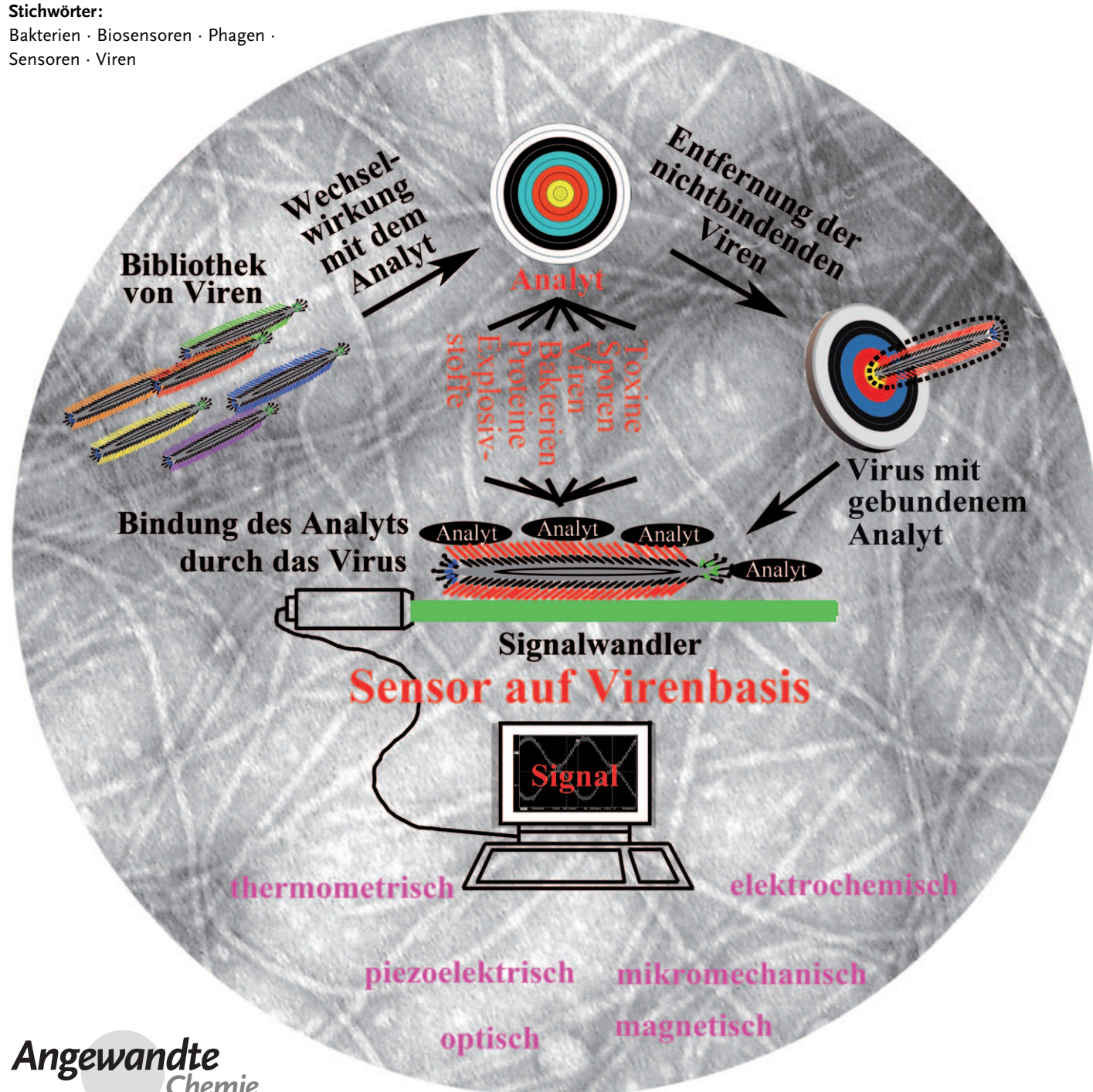


# Die Anwendung von Viren in Chemo- und Biosensoren

Chuanbin Mao,\* Aihua Liu und Binrui Cao

**Stichwörter:**

Bakterien · Biosensoren · Phagen · Sensoren · Viren



**V**iren haben sich in jüngster Zeit als einzigartige Hilfsmittel für den empfindlichen und selektiven Nachweis von Analyten wie Explosivstoffen, Proteinen, Bakterien, Viren, Sporen und Toxinen erwiesen. Auf Bakterien spezialisierte Viren, die Bakteriophagen – oder kurz Phagen –, wurden dabei am intensivsten untersucht: Zielspezifische nichtlysierende Phagen (sowie von diesen präsentierte Peptide und Proteine) können mithilfe hoch entwickelter Phagendisplaytechniken identifiziert werden, und lysierende Phagen können gezielt Bakterien aufbrechen und spezifische Zellmarker wie Enzyme ausschütten, die analysiert werden können. Darüber hinaus sind Phagen chemisch wie thermisch hinreichend stabil, und sie lassen sich mit Molekülen kuppeln und mit Nanomaterialien kombinieren und auf der Oberfläche eines Signalwandlers in einem Analysesystems verankern. Im Mittelpunkt dieses Aufsatzes stehen Fortschritte bei der Verwendung von Phagen in Chemo- und Biosensoren durch Kombination mit etablierten analytischen Techniken. Überdies werden aktuelle Entwicklungen bei der Verwendung von Virus-Nanomaterial-Kompositen und anderen Viren in Sensoranwendungen vorgestellt.

## 1. Einleitung

Chemo- und Biosensoren liefern quantitative oder zumindest halbquantitative Informationen, indem sie ein chemisches bzw. biologisches Erkennungselement nutzen.<sup>[1–4]</sup> In den Sensoren ist dieses Erkennungselement entweder in einen Signalwandler eingebettet oder eng mit diesem verbunden; dieser Signalwandler muss in der Lage sein, chemische, physikalische oder biologische Wechselwirkungen in ein Ausgabesignal umzuwandeln. In den vergangenen zwanzig Jahren sind Sensoren, und besonders Biosensoren, unentbehrlich geworden. Sie ermöglichen den Nachweis so verschiedener Analyte wie Explosivstoffe,<sup>[5,6]</sup> Proteine,<sup>[7,8]</sup> DNA,<sup>[9,10]</sup> Krebsmarker,<sup>[11,12]</sup> Bakterien,<sup>[13,14]</sup> Viren<sup>[15,16]</sup> und Toxine<sup>[17,18]</sup> in Bereichen wie Nahrungsmittelindustrie, Umweltüberwachung, klinischer Diagnostik oder Bioterrorismus-Bekämpfung.<sup>[3,19,20]</sup> Je nach Art des Signalwandlers lassen sich die Biosensoren als optisch, thermometrisch, piezoelektrisch, magnetisch, mikromechanisch oder elektrochemisch einstufen.<sup>[21,22]</sup> Weil solche Signalwandler gewöhnlich nicht auf einen bestimmten Analyt ansprechen, muss zunächst ein Weg gefunden werden, ihnen eine entsprechende Spezifität zu vermitteln.<sup>[22]</sup> Erschwerend kommt hinzu, dass die Analytkonzentration in den Proben über einen breiten Bereich variieren kann; zudem sind oft nur geringe Probenmengen verfügbar, und die Proben können noch dazu heterogen sein.

Aus diesen Gründen ist es unbedingt erforderlich, zielselektive Sensoren für bestimmte Analyte zu entwickeln. Um hierbei erfolgreich zu sein, werden Viren eingesetzt, die ihre Wirte spezifisch infizieren. Die natürliche Funktion von Viren besteht darin, die Virusgene zu speichern und zu transportieren. Seit kurzem ist es auch möglich, Viren als Templat beim Aufbau von Nanomaterialien,<sup>[23–27]</sup> zum gezielten Transport von Genen und Wirkstoffen<sup>[28,29]</sup> sowie als Sonden

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	6923
<b>2. Phagen als bakterienspezifische Viren und das Phagendisplay</b>	6924
<b>3. Viren und Sensoren: Phagen als Fallbeispiel</b>	6927
<b>4. Andere Viren für Sensoranwendungen</b>	6937
<b>5. Perspektiven für den Einsatz von Viren in Sensoren</b>	6938
<b>6. Zusammenfassung und Ausblick</b>	6940

in Sensoren und Bildgebungsanwendungen einzusetzen.<sup>[30–32]</sup> Drei Virusarten können hierfür verwendet werden: Bakteriophagen sowie Tier- und Pflanzenviren.<sup>[33,34]</sup> Insbesondere der Einsatz von Viren in Sensoren scheint viele Möglichkeiten zu bieten. Der vorliegende Aufsatz stellt die Fortschritte auf diesem schnell wachsenden Forschungsfeld vor und wägt dessen Entwicklungsmöglichkeiten ab.

In den Untersuchungen zum Einsatz von Viren in Chemo- und Biosensoren erwiesen sich Bakteriophagen (kurz Phagen) – auf Bakterien spezialisierte Viren – aus verschiedenen Gründen als die aussichtsreichsten Kandidaten. Am wichtigsten ist dabei, dass mit dem Phagendisplay<sup>[35–38]</sup> eine hoch entwickelte Technik zur Verfügung steht. Peptide oder Proteine mit der Fähigkeit zur spezifischen Analyterkennung lassen sich mithilfe einer kombinatorischen Peptid-/Protein-Bibliothek im Phagendisplayformat ermitteln, aus der zielspezifische Viruspartikel selektiert werden. Des Weiteren sind Phagen thermisch und chemisch stabil, sie lassen sich leicht an Biomoleküle oder Nanopartikel kuppeln, und sie können auf der Oberfläche eines Signalwandlers verankert werden. Aus diesen Gründen werden wir uns hier auf die Anwendungen von Phagen in Sensoren konzentrieren.

Phagen können gentechnisch so modifiziert werden, dass sie zielspezifische Peptide oder Proteine für biologische Erkennungsprozesse tragen. Ihr Grundkörper selbst verfügt hingegen über keinerlei physikalische Eigenschaften, die sich zur Erzeugung eines Ausgabesignals nach der Bindung an einen bestimmten Analyt nutzen ließen. Somit erfordern Anwendungen von Phagen in Sensoren noch die Integration

[\*] Prof. C. B. Mao, A. Liu, B. Cao  
Department of Chemistry & Biochemistry  
University of Oklahoma, Norman, OK 73019 (USA)  
Fax: (+1) 405-325-6111  
E-Mail: cbmao@ou.edu  
Homepage: <http://chem.ou.edu/Details/Chuanbin-Mao.html>

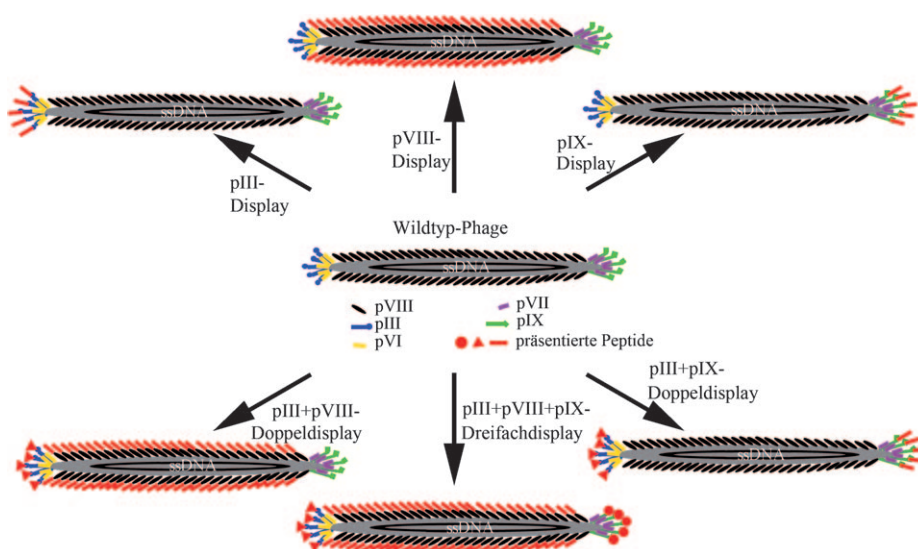


der Sonde – dies können die ziel-spezifischen Phagen selbst oder die von ihnen präsentierten Peptide oder Proteine sein – in Analysensysteme, die den Erkennungsprozess zwischen der Sonde und dem Analyt in ein Ausgabesignal übersetzen. Wir werden daher erklären, wie der Einsatz von Phagen mit herkömmlichen analytischen Techniken kombiniert werden kann, um hoch selektive und empfindliche Sensoren für unterschiedliche Anwendungsgebiete zu erhalten. Wir werden auch auf die Anwendung anderer Viren in Sensoren eingehen und abschließend auf einige Perspektiven für Sensoren auf Virusbasis verweisen.

## 2. Phagen als bakterienspezifische Viren und das Phagendisplay

### 2.1. Phagen

Phagen – bakterienspezifische Viren – bestehen aus einer Proteinhülle, die das genetische Material (DNA oder RNA) umschließt.<sup>[39,40]</sup> Man unterscheidet lysierende und nichtlysierende natürliche Phagen: Wenn lysierende Phagen wie T4 oder MS2 Bakterienzellen infizieren, so werden diese nach der Replizierung der Viren lysiert (d.h. aufgebrochen) und abgetötet.<sup>[41]</sup> Nach der Zerstörung der Bakterienzellen suchen sich die freigesetzten Virionen neue Wirtszellen. Solche lysierenden Phagen wurden als Mittel für eine antibakterielle Behandlungsmethode vorgeschlagen (Phagentherapie).<sup>[41,42]</sup> Nichtlysierende Phagen wie fd und M13 (Abbildung 1) brechen nach einer Infektion ihre Wirtszellen hingegen nicht auf, sondern sie nutzen einen lysogenen Zyklus, wobei das Phagen-genom in die Wirt-DNA eingebaut und mit dieser repliziert wird. Die befallenen Wirtszellen leben weiter und vermehren sich, aber auch die Phagen. Aus diesem



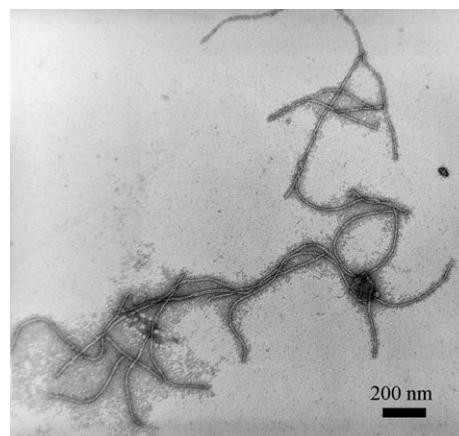
**Abbildung 1.** Struktur eines filamentösen Phagen (M13 oder fd) und seiner gentechnisch veränderten Varianten. Die Phagen-DNA ist in einem Kapsid eingeschlossen, das aus den vier Hüllproteinen an den Enden (pIII, pIX, pVI und pVII) und dem Haupt-Hüllprotein (pVIII) besteht, das in mehreren Tausend Kopien die Seitenwand des Phagen aufbaut. Pfeile zeigen unterschiedliche Möglichkeiten an, ein Peptid oder Protein auf der Oberfläche des Phagen zu präsentieren: durch Anknüpfen an pIII oder pIX (am Ende) und/oder durch Anknüpfen an pVIII (an der Seitenwand). Ein, zwei oder drei Peptide oder Proteine lassen sich an diesen bestimmten Bereichen der Phagenoberfläche präsentieren, indem die Phagen-DNA gentechnisch verändert wird. Fremde Peptide oder Proteine an den Hüllproteinen sind rot dargestellt.

Grund werden nichtlysierende Phagen wie M13 häufig zur Erzeugung rekombinanter DNA eingesetzt.

Chemiker und Materialwissenschaftler dürften an den morphologischen Unterschieden zwischen den verschiedenen Phagenarten interessiert sein, wenn sie Phagen in der Nanosynthese und in Sensoren einzusetzen planen. In dieser Hinsicht sind drei Phagenarten zu unterscheiden:<sup>[39]</sup> 1) filamentöse (stabförmige) Phagen wie fd und M13 (Abbildung 1 und 2), 2) ikosaedrische Phagen wie MS2 und  $\Phi$ 174, und 3) verzerrt ikosaedrische Phagen mit helikalen Schwanzfasern wie T4 und T7. Bei all diesen Phagen handelt es sich um nano-



Chuanbin Mao promovierte an der North-eastern University (China) und arbeitete anschließend an der Tsinghua University als Postdoktorand und später als Associate Professor. Nach einer kurzen Beschäftigung an der University of Tennessee war er ab 2000 als Postdoktorand an der University of Texas in Austin tätig. 2005 wechselte er auf eine Position als Assistant Professor an die University of Oklahoma. Seine Forschungsinteressen gelten der biotemplatunterstützten Nanosynthese, Biosensoranwendungen, der Bionanotechnologie und der Nanomedizin.



**Abbildung 2.** Transmissionselektronenmikroskopie(TEM)-Bild eines angefärbten M13-Phagen. Die Morphologie von fd- und M13-Phagen ist in TEM-Bildern praktisch identisch.

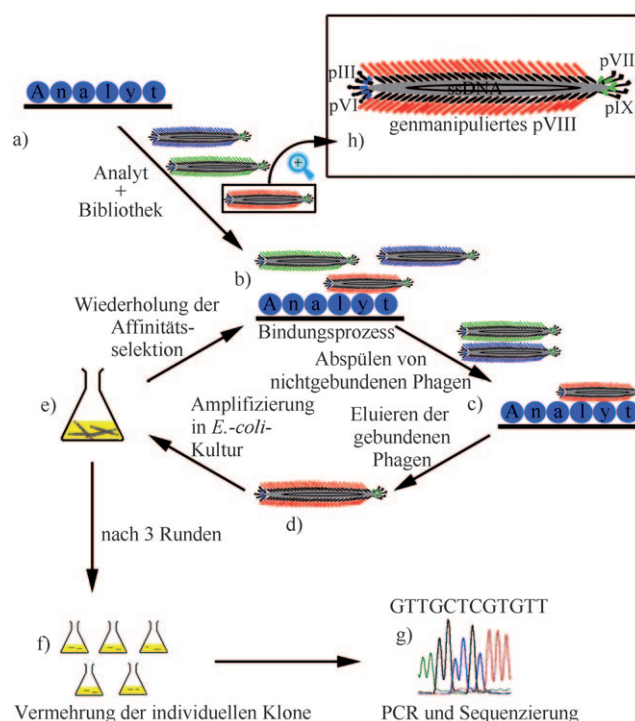
metergroße Strukturen. Die filamentösen fd- und M13-Phagen entsprechen beispielsweise Nanofasern von etwa 1 µm Länge und 7 nm Breite (Abbildung 1 und 2), der ikosaedrische MS2-Phage ist ein Nanokügelchen mit ungefähr 23–27 nm Durchmesser,<sup>[39,43,44]</sup> und der T7-Phage besteht aus einer kugelförmigen Proteinhülle mit 55 nm Innendurchmesser, an die ein 28,5 nm langer Schwanz mit 19 nm Durchmesser angesetzt ist.<sup>[39,40,45]</sup> Diese Größe der Phagen sowie die Fähigkeit, die chemischen Eigenschaften ihrer Oberfläche durch gentechnische Modifizierung so zu verändern, dass ein Peptid oder Protein an bestimmten Stellen präsentiert wird, ermöglicht es, Phagen sowohl als Template für die Synthese und den Aufbau von Nanomaterialien als auch für die Entwicklung fortschrittlicher Nanosensoren zu nutzen.

## 2.2. Filamentöse Phagen als gentechnisch modifizierbare biologische Nanofasern

Die bisher erfolgreichsten Phagen in Nanosynthese- und Biosensoranwendungen waren die filamentösen M13- und fd-Phagen, vor allem weil die etablierten Phagendisplays hauptsächlich auf solchen filamentösen Phagen beruhen. Der M13- und der fd-Phage sind bezüglich Struktur und Morphologie nahezu identisch (Abbildung 1 und 2). Sie sind als zylindrische Anordnungen von ca. 3000 Kopien des Haupt-Hüllproteins (pVIII) um einen zirkulären DNA-Einzelstrang als Genom zu beschreiben (Abbildung 1).<sup>[46]</sup> Der Unterschied zwischen M13- und fd-Phagen liegt in der zwölften Aminosäure des 50 Aminosäuren langen Proteins pVIII; anstelle von N in M13 findet man D in fd-Phagen. Der DNA-Einzelstrang kodiert pVIII für die Seitenwand sowie vier weitere Strukturproteine, nämlich die Hüllproteine für die beiden Enden: pIII und pVI, pVII und pIX. An einem Ende des Zylinders befinden sich jeweils fünf Kopien von pIII und pVI, am anderen Ende jeweils fünf Kopien von pVII und pIX. Indem man für Fremdpeptide kodierende DNA-Sequenzen in die Gensequenzen der Hüllproteine einfügt, kann man bewirken, dass diese Peptide an der Oberfläche des Phagen präsentiert werden; je nachdem, welche Sequenz modifiziert wurde, kann dies an den Enden (z.B. beim pIII- oder pIX-Display) und/oder entlang der Seitenwand geschehen (pVIII-Display; Abbildung 1). Damit ist das Prinzip des Phagendisplays von Peptiden oder Proteinen beschrieben. Durch Modifizieren der DNA lassen sich Peptide oder Proteine gezielt an einem Ende und/oder entlang der Seitenwand des Phagen präsentieren, indem ihre Gene mit den Genen für die jeweiligen Hüllproteine fusioniert werden. Auf diese Weise können ein, zwei oder drei verschiedene Peptide oder Proteine auf einem einzigen Viruspartikel präsentiert werden (Abbildung 1). Ein filamentöser Phage ist demnach nichts anderes als eine Nanofaser (Abbildung 2), deren Oberfläche auf genetischem Weg gezielt modifiziert werden kann (Abbildung 1).<sup>[36]</sup>

## 2.3. Das Phagendisplay als Technik zur Identifizierung von zielspezifischen Peptiden oder Proteinen

Es ist also möglich, fremde Peptide oder Proteine an einem Ende (z.B. an pIII) und/oder entlang der Seitenwand (an pVIII) von filamentösen Phagen zu präsentieren, indem man einfach eine DNA-Sequenz inseriert, die für diese Peptide oder Proteine kodiert (Abbildung 1). Damit lässt sich eine Bibliothek aus Milliarden von M13- oder fd-Phagenklonen aufbauen, in der jeder Phagenklon eine andere fremde Peptid- oder Proteinsequenz präsentiert.<sup>[36]</sup> In einer solchen Bibliothek kann unter Milliarden von Kandidaten ein Peptid oder Protein identifiziert werden, das spezifisch an einen Analyt bindet (z.B. an ein Protein, eine Zelle oder einen Kristall). Hierbei kommt ein als „Biopanning“ bezeichneter Selektionsprozess zum Einsatz, der in Abbildung 3 skizziert ist.<sup>[35,47,48]</sup>



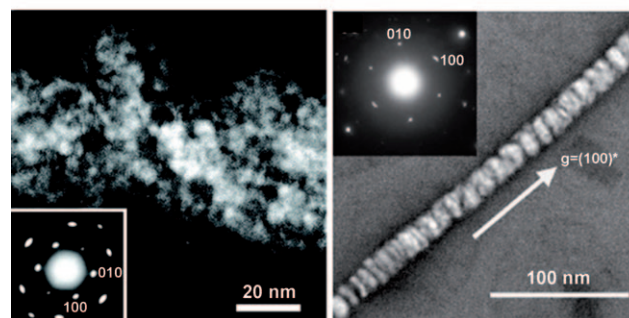
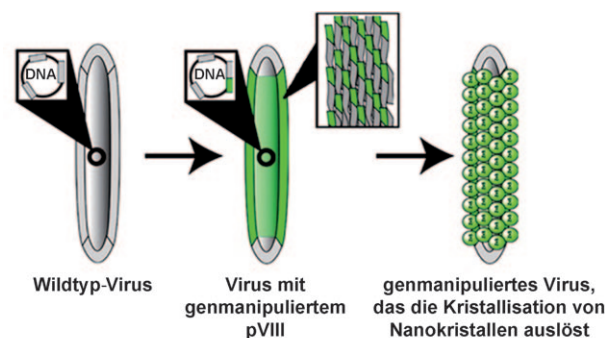
**Abbildung 3.** Vorgehensweise beim „Biopanning“ zur Identifizierung eines zielspezifisch bindenden Peptids oder Proteins mithilfe eines Phagendisplays. a) Der Analyt (blaue Kreise) wird auf dem Substrat immobilisiert; b) eine Bibliothek aus Milliarden von Phagenklonen wechselwirkt mit dem Analyt; c) mit Waschlösung werden nicht gebundene Phagen heruntergespült, bindende Phagen verbleiben am Analyt; d) die bindenden Phagen werden mit einem Elutionspuffer vom Analyt gewaschen; e) die bindenden Phagen werden durch Infektion von Bakterien in Kultur vermehrt; so erhält man eine kleinere Bibliothek, die in der nächsten Selektionsrunde wieder in Schritt (b) eingesetzt wird; f) nach mehreren Selektionsrunden (b → c → d → e → b) werden die am besten an den Analyt bindenden Phagenklone vermehrt. g) Die kodierende Region der Phagen-DNA wird sequenziert, um die Primärstruktur des zielspezifisch bindenden Peptids oder Proteins zu entschlüsseln. h) Struktur eines „Landscape“-Phagen, in dem jede der tausenden pVIII-Kopien das fremde Peptid trägt. PCR: Polymerasekettenreaktion.

Derzeit gibt es zwei Arten von Peptid-/Protein-Bibliotheken im Phagendisplayformat.<sup>[35,49]</sup> In pVIII-Bibliotheken wie der „Landscape“-Phagen-Bibliothek<sup>[50]</sup> wird jede Peptidsequenz, gebunden an pVIII, in tausendfacher Kopie entlang der Seitenwand des Phagen präsentiert (Abbildung 1 und 3).<sup>[51]</sup> Hierbei ist zu beachten, dass die Fusion langer Peptide an pVIII die Zusammenlagerung der pVIII-Proteine um die DNA und somit die Bildung des reifen Phagenpartikels beeinträchtigen kann. Die Länge von Peptiden, die auf der Seitenwand problemlos präsentiert werden können, ist auf 12 Aminosäurereste beschränkt (wobei auch die Peptidsequenz eine Rolle spielt).<sup>[23]</sup> Die Alternative hierzu sind pIII-Bibliotheken,<sup>[23,24,52]</sup> in denen die Peptide oder Proteine an die fünf Kopien von pIII fusioniert und an einem Ende des Viruspartikels präsentiert werden (Abbildung 1).<sup>[48]</sup> Die „Landscape“-Phagen-Bibliothek wurde von Petrenko, Smith und Mitarbeitern entwickelt.<sup>[51,53]</sup> Abbildung 3 zeigt das Prinzip des „Biopanning“, durch das ein Peptid, das spezifisch an einen Analyt bindet, in einer „Landscape“-Phagen-Bibliothek ermittelt werden kann.

Die allgemeine Vorgehensweise beim „Biopanning“ (Abbildung 3) zur Selektion eines zielspezifischen Phagen aus einer Zufallsbibliothek umfasst die folgenden Schritte: Zunächst lässt man eine Bibliothek mit Milliarden von Phagenklonen, die an einer Spitze oder an ihrer Seitenwand jeweils ein anderes Peptid oder Protein tragen (siehe Abbildung 1), auf den immobilisierten Analyt einwirken, wobei einige der Phagen an den Analyt binden. Anschließend werden die nicht bindenden Phagen mit einem Waschpuffer entfernt. Die bindenden Phagen werden im nächsten Schritt mithilfe eines Elutionspuffers vom immobilisierten Analyt abgewaschen. Das Eluat enthält den bindenden Phagen, der dann durch Infektion von *E. coli*-Bakterien vermehrt werden kann, sodass man, als Ergebnis des „Biopanning“, eine kleinere Bibliothek mit weniger Phagenklonen erhält. Um die spezifischsten Phagen für den Analyt zu ermitteln (und somit das Peptid oder Protein mit der höchsten Spezifität), wird diese kleinere Bibliothek erneut mit demselben Analyt umgesetzt. Nach mehreren solcher Zyklen erhält man eine Bibliothek mit deutlich weniger Phagenklonen, die dann sequenziert werden, um die Peptide oder Proteine auf denjenigen Phagenklonen zu identifizieren, die aus dem „Biopanning“ hervorgingen. Weil diese Peptide oder Proteine mit dem Hüllprotein des Phagen fusioniert sind, sind sie genetisch in der Phagen-DNA verschlüsselt. Die Sequenzierung dieser DNA ergibt somit die Aminosäuresequenz der zielspezifisch bindenden Peptide oder Proteine, die auf der Oberfläche der Phagen präsentiert werden. Weil es sich beim Phagendisplay grundsätzlich um einen evolutionären Selektionsprozess handelt, sollte der Analyt theoretisch auf die Erkennung durch ein spezifisches Peptid oder Protein reagieren. Eine Veränderung des Analyts würde wiederum eine Veränderung der zielspezifischen Peptid- oder Proteinsequenz zur Folge haben. Die Phagendisplaytechnik wurde in mehreren Übersichten<sup>[35,54,55]</sup> und Büchern beschrieben.<sup>[36–38]</sup> Sie war bei der Entwicklung von Impfstoffen und Antikörpern erfolgreich und hat sich bei der Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie beim Protein-Engineering bewährt.<sup>[35,37,49,56]</sup>

## 2.4. Phagen als Template beim Aufbau von Nanostrukturen

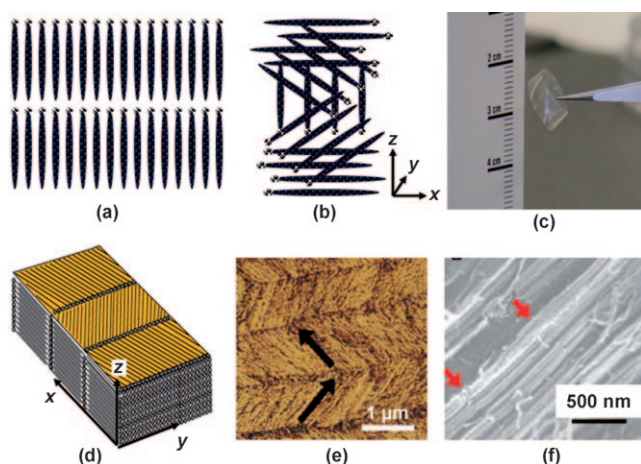
Filamentöse Phagen sind einzigartige Template für die Synthese und den Aufbau von Nanostrukturen.<sup>[23,24]</sup> Dafür gibt es zwei Gründe: Erstens können Phagen fremde Peptide oder Proteine exprimieren und auf ihrer Oberfläche präsentieren, wenn die Gensequenzen dieser fremden Peptide oder Proteine in die Phagen-DNA eingebaut werden (Abbildung 1); dadurch können Phagen als Template für die Abscheidung von Nanokristallen dienen. Zweitens haben mit Nanopartikeln beschichtete Phagen, wie Wildtyp-Phagen auch,<sup>[57,58]</sup> eine einheitliche Größe und Form, sodass sie freitragende dreidimensionale Materialien mit unterschiedlichen Strukturen aufbauen können (z. B. über die Bildung lyotroper Flüssigkristalle).<sup>[23,24,48]</sup> Peptide, die durch Screening einer kombinatorischen Bibliothek („Biopanning“) identifiziert wurden und spezifisch für anorganische Materialien wie ZnS oder CdS sind, wurden entlang der Seitenwand eines M13-Phagen präsentiert, um dort das geordnete Wachstum von Nanokristallen in einer bestimmten Orientierung auszulösen (Abbildung 4).<sup>[23,24]</sup> Solche mineralisierten Phagen können



**Abbildung 4.** Oben: Ein Wildtyp-Phage (links) kann gentechnisch dahingehend verändert werden, dass er kristallspezifische Peptide am Haupt-Hüllprotein pVIII trägt (Mitte), die eine Mineralisation von Nanokristallen auf der Seitenwand auslösen können (rechts). Unten: hochauflösende TEM-Bilder von Phagenanofasern mit einem Überzug von ZnS-Nanokristallen auf der Seitenwand. Die Einschübe zeigen Elektronenbeugungsmuster der mineralisierten Nanofasern, die Informationen über die bevorzugte Kristallorientierung liefern.<sup>[23,24]</sup>

dann zu einem dreidimensionalen bioanorganischen Hybridmaterial aggregieren (Abbildung 5).<sup>[23,48]</sup> Dieses Beispiel zeigt, dass Phagen leistungsfähige Template für die Synthese und den Aufbau von Nanomaterialien sind. Durch Modifizieren der DNA lassen sich verschiedene kristallisationsver-





**Abbildung 5.** Beispiele für flüssigkristalline Strukturen, die aus mineralisierten Phagennanofasern aufgebaut werden können: a) cholesterisch, b) smektisch. c) Photographie eines dünnen flüssigkristallinen Films. d) Schematische Darstellung des dünnen Films in (c). e) AFM-Bild des dünnen Films in Draufsicht und f) SEM-Bild des dünnen Films in Seitenansicht. Wo sich die Nanokristalle abscheiden, hängt von der Platzierung des kristallisationsvermittelnden Peptids auf den Phagen ab.<sup>[48]</sup>

mittelnde Peptide an der Seitenwand präsentieren, sodass unterschiedliche Nanokristalle auf den Phagen aufgewachsen werden können.

### 3. Viren und Sensoren: Phagen als Fallbeispiel

#### 3.1. Phagen in der Sensorentwicklung

Mithilfe des Phagendisplay können bereits seit den 80er Jahren zielspezifische Peptid- oder Proteinsonden identifiziert werden, dennoch wurden Phagen kaum in der Sensorentwicklung eingesetzt. Für Chemo- und Biosensoren ist die Spezifität ein entscheidendes Kriterium;<sup>[59]</sup> Phagen können verwendet werden, um zielspezifische Peptide oder Proteine zu identifizieren, und ihnen kann eine Spezifität für einen bestimmten Analyt verliehen werden. Lysierende Phagen töten überdies spezifisch Bakterienzellen ab, deren Inhalt dadurch in das Medium ausgeschüttet wird; somit könnten lysierende Phagen den spezifischen Nachweis von Bakterien ermöglichen. Weil Phagen selbst nicht über die erforderlichen physikalischen Eigenschaften verfügen, um ein Ausgabe-signal zu erzeugen, müssen sie – oder nur die zielspezifischen Peptide oder Proteine, die durch ein Phagendisplay identifiziert wurden – in ein Analysesystem integriert werden, das den Erkennungsprozess zwischen dem Phagen und dem Analyt in ein Ausgabesignal übersetzt.

Phagen verfügen über einige vorteilhafte chemische und biologische Eigenschaften im Hinblick auf die Entwicklung eines Sensors zum schnellen und selektiven Nachweis von Antigenen in Echtzeit. Erstens kann ein Phagendisplay genutzt werden, um Peptide oder Proteine zu selektieren, die Analyte spezifisch erkennen. Diese zielspezifischen Peptide

oder Proteine können auf der Oberfläche von Phagen präsentiert werden, die dadurch als ganzes zu zielspezifischen Sonden werden. Zweitens lassen sich nichtlysierende Phagen wie M13 und fd in großen Mengen, leicht und billig durch Infektion von Bakterien produzieren. Drittens sind Phagen unter harschen Bedingungen beständig, etwa im sauren oder basischen pH-Bereich sowie in Gegenwart von Nucleasen oder proteolytischen Enzymen.<sup>[60]</sup> Viertens sind Phagen auch thermisch (bis 180°C)<sup>[61]</sup> und chemisch stabil (z.B. in nicht-wässrigen Medien).<sup>[62,63]</sup> Diese ausgezeichnete Stabilität, gepaart mit der Möglichkeit, die Spezifität auf genetischem Weg einzustellen, schafft die Voraussetzung für den Einsatz von Phagen als Sonden in Biosensoren.

Phagen sind bisher in viererlei Weise bei der Sensorentwicklung verwendet worden: 1) Nichtlysierende Phagen (M13 oder fd), die das zielspezifische Peptid oder Protein präsentieren, wurden durch Phagendisplay identifiziert und anstelle von Antikörpern direkt als Sonden in den Sensoren eingesetzt; 2) Analyte erkennende Peptide, Proteine oder Antikörper wurden durch Phagendisplay identifiziert, chemisch synthetisiert oder gentechnisch produziert und als Sonden eingesetzt; 3) lysierende Phagen (T4 oder T7) können als Sonden für Bakterien wirken, die sie spezifisch aufbrechen; der Inhalt der Bakterienzellen kann daraufhin analysiert und der entsprechende Bakterienstamm nachgewiesen werden; 4) Phagen können als Nanofasern in Sensoren mit organischen Molekülen oder Biomolekülen konjugiert und/oder mit anderen Nanomaterialien zu Kompositstrukturen kombiniert werden, die auf äußere Reize ansprechen.

#### 3.2. Sensoren auf der Basis von Phagen und bioanalytischen Methoden

Um funktionsfähige Sensoren zu erhalten, müssen Erkennungsprozesse durch Phagen mit weiteren analytischen Methoden kombiniert werden. In den folgenden Abschnitten werden wir erklären, wie solche Sensoren durch Kombination von Phagen und in Phagendisplay selektierten Proteinen mit analytischen Techniken wie der Quarzmikrowaage (QCM), dem enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) sowie optischen und elektrochemischen Methoden zugänglich sind. Die vielfältigen Analyte und Zielstrukturen, die auf diesem Weg nachgewiesen werden können, sind in den Tabellen 1–4 zusammengefasst.

##### 3.2.1. QCM-Biosensoren auf Phagenbasis

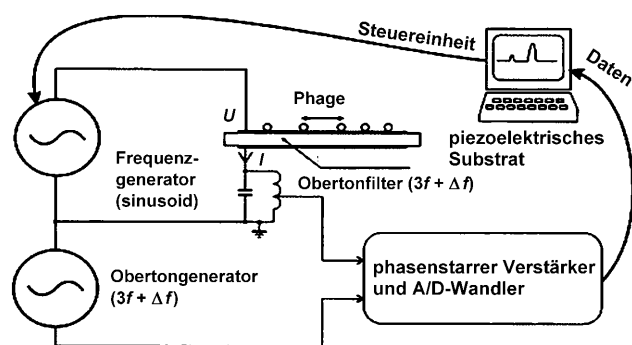
Eine QCM spricht empfindlich auf Masseänderungen im Nanogrammbereich an. Entsprechende Sensoren bestehen aus einer piezoelektrischen Quarzscheibe im AT-Schnitt, die auf beiden Seiten mit Metallelektroden (z.B. aus Gold) überzogen ist. Wenn eine geringe Masse auf der Elektrodenoberfläche adsorbiert wird, kommt es zu einer Frequenzverringerung der Resonanzfrequenz des piezoelektrischen Kristalls, die proportional zur adsorbierten Masse ist. Diesen Zusammenhang gibt die Sauerbrey-Gleichung wieder [Gl. (1)].<sup>[70]</sup>

$$\Delta f = \frac{-2nf_0^2 \Delta m}{A(\mu\rho)^{1/2}} \quad (1)$$

Darin ist  $\Delta f$  die Änderung der Resonanzfrequenz,  $\Delta m$  die Massenänderung,  $n$  die Ordinalzahl der Oberschwingung,  $\mu$  der Schermodul von Quarz ( $2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$ ),  $f_0$  die Resonanzfrequenz,  $A$  die piezoelektrisch aktive Fläche des Kristalls und  $\rho$  die Dichte von Quarz ( $2.648 \text{ g cm}^{-3}$ ). Weil die QCM hoch empfindlich Massen im Nanogramm-Bereich bestimmen kann, ist auch eine Anwendung zur Messung von Biomolekül-Wechselwirkungen in Echtzeit möglich.<sup>[71]</sup> QCM-Sensoren können dazu dienen, die Bindung zwischen einem Analyt und einer Sonde zu verfolgen, die an der Oberfläche eines piezoelektrischen Kristalls verankert ist. Solche QCM-Sensoren wurden für Immunassays<sup>[72,73]</sup> sowie zum Nachweis von Bakterien,<sup>[74–83]</sup> Viren und Toxinen entwickelt.<sup>[82,84–86]</sup>

Der gravierendste Nachteil dieser Methode ist die mangelnde Selektivität. Falls aber durch Phagendisplays zielspezifische Phagen oder Proteine identifiziert werden könnten, die auf der Oberfläche des QCM-Signalwandlers immobilisiert werden können, so wäre dieses Problem gelöst (Tabelle 1). Abbildung 6 skizziert den Aufbau einer Quarzmikrowaage, in der Phagen auf dem piezoelektrischen Signalwandler verankert sind.<sup>[64]</sup>

QCM-Sensoren eignen sich zum Nachweis von Bakterien, wenn zielspezifische Phagen als Sonden auf dem QCM-



**Abbildung 6.** Aufbau einer Quarzmikrowaage.<sup>[64]</sup> Der zielspezifische Phage kann auf der Oberfläche des piezoelektrischen Substrats verankert werden.

Signalwandler gebunden sind (Abbildung 6). Für herkömmliche QCM-Verfahren ohne Phagen war der empfindliche Nachweis von Bakterien problematisch. Zudem verursachte die direkte Bindung von Bakterien an den Signalwandler eine innere Reibung oder die Einlagerung von Wasser zwischen den Zellen, was die Schwingung des Kristalls dämpfte.<sup>[87]</sup> Um trotzdem Bakterien mithilfe eines QCM-Sensors nachweisen zu können, muss also eine Methode gefunden werden, die Bakterien fest an der Oberfläche des QCM-Signalwandlers zu fixieren – beispielsweise durch Verankern von Bakterien er-kennenden Phagen. So gelang der schnelle Nachweis von *S.-typhimurium*-Bakterien in Lösung mithilfe eines fd-Phagen als Sonde, der durch Affinitätscreening in einem Phagendisplay selektiert (Abbildung 3) und auf dem piezoelektrischen Signalwandler physisorbiert worden war.<sup>[66]</sup> Zuerst wurden binnen 1 h bei Raumtemperatur ungefähr  $3 \times 10^{10}$  Phagenpartikel pro  $\text{cm}^2$  auf der Oberfläche der QCM-Signalwandler adsorbiert. Im nächsten Schritt führte die spezifische Bindung von Bakterien an die immobilisierten Phagen zu einer Änderung der Resonanzfrequenz der QCM-Sensoren. Dabei bestachen die mit Phagen belegten QCM-Sensoren durch eine kurze Antwortzeit (unter 180 s) und eine Nachweisgrenze von nur  $10^2$  Bakterienzellen pro mL.<sup>[66]</sup>

Phagen können auf verschiedene Art auf der Oberfläche von QCM-Signalwandlern verankert werden, z.B. durch Physisorption, mithilfe der Langmuir-Blodgett (LB)-Technik oder durch molekulare Selbstorganisation. Die einfachste und billigste Methode ist die Physisorption, während die Sensorleistung bei allen drei Immobilisierungstechniken ähnlich ist.<sup>[67]</sup> Durch Affinitätscreening ermittelte fd-Phagen für den Nachweis von  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -gal) wurden in einem Beispiel auf einem QCM-Sensor physisorbiert.<sup>[67]</sup> Durch die Anwendung des Phagen als Sonde hatte der Sensor eine Nachweisgrenze im niedrigen nanomolaren Bereich und eine kurze Reaktionszeit um 100 s. Darüber hinaus war er außergewöhnlich selektiv für  $\beta$ -gal, sogar in einer Mischung mit der 2000-fachen Konzentration an BSA.<sup>[67]</sup> In einem weiteren Beispiel wurden Streptavidin- oder *S.-typhimurium*-selektive Phagen aus einem Phagendisplay mithilfe der LB-Technik an QCM-Sensoren verankert. Die resultierenden QCM-Sensoren waren hoch selektiv und sprachen schnell

**Tabelle 1:** QCM-Sensoren auf Phagenbasis (o.A.: ohne Angabe).

Sonde	Analyt	Nachweisgrenze	Lit.
verzweigte Maltosepolymere	M13-Phagen mit dem Maltose bindenden Protein auf pIII	20 Phagen	[64]
Anti-pVIII-Antikörper	M13-Phagen	$10^6 \text{ pfu mL}^{-1}$	[65]
VTPPTQHQ auf pVIII von fd-Phagen, selektiert aus einer f8/8-„Landscape“-Phagen-Bibliothek	<i>Salmonella typhimurium</i>	$10^2 \text{ Zellen mL}^{-1}$	[66]
$\beta$ -gal bindendes Peptid auf pVIII von fd-Phagen	$\beta$ -gal aus <i>E. coli</i>	3 pM	[67]
<i>S. typhimurium</i> bindendes Peptid auf pVIII von sphäroiden fd-Phagen	<i>Salmonella typhimurium</i>	$10^2 \text{ Zellen mL}^{-1}$	[68]
MOMP <sup>[a]</sup> -Fragment aus <i>Legionella pneumophila</i>	M13-Phagen, die ein Anti-MOMP-Fragment präsentieren	o.A.	[69]

[a] MOMP = major outer membrane protein.

und empfindlich auf zunehmende Konzentrationen der Analyte, Streptavidin oder *S. typhimurium* an. Anstelle von affinen Phagen konnten auch nur die in einem Phagendisplay selektierten Peptide auf QCM-Sensoren immobilisiert und als Sonden für den Nachweis von speziesübergreifenden Zelloberflächenmarkern in Gewebehomogenaten verwendet werden.<sup>[93]</sup>

QCM-Sensoren können außerdem eingesetzt werden, um Phagen in Lösung nachzuweisen, vorausgesetzt, es sind Sonden auf den Signalwandlern verankert, die diese Phagen binden können.<sup>[64,65]</sup> Eine Schicht, die verzweigte Maltosepolymere enthielt, wurde über Au-S-Bindungen chemisch an der Oberfläche eines QCM-Signalwandlers befestigt.<sup>[64]</sup> Der resultierende, mit Maltose funktionalisierte QCM-Sensor lagert M13-Phagen an, die das Maltose bindende Protein an einem Ende tragen (an pIII). Die Gewichtsabnahme beim Ablösen der Maltose bindenden Phagen von der Oberfläche des Signalwandlers konnte genutzt werden, um diese Phagen empfindlich nachzuweisen; Phagen, die Maltose nicht binden, störten dabei nicht.<sup>[64]</sup> Angeblich kann dieser QCM-Sensor schon 20 Phagen nachweisen, was eine Anwendung als empfindliches und kostengünstiges Virus-Nachweisverfahren nahelegt.<sup>[64]</sup> Bei einem ähnlichen Immunassay, das auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen Anti-M13-Antikörpern und M13-Phagen beruht, wurden die Anti-M13-Antikörper zunächst auf dem geätzten, im Schermodus schwingenden Quarzkristall verankert, der als Signalwandler diente. Der mit den Antikörpern belegte QCM-Sensor wurde dann verwendet, um M13-Phagen direkt und spezifisch nachzuweisen. Die spezifische Bindung der M13-Phagen an den Sensor erhöhte das Signal-Rausch-Verhältnis um einen Faktor größer 6, und die Nachweisempfindlichkeit für M13-Phagen wurde um das 200-fache verbessert.<sup>[65]</sup>

Die beschriebenen Ergebnisse deuten an, dass QCM-Sensoren auf Phagenbasis angewendet werden können, um Bakterien und Viren in Nahrungsmitteln sowie für Verteidigungs- und Personenschutz Zwecke aufzuspüren.<sup>[68]</sup> Dabei kamen Techniken wie Infrarot- und Fluoreszenzspektroskopie, Flusszytometrie, Chromatographie und Chemolumineszenzverfahren zum Einsatz.<sup>[76]</sup> Fortschritte bei der Entwicklung von Sensoren für pathogene Bakterien in der klinischen

Diagnostik und in der Umweltüberwachung waren zu verzeichnen,<sup>[94]</sup> doch es ist nach wie vor eine Herausforderung, pathogene Bakterien in Nahrungsmitteln sicher nachzuweisen. Sensoren auf der Basis von Phagen und analytischen Techniken wie der QCM können einen schnelleren und selektiveren Bakterien-Nachweis ermöglichen.<sup>[95]</sup>

Ferner können Phagendisplays genutzt werden, um Antikörperfragmente zu selektieren, die spezifisch an ein Antigen binden. Dabei ist es wichtig, die Bindungsaffinität des rekombinanten Antikörperfragments für sein Antigen zu bestimmen. Dies kann mithilfe von QCM-Sensoren geschehen. Wenn an Phagen befestigte Antikörper an ein Antigen binden, das auf einem QCM-Sensor verankert ist, wird sich die Resonanzfrequenz infolge der Gewichtszunahme verringern. Auf diesem Weg lässt sich die effektive Affinität eines „single-chain“-Fv(scFv)-Antikörpers für das Antigen ermitteln. So erhaltene effektive Affinitäten stimmten mit Affinitätswerten für das scFv-Fragment überein, die mithilfe von üblichen Gleichgewichts-ELISA- und Oberflächenplasmonenresonanz-Methoden erhalten wurden.<sup>[96,97]</sup>

### 3.2.2. Phagen in ELISA-Biosensoren

ELISA wird weithin zum Nachweis von biologischen Agentien und von spezifischen Antikörpern angewendet.<sup>[117]</sup> Man unterscheidet zwei Arten von ELISA: Bei indirekten ELISA-Tests wird das Zielantigen durch einen Antikörper eingefangen und durch einen zweiten Antikörper detektiert, während bei direkten ELISA-Tests das Antigen in der Probenlösung mit einem markierten Antigen um die Bindung an einen Antikörper konkurriert. Phagen können Antikörper in direkten ELISA-Tests als Sonden ersetzen (Tabelle 2). Beispiele hierfür sind zielspezifische fd-Phagen für  $\beta$ -gal,<sup>[67]</sup> Streptavidin und Neutraavidin.<sup>[88]</sup> Direkte ELISA-Tests mit Phagen anstelle von Antikörpern als Sonden wurden angewendet, um Bakterien,<sup>[67,88]</sup> Sporen<sup>[80]</sup> und Viren<sup>[105,118]</sup> spezifisch nachzuweisen.

„Landscape“-Phagen sind fd-Phagen, die je ein fremdes Peptid an jeder Kopie des Haupt-Hüllproteins tragen. Anders als Phagen, die fremde Proteine an den fünf Kopien der Hüllproteine an ihren Enden tragen, präsentieren diese

**Tabelle 2:** ELISA-Sensoren auf Phagenbasis (o.A.: ohne Angabe).

Sonde	Analyt	Nachweisgrenze	Lit.
<i>B.-anthracis</i> -Sporen bindendes Peptid auf pVIII von fd-Phagen	<i>Bacillus-anthraxis</i> -Sporen	o.A.	[80]
zielbindende Peptide auf pVIII von fd-Phagen (selektiert durch Phagendisplay)	Streptavidin, Avidin und $\beta$ -gal	o.A.	[88]
mAbs F4, F5 und LT1 bindendes Heptapeptid auf T7-Phagen	mAbs F4, F5 und LT1 (Antikörper gegen das große T-Antigen des Mauspolyomavirus)	o.A.	[89]
HBsAg bindendes Heptapeptid, präsentiert auf pIII von M13-Phagen (selektiert durch Phagendisplay)	Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg)	$K_d = 2.9$ nM	[90]
humane scFv-Antikörper (selektiert durch Phagendisplay)	Proteinantigene (z. B. ErbB2)	$K_d = 220$ pM–4 nM	[91]
Anti-Atrazin-Antikörper (selektiert durch Phagendisplay)	Atrazin	1–2 ppt	[92]



„Landscape“-Phagen tausende Kopien des Peptids in hoch geordneter Form an ihrer Seitenwand (Abbildung 1). Phagen, die durch Affinitätscreening einer „Landscape“-Phagen-Bibliothek (Abbildung 3) ermittelt wurden, stellen einen Ersatz für den Antikörper in ELISA-Test dar, der bequemer ist als die Immunglobuline.<sup>[88]</sup> Beispielsweise war die Bindungsaffinität des spezifischsten Phagen, der durch Phagendisplay in einer „Landscape“-Phagen-Bibliothek selektiert wurde und das Peptid EPRLSPHS an der Seitenwand präsentierte, für Sporen von *B. anthracis* Sterne um 3.5- bis 70-mal höher als für Sporen anderer *Bacillus*-Spezies.<sup>[80]</sup> Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass derartige Phagen in der kontinuierlichen Überwachung und in Biosorbentien zum Einsatz kommen könnten.<sup>[80]</sup>

### 3.2.3. Optische Biosensoren auf Phagenbasis

Es gibt zwei Arten von optischen Sensoren: Die einen messen Intensitätsschwankungen bei einer vorgegebenen Wellenlänge und nutzen dabei z.B. UV/Vis-Spektrometrie, Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzspektrometrie, Bio- oder Chemolumineszenz sowie IR-Spektrometrie. Die anderen erfassen Änderungen von chemischen Eigenschaften beim Wechsel der Wellenlänge anhand von Oberflächenplasmonenresonanz (SPR), resonantem Fluoreszenzenergietransfer (FRET) oder Kolorimetrie. In diesem Abschnitt werden wir uns auf optische Biosensoren auf der Grundlage von Immunfluoreszenz, FRET und SPR konzentrieren (Tabelle 3).

#### 3.2.3.1. Immunfluoreszenzassays

Immunfluoreszenzassays beruhen auf Fluoreszenzspektrometrie und spezifischen biologischen Erkennungsprozessen und liefern quantitative Resultate. Ein lysierender Phage infiziert und zerstört Bakterienzellen, die daraufhin ihre Bestandteile freisetzen. Wenn diese zellspezifischen Bestandteile nachgewiesen werden können, lässt sich mithilfe des lysierenden Phagen als Sonde ein Nachweisverfahren für die Bakterien ausarbeiten. Bei einer Methode betrachtet man die Fluoreszenz der freigesetzten Zellbestandteile. Blasco et al. entwickelten einen schnellen und empfindlichen Bakterienachweis, wobei sie *E. coli* und *Salmonella newport* als Modellorganismen prüften.<sup>[119]</sup> Bei ihrem Test lysierte der Phage die Bakterien spezifisch, und die Freisetzung des Zellinhalts wurde durch ATP-Biolumineszenz nachgewiesen.<sup>[119]</sup> Die Nachweisempfindlichkeit ließ sich erhöhen, wenn anstelle von ATP die Adenylat-Kinase der Bakterien als Zellmarker verwendet wurde. Diese Methode war in der Lage, schon weniger als  $10^3$  Bakterienzellen nachzuweisen, wofür sie nicht einmal 1 h benötigte.<sup>[119]</sup> Wu et al. nutzten eine Biolumineszenzmethode, um Adenylat-Kinase aus lysierten Bakterien zu erkennen, und sie bestimmten die Zahl an *Salmonella enteritidis*- und *E.-coli*-Bakterien, die von spezifischen Phagen lysiert worden waren.<sup>[115]</sup> Dabei war die Freisetzung von Adenylat-Kinase am größten, wenn das Verhältnis von Phagen zu Bakterienzellen („multiplicity of infection“) zwischen 10 und 100 lag. Mit diesem Test gelang der Nachweis von Bakterien schon binnen 2 h und bei niedrigen Konzentrationen ( $10^3$  CFU mL<sup>-1</sup>).<sup>[115]</sup> Der spezifische Nachweis von

Bakterien mithilfe von lysierenden Phagen vermeidet zeitaufwändige mikrobiologische Arbeitsschritte sowie die Verwendung selektiver Medien, weil die Phagen von Natur aus selektiv die Rezeptoren bestimmter Bakterien angreifen.<sup>[32,120]</sup>

Ein Bakteriophagen-Fluoreszenzassay (fluorescent bacteriophage assay, FBA) wurde entwickelt, um *E. coli* O157:H7 in Rinderhackfleisch und Rohmilch nachzuweisen.<sup>[99]</sup> Dieses zweistufige Verfahren umfasst eine immunmagnetische Reinigung des Zielorganismus aus einer gemischten Kultur sowie die Anwendung eines fluoreszenzmarkierten Phagen, der *E.-coli*-O157:H7-Zellen hoch spezifisch angreift.<sup>[99]</sup> Mit dem FBA gelang es, 10 bis 100 CFU mL<sup>-1</sup> in künstlich verunreinigter Rohmilch nach einem 10-stündigen Anreicherungsschritt nachzuweisen. Diesen Untersuchungen zufolge eignet sich das FBA zum zügigen Nachweis von *E. coli* O157:H7 in Nahrung und Milch.<sup>[99]</sup> Durch das FBA war *E. coli* O157:H7 auch in Konzentrationen von  $10^4$  Zellen pro mL in Kulturbrühe nachweisbar.<sup>[100]</sup>

In einer weiteren Studie wurde durch ein Phagendisplay ein Peptid mit 12 Aminosäureresten selektiert, das an das Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB), eine Ursache von Lebensmittelvergiftungen, binden konnte.<sup>[104]</sup> Die neun selektierten SEB bindenden Phagenklone zeigten übereinstimmend eine N-terminale Trp-His-Lys-Sequenz. Nach der Markierung der SEB bindenden Phagen mit dem Fluorophor Cy5 wurde eine Nachweisgrenze von 1.4 ng SEB pro Probentaste in einem Immunfluoreszenzassay erzielt.<sup>[104]</sup> Später entwickelte Biosensoren mit einem ähnlichen Wirkprinzip können *Bacillus globigii*, den MS2-Phagen und SEB nebeneinander nachweisen.<sup>[121]</sup> Diese Studien belegen, dass auf Phagen basierende Immunfluoreszenzassays zum hoch selektiven Nachweis in der Nahrungsmittelanalyse und für die klinische Diagnostik infrage kommen.

Ein Immunfluoreszenzassay auf Phagenbasis kann auch dabei helfen, Explosivstoffe mit hoher Empfindlichkeit aufzuspüren.<sup>[102]</sup> Zunächst wurden in einem Phagendisplay für 2,4,6-Trinitrobenzol – eine dem 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) ähnliche Verbindung – spezifische Peptide identifiziert. Die Phagen mit den entsprechenden Peptiden wurden dann in einen Immunsensor zum TNT-Nachweis integriert.<sup>[102]</sup> Dazu wurden sie mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin5 (Cy5) markiert und in einen Durchfluss-Sensor eingebaut. Der so erhaltene Fluoreszenzsensor detektierte  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  TNT mit hohem Signal-Rausch-Verhältnis in einer Seewasser-Probe (die nach und nach eingespritzt wurde).<sup>[102]</sup> In diesem Sensor wurde erstmals ein farbstoffmarkierter spezifischer Phage zum TNT-Nachweis im Durchflussmodus eingesetzt,<sup>[102]</sup> wobei eine sehr niedrige Nachweisgrenze von  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  erreicht wurde.<sup>[103]</sup> Diese Ergebnisse deuten an, dass solche Sensoren für TNT und ähnliche Verbindungen sowie für weitere Explosivstoffe entwickelt werden können. Kürzlich wurde überdies entdeckt, dass Peptide, die durch ein Phagendisplay für den Nachweis von Explosivstoffen in der Flüssigphase selektiert worden waren, dieselben Analyte auch selektiv in der Gasphase erkennen.<sup>[122]</sup>

Hybride aus zielspezifischen Phagen und fluoreszierenden Substanzen können als neuartige Fluoreszenzsonden für

**Tabelle 3:** Optische Biosensoren auf Phagenbasis (o.A.: ohne Angabe).

Sonde	Analyt	Nachweis- verfahren	Nachweis- grenze	Lit.
Calciumempfindlicher X-rhod-Farbstoff, gebunden an ein farbstoffbindendes Peptid (selektiert durch Phagendisplay)	Ca <sup>2+</sup>	Calciumempfindliche Fluoreszenz	100 nm	[98]
Fluoreszierender Bakteriophage LG1	<i>E. coli</i> O157:H7	FBA, Flusszytometrie	2.2 CFU g <sup>-1</sup> in Rinderhackfleisch	[99]
Fluoreszierender Bakteriophage LG1	<i>E. coli</i> O157:H7	Immunmagnetische Abtrennung mit Bakteriophagen-Fluoreszenzassay und Flusszytometrie	10 <sup>4</sup> Zellen mL <sup>-1</sup> in Kulturbrühe	[100]
Rekombinanter A511:luxAB-Phage	<i>Listeria</i> -Zellen	Epifluoreszenzmikroskopie an Filtern	o.A.	[101]
TNT bindendes Peptid auf M13-Phagen (selektiert durch Phagendisplay)	2,4,6-Trinitrotoluol (TNT)	ELISA, Immunfluoreszenzassay	10 µg mL <sup>-1</sup>	[102]
Rekombinante Anti-TNT-Antikörper (isoliert aus einer Antikörper-Phagenbibliothek)	2,4,6-Trinitrobenzol (TNB)	ELISA, Immunfluoreszenzassay	1 ng mL <sup>-1</sup>	[103]
SEB bindendes Peptid auf pIII von M13-Phagen mit Cy5-Farbstoffmarkierung	Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)	ELISA, Immunfluoreszenzassay	1.4 ng mL <sup>-1</sup>	[104]
HBsAg bindendes Protein auf pIII von M13-Phagen	Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg)	Phagengekoppeltes Immunabsorptionsassay	ca. 1 ng	[105]
Humane Anti-HBsAg-Antikörper (selektiert durch Phagendisplay)	Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg)	ELISA, Nitrocellulose-Filter-Assay	o.A.	[106]
Anti-HSV-Antikörper an M13-Phagen	Herpes-simplex-Viren	Phagengekoppeltes Immunabsorptionsassay	o.A.	[107]
Morphin bindendes Peptid auf Phagen (selektiert durch Phagendisplay)	Morphin	FRET	5 ng mL <sup>-1</sup>	[108]
CPMV bindendes Peptid auf pIII von Phagen (selektiert durch Phagendisplay)	Augenbohnen-Mosaikvirus (CPMV)	SPR	o.A.	[109]
β-gal bindender „Landscape“-Phage	β-gal	SPR	1 pM	[110]
scFv-Antikörper auf pIII des Phagen Lm P4:A8	<i>L. monocytogenes</i> , Actin polymerisierendes Protein (ActA)	SPR	<i>L. monocytogenes</i> : 2 × 10 <sup>6</sup> CFC mL <sup>-1</sup> ; ActA: 4.5 nM	[111]
Lysierende Phagen	<i>S. aureus ssp. aureus</i>	SPR	10 <sup>4</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	[112]
Anti-Aflatoxin-B <sub>1</sub> -scFv-Antikörper (selektiert durch Phagendisplay)	Aflatoxin B <sub>1</sub>	SPR	3 ng mL <sup>-1</sup>	[113]
Affibody-Liganden (selektiert durch Phagendisplay)	Oberflächenglykoprotein gp120 von HIV-1	SPR	monovalenter Affibody: K <sub>d</sub> ≈ 100 nM; divalenter Affibody: 10 nM	[114]
Freisetzung des Enzyms AK als Zellmarker durch lysierende Phagen	<i>Salmonella enteritidis</i> , <i>E. coli</i>	Biolumineszenz	10 <sup>3</sup> CFU mL <sup>-1</sup>	[115]
<i>luxI</i> -basierte Acylhomoserinlacton-Synthase, gebunden an λ-Phagen	<i>E. coli</i>	Biolumineszenz, Bioreporter	Kontaminiertes Spülwasser von Blattsalat, 130 CFU mL <sup>-1</sup>	[116]

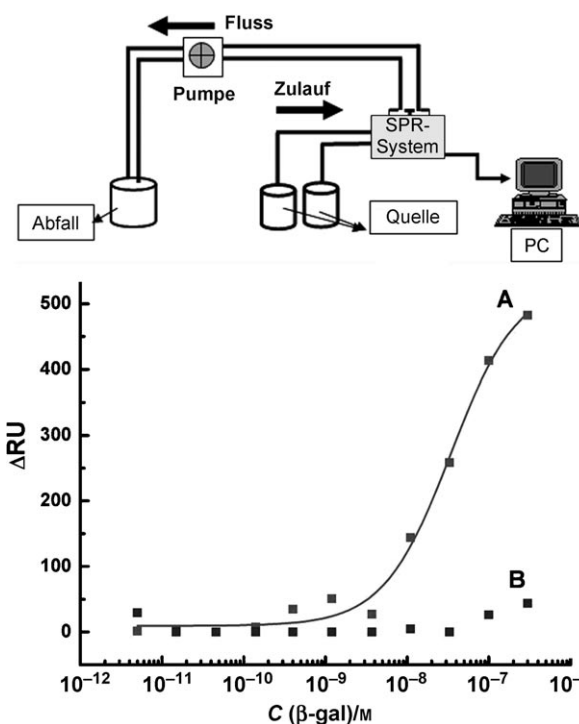
Sensoranwendungen dienen. So kann eine Liganden präsentierende leere T7-Phagenhülle unter Bildung eines Hybridnanopartikels mit einem fluoreszierenden anorganischen Europiumkomplex beladen werden.<sup>[45]</sup> Ein zielspezifisches Peptid (Ligand) kann durch ein Phagendisplay selektiert und auf der Virusoberfläche präsentiert werden. Diese Methode bietet daher einen neuen Ansatz für die Fluoreszenzmarkierung eines zielspezifischen Viruspartikels – und, umgekehrt betrachtet, zur Biofunktionalisierung von fluoreszierenden Nanopartikeln.<sup>[45]</sup> Wird die leere Phagenhülle mit radioaktiven oder magnetischen Nanopartikeln beladen, so erhält man weitere funktionelle Hybridsonden für Bildgebungsanwendungen und Bioassays.<sup>[45]</sup>

### 3.2.3.2. Resonanter Fluoreszenzenergietransfer

Die Beobachtung von FRET-Prozessen ist eine sehr verbreitete Untersuchungsmethode für Wechselwirkungen, Struktur und Dynamik von Biomolekülen.<sup>[123,124]</sup> Um ein FRET-Signal zu erzeugen, sollten die beiden beteiligten Fluorophore ungefähr 2 bis 6 nm voneinander entfernt sein. In diesen Bereich fällt auch der Abstand zwischen zwei Fab-Antikörper-Fragmenten, die ein Immunkomplex(IC)-Bindungspaar aufbauen, sodass dieses System einem FRET-Assay zugänglich ist. Durch ein Phagendisplay lassen sich spezifisch bindende Proteine selektieren, die in Kombination mit einem FRET-Assay zum immunologischen Nachweis niedermolekularer Analyte wie Morphin in einem Schritt angewendet werden können. Beispielsweise wurden Anti-Morphin- und Anti-IC-Antikörper-Fragmente für ein FRET-Assay aus Antikörperbibliotheken im Phagendisplayformat selektiert und mit Donor- (Europium) bzw. Akzeptorfluorophoren (Cy5) markiert.<sup>[108]</sup> Dieses FRET-Assay erwies sich als spezifisch und empfindlich, schnell und leicht zu handhaben; außerdem ließ es sich auch zum Nachweis anderer niedermolekularer Analyte nutzen. Morphin-Konzentrationen von  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  waren nachweisbar, ohne dass Codein oder Heroin störten.<sup>[108]</sup> Der Anti-IC-Fab-Antikörper kann zwischen dem Immunkomplex, der aus M1-Fab und Morphin entsteht, und denjenigen aus M1-Fab und den strukturell ähnlichen Substanzen Heroin oder Codein unterscheiden.<sup>[91]</sup>

### 3.2.3.3. Oberflächenplasmonenresonanz-Sensoren

Eine SPR resultiert aus der Anregung von Oberflächenplasmonen mit Licht und geht mit einer Veränderung des Brechungsindex durch die Moleküle in unmittelbarer Nähe der Metalloberfläche einher.<sup>[125]</sup> Die SPR wurde in der Sensorentwicklung genutzt, weil sie einen empfindlichen, schnellen und markierungsfreien Nachweis von Biomolekülen bei geringen Probenvolumina ermöglicht. Haes et al. haben kürzlich eine Übersicht über optische Nanosensoren auf der Basis von SPR publiziert.<sup>[126]</sup> Der Aufbau eines SPR-Sensors ist in Abbildung 7 skizziert.<sup>[110]</sup> SPR-Biosensoren (z.B. von BIAcore) haben sich als nützlich für die Untersuchung von Biomolekül-Wechselwirkungen in Echtzeit erwiesen.<sup>[113,127]</sup> Phagen können bei der Entwicklung von spezifischen SPR-Sensoren in zweierlei Weise genutzt werden:<sup>[110,114,113,127–129]</sup> durch Verankern des zielspezifischen



**Abbildung 7.** Oben: Durchfluss-SPR-System mit Behältern für die Ausgangslösungen, einem Abfallbehälter für verbrauchte Lösungen, einer peristaltischen Pumpe und einem Computer (PC) für Datensammlung und Offline-Analyse. Die Phagen werden auf dem goldbeschichteten SPR-Sensorchip verankert. Unten: typisches Verhalten eines SPR-Sensors mit immobilisierten Phagen im Durchflussmodus. Die Kurve A entspricht der Antwort des  $\beta$ -gal-spezifischen Phagen 1G40, der in einem der beiden Kanäle des Sensors verankert ist, bei  $\beta$ -gal-Konzentrationen zwischen 0.0032 und 210 nM. Kurve B zeigt die Antworten des Wildtyp-Phagen F8-5 im zweiten Kanal; auch bei der höchsten  $\beta$ -gal-Konzentration im Test (210 nM) ergab der für das Zielantigen  $\beta$ -gal hochaffine Phage ein ungefähr zehnmal so starkes Signal wie der Wildtyp-Phage.<sup>[110]</sup> RU = Resonanzeinheiten.

Phagen auf einem Sensorchip<sup>[110,127]</sup> sowie bei der Selektion eines zielspezifischen Proteins mithilfe eines Phagendisplays und anschließendem Verankern dieses Proteins auf dem Sensorchip.<sup>[113,114]</sup>

Durch Einführung eines zielspezifischen Phagen in einen SPR-Sensor konnte dessen Leistungsfähigkeit merklich gesteigert werden. Beispielsweise wurde in einem Zweikanal-Experiment ein  $\beta$ -gal-spezifischer „Landscape“-Phage, der mithilfe eines Phagendisplays identifiziert worden war (Abbildung 3), durch Physisorption auf der Goldoberfläche in einem Kanal eines SPREETA-SPR-Sensorchips verankert.<sup>[110]</sup> Im zweiten Kanal war zum Vergleich ein unspezifischer Wildtyp-Phage auf der Oberfläche des Sensorchips verankert. Die optische Antwort des Sensors wurde beobachtet, um die Auswirkungen der Behandlung des Sensorchips mit verschiedenen  $\beta$ -gal-Konzentrationen in den beiden Kanälen zu vergleichen. Der SPR-Sensorchip mit dem  $\beta$ -gal-spezifischen Phagen sprach selektiv auf  $\beta$ -gal an, während der Kanal mit dem Wildtyp-Phagen kein Signal lieferte (Abbildung 7). Der Sensor konnte  $\beta$ -gal in Konzentrationen zwischen  $10^{-3} \text{ nM}$  und  $10^{-1} \text{ } \mu\text{M}$  leicht nachweisen. Aus dem zeitlichen Verlauf der optischen Antwort im Durchflussmodus



konnten außerdem der mittlere  $K_d$ -Wert ( $1.3 \pm 0.001$  nM) und die Bindungswalenz ( $1.5 \pm 0.03$ ) bestimmt werden.<sup>[110]</sup>

In einer anderen Untersuchung<sup>[127]</sup> wurde ein Phage, der einen scFv-Antikörper gegen einen Virulenzfaktor, das Actin polymerisierende Protein ActA, präsentierte, physikalisch auf einem SPR-Sensorchip adsorbiert. Dieser SPR-Sensorchip wurde dann verwendet, um das Bakterium *L. monocytogenes*, das häufig als Verunreinigung in Lebensmitteln auftritt, spezifisch nachzuweisen. Die Nachweisgrenze für *L. monocytogenes*-Zellen betrug dabei  $2 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>, und für die Wechselwirkung zwischen dem phagegebundenen scFv und löslichem ActA wurde experimentell ein  $K_d$ -Wert von 4.5 nM bestimmt.<sup>[127]</sup> Die Möglichkeit,  $K_d$ -Werte und Bindungswalenzen messen zu können, ist einer der wichtigsten Vorteile dieser SPR-Sensoren auf Phagenbasis gegenüber anderen Sensoren. Alternativ kann ein zielspezifisches Peptid oder Protein durch ein Phagendisplay selektiert und anschließend auf dem Sensorchip verankert werden, um einen Erkennungsprozess oder einen Nachweis zu ermöglichen.<sup>[114]</sup> Ein spezifischer scFv-Antikörper gegen Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) wurde in einem Beispiel aus einer Phagendisplay-Bibliothek selektiert. Auf der Grundlage dieses scFv-Antikörpers und der SPR wurden Inhibitionsimmunoassays entwickelt, die AFB<sub>1</sub> empfindlich und selektiv nachweisen konnten.<sup>[113]</sup> Die vorgestellten SPR-Biosensoren arbeiten viel schneller und sind viel einfacher zu handhaben als herkömmliche ELISA-Verfahren.

Mithilfe von SPR-Sensoren lässt sich auch die Spezifität der Phagen und Proteine überprüfen, die durch Phagendisplay selektiert wurden. Glutathion-Peroxidase (GPX), ein Oxidantien abbauendes Enzym, ist maßgeblich am Abbau reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt. Entsprechende katalytische Antikörper wurden durch „Biopanning“ aus einer Phagendisplay-Bibliothek von humanen Antikörpern selektiert, wobei die drei Haptene (*S*)-2,4-Dinitrophenyl-*tert*-butylester, (*S*)-2,4-Dinitrophenyl-*tert*-hexylester und (*S*)-2,4-Dinitrophenyl-cyclohexylester als Analyt dienten.<sup>[128]</sup> Diese Antigene wurden jeweils unter Bildung einer Membran chemisch auf der Goldoberfläche eines SPR-Sensorchip verankert. Durch Wechselwirkung dieser Antigen-Membran mit den phagegebundenen Antikörpern können die Bindungsspezifitäten ermittelt werden.<sup>[128]</sup>

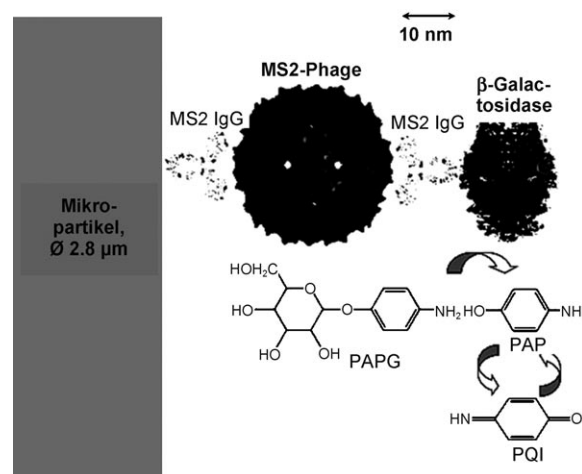
### 3.2.4. Phagen in elektrochemischen Biosensoren

Biosensoren auf der Grundlage elektrochemischer Methoden sind einfach, schnell und hoch empfindlich sowie zum Einsatz in trüben Medien und zur Miniaturisierung geeignet.<sup>[142–146]</sup> Solche elektrochemische Sensoren wurden für den Nachweis von Bakterien, Viren und Toxinen vorgeschlagen.<sup>[147]</sup> Die Elektrodenoberflächen können mit verschiedenartigen Materialien beschichtet werden, z.B. mit Polymeren, Sol-Gel-Materialien, Ionophoren, Enzymen, Antikörpern, DNA, Bakterien oder Viren, um entsprechende elektrochemische Sensoren zu erhalten.<sup>[145,148,149]</sup> Die Verankerung eines zielspezifischen Phagen als Sonde auf der Arbeitselektrode eines elektrochemischen Sensors kann zum spezifischen Nachweis von Analyten genutzt werden (Tabelle 4).

#### 3.2.4.1. Amperometrische Sensoren

Phagen selbst sind nicht elektrochemisch aktiv. Lysierende Phagen sind aber in der Lage, die Freisetzung von Enzymen als Zellmarkern aus ihren bakteriellen Zielzellen auszulösen; solche Enzyme können daraufhin bestimmte Substrate in elektrochemisch aktive Spezies umwandeln. Dieser Prozess lässt sich zum elektrochemischen Nachweis der Bakterien oder der lysierenden Phagen nutzen.<sup>[130,132,139,150]</sup> So sind die Infektion durch einen virulenten Phagen (phage  $\lambda$  vir) und die Aktivität des Enzyms  $\beta$ -D-gal spezifisch für den Bakterienstamm *E. coli* (K-12, MG1655).<sup>[130]</sup> Der lysierende Phage erkennt, infiziert und lysiert Bakterien dieses Stamms, die daraufhin  $\beta$ -D-gal freisetzen. Dieses Enzym wandelte das elektrochemisch inaktive Substrat *p*-Aminophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (PAPG) in *p*-Aminophenol (PAP) um, das elektrochemisch oxidiert werden konnte. Der bei diesem Prozess auftretende Strom diente zum amperometrischen Nachweis des spezifischen Bakterienstamms anhand der  $\beta$ -D-gal-Aktivität. Bei 6 bis 8 h Analysedauer lag die Nachweisgrenze bei lediglich 1 CFU pro 100 mL.<sup>[130]</sup>

Ein ähnliches Konzept kann eingesetzt werden, um Phagen nachzuweisen.<sup>[132,150]</sup> Ein Beispiel hierfür ist der MS2-Phage, der auf Pockenviren stimulierend wirkt. Weil solche Viren eine potenzielle Bedrohung darstellen, ist der Nachweis dieses Phagen von größter Bedeutung. In einem elektrochemischen Immunoassay unter Verwendung von paramagnetischen Kügelchen wird der MS2-Phage amperometrisch nachgewiesen (Abbildung 8).<sup>[132]</sup> Ein biotinyliertes Kaninchen-Anti-MS2-IgG wurde zuerst an ein Mikropartikel mit Streptavidin-Überzug gebunden und immobilisierte dann seinerseits den Phagen. Anschließend wurde ein Konjugat aus Kaninchen-Anti-MS2-IgG und  $\beta$ -gal an der anderen Seite des



**Abbildung 8.** Immunassay für den Bakteriophagen MS2. Biotinyliertes Kaninchen-Anti-MS2-IgG (biotin-1° Ab) wird an die Streptavidin-beschichteten Mikrokügelchen gebunden. Der Bakteriophage MS2 bindet zugleich an biotin-1° Ab und an ein Konjugat aus dem Kaninchen-Anti-MS2-IgG und  $\beta$ -Galactosidase. Dieses Enzym wandelt *p*-Aminophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (PAPG) in *p*-Aminophenol (PAP) um. Die elektrochemische Zweielektronenoxidation von PAP bei einem Potenzial von +290 mV gegen Ag/AgCl führt zu *p*-Chinonimin (PQI), das bei –300 mV wieder zu PAP reduziert werden kann.<sup>[132]</sup>

**Tabelle 4:** Elektrochemische Biosensoren auf Phagenbasis (o.A.: ohne Angabe).

Sonde	Analyt	Nachweisverfahren	Nachweisgrenze	Lit.
Freisetzung von $\beta$ -gal als Zellmarker durch lysierende Phagen	<i>E. coli</i> K-12, <i>E. coli</i> MG1655	Freisetzung von Marker-enzymen; Amperometrie	1 CFU/100 mL	[130]
M13-Phagen mit einem Gen für alkalische Phosphatase	<i>E. coli</i> TG-1	Amperometrie	1 CFU mL <sup>-1</sup>	[131]
Anti-MS2-IgG auf paramagnetischen Kügelchen	Bakteriophage MS2	elektrochemisches Immunassay mit paramagnetischen Kügelchen	1.5 × 10 <sup>10</sup> MS2-Phagenpartikel mL <sup>-1</sup>	[132]
Mit Anti-MS2/OVA-IgG funktionalisierte paramagnetische Mikrokügelchen	MS2-Phage, Ovalbumin	Amperometrie	1.6 × 10 <sup>11</sup> MS2-Phagenpartikel mL <sup>-1</sup> ; 470 (ng Ovalbumin) mL <sup>-1</sup>	[133]
Antikörper auf Phagen	Lactose, <i>L. monocytogenes</i> , MtKatG-Enzym	Amperometrie	o.A.	[134]
Zielspezifische Peptide auf Phagen	hPRL-3, MDAMB231-Brustkrebszellen	Potentiometrie, LAPS	0.04 nM hPRL-3, 10 <sup>5</sup> MDAMB231-Zellen mL <sup>-1</sup>	[135]
Elektrodenverankerte M13-Phagen	PSMA <sup>[a]</sup>	EIS	120 nM	[136]
Elektrodenverankerte M13-Phagen	Anti-M13-Antikörper	EIS	20 nM	[137]
Elektrodenverankerte M13-Phagen	Anti-M13-Antikörper	EIS, QCM	7 nM	[138]
Antikörper auf Phagen	h $\alpha$ 1-Säureglykoprotein, Ricin, M13-Phage, Fluorescein, <i>Bacillus globigii</i>	Redoxenzymverstärkte elektrochemische Detektion	Attomolare Konzentrationen	[139]
Sonden-DNA	Phagen	Elektronische DNA-Chips, Sandwich-Hybridisierung mit enzymmarkierten Sonden auf Kügelchen	10 <sup>7</sup> Phagen	[140]
$\alpha$ - oder $\beta$ -Glucosidase auf Phagen	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i>	Amperometrie mit bedruckten Einwegelektroden	10 lebende Zellen mL <sup>-1</sup>	[141]

[a] PSMA = prostataspezifisches Membranantigen.

Phagen befestigt.  $\beta$ -gal wandelt PAPG in *p*-Aminophenol (PAP) um, das elektrochemisch zu *p*-Chinonimin (PQI) oxidiert werden kann. Der Stromfluss bei dieser Reaktion lässt sich durch Amperometrie mit einer rotierenden Scheibenelektrode (RDE) oder mithilfe einer verzahnten Mikroelektrodenanordnung messen; er ist direkt proportional zur Konzentration des Antigens in der Probe. Die Nachweisgrenze dieser elektrochemischen Methode kann 3.2 × 10<sup>10</sup> Virenpartikel pro mL erreichen (RDE-Amperometrie bei einem Potential von +290 mV gegen Ag/AgCl und 3000 Umdrehungen pro Minute).<sup>[132]</sup> Für ein Immunassay mit amperometrischem Nachweis von MS2-Phagen und Ovalbumin (OVA) wurde ein vollautomatisches Fluss-System entwickelt.<sup>[150]</sup>

Über diesen Einsatz lysierender Phagen in amperometrischen Sensoren hinaus kann auch ein Reporter-Phagemid-

System zum spezifischen amperometrischen Nachweis von Bakterien eingesetzt werden.<sup>[131]</sup> Der Helferphage M13KO7 und das käufliche Plasmid pFLAG-ATS-BAP wurden dabei zu einem Phagemid kombiniert. Das System enthielt weiterhin ein Gen für alkalische Phosphatase (ALP) als Reportergen.<sup>[131]</sup> ALP reagiert mit *p*-Aminophenylphosphat, dem Substrat der enzymatischen Reaktion, im Periplasma von Bakterienzellen.<sup>[131]</sup> PAP, das Produkt der enzymatischen Reaktion, kann die Zellen verlassen und an der Arbeitselektrode bei einem Potenzial von 220 mV gegen Ag/AgCl oxidiert werden. Auch in diesem Fall dient der erzeugte Strom zum Nachweis der Bakterien. Die ALP-Aktivität kann mithilfe einer elektrochemischen Zelle zum spezifischen amperometrischen Nachweis von Bakterien in Gegenwart eines Phagen ermittelt werden. Der amperometrische Sensor mit einem Phagemid detektierte bereits 1 CFU mL<sup>-1</sup> *E. coli* TG1

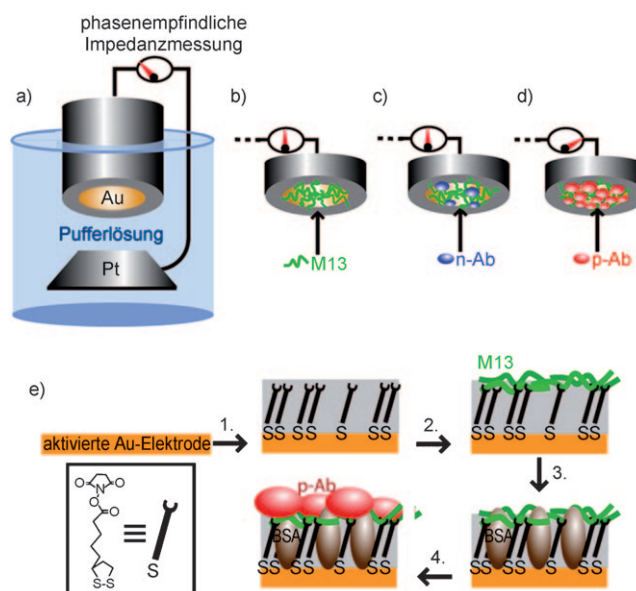
in weniger als 3 h. Indem man sich die ALP-Aktivität zunutze machte, konnte die Empfindlichkeit des Sensors um das 10-fache gegenüber amperometrischen Nachweismethoden mit lysierenden Phagen verbessert werden. Es ist möglich, solche amperometrischen Sensoren zum schnellen Nachweis beliebiger Bakterienstämme zu entwickeln, indem man geeignete Phagen und Reportergene verwendet.<sup>[131]</sup>

### 3.2.4.2. Lichtadressierbare potentiometrische Sensoren

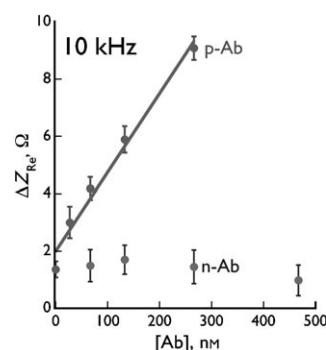
Lichtadressierbare potentiometrische Sensoren (LAPSs) sind Chemo- oder Biosensoren mit einer Elektrolyt-Isolator-Halbleiter-Konfiguration.<sup>[151]</sup> Bei LAPS werden viele Mess-Stellen in die Sensoroberfläche integriert, die einzeln mit einem Lichtstrahl angefahren werden können. Ein Sensor mit unterschiedlich modifizierten Mess-Stellen kann mehrere Analyte nachweisen. LAPS kann genutzt werden, um das extrazelluläre Aktionspotenzial einzelner lebender Zellen unter Reizeinwirkung nachzuverfolgen. Weil Phagen unter den Messbedingungen stabil sind und weniger kosten als Antikörper, können zielspezifische Phagen als Sonden zur Modifizierung von Mess-Stellen in LAPS eingesetzt werden. In solchen LAPS sind spezifische Phagen kovalent an der Oberfläche eines beleuchtbaren  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -Chips verankert. Ein LAPS auf Phagenbasis konnte zwei Analyte in unterschiedlichen Konzentrationen erkennen: hPRL-3 („human phosphatase of regenerating liver-3“) in Konzentrationen von 0.04–400 nM und MDAMB231-Brustkrebs-Zellen in Konzentrationen von  $0\text{--}10^5$  Zellen pro mL.<sup>[135]</sup> Die Zellen ergaben maximale potentiometrische Signale um 10 bzw. 60  $\mu\text{V}$  bei der Bindung an spezifische Phagen auf der Oberfläche des Sensorchips. Derartige LAPSs mit Phagen sind besser für den Nachweis von Krebszellen geeignet als Tests auf Krebsmarker,<sup>[135]</sup> sie könnten zur Früherkennung angewendet werden, um eine effizientere klinische Behandlung zu ermöglichen.

### 3.2.4.3. Elektrochemische Impedanzspektroskopie

Die elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS), eine Untersuchungsmethode für Elektrodengrenzflächen,<sup>[119]</sup> wurde zur Entwicklung von Biosensoren mit Phagen kombiniert (Abbildung 9).<sup>[137, 138, 152, 153]</sup> Eine Schicht von M13-Phagen wurde dabei zunächst unter Bildung einer kovalent gebundenen Virusschicht (covalent virus layer, CVL) auf der Oberfläche einer Goldelektrode verankert.<sup>[152]</sup> Dann wurde die Impedanz dieser CVL-beschichteten Elektrode in Kontakt mit verschiedenen Konzentrationen von Anti-M13-Phage-Antikörpern (p-Ab) in einer Pufferlösung bei Frequenzen zwischen 0.1 und 1 MHz gemessen, um die elektrochemische Antwort der CVL auf p-Ab zu ermitteln. Die Änderung der ohmschen Impedanz ( $\Delta Z_{\text{re}}$ , bezogen auf die Impedanz der ursprünglichen CVL-beschichteten Elektrode) war bei hohen Frequenzen (zwischen 4 und 140 kHz) direkt proportional zur p-Ab-Konzentration in Lösung (Abbildung 10).<sup>[137]</sup> Wurde der nichtbindende Anti-FLAG-M2-Antikörper (n-Ab) als Analyt verwendet, so war  $\Delta Z_{\text{re}}$  praktisch unabhängig von der Antikörperkonzentration. Folglich bietet sich die EIS in Kombination mit Phagen als ein selektives und hoch empfindliches Nachweisverfahren für p-Ab an



**Abbildung 9.** Eine Viruselektrode: Auf einer Au-Scheibenelektrode mit 3 mm Durchmesser sind modifizierte M13-Phagenpartikel kovalent gebunden (Schritte 1–3 in Bildteil (e)). Der Zustand der Elektrode lässt sich anhand ihrer ohmschen Impedanz  $Z_{\text{re}}$  bei hohen Frequenzen (2–500 kHz) gegen eine großflächige Platinelektrode in derselben Pufferlösung bestimmen. Vor der Anlagerung der Phagenpartikel (a) ist  $Z_{\text{re}}$  des Systems bei allen Frequenzen recht gering. b) Eine Virusschicht wurde gemäß der Schritte 1–3 in (e) kovalent an die Goldoberfläche gebunden. Die dadurch erhaltene dichte Phagenschicht isoliert die Goldoberfläche elektrisch von der Pufferlösung. c) Bei Behandlung dieser Viruselektrode mit einem „negativen“ Antikörper (n-Ab, blau) ändert sich weder der Imaginärteil  $Z_{\text{im}}$  der Impedanz noch  $Z_{\text{re}}$ . d) Kontakt mit einem „positiven“ Antikörper (p-Ab, rot), der durch die Phagen selektiv erkannt und gebunden wird, führt zu einem deutlichen Anstieg von  $Z_{\text{re}}$  bei hohen Frequenzen, jedoch nur zu geringen Änderungen von  $Z_{\text{im}}$  bei allen Frequenzen. e) Die Arbeitsschritte bei der Herstellung der Viruselektrode: 1) Auf eine elektrochemisch aktivierte Goldelektrode wird über Thiol-Gold-Bindungen eine selbstorganisierte Monoschicht (SAM) von Liponsäure-N-hydroxysuccinimid (NHS)-Ester aufgebracht. 2) M13-Phagen werden kovalent an die selbstorganisierte Monoschicht geknüpft, indem Amidbindungen zwischen freien Amino-gruppen auf der Oberfläche der Phagen und den aktivierten Carboxy-gruppen aufgebaut werden. 3) Mit BSA werden Lücken in der Monoschicht geschlossen und nicht umgesetzte NHS-Ester entfernt. 4) Fertig ist die Viruselektrode, bereit für den Einsatz in der Analyse!<sup>[136]</sup>



**Abbildung 10.** Änderung der ohmschen Impedanz  $\Delta Z_{\text{re}}$  mit der Konzentration eines Anti-Phage-Antikörpers (p-Ab) und eines nichtbindenden Antikörpers (n-Ab).<sup>[137]</sup>



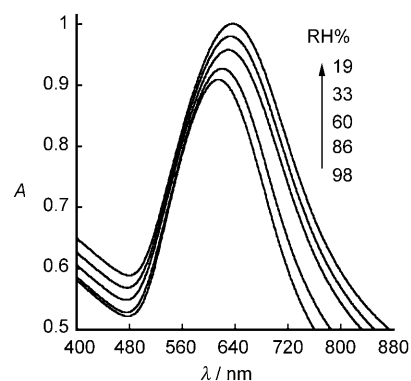
(Abbildung 10). Die Methode liefert außerordentlich reproduzierbare Ergebnisse.<sup>[137]</sup> Wird beim „Biopanning“ das prostata-spezifische Membranantigen (PSMA) als Analyt für M13-Phagen eingesetzt, so kann man einen Phagen identifizieren, der PSMA spezifisch bindet. Ein EIS-Biosensor mit einer CVL aus solchen Phagen eignet sich für den selektiven PSMA-Nachweis.<sup>[136]</sup> Weil zielspezifische Proteine durch Phagendisplays identifiziert und mithilfe von gentechnischen Methoden auf der Oberflächen von Phagen präsentiert werden können, sollten Phagen für EIS-Biosensoren mit höherer Affinität und Spezifität für so gut wie jeden Analyt herstellbar sein.<sup>[154]</sup>

### 3.3. Phagen in Feuchtigkeitssensoren: Anwendungen für Virus-Nanomaterial-Komposite

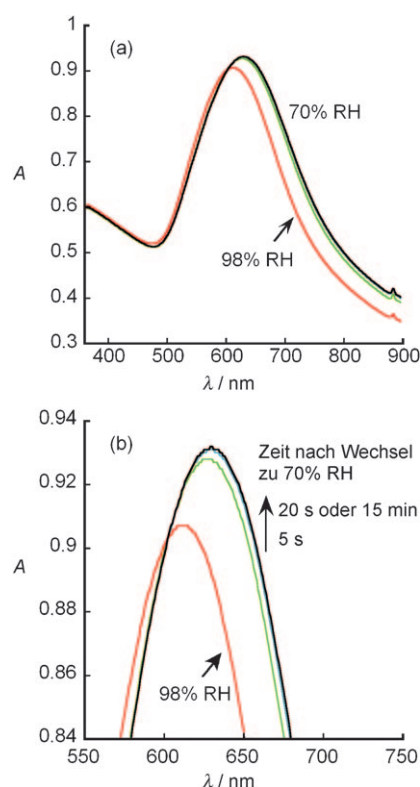
Die lokalisierte SPR an Goldnanopartikeln (AuNPs) kann zur Entwicklung von optischen Sensoren genutzt werden.<sup>[155]</sup> Der Aufbau von Nanopartikelstrukturen an Viren<sup>[23,24,48]</sup> und die schichtweise Abscheidung (layer-by-layer assembly, LBL)<sup>[156–159]</sup> wurden schon zuvor unabhängig voneinander eingesetzt, um Bionanoarchitekturen zu erhalten. Vor kurzem kombinierten wir beide Ansätze zur Fertigung von Nanokompositfilmen aus anionischen AuNPs und kationischen M13-Viren, die gentechnisch so verändert worden waren, dass sie das positiv geladene Peptid tetraArg an der Seitenwand präsentierten.<sup>[160]</sup> Zuerst wurde ein Quarz-Objektträger mit zwei Doppelschichten des Kaliumsalzes von Poly(vinylsulfat) (PVS) als anionischer und Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) (PDDA) als kationischer Komponente beschichtet. Der LBL-Aufbau der Kompositstrukturen gelang anschließend durch abwechselndes Eintauchen des Objektträgers in Lösungen der anionischen AuNPs und der kationischen, tetraArg-modifizierten M13-Phagen für jeweils 30 min. Die SPR-Spektren des so erhaltenen Nanokomposits änderten sich interessanterweise bei wechselnder Luftfeuchtigkeit.<sup>[160]</sup>

Der Gang der SPR-Spektren dieser  $(\text{PVS/PDDA})_2(\text{AuNPs/M13})_4$ -Nanokompositfilme mit der relativen Luftfeuchtigkeit (RH) bei 25 °C ist in Abbildung 11 dargestellt. Eine abnehmende Feuchtigkeit resultierte in einer Rotverschiebung von  $\lambda_{\text{max}}$  des SPR-Spektrums. Diese Verschiebung hing zwischen 19 und 86 % RH näherungsweise linear von der Feuchtigkeit ab. Wurde der Sensor erst feuchter Luft mit 98 % RH und dann Luft mit 70 % RH ausgesetzt, so pendelte sich die Absorbanz des Sensors binnen 20 s auf einen recht stabilen Wert ein (Abbildung 12), und nach 15 min konnten wir keinerlei Änderungen in den SPR-Spektren mehr feststellen. Wir fanden weiterhin, dass der RH-Sensor reversibel war.<sup>[160]</sup> Dieser Film aus gentechnisch modifizierten M13-Phagen und AuNPs mit seinen außergewöhnlichen, feuchtigkeitsabhängigen SPR-Spektren ermöglicht es also, einen spektrophotometrischen Feuchtigkeitssensor auf Phagenbasis zu entwickeln.<sup>[160]</sup>

Die Feuchtigkeitsabhängigkeit der SPR-Spektren dieser Phagen-AuNP-Nanokompositfilme lässt sich erklären, wenn man zwei bekannte Phänomene in Betracht zieht: 1) Die SPR-Spektren der AuNPs sind abhängig vom Partikelab-



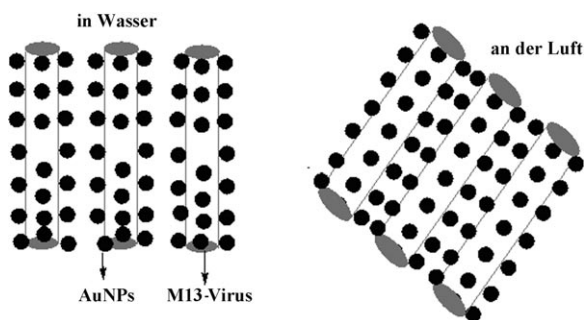
**Abbildung 11.** SPR-Spektren eines mit  $(\text{PVS/PDDA})_2(\text{AuNPs/M13})_4$  beschichteten Quarz-Objektträgers als Funktion der relativen Luftfeuchtigkeit.<sup>[160]</sup>



**Abbildung 12.** Antwortzeit des Feuchtigkeitssensors aus dem  $(\text{PVS/PDDA})_2(\text{AuNPs/arg-M13})_4$ -Film auf einem Quarz-Objektträger. a) SPR-Spektren des Films in Luft mit 98 % RH und zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Übergang in Luft mit 70 % RH. b) Vergrößerter Bereich um die Absorbanzpeaks in (a). Die Werte auf dem Pfeil geben den Zeitpunkt der Spektrenaufnahme nach dem Wechsel von 98 zu 70 % RH wieder.<sup>[160]</sup>

stand, und 2) die Phagenkörper flachen mit abnehmender Feuchtigkeit ab. Bei der LBL-Abscheidung ordnen sich die AuNPs aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen entlang der Phagen an. Beim Trocknen des Phagen-AuNP-Nanokompositfilms an der Luft sinkt der Wassergehalt im Film, und die von AuNPs eingehüllten zylinderförmigen M13-Phagen flachen ab. Dadurch verringerten sich der Abstand

der AuNPs sowohl in vertikaler (für AuNPs ober- und unterhalb eines Zylinders, der auf dem Film liegt) als auch in horizontaler Richtung (für AuNPs, die an zwei benachbarte Zylinder gebunden sind; Abbildung 13). Diese Annäherung



**Abbildung 13.** Unterschiedliches Verhalten des arg-M13/AuNPs-Nanokomposits in Wasser und an der Luft (nicht skaliert). Das stabförmige Virus ist an der Luft teilweise abgeflacht, sodass sich sein Querschnitt von einem Kreis zu einem Oval verändert. Die Seitenwand jedes Virus besteht aus etwa 2700 Kopien des Proteins pVIII, deren Konformation sich beim Abflachen des Virus ebenfalls ändern wird.

der AuNPs verursacht die Rotverschiebung der Absorbanzmaxima in den SPR-Spektren des Films. Umgekehrt erhöht sich der Abstand der AuNPs bei zunehmender Feuchtigkeit wieder, und es kommt zu einer Blauverschiebung in den SPR-Spektren. Der Phagen-AuNP-Nanokompositfilm reagierte empfindlicher auf den Wassergehalt als Composite aus einem amphiphilen Triblockcopolymer und Goldnanostäbchen.<sup>[160]</sup>

#### 4. Andere Viren für Sensoranwendungen

Wie Phagen wurden auch andere Viren, darunter das Tabakmosaikvirus (TMV),<sup>[161]</sup> CCMV (cowpea chlorotic mottle virus),<sup>[162]</sup> RCNMV (red clover necrotic mosaic virus)<sup>[163]</sup> und das Augenbohnenmosaikvirus (CPMV),<sup>[164]</sup> als Template zur Synthese von Nanomaterialien angewendet. Anorganische Materialien können dabei entweder auf der Hülle oder im Inneren von stabförmigen Viren wie TMV abgelagert werden. So wurden 3 nm breite und bis zu 150 nm lange Kupfernanodrähte durch stromlose Abscheidung im kanalförmigen Innenraum von TMV-Partikeln erhalten.<sup>[25]</sup> Auch auf oder in ikosaedrischen Viren wie CCMV können Nanomaterialien aufgebaut werden. Beispielsweise wurden im Inneren von CCMV gezielt anorganische Mineralien und ein organisches Polymer eingelagert, was zur Bildung von Hybridmaterialien führte.<sup>[162]</sup>

Berichte über Anwendungen solcher Viren in Sensoren sind hingegen sehr selten. Mit Palladiumnanopartikeln beschichtete TMV-Viren wurden als Sensormaterial in Wasserstoffsensoren auf der Grundlage akustischer Oberflächenwellen (surface acoustic wave, SAW) vorgeschlagen, die mit Zweitor-SAW-Resonatoren bei 315 MHz arbeiten.<sup>[165]</sup> Die Adsorption und Desorption von Wasserstoff an der Palladium-TMV-Sensorschicht hatten Veränderungen der Wel-

lengeschwindigkeit und der Resonanzfrequenz der Oberflächenwellen zur Folge, die direkt mit der Wasserstoffkonzentration zusammenhingen. Niedrige Wasserstoffkonzentrationen (0,2–2,5 %) ließen sich bei einer Antwortzeit von nur 30 s nachweisen. In diesem Gassensor fungieren die TMVs als Gerüst, das die Palladiumnanopartikel trägt.

Eine Modifizierung dieser Viren liefert neue Hybridmaterialien, die für zukünftige Studien in Sensoren geeignet sein können. Für den Nachweis biologischer Analyte und für Bildgebungsanwendungen können funktionelle Moleküle mit den Viren konjugiert werden. Die Carboxygruppen an der Oberfläche von CPMV-Partikeln lassen sich beispielsweise mit ansprechbaren Gruppen modifizieren.<sup>[166]</sup> So kann der Fluoreszenzfarbstoff *N*-Cyclohexyl-*N'*-[4-(dimethylamino)naphthyl]carbodiimid angehängt werden, oder es können ungefähr 180 redoxaktive Methyl(aminopropyl)viologen-Gruppen an die Oberfläche eines Viruspartikels geknüpft werden. Solche Konstrukte können zur Entwicklung neuartiger Elektronenüberträger in der Redoxkatalyse, in Biosensoren und in der Nanoelektronik von Nutzen sein.<sup>[166]</sup> Außerdem konnten Fluoreszenzfarbstoffe an die Untereinheiten von CPMV angebracht werden; dies führte zu Viruspartikeln, die Fluoreszenzfarbstoff-Moleküle in hoher Dichte auf ihrer Oberfläche präsentieren.<sup>[164]</sup> Solchermaßen modifizierte Viren eignen sich für die Bildgebung tiefliegender Gewebe in lebenden Organismen. Die fluoreszenzmarkierten CPMVs zeigen kein erkennbares Löschen, sodass sie als sehr helle Partikel eine hochauflösende Bildgebung des Gefäßendothels über Zeiträume von 72 h oder mehr ermöglichen könnten. Sie haben sich bereits bei der Abbildung der Blutgefäße und des Blutflusses in lebenden Mäusen und Hühnerembryos bei Eindringtiefen bis 500  $\mu\text{m}$  bewährt.<sup>[164]</sup>

Vor kurzem wurden auf der Hülle von stabförmigen TMVs leitfähige Polymere wie Polyanilin aufgewachsen.<sup>[167]</sup> Auf diesem Weg gelang es, Polyanilin-Nanodrähte einheitlicher Größe herzustellen. Zwar wurden solche Virus-Polymer-Komposite noch nicht in Biosensoren geprüft, doch weil leitfähige Polymere als Materialien für (Bio)Sensoren gut etabliert sind,<sup>[168–170]</sup> sollten auch sie für den Einsatz in neuartigen Sensoren geeignet sein. Es ist überdies vorstellbar, auch andere funktionelle molekulare oder Nanomaterialien mit Viren zu verknüpfen und dann mit modernen analytischen Methoden in leistungsfähigen Sensoren zu kombinieren.

Nanopartikel (NPs), Quantenpunkte (QDs), Nanodrähte und Nanoröhren bieten sich wegen ihrer außergewöhnlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften<sup>[171–175]</sup> als aktive Komponenten oder Sensormaterialien in empfindlichen Sensoren an.<sup>[144,176,177]</sup> AuNPs können selektiv an die Enden von TMV gebunden werden, wodurch Gold-Virus-Gold-Hanteln entstehen.<sup>[26]</sup> Die selektive Anlagerung von AuNPs an die Viren deutet auf Anwendungsmöglichkeiten solcher Composite in Sensoren hin. Dafür spricht auch die Entwicklung kolorimetrischer Biosensoren durch die Anordnung von Nanopartikeln mithilfe von Nucleinsäureenzymen.<sup>[178]</sup>

Die Erforschung der physikalischen und chemischen Eigenschaften von Virus-Nanomaterial-Kompositen kann den Weg zu neuartigen Sensoren bereiten. Dieses noch uner-

forschte Gebiet kann von den erfolgreichen Arbeiten zu Sensoren auf Phagenbasis profitieren, denn ähnlich wie Phagen lassen sich auch andere Viren gentechnisch in einer Weise modifizieren, dass sie ein bestimmtes Peptid oder Protein auf ihrer Oberfläche präsentieren und Komposite mit anderen Nanomaterialien bilden können. Weiterhin können anorganische Nanomaterialien dem Komposit physikalische oder chemische Eigenschaften verleihen, die nach der Bindung eines Analyts in einem messbaren Signal resultieren. Medintz et al. haben Methoden beschrieben, um lumineszierende QDs über eine Biotin-Avidin-Verknüpfung an CPMV zu kuppeln.<sup>[179]</sup> An die Lysinreste auf der Oberfläche der CPMVs wurden Biotingruppen angebracht, und die so erhaltenen Konjugate wurden anschließend über Neutravidin-Biotin-Wechselwirkungen auf einem Substrat verankert. Die freien Biotingruppen an der Oberfläche der verankerten CPMV konnten daraufhin QDs anlagern, die einerseits Avidin und andererseits ein zweites Protein, z. B. das Maltose bindende Protein, trugen.<sup>[179]</sup> Solche Virus-QD-Konjugate könnten beim Maltose-Nachweis zur Anwendung kommen.

Kürzlich wurden auch behüllte Viren bei der Entwicklung neuartiger Nanomaterialien für Biosensoren genutzt.<sup>[180–184]</sup> So kann ein lipidumhülltes Rubella-Virus (RV) an die Oberfläche seiner Wirtszellen binden und nach der Endozytose mit der Endosomenmembran fusionieren. Das RV-Membranprotein E1, das einen Komplex mit E2, einem weiteren äußeren Membranprotein von RV, bildet, vermittelt die Bindung und den Fusionsprozess. Die Fusionsfähigkeit des E1-Proteins wird durch einen niedrigen pH-Wert aktiviert. RV ohne Virusgenom, so genannte Rubella-ähnliche Partikel (rubella-like particles, RLPs), können verwendet werden, um LBL-Kolloide zu funktionalisieren.<sup>[184]</sup> Dabei wird ein Kolloidkern zunächst durch einen LBL-Prozess mit mehreren Polyelektrolytschichten umhüllt, und dann wird auf diese Polyelektrolytschicht eine Lipiddoppelschicht aufgesetzt. Die resultierenden Teilchen werden bei niedrigem pH-Wert mit RLPs umgesetzt, die mit den Lipiddoppelschichten fusionieren. Die RLPs werden erst elektrostatisch an die Lipiddoppelschicht angelagert und dann mit dieser fusioniert, wobei die RV-Hüllproteine E1 und E2 zugänglich an der Oberfläche verbleiben. Nach Entfernen des Kolloidkerns entsteht eine Kapsel, die die Virusproteine auf der Oberfläche präsentiert. Diese Strategie lässt sich anwenden, um virusbeschichtete LBL-Kolloide für den quantitativen Nachweis mehrerer virusspezifischer Antikörper in Suspension zu erhalten.<sup>[182]</sup> Echte Viren (Chimären oder Wildtyp) wie Baculoviren sowie Influenza-A-Viren wurden an farbkodierten, mit einer Lipiddoppelschicht überzogenen Kügelchen angebracht, um virusspezifische Antikörper in einer flusszytometrischen Analyse einzufangen und zu quantifizieren. Eine Immunfluoreszenz zeigte die spezifische Bindung zwischen den auf der Kügelchenoberfläche präsentierten Viren und den gewünschten Antikörpern an. Mithilfe dieser Technik war es möglich, Primärantikörper in bis zu  $10^5$ -facher Verdünnung nachzuweisen. Die Methode könnte mit ELISA bei der schnellen Analyse virusspezifischer Antikörper konkurrieren,<sup>[182]</sup> beispielsweise beim Nachweis schwerwiegender viraler Infektionen in Menschen.

## 5. Perspektiven für den Einsatz von Viren in Sensoren

Sensoren auf Virusbasis wurden in den vergangenen Jahren intensiv erforscht und haben durch die allgemeinen Fortschritte der Nanotechnologie noch an Reiz gewonnen. Die noch immer häufigste Anwendung ist die Phagen-basierte Sensorik, vor allem weil selektive Chemo- und Biosensoren mithilfe von Phagendisplays und durch gentechnische Modifizierung der Phagen mit einem zielspezifischen Motiv erhältlich sind. Zunehmend häufiger wird auch die Anwendung von Viren als Template für Nanomaterialien und in Biosensoren. Wenn es darum geht, Chemo- und Biosensoren mit verbesserter Empfindlichkeit und Selektivität für Echtzeitmessungen zu entwickeln, verdienen unserer Meinung nach die folgenden drei Gebiete stärkere Beachtung: 1) die Kombination von Viren mit neuen analytischen Methoden und der Einbau in Mikro- und Nanofunktionseinheiten, 2) die Entwicklung und die Anwendung virusähnlicher Nanomaterialien (VLNs) und 3) der Einsatz selbstorganisierter supramolekularer Strukturen aus Viren und Nanomaterialien.

### 5.1. Kombination von Viren mit neuen analytischen Methoden und ihr Einbau in Mikro- und Nanofunktionseinheiten

Viren als solche können keine vollständigen Sensoren darstellen, aber sie eignen sich als Schlüsselkomponenten wie Sonden. Dank aufstrebender Techniken wie On-chip- und Mikrofluidik-Verfahren sowie der enormen Fortschritte in der Mikro- und Nanofabrikation können Viren nun als Sonden in neuartige Analysesysteme integriert werden. Beispielsweise wurde durch Kombination eines konventionellen Ringresonators mit einem Mikrofluidiksystem ein optofluidischer Ringresonator (OFRR) für den Echtzeitnachweis von Biomolekülen entwickelt.<sup>[185]</sup> Bei der Umsetzung dieses Konzepts wurde ein filamentöser Phage, der das Streptavidin bindende Peptid auf der Seitenwand präsentierte, chemisch an der Innenwand der mikrofluidischen Kapillare verankert. Wellenleitermoden (waveguide modes, WGMs) kreisen um den Kanal herum, d. h. um die Resonatoroberfläche. Das evaneszierende Feld der resonanten WGMs kann in die mikrofluidischen Kanäle hineinreichen und mit dem Analyt (im Beispiel Streptavidin) wechselwirken, der im Kanal spezifisch an die Phagen gebunden ist, die ihrerseits an der Kanalwand verankert sind. Diese Wechselwirkung zwischen dem evaneszierenden Feld der resonanten WGMs und dem gebundenen Analyt liefert ein erfassbares Signal (eine Verschiebung im WGM-Spektrum), sodass es möglich ist, einen Analyt ohne radioaktive oder fluoreszierende Markierung nachzuweisen. In OFRRs kreisen Photonen viele Male um den Ringresonator herum, was die Wechselwirkung zwischen der evaneszierenden Welle und dem oberflächengebundenen Analyt (dem phagegebundenen Streptavidin) – und somit auch die Empfindlichkeit der Methode – stark erhöht. Ein OFRR mit Phagen hatte eine Nachweisgrenze um 100 pM für Streptavidin und einen  $K_d$ -Wert von 25 pM.<sup>[185]</sup> Weil es leicht ist, zielspezifische Phagen mithilfe von Phagendisplays zu

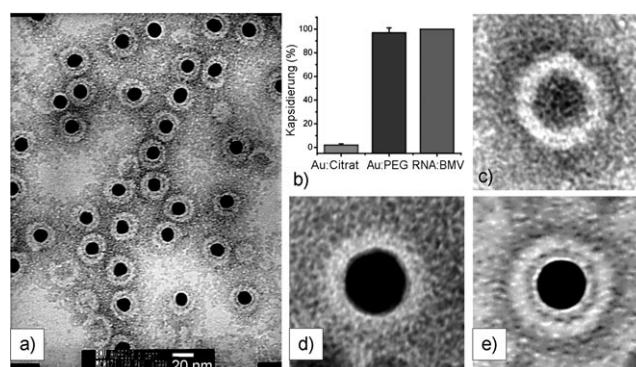


erhalten, sollte sich der Anwendungsbereich solcher OFRR-Biosensoren auf weitere Biomoleküle ausdehnen lassen und hoch empfindliche, kostengünstige und selektive Systeme liefern.

Viren können als Template Nanomaterialien mit verschiedenen Funktionen anordnen, beispielsweise magnetische und metallische Nanopartikel oder Quantenpunkte (Abbildung 4). Die Virus-Nanomaterial-Komposite sind vielversprechende Bausteine für Mikro- oder Nanofunktionseinheiten. Als Vorteile dieser Komposite sind ihre definierte Größe und Form zu nennen, die bei Anwendung synthetischer Template nicht erreichbar sind. Beispielsweise wurden kürzlich Platinnanopartikel auf der Oberfläche von stabförmigen TMVs gebildet.<sup>[186]</sup> Diese Virus-Nanopartikel-Nanodrähte wurden genutzt, um Lücken zwischen zwei Elektroden in mikroelektronischen Funktionseinheiten zu überbrücken. Ein Gedächtniseffekt der mit Pt-Nanopartikeln beschichteten TMVs ließ sich zur Entwicklung eines Speichermediums einsetzen. Dieser Effekt resultiert aus einem Ladungseinfang durch die Nanopartikel, die entlang des TMV angeordnet sind, und aus einem Elektronentunneln zwischen den Nanopartikeln.<sup>[186]</sup> Diese Arbeit zeigt, wie Virus-Nanopartikel-Komposite in Mikro- und Nanofunktionseinheiten integriert werden können, um Sensoren zu erhalten, deren Funktion auf den elektronischen Eigenschaften des Komposits beruht. Wird überdies der M13-Phage verwendet, so hat man die Möglichkeit, seine Enden mit Proteinen zu versehen, die bestimmte Materialien spezifisch erkennen (Abbildung 1). Solche Virus-Nanomaterial-Konstrukte lassen sich gezielt platzieren, z.B. zwischen zwei Elektroden, die durch Elektronenstrahlolithographie erzeugt wurden.

### 5.2. Entwicklung und Anwendung virusähnlicher Nanomaterialien

Viren wie die M13- oder T7-Phagen sind vereinfacht als Nucleinsäuren (DNA oder RNA) mit einer Proteinhülle zu betrachten. Zwischen der Nucleinsäure im Inneren und der Proteinhülle wirken elektrostatische Kräfte, und die Hülle besteht aus vielen Kopien der Proteine. Man könnte sagen, dass die Viruspartikel durch Anordnung der Proteine um das Nucleinsäure-Templat entstehen, wobei elektrostatische Wechselwirkungen als Triebkraft wirken. Ersetzt man nun die Nucleinsäure in einem Virus durch anorganische Nanokügelchen, Nanostäbe oder Nanodrähte, deren Oberfläche in einer Weise funktionalisiert ist, dass sie hinsichtlich der elektrostatischen Eigenschaften die Nucleinsäure nachahmen, so resultiert ein virusähnliches Nanomaterial (VLN) aus einem analogen, elektrostatisch getriebenen Selbstorganisationsprozess. Um solche VLN aufzubauen, benötigt man das gereinigte virale Protein des Viruspartikels. Die Selbstorganisation solcher viraler Proteine um Nanopartikel-Template unter Bildung von virusähnlichen Partikeln gelang vor kurzem.<sup>[163,187–191]</sup> Beispielsweise kann das Hüllprotein des Trespenmosaikvirus (brome mosaic virus, BMV) ein funktionalisiertes AuNP als Kern eines VLP umgeben (Abbildung 14).<sup>[188]</sup> Die funktionalisierten AuNPs ahmten dabei die



**Abbildung 14.** a) TEM-Bilder von negativ angefärbten virusähnlichen Partikeln aus funktionalisierten AuNPs (schwarze Kerne, 12 nm Durchmesser) und dem BMV-Kapsidprotein. b) Vergleich der Ausbeuten bei der Einlagerung von Gold-Citrat- und Gold-TEG-Nanopartikeln sowie nativer RNA im Kapsid. c–e) Gemittelte TEM-Bilder von leerem BMV-Kapsid (c), VLP mit citratbeschichteten NPs (d) und VLP mit TEG-beschichteten NPs (e) (jeweils konstruiert durch Überlagerung von zehn Einzelbildern).<sup>[188]</sup>

elektrostatischen Eigenschaften der Nucleinsäure im nativen Virus nach und lösten die Umhüllung durch die Proteine aus.<sup>[188]</sup> Auf diesem Weg sind VLN erhältlich, die zielspezifische Peptide oder Proteine auf ihrer Oberfläche tragen.<sup>[163]</sup> Überdies ließen sich funktionalisierte magnetische Nanokügelchen auch dann von viralen Proteinen umschließen, wenn sie größer waren als der Hohlraum im nativen Kapsid des BMV.<sup>[192]</sup> Vor kurzem konnten Petrenko et al. nachweisen, dass ein durch Phagendisplay selektiertes zielspezifisches Hüllprotein auf einer Liposomenoberfläche präsentiert werden kann,<sup>[193]</sup> somit sollten entsprechende zielspezifische Proteine auch auf der Oberfläche von Nanopartikeln präsentiert werden können.

### 5.3. Selbstorganisierte supramolekulare Strukturen aus Viren und Nanomaterialien

Es ist bekannt, dass stabförmige Viren wegen ihrer einheitlichen Größe und ihrer Anisotropie dreidimensionale lyotrope Flüssigkristalle bilden können,<sup>[23,24,48,194]</sup> wohingegen kugelförmige Viren wegen ihrer einheitlichen Größe und gleichmäßigen Form zweidimensionale Übergitter aufbauen.<sup>[166,195,196]</sup> Die Ordnung dieser zwei- oder dreidimensionalen Virenmuster lässt sich auf anorganische Nanomaterialien übertragen, indem beispielsweise Nanopartikel auf der Oberfläche von stabförmigen Viren oder im Inneren ikosaedrischer Viren angeordnet wurden. Auch ein Komposit aus einem stabförmigen Virus und Nanopartikeln kann einen dreidimensionalen Flüssigkristall ergeben, der nach dem Verdampfen des Lösungsmittels einen freitragenden Film zurücklässt (Abbildung 5).<sup>[48]</sup> Die auf diese Weise zugänglichen freitragenden supramolekularen Materialien aus Viren oder deren Kompositen mit Nanomaterialien wurden unseres Wissens noch nicht in Sensoranwendungen erprobt. Vor kurzem kamen selbstorganisierte Virus-Nanopartikel-Komposite in einer Lithiumionen-Batterie mit verbesserter Leis-

tungsfähigkeit zum Einsatz, was die Bedeutung dieser Materialien für elektrochemische Funktionseinheiten belegt.<sup>[197]</sup>

Nanopartikel, Nanodrähte und Nanoröhren wurden bereits erfolgreich in Sensoren eingesetzt.<sup>[198,199]</sup> Die Anwendung supramolekularer Strukturen aus zielspezifischen Viren und einem oder mehreren dieser Nanomaterialien in Chemo- und Biosensoren sollte daher auch geprüft werden. In freitragenden supramolekularen Strukturen (Filme oder Festkörper) aus zielspezifischen Viren und funktionellen Nanomaterialien können viele physikalische Phänomene auftreten, da die Nanomaterialien individuelle und kollektive Eigenschaften aufweisen wie Elektronentunneln (wenn sich Halbleiternanopartikel in engem Kontakt befinden) oder Oberflächenplasmonenresonanz (wenn Metallnanopartikel sich nahe beieinander befinden). Ob die Spezifität der Viren mit den physikalischen Eigenschaften der Nanomaterialien vorteilhaft vereint werden kann, wird sich zeigen, wenn die Kompositmaterialien bei der Entwicklung spezifischer und empfindlicher Sensoren getestet werden.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Viren sind bereits mehrfach zur Entwicklung von Chemo- und Biosensoren genutzt worden, wobei die Verwendung von Phagen am erfolgreichsten war. Nichtlysierende Phagen wie der M13-Phage können mithilfe etablierter Phagendisplay-Techniken so verändert werden, dass sie zielspezifische Peptide oder Proteine (für beliebige Analyte) präsentieren. Lysierende Phagen können Bakterien spezifisch abtöten und dadurch Zellmarker freisetzen, anhand derer die Bakterien dann nachgewiesen werden. Im Zusammenhang mit Sensoren können Phagen in viererlei Weise eingesetzt werden: Erstens können zielspezifische Peptide oder Proteine in einer Peptid-/Protein-Bibliothek im Phagendisplayformat entdeckt und als Sonde eingesetzt werden. Zweitens kann auch der Phage, der die zielspezifischen Peptide oder Proteine präsentiert, direkt als Sonde dienen. Drittens können lysierende Phagen Bakterien spezifisch abtöten und dadurch Zellmarker für den Nachweis der Bakterien freisetzen. Viertens können Phagen als Gerüstmaterial wirken, das funktionelle Moleküle oder andere Nanomaterialien für die Anwendung in Sensoren anordnet. Um einen funktionsfähigen Sensor zu erhalten, müssen Phagen, mithilfe von Phagendisplays selektierte Proteine oder Phagen-Nanomaterial-Komposite mit Analysesystemen gekoppelt werden, die ein Ausgabesignal erzeugen können.

Sensoren mit anderen Viren als Phagen wurden bisher kaum erforscht, doch es erscheint möglich, dass weitere Beispiele folgen werden, sobald es gelingt, solche Viren auf chemischem Weg mit funktionellen Molekülen zu konjugieren oder mit anorganischen Nanomaterialien zu kombinieren, die über besondere physikalische (optische, elektronische oder magnetische) Eigenschaften verfügen. Solche Komposite, denen ihre Spezifität durch ein zielspezifisches Protein auf dem Kapsid vermittelt wird, könnten dann als Sensor- oder Signalwandler-Material dienen.

Weitere Perspektiven bieten die Kombination von Viren mit neuen Analysesystemen und der Einbau in Mikro- oder

Nanofunktionseinheiten, die Entwicklung virusähnlicher Nanomaterialien und die Anwendung freitragender supramolekularer Strukturen aus zielspezifischen Viren und funktionellen Nanomaterialien. Auf der Suche nach neuen Ideen für Sensormaterialien und -prinzipien könnte man sich auch biologische Prozesse zum Vorbild nehmen, etwa die Bindung und Fusion behüllter Viren an der Zellmembran. Biosensoren mit einer solchen biomimetischen Strategie können die zielspezifischen Erkennungsprozesse echter Viren und die funktionellen Eigenschaften von Nanomaterialien vereinen. Sensoren auf Virusbasis werden zu neuen Strategien für einen schnellen, selektiven und empfindlichen Nachweis von Chemikalien, Explosivstoffen, Proteinen, Bakterien, Sporen, Viren und Toxinen in der chemischen Analytik, der Nahrungsmittelindustrie, der medizinischen Diagnostik, der Umweltüberwachung und bei der Bekämpfung des Bioterrorismus führen.

*Wir danken der National Science Foundation, den Department of Defense Congressionally Directed Medical Research Programs, den National Institutes of Health und dem Oklahoma Center for the Advancement of Science and Technology für finanzielle Unterstützung.*

Eingegangen am 14. Januar 2009

Online veröffentlicht am 7. August 2009

Übersetzt von Dr. Volker Jacob, Mannheim

- [1] A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson in *Biosensors: Fundamentals and Applications* (Hrsg.: A. P. F. Turner), Oxford University Press, Oxford, **1987**, S. 770.
- [2] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 121.
- [3] A. P. F. Turner, *Science* **2000**, *290*, 1315.
- [4] I. Willner, *Science* **2002**, *298*, 2407.
- [5] J. I. Steinfeld, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1998**, *49*, 203.
- [6] J. Yinon, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 292.
- [7] A. H. Diercks, A. Ozinsky, C. L. Hansen, J. M. Spotts, D. J. Rodriguez, A. Aderem, *Anal. Biochem.* **2009**, *386*, 30.
- [8] P. H. Tsou, C. K. Chou, S. Saldana, M. C. Hung, J. Kameoka, *Nanotechnology* **2008**, *19*, 445714.
- [9] Z. Gagnon, S. Senapati, J. Gordon, H.-C. Chang, *Electrophoresis* **2008**, *29*, 4808.
- [10] Q. Guo, X. Yang, K. Wang, W. Tan, W. Li, H. Tang, H. Li, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e20.
- [11] V. Brower, *J. Natl. Cancer Inst.* **2009**, *101*, 11.
- [12] A. Gokarna, L. H. Jin, J. S. Hwang, Y. H. Cho, Y. T. Lim, B. H. Chung, S. H. Youn, D. S. Choi, J. H. Lim, *Proteomics* **2008**, *8*, 1809.
- [13] B. R. Panda, A. K. Singh, A. Ramesh, A. Chattopadhyay, *Langmuir* **2008**, *24*, 11995.
- [14] P. G. Luo, F. J. Stutzenberger, *Adv. Appl. Microbiol.* **2008**, *63*, 145.
- [15] R. I. MacCuspie, N. Nuraje, S.-Y. Lee, A. Runge, H. Matsui, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 887.
- [16] X. Cheng, G. Chen, W. R. Rodriguez, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 487.
- [17] S. Tang, M. Moayeri, Z. Chen, H. Harma, J. Zhao, H. Hu, R. H. Purcell, S. H. Leppla, I. K. Hewlett, *Clin. Vaccine Immunol.* **2009**, *16*, 408.
- [18] R. C. She, R. J. Durrant, C. A. Petti, *Am. J. Clin. Pathol.* **2009**, *131*, 81.
- [19] D. A. Henderson, *Science* **1999**, *283*, 1279.

- [20] Y. Cui, Q. Wei, H. Park, C. M. Lieber, *Science* **2001**, 293, 1289.
- [21] L. J. Blum, P. R. Coulet, *Biosensor Principles and Applications*, CRC, Boca Raton, **1991**.
- [22] L. Gorton, *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*, Elsevier, Dordrecht, **2005**.
- [23] C. B. Mao, C. E. Flynn, A. Hayhurst, R. Sweeney, J. Qi, B. Iverson, G. Georgiou, A. M. Belcher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 6946.
- [24] C. B. Mao, D. J. Solis, B. D. Reiss, S. T. Kottmann, R. Y. Sweeney, A. Hayhurst, G. Georgiou, B. Iverson, A. M. Belcher, *Science* **2004**, 303, 213.
- [25] S. Balci, A. M. Bittner, K. Hahn, C. Scheu, M. Knez, A. Kadri, C. Wege, H. Jeske, K. Kern, *Electrochim. Acta* **2006**, 51, 6251.
- [26] S. Balci, K. Noda, A. Bittner, A. Kadri, C. Wege, H. Jeske, K. Kern, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 3210; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 3149.
- [27] R. A. Vega, D. MasPOCH, K. Salaita, C. A. Mirkin, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 6167; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6013.
- [28] M. R. A. Carrera, G. F. Kaufmann, J. M. Mee, M. M. Meijler, G. F. Koob, K. D. Janda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 10416.
- [29] E. W. Kovacs, J. M. Hooker, D. W. Romanini, P. G. Holder, K. E. Berry, M. B. Francis, *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 1140.
- [30] G. R. Souza, D. R. Christianson, F. I. Staquicini, M. G. Ozawa, E. Y. Snyder, R. L. Sidman, J. H. Miller, W. Arap, R. Pasqualini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 1215.
- [31] C. Wu, H. Barnhill, X. Liang, Q. Wang, H. Jiang, *Opt. Commun.* **2005**, 255, 366.
- [32] V. A. Petrenko, I. B. Sorokulova, *J. Microbiol. Methods* **2004**, 58, 147.
- [33] N. L. Goicochea, M. De, V. M. Rotello, S. Mukhopadhyay, B. Dragnea, *Nano Lett.* **2007**, 7, 2281.
- [34] V. A. Petrenko, *Expert Opin. Drug Delivery* **2008**, 5, 825.
- [35] G. P. Smith, V. A. Petrenko, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 391.
- [36] C. F. Barbas, D. R. Burton, J. K. Scott, *Phage Display, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **2001**.
- [37] S. S. Sidhu, *Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery*, CRC, Boca Raton, **2005**.
- [38] T. Clackson, H. B. Lowman, *Phage Display: a Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, **2004**.
- [39] S. McGrath, D. v. Sinderen, *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*, Horizon Scientific Press, **2007**.
- [40] J. R. Harris, R. W. Horne, *Electron Microscopy of Proteins: Viral Structure*, Academic Press, New York, **1986**.
- [41] T. E. Waddell, K. Franklin, A. Mazzocco, A. M. Kropinski, R. P. Johnson, *Methods Mol. Biol.* **2009**, 501, 293.
- [42] J. Chen, R. P. Novick, *Science* **2009**, 323, 139.
- [43] J. M. Hooker, E. W. Kovacs, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3718.
- [44] D. A. Kuzmanovic, I. Elashvili, C. Wick, C. O'Connell, S. Krueger, *Structure* **2003**, 11, 1339.
- [45] C.-M. Liu, Q. Jin, A. Sutton, L. Chen, *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 1054.
- [46] M. B. Irving, O. Pan, J. K. Scott, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 314.
- [47] B. Cao, C. B. Mao, *Biomacromolecules* **2009**, 10, 555.
- [48] S. W. Lee, C. B. Mao, C. E. Flynn, A. M. Belcher, *Science* **2002**, 296, 892.
- [49] V. A. Petrenko, G. P. Smith in *Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery* (Hrsg.: S. Sidhu), CRC, Taylor & Francis, Boca Raton, **2005**, S. 714.
- [50] S. Modali, G. Abbineni, P. Jayanna, V. Petrenko, C. B. Mao, *Nanotechnology 2008: Life Sciences, Medicine & Bio Materials*, Vol. 2, CRC, Boca Raton, **2008**, S. 465.
- [51] V. A. Petrenko, G. P. Smith, X. Gong, T. Quinn, *Protein Eng.* **1996**, 9, 797.
- [52] C. E. Flynn, C. B. Mao, A. Hayhurst, J. Williams, G. Georgiou, B. Iverson, A. M. Belcher, *J. Mater. Chem.* **2003**, 13, 2414.
- [53] G. A. Kuzmicheva, P. K. Jayanna, I. B. Sorokulova, V. A. Petrenko, *Protein Eng. Des. Sel.* **2009**, 22, 9.
- [54] B. A. Katz, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, 26, 27.
- [55] J. W. Kehoe, B. K. Kay, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 4056.
- [56] A. Fernandez-Gacio, M. Uguen, J. Fastrez, *Trends Biotechnol.* **2003**, 21, 408.
- [57] L. G. Barrientos, J. M. Louis, A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.* **2001**, 149, 154.
- [58] Z. Dogic, S. Fraden, *Phys. Rev. Lett.* **1997**, 78, 2417.
- [59] V. A. Petrenko, V. J. Vodyanoy, *J. Microbiol. Methods* **2003**, 53, 253.
- [60] D. Larocca, M. A. Burg, K. Jensen-Pergakes, E. P. Ravey, A. M. Gonzalez, A. Baird, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2002**, 3, 45.
- [61] J. R. Brigati, V. A. Petrenko, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 382, 1346.
- [62] E. Fukusaki, T. Nakanishi, K. Ogawa, A. Kogayashi, *Electrochemistry* **2001**, 69, 966.
- [63] L. Olofsson, J. Ankarloo, P. O. Andersson, I. A. Nicholls, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 661.
- [64] F. N. Dultsev, R. E. Speight, M. T. Fiorini, J. M. Blackburn, C. Abell, V. P. Ostanin, D. Klenerman, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 3935.
- [65] E. Uttenthaler, M. Schraml, J. Mandel, S. Drost, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16, 735.
- [66] E. V. Olsen, I. B. Sorokulova, V. A. Petrenko, I.-H. Chen, J. M. Barbaree, V. J. Vodyanoy, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21, 1434.
- [67] V. Nanduri, I. B. Sorokulova, A. M. Samoylov, A. L. Simonian, V. A. Petrenko, V. Vodyanoy, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 986.
- [68] E. V. Olsen, J. Sykora, I. Sorokulova, W. Neely, V. Petrenko, I.-H. Chen, J. Barbaree, V. Vodyanoy, *ECS Trans.* **2007**, 2, 9.
- [69] J. Decker, K. Weinberger, E. Prohaska, S. Hauck, C. Kosslinger, H. Wolf, A. Hengerer, *J. Immunol. Methods* **2000**, 233, 159.
- [70] G. Z. Sauerbrey, *Physics* **1959**, 155, 206.
- [71] A. M. Hutchinson, *Mol. Biotechnol.* **1995**, 3, 47.
- [72] J. Ngeh-Ngwainbi, A. A. Suleiman, G. G. Guilbault, *Biosens. Bioelectron.* **1990**, 5, 13.
- [73] N. Schmitt, L. Tessier, H. Watier, F. Patat, *Sens. Actuators B* **1997**, 43, 217.
- [74] H. Muramatsu, K. Kajiwarra, E. Tamiya, I. Karube, *Anal. Chim. Acta* **1986**, 188, 257.
- [75] M. Plomer, G. G. Guilbault, B. Hock, *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, 14, 230.
- [76] D. Ivnitiski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, E. Wilkins, *Biosens. Bioelectron.* **1999**, 14, 599.
- [77] S. T. Pathirana, J. Barbaree, B. A. Chin, M. G. Hartell, W. C. Neely, V. Vodyanoy, *Biosens. Bioelectron.* **2000**, 15, 135.
- [78] Y. S. Fung, Y. Y. Wong, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5302.
- [79] R. D. Vaughan, C. K. O'Sullivan, G. G. Guilbault, *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, 29, 635.
- [80] J. Brigati, D. D. Williams, I. B. Sorokulova, V. Nanduri, I.-H. Chen, C. L. Turnbough, Jr., V. A. Petrenko, *Clin. Chem.* **2004**, 50, 1899.
- [81] I. Ben-Dov, I. Willner, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3506.
- [82] B. Koenig, M. Graetzel, *Anal. Lett.* **1993**, 26, 1567.
- [83] Z. Shen, M. Huang, C. Xiao, Y. Zhang, X. Zeng, P. G. Wang, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 2312.
- [84] S. Susmel, C. K. O'Sullivan, G. G. Guilbault, *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, 27, 639.
- [85] J. M. Abad, F. Pariente, L. Hernández, E. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta* **1998**, 368, 183.
- [86] A. J.-C. Eun, L. Huang, F.-T. Chew, S. F.-Y. Li, S.-M. Wong, *Phytopathology* **2002**, 92, 654.
- [87] O. Tamarin, C. Déjous, D. Rebière, J. Pistré, S. Comeau, D. Moynet, J. Bezian, *Sens. Actuators B* **2003**, 91, 275.
- [88] V. A. Petrenko, G. P. Smith, *Protein Eng.* **2000**, 13, 589.



- [89] H. Houshmand, G. Fröman, G. Magnusson, *Anal. Biochem.* **1999**, 268, 363.
- [90] W. S. Tan, G. H. Tan, K. Yusoff, H. F. Seow, *J. Clin. Virol.* **2005**, 34, 35.
- [91] M. D. Sheets, P. Amersdorfer, R. Finnern, P. Sargent, E. Lindqvist, R. Schier, G. Hemingsen, C. Wong, J. C. Gerhart, J. D. Marks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6157.
- [92] K. Charlton, W. J. Harris, A. J. Porter, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16, 639.
- [93] A. M. Samoylova, T. I. Samoylova, S. T. Pathirana, L. P. Globa, V. J. Vodyanoy, *J. Mol. Recognit.* **2002**, 15, 197.
- [94] L. C. Shriver-Lake, C. R. Taft, F. S. Ligler, *J. AOAC Int.* **2004**, 87, 1498.
- [95] G. C. Paoli, *ACS Symp. Ser.* **2006**, 931, 41.
- [96] A. Hengerer, C. Kosslinger, J. Decker, S. Hauck, I. Queitsch, H. Wolf, S. Dubel, *BioTechniques* **1999**, 26, 956.
- [97] V. Nanduri, A. M. Samoylova, V. Petrenko, V. Vodyanoy, A. L. Simonian in *206th Meeting of The Electrochemical Society*, Honolulu (USA), **2004**.
- [98] K. M. Marks, M. Rosinov, G. P. Nolan, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 347.
- [99] L. Goodridge, J. Chen, M. Griffiths, *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, 47, 43.
- [100] L. Goodridge, J. Chen, M. Griffiths, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 1397.
- [101] M. Loessner, M. Rudolf, S. Scherer, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63, 2961.
- [102] E. R. Goldman, M. P. Pazirandeh, P. T. Charles, E. D. Balighian, G. P. Anderson, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 457, 13.
- [103] E. R. Goldman, A. Hayhurst, B. M. Lingerfelt, B. L. Iverson, G. Georgiou, G. P. Anderson, *J. Environ. Monit.* **2003**, 5, 380.
- [104] E. R. Goldman, M. P. Pazirandeh, J. M. Mauro, K. D. King, J. C. Frey, G. P. Anderson, *J. Mol. Recognit.* **2000**, 13, 382.
- [105] X. Lu, P. Weiss, T. Block, *J. Virol. Methods* **2004**, 119, 51.
- [106] S. L. Zebede, C. F. Barbas, Y. Hom, R. H. Coathien, R. Graff, J. DeGraw, J. Pyati, R. LaPolla, D. R. Burton, R. A. Lerner, G. B. Thornton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 3175.
- [107] T. Block, R. Miller, R. Korngold, D. Jungkind, *Biotechniques* **1989**, 7, 756.
- [108] T. Pulli, M. Hoyhtya, H. Soderlund, K. Takkinen, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 2637.
- [109] L. Torrance, A. Ziegler, H. Pittman, M. Paterson, R. Toth, I. Eggleston, *J. Virol. Methods* **2006**, 134, 164.
- [110] V. Nanduri, S. Balasubramanian, S. Sista, V. J. Vodyanoy, A. L. Simonian, *Anal. Chim. Acta* **2007**, 589, 166.
- [111] V. Nanduri, A. K. Bhunia, S.-I. Tu, G. C. Paoli, J. D. Brewster, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 23, 248.
- [112] S. Balasubramanian, I. B. Sorokulova, V. J. Vodyanoy, A. L. Simonian, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 948.
- [113] S. Daly, P. Dillon, B. Manning, L. Dunne, A. Killard, R. O'Kennedy, *Food Agric. Immunol.* **2002**, 14, 255.
- [114] M. Wikman, E. Rowcliffe, M. Friedman, P. Henning, L. Lindholm, S. Olofsson, S. Ståhl, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2006**, 45, 93.
- [115] Y. Wu, L. Brovko, M. W. Griffiths, *Lett. Appl. Microbiol.* **2001**, 33, 311.
- [116] S. Ripp, P. Jegier, M. Birmele, C. M. Johnson, K. A. Daumer, J. L. Garland, G. S. Sayler, *J. Appl. Microbiol.* **2006**, 100, 488.
- [117] V. A. Petrenko, J. R. Brigati in *Immunoassay and other Bio-analytical Techniques* (Hrsg.: J. M. V. Emon), CRC, Taylor & Francis, Boca Raton, **2007**, S. 187.
- [118] P. Ramanujam, W. S. Tan, S. Nathan, K. Yusoff, *BioTechniques* **2004**, 36, 296.
- [119] R. Blasco, M. J. Murphy, M. F. Sanders, D. J. Squirrell, *J. Appl. Microbiol.* **1998**, 84, 661.
- [120] R. S. Lakshmanan, J. Hu, R. Guntupalli, J. Wan, S. Huang, H. Yang, V. A. Petrenko, J. M. Barbaree, B. A. Chin, *SPIE-The International Society for Optical Engineering*, Bellingham, Washington, **2006**, S. 6218.
- [121] C. A. Rowe, L. M. Tender, M. J. Feldstein, J. P. Golden, S. B. Scruggs, B. D. MacCraith, J. J. Cras, F. S. Ligler, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3846.
- [122] J. W. Jaworski, D. Raorane, J. H. Huh, A. Majumdar, S. W. Lee, *Langmuir* **2008**, 24, 4938.
- [123] L. Stryer, R. P. Haugland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, 58, 719.
- [124] P. R. Selvin, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 730.
- [125] J. M. Brockman, B. P. Nelson, R. M. Corn, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2000**, 51, 41.
- [126] A. J. Haes, D. A. Stuart, R. P. V. Duyne in *Nanotechnology in Biology and Medicine: Methods, Devices, and Applications* (Hrsg.: T. Vo-Dinh), CRC, Boca Raton, **2007**, S. 20/1.
- [127] V. Nanduri, A. K. Bhunia, S.-I. Tu, G. C. Paoli, J. D. Brewster, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 23, 248.
- [128] Y. Mu, D. Song, Y. Li, H.-Q. Zhang, W. Li, G.-M. Luo, Q.-H. Jin, *Talanta* **2005**, 66, 181.
- [129] E. Åström, S. Ohlson, *J. Mol. Recognit.* **2006**, 19, 282.
- [130] T. Neufeld, A. Schwartz-Mittelmann, D. Biran, E. Z. Ron, J. Rishpon, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 580.
- [131] T. Neufeld, A. S. Mittelman, V. Buchner, J. Rishpon, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 652.
- [132] J. H. Thomas, S. K. Kim, P. J. Hesketh, H. B. Halsall, W. R. Heineman, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 2700.
- [133] H. Kuramitz, M. Dziewatkoski, B. Barnett, H. B. Halsall, W. R. Heineman, *Anal. Chim. Acta* **2006**, 561, 69.
- [134] I. Benhar, I. Eshkenazi, T. Neufeld, J. Opatowsky, S. Shaky, J. Rishpon, *Talanta* **2001**, 55, 899.
- [135] Y. Jia, M. Qin, H. Zhang, W. Niu, X. Li, L. Wang, X. Li, Y. Bai, Y. Cao, X. Feng, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 3261.
- [136] L.-M. C. Yang, P. Y. Tam, B. J. Murray, T. M. McIntire, C. M. Overstreet, G. A. Weiss, R. M. Penner, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3265.
- [137] L.-M. C. Yang, J. E. Diaz, T. M. McIntire, G. A. Weiss, R. M. Penner, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 5695.
- [138] L.-M. C. Yang, J. E. Diaz, T. M. McIntire, G. A. Weiss, R. M. Penner, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 933.
- [139] K. Dill, D. D. Montgomery, A. L. Ghindilis, K. R. Schwarzkopf, S. R. Ragsdale, A. V. Oleinikov, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 20, 736.
- [140] M. Gabig-Ciminska, M. Los, A. Holmgren, J. Albers, A. Czyz, R. Hintsche, G. Wegrzyn, S.-O. Enfors, *Anal. Biochem.* **2004**, 324, 84.
- [141] M. Yemini, Y. Levi, E. Yagil, J. Rishpon, *Bioelectromagnetics* **2007**, 70, 180.
- [142] A. Liu, I. Honma, H. S. Zhou, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 21, 809.
- [143] A. Liu, T. Watanabe, I. Honma, J. Wang, H. Zhou, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 22, 694.
- [144] A. Liu, I. Honma, H. Zhou, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 23, 74.
- [145] A. Liu, M. D. Wei, I. Honma, H. Zhou, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, 16, 371.
- [146] A. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2. Aufl., Wiley, New York, **2001**.
- [147] J. Shah, E. Wilkins, *Electroanalysis* **2003**, 15, 157.
- [148] A. Liu, J.-i. Anzai, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 2975.
- [149] E. Bakker, Y. Qin, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3965.
- [150] H. Kuramitz, M. Dziewatkoski, B. Barnett, H. B. Halsall, W. R. Heineman, *Anal. Chim. Acta* **2006**, 561, 69.
- [151] T. Yoshinobu, H. Iwasaki, Y. Ui, K. Furuichi, Y. Ermolenko, Y. Mourzina, T. Wagner, N. Näther, M. J. Schöning, *Methods* **2005**, 37, 94.
- [152] J. E. Diaz, L. M. Yang, J. A. Lamboy, R. M. Penner, G. A. Weiss, *Methods Mol. Biol.* **2009**, 504, 255.

- [153] S. Majumdar, A. Hajducski, A. S. Mendez, G. A. Weiss, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5937.
- [154] G. A. Weiss, R. M. Penner, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3082.
- [155] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, *382*, 607.
- [156] G. Decher, *Science* **1997**, *277*, 1232.
- [157] A. Liu, Y. Kashiwagi, J.-i. Anzai, *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1139.
- [158] A. Liu, J.-i. Anzai, *Langmuir* **2003**, *19*, 4043.
- [159] A. Liu, J.-i. Anzai, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *380*, 98.
- [160] A. Liu, G. Abbineni, C. B. Mao, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 1001.
- [161] W. Shenton, T. Douglas, M. Young, G. Stubbs, S. Mann, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 253.
- [162] S. Mukherjee, C. M. Pfeifer, J. M. Johnson, J. Liu, A. Zlotnick, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2538.
- [163] L. Loo, R. H. Guenther, V. R. Basnayake, S. A. Lommel, S. Franzen, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4502.
- [164] J. D. Lewis, G. Destito, A. Zijlstra, M. J. Gonzalez, J. P. Quigley, M. Manchester, H. Stuhlmann, *Nat. Med.* **2006**, *12*, 354.
- [165] K. Srinivasan, S. Cular, V. R. Bhethanabotla, S. Y. Lee, M. T. Harris, J. N. Culver, *AIChE Annual Meeting*, Cincinnati (USA), **2005**, S. 74d/1.
- [166] N. F. Steinmetz, G. P. Lomonosoff, D. J. Evans, *Langmuir* **2006**, *22*, 3488.
- [167] Z. Niu, J. Liu, L. A. Lee, M. A. Bruckman, D. Zhao, G. Koley, Q. Wang, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3729.
- [168] F. R. Simões, L. H. C. Mattoso, C. M. P. Vaz, *Sens. Lett.* **2006**, *4*, 319.
- [169] Y. S. Jung, W. C. Jung, H. L. Tuller, C. A. Ross, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 3776.
- [170] M. Gerard, A. Chaubey, B. D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 345.
- [171] J. L. West, N. J. Halas, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2003**, *5*, 285.
- [172] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128.
- [173] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D* **2003**, *36*, R167.
- [174] P. Tartaj, M. del Puerto Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. González-Carreño, C. J. Serna, *J. Phys. D* **2003**, *36*, R182.
- [175] C. C. Berry, A. S. G. Curtis, *J. Phys. D* **2003**, *36*, R198.
- [176] A. Liu, H. Zhou, I. Honma, M. Ichihara, *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *90*, 253112.
- [177] R. J. Chen, S. Bangsaruntip, K. A. Drouvalakis, N. W. S. Kam, M. Shim, Y. Li, W. Kim, P. J. Utz, H. Dai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4984.
- [178] Y. Lu, J. Liu, *PCT Int. Appl.* **2005**, 69.
- [179] I. L. Medintz, K. E. Sapsford, J. H. Konnert, A. Chatterji, T. Lin, J. E. Johnson, H. Mattoussi, *Langmuir* **2005**, *21*, 5501.
- [180] M. Fischlechner, U. Reibetanz, M. Zaulig, D. Enderlein, J. Romanova, S. Leporatti, S. Moya, E. Donath, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3540.
- [181] M. Fischlechner, E. Donath, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3246; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3184.
- [182] L. Toellner, M. Fischlechner, B. Ferko, R. M. Grabherr, E. Donath, *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 1575.
- [183] M. Fischlechner, L. Toellner, P. Messner, R. Grabherr, E. Donath, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 784.
- [184] M. Fischlechner, O. Zschornig, J. Hofmann, E. Donath, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2952; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2892.
- [185] H. Zhu, I. M. White, J. D. Suter, X. Fan, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 461.
- [186] R. J. Tseng, C. Tsai, L. Ma, J. Ouyang, C. S. Ozkan, Y. Yang, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 72.
- [187] S. Clarkson, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 353.
- [188] C. Chen, M. C. Daniel, Z. T. Quinkert, M. De, B. Stein, V. D. Bowman, P. R. Chipman, V. M. Rotello, C. C. Kao, B. Dragnea, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 611.
- [189] Y.-b. Lim, E. Lee, Y.-R. Yoon, M. S. Lee, M. Lee, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4601; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4525.
- [190] E. S. Lee, D. Kim, Y. S. Youn, K. T. Oh, Y. H. Bae, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2452; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2418.
- [191] T. Haselhorst, J.-M. Garcia, T. Islam, J. C. C. Lai, F. J. Rose, J. M. Nicholls, J. S. M. Peiris, M. von Itzstein, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1936; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1910.
- [192] X. Huang, L. M. Bronstein, J. Retrum, C. Dufort, I. Tsvetkova, S. Anigayei, B. Stein, G. Stucky, B. McKenna, N. Remmes, D. Baxter, C. C. Kao, B. Dragnea, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2407.
- [193] P. K. Jayanna, V. P. Torchilin, V. A. Petrenko, *Nanomedicine* **2009**, *5*, 83.
- [194] S.-W. Lee, S. K. Lee, A. M. Belcher, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 689.
- [195] T. Douglas, M. Young, *Science* **2006**, *312*, 873.
- [196] N. F. Steinmetz, K. C. Findlay, T. R. Noel, R. Parker, G. P. Lomonosoff, D. J. Evans, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1662.
- [197] K. T. Nam, D.-W. Kim, P. J. Yoo, C.-Y. Chiang, N. Meethong, P. T. Hammond, Y.-M. Chiang, A. M. Belcher, *Science* **2006**, *312*, 885.
- [198] S. Takeda, H. Ozaki, S. Hattori, A. Ishii, H. Kida, K. Mukasa, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2007**, *7*, 752.
- [199] D. Pantarotto, C. D. Partidos, J. Hoebeke, F. Brown, E. Kramer, J.-P. Briand, S. Muller, M. Prato, A. Bianco, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 961.