

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Nicht-manuelle Immobilisierung von biologischen Erkennungselementen durch pH-induzierte Deposition von Polymerfilmen als Basis für die reproduzierbare Herstellung amperometrischer Biosensoren

Christian Kurzawa, Andreas Hengstenberg, Wolfgang Schuhmann
Analytische Chemie – Elektroanalytik & Sensorik, Ruhr-Universität Bochum,
Universitätsstr. 150, D-44780 Bochum
Tel. 0234 322 8202
Kurzawa@anachem.ruhr-uni-bochum.de
Registriernummer der Online-Anmeldung: 142

Vortrag

Die reproduzierbare, parallele und nicht-manuelle Fixierung von molekularen Erkennungselementen auf Oberflächen hat eine erhebliche Bedeutung für die Entwicklung von spezifischen Sensoren für Anwendungen im Bereich der Biotechnologie, der klinischen Analytik, der medizinischen Diagnostik sowie in der kombinatorischen Chemie und dem Hochdurchsatzscreening. Insbesondere bei der Miniaturisierung von Biosensoren sowie der Herstellung höher integrierter Sensor-Aktuator-Systeme besteht dabei die Notwendigkeit für eine lokale Abscheidungstechnik mit hoher Auflösung bei gleichzeitig geringem Verbrauch an biologischen Erkennungskomponenten. Eine Methode, die diese Anforderungen erfüllen kann, ist die elektrochemisch induzierte Abscheidung von Polymeren in Gegenwart unterschiedlicher Erkennungselemente. Dabei erfolgt bei den herkömmlich verwendeten Polymerabscheidungen^[1] die Kettenwachstumsreaktion durch Oxidation des entsprechenden Monomers über intermediäre radikalische Zwischenstufen in der Diffusionsschicht vor der Elektrode. Aufgrund des Radikalmechanismus sind solche Reaktionen sensitiv gegenüber der Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und nukleophilen Reagenzien, so daß die Konzentration von Proteinen (z.B. Enzymen) in der Abscheidungslösung wegen der nukleophilen Seitenketten gering gehalten werden muß.

Demgegenüber erfolgt die Bildung des Polymerfilms bei der von uns auf Basis eines industriell gebräuchlichen Verfahrens für den Korrosionsschutz^[2] entwickelten Methode, durch eine elektrochemisch oder photochemisch induzierte lokale Änderung des pH-Wertes, welche die Löslichkeit von emulgierten Polymeren verändert und somit zu dessen Koagulation auf der Elektrodenoberfläche führt. Die elektrochemische Abscheidung kann dabei je nach verwendetem Polymer entweder an der Anode oder der Kathode erfolgen. Bei der anodischen Elektrodeposition

werden die durch Wasserelektrolyse lokal an der Anode erzeugten Protonen genutzt, ein wasserlösliches, aufgrund von Carboxylat-Gruppen negativ geladenes Polymer, zu neutralisieren. Die neutrale Form des Polymers ist wasserunlöslich und tendiert zur Koagulation auf der Elektrodenoberfläche (Abb.1a). Demgegenüber erfolgt die kathodische Deposition durch lokal erzeugte Hydroxid-Ionen, welche ein lösliches durch Amino-Gruppen positiv geladenes Polymer neutralisieren und damit ausfällen (Abb.1b).

a) Anode



b) Kathode

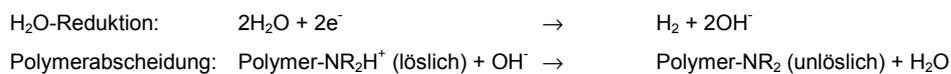


Abb.1 a) und b): anodische und kathodische Abscheidung von Polymeren

Bei der photochemischen Polymerabscheidung, erfolgt die lokale pH-Änderung unter Verwendung einer "Caged-Proton" Substanz^[3], welche bei Einstrahlung von Licht einer bestimmten Wellenlänge Protonen freisetzt. Diese lokal erzeugten Protonen neutralisieren wie bei der anodischen Polymerabscheidung ein wasserlösliches, aufgrund von Carboxylat-Gruppen negativ geladenes Polymer, und führen so zu dessen Koagulation auf der Oberfläche.

Da die Depositionsreaktionen prinzipiell auch in Gegenwart von Sauerstoff und aus einer wässrigen Polymersuspension bei moderaten pH-Werten erfolgen, ist es möglich biologische Erkennungskomponenten mittels dieses Verfahrens auf Sensoroberflächen zu immobilisieren.

Zur Funktionalisierung dieser Filme werden der Elektrodepositionslösung Enzyme oder andere makromolekulare Erkennungselemente zugesetzt, die bei der elektrochemisch oder photochemisch induzierten Polymerabscheidung in den entstehenden Polymerfilm eingeschlossen werden. Als Beispiel für die Integration von Enzymen in solche Polymerfilme wurde – aufgrund der guten Stabilität und hohen Aktivität – Glucoseoxidase (GOD) benutzt. Die so erhaltenen Sensoren wiesen eine gute Langzeitstabilität (über 5000 Messungen in einem Fließinjektionssystem) und Reproduzierbarkeit (Standardabweichung von < 5%) (Abb.2) auf.

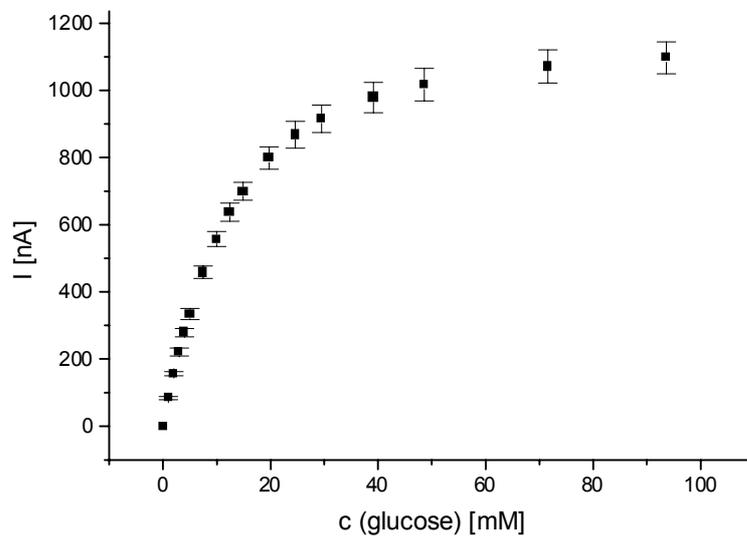


Abb.2: Glucose-Kalibrierkurve einer GOD-modifizierten Platinscheibenelektrode (\varnothing 1 mm; n = 5)

Zum Beweis, daß sich das Verfahren auch für andere biologische Erkennungselemente und polymere Mikrostrukturen eignet, wird gezeigt, daß auch Katalase, Laktatoxidase, Pyruvatoxidase und Latexbeads auf leitfähigen Strukturen immobilisiert werden können. Neben der Abscheidung von funktionalisierten Einzelschichten, erlaubt das Verfahren die einfache Erzeugung von Multischichten mit unterschiedlichen Enzymen. Dieses kann z.B. für die Herstellung von Antiinterferenzschichten bei Gebrauch mehrerer Oxidasen eingesetzt werden. Des weiteren eignet sich die Abscheidungstechnik für eine einfache und lokal begrenzte Modifizierung von vorgefertigten Mikrostrukturen zur Herstellung von Mikrobiosensoren (Abb.3).

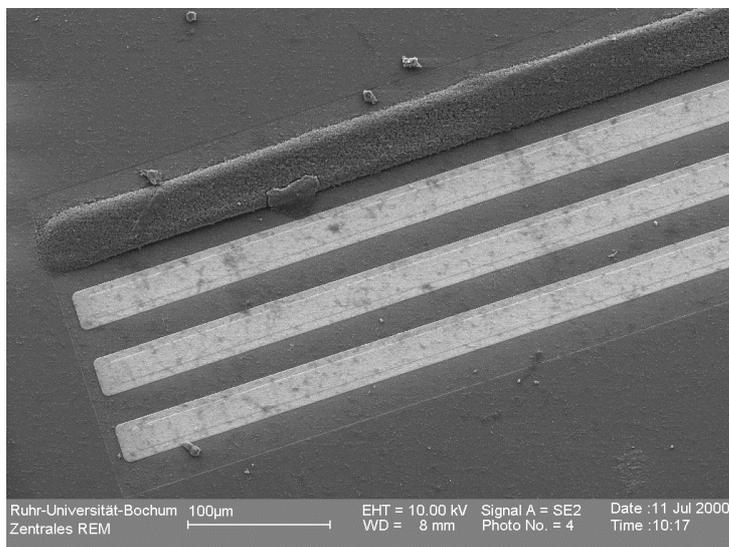


Abb.3: Mikrobandedelektroden-Array mit Glucoseoxidase modifizierter erster Bande

Die Erzeugung von Mikrostrukturen ist dabei aber nicht nur auf vorgefertigte Mikroelektrodenarrays beschränkt, sondern kann auch direkt auf leitfähigen Oberflächen durch lokale Pulsabscheidung mittels eines elektrochemischen Rastermikroskops (SECM) erfolgen. Aufgrund der Schnelligkeit der Immobilisierungsprozedur (Beschichtung einer Elektrode in ca. 1 s) und der guten Reproduzierbarkeit eignet sich das Verfahren auch zur industriellen Fertigung von Biosensoren.

Literatur

- [1] a) Schuhmann, W. (1995) *Mikrochim. Acta*, **121**, 1-29; b) Cosnier, S. (1999) *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 443-456
- [2] Beck, F. (1988) *Electrochim. Acta*, **33**, 839-850
- [3] Kahn, S., et al. (1993) *Biophys. J.*, **65**, 2368-2382