

Potentialgestützte DNA-Immobilisierung als Voraussetzung für eine schnelle und kontrollierte Bildung von DNA-Monoschichten

Daliborka Jambrec, Magdalena Gebala, Fabio La Mantia und Wolfgang Schuhmann*

Abstract: Die Immobilisierung von DNA-Einzelsträngen auf Goldoberflächen kann hochreproduzierbar mithilfe einer geeigneten Potentialpulssequenz substanziell beschleunigt werden. Die gewünschte Oberflächenbelegung mit einzelsträngiger DNA lässt sich innerhalb weniger Minuten erhalten. Entscheidend ist das Verständnis der zugrundeliegenden Prozesse. Ein von uns vorgeschlagenes Modell berücksichtigt sowohl die Rolle der Ionen in der Umgebung der elektrifizierten Grenzfläche und der DNA-Stränge als auch die Distanz, in der das angelegte Potential einen Einfluss auf die DNA-Einzelstränge in der Nähe der elektrifizierten Grenzfläche hat. Auch die Verschiebung des Nullladungspotentials der Elektrode infolge der Oberflächenmodifizierung durch die DNA-Stränge wird berücksichtigt und ist von besonderer Bedeutung. Die Kontrolle der Oberflächenbedeckung der Einzelstrang-DNA, in Kombination mit der erreichten Geschwindigkeit und Reproduzierbarkeit, ist eine Voraussetzung für verbesserte DNA-basierte Bioassays.

Der Nachweis von DNA-Hybridisierung bildet die Grundlage der Mehrzahl aller DNA-basierten Biosensoren und Bioassays mit einer Vielzahl von Anwendungen in der medizinischen Diagnostik, der Forensik, der Genomik und der Umweltanalytik.^[1] Der Nachweis der Hybridisierung mithilfe elektrochemischer Methoden ist dabei von steigender Bedeutung,^[2] besonders da der Einsatz von elektrochemischen DNA-Hybridisierungsassays markierungsfreie Verfahren mit hoher Empfindlichkeit durch elektrochemische Verstärkungsschritte erlaubt.^[3]

Die elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) ermöglicht eine markierungsfreie Detektion von DNA-Hybridisierung. Durch eine sequenzielle Analyse aller Schritte während des Aufbaus des DNA-Assays liefert die EIS ver-

tiefe Einblicke in die Prozesse an der Elektrode/Elektrolyt-Grenzfläche.^[4] Der erste Schritt beim Aufbau einer DNA-modifizierten Elektrode ist die Immobilisierung der Erkennungs-DNA (pDNA) auf einer Goldelektrodenoberfläche unter Bildung von Gold-Schwefel-Bindungen. Die pDNA-modifizierte Elektrode wird dann weiter mit einem Alkylthiol, typischerweise Mercaptohexanol (MCH), inkubiert, um einerseits unspezifisch gebundene DNA zu entfernen und andererseits die pDNA-Stränge von der Elektrodenoberfläche aufzurichten, indem unbelegte Bereiche auf der Goldoberfläche bedeckt werden. Schließlich wird die DNA/MCH-modifizierte Elektrode zur Bindung der im Hybridisierungsprozess komplementären Ziel-DNA (tDNA) verwendet.^[5]

Die Bildung der pDNA-Schicht, d. h. die Oberflächenbelegung und die Zugänglichkeit der spezifischen pDNA auf der Elektrodenoberfläche, beeinflusst signifikant den späteren Hybridisierungsprozess. Daher sind gut definierte, reproduzierbare und kontrollierbare pDNA-modifizierte Oberflächen eine Voraussetzung für die Entwicklung von optimierten DNA-Sensoren.^[5,6]


Das Verhalten der DNA in der Umgebung der elektrifizierten Grenzfläche kann durch das an die Elektrode angelegte Potential verändert werden.^[7,8] Dieser Prozess ist allerdings noch immer nicht im Detail verstanden. Die Gruppen um Bartlett und Sosnowski^[8] trugen zum Verständnis der potentialgestützten Hybridisierung und potentialinduzierten Denaturierung von DNA bei und untersuchten die Auswirkungen des angelegten Potentials z. B. auf den pH-Wert oder auf Temperaturänderungen. Die Wirkung von Potentialpulsen auf die Kinetik der DNA-Hybridisierung und der Beitrag von unerwünschten elektrostatischen Wechselwirkungen mit der immobilisierten DNA-Schicht wurden diskutiert.^[9] Hinsichtlich des Einflusses des elektrischen Feldes auf die bereits immobilisierte DNA wird berichtet, dass Potentiale positiver als das Nullladungspotential (potential of zero charge, pzc) die gebundenen DNA-Stränge in Richtung der Oberfläche bewegen; negativere Potentiale hingegen begünstigen eine aufrechte Anordnung der immobilisierten pDNA-Stränge.^[10] Ähnliches wird für das angelegte Potential während der Immobilisierung berichtet. Je nach angelegtem Potential stoßen sich die pDNA-Stränge ab oder ziehen sich an, vermutlich durch Ladungswechselwirkungen der negativ polarisierten pDNA-Stränge. Die Potentialwerte für die gepulste Deposition wurden jedoch experimentell bestimmt oder bestenfalls auf das pzc der unbehandelten Elektrode bezogen (pzc (bare)).^[11]

Wir zeigen hier, dass der Einfluss der elektrostatischen Anziehung/Abstoßung allein nicht ausreicht, um die Prozesse an der DNA-modifizierten elektrifizierten Grenzfläche zu erklären. Wir schlagen dagegen ein neues Modell für die

[*] D. Jambrec, Prof. Dr. W. Schuhmann
Analytische Chemie – Zentrum für Elektrochemie (CES)
Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstraße 150, 44780 Bochum (Deutschland)
E-Mail: wolfgang.schuhmann@rub.de

Dr. M. Gebala
Stanford School of Medicine; Biochemistry
Beckman Center (USA)

Dr. F. La Mantia
Semiconductor and Energy Conversion –
Zentrum für Elektrochemie (CES)
Ruhr-Universität Bochum (Deutschland)

 Hintergrundinformationen (experimenteller Teil, Beschleunigung der MCH-Immobilisierung auf Elektrodenoberflächen, Bestimmung des Nullladungspotentials, Hybridisierungsausbeute, Reproduzierbarkeit) und ORCIDs der Autoren zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201506672> zu finden.

potentialgestützte Immobilisierung von pDNA auf Goldoberflächen vor: Dieses Modell berücksichtigt sowohl die Rolle der Ionen in der Umgebung der elektrifizierten Grenzfläche und der DNA-Stränge als auch die Distanz, über die das angelegte Potential einen Einfluss auf die DNA-Stränge in der Nähe der elektrifizierten Grenzfläche hat. Auch die Modulation des pzc der Elektrode, die aus der Oberflächenmodifizierung durch die pDNA-Stränge resultiert, wird von dem Modell berücksichtigt und hat sich als besonders wichtig herausgestellt. Die Verschiebung des pzc erfordert eine präzise Auswahl der anzulegenden Pulsopotentiale, um Kontrolle über den pDNA-Immobilisierungsprozess zu erhalten. Die Erkenntnisse aus diesem Modell ermöglichen die Entwicklung eines reproduzierbaren, potentialgestützten pDNA-Immobilisierungsverfahrens, das sehr viel effizienter und schneller als die derzeitige Inkubationsmethode ist.

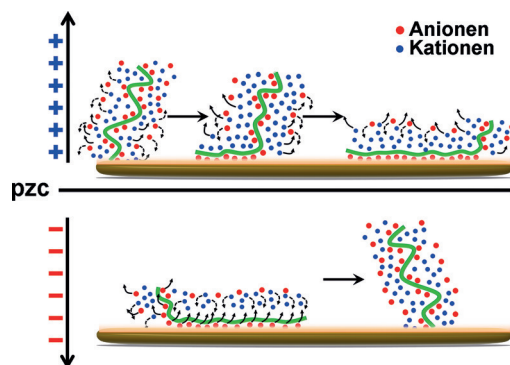
Auch wenn pDNA-modifizierte Oberflächen die Grundlage für mögliche Anwendungen bilden, ist der Mechanismus der pDNA-Immobilisierung noch nicht vollständig aufgeklärt. Die DNA-Immobilisierung ist ein komplexer Prozess und abhängig von zahlreichen Parametern, wie der Ionenstärke, der Stranglänge oder der Wertigkeit der Ionen, die die Ladung der DNA-Stränge kompensieren.^[12] Unterschiedliche angelegte Potentiale während des Prozesses stellen einen zusätzlichen Parameter dar, der die Komplexität weiter erhöht. Es ist bekannt, dass bestimmte Potentiale (bezogen auf das pzc) eine Anziehung oder Abstoßung der pDNA an der elektrifizierten Grenzfläche hervorrufen. Die Aussage, dass die DNA selbst von der positiv geladenen Elektrode angezogen oder von einer negativ geladenen Elektrode abgestoßen wird, ist unserer Ansicht nach jedoch nicht gerechtfertigt.

Um eine dichte Bedeckung und hohe Geschwindigkeiten zu erreichen, erfolgt die pDNA-Immobilisierung häufig in Lösungen mit hoher Ionenstärke. Die Debye-Länge, welche die Abnahme des elektrischen Potentials in der Elektrolytlösung vor der Elektrode beschreibt, verringert sich stark mit der Ionenstärke, und folglich ist bei hohen Ionenstärken bereits ein erheblicher Potentialabfall in der nächsten Umgebung der Elektrode zu verzeichnen.^[13] So wird auch nur ein kleiner Anteil eines DNA-Strangs in der Umgebung der elektrifizierten Oberfläche vom angelegten Potential beeinflusst. DNA ist ein mehrfach negativ geladener Polyelektrolyt, der mit den in der Elektrolytlösung vorhandenen Ionen wechselwirkt, sodass die Ladung weitestgehend kompensiert wird. Dieses Phänomen, das so genannte DNA-Screening, wurde erstmals als Gegenionenkonensation von Manning beschrieben.^[14] Im Fall von Salzen aus einwertigen Ionen wird die Ladung am DNA-Strang durch kondensierte Gegenionen, die sich um den DNA-Strang anreichern, sowie durch Ionen in einer zweiten Schicht kompensiert.^[15] Durch das Fehlen einer effektiven Nettoladung kann also ein DNA-Strang nicht direkt durch das angelegte Potential beeinflusst werden, wie im Allgemeinen behauptet wird. Hieraus ergibt sich die Frage, ob auch ungeladene Moleküle durch eine geeignete Folge von Potentialpulsen beeinflusst werden können. Überraschenderweise kann durch Potentialpulse, die an eine Goldelektrode in Gegenwart von MCH angelegt werden, die

Bildung einer kompakten MCH-Monolage erheblich beschleunigt werden (Hintergrundinformationen (SI), Sektion S2).

Zwar kann die Wirkung angelegter Potentiale auf MCH oder DNA-Stränge unterschiedlich sein, allerdings zeigen diese Ergebnisse, dass die angelegten Potentialpulse nicht zu einer Abstoßung oder Anziehung der DNA-Stränge führen, sondern zu einer der Ionen in der Nähe der elektrifizierten Grenzfläche. Während der Aufladung der elektrischen Doppelschicht an der Elektrode müssen sich die Ionen offensichtlich sowohl in der inneren und äußeren Helmholtz-Schicht als auch in der Diffusionsschicht neu anordnen. Durch Änderung des elektrischen Potentials zu negativen Werten bezogen auf das pzc bewegen sich die Kationen also in Richtung der elektrifizierten Grenzfläche, während die Anionen in Richtung der Lösung wandern oder umgekehrt. Dieser Effekt geht offenbar über die Debye-Länge vor der elektrifizierten Grenzfläche hinaus. Wird zwischen diesen beiden Potentialbedingungen hin und her geschaltet, wird ein Rühreffekt induziert, der die Moleküle in der Nähe der Elektrodenoberfläche inklusive ihrer Ionenwolken (oder im Falle von ungeladenen Molekülen der Solvathülle) bewegt (Schema 1).

Wegen der kurzen Debye-Länge wird im Mittel nur ein kleiner Teil eines DNA-Stranges in Richtung der geladenen Elektrodenoberfläche bewegt. Damit wird der restliche Teil des DNA-Stranges, der sich außerhalb des Einflusses der Ladung an der elektrifizierten Grenzfläche befindet, näher an



Schema 1. Vorgeschlagenes Modell für einen potentialgestützten DNA-Immobilisierungsprozess. Das Anlegen von positiven Potentialen relativ zu pzc verursacht eine Wanderung der Anionen in Richtung der Elektrodenoberfläche und der Kationen in Richtung der Lösung, sodass ein „Rühreffekt“ induziert wird. Ein kleiner Anteil der kondensierten Kationen, welche die DNA in der Nähe der Elektrode umgeben, wird abgestoßen. Damit verbunden ist eine Verringerung der Ladungskompensation des DNA-Stranges. Ein geringer Teil des DNA-Strangs wird in Richtung der Oberfläche geschoben und bringt damit den restlichen DNA-Strang ebenfalls näher an die Elektrode heran. Hieraus resultiert eine schrittweise Annäherung des DNA-Stranges, bis dieser flach auf der Elektrodenoberfläche liegt. Beim Anlegen von negativen Potentialen relativ zu pzc hingegen werden die Anionen in der Umgebung der Elektrode zusammen mit der partiell negativ geladenen DNA abgestoßen, und die DNA-Stränge werden in eine aufrechte Orientierung gezwungen. Wiederholtes Wechseln zwischen positiven und negativen Potentialen bewirkt daher einen Rühreffekt, der neue DNA-Stränge in die Nähe der Elektrodenoberfläche bringt und damit die Immobilisierung beschleunigt.

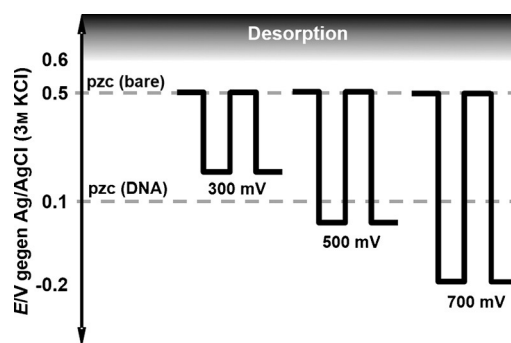
die Elektrodenoberfläche gebracht. Schließlich wird durch Wiederholung dieses Prozesses nach und nach der vollständige DNA-Strang zur Elektrodenoberfläche hingezogen. Dieser Prozess findet innerhalb eines positiven Potentialpulses statt, der nur eine Dauer von wenigen Millisekunden hat. Der reißverschlussartigen Anziehung eines kompletten DNA-Stranges in Richtung der Elektrodenoberfläche folgt ein Potentialsprung zu einem Potential, das negativ bezogen auf das pzc ist. Wenn ein geeignetes negatives Potential angelegt wird, werden die Anionen in der Nähe der Elektrode zusammen mit dem DNA-Gerüst, das eine negative Nettoladung trägt, in Richtung des Volumens des Elektrolyten abgestoßen. Der DNA-Strang wird in eine aufrechte Orientierung gebracht, sodass Platz für die Annäherung neuer DNA-Stränge auf der Oberfläche geschaffen wird.

Unabhängig von der Orientierung des DNA-Strangs werden wegen der reißverschlussartigen Anziehung des kompletten DNA-Stranges durch die Goldoberfläche bei ausreichend langen Potentialpulsdauern die Ankergruppen (Thiol oder Disulfid) immer an der Goldoberfläche lokalisiert, sodass die Bildung der Gold-Thiol-Bindung erleichtert wird. Wiederholte Wechsel zwischen positiven und negativen Potentialen erhöhen den Anteil an immobilisierter DNA. Dies lässt vermuten, dass die Potentialpulse durch Ionenbewegung einen Rühreffekt induzieren und dass so die Annäherung des DNA-Strangs an die Goldoberfläche erleichtert wird.

Das vorgeschlagene Modell erklärt die Rolle und die Bedeutung des Wechsels zwischen positiven und negativen Potentialen bezogen auf das pzc während der potentialgestützten Immobilisierung der DNA. Eine essenzielle Frage ist jedoch, welcher Wert für das pzc während der Immobilisierung angenommen werden muss. In vorgangenen Arbeiten wurde vorgeschlagen, die Manipulation der DNA bei Potentialen durchzuführen, die sich auf das pzc der unbehandelten Elektrode beziehen. Es ist jedoch bekannt, dass das pzc von Ionenadsorption und Oberflächenmodifikationen abhängt.^[16] Auch ist das pzc von polykristallinem Gold empfindlich gegen Oberflächenverunreinigungen.^[17] Wir haben daher das pzc einer unbehandelten (pzc) und einer DNA-modifizierten Elektrode (pzc(DNA)) in der gleichen Lösung, in der die Immobilisierung durchgeführt wurde, bestimmt.

Nach dem Gouy-Chapman-Stern-Modell der Doppelschicht ergibt sich die differenzielle Kapazität (C_d) aus einem Beitrag für die Kapazität der Helmholtz-Schicht (C_H) und einem für die Kapazität der diffusen Schicht (C_{ddl}). Während C_H weder von der Ionenstärke noch vom Potential abhängt, haben beide Parameter unter bestimmten Bedingungen Einfluss auf C_{ddl} . Bei sehr geringen Ionenstärken und bei Potentialen nahe dem pzc wird C_d hauptsächlich durch den Beitrag von C_{ddl} bestimmt und erreicht ein Minimum am pzc (siehe auch SI, Sektion 3, für die detaillierte Beschreibung der pzc-Bestimmung). Wir zeigen, dass sich wegen der spezifisch gebundenen Anionen in Gegenwart von DNA das pzc in Richtung negativerer Potentiale verschiebt. Zur Vorhersage von optimalen Potentialen für die DNA-Immobilisierung ist es daher wichtig, diese Verschiebung zu berücksichtigen. Das pzc verschiebt sich von 0.5 V für pzc(bare) zu 0.1 V für pzc(DNA).

Um eindeutig die Bedeutung der Wahl eines geeigneten Immobilisierungspotentials mit ausreichender Amplitude aufzuzeigen, haben wir drei Potentialpulsprofile verglichen. Während für die drei Messungen das obere Potential konstant gehalten wurde (+0.5 V entsprechend pzc(bare)), wurde das untere Potential variiert, sodass sich Pulssequenzen mit unterschiedlicher Potentialdifferenz (ΔE) von 0.3, 0.5 und 0.7 V ergaben. In Schema 2 werden die Potentialdifferenzen relativ zu pzc(bare) und pzc(DNA) gezeigt. Für $\Delta E = 0.3$ V (Pulsprofil: +0.5/+0.2 V) sind beide Potentiale immer positiv



Schema 2. Ausgewählte Potentialpulsprofile relativ zu pzc(bare) und pzc(DNA): $\Delta E = 0.3$ V (Pulsprofil +0.5/+0.2 V), $\Delta E = 0.5$ V (Pulsprofil +0.5/0 V) und $\Delta E = 0.7$ V (Pulsprofil +0.5/−0.2 V).

bezogen auf pzc(DNA). Für $\Delta E = 0.5$ V (Pulsprofil: +0.5/0 V) liegen die Pulse zwischen positiven und leicht negativen Potentialen, während für $\Delta E = 0.7$ V (Pulsprofil: +0.5/−0.2 V) sowohl das positive als auch das negative Potential eine vergleichbare Amplitude relativ zu pzc(DNA) aufweisen.

Sind beide angelegten Potentiale positiv gegenüber pzc(DNA) (Pulsprofil +0.5/+0.2 V), liegen die DNA-Stränge nach einer anfänglichen Immobilisierung flach auf der Elektrodenoberfläche. Nach Immobilisierung einer geringen Zahl an DNA-Strängen verschiebt sich das pzc von pzc(bare) nach pzc(DNA). Dadurch wird der Rühreffekt verringert und so die DNA-Adsorption auf der Elektrodenoberfläche erleichtert. Die Elektrodenoberfläche ist durch die anfänglich immobilisierten pDNA-Stränge blockiert, und die Annäherung weiterer DNA-Stränge ist gehindert.

Dies erklärt die geringe Effizienz der Immobilisierung für dieses Potentialpulsprofil. Ein Maß für die Effizienz ist die – in diesem Fall nur geringe – Erhöhung des Durchtrittswiderstands (R_{ct}) im Vergleich zu dem der MCH-modifizierten Elektrode (Abbildung 1, ○). R_{ct} wurde aus den faradayschen elektrochemischen Impedanzspektren in Gegenwart von äquimolaren Konzentrationen an $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ bestimmt. Ein vergleichbares Ergebnis wird für das Pulsprofil +0.5/0 V (Abbildung 1, ◆) erhalten. Obwohl ΔE höher ist, ist das angelegte negative Potential offensichtlich nicht ausreichend niedrig, um die anfänglich gebundenen pDNA-Stränge abzustößen. Daher ist die Annäherung weiterer Stränge gehindert, und es werden schlechte Immobilisierungsausbeuten beobachtet.

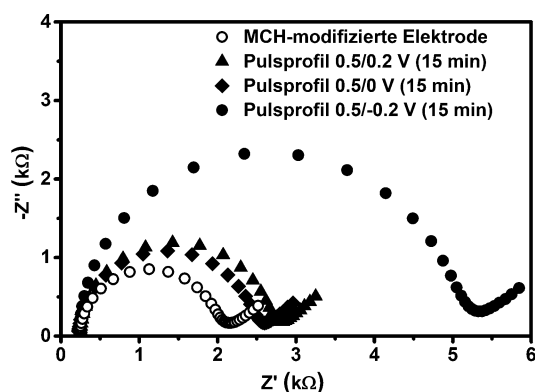


Abbildung 1. Vergleich der Auswirkungen der unterschiedlichen angewendeten Pulsprofile auf R_{ct} mittels EIS. Die Nyquist-Plots zeigen repräsentative Werte von R_{ct} für eine MCH-modifizierte Elektrode (○) und eine pDNA/MCH-modifizierte Elektrode, die mit den verschiedenen Pulsprofilen erhalten wurden: $\Delta E = 0.3$ V (Pulsprofil +0.5/+0.2 V; ▲); $\Delta E = 0.5$ V (Pulsprofil +0.5/0 V; ◆), und $\Delta E = 0.7$ V (Pulsprofil +0.5/-0.2 V; ●). Experimentelle Bedingungen der pDNA-Immobilisierung: 10 mM Phosphatpuffer (PB), 450 mM K_2SO_4 , mit 1 μ M pDNA versetzt; MCH-Immobilisierung: Inkubation über Nacht in 10 mM MCH-Lösung, mit 10 mM PB versetzt, 20 mM K_2SO_4 ; EIS: 10 mM PB, 20 mM K_2SO_4 mit äquimolaren Konzentrationen an $K_4[Fe(CN)_6]$ und $K_3[Fe(CN)_6]$ (5 mM); DC-Potential: +220 mV gegen Ag/AgCl/3 M KCl; AC-Störung mit 10 mV_{pp}-Amplitude. Frequenzbereich von 30 kHz bis 10 mHz.

Eine weitere Erhöhung der Potentialdifferenz auf $\Delta E = 0.7$ V führt zu einer deutlichen Verbesserung der Immobilisierungsausbeute für pDNA (Abbildung 1, ●). Dies ist auf eine erhöhte Ionenbewegung während der Potentialänderung zurückzuführen, wodurch der Rühreffekt verstärkt wird. Hierbei ist zu beachten, dass das absolute Potential stets höher ist, obwohl der Potentialabfall ausgeprägter bei höheren angelegten Potentialen ist.

Die Bindung von DNA an Trägermaterialien durch potentialgestützte Immobilisierung erfolgt durch eine sequenzielle, reißverschlussartige Anziehung der DNA-Stränge in Richtung der elektrifizierten Grenzfläche bei positiven Potentialen relativ zu pzc (DNA). Für eine möglichst hohe Immobilisierungseffizienz muss die Dauer, für die ein bestimmtes Potential angelegt ist, lang genug sein, um den DNA-Strang unabhängig von seiner Orientierung vollständig, einschließlich der Ankergruppe, auf die Elektrodenoberfläche zu ziehen. Rant et al.^[18] berichten, dass für den Übergang eines fixierten DNA-Strangs von einer liegenden Orientierung in eine aufrechte nur etwa 250 μ s ausreichen. Für die Bestimmung einer optimalen Potentialdauer und somit für das Erreichen einer möglichst hohen Immobilisierungseffizienz haben wir den Einfluss verschiedener Pulsdauern auf die Immobilisierungseffizienz untersucht (Abbildung 2). Die pDNA-Immobilisierung wurde 5 min mit einem Pulsprofil von +0.5/-0.2 V und Pulsdauern von jeweils 1, 10 und 100 ms durchgeführt. Die Verringerung der Pulsdauer erhöht die Anzahl an Zyklen während der gesamten 5-minütigen Immobilisierungszeit von 1500 Zyklen bei 100 ms Pulsdauer auf 15000 bei 10 ms und 150000 bei 1 ms. Die höchste pDNA-Immobilisierungsausbeute, d.h. der höchste Wert für R_{ct} , wurde bei einer Pulsdauer von 10 ms beobachtet. Diese Zeit

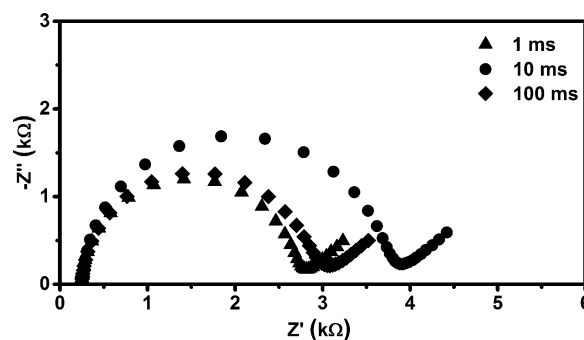


Abbildung 2. Einfluss der Potentialpulsdauern auf die Immobilisierungseffizienz. Für die EIS-Messungen wurden pDNA/MCH-modifizierte Elektroden verwendet. Die Immobilisierung erfolgte 5 min mit einem Pulsprofil von +0.5/-0.2 V und Pulsdauern von 1 (▲), 10 (●) oder 100 ms (◆). Experimentelle Bedingungen siehe Abbildung 1.

reicht offenbar aus, um die DNA-Stränge vollständig in Richtung der Grenzfläche zu ziehen und die Bildung der AuS-Bindung zu ermöglichen. Gleichzeitig ist diese Zeit aber kurz genug, um eine ausreichende Anzahl an Zyklen zu gewährleisten.

Im Anschluss an die Optimierung haben wir die potentialgestützte Immobilisierungsmethode mit der im Allgemeinen angewendeten Inkubationsmethode verglichen. Bei der Immobilisierung mithilfe der Inkubationsmethode wird die Fixierung weiterer pDNA-Stränge mit zunehmender Menge immobilisierter pDNA an der Elektrodenoberfläche energetisch ungünstig, da die gegenseitige elektrostatische Abstoßung der DNA-Stränge zunimmt. Daher dauert die Inkubationsmethode je nach gewünschter DNA-Bedeckung von mehreren Stunden bis zu einigen Tagen. Die hier vorgeschlagene potentialgestützte Immobilisierungsmethode hat diese Limitierung nicht und kann damit den Immobilisierungsprozess deutlich beschleunigen, indem eine Pulsmodulation des an der Elektrode angelegten Potentials während der Immobilisierung einen Rühreffekt hervorruft.

Die Verwendung des Pulsprofils mit Potentialen von +0.5/-0.2 V (Pulsdauer 10 ms) führt zu einer Oberflächenbedeckung von $(6.85 \pm 0.47) \times 10^{12}$ Moleküle cm^{-2} innerhalb von 15 min (Abbildung 3), ein Wert, der im optimalen Bereich für die Anwendung von DNA-Sensoren liegt.^[19,20] Niedrigere Bedeckungen verringern die Empfindlichkeit der DNA-Hybridisierungssensoren, und höhere Werte gelten als nachteilig für die Hybridisierung. Eine Abhängigkeit des Verhältnisses von R_{ct} der hybridisierten und der pDNA/MCH-modifizierten Oberfläche von der Pulsimmobilisierungszeit ist in Sektion 4 der Hintergrundinformationen gezeigt.

Mithilfe der Inkubationsmethode konnten nach 15 min nur ein vernachlässigbarer Anstieg von R_{ct} und somit eine geringe Immobilisierungsausbeute für die pDNA/MCH-modifizierte Elektrode gegenüber derjenigen für die MCH-modifizierte Elektrode beobachtet werden (Abbildung 3a, ▲). Zweistündige Immobilisierung führte zu einer Bedeckung von $(4.65 \pm 0.26) \times 10^{12}$ Moleküle cm^{-2} (Abbildung 3a, ◆) – 47% geringer als bei 15 min Immobilisierung mithilfe der potentialgestützten Methode. Eine Erhöhung der Inkubati-

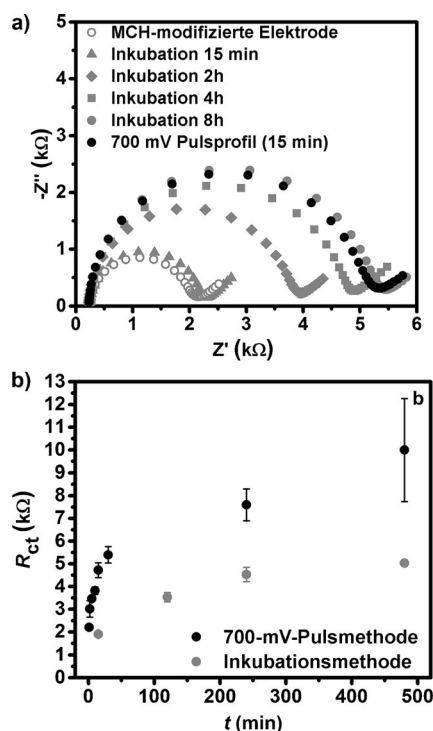


Abbildung 3. Vergleich der Immobilisierung von pDNA mithilfe der potentialgestützten Methode und der Inkubationsmethode. a) Nyquist-Plots mit repräsentativen R_{ct} -Werten für eine MCH-modifizierte Elektrode (○) und pDNA/MCH-modifizierte Elektroden nach DNA-Inkubation für 15 min (▲), 2 h (◆), 4 h (■) und 8 h (●) und solche nach Immobilisierung unter Nutzung des +0.5/-0.2-V-Pulsprofils (Pulsdauer 10 ms) für 15 min (●). Experimentelle Bedingungen siehe Abbildung 1. b) Vergleich der pDNA-Immobilisierungsgeschwindigkeit unter Nutzung der Inkubationsmethode (●) und des +0.5/-0.2-V-Pulsprofils (Pulsdauer 10 ms; ●).

onszeit verlangsamt die pDNA-Immobilisierung wegen der elektrostatischen Abstoßung zwischen den pDNA-Strängen erheblich (Abbildung 3b). pDNA-Immobilisierung per Inkubation benötigt daher mindestens 4–8 h, um eine vergleichbare Bedeckung wie bei der potentialgestützten Immobilisierung innerhalb von 15 min zu erreichen (Abbildung 3). Potentialgestützte pDNA-Immobilisierung verringert damit die Zeit für das Erreichen einer optimalen DNA-Oberflächenbedeckung um etwa einen Faktor 30. Darüber hinaus zeigen wir, dass mit der vorgeschlagenen Methode auch viel dichtere pDNA-Bedeckungen realisiert werden können, wie Abbildung 3 zu entnehmen ist. Dichte DNA-Bedeckungen können für Anwendungen wie die Untersuchungen von Proteinen für die DNA-Reparatur sehr vorteilhaft sein.^[21]

Die potentialgestützte pDNA-Immobilisierung führt zu einer sehr gut reproduzierbaren Immobilisierung, mit der Möglichkeit, durch die Anzahl der Potentialpulse die gewünschte pDNA-Bedeckung zu steuern. Der R_{ct} -Wert nach der pDNA-Immobilisierung, der in Bezug zur Oberflächenbedeckung steht, wurde mit einer Standardabweichung < 5 % bestimmt (SI, Sektion 5).

Wir glauben, dass das Verständnis des Verhaltens von pDNA an einer elektrifizierten Elektrode eine grundlegende

Voraussetzung für eine reproduzierbare und schnelle pDNA-Immobilisierungsstrategie ist. Offenbar führen die sich während der Immobilisierung ändernden Eigenschaften der elektrifizierten Grenzfläche zu Effekten, die bei der Immobilisierung berücksichtigt werden müssen. Beispielsweise ist die Änderung des pzc in Gegenwart von immobilisierter DNA sehr wichtig für die Auswahl der geeigneten Pulsopotentiale. Auch ist wegen der kurzen Debye-Länge bei hohen Ionenstärken die Anziehung oder Abstoßung des Polyelektrolyten DNA selbst durch das elektrische Feld vor der elektrifizierten Grenzfläche sehr unwahrscheinlich. Wir schlussfolgern daher, dass Ionenbewegung und der dadurch hervorgerufene Rühreffekt in der elektrischen Doppelschicht der Grund für die beschleunigte Immobilisierung sind. Die vorgeschlagene potentialgestützte Immobilisierungsstrategie unter Verwendung von rational gewählten Pulsopotentialen kann sich zu einer neuen Standardmethode für die pDNA-Immobilisierung entwickeln, um sehr gut reproduzierbare DNA-modifizierte Oberflächen mit kontrollierter Bedeckung in kurzer Zeit herstellen zu können. Dieses ist eine Voraussetzung für die Entwicklung von hochempfindlichen und reproduzierbaren DNA-Hybridisierungsassays mit elektrochemischen Ausleseverfahren.

Danksagung

Die Arbeiten wurden von der DFG im Rahmen des Exzellenzclusters RESOLV (EXC1069) sowie dem BMBF im Rahmen der Projekte „PathogenDirekt“ (FKZ: 0315823B) und „Uripoc“ (FKZ: 03SHWB033) unterstützt. Wir danken K. Slizberg für die Entwicklung der automatischen Elektrodenpoliermaschine.

Stichwörter: Grenzflächen · DNA · Elektrochemie · Immobilisierung · Potentialpulse

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15064–15068
Angew. Chem. **2015**, *127*, 15278–15283

- [1] a) B. C. Janegitz, J. Cancino, V. Zucolotto, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *14*, 378–389; b) *Series in Sensors* (Hrsg.: D. Nikolelis, T. Varzakas, A. Erdem, G.-P. Nikoleli), CRC, Boca Raton, **2013**; c) C. L. Manzanarez-Palenzuela, B. Martín-Fernández, M. S.-P. López, B. López-Ruiz, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2015**, *66*, 19–31.
- [2] M. Riedel, J. Kartchemnik, M. J. Schöning, F. Lisdat, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 7867–7874.
- [3] a) J. Wang, A.-N. Kawde, M. Musameh, *Analyst* **2003**, *128*, 912–916; b) M. Gebala, G. Hartwich, W. Schuhmann, *Faraday Discuss.* **2011**, *149*, 11–22.
- [4] F. Lisdat, D. Schäfer, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1555–1567.
- [5] M. Gebala, W. Schuhmann, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 14933–14942.
- [6] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1192–1199.
- [7] a) U. Rant, K. Arinaga, S. Fujita, N. Yokoyama, G. Abstreiter, M. Tornow, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2441–2445; b) X. Quan, A. Heiskanen, M. Tenje, A. Boisen, *Electrochem. Commun.* **2014**, *48*, 111–114.

- [8] a) J. Hassmann, A. Misch, J. Schüle, J. Krause, B. Graßl, P. Müller, W. Bertling, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 857–863; b) J. Schüle, *Talanta* **2002**, *56*, 875–885; c) R. G. Sosnowski, E. Tu, W. F. Butler, J. P. O’Connell, M. J. Heller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 1119–1123; d) R. P. Johnson, R. Gao, T. Brown, P. N. Bartlett, *Bioelectrochemistry* **2012**, *85*, 7–13; e) R. P. Johnson, J. A. Richardson, T. Brown, P. N. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 14099–14107.
- [9] J. Tymoczko, W. Schuhmann, M. Gebala, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 21851–21858.
- [10] S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson, L. D. McPherson, A. B. Potter, E. M. Spain, M. J. Allen, M. G. Hill, *Langmuir* **1998**, *14*, 6781–6784.
- [11] C. Ge, J. Liao, W. Yu, N. Gu, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 53–58.
- [12] M. Revenga-Parra, T. García, F. Pariente, E. Lorenzo, C. Alonso, *Electroanalysis* **2011**, *23*, 100–107.
- [13] R. P. Johnson, N. Gale, J. A. Richardson, T. Brown, P. N. Bartlett, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1625.
- [14] G. Manning, *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 443–449.
- [15] S. Tomić, S. Babić, T. Vuletić, S. Krča, D. Ivanković, L. Griparić, R. Podgornik, *Phys. Rev. E* **2007**, *75*, 021905.
- [16] V. Kuznetsov, G. Papastavrou, *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 2673–2685.
- [17] T. A. Brunt, E. D. Chabala, T. Rayment, S. J. O’Shea, M. E. Welland in *Electrochemical nanotechnology, In-situ local probe techniques at electrochemical interfaces* (Hrsg.: W. J. Lorenz, W. Plieth), Wiley-VCH, Weinheim, New York, **1998**, S. 88–99.
- [18] U. Rant, K. Arinaga, M. Törnqvist, Y. W. Kim, R. R. Netz, S. Fujita, N. Yokoyama, G. Abstreiter, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 3666–3671.
- [19] a) P. Gong, R. Levicky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 5301–5306; b) D. Irving, P. Gong, R. Levicky, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 7631–7640; c) S. D. Keighley, P. Li, P. Estrela, P. Migliorato, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1291–1297.
- [20] A. B. Steel, T. M. Herne, M. J. Tarlov, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4670–4677.
- [21] a) T. Doneux, A. De Rache, E. Triffaux, A. Meunier, M. Steichen, C. Buess-Herman, *ChemElectroChem* **2014**, *1*, 147–157; b) C. G. Pheeny, A. R. Arnold, M. A. Grodick, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11869–11878.

Eingegangen am 19. Juli 2015

Online veröffentlicht am 21. Oktober 2015