

Logisches Mehrschrittgatter auf Basis eines Aptamersensors mit verstärktem Sensorsignal**

Lingyan Feng, Zhaozi Lyu, Andreas Offenhäusser und Dirk Mayer*

Abstract: Konventionelle Elektronik kann mehrere Logikoperationen hintereinander ausführen; für bioelektronische Logikgatter wurde diese Fähigkeit bisher jedoch selten nachgewiesen. Zudem ist die Fragestellung, wie man die technologische Lücke zwischen biochemischen Prozessen und Silicium-basierten elektrischen Schaltungen schließt, eine Schlüsselproblematik der Bioelektronik. Hier untersuchen wir ein neuartiges, Aptamer-basiertes Mehrschrittgatter, zusammengesetzt aus INHIBIT- und AND-Gattern, das eine Netto-XOR-Analyse ausführt und ein elektrochemisches Ausgabesignal erzeugt. Durch die Bindung des Zielmoleküls an ein Aptamer wird ein Ladungstransfer zwischen Elektrode und Redoxsonden in der Lösungsphase ermöglicht, der das Sensorsignal verstärkt und eine direkte und zuverlässige Diagnose erlaubt. Wir zeigen eine neue Möglichkeit auf, bioelektronische logische Mehrschrittgatter zu entwerfen, mit dem Ziel, eine komplexe Diagnose basierend auf mehreren Eingangssignalen in eine Ja- oder Nein-Entscheidung zu vereinfachen.

Eine große Auswahl an DNA-basierten Schaltkreisen wurde während des letzten Jahrzehnts realisiert, mit dem Ziel, die spezifischen Eigenschaften von Molekülen für elektrische Bauelemente zu nutzen.^[1] Verschiedene boolesche Logikoperationen konnten ausgeführt werden. Diese waren primär auf die logischen Basisfunktionen wie AND, OR und XOR fokussiert, mit Anwendungen in der Biologie, der Biosensorik, dem Bioimaging und der Therapie von Krankheiten.^[2] Für integrierte elektronische Schaltungen kann eine logische Mehrschrittoperation einfach durch die elektrische Verknüpfung von mehreren Logikgattern realisiert werden. Die Kombination von biologischen Logikgattern zu Mehrschrittschaltungen ist in der Regel nicht einfach ausführbar und wurde erst selten demonstriert. Zwar konnten enzymatische Netzwerke mit hierarchischem Schaltungsdesign^[3] sowie DNA-basierte boolesche Gatter mit Dreischrittschaltung realisiert werden,^[4] jedoch basiert die Ausgabe dieser Logikgatter in der Regel auf fluoreszierenden oder kolorimetrischen Signalen. Das weitere Kombinieren von optischen Si-

gnalen bei der Herstellung von Mehrschrittgattern erweist sich als umständlich und ist schwierig in elektrische Bauelemente zu integrieren. Um eine breite Basis an kombinierbaren Mehrschrittgattern zu entwerfen und die Lücke zwischen DNA-Logik und Festkörper-basierten elektrischen Schaltungen zu schließen, bedarf es einer geeigneten Plattform, die sowohl Logikoperationen als auch eine Signalwandlung in elektrische oder elektrochemische Signale ermöglicht. Bislang wurde nur in einigen wenigen Pionierarbeiten über Gatter berichtet, bei denen DNA-Bausteine auf elektrochemisch aktive Substrate immobilisiert wurden. Diese Systeme waren jedoch auf logische Ein- oder Zwei-Schritt-Operationen begrenzt.^[5]

Hier wird ein elektrochemisches Logikgatter vorgestellt, dass eine Drei-Schritt-Operation ausführt und auf einer Aptamererkennungsreaktion beruht. Aptamere stellen neue Art von molekularen Erkennungselementen dar, die auf Einzelstrang-DNA/RNA-Molekülen basieren und durch ein Selektionsverfahren aus Bibliotheken von Molekülen mit zufälliger Sequenz ausgewählt werden.^[6] Die Aptamere weisen eine große konformativ Flexibilität auf und ermöglichen es somit, eine Vielzahl unterschiedlicher Zielmoleküle mit hoher Affinität und Spezifität zu binden. Sie können als vielversprechende Kandidaten sowohl für bioanalytische Anwendungen als auch für neuartige Logikgatter angesehen werden.^[7] Wird das Aptamer in zwei Teile gespalten, können diese einen Sandwichkomplex mit ihrem Zielmolekül bilden.^[8] Hier wird das Konzept des geteilten Aptamersensors erweitert, indem ein elektrochemischer Stromgleichrichter (ECR) für die Signalverstärkung und die Erzeugung einer logischen Mehrschrittschaltung eingebunden wird.

Die besondere Charakteristik des ECR-Prozesses ist, dass der gesamte Ladungstransfer zwischen redoxaktiven Molekülen in der Lösungsphase und der Elektrode über oberflächengebundene Redoxgruppen nur in eine Richtung auftritt, während der Transfer in die entgegengesetzte Richtung aus thermodynamischen Gründen unterdrückt ist.^[9] Elektrochemische Gleichrichter wurden in verschiedenen bioelektronischen und bioelektrochemischen Systemen implementiert.^[10] So wurde beispielsweise über den Einsatz von ECRs zum Ausführen von Operationen molekularer Logikgatter sowie über die Realisierung elektrochemischer Transistorfunktionen mit Signalverstärkung berichtet.^[11]

Wir stellen hier ein Aptamer-basiertes, logisches Mehrschrittgatter vor, das aus sequenziellen INHIBIT(INH)- und AND-Gattern aufgebaut ist und eine Netto-XOR-Analyse mit elektrochemischem Ausgabesignal ausführt. Hierfür werden ATP als Analyt und ein zugehöriges, geteiltes Aptamer zur Detektion verwendet, die eine Logikoperation in Form eines INH-Logikgatters ausführen (Abbildung 1A).

[*] Dr. L. Feng, Z. Lyu, Prof. A. Offenhäusser, Dr. D. Mayer
Peter Grünberg Institut, PGI-8, Forschungszentrum Jülich
JARA – Fundamentals of Future Information Technology
Jülich 52425 (Deutschland)
E-Mail: dirk.mayer@fz-juelich.de

[**] Wir danken Dr. Youlia Mourzina für hilfreiche Kommentare zum Manuskript sowie dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, Fördernr. 031A095B, für finanzielle Unterstützung. Dr. L. Feng dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für ein Humboldt Stipendium.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201502315> zu finden.

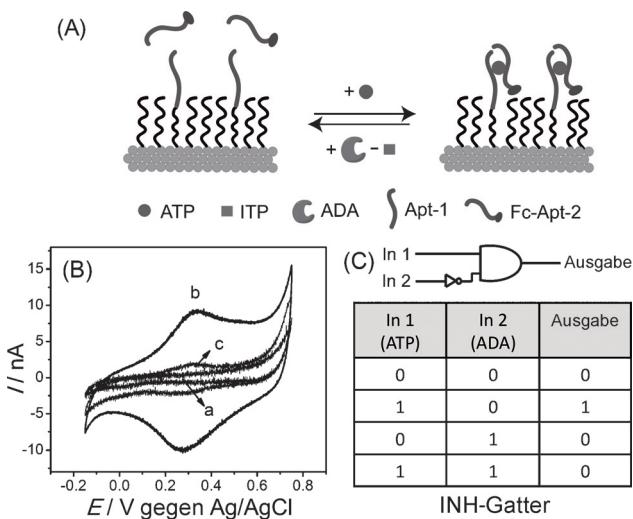


Abbildung 1. A) Schematische Darstellung des ATP-Aptamer-basierten INH-Logikgatters. In der Gegenwart von ATP bildet sich ein Sandwichkomplex zwischen dem oberflächengebundenen Teilaptamer (Apt-1) und dem Ferrocen-modifizierten Teilaptamer (Apt-2). ADA ist fähig, das ATP katalytisch zu Inosintriphosphat (ITP) umzusetzen. Dieses zeigt keine Wechselwirkung mit dem ATP-Aptamer, und der Sandwichkomplex dissoziert. B) CV-Kurven von verschiedenen Elektrodenoberflächen. a) Apt-1-modifizierte Goldelektroden; Apt-1-modifizierte Elektrode nach Inkubation in 1 µM Apt-2-Lösung in der Gegenwart von b) 500 µM ATP sowie c) 500 µM ATP und 0.1 U mL⁻¹ ADA. C) Das INH-Logikschema und die zugehörige Wahrheitstabelle.

Das 27-mere ATP-Aptamer ist in zwei Teile mit verschiedenen Sequenzen aufgeteilt.^[8,12] Die Elektrodenoberfläche wird mit einem 14-meren Teilaptamer (Apt-1) über kovalente Thiol-Gold-Bindungen modifiziert (Abbildung 1B, Kurve a). Mit dem Hinzufügen des zweiten 13-meren Teilaptamerstranges (Apt-2), der einen Ferrocen(Fc)-Marker trägt, wird eine stabile Sandwichstruktur über die Bildung einer ATP-Aptamer-Bindung aufgebaut. Ein anodischer Peak bei ca. 0.35 V und ein kathodischer Peak bei ca. 0.28 V (gegen Ag/AgCl) können nachgewiesen werden, die die Oberflächenbindung des Ferrocenmarkers und die Bildung des Aptamerkomplexes belegen (zyklisches Voltammogramm, CV; Abbildung 1B, Kurve b). Das System reagiert unterschiedlich auf die An- oder Abwesenheit von ATP-Molekülen wegen der thermischen Instabilität von ATP-freien Aptamerkomplexen (Abbildung 1B, Kurve c).^[13] Die Peakposition und die gleiche Peakhöhe lassen auf einen reversiblen und oberflächengebundenen Elektronentransfer zwischen Fc und Elektrode schließen (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen). Unter optimierten Modifizierungsbedingungen (Abbildungen S2, S3) beträgt die berechnete DNA-Oberflächenbeschichtung ca. $(3.85 \pm 0.33) \times 10^{11}$ Moleküle cm⁻², was einer früher publizierten DNA-Dichte entspricht.^[14] Darüber hinaus kann ein ATP-Aptamer-Komplex, der einmal gebildet wurde, wieder dissoziert werden, indem er mit Adenosin-Desaminase (ADA) versetzt wird (Abbildung 1B, Kurve d). ADA ist ein Schlüsselenzym in Purinstoffwechselprozessen, das effektiv die Desaminierung von Adenosin (Desoxyadenosin) in Inosin (Desoxyinosin) katalysieren kann, für welches das ATP-Aptamer keine detektierbare Affinität zeigt.

Dies ermöglicht es der ADA, die gebildete Sandwichstruktur zu lösen (Abbildung 1B, Kurve d).^[15] Vererbter ADA-Mangel ist ein Hauptgrund für das Auftreten von schweren kombinierten Immundefekten (SCIDs),^[16] aber auch ein erhöhter ADA-Spiegel kann auf Krankheiten hindeuten, wie hämolytische Anämie oder Tuberkulose.^[17] Im Plasma von gesunden Menschen liegt die ATP-Konzentration in etwa im µM-Bereich und die ADA-Aktivität bei 0.03 U mL⁻¹.^[18]

Zu hohe oder zu niedrige ATP/ADA-Konzentrationen sind als kritisch für den Menschen zu betrachten. Das hier vorgestellte Logikgatter ist nicht nur in der Lage, mehrere Logikoperationen hintereinander auszuführen, sondern kann auch diagnostische Informationen über gekoppelte biologische Systeme liefern.

Um die Grenzwerte für ein INH-Gatter festzulegen, werden Konzentrationen $\geq 10 \mu\text{M}$ für ATP (In1) und $\geq 0.03 \text{ U mL}^{-1}$ für ADA (In2) als „1“-Status definiert, während geringere Konzentrationen jeweils dem „0“-Status zugeordnet werden. Das elektrochemische Signal in Gegenwart von 10 µM ATP stellt den Grenzwert für die Ausgabe des INH-Gatters dar. Falls der Stromwert höher als dieser ist, wird er als „1“ betrachtet, während kleinere Werte als „0“ angesehen werden. Beim Beurteilen der vier verschiedenen Zustände in der An- und/oder Abwesenheit von ATP und ADA – (0,0), (1,0), (0,1), (1,1) – liefert nur (1,0) eine signifikante relative Stromänderung, was in einem Ausgabesignal „1“ resultiert. Somit kann eine INH-Logikoperation durch die Steuerung der Konzentrationen von ATP- und ADA-Aktivitätseinheit realisiert werden. Eine entsprechende schematische Darstellung und die zugehörige Wahrheitstabelle des Logikgatters sind in den Abbildungen 1C und S4 dargestellt.

Eine Problematik bei Aptamersensoren ist, dass das erhaltene Signal stark von der Oberflächendichte der Aptamermoleküle abhängt, die typischerweise im Bereich von einigen wenigen pmol cm⁻² oder darunter liegt. Die niedrige Sondendichte beeinflusst normalerweise die Empfindlichkeit und Anwendbarkeit des Sensors erheblich.^[14] Deshalb führen wir hier das Konzept des elektrochemischen Gleichrichters (ECR) als Signalverstärkung ein.

Zu diesem Zweck fügen wir den Eingängen des INH-Gatters einen dritten Eingang, Ferrocyanid (In3), hinzu, um eine Zwei-Schritt-Operation auszuführen. Der ECR-Effekt wird durch einen gerichteten Ladungstransport zwischen den Fc-Gruppen, die an die Aptamermoleküle gebunden sind, und den Redoxsonden in der Lösungsphase realisiert (Abbildung 2A). Die Fc-Gruppe wird an die Oberfläche durch die Bildung einer stabilen Sandwichstruktur zwischen den Aptamersträngen Apt-1 und Apt-2 sowie ATP angeheftet. Das Fc-modifizierte Apt-2 verhält sich wie ein Ladungstransfermediator zwischen der Elektrode und den Redoxmolekülen in der Lösungsphase. Durch deren unterschiedliche Redoxpotentiale kann ein effektiver Ladungstransport von der Elektrode über das Fc-Zentrum (Fe^+/Fe^- -Redoxpotential ca. 0.32 V gegen Ag/AgCl) zu den Ferrocyanidionen stattfinden ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -Redoxpotential ca. 0.21 V gegen Ag/AgCl). Dies führt zu einem signifikanten Anstieg des Anodenstromes (Abbildung 2A). In der entgegengesetzten Richtung ist der Elektronentransferprozess thermodynamisch

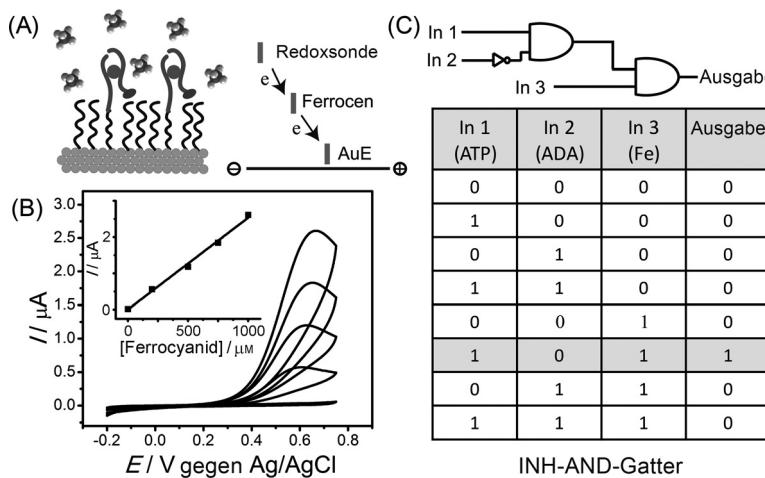


Abbildung 2. A) Schema des elektrochemischen Stromgleichrichters (ECR). Der ECR-Effekt wird durch einen gerichteten Ladungstransport zwischen der Aptamer-gebundenen Fc-Gruppe und Redoxmolekülen in der Lösungsphase realisiert. B) CV-Kurven des Gleichtrichters in $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -Lösungen verschiedener Konzentrationen. Einschub: der lineare Zusammenhang zwischen Peakstrom und $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -Konzentration. C) Das zweistufige INH-AND-Logikschema und die dazugehörige Wahrheitstabelle.

misch unterdrückt.^[11,19] Die Umgebung der oberflächengebundenen Aptamerstränge wird mit isolierenden 1-Undecanthiolmolekülen aufgefüllt, um den direkten Ladungstransfer zwischen der Elektrode und den Redoxmolekülen in der Lösungsphase zu eliminieren (Abbildung S5).^[19] Das Sensorsignal kann einfach verstärkt werden, indem die Konzentration der elektronenliefernden Redoxsonden in der Lösung eingestellt wird. So kann beispielsweise der Anodenpeakstrom signifikant erhöht werden, indem die Konzentration der Ferrocyanide angehoben wird (Abbildung 2B). Die Redoxmoleküle in der Lösungsphase diffundieren zur Elektrode und füllen Elektronen des Elektronentransferrediagonals wieder auf, der zuvor von der Elektrode oxidiert wurde. Für die in der Folge beschriebenen Experimente wurde eine Konzentration von 1 mM für die Redoxsonden der Lösungsphasen ausgewählt (Abbildungen S6, S7). Der gleichgerichtete Strom (j) kann durch zwei justierbare Parameter [Gl. (1)] eingestellt werden: die Konzentration der Redoxsonden in der Lösung, wie oben diskutiert, und die Anzahl an Fc-Redoxgruppen an der Elektrode, die wiederum von der Bindung des ATP und der Bildung der Aptamer-sandwichstruktur abhängt (Abbildung 2A).^[10]

$$j = F \kappa_{\text{cross}} \Gamma_0 c_D \quad (1)$$

Gleichung (1) enthält die Faraday-Konstante F sowie die Geschwindigkeitskonstante κ_{cross} für die Reaktion zwischen oberflächengebundenen Fc-Gruppen und den Redoxmolekülen in der Lösungsphase; Γ_0 ist der Bedeckungsgrad der redoxaktiven Fc-Gruppen an der Oberfläche und c_D die Konzentration an Redoxmolekülen in Lösung. Γ_0 hängt entscheidend von der Anzahl der Fc-markierten Apt-2-Aptamere in der Gegenwart von ATP ab. Die Abhängigkeit des verstärkten Peakstroms und der ATP-Konzentrationen wurde bestimmt und eine Detektionsgrenze von ca. 7.5 nM ermittelt

(Abbildungen 3 A, S8). Dieses Resultat entspricht einer ca. 130-fachen Verbesserung gegenüber der Detektionsgrenze von 1 μM , die für ECR-freie Sensoren bestimmt wurde (Abbildung S9). Die Selektivität des Aptamersensors wurde durch einen Vergleich unter Verwendung von ATP-Analoga und eine direkte Detektion in komplexen Serumlösungen nachgewiesen (Abbildung S10). Zudem ist der hier vorgestellte Aptamersensor auch hinsichtlich der Aktivität von ADA empfindlich, da der Fc-modifizierte Apt-2-Strang nach Enzymbehandlung von der Oberfläche freigesetzt wird (Abbildung S11). Die Detektion basiert auf der Abnahme des Peakstromes und ermöglicht eine Bestimmung der ADA-Aktivitätsgrenze von 0.002 U mL^{-1} , was einer höheren Empfindlichkeit und exzellenter Selektivität im Vergleich mit früheren Berichten entspricht (Abbildungen 3B, S12 und Tabelle S1).

Weder die Detektion von ATP noch jene von ADA werden durch die Gegenwart von Be-standteilen komplexer Medien beeinflusst.

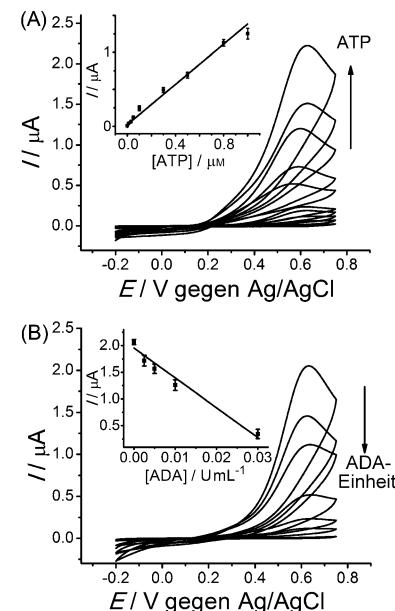


Abbildung 3. A) CV-Kurven mit verstärktem Anodenstrom, verursacht durch den Anstieg der ATP-Konzentration von 0.01 auf 50 μM , in der Gegenwart von 1 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Einschub: Vergrößerung des linearen Bereiches bei niedrigen ATP-Konzentrationen. B) CVs, die von einer Elektrode mit einem oberflächengebundenen ATP/Aptamer-Komplex während der Detektion der ADA-Aktivität mit verschiedenen Aktivitäts-einheit von (0, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.03, 0.05, 0.1) U mL^{-1} aufgenommen wurden. Einschub: lineare Region des Peakstroms und der ADA-Aktivitätseinheit.

Zudem wird das Sensorsignal nicht entscheidend durch die Permeation von Redoxsonden aus der Lösungsphase durch die selbstorganisierte Monoschicht verfälscht. Dies ist ein wichtiger Vorteil der ECR-basierten Verstärkung gegenüber zuvor berichteten elektrokatalytischen Verstärkungsprinzipien, da ein direkter Ladungstransfer zwischen Elektrode und

Redoxsonde die Effizienz des Ladungstransfers zwischen oberflächengebundenen Fc-Gruppen und Redoxmolekülen in der Lösung verringern würde.^[20] Unser einfaches ECR-Verstärkungsprinzip ist nicht auf vergleichsweise teure Enzyme, stringente experimentelle Bedingungen oder komplizierte Syntheseprozesse angewiesen.^[21] Deshalb kann geschlussfolgert werden, dass das Konzept der ECR-basierten Signalverstärkung ein geeignetes Verfahren ist, um die Leistung von Aptamerbiosensoren zu verbessern.

Darüber hinaus wird durch Verwendung des dritten zusätzlichen Einganges (In3) eine zweite Logikoperation ausgeführt, die unterscheidbare Ausgabesignale durch Erhöhung der Ausgabegrenzwerte ermöglicht. Deshalb können das Ausgabesignal des INH-Logikgatters (siehe oben) und In3 als Eingänge für die nächste INH-AND-Logikoperation angesehen werden (siehe Logikschemata und zugehörige Wahrheitstabelle in Abbildung 2C). Beachtenswert ist hier, dass wir verschiedene Grenzwerte für den endgültigen Ausgabestrom nach ECR-Verstärkung definiert haben. Die Region mit einem absoluten Stromwert $> 1.5 \mu\text{A}$ (wenn $\text{ATP} \geq 10 \mu\text{M}$ oder $\text{ADA} < 0.01 \text{ U mL}^{-1}$) wurde als „1“ definiert, die zweite Region mit einem Stromwert $< 0.1 \mu\text{A}$ (wenn $\text{ATP} < 0.1 \mu\text{M}$ oder $\text{ADA} \geq 0.03 \text{ U mL}^{-1}$) als „0“. Der Unterschied zwischen beiden Grenzwerten liegt bei einem Faktor von 15, wodurch doppeldeutige Zustände vermieden werden (Abbildung 3). Diese als grauer Bereich bezeichnete Region zwischen „1“ und „0“, in der beide Grenzwerte nicht überschritten werden, kann einer Menge an ATP ($0.1\text{--}10 \mu\text{M}$) und ADA ($0.01\text{--}0.03 \text{ U mL}^{-1}$) zugeordnet werden, wie sie gewöhnlich in normalem menschlichem Serum auftritt.^[18] Die Definition von Graubereichen entspricht der Zuordnung von Grenzwerten in der Elektronik, wo nur eindeutige Spannungsregionen für die Ausgabesignale genutzt werden, um fehlerhafte Operationen zu vermeiden. Mit der Hilfe des ECR ist das unterschiedliche Ansprechen der Sensoren auf die ATP-Konzentration und ADA-Aktivität viel einfacher zu analysieren, da das Logikgatter direkt unterschiedliche Gesundheitszustände diskriminieren kann. Der Strom steigt signifikant nur, wenn $\text{In1}=1$ ($\text{ATP} \geq 10 \mu\text{M}$), $\text{In2}=0$ ($\text{ADA} < 0.01 \text{ U mL}^{-1}$) und $\text{In3}=1$ (1 mM Ferrocyanid) ist, was zu einem Ausgabesignal von „1“ führt. Diese Signal kodiert einen Krankheitszustand, z.B. das Vorhandensein eines schweren kombinierten Immundefekts.^[22] Ist im Unterschied dazu die Stromintensität klein, erhält man ein Ausgabesignal von „0“ (Abbildungen 2C und S13). Laut klinischen Studien^[18b] haben Patienten mit Tuberkulose normalerweise erhöhte Werte für die ADA-Aktivität ($\text{ADA} \geq 0.03 \text{ U mL}^{-1}$) in ihrem Serum, was zu den Eingängen (0,1,1) oder (1,1,1) führt. Beide Ausgabesignale, „0“ und „1“, liefern Diagnosedaten, die auf körperliche Erkrankungen schließen lassen. Nur wenn die Eingänge innerhalb des grauen Bereiches liegen, ist die Diagnose ohne Befund.

Auf Grundlage dieses ECR-verstärkten Aptamersensors soll nun eine weitere Logikoperation hinzugefügt werden. Zu diesem Zweck wird das INH-AND-Gatter mit einer XOR-Funktion kombiniert (Abbildung 4A). Dafür muss berücksichtigt werden, dass anstelle der anodischen Gleichrichtung

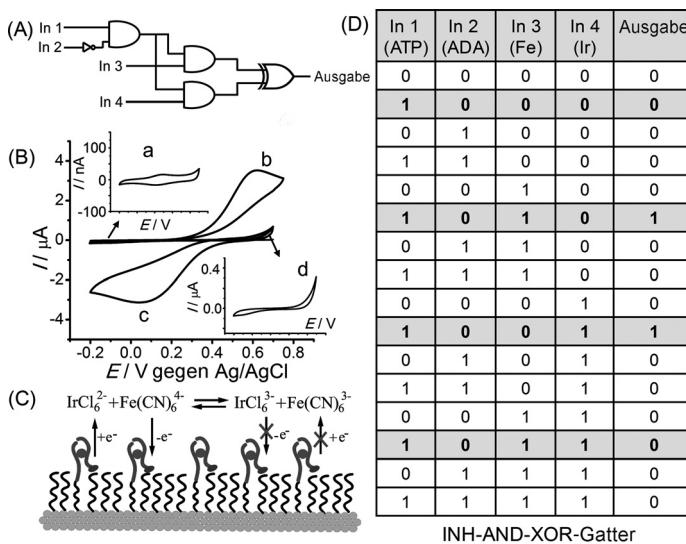


Abbildung 4. A) Schéma des INH-AND-XOR-Logikgatters aus einem INH-BIT- und AND-Gatter, das eine Netto-XOR-Analyse ausführt. B) Der Aptamersensor in der Gegenwart von verschiedenen Eingängen: a (1,0,0,0), b (1,0,1,0), c (1,0,0,1) und d (1,0,1,1). Die anodische und kathodische Stromverstärkung ist mit 1 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ bzw. 1 mM $\text{K}_2[\text{IrCl}_6]$ realisiert. C) Elektrontransferprozesse zwischen Redoxmolekülen und der Aptamer-modifizierten Elektrodenoberfläche. Die chemische Gleichung zeigt den direkten Ladungstransfer zwischen den beiden Redoxsonden in der Lösung. D) Wahrheitstabelle aller Schritte des mehrstufigen Logikgatters.

auf Basis der Ferrocyanide auch der kathodische Strom verstärkt werden kann. Dies kann einfach über einen Austausch der Redoxsonde von Ferrocyanid (0.21 V gegen Ag/AgCl) gegen Hexachloroiridat(IV) (0.68 V gegen Ag/AgCl) erreicht werden. Die unterschiedlichen Redoxpotentiale dieser Redoxmoleküle in der Lösungsphase führen zu unterschiedlichen Richtungen des Ladungstransfers zwischen den oberflächengebundenen Fc-Zentren (Fc^+/Fc -Redoxpotential 0.32 V gegen Ag/AgCl) und Elektronendonoren (Ferrocyanid, $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) sowie -akzeptoren (Hexachloroiridat, $\text{Ir}^{4+}/\text{Ir}^{3+}$); Abbildung 4B. In3 und In4 entsprechen der Zugabe von 1 mM Ferrocyanid bzw. Iridat(IV)-Ionen, wohingegen das Fehlen der jeweiligen Verbindung eine „0“ darstellt. Mit der gleichen Definition der Ausgabe, wie oben für das INH-AND-Logikgatter beschrieben, werden drei Regionen „1“, „0“ und „grau“ für die Intensität des Ausgabesignals angenommen. Die angestrebte Drei-Schritt-Logikfunktion kann nun über das Einstellen der verschiedenen Eingabesignale realisiert werden. Wenn nur eine Sorte der Redoxsonden zur Lösung hinzugefügt wird, können die Aptamer-modifizierten Elektroden als anodischer oder kathodischer ECR angesehen werden. Diese ECR-Funktionen ähneln einer Diode, die den elektrischen Strom in eine Richtung ermöglicht (Durchlassrichtung) und den Strom in der entgegengesetzten Richtung blockiert (Sperrrichtung). Dies resultiert im oben beschriebenen INH-AND-Logikgatter (Abbildung 4B, Kurven b und c). Wenn In3 und In4 gleichzeitig zugegeben werden, vermindert sich das Stromsignal aufgrund von verschiedenen grenzflächen- und lösungsbasierten Ladungstransferprozessen signifikant (Abbildung 4B, Kurve d, und Abbildung 4C).^[11] Das Mehrschrittgatter führt letztlich eine XOR-

Operation aus, die auf der Kombination des INH- und AND-Gatters basiert (Abbildungen 4D und S16). Zwei Eingangssätze (1,0,1,0) und (1,0,0,1) ergeben in der Summe eine „1“-Ausgabe, in welcher der Strom als Absolutwert richtungsunabhängig ausgelesen wird. Das XOR-Logikgatter kann genutzt werden, um ungenaue Diagnosen infolge von Fehlfunktionen des Systems zu eliminieren. Hohe Rauschanteile im Sensorsignal können fälschlicherweise zu einer falschen „1“-Ausgabe führen. Diese Ausgabe sollte nach der Zugabe von In3 und In4 zusammen jedoch nur Bestand haben, falls das System defekt ist. Das Signal sollte sich aber in „0“ oder „grau“ ändern, wenn das System korrekt arbeitet und der Rauschanteil am Signal gering ist.

Die volle Funktion des hier vorgestellten Logikgatters entspricht einer INH-AND-XOR-Operation. Es kombiniert das Sensorsignal des Aptamer-basierten biochemischen Logikgatters (INH) mit dem Logikgatter des elektrochemischen Transducers (AND-XOR). Auf diese Weise wird ein biochemischer Bindungsprozess in ein elektrisches Signal umgewandelt, das Sensorsignal wird verstärkt und mehrere (bio)chemische Eingangssignale werden zu einem Ausgabesignal zusammengefasst, das den globalen Status des untersuchten Systems widerspiegelt. Unterschiedliche Analytkonzentrationen führen zu unterscheidbaren und einfach zu analysierenden Ja- oder Nein-Ausgaben, was speziell für „Point of care“-Diagnosen von Bedeutung ist.

Ein neues logisches Mehrschrittgatter wurde hergestellt, das auf der Kombination einer empfindlichen Aptamerbindungsreaktion mit dem Konzept der elektrochemischen Gleichrichtung basiert. Ein gleichgerichteter Sensorstrom wird durch den fortlaufenden Ladungstransfer zwischen der Elektrode, dem Aptamer-gebundenen Redoxmediator und den Redoxsonden in der Lösung erzeugt. Die auf diese Weise erhaltene Verstärkung des Sensorsignals bietet eine empfindliche, direkte und robuste Detektionsstrategie für Aptamer-basierte elektrochemische Biosensoren. Durch die sorgfältige Auswahl der Konzentrationsbereiche der Analytmoleküle und die Zusammenfassung der anodischen sowie kathodischen Stromgleichrichter wird eine logische INH-AND-XOR-Operation ausgeführt, die ein hohes Signalverhältnis zwischen den Ausgabesignalen „1“ und „0“ aufweist. Die Analyse des Logikgatters ermöglicht eine Unterscheidung von verschiedenen Gesundheitszuständen und auf diese Weise eine schnelle sowie akkurate Diagnose. Der hier vorgestellte Sensor soll als Nachweis für die Machbarkeit von Sensoren dienen, die durch die Verwendung von multiplen Logikgattern zu höheren Sensorsignalen und zu exakteren Diagnosen führen.

Stichwörter: Aptamere · Diagnose · Logikgatter · Sensoren · Signalverstärkung

Zitierweise: Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 7693–7697
Angew. Chem. 2015, 127, 7803–7808

- [1] a) X. P. Su, L. M. Smith, *Nucleic Acids Res.* 2004, 32, 3115–3123; b) Y. Krishnan, F. C. Simmel, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 3124–3156; *Angew. Chem.* 2011, 123, 3180–3215; c) L. Qian, E. Winfree, J. Bruck, *Nature* 2011, 475, 368–372.

- [2] a) F. Wang, X. Liu, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 1098–1129; *Angew. Chem.* 2015, 127, 1112–1114; b) K. Szacilowski, *Infochemistry*, Wiley, Chichester, 2012; c) A. P. de Silva, *Molecular Logic-Based Computation*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2013; d) *Molecular und Supramolecular Information Processing-From Molecular Switches to Unconventional Computing* (Hrsg.: E. Katz), Wiley-VCH, Weinheim, 2012; e) *Bimolecular Computing-From Logic Systems to Smart Sensors and Actuators* (Hrsg.: E. Katz), Wiley-VCH, Weinheim, 2012; f) M. N. Stojanovic, T. E. Mitchell, D. Stefanovic, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 3555–3561; g) J. Elbaz, F. Wang, F. Remacle, I. Willner, *Nano Lett.* 2012, 12, 6049–6054; h) J. Elbaz, O. Lioubashevski, F. Wang, F. Remacle, R. D. Levine, I. Willner, *Nat. Nanotechnol.* 2010, 5, 417–422; i) T. Li, E. Wang, S. Dong, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 15082–15083; j) F. Pu, J. Ren, X. Qu, *Adv. Mater.* 2014, 26, 5742–5757.
- [3] a) M. N. Stojanovic, D. Stefanovic, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 6673–6676; b) E. Katz, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2015, 34, 202–208; c) E. Katz, V. Privman, *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 1835–1857.
- [4] B. M. Frezza, S. L. Cockcroft, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 14875–14879.
- [5] a) Y. Jia, R. Duan, F. Hong, B. Wang, N. Liu, F. Xia, *Soft Matter* 2013, 9, 6571–6577; b) D. Kang, R. J. White, F. Xia, X. Zuo, A. Vallee-Belisle, K. W. Plaxco, *NPG Asia Mater.* 2012, 4, e1; c) F. Xia, X. Zuo, R. Yang, R. J. White, Y. Xiao, D. Kang, X. Gong, A. A. Lubin, A. Vallée-Bélisle, J. D. Yuen, B. Y. B. Hsu, K. W. Plaxco, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 8557–8559.
- [6] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* 1990, 346, 818–822.
- [7] a) M. Famulok, G. Mayer, *Acc. Chem. Res.* 2011, 44, 1349–1358; b) A. A. Lubin, K. W. Plaxco, *Acc. Chem. Res.* 2010, 43, 496–505.
- [8] a) X. Zuo, Y. Xiao, K. W. Plaxco, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 6944–6945; b) J. Elbaz, M. Moshe, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 3834–3837; *Angew. Chem.* 2009, 121, 3892–3895; c) Z. Liu, W. Zhang, L. Hu, H. Li, S. Zhu, G. Xu, *Chem. Eur. J.* 2010, 16, 13356–13359.
- [9] a) H. D. Abruna, P. Denisevich, M. Umana, T. J. Meyer, R. W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103, 1–5; b) P. Denisevich, K. W. Willman, R. W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103, 4727–4737.
- [10] a) O. Azzaroni, M. Álvarez, A. I. Abou-Kandil, B. Yameen, W. Knoll, *Adv. Funct. Mater.* 2008, 18, 3487–3496; b) O. Azzaroni, M. Mir, M. Álvarez, L. Tiefenauer, W. Knoll, *Langmuir* 2008, 24, 2878–2883; c) D. Rong, H.-G. Hong, Y. I. Kim, J. S. Krueger, J. E. Mayer, T. E. Mallouk, *Coord. Chem. Rev.* 1990, 97, 237–248; d) Y. Liu, A. Offenhäusser, D. Mayer, *Bioelectrochemistry* 2010, 77, 89–93.
- [11] a) Y. Liu, A. Offenhäusser, D. Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 2595–2598; *Angew. Chem.* 2010, 122, 2649–2652; b) Y. Liu, B. Wolfrum, M. Hüskes, A. Offenhäusser, E. Wang, D. Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 4029–4032; *Angew. Chem.* 2013, 125, 4121–4124.
- [12] A. K. Sharma, J. M. Heemstra, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 12426–12429.
- [13] H. Urata, K. Nomura, S.-i. Wada, M. Akagi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 360, 459–463.
- [14] a) R. J. White, N. Phares, A. A. Lubin, Y. Xiao, K. W. Plaxco, *Langmuir* 2008, 24, 10513–10518; b) S. J. P. Canete, W. Yang, R. Y. Lai, *Chem. Commun.* 2009, 4835–4837.
- [15] a) R. Nutiu, J. M. Y. Yu, Y. Li, *ChemBioChem* 2004, 5, 1139–1144; b) L. Feng, Z. Zhang, J. Ren, X. Qu, *Biosens. Bioelectron.* 2014, 62, 52–58.
- [16] J. J. Sanchez, G. Monaghan, C. Børsting, G. Norbury, N. Morling, H. B. Gaspar, *Ann. Hum. Genet.* 2007, 71, 336–347.
- [17] X.-J. Xing, X.-G. Liu, H. Yue, Q.-Y. Luo, H.-W. Tang, D.-W. Pang, *Biosens. Bioelectron.* 2012, 37, 61–67.

- [18] a) M. W. Gorman, E. O. Feigl, C. W. Buffington, *Clin. Chem.* **2007**, *53*, 318–325; b) M. F. Baganha, A. Pêgo, M. A. Lima, E. V. Gaspar, A. R. Cordeiro, *Chest* **1990**, *97*, 605–610.
- [19] a) H. Li, D. Li, J. Liu, Y. Qin, J. Ren, S. Xu, Y. Liu, D. Mayer, E. Wang, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2594–2596; b) L. Feng, A. Sivanesan, Z. Lyu, A. Offenbässer, D. Mayer, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *66*, 62–68.
- [20] J. Zhang, L. Wang, D. Pan, S. Song, C. Fan, *Chem. Commun.* **2007**, 1154–1156.
- [21] a) E. J. Cho, L. Yang, M. Levy, A. D. Ellington, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2022–2023; b) K. Hsieh, Y. Xiao, H. T. Soh, *Langmuir* **2010**, *26*, 10392–10396; c) X. Chen, L. Ge, B. Guo, M. Yan, N. Hao, L. Xu, *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *58*, 48–56; d) K.-J. Huang, Y.-J. Liu, H.-B. Wang, Y.-Y. Wang, Y.-M. Liu, *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *55*, 195–202; e) I. Palchetti, M. Mascini, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 3103–3114.
- [22] a) M. S. Coleman, J. Donofrio, J. J. Hutton, L. Hahn, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 1619–1626; b) H. A. Simmonds, R. J. Levinsky, D. Perrett, D. R. Webster, *Biochem. Pharmacol.* **1982**, *31*, 947–951.

Eingegangen am 12. März 2015
Online veröffentlicht am 8. Mai 2015