Peptidnucleinsäure (PNA) entstand eine negativ geladene Doppelstrangstruktur, die den Polyelektrolyten **4** band. Die Menge an gebildetem Doppelstrang auf der Elektrode nimmt mit der Thrombinkonzentration zu, sodass das voltammetrische Signal ansteigt (Abbildung 5C). Mit dieser Methode ließ sich Thrombin bis zu einer Konzentration von  $7.5 \times 10^{-8}$  M nachweisen.

Die oben beschriebenen elektrochemischen Aptasensoren enthalten Redoxmarker oder Katalysatoren, die als Reportergruppen auf die Bildung des Aptamer-Substrat-Komplexes reagieren. Darüber hinaus wurden aber auch markierungsfreie elektrochemische Aptasensoren entwickelt. In diesem Fall verursacht die biologische Erkennung Änderungen des Elektronenübergangswiderstands an der Elektrode, die sich durch Faraday-Impedanzspektroskopie verfolgen lassen.<sup>[35]</sup> Die Assoziation von Proteinen an die Elektrodenunterlage, z.B. unter Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen, erzeugt eine Barriere für den elektrischen Kontakt zwischen einem Redoxmarker (der sich in der Elektrolytlösung befindet) und der Elektrode; dadurch steigt der Elektronenübergangswiderstand an der leitenden Unterlage an.<sup>[16,36]</sup> In einem ähnlichen Ansatz erzeugt die Bildung einer doppelsträngigen DNA auf einer Nucleinsäure-modifizierten Elektrode eine höhere negative Ladung an der Elektrode und stößt so einen negativ geladenen Redoxmarker, der sich in der Elektrolytlösung befindet, ab. Die Abstoßung der redoxaktiven Sonde erhöht an der Grenzfläche den Elektronenübergangswiderstand; anhand der Änderung lässt sich die Menge der hybridisierten DNA bestimmen.<sup>[37,38]</sup>

Der Umstand, dass sich die Eigenschaften einer Elektrodenoberfläche über Aptamer-Substrat-Wechselwirkungen steuern lassen, wurde ebenfalls zur Entwicklung von markierungsfreien elektrochemischen Aptasensoren entwickelt. Um eine Sensoroberfläche für Lysozym zu erhalten, wurde das zugehörige biotinylierte Aptamer an eine mit Streptavidin beschichtete Indiumzinnoxid(ITO)-Elektrode gekuppelt.<sup>[39]</sup> Das Aptamer erzeugt eine negativ geladene Oberfläche, die eine anionische Redoxsonde wie  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/-4-}$  elektrostatisch abstoßt. Dies induziert eine Barriere gegen die Elektronenübertragung auf den Elektrodenträger und verursacht einen höheren Elektronenübergangswiderstand. Die

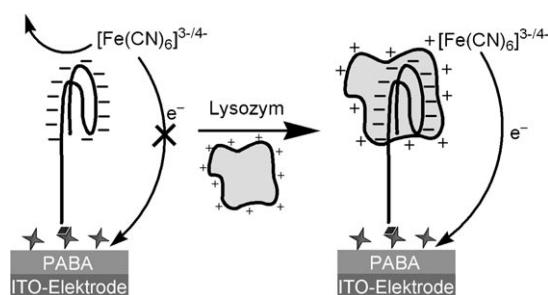


**Abbildung 5.** Elektrochemischer Nachweis von Thrombin durch die Wechselwirkung einer Nucleinsäure mit dem redoxaktiven Oligothiophen-Polyelektrolyten **4**: A) Blockade des elektrischen Kontakts zwischen dem Polyelektrolyten und der Elektrode durch den Aptamer-Thrombin-Komplex. B) Trennung des Aptamer-Thrombin-Komplexes durch Bildung eines Doppelstrangs zwischen einer Peptidnucleinsäure (PNA) und einem geöffneten Aptamer-Doppelstrang auf der Elektrode und die Analyse anhand des redoxaktiven Polyelektrolyten. C) Voltammetrische Messung unterschiedlicher Konzentrationen von Thrombin nach der in (B) skizzierten Methode: a) 0 M, b) 125 nM, c) 250 nM, d) 500 nM, e) 1 μM und f) 2 μM. (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [33]. Copyright 2006, American Chemical Society.)

lisierte Aptamer an einer Elektrodenoberfläche fixiert. Durch die Wechselwirkung zwischen dem Polyelektrolyten und dem Thrombin-Aptamer wurde ein voltammetrisches

Assoziation des Proteins an die „negativ geladene Grenzfläche“ des Aptamers (bei geeignetem pH-Wert) führt zu einer Umkehrung der Oberflächenladung und bringt eine positive Ladung ein, die den Elektronenübergangswiderstand verringert (Abbildung 6). Auf diese Weise gelingt die quantitative Bestimmung von Lysozym. Mit Faraday-Impedanzspektroskopie ließ sich auch Thrombin auf einer thiolbedeckten aptamerfunktionalisierten Goldelektrode bestimmen.<sup>[40]</sup> Die Assoziation des Proteins mit der aptamerbedeckten Oberfläche isolierte die Elektrodenoberfläche gegen die  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/-4-}$ -Redoxsonde in der Elektrolytlösung und erhöhte den Elektronenübergangswiderstand; so ließ sich Thrombin quantitativ bestimmen.

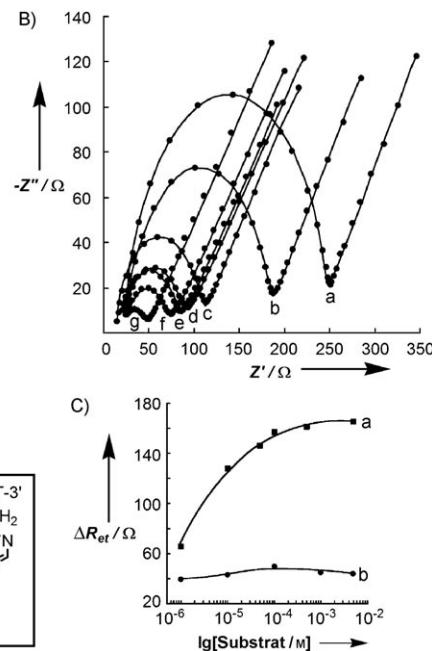
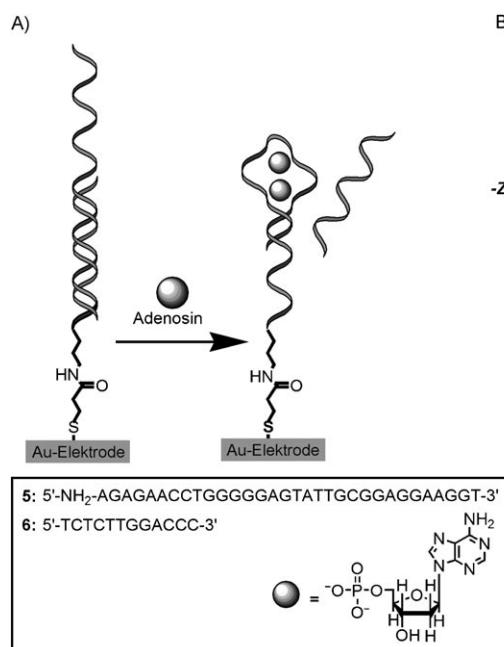
Die Faraday-Impedanzübertragung von Aptamer-Protein-Erkennungsvorgängen wurde auch für Elektrodenanord-



**Abbildung 6.** Impedimetrische Analyse des Aptamer-Lysozym-Komplexes mit  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/-4-}$  als Redoxmarker. PABA: Polyaminobenzoësäure.

nungen untersucht.<sup>[41]</sup> Das Aptamer für menschliche IgE-Antikörper wurde auf den Goldelektroden eines Chips immobilisiert, und der Anstieg des Elektronenübergangswiderstands an den Grenzflächen bei Bindung des IgE-Antikörpers mit  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/-4-}$  als Redoxsonde wurde detektiert. Der Widerstand an der Grenzfläche stieg mit zunehmender Konzentration des Antikörpers, und IgE konnte mit einer Nachweisgrenze von  $1 \times 10^{-10} \text{ M}$  detektiert werden. Es könnte möglich sein, eine solche Elektrodenanordnung für die Multiplex-Analyse von Proteinen zu nutzen. Bereits untersucht wurde der Einfluss von Basenmutationen in der Aptamersequenz auf die Bindung von IgE-Antikörpern. Bringt man unterschiedliche Aptamermutanten auf dem Elektrodenfeld auf und bestimmt den Elektronenübergangswiderstand an der Grenzfläche bei der Bindung des IgE-Antikörpers, lassen sich daraus die Affinitäten der Mutanten zum Protein ableiten.

Der Nachweis von Affinitätskomplexen zwischen Aptamern und kleinen Molekülen mit Faraday-Impedanzspektroskopie ist dagegen schwieriger, weil die Bindung des Zielmoleküls durch das Aptamer an der Elektrode nur eine kleine, meist nicht nachweisbare Änderung des Elektronenübergangswiderstands an der Grenzfläche hervorruft. Ein Ansatz, um dieses Problem zu überwinden, besteht in der Immobilisierung eines doppelsträngigen DNA-Komplexes auf der Elektrode, der aus dem aminofunktionalisierten Aptamer **5** für Adenosin und einem zum Aptamer komplementären Fragment besteht (**6**; Abbildung 7A). In Gegen-



**Abbildung 7.** A) Impedimetrische Analyse von Adenosin durch die Bildung des Aptamer-Adenosin-Komplexes unter Öffnung des an der Elektrode immobilisierten Aptamer-Nucleinsäure-Doppelstrangs. Die Redoxsonde in Lösung ist  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/-4-}$ . B) Elektronenübergangswiderstand an der Grenzfläche bei Messung unterschiedlicher Adenosinkonzentrationen: a) an der Monoschicht, die durch die Assoziation des Aptamer-Nucleinsäure-Doppelstrangs an die Elektrode entsteht; b-f) nach Zugabe von Adenosin: b)  $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ , c)  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ , d)  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ , e)  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  und f)  $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ ; g) an der unbehandelten Elektrode vor der Immobilisierung des Aptamer-Nucleinsäure-Doppelstrangs. C) a) Kalibrierkurve zur Bestimmung von Adenosinkonzentrationen ( $R$ : Widerstand); b) Kalibrierkurve für das Kontrollexperiment, in dem die gleichen Konzentrationen von Cytidin mit dem Aptamer-Nucleinsäure-Komplex analysiert wurden. (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [42]. Copyright 2006, American Chemical Society.)

wart von Adenosin wurde der DNA-Doppelstrang aufgetrennt, und das Aptamer wurde in die 3D-Struktur umgefaltet, die Adenosin bindet.<sup>[42]</sup> Durch die Auftrennung des mit der Elektrode assoziierten Doppelstrangs wird die negative Ladung von der Elektrodenoberfläche angezogen und so der Elektrodenübergangswiderstand an der Grenzfläche verringert. Die Auftrennung des DNA-Doppelstrangs wird durch die Konzentration des Adenosins gesteuert, wodurch die quantitative Analyse des niedermolekularen Substrats möglich wird (Abbildung 7B,C).

### 3. Feldeffekttransistoren als Aptasensoren

Eine weitere Methode zum elektronischen Auslesen von biologischen Erkennungereignissen beruht auf der Verwendung ionenselektiver Feldeffekttransistoren (ISFETs). Die Steuerung des Gate-Potentials von Feldeffekttransistoren mithilfe von biologischen Erkennungsprozessen, die auf der Oberfläche der Gate-Elektrode ablaufen, ist ein mittlerweile verbreitetes Konzept in der Biosensorik.<sup>[43,44]</sup> Die Änderung der Ladung (und damit des Potentials) auf der Gate-Elektrode des ISFET bei der Hybridisierung einer komplementären Nucleinsäure an eine an der Gate-Elektrode immobilisierte DNA diente zum markierungs- und reagentienfreien Nachweis von DNA.<sup>[45,46]</sup> Allgemein besteht ein ISFET-Biosensor aus zwei Elektroden (Source- und Drain-Elektrode) auf einer Halbleiterunterlage (z.B. Silicium). Eine Gate-Oberfläche wird auf dem Halbleiter in Form einer dünnen Isolierschicht abgeschieden, die die beiden Elektroden voneinander trennt. Das Potential der Gate-Elektrode kann durch auf seiner Oberfläche ablaufende chemische Vorgänge wie Ladungsveränderungen oder Ionisierungen (z.B. durch Änderung des pH-Werts) beeinflusst werden. Für die Verwendung als Biosensor wird die Vorrichtung in ein Elektrolytmedium eingetaucht, und eine Referenzelektrode, die mit der Source-Elektrode verbunden ist, erfasst das Gate-Potential. So kann für ein bestimmtes Gate-Potential ein Potential zwischen Source- und Drain-Elektrode ( $V_{ds}$ ) angelegt werden, wobei ein Stromfluss  $I_{ds}$  aufrechterhalten bleibt. Ändert sich durch die biologische Erkennung das Potential an der Gate-Elektrode, kann die Änderung des Source-Drain-Stroms entweder durch Änderung des  $V_{ds}$ -Potentials oder des Potentials zwischen der Referenz- und der Source-Elektrode ( $V_{gs}$ ) kompensiert werden.

Die Bindung des niedermolekularen Substrats Adenosin an sein Aptamer wurde mit einem ISFET verfolgt.<sup>[42]</sup> Die Oberfläche der  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Gate-Elektrode wurde mit 3-Aminopropyltriethoxysilan funktionalisiert und dann mit Glutardialdehyd modifiziert; anschließend wurde das aminofunktionalisierte Aptamer **5** (siehe Abbildung 7) auf der Oberfläche der Gate-Elektrode immobilisiert (Abbildung 8A). Die Nucleinsäure **6** wurde mit dem Aptamer hybridisiert, um die negative Ladung auf der Oberfläche der Gate-Elektrode zu verstärken. Das Adenosin wurde durch die Verdrängung von **6** und die Umorientierung des Adenosin-Aptamer-Komplexes an der Oberfläche nachgewiesen. Die Verdrängung von **6** beeinflusst die lokale Ladung an der Gate-Elektrode, wodurch ein Signal für die Bindung von Adenosin am ISFET

erzeugt wird. Die Kurve a in Abbildung 8B zeigt die Änderungen des Potentials zwischen Gate- und Source-Elektrode ( $V_{gs}$ ) beim Nachweis unterschiedlicher Adenosinkonzentrationen. Die Nachweisgrenze für Adenosin lag bei  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ . Die Messung von Adenosin durch das Aptamer läuft mit hoher Spezifität ab; der aptamermodifizierte ISFET reagiert nicht auf andere Nucleotide wie Cytidin (Abbildung 8B, Kurve b). Das Verfahren ermöglicht eine markierungs- und reagentienfreie Analyse der Bindungsreaktionen zwischen Aptamern und niedermolekularen Substraten.

Für die Aptamer-Protein-Affinitätsbindung wurde ein auf einwandigen Kohlenstoffnanoröhren (SWCNTs) basierter FET verwendet.<sup>[47]</sup> Die Untersuchung von Bindungsergebnissen zwischen Proteinen mithilfe eines FET ist schwierig, weil die Erkennung außerhalb der elektrischen Doppelschicht auf der Gate-Elektrode stattfindet und die Auswirkungen auf das Potential deshalb gering sind. Andererseits ermöglichen die Aptamer-Abmessungen von 1–2 nm eine Störung des Gate-Potentials durch aptamergebundene Proteine, da die Bindungsergebnisse innerhalb der Debye-Länge der Doppelschicht stattfinden (ca. 3 nm bei einer Ionenkonzentration von 10 mM). Um diesen Effekt zu nutzen, wurden SWCNTs zwischen Source- und Drain-Elektrode angeordnet und das Thrombin-Aptamer an die Kohlenstoffnanoröhren konjugiert (Abbildung 8C). Die Leitfähigkeit ändert sich bei der Bindung von Thrombin an das Aptamer, sodass die Bindung des Proteins nachgewiesen werden kann (Abbildung 8D). Der FET war spezifisch für Thrombin, und ein anderes Protein wie Elastase zeigte keinen Einfluss auf die Leitfähigkeit.

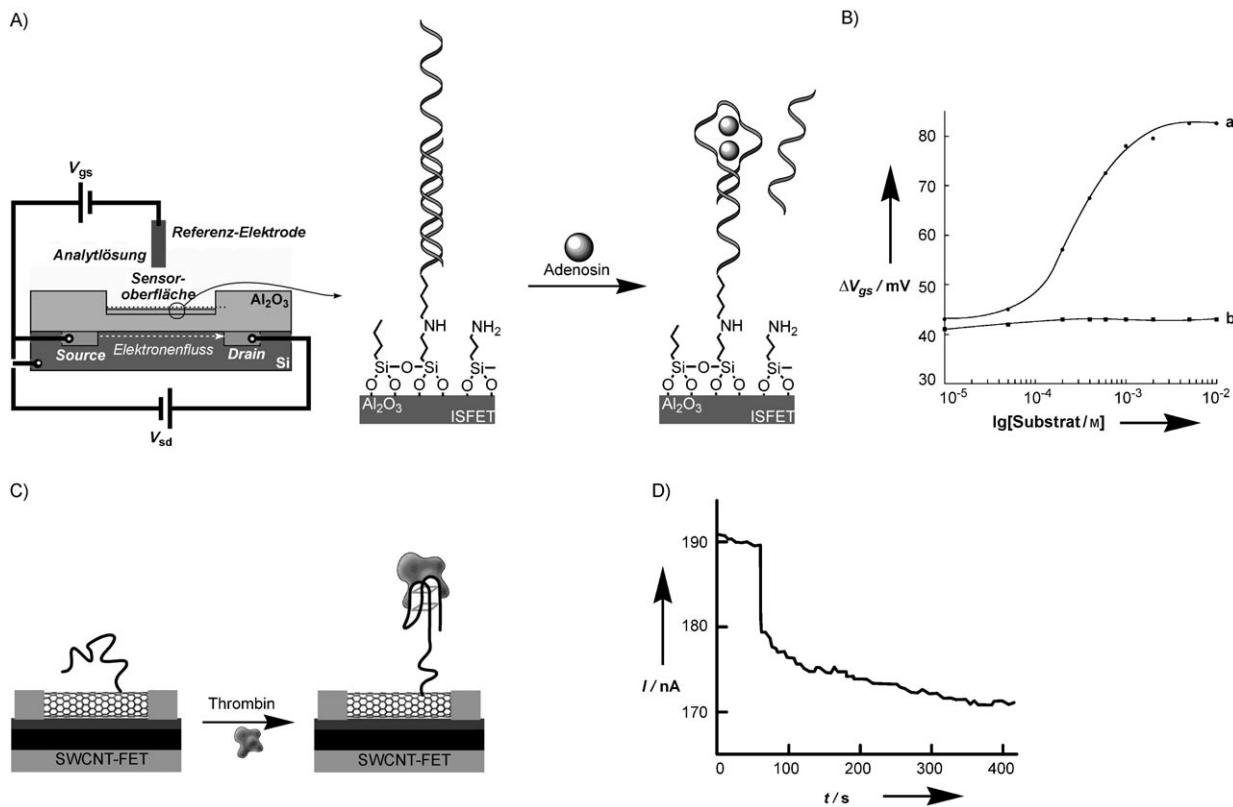
### 4. Mikrogravimetrische Aptasensoren auf piezoelektrischen Kristallen

Mikrogravimetrische Sensoren auf piezoelektrischen Quarzkristallen (Quarzkristall-Mikrowaagen; QCMs) wurden zur elektronischen Übertragung von Aptamer-Protein-Wechselwirkungen verwendet. Die Frequenz  $f$  des Quarzkristalls hängt von Änderungen der Masse  $m$  des Kristalls gemäß der Sauerbrey-Gleichung ab [Gl. (1);  $A$  ist die piezo-

$$\Delta f = -2f_0^2 \frac{\Delta m}{A(\mu_q \rho_q)^{1/2}} \quad (1)$$

elektrisch aktive Fläche,  $\mu_q$  ist der Schermodul und  $\rho_q$  ist die Dichte von Quarz].<sup>[48]</sup> Entsprechend dieser Gleichung erhöht die Assoziation eines Proteins auf einem Aptamer-modifizierten Kristall die Masse der Überträgereinheit, wodurch die Resonanzfrequenz des Kristalls sinkt.

Ein RNA-Aptamer, das spezifisch für das HIV-1-Tat-Protein war, wurde auf einer QMC immobilisiert. Damit konnte das Protein mit einer Nachweisgrenze von etwa 0.25 ppm bestimmt werden.<sup>[49]</sup> Auf ähnliche Weise wurde das DNA-Aptamer für IgE-Antikörper als mikrogravimetrischer Sensor für den Nachweis des Antikörpers verwendet.<sup>[50]</sup> Der mit einer Goldelektrode versehene Quarzkristall wurde mit einer Schicht Streptavidin belegt, und das biotinylierte Derivat des Aptamers wurde an den Kristall gebunden. Der IgE-

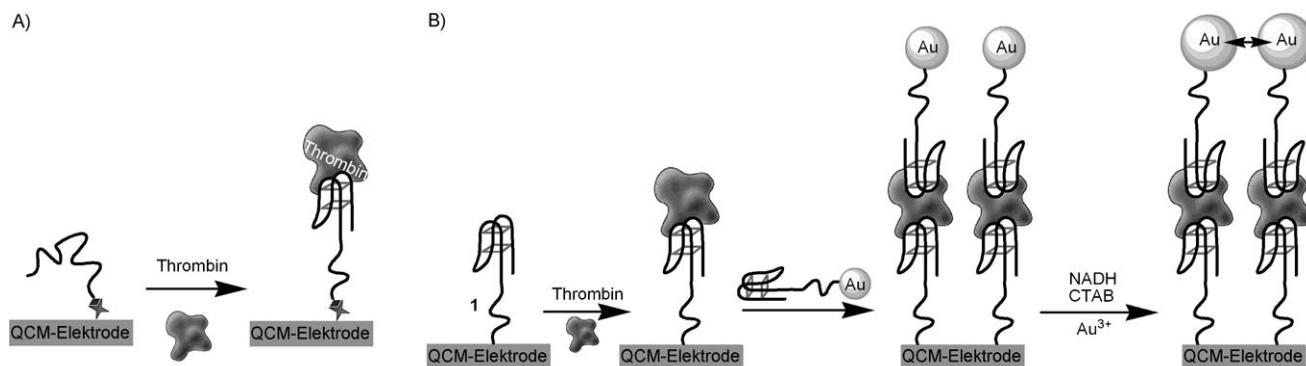


**Abbildung 8.** A) Markierungs- und reagentienfreie Analyse von Adenosin auf einer ISFET-Komponente durch Spaltung des Aptamer-Nucleinsäure-Komplexes in Gegenwart von Adenosin. B) Änderungen des Potentials zwischen Gate- und Source-Elektrode bei der Analyse von a) Adenosin und b) Cytidin. (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [42]; Copyright 2006, American Chemical Society). C) Bestimmung von Thrombin mithilfe einer Aptamer-funktionalisierten SWCNT, die als Gate-Elektrode eines Feldeffekttransistors fungiert. D) Änderungen der Leitfähigkeit des Aptamer-funktionalisierten SWCNT-FET bei der Bestimmung von Thrombin (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [47]. Copyright 2005, American Chemical Society).

Antikörper ließ sich mit einer Empfindlichkeit von  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  nachweisen. Der lineare Konzentrationsbereich für den Nachweis der IgE-Antikörper ist zehnfach größer als mit klassischen Immunsensoren, bei denen anti-IgE auf der Kristalloberfläche immobilisiert wird. Als Ursache für den verbesserten Nachweisbereich wurde die geringe Größe des Aptamers genannt, die die Bildung einer dichten, einheitlich orientierten Sensoroberfläche für den Antikörper ermöglicht. Die Aptasensoren für IgE konnten leicht regeneriert werden und waren spezifisch für IgE. Die einfache Wiedergewinnung der Aptasensoren und die Vermeidung unspezifischer Adsorption von Proteinen sind klare Vorteile eines Proteinsensors, der ohne Antikörper als Erkennungsmoleküle auskommt.

Auch für die Analyse von Thrombin wurde ein elektrochemisches QCM-Verfahren beschrieben.<sup>[51]</sup> Das biotinylierte Aptamer, das Thrombin erkennt, wurde an einer avidin-beschichteten Oberfläche immobilisiert, und Thrombin wurde an das Aptamer gebunden (Abbildung 9 A). Die Bindungskonstante des Thrombin-Aptamer-Komplexes wurde entweder durch die Frequenzänderungen ermittelt, die mit der Bindung von Thrombin bei unterschiedlichen Thrombinkonzentrationen im Medium einhergehen, oder durch kolorimetrische Analyse der chemischen Reduktion von Methylenblau, das an den Aptamer-Thrombin-Komplex ge-

bunden ist. Mit dem elektrochemischen Verfahren konnte das Protein bis zu einer Nachweisgrenze von etwa  $1 \times 10^{-8}\text{ M}$  bestimmt werden, während die Nachweisgrenze der empfindlicheren QCM-Methode bei  $1 \times 10^{-9}\text{ M}$  liegt. Aus den QCM-Messungen ließ sich eine Assoziationskonstante für den Thrombin-Aptamer-Komplex von  $1.7 \times 10^{-10}\text{ M}$  ableiten. Ebenfalls beschrieben wurde der Einsatz von Metallnanopartikel-Markern für einen empfindlicheren Nachweis von Thrombin.<sup>[52]</sup> Zur Entwicklung eines mikrogravimetrischen QCM-Aptasensors für Thrombin wurden die beiden Bindungsstellen des Thrombins für Aptamere<sup>[20]</sup> sowie auch die katalytischen Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln genutzt (Abbildung 9B). In dieser Anordnung wird das thioetherierte Aptamer **1** an einen mit einer Au-Elektrode versehenen Quarzkristall gebunden. Die Wechselwirkung des modifizierten Kristalls mit Thrombin und die nachfolgende Assoziation des Konjugats mit Aptamer-funktionalisierten Gold-Nanopartikeln ergab eine Verstärkung des Messsignals von Thrombin durch die als „Gewichtsmarker“ wirkenden Gold-NPs. Der Größenzuwachs der Gold-NPs durch die partikelkatalysierte Reduktion von  $\text{AuCl}_4^-$  mit 1,4-Dihydro-nicotinamidadenin dinucleotid (NADH)<sup>[53]</sup> machte das Verfahren noch empfindlicher. Bei der Messung einer Thrombinkonzentration von etwa  $2 \times 10^{-9}\text{ M}$  führte der erste Verstärkungsschritt zu einer Frequenzänderung von  $-30\text{ Hz}$  und



**Abbildung 9.** Mikrogravimetrischer Nachweis von Thrombin auf piezoelektrischen Kristallen: A) Nachweis des Aptamer-Thrombin-Komplexes; B) empfindlicherer Nachweis von Thrombin durch Assoziation mit einem mit Gold-Nanopartikeln markierten Aptamer und anschließenden katalytischen Größenzuwachs der NPs. CTAB: Cetyltriethylammoniumbromid.

der zweite Schritt zu einer Frequenzänderung von  $-900 \text{ Hz}$  (wenn für das Experiment 9-MHz-Kristalle eingesetzt wurden).

Ein anderer Ansatz, um die Bildung von Aptamer-Protein-Komplexen zu verfolgen, greift auf die Anwendung von Oberflächenschallwellen (surface acoustic waves, SAWs) in Love-Wellensensoren zurück.<sup>[54]</sup> Die Beladung der Oberfläche des Sensors mit Proteinen verändert die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Schallwellen, sodass entweder die Resonanzfrequenz des Kristalls verringert oder die Phasenverschiebung zwischen Ein- und Ausgangssignal verändert wird. Die Love-Wellensensoren nutzen horizontale akustische Scherwellen, die die Energiedissipation mit dem umgebenden Lösungsmittel minimieren. Die Methode hat sich auch bei fragmentierten Monoschichten als tauglich erwiesen.<sup>[55]</sup> Das Verfahren wurde zum Nachweis von Thrombin oder des HIV-1-Rev-Peptids mit den entsprechenden Aptameren verwendet. Das DNA-Aptamer für Thrombin bzw. das RNA-Aptamer für das HIV-1-Rev-Protein wurden auf den SAW-Kristallen immobilisiert, und durch die Auswertung der Phasenverschiebung zwischen Ein- und Ausgangssignal konnten die jeweiligen Proteine mit einer Nachweisgrenze von  $75 \text{ pg cm}^{-2}$  bestimmt werden.

## 5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Elektronische Aptasensoren weisen etliche Vorteile gegenüber optischen Aptasensoren auf. So ist es z.B. möglich, den Aptamer-Target-Komplex mit katalytischen oder biokatalytischen Markern zu versehen, die die Nachweisgrenze für das Substrat herabsetzen und so die Empfindlichkeit der Methode erhöhen. In aktuellen Arbeiten wurde auch eine markierungsfreie elektronische Detektion der Substrate durch Aptamere beschrieben, wobei auf Fluoreszenzmarker verzichtet werden konnte.

Mit den in großer Zahl verfügbaren Oligonucleotidsequenzen ergibt sich eine enorme Diversität von Aptameren für fast jedes Molekül oder Makromolekül, und tatsächlich wurden bereits für Hunderte von Zielmolekülen DNA- und RNA-Aptamere entwickelt.<sup>[56]</sup> Die beeindruckende Selektivität der Aptamere lässt erwarten, dass die evolutionär optimierte Bindung der Oligonucleotide die Selektivität der Antikörper übertreffen kann. So bindet ein Aptamer für Theophyllin sein Substrat etwa  $10^4$ -mal besser als Coffein, das sich in der Struktur nur durch eine Methylgruppe unterscheidet.<sup>[21]</sup> Und obwohl bei der Anwendung von Aptameren in der analytischen Chemie bereits beträchtliche Fortschritte erzielt wurden, gibt es bei den Aptasensoren noch genügend Spielraum für aufregende Entwicklungen. Zum Beispiel könnte die Verwendung synthetisch modifizierter Nucleotide als Zusatzkomponenten bei der Selektion der Aptamere nucleaseresistente Oligonucleotide und eventuell auch Aptamere mit höherer Affinität für ihre Substrate liefern. Die Anwendung des SELEX-Verfahrens für die Synthese von Aptameren haben wir erwähnt; ähnlich wie zur Erzeugung katalytischer Antikörper wurde das SELEX-Verfahren verwendet, um katalytische DNA und RNA (DNAzymes und RNAzymes) herzustellen.<sup>[57]</sup> Die Kombination der Bindungseigenschaften von Aptameren mit den Eigenschaften von DNAzymen könnte zu Hybridsystemen führen, die einen internen verstärkenden Marker tragen. Solche molekularen Hybride sollten überlegene Sensoreigenschaften aufweisen, da sie evolutionär selektierte Bindungs- und katalytische Eigenschaften von Nucleinsäuren in sich vereinen.

Unsere Forschungsarbeiten über Aptasensoren werden durch das Israelische Wissenschaftsministerium gefördert.

Eingegangen am 5. November 2006  
Online veröffentlicht am 28. Juni 2007

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] a) S. Jayasena, *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1628; b) K. M. You, S. H. Lee, A. Im, S. B. Lee, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2003**, *8*, 64; c) E. Luzzi, M. Minunni, S. Tombelli, M. Mascini, *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 810.
- [2] R. D. Jenison, S. C. Gill, A. Pardi, B. Polisky, *Science* **1994**, *263*, 1425.
- [3] a) A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818; b) C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505; c) D. S. Wilson, J. W. Szostak, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 611; d) M. Famulok, G. Mayer, M. Blind, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 591.
- [4] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1992**, *355*, 850.

- [5] a) J. Feigon, T. Dieckmann, F. W. Smith, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 611; b) D. J. Patel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 32.
- [6] a) S. L. Clark, V. T. Remcho, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 1335; b) M. Michaud, E. Jourdan, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, E. Peyrin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8672; c) Q. Deng, C. J. Watson, R. T. Kennedy, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1005*, 123.
- [7] a) S. L. Clark, V. T. Remcho, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5692; b) S. D. Mendonsa, M. T. Bowser, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 20.
- [8] a) R. R. White, B. A. Sullenger, C. P. Rusconi, *J. Clin. Invest.* **2000**, *106*, 929; b) E. N. Brody, L. Gold, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2000**, *74*, 5.
- [9] a) S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2424; b) N. K. Navani, Y. Li, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 272; c) C. K. O'Sullivan, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *372*, 44.
- [10] W. Pieken, D. B. Olsen, F. Benseler, H. Aurup, H. F. Eckstein, *Science* **1991**, *253*, 314.
- [11] a) O. Heidenreich, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1904; b) W. Kusser, *J. Biotechnol.* **2000**, *74*, 27.
- [12] a) J. Liu, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12677; b) M. Levy, S. F. Cater, A. D. Ellington, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2163; c) V. Pavlov, B. Shlyahovsky, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6522.
- [13] a) J. J. Li, X. Fang, W. Tan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *292*, 31; b) M. Lee, D. R. Walt, *Anal. Biochem.* **2000**, *282*, 142; c) R. Kirby, E. J. Cho, B. Gehrke, T. Bayer, Y. S. Park, D. P. Neikirk, J. T. McDevitt, A. D. Ellington, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4066.
- [14] H. T. Tang, C. E. Lunte, H. B. Halsall, W. R. Heineman, *Anal. Chim. Acta* **1988**, *214*, 187.
- [15] F. Patolsky, E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3548; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3398.
- [16] a) L. Alfonta, A. Bardea, O. Khersonsky, E. Katz, I. Willner, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 675; b) A. Bardea, E. Katz, I. Willner, *Electroanalysis* **2000**, *12*, 1097.
- [17] F. Patolsky, A. Lichtenstein, I. Willner, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1137.
- [18] F. Patolsky, A. Lichtenstein, I. Willner, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 253.
- [19] M. Mir, M. Vreeke, I. Katakis, *Electrochim. Commun.* **2006**, *8*, 505.
- [20] a) L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermass, J. J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564; b) D. M. Tasset, M. F. Kubik, W. Steiner, *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 688; c) K. Padmanabhan, K. P. Padmanabhan, J. D. Ferrara, J. E. Sandler, A. Tulinsky, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 17651.
- [21] K. Ikebukuro, C. Kiyohara, K. Sode, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2168.
- [22] R. Polksy, R. Gill, I. Willner, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2268.
- [23] C. Fan, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9134.
- [24] a) C. E. Immoos, S. J. Lee, M. W. Grinstaff, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1100; b) Y. Mao, C. Luo, Q. Ouyang, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, e108.
- [25] Y. Xiao, A. A. Lubin, A. J. Heeger, K. W. Plaxco, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5592; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5456.
- [26] A.-E. Radi, J. L. A. Sánchez, E. Baldrich, C. K. O'Sullivan, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 117.
- [27] Y. Xiao, B. D. Piorek, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17990.
- [28] B. R. Baker, R. Y. Lai, M. S. Wood, E. H. Doctor, A. J. Heeger, K. W. Plaxco, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3138.
- [29] G. S. Bang, S. Cho, B.-G. Kim, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 863.
- [30] J. Wang, D. Xu, A.-N. Kawde, R. Polksy, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5576.
- [31] J. Wang, G. Liu, A. Merkoçi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3214.
- [32] J. A. Hansen, J. Wang, A.-N. Kawde, Y. Xiang, K. V. Gothelf, G. Collins, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2228.
- [33] F. L. Floch, H. A. Ho, M. Leclerc, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4727.
- [34] a) H. A. Ho, M. Leclerc, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1384; b) H. A. Ho, K. Doré, M. Boissinot, M. G. Bergeron, R. M. Tanguay, D. Boudreau, M. Leclerc, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12673.
- [35] E. Katz, I. Willner, *Electroanalysis* **2003**, *15*, 913.
- [36] R. Pei, Z. Cheng, E. Wang, X. Yang, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 355.
- [37] A. Bardea, F. Patolsky, A. Dagan, I. Willner, *Chem. Commun.* **1999**, *1*, 21.
- [38] M. Y. Vagin, A. A. Karyakin, T. Hianik, *Bioelectrochemistry* **2002**, *56*, 91.
- [39] M. C. Rodriguez, A.-N. Kawde, J. Wang, *Chem. Commun.* **2005**, *34*, 4267.
- [40] a) H. Cai, T. M.-H. Lee, I.-M. Hsing, *Sens. Actuators B* **2006**, *114*, 433; b) A.-E. Radi, J. L. A. Sánchez, E. Baldrich, C. K. O'Sullivan, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6320.
- [41] D. Xu, D. Xu, X. Yu, Z. Liu, W. He, Z. Ma, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5107.
- [42] M. Zayats, Y. Huang, R. Gill, C. A. Ma, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13666.
- [43] P. Bergveld, *Sens. Actuators B* **2003**, *88*, 20.
- [44] a) S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *568*, 248; b) M. J. Schenning, A. Poghossian, *Analyst* **2002**, *127*, 1137; c) M. J. Schenning, A. Poghossian, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 1893.
- [45] a) J.-K. Shin, D.-S. Kim, H.-J. Park, G. Lim, *Electroanalysis* **2004**, *16*, 1912; b) J. Fritz, E. B. Cooper, S. Gaudet, P. K. Sorger, S. R. Manalis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14142; c) D.-S. Kim, Y. T. Jeong, H. K. Lyu, H.-J. Park, J.-K. Shin, P. Choi, J. H. Lee, G. Lim, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20*, 69.
- [46] a) F. Uslu, S. Ingebrandt, D. Mayer, S. Böcker-Meffert, M. Odenthal, A. Offenhäusser, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1723; b) T. Sakata, Y. Miyahara, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21*, 827.
- [47] H.-M. So, K. Won, Y. H. Kim, B.-K. Kim, B. H. Ryu, P. S. Na, H. Kim, J.-O. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11906.
- [48] D. A. Buttry, M. D. Ward, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1355.
- [49] a) S. Tombelli, M. Minunni, E. Luzi, M. Mascini, *Bioelectrochemistry* **2005**, *67*, 135; b) M. Minunni, S. Tombelli, A. Gullotto, E. Luzi, M. Mascini, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20*, 1149.
- [50] M. Liss, B. Peterson, H. Wolf, E. Prohaska, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4488.
- [51] T. Hianik, V. Ostatná, Z. Zajacová, E. Stoikova, G. Evtugyn, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 291.
- [52] V. Pavlov, Y. Xiao, B. Shlyahovsky, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11768.
- [53] Y. Xiao, V. Pavlov, S. Levine, T. Niazov, G. Markovitch, I. Willner, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4619; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4519.
- [54] a) M. D. Schlensog, T. M. A. Gronewold, M. Tewes, M. Famulok, E. Quandt, *Sens. Actuators B* **2004**, *101*, 308; b) T. M. A. Gronewold, S. Glass, E. Quandt, M. Famulok, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2044.
- [55] F. Josse, F. Bender, R. W. Gernosek, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5937.
- [56] a) D. J. Patel, A. K. Suri, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2000**, *74*, 39; b) M. Famulok, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 324; c) L. Gold, B. Polisky, O. Uhlenbeck, M. Yarus, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 763.
- [57] a) Y. Lu, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4588; b) S. K. Silverman, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2701; c) R. Fiammengo, A. Jäschke, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 614; d) D. M. J. Lilley, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 313.