

Impedimetrischer DNA-Nachweis – Schritte in Richtung sensorischer Anwendung

Marc Riedel, Julia Kartchemnik, Michael J. Schöning, Fred Lisdat*

Zusammenfassung

Diese Studie beschreibt einen labelfreien impedimetrischen Sensor auf der Grundlage von kurzen einzelsträngigen DNA-Erkennungselementen für den Nachweis von Hybridisierungsereignissen. Der Fokus der Arbeit liegt auf der Aufklärung des Einflusses der Ziel-DNA-Länge und der Erkennungssequenzposition auf die sensorische Leistungsfähigkeit. Die impedimetrischen Messungen werden in Anwesenheit des Redoxsystems Kaliumhexacyanoferrat (II/III) durchgeführt und zeigen einen Anstieg des Durchtrittswiderstandes nach der Hybridisierung mit komplementärer Ziel-DNA mit einer Nachweisgrenze im unteren nanomolaren Bereich. Nach der Hybridisierung kann die Regeneration des Sensors mit deionisiertem Wasser durch die Einstellung effektiver Konvektionsbedingungen erreicht werden und ermöglicht somit eine Wiederverwendbarkeit des Sensors. Untersuchungen zu längeren Ziel-DNA-Strängen mit einem zur Lösung exponierten Überhang demonstrieren die Anwendbarkeit des impedimetrischen Nachweises für längere Sequenzen. Allerdings resultiert eine zunehmende Überhanglänge in einer verringerten Durchtrittswiderstandsänderung. Um die Impedanzänderung für längere Ziel-DNA zu erhöhen, wird die Erkennungssequenzposition verändert, sodass ein kleiner Überhang zur Elektrode ausgerichtet ist. Die Ergebnisse legen nahe, dass DNA in direkter Nähe zur Elektrode einen größeren Einfluss auf das impedimetrische Signal besitzt als weiter entfernte DNA.

Abstract

This study describes a label-free impedimetric sensor based on short ssDNA recognition elements for the detection of hybridisation events. We concentrate on the elucidation of the influence of target length and recognition sequence position on the sensorial performance. The impedimetric measurements are performed in the presence of the redox system ferri-/ferrocyanide and show an increase in charge transfer resistance upon hybridisation of complementary ssDNA in the nanomolar range. After hybridisation, a sensor regeneration can be achieved with deionised water by adjustment of effective convection conditions, ensuring sensor reusability. By investigation of longer targets with overhangs exposed to the solution, we can demonstrate applicability of the impedimetric detection for longer ssDNA. However, a decreasing charge transfer resistance change (ΔR_{ct}) is found by extending the overhang. As a strategy to increase the impedance change for longer target strands, the position of the recognition sequence can be designed in a way that a small overhang is exposed to the electrode surface. These results suggest that DNA near the electrode possesses a larger impact on the impedimetric signal than DNA further away.

1. EINLEITUNG

Die Bioanalytik in den Bereichen Medizin, Nahrungsmittelindustrie und Umweltkontrolle strebt nach einfachen und schnellen DNA-Nachweissystemen mit einer hohen Präzision und geringen Kosten. Verschiedene Verfahren wurden bereits für die Erkennung von genetisch bedingten Krankheiten, die Identifikation pathogener Krankheitserreger, den Nachweis von Kontaminationen in Nahrungsmitteln sowie für forensische Studien

entwickelt. Neben bereits etablierten Nachweismethoden, wie z.B. PCR, werden ebenfalls DNA-Biosensoren mit zunehmendem Interesse während des letzten Jahrzehnts verfolgt (Drummond et al. 2003, Lucarelli et al. 2008, Sassolas et al. 2008). Das Funktionsprinzip von DNA-Biosensoren basiert gewöhnlich auf einem spezifischen Hybridisierungsereignis zwischen immobilisierter einzelsträngiger DNA (Fänger-ssDNA) und komplementärer Ziel-ssDNA in einer Probenlösung, welche die Umwandlung in ein ana-

lytisches Signal auslöst. Die Analyse von hybridisierungsinduzierten Veränderungen der Oberflächeneigenschaften ist bereits mit verschiedenen Signalwandlern wie piezoelektrischen (Kleo et al. 2011), optischen (Fan et al. 2008) und elektrochemischen Systemen (Drummond et al. 2003, Pänke et al. 2007) gezeigt worden. Insbesondere elektrochemische Biosensoren sind aufgrund der einfachen, billigen und tragbaren Anwendung vielversprechend für eine Verwendung in der „Point-of-care“-Diagnostik

* korrespondierender Autor

(Lucarelli et al. 2008). In verschiedenen Ansätzen ist bereits der Nachweis von Hybridisierungsreaktionen mit elektrochemischen Methoden gezeigt worden. Meistens wird für den Nachweisprozess des Hybridisierungsereignisses ein Redoxmolekül benötigt. Oft muss ein Redox- oder Enzymlabel an die komplementäre Zielsequenz gekoppelt werden, was zu einer hohen Sensitivität führt, jedoch die Anwendung teuer und zeitintensiv macht. Des Weiteren können ein Einfluss des Labels auf die DNA-Erkennung sowie eine variierende Ausbeute der DNA-Label-Kopplung nicht ausgeschlossen werden (Daniels & Pourmand 2007). Infolgedessen ist die Verwendung eines Labels für eine biosensorische "Point-of-care"-Anwendung nicht vorteilhaft.

Stattdessen wird ein labeltfreies Nachweissystem mit einer kosteneffektiven und schnellen Anwendbarkeit bevorzugt. Dabei resultiert die Bindung der komplementären Ziel-DNA am immobilisierten Fängerstrang in einer Veränderung der elektrochemischen Eigenschaften (wie z. B. Leitfähigkeit, Widerstand und Oberflächenpotenzial) der Elektrodenoberfläche (Berggren et al. 1999, Li et al. 2005). Dies macht die Verwendung eines Labels unnötig. Die große Anzahl an Studien, welche die Impedanzspektroskopie für Bindungsanalysen nutzen, zeigt das deutliche Interesse für die Verwendung dieser Technik zum Aufbau elektrochemischer Sensoren (Lisdät & Schäfer 2008, Park & Park 2009, Kafka et al. 2008). Dies kann ebenfalls auf die Möglichkeit der kompletten Oberflächencharakterisierung durch die Aufnahme von Spektren über einen weiten Frequenzbereich zurückgeführt werden.

Erste Bemühungen der Kombination von Impedanzspektroskopie und DNA-Nachweis fokussierten auf die Sensorsensitivität durch die Änderung der DNA-Immobilisierungsmethoden (Park et al. 2008, Peng et al. 2007), der Bestimmung des Einflusses des Fängertyps (Wang et al. 2008), der Oberflächenkonzentration (Keighley et al. 2008, Witte & Lisdät 2011) und der Verwendung von verschiedenen Oberflächenmaterialien (Kafka et al. 2008, Cai et al. 2004). Weitere Ansätze mit Impedanzspektroskopie zeigen das Potenzial zum Nachweis von „single base mismatches“ (Kafka et al.

2008, Wang et al. 2008) oder DNA-Protein-Interaktionen (Witte & Lisdät 2011, Tersch & Lisdät 2011). In den meisten Fällen werden eher kurze Zielstränge verwendet, welche für Proof-of-Principle-Betrachtungen gut geeignet sind, aber die Leistung des Systems für den Nachweis von längeren Strängen aus z. B. PCR-Amplifikationsprotokollen nicht zeigen. Des Weiteren existieren einige andere Probleme bei der Anwendung der Impedanzspektroskopie in der Bioanalytik wie z. B. zeitliche Impedanzänderungen (Tersch & Lisdät 2011) oder die schlechte Wiederverwendbarkeit (Patolsky et al. 1999). Es besteht somit weiterhin Forschungsbedarf, um gut definierte Schnittstellen und Nachweiszyklen zu erhalten. Dies ist für ein Sensorformat, welches einen Nachweis von gelabelten Molekülen vermeidet, besonders wichtig.

In dieser Studie soll der Einfluss der Ziel-DNA-Länge und der Erkennungssequenzposition auf das Impedanzsignal untersucht werden. Zunächst werden dazu die Bedingungen evaluiert, um ein Sensorsystem mit einer ausreichenden Signalstabilität und einer wiederverwendbaren Anwendung zu realisieren.

2. EXPERIMENTELLER TEIL

Die Thiol-modifizierte Fänger-DNA und die komplementäre Ziel-DNA wurden von biomers.net (Ulm, Deutschland) synthetisiert. Die verwendeten Sequenzen sind in Tabelle 1 dargestellt. Alle anderen Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Die Herstellung der Lösungen erfolgte mit Reinstwasser.

Für die elektrochemischen Untersuchungen wurden Goldchipelektroden mit einer 200 nm dicken Goldschicht verwendet. Die Sensorfläche besitzt einen Durchmesser von 5 mm und eine Fläche von 0,2 cm².

Die gereinigten Goldchips wurden für den Aufbau einer DNA-Erkennungsschicht mit 1 µM Thiol-modifizierter Fänger-DNA und 0,5 µM Mercaptohexanol in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (+ 1 M Kaliumchlorid und 2 mM Magnesiumchlorid, pH 7) für zwei Stunden inkubiert. Um unspezifische Wechselwirkungen der immobilisierten DNA zu vermeiden, wurde die

Sensoroberfläche anschließend durch die Inkubation mit 1 mM Mercaptohexanol in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7) passiviert.

Die Hybridisierung wurde auf der modifizierten Sensorelektrode für zehn Minuten unter Rühren mit 10 µM Ziel-DNA in 50 mM TRIS-Puffer (+ 0,1 M Natriumphosphat, pH 7) durchgeführt. Für die Untersuchung der Sensorsensitivität wurden Konzentrationen zwischen 0,01 µM und 10 µM verwendet. Die Impedanzspektroskopiemessungen wurden in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7) in Anwesenheit von 2 mM Kaliumhexacyanoferrat(II/III) unter folgenden Parametern durchgeführt: Frequenzbereich 10 kHz – 1 Hz, 5 mV AC Amplitude, Open Circuit Potential (180–190 mV vs. Ag/AgCl).

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 SENSORPRINZIP UND CHARAKTERISIERUNG

Für den Aufbau des Sensors wird kurze Thiol-modifizierte Fänger-DNA, welche als Erkennungselement dient, auf den Goldchipelektroden über Chemisorption immobilisiert. Wir verwenden Fänger-DNA mit einer Länge von 25 Nukleotiden aufgrund der höheren Hybridisierungsspezifität und -effizienz im Vergleich zu längeren Fängern (Lucarelli et al. 2008). Zusätzlich wird Mercaptohexanol verwendet, um unspezifische Wechselwirkungen der DNA mit der Goldoberfläche zu vermeiden und die Orientierung der Fänger-DNA Richtung Lösung zu begünstigen.

Um die Qualität der hergestellten DNA-Elektroden zu evaluieren, werden die Elektroden hinsichtlich der Konzentration an hybridisierungsfähiger Fänger-DNA durch einen Hybridisierungsschritt mit Methylenblau-modifizierter DNA (25merMB) voltammetrisch untersucht. Die Oberflächenbelegung an funktionaler Fänger-DNA wird anhand der Reduktionspeakfläche, welche der Anzahl gebundener 25merMB-DNA entspricht, bestimmt. Da verschiedene Studien einen Einfluss der Fänger-DNA-Dichte auf die Hybridisierungseffizienz und Sensorleistung demonstrieren (Keighley et al. 2008, Witte & Lisdät 2011), haben wir Elektroden mit einer ähnlichen Oberflächenkonzentration (11,5 ± 2,2 pmol/cm²) gewählt, um

Tab. 1: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten einzelsträngigen DNA. Komplementäre Sequenzposition der Ziel-DNA in Bezug zum 25mer Fänger ist fett dargestellt. SH – Thiol; MB – Methylenblau; eü – Sequenz mit einem zur Elektrodenoberfläche ausgerichteten Überhang.

Typ	Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
Fänger	25mer Fänger	SH-C ₆ - CGT CCA AGC GGG CTG ACT CAT CAA G
Zielstrang	25merMB	MB-C ₆ - CTT GAT GAG TCA GCC CGC TTG GAC G
Zielstrang	25mer	CTT GAT GAG TCA GCC CGC TTG GAC G
Zielstrang	35mer	TAC AGT ACA CCT TGA TGA GTC AGC CCG CTT GGA CG
Zielstrang	45mer	CCA CTA GCA TTA CAG TAC ACC TTG ATG AGT CAG CCC GCT TGG ACG
Zielstrang	45mer(eü:5)	AGC ATT ACA GTA CAC CTT GAT GAG TCA GCC CGC TTG GAC GCC ACT
Zielstrang	45mer(eü:10)	TAC AGT ACA CCT TGA TGA GTC AGC CCG CTT GGA CGC CAC TCC CAT
Zielstrang	80mer	CAC AAC GCA CTA GGA TGT TCA CAA TCG CAG TCA GAC CAC TAG CAT TAC AGT ACA CCT TGA TGA GTC AGC CCG CTT GGA CG

eine gute Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Anschließend werden die Elektroden vor und nach der Hybridisierung mit 25mer Ziel-DNA in Anwesenheit des Redoxsystems Kaliumhexacyanoferrat(II/III) mittels Impedanzspektroskopie untersucht. Um eine schnelle sensorische Anwendbarkeit zu gewährleisten, wird die Hybridisierung auf eine sehr kurze Zeit von nur zehn Minuten reduziert. Ein repräsentatives Impedanzspektrum einer Elektrode mit einer denaturierten und hybridisierten Oberfläche ist in Abbildung 1 dargestellt. Dabei korreliert der Halbkreisdurchmesser mit dem Durchtrittswiderstand (R_{ct}) und steigt nach der Hybridisierung. Diese Beobachtung ist auf die weitere Akkumulation von negativer Ladung zurückzuführen, welche die Umwandlung des negativ geladenen Redoxsystems an der Elektrode stört. Das aufgenommene Impedanzspektrum wird anschließend durch eine Anpassung an das Ersatzschaltbild ausgewertet und der Durchtrittswiderstand als analytische Messgröße gewählt. Nach der Hybridisierung mit 25mer DNA steigt der R_{ct} von $4510 \pm 1150 \Omega$ auf $12140 \pm 3810 \Omega$ ($n=8$) und erlaubt eine gute Diskriminierung zwischen dem denaturierten und dem hybridisierten Zustand. Trotz der Unterschiede jeder Elektrode in Bezug auf den absoluten Durchtrittswiderstand bleibt das R_{ct} -Verhältnis zwischen dem denaturierten und hybridisierten Zustand mit

$2,7 \pm 0,25$ ($n=8$) relativ konstant und wird als Sensorparameter gewählt.

3.2 SENSORREGENERATION

Die Denaturierung ist ein essenzieller Schritt, um den Sensor nach der Hybridisierung zu regenerieren und eine Wiederverwendbarkeit für einen nachhaltigen und ökonomischen Betrieb zu ermöglichen. Aus diesem Grund werden nachfolgend verschiedene Denaturierungsstrategien mit

destilliertem Wasser als Denaturierungsreagenz und Methylenblau-modifizierter Ziel-DNA voltammetrisch getestet. Das Denaturierungsprinzip von destilliertem Wasser basiert auf der Destabilisierung des DNA-Duplexes aufgrund der fehlenden Abschirmung der negativen Eigenladung der DNA in Abwesenheit von Kationen. Dies führt wiederum zu einer elektrostatischen Abstoßung der einzelnen Stränge. Es werden drei verschiedene Denaturierungsmethoden mit destil-

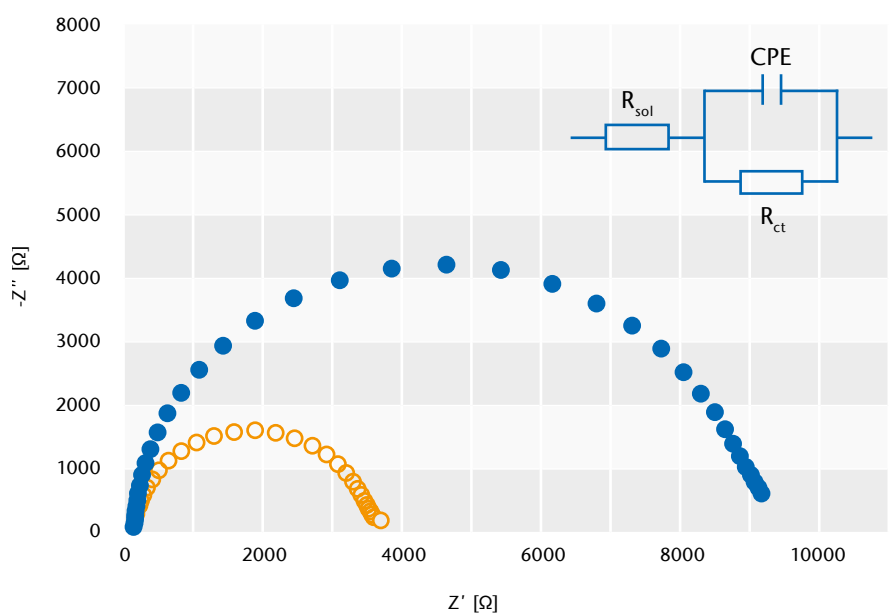


Abb. 1) Im Nyquist-Plot dargestellte Impedanzspektren einer DNA-modifizierten Goldchipelektrode im denaturierten (weiß) und hybridisierten Zustand (blau). Inset: Das in dieser Arbeit für die Analyse der Daten verwendete Ersatzschaltbild (R_{sol} – Lösungswiderstand, R_{ct} – Durchtrittswiderstand, CPE – konstantes Phasenelement, welches die Doppelschichtkapazität repräsentiert).

liertem Wasser untersucht: zehn Minuten Inkubation, zehnmaliges Spülen des Chips für je drei Sekunden sowie zehnmaliges Spülen des Chips für je drei Sekunden, gefolgt von einer vierminütigen Inkubation unter Rühren. Während eine Inkubation in Wasser für zehn Minuten zu einer schlechten Entfernung von 25merMB DNA (14%) führt, steigt die Effizienz auf bis zu 60% durch das Spülen mit Wasser und kann auf nahezu 100% durch einen zusätzlichen Rührschritt für vier Minuten gesteigert werden (siehe Abbildung 2). Das heißt, dass durch die Einstellung geeigneter konvektiver Bedingungen eine effektive Denaturierungsprozedur mit destilliertem Wasser etabliert werden kann. Durch die Verwendung dieser Prozedur sind vier repetitive Hybridisierungs-/Denaturierungszyklen durchgeführt worden, ohne Veränderungen der Hybridisierungs- und Denaturierungseffizienz (durchschnittlich $98 \pm 2\%$) festzustellen. Somit wird die Elektrodenfunktionalität nicht durch die Denaturierungsprozedur beeinflusst und eine konstante Qualität des DNA-Nachweises während der Messzyklen ist möglich. Eine gleichbleibende Denaturierungsqualität kann auch für den impedimetrischen Sensor zum Nachweis von labelfreier DNA über mehrere Messzyklen gezeigt werden.

3.3 SENSORSSENSITIVITÄT

Anschließend werden die Elektroden bei verschiedenen Konzentrationen von 25mer Ziel-DNA untersucht, um die untere Nachweisgrenze und den dynamischen Bereich des impedimetrischen Sensors zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 als normalisiertes R_{ct} -Verhältnis in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration dargestellt. Sie zeigt eine sigmoide Bindungskurve mit einem ansteigenden R_{ct} nach der Hybridisierung mit Konzentrationen zwischen $0,01 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ 25mer DNA. Die Halbwertkonzentration beträgt $380 \pm 50 \text{ nM}$ und der lineare Messbereich liegt zwischen $0,15 \mu\text{M}$ und $1 \mu\text{M}$. Der Konzentrationsbereich des Sensors ist damit ähnlich wie ein impedimetrisches System mit kürzeren Fängersequenzen (Kafka et al. 2008) und ein voltametrischer Sensor, welcher gelabelte Ziel-DNA verwendet (Pänke et al. 2007).

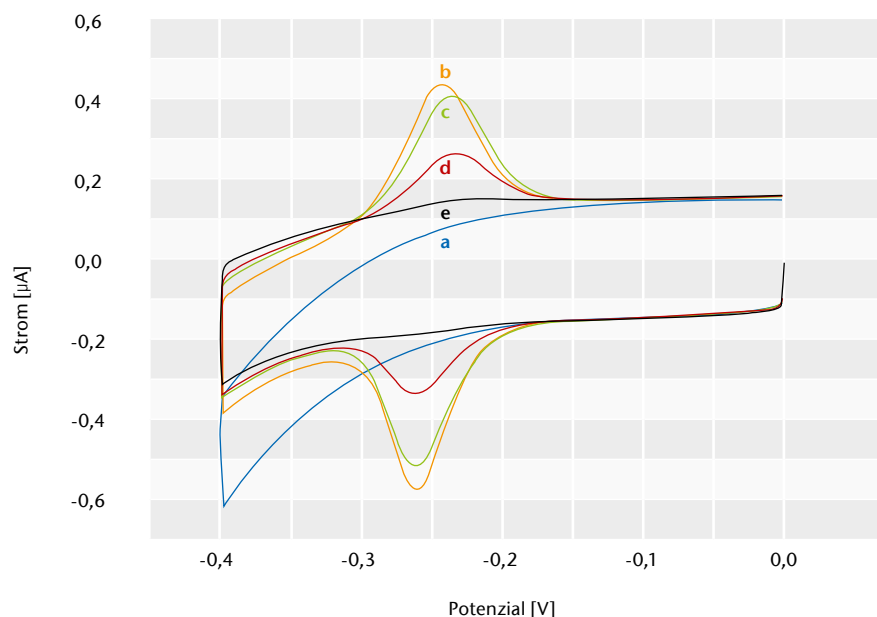


Abb. 2) Zyklische Voltammogramme einer DNA-modifizierten Goldchipelektrode vor (a) und nach der Hybridisierung (b) mit komplementärer Methylblau-modifizierter DNA sowie nach der Anwendung verschiedener Denaturierungsprozeduren mit destilliertem Wasser: 10 min Inkubation (c), 10 x spülen für je 3 s (d), 10 x spülen für je 3 s sowie eine 4 min Inkubation unter Rühren (e).

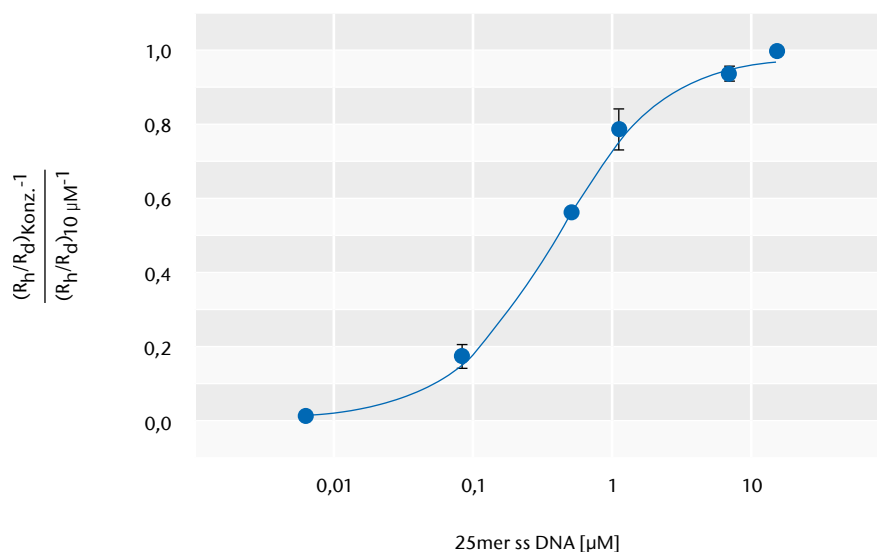


Abb. 3) Relatives Verhältnis des Durchtrittswiderstandes von DNA-modifizierten Goldchipelektroden ($n=3$) in Abhängigkeit von der 25mer DNA-Konzentration. Die Daten sind auf den Wert für die Hybridisierung mit $10 \mu\text{M}$ Ziel-DNA normalisiert: $(R_H/R_D)_{\text{konz.}}$ – Durchtrittswiderstandsverhältnis zwischen dem hybridisierten (R_H) und dem denaturierten Zustand (R_D) nach der Inkubation mit verschiedenen 25mer DNA-Konzentrationen; $(R_H/R_D)_{10\mu\text{M}}$ – Durchtrittswiderstandsverhältnis zwischen dem hybridisierten (R_H) und dem denaturierten Zustand (R_D) nach der Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ 25mer Ziel-DNA.

3.4 EINFLUSS DER ZIEL-DNA-LÄNGE UND DER ERKENNUNGS-SEQUENZPOSITION

Obwohl eine Sensitivität im nanomolaren Bereich erreicht werden kann, sind oft Amplifizierungsschritte für einen analytischen Nachweis von geringen DNA-Mengen notwendig. Durch

den Einsatz von Amplifizierungsmethoden wie PCR entstehen jedoch längere DNA-Stränge, deren Einfluss auf das Impedanzsignal bisher nur wenig beachtet worden ist. Deshalb haben wir Hybridisierungsstudien mit unterschiedlich langen komplementären Ziel-DNA-Strängen durchgeführt. Zunächst werden dazu Sequenzen

mit einer Länge zwischen 35 und 80 Nukleotiden (35mer, 45mer, 80mer) untersucht, welche nach der Bindung am immobilisierten Fänger einen zur Lösung exponierten Überhang besitzen. Das Design der Strukturen ist in Abbildung 4 dargestellt.

Wie in Abbildung 5A dargestellt, induzieren alle Zielsequenzen einen Anstieg der Impedanz nach der Hybridisierung. Entgegen unseren Erwartungen nimmt die Rct-Änderung mit zunehmender Stranglänge ab, obwohl ein längerer Strang eine höhere Akkumulation der DNA-Masse bzw. negativer Ladung vor der Elektrode bedingt. Da eine sinkende Hybridisierungseffizienz für längere Stränge bekannt ist (Baker & Milam 2011), kann der Einfluss einer kleineren Menge an Fänger-Ziel-DNA-Komplexen auf die impedimetrische Signalantwort nicht ausgeschlossen werden. Die impedimetrischen Experimente geben keinen Einblick in die Hybridisierungseffizienz der jeweiligen Stränge, weshalb die Hybridisierungsstudien mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) reproduziert wurden. Der

Aufbau der DNA-Sensorschicht auf dem SPR-Chip und die Hybridisierung mit den Zielsequenzen erfolgten in einem Fließsystem unter identischen Bedingungen wie für den impedimetrischen Sensor. In Abbildung 5B ist eine repräsentative SPR-Messung der unterschiedlich langen Zielsequenzen dargestellt. Für das 25mer kann ein stabiles SPR-Signal zum Ende der Hybridisierung festgestellt werden, was einen klaren Hinweis für die Ausbildung einer komplett hybridisierten Sensoroberfläche gibt. Im Gegensatz dazu zeigen die Sequenzen mit einem Überhang ein ansteigendes SPR-Signal am Ende der Hybridisierung, dies ist wahrscheinlich auf eine langsamere Hybridisierungskinetik von längeren Zielsträngen zurückzuführen. Für die Auswertung der Messung ist die angelagerte Masse der Zielstränge bestimmt worden ($1000 \text{ RU} = 100 \text{ ng/cm}^2$), um die Oberflächenkonzentration an Fänger-Ziel-DNA-Komplexen zu berechnen. Während eine zunehmende Zielsequenzlänge aus einer Zunahme der angelagerten hybridisierten Masse resultiert, nimmt die molare Konzentration an Fänger-Ziel-DNA-Komplexen

bei längeren DNA-Strängen ab. Eine Abnahme der Hybridisierungseffizienz geschieht in guter Übereinstimmung mit anderen Berichten (Baker & Milam 2011, McKendry et al. 2002) und zeigt die sterische und abstoßende Behinderung der Überhänge. In Bezug auf die impedimetrischen Ergebnisse bedeutet dies, dass die Rct-Änderung einen identischen Verlauf wie die Oberflächenkonzentration der ausgebildeten Fänger-Ziel-DNA-Komplexe besitzt (siehe Abbildung 5C). Demzufolge ist eine hohe Oberflächenkonzentration an Fänger-Ziel-DNA-Komplexen wichtiger als die angelagerte DNA-Masse, sofern ein großer Teil der DNA weiter entfernt vor der Elektrode lokalisiert ist. Eine Akkumulation negativer Ladung durch den Überhang besitzt somit einen geringeren Einfluss auf das Impedanzsignal als zunächst vermutet. Wir schlussfolgern, dass elektroden-nah positionierte DNA die Abstoßung zwischen Elektrodenoberfläche und dem negativ geladenen Redoxsystem stärker erhöht und schwieriger für die Komplexionen zu penetrieren ist. Dessen ungeachtet zeigt der Sensor

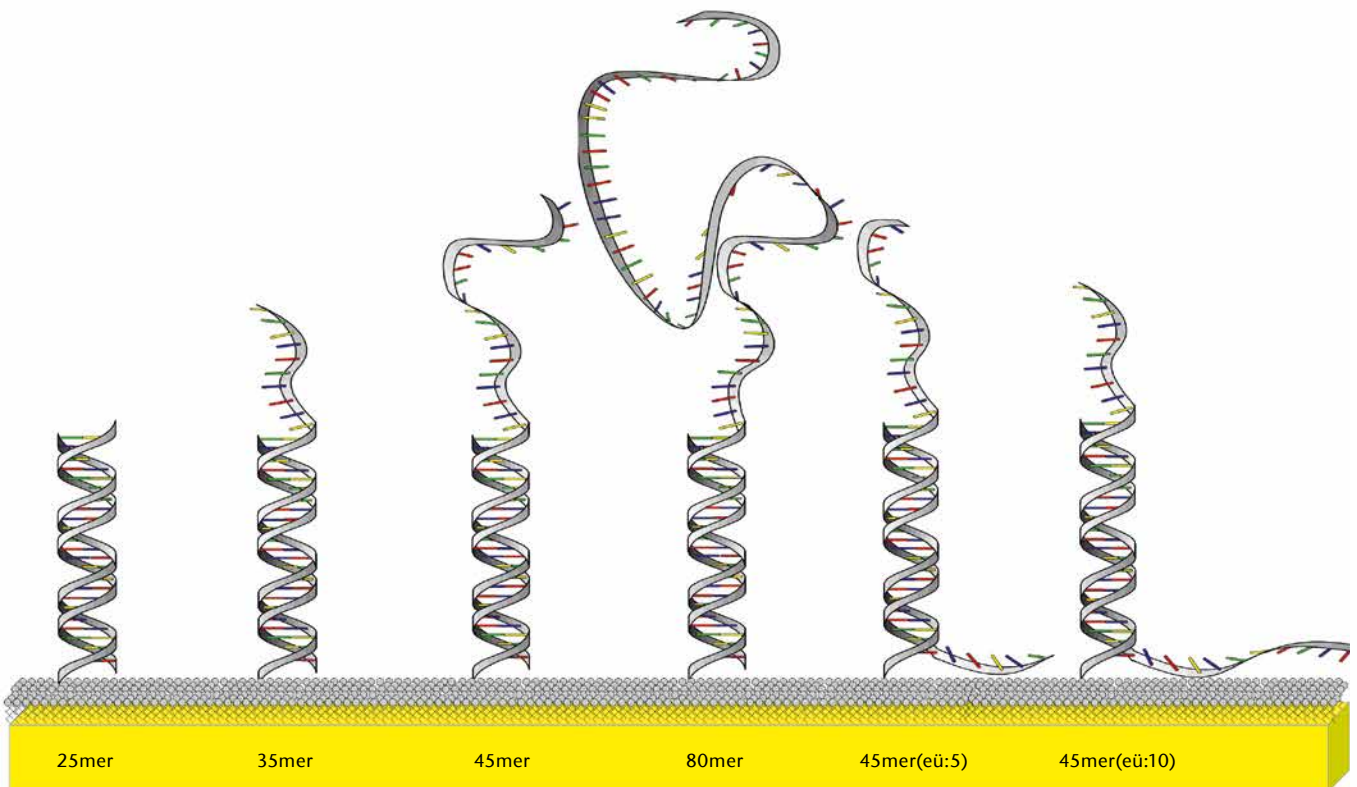


Abb. 4) Schematische Darstellung der Fänger-Ziel-DNA-Komplexe zwischen einem 25mer Fänger und den entsprechenden Zielsträngen.

das Potenzial für den Nachweis von längeren DNA-Sequenzen bis zu einer Länge von 80 Nukleotiden nach einer kurzen Hybridisierungszeit von nur zehn Minuten.

Im Weiteren wird untersucht, wie das impedimetrische Signal für längere Zielsequenzen gesteigert werden kann. Dazu wird die Position der Erkennungssequenz in dem Strang verändert, sodass die verwendeten 45mere einen zur Oberfläche ausgerichteten Überhang von fünf Nukleotiden (45mer(eo:5)) oder zehn Nukleotiden (45mer(eo:10)) besitzen (siehe Abbildung 4). Durch die Ausrichtung des Überhangs zur Oberfläche soll eine weitere Akkumulation der negativen Ladung direkt vor der Elektrode induziert werden, welche zu einem Anstieg des Rct im Vergleich zum 45mer ohne Überhang zur Elektrode führt. Eine Ausrichtung der Überhänge zur Elektrode könnte jedoch auch die Hybridisierungskinetik aufgrund sterischer und abstoßender Effekte beeinflussen. In Abbildung 6 sind die repräsentativen Impedanzspektren einer Elektrode für die verschiedenen 45mer Sequenzen dargestellt. Trotz der unterschiedlichen Erkennungssequenzposition induzieren alle 45mer Moleküle eine Impedanzänderung nach dem Hybridisierungsereignis und sind nachweisbar. Das erhaltene Rct-Verhältnis steigt für das 45mer, 45mer(eo:5) und 45mer(eo:10) auf $1,72 \pm 0,13$, $2,03 \pm 0,08$ bzw. $2,25 \pm 0,07$ und zeigt eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Rct-Änderung und dem zur Elektrodenoberfläche ausgerichteten Überhang. Um konzentrationsbedingte Effekte auf das Impedanzsignal auszuschließen, werden anschließend SPR-Untersuchungen durchgeführt. Diese zeigen lediglich eine geringe Abnahme der Oberflächenkonzentration der ausgebildeten Fänger-Ziel-DNA-Komplexe mit zunehmender Länge des zur Elektrode exponierten Überhangs. Der impedimetrische Effekt des elektroden-nahen Überhangs kann somit auf den Anstieg der negativen Ladung nahe der Elektrode zurückgeführt werden, welche die Permeation des Redoxsystems zur Elektrode erschwert. Die Ergebnisse zeigen, dass das impedimetrische System die Unterscheidung von

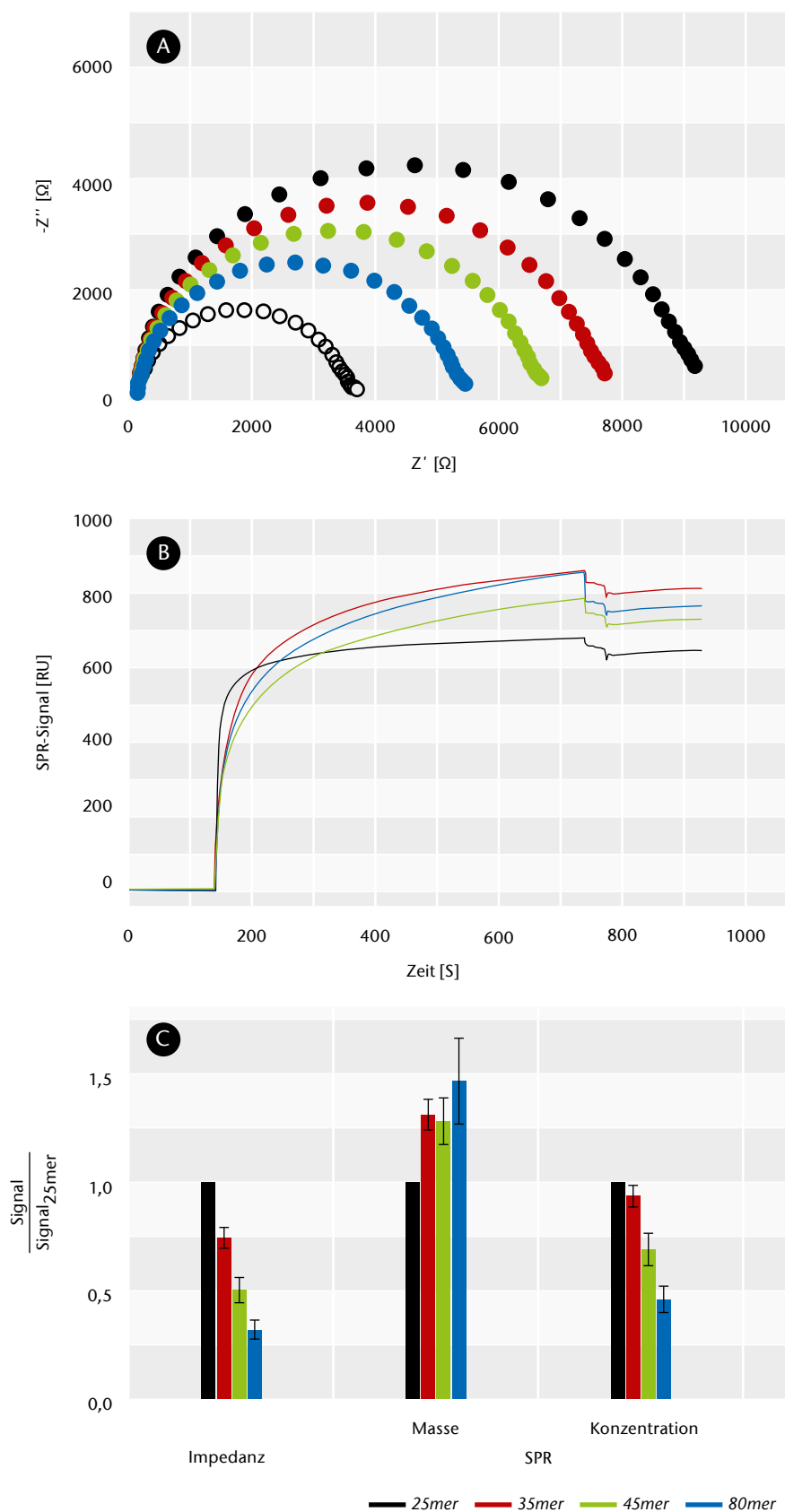


Abb. 5) (A) Impedanzspektren einer DNA-modifizierten Goldchipelektrode vor (weiß) und nach der Hybridisierung mit 25mer (schwarz), 35mer (rot), 45mer (grün) und 80mer (blau) Ziel-DNA. (B) SPR-Messung der Hybridisierung mit 25mer (schwarz), 35mer (rot), 45mer (grün) und 80mer (blau) Ziel-DNA auf einem Fänger-DNA-modifizierten SPR-Chip. (C) Normalisierte Hybridisierungssignale der Impedanz- und SPR-Ergebnisse für die Hybridisierung mit 25mer, 35mer, 45mer und 80mer Ziel-DNA. Das impedimetrische Signal wird anhand des Durchtrittswiderstandsverhältnisses $[(R_h/R_d)-1]$ zwischen der hybridisierten (R_h) und denaturierten Situation (R_d) bestimmt. Die Masse und Konzentration der gebundenen Zielstränge wird anhand des SPR-Signals kalkuliert.

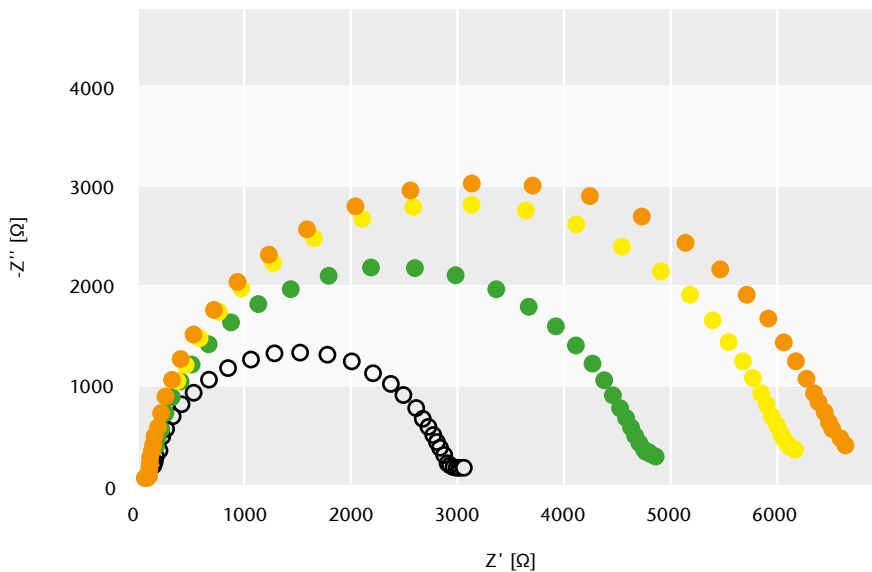


Abb. 6 Impedanzspektren einer DNA-modifizierten Goldchipelektrode vor (weiß) und nach der Hybridisierung mit 45mer (grün), 45mer(eü:5) (gelb) und 45mer(eü:10) (orange) Ziel-DNA (eü:5 und eü:10 bedeutet, dass ein Überhang von 5 oder 10 Nukleotiden zur Elektrode ausgerichtet ist).

Zielsequenzen mit einer identischen Länge, aber unterschiedlichen Erkennungssequenzpositionen ermöglicht. Des Weiteren geben die Ergebnisse Zugang zum Design von vorteilhaften Fänger-Ziel-DNA-Komplexen, welche in einem gesteigerten Impedanzsignal resultieren und möglicherweise eine labelfreie Detektion von längeren Zielsequenzen als dem vorgestellten 80mer erlauben.

4. SCHLUSSFOLGERUNG

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente zeigen, dass durch die Kombination von Fänger-DNA-modifizierten Goldchipelektroden und der Impedanzspektroskopie ein sensorisches System zum labelfreien Nachweis von Nukleinsäuren entwickelt werden kann. Der Sensor ermöglicht eine eindeutige Diskriminierung zwischen dem hybridisierten und dem denaturierten Zustand bis zu einer Nachweisgrenze im unteren nanomolaren Bereich sowie eine Wiederverwendbarkeit nach der Denaturierung mit Wasser. Untersuchungen zum Einfluss der Zielsequenzlänge und der Erkennungssequenzposition auf das impedimetrische Signalverhalten zeigen eine direkte Beziehung zwischen der Länge der Sequenzen sowie der Ausrichtung des Überhangs und liefern wichtige Erkenntnisse zur Steigerung der Sensitivität des sensorischen Systems.

Sequenzen mit einem zur Lösung exponierten Überhang führen mit zunehmender Länge zu abnehmenden Impedanzänderungen, was zum einen auf eine geringere Hybridisierungseffizienz längerer Stränge und zum anderen auf den geringeren Einfluss der weiter entfernten DNA-Überhänge auf die Signalantwort zurückzuführen ist. Dessen ungeachtet können Zielstränge mit einer Länge von bis zu 80 Nukleotiden labelfrei innerhalb einer kurzen Hybridisierungszeit von zehn Minuten detektiert werden, was einen Zugang zum Nachweis von PCR-Produkten aus biochemischen Proben gibt. Eine Steigerung der Signalantwort kann durch eine Veränderung der Erkennungssequenzposition innerhalb der Ziel-DNA, d. h. eine Verschiebung des Überhangs zur Elektrode, erreicht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass durch das Design von vorteilhaften Fänger-Ziel-DNA-Komplexen eine verbesserte Sensitivität von langen DNA Sequenzen erreicht werden kann. Des Weiteren ermöglicht das impedimetrische System eine Unterscheidung von Zielsequenzen mit gleicher Länge, aber unterschiedlicher Erkennungssequenzposition. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in dieser Arbeit einige Hindernisse in der Anwendung der Impedanzspektroskopie für den Nachweis von DNA überwunden worden sind.

LITERATUR

Baker BA, Milam VT (2011) Hybridization kinetics between immobilized double-stranded DNA probes and targets containing embedded recognition segments. *Nucl Acids Res* 39(15):e99. doi: 10.1093/nar/gkr293

Berggren C, Stålhandske P, Brundell J, Johansson G (1999) A Feasibility Study of a Capacitive Biosensor for Direct Detection of DNA Hybridization. *Electroanalysis* 11(3):156–160. doi: 10.1002/(SICI)1521-4109(199903)11:3<156::AID-ELAN156>3.0.CO;2-O

Cai W, Peck JR, van der Weide, Daniel W, Hamers RJ (2004) Direct electrical detection of hybridization at DNA-modified silicon surfaces. *Biosens Bioelectron* 19(9):1013–1019. doi: 10.1016/j.bios.2003.09.009

Daniels JS, Pourmand N (2007) Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. *Electroanalysis* 19:1239–1257. doi: 10.1002/elan.200603855

Drummond TG, Hill MG, Barton JK (2003) Electrochemical DNA sensors. *Nat Biotechnol* 21:1192–1199. doi: 10.1038/nbt873

Fan X, White IM, Shopova SI, Zhu H, Suter JD, Sun Y (2008) Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. *Anal. Chim. Acta* 620:8–26. doi: 10.1016/j.aca.2008.05.022

Kafka J, Pänke O, Abendroth B, Lisdat F (2008) A label-free DNA sensor based on impedance spectroscopy. *Electrochim Acta* 53(25):7467–7474. doi: 10.1016/j.electacta.2008.01.031

Keighley SD, Li P, Estrela P, Migliorato P (2008) Optimization of DNA immobilization on gold electrodes for label-free detection by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosens Bioelectron* 23:1291–1297. doi: 10.1016/j.bios.2007.11.012

Kleo K, Kapp A, Ascher L, Lisdat F (2011) Detection of vaccinia virus DNA by quartz crystal microbalance. *Anal Biochem* 418(2):260–266. doi: 10.1016/j.ab.2011.07.016

Li C, Liu Y, Luong JHT (2005) Impedance sensing of DNA binding drugs using gold substrates modified with gold nanoparticles. *Anal. Chem.* 77(2):478–485. doi: 10.1021/ac048672l

Lisdat F, Schäfer D (2008) The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Anal Bioanal Chem* 391(5):1555–1567. doi: 10.1007/s00216-008-1970-7

Lucarelli F, Tombelli S, Minunni M, Marrazza G, Mascini M (2008) Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection. *Anal. Chim. Acta* 609(2):139–159. doi: 10.1016/j.aca.2007.12.035

McKendry R, Zhang J, Arntz Y, Strunz T, Hegner M, Lang HP, Baller MK, Certa U, Meyer E, Güntherodt H, Gerber C (2002) Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(15):9783–9788. doi: 10.1073/pnas.152330199

Pänke O, Kirbs A, Lisdat F (2007) Voltammetric detection of single base-pair mismatches and quantification of label-free target ssDNA using a competitive binding assay. *Biosens Bioelectron* 22(11):2656–2662. doi: 10.1016/j.bios.2006.10.033

Park J, Kwon SH, Park JW, Park S (2008) Label-free detection of DNA molecules on the dendron based self-assembled monolayer by electrochemical impedance spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* 619(1):37–42. doi: 10.1016/j.aca.2008.02.055

Park J, Park S (2009) DNA Hybridization Sensors Based on Electrochemical Impedance Spectroscopy as a Detection Tool. *Sensors* 9(12):9513–9532. doi: 10.3390/s91209513

Patolsky F, Katz E, Bardea A, Willner I (1999) Enzyme-Linked Amplified Electrochemical Sensing of Oligonucleotide–DNA Interactions by Means of the Precipitation of an Insoluble Product and Using Impedance Spectroscopy. *Langmuir* 15(11):3703–3706. doi: 10.1021/la981682v

Peng H, Soeller C, Travas-Sejdic J (2007) Novel Conducting Polymers for DNA Sensing. *Macromolecules* 40(4):909–914. doi: 10.1021/ma062060g

Sassolas A, Leca-Bouvier BD, Blum LJ (2008) DNA biosensors and microarrays. *Chem Rev* 108(1):109–139. doi: 10.1021/cr0684467

Tersch C, Lisdat F (2011) Label-free detection of protein–DNA interactions using electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochim Acta* 56(22):7673–7679. doi: 10.1016/j.electacta.2011.06.063

Wang Y, Li C, Li X, Li Y, Kraatz H (2008) Unlabeled hairpin-DNA probe for the detection of single-nucleotide mismatches by electrochemical impedance spectroscopy. *Anal. Chem.* 80(6):2255–2260. doi: 10.1021/ac7024688

Witte C, Lisdat F (2011) Direct detection of DNA and DNA-Ligand interaction by impedance spectroscopy. *Electroanalysis* 23(2):339–346. doi: 10.1002/elan.201000410

AUTOREN

Marc Riedel M. Sc.

Technische Hochschule Wildau
AG Biosystemtechnik
marc.riedel@th-wildau.de

Julia Kartchemnik B. Sc.

Technische Hochschule Wildau
AG Biosystemtechnik
julia.kartchemnik@th-wildau.de

Prof. Dr. Michael J. Schöning

Institut für Nano- und Biotechnologie
FH Aachen
schoening@fh-aachen.de

Prof. Dr. rer. nat. habil. Fred Lisdat

Technische Hochschule Wildau
AG Biosystemtechnik
fred.lisdat@th-wildau.de