

Entwicklung eines
impedimetrischen Aptasensors
zur Detektion von
Staphylococcus aureus

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Peggy Reich, M. Sc.

Erscheinungs- bzw. Druckjahr 2020

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr.-Ing. habil Uwe Pliquett

Tag der Promotion: 02.12.2020

*Wenn man nur genau genug hinschaut,
entdeckt man eine ganz neue Welt.*

Ein Erfolg ist nichts wert,
wenn man ihn nicht mit den Liebsten teilen kann,
die einen auf dem Weg dorthin unterstützt haben.

Dem perfekten Partner,
meiner Familie &
meinen Freunden gewidmet.



Danke an Prof. Thomas Scheper und Prof. Uwe Pliquett für die unendliche Geduld, die antreibenden Diskussionen und für den Feinschliff der Arbeit. Ganz großen Dank für die einzigartige Möglichkeit des Forschungsaustauschs in Israel. Dabei danke ich Prof. Scheper für die Vermittlung, der Deutschen Technion-Gesellschaft e.V. für das Stipendium des Life Science Network, Prof. Ester Segal vom Technion in Haifa für die Aufnahme und Betreuung vor Ort sowie Katharina Urmann für die spannende Zusammenarbeit.

All meinen Kollegen am iba in Heilbad Heiligenstadt gilt besonderer Dank für die schöne Zeit im grünen Eichsfeld. Ich danke den Kollegen der Analysenmesstechnik für die technische Unterstützung beim Umsetzen meiner Ideen und dem Aufbau des Messplatzes. Ich danke den Kollegen in der Werkstatt für die Umsetzung meiner Skizzen in die Realität. Ich danke herzlich allen Kollegen/Kolleginnen für die Unterstützung im Labor. Und ich danke meinen Doktorbrüdern und -schwestern für die unterhaltsame Zeit nach der Arbeit.

Nicht nur für die Bereitstellung des Aptamers, sondern auch für die Einführung in die Arbeit mit Aptameren, die Beratung sowie Unterstützung möchte ich mich bei Dr. Stoltenburg und Dr. Strehlitz bedanken. Weiterer Dank gilt Eric Schäfer, der die Fertigstellung der Arbeit parallel zu meiner Stelle am IMMS ermöglicht hat.

Konstanten Beistand erhielt ich von meinem perfekten Partner und ich weiß nicht, ob ich ohne ihn durchgehalten hätte. Auch meine Familie und meine Freunde haben mich mit ihrem Verständnis unterstützt und mir Kraft gegeben. Ich danke allen für die vielen schönen Momente, die zum Ausgleich einfach notwendig sind.

Ein großer Dank gilt Prof. Beckmann für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Abstract

In this work, an impedimetric aptasensor for the detection of *Staphylococcus aureus* was developed. For this purpose, an aptamer was used that specifically binds to protein A that is found on the surface of *Staphylococcus aureus*. The aptamer was modified with an alkane thiol and co-immobilized with mercaptohexanol on a gold electrode with a density of $2.41 \cdot 10^{12}$ aptamers per cm^2 . The binding of protein A and vital *Staphylococcus aureus* to the immobilized aptamers was detected with the electrochemical impedance spectroscopy, whereby an increase in impedance was measured. Fitting the spectra with the modified Randles equivalent circuit showed that the charge-transfer resistance alone changes significantly with the increase in the analyte concentration. The impedimetric aptasensor shows a detection limit of 10 colony-forming units per ml and a dissociation constant of 111 ± 96 colony-forming units per ml. In addition, the sensor has a high specificity because protein A-deficient bacteria such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis* were not detected. A model for determining the impedance was developed, based on the change in the area available for charge transfer A_{faraday} . The simulated curves agree very well with the measured curves, which proves that the impediment to the charge transfer due to the binding of the analyte is the cause of the increase in impedance. In spite of the saturation of all binding sites, a charge transfer can be observed, which means that the charge transfer is not completely hindered by the binding of the analyte. The diffusion and electron-transfer constants for the aptamer-modified electrodes are lower than those for bare electrodes. This means that the diffusion and the charge transfer of the redox mediator ferri-/ferrocyanide are inhibited by the immobilized aptamers. The results suggest that the aptamers induce defects in the self-assembled monolayer, which act like microelectrodes. These findings can be used to improve the surface design of impedimetric aptasensors in the future.

protein A, SAM, model, MST, QCM, chronocoulometry, charge transfer, diffusion, biosensor, ferri-/ferrocyanide

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein impedimetrischer Aptasensor zur Detektion von *Staphylococcus aureus* entwickelt. Dazu wurde ein Aptamer verwendet, das spezifisch an das auf der Oberfläche von *Staphylococcus aureus* vorkommende Protein A bindet. Das Aptamer wurde mit einem Alkanthiol modifiziert und mit Merkptohexanol auf einer Goldelektrode ko-immobilisiert, wobei eine Dichte von $2,41 \cdot 10^{12}$ Aptamere pro cm^2 erreicht werden konnte. Die Bindung von Protein A und vitalen *Staphylococcus aureus* an die immobilisierten Aptamere konnte mit der elektrochemischen Impedanzspektroskopie detektiert werden, wobei ein Anstieg der Impedanz gemessen wurde. Das Fitten der Spektren mit dem modifizierten Randles-Ersatzschaltbild ergab, dass sich allein der Ladungstransferwiderstand signifikant mit dem Anstieg der Analytkonzentration ändert. Der impedimetrische Aptasensor zeigt ein Detektionslimit von 10 koloniebildenden Einheiten pro ml und eine scheinbare Dissoziationskonstante von 111 ± 96 koloniebildenden Einheiten pro ml. Zudem weist der Sensor eine hohe Spezifität auf, da die Protein A-defizienten Bakterien *Escherichia coli* und *Staphylococcus epidermidis* nicht detektiert werden konnten. Es wurde ein Modell zur Bestimmung der Impedanz erstellt, basierend auf der Änderung der für den Ladungstransfer verfügbaren Fläche A_{faraday} . Die simulierten Kurven stimmen sehr gut mit den gemessenen Kurven überein, was beweist, dass die Behinderung des Ladungstransfers durch die Anbindung des Analyten die Ursache des Impedanzanstiegs ist. Trotz der Sättigung aller Bindungsstellen ist ein Ladungstransfer zu beobachten, was bedeutet, dass durch die Anbindung des Analyten, der Ladungstransfer nicht komplett inhibiert wird. Die Diffusions- und Elektronentransferkonstanten für die Aptamer-modifizierten Elektroden sind niedriger als die für blanke Elektroden. Das heißt, die Diffusion und der Ladungstransfer des Redoxmediators Kaliumhexacyanoferrat werden durch die immobilisierten Aptamere gehemmt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aptamere Defekte in die selbstorganisierende Monoschicht induzieren, welche wie Mikroelektroden fungieren. Diese Erkenntnisse können zukünftig zur Verbesserung des Designs der Oberfläche von impedimetrischen Aptasensoren genutzt werden.

Protein A, SAM, Modell, MST, QCM, Chronocoulometrie, Ladungstransfer, Diffusion, Biosensor, Hexacyanoferrat

Inhaltsverzeichnis

Widmung	iii
Danksagung	v
Abstract	vii
Zusammenfassung	ix
Inhaltsverzeichnis	xi
Abkürzungsverzeichnis	xiv
1 Einleitung	1
1.1 Motivation	1
1.2 Zielstellung	2
2 Theoretischer Teil und Stand der Forschung	5
2.1 Das Bakterium <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.1.1 Pathogenität	5
2.1.2 Verbreitung und Übertragung	10
2.1.3 Bekämpfung	11
2.1.4 Detektion mittels konventioneller und molekularbiologischer Methoden	13
2.2 Die Biosensorik	18
2.2.1 Aufbau und Funktion eines Biosensors	19
2.2.2 Immobilisierung des Erkennungselementes	24
2.2.3 Biosensoren zur Detektion von <i>S. aureus</i>	27
2.2.4 Schlussfolgerungen für die Dissertation	39
2.3 Aptamere als Erkennungselemente	40
2.3.1 Die dreidimensionale Struktur von Aptameren	44
2.3.2 Chemie der Aptamer-Analyt-Bindung	50
2.3.3 Aptamere für <i>S. aureus</i>	53

2.3.4	Das Protein A-bindende Aptamer	57
2.3.5	Aptasensoren für die Detektion von <i>S. aureus</i>	59
2.4	Die Elektrochemische Impedanzspektroskopie	63
2.4.1	Die Impedanz ist komplex	63
2.4.2	Die elektrochemische Messzelle	65
2.4.3	Referenzelektroden	67
2.4.4	Messtechnik der Impedanzspektroskopie	69
2.4.5	Messdatenqualität	71
2.4.6	Ersatzschaltbilder und ihre Elemente	72
2.4.7	Kurvenanpassung und Modelle	79
2.4.8	Impedimetrische Biosensoren zur Detektion von <i>S. aureus</i>	81
2.5	Schlussfolgerungen	85
3	Material und Methoden	89
3.1	Materialien	89
3.2	Aufbau des Messplatzes	92
3.2.1	Messkammer	92
3.2.2	Elektroden	94
3.2.3	Messplatz	95
3.2.4	Messplatz im S2-Labor	95
3.3	Messmethoden	96
3.3.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	96
3.3.2	Microscale Thermophorese	97
3.3.3	Modifizierung der Elektroden	98
3.3.4	Quarzkristallmikrowaage	99
3.3.5	Chronocoulometrie	101
3.3.6	Elektrochemische Impedanzspektroskopie	104
3.3.7	Zyklovoltammetrie	105
3.3.8	Vorbereitung der Bakterien	107
3.3.9	Ersatzschaltbild und Kurvenfitting	108
4	Ergebnisse	113
4.1	Entwicklung der Messkammer	114
4.1.1	Fluidik	114
4.1.2	Elektrodensystem	118

4.1.3	Aufbau des Messplatzes	122
4.2	Immobilisierung des Aptamers	123
4.2.1	Qualität des synthetisierten Aptamers	123
4.2.2	Bindungsaffinität des thiolmodifizierten Aptamers	125
4.2.3	Immobilisierung des Aptamers	128
4.3	Charakterisierung	145
4.3.1	Charakterisierung der Elektroden	146
4.3.2	Charakterisierung des Messsystems	157
4.3.3	Optimierung der Parameter	168
4.4	Detektion von Protein A und <i>S. aureus</i>	174
4.4.1	Theoretische Betrachtung der Anbindung	175
4.4.2	Detektion von Protein A mit der EIS	186
4.4.3	Detektion von <i>S. aureus</i> mit der EIS	197
4.5	Modell	203
4.5.1	Herleitung der einzelnen Elemente	203
4.5.2	Bestimmung der Impedanz	208
4.5.3	Bestimmung der Parameter	209
4.5.4	Simulierte Kurven & Vergleich mit den Messdaten	219
5	Diskussion und Ausblick	225
5.1	Messkammer	226
5.2	Immobilisierung	227
5.3	Messsystem	229
5.4	Detektion der Analyten	231
5.5	Modell	233
5.6	Ausblick	235
	Literaturverzeichnis	237
	Anhang	269
	Publikationen	272
	Lebenslauf	274

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha_{\text{ox/red}}$	Ladungstransferkonstanten
A	Adenin
AFM	Rasterkraftmikroskop
AS	Aminosäuren
A_w	Warburgkoeffizient
BB	Bindungspuffer
C	Cytosin
CC	Chronocoulometrie
C_{dl}	Doppelschichtkapazität
CE	Gegenelektrode
CPE	Konstantphasenelement
CV	Zyklovoltammetrie
d	Schichtdicke
$D_{\text{ox/red}}$	Diffusionskonstanten
DIMDI	Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPV	differentielle Pulsvoltammetrie
DRN	Daunorubicin-Aptamer
dsDNS	Doppelstrang-DNS
ϵ_0	Permittivität des Vakuums
ϵ_r	relative Permittivität
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIS	elektrochemische Impedanzspektroskopie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELONA	Enzyme-linked Oligonukleotid Assay
F	Faradaykonstante
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$	Hexacyanoferrat
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer

G	Guanin
GQD	Graphen Quantum Dots
HDA	Helicase-abhängige Vervielfältigung
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
ITO	Indium- Zinn- Oxid
k_0	heterogene Elektronentransferkonstante
k_{app}	scheinbare heterogene Elektronentransferkonstante
k	Zellkonstante
κ	Leitfähigkeit
KbE	koloniebildende Einheiten
KCl	Kaliumchlorid
K_d	Dissoziationskonstante
K_D	scheinbare Dissoziationskonstante
$K_{3/4}[Fe(CN)_6]$	Kaliumhexacyanoferrat
KK	Kramers Kronig Beziehung
LoD	untere Nachweisgrenze
LSPR	lokalisierten Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie
MCH	Merkaptohexanol
MHK	minimale Hemmkonzentration
MPA	Merkaptopropionsäure
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MST	Microscale Thermophoresis
n	Koeffizient des Konstantphasenelementes
NHE	Normalwasserstoffelektrode
NP	Nanopartikel
OCV	Nullstrompotential
ON	Oligonukleotid
PA	Protein A
PAA	Protein A-bindendes Aptamer

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEEK	Polyetheretherketon
PNS	Peptidnukleinsäure
PTFE	Polytetrafluorethylen
QCM	Quarzkristallmikrowaage
R	Gaskonstante
R_{sol}	Lösungsmittelwiderstand
R_{ct}	Ladungstransferwiderstand
R_u	unkompensierter Widerstand
RE	Referenzelektrode
RNS	Ribonukleinsäure
RuHex	Hexaamin-Ruthenium-chlorid
SAM	selbstorganisierende Monoschicht
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SD	Standardabweichung
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SEB	<i>staphylococcal</i> enterotoxin B
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SERS	oberflächenverstärkten Raman Spektroskopie
SHE	Standardwasserstoffelektrode
SOMAmer	Slow off-rate modified aptamers
SPR	Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie
ssDNS	Einzelstrang-DNS
T	Temperatur
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer

TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TSB	Tryptic soy broth
vdW	van-der-Waals-Wechselwirkungen
ω	Kreisfrequenz
W	Warburg-Impedanz
WE	Arbeitselektrode
WGM	whispering gallery mode
z	Anzahl übertragener Elektronen

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Motivation

Vor der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming im Jahre 1928 waren infektiöse Krankheiten eine der häufigsten Todesursachen beim Menschen. Erst die Entwicklung von Antibiotika wie Penicillin ermöglichte die effektive Behandlung von bakteriellen Infektionen. Doch schon im Jahre 1940 erbrachten Abraham und Chain den Nachweis, dass bestimmte Bakterien eine Resistenz gegen Penicillin entwickelt hatten, indem diese ein Enzym produzierten, welches das Penicillin zerstört [1]. In den darauffolgenden Jahrzehnten gelang es Forschern, weitere wirksame Antibiotika zu entwickeln. Und die Bakterien entwickelten weitere ausgefeilte Resistenzmechanismen. Die Zahl der jährlich neu entdeckten Wirkstoffe nimmt immer weiter ab, während die Anzahl resistenter Erreger steigt [2]. Als Quelle der rasanten Entwicklung von Resistenzen wird die häufige Nutzung von Antibiotika bei Mensch und Nutztier vermutet. Der Verbrauch von Antibiotika in Deutschland lag 2011 bei ~2200 t, wovon 85 % in der Tierhaltung verwendet wurden [3]. Laut einer Studie von Feßler et al. sind 37 % aller Hühnchen- und Putenprodukte in Deutschland mit dem häufigsten Vertreter der resistenten Keime kontaminiert, den gegen mehrere Antibiotika und somit multiresistenten *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [4].

Da die Zahl neuer Antibiotika abnimmt, muss die Entwicklung von Resistenzen bei den Bakterien gehemmt werden, vor allem durch die Eindämmung des Antibiotikaverbrauchs, regelmäßige Kontrollen der Hygienestandards sowie die Vermeidung von nosokomialen Infektionen. Nosokomiale Infektionen

sind Infektionen, die im Zuge eines Aufenthalts in Krankenhäusern, Pflegestationen oder Arztpraxen auftreten. Trotz strenger Hygienevorschriften, sind in Deutschland 3,5 % der Patienten auf Allgemeinstationen und 15 % der Patienten auf Intensivstationen von nosokomialen Infektionen betroffen [5]. Hochrechnungen ergeben, dass jährlich etwa 500 000 Patienten in Deutschland von nosokomialen Infektionen betroffen sind, wovon 30 % vermeidbar wären [6]. In den Niederlanden wurden bereits Screenings, d.h. regelmäßige Kontrollen von Mitarbeitern und Risikopatienten auf Kontamination mit *S. aureus* in Krankenhäusern eingeführt [7]. Studien zeigen, dass bei 27 von 36 beobachteten Einrichtungen ein Screening zur Reduktion der Infektionen mit multiresistenten *S. aureus* führte [8]. Das Problem mit resistenten Keimen kostet das europäische Gesundheitssystem jährlich 900 Millionen Euro [9].

Für den Nachweis von multiresistenten Keimen wird im Krankenhaus ebenso wie in der Viehwirtschaft und der Lebensmittelherstellung hauptsächlich das Ausplattieren auf Agarplatten verwendet. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass das Ergebnis erst nach 2-4 Tagen erhalten wird. Durch lange Wartezeiten können sich die Keime vermehren und verbreiten, vor allem wenn der Patient nicht isoliert wird. Eine schnellere Analytik, die die Kontamination mit multiresistenten Keimen innerhalb von Minuten detektieren könnte, birgt eine Lösung für die effektive Infektionskontrolle. So könnten Kontaminationsstellen schnell identifiziert und der Antibiotikaverbrauch sowie die anfallenden Kosten drastisch reduziert werden.

1.2 Zielstellung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Entwicklung eines Biosensors zur Detektion von *S. aureus*, der eine möglichst schnelle Messung ermöglichen, dabei aber gleichzeitig sehr robust und preiswert herstellbar sein soll. Anhand dieser Kriterien wurde die elektrochemische Impedanzspektroskopie als Detektionsmethode und ein Aptamer als Erkennungselement gewählt.

Aptamere sind eine Klasse von Erkennungselementen, die den Analyten sensitiv und selektiv binden. Sie weisen aufgrund ihrer oligonukleotiden Struktur eine hohe Stabilität auf. Zudem können sie preisgünstig synthetisch in großen Mengen hergestellt werden. Die elektrochemische Impedanzspektroskopie ist

eine markierungs- und zerstörungsfreie Analysenmesstechnik, die vor allem für ihre Schnelligkeit bekannt ist und ein hohes Potenzial für preisgünstige tragbare Sensoren birgt. Die Kombination von Aptameren und der elektrochemischen Impedanzspektroskopie vereint deren Vorteile und erschafft eine neue Klasse von Biosensoren: die impedimetrischen Aptasensoren.

Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung eines solchen impedimetrischen Aptasensors von der Entwicklung der Messkammer, der Immobilisierung der Aptamere bis hin zur Untersuchung der Anbindung des Analyten. Das wissenschaftliche Gerüst bildet die Prüfung zweier Hypothesen:

- I Die Bindung von *S. aureus* an das Aptamer kann mit der elektrochemischen Impedanzspektroskopie detektiert werden.
- II Die Detektion basiert auf der Hinderung des Elektronentransfers zwischen dem Redoxmediator in Lösung und der Elektrode

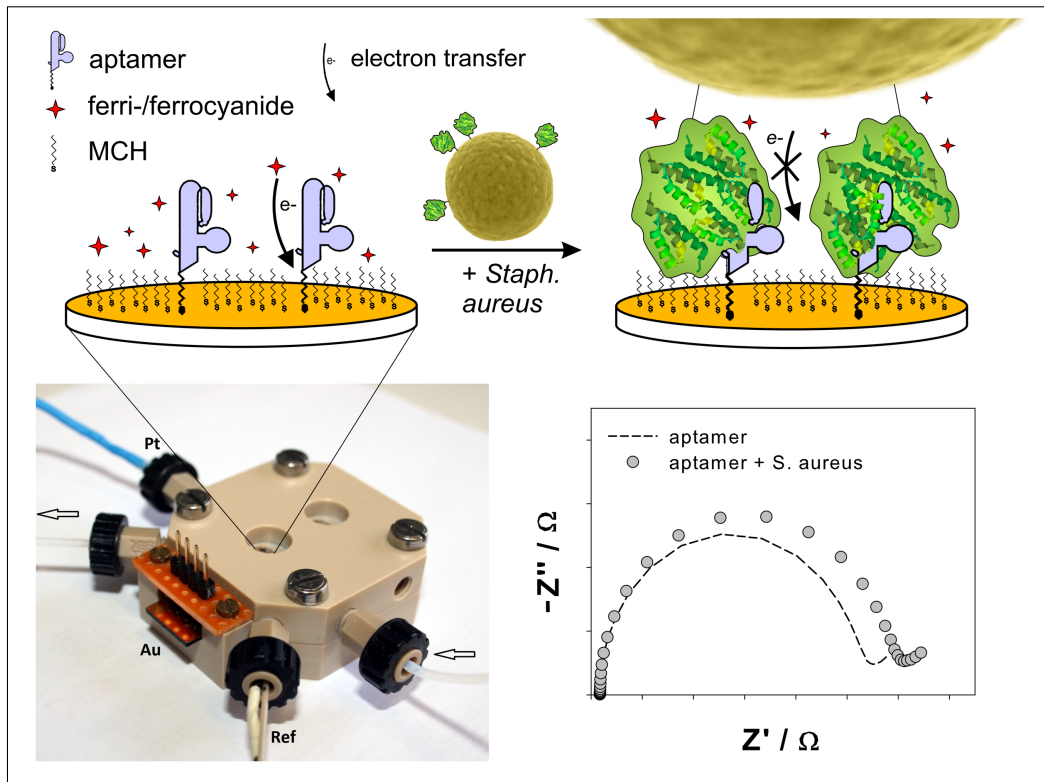
Um die zweite Hypothese zum Mechanismus der Detektion zu prüfen, wird ein mathematisches Modell erstellt, die nötigen Parameter für den entwickelten Sensor bestimmt und die Impedanz simuliert. Der Vergleich der simulierten Daten mit den gemessenen Daten gibt Aufschluss über die Vorgänge an der Elektrodenoberfläche.

Die Arbeit teilt sich in fünf Kapitel, nach der Einleitung werden im zweiten Kapitel die Grundlagen erläutert und ein Überblick über den Stand der Forschung für die Detektion von *S. aureus* gegeben. Das dritte Kapitel dieser Arbeit beschreibt die verwendeten Materialien und Methoden. Im vierten Kapitel werden die Ergebnisse dargestellt, von der Entwicklung der Messkammer, der Kopplung des Aptamers an die Goldelektrode, der Charakterisierung und Optimierung des Systems sowie bis zum Modell. Im fünften Kapitel werden die Ergebnisse diskutiert und ein Ausblick für weiterführende Forschungen gegeben.

Das Ergebnis dieser Arbeit ist ein impedimetrischer Aptasensor zur Detektion von *S. aureus* mit einer unteren Nachweisgrenze von 10 koloniebildende Einheiten (KbE) per ml, einer hohen Selektivität, einer Messzeit von 10 Minuten und einem Preis pro Elektrode von etwa einem Euro. Die Verifikation des Sensors an Realproben muss in weiterführenden Arbeiten erfolgen. Der Aptasensor enthält ebenfalls eine Fluidik, die automatisiert werden kann. Das Prinzip kann

KAPITEL 1. EINLEITUNG

auf andere Aptamer-Analyt-Paare übertragen sowie für Multianalysen verwendet werden und zeigt somit das innovative Potenzial impedimetrischer Aptasensoren für die Zukunft.



Kapitel 2

Theoretischer Teil und Stand der Forschung

2.1 Das Bakterium *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist ein ca. 1 μm großes grampositives beerenförmiges Bakterium (siehe Abbildung 2.1). Es ist fakultativ anaerob, betreibt keine aktive Bewegung und bildet keine Sporen. Es wächst bei Temperaturen von 7-47,8°C mit einem Optimum bei 35°C und in einem pH-Bereich von 4,5 bis 9,3 mit einem Optimum bei 7-7,5 [10]. Aureus bedeutet golden und rührt von der goldgelben Farbe der Kolonien her. Das für die gelbe Farbe verantwortliche Pigment Staphyloxanthin aus der Gruppe der Carotinoide ist ein Antioxidant und schützt das Bakterium vor reaktiven Sauerstoffspezien [11]. *S. aureus* siedelt sich vor allem auf der Haut und Schleimhaut von warmblütigen Tieren sowie Menschen an [12]. Ungefähr 30 % der Bevölkerung sind symptomfreie Träger des Bakteriums [13].

2.1.1 Pathogenität

S. aureus verfügt über eine Reihe von Abwehrmechanismen, wie zum Beispiel die Umhüllung mit einer Polysaccharidkapsel zum Schutz vor Umwelteinflüssen und vor dem Immunsystems des Wirtsorganismus. Ein weiterer Mechanismus ist die Bildung des Clumping-Faktors A, der sich auf der Oberfläche von *S. aureus* befindet und an das Fibrinogen im Blutplasma bindet, welches

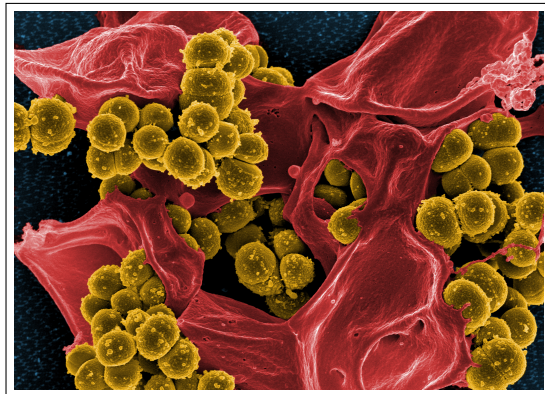


Abbildung 2.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *S. aureus* Bakterien (gelb) und humanen Neutrophilen (rot) - Quelle: Micrograph of MRSA von NIAID, lizenziert unter CC BY 2.0

durch die vom Bakterium produzierte Koagulase gerinnt. Eingehüllt im Fibrin wird *S. aureus* nicht mehr vom Immunsystem erkannt. Weitere vom Bakterium selbst produzierte Enzyme zerstören Bindegewebszellen, wodurch das Bakterium tiefer in den Körper des Wirtes eindringen kann. Zusätzlich kann *S. aureus* über das gebundene Fibrinogen an Integrine der Wirtszellen binden und so in diese eindringen [14].

S. aureus besitzt durchschnittlich 24 verschiedene Oberflächenproteine, die mittels des Enzyms Sortase an die Peptidoglykane der Zellwand gebunden werden [15] (siehe Abbildung 2.2). Zu diesen zählt auch das Protein A, welches in 99 % aller Koagulase-positiven *Staphylokokken* vorkommt [16], wobei die Menge an produziertem Protein A in den unterschiedlichen Stämmen variiert [17]. Protein A wird im Zytoplasma synthetisiert, anschließend sekretiert und schließlich entweder auf der Zelloberfläche gebunden oder in das extrazelluläre Medium abgegeben (etwa 15 %) [18]. O'Halloran et al. zeigten, dass die Kombination von Oberflächen-Protein A und sekretiertem Protein A die Überlebenschance von *S. aureus* in humanem Blut signifikant erhöht im Vergleich zu *S. aureus* mit nur einem der beiden Mechanismen [19].

Die Pathogenität des Protein A basiert zum Einen auf der Bindung des von-Willebrand-Faktors (vWF), ein essentielles Protein für die Hämostase, das dem Bakterium das Eindringen in Wunden ermöglicht [20, 21] und zum Anderen auf der Fähigkeit an die Fc-Region von Immunglobulinen zu binden, was das Bakterium vor der Phagozytose schützt [22]. Selbst von in einer Poly-

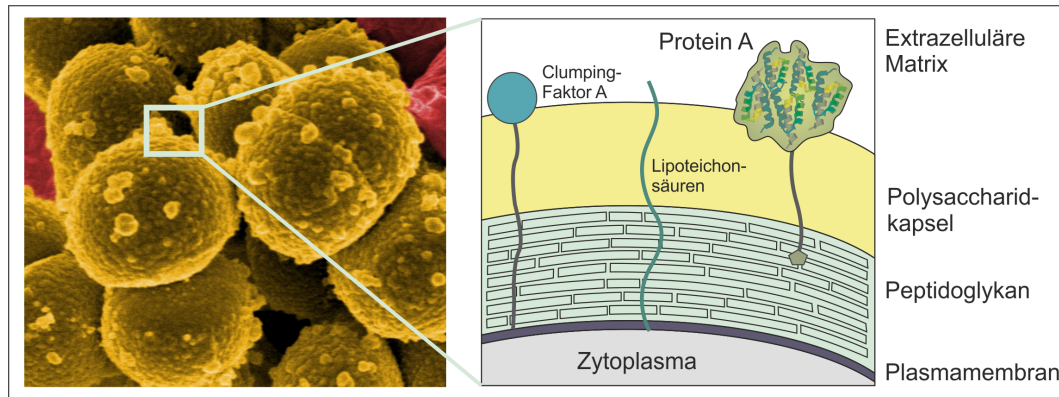


Abbildung 2.2: links: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *S. aureus* Bakterien (gelb) - Quelle: Micrograph of MRSA von NIAID, lizenziert unter CC BY 2.0; rechts: schematische Darstellung der *S. aureus*-Oberfläche bestehend aus einer das Zytoplasma umgebenden Plasmamembran, einer aufgelagerten mehrschichtigen Mureinhülle bestehend aus Peptidoglykanen, an die das Protein A verankert ist, sowie einer das Bakterium umschließenden Polysaccharidkapsel. Die Zellwand besteht aus 20-40 % Lipoteichonsäuren und präsentiert mehr als 24 verschiedene Oberflächenproteine, zu denen der Clumping-Faktor A und das Protein A zählen.

saccharidhülle eingekapselte *S. aureus*, wird das Immunglobulin G (IgG) über Protein A gebunden [23]. Untersuchungen mit Immunglobulin M (IgM) ergaben, dass Protein A ebenfalls an eine konservierte Region der schweren Kette des Fab-Fragmentes bindet [24]. Da diese Region der variablen β -Kette des T- und B-Zell-Rezeptors ähnelt, stellt Protein A ein Superantigen für B-Zellen dar, was zum Versagen eines Impfstoffes gegen *S. aureus* führte [25].

Mittels des Enzyms Trypsin kann das Protein A von der Oberfläche entfernt werden. Untersuchungen von De Dent et al. zur Verteilung von Protein A auf der Zelloberfläche ergaben, dass schon innerhalb einer Stunde nach Trypsinbehandlung die komplette Oberfläche wieder gleichmäßig mit Protein A bedeckt war [26].

Protein A (uniprot-ID: [P38507](#)) ist 40-60 kDa groß, wird durch das Gen *spa* kodiert und besteht in der Primärstruktur aus 441 Aminosäuren, enthält jedoch kein Cystein und keine freie Thiol-Gruppe. Es besitzt fünf homologe Domänen, die die Bindungsstelle für das IgG enthalten, sowie eine polymorphe variable Octapeptid-Repeat-Region, die eventuell als Linker zwischen Zellmembran und Medium dient [27].

S. aureus ist bekannt dafür, sich genetisch schnell an neue Umgebungsbe-



Abbildung 2.3: Nosokomiale Infektionen - links: Hautabzess verursacht durch *S. aureus* Bakterien - Quelle: CDC/ Bruno Coignard and Jeff Hageman; rechts: Jedes Jahr sind etwa 500 000 Patienten in Deutschland von einer nosokomialen Infektion betroffen, jeder 25te stirbt daran.

dingungen anzupassen. Jedoch weist die konservierte Sequenz des immunoinvasiven Faktors Protein A durchschnittlich nur eine Mutation in 70 Monaten auf [28]. Daher ist Protein A ein optimaler Angriffspunkt zur spezifischen Detektion von *S. aureus*.

Gelangt das Bakterium in offene Wunden unter günstigen Bedingungen wie z.B. ein geschwächtes Immunsystem, kann es sich ungehindert ausbreiten und Erkrankungen der Haut, sowie lebensbedrohliche Infektionen der Atemwege, des Herzens oder des Blutkreislaufes verursachen [29]. Jährlich sterben in Deutschland ungefähr 20 000 Patienten an den Folgen einer nosokomialen Infektion (siehe Abbildung 2.3).

Zudem zählt *S. aureus* zu den häufigsten Verursachern von Lebensmittelvergiftungen [30]. Die Bakterien können zwar durch hohe Temperaturen abgetötet werden, jedoch produziert *S. aureus* mehr als 20 verschiedene Toxine, von denen die bekanntesten Vertreter, die *Staphylokokken*-Enterotoxine A und B besonders hitzestabil sind [31]. Seit 2005 müssen Lebensmittelvergiftungen offiziell gemeldet werden und insbesondere Milchprodukte müssen auf Enterotoxine untersucht werden, wenn sie eine Kontamination mit *S. aureus* von mehr als 10^5 koloniebildende Einheiten (KbE)/g aufweisen [32]. Die jährlichen Kurzberichte der Europäischen Union zeigen jedoch, dass auch andere Lebensmittel betroffen sind, z.B. waren im Jahr 2015 gemischte Lebensmittel für 75 Ausbrüche und Fleisch für 85 Ausbrüche von Lebensmittelvergiftungen verantwortlich [33]. In Europa waren 2010 über eine Million Menschen von Lebensmittelerkrankungen betroffen, die durch *Staphylokokken*-Enterotoxine

verursacht wurden [34].

Normalerweise können Patienten mit Antibiotika behandelt werden, jedoch im Fall von resistenten Stämmen sind die Erkrankungen teilweise lebensbedrohlich. Laut ISO 20776-1:2006 wird ein Bakterium als resistent bezeichnet, wenn die Anwendung eines Antibiotikums in bestimmter Konzentration mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Versagen der Therapie führt. Um dies zu beurteilen, wird die minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt, also die kleinste Konzentration an Antibiotikum, die das Wachstum der Bakterien sichtbar hemmt. Die MHK von Kontrollkulturen, also nicht resistenten *S. aureus* (ATCC 29213, NCTC 12973, CIP 103429, DSM 2569) gegenüber dem Antibiotikum Methicillin liegt im Bereich 0,5-2 mg/l (ISO 20776-1:2006). Das Antibiotikum Methicillin wurde 1959 auf den Markt gebracht und schon drei Jahre später, 1962, wurde über erste Methicillin resistente *S. aureus* berichtet [35]. Im Jahr 2001 lag die Resistenzrate von *S. aureus* gegenüber Methicillin in Deutschland bei 20,7 % [36].

Ist ein Bakterium gegenüber mehreren Antibiotika resistent, so wird es als multiresistent bezeichnet. Der multiresistente *S. aureus* (MRSA) gehört zu den wichtigsten Vertretern der menschlichen Pathogene und stellt ein ernstzunehmendes Problem dar. In den USA wurden multiresistente *S. aureus* mit neun verschiedenen Resistenzen in Rind- und Putenfleisch nachgewiesen [37]. Laut dem Robert Koch-Institut weisen in Deutschland 70-80 % aller *S. aureus* Isolate eine Resistenz gegen β -Laktamase-empfindliche Penicilline auf, 72 % aller Methicillin resistenten *S. aureus* sind ebenfalls gegen Erythromycin resistent, 94 % gegen Chinolone und 66 % gegen Clindamycin, sowie 17 % gegen Gentamicin [38]. Die Ausbreitung von Glykopeptid-intermediate *S. aureus* würde die Therapie von multiresistenten *S. aureus* Infektionen trotz der mehr als 20 verschiedenen Antibiotika-Klassen mit zahlreichen Substanzen an ihre Grenzen bringen. Es ist offensichtlich, dass großer Bedarf an neuen antibiotischen Substanzen besteht, um resistente Keime bekämpfen zu können. Da jedoch seit der Jahrtausendwende nur 18 neue Wirkstoffe zugelassen wurden, muss ebenso nach alternativen Methoden zur Bekämpfung multiresistenter Keime gesucht werden [39].

2.1.2 Verbreitung und Übertragung

Die Resistenzen entstehen durch evolutionsbiologische Mechanismen, welche durch die schnelle Reproduktionsrate von Bakterien begünstigt werden. Bakterien, die einen Mechanismus entwickelt haben, der sie vor der Wirkung eines Antibiotikums schützt, überleben und vermehren sich [40]. Es ist bekannt, dass die Resistenzgene durch horizontalen Gentransfer von Bakterium zu Bakterium übertragen werden können, auch zwischen unterschiedlichen Bakterienarten [41]. Zum Thema der Übertragung von Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) und dessen Epidemiologie schrieb Grema et al. ein Review [42]. MRSA war anfangs nur beim Menschen diagnostiziert worden, bis 1972 die erste Infektion einer Milchkuh festgestellt wurde [43]. Inzwischen ist *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) die häufigste Ursache für Mastitis bei Milchkühen [44] und MRSA Infektionen wurden bei Pferden [45], Schweinen [46] sowie Hunden und Katzen [47] nachgewiesen. Voss et al. zeigte, dass 6 von 26 Mitarbeitern verschiedener Schweinebetriebe in den Niederlanden, aber nur 1 von 30 Schweinen MRSA positiv waren [46]. Der Mensch galt als Ursache für die Übertragung der Infektion auf die Tiere. Inzwischen gibt es jedoch Beweise, dass MRSA in alle Richtungen übertragen wird, d.h. auch von Tier-zu-Mensch und von Tier-zu-Tier [48].

Der hohe Verbrauch von Antibiotika beim Nutztier, allein 1800 t jährlich in Deutschland [3], lässt vermuten, dass diese eine große Rolle in der Entwicklung von Resistenzen spielen. Bestätigt wird diese Vermutung durch die deutlich geringere Anzahl von Resistenzen bei europäischen Wildtieren [49]. Die Studien von Paterson et al. deuten an, dass Personen mit regelmäßigem Kontakt zum Vieh, MRSA in Krankenhäuser eintragen könnten [50]. Die Gefahr liegt darin, dass die meisten Träger von MRSA symptomfrei sind und die Übertragung über Hände, Geräte und Oberflächen stattfindet. So zeigten Broens et al, dass sich 10 % von 117 getesteten Schweinen auf dem Weg zum Schlachthaus mit MRSA infizierten und die Zahl der infizierten Tiere erhöhte sich auf 60 % bis zum Moment der Betäubung [51]. Auf diese Weise gelangt *S. aureus* in unsere Lebensmittel und kann sich bei 15 °C in nur 8 h verdoppeln wie am Beispiel von rohem Schweinefleisch gezeigt wurde [52]. In China sind 20 % (49 von 250 Proben) aller tierischen Lebensmittel mit MRSA infiziert [53], in Deutschland sind es 37 % (32 von 86 Proben) aller Hühnchen- und Putenprodukte [4].

MRSA ist schon lang nicht mehr eine nur in Krankenhäusern anzutreffende Gefahr, denn Träger von MRSA finden sich in den unterschiedlichsten Umgebungen [42]. Daher sind regelmäßige Screenings von Patienten und Mitarbeitern extrem wichtig und diese müssen auf Tierarztpraxen, Tierpfleger, Schlachthöfe und viele weitere Einrichtungen ausgeweitet werden, um die Zahl resistenter Keime einzudämmen [54]. Zudem muss der Antibiotikaverbrauch in der Nutztierhaltung reduziert werden.

2.1.3 Bekämpfung

Seit 1997 gibt es in Europa ein Komitee (EUCAST) zur Angleichung der Richtlinien hinsichtlich der Durchführung von Antibiotika-Sensitivität-Tests [55]. Dank dieses Komitees und den daraus entstandenen nationalen Komitees, wie z.B. seit 2012 das nationale Antibiotika-Sensitivitätstest-Komitee in Deutschland [56], sind einheitliche Definitionen von Grenzwerten möglich. Im Jahr 2001 wurde das Infektionsschutzgesetz erlassen, welches zum einen die Meldepflicht von Krankheiten regelt, zum anderen das Robert-Koch-Institut verpflichtet, Empfehlungen zur Vorbeugung und Verhinderung von Infektionen auf Basis von Analysen bereit zu stellen und des Weiteren das Gesundheitsamt für die Überwachung der Umsetzung dieser Empfehlungen beauftragt [57]. Direkte Vorschriften zur Hygiene enthält das Gesetz nicht. Diese werden durch die Länder in der sogenannten Verordnung über die Hygiene und Infektionsprävention in medizinischen Einrichtungen (HygMedVO) festgelegt, die jedoch keinerlei spezifische Angaben zu MRSA enthält [58].

In den Niederlanden wurden bereits kontinuierliche Screenings von Mitarbeitern und Patienten im Krankenhaus im Zuge der sogenannten „Search and Destroy“-Taktik eingeführt. Dabei werden die Patienten in sogenannte Risikoklassen eingeteilt und entsprechend dieser behandelt [59]. Bei der Detektion von MRSA positiven Patienten, werden potentielle Kontaktpersonen gescreent und im Falle von mehr als zwei weiteren Fällen wird ein Krisenmanagement eingeleitet [60]. Ein kontinuierliches Screening von Patienten wird in Deutschland als zu aufwendig angesehen. Außerdem gibt es in den Niederlanden durchschnittlich 3 Mikrobiologen bzw. Hygieneärzte pro 1000 Betten, die für die Aktualität und Einhaltung von externen und internen Hygienevorschriften sorgen, während es in Deutschland 0,3 pro 1000 Betten sind [61]. Die

Anpassung dieses Faktors ist jedoch aufgrund der fehlenden Ausbildung und der chronischen Unterbesetzung problematisch.

Auf die Gefahren der massiven Nutzung von Antibiotika wird bereits seit Ende der 90er Jahre hingewiesen [62]. In den Niederlanden wird eine unabhängige Überwachung des Antibiotika-Einsatzes sowohl im Gesundheitswesen als auch in der Landwirtschaft durchgeführt. Dank der Kombination von verschiedenen Maßnahmen, wie z.B. die Bestrafung von Überdosierung, sowie das Verbot von bestimmten Antibiotika, konnten die Niederlande den Verbrauch von Antibiotika in der Viehzucht von 2007 bis 2012 um 50 % reduzieren [63]. In Deutschland werden bisher die Zahlen der verkauften Antibiotika aufgenommen, wobei mit Antibiotika versetzte Futtermittel nicht betrachtet werden [64].

Der große Unterschied zwischen den Taktiken in den Niederlanden und Deutschland zeigt, dass eine stärkere Zusammenarbeit weltweit gefördert werden muss [65]. Doch die Sicht auf Krankenhäuser und Veterinäre allein genügt nicht. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, können Tiere auf dem Weg ins Schlachthaus und Fleisch während der Verarbeitung mit MRSA infiziert werden [51], daher sollten die Hygieneanforderungen auf Lebensmittelhersteller sowie weitere Berührungstellen ausgeweitet werden. Für Lebensmittel gibt es seit 1998 eine gesonderte Lebensmittelhygiene-Verordnung, die im Jahr 2006 durch folgende EU-Verordnungen ersetzt wurde: EG-Verordnung 852/2004, 853/2004 und 854/2004. Sie sollen die Lebensmittelsicherheit EU-weit regeln und gewährleisten sowie die Lebensmittelhygiene überwachen. Zusätzlich gibt es noch die EG-Verordnung 2073/2005, die Kriterien zu Mikroorganismen in Lebensmittel festlegt. Diese enthält bereits einen Abschnitt (Kapitel V) über die Reinigung und Desinfektion von Gegenständen, Armaturen und Ausrüstungen, die mit Lebensmittel in Berührung kommen.

Erst kürzlich wurde entdeckt, dass Kläranlagen ein Reservoir für Resistenzgene darstellen [66, 67, 68] und damit zum Anstieg der resistenten Keime beitragen. Das macht es erforderlich, effektive Strategien zur Entfernung von Antibiotika aus dem Wasserkreislauf zu entwickeln.

Um diese Ziele umsetzen zu können, muss die Analytik von Mikroorganismen gleichermaßen weiterentwickelt werden. Im Folgenden soll der Stand der Technik für die Detektion von *S. aureus* betrachtet werden.

2.1.4 Detektion mittels konventioneller und molekularbiologischer Methoden

Eine einfache und günstige Methode *S. aureus* nachzuweisen, ist die Auftragung der Probe auf Agarplatten und die phänotypische Auswertung der gewachsenen Kolonien (siehe Tabelle 2.1). Die Auswertung erfordert erfahrenes Personal, um *S. aureus* Kolonien von anderen gewachsenen Kolonien zu unterscheiden. Um dies zu erleichtern, wurden selektive Agar entwickelt, dessen Zusammensetzung das Wachstum von *S. aureus* fördert und gleichermaßen das Wachstum anderer Arten hemmt. Zum Beispiel inhibiert die Zugabe von Salz das Wachstum der meisten Bakterienarten, während *S. aureus* auch hohe Salzkonzentrationen toleriert [10] und die Zugabe von Pyruvat und Katalase fördert nachweislich das Wachstum von *S. aureus* [69]. Die Zählung der Kolonien von beimpften Platten mit selektivem Baird-Parker-Agar oder Kaninchenplasma-Fibrinogen-Agar gelten weiterhin als Goldstandard (EN/ISO 68888), aber eine Inkubationszeit von 48 h wird empfohlen [70].

Tabelle 2.1: Übersicht von konventionellen und molekularbiologischen Methoden für die Detektion von *S. aureus*

Methoden	Analyt	Testzeit /h	Vorteile	Nachteile
Kultivierung	<i>S. aureus</i>	16 - 48	günstig, einfache Handhabung, selektiv, sensitiv	hohe Testzeit, benötigt trainiertes Personal
Koagulase-Test	Koagulase	4 - 24	einfache Handhabung, sensitiv	teuer, bedingt selektiv
Latex-Agglutinationstest	Protein A, clumping factor	0,25 - 1	einfache Handhabung	hohe Anzahl falsch-negativer Ergebnisse
ELISA	Antigene	1,5 - 4	hohe Selektivität	teuer, geringe Sensitivität, Kreuzreaktionen
PCR	Genabschnitte	2,5 - 6	hohe Sensitivität	teuer, benötigt trainiertes Personal

Eine Weiterentwicklung sind sogenannte chromogene Medien, die die biochemischen Eigenschaften der Zellen sichtbar machen. Die im Medium enthaltenen Substrate werden durch die von den Bakterien produzierten Enzyme gespal-

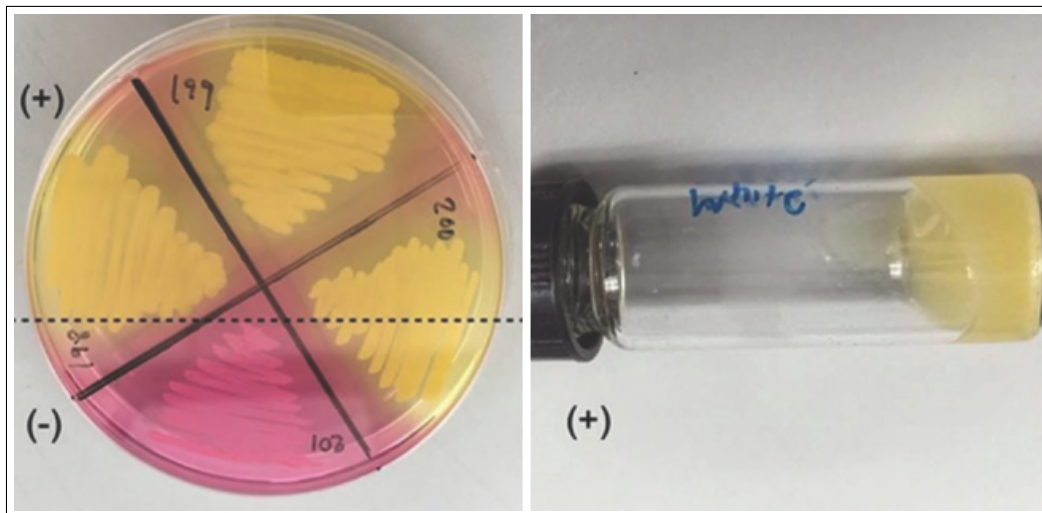


Abbildung 2.4: links: Chapman-Agar mit vier verschiedenen Milchproben - die Proben mit gelber Farbe sind *S. aureus* positiv; rechts: Koagulasetest einer positiven Milchprobe (Reproduziert aus [73] CC BY 4.0).

ten, wobei Chromophore entstehen, die die Kolonie einfärben. Zum Beispiel ChromIDTM (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) färbt α -Glukosidase produzierende Kolonien grünlich ein [71, 72]. Der Chapman-Agar enthält Mannit, welches von *S. aureus* zu einer Säure umgesetzt wird, woraufhin der Farbindikator von rot zu gelb umschlägt (siehe Abbildung 2.4) [73].

Die Vorteile chromogener Medien sind die einfache Handhabung sowie die hohe Sensitivität und Selektivität, jedoch erschwert die lange Inkubationszeit von mindestens 24 h das Screening von ambulanten Patienten oder von Produkten in schnellen Abläufen wie z.B. Lebensmittel [74].

Daher wird für das Screening von Milchkühen auf Mastitis im Allgemeinen der schnellere Koagulase-Test verwendet. Die Koagulase ist ein für *S. aureus* spezifisches Enzym, das in anderen Arten nicht vorkommt. Der Koagulase-Test besteht darin, dass die Probe mit Kaninchenblut inkubiert wird, welches in Anwesenheit von Koagulase gerinnt [75], wodurch auf die Anwesenheit von *S. aureus* geschlossen werden kann. Dieser Test gibt zwar schnelle Resultate, weist jedoch einen Mangel an Sensitivität und Spezifität auf. Ein Überblick aller konventionellen Methoden in der Labordiagnostik zur Identifizierung von *S. aureus* und dessen Resistenzen bietet das Review von Brown et al. [76].

Eine höhere Spezifität kann mit dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) erreicht werden, ein fundamentaler und weit verbreiteter Immuno-

assay, der auf der spezifischen Bindung eines Antigens an einen Antikörper basiert. Durch die anschließende Zugabe eines Substrates wird eine enzymatische Farbreaktion induziert, womit das Antigen quantifiziert werden kann. Yazdankhah et al. entwickelte einen ELISA zur Detektion von *S. aureus* in Milch, der 3 h benötigt und ein Detektionslimit von 10^4 - 10^5 koloniebildende Einheiten (KbE) per ml aufweist [75]. Der Assay konnte 14 von 16 unterschiedlichen *Staphylokokken* detektieren und ist somit für die Diagnose von Mastitis gut geeignet. Er eignet sich jedoch nicht zur Unterscheidung von resistenten und sensitiven *Staphylokokken*. ELISA für die spezifische Detektion von *S. aureus* haben den Nachteil, dass das von *S. aureus* produzierte und an der Oberfläche gebundene Protein A an die Fc-Region der Antikörper von Säugetieren bindet und somit Kreuzreaktionen auftreten. Die Fc-Region von Nicht-säugetieren wird hingegen nicht von Protein A erkannt, wie z.B. der Antikörper IgY aus dem Eigelb von Hühnereiern [77]. Yamada et al. nutzte diesen Antikörper für die Entwicklung eines ELISA um die Kreuzreaktion mit Protein A zu minimieren [78]. Dieser Antikörper detektiert ein von Methicillin resistenten *S. aureus* produziertes Protein und kann somit diese von Methicillin sensitiven *S. aureus* mit hoher Protein A Expression unterscheiden. Jedoch liegt die Sensitivität des entwickelten Assays bei 10^7 KbE/ml.

In der Lebensmittelindustrie sind es die über 20 verschiedenen von *S. aureus* produzierten Toxine, die auch nach der Tötung und Entfernung von *S. aureus* in den Produkten verbleiben und Lebensmittelvergiftungen verursachen können. Im Allgemeinen ist die Aufnahme von $\sim 1 \mu\text{g}$ Toxin ausreichend, um typische Symptome wie Übelkeit, Erbrechen, Krämpfe, Kopfschmerzen und Erschöpfung zu verursachen. Diese Toxinkonzentration wird von einer *S. aureus*-Kultur mit 10^5 KbE pro ml produziert [10]. Der Betroffene ist 2-3 Tage arbeitsunfähig, nur in seltenen Fällen kann eine Vergiftung mit *S. aureus* zum Tod führen. Das Review von Wu et al. beschreibt die in den letzten Jahrzehnten entwickelten Methoden zur Detektion von *Staphylokokken*-Enterotoxinen in Lebensmitteln [79]. Die EU verabschiedete 2006 eine Verordnung (EG-VO 2073/2005) über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel aufgrund des Einflusses von *Staphylokokken*-Enterotoxinen auf die menschliche Gesundheit. In dieser Verordnung sind die Grenzwerte für *S. aureus* in KbE/g für Milch und Milchprodukte festgelegt. Diese gelten zur Kontrolle der Prozesshygiene

und werden am Ende der Herstellung kontrolliert. Dabei wird die Verwendung der Nachweismethoden nach EN/ISO 68888-1, dem Zählverfahren mit Baird-Parker-Agar und anschließendem Koagulase-Test oder nach EN/ISO 68888-2, dem Zählverfahren mit Kaninchenplasma-Fibrinogen-Agar empfohlen. Bei unbefriedigenden Ergebnissen soll die Hygiene bzw. die Wahl der Rohstoffe verbessert werden. Nur im Falle von 10^5 KBE/g wird eine weitere Untersuchung auf *Staphylokokken*-Enterotoxine empfohlen.

ELISA für die parallele Detektion der *Staphylokokken*-Enterotoxine A-E mit Nachweisgrenzen von 0,05-0,25 ng/g sind kommerziell verfügbar und liefern Ergebnisse innerhalb von 1,5-4 h [80]. Zum Screening sind ELISA jedoch aufgrund des hohen Preises eher ungeeignet. Daher wird trotz der höheren Relevanz der Toxine weiterhin auf die Anwesenheit von *S. aureus* mit den Zählverfahren auf Agarplatten getestet. Zudem ist nach der EG-Verordnung 2073/2005 nur bei Milch und Milchprodukten ein Nachweis auf *S. aureus* verpflichtend, obwohl vor allem auch Fleischprodukte mit *S. aureus* kontaminiert sind [10].

Eine weitere Alternative zur Detektion von *S. aureus* bietet die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), eine Methode zur Vervielfältigung von einzelnen DNS-Strängen und somit zur Detektion von spezifischen Genen. Wie in dem Review von Carroll beschrieben, wurden seit der Jahrtausendwende große Fortschritte in der Entwicklung dieser molekularen Assays hinsichtlich Echtzeitmessungen erzielt [81]. PCR-basierte Methoden beinhalten die Detektion von *S. aureus* spezifischen Genen wie z.B. *nuc*, *spa* oder *fem* in Kombination mit den Genen für die Resistenz gegenüber β -lactam Antibiotika, *mecA* und *mecC* [82]. Die *mec* Gene kodieren die Penicillin-bindenden Proteine, PBP2a (*mecA*) und PBP2c (*mecC*), die eine Resistenz gegenüber Penicillase-resistente Antibiotika wie z.B. Methicillin und Oxacillin ermöglichen. Die PCR wird zum Nachweis von Methicillin resistenten *S. aureus* verwendet, da sie eine vergleichbare Sensitivität, aber schnellere Ergebnisse als plattenbasierte Techniken aufweisen. Aufgrund der hohen Investitionskosten für die Anschaffung der Geräte und die hohen Anforderungen an das bedienende Personal, sind die PCR-basierten Methoden eher in Zentrallaboren zu finden.

Wie in Hirvonen et al. zusammengefasst, gibt es zahlreiche entwickelte PCR-basierte Assays zur Detektion von *S. aureus* [82]. Es gibt kompakte Testchips, die die benötigten Enzyme für die PCR bereits enthalten und somit deren

Anwendung vereinfachen, wie z.B. der GenomEra MRSA/SA (Abacus Diagnostica, Turku, Finnland). Jedoch setzen diese Assays eine vorhergehende Anreicherung bzw. Kultivierung der Probe voraus, was die Testzeit zu 16-24 h verlängert und somit keinen Vorteil zu plattenbasierten Techniken bieten. PCR-basierte Methoden, die zusätzliche Geräte voraussetzen, benötigen normalerweise 2,5-6 h, wie z.B. der Verigene[®] Gram-Positive Blood Culture Test (Nanosphere, IL, USA), der auf die Präsenz von verschiedenen Bakterien und gleichzeitig auf das Vorhandensein von Methicillin Resistenz (*mecA*) sowie von Vancomycin Resistenzen (*vanA* und *vanB*) testet. Ein großer Nachteil dieser Methode liegt in der Zuweisung der Resistenzen, da diese nicht den Bakterienarten zugeordnet werden können. Da die Methicillinresistenz auch von anderen Bakterien als *S. aureus* stammen kann, sollten Proben, die Mischungen von verschiedenen Bakterien enthalten, erst mittels anderer Methoden auf MRSA getestet und die PCR zur anschließenden Verifizierung genutzt werden.

Die Entdeckung der Genverbindung *SCC_{mec}-orfX* ermöglichte die Weiterentwicklung der Methode, denn das *S. aureus* spezifische Gen *orfX* befindet sich direkt an der Stelle, wo das mobile genetische Element für die Methicillin Resistenz (*SCC_{mec}*) eingefügt wird [83]. Durch die Detektion dieser Genverbindung, auch junction genannt, werden nur *S. aureus* detektiert, die das *mec* Gen tragen, was die Sensitivität und Spezifität der Assays erhöht. Kommerzielle Beispiele, die diese *SCC_{mec}-orfX* junction nutzen, sind GeneXpert MRSA Assay (Cepheid Diagnostics, CA, USA), BD MAX MRSA Assay (Becton Dickinson Diagnostics, MD, USA) und LightCycler MRSA Advanced Test (Roche Diagnostics, Schweiz). Der BD MAX MRSA erreicht die höchsten Werte mit einer Sensitivität von 93,9 % und einer Spezifität von 99,2 % [82].

Es gibt jedoch Stämme, die sensitiv zu Oxacillin sind, obwohl sie das *mecA* Gen tragen und Stämme, denen das *mecA* oder *mecC* Gen fehlt, aber trotzdem eine Oxacillin Resistenz aufweisen. Deshalb weisen PCR-basierte Methoden hohe Zahlen von falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen auf [84]. Zudem müssen, durch die sich schnell ändernde Epidemiologie von *S. aureus* und der Entstehung neuer infektiöser Stämme mit neuen Resistenzmechanismen, neue kodierende Gene gefunden und der Assay entsprechend erweitert werden, wie das Beispiel der Entdeckung von *mecC* zeigt [85]. Weiterhin detektiert die PCR als indirekte Methode die Desoxyribonukleinsäure (DNS) und

nicht direkt die Bakterien oder Toxine, wodurch Verunreinigungen der Probe oder Fehler in der Probenvorbereitung das Ergebnis verfälschen.

Kürzere Testzeiten, günstigere Herstellung und die Entwicklung von vor-Ort-Analytik-Geräten bietet der Bereich der Biosensorik. Dieser wird im nächsten Abschnitt beschrieben und an dessen Ende auf den Stand der Forschung für die Detektion von *S. aureus* mittels Biosensoren eingegangen.

2.2 Die Biosensorik

Seit jeher versucht der Mensch, seine Umgebung zu beobachten, zu verstehen und zu analysieren. Wo unsere Sinne an ihre Grenzen reichen, werden technische Messgeräte entwickelt, die Stoffe in der Umgebung qualitativ oder quantitativ nachweisen können. Zu solchen analytischen Messgeräten zählen auch die Biosensoren. Als Inspiration dient oftmals das biologische Vorbild, wie zum Beispiel das Männchen des Seidenspinners. Diesem Schmetterling genügt ein Duftstoffmolekül auf 11 km Entfernung, um eine Partnerin zu finden [86]. Ein vergleichbares Beispiel solch hoher Sensitivität bei Biosensoren bietet der Herbizid-Sensor, der 50 ng Atrazin in einem Liter Probe nachweisen kann [87]. Durch die Automatisierung von Prozessen wächst stetig der Bedarf an schneller Analytik und somit auch an Biosensoren. Laut dem Bericht von „Research and Markets“ lag der weltweite Markt für Biosensoren im Jahr 2016 bei 16 Milliarden US \$ und steigt voraussichtlich bis 2021 jährlich um 9 % [88]. Jedoch gibt es deutlich mehr in der Forschung entwickelte Problemlösungen und Detektionsprinzipien als auf dem Markt verfügbare Anwendungen [89]. Die Hauptanwendung von Biosensoren liegt mit 80 % weiterhin im medizinischen Sektor mit den bekanntesten Beispielen, dem Glukosesensor und dem Schwangerschaftstest [90]. Ihr Einsatz ist jedoch in vielen Bereichen denkbar, wie z.B.:

1. In der Lebensmittelindustrie zur Prozessüberwachung und zur Kontrolle der Produktqualität,
2. In der Umweltanalytik zur Kontrolle von Abwässern und der Bewertung von Böden,

3. In der öffentlichen Sicherheit zur Detektion kleinster Spuren von Biowaffen [91, 92],
4. In der Landwirtschaft zur Bewertung von Böden, Detektion von Krankheiten bei Pflanzen und Tieren oder der Überwachung des Progesteronlevels bei Kühen [93],
5. etc.

2.2.1 Aufbau und Funktion eines Biosensors

Ein Biosensor ist ein Gerät, das einen Analyten qualitativ oder quantitativ nachweisen kann [89]. Die Biosensoren gehören zur Klasse der chemischen Sensoren und bestehen aus einem analytischen Erkennungselement und einem Transducer (Signalwandler, siehe Abbildung 2.5). Das biologische Erkennungselement steht in Kontakt mit der Probe und ist mit dem Transducer verbunden. Tritt der Analyt mit dem Erkennungselement in Wechselwirkung, so resultiert dies in der Änderung einer Eigenschaft bzw. mehrerer Eigenschaften des Systems, wie z.B. die Veränderung der Schichtdicke, des Brechungsindex oder der elektrischen Ladung. Der Transducer wandelt diese Änderung, Effekt genannt, in ein elektrisches Signal um und verstärkt es gegebenenfalls. Anschließend wird das elektrische Signal verarbeitet und ausgewertet.

An Biosensoren werden hohe Anforderungen gestellt: Neben einer hohen Sensitivität und Selektivität, sind möglichst kurze Antwortzeiten, ein geringer Preis und einfache Handhabung, sowie hohe Stabilität und Reproduzierbarkeit gewünscht [94]. Ein Grund, warum Biosensoren oftmals nicht den Sprung auf den Markt schaffen, liegt an der hohen Rate von falsch-positiven Ergebnissen. Daher sind Genauigkeit und Präzision ebenso wichtige Kriterien für die Qualität eines Biosensors wie die zuvor genannten Anforderungen. Nichtsdestotrotz, hängt der Erfolg eines Biosensors immer von der Akzeptanz des Anwenders ab.

Die Selektivität eines Biosensors wird vor allem durch das Erkennungselement definiert, das aus der Vielzahl von Molekülen in der Probe spezifisch den Analyten erkennt. Aber auch der Transducer kann zur Selektivität beitragen, indem nur bestimmte Effekte in ein elektrisches Signal umwandelt werden, z.B. durch einen Fluoreszenzfilter. Die Sensitivität eines Biosensors hingegen wird hauptsächlich durch den Transducer bestimmt, definiert durch dessen

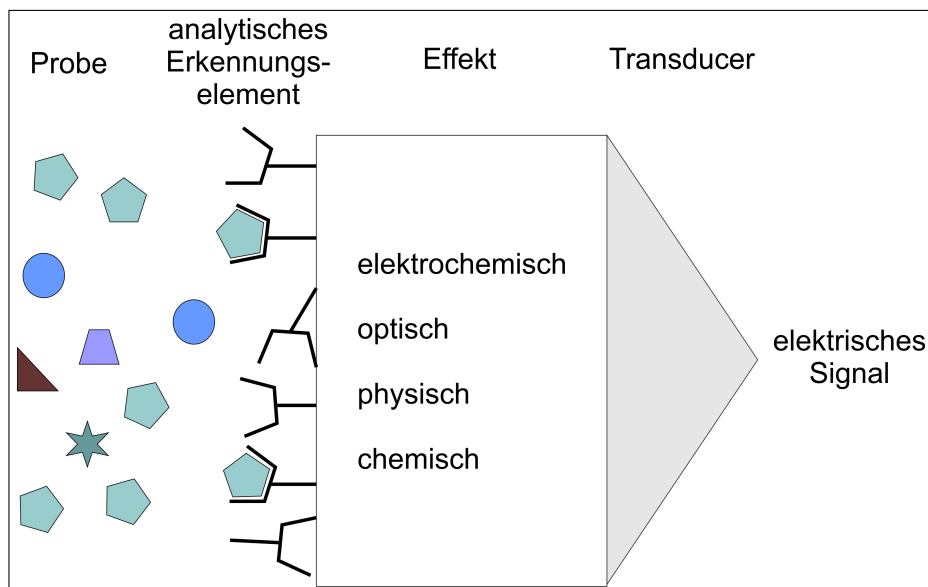


Abbildung 2.5: Prinzipieller Aufbau eines Biosensors aus analytischem Erkennungselement, Effekt und Transducer

Empfindlichkeit für die Messung des Effektes und dessen Genauigkeit bei der Umwandlung in ein elektrisches Signal. Der Transducer kann den Effekt gegebenenfalls verstärken. Aber auch das Erkennungselement kann die Sensitivität des Biosensors erhöhen, wenn dieses den Analyten auch in kleinen Konzentrationen erkennt bzw. fest bindet. Die Wahl der Komponenten ist somit ein wichtiger Bestandteil bei der Entwicklung eines Biosensors.

Transducer

Die Transducer werden nach dem gemessenen Parameter unterteilt. So messen z.B. thermische Transducer die Temperatur, akustische Transducer können anhand des Piezo-Effektes kleinste Frequenzänderungen aufnehmen, optische Transducer detektieren Photonen und elektrochemische Transducer detektieren die bei einer chemischen Reaktion involvierten Elektronen.

Die Vorteile optischer Transducer sind deren Unempfindlichkeit gegenüber elektrischen und magnetischen Feldern sowie Temperaturschwankungen, sowie dass sie kein Referenzsignal benötigen und eine hohe Kalibrierstabilität aufweisen. Daher sind optische Transducer nach den elektrochemischen in Biosensoren am zweithäufigsten vertreten. Allerdings ist ihre Verwendung in vielen Anwendungen aufgrund prägnanter Nachteile nicht möglich, wie z.B. deren

Empfindlichkeit gegenüber Umgebungslicht, die längeren Ansprechzeiten und die begrenzte Langzeitstabilität.

Die Vorteile der elektrochemischen Transducer gegenüber optischen sind ihre hohe Sensitivität, ihre einfache Handhabung und das sie kostengünstig hergestellt werden können. Zudem ist meist keine Zugabe von Markern notwendig. Der markanteste Nachteil ist deren Temperaturempfindlichkeit. Je nach Anwendung sollte somit der passende Transducer gewählt werden.

Bei den elektrochemischen Transducern handelt es sich um Elektroden, die einen Ladungsfluss in Form eines Stroms, einer Spannung oder einer Aufladung detektieren. Für die Messung des Ladungsflusses benötigt man mindestens zwei Elektroden, die in einer sogenannten elektrochemischen Messzelle über einen Elektrolyten miteinander verbunden sind. Es gibt zahlreiche elektroanalytische Messmethoden, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Messprinzipien verschiedene Charakteristika des zu untersuchenden Systems betrachten [95]. So detektiert die Amperometrie den Strom, der aus einer angelegten konstanten Spannung resultiert. Sie wird meist zur Detektion von Edukten oder Produkten bei einer Umsatz-Reaktion verwendet, wie z.B. bei der von Clark et al. im Jahr 1962 entwickelte Clark-Elektrode, die den Blutzucker misst [96]. Das auf der Oberfläche der Clark-Elektrode immobilisierte Enzym Glukose-Oxidase setzt Glukose unter Anwesenheit von Sauerstoff zu Glukonolakton und Wasserstoffperoxid um. Das Wasserstoffperoxid wird bei einer Spannung von etwa -150 mV bezogen auf eine Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode an der Elektrode reduziert und der resultierende Strom ist proportional zur Glukosekonzentration.

Eine Variante der Amperometrie ist die Chronoamperometrie [95], bei der der Stromverlauf nach einem angelegten Potentialsprung zeitabhängig ausgewertet wird. Dabei wird die Arbeitselektrode auf ein bestimmtes Potential vorgespannt, bei dem quasi kein Strom fließt. Anschließend wird ein Potential angelegt, bei dem die elektroaktiven Moleküle an der Elektrodenoberfläche sofort umgesetzt werden. Bei einer ungerührten Lösung ist der Transport der elektroaktiven Moleküle von und zur Elektrodenoberfläche allein von deren Diffusion abhängig. Da die Diffusion der Moleküle zumeist deutlich langsamer ist (ms) als der Ladungstransfer mit der Elektrode, erhält man einen Strom, der mit der Zeit exponentiell abfällt. Die Chronoamperometrie wird oft zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von elektroaktiven Substanzen oder zur

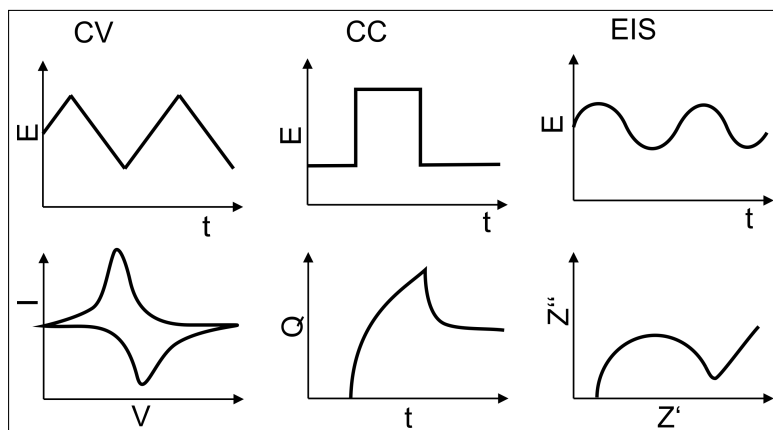


Abbildung 2.6: Analytische Messmethoden elektrochemischer Transducer, die in dieser Arbeit verwendet wurden - CV = Zyklovoltammetrie, CC = Chronocoulometrie, EIS = Elektrochemische Impedanzspektroskopie - oben ist das aufgetragene Signal, unten die Antwort dargestellt.

Untersuchung des Mechanismus von Elektrodenreaktionen verwendet. Durch Integration des Stroms i erhält man die Ladung Q , dessen zeitabhängige Betrachtung als Chronocoulometrie (CC) bezeichnet wird (siehe Abbildung 2.6) [95].

Bei der Voltammetrie wird wie bei der Amperometrie ebenfalls der Strom detektiert, jedoch eine variable Spannung angelegt, wie z.B. eine Dreiecksspannung (Zyklovoltammetrie). Der resultierende Strom wird gemessen und gegen die angelegte Spannung aufgetragen, was als Zyklovoltammogramm bezeichnet wird (siehe Abbildung 2.6). Zur Charakterisierung des in dieser Arbeit entwickelten Biosensors wurden sowohl die Chronocoulometrie als auch die Zyklovoltammetrie angewendet. Zur Detektion der Analyten wurde die elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) verwendet, bei der die Stromantwort auf eine sinusförmige Wechselspannung gemessen und die Impedanz aus dem Quotient berechnet wird [97]. Die EIS hat gegenüber den anderen elektrochemischen Messmethoden den Vorteil, dass die Untersuchung aufgrund der Verwendung sehr niedriger Spannungen ohne signifikante Veränderung des zu untersuchenden Systems stattfindet, also zerstörungsfrei arbeitet.

Ein Biosensor wird zudem dadurch definiert, dass das Erkennungselement mit dem Transducer gekoppelt ist. Je nachdem wie diese Kopplung erreicht wird, unterscheidet man die Biosensoren der ersten, zweiten und dritten Generation [89]. Bei Biosensoren der ersten Generation befindet sich das Erken-

nungselement in räumlicher Nähe zum Transducer ohne eine direkte Verbindung. Bei der zweiten Generation wird ein Mediator als flexible Verbindung zwischen Erkennungselement und Transducer eingeführt. Und in der dritten Generation wird das Erkennungselement am Transducer immobilisiert und somit eine direkte Kopplung geschaffen. Am meisten verbreitet sind Biosensoren der dritten Generation, indem das Erkennungselement kovalent an den Transducer gebunden wird. Dies hat die Vorteile der höheren Stabilität des Systems und deren mögliche Wiederverwendung sowie die Möglichkeit der Manipulation der unmittelbaren Umgebung des Erkennungselementes durch geeignetes Design.

Erkennungselemente

Die bisher bekannten Erkennungselemente werden in drei Hauptkategorien unterteilt: die affinen, katalytischen und synthetischen Erkennungselemente. Zu den affinen Erkennungselementen werden z.B. Antikörper, Lektine und Nucleotide gezählt, die den Analyt reversibel binden. Sie eignen sich vor allem zur Entwicklung von Biosensoren, die regenerierbar sein sollen. Zu den katalytischen Erkennungselementen gehören unter anderem Enzyme, Ribozyme und Zellen, da diese Edukte zu Produkten umsetzen. Vor allem Enzyme eignen sich für kontinuierliche Messungen, da bei jedem Analyt ein Signal erzeugt wird. Unter synthetischen Erkennungselementen versteht man zum Beispiel molekular geprägte Polymere, d.h. biologische Strukturen, die in der Natur so nicht vorkommen. Sie eignen sich vor allem, wenn man toxische Substanzen detektieren will, gegen die auf biologischem Wege keine Erkennungselemente erzeugt werden können.

Antikörper sind die am häufigsten verwendeten Erkennungselemente bei Biosensoren. Antikörper, auch Immunglobuline, sind Proteine, die vom Immunsystem bei Wirbeltieren zur Abwehr von unerwünschten Stoffen, sogenannten Antigenen, produziert werden. Ihre hohe Selektivität für ein spezifisches Antigen wird bei Biosensoren genutzt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Aptamere sind sowohl synthetische als auch affine Erkennungselemente und vereinen die hohe Selektivität und Sensitivität von Antikörpern mit der kostengünstigen synthetischen Produktion und der in-vitro Selektion. Die Aptamere werden im Abschnitt 2.3 detailliert

beschrieben.

2.2.2 Immobilisierung des Erkennungselementes

Mittlerweile gibt es zahlreiche Möglichkeiten für die Immobilisierung des Erkennungselementes, wobei man die spezifischen Eigenschaften der Erkennungselemente nutzt. Die Immobilisierungsverfahren werden in zwei Kategorien unterteilt: Zum einen die nicht-kovalenten Immobilisierungsmethoden, wie z.B. der Adsorption aufgrund Van-der-Waals-Kräfte, dem Einschluss in eine Matrix oder semi-permeable Membran oder der Vernetzung untereinander, und zum anderen die kovalenten Immobilisierungsmethoden, wobei hier nur die letzteren genauer betrachtet werden. Bei der kovalenten Bindung wird zwischen den funktionellen Gruppen der Transduceroberfläche und den funktionellen Gruppen des Erkennungselementes eine chemische Bindung geschlossen, die weitestgehend irreversibel ist. Zu den funktionellen Gruppen zählen Hydroxyl(OH)-, Amino(NH_x)-, Carboxyl(COOH)-, Sulfhydryl(SH)-, Phenyl-, Imidazol-, Epoxy-Gruppen sowie aktive Verbindungen, wie z.B. Doppel- oder Dreifachbindungen. Sind keine der gewünschten funktionellen Gruppen vorhanden, so muss die Oberfläche bzw. der Rezeptor zuerst aktiviert, d.h. durch chemische Modifizierung mit entsprechenden funktionellen Gruppen versehen werden. Anschließend kann die Bindung entweder direkt oder indirekt über bifunktionelle Linker, d.h. kleine Moleküle, die zwei funktionelle Gruppen tragen, geschlossen werden. Kohlenstoff-, Glas- und Siliziumoberflächen weisen Hydroxyl- oder Carboxylgruppen auf, während Proteine und Oligonukleotide Amino-, Carboxyl- oder Sulfhydrylgruppen aufweisen. Es gibt auch Interaktionen, bei denen keine chemische Verbindung geschlossen wird, die aber aufgrund ihrer Stärke trotzdem zu den kovalenten Bindungen gezählt werden, wie z.B. die Bindung von Lektinen an Zuckermoleküle oder die Avidin-Biotin-Bindung, die stärkste bisher bekannteste Protein-Protein-Interaktion ($K_D = 10^{-15}$ M). Eine weitere Besonderheit ist die quasi-kovalente Bindung von Sulfhydrylgruppen auf metallischen Oberflächen (Gold, Platin und Silber) mit einer Stärke von ~ 126 kJ/mol [98].

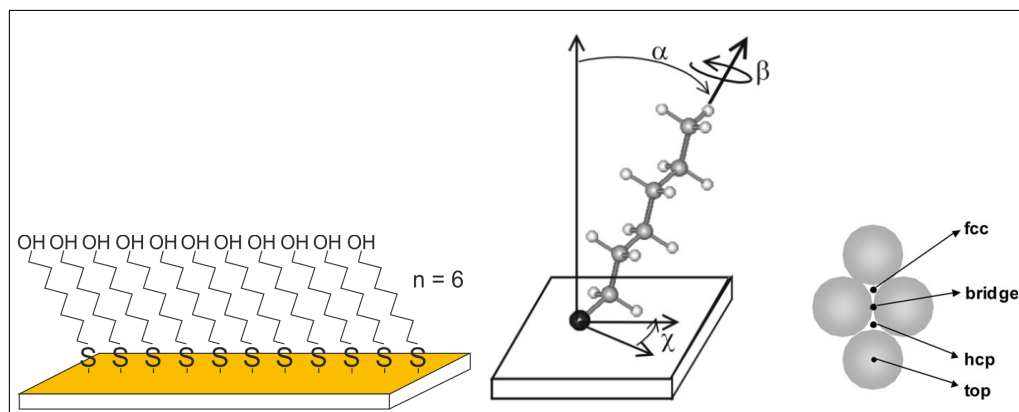


Abbildung 2.7: Links: Schematische Darstellung einer selbstorganisierenden Monoschicht (SAM) aus Alkanthiolen mit der Kettenlänge $n = 6$ und der Endgruppe $X = \text{OH}$; Mitte: Ein Alkanthiol adsorbiert auf einer Goldoberfläche via Goldmercaptidbindung, in einer aufgerichteten Stellung mit $\alpha = 30^\circ$, $\beta = 55^\circ$ und $\chi = 14^\circ$; Schwarz = Schwefelatom, grau = Kohlenstoffatom und weiß = Wasserstoffatom; Rechts: Goldatomgitter mit möglichen Bindungsstellen für Thiole. Abbildungen in der Mitte und rechts reproduziert aus [100] mit Erlaubnis der PCCP Owner Societies.

Die Goldmercaptidbindung und selbstorganisierende Monoschichten

Durch die Physisorption von Molekülen mit Sulfhydrylgruppen (SH) auf einer Goldoberfläche entstehen Goldmercaptidbindungen (Au-S-). Die Mercaptidbindung tritt auch bei Silber und Platin sowie anderen Edelmetallen auf und ist daher häufig bei den elektrochemischen Biosensoren vertreten, da die Transducer meist aus Edelmetallen bestehen. Das Phänomen der Mercaptidbindung ist ausführlich für Alkanthiole ($\text{SH}(\text{CH}_2)_n\text{X}$) beschrieben, die eine selbstorganisierende Monoschicht (SAM), d.h. eine geordnete Struktur bilden (siehe Abbildung 2.7 links). Die Ausrichtung der Moleküle zueinander ist jedoch abhängig davon, welche Konfiguration sie einnehmen [99]. Die bekannteste Konfiguration ist die $\sqrt{3} \times \sqrt{3} \text{ R}30^\circ$, bei der der Abstand zwischen zwei Mercaptidbindungen 0,499 nm beträgt und die Ketten um 30° zur Oberfläche geneigt sind (siehe Abbildung 2.7 Mitte) [100]. Ein einzelnes Alkanthiol nimmt dabei eine Fläche von $0,22 \text{ nm}^2$ ein. Ein Alkanthiol kann an verschiedene Positionen im Goldatomgitter binden (siehe Abbildung 2.7 rechts): Direkt auf einem Goldatom (top), zwischen zwei Goldatomen (bridge) oder in der Mitte von drei Goldatomen (fcc und hcp).

Die Physisorption der Alkanthiole auf Goldoberflächen findet nachweislich in

zwei Schritten statt. Einem schnellen innerhalb der ersten ~ 10 Minuten stattfindenden Prozess, bei dem eine Oberflächenbedeckung von $\sim 50\text{-}80\%$ erreicht wird. Und einem langsamen 8-24 Stunden andauernden Prozess der Umordnung und Sortierung, durch die eine kompaktere Schicht erhalten wird [101]. Nach Vericat et al. [100] adsorbieren alle Alkanthiole nach dem Zwei-Stufen-Prozess zuerst direkt auf einem Goldatom (top, Abbildung 2.7, dauert wenige Minuten) und dann bei der Ordnung nehmen sie eine der anderen drei Positionen ein, wobei die Positionen hcp und fcc bevorzugt werden. De Renzi et al. [102] hatte entdeckt, dass auch zwei Konfigurationen in einer SAM koexistieren können. Wo zwei unterschiedliche Konfigurationen aufeinander treffen, entstehen Defekte, d.h. Stellen, an denen ein erhöhter Elektronentransfer stattfindet. Auch liegende Moleküle, unsymmetrische Anordnungen, gekrümmte oder geknickte Moleküle verursachen Defekte in der SAM. Mit zunehmender Kettenlänge n der Alkanthiole steigt die Stabilität der Monoschicht und die Anzahl von Defekten sinkt. Obwohl die Ordnung der Monoschicht unter Verwendung von Alkanthiolen mit der Kopfgruppe $X = \text{CH}_3$ am höchsten ist und für andere Endgruppen abnimmt, kann die Wahl der Endgruppe effektiv für die Immobilisierung von Erkennungselementen oder zur Alternierung der Benetzungseigenschaften der Oberfläche benutzt werden. Bain et al. [103] zeigten, dass eine SAM aus Alkanthiolen mit $X = \text{OH}$, COOH hydrophile Oberflächen und mit $X = \text{CF}_3$, CH_3 , CH_2 hydrophobe Oberflächen erzeugen.

Die Beschichtung von Goldelektroden mit einer kompakten SAM aus Alkanthiolen hat einen isolierenden Effekt. Boubour und Lennox zeigten, dass Alkanthiolmonoschichten für Ionen undurchlässig sind, auch wenn diese Defekte aufweisen [104]. Allerdings konnte für dünne Alkanthiolmonoschichten ein Stromfluss gemessen werden, der mit der Länge n der Alkanthiole abnimmt. Dieser beobachtete Stromfluss durch eine isolierende Schicht wird dem Tunneleffekt zugeschrieben [105]. Liu et al. untersuchten den Elektronentransfer von verschiedenen SAM [106] und konnten unter anderem belegen, dass ab $n \geq 11$ der Stromfluss so gering ist, dass von einer Defekt-freien, isolierenden Schicht gesprochen werden kann. Zudem untersuchten sie die Abnahme des Elektronentransfers zwischen einem Redoxmediator in Lösung und der SAM-beschichteten Goldelektrode in Abhängigkeit von der Länge n der SAM und konnten die Werte von Xu et al. [107] bestätigen, die besagen, dass der Elektro-

menttransfer k_{et} exponentiell mit einer Abklingkonstanten β von $1,02 \pm 0,2$ und $1,08 \pm 0,2$ pro Methylengruppe n für Alkanthiole bzw. ω -hydroxy-Alkanthiole abnimmt. Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften, weisen SAM ein hohes Potenzial für die Entwicklung von Nano-Elektroden auf.

Die Wahl der Immobilisierungsmethode sollte entsprechend der Anwendung und der damit verbundenen Wahl des Erkennungselementes und des Transducers gefällt werden. Dabei gilt zu beachten, welche Größe das zu immobilisierende Molekül hat, welche funktionellen Gruppen vorhanden sind und ob diese frei zugänglich bzw. an der Bindung des Analyten beteiligt sind. Weiterhin sollte bedacht werden, ob das Erkennungselement gerichtet immobilisiert werden muss [108] und ob die Dichte der Erkennungselemente einen Einfluss auf deren Affinität hat. Zudem können durch die Immobilisierung von anderen Thiolen freie Goldflächen geblockt und somit unspezifische Bindungen an der Transduceroberfläche reduziert werden.

2.2.3 Biosensoren zur Detektion von *S. aureus*

Die hohe Relevanz der Detektion von *S. aureus* für die humane Gesundheit hat die Entwicklung von Problemlösungen vorgebracht. In der klinischen und diagnostischen Anwendung wird eine hohe Sensitivität gefordert, da auch ein einzelnes Bakterium erkannt werden muss. Im Bereich der Lebensmittelanalytik werden geringere Anforderungen an die Sensitivität gestellt, da erst hohe Konzentrationen an *S. aureus*, $\sim 10^5$ Kolonie bildenden Einheiten pro Milliliter (KbE/ml), in dem Maße Toxine produzieren, dass sie Vergiftungen hervorrufen. Eine hohe Spezifität ohne Kreuzreaktionen mit anderen Pathogenen oder Molekülen in komplexen Matrices wird in allen Fällen benötigt. Die Fusion von biologischen Erkennungselementen mit der Messtechnik in einem Gerät, macht Biosensoren so attraktiv für die Diagnostik, da hohe Selektivität und Sensitivität vereint werden können. Weitere Vorteile von Biosensoren zu herkömmlichen Analysemethoden (selektive Medien, PCR, ELISA, etc.), sind die Miniaturisierung, die einfache Handhabung, schnelle Ergebnisse, mögliches Online-Monitoring und preisgünstige Systeme. Die Entwicklung von Kompaktsystemen ermöglicht die Bedienung durch Personal ohne spezielle Schulung.

Im Zuge der Literaturrecherche wurden zahlreiche Publikationen über Biosensoren zur Detektion von *S. aureus* mit verschiedenen Erkennungselementen

und Transducern gefunden. Einen Überblick all dieser zu geben, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, daher soll hier auf Rubab et al. verwiesen werden [109]. Rubab et al. verfassten ein Review über Biosensoren für die Detektion von *S. aureus* in Lebensmitteln, wobei sie sich auf die Erkennung der Bakterien und nicht der Toxine konzentrierten. Sie unterteilten die Biosensoren entsprechend ihrem Transducer und vergleichen vor allem deren Sensitivität und Funktionalität in Lebensmittelmatrices. Wu et al. hingegen publizierten eine umfangreiche Literaturrecherche der Detektionsmethoden für die Endotoxine von *S. aureus* [79]. Zudem gibt es zahlreiche Reviews über die Entwicklung von Biosensoren zur Detektion von Pathogenen [110, 111, 112], meist sind diese ebenfalls nach den Transducern unterteilt, außer Templier et al, die die Biosensoren entsprechend der verwendeten Erkennungselemente unterteilten [110]. Diese Reviews enthalten auch einige Beispiele für die Detektion von *S. aureus*. In den folgenden Abschnitten werden einige ausgewählte Biosensoren beispielhaft für die bisher erreichten Leistungen im letzten Jahrzehnt vorgestellt, wobei ebenfalls die Einteilung entsprechend der verwendeten Transducer gewählt wurde. Beschrieben werden Biosensoren mit optischen, massesensitiven und elektrochemischen Transducern, ausgenommen der elektrochemischen Impedanzspektroskopie, die erst im Abschnitt 2.4 ab Seite 63 betrachtet werden und ebenfalls ausgenommen wurden Biosensoren mit dem Erkennungselement Aptamer, die im Abschnitt 2.3 ab Seite 40 behandelt werden. Eine Zusammenstellung der in diesem Abschnitt beschriebenen Biosensoren zur Detektion von *S. aureus* befindet sich in Tabelle 2.2.

Optische Biosensoren

Optische Transducer basieren auf der Detektion von Photonen, wobei die Bindung des Analyten an das Erkennungselement eine Änderung des detektierten Lichtes verursacht, entweder durch Absorption, wobei die Intensität des detektierten Lichtes abnimmt, oder durch Lumineszenz, wobei die Energie des Anregungslichtes absorbiert und in Form von Photonen höherer Wellenlänge emittiert wird. In dem Review von Yoo et al. werden optische Biosensoren für die Detektion von pathogenen Mikroorganismen zusammengefasst [113].

Unter den optischen Methoden (siehe Abbildung 2.8) ist die Oberflächen-Plasmon-Resonanzspektroskopie (SPR) die am häufigsten angewendete Me-

thode. Bei dieser Methode werden durch die Einstrahlung von polarisiertem Licht in Totalreflexion auf eine dünne Metallschicht, die in direktem Kontakt mit einem Dielektrikum steht, konzentrierte Elektronenschwingungen (Oberflächenplasmonenpolaritons) erzeugt, die entlang der Grenzfläche Metall/ Dielektrikum propagieren. Das reflektierte Licht weist bei einem bestimmten Winkel ein Minimum auf, der vor allem vom Brechungsindex des Dielektrikums abhängt. Bei der Anlagerung von Molekülen an der Oberfläche verändert sich der Brechungsindex und die Verschiebung des Winkels korreliert mit der Analytkonzentration.

Tokel et al. entwickelte einen portablen SPR-basierten Biosensor mit immobilisierten anti-Lipopolysaccharid-Antikörpern, der gramnegative Bakterien wie z.B. *Escherichia coli* (*E. coli*) detektiert [114]. Auch *S. aureus* (obwohl grampositiv) verursachte ein Signal, vermutlich durch die Bindung von Protein A an den immobilisierten Antikörper, mit einem Detektionslimit von 10^5 KBE/ml. Normalerweise benötigt die SPR teure komplexe Geräte sowie teure empfindliche Chips, die diese Methode nur für große Labore mit hohem Probendurchsatz erschwinglich machen [113]. Dieser Sensor detektiert zwar eine Reihe von Bakterien und ist somit nicht für die spezifische Detektion von *S. aureus* geeignet, aber kann durch seine portable Form divers eingesetzt werden.

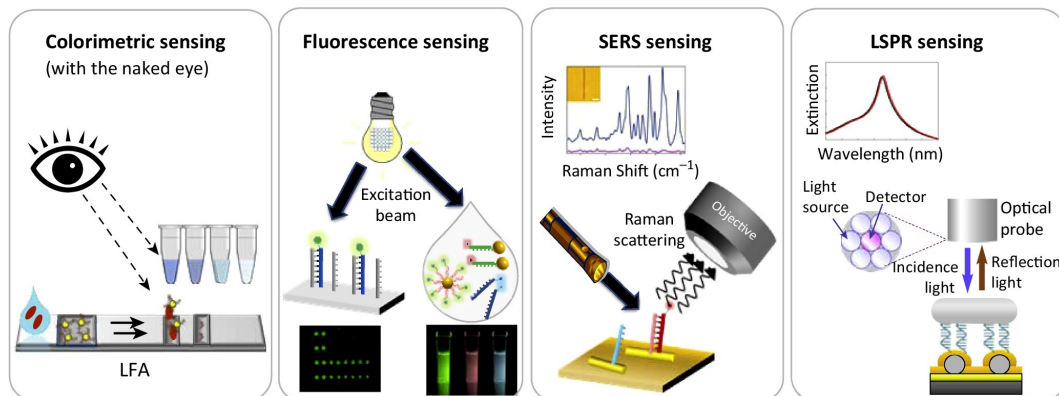


Abbildung 2.8: Messmethoden optischer Biosensoren zur Detektion von Pathogenen wie *S. aureus*. Von links nach rechts: Kolorimetrie, Fluoreszenz, SERS, LSPR. Adaptiert von [113] mit Erlaubnis von Elsevier.

Das Prinzip der Oberflächenplasmonen kann anstatt auf eine Goldoberfläche auch auf Goldnanopartikel übertragen werden, die dann als lokalisierte

Oberflächenplasmonen oder auch Partikelplasmonen bezeichnet werden. Bei der LSPR zeigen die mit Licht angeregten Metallnanopartikel ein Absorptionsspektrum bei einer bestimmten Wellenlänge im Bereich des sichtbaren Lichts. Die Position des Peaks ist dabei abhängig von dem Brechungsindex des den Partikel umgebenden Mediums und verschiebt sich somit bei der Anbindung eines Analyten an die Oberfläche des Partikels. Die LSPR weist einige Vorteile gegenüber der SPR auf: Es wird kein Prisma zur Einkopplung des Lichts benötigt; Da nicht der Winkel, sondern die Wellenlänge gemessen wird, ist die LSPR weniger anfällig gegenüber Erschütterungen; Aufgrund der zuvor genannten Vorteile ist der Aufbau des Messinstrumentes für die LSPR einfacher und günstiger; Der Abfall des elektromagnetischen Feldes ist steiler bei der LSPR, wodurch der Einfluss der Flüssigkeit minimiert wird. Verdoodt et al. nutzten die LSPR zur Detektion von grampositiven Bakterien, indem sie Goldnanopartikel mit entsprechenden Antikörpern modifizierten [115]. Das Detektionslimit dieser Methode beträgt 120 KBE/ml für *S. aureus* und liegt somit drei Dekaden unter dem des zuvor beschriebenen SPR Biosensors. Sowohl die SPR als auch die LSPR haben den Nachteil der geringen Sensitivität für große Analyten, da das elektromagnetische Feld mit der Entfernung zur Oberfläche schnell abfällt [109].

Bei der oberflächenverstärkten Raman Spektroskopie (SERS) wird das Streulicht von angeregten Molekülen detektiert, welches durch die Nähe zu metallischen Oberflächen verstärkt wird, vermutlich verursacht durch Oberflächenplasmonen. Dadurch sind Raman-Spektren von einzelnen Molekülen detektierbar. Da der Mechanismus der Verstärkung noch nicht ausreichend verstanden ist, wird diese Methode eher selten in der Biosensorik verwendet. Wang et al. entwickelten eine SERS basierte Methode zur Trennung und Detektion von pathogenen Bakterien in Lebensmittelproben [116]. Dabei wurden Magnetnanopartikel als auch Goldnanopartikel mit anti-*S. aureus*-Antikörpern modifiziert. Ebenfalls auf den Goldnanopartikeln immobilisierte SERS-Sonden wirken als Verstärker des Raman-Signals. Mit dieser Methode konnte ein Detektionslimit von 10^3 KBE/ml in Spinatproben erreicht werden. Der Vorteil liegt darin, dass Raman-Spektroskope als kleine handliche Geräte verfügbar sind, die dafür jedoch höhere Detektionslimits aufweisen, die den Anforderungen der medizinischen Diagnostik nicht genügen.

In der Lebensmittelindustrie ist die Anforderung an die Sensitivität mit 10^5 KBE/ml deutlich niedriger, jedoch muss die Detektion schnell erfolgen, einfach handhabbar, preisgünstig und bevorzugt in den Verarbeitungsprozess integrierbar sein. Daher sind herkömmliche Analysemethoden wie z.B. die PCR für Lebensmittelhersteller eher ungeeignet. Kolorimetrische Methoden dagegen sind äußerst attraktiv, da die Auswertung hinsichtlich einer positiven oder negativen Probe teils mit bloßem Auge möglich ist. Quantitative Bestimmungen benötigen weiterhin ein Spektroskop zur Auswertung.

Alamer et al. entwickelten einen schnellen simplen Assay, indem sie Wattestäbchen mit *S. aureus*-spezifischen Antikörpern modifizierten und diese nach dem Kontakt mit der Probe basierend auf einem Sandwich-Assay mit Antikörper-modifizierten Nanopartikel inkubierten [117]. Die Nanopartikel wurden mit polymeren Farbstoffen eingefärbt, weshalb sich das Wattestäbchen nach Inkubation und Anwesenheit des Analyten verfärbt. Ein Detektionslimit von 10 KBE/ml konnte erreicht werden, wobei eine Quantifizierung nur bedingt möglich war.

Bei den bisher vorgestellten Methoden werden anti- *S. aureus*- Antikörper benutzt und dies führt durch die unspezifische Bindung von *S. aureus* an probeneigene Antikörper zu Kreuzreaktionen und somit zu falsch-negativen Ergebnissen.

Eine Alternative zu Antikörpern als Erkennungselement sind Enzyme, Proteine, die als Katalysator eine oder mehrere biochemische Reaktionen beschleunigen können. Sie sind hochspezifisch für ihr Substrat und werden in der Biosensorik zur Detektion des Substrates oder von Kosubstraten oder auch Produkten als Konkurrenzreaktion eingesetzt. Sie werden auch häufig als Marker genutzt, aufgrund deren Fähigkeit ein nicht detektierbares Substrat in ein optisch oder elektrochemisch messbares Molekül umzuwandeln. Die Nutzung der intrinsischen enzymatischen Reaktionen eines Bakteriums, wie zum Beispiel die Fähigkeit der von *S. aureus* produzierten Katalase, Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff zu oxidieren, nutzten Abdelhamid et al. zur Entwicklung eines optischen Biosensors [118]. Mit Chitosan modifizierte Cadmium-Sulfid-Quantum-Dots emittieren bei Anregung fluoreszierendes Licht, was jedoch bei Anwesenheit von Katalase-positiven *Staphylokokken* gequencht wird.

Tabelle 2.2: Eine Auswahl an Biosensoren für die Detektion von *S. aureus*

Transducer	Methode	Erkennungselement	LoD /KbE * ml ⁻¹	Realproben	Referenz
Optisch	SPR	Antikörper	10 ⁵	-	[114]
Optisch	LSPR	Antikörper	120	-	[115]
Optisch	SERS	Antikörper	1000	Spinat	[116]
Optisch	Kolorimetrisch	Antikörper	10	Hühnchen	[117]
Optisch	WGM	Phagenprotein	5 · 10 ⁶	-	[119]
Optisch	Fluoreszenz	Enzym	200	-	[118]
Optisch	Fluoreszenz	Oligonukleotid	1 nM	-	[120]
Optisch	FRET	Oligonukleotid	10 Kopien	-	[121]
Masse	Magnetoelastisch	Phage	10	Spinat	[122]
Elektrochemisch	Amperometrisch	Antikörper	10	Milch, Käse, Fleisch	[123]
Elektrochemisch	Amperometrisch	Antikörper	1	Milch	[124]
Elektrochemisch	Amperometrisch	Oligonukleotid	10 pM	-	[125]
Elektrochemisch	Amperometrisch	Oligonukleotid	10 fM	-	[126]
Elektrochemisch	CV	Oligonukleotid	10 pM	-	[127]
Elektrochemisch	DPV	Enzym	100	-	[128]

Dabei konnte ein Detektionslimit von 150 KbE/ml erreicht werden, jedoch interferieren in der Probe vorhandene *E. coli*, da diese ebenfalls Katalase-positiv sind.

Eine weitere Alternative zu Antikörpern als Erkennungselement bilden Oligonukleotide, dessen Sequenz komplementär zu der gewünschten Analyt-DNS gewählt wird. Die Hybridisierung von Nukleinsäuren ist hochspezifisch und stabil, und kann daher zur spezifischen Detektion von Gensequenzen genutzt werden. Shi et al. entwickelten einen Biosensor zur Detektion des *mecA* Gens aus *S. aureus* unter Nutzung des sogenannten Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) [120]. Dabei wurden mit Fänger-DNS modifizierte Graphen Quantum Dots (GQD) verwendet, die bei Anregung mit Licht fluoreszieren. Mit einer zweiten Fänger-DNS modifizierte Goldnanopartikel quenchen bei Anwesenheit der Analyt-DNS durch dessen Hybridisierung die Fluoreszenz der GQD, wodurch die Analyt-DNS quantifiziert werden kann. Shi et al. konnten mit dieser Methode ein Detektionslimit von 1 nM genomischer DNS erreichen. Der geringen Anzahl an DNS Strängen in Bakterienzellen wird entgegengewirkt, indem diese vor der Detektion vervielfältigt werden, normalerweise mittels der PCR, bei der, mithilfe des Enzyms Polymerase und einem iterativen Zyklus bei verschiedenen Temperaturen, der DNS Strang denaturiert, d.h. aufgetrennt, und kopiert wird. Die Weiterentwicklung des Prozesses zur sogenannten isothermalen Vervielfältigung (isothermal amplification) ermöglicht das Kopieren des DNS Stranges ohne Temperaturwechsel. Eine Methode der isothermalen Vervielfältigung ist die Nutzung des Enzyms Helicase zur Auftrennung der DNS anstelle von Temperaturzyklen. Diese sogenannte Helicase-abhängige Vervielfältigung (HDA) nutzten Jenison et al. um einen optischen Biosensor basierend auf DNS als Erkennungselement zu entwickeln [121]. Beim Vervielfältigen wird dem DNS Strang ein Biotin angehängt und von der komplementären Fänger-DNS auf dem Chip gebunden. Ein markierter Antikörper bindet an das Biotin und erzeugt eine messbare Farbänderung. Unter optimalen Bedingungen können schon 10 Kopien des *mecA* Gens aus *S. aureus* detektiert werden. Der indirekte Nachweis von *S. aureus* über dessen DNS erfordert zum einen die Extraktion der DNS, die teilweise sehr aufwendig sein kann, zum anderen lässt dies nur eine semi-quantitative Auswertung zu.

Die natürlichen Feinde von Bakterien, Bakteriophagen, das sind Viren, die

auf Bakterien als Wirte spezialisiert sind, eignen sich besonders zu deren spezifischen Erkennung [112]. Der Vorteil von Bakteriophagen liegt darin, dass sie zwischen toten und lebenden Bakterien unterscheiden, da sie nur an die lebenden binden. Bhardwaj et al. selektierten Bakteriophagen aus einer Bodenprobe für die spezifische Erkennung von *S. aureus* und immobilisierten diese auf lumineszenten wasserlöslichen Metall-organischen Partikeln [129]. Durch die Anbindung der in der Probe vorhandenen *S. aureus* an den Partikel wird dessen Lumineszenz gequenchet und dieser gemessene Abfall der Photolumineszenz korreliert mit der Pathogenkonzentration. Dabei konnte ein Detektionslimit von 31 KbE/ml erreicht werden und der optische Biosensor zeigt eine hohe Stabilität von mindestens 100 Tagen ohne Verlust an Photolumineszenz und eine Selektivität für *S. aureus* gegenüber *E. coli* oder *Staphylococcus arlettae*. Mit *S. aureus* versetzte Krumenbrotproben zeigten Wiederfindungsraten von 96-104%. Obwohl die Sensitivitäten für die klinische Diagnostik nicht ausreichend sind, birgt dieser Biosensor hohes Potential für die Anwendung in der Lebensmittelindustrie. Die Bakteriophage K bindet spezifisch an *Staphylokokken* [130] und enthält das Enzym LysK, das die Bakterienzellen lysiert [131]. Dieses Enzym nutzten Ghali et al. um einen optischen Biosensor zur Detektion von *S. aureus* basierend auf dem Effekt der Flüstergalerie (whispering gallery) zu entwickeln [119]. Dabei konstruierten sie einen Mikroscheibenresonator und koppelten das Licht über eine konische Faser ein, welches dann an den Wänden des Resonators durch kontinuierliche Totalreflexion im Kreis geleitet wird und schließlich an den ursprünglichen Punkt zurückkehrt, wo es mit sich selbst konstruktiv interferiert und dabei stehende Wellen bildet. Die entstehenden Resonanzen hängen stark von der Geometrie des Resonators ab und verschieben sich für den Fall der Anbindung des Analyten, was mithilfe eines Photodetektors aufgenommen werden kann. Mit dieser Methode konnte ein Detektionslimit von $5 \cdot 10^6$ KbE/ml erreicht werden. Das auf der Mikroscheibe immobilisierte LysK bindet an mindestens neun verschiedene *Staphylokokken*, darunter *S. aureus* und *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) [132], jedoch ist die Unterscheidung zwischen diesen beiden Spezies für die Diagnostik wichtig.

Ein Nachteil von optischen Biosensoren ist deren hohe Abhängigkeit vom Brechungsindex, was deren Kalibrierung auf die Probenlösung erfordert [133].

Zudem erfordern die meisten optischen Biosensoren eine präzise Lichtkopplung für die Erfassung des emittierten Lichtes, was eine Herausforderung für deren Nutzung in der vor-Ort-Analytik darstellt. Kalorimetrische Methoden benötigen zudem meist große Probenvolumen.

Massesensitive Biosensoren

Massesensitive Biosensoren basieren auf der Erzeugung einer Schwingung und die Abhängigkeit dieser Schwingung von der angelagerten Masse [134]. Piezoelektrische Biosensoren bringen dabei piezoelektrische Materialien durch das Anlegen einer alternierenden elektrischen Spannung zum Schwingen, wobei die Resonanzfrequenz der Schwingung abhängig von der Art und Dicke des Materials ist. Dass heißt, die Resonanzfrequenz verschiebt sich bei Bindung des Analyten auf der Oberfläche des piezoelektrischen Materials. Hierzu gehören die Quarzkristallmikrowaage (QCM) und die akustischen Oberflächenwellen Sensoren (SAW). Magnetoelastische Biosensoren basieren dagegen auf magnetoelastischem Material, das bei Anlegen eines magnetischen Feldes in Schwingung versetzt wird und dessen Resonanzfrequenz von der Masse des Materials abhängt. Der Vorteil der magnetoelastischen Messweise ist, dass die Resonanzfrequenz kontaktfrei mittels einer Spule gemessen werden kann. Byeon et al. entwickelten einen magnetelastischen Biosensor zur Detektion von *S. aureus* auf Spinatblättern [122]. Dafür wurden dünne Streifen eines magnetoelastischen Materials mit Gold beschichtet, um darauf die Bakteriophage 12600 zu immobilisieren, die spezifisch *S. aureus* bindet. Die Streifen können direkt auf Spinatblätter befestigt werden und detektieren *S. aureus* ab 57 KbE/25 mm² Spinat. Die Stärke des angelegten magnetischen Feldes liegt im Bereich des Erdmagnetfeldes und der Biosensor wird daher auch durch dieses beeinflusst. Durch das Anlegen eines antisymmetrischen Feldes kann dieser Einfluss minimiert werden [135].

Zudem ist die Verschiebung der Resonanzfrequenz neben der Masse auch von der Viskosität bzw. Luftfeuchtigkeit abhängig, was die Sensitivität des Sensors negativ beeinflusst. Eine Alternative bieten die am weitesten verbreiteten Biosensoren basierend auf elektrochemischen Transducern, dessen Entwicklungen für die Detektion von *S. aureus* im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

Elektrochemische Biosensoren

Die elektrochemischen Transducer werden aufgrund ihrer einfacheren Handhabung, preisgünstigen und miniaturisierten Herstellung bevorzugt in Biosensoren angewendet. Duffy and Moore publizierten ein Review über elektrochemische Immunosensoren für die Lebensmittelkontrolle, wobei der Schwerpunkt auf der Betrachtung neuer Oberflächenmodifikationen mit Nanomaterialien liegt [136]. Zu den elektrochemischen Messmethoden zählen unter anderem die Amperometrie, Potentiometrie und Impedanzspektroskopie.

Amperometrische Biosensoren basieren auf der Messung des Stroms im zu untersuchenden System als Antwort auf ein konstantes Spannungssignal. Das Prinzip dabei ist, dass der gemessene Strom mit der Konzentration des Analyten korreliert. Der Antikörper Immunglobulin G (IgG) bindet, wie im Abbildung 2.1.1 beschrieben, an das Protein A des *S. aureus* und wurde daher oft als Erkennungselement für Biosensoren angewendet. De Ávila et al. entwickelten einen amperometrischen Biosensor, indem sie Magnetpartikel mit Protein A modifizierten und diese auf eine Dickfilmelektrode aufbrachten [124]. Die Oberfläche wurde mit anti-Protein A-Antikörper gesättigt und ein kompetitiver Assay mit *S. aureus* und Meerrettich-Peroxidase modifizierten Protein A durchgeführt. Bei Substratzugabe wurde ein Abfall des Stroms detektiert, der mit der Anzahl gebundener Bakterien korreliert. Diese Methode zeigte ein Detektionslimit von 1 Kbe/ml und das innerhalb einer Messzeit von 2 h.

Neben Antikörpern können andere Erkennungselemente für die Entwicklung von amperometrischen Biosensoren für die Detektion von *S. aureus* verwendet werden. Watanabe et al. zum Beispiel modifizierten Magnetpartikel und Goldnanopartikel mit kurzen DNS Proben, um damit das *mecA*-Gen zu detektieren, welches in Methicillin resistenten *S. aureus* vorkommt [125]. Das Fragment hybridisiert sowohl an die Probe I am Magnetpartikel als auch an Probe II am Goldnanopartikel, der ebenfalls mit Ferrocen modifiziert wurde. Mithilfe eines Magneten werden die Komplexe aus Magnetpartikel, *mecA*-Gen und Goldnanopartikel sondiert. Nach der Zugabe von L-Prolin, das von der L-Prolin-Dehydrogenase unter Verwendung von Ferrocen zu Pyrroline-6-carboxylat umgesetzt wird, oxidiert das Ferrocen an der Dickschichtelektrode und der daraus resultierende Strom wird gemessen. Dabei konnte ein Detektionslimit von 10 pM genomischer DNS erreicht werden, womit dieser ampero-

metrische Biosensor zwei Größenordnungen sensitiver ist, als der von Shi et al. entwickelte optische Biosensor (1 nM) [120].

Die hohe Sensitivität von elektrochemischen Methoden im Vergleich zu optischen Transducern ermöglicht die sensitive Detektion von DNS ohne vorherige Vervielfältigung mittels PCR, was für die schnelle Analyse vor Ort wichtig ist. Xu et al. konnten ein Detektionslimit von 10 fM erreichen [126], also nochmal drei Größenordnungen sensitiver als Watanabe et al. Sie nutzten dabei DNS-Origami um einen Tetraeder zu formen, den sie auf der Goldelektrode mittels der Goldmercaptidbindung immobilisierten und dessen Spitze eine Fänger-DNS aufweist (Abbildung 2.9). Diese Tetraeder Struktur sorgt zum einen für genügend Abstand zwischen den Fänger-Molekülen, um eine effiziente Hybridisierung zu ermöglichen und zum anderen für eine stabile Basis, um das lange *mecA*-Gen aus der Probe zu halten. Weiterhin werden sieben biotinylierte DNS-Fragmente zugegeben, die komplementär zu bestimmten Abschnitten auf dem *mecA*-Gen sind. Durch die Zugabe von Streptavidin modifizierter Meerrettichperoxidase, die an die Biotine der sieben DNS-Fragmente bindet, und dem Substrat Tetramethylbenzidin, wird dieses bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid in ein Diimin umgewandelt, wobei es Elektronen von der Elektrode aufnimmt. Dieser Reduktionsstrom wird gemessen und korreliert mit der Konzentration der Analyt-DNS. Durch die Länge des *mecA*-Gens ist die Hybridisierung langsam und die optimale Hybridisierungszeit wurde auf 4 h bestimmt. Daraus ergibt sich eine Gesamtdauer des Assays samt Extraktion der DNS aus der Probe von 6 h. Deshalb ist der Sensor, obwohl die amperometrische Messung nur etwa 2 Minuten dauert, nicht für die Anwendung einer vor-Ort-Analyse geeignet.

Zudem ist es nicht ausreichend, allein das *mecA*-Gen zu detektieren, da dieses auch in anderen Mikroorganismen vorkommt [137]. Für Methoden, die die DNS aus *S. aureus* detektieren, gelten die gleichen Nachteile wie für die PCR, außer dass in diesem Fall keine komplexen, teuren Geräte benötigt werden. Jedoch erfordert die Extraktion der DNS eine aufwendige Probenvorbereitung, die durch die indirekte Detektion zahlreiche Fehlerquellen beinhaltet. Beim direkten Nachweis von *S. aureus* werden die Fehlerquellen deutlich reduziert.

Chen et al. entwickelten einen elektrochemischen Biosensor basierend auf kationischen Goldnanopartikeln (AuNP), die aufgrund von elektrostatischen

Wechselwirkungen sowohl an das Enzym β -Galaktosidase als auch an die Oberfläche von Bakterien binden kann [128]. Durch die Bindung der kationischen AuNPs an das Enzym wird dieses inhibiert, doch bei Anwesenheit von Bakterien werden durch die höhere elektrostatische Anziehung die AuNPs vom Enzym entfernt und dieses aktiviert. Die β -Galaktosidase setzt 4-aminophenyl- β -galaktopyranosid zu 4-aminophenol um, das wiederum an der Elektrode oxidiert wird. Der Oxidationspeak wird in diesem Fall mithilfe der differentiellen Pulsvoltammetrie (DPV) detektiert. Dabei werden wiederholte Spannungspulse überlagert auf einer linearen Spannungsrampe auf das System gegeben und die Stromdifferenz aus gemessenem Stromsignal vor dem Puls und am Ende des Pulses bestimmt [138]. Die Auftragung der Stromdifferenz gegenüber der angelegten Spannung resultiert in einem Peak, der direkt proportional zur Analytkonzentration ist. Chen et al. konnten mit dieser Methode ein Detektionslimit von 100 KBE/ml bei einer Messzeit von einer Stunde erreichen, jedoch ist sie nicht spezifisch für *S. aureus*, da die AuNPs von allen Bakterien angezogen werden.

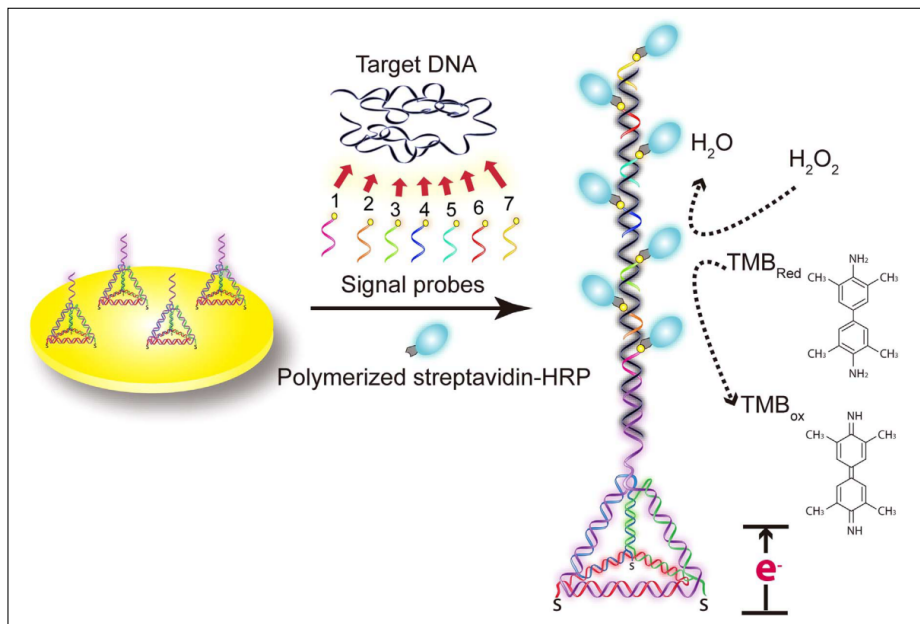


Abbildung 2.9: Amperometrischer Biosensor zur Detektion von *S. aureus* mit DNS als Erkennungselement. Detaillierte Beschreibung befindet sich im Text. Adaptiert von [126] mit Erlaubnis von Elsevier.

2.2.4 Schlussfolgerungen für die Dissertation

Wie man anhand der ausgewählten Beispiele aus der Literatur erkennen kann, ist die Entwicklung eines Biosensors sehr divers, wobei jeder Biosensor seine eigenen Vor- und Nachteile hat. Die richtige Kombination für die gewünschte Anwendung zu finden, ist die eigentliche Herausforderung. Wie man anhand der Beispiele in der Tabelle sehen kann, weisen die elektrochemischen Transducer gegenüber den optischen Transducern höhere Sensitivitäten auf. Zudem können diese einfacher miniaturisiert werden, benötigen keine Markierung und weisen einen geringeren Stromverbrauch auf, was die Möglichkeit zur autonomen Arbeitsweise eröffnet.

In dem in dieser Arbeit entwickelten Biosensor zur Detektion von *S. aureus* wurde als Transducer eine Goldelektrode und als Detektionsmethode die elektrochemische Impedanzspektroskopie gewählt. Eine hohe Sensitivität und kurze Antwortzeiten, sowie markierungs- und zerstörungsfreie Detektion des Analyten prägen die elektrochemische Impedanzspektroskopie [97]. Dank der Entwicklung kleiner kompakter Oszillatoren, ist die preisgünstige Entwicklung von tragbaren Impedanzanalysatoren möglich [139]. Die Selektivität wird zum einen durch das Erkennungselement erreicht, zum anderen durch das Fitten der Impedanz-Daten und der Extraktion relevanter Parameter erhöht. Die elektrochemische Impedanzspektroskopie wird im Abschnitt 2.4 auf Seite 63 ausführlich behandelt.

Zwar sind Antikörper die am häufigsten angewendeten affinen Erkennungselemente, da sie für zahlreiche Analyten kommerziell erhältlich sind, jedoch ist ihre Produktion kostenintensiv und benötigt Tierexperimente. Zudem zeigt Protein A eine hohe Affinität für Antikörper, was bei der Detektion von *S. aureus* zu Kreuzreaktionen und falsch-positiven Ergebnissen führt. Da eine hohe Stabilität auch über lange Zeit von Biosensoren gefordert wird, sollte auch auf die Verwendung von Enzymen als Erkennungselement verzichtet werden. Obwohl die Detektion der SCC-*mec-orfX*-Genverbindung den Vorteil hat, dass man nur die Methicillin resistenten *S. aureus* ermittelt, ist die direkte Detektion von *S. aureus* immer der indirekten Detektion von DNS vorzuziehen, um die Fehlerrate zu minimieren. Daher wurde für den in dieser Arbeit entwickelten Biosensor als Erkennungselement ein Aptamer gewählt, ein kurzes Oligonukleotid, das durch dessen dreidimensionale Struktur entsprechend dem Schlüssel-

Schloss-Prinzip spezifisch seinen Analyten bindet. Nukleotide gehören ebenfalls zu den affinen Erkennungselementen, können jedoch günstig synthetisch in großen Mengen produziert werden und weisen im Vergleich zu Antikörpern eine höhere Stabilität auf [140]. Die Aptamere werden im Abschnitt 2.3 erläutert. Zudem sollte das Erkennungselement kovalent und möglichst direkt an den Transducer gebunden werden, um Stabilität und Sensitivität zu erhöhen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Goldmercaptidbindung zur Immobilisierung der Aptamere auf den Goldelektroden verwendet, um durch die geringe Komplexität des Systems eine mathematische Modellierung zu ermöglichen.

Biosensoren für die Detektion von *S. aureus* basierend auf Aptameren als Erkennungselement oder der elektrochemischen Impedanzspektroskopie als Detektionsmethode wurden in diesem Abschnitt ausgelassen, um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Diese werden in Abschnitt 2.3 auf Seite 40 und Abschnitt 2.4 auf Seite 63 jeweils getrennt detaillierter diskutiert.

2.3 Aptamere als Erkennungselemente

Aptamere (aus dem lateinischen *aptus* = passen und dem griechischen *meros* = Teil) sind einzelsträngige Oligonukleotide, die mittels Faltung eine dreidimensionale Struktur ausbilden, mit der sie passgenau einen Analyten mit hoher Affinität binden (siehe Abbildung 2.10) [141]. Der Analyt kann dabei beliebig gewählt werden, so gibt es Aptamere, die spezifisch ganze Zellen binden [142] oder ein Virus [143], ein Protein [144], ein Peptid [145], ein kleines organisches Molekül [146] oder sogar ein Ion [147].

Aptamere werden mittels eines evolutionären Prozesses selektiert, dem sogenannten SELEX (= Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), der 1990 entwickelt wurde [148] und den Beginn der Aptamere einläutete [149]. Das allgemeine Prinzip des SELEX basiert auf der Inkubation eines Pools aus 10^{15} kurzen Oligonukleotiden (≤ 100 Basen) verschiedener Sequenzen mit dem gewünschten Analyten. Die ungebundenen Sequenzen werden nun von den gebundenen durch Waschschrte separiert und verworfen, während die gebundenen Sequenzen vom Analyten eluiert werden. Dieser Vorgang (Inkubation, Waschen, Eluieren) wird bis zu zwölf Mal wiederholt, wobei Mutationen oder Änderungen der Parameter genutzt werden können, um die

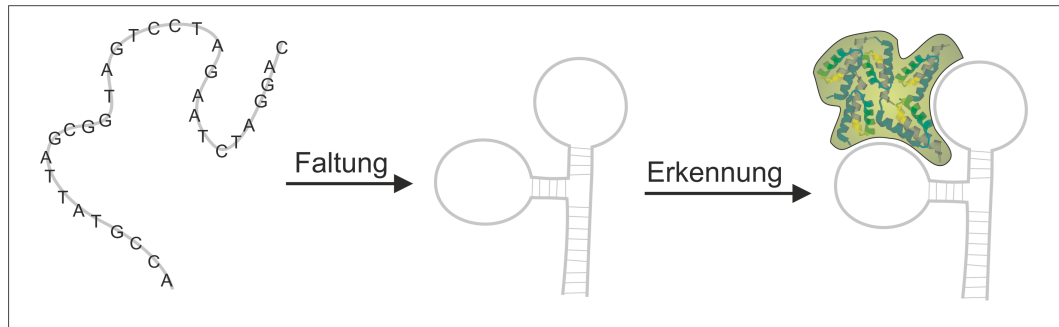


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips von Aptameren: Durch die spezifische dreidimensionale Faltung kann der Analyt nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip erkannt und hochaffin gebunden werden

Selektion zu verfeinern. Anschließend werden die selektierten Oligonukleotide sequenziert (meist ~ 100 an der Zahl) und hinsichtlich homologer Sequenzen in Familien sortiert. Vielversprechende Kandidaten werden einzeln in Assays auf ihre Affinität zum Analyten getestet und gegebenenfalls gekürzt.

Bei manueller Durchführung dauert die Selektion eines Aptamers mehrere Monate und die anschließende Charakterisierung und Optimierung dauert weitere zwei bis sechs Monate. Inzwischen gibt es zahlreiche Weiterentwicklungen des SELEX, wie z.B. der FluMag-SELEX [150], bei dem der Analyt zur besseren Trennung der ungebundenen Oligonukleotide auf Magnetnanopartikel immobilisiert und die Aptamere mit Fluoreszenzmarkern zur Echtzeit-Überwachung des Selektionsprozesses versehen werden. Es gibt zahlreiche Publikationen über den SELEX-Prozess, auf einige davon wird hier für Interessierte verwiesen: Stoltenburg et al. [141], Darmostuk et al. [151] und Zhou et al. [152].

DNS-Aptamere lassen sich einfacher selektieren, da im Gegensatz zu RNS kein Translationsschritt benötigt wird. Zudem sind DNS-Aptamere deutlich stabiler als RNS-Aptamere, was in der klinischen Diagnostik von hoher Relevanz ist. Neben der Selektion von Sequenzen aus RNS oder DNS gibt es sogenannte Peptidaptamere, kombinatorische Proteinmoleküle, in denen eine variable Peptidsequenz von 5-20 Aminosäuren in ein konstantes Gerüstprotein eingebaut wird [153]. Die Peptidbindung zwischen den einzelnen Aminosäuren ist im Gegensatz zum Phosphatrückgrat der DNS stabil gegenüber Nukleasen. Um diese Stabilität auf DNS zu übertragen, wurde die sogenannte Peptidnukleinsäure (PNS) entwickelt, die anstelle des Phosphatrückgrates eine

Kette aus *N*-(2-aminoethyl)glycinen mit Peptidbindungen enthält, wobei die Basen an die Seitengruppen gebunden werden [154]. Die PNS kann sowohl mit einem komplementären DNS-, als auch PNS-Strang hybridisieren. Ein weiterer Vorteil von PNS ist, dass das Peptidrückgrat im Gegensatz zum Phosphatrückgrat ungeladen ist und somit unspezifische Bindungen über elektrostatische Interaktionen vermindert werden, wie am Beispiel des Thrombinaptamers gezeigt werden konnte, welches als PNS Aptamer an das Thrombin mit höherer Affinität bindet als das DNS Aptamer [155]. Somit sind PNS Aptamere als alternative Klasse für die Entwicklung von stabileren Biosensoren geeignet, jedoch muss die Selektion der Aptamere mit PNS stattfinden, was bisher selten angewendet wird.

Die Vorteile von Aptameren sind zahlreich. So weisen sie Affinitäten im mikro- bis pikomolaren Bereich und Spezifitäten vergleichbar mit Antikörpern auf [140]. Aptamere werden *in vitro* selektiert und hergestellt, wodurch sie die Palette der Antikörper erweitern können, da Aptamere auch gegen toxische oder schwach bis nicht immunogene Moleküle selektiert werden können. Außerdem können die Faktoren wie z.B. Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke, etc. während der Selektion den Bedingungen der späteren Anwendung angepasst werden. Die Spezifität eines Aptamers kann während der Selektion durch Zwischenschritte verfeinert werden, zum Beispiel mit einem sogenannten negativen Selektionsschritt, bei dem Moleküle zugegeben werden, die nicht vom Aptamer erkannt werden sollen. Zudem können Aptamere nach der Selektion preiswert in großen Mengen synthetisch mit exzellenter Chargen-Konsistenz hergestellt und dabei quasi beliebig zum Beispiel mit Fluoreszenzmarkern an definierten Stellen modifiziert werden [156]. Zusätzlich können Aptamere im Gegensatz zu Antikörpern reversibel denaturiert werden und deren geringes molekulares Gewicht erleichtert dessen Immobilisierung.

Ein Nachteil der Aptamerforschung ist das Fehlen eines einheitlichen Protokolls für die Aptamers Selektion, wodurch beim SELEX zahlreiche Fehler gemacht werden, was zu einer ungenügenden Leistung der Aptamere in diagnostischen Assays führt. Zum Beispiel sollte bei der Selektion von Aptameren für Analyten, die in der klinischen Diagnostik standardmäßig im Urin nachgewiesen werden, ein urinähnlicher Puffer verwendet werden und im Urin standardmäßig vorhandene Moleküle sollten für den negativen Selektionsschritt

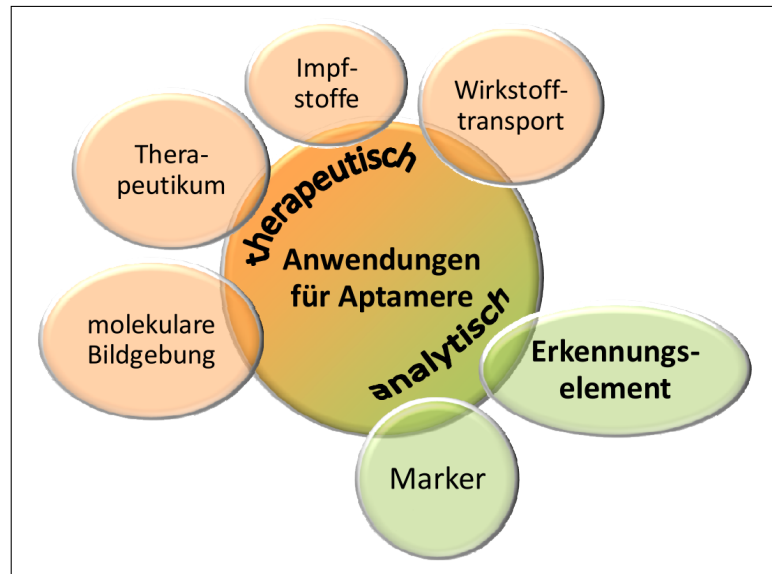


Abbildung 2.11: Anwendungsgebiete von Aptameren als therapeutisches (orange) und analytisches (grün) Instrument

verwendet werden.

Aufgrund der zahlreichen Vorteile von Aptameren haben sich ebenso zahlreiche Anwendungsgebiete entwickelt [157]. Bisher werden Aptamere überwiegend als therapeutisches oder analytisches Instrument benutzt (siehe Abbildung 2.11). Auf die gleiche Weise wie therapeutische Antikörper, können Aptamere durch die feste Bindung an einen Analyten dessen Funktion inhibieren [158] und so als Therapeutikum eingesetzt werden. Zum Beispiel wird das Aptamer, das spezifisch an den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF167 bindet, als Medikament zur Behandlung von altersbedingter Makulardegeneration verwendet [159]. Aufgrund der geringen Immunogenität können Aptamere weiterhin für Impfstoffe [160] und für den gezielten Wirkstofftransport [161] angewendet werden. Die hohe Stabilität und das geringe Molekulargewicht macht Aptamere attraktiv für die molekulare Bildgebung zur Visualisierung von spezifischen Zellmarkern in der klinischen Diagnostik [162].

Vor allem die preisgünstige synthetische Herstellung, die einfache Modifikation als auch das geringe Molekulargewicht und die hohe Stabilität sind ausschlaggebend für die Anwendung von Aptameren als analytisches Instrument. Durch die Modifizierung der Aptamere z.B. mit einem Fluoreszenzfarbstoff

kann der gebundene Analyt markiert werden. Zudem werden Aptamere in der Biosensorik als innovatives Erkennungselement eingesetzt, da sie aufgrund der Modifizierung während der Synthese auf quasi allen Oberflächen immobilisiert werden können, sehr stabil sind und hohe Sensitivität und Spezifität zum Analyten aufweisen. Für die Planung und Entwicklung eines Biosensors basierend auf Aptameren muss beachtet werden, dass Aptamere meist in Lösung selektiert werden und somit die Immobilisierung einen gravierenden Einfluss auf die Bindung des Analyten haben kann. Die dreidimensionale Struktur des selektierten Aptamers kann wertvolle Hinweise zu dessen Immobilisierung und Bindung geben. Inwieweit es möglich ist, die dreidimensionale Struktur eines Aptamers zu bestimmen, wird im folgenden Abschnitt betrachtet. Anschließend wird das Zustandekommen der Bindung zwischen Aptamer und Analyt erörtert.

2.3.1 Die dreidimensionale Struktur von Aptameren

Die selektive Affinität der Aptamere zu dem Analyten wird erst durch deren Faltung in eine dreidimensionale Struktur erhalten. Diese basiert vor allem auf der Hybridisierung der Basen im Strang miteinander, bei der die Basen über Wasserstoffbrückenbindungen nicht kovalent aneinander gebunden werden. Die Doppelstrangbildung von zwei DNS-Strängen wie sie in den menschlichen Zellen vorkommen, basiert auf den Watson-Crick-Basenpaarungen [163], die Adenin (A) und Thymin (T) über zwei Wasserstoffbrücken und Cytosin (C) und Guanin (G) über drei Wasserstoffbrücken verbindet.

Obwohl die 1953 entdeckten Watson-Crick-Basenpaarungen in der Natur vorherrschend sind, gibt es weitere Möglichkeiten der Basenpaarung aufgrund von Wasserstoffbrücken (siehe Abbildung 2.12), wie z.B. die reversen Watson-Crick-Paarungen, die Wobble-Paarungen (z.B. A-C und G-T), die Hoogsteen-Paarungen (Anlagerung einer dritten Base: z.B. C-G-C oder T-A-T oder G-G-G) [164] und einige weitere. Zudem gibt es Paarungen, die über andere Moleküle vermittelt werden, wie zum Beispiel über Metallionen [165].

Nicht alle Basen in einem Oligonukleotid liegen hybridisiert vor und durch die Kombination von hybridisierten Abschnitten und freien Basen entstehen zahlreiche Strukturelemente, wie zum Beispiel Schleifen (loop), Pseudoknoten (pseudoknot) und viele weitere (siehe Abbildung 2.13). Die meisten dieser

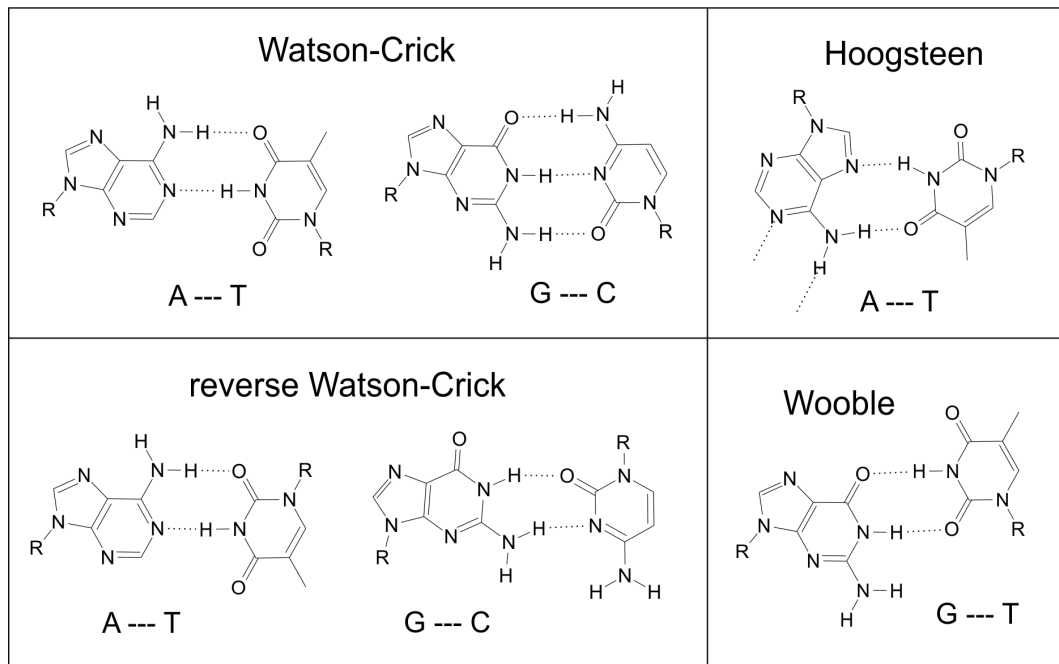


Abbildung 2.12: Eine Auswahl an möglichen Basenpaarungen in Oligonukleotiden. G = Guanin, C = Cytosin, A = Adenin, T = Thymin, Wasserstoffbrücken sind durch eine gepunktete Linie dargestellt.

Strukturen hat man durch die Untersuchung von RNS-Strukturen entdeckt und sind daher als Elemente der RNS-Sekundärstruktur bekannt, können jedoch weitestgehend auf DNS-Strukturen übertragen werden. Die Komplexität und Vielzahl von Möglichkeiten für die Bildung von Strukturen bei Oligonukleotiden stellt eine Herausforderung für die Vorhersage der dreidimensionalen Struktur anhand der Sequenz dar, da allein $1, 8^N$ zweidimensionale Strukturen für ein Oligonukleotid der Länge N möglich sind [167].

mfold

Eine der ersten computergestützten Methoden für Vorhersagen der zweidimensionalen Struktur von RNS wurde im Jahr 1981 von Zuker und Stiegler entwickelt [168] und ist heute als „mfold“ bzw. dessen Weiterentwicklung „UNA-fold“ [169] bekannt. Das Programm basiert auf der Berechnung der freien Energie von zweidimensionalen Strukturen einer Oligonukleotidsequenz nach dem „Nearest-Neighbor“-Algorithmus unter Verwendung von experimentellen Daten der thermodynamischen Parameter für Basenpaarungen, Fehlpaarungen, freihängenden Sequenzen, terminalen Fehlpaarungen, coaxialen Stappeln-

gen und einer Reihe von Schleifen [170, 167]. Die zweidimensionale Struktur ist stark abhängig von den Umgebungsbedingungen, wie z.B. Temperatur und Salzkonzentration, die daher bei der Vorhersage ebenfalls betrachtet werden müssen [171]. Am Ende wird die Struktur mit der kleinsten freien Energie als höchst wahrscheinlich eingeordnet, aber auch suboptimale Strukturen werden als wahrscheinlich angesehen und von mfold als Ergebnis ausgegeben. Mfold wurde in dieser Arbeit zur Vorhersage der zweidimensionalen Struktur des verwendeten Aptamers benutzt. Neben mfold gibt es andere Programme für die Vorhersage der zweidimensionalen und dreidimensionalen Struktur von RNS, da diese bekanntermaßen an wichtigen biologischen Prozessen beteiligt sind, vor allem in der Regulierung der Expression von Genen [172]. Bisher gibt es

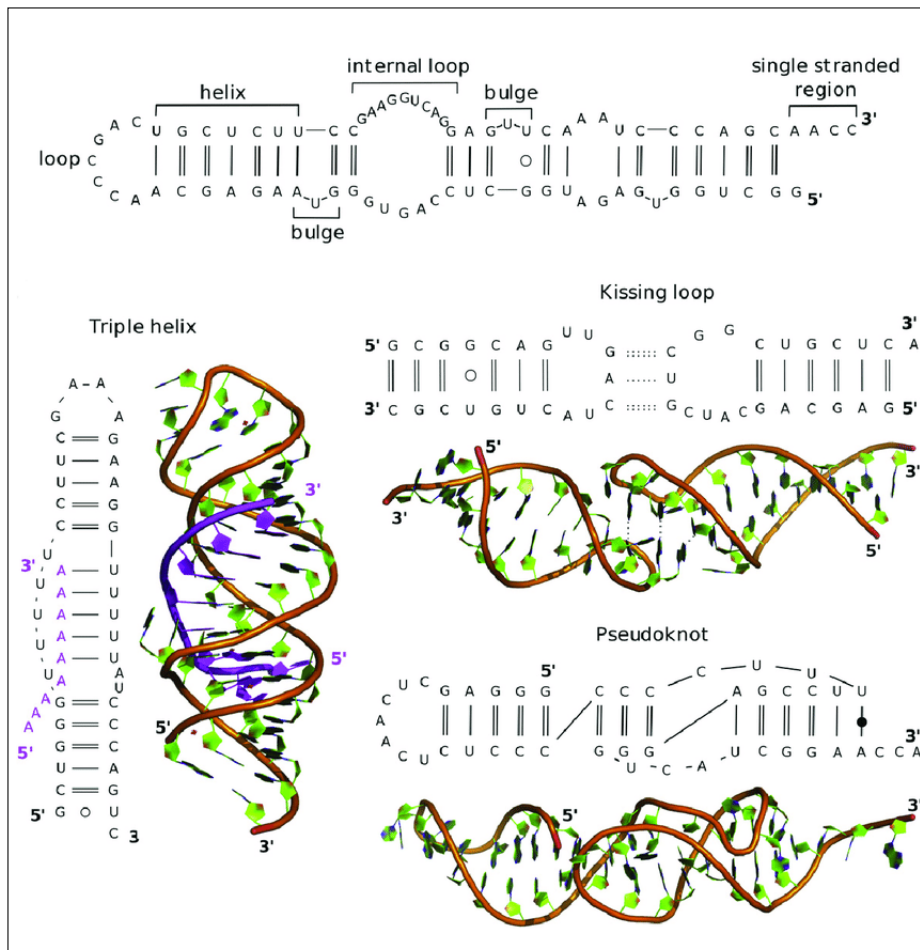


Abbildung 2.13: Eine Auswahl an sekundären Strukturelementen typisch für RNS zur Darstellung der Komplexität von dreidimensionalen Strukturen einzelsträngiger Oligonukleotide. Reproduziert aus [166] mit Erlaubnis von Elsevier.

jedoch kein Äquivalent für die Vorhersage der dreidimensionalen Struktur von DNS, die jedoch aufgrund ihrer Stabilität weitaus häufiger als Aptamer eingesetzt werden als RNS. Erste Entwicklungen in diese Richtung wurden kürzlich gestartet [173], aber stoßen an ihre Grenzen aufgrund der geringen Anzahl von Strukturanalysen von Aptameren.

Quadruplexe

Zudem gibt es weitere dreidimensionale Strukturen, die in den genannten Programmen nicht betrachtet werden, wie zum Beispiel Paarungen von 3, 4 oder sogar 5 Basen zu einer Ringstruktur, wozu das sogenannte G-Quartett zählt, welches 1962 erstmals entdeckt wurde [174]. In einem G-Quartett bilden vier Guaninbasen eine quadratische planare Struktur mittels Hoogsteen-Paarungen, wobei ein Guanin jeweils zwei Wasserstoffbrücken zum linken und rechten Nachbarn ausbildet (siehe Abbildung 2.14) [175].

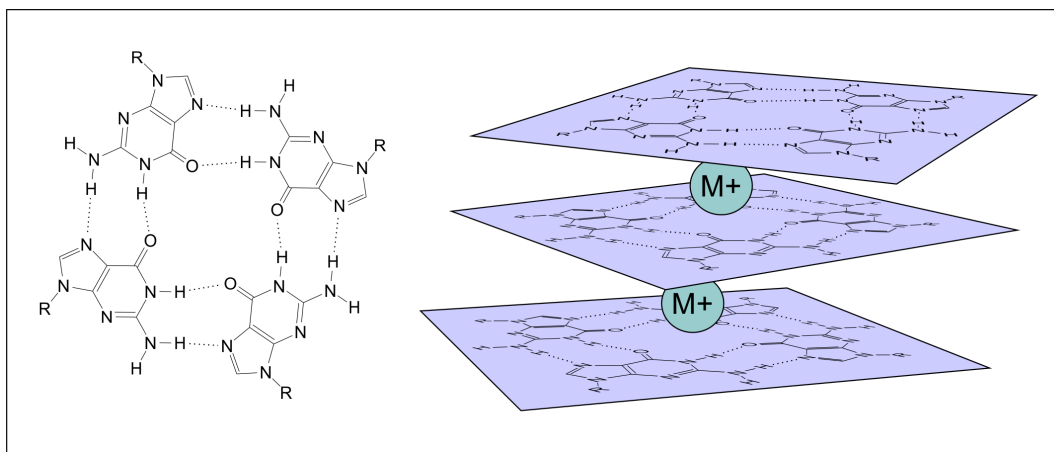


Abbildung 2.14: Beispiel für ringförmige Basenpaarungen - links: G- Quartett aus vier Guaninbasen; rechts: Quadruplex aus drei gestapelten G- Quartetten und zwei Kationen M^+ zur Stabilisierung.

In einem zweiten Schritt können G-Quartette übereinander in einem Abstand von $3,3 \text{ \AA}$ und einer 30° -Drehung zueinander gestapelt werden, was als Quadruplex bezeichnet wird (siehe Abbildung 2.14). Durch die Komplexierung eines Kations M^+ in der Mitte von zwei G-Quartetten, welches mit jeder Base der beiden G-Quartetts wechselwirkt, wird der Quadruplex stabilisiert und die Basenstapelwechselwirkungen verstärkt. In einem dritten Schritt kann der Quadruplex durch Anione, die mit den nach außen zeigenden Aminogruppen

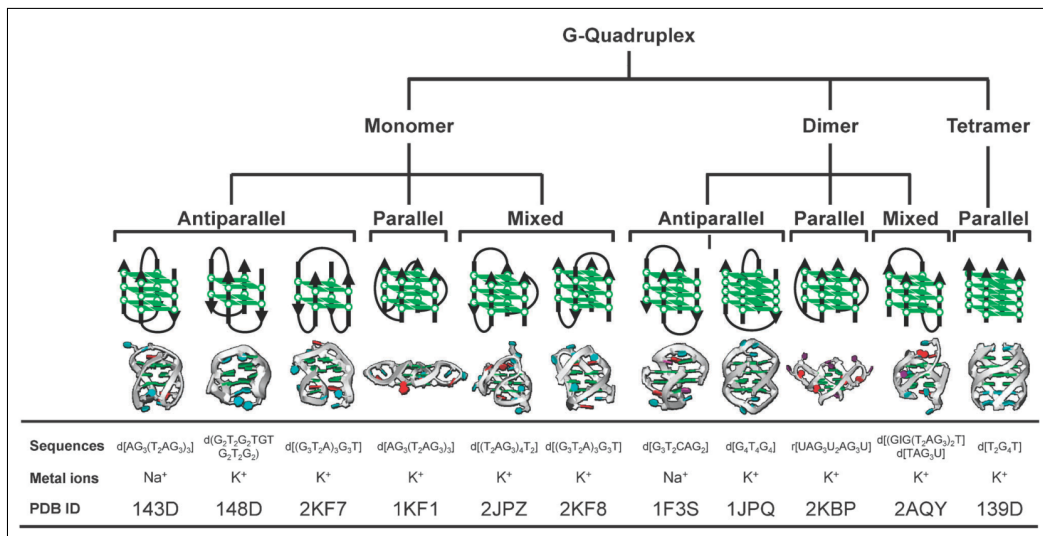


Abbildung 2.15: G-Quadruplexe aus einem, zwei oder vier Oligonukleotidsträngen mit parallelem, anti-parallel oder gemischtem Verlauf - schematische Darstellung in grün und darunter die molekulare Struktur eines Beispiels zu finden in der Proteindatenbank PDB unter der darunter aufgelisteten ID. Reproduziert aus [176] mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry.

der Guanine interagieren, weiter stabilisiert werden. Der Quadruplex kann aus vier parallelen DNS-Strängen gebildet werden, aber auch intramolekular aus einem einzigen Strang und natürlich alle Varianten dazwischen (siehe Abbildung 2.15). Dabei wird zwischen parallel, anti-parallel und gemischt verlaufenden Strängen unterschieden, wobei jede Variante eine andere molekulare Struktur und somit eine andere Funktionalität hervorbringt.

1987 entdeckte man, dass Telomere - so bezeichnet man repetitive Sequenzen an den Enden der Chromosomen - mit ihren guaninreichen DNS-Sequenzen Quadruplexe bilden können und die Bedeutung von Quadruplexen in der Natur größer ist, als bisher angenommen [177]. In der Krebstherapie wird diese Entdeckung heute genutzt, um neue Medikamente zu entwickeln [178]. So wurden zum Beispiel Proteine gefunden, die die Bildung von Quadruplexen an den Telomeren begünstigen, welche wiederum die Anbindung der Telomerase verhindern, wodurch die Proliferation der Krebszellen reduziert wird. Die Untersuchung der Kristallstruktur der menschlichen Telomerasequenz [179] zeigte, dass diese einen intramolekularen G-Quadruplex, ein paralleles Monomer bildet, indem alle drei Schleifen weit nach außen reichen (siehe Abbildung 2.16 und vergleiche mit Abbildung 2.15). Diese Schleifen interagieren nachweislich

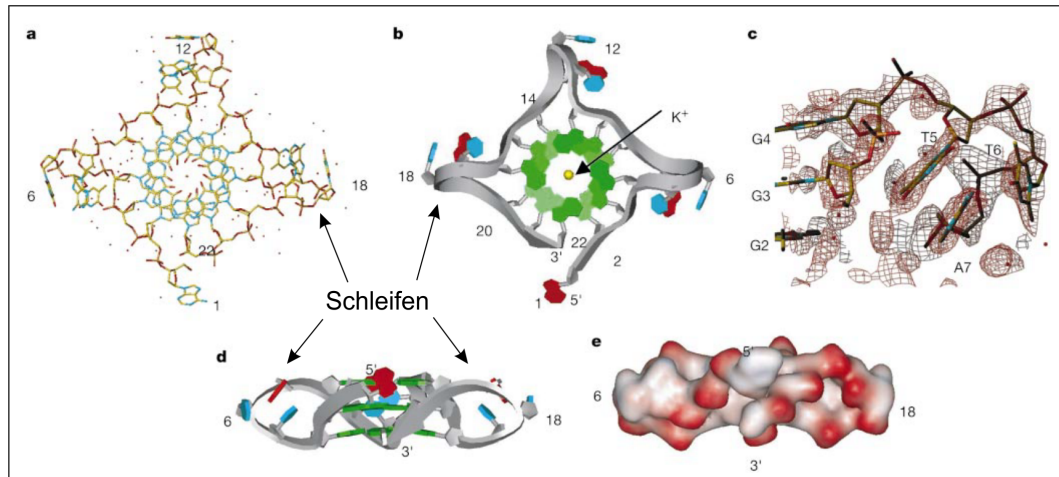


Abbildung 2.16: Darstellung der gefalteten Struktur eines intramolekularen G-Quadruplex aus dem menschlichen Telomer - a) Stick Darstellung des Quadruplexes mit parallelen Strangverlauf und komplexiertem Kaliumion; b) Cartoon Darstellung - Guanine sind grün, Thymin blau und Adenin rot, das Phosphatrückgrat ist grau; c) die TTA-Schleife; d) Seitenansicht; e) Konturdarstellung gefärbt nach Ladung mit rot = negativ. Adaptiert aus [179] mit Erlaubnis von Springer Nature.

mit dem Telomerende-bindenden Protein aus *Oxytricha nova* (OnTEBP) [180]. Daher wird vermutet, dass die Quadruplexe die Stabilität dieser Schleifen gewährleisten und so die feste Bindung des Analyten ermöglichen [175]. Dies ist besonders bei Aptameren von Bedeutung, da diese aufgrund ihrer kurzen Sequenzen eine hohe Flexibilität aufweisen.

Quadruplexe werden in dem mfold-Programm nicht berücksichtigt. Informationen über die Lage, Form und Wahrscheinlichkeit von Quadruplexen in einer Oligonukleotidsequenz können mithilfe des Programms „QGRS-mapper“ erhalten werden [181], welches guaninreiche Regionen in der Sequenz sucht und den Abstand zwischen den Regionen bestimmt, wobei anhand verschiedener Kriterien ein G-score berechnet wird. Je höher dieser G-score, desto wahrscheinlicher ist der Quadruplex. Die Bildung eines Quadruplexes ist ebenfalls von den äußeren Bedingungen wie Temperatur, Ionenstärke und vor allem Valenz der Kationen abhängig [182], die jedoch bisher in dem Programm nicht berücksichtigt werden. „QGRS-mapper“ wurde zur Abschätzung der Bildung eines Quadruplexes durch das in dieser Arbeit verwendete Aptamer benutzt.

2.3.2 Chemie der Aptamer-Analyt-Bindung

Aus der Biologie ist bekannt, dass viele Moleküle an DNS- und RNS-Strukturen binden, allen voran die sogenannten Transkriptionsfaktoren, Proteine, die die Expression von Genen regulieren. Über die Interaktion von Proteinen mit der Doppelstrang-DNS wurde viel erforscht, allerdings ist nur wenig über die Interaktion zwischen Einzelstrang-DNS und Proteinen bekannt. Aus der bisherigen Forschung geht hervor, dass die Bindung zwischen Aptamer und Analyt vor allem auf den folgenden vier Interaktionen basiert [175]:

- elektrostatischen Interaktionen,
- Van-der-Waals-Kräften,
- Wasserstoffbrückenbindungen und
- Stabelwechselwirkungen.

Wie schon erwähnt, ist die Anzahl von Aptameren, deren dreidimensionale Struktur bekannt ist, sehr gering und die Zahl der hervorgegangenen Kristallstrukturen von Aptamer-Protein-Komplexen beläuft sich auf 16 [183].

Anhand der wenigen Aptamer-Protein-Strukturen können keine Rückschlüsse auf spezifische Aminosäuren-Basen-Interaktionen gezogen werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Interaktionen von Proteinen an doppelsträngiger DNS ebenfalls auf einzelsträngige DNS übertragen werden können. Da deutlich mehr Kristallstrukturen von Protein-dsDNS-Komplexen vorhanden sind, können deren Betrachtungen zum Verständnis der Aptamer-Protein-Bindung herangezogen werden. Das betrifft jedoch nur einen winzigen Teil aller möglichen Interaktionen, da zahlreiche Interaktionsstellen für Proteine aufgrund der Hybridisierung im Doppelstrang nicht zugänglich sind.

Luscombe et al. untersuchten 129 Kristallstrukturen von Protein-DNS-Komplexen (hauptsächlich Doppelstrang-DNS) auf Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Wechselwirkungen [184]. Sie fanden heraus, dass 75 % aller Wechselwirkungen mit dem Rückgrat der DNS stattfanden, welche als unspezifisch einzuordnen sind. Von den spezifischen Wechselwirkungen beruhen 65 % auf Van-der-Waals-Kräfte und 35 % auf Wasserstoffbrücken. Aus den 25 % spezifischen Wechselwirkungen konnten Luscombe et al. bevorzugte Aminosäuren-Basen-Paarungen extrahieren, die im Folgenden kurz dargestellt werden sollen. In Tabelle 2.3 sind die Ergebnisse von Luscombe et al. [184] zusammengefasst, wobei hier nur die Aminosäuren dargestellt werden, die mindestens mit ei-

Tabelle 2.3: Zusammenfassung der Ergebnisse von Luscombe et al. [184] über die Interaktionen von Aminosäuren (Reihen) und Basen (Spalten) in Protein-DNS-Komplexen basierend auf 129 Kristallstrukturen. Dargestellt sind die Aminosäuren, bei denen mit mindestens einer Base signifikant mehr Interaktionen stattfanden als bei zufälligen Interaktionen zu erwarten wären (fett gedruckt). Die Art der Interaktion ist nach Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Wechselwirkungen unterteilt. Die jeweils letzte Zeile und Spalte eines Abschnitts zeigt die Summe aller Interaktionen der jeweiligen Aminosäure mit allen Basen bzw. der jeweiligen Base mit allen Aminosäuren (inklusive der nicht dargestellten).

Wasserstoffbrücken					
	Adenin	Thymin	Guanin	Cytosin	gesamt
Arginin	19	24	98	8	149
Lysin	4	9	30	6	49
Asparagin	18	7	7	10	42
Glutamin	16	2	6	2	26
Glutaminsäure	1	0	1	10	12
Asparaginsäure	2	0	2	5	9
gesamt	66	53	180	56	365
Van-der-Waals-Interaktionen					
	Adenin	Thymin	Guanin	Cytosin	gesamt
Glutamin	26	36	6	13	81
Phenylalanin	22	29	7	22	80
Arginin	14	14	31	14	73
Threonin	11	42	5	0	58
Prolin	28	15	1	2	46
gesamt	202	300	150	146	798

ner Base signifikant mehr Bindungen zeigten als bei zufälligen Interaktionen zu erwarten wäre (fett gedruckt). Die Tabelle ist in zwei Abschnitte unterteilt, die jeweils die Ergebnisse für Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Interaktionen darstellen. Jeweils die letzte Spalte und Zeile eines Abschnittes zeigt die Summe der spezifischen Interaktionen der jeweiligen Aminosäuren mit allen Basen bzw. der Base mit allen Aminosäuren (inklusive den nicht dargestellten). Aus der Tabelle kann man lesen, dass Arginin und Lysin bevorzugt Wasserstoffbrücken mit den Basen Thymin und Guanin bilden, während Cytosin bevorzugt Wasserstoffbrücken mit Glutaminsäure und Asparaginsäure bildet. Die Base Adenin interagiert bevorzugt mit Arginin, Asparagin und Glutamin über Wasserstoffbrücken. Die unspezifischen Wechselwirkungen der Aminosäuren basierend auf Wasserstoffbrücken finden vor allem mit den Phosphaten des DNS-Rückgrates statt, während die unspezifischen Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den Zuckermolekülen des DNS-Rückgrates stattfinden. Über Van-der-Waals-Kräfte bindet Glutamin bevorzugt an Adenin und Thymin sowie Arginin an Guanin. Adenin interagiert zudem bevorzugt mit Phenylalanin und Prolin mittels Van-der-Waals-Wechselwirkungen, Thymin hingegen mit Threonin und Phenylalanin. Cytosin interagiert allein mit Phenylalanin spezifisch.

Anhand der Ergebnisse von Luscombe et al. lässt sich ebenfalls zusammenfassen, dass Cystein, Methionin und Tryptophan selten mit Basen interagieren und Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin und Tyrosin zwar zahlreich an den unspezifischen Bindungen zum Rückgrat der DNS beteiligt sind, aber nur selten spezifische Interaktionen mit Basen zeigen. Diese Ergebnisse geben wertvolle Hinweise auf die Interaktion von DNS mit Proteinen und wurden zur theoretischen Betrachtung der Bindung zwischen Aptamer und Protein A in Unterabschnitt 4.4.1 verwendet. Bei der Bildung von Quadruplexen, stehen die daran beteiligten Guanine für die Interaktion mit Aminosäuren nicht zur Verfügung, da vier der möglichen Stellen für Wasserstoffbrücken zur Bildung des Quartetts belegt sind und Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den Quartetten untereinander stattfinden. Dies lässt vermuten, dass vor allem Adenin und Thymin an der Bindung von Proteinen an Aptamere beteiligt sind. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Bindungsanalysen überein, wie z.B. bei dem Thrombinaptamer, dessen bindende Schleifen zwei Thymine enthal-

ten [185, 186] und bei der Telomersequenz, dessen Schleife eine TTA-Abfolge enthält [180]. Eine Software zur Vorhersage der Interaktion von Aptamer und Analyt wäre ein wertvolles Werkzeug für die Entwicklung von Aptasensoren.

Im folgenden Abschnitt wird betrachtet, welche Aptamere bereits für das pathogene Bakterium *S. aureus* selektiert wurden und welche Überlegungen hinsichtlich der Wahl des Aptamers für die Entwicklung eines impedimetrischen Biosensors getroffen werden müssen.

2.3.3 Aptamere für *S. aureus*

Wie in der Publikation von Hong et al. [187] übersichtlich dargestellt, wurden bereits Aptamere gegen diverse pathogene Mikroorganismen selektiert, wie z.B. für *E. coli*, *Salmonellen*, *Streptokokken* und *Pseudomonas aeruginosa*. In den meisten Fällen wurde dafür der sogenannte Zell-SELEX [188] verwendet, bei dem lebende Zellen als Analyt zu dem Pool aus Oligonukleotidsequenzen gegeben werden, mit dem Vorteil der Selektion von spezifischen Aptameren ohne nötige Kenntnis der Oberflächenbeschaffenheit der Zelle. Mithilfe des Zell-SELEX entwickelte Anti-*S. aureus*-Aptamere sind in Tabelle 2.4 zusammengefasst.

Tabelle 2.4: DNS-Aptamere für die Detektion von *S. aureus* selektiert mittels des Zell-SELEX

Name	K_d /nM	Länge /nt	Referenz
SA20, SA23, SA31, SA34, SA43	62-211	88	[189]
SA-17	35	62	[190]
DTMRSA3	130	77	[191]
A14	3,5	108	[192]
RAB10, RAB35	46, 34	77	[193]

Der Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass Oberflächenstrukturen gebunden werden, die tatsächlich am lebenden Organismus zugänglich sind [194]. Der größte Nachteil dieser Methode ist die Ungewissheit, welches Molekül tatsächlich gebunden wird. Mit großer Wahrscheinlichkeit werden Moleküle gebunden, die in hoher Zahl vorhanden und positiv geladen sind. Sind die für die Gattung

spezifischen Moleküle auf der Zelloberfläche selten vorhanden, negativ geladen oder stark hydrophob, so ist die Selektivität der Aptamere stark beeinträchtigt. Zum Beispiel zeigten einige der selektierten Aptamere von Turek et al. [191] trotz etablierten negativen Selektionsschritt mit *E. coli* eine hohe Kreuzreaktivität mit diesem Pathogen. Zudem ist der Zell-SELEX ein langwieriger Prozess, bei dem im Vergleich zum normalen SELEX meist mehr Runden (10-12) für die Reduktion der Anzahl der diversen Sequenzen benötigt werden, da die große Anzahl von Bindungsstellen an der Oberfläche miteinander interferieren und somit die Anreicherung spezifischer Sequenzen verzögern bzw. verhindern. Zusätzlich müssen in jedem Zyklus neue lebende Zellen hinzugefügt werden, die sich zu denen im vorherigen Zyklus in der Passage und somit den Eigenschaften unterscheiden. Weiterhin ist die Charakterisierung der erhaltenen Aptamere deutlich umfangreicher, da die Kreuzreaktivität sowohl zu anderen gram-negativen und gram-positiven Bakterien als auch zu verschiedenen *S. aureus* getestet werden muss. Zum Beispiel testeten Chang et al. [190] nur die Spezifität hinsichtlich *S. aureus* und *S. epidermidis*, aber keine weiteren Bakterien, während Ramlal et al. [193] die Spezifität der selektierten Aptamere gegen eine Reihe von anderen Bakterien, aber nicht gegen *S. epidermidis* testeten. Bei den von Ramlal et al. entwickelten Aptameren verursachten *Streptokokken* ein unspezifisches Fluoreszenzsignal von etwa 40 % des spezifischen Signals.

Als Alternative kann ein SELEX mit einem spezifischen Bestandteil der Oberfläche des Pathogens als Analyt durchgeführt werden. Der Vorteil liegt darin, dass der normale SELEX effizienter ist und daher weniger Zeit und Ressourcen verbraucht. Der Nachteil ist, dass die Moleküle charakterisiert und aufgereinigt werden müssen und man nicht weiß, ob das Molekül während des SELEX die gleiche Konformation einnimmt wie am lebenden Organismus (vor allem bei Proteinen). Maeng et al. selektierte Aptamere gegen die sogenannten Teichonsäuren, polymere Bestandteile der Zellwand von gram-positiven Bakterien [195]. Mit diesen Aptameren kann zwischen gram-positiven und gram-negativen Bakterien unterschieden werden. Das an der Oberfläche gebundene Protein A ist spezifisch für *S. aureus* und kommt in anderen Arten nicht vor, weshalb es ein geeignetes Molekül für die Erkennung von *S. aureus* ist. Weitere Vorteile sind, dass Protein A rekombinant hergestellt werden kann und dass

Tabelle 2.5: Aptamere für die Detektion von *S. aureus* selektiert mit anderen Methoden

Aptamer	Analyt	SELEX Methode	Typ	K_D /nM	Länge /nt	Referenz
fmA12	Protein A	Magnetic bead	RNS	67	100	[196]
4520-8	Protein A	Magnetic bead	SOMAmer	0,22	>40	[197]
4503-73	clumping factor A	Magnetic bead	SOMAmer	0,79	>40	[197]
PA#2/8	Protein A	FluMag	DNS	1350	76	[198]
PA#2/8 [S1-58]	Protein A	FluMag	DNS	522	58	[198]

die Gensequenz von Protein A über Generationen konserviert wurde. Aptamere, die gegen dieses Protein entwickelt wurden, sind in Tabelle 2.5 aufgelistet. Friedman et al. selektierten RNS-Aptamere spezifisch für *staphylococcal* Protein A, wobei die Stabilität der RNS durch die Modifizierung der Basen mit Methyl- und Fluorgruppen von 5 auf 15 Stunden erhöht werden konnte [196]. Baumstummler et al. entwickelten Protein A-bindende SOMAmers (= Slow Off-rate Modified Aptamers), Oligonukleotide mit modifizierten Basen, die den Seitenketten von Aminosäuren nachempfunden sind, um dadurch die Diversität des Sequenzpools zu erhöhen [197]. Der Einsatz von Dextransulfat während des SELEX fördert die Anreicherung von Aptameren mit einer geringen Dissoziationsrate k_d , wodurch niedrigere Dissoziationskonstanten K_d und somit höhere Affinitäten erreicht werden. Daher konnten Baumstummler et al. Aptamere selektieren, die erstaunliche Bindungskonstanten von <1 nM aufweisen, bestimmt durch Bindungsassays basierend auf radioaktiven Markierungen.

Sowohl Baumstummler et al. als auch Stoltenburg et al. [198] nutzten rekombinantes Protein A, d.h. in *E. coli* exprimiertes Protein A für die Selektion spezifischer Aptamere. Stoltenburg et al. nutzten den sogenannten FluMag-SELEX [150], bei dem das Protein A auf Magnetpartikeln immobilisiert wurde (in diesem Fall biotinyliertes Protein A auf Streptavidin-modifizierte Magnetpartikel) und die gebundenen Oligonukleotide nach der Hitzedenaturierung während der PCR mit Fluorescein markiert wurden, was die Quantifizierung der gebundenen Sequenzen ermöglichte. Ein negativer Selektionsschritt mit unmodifizierten Streptavidin-Magnetpartikeln wurde in den Runden 3 und 7-

11 eingefügt. Zudem wurden die Waschschriffe ab Runde 9 in ihrer Anzahl, Länge und dem verwendeten Volumen erhöht. Nach der 11. SELEX-Runde wurden 88 spezifische Sequenzen erhalten, die in 7 Gruppen unterteilt werden konnten. Bindungsversuche mit Vertretern der 7 Gruppen ergaben, dass die Sequenz PA#2/8 die höchste Affinität für das Protein A mit einer scheinbaren Dissoziationskonstanten K_D von 1350 nM aufwies. Weitere Optimierungsversuche zeigten, dass eine verkürzte Variante dieses Aptamers, das PA#2/8[S1-58], eine höhere Affinität mit einer K_D von 522 nM für natives Protein A aufweist.

Die K_D ist ein Maß für die Affinität der Bindung. Aus physikalischer Sicht wird die Affinität eines Analyten zu einem Aptamer durch die Änderung der Gibbs-Energie ΔG beschrieben, die sich aus der Differenz der Enthalpieänderung ΔH und der Entropieänderung ΔS der Bindung ergibt (Gleichung 2.1), wobei diese sowohl von der Temperatur T als auch vom Druck ρ abhängig ist. Die Änderung der Gibbs-Energie bei der Dissoziation von Analyt und Aptamer ΔG_d ist proportional zur Dissoziationskonstanten K_d , wobei man vom Standardzustand ausgeht, d.h. $T = 25^\circ C$ und $\rho = 1$ bar und die Aktivitäten der beteiligten Moleküle c_0 sind 1 [199].

$$\Delta G_d = -RT \ln \frac{K_d}{c_0} = \Delta H_d - T\Delta S_d \quad (2.1)$$

Jede Abweichung vom Standardzustand zieht eine Änderung der Dissoziationskonstante mit sich, daher ist diese von der Messmethode und den Messbedingungen abhängig [200]. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wird ebenso vorausgesetzt, dass Analyt und Aptamer nur in freier oder gebundener Form vorliegen, die Immobilisierung der Aptamere hat einen Einfluss auf die freie Energie des Aptamers und somit auch auf die Dissoziationskonstante [201]. Weiterhin ist die Affinität der Aptamere von den Pufferbedingungen, wie Ionenstärke und pH abhängig [202], was sich ebenfalls auf die Dissoziationskonstante auswirkt. Daher eignet sich die K_d nur bedingt zum Vergleich der Aptamere untereinander und wird oftmals als scheinbare Dissoziationskonstante K_D angegeben. Obwohl das Aptamer PA#2/8[S1-58] [198] eine scheinbar geringe Affinität im Vergleich zu den anderen Aptameren aus Tabelle 2.5 aufweist, wurde dieses Aptamer für die Entwicklung des in dieser Arbeit beschriebenen impedimetrischen Biosensor zur Detektion von *S. aureus* gewählt, da zum einen Protein A ein optimales Erkennungsmolekül hinsichtlich Spezifi-

tät darstellt und zum anderen dieses DNS Aptamer keine modifizierten Basen enthält und somit preiswert synthetisiert werden kann. Gegenüber RNS Aptamere ist ein DNS Aptamer aufgrund dessen Stabilität zu bevorzugen und die Kürze der Sequenz (58 Nukleotide) dieses Aptamers erleichtert die Immobilisierung. Weiterhin wurde dieses Aptamer ausführlich von Stoltenburg et al. charakterisiert und optimiert [198], was eine stabile Grundlage für die Entwicklung eines Sensors bietet. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Charakterisierung zusammengefasst.

2.3.4 Das Protein A-bindende Aptamer

Die Sequenz des von Stoltenburg et al. selektierten Aptamers und dessen verkürzte Variante sind in Tabelle 2.6 dargestellt [198].

Tabelle 2.6: Sequenzen des spezifisch an Protein A bindenden Aptamer und dessen verkürzten Version selektiert von Stoltenburg *et al.* [198]. Grau markiert sind die Primer, unterstrichen die guaninreichen Regionen.

Name	Sequenz	Länge
PA#2/8	ATACCAGCTTATTCAATTAGCAACATGA <u>GGGGGATAGAGGGGGTGGGT</u> TCTCTCGGCT ACAATCGTAATCAGTTAG	76
PA#2/8[S1-58]	ATACCAGCTTATTCAATTAGCAACATGA <u>GGGGGATAGAGGGGGTGGGT</u> TCTCTCGGCT	58

Eine Vorhersage der zweidimensionalen Struktur des Aptamers PA#2/8 mittels „mfold“ ergab drei Haarnadelschleifen, wobei die Sequenz auffällige Guaninreiche Bereiche aufweist. Um die Rolle der Schleifen und der Guaninreichen Bereiche zu klären, untersuchten Stoltenburg et al. verkürzte Varianten des Aptamers auf dessen Bindung zu Protein A. Die Experimente zeigten, dass der 3'-Primer nicht zur Bindung benötigt wird, jedoch die Entfernung des 5'-Primers zum Verlust der Affinität führt. Genauso führt die Entfernung der Guaninreichen Regionen zum Verlust der Affinität des Aptamers, was bereits vermuten lässt, dass ein Quadruplex ausgebildet wird. Während der praktischen Arbeiten zu dieser Dissertation publizierten Stoltenburg et al. ein weiteres Paper [203], indem sie das Aptamer PA#2/8 und verkürzte Varianten mittels der CD Spektroskopie (CD = Circular dichroismus) untersuchten und die

Bildung eines parallelen G-Quadruplexes aus Guaninen in *anti*-Konformation bestätigen konnten, unter der Annahme, dass es sich um einen intramolekularen Quadruplex handelt. Bimolekulare oder multimolekulare Quadruplexe sind nicht auszuschließen und somit auch andere Quadruplexstrukturen möglich.

Für die Bindung von rekombinanten Protein A an die immobilisierten Aptamere zeigten Stoltenburg et al, dass die lange Version des Aptamers mit höherer Affinität bindet als das verkürzte Aptamer [S1-58] [198]. Beide Aptamere binden ebenfalls an das native Protein A, wobei hier die verkürzte Version [S1-58] eine höhere Affinität aufwies. Untersuchungen der Bindung, wenn beide Partner frei beweglich in Lösung sind, zeigten sowohl für das native als auch das rekombinante Protein A höhere Affinitäten zur verkürzten Variante des Aptamers. In späteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass weiter verkürzte Varianten des Aptamers, [S1-43] und [S1-50], zu einem Verlust der Affinität für Protein A führten. Weiterhin konnten mit dem Aptamer PA#2/8 und dessen verkürzte Variante [S1-58] in einem optischen Assay (ELONA= Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay) immobilisierte tote *S. aureus* detektiert werden [203]. Stoltenburg et al. konnten die hohe Selektivität des Aptamers PA#2/8 zeigen, denn Protein G, Protein L, humanes und bovines Serumalbumin und humanes Thrombin wurden nicht vom immobilisierten Aptamer gebunden [198]. Zusätzlich konnten Stoltenburg et al. die Hypothese unterstützen, dass das Aptamer PA#2/8 und der Antikörper IgG an die gleichen Domänen am Protein A binden, denn SPR-Chips mit immobilisiertem Protein A zeigten nach der Inkubation mit >100 nM IgG kein Bindungssignal für das Aptamer, während das Aptamersignal für IgG Konzentrationen unterhalb von 100 nM mit abnehmender IgG Konzentration stieg und somit von einer Konkurrenzreaktion von Aptamer und IgG um die Bindungsstelle am Protein A ausgegangen werden kann [198].

Aufgrund der im Allgemeinen höheren Sensitivität für *S. aureus* der verkürzten Version des Aptamers, wurde diese für die Entwicklung des impedimetrischen Aptasensors verwendet. Die Sequenz ist in Tabelle 2.6 dargestellt. Analysen zur Struktur der verkürzten Variante und dessen Bindung zu Protein A, die im Zuge dieser Arbeit stattfanden, werden im Ergebnisteil dargestellt (siehe Unterabschnitt 4.4.1).

Die Bedeutung von Aptameren für die Biosensorik zeigt sich in der wachsen-

den Anzahl von Aptamer-basierten Biosensoren, kurz Aptasensoren, in allen Bereichen [204]. Welche Aptasensoren bereits für die Detektion von *S. aureus* entwickelt wurden und welche Vor- und Nachteile diese aufweisen, soll im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

2.3.5 Aptasensoren für die Detektion von *S. aureus*

Dass Aptamere sich dazu eignen, Biosensoren mit hoher Sensitivität und Spezifität zu entwickeln, wurde mehrfach bewiesen [205]. Vor allem in den Bereichen der Detektion von kleinen Molekülen [206], der Verwendung von Nanomaterialien [207, 208] sowie in der Mikrofluidik [209] wurden mithilfe der Aptamere signifikante Fortschritte erzielt. Einige der entwickelten Aptasensoren eignen sich für die patientennahe Labordiagnostik, diese werden in dem Artikel von Gopinath et al. zusammengefasst [210]. Ein besonderer Fokus liegt auf der Entwicklung von elektrochemischen Biosensoren, da diese schnell, zerstörungsfrei und meistens markierungsfrei messen sowie miniaturisierbar sind. Cheng et al. überblickt elektrochemische Aptasensoren zur Detektion von Proteinen und kleinen Molekülen unterteilt nach den Detektionsprinzipien basierend auf der Änderung der Konfiguration, der Faltung oder der Leitfähigkeit des Aptamer-Sensor-Konstrukts [211]. Jarczewska et al. diskutiert Aptasensoren für die Anwendung in der klinischen Diagnostik und konzentriert sich daher auf klinisch relevante Analyten, zu denen auch Krebszellen zählen [212]. Die Zunahme der Bedenken bezüglich der Qualität von Lebensmitteln und Trinkwasser förderte die Entwicklung von Aptasensoren in diesem Bereich, in einem Review zusammengefasst von Mishra et al. [213]. Da Protein A mit Antikörpern unspezifisch interagiert, bieten Aptamere vor allem für die Entwicklung von Biosensoren zur Detektion von *S. aureus* den bedeutenden Vorteil der geringeren Kreuzreaktivität. Shahdordizadeh et al. haben in ihrem Artikel alle relevanten Entwicklungen von Aptasensoren für die Detektion von *S. aureus* bis zum Jahre 2017 übersichtlich darstellt [214].

In diesem Abschnitt werden einige Beispiele vorgestellt, die den Fortschritt in der *S. aureus*-Aptasensorik zusammenfassen sollen (siehe Tabelle 2.7).

Zuo et al. entwickelten ein auf Polydimethylsiloxan (PDMS), Papier und Glas basierendes mikrofluidisches System zur Detektion von *S. aureus* mithilfe von fluoreszenzmarkierten Aptameren [215]. Die Fluoreszenz der auf dem Gra-

phenoxid adsorbierten Aptamere ist gequenchet. In Anwesenheit des Analyten löst sich das Aptamer vom Graphen und bindet an *S. aureus*, was zu einer Zunahme der gemessenen Fluoreszenz führt. Mit diesem Prinzip und dem von Cao et al. selektiertem Aptamer SA43 [189] konnten sie ein Detektionslimit von 800 KbE per ml erreichen, während die Dauer des Assays ~18 min betrug. Die Sensitivität dieses Biosensors ist mit der von Antikörper-basierten optischen Biosensoren vergleichbar.

Um die Sensitivität allgemein von Biosensoren zu erhöhen, kann ein Anreicherungsschritt vor der Detektion verwendet werden. Dazu verwendeten Shangguan et al. das Aptamer SA31 [189], immobilisierten es auf fluoreszierenden Silica-Nanopartikeln und reicherten mittels einer positiven Dielektrophorese in einem mikrofluidischen Kanal die *S. aureus* aus einer Wasserprobe an und detektierten anschließend die Fluoreszenz [216]. Mit einer Messzeit von weniger als 2 h konnte damit ein Detektionslimit von 270 KbE/ml erreicht werden.

Dass die simultane Detektion zweier Bakterienarten in einer Probe möglich ist, zeigten Zhang et al. mit der Entwicklung eines Assays basierend auf der SERS [217]. Sie erzeugten zweierlei Goldnanopartikel: eine Sorte modifiziert mit dem *S. aureus*-Aptamer SA43 [189] und der Ramanprobe DNTB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) und eine Sorte mit anti-*Salmonella typhimurium*-Aptameren und der Ramanprobe MBA (Mercaptobenzoic acid). Magnetnanopartikel modifiziert mit beiden Aptameren dienten zur Separation und Anreicherung der Zellen aus der Probe, während die modifizierten Goldnanopartikel als Signalproben fungierten. Für *S. aureus* konnte ein Detektionslimit von 35 KbE/ml erreicht werden, wobei der Assay weniger als 3 h benötigt. Angereicherte Schweinefleischproben konnten mit einer Wiederfindungsrate von

Tabelle 2.7: Eine Auswahl an Aptasensoren für die Detektion von *S. aureus*

Transducer	Methode	Assaydauer	LoD /KbE · ml ⁻¹	Real- proben	Referenz
Optisch	Fluoreszenz	18 min	800	-	[215]
Optisch	Fluoreszenz	2 h	270	Wasser	[216]
Optisch	SERS	3 h	35	-	[217]
Optisch	Fluoreszenz	30 min	682	Blut	[218]
Masse	Magnetoelastisch	10 min	5	Wasser	[219]
Elektrochemisch	Potentiometrisch	-	1	-	[220]

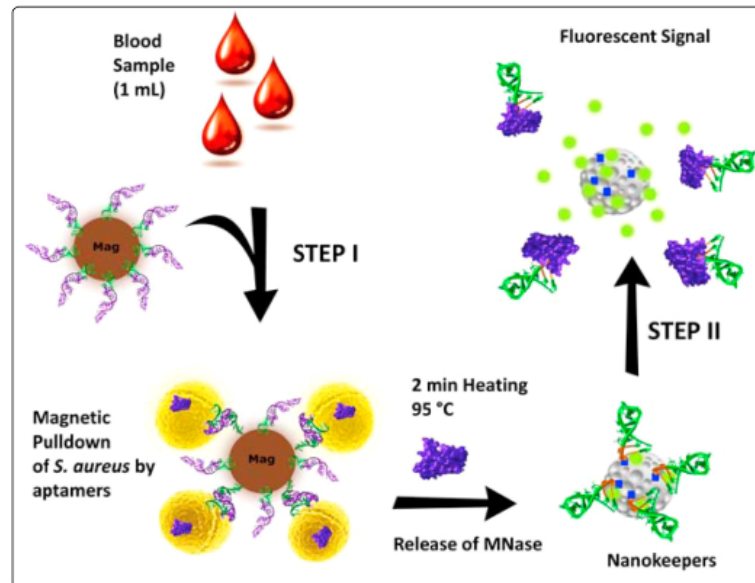


Abbildung 2.17: Beispiel für einen optischen Aptasensor für *S. aureus* - Schritt 1: Mit Aptamer-modifizierten Magnetpartikeln werden die Bakterien aus der Blutprobe separiert; Schritt 2: Das von den Bakterien produzierte Enzym bricht die Nanokeepers auf und die freien Fluorophore werden optisch detektiert. Reproduziert aus [179] mit Erlaubnis von Elsevier.

94-108% detektiert werden.

Die Detektion von *S. aureus* in Blut mit einem Detektionslimit von 682KbE pro ml gelang Borsa et al. unter der Verwendung von sogenannten „Nanokeepers“ [218]. Nanokeepers sind mesoporöse Silica-Nanopartikel, in die durch die Immobilisierung von bestimmten Oligonukleotiden Moleküle eingeschlossen werden können (siehe Abbildung 2.17). In diesem Fall füllten Borsa et al. die Nanokeepers mit Fluorescein-Molekülen und verschlossen die Poren durch die Immobilisierung von methylierten Haarnadel-Oligonukleotiden über eine ungeschützte TT-Sequenz. *S. aureus* produziert eine Nuklease (micrococcal nuclease), die diese TT-Sequenz spaltet, wodurch die Oligonukleotide vom Nanokeeper gelöst werden, einhergehend mit der Zunahme des Fluoreszenzsignals. Die Bakterien werden durch Magnetpartikel, modifiziert mit dem Aptamer SA20 [189], aus der Blutprobe separiert, angereichert und mit den Nanokeepers inkubiert. Das Fluoreszenzsignal erreicht zwar erst nach 20 Stunden das Maximum, aber eine signifikante Änderung der Fluoreszenz ist bereits nach 10 Minuten zu sehen, daher dauert der gesamte Assay nur etwa 30 Minuten. Da es sich hierbei um eine indirekte Methode handelt, dessen Ergebnis von der Produktion der

Nuklease abhängt, erfordert die Quantifizierung eine Kalibrierung.

Neben den bisher beschriebenen optischen Methoden gibt es Aptasensoren basierend auf massesensitiven Methoden. Als Beispiel sei hier die Entwicklung eines magnetoelastischen Aptasensors zur Detektion von *S. aureus* von Rahman et al. genannt [219]. Das Prinzip von magnetoelastischen Sensoren basiert darauf, dass der durch eine Erregerspule eingespeiste Wechselstrom ein magnetisches Feld erzeugt, wodurch der Sensor mit ferromagnetischen Eigenschaften in eine mechanische Schwingung versetzt wird, dessen Resonanzfrequenz unter anderem von der Masse des Sensors abhängt. Durch eine Empfängerspule kann die Verschiebung der Resonanzfrequenz korrelierend mit der Anzahl der gebundenen *S. aureus* an der mit SA43-Aptamer [189]-modifizierten Sensoroberfläche detektiert werden. Mit dieser Methode konnte ein Detektionslimit von 5 KbE/ml von *S. aureus* in Wasser in nur 10 Minuten detektiert werden. Magnetoelastische Sensoren haben die Vorteile, kostengünstig hergestellt werden zu können und kontaktfrei zu messen, d.h. die Spulen stehen nicht in direktem Kontakt mit der Probe, in der sich der ferromagnetische Sensor befindet. Einige Nachteile von magnetoelastischen Sensoren sind deren Sensitivität gegenüber dem Erdmagnetfeld und anderen externen Magnetfeldern, die ungleiche Frequenzverschiebung bei ungleichmäßiger Massebeladung und der hohe Stromverbrauch.

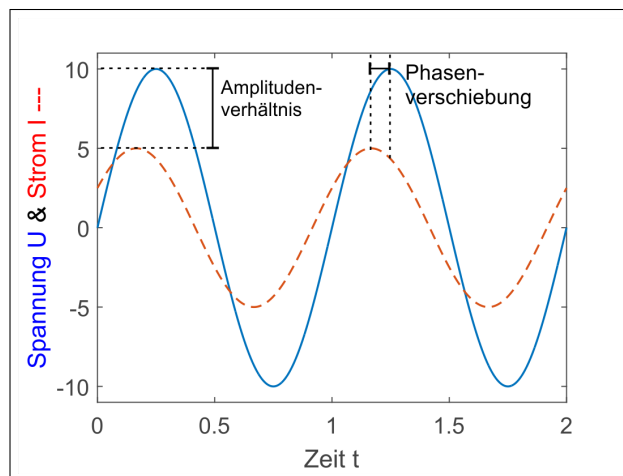
Die sensitivsten Biosensoren basieren auf elektrochemischen Methoden, wie zum Beispiel der Potentiometrie. Hernández et al. [220] modifizierte Graphenoberflächen mit dem SA20-Aptamer [189] und detektierte die Zunahme der Spannung bei der Bindung von *S. aureus*. Ein Detektionslimit von 1 KbE/ml in Puffer in nahezu Echtzeit konnte erreicht werden, wobei die Selektivität und das Verhalten mit Realproben nicht getestet wurde. Der Biosensor beeindruckt mit seiner Schlichtheit, aber die freien Graphenflächen lassen eine hohe Zahl an unspezifischen Interaktionen vermuten. Zu den elektrochemischen Biosensoren zählen ebenfalls die Impedanz-basierten Biosensoren, auch impedimetrische Biosensoren genannt. Die Grundlagen der Impedanzspektroskopie werden im nächsten Abschnitt beschrieben und anschließend wird auf die bereits entwickelten impedimetrischen Biosensoren zur Detektion von *S. aureus* eingegangen.

2.4 Die Elektrochemische Impedanzspektroskopie

Die Impedanzspektroskopie ist eine Messtechnik, bei der das Verhalten eines Systems auf angelegte Strom- oder Spannungssignale bei verschiedenen Frequenzen untersucht wird. Bei der potentiostatischen Methode wird eine Wechselspannung an das zu untersuchende System angelegt und der resultierende Strom gemessen, um daraus Informationen über das System zu gewinnen. Die EIS bezeichnet die Untersuchung elektrochemischer Systeme, d.h. Messzellen, in denen die Elektroden über einen Elektrolyten miteinander verbunden sind. Die Vorteile der EIS gegenüber anderen Messtechniken sind kurze Antwortzeiten sowie markierungsfreie und zerstörungsfreie Messungen, da bei geringen Spannungsamplituden von ~ 10 mV gemessen wird. Die folgenden Abschnitte behandeln die Grundlagen der EIS.

2.4.1 Die Impedanz ist komplex

Die Impedanz bezeichnet den komplexen Widerstand eines Systems. Die meist sinusförmige, angelegte Wechselspannung $u(t)$ (Gleichung 2.2) induziert einen



$$u(t) = \hat{u} \cdot \sin(\omega t + \varphi_u) \quad (2.2)$$

$$i(t) = \hat{i} \cdot \sin(\omega t + \varphi_i) \quad (2.3)$$

$$Z(j\omega) = \frac{u(j\omega)}{\hat{i}(j\omega)} \quad (2.4)$$

$$Z(j\omega) = |Z| \cdot e^{j\varphi} \quad (2.5)$$

$$Z(j\omega) = Z' + jZ'' \quad (2.6)$$

$$|Z| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2} \quad (2.7)$$

$$\varphi = \arctan(Z''/Z') \quad (2.8)$$

Abbildung 2.18: Dargestellt sind eine sinusförmige Wechselspannung $u(t)$ (—) und der resultierende Strom $i(t)$ (---) mit den Amplituden \hat{u} und \hat{i} , sowie die entsprechenden Formeln für die Spannung, den Strom und der daraus bestimmbaren Impedanz Z mit der Kreisfrequenz $\omega = 2\pi f$, dem Betrag der Impedanz $|Z|$, der imaginären Zahl $j = \sqrt{-1}$, dem Realteil Z' , dem Imaginärteil Z'' und der Phasenverschiebung ($\varphi = \varphi_u - \varphi_i$).

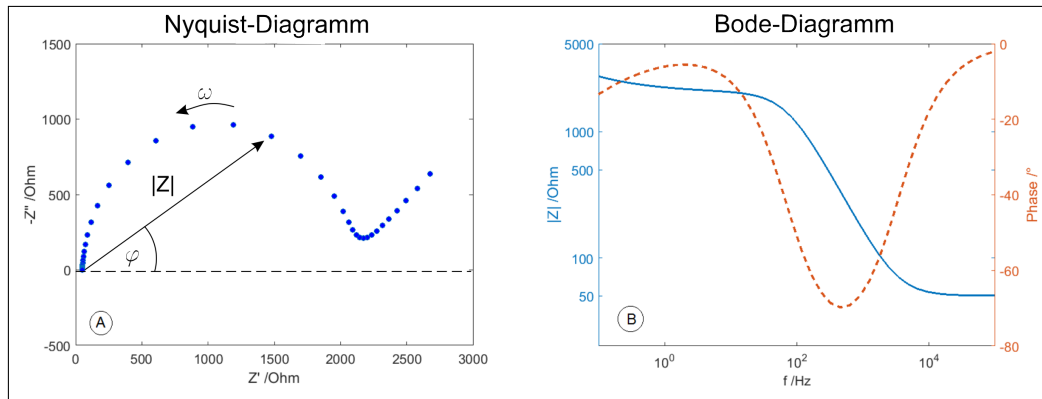


Abbildung 2.19: Darstellungsformen der Impedanz - A: Im Nyquist-Diagramm wird der Realteil Z' gegenüber dem Imaginärteil Z'' der Impedanz Z dargestellt. Jeder Punkt im Diagramm kann durch einen Zeiger repräsentiert werden, der den Bezug zu Phase φ und Betrag $|Z|$ der Impedanz darstellt. B: Im Bode-Diagramm wird der Betrag $|Z|$ und die Phase φ der Impedanz Z gegenüber dem Logarithmus der Frequenz f dargestellt.

Strom $i(t)$ (Gleichung 2.3), der von den elektrochemischen Eigenschaften des zu untersuchenden Systems beeinflusst wird, was in einer frequenzabhängigen Abnahme der Amplitude \hat{i} und der Verschiebung des Phasenwinkels φ_i resultiert (siehe Abbildung 2.18). Aus dem Quotienten der angelegten Spannung und des resultierenden Stroms ergibt sich die Impedanz des Systems $Z(\omega)$ (Gleichung 2.4). Dieser Ansatz wird auch als Ohmsches Gesetz im komplexen Bereich bezeichnet. Mittels der Eulerschen Formel kann die Impedanz in Abhängigkeit des Impedanzbetrages $|Z|$ und der Phasenverschiebung φ dargestellt werden (siehe Abbildung 2.18, Gleichung 2.5), wobei j die imaginäre Zahl $j = \sqrt{-1}$ ist. Die Differenz der beiden Nullphasenwinkel φ_u und φ_i wird als Phasenverschiebung φ bezeichnet. Des weiteren kann die Impedanz als Summe aus Realteil (Z') und Imaginärteil (Z'') dargestellt werden (siehe Abbildung 2.18, Gleichung 2.6). Diese beiden Darstellungen können mit Gleichung 2.7 und Gleichung 2.8 ineinander überführt werden.

Eine Variante, die Impedanz grafisch darzustellen, ist das Bode-Diagramm, wobei der Impedanzbetrag $|Z|$ und die Phasenverschiebung φ (auch kurz Phase genannt) gegenüber der Frequenz f aufgetragen werden (siehe Abbildung 2.19). Der Vorteil des Bode-Diagramms liegt vor allem darin, dass die x-Achse entsprechend der gewählten Verteilung der Messpunkte angepasst werden kann, d.h. logarithmisch oder linear. Eine andere Darstellungsmöglichkeit ist die Auf-

tragung des Realteils der Impedanz (Z') gegenüber des Imaginärteils der Impedanz (Z''). Diese Darstellung wird auch Nyquist-Diagramm genannt und eignet sich vor allem bei der logarithmischen Verteilung der Messpunkte für die Darstellung der Veränderungen bei kleinen Frequenzen ($< 10 \text{ k}\Omega$). Es handelt sich dabei um ein Zeigerdiagramm, in dem jeder Punkt durch einen Zeiger repräsentiert wird, dessen Winkel der Phasenverschiebung φ und dessen Länge dem Betrag der Impedanz $|Z|$ entsprechen. Die Frequenzen sind absteigend von links nach rechts angeordnet. In dieser Arbeit wird zur Darstellung der Ergebnisse das Nyquist-Diagramm verwendet.

2.4.2 Die elektrochemische Messzelle

In der elektrochemischen Impedanzspektroskopie muss das zu untersuchende System mit mindestens zwei Elektroden zu einer Messzelle kombiniert werden (siehe Abbildung 2.20). In dieser elektrochemischen Messzelle sind die Elektroden über einen Elektrolyten verbunden, der den Stromfluss zwischen den Elektroden ermöglicht. Durch das Anlegen einer Spannung wird der Stromfluss initiiert und dieser wird beim Durchdringen der Messzelle und des zu untersuchenden Systems beeinflusst, was wiederum gemessen wird und woraus Informationen über das zu untersuchende System gewonnen werden können. Je nachdem, um was es sich bei dem zu untersuchenden System handelt, kann die Messzelle angepasst werden. Man unterscheidet zum Beispiel zwischen Messzellen mit einem 2-, 3- oder 4-Elektrodensystem.

Ein 2-Elektrodensystem besteht aus einer Arbeitselektrode und einer Gegenelektrode, wobei das Wechselspannungssignal an der Gegenelektrode anliegt und an der Arbeitselektrode der resultierende Strom gemessen wird. In Abbildung 2.20 ist die Verteilung der Potentialpunkte über eine Messzelle mit zwei Elektroden dargestellt. Bei der 2-Elektroden-Messanordnung wird die komplette Messzelle gemessen samt der Vorgänge an den beiden Elektroden. Es wird der Spannungsabfall zwischen den Potentialpunkten A und E detektiert.

Beim 3-Elektrodensystem wird eine Referenzelektrode hinzugefügt, mit deren Hilfe das Potential an der Arbeitselektrode konstant gehalten und somit der Einfluss der Gegenelektrode weitestgehend eliminiert wird [221]. Für eine optimale Funktionsfähigkeit der Referenzelektrode muss diese möglichst nahe an der Arbeitselektrode und möglichst weit entfernt von der Gegenelektrode po-

sitioniert werden, also an Punkt B. Der Vorteil dieser Messanordnung besteht darin, dass nur die Vorgänge an der Arbeitselektrode und nahe der Arbeitselektrode gemessen werden (Potential zwischen A und B in Abbildung 2.20) und somit das Messergebnis weitestgehend unabhängig von den Vorgängen an der Gegenelektrode ist. Das setzt jedoch voraus, dass der Strom nicht durch die Gegenelektrode limitiert wird. Aus diesem Grund wird meist eine platinierete Platinelektrode mit möglichst großer Oberfläche gewählt, damit dort eine große Stromdichte gewährleistet ist. Diese Messmethode wird in der Elektrochemie am Häufigsten verwendet und wurde auch in dieser Arbeit ausgewählt, um die Bindung der Bakterien an die auf der Arbeitselektrode immobilisierten Aptamere zu detektieren.

Beim 4-Elektrodensystem gibt es insgesamt vier Elektroden, wobei es sich zumeist um vier identische Elektroden handelt. Mit dieser Methode kann der Einfluss aller Elektroden und somit ebenfalls der Einfluss der Polarisation weitestgehend eliminiert werden. Bei dieser Messvariante wird detektiert, was in dem Medium zwischen den Elektroden durch das angelegte Feld passiert (zwischen B und D in Abbildung 2.20). Die Messung ist somit weitestgehend unab-

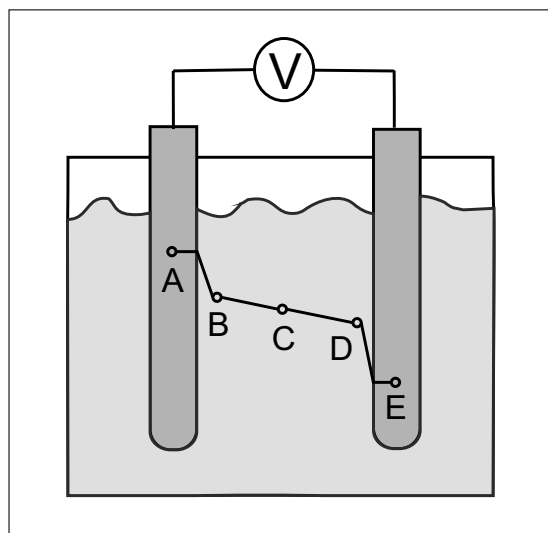


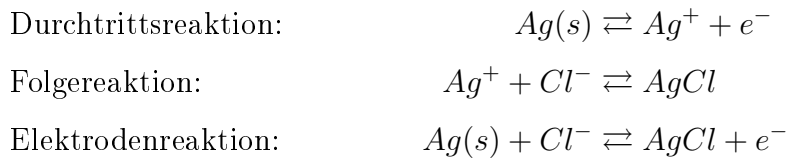
Abbildung 2.20: Potentialpunkte A bis E über eine elektrochemische Messzelle mit zwei Elektroden, an denen die Wechselspannung anliegt. Ein 2-Elektrodensystem misst den Spannungsfall zwischen Punkt A und E. Im Falle eines 3-Elektrodensystems befindet sich die Referenzelektrode am Punkt B, wodurch nur der Spannungsabfall zwischen Punkt A und B gemessen wird. Beim 4-Elektrodensystem befinden sich die inneren Elektroden an Punkt B und D und nur der Spannungsfall zwischen diesen beiden Punkten wird detektiert.

hängig von den Vorgängen an den Elektrodenoberflächen. Dieser Messaufbau wird bei der Messung der Leitfähigkeit von Medien verwendet, in sogenannten Konduktometern. Aber auch um Vorgänge an einer Membran zu messen, ist diese Messanordnung geeignet oder um den Wachstum von Mikroorganismen aufzunehmen, wobei sich der Widerstand der Lösung durch die Anreicherung von Stoffwechselprodukten ändert.

2.4.3 Referenzelektroden

Die Spannung kann nur als Differenz zwischen zwei Elektroden bestimmt werden. Referenzelektroden sind dabei Elektroden mit bekanntem Potential, das sich unter gegebenen Bedingungen schnell einstellt und konstant bleibt. Das Potential der Standardwasserstoffelektrode (SHE) wurde als 0 V definiert. Die Standardwasserstoffelektrode ist eine Platinelektrode, die in eine Lösung mit der Wasserstoffionenaktivität von 1 M getaucht und von Wasserstoff bei einem Druck von 1013 hPa umspült wird. Das Potential der anderen Referenzelektroden bezieht sich immer auf die SHE. Aufgrund des komplexen Aufbaus der SHE, werden in der Praxis zumeist Elektroden zweiter Art eingesetzt. Dabei handelt es sich um Elektroden aus Metallen und deren schwer löslichen Salzen. Die Metallionen in Lösung stehen mit dem Salz im Gleichgewicht, wobei das Anion des schwerlöslichen Salzes die Verbindung zur Testlösung bildet. Ändert sich die Konzentration des Anions in der Testlösung, so ändert sich die Konzentration des Salzes und somit ebenfalls die Konzentration des Metallions. Somit ist das Elektrodenpotential von der Konzentration des Anions abhängig. Das Prinzip wird im Folgenden anhand der Silber/ Silberchloridelektrode ($Ag/AgCl$) näher erläutert. Bei der $Ag/AgCl$ -Referenzelektrode laufen zwei Reaktionen an der Elektrodenoberfläche ab. Zum einen löst sich das Silber zu geringen Teilen bis zur Sättigung in der Lösung. Diese Reaktion bezeichnet man auch als Durchtrittsreaktion, da dabei ein Elektron an die Elektrode abgegeben wird. Als Folgereaktion reagieren die Silberionen Ag^+ mit dem Anion Cl^- der KCl -Lösung und fallen als schwer lösliches Silberchlorid $AgCl$ aus. Da diese Prozesse im Gleichgewicht stehen, laufen sie jeweils in beide Richtungen

ab. Aus den beiden Einzelreaktion ergibt sich die Elektrodenreaktion.



Die Durchtrittsreaktion ist eine Redoxreaktion, da Silber oxidiert bzw. Silberionen reduziert werden. Die Abhängigkeit des Elektrodenpotentials E von den Aktivitäten der Redoxpartner a_{Ox}/a_{Red} wird durch die Nernst-Gleichung beschrieben:

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}} \quad (2.9)$$

mit E_0 das Standardelektrodenpotential, R die Gaskonstante, T die Temperatur, F die Faradaykonstante, z die Anzahl der übertragenen Elektronen.

Da die Aktivität von Feststoffen 1 ist, ergibt sich für die Ag/AgCl-Elektrode folgende Gleichung:

$$E(\text{Ag}/\text{AgCl}) = E_0(\text{Ag}/\text{Ag}^+) + \frac{RT}{F} \cdot \ln a_{\text{Ag}^+} \quad (2.10)$$

Das Löslichkeitsprodukt für Silberchlorid entspricht:

$$K_L(\text{AgCl}) = \frac{a_{\text{Ag}^+} + a_{\text{Cl}^-}}{a_{\text{AgCl}}}$$

Daraus ergibt sich:

$$E(\text{Ag}/\text{AgCl}) = E_0(\text{Ag}/\text{Ag}^+) + \frac{RT}{F} \cdot \ln K_L - \frac{RT}{F} \cdot \ln a_{\text{Cl}^-} \quad (2.11)$$

Das Standardelektrodenpotential E_0 von Silber (Ag/Ag^+) beträgt entsprechend der elektrochemischen Spannungsreihe $+0,8 \text{ V}$. Das Löslichkeitsprodukt von Silberchlorid $K_L(\text{AgCl})$ ist $1,74 \cdot 10^{-10} \text{ mol}^2/\text{l}^2$. Bei 25°C und einer Aktivität der Chloridionen a_{Cl^-} von 1 ergibt sich ein Elektrodenpotential der Halbzelle $E(\text{Ag}/\text{AgCl})$ von:

$$E_0(\text{Ag}/\text{AgCl}) = +0,2223 \text{ V}$$

In einer 3 M KCl -Lösung beträgt das Halbzellenpotential $0,207 \text{ V}$, in einer gesättigten KCl -Lösung $0,197 \text{ V}$. Daran ist zu erkennen, wie stark das

Potential von der Konzentration der Chlorid-Ionen abhängt. Eine *Ag/AgCl*-Referenzelektrode besteht aus einem Gehäuse, das die Silber-/Silberchlorid-elektrode und die gesättigte *KCl*-Lösung umgibt, sowie einer Fritte, die die *KCl*-Lösung mit der Lösung in der Messkammer verbindet. Die Fritte kann aus unterschiedlichen Materialien bestehen, z.B. Keramik, Vycor oder Asbest. Sie sollte den Fluss der Cl^- -Ionen ermöglichen, um den Ausgleich des Potentials zu garantieren. Jedoch sollte die Fließrate so gering wie möglich sein, um die Kontamination der Messlösung zu vermeiden. Um eine hohe Qualität der Messung zu gewährleisten, sollte die Konzentration des Anions in der Testlösung möglichst konstant bleiben. Für Testlösungen mit sehr geringen Ionenkonzentrationen wird der Einsatz von Referenzelektroden mit doppelter Fritte zur Minimierung der Kontamination notwendig. Die Impedanz der Referenzelektrode sollte zudem möglichst klein sein, um eine Oszillation des Potentiostaten zu verhindern. Da die Impedanz steigt, je geringer die Fließrate ist, muss dementsprechend ein Kompromiss gefunden werden. Das Potential der Referenzelektrode muss regelmäßig überprüft werden, um Fehlfunktionen vorzubeugen. Für den in dieser Arbeit entwickelten Biosensor wurde das 3-Elektrodensystem mit einer *Ag/AgCl*-Referenzelektrode gewählt. Details zu der Referenzelektrode und deren Vermessung stehen im Abschnitt 4.3.1.

2.4.4 Messtechnik der Impedanzspektroskopie

Der stark vereinfachte Aufbau eines Potentiostaten für ein 3-Elektrodensystem ist in Abbildung 2.21 gezeigt. Mit dem Signalgenerator wird ein Wechselspannungssignal U_{ac} auf der Gleichspannung U_{dc} generiert und an der Gegenelektrode eingespeist. Dem Anschluss für die Referenzelektrode muss ein großer Eingangswiderstand Z_{in} vorgeschaltet sein, damit kein Strom über die Referenzelektrode fließt. Über einen Operationsverstärker wird das Potential an der Referenzelektrode mit der anliegenden Wechselspannung verglichen und über eine Rückkopplung korrigiert. Diese Korrektur findet permanent während der Messung statt. Der durch das System fließende Strom wird an der Arbeitselektrode indirekt durch den Spannungsabfall über einen Messwiderstand R_m gemessen. Die Wahl des R_m spielt für die Genauigkeit der Messung eine große Rolle, denn je näher R_m an der Impedanz des Systems, desto genauer die Messung des Stroms. Bei vielen Impedanzanalysatoren wird R_m während der

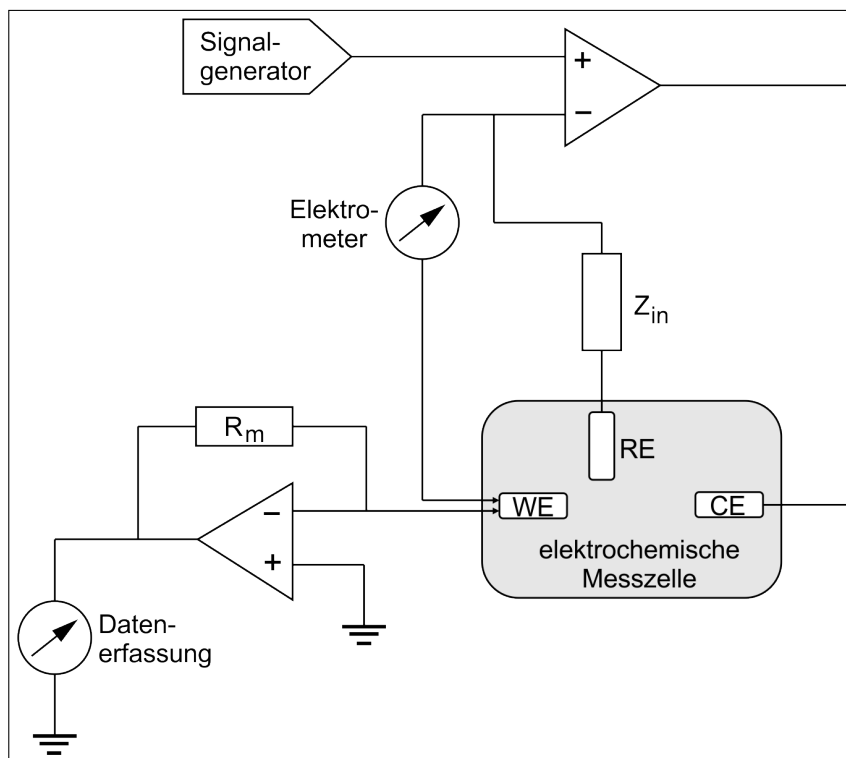


Abbildung 2.21: Vereinfachte Darstellung der Schaltung eines Potentiostaten für eine elektrochemische Messzelle mit einem 3-Elektrodensystem. WE = Arbeitselektrode, CE = Gegenelektrode, RE = Referenzelektrode, R_m = Messwiderstand. Eine genaue Beschreibung befindet sich im Text.

Messung umgeschaltet, um die Genauigkeit über den gesamten Frequenzbereich konstant zu halten. Abhängig vom verwendeten Frequenzbereich erhält man verschiedene Informationen über das System. Im Frequenzbereich von $10^2 - 10^{10}$ Hz werden Relaxationsmechanismen detektiert, d.h. die Bewegung von Ladungsträgern und Dipolen. Allgemein erhältliche Impedanzanalysatoren verfügen zumeist über einen Messbereich von 1 mHz bis 1 GHz.

Die Impedanz eines elektrochemischen Systems ist von der Temperatur abhängig und schon kleinste Änderungen der Temperatur können die Messung beeinflussen, daher müssen Impedanzmessungen entweder in temperierten Messzellen durchgeführt oder die gemessene Impedanz rechnerisch mit der gemessenen Temperatur korrigiert werden. Äußere elektrische und magnetische Felder können die Messung ebenfalls beeinflussen, daher ist abhängig von den vorhandenen Umgebungseinflüssen ggf. eine Abschirmung durch einen faradayschen Käfig erforderlich.

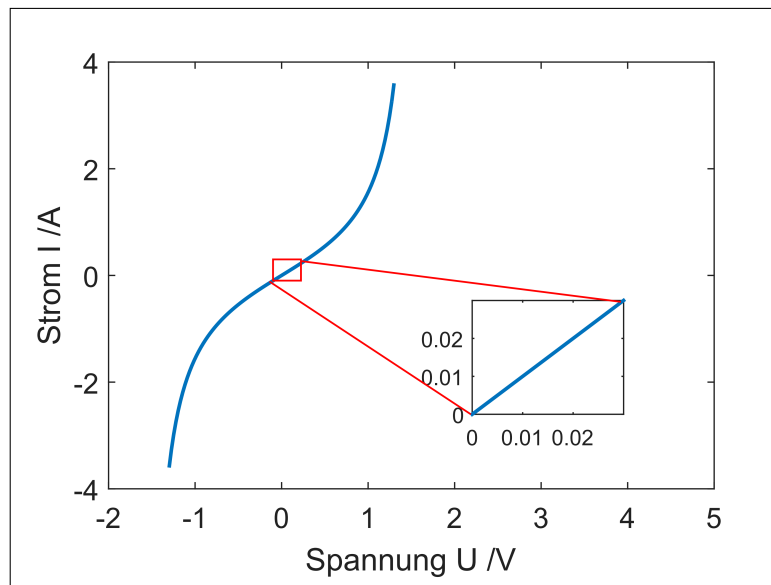


Abbildung 2.22: Strom-Spannungs-Kurve eines elektrochemischen Messsystems - Quasi-Linearität durch Anlegen kleiner Spannungen zur Einhaltung des Linearitätskriteriums.

2.4.5 Messdatenqualität

Für den Erfolg der Untersuchung ist eine hohe Qualität der Messdaten erforderlich. Die Qualität der Messdaten ist nicht nur vom Aufbau des Impedanzanalyzers und der elektrochemischen Messzelle, sondern vor allem vom Anwender abhängig. Um eine gute Qualität zu gewährleisten, müssen die Bedingungen der **Linearität**, **Stationarität** und **Kausalität** eingehalten werden.

Die **Linearität** bezieht sich auf den Verlauf der angelegten Spannung zum erhaltenen Stromsignal. Gegeneinander aufgetragen sollten diese eine lineare Abhängigkeit aufweisen. In elektrochemischen Zellen sind jedoch Abweichungen davon nicht zu vermeiden (siehe Abbildung 2.22). Um der Bedingung der Linearität zu entsprechen, wird daher in der Regel eine möglichst kleine Amplitude (1-30 mV) des Wechselspannungssignals gewählt und ein quasi-lineares Verhalten beobachtet. Die Einhaltung der Linearität und die optimalen Amplitude werden für den entwickelten impedimetrischen Aptasensor im Abschnitt 4.3.3 untersucht.

Mit **Kausalität** ist der direkte Zusammenhang des Messsignals mit dem Messstimulus gemeint, um die eindeutige Zuordnung eines angelegten Signals und einem beobachteten Signal und somit Rückschlüsse auf das Bindungsereignis zu gewährleisten.

Ein zu untersuchendes System ist stationär, wenn es sich im Gleichgewicht befindet. **Stationarität** setzt eine zeitliche Invarianz des Systems voraus, d.h. die Impedanz darf sich während der Messung nicht verändern. Dies kann bei elektrochemischen Systemen nur selten gewährleistet werden, da durch kleinste Veränderungen des Systems, z.B. durch Adsorption von Unreinheiten aus der Lösung an der Elektrodenoberfläche, Anreicherung von Produkten, Entstehung von Defekten in der Elektrodenbeschichtung oder lokalen Temperaturveränderungen, die Impedanz mit der Zeit driftet. Es ist allgemein anerkannt, dass die Bedingungen der Stationarität und Kausalität erfüllt sind, wenn der Drift signifikant langsamer ist als die Messung. Inzwischen gibt es auch zahlreiche Ansätze, die Drift mathematisch zu korrigieren [222]. Es sollte jedoch darauf geachtet werden, dass nach einer Veränderung des Systems, diesem genügend Zeit gegeben wird, ins chemische Gleichgewicht zurückzufinden bevor die Impedanz gemessen wird.

2.4.6 Ersatzschaltbilder und ihre Elemente

Die Impedanzmessdaten hoher Qualität werden als Bode- oder Nyquist-Diagramm dargestellt. Daraus kann abgelesen werden, welche Tendenz die Impedanz während des zu untersuchenden Prozesses zeigt. Zum Beispiel sinkt die Impedanz eines Elektrolyten bei der Zugabe von Kochsalz. Welche Prozesse jedoch am Abfall der Impedanz beteiligt sind, ist bei komplexen Systemen nicht zu erkennen. Eine Möglichkeit mehr Informationen aus den Impedanzdaten zu gewinnen, ist die Verwendung von Ersatzschaltbildern, die die Vorgänge im zu untersuchenden System beschreiben. Ersatzschaltbilder sind Schaltkreise aus elektrischen Bauelementen oder Äquivalenten, die die chemischen Prozesse repräsentieren. Die einfachste elektrochemische Messzelle besteht aus zwei Platin-Elektroden, die in einen Elektrolyten gehalten werden. Der Elektrolyt ist weniger leitfähig als die elektrischen Leitungen, daher stellt dieser einen Widerstand für den Strom dar, welcher als Lösungswiderstand R_{sol} bezeichnet wird. In einem Ersatzschaltbild kann also der Elektrolyt durch einen Widerstand repräsentiert werden. Die Eigenschaften eines Widerstandes sind bekannt, ebenso sein Verhalten. Die Impedanz eines Widerstandes ist unabhängig von der Frequenz und zeigt eine Phasenverschiebung von 0 (siehe

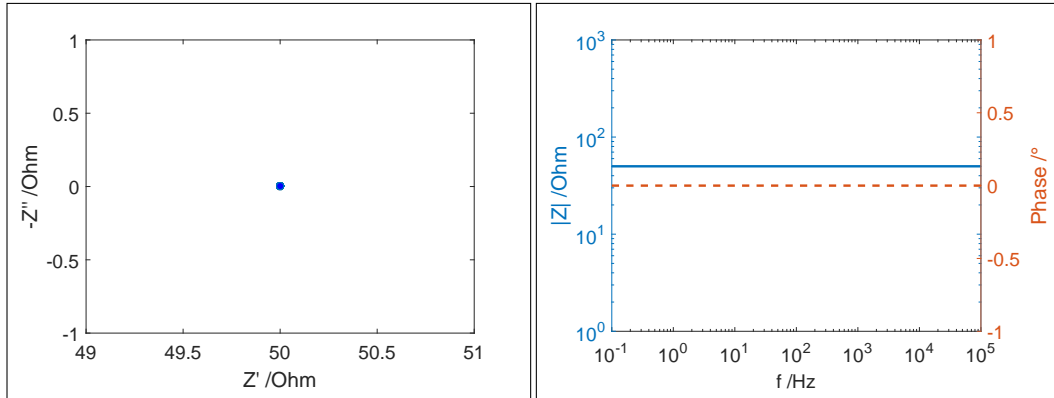


Abbildung 2.23: Impedanz eines Widerstandes (50Ω) dargestellt als Nyquist-Diagramm (links) und Bode-Diagramm (rechts)

Abbildung 2.23). Daher ist die Impedanz gleich dem Wert des Widerstandes:

$$Z_R = R_{sol} \quad (2.12)$$

Der Wert des Lösungswiderstandes R_{sol} ist abhängig von der spezifischen Leitfähigkeit des Elektrolyten κ und der Zellkonstanten k der Messzelle. Die Zellkonstante definiert sich durch den Quotienten aus Länge l und Querschnittsfläche A des Leitungskanals.

$$R_{sol} = \frac{k}{\kappa} \quad k = \frac{l}{A} \quad (2.13)$$

Sind diese Werte bekannt, so kann der Widerstand und dessen Impedanz berechnet werden. Umgekehrt kann aus der gemessenen Impedanz der Widerstand und bei bekannter Zellkonstante die Leitfähigkeit des Elektrolyten bestimmt werden. Dieses Prinzip nutzen Konduktometer, um mit einem 4-Elektrodensystem die Leitfähigkeit von Lösungen zu bestimmen.

Ein elektrochemisches System bestehend aus nur zwei Elektroden in einer Elektrolytlösung besteht jedoch nicht nur aus einem Widerstand. Durch die angelegte Wechselspannung entsteht ein elektrisches Feld, in dem sich die Ladungsträger des Elektrolyten, die Ionen, ausrichten und zur Elektrode mit gegensätzlicher Ladung bewegen, wodurch sich an der Elektrodenoberfläche eine Schicht von Ionen bildet. Dieses Phänomen bezeichnet man als Doppelschicht. Die Schicht nahe der Elektrode wird als starr angesehen und durch das

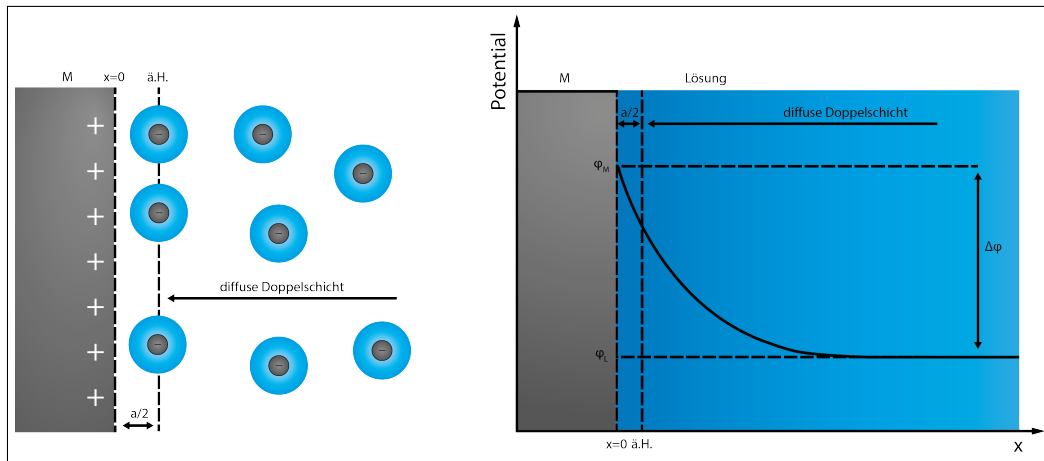


Abbildung 2.24: Doppelschicht an einer Elektrode (M) in einer Elektrolytlösung entsprechend dem Sternmodell zusammengesetzt aus einer starren Doppelschicht (ä.H. = äußere Helmholtz-Schicht), in der das Potential φ linear mit zunehmender Distanz x von der Elektrode abfällt, und einer diffusen Doppelschicht, in der das Potential exponentiell abfällt. φ_L = Potential der Lösung, φ_M = Potential der Elektrode, $a/2$ = Radius der solvatisierten Überschuss Ionen [Abbildung: Gouy-Chapman Modell.png von Marvin Radke, Lizenz: CC-BY-SA-4.0, [URL](#)]

Helmholtz-Modell beschrieben, wonach das Potential in dieser Schicht linear mit der Distanz x zur Elektrode abfällt (siehe Abbildung 2.24). Die Helmholtz-Schicht ist typischerweise einige Zehntel Nanometer (\AA) dick. Die Bildung von zwei parallelen Schichten gegensätzlicher Ladung entspricht dem Prinzip eines Kondensators. Die Kapazität eines Plattenkondensators berechnet sich aus dem Produkt von der Permittivität im Vakuum ε_0 , der relativen Permittivität des Elektrolyten ε_r und der Fläche A geteilt durch den Abstand d zwischen den Schichten:

$$C_H = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r A}{d} \quad (2.14)$$

Hinter der starren Helmholtz-Schicht werden weiterhin Ionen durch die Elektrode angezogen. Durch Konvektion und Migration wird diese Schicht mit zunehmender Entfernung von der Elektrode diffuser. Die diffuse Schicht wird durch das Gouy-Chapman-Modell beschrieben, wobei hier das Potential exponentiell mit der Entfernung x von der Elektrode abfällt. Die differentielle Doppelschichtkapazität der diffusen Schicht berechnet sich nach der Gouy-Chapman-Gleichung:

$$C_G = zF \sqrt{\frac{2\varepsilon c}{RT}} \cosh\left(\frac{zF(\varphi - \varphi_0)}{2RT}\right) \quad (2.15)$$

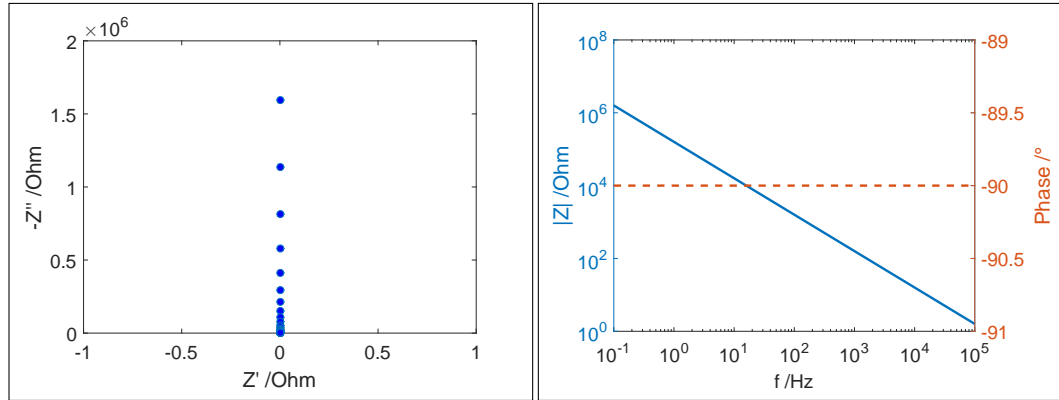


Abbildung 2.25: Impedanz einer Kapazität ($1 \mu F$) dargestellt als Nyquist-Diagramm (links) und Bode-Diagramm (rechts)

mit z = Ladungszahl, F = Faradaykonstante, ε = Permittivität des Elektrolyten = $\varepsilon_0 \varepsilon_r$, c = Konzentration der Ladungsträger im Elektrolyten, R = universelle Gaskonstante, T = Temperatur, φ = Potential der Elektrode, φ_0 = Nullladungspotential.

C_G ist im Gegensatz zu C_H von der Elektrolytkonzentration und der Temperatur abhängig. Das Gouy-Chapman-Modell allein versagt jedoch bei hohen Elektrolytkonzentrationen (>1 mM). Das Stern-Modell vereint daher das Helmholtz- und das Gouy-Chapman-Modell:

$$\frac{1}{C_S} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_G} \quad (2.16)$$

Die Impedanz eines Kondensators ist von der Frequenz abhängig und hat einen Phasenwinkel von -90° , wie in Abbildung 2.25 dargestellt. Sie wird durch folgende Gleichung repräsentiert:

$$Z_C = \frac{1}{jC\omega} \quad (2.17)$$

Das Ersatzschaltbild für zwei Platinelektroden in einer Elektrolytlösung wird durch zwei Kondensatoren in Reihe mit einem Widerstand beschrieben. Sind die beiden Platinelektroden identisch, so können die beiden Kondensatoren zu einem zusammengefasst werden. Auch bei der Messung mit einer Referenzelektrode kann die Kapazität der Gegenelektrode vernachlässigt werden:



In elektrochemischen Systemen mit Pufferlösungen werden im Allgemeinen keine Elektronen von der Elektrode auf die Lösung übertragen und die Impedanz nimmt bei kleinen Frequenzen große Werte an. Der Großteil der Impedanz wird durch den Elektrolyten bestimmt. Um Informationen über die Vorgänge an einer Elektrodenoberfläche zu erhalten, wird auf sogenannte Redoxmediatoren zurückgegriffen, die den Transfer erleichtern und die Impedanz senken. Redoxmediatoren wurden bei der Entwicklung von enzymatischen Biosensoren eingesetzt, da Enzyme oftmals durch die Nähe zur Elektrodenoberfläche an Aktivität verlieren. Daher wurden die Enzyme mit ausreichend Abstand zur Elektrode immobilisiert und Mediatoren zum Transfer der Elektronen zwischen Elektrode und Enzym eingesetzt. Heutzutage spielen Redoxmediatoren in vielen Bereichen eine große Rolle, wie z.B. in Klärwerken zur Entfernung von organischen Kontaminationen [223], in Biokraftstoffzellen [224] oder in Batterien. Mithilfe von Redoxmediatoren kann man die Impedanz eines Systems auf den Bereich mit der höchsten Sensitivität des Messgerätes einstellen. Typische Redoxmediatoren haben eine hohe Aktivität, d.h. eine hohe heterogene Elektronentransferkonstante (k_0) und eine hohe Diffusivität, d.h. hohe Diffusionskonstanten ($D_{\text{ox/red}}$). Ein Redoxmediator kann sowohl Elektronen von der Elektrode aufnehmen als auch an diese abgeben. Der zumeist in der Elektrochemie verwendete Redoxmediator ist Hexacyanoferrat (Abbildung 2.26), ein chemischer Komplex, in dessen Mitte ein Eisenatom gebunden ist und der zwei Oxidations-Zustände annehmen kann, 3- und 4-. Der Transfer von einem Zustand in den anderen geschieht sehr schnell ($k_0 \sim 0,1 \text{ cm/s}$ [225]). Ein weiterer Vorteil der Nutzung von Redoxmediatoren ist, dass sich das Gleichgewicht des Systems schnell einstellt. Im Gleichgewicht ist die Bedingung der Stationarität erfüllt. In dieser Arbeit wurde der Redoxmediator Kaliumhexacyanoferrat ($\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) verwendet, um den Ladungstransfer in der Messzelle zu ermöglichen und somit die Vorgänge an der Elektrodenoberfläche untersuchen zu können.

Findet in dem elektrochemischen Messsystem ein Transfer von Ladung zwischen Elektrolyt und Elektrode statt, so muss eine faradaysche Impedanz dem

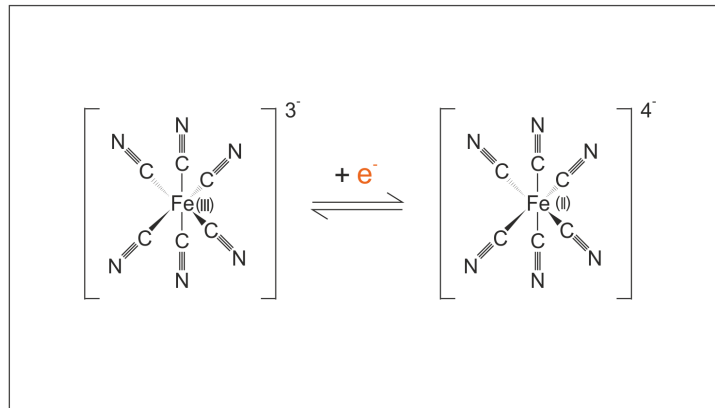


Abbildung 2.26: Das Redoxsystem von Hexacyanoferrat

Ersatzschaltbild hinzugefügt werden. Die faradaysche Impedanz besteht aus einem Ladungstransferwiderstand (R_{ct}) und einer Warburg-Impedanz (W). Der Ladungstransfer zum Elektrolyten ist langsamer als der im elektrischen Leiter und stellt somit einen zusätzlichen Widerstand dar. Die Impedanz des R_{ct} ist unabhängig von der Frequenz und zeigt keine Phasenverschiebung:

$$Z_{ct} = R_{ct} \quad (2.18)$$

Zur Ermöglichung des Ladungstransfers müssen die Ladungsträger zur Elektrodenoberfläche diffundieren, meist durch die Doppelschicht hindurch, ein Prozess, der deutlicher langsamer ist als der Ladungstransfer. Diese Diffusion von Ladungsträgern wird durch die Warburg-Impedanz beschrieben [226]. Die Warburg-Impedanz hat eine konstante Phase von 45° , die unabhängig von der Frequenz ist, jedoch ist der Impedanzbetrag invers proportional zur Wurzel der Frequenz. Unter der Voraussetzung einer ungehinderten Diffusion zu einer großen planaren Elektrodenoberfläche wird die Warburg-Impedanz mit folgender Gleichung definiert:

$$Z_W = \frac{A_w}{\sqrt{\omega}} - j \frac{A_w}{\sqrt{\omega}} \quad (2.19)$$

wobei A_w der Warburgkoeffizient, j die imaginäre Zahl $\sqrt{-1}$ und ω die Kreisfrequenz $2\pi f$ sind.

Ohne die Diffusion der Ladungsträger findet kein Ladungstransfer statt, somit sind diese beiden Elemente in Reihe geschaltet. Die faradaysche Impedanz

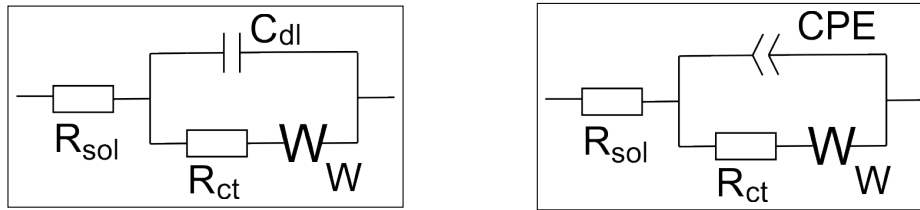


Abbildung 2.27: Ersatzschaltbilder - links: das Randles Ersatzschaltbild beschreibt ein elektrochemisches System bestehend aus einer Elektrode in einer Elektrolytlösung mit Elektronentransfer (faradaysche Impedanz); rechts: das modifizierte Randles Ersatzschaltbild beschreibt ein elektrochemisches System bestehend aus einer polykristallinen Elektrode in einer Elektrolytlösung mit Elektronentransfer (faradaysche Impedanz)

Z_f wird wie folgt definiert:

$$Z_f = Z_{ct} + Z_W \quad (2.20)$$

Dagegen finden der Ladungstransfer und die Bildung der Doppelschicht parallel statt, wobei der Strom entweder über die Ladungsträger oder die Doppelschicht fließen kann. Daher sind der Kondensator und die faradaysche Impedanz im Ersatzschaltbild parallel angeordnet. Das Ersatzschaltbild für eine elektrochemische Messzelle mit zwei Elektroden in einer Elektrolytlösung mit vorhandenem Elektronentransfer ist in Abbildung 2.27 dargestellt und wird nach seinem Entdecker „Randles circuit“ genannt [227].

Dabei entspricht R_{sol} dem Lösungswiderstand des Elektrolyten, C_{dl} der Doppelschichtkapazität repräsentiert durch einen Kondensator, R_{ct} dem Ladungstransferwiderstand und W ist die Warburg-Impedanz, die die Diffusion der Ladungsträger zur Elektrode beschreibt.

Mikroskopisch betrachtet sind die Oberflächen der Elektroden in realen elektrochemischen Messzellen eher rau (z.B. durch Polykristallinität), d.h. die Schichtdicke der aufgetragenen leitenden Schicht (z.B. Gold) variiert, das elektrische Feld ist nicht durchgehend homogen und strukturierte Elektroden zeigen sogenannte Randeffekte. All dies führt zur Abweichung vom idealen Verhalten eines Kondensators, daher wird die Doppelschichtkapazität in der Praxis durch ein Konstantphasenelement (CPE) ersetzt. Die Impedanz des CPE ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Q(j\omega)^n} \quad (2.21)$$

Wie der Kondensator, weist das CPE eine von der Frequenz unabhängige Phase auf, jedoch beträgt diese ($n \cdot 90^\circ$), wobei n als Faktor für die Inhomogenität angesehen werden kann. Je größer die Abweichung vom idealen Verhalten, desto kleiner ist n ($0 > n > 1$). Die Warburg-Impedanz ist eine besondere Form des CPE mit $n=0,5$.

Bei der Verwendung einer polykristallinen Arbeitselektrode wird das Randles Ersatzschaltbild angepasst und der Kondensator C_{dl} durch ein CPE ersetzt (siehe Abbildung 2.27).

2.4.7 Kurvenanpassung und Modelle

Um aus den Impedanzmessdaten mithilfe der entwickelten Ersatzschaltbilder Informationen zu gewinnen, müssen diese mittels nicht-linearer Kurvenanpassung extrahiert werden. Dieser Vorgang wird auch als "Fitten" bezeichnet. Dabei wird eine nicht-lineare Regression der aus dem Ersatzschaltbild und den vorgegebenen Startwerten berechneten Impedanz an die gemessene Impedanz für das ganze Frequenzspektrum durchführt. Die Werte werden solange angepasst, bis ein Minimum der Abweichungsquadrate erreicht wird. Es gibt verschiedene Algorithmen, wobei Levenberg-Marquardt [228] wohl der bekannteste ist. Bei dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus besteht die Gefahr an einem lokalen Minimum hängen zu bleiben, daher wurde für das Fitten der Impedanzspektren in dieser Arbeit der Downhill-Simplex-Algorithmus [229] verwendet.

Die Wahl eines Ersatzschaltbildes für das zu untersuchende System ist un-
abdingbar, um an die gesuchten Informationen zu gelangen. Die Wahl eines falschen Ersatzschaltbildes kann zu falschen Informationen führen. Ein zu komplexes Ersatzschaltbild hat zu viele Freiheitsgrade und erschwert das Finden eines Minimums. Daher ist ein Verständnis der Vorgänge in der Messzelle auf molekularer Ebene von großer Bedeutung.

Als Maß für die Passfähigkeit des gewählten Ersatzschaltbildes kann zum Einen die Größe der Abweichungsquadrate (angegeben als die Güte des Fits χ^2) herangezogen werden. Allerdings ist dies kein Maß für die Richtigkeit des Ersatzschaltbildes, denn zwei verschiedene Ersatzschaltbilder können das gleiche Impedanzspektrum repräsentieren.

Eine andere Möglichkeit, Informationen aus den gemessenen Impedanzda-

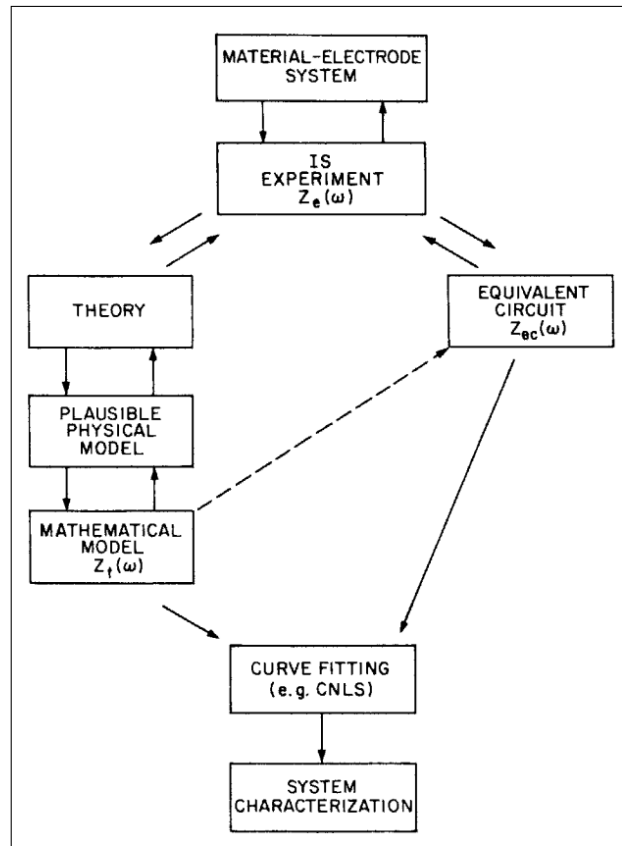


Abbildung 2.28: Ablauf der Analyse eines Impedanzexperimentes mit den zwei möglichen Wegen über die Erarbeitung eines Ersatzschaltbildes und dem Fitten der Impedanzspektren oder der Erstellung eines physikalischen Modells. Reproduziert aus [97] [Seite 10] mit Erlaubnis von John Wiley and Sons.

ten zu gewinnen, ist die Erstellung eines mathematischen Modells (siehe Abbildung 2.28). Die anhand des Modells berechnete Impedanz kann dann mit der gemessenen Impedanz verglichen werden. Der Vorteil eines physikalischen Modells ist, dass nicht die einzelnen Parameter des Ersatzschaltbildes sondern auch die darunter liegenden Parameter wie Temperatur, Diffusionskonstanten, etc. betrachtet werden können.

In dieser Arbeit wurde eine gemischte Vorgehensweise gewählt. Als erstes wurde anhand der auftretenden Prozesse in der elektrochemischen Messzelle ein Ersatzschaltbild erarbeitet. Das Fitten der Impedanzspektren mit dem Ersatzschaltbild gibt wichtige Hinweise dazu, welche Prozesse für den Bindungsprozess relevant sind und welche Parameter von der Konzentration des Analyten abhängen. Dann wurde basierend auf diesem Ersatzschaltbild ein

physikalisches Modell erstellt. Mit dem physikalischen Modell kann untersucht werden, welche physikalischen Größen die Impedanzänderung repräsentieren und somit für die Bindung von *S. aureus* an die immobilisierten Aptamere relevant sind. Durch diese Kombination können Informationen über die Vorgänge an der Elektrodenoberfläche gewonnen werden. Dafür sind fundamentale Kenntnisse der elektrochemischen Prozesse in der Messzelle als auch den zugrunde liegenden physikalischen Prinzipien notwendig. Die Erarbeitung des physikalischen Modells wird in Abschnitt 4.5 beschrieben.

2.4.8 Impedimetrische Biosensoren zur Detektion von *S. aureus*

Die EIS ist bereits in zahlreichen Forschungslaboren etabliert und wird für die Charakterisierung der elektrochemischen Material- und Systemeigenschaften genutzt. Auch in der Industrie findet die EIS bereits Anwendung, wie zum Beispiel zur Bestimmung des Ladungszustandes von Batterien [230], der Überprüfung der Qualität von Beschichtungen [231] oder die Detektion von Korrosionsstellen [232]. In der Petrochemie als auch in der Lebensmittelindustrie wird die Impedanzspektroskopie zur Charakterisierung von Emulsionen verwendet, zur Bestimmung des Wassergehalts von Petroleum [233] bzw. des Gefrierpunktes von Eiskremmischungen [234]. Weiterhin wird sie genutzt, um die Qualität von Fleisch zu beurteilen [235] oder den Gehalt von freien Fettsäuren in Olivenöl zu bestimmen [236]. In der medizinischen Diagnostik wird die EIS als Bioimpedanz bezeichnet und unter anderem zur Bestimmung des Körperfetts [237] und zur Diagnose von Brustkrebs verwendet [238, 239].

Im Bereich der Biosensorik ist die EIS vielversprechend, vor allem, da im Gegensatz zu den weit verbreiteten optischen Methoden mit der EIS markierungsfrei gemessen werden kann. Das Review von Bahadir et al. [240] zeigt zahlreiche erfolgreiche Umsetzungen von impedimetrischen Biosensoren, die vor allem durch ihre kurzen Analysezeiten hervorstechen, aber ebenso hohe Sensivitäten (μM bis aM) und gute Reproduzierbarkeit aufweisen. Obwohl das Review keine Biosensoren für *S. aureus* enthält, zeigt es den Erfolg der EIS in der Biosensorik. Die Publikation von Wang et al. überblickt impedimetrische Biosensoren für den Nachweis von Pathogenen in Lebensmitteln [241].

Tabelle 2.8: Eine Auswahl an impedimetrischen Biosensoren für die Detektion von *S. aureus*

Analyt	Erkennungselement	Assaydauer	LoD /KbE * ml ⁻¹	Realproben	Referenz
<i>S. aureus</i>	Peptide	30 min	100	Wasser	[242]
<i>S. aureus</i>	Antikörper	1-2 h	100	-	[243]
<i>S. aureus</i>	Antikörper	-	10	-	[244]
<i>S. aureus</i>	Antikörper	-	10	-	[245]
<i>S. aureus</i>	Antikörper	-	4,4	-	[246]
<i>staphylococcal</i> enterotoxin B	Aptamer	100 min	6 pM	Milch	[247]
<i>S. aureus</i>	Aptamer	1 h	10	Fisch, Wasser	[248]

Auch hier werden die bereits erwähnten Vorteile von impedimetrischen Biosensoren ersichtlich, erweitert um die mögliche Miniaturisierung des Messaufbaus. Das Review von Wang et al. enthält ein Beispiel für das Pathogen *S. aureus*, welches in diesem Abschnitt neben ein paar weiteren impedimetrischen Biosensoren für die Detektion von *S. aureus* näher erläutert wird (siehe Tabelle 2.8).

Liu et al. [242] beschreiben einen impedimetrischen Biosensor basierend auf synthetischen Peptiden (sAMPs), die für ihre antibakterielle Wirkung auf verschiedene Bakterien bekannt sind und die minimale Hemmkonzentrationen von 5-20 μM aufweisen. Liu et al. zeigen, dass diese Peptide als biologische Erkennungselemente in Biosensoren verwendet werden können. Dazu wurde der Peptidsequenz ein Cystein zur Immobilisierung auf Gold und drei Glycine als Spacer angehängt. Die Bindung von vier verschiedenen Bakterienarten, darunter *S. aureus*, wurde mit der EIS untersucht, wobei ein Detektionslimit von 100 KbE per ml in Tris-HCl-Puffer bestimmt wurde. Sowohl tote als auch lebende Bakterien zeigten einen Anstieg der Impedanz, wobei der Anstieg bei toten Zellen geringer war, was darauf hinweist, dass die sAMPs an Membranstrukturen binden. Eventuell könnte durch die Modifikation der Peptidsequenz eine Spezifität für eine Bakterienart erzeugt werden, was den Sensor durch seine kurze Analysezeit von 30 Minuten zu einer möglichen Alternative für die kostengünstige Detektion von *S. aureus* machen würde.

Obwohl der von Liu et al. beschriebene Sensor nur 100 μl Probenvolumen benötigt, hat die Entwicklung einer Mikrofluidik gewisse Vorteile für die späte-

re Anwendung, wie zum Beispiel die einfache Automatisierung des Prozesses. Solch ein mikrofluidischer Biosensor mit einer nanoporösen Aluminiumoxidmembran modifiziert mit spezifischen Antikörpern zur Detektion von *E. coli* und *S. aureus* wurde von Tan et al. entwickelt [243]. Die Antikörper wurden mittels eines Silans auf der Membran immobilisiert und anschließend mit der Probe inkubiert, bis sich nach 1-2 h ein Gleichgewicht eingestellt hat. Die Messung der Impedanz ergab ein Detektionslimit von 100 KbE/ml. Die Vorteile der Mikrofluidik gleichen sich mit den Nachteilen der langen Inkubationszeit und der geringen Sensitivität aus.

Ein weiterer Immunosensor mit einem Detektionslimit von 10 KbE/ml in PBS wurde von Braiek et al. entwickelt [244]. Der Sensor zeichnet sich durch seinen simplen Aufbau aus, bei dem eine Goldelektrode zuerst mit Merkapto-propionsäure (MPA) und anschließend mit dem Antikörper über die mittels EDC/NHS aktivierten Carboxylgruppen modifiziert wurde. Verschiedene Bakterienkonzentrationen in PBS wurden mit der EIS vermessen in Anwesenheit von 8 mM Kaliumhexacyanoferrat als Redoxmediator. Der Nachteil hierin liegt in der Verwendung einer Standardmesszelle, die keine Mikrofluidik beinhaltet und bei der 20 ml bis 50 ml Probenvolumen benötigt werden. Dafür zeigten die Messwerte eine gute Reproduzierbarkeit mit einer durchschnittlichen Standardabweichung von 8%.

Während Braiek et al. mit Merkapto-propionsäure (MPA) eine sehr dünne SAM verwendet und somit Impedanzmesswerte im Bereich von 200 Ω bis 1 k Ω erhalten hat, wurde bei Bekir et al. [245] die Goldelektrode mit einer SAM aus Merkaptohexadecansäure modifiziert, wodurch Impedanzen von 50 k Ω bis 100 k Ω gemessen wurden. Die höheren Impedanzen sind ebenfalls durch die geringere Konzentration des Redoxmediators $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ von 5 mM bedingt. Der spezifische Antikörper wurde ebenfalls durch EDC/NHS-Aktivierung auf der Elektrode immobilisiert und es konnte ein Detektionslimit von 10 KbE/ml bestimmt werden. Jedoch ist bei diesem Sensor der Bogen im Nyquistdiagramm nicht komplett und somit die Bestimmung des Transferwiderstandes mit einer höheren Standardabweichung verbunden.

Als letzter Immunosensor sei die Publikation von Wu et al. genannt [246]. Hierin wurde der Antikörper auf ein Nanokomposit aus reduziertem Graphen und Kupfer Cu(II) mittels EDC/NHS-Aktivierung immobilisiert. Die Impe-

danzmessung erfolgte in PBS mit 5 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ und es wurden keine Wiederholungsmessungen durchgeführt. Die Untersuchungen ergaben, dass kein signifikanter Unterschied in der Impedanz von normalen zu gestressten *S. aureus* vorliegt und ein Detektionslimit von 4,4 KbE/ml erreicht werden konnte. Die Spezifität des impedimetrischen Immunosensors wurde nicht untersucht.

Neben den impedimetrischen Immunosensoren wurden während der Literaturrecherche bis einschließlich Juli 2018 nur zwei Publikationen zu impedimetrischen Aptasensoren zur Detektion von *S. aureus* bzw. dessen Toxin gefunden. Xiong et al. beschreiben die Detektion von *staphylococcal* enterotoxin B (SEB) [247] mit thiol-modifizierten Aptameren immobilisiert auf Goldelektroden und geblockt mit Merkcaptohexanol. Bei der Anbindung von SEB an die Elektrodenoberfläche wird der Ladungstransfer des Redoxmediators $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ behindert und die Impedanz steigt. Damit konnte ein Detektionslimit von 0,17 ng/ml innerhalb von 100 Minuten erreicht werden. Trotz recht langer Analysezeit weist der Sensor eine hervorragende Spezifität auf und gespikte Milch-, Milchpulver- und Reispulverproben zeigten Wiederfindungsraten von 77-118,6%, wobei die Abweichung der Messwerte zu einem Standard-ELISA weniger als 10% betragen.

Jia et al. beschreiben einen impedimetrischen Aptasensor zur Detektion von *S. aureus* basierend auf einem Nanokomposit aus reduziertem Graphenoxid und Goldnanopartikeln [248]. Das darin verwendete Aptamer SA43 wurde von Cao et al. [189] mittels des Zell-SELEX entwickelt. Das thiolmodifizierte Aptamer wurde über die Mercaptidbindung auf die Goldnanopartikel auf der Graphenoxidelektrode immobilisiert und mit Mercaptoethanol geblockt (Abbildung 2.29). Die Impedanzmessung ergab ein Detektionslimit von 10 KbE per ml bei einer Analysezeit von 1 h. Sieben verschiedene aptamer-modifizierte Elektroden wurden unter gleichen Bedingungen hergestellt und vermessen, wodurch sich eine relative Standardabweichung von 4,3% errechnen lies. Fisch- und Wasserproben wurden mit *S. aureus* gespikt und mit dem beschriebenen Aptasensor vermessen, wobei Wiederfindungsraten von 92-114% erreicht wurden. Für den Nachweis von *S. aureus* in Lebensmitteln ist ein Detektionslimit von 10^4 KbE/g Lebensmittel notwendig und somit eine kostengünstigere und weniger aufwendige Oberflächenmodifizierung vorteilhaft. Zudem ist bei dem

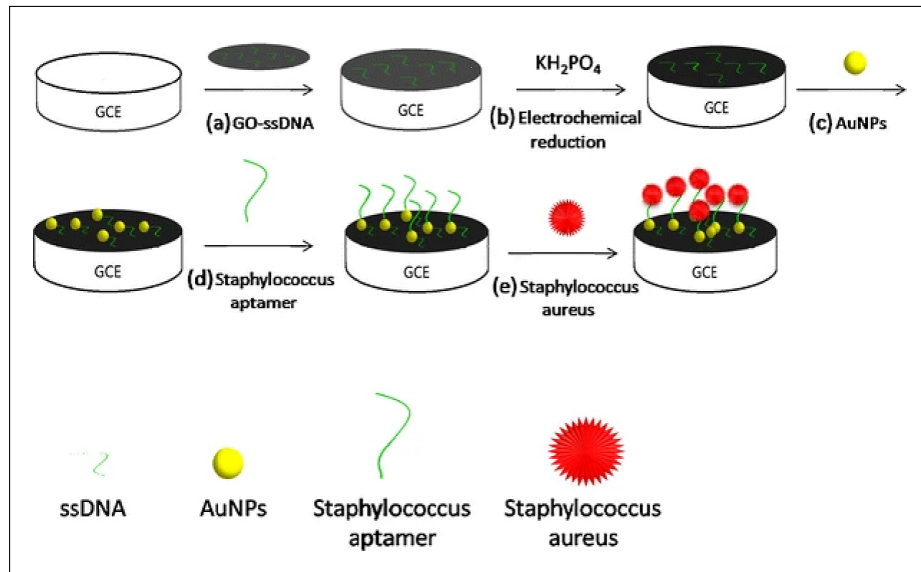


Abbildung 2.29: Impedimetrischer Aptasensor zur Detektion von *S. aureus* - Glaskohlenstoffelektroden wurden mit Graphenoxid und Goldnanopartikeln modifiziert. Die *S. aureus*-bindenden Aptamere wurden an die Goldnanopartikel immobilisiert. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen wurde die restliche Fläche mit Mercaptoethanol geblockt. Die Bindung von *S. aureus* verursachte einen Anstieg der Impedanz. Reproduziert aus [248] mit Erlaubnis von Springer Nature.

per Zell-SELEX entwickelten Aptamer unbekannt, welche Moleküle gebunden werden. Es konnte die Selektivität des Aptasensors für *S. aureus* gegenüber *E. coli* und eine nicht definierte Art von Salmonellen gezeigt werden. Jedoch sollte dieser Test für ähnlichere Spezies wie z.B. *S. epidermidis* wiederholt werden.

Im Allgemeinen erreichen impedimetrische Biosensoren für den Nachweis von *S. aureus* ein Nachweislimit von <100 KfE/ml. Sie haben kurze Messzeiten, weisen aber ein Mangel an der Validierung mittels Realproben auf.

2.5 Schlussfolgerungen

Die Literaturrecherche in allen Teilbereichen zeigt, dass es bereits zahlreiche Publikationen über die Entwicklung von Biosensoren für die Detektion von *S. aureus* gibt. Am häufigsten sind optische und elektrochemische Transducer vertreten. Als häufigstes Erkennungselement werden Antikörper verwendet, gefolgt von Oligonukleotid-basierten Ansätzen. Auch Aptamere sind be-

reits als Erkennungselement etabliert, aber es gibt nur einen impedimetrischen Aptasensor zur Detektion von *S. aureus* (Jia et al. 2014 [248]). Die unteren Nachweisgrenzen (LoD) der entwickelten Biosensoren reichen von 1 KbE/ml bis $5 \cdot 10^6$ KbE/ml, wobei elektrochemische Biosensoren im Allgemeinen höhere Sensitivitäten aufweisen als optische. Zwei elektrochemische Biosensoren erreichten die Nachweisgrenze von einer einzigen Zelle pro ml und zwar zum einen der amperometrische Immunosensor von de Ávila et al. [124] und der potentiometrische Aptasensor von Hernández et al. [220]. Bei den meisten Biosensoren wurde die Evaluierung mit Realproben entweder ganz weggelassen oder mit gespikten Lebensmitteln wie z.B. Milch oder Fleisch durchgeführt. Dies liegt vermutlich an dem begrenzten Zugang zu medizinischen Realproben, der nötigen Laborausstattung oder dem teuren Transport dieser Pathogene der Risikogruppe 2. Bei den Aptasensoren ist der Großteil der Realproben Wasser, was vermutlich auf die Anforderung an pH, Ionenaktivität und Temperatur für die korrekte Faltung zurückzuführen ist, dessen Prozess noch nicht ausreichend erforscht wurde. Besonders erwähnenswert ist daher der auf Fluoreszenz basierende Aptasensor entwickelt von Borsa et al. [218], bei dem mit *S. aureus* gespikte Vollblutproben gemessen wurden und ein Detektionslimit von 682 KbE/ml erreicht werden konnte. Dabei wurden Aptamer-modifizierte Magnetnanopartikel und sogenannte Nanokeepers hergestellt, was allerdings ein komplexer und teurer Prozess ist.

Es stellt sich die Frage, warum bei so zahlreichen Biosensorentwicklungen, kaum kommerzielle Produkte verfügbar sind. Zum einen liegt dies vermutlich an der teuren Messtechnik, da es an miniaturisierten günstigen optischen oder elektrochemischen Systemen fehlt. Andererseits sind die entwickelten Biosensoren oft zu komplex, um die Methodik in kurzer Zeit nachzubilden. Als letzten Punkt sei das fehlende Wissen genannt, d.h. viele der entwickelten elektrochemischen Biosensoren bieten keine Modellierung der Methodik, mit denen man theoretische Berechnungen durchführen könnte. Vor allem bei impedimetrischen Biosensoren wird meist nur die Änderung der Gesamtimpedanz betrachtet und selten der Einfluss der einzelnen Prozesse bzw. Ersatzschaltbildelemente diskutiert.

Daher soll in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mit dem richtigen Design schon einfach aufgebaute Biosensoren hohe Sensitivitäten erreichen können und

dass durch die geringe Komplexität eine Modellierung des Prozesses möglich ist. Die Modellierung ermöglicht die Optimierung neuer Sensorentwicklungen und die Übertragung des Prozesses auf andere Aptamer-Analyt-Paare.

Kapitel 3

Material und Methoden

In diesem Kapitel werden alle verwendeten Materialien, Chemikalien, Reagenzien und Geräte aufgelistet sowie die verwendeten Methoden beschrieben. Diese Arbeit wurde mit MiKTeX 2.9 erstellt und alle Graphen wurden mit Sigmaplot 12.5 angefertigt, während die Schemata mit CorelDraw X5 gezeichnet wurden.

3.1 Materialien

In Tabelle 3.1 werden alle verwendeten Geräte, Materialien und Software aufgelistet, während in Tabelle 3.2 die verwendeten Chemikalien und Reagenzien aufgelistet sind. Alle Reagenzien waren analysenrein und wurden wie erhalten verwendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 3.3 dargestellt. Alle Lösungen wurden mit Wasser angesetzt, das mit einem Milli-Q Typ-1-System (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA; 18 M Ω cm) gefiltert wurde. Protein A wurde direkt in BB mit 0,005% Tween 20 gelöst und für die Versuche in BB verdünnt.

Tabelle 3.1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Materialien und Software sowie deren Bezugsquelle

Gegenstand	Produktname	Hersteller
Silikonkleber	Silicone Rubber Compound Rs 692-542	Rs components Ltd, UK
Platindraht	$\varnothing = 0,5$ mm, 99,9% Reinheit	-
Goldelektrode	TA134-(Ti/Au)	EMF Corporation, Ithaca, NY, USA
Ag/AgCl-Referenzelektrode	LF-1	Innovative Instruments, Inc. Tampa, Florida, USA
Wärmeschrank	WB 22	mytron Bio- und Solartechnik GmbH, Heilbad Heiligenstadt, Deutschland
Schlauchpumpe	REGLO, ECOLINE, IPC	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
Tygon®-Schlauch	Tygon®-Schlauch (ID = 0,64 mm; AD = 2,46 mm; mit 2 oder 3 Stoppern)	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
PTFE Schlauch	PTFE-Chemieschlauch (ID = 1 mm; AD = 1,5 mm)	Reichert Chemietechnik GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland
Impedanzanalysator	SP-300	Bio-Logic Science Instruments SAS, Claix, Frankreich
EC-Lab	V11.01	Gaskatel
H2-Referenzelektrode	Hydroflex®	Gaskatel
QCM-D	Qsense E4 (Qsense Analyzer)	Biolin Scientific Holding AB, Gothenburg, Schweden
QCM Sensor	QSX301 (Cr/Au)	Biolin Scientific Holding AB, Gothenburg, Schweden
QCM Zelle	QFM401	Biolin Scientific Holding AB, Gothenburg, Schweden
QCM Software	QTools 3	Biolin Scientific Holding AB, Gothenburg, Schweden
MST	Monolith NT.115	NanoTemper Technologies GmbH, München, Deutschland
MST software	MO Affinity Analysis v2.1.3	NanoTemper Technologies GmbH, München, Deutschland
Nanophotometer	nanophotometer™	Implen GmbH, München, Deutschland
PAGE	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
AFM	NanoWizard®	Bruker Nano GmbH, Berlin, Deutschland
Konduktometer	WTW LF3000 + TetraCon 96	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, WTW, Weilheim, Deutschland
MATLAB®	R2015a	The MathWorks, Inc.

Tabelle 3.2: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien inklusive deren Bezugsquelle

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
20 bp DNS-Leiter	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rekombinantes Protein A P7837	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Pierce Ig Binding Proteins (Protein G 21193 und Protein L 21189)	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Fluorophor NT-547 Labeling Kit MO-L005 Monolith™	NanoTemper Technologies GmbH, München, Deutschland
PAA (mit C6-SH am 3'-Ende) Oligonukleotid Pool	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
<i>S. aureus</i> (DSM 20231)	
<i>S. epidermidis</i> (DSM 3269)	Leibniz Institut DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland
<i>E. coli</i> (DSM 498)	
$K_{3/4}[Fe(CN)_6]$	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
TCEP	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
RuHex	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 3.3: Formeln der verwendeten Puffer

Bindungspuffer (BB) pH 7,6	NaCl	100 mM	Autoclaved sterile filtered
	Tris/HCl	20 mM	
	MgCl ₂	10 mM	
	KCl	5 mM	
	CaCl ₂	1 mM	
TBE Puffer pH 8,3	Tris	90 mM	gefiltert
	Borsäure	90 mM	
	EDTA	2 mM	
Gelladepuffer pH 8	Formamid	98%	
	Na-EDTA	20 mM	
	Orange G	0,05%	
	Merkaptoethanol	1 mM	
Tris Puffer pH 7,6	Tris/HCl	40 mM	Mit Stickstoff entgast

3.2 Aufbau des Messplatzes

3.2.1 Messkammer

Der Entwurf der Messkammer wurde mit freundlicher Unterstützung von Daniel Martin (iba e.V. Heilbad Heiligenstadt) in Autodesk® Inventor 2015 erstellt und von den kompetenten Kollegen am iba in der Werkstatt hergestellt. Die Messkammer besteht aus einem Unterteil, einem Oberteil und einem U-Stück zur Kontaktierung der Arbeitselektrode (Abbildung 3.1). Alle drei Teile sind aus Polyetheretherketon (PEEK) hergestellt. Die Kantenlänge der Messkammer beträgt 4 cm. Ober- und Unterteil wurden mittels 4 Schrauben miteinander verbunden und das U-Stück wurde an die Unterseite mit Silikonkleber befestigt. Die Kontaktierung der goldenen Arbeitselektrode erfolgt über Federstiftkontakte, die an einer Lochplatte mit einer Stiftleiste angelötet wurden und am U-Stück über zwei Schrauben befestigt wurden.

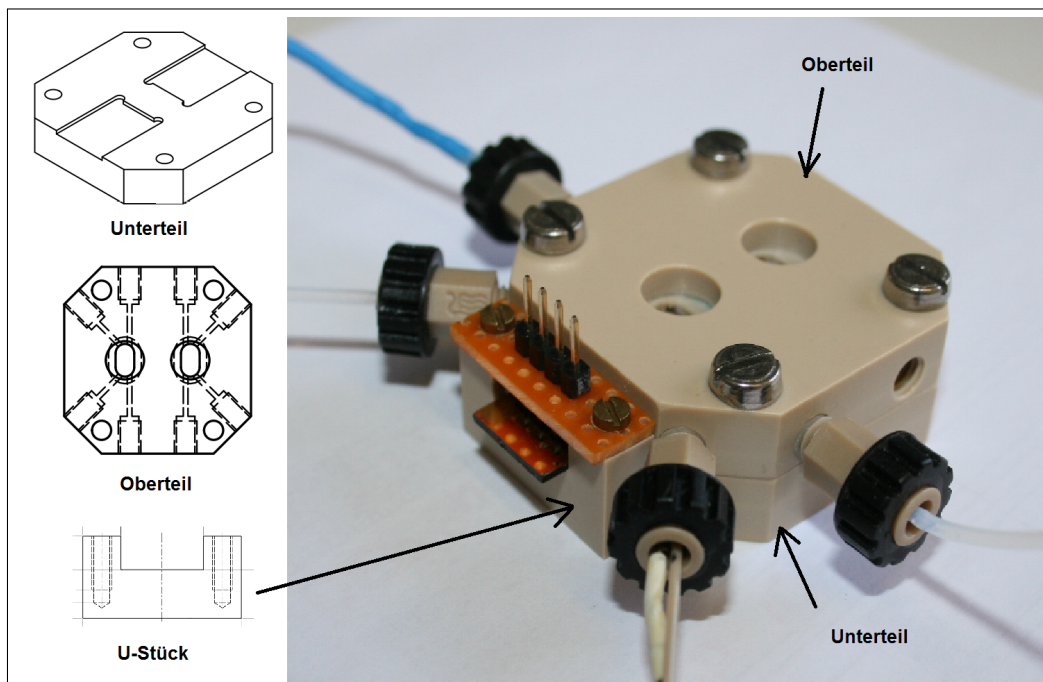


Abbildung 3.1: Konstruktion der Messkammer: links: Zeichnungen der drei Teile der Messkammer: Unterteil, Oberteil und U-Stück; rechts: Abbildung der zusammengesetzten Messkammer

Das Oberteil ist detaillierter in Abbildung 3.2 dargestellt. Die Unterseite enthält eine Einbuchtung für einen O-Ring mit einem Durchmesser von 6 mm

und einer Dicke von 1 mm. Mit dem O-Ring und den Schrauben wird die Dichtigkeit zwischen Arbeitselektrode und Durchflusskammer gewährleistet. In der Biosensorik wird im Allgemeinen ein großes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis angestrebt, da dadurch die Interaktionen der Analytmoleküle mit der Oberfläche maximiert werden können. Jedoch gilt für die Impedanz eine inverse Relation zwischen Fläche und Signal, d.h. je größer die Fläche der Elektrode, desto kleiner die Impedanz. Daher muss in diesem Fall ein Kompromiss gefunden werden. Die Fläche der Arbeitselektrode, die in Kontakt mit der Flüssigkeit steht, beträgt etwa $0,246 \text{ cm}^2$, während das Volumen der Durchflusskammer etwa $100 \mu\text{l}$ beträgt. Daraus ergibt sich ein Flächen-Volumen-Verhältnis von 2,5, welches sicherlich in zukünftigen Entwicklungen noch optimiert werden kann.

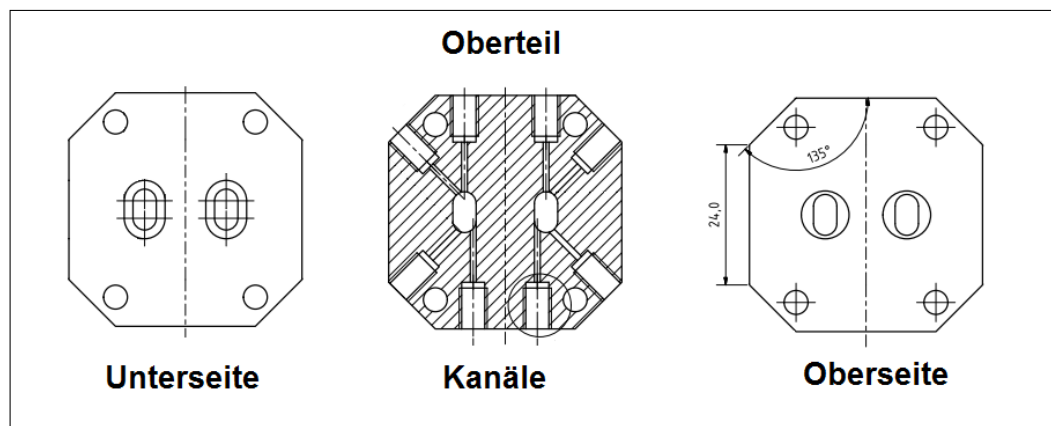


Abbildung 3.2: Zeichnungen des Oberteils der Messkammer aus drei verschiedenen Perspektiven: Unterseite, die im Kontakt mit der Goldelektrode steht; die Ansicht der gefrästen Kanäle zur Erstellung einer Fluidikkammer mit Ein- und Auslass sowie zwei Kanälen zur Einbringung von Referenz- und Gegenelektrode; die Oberseite, die mit einem Sichtfenster ausgestattet ist.

Die Kanäle im Inneren des Oberteils haben einen Durchmesser von 1 mm und wurden in das PEEK gefräst. Der Kanal für die Referenzelektrode wurde im Nachhinein zu einem Durchmesser von 2 mm erweitert, da die Überbrückungskapazität mit hinein passen musste. Die Kanäle enthalten jeweils ein Gewinde (UNF 10-32 Toleranz 2B) von 7 mm Tiefe. Für den Ein- und Auslass der Durchflusskammer wurden passende Hohlschrauben aus PEEK für Schlauchdurchmesser von 1,6 mm mit entsprechenden PTFE-schläuchen (Außendurchmesser = 1,5 mm, Innendurchmesser = 1 mm) versehen. Für den

Übergang wurden die Hohlschrauben mit einem passenden Ferrule versehen, O-Ringe eingefügt und die PTFE-Schläuche am Ende gebördelt (siehe auch Abbildung 4.2 in Unterabschnitt 4.1.1). Der PTFE-Schlauch am Ausfluss wurde mit einem Schlauchverbinder zu einem Tygon[®]-Schlauch überführt (Tygon[®]-Schlauch mit zwei oder drei Stopfen und einem Innendurchmesser von 0,64 mm von Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland). Die Oberseite enthält 4 mm tiefe Löcher mit einem Durchmesser von 8,2 mm für die Sichtfenster. Das Sichtfenster besteht aus B33 Glas und ist etwa 1 mm dick. Es wurde auf die benötigte Größe zurechtgeschliffen und mit Silikonkleber befestigt und abgedichtet.

3.2.2 Elektroden

Das Unterteil der Messkammer enthält zwei Einbuchtungen für die goldene Arbeitselektrode. Diese wurde aus goldbeschichteten Glasobjektträgern (siehe Tabelle 3.1) zurechtgeschnitten, indem die Rückseite mit einem Diamantschneider angeritzt und dann der Glasträger gebrochen wurde. Dadurch konnten aus einem Glasobjektträger 6 Elektroden gewonnen werden. Die Elektroden wurden beschichtet, dann in die Einbuchtung eingelegt, mit dem Oberteil befestigt und abschließend die Kontaktierung befestigt.

Die anderen beiden Bohrungen im Oberteil der Messkammer wurden für die Referenz- und Gegenelektrode benutzt. Als Referenzelektrode wurde die Leak-Free Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode LF-1 von Innovative Instruments (Inc, Tampa, Florida, USA) verwendet. Zur Stabilisierung der hohen Frequenzen wurde ein Platindraht mit einer Kapazität von $1 \mu\text{F}$ in Reihe zur Referenzelektrode parallel geschaltet. Diese Überbrückungskapazität (=Bypass) wurde zusammen mit der Referenzelektrode in einer Hohlschraube mit Silikonkleber verklebt, sodass die Elektrode etwa 8 mm vorne überstand, sodass sie in Berührung mit der Flüssigkeit in der Durchflusskammer kommt. Ein Dichtungsring genügte, um das Ganze abzudichten. Die Referenzelektrode wurde direkt am Einfluss der Kammer positioniert. Wenn die Referenzelektrode nicht verwendet wurde, wurde sie in 0,05 M Schwefelsäure gelagert.

Platinierung

Die Gegenelektrode besteht aus einem Platindraht (99,9% Reinheit mit einem Durchmesser von 0,5 mm) mit einer Oberfläche von etwa 0,066 cm². Um die Oberfläche zu vergrößern wurde die Elektrode wie folgt platinieren. Es wurde eine Platinierlösung aus 130 µM Bleiacetat, 146 mM Hexachloroplatinsäure in 2 M Salzsäure hergestellt und für 5 min mit Stickstoff entgast und anschließend im Dunkeln aufbewahrt. Der Platindraht wurde mit Schleifpapier abgerieben, mit Reinstwasser gespült und in Königswasser (3:1 Salzsäure und Salpetersäure) im Ultraschallbad bei 50°C etwa 2 Minuten lang gereinigt. Anschließend wurde der Draht erneut mit Reinstwasser gespült und mit Stickstoff getrocknet. Der Platindraht wurde als Kathode gegen einen anderen Platindraht in der Platinierlösung mit 2,2 mA (20 mA pro cm²) für 10 Minuten platinieren. Anschließend wurde der Draht erneut mit Reinstwasser gespült und in Bindungspuffer BB bei 1 kHz mit einer Amplitude von 500 mV bei DC = 0,95 V für 5 Minuten konditioniert. Wenn nicht benötigt wurde die Gegenelektrode in 0,05 M Salzsäure gelagert.

3.2.3 Messplatz

Die Messkammer und die Proben wurden in einem Wärmeschrank platziert. Dadurch wurden die elektrochemischen Experimente bei 21°C ± 0,1°C durchgeführt (bei dieser Temperatur wurde das Aptamer selektiert). Die verglaste Tür des Wärmeschranks wurde mit einer Alufolie abgedeckt, um das lichtempfindliche Hexacyanoferrat zu schützen. Durch eine abgedichtete Öffnung an der Seite des Wärmeschranks wurden die Kabel und Schläuche nach draußen geführt. Zum Pumpen der Flüssigkeit wurde eine Schlauchpumpe (je nach Anwendung eine REGLO, ECOLINE oder IPC) verwendet. Die Impedanzmessungen wurden mit dem Impedanzanalysator SP-300 von Bio-Logic[®] durchgeführt. Dieser war mit einem Standard-PC mit Windows verbunden, auf dem die zugehörige Impedanz-Software EC-Lab V11.01 lief.

3.2.4 Messplatz im S2-Labor

Die Versuche mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) wurden im Labor der Schutzstufe 2 durchgeführt und dafür geschlossene Flüssigkeits-Kreisläufe ver-

wendet. Dazu wurden autoklavierbare Glasgefäße mit PTFE- oder PEEK-Verschlüssen mit GL 45 Dichtungen und Schlauchanschlüssen sowie einem Luft-Filter versehen. Alle autoklavierbaren Teile des Systems wurden autoklaviert, die anderen Teile (Elektroden, Tygon[®]-Schlauch und Dreiwegeventil) wurden intensiv mit Ethanol und Reinstwasser gespült und anschließend über Nacht in 80%igen Ethanol gelagert. Die Dichtigkeit des Systems wurde jeden Tag vor den Messungen mit Reinstwasser und Druckaufbau durch Verschließen des Ausflusses für 10 Sekunden geprüft. Alle Oberflächen wurden täglich vor und nach den Messungen desinfiziert.

3.3 Messmethoden

3.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (kurz PAGE) wurde zur Überprüfung der Qualität der modifizierten Aptamere verwendet. Für die Auftrennung von kurzen Oligonukleotiden von 20-250 Basenpaaren eignen sich 10% Polyacrylamid-Gele mit Harnsäure und Formamid für stark denaturierende Bedingungen. Die Gele wurden gegossen aus:

- 9,5% Acrylamid
- 0,5% Bisacrylamid
- 8 M Harnstoff
- 17,5% Formamid
- in 1x TBE (Tabelle 3.2)

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,05% Ammoniumpersulfat (APS) und 0,1% Tetramethylethyldiamin (TEMED) gestartet und war nach 2h abgeschlossen. Die Gele wurden in einer vertikalen Gelapparatur (Tabelle 3.1) eingesetzt und es wurde ein Vorlauf bei 200 V für 15 min durchgeführt. Alle Oligonukleotidproben (Endkonzentration 13 μ M) wurden 1-zu-1 mit 2x Gelladepuffer (Tabelle 3.2) versehen und anschließend im Thermoblock für 5 min auf 95°C erhitzt und abschließend zentrifugiert und auf Eis bis Zimmertemperatur gekühlt. Von jeder Probe und einer 20 bp DNS-Leiter wurden jeweils 5 μ l bei 20 V aufgetragen. Es wurde 5 min gewartet, um die Proben zu sammeln. Dann wurden die Proben bei 200 V aufgetrennt, bis das Orange G

ans untere Ende gelaufen war. Als Lauffuffer diente TBE und die Apparatur stand auf Eis. Gele wurden mit $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid in TBE für 20 Minuten gefärbt und anschließend für 5 min entfärbt. Die Banden wurden unter einem UV-Gelscanner fotografiert.

3.3.2 Microscale Thermophorese

Die Microscale Thermophorese (kurz MST) wurde verwendet, um den Einfluss des Redoxmediators Hexacyanoferrat auf die Bindung von Aptamer und Protein A zu untersuchen. Das Aptamer wurde dafür mit dem Maleimide-Fluorophor NT-547 (Tabelle 3.2) markiert, welches an die Thiolgruppe bindet. Die Markierungs-Prozedur wurde durchgeführt wie im Handbuch beschrieben. Dazu wurden $20\ \mu\text{l}$ einer $100\ \mu\text{M}$ Stammlösung des Aptamers PAA (mit C6-SH-Modifikation) in Reinstwasser eingesetzt. Zur Spaltung von Disulfidbrücken wurde das Aptamer mit TCEP ($200\ \mu\text{M}$ pro μM Thiol) für 20 Minuten inkubiert und anschließend im Thermocycler bei 95°C für 5 Minuten erhitzt. Das Aptamer wurde eine Minute auf Eis abgekühlt und dann 1-zu-10 in Markierungspuffer verdünnt. Das Aptamer ($10\ \mu\text{M}$) wurde mit dem Fluorophor ($30\ \mu\text{M}$) im Verhältnis 1-zu-1 gemischt und mindestens 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Das markierte Aptamer wurde mit der im Kit enthaltenen Säule aufgereinigt. Dabei wurden drei Fraktionen gesammelt und die mittlere Fraktion weiterverwendet. Die Effizienz der Markierung wurde mit einem Nanophotometer bei 260 nm und 555 nm geprüft. Die Messungen ergaben eine Konzentration des PAA von $6,19\ \mu\text{M}$ und eine Farbstoffkonzentration von $2,96\ \mu\text{M}$. Das entspricht einem Markierungs-Verhältnis von 0,48 und bedeutet, dass etwa jedes zweite Aptamer markiert wurde. Für die Versuche mit der MST wurde die mittlere Fraktion 1-zu-80 in Bindungspuffer verdünnt (= $77,42\ \text{nM}$ PAA, davon $38,5\ \text{nM}$ markiert) und mit dem rekombinanten Protein A in Konzentrationen von $0,2\ \text{nM}$ bis $6,25\ \mu\text{M}$ inkubiert. Die Proben wurden in die 16 Kapillaren des Monolith NT.115 gefüllt und bei 40% Intensität der MST und 100% Intensität des Anregungslichtes vermessen. Die Daten wurden mit der Software MO Affinity Analysis v2.1.3 ausgewertet.

3.3.3 Modifizierung der Elektroden

Die goldbeschichteten Quarzchips für die QCM und die Arbeitselektroden der Impedanzspektroskopie wurden gleichermaßen modifiziert und werden im folgenden als Elektroden bezeichnet.

Zur Reinigung wurden die Elektroden fünf Minuten lang mit UV/Ozon behandelt (172nm) und anschließend mit Reinstwasser, Ethanol und wieder Reinstwasser gespült. Dann wurden die Elektroden fünf Minuten lang in 0,5 M Natronlauge getaucht und wieder mit Reinstwasser gespült. Als letzten Schritt wurden die Elektroden in 50°C-heißer alkalischer Piranhalösung (5:1:1 Reinstwasser mit 25%igen Ammoniak und 30%igen Wasserstoffperoxid; ACHTUNG: Diese Lösung reagiert mit allen organischen Stoffen!) im Ultraschallbad für fünf Minuten und anschließend für fünf Minuten in Reinstwasser behandelt. Abschließend wurden die Elektroden unter einem Stickstoffstrom getrocknet und in Kristallisierschalen unter einer Stickstoffschicht gelagert.

Das C6-SH-modifizierte Aptamer kann Disulfidbrücken ausbilden. Um diese zu Spalten und die Aptamere somit zu vereinzeln wurden 200 μM TCEP pro μM Thiol hinzugefügt und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Aptamer in Bindungspuffer verdünnt und fünf Minuten lang auf 95°C erhitzt, um eine komplette Entfaltung zu gewährleisten. Das Aptamer wurde eine Minute auf Eis runtergekühlt und anschließend im Wärmeschrank bei 21°C gehalten.

Zur Immobilisierung des Aptamers wurde 1 μM PAA mit 4 μM MCH in Bindungspuffer (BB) gemischt und davon 100 μl auf die gereinigte Elektrode gegeben. Das Ganze wurde in einer Kristallisierschale mit Stickstoff belegt und luftdicht verschlossen, um Verdunstung zu verhindern. Die Inkubation wurde über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt (14-16 h). Am nächsten Tag wurde die Elektrode intensiv mit BB gewaschen und für 30 Minuten mit 1 mM MCH in BB inkubiert. Die Elektrode wurde wiederum mit BB gewaschen und in BB bis zur Verwendung aufbewahrt. Zur Immobilisierung des Oligonukleotid Pools wurde genauso verfahren und anstatt des PAA 1 μM des ON Pool verwendet. Bei der Modifizierung der Elektroden mit einer MCH Monoschicht, wurde im ersten Schritt 10 μM MCH verwendet und ansonsten die gleiche Prozedur verwendet. In einer Kristallisierschale konnten drei Elektroden gleichzeitig modifiziert werden. Die Elektroden wurden nach der Messung

gereinigt und wiederverwendet.

3.3.4 Quarzkristallmikrowaage

Um die Immobilisierung des Aptamers zu verifizieren, wurde die in Unterabschnitt 3.3.3 beschriebene Prozedur ebenfalls mit der Quarzkristallmikrowaage (kurz QCM) untersucht. Dazu wurde eine gereinigte Elektrode in die Durchflusszelle eingebaut und die Immobilisierung des Aptamers durchgeführt. Die Lösung aus Protein A-bindendes Aptamer (PAA) und Merkaptohexanol (MCH) im Verhältnis 1-zu-4 wurde über die Elektrode gepumpt und dann die Pumpe gestoppt, um das Ganze über Nacht inkubieren zu lassen, während die Frequenzänderung einmal alle zwei Minuten aufgenommen wurde. Am nächsten Tag wurde die Elektrode mit BB gewaschen und mit 1 mM MCH für 30 Minuten geblockt und wiederum mit BB gewaschen. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 4.2.3 beschrieben.

Mit der QCM wurde ebenfalls untersucht, welche Endgruppe des Füllthiols die unspezifische Adsorption von Protein A minimiert. Dazu wurden die Elektroden mit einer SAM aus verschiedenen Alkanthiolen modifiziert. Diese Immobilisierungen wurden ebenfalls in der Durchflussmesskammer durchgeführt, um deren Erfolg zu verifizieren. Es wurden jeweils 10 μM Gesamtkonzentration der Alkanthiole in BB verwendet. Der zweite Schritt zum Füllen der freigewordenen Stellen, auch Blocken genannt, fiel bei diesen Experimenten weg.

Für die Versuche wurde der Qsense Analyzer E4 (siehe Tabelle 3.1) mit der Durchflussmesskammer QFM 401 und den goldbeschichteten Quartzsensoren QSX 301 verwendet. Das Gerät ist eine QCM-D, d.h. sie detektiert ebenfalls die Dämpfung. Zudem kann dieses Gerät alle 25 ms eine Messung durchführen, was sie geeignet für kinetische Untersuchungen macht. Die Resonanzfrequenz des Sensors liegt bei 4,95 MHz \pm 50 kHz. Durch die Anlagerung von Masse auf der Oberfläche des Sensors verschiebt sich die Resonanzfrequenz. Dieser Zusammenhang wird durch die Sauerbrey-Gleichung beschrieben [249]:

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2 n}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}} \Delta m \quad (3.1)$$

$$\Delta m = S \frac{\Delta f_n}{n} \quad (3.2)$$

mit Δf = Frequenzänderung, f_0 = Resonanzfrequenz, n = Zahl der harmonischen Oberwellen, A = piezoelektrisch aktive Fläche des Kristalls, ρ_q = Dichte des Quarzes, μ_q = Schermodus des Quarzes, Δm = Masseänderung und S = Sauerbrey-Konstante.

Diese Gleichung gilt für feste, gleich verteilte Schichten und wird für die Messung an Luft oder in Vakuum verwendet. Bei der Messung in Flüssigkeiten wird der Kristall durch die Viskosität gedämpft, was zur Unterbestimmung der Masse führt. Daher haben Kanazawa et al. die Gleichung für Flüssigkeiten angepasst [250]:

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\rho_L \eta}{\rho_q \mu_q \pi}} \quad (3.3)$$

mit Δf = Frequenzänderung, f_0 = Resonanzfrequenz, ρ_L = Dichte der Flüssigkeit, η = Viskosität, ρ_q = Dichte des Quarzes, μ_q = Schermodus des Quarzes.

Weiterhin ist ebenfalls die Dämpfung D der Schwingung von der Viskosität und Dichte der Flüssigkeit abhängig, wie durch folgende Gleichung beschrieben [251]:

$$D = \frac{2\sqrt{\rho_L \eta}}{\sqrt{\pi} f_0 \rho_q \mu_q} \quad (3.4)$$

mit f_0 = Resonanzfrequenz, ρ_L = Dichte der Flüssigkeit, η = Viskosität, ρ_q = Dichte des Quarzes, μ_q = Schermodus des Quarzes.

Die Viskosität der Lösung und der Beschichtung haben also einen Einfluss auf die Verschiebung der Resonanzfrequenz und führen ohne entsprechende Korrektur zu einer Überschätzung der Masse. In unserem Fall ist der Einfluss der Viskosität sehr gering und es wurde auf eine numerische Korrektur verzichtet. Der Einfluss wurde größtenteils entfernt, indem vor und nach dem Analyten ausführlich mit Medium gespült wurde und diese Werte voneinander subtrahiert wurden.

Die Resonanzfrequenz ist sehr anfällig gegenüber Einbauspännungen im Kristall als auch gegenüber der Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit. Da die Beschichtung mit Aptamer und Protein A eine Dicke von <50 nm aufweisen sollte, sind theoretisch alle Oberwellen bis 15 für die Auswertung geeignet. Mit zunehmender Frequenz der Oberwellen sinken Eindringtiefe der Schwingung und Amplitude des Signals, jedoch steigt das Signal-Rausch-Verhältnis.

Um einen guten Kompromiss zu finden, wurde für alle Messungen die fünfte harmonische Oberschwingung zur Auswertung herangezogen. Die Auswertungen wurden mit der Software QTools3 durchgeführt.

3.3.5 Chronocoulometrie

Die Coulometrie ist eine Methode zur Quantifizierung eines Redoxmoleküls in Lösung. Sie beruht auf dem Faradayschen Gesetz, demnach die elektrische Ladung proportional zur umgesetzten Stoffmenge ist. Es gibt verschiedene Varianten der Coulometrie. Bei der Chronocoulometrie (CC) wird für kurze Zeit (250-500 ms) eine Gleichspannung angelegt und der resultierende Strom gemessen. Die CC verfolgt den Strom mit hoher zeitlicher Auflösung, wodurch zwischen der Umsetzung von gelösten und adsorbierten Stoffen unterschieden werden kann. Durch Integration der Strom-Zeit-Kurve erhält man die Ladung Q . Zur Bestimmung der Anzahl von elektrochemisch aktiven Molekülen wird das Potential sprunghaft erhöht, um eine faradaysche Reaktion auszulösen. In Abbildung 3.3 ist die Stromantwort auf einen Doppelpotentialsprung und die daraus berechnete Ladung Q für eine mit dem Aptamer PAA beschichtete Goldelektrode zu sehen.

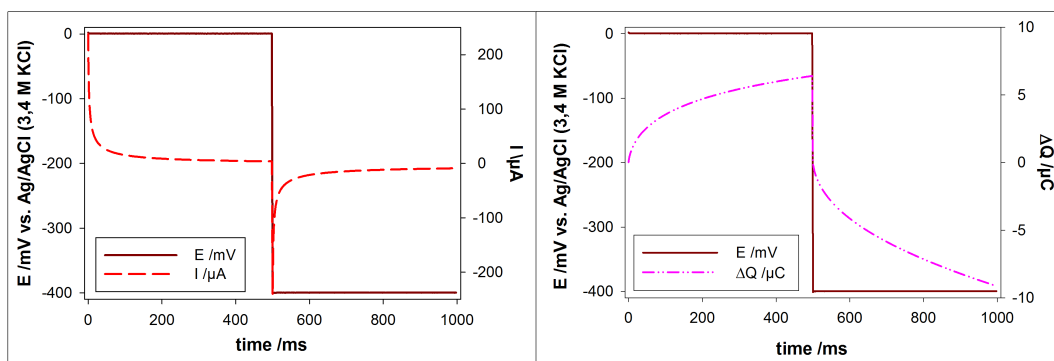


Abbildung 3.3: CC-Messung einer mit Aptamer modifizierten Goldelektrode - Links: Strom-Zeit-Kurve eines CC-experimentes mit Doppelpotentialsprung von vorgespannten -400 mV auf 0 V und von 0 auf -400 mV; rechts: die Ladung-Zeit-Kurve des gleichen Experimentes erhalten durch die Integration der Strom-Zeit-Kurve.

Die Q-t-Kurve zeigt einen Sprung und geht anschließend in eine Kurve über, die sich einem Maximalwert annähert. Der Sprung wird durch die sofortige Umsetzung adsorbierter Moleküle in der unmittelbaren Umgebung der Elek-

trode verursacht, während der nachfolgende Bereich den diffusionslimitierten Ladungstransfer repräsentiert. Der Zusammenhang zwischen Strom i und Zeit t in einem Chronocoulometrie-Experiment wird durch die Cottrell-Gleichung [252] beschrieben:

$$i(t) = \frac{nFAc_0D^{1/2}}{\sqrt{\pi t}} = kt^{1/2} \quad (3.5)$$

Die Integration der Cottrell-Gleichung ergibt die Ladung Q [253]:

$$Q = \frac{2nFA\sqrt{D_0}c_0}{\sqrt{\pi}}\sqrt{t} + Q_{dl} + Q_{ads} \quad (3.6)$$

wobei n die Anzahl der übertragenen Elektronen ist, F die Faradaykonstante, A die Fläche der Elektrode, D_0 der Diffusionskoeffizient, c_0 die Konzentration der Redoxmoleküle in Lösung, Q_{dl} die Ladung der Doppelschicht und Q_{ads} die Ladung der adsorbierten Redoxmoleküle.

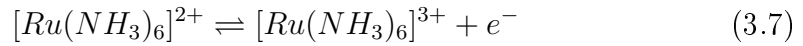
Bestimmung der Anzahl immobilisierter Aptamere

Die CC wurde in dieser Arbeit verwendet, um mit der Methode nach Steel et al. [253] die Anzahl der immobilisierten Aptamere zu bestimmen und den Einfluss der Konzentration des Füllthiols MCH auf die Dichte der Aptamere zu untersuchen. Die Quantisierung der Oligonukleotide wird teilweise angezweifelt, was vermutlich durch die eingeschränkte Nutzung aufgrund der limitierenden Voraussetzungen gegeben ist. Die Gültigkeit des Ansatzes von Steel et al. ist nur unter folgenden Voraussetzungen gültig:

- 1 Die Interaktionen zwischen Redoxmarker und DNS sind rein elektrostatisch
- 2 Alle adsorbierten Redoxmarker sind elektrochemisch erreichbar
- 3 Die Ladung der Phosphatgruppen der Oligonukleotide wird ausschließlich durch den Redoxmarker kompensiert

Diese Voraussetzungen machen die Methode nur bedingt nutzbar, da spezielle Umgebungsbedingungen gewährleistet werden müssen. In Abschnitt 4.2.3 ist beschrieben, wie diese Bedingungen für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche gewährleistet und geprüft wurden. Diese Methode basiert darauf, dass die negativen Ladungen der Phosphatgruppen entlang des Rückgrats

von Oligonukleotiden die Adsorption von Kationen ermöglichen. Hexaamin-Ruthenium-chlorid (kurz RuHex) ist ein Kation und adsorbiert an die Phosphatgruppen von Oligonukleotiden. RuHex ist zudem ein redoxaktiver Stoff, der ein Elektron abgeben oder aufnehmen kann, entsprechend:



Ein RuHex-Molekül kann entsprechend seiner Ladung zwei oder drei Phosphatgruppen kompensieren. Das adsorbierte RuHex wird beim Anlegen der Spannung sofort umgesetzt und mit der CC wird die dabei umgesetzte Ladung Q gemessen (siehe Gleichung 3.6).

Die CC-Messungen in dieser Arbeit wurden mit dem Potentiostaten SP-300 von Bio-Logic durchgeführt. Die Experimente wurden in 40 mM Tris Puffer (pH 7,6) mit 200 μ M RuHex bei einer Pulssprungweite von 400 mV (von 0 mV auf -400 mV) und einer Pulsdauer von 500 ms durchgeführt. Jede CC-Messung basiert auf drei aufeinanderfolgenden Doppelpotentialsprüngen, wovon der Mittelwert der drei Reduktionszyklen gebildet wurde. Zudem wurde jede CC-Messung zuerst in Tris Puffer ohne RuHex durchgeführt, um Q_{dl} zu bestimmen. Der diffusionslimitierte Bereich ist in der Q - \sqrt{t} -Kurve linear. Für die lineare Regression der Q - \sqrt{t} -Kurven zur Bestimmung von $Q_{t=0}$ wurde jeweils der Abschnitt von 0,25 bis 0,5 \sqrt{s} verwendet.

$$Q_{t=0} = Q_{dl} + Q_{ads} \quad (3.8)$$

$$Q_{ads} = nFA\Gamma_0 \quad (3.9)$$

$$\Gamma_{DNS} = \Gamma_0 \frac{z}{m} N_A \quad (3.10)$$

mit Γ_0 = Anzahl der adsorbierten und umgesetzten Redoxmoleküle, z = Ladung der Redoxmoleküle, m = Anzahl der Basen im Oligonukleotid, N_A = Avogadrokonstante

Q_{ads} wurde durch die Subtraktion der Q_{dl} von $Q_{t=0}$ erhalten. Der Wert für Q_{ads} wurde mit der Gleichung 3.9 in die Anzahl der reduzierten adsorbierten RuHex-Moleküle Γ_0 umgewandelt, woraus mit Gleichung 3.10 die Konzentration der DNS bestimmt wurde (mit $m = 58$ und $z = 3$).

Die Integration der Strom-Zeit-Kurven erfolgte mit der Software EC-Lab V11.01. Die weitere Auswertung erfolgte in Microsoft Excel 2007.

Bestimmung der Diffusionskonstanten des Redoxmarkers

Weiterhin wurde die Chronocoulometrie (CC) zur Bestimmung der Diffusionskonstanten von Kaliumhexacyanoferrat ($K_{3/4}[Fe(CN)_6]$) verwendet. Die CC-Messungen wurden mit dem Impedanzanalysator SP-300 von Bio-Logic durchgeführt. Die Experimente wurden in BB (pH 7,6) mit 2 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ bei einer Pulssprunghöhe von 600 mV (von -200 mV auf 400 mV) und einer Pulsdauer von 500 ms durchgeführt. Jede CC-Messung basiert auf drei aufeinanderfolgenden Doppelpotentialsprüngen, wovon der Mittelwert der drei Reduktionszyklen gebildet wurde. Der diffusionslimitierte Bereich der $Q-\sqrt{t}$ -Kurve ist linear und der Anstieg dieses Bereiches wurde durch lineare Regression des jeweiligen Abschnitts von 0,25 bis 0,5 \sqrt{s} bestimmt. Aus den Anstiegen wurden entsprechend der Gleichung 3.6 die Diffusionskonstanten jeweils getrennt für Oxidation und Reduktion berechnet. Die Ergebnisse sind in Unterabschnitt 4.5.3 dargestellt.

3.3.6 Elektrochemische Impedanzspektroskopie

Für die Aufnahme der Impedanzspektren wurde der Impedanzanalysator SP-300 (Tabelle 3.1) verwendet. Es wurde der Frequenzbereich von 1 Hz - 200 kHz in logarithmischen Abständen mit sieben Frequenzen pro Dekade vermessen. Das Potential der Arbeitselektrode E_{we} setzt sich wie folgt zusammen:

$$E_{we} = E + V_a \sin 2\pi ft \quad (3.11)$$

Die Amplitude V_a betrug 10 mV ($V_{rms}=7,07$ mV) und wurde dem individuell für jede Elektrode bestimmten Nullstrompotential ($E = E_{oc} = \sim 143$ mV mit $t_E = 30$ s) überlagert. Der Messwert für eine Frequenz entspricht der Mittelung über drei Wiederholungen ($N_a = 2$). Zwischen den Messungen der einzelnen Frequenzen wurde eine Zehntel Periode gewartet ($p_w = 0,1$). Jede Messung wurde vier mal wiederholt ($n_c = 3$), während zur Auswertung die letzten 3 Zyklen herangezogen wurden. Der Potentialbereich E_{range} war auf ± 1 V eingestellt, was einer Auflösung von $50 \mu V$ entspricht. Der Strommessbereich wurde vom Gerät automatisch angepasst und die Bandbreite wurde für alle Messungen auf 7 eingestellt. Es wurde keine Driftkorrektur und keine Filterung

vorgenommen. Jede Messung dauerte etwa 3 min. Um die Messzelle vor Beschädigung zu schützen, wurde der Strom $|I|$ auf 1 mA begrenzt.

Messprozedur

Als erstes wurden die beschichtete oder unbeschichtete Goldelektrode in die Durchflussmesskammer eingebaut und das System mit BB + 2 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ befüllt. Dann wurde eine Impedanzmessung durchgeführt und diente zur Prüfung, ob die Immobilisierung erfolgreich war und der Ladungstransferwiderstand (R_{ct}) im zu erwartenden Bereich lag. Folgend wurden 6 ml einer Protein A- oder *S. aureus*-Lösung (Konzentrationen von 2-700 nM) mit 50 μ l/min durch die Kammer gepumpt und diese dann für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 6 ml BB + 2 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ durch die Kammer gepumpt, 30 Sekunden gewartet und eine Messung durchgeführt. Jede Konzentration wurde auf drei verschiedenen Elektroden vermessen. Für die Auswertungen wurde die Änderung des Ladungstransferwiderstandes ΔR_{ct} verwendet.

Zum Nachweis der Selektivität des Sensors wurde die gleiche Prozedur mit 1 μ M der IgG-bindenden Proteine G und L durchgeführt. Ebenso die gleiche Messprozedur wurde bei der Inkubation von 1 μ M Protein A auf mit Oligonukleotid-Pool modifizierten Elektroden durchgeführt.

Für die Messungen mit dem Aptasensor mit lebenden Bakterien wurde die gleiche Prozedur verwendet, nur dass 6 ml der Bakterien in TSB von 1 KbE pro ml bis 10⁹ KbE pro ml verwendet wurden und das Ganze in einem geschlossenen System im S2-Labor durchgeführt wurde. Zum Nachweis der Selektivität wurde der Sensor mit 10⁸ KbE/ml von *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) inkubiert.

3.3.7 Zyklovoltammetrie

Mit der Zyklovoltammetrie (CV) wurde die elektrochemisch aktive Fläche der goldenen Arbeitselektrode sowie die Parameter für das Modell bestimmt.

Zur Bestimmung der elektrochemisch aktiven Fläche wurde eine frisch gereinigte blanke Goldelektrode in die Durchflussmesskammer eingebaut. Die Reinigungsprozedur ist in Unterabschnitt 3.3.3 beschrieben. Die Kammer wurde mit 0,5 M Schwefelsäure (H_2SO_4) gefüllt und mit der CV wurden drei Zyklen

von 0,2 V bis 1,5 V bei 100 mV s^{-1} aufgenommen. Die Integration des Reduktionspeaks bei etwa 800 mV ergibt die Ladung Q , die verbraucht wurde, um eine Goldschicht zu reduzieren ($Q = 215 \mu\text{C}$). Oesch und Janata haben Goldelektroden untersucht und konnten für die Reduktion der anodischen Goldoxide einen Wert von $482 \mu\text{C cm}^{-2}$ bestimmen. Demnach beträgt die elektroschemisch aktive Fläche A_{true} der verwendeten Goldelektrode $0,444 \pm 0,039 \text{ cm}^2$. Da die geometrische Fläche der Goldelektrode $A_{\text{geo}} 0,246 \text{ cm}^2$ beträgt, ergibt sich daraus ein Rauigkeitsfaktor $R = A_{\text{true}}/A_{\text{geo}}$ von 1,8.

Zur Bestimmung der heterogenen Elektronentransferkonstanten (k_0) bzw. der scheinbaren heterogenen Elektronentransferkonstanten (k_{app}) wurden unbeschichtete und beschichtete Goldelektroden in die Durchflussmesskammer eingebaut und Zyklovoltammogramme bei verschiedenen Scanraten ν in $\text{BB} + 2 \text{ mM K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ aufgenommen. Die Oxidations- und Reduktionspeaks wurden mit dem Tool “Peak Analysis” der Software EC-Lab (siehe Tabelle 3.1) gefittet. Die Basislinie wurde mit linearer Regression bestimmt und es wurden mindestens 70 Datenpunkte ausgewählt.

Für die Redoxreaktion von $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ an **blanken** Goldelektroden konnte ein reversibler Ladungstransfer mit Peakseparationen unter 200 mV beobachtet werden. Zur Bestimmung der Ladungstransferkoeffizienten $\alpha(\text{ox/red})$ wurden die Peakpotentiale E_p gegenüber der Peakseparation aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Der Anstieg der Regressionsgeraden entspricht jeweils dem $\alpha(\text{ox/red})$. Zur Bestimmung der k_0 wurde mithilfe der Daten in Tabelle 1 aus Laviron [254] für jede Scanrate ν anhand der aus den CVs bestimmten Peakseparation ΔE_p der Wert für m bestimmt. Mit folgender Gleichung wurde aus m die Elektronentransferkonstante k_s für jede Scanrate bestimmt:

$$m = \frac{RT A k_s}{F V z \nu} \quad (3.12)$$

mit $V = \text{Volumen}$, $z = \text{Anzahl übertragener Elektronen}$, $A = \text{elektrochemisch aktive Fläche } A_{\text{true}}$

Die bestimmten k_s -Werte wurden gegenüber der Scanrate aufgetragen und mit linearer Regression der Wert k_0 bei $\nu=0$ bestimmt.

Für **beschichtete** Elektroden wurden Peakseparationen von 400 mV und größer beobachtet. Unter der Annahme, dass es sich hierbei um einen gehemm-

ten reversiblen Ladungstransfer handelt, wurde k_{app} aus den CVs bei 50 mV s^{-1} bis 1 V s^{-1} anhand der Gleichungen von Laviron für $\Delta E_p > 200 \text{ mV}$ bestimmt [254]. Dazu wurden die Peakpotentiale E_p und die Peakseparation ΔE_p gegenüber dem Logarithmus der Scanrate ν aufgetragen. Aus den Anstiegen der Regressionsgeraden der Peakpotentiale E_p wurden die Ladungstransferkoeffizienten $\alpha(\text{ox/red})$ bestimmt. Aus der Regressionsgeraden für ΔE_p wurde die Scanrate bei $\Delta E_p = 0$ bestimmt und daraus wiederum die scheinbare heterogene Elektronentransferkonstante (k_{app}). Die Ergebnisse sind in Abschnitt 4.5.3 dargestellt.

3.3.8 Vorbereitung der Bakterien

Sowohl *S. aureus* als auch die Protein A defizienten Bakterien *E. coli* und *S. epidermidis* wurden gleichermaßen behandelt. Die Bakterien wurden für 12-24 h in Tryptic soy broth (TSB) kultiviert und anschließend deren Konzentration durch Zählung bestimmt. Dazu wurden die Bakterien angefärbt, ausreichend verdünnt und in einer Thoma Kammer mit 0,02 mm Tiefe unterm Mikroskop gezählt.

Detaillierter beschrieben, wurden 40 ml der Bakteriensuspension entnommen und intensiv bewegt, um die Zellen zu vereinzeln. Davon wurde 1 ml entnommen und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden $500 \mu\text{l}$ mit $0,6 \mu\text{l}$ SYTO9 (3,34 mM in DMSO) vermischt und fünf Minuten im Dunkeln inkubiert. Davon wurden $4 \mu\text{l}$ in die Thomakammer gegeben und unterm Mikroskop gezählt. Der Mittelwert einer Dreifachbestimmung wurde ermittelt und dementsprechend die entnommene Bakteriensuspension auf eine Zellzahl von 10^7 in TSB verdünnt. Diese wurde wiederum unter dem Mikroskop gezählt. Bei Übereinstimmung wurde eine Verdünnungsreihe in TSB erstellt und jeweils 6 ml davon als Probe für die elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) verwendet.

In einem späteren Versuch wurde die Bakteriensuspension in TSB gewaschen, um tote Zellen, freies Protein A und andere Metabolismusprodukte zu entfernen. Dazu wurden 15 ml Suspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 3 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem TSB gelöst. Dieser Waschvorgang wurde ein zweites Mal wiederholt. Die gewaschene Zellsuspension wurde gezählt, entsprechend

verdünnt und 6 ml davon mit der EIS vermessen.

Um die gebundenen Bakterien auf der Elektrodenoberfläche sichtbar zu machen, wurde die Elektrode ausgebaut, wobei der Dichtungsring auf der Elektrode haften bleibt. 0,6 μl SYTO9 wurden in 500 μl BB gelöst und davon 100 μl auf die Elektrode in den Dichtungsring gegeben. Nach fünf Minuten wurde der Dichtungsring entfernt, mit BB gewaschen, ein Deckglas aufgebracht und die Elektrode unterm Mikroskop mit Auflichtfluoreszenz und einem 40x Objektiv bei 2fachem Zoom betrachtet.

3.3.9 Ersatzschaltbild und Kurvenfitting

Ersatzschaltbilder dienen zur vereinfachten Darstellung der Wirklichkeit, wobei die Anzahl der Elemente auf ein für die Untersuchung relevantes Minimum reduziert wird, um die mathematische Betrachtung des Systems zu ermöglichen. Im Falle der Untersuchung von elektrochemischen Systemen dient ein Ersatzschaltbild ebenfalls dazu, das elektrische Verhalten des elektrochemischen Systems anhand von elektrischen Bauelementen wiederzugeben. Das Randles Ersatzschaltbild wurde von Randles [227] vorgeschlagen zur Beschreibung einer semi-infiniten linearen Diffusion von elektrochemisch aktiven Molekülen zu einer planaren Elektrode. In dem vorgeschlagenen Model besteht die faradaysche Reaktion aus einem Ladungstransferwiderstand R_{ct} und einer Diffusion, dargestellt durch ein Warburgelement W . Die Impedanz einer elektrochemischen Messzelle ist weiterhin von der Doppelschichtkapazität C_{dl} an der Elektrodenoberfläche und dem Widerstand des Puffers R_{sol} abhängig. Randles verwendete einen Quecksilbertropfen in einer Amalgamlösung. Aufgrund von Oberflächenrauigkeiten, der Adsorption von Ionen und chemischen Inhomogenitäten wird eine Elektrodenoberfläche besser durch ein Konstantphasenelement (CPE) beschrieben anstatt durch eine Doppelschichtkapazität C_{dl} [255]. Dieses Ersatzschaltbild in Abbildung 3.4 wird auch als modifiziertes Randles Ersatzschaltbild bezeichnet und wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung des Ladungstransferwiderstandes R_{ct} verwendet. Inwiefern dieses Ersatzschaltbild zur Modellierung der Anbindung von Protein A oder *S. aureus* an das immobilisierte Aptamer genutzt werden kann bzw. welche Abweichungen dabei auftreten ist in Abschnitt 4.5 beschrieben.

Für das Fitten der Impedanzkurven mit dem in Abbildung 3.4 dargestell-

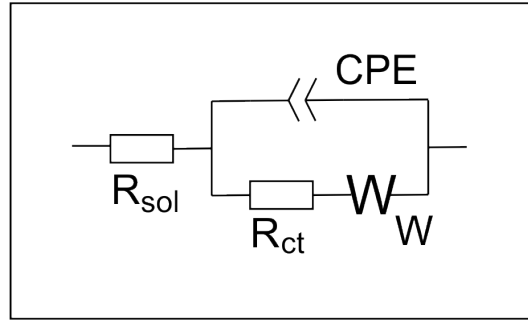


Abbildung 3.4: Ersatzschaltbild für eine elektrochemische Messzelle mit einer faradayschen Reaktion - modifiziertes Randles Ersatzschaltbild für raue inhomogene Elektrodenoberflächen.

ten Ersatzschaltbild wurde EC-Lab V11.01 verwendet. Es wurde die Methode “Randomize + Simplex” mit 5000 Iterationen für “Randomize” und 100000 Iterationen insgesamt verwendet. Die Abweichungsquadrate wurden nach dem Betrag der Impedanz gewichtet, um den Fokus des Fits auf die kleinen Frequenzen zu legen. Der Downhill-Simplex-Algorithmus wurde von Nelder und Mead entwickelt [256] und ist eine Methode zur Optimierung nichtlinearer Funktionen mit mehreren Parametern und wird unter anderem in der Impedanzspektroskopie zum Fitten der Messkurven verwendet. Dabei sucht der Algorithmus das Minimum der Fehlerquadratsumme χ^2 unter der Verwendung eines Simplex mit $N+1$ Ecken im N -dimensionalen Parameterraum. Der Schwachpunkt der Methode liegt darin, dass es ein lokales Minima sucht, das am nächsten an den eingegebenen Startwerten liegt. Daher sollten diese möglichst in der richtigen Größenordnung vorgegeben werden.

Bindungsmodell

Die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor bezeichnet man als Assoziation, wobei der Ligand-Rezeptor-Komplex gebildet wird. Dieser Komplex kann auch wieder in Ligand und Rezeptor zerfallen, was als Dissoziation bezeichnet wird. Diese Reaktionen finden mit einer bestimmten Geschwindigkeit statt, beschrieben durch die Geschwindigkeitskonstanten k_a und k_d . Für die Bindung von Protein A (PA) an ein Protein A-bindendes Aptamer (PAA) sehen die Gleichungen wie folgt aus:



Die Bildung neuer Komplexe (PAPAA) ist abhängig von k_a und der Konzentration an freien Liganden ($[PA]$) sowie der Konzentration an freien Rezeptoren ($[PAA]$). Entsprechend ist die Anzahl an Dissoziationen von k_d und der Konzentration der Komplexe ($[PAPAA]$) abhängig. Mit der Zeit stellt sich ein Gleichgewicht ein, bei dem die Bildung neuer Komplexe und der Zerfall dieser gleich schnell ablaufen. Dies wird durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben. Im chemischen Gleichgewicht nimmt der Quotient der Geschwindigkeitskonstanten k_d und k_a einen festen für die Reaktion charakteristischen Wert an, die Dissoziationskonstante K_d :

$$K_d = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[PA][PAA]}{[PAAPA]} \quad (3.16)$$

mit den Geschwindigkeitskonstanten k als Proportionalitätsfaktor in der Umrechnung der Reaktionsgeschwindigkeit ν in Aktivität a : $\nu = k a$

Es gilt zu beachten, dass die Dissoziationskonstante K_d von der Temperatur, dem Druck, der Konzentration des Rezeptors und weiteren Bedingungen abhängig ist und somit falls experimentell bestimmt eher als scheinbare Dissoziationskonstante K_D bezeichnet werden sollte. Vorausgesetzt, die Konzentration der Aptamere bleibt während des Experimentes konstant, so kann der Anteil gebundener Aptamere θ (= fraction bound) folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$\theta = \frac{\text{Aptamere}_{\text{gebunden}}}{\text{Aptamere}_{\text{gesamt}}} = \frac{[PAAPA]}{[PAA] + [PAAPA]} \quad (3.17)$$

In Verbindung mit der Gleichung 3.16 ergibt sich daraus das Bindungsmodell:

$$\theta = \frac{[PA][PAA]}{K_D[PAA] + [PA][PAA]} = \frac{[PA]}{K_D + [PA]} \quad (3.18)$$

Der Anteil gebundener Aptamere verhält sich proportional zum Signal S , d.h. die maximale Signaländerung tritt ein, wenn alle Aptamere gebunden

vorliegen und somit ist die Signaländerung proportional zu den gebundenen Aptameren:

$$\theta = \frac{\Delta S}{\Delta S_{max}} = \frac{[PA]}{K_D + [PA]} \quad (3.19)$$

Durch das Fitten der Impedanzsignale konnte gezeigt werden, dass allein der R_{ct} eine signifikante konzentrationsabhängige Änderung aufweist. Um den Einfluss unspezifischer Signale zu minimieren, wurde als Signal die Änderung des R_{ct} verwendet. Die Gleichung kann demnach umgeschrieben werden zu:

$$\theta = \frac{\Delta R_{ct}}{\Delta R_{ct_{max}}} = \frac{[PA]}{K_D + [PA]} \quad (3.20)$$

Dieses simple empirische Modell wurde hierin zur Bestimmung der scheinbaren Affinitätskonstanten K_D verwendet. Dazu wurde die nicht-lineare Kurvenanpassung der Software Sigmaplot verwendet Tabelle 3.1. Die Sensitivität S eines Biosensors wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$S = \frac{\Delta R_{ct}}{\Delta [PA]} \quad (3.21)$$

Die Sensitivität des entwickelten impedimetrischen Aptasensors wurde aus dem Anstieg im Punkt K_D bestimmt. Zur Bestimmung der LoD wurde die Standardabweichung s von R_{ct} einer beschichteten Goldelektrode in $BB + 2 \text{ mM } K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ bestimmt und die Konzentration $[PA]$ für ein Signal der Größe $3s$ mit der Gleichung 3.20 berechnet.

Kapitel 4

Ergebnisse

Dieses Kapitel enthält die Ergebnisse der Arbeit, angefangen beim Aufbau der Messkammer und des Messplatzes. Es wurde eine spezielle Durchflussmesskammer entwickelt und hergestellt. Anschließend wurde die Modifizierung der Arbeitselektrode mit dem Protein A-bindenden Aptamer entwickelt, validiert und die Immobilisierungsdichte bestimmt. Weiterhin wurde die gesamte Messkammer charakterisiert und die Parameter für die Impedanzmessung optimiert.

Mit dem fertigen Aufbau wurde als erstes die Anbindung von Protein A untersucht. Um die Vorgänge an der Elektrodenoberfläche beschreiben zu können, wurden theoretische Betrachtungen der Struktur des Aptamers, des Protein A und deren Bindung gemacht. Die Anbindung von Protein A an das immobilisierte Aptamer wurde mit verschiedenen Methoden validiert. Zudem wurde die Selektivität des Biosensors gegenüber den ähnlichen Proteinen, Protein G und Protein L getestet.

Letztendlich wurden mit dem entwickelten Biosensor Messungen mit *Staphylococcus aureus* durchgeführt. Dafür musste der gesamte Aufbau desinfiziert und in ein S2-Labor verlegt werden, um die Messungen unter den entsprechenden Sicherheitsbedingungen für Pathogene der Risikogruppe 2 durchführen zu können. Leider war es nicht möglich, medizinische Realproben zu testen. Es wurde eine Kalibrationskurve erstellt und Testmessungen mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in Tryptic Soy Broth zeigten eine steigende Impedanz mit steigender Bakterienkonzentration. Die Anwesenheit von *S. aureus* auf der Elektrodenoberfläche konnte mittels Fluoreszenzfärbung validiert werden. Die Selektivität des Biosensors gegenüber anderen Bakterienarten wurde ebenfalls

getestet.

4.1 Entwicklung der Messkammer

Der Biosensor sollte eine Fluidik enthalten, um den Messprozess später automatisieren zu können. Leider wurde die vollständige Automatisierung aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht umgesetzt. Die zeitliche Ansteuerung der Pumpe konnte umgesetzt werden.

Für die effiziente Entwicklung einer Durchflussmesskammer für die elektrochemische Impedanzspektroskopie müssen zahlreiche Faktoren beachtet werden, wie z.B. die Durchmischung der Messzelle, der Einfluss der Fließgeschwindigkeit, die Wahl und Anordnung der Elektroden, die Bildung von Luftblasen, die Temperatur und eventuell auftretende Gradienten, das verwendete Material, Einflüsse der Kontaktierung der Elektroden, die Möglichkeit des Austausches der Elektroden, Dichtigkeit, etc. Auch müssen eventuelle Interdependenzen zwischen den einzelnen Faktoren betrachtet werden. Zudem wurden einige Bedingungen an das System gestellt, die hier aufgelistet werden:

- Geringes Volumen von <1 ml
- Sichtfenster
- 3-Elektrodensystem mit einer Ag/AgCl-Referenzelektrode
- Austauschbare Referenz- und Gegenelektrode
- Sterilisierbar
- Schnell und leicht austauschbare Arbeitselektrode

4.1.1 Fluidik

Für die Entwicklung der Fluidik wurden verschiedene Designs betrachtet und letztendlich die Variante einer kapselförmigen Probenkammer mit Ein- und Auslauf im 140° -Winkel zueinander gewählt (siehe Abbildung 4.1). Die Messkammer wurde für die Durchführung von parallelen Messungen konstruiert und enthält daher zwei identische Probenkammern.

Die untere Fläche der Probenkammer bildet die Arbeitselektrode, die über einen Dichtungsring abgedichtet wird. Durch die längliche schmale Form der Probenkammer konnte die Entstehung von Luftblasen minimiert werden. Die Fläche der Arbeitselektrode in Kontakt mit der Probe beträgt $0,246 \text{ cm}^2$ und

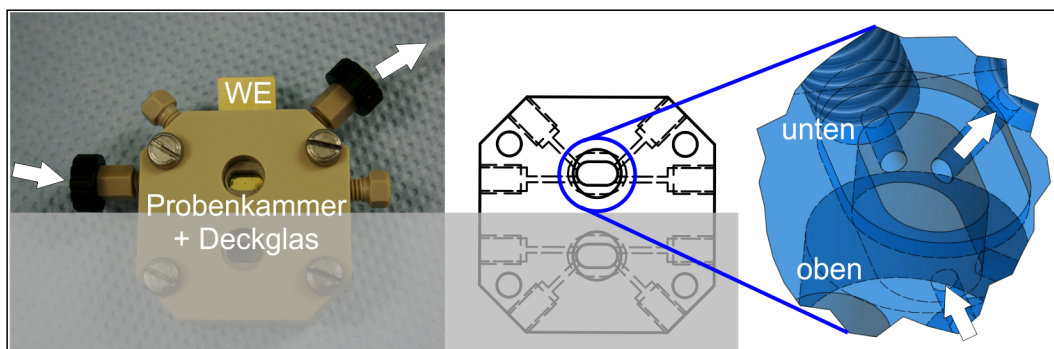


Abbildung 4.1: Fluidiksystem der Messkammer: Foto (links) und schematische Darstellung (rechts) der Messkammer mit der Probenkammer und den vier Bohrungen sowie schematische 3D-Darstellung der Probenkammer - Pfeile markieren Ein- und Auslauf; die WE = Arbeitselektrode befindet sich *unten* und *oben* befindet sich das Deckglas; grau abgedeckt sind die parallelen Probenkammern in der Messkammer, die nicht genutzt wurden.

das Volumen der Probenkammer beträgt $\sim 100 \mu\text{l}$. Die obere Fläche der Messkammer wurde mit einem Sichtfenster aus Glas verklebt (mit Silikonkleber), wodurch die Probenkammer auf Luftblasen kontrolliert und die Arbeitselektrode mit einem Auflichtmikroskop betrachtet werden kann, ohne diese entfernen zu müssen. An der Wand der Probenkammer gibt es vier Bohrungen, von denen zwei als Ein- und Auslauf dienen und die anderen beiden für die Gegen- und Referenzelektrode. Alle vier Bohrungen enthalten ein Gewinde, was das leichte Austauschen der Schläuche und Elektroden ermöglicht. Für detaillierte Informationen siehe auch Unterabschnitt 3.2.1.

Die verwendeten Schläuche für den Zu- und Ablauf sind aus PTFE, ein hydrophobes Material, das die Anhaftung von Substanzen an den Schläuchen minimiert. Die Schläuche wurden mit einem Fitting, einem Ferrule und einem Dichtungsring versehen und anschließend am vorderen Ende leicht aufgebördelt (siehe Abbildung 4.2). Dadurch wird eine dichte Verbindung geschaffen und der Schlauch kann jederzeit leicht entfernt, gereinigt und wieder eingefügt werden.

Der Nachteil von PTFE-Schläuchen ist deren geringe Elastizität, weshalb sie sich nicht für Schlauchpumpen eignen. Daher wurde für die Schlauchpumpe ein Schlauch aus Tygon[®] verwendet und ein Verbinder für den Übergang zwischen den Schläuchen genutzt (siehe Abbildung 4.2). Da Tygon[®] weniger inert ist als PTFE, wurde die Schlauchpumpe am Ende positioniert, nahe des Abfallbehälters und die Flüssigkeiten durch die Messkammer gezogen.

Die Dichtigkeit der Probenkammer wurde geprüft, indem mit einer Pumpe

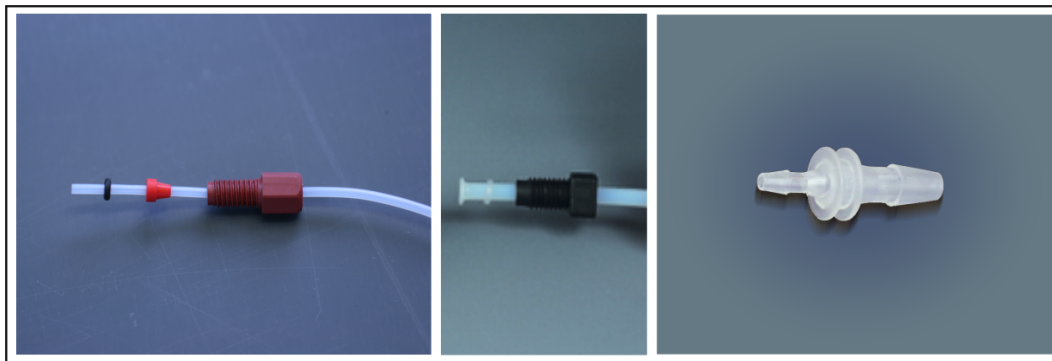


Abbildung 4.2: Links: PTFE-Schlauch mit Hohlschraube (Fitting), Ferrule (rot) und Dichtungsring, Mitte: ein gebördelter Schlauch; Rechts: Schlauchverbinder

Wasser in die Durchflusskammer gepumpt und 10 s lang das Ende des Ausflusses verschlossen wurde. Hielt die Messkammer dem erzeugten Überdruck stand, so war diese hinreichend dicht.

Weiterhin wurde getestet, wie gut die Kammer durchmischt wird und wie lange es dauert, bis ein vollständiger Lösungswechsel stattgefunden hat. Dazu wurde Wasser mit Methylenblau eingefärbt, die Probenkammer damit befüllt und anschließend wiederum mit Wasser verdrängt. Die benötigte Zeit bis die blaue Färbung komplett verschwunden war, wurde gestoppt. Es wurden drei verschiedene Pumpgeschwindigkeiten getestet und jeder Versuch mindestens zweimal durchgeführt. Zudem wurde sowohl die Verdrängung des Methylenblaus als auch der Einlauf getestet. Die Gegen- und Referenzelektrode wurden für diese Versuche entfernt und die Messkammer wurde anschließend gründlich gereinigt, sowie die Schläuche gewechselt. Die Ergebnisse der Verdrängung von Methylenblau bei zwei Pumpgeschwindigkeiten sind als Bilderserien in Abbildung 4.3 dargestellt. Zudem enthält die Abbildung eine Tabelle, in der alle Ergebnisse zusammengefasst sind.

Es zeigte sich, dass bei einer Pumpgeschwindigkeit von $625 \mu\text{l}/\text{min}$ nach 130s, bei $1250 \mu\text{l}/\text{min}$ nach 90 s und bei $1818 \mu\text{l}/\text{min}$ nach 60 s ein kompletter Lösungsaustausch stattgefunden hat, wobei bei $625 \mu\text{l}/\text{min}$ leichte Spuren von blau am Rand der Probenkammer verblieben. Daher wurde für alle folgenden Versuche die Pumpgeschwindigkeit $1818 \mu\text{l}/\text{min}$ verwendet und die Probenkammer jeweils zwei Minuten lang gespült, um einen kompletten Lösungsaustausch zu gewährleisten. Obwohl das Probenvolumen der Kammer nur $100 \mu\text{l}$ beträgt, sind durch die entstehenden Verwirbelungen mindestens 4 ml Probe

notwendig. Vermutlich ließe sich mithilfe von Strömungssimulationen die Messkammer hinsichtlich der Durchmischung und nötigen Volumen optimieren. Dies lag jedoch nicht im Rahmen dieser Dissertation und sollte in weiterführenden Arbeiten betrachtet werden.

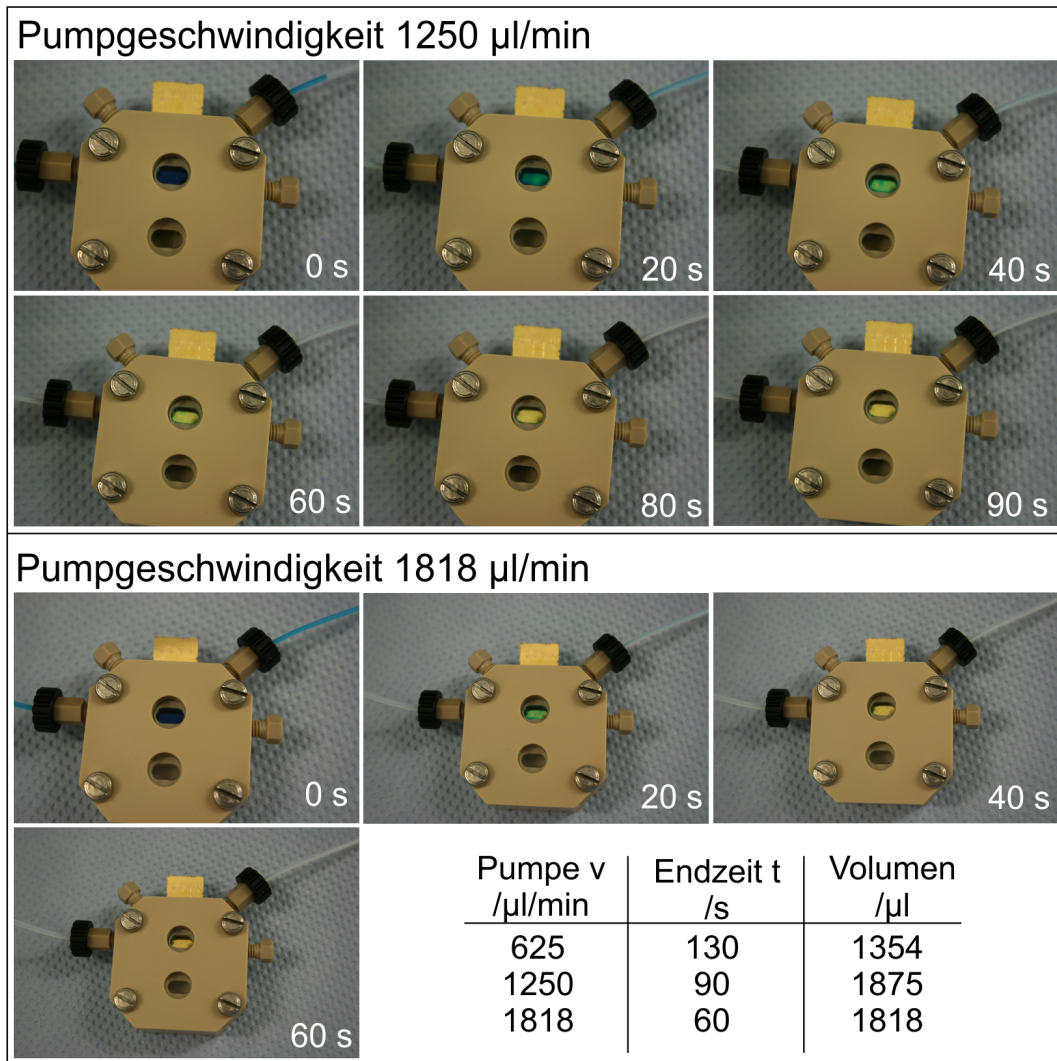


Abbildung 4.3: Versuche zur Durchmischung in der Probenkammer mittels Verdrängung von Methylenblau-gefärbten Wasser bei den Pumpgeschwindigkeiten 1250 $\mu\text{l}/\text{min}$ (oben) und 1818 $\mu\text{l}/\text{min}$ (unten); der Einlauf ist auf der linken Seite, der Auslauf auf der rechten; die Zeit der Aufnahme ist jeweils rechts unten dargestellt; ganz rechts unten sind die Ergebnisse tabellarisch zusammengefasst.

4.1.2 Elektrodensystem

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Entwicklung der Messkammer war die Wahl und Anordnung der Elektroden. Bei der Arbeitselektrode wurden verschiedene Materialien und Formen getestet (siehe Abbildung 4.4).

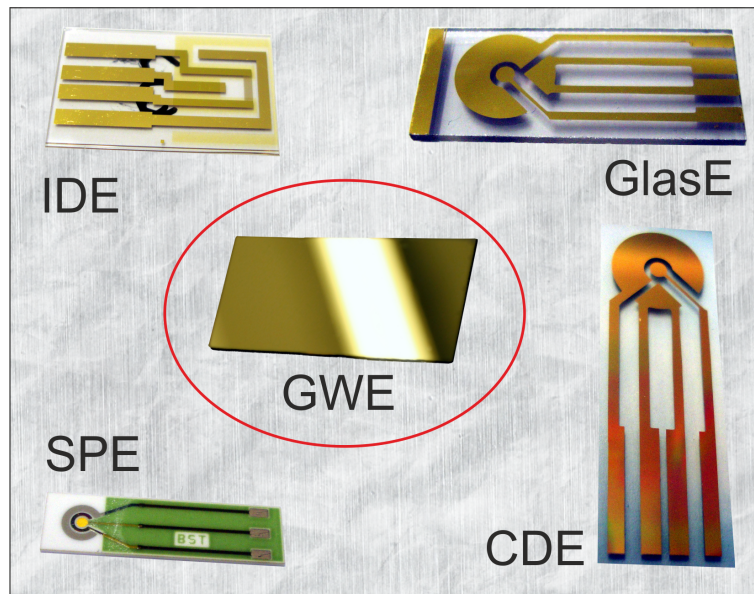


Abbildung 4.4: Übersicht der Elektroden, die für die Entwicklung des Aptasensors betrachtet wurden - Rot eingekreist ist die verwendete Arbeitselektrode, ein goldbesputterter Glasobjektträger mit einer Titanhaftschrift.

Es wurden interdigitale Elektrodenstrukturen (IDE) und aus Gold-CDs mittels Fotolithografie [257] hergestellte Elektroden (CDE) getestet. Bei beiden Varianten waren Gegen- und Referenzelektrode auf dem Träger und aus Gold, aber das hauptsächliche Problem lag in der geringen Stabilität, da nach einigen Reinigungsschritten die Goldelektroden abblättern und die Kontakte hochohmig wurden. Eine höhere Stabilität zeigten mit Gold besputterte Objektträger (GlasE), die mittels der Fotolithografie strukturiert wurden. Allerdings konnten Kanteneffekte und Effekte durch das freigelegte, als Adhäsionsschicht dienende Titan nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde eine Dickschichtelektrode (SPE) untersucht, die eine Arbeitselektrode aus Gold, eine Gegenelektrode aus Platin und eine Silberchloridreferenzelektrode vereint. Die Arbeitselektrode wies eine hohe Rauigkeit auf, die mit der letztendlich gewählten Immobilisierungsmethode via selbst-organisierenden Schichten unvereinbar war. Daher wurde die mit Gold besputterten Objektträger ohne Struk-

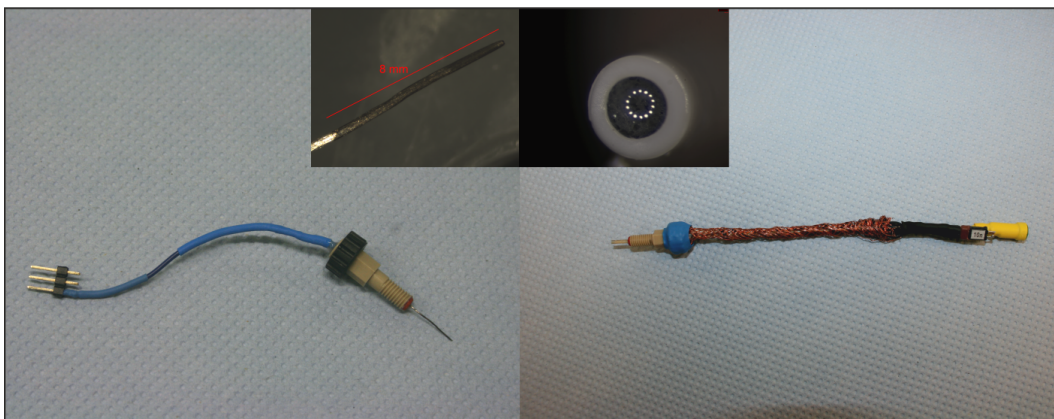


Abbildung 4.5: Gegen- (rechts) und Referenzelektrode (links) des entwickelten impedimetrischen Aptasensors - mit Silikonkleber in die Hohlschrauben eingeklebt; Insets zeigen die 40-fache Vergrößerung der Elektroden

turierung (GWE) als Arbeitselektrode für den impedimetrischen Aptasensor gewählt (siehe Kapitel 3). Der Objektträger hat eine Größe von 7,9 cm x 2,6 cm und wurde auf der Rückseite mit einem Diamantschneider angeritzt, um Arbeitselektroden der Größe 1,2 cm x 2,6 cm abzubereiten. Somit konnten jeweils 6 Arbeitselektroden aus einem Objektträger gewonnen werden.

Zur Vollständigkeit des gewünschten 3-Elektrodensystems wurden externe Gegen- und Referenzelektroden gewählt. Für die elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) ist wichtig, dass bei der Untersuchung von Reaktionen an der Oberfläche der Arbeitselektrode, diese bestimmend gegenüber anderen Effekten sind. D.h. die Gegenelektrode darf den Strom nicht limitieren, sondern muss eine große Stromdichte aufweisen und sollte zudem inert sein, damit keine an deren Oberfläche stattfindenden Reaktionen den Strom limitieren. Für die Gegenelektrode wurde daher ein Platindraht gewählt und mittels Elektrolyse (siehe Abschnitt 3.2.2) platinert, um dessen Oberfläche signifikant zu erhöhen (siehe Abbildung 4.5). Platin ist bekannt für dessen Inertheit gegenüber biologischen Molekülen und die Rauigkeit erhöht die Stromdichte.

Die Wahl der Referenzelektrode fiel aufgrund der Anwendung des Systems in biologischen Lösungen bei neutralem pH auf eine Silber-/ Silberchlorid-elektrode (Ag/AgCl). Um das benötigte Probenvolumen zu minimieren, wurde eine Probenkammer mit Millimeter-Abmaßen entwickelt, wofür eine miniaturisierte Ag/AgCl-Elektrode mit einem Durchmesser von 1-2 mm gefunden werden musste. Allerdings ist das Angebot solcher Ag/AgCl-Elektroden

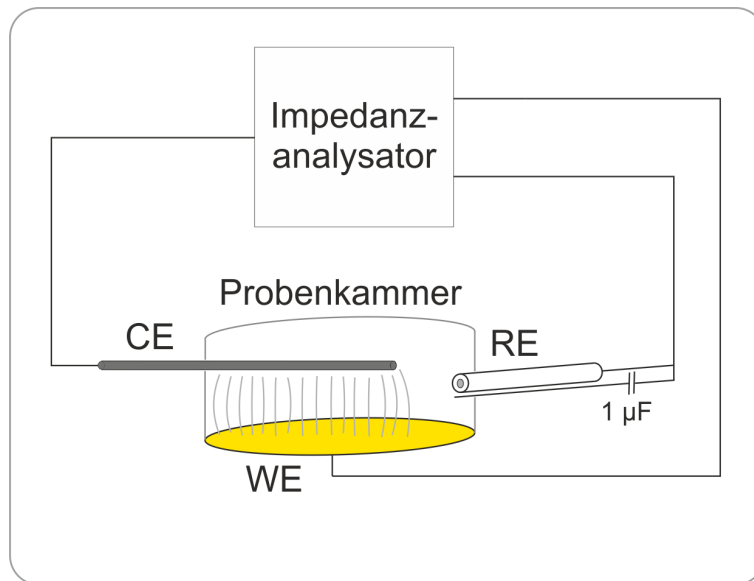


Abbildung 4.6: Anordnung der Elektroden in der Probenkammer - die untere Fläche bildet die Arbeitselektrode aus Gold (WE), die Gegenelektrode, der platinierter Platindraht (CE), befindet sich darüber und die Ag/AgCl- Referenzelektrode (RE) mit dem Kapazitätsbypass von $1 \mu\text{F}$ liegt an der gegenüberliegenden Seite; CE und RE stehen im 140° -Winkel zueinander.

auf dem Markt gering. Nach einigen Fehlversuchen wurde die LF-1 (Unterabschnitt 3.2.2 in Kapitel 3) gewählt, eine Ag/AgCl- Referenzelektrode mit einer neu entwickelten, leitfähigen Fritte, die die Kontaminierung der Probe mit Chlorid- oder Silberionen verhindert. Die Ag/AgCl- Elektrode befindet sich in einem PEEK- Gehäuse gefüllt mit 3,4 M Kaliumchloridlösung und hat einen Durchmesser von 1 mm. Der Widerstand der Referenzelektrode ist mit $30 \text{ k}\Omega$ relativ hoch, wodurch bei hohen Frequenzen Instabilitäten auftraten und der Impedanzanalysator oszillierte. Diese Instabilität konnte mit einer parallelen Kapazität von $1 \mu\text{F}$ an einem Platindraht, ein sogenannter Bypass, ausgeglichen werden (siehe Abbildung 4.6). Für die Untersuchung der Prozesse an der Elektrodenoberfläche sind vor allem die kleinen Frequenzen von Bedeutung.

Als weiteren Punkt musste die Anordnung der Elektroden in der Probenkammer betrachtet werden. Um den Anteil des unkompenzierten Widerstandes R_u des Systems so gering wie möglich zu halten, muss die Referenzelektrode so nah wie möglich an der Arbeitselektrode positioniert werden. Die Gegenelektrode sollte hingegen weit entfernt von der Referenzelektrode positioniert werden und ein möglichst gleichmäßiges elektrisches Feld auf der Arbeitselektrode

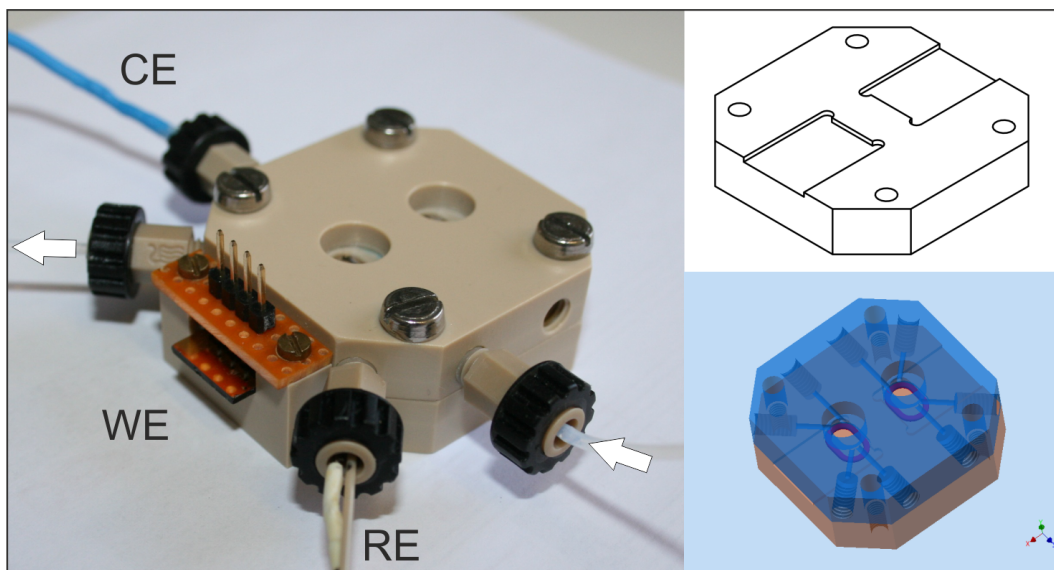


Abbildung 4.7: Foto (links) und 3D-Animation (rechts unten) der aufgebauten Messkammer aus Unterteil (rechts oben) und Oberteil mit Ein- und Ausfluss (Pfeile) und einem 3-Elektrodensystem bestehend aus einer goldenen Arbeitselektrode (WE), einer Gegenelektrode aus Platin (CE) und einer Ag/AgCl-Referenzelektrode (RE).

erzeugen. Und das in einer kleinen Fluidikzelle von $100\ \mu\text{l}$. Bei der letztendlich gewählten Anordnung befindet sich die Referenzelektrode sowohl 3 mm oberhalb der Arbeitselektrode als auch etwa in der gleichen Entfernung zur Gegenelektrode (siehe Abbildung 4.6). Die Gegenelektrode befindet sich 3 mm über der Arbeitselektrode und ragt etwa 5 mm in die Probenkammer, wodurch ein Großteil der Arbeitselektrode ein gleichmäßiges Feld ausbilden sollte. Eine flächige Gegenelektrode wäre gegenüber einem Draht zu bevorzugen, würde allerdings den Einbau eines Sichtfenster unmöglich machen. Der Einsatz von Indium- Zinn- Oxid (ITO) als Arbeits- oder Gegenelektrode würde hier eventuell eine Lösung darstellen.

Der letzte Schritt besteht in der Kontaktierung der Elektroden. An die Referenz- und Gegenelektrode wurden Steckverbindungen angelötet, kompatibel mit den Steckern des Impedanzanalysators. Die goldene Arbeitselektrode GWE soll schnell und einfach austauschbar sein, weshalb hier Federkontakte verwendet wurden, die an einem Adapter vor der Messkammer angebracht wurden (Abbildung 4.7). Durch das Lösen der Schrauben kann die Arbeitselektrode ausgetauscht werden. Die Kabel der Gegen- und Arbeitselektrode wurden zusammengeführt und miteinander verdreht, um durch den gegenläu-

figen Strom, die entstehenden Magnetfelder zu eliminieren.

4.1.3 Aufbau des Messplatzes

Die gesamte Messkammer besteht aus zwei parallelen Probenkammern und misst 4 cm x 4 cm x 1,6 cm (siehe Abbildung 4.7). Sie besteht aus zwei Teilen, einem Unterteil mit zwei Vertiefungen für die Arbeitselektroden und einem Oberteil mit der Fluidik und den Gegen- und Referenzelektroden. Beide Teile sind über Schrauben miteinander verbunden, wobei eine Kerbe am Rand die korrekte Ausrichtung sicherstellt.

Die Messkammer wurde zur Sicherstellung einer konstanten Temperatur während der Messung in eine Temperaturbox gelegt, die gleichzeitig als faradayscher Käfig wirkte. Die Probe und der Messpuffer wurden bis zur Messung ebenfalls in der Temperaturbox aufbewahrt. Das Netzteil der Pumpe verursachte erhebliche Störungen der Impedanzmessung, daher wurde die Pumpe außerhalb der Temperaturbox positioniert, ebenso wie der Abfallbehälter für die Lösungen. Für sehr hochohmige Messungen wurde ein low-current-Adapter verwendet, um die Ströme im nA-Bereich mit hoher Präzision messen zu können.

Die Messungen mit den Bakterien wurden im Labor der Schutzstufe 2 durchgeführt. Dafür wurde das Fluidiksystem den Sicherheitsbestimmungen entsprechend angepasst (siehe Unterabschnitt 3.2.4).

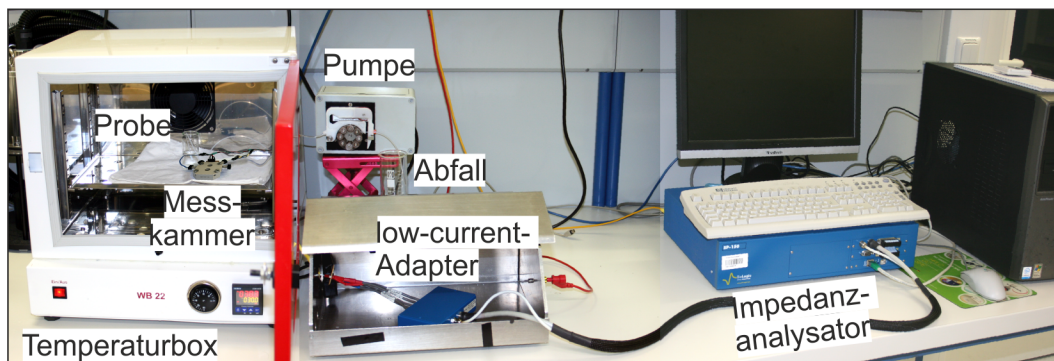


Abbildung 4.8: Aufbau des Messplatzes

4.2 Immobilisierung des Aptamers

In dieser Arbeit wurde die verkürzte Version PA#2/8[S1-58] des Protein A-bindenden Aptamers [198] verwendet, da es in früheren Untersuchungen eine höhere Affinität zu Protein A aufwies. In den Untersuchungen von Stoltenburg et al. wurde das biotinylierte Aptamer auf Streptavidin-modifizierten Oberflächen immobilisiert und mittels optischer Methoden analysiert. Da in dieser Arbeit die Anbindung mittels Impedanzspektroskopie gemessen werden soll, wurde eine andere Immobilisierungsmethode verwendet. Das Aptamer wurde dazu mit einem Thiol und einem Alkan als Spacer modifiziert und direkt als selbstorganisierende Schicht (SAM) auf den Goldelektroden immobilisiert. Diese Immobilisierungsmethode ist kostengünstiger und kann aufgrund der geringeren Komplexität besser modelliert werden. Zudem kann durch die Verwendung von Alkanthiolen mit verschiedenen Kopfgruppen und Kettenlänge Einfluss auf die Eigenschaften der Oberfläche genommen werden. Das wiederum ermöglicht die Untersuchung der Rolle des Elektronentransfers bei der Bindung des Analyten an das immobilisierte Aptamer.

Aufgrund der geänderten Modifizierung sollte zuerst die Funktionalität des Aptamers nachgewiesen werden. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse für die Funktionalität des Aptamers vor und nach der Immobilisierung beschrieben.

4.2.1 Qualität des synthetisierten Aptamers

Das thiolmodifizierte Aptamer PAA wurde in sterilem Wasser gelöst und in Portionen eingefroren. Um die Qualität des Aptamers zu überprüfen, wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) unter stark denaturierenden Bedingungen durchgeführt (mit Harnstoff und Formamid, für Details siehe Unterabschnitt 3.3.1). Zum Vergleich wurden drei verschiedene Aptamere aufgetragen: das biotinylierte Protein A-bindende Aptamer PA#2/8 (PAAlang, 76 nt), das thiolmodifizierte verkürzte PA#2/8[S1-58] (PAAkurz, 58 nt) und das ebenfalls mit einem Thiol modifizierte Daunorubicinaptamer (DRN, 60 nt) aus einem parallel laufenden Projekt am Institut. Es wurde Merkaptoethanol im Verhältnis 50:1 zum Gelladepuffer gegeben, um die Disulfidbrücken aufzutrennen, die sich zwischen zwei Aptameren gebildet haben könnten. Es sind

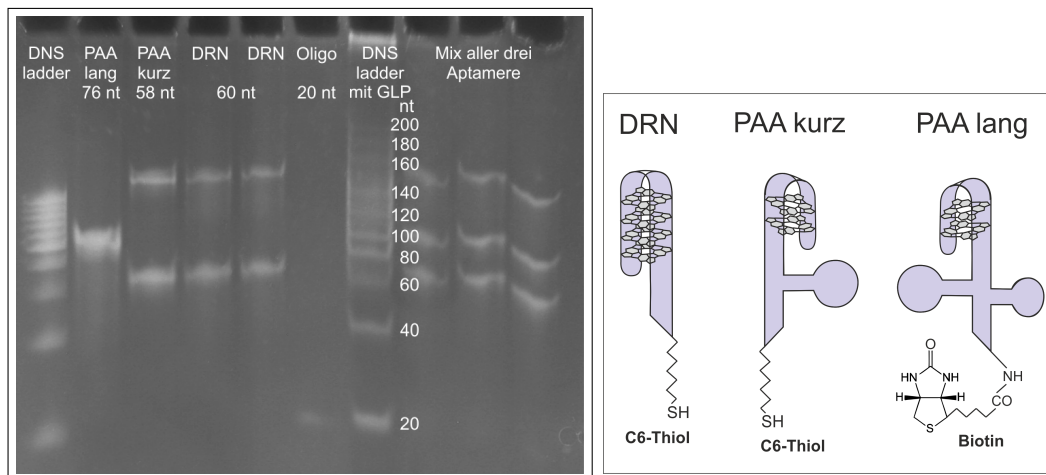


Abbildung 4.9: links: Ergebnis der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese zur Bestimmung der Größe verschiedener Aptamere - von links nach rechts: DNS-Leiter ($5 \mu\text{l}$ unverdünnt), biotinyliertes PA#2/8 (PAA lang), thiolmodifiziertes PA#2/8[S1-58] (PAA kurz), thiolmodifiziertes Daunorubicinaptamer (DRN) 2x, kurzes Kontrolloligonukleotid, DNS-Leiter ($10 \mu\text{l}$ 1:1 verdünnt in Gelladepuffer), dreimal ein Mix aus allen 3 Aptameren. Rechts: Schema einer möglichen Struktur des Aptamers zur Darstellung der unterschiedlichen Größen und Modifikationen der auf dem Gel aufgetragenen Aptamere.

auf dem Gel bei den thiolmodifizierten Aptameren deutlich zwei Banden zu erkennen (siehe Abbildung 4.9), während das mit Biotin modifizierte PAA lang nur eine Bande zeigt. Die unteren Banden der thiolmodifizierten Aptamere PAA kurz und DRN liegen bei 60 nt und repräsentieren somit die als Einzelstrang vorliegenden Aptamere. Die oberen Banden liegen bei etwa 150 nt und könnten somit Dimere (120 nt) repräsentieren, die durch nicht reduzierte Disulfidbrücken entstanden sein könnten. Auch das biotinylierte PAA lang liegt bei etwa 100 nt und somit leicht oberhalb der zu erwartenden Position von 76 nt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die gelieferten Aptamere die zu erwartende Länge haben und ebenfalls aufgereinigt vorliegen, da klare Banden zu erkennen sind. Somit weisen die Aptamere eine hohe Qualität auf. Zudem machen die Ergebnisse deutlich, dass vor der Immobilisierung der thiolmodifizierten Aptamere die Disulfidbrücken reduziert werden sollten. Dafür wurde bei allen folgenden Experimenten Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) eingesetzt.

4.2.2 Bindungsaffinität des thiolmodifizierten Aptamers

Untersuchungen von Stoltenburg et al. [198] zeigten, dass zum einen das Entfernen des 5'-Primers zum Verlust der Affinität des Aptamers führt und zum anderen, dass ein am 5'-Ende immobilisiertes Aptamer zu einer signifikanten Abnahme der Affinität zu Protein A führt. Daher wurde vermutet, dass das frei bewegliche 5'-Ende für die Bindung relevant ist und dementsprechend wurde das 3'-Ende des Aptamers mit dem Alkanthiol modifiziert. Um zu klären, ob das Alkanthiol am 3'-Ende einen Einfluss auf die Bindungsaffinität des Aptamers hat, wurde die Microscale Thermophoresis (MST) verwendet (siehe Unterabschnitt 3.3.2).

Die MST ist eine effiziente Methode zur Untersuchung der Interaktionen von Biomolekülen basierend auf deren Bewegung in einem Temperaturgradienten. Diese Bewegung ist abhängig von der Hydratationshülle, der Ladung und der Größe der Moleküle, also Eigenschaften, die durch die Bindung zweier Moleküle aneinander beeinflusst werden. Für die MST-Messungen wurde das Aptamer am Thiol mit einem Fluorophor markiert und in einer konstanten

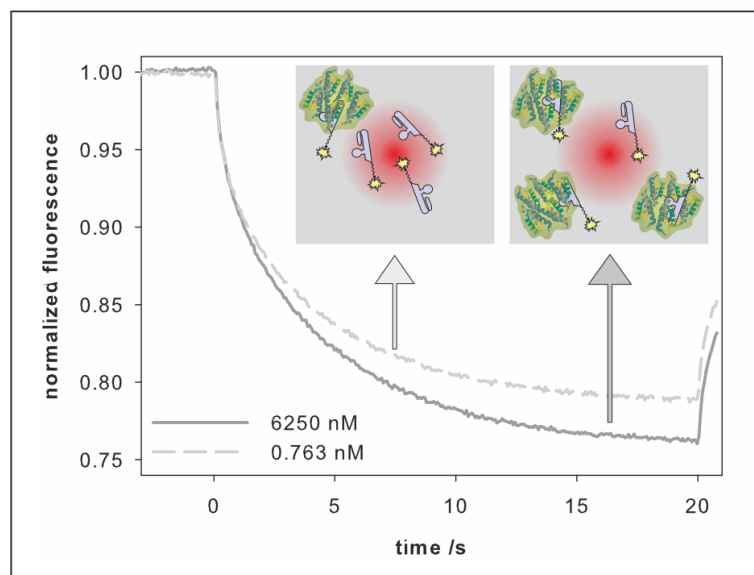


Abbildung 4.10: Prinzip der MST - Fluoreszenzabnahme bei einer MST Messung während der Laser die Probe für 2 s um einige Grad Celsius erwärmt - dargestellt sind die Kurven für eine niedrige (0,763 nM) und eine hohe (6250 nM) Konzentration an rekombinanten Protein A bei konstanter PAA-Konzentration von 38,5 nM; MST Power 40 %, Excitation Power 100 %

Konzentration von 38,5 nM zu 16 verschiedenen Protein A-Konzentrationen (rekombinantes Protein A) gegeben. Die Glaskapillaren der MST wurden mit den Proben befüllt. In der Mitte der Glaskapillare wird die Temperatur mit einem Laser um 2-6°C erhöht und somit ein lokaler Temperaturgradient erzeugt. Anschließend wird die Abnahme der Fluoreszenz durch das migrierende markierte Aptamer aufgenommen. In Abbildung 4.10 ist diese Fluoreszenzabnahme für eine niedrige und eine hohe Protein A-Konzentration gezeigt. Es ist ein signifikanter Unterschied zu erkennen, was bedeutet, dass eine Interaktion zwischen den Molekülen stattfindet.

Es wurde eine Bindungskurve aufgenommen und mit der Gleichung 3.20 (siehe Abschnitt 3.3.9) gefittet:

$$\theta = \frac{\Delta S}{\Delta S_{max}} = \frac{[PA]}{K_D + [PA]} \quad (4.1)$$

mit $\Delta S/\Delta S_{max}$ = normierte Fluoreszenzabnahme, $[PA]$ = Konzentration des Protein A, K_D = scheinbare Dissoziationskonstante

Es wurde eine Dissoziationskonstante von K_D von $22,4 \pm 5,8$ nM bestimmt, die abhängig von der Methode und den Bedingungen des Experimentes ist (wie z.B. Temperatur, pH und Ionenstärke). Im Vergleich zu der Messkurve aus [198] ($K_D = 94,7 \pm 64,6$ nM) ist die gemessene Bindungskurve deutlich zu

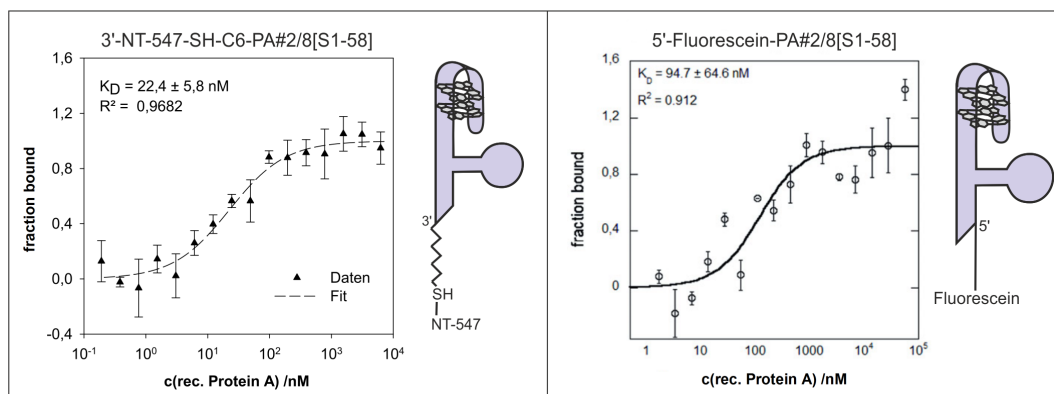


Abbildung 4.11: Vergleich der MST-Bindungskurven des 3'-NT-547-SH-C6-modifizierten PA#2/8[S1-58] (links) und dem 5'-Fluorescein-modifizierten PA#2/8[S1-58] (rechts, aus Stoltenburg et al. [198]) - die Bindungsaffinität wird durch die Modifizierung mit einem Alkanthiol nicht negativ beeinflusst - die scheinbar höhere Affinität ist bedingt durch eine geringere Konzentration des Aptamers (38,5 nM links, 50 nM rechts) und veränderten Pufferbedingungen (0,005 % Tween20 links, 0,05 % Tween20 rechts).

kleineren Konzentrationen verschoben, was die kleinere Dissoziationskonstante widerspiegelt (siehe Abbildung 4.11). Der Grund dafür, wurde zuerst in der Markierung mit einem anderen Fluorophor und der Modifizierung mit dem Alkanthiol vermutet. Die MST-Messungen aus [198] wurden von der Firma 2bind GmbH (Dr. Thomas Schubert, Regensburg, Deutschland) durchgeführt. Um den Einfluss der Markierung zu ergründen, wurden von der 2bind GmbH MST-Messungen mit 3'- und 5'-Thiol-modifizierten PAA und dem Marker NT-547 durchgeführt und dabei Dissoziationskonstanten von 110,8 und 115,6 nM erhalten. Dies zeigt, dass weder die Platzierung noch die Prozedur der Markierung einen Einfluss auf die Affinität der Bindung des freien verkürzten Aptamers PAA haben. Die im MST-Experiment beobachtete höhere Affinität wird der geringeren Aptamerkonzentration (38,5 statt 50 nM) und den veränderten Pufferbedingungen (0,005 % statt 0,05 % Tween20) zugeschrieben.

Weiterhin wurde die MST verwendet, um den Einfluss des für die elektrochemische Impedanzspektroskopie benötigten Redoxmediators $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ auf die Affinität der Bindung zu Protein A zu untersuchen. Dafür wurde eine Bindungskurve in Anwesenheit von 2 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ unter sonst gleich-

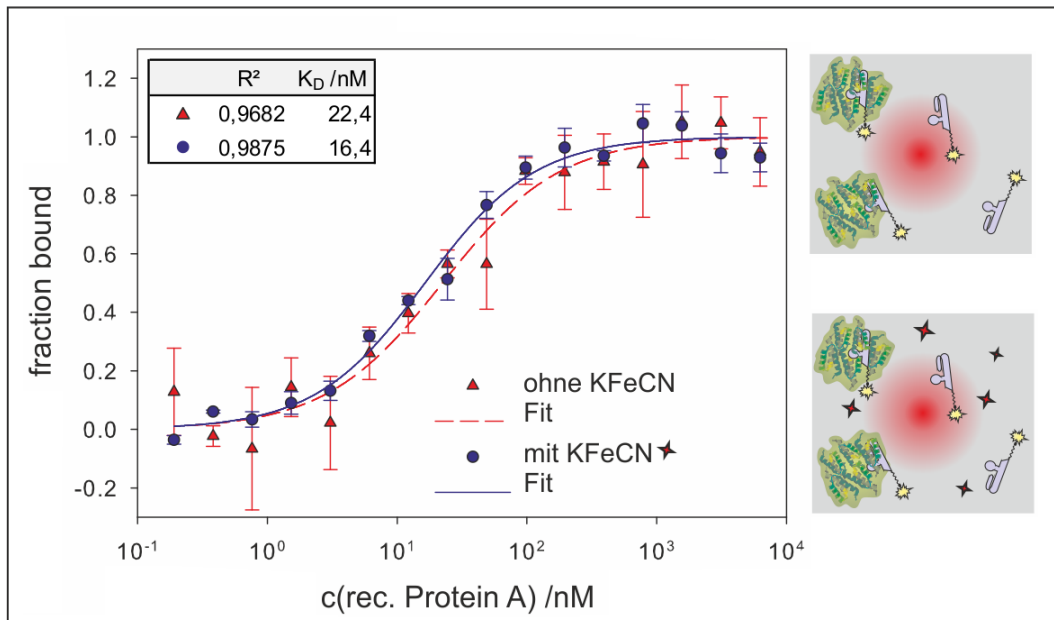


Abbildung 4.12: Vergleich der Bindungsaffinität des Aptamers PAA (markiert mit dem Maleimid-Fluorophor NT-547) in Ab- und Anwesenheit von 2 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ - die Dissoziationskonstanten K_D wurden durch das Fitten der Daten mit dem Bindungsmodell (Gleichung 4.1) bestimmt.

chen Bedingungen aufgenommen (siehe Abbildung 4.12). Die Daten wurden mit dem Bindungsmodell (Gleichung 4.1) gefittet und ergaben eine Dissoziationskonstante von $16,4 \pm 2,5$ nM, die sich nicht signifikant von der Messung in Abwesenheit von $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ unterscheidet, weshalb geschlossen wurde, dass $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ keinen signifikanten Einfluss auf die Affinität der Bindung hat.

4.2.3 Immobilisierung des Aptamers

Im letzten Abschnitt wurde gezeigt, dass die Bindungsaffinität des mit einem Alkanthiol am 3'-Ende modifizierten Protein A-bindenden Aptamers (PAA) in Anwesenheit von 2 mM Kaliumhexacyanoferrat erhalten bleibt. Im folgenden Abschnitt wird die Immobilisierung des Aptamers verifiziert und optimiert und geprüft, ob das immobilisierte Aptamer seine Bindungsfähigkeit erhalten hat. Dazu wurde das thiolmodifizierte PAA über eine Mercaptidbindung auf einer Goldelektrode immobilisiert (siehe Abbildung 4.13).

Alkanthiole $[SH-(CH_2)_n-x]$ bilden die stabilsten selbstorganisierenden Monoschichten (SAM) aus und je länger die Alkylkette n , desto stabiler und ge-

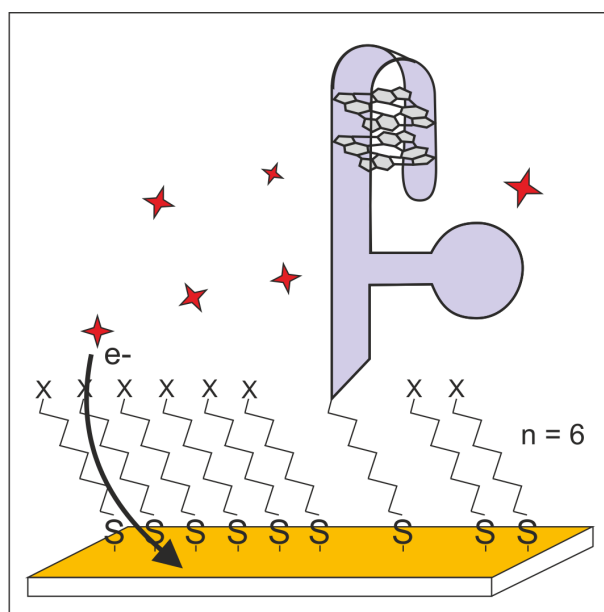


Abbildung 4.13: Schematische Darstellung der Immobilisierung des thiolmodifizierten Aptamers PAA mit einer selbstorganisierenden Monoschicht aus Alkanthiolen. Die roten Sterne symbolisieren den Redoxmediator $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$

ordneter ist die SAM (siehe auch Abschnitt 2.2.2). Die Endgruppe x beeinflusst ebenfalls die Stabilität und Ordnung der SAM und kann gleichzeitig zur aktiven Veränderung der Oberflächeneigenschaften verwendet werden, wie z.B. der Benetzung. So kann man mit hydrophilen Kopfgruppen eine gute Benetzung mit Wasser erreichen. Es ist ebenso bekannt, dass über dünne SAM ein Elektronentransfer möglich ist, während ab $n \geq 11$ die SAM isolierend wirkt. In diesem Fall ist der Elektronentransfer Grundvoraussetzung für die Detektionsmethode, wobei eine möglichst stabile und geordnete SAM mit wenig Defekten das Signal verbessert. Daher wurde die Länge der Alkylkette auf 6 festgelegt, was einen Kompromiss zwischen beiden Bedingungen darstellt.

Optimierung der Oberfläche gegen unspezifische Adsorption

Standardmäßig wird zur Immobilisierung von thiolmodifizierten Oligonukleotiden ein Zweistufenprozess verwendet, bei dem als erstes das thiolmodifizierte Aptamer auf die Goldelektrode gegeben und anschließend in einem zweiten Schritt ein Füllthiol aufgetragen wird. Das Füllthiol dient zum einen dazu, die Aptamere aufzurichten und zum anderen die freien Oberflächen zu füllen, um unerwünschte Reaktionen mit dem blanken Gold zu verhindern. Zur Minimierung der unspezifischen Bindungen ist die Wahl der Endgruppe x dieser Füllthiole von großer Bedeutung. Daher wurde die Adsorption von Protein A auf selbstorganisierenden Monoschichten (SAM) von Alkanthiolen mit $n=6$ und verschiedenen Endgruppen x sowie auf einer blanken Goldelektrode getestet.

Dazu wurde die Quarzkristallmikrowaage (QCM) verwendet, die die Verschiebung der Resonanzfrequenz eines schwingenden Quarzkristalls durch die Anlagerung von Masse misst. Aus den beobachteten Frequenzänderungen wurde mithilfe der Sauerbrey-Gleichung (siehe Gleichung 3.2) die Masseänderung bestimmt.

Die mit Gold beschichteten Quarzchips wurden über Nacht mit der jeweiligen SAM beschichtet. An der QCM wurden die Chips etwa 2-5 Minuten mit einer 400 nM Protein A- Lösung inkubiert und anschließend mit Pufferlösung gewaschen. Die Massenzunahme durch adsorbiertes Protein A ist in Abbildung 4.14 dargestellt.

Es zeigte sich, dass Hydroxylgruppen (-OH) die geringste Adsorption von

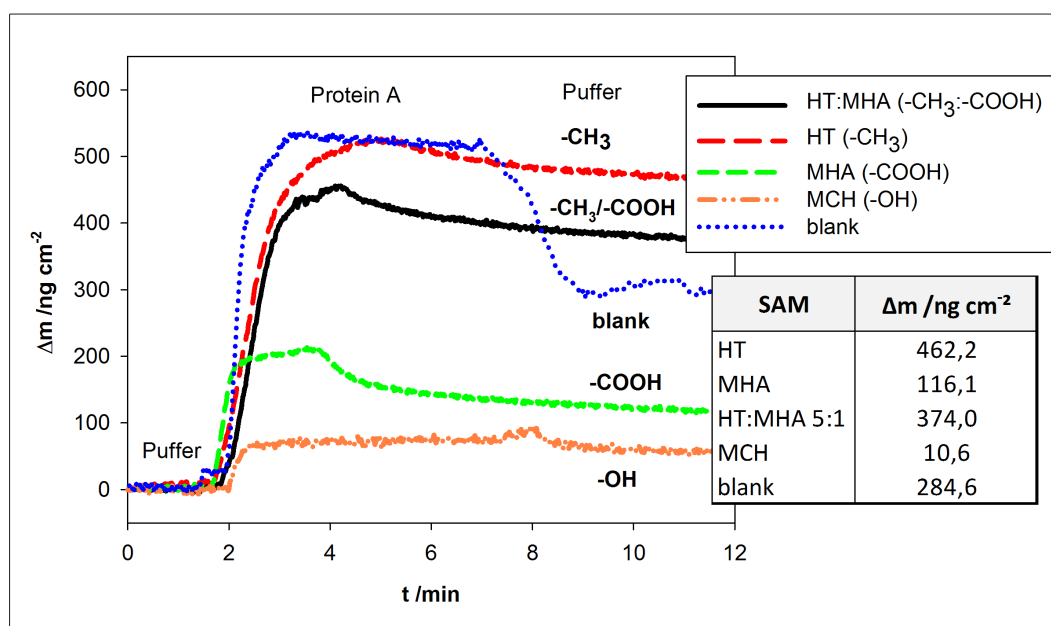


Abbildung 4.14: QCM - Untersuchung der unspezifischen Adsorption von 400 nM Protein A in BB-Puffer auf verschiedenen Alkanthiol-SAMs mit der gleichen Kettenlänge $n=6$ und verschiedenen Kopfgruppen sowie auf einer blanken Goldelektrode.

Protein A aufweisen, während bei hydrophoben Methylgruppen ($-\text{CH}_3$) die größte Massenzunahme zu beobachten war. Die Menge des adsorbierten Protein A auf blankem Gold liegt dazwischen. Anhand dieser Ergebnisse wurde das Merkptohexanol (MCH) $[\text{SH}-(\text{CH}_2)_6-\text{OH}]$ als Füllthiol gewählt.

Verifikation der Immobilisierung mittels der QCM

Weiterhin wurde die Methode der Ko-Immobilisierung genutzt [258], bei der in einem Schritt immobilisiert wird, indem Aptamer und Füllthiol gemischt auf die Goldelektrode gegeben werden. Keighley et al. zeigten, dass dadurch höhere Immobilisierungsdichten erreicht werden konnten. Für die Verifikation dieser Immobilisierungsmethode mit dem Aptamer PAA wurde die Quarzkristallmikrowaage (QCM) herangezogen.

Die Ausbildung einer SAM ist ein zweistufiger Prozess mit einer in Minuten stattfindenden Adsorption der Moleküle auf der Oberfläche und einer über Stunden andauernden Anordnung der Moleküle. Um eine möglichst defektfreie und hoch geordnete SAM zu erhalten, wurde die Immobilisierung über Nacht durchgeführt. Der Immobilisierungsprozess aufgenommen mit der QCM ist in

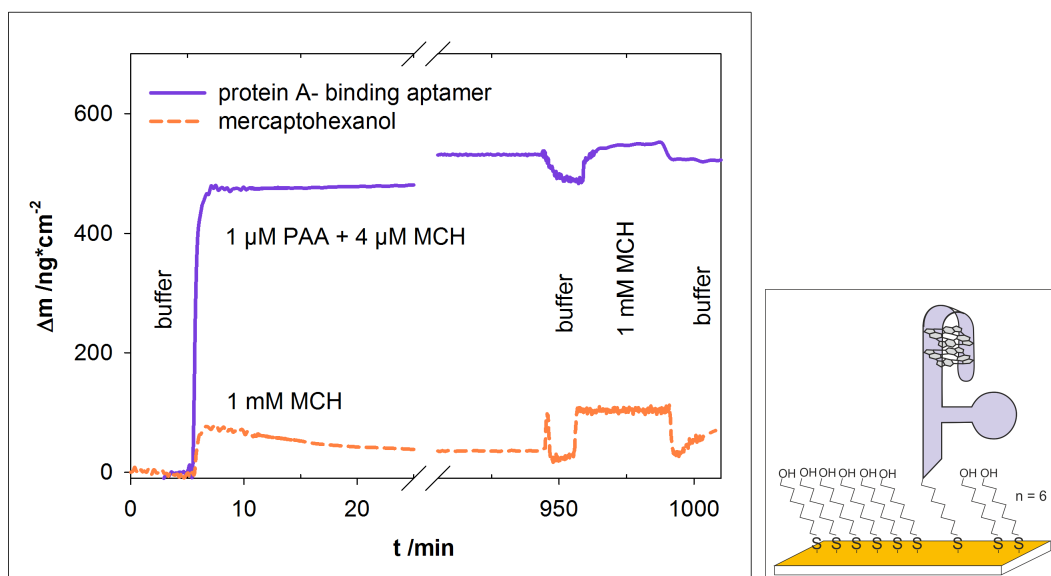


Abbildung 4.15: QCM - Untersuchung der unspezifischen Adsorption von 400 nM Protein A in BB-Puffer auf verschiedenen Alkanthiol-SAMs mit der gleichen Kettenlänge $n=6$ und verschiedenen Kopfgruppen sowie auf einer blanken Goldelektrode.

Abbildung 4.15 dargestellt. Innerhalb der ersten 20 Minuten ist eine Massenzunahme von $\sim 470 \text{ ng/cm}^2$ zu verzeichnen, die sich über Nacht auf $\sim 530 \text{ ng/cm}^2$ erhöht. Durch das Waschen wurden ungebundene Moleküle entfernt, was in einer Massenabnahme von 40 ng/cm^2 resultiert. Durch den Ordnungsprozess der SAM über Nacht sind freie Stellen entstanden, die durch frisches Mercaptohexanol gefüllt und weitere 30 ng/cm^2 angelagert wurden. Eine SAM aus Mercaptohexanol allein weist eine deutlich geringere Massenzunahme von $\sim 70 \text{ ng/cm}^2$ auf.

Dies zeigt, dass das Aptamer über das Thiol an die Goldelektrode immobilisiert werden konnte. Es wurden drei unabhängig voneinander beschichtete Elektroden vermessen und von der detektierten Massenzunahme wurde die Masse der Füllthiole MCH abgezogen, um die Masse der immobilisierten Aptamere zu erhalten. Der bestimmte Mittelwert beträgt $319,9 \pm 138,5 \text{ ng/cm}^2$, aus dem mit der molekularen Masse des Aptamers PAA (19 kDa) die Anzahl der immobilisierten Moleküle berechnet werden kann. Demnach wurden $1 \times 10^{13} \pm 4,39 \times 10^{12}$ Moleküle/ cm^2 immobilisiert, was jedoch nur ein Schätzwert ist, da bei der QCM nicht nur die Masse der Moleküle, sondern auch Viskosität und adsorbierte, angelagerte Ionen bzw. Wasser die Frequenz beeinflussen.

Optimierung der Immobilisierung mit der Chronocoulometrie

Für die Sensitivität des Biosensors ist es wichtig, eine möglichst hohe Dichte der Aptamere auf der Oberfläche zu erhalten und gleichzeitig zu gewährleisten, dass genügend Platz für den Analyten bleibt, damit dieser binden kann. Daher wurde untersucht, welchen Einfluss das Verhältnis von Aptamer zu MCH auf die Immobilisierungsdichte hat. Dazu wurde die Chronocoulometrie (CC) (siehe Unterabschnitt 3.3.5) und die Methode von Steel et al. verwendet [253], mit der die Anzahl der immobilisierten Aptamere über die Ladung der adsorbierten Hexaamin-Ruthenium-chlorid-Ionen (RuHex) bestimmt werden kann (siehe Abbildung 4.16).

Um das Verhalten des RuHex zu überprüfen und die entsprechenden Potentiale für die CC zu bestimmen, wurden Zyklovoltammogramme verschieden beschichteter Goldelektroden aufgenommen (siehe Abbildung 4.17). Der Oxidationspeak des RuHex ist deutlich bei -210 mV zu erkennen, während der Reduktionspeak bei -270 mV zu finden ist. Wie für einen Einelektronenprozess zu erwarten, ergibt sich eine Peakseparation von ~59 mV. Bei der blanken Elektrode finden ebenfalls Interaktionen mit dem Gold statt, zu erkennen am steigenden Reduktionsstrom bei -500 mV. Auch der größere Ladestrom bei der blanken Goldelektrode ist deutlich im Bereich von -100 mV bis 100 mV zu erkennen. Im Falle der beschichteten Elektroden, eine mit Aptamer/MCH (PAA) und eine

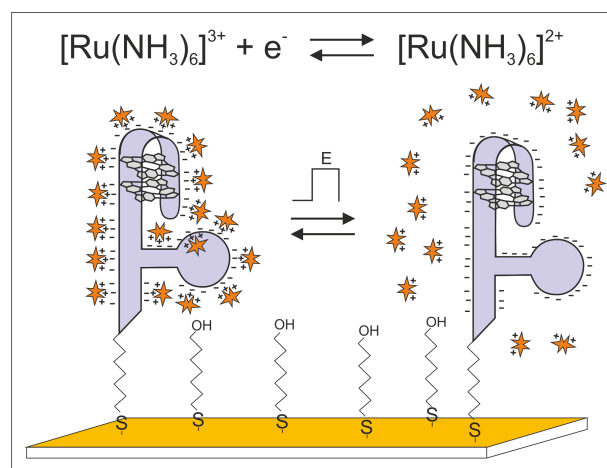


Abbildung 4.16: Schematische Darstellung des Messprinzips der Chronocoulometrie zur Bestimmung der Anzahl der immobilisierten Aptamere. Die Adsorption von RuHex an das Aptamer und dessen Reduktion durch den Potentialsprung.

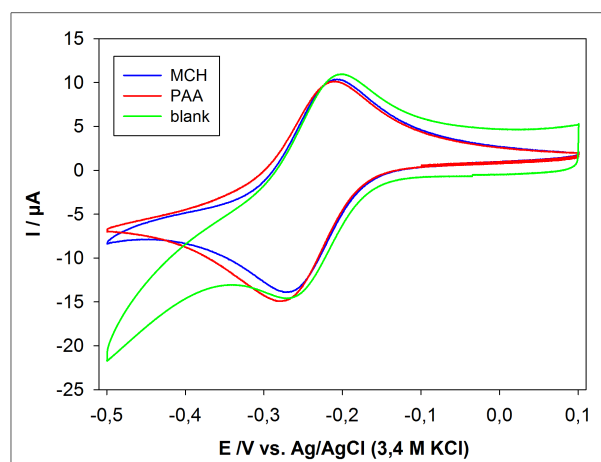


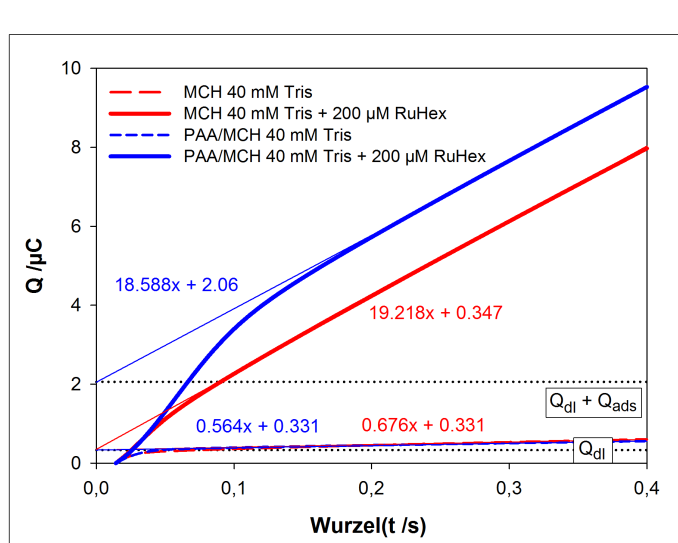
Abbildung 4.17: Zyklovoltammogramme einer blanken Goldelektrode (grün), einer mit Mercaptohexanol (blau) beschichteten und einer mit Aptamer (rot) beschichteten Goldelektrode in 40 mM Tris + 200 μ M RuHex

nur mit Mercaptohexanol (MCH), unterscheidet sich der Bereich oberhalb von -200 mV kaum, jedoch unterhalb dieser Spannung gehen die Graphen auseinander, wobei die mit Aptamer beschichtete Elektrode einen höheren Strom aufweist. Dies ist bereits ein Hinweis auf die Anreicherung der Oberfläche mit RuHex-Molekülen durch deren Adsorption an den Oligonukleotiden. Entsprechend diesen Voltammogrammen wurde das Potential für die CC auf -400 mV gesetzt, um die Reduktion der adsorbierten RuHex-Ionen zu bestimmen.

Bei der CC wurde davon ausgegangen, dass die Adsorption des RuHex am DNS-Strang nur über elektrostatische Interaktionen stattfindet. Weiterhin wurde angenommen, dass die Kompensation der negativen Ladungen entlang des Rückgrats des DNS-Strangs nur durch RuHex erfolgt, d.h. diese müssen frei zugänglich sein und dürfen nicht durch andere adsorbierte Kationen blockiert werden. Zudem müssen alle negativen Ladungen der DNS gesättigt sein, d.h. es müssen ausreichend RuHex-Ionen zur Verfügung stehen. Außerdem sollte die Adsorption von RuHex nur an der DNS erfolgen und nicht an anderen Molekülen oder Oberflächen im Messsystem. Als letztes muss gegeben sein, dass alle adsorbierten RuHex-Ionen elektrochemisch erreichbar sind. Im Folgenden wird erläutert, wie die Gewährleistung dieser Annahmen weitestgehend umgesetzt wurden.

Als erstes wurde die unspezifische Adsorption von RuHex auf einer MCH

Monoschicht untersucht. Dazu wurden Chronocoulometrie-Messungen an Elektroden, beschichtet mit einer MCH Monoschicht, in An- und Abwesenheit des Redoxmarkers durchgeführt. In Abbildung 4.18 ist die aus dem gemessenen Strom durch Integration bestimmte Ladung Q gemäß der integrierten Cottrell-Gleichung gegenüber der Wurzel der Zeit dargestellt. Der lineare Abschnitt der Kurve beschreibt den ersten Teil der Gleichung: die Umsetzung der RuHex Moleküle in Abhängigkeit von der Zeit, bedingt durch die Diffusion der Moleküle aus der Lösung zur Elektrodenoberfläche. Die Interpolation des linearen Abschnitts der Kurve zum Punkt $t=0$ ergibt die Ladung, die beim Anlegen der Spannung sofort umgesetzt wurde und unabhängig von der Diffusion der Moleküle ist. Die Ladung $Q_{t=0}$ für eine MCH Monoschicht in Anwesenheit von RuHex beträgt $0,3474 \mu\text{C}$ und ist nur geringfügig größer als $Q_{t=0}$ in Abwesenheit von RuHex ($0,3312 \mu\text{C}$) (siehe interpolierte Achsenabschnitte der roten Chronocoulometrie-Kurven). Dieser Wert entspricht der Ladung der Doppelschicht Q_{dl} . Die beiden Werte sind nahezu gleich, d.h. es findet keine relevante Adsorption von RuHex an MCH bzw. an andere Komponenten der Messkam-



$$i = \frac{nFAc_j^0 \sqrt{D_j}}{\sqrt{\pi t}} \quad (4.2)$$

$$Q = \frac{2nFA\sqrt{D_0}c_0}{\sqrt{\pi}} \sqrt{t} + Q_{dl} + Q_{ads} \quad (4.3)$$

$$Q_{ads} = nFA\Gamma_0 \quad (4.4)$$

Abbildung 4.18: Links: Chronocoulometriemessungen zur Untersuchung der unspezifischen Adsorption von RuHex auf mit MCH beschichteten Elektroden - CC von MCH (rot) und PAA (blau; $1 \mu\text{M}$ PAA + $4 \mu\text{M}$ MCH) beschichteten Elektroden in 40 mM Tris (gestrichelte Kurven) und in Anwesenheit von $200 \mu\text{M}$ RuHex (durchgezogene Kurven). Regressionsgleichungen der linearen Bereiche der Kurven sind in den entsprechenden Farben dargestellt. Gepunktete Linien markieren die Schnittpunkte der Regressionsgeraden mit der y-Achse. Rechts: Cottrell-Gleichung und deren Integration.

mer statt.

Die Immobilisierung von PAA wurde in Bindungspuffer in Anwesenheit von verschiedenen Kationen, wie Kalium und Magnesium, durchgeführt. Anschließend wurde intensiv mit Wasser, Tris-Puffer und Tris-Puffer mit EDTA gewaschen, um adsorbierte Ionen zu entfernen. Bei der Bildung von Quadruplexen werden zwar Magnesium-Ionen komplexiert, aber diese interagieren mit den Guaninen und nicht mit dem Rückgrat des DNS-Strangs, weshalb Quadruplexe die Chronocoulometriemessungen nicht beeinflussen sollten. In Abbildung 4.18 ist zu erkennen, dass die Ladung $Q_{t=0}$ einer mit Aptamer beschichteten Elektrode in Abwesenheit von RuHex (blau gestrichelte Linie) identisch mit Q_{dl} ist ($0,3308 \mu\text{C}$). Das zeigt, dass keine weiteren Moleküle an der Reaktion beteiligt sind. Die Ladung $Q_{t=0}$ einer PAA/MCH-Monoschicht in Anwesenheit von $200 \mu\text{M}$ RuHex (blaue durchgezogene Linie) ist dagegen signifikant größer ($2,06 \mu\text{C}$), was durch die Ladung der adsorbierten RuHex-Ionen Q_{ads} verursacht wird. Dieser Wert entspricht der Summe aus Q_{dl} und Q_{ads} und letzteres wird zur Bestimmung der Anzahl der immobilisierten Aptamere verwendet.

Weiterhin wurde untersucht, ab welcher Konzentration von RuHex die Oberfläche gesättigt ist. Dazu wurde die Ladung Q_{ads} einer PAA/MCH-Monoschicht in Abhängigkeit von der RuHex-Konzentration aufgenommen (siehe Abbildung 4.19). Ab einer Konzentration von $200 \mu\text{M}$ RuHex tritt die Sättigung ein, daher wurde diese Konzentration in allen folgenden Experimenten verwendet.

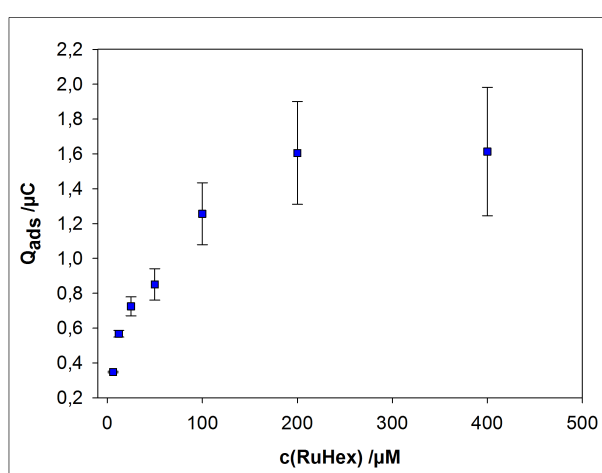


Abbildung 4.19: Ladung der adsorbierten RuHex-Ionen Q_{ads} in Abhängigkeit von der RuHex-Konzentration zur Bestimmung der Sättigung der Oberfläche.

Steel et al. [253] und Guadalupe et al. [259] wiesen nach, dass die elektrochemische Verfügbarkeit nur für dünne Schichten gewährleistet ist. Leider konnte keine Quantifizierung von “dünn” in diesem Zusammenhang in der Literatur gefunden werden. Guadalupe et al. arbeitete mit Polymerschichten und betrachtete hauptsächlich Monolayer, die somit einige nm dünn sind. Keighley et al. verwendete ssDNS mit 18 Nukleotiden (nt) und einem etwa 4 nm langen Thiol-Spacer [258]. Da der mittlere Abstand zweier Basen in Einzelstrang-DNS 0,63 nm beträgt [260], ist deren Monoschicht etwa 15 nm dünn. Steel et al. verwendete 25-Basen lange Oligonukleotide und einen Merkptohexanol-Spacer, die eine Monoschicht mit der Dicke von etwa 16 nm bilden. In dieser Arbeit wurden Aptamere mit 58 nt und einem Merkptohexanol-Spacer verwendet, d.h. die hier gebildeten Monoschichten sind maximal 37 nm lang. Es ist aber mit deutlich dünneren Schichten zu rechnen, da zum einen Ambia-Garrido et al. zeigten [260], dass der mittlere Abstand zweier Nukleotide abnimmt, je länger die ssDNS ist - so ist eine 30 nt ssDNS nur ~10 nm lang statt der zu erwartenden 18,9 nm - und zum anderen wird angenommen, dass das Aptamer einen intramolekularen Quadruplex bildet, was eine deutliche Verdichtung der Struktur bedeutet. Nichtsdestotrotz sind die hier verwendeten Monoschichten dicker als bisher mit der Chronocoulometrie untersuchte Oberflächen, daher wurden Zyklovoltammogramme einer mit PAA/MCH beschichteten Elektrode in 40 mM Tris-Puffer in Anwesenheit von 200 μ M RuHex bei verschiedenen Scanraten aufgenommen (siehe Abbildung 4.20).

Die gemessenen Zyklovoltammogramme zeigen ein reversibles Verhalten, das durch die Randles-Sevcik-Gleichung beschrieben wird:

$$j_p = -2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{\frac{3}{2}} \cdot c_{Ox} \sqrt{D_{Ox} \nu} \quad (4.5)$$

mit der Stromdichte j_p in A/cm², der Anzahl übertragener Elektronen n , der Konzentration der redoxaktiven Moleküle c_{Ox} [mol/cm³], dem Diffusionskoeffizienten D_{Ox} [cm²/s] und der Scanrate ν [V/s].

Mithilfe dieser Gleichung kann die Konzentration der Redoxmoleküle c_{Ox} bestimmt werden. Wären Redoxmoleküle elektrochemisch im Rahmen eines CVs nicht erreichbar, würde sich die berechnete Konzentration von der wirklichen unterscheiden. Die Bestimmung der Konzentration aus Messungen bei 6 verschiedenen Scanraten (5, 10, 50, 100, 500 und 1000 mV/s) mit der Diffusi-

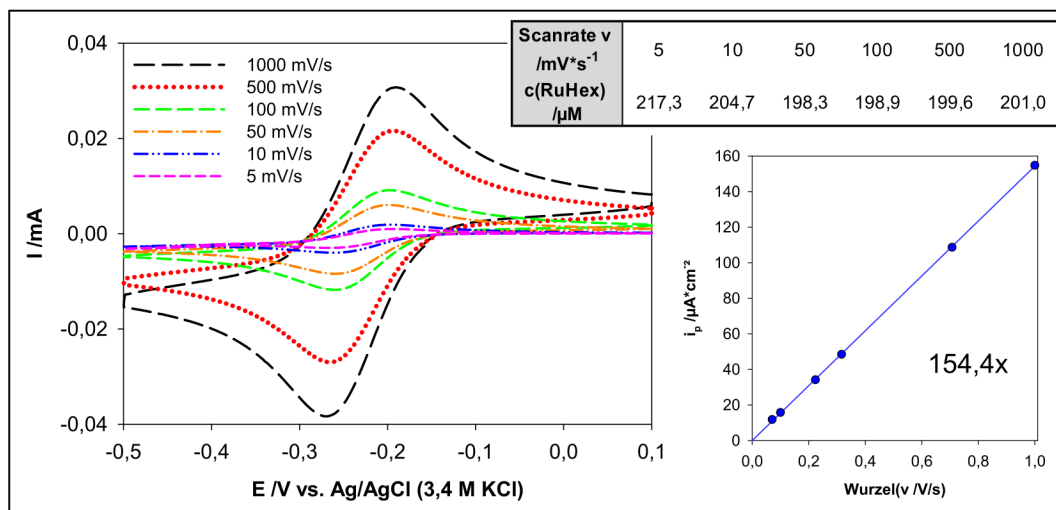


Abbildung 4.20: Links: Zyklovoltammogramme einer mit PAA beschichteten Elektrode in 40mM Tris und 200 μM RuHex bei verschiedenen Scanraten zur Untersuchung der elektrochemischen Verfügbarkeit der adsorbierten RuHex-Ionen an der Elektrodenoberfläche. Rechts: Peakstrom in Abhängigkeit von der Wurzel der Scanrate ν . In der Tabelle sind die aus dem Peakstrom bestimmten Konzentrationen c_{Ox} zusammengefasst.

onskonstanten $D_{\text{Ox}} = 8,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ [261] ergab ein c_{Ox} von $203,3 \pm 7,2 \mu\text{M}$ und entspricht somit sehr genau der eingesetzten Konzentration von 200 μM . Daher ist davon auszugehen, dass alle Redoxmoleküle elektrochemisch erreichbar sind.

Nachdem die Voraussetzungen bestätigt werden konnten, wurde der Einfluss des Verhältnisses von Aptamer zu MCH auf die Immobilisierungsdichte untersucht. Dabei gibt es drei Möglichkeiten, das Verhältnis von Aptamer und MCH zu variieren:

- Die Konzentration des Aptamers PAA wird konstant gehalten und die Konzentration von MCH erhöht, was ebenfalls die Gesamtthiolmenge erhöht
- Die Konzentration von MCH wird konstant gehalten und die Konzentration des Aptamers erhöht, was ebenfalls die Gesamtthiolmenge erhöht
- Die Gesamtthiolmenge wird konstant gehalten und die beiden Konzentrationen von MCH und PAA entsprechend angepasst

Um tatsächlich den Einfluss des Füllthiols auf die Immobilisierung zu sehen und keine Effekte der Aptamerkonzentration, wurde die erste Variante verwendet. Die Aptamerkonzentration wurde konstant bei 1 μM gehalten und die Konzentration von MCH von 1 bis 100 μM variiert. Für jedes Verhältnis wur-

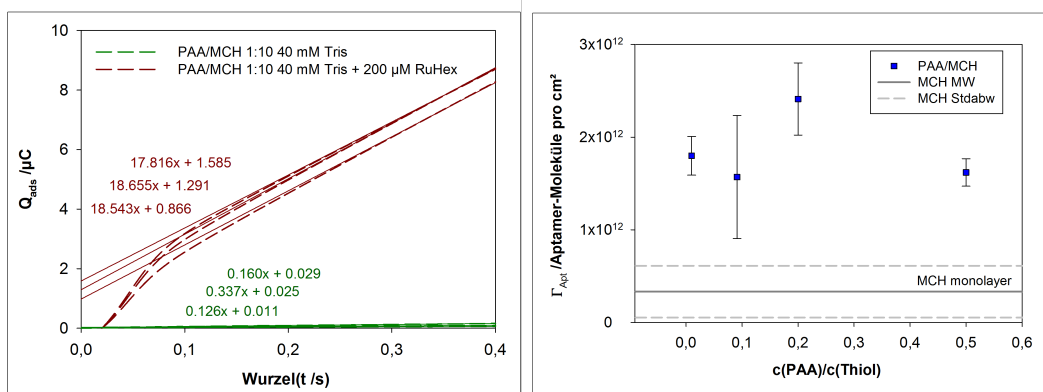


Abbildung 4.21: Links: Chronocoulometriemessung von 3 mit PAA ($1 \mu M$ PAA + $4 \mu M$ MCH) beschichteten Goldelektroden in 40 mM Tris (grün) und in Anwesenheit von $200 \mu M$ RuHex (braun). Regressionsgeraden der linearen Abschnitte sind in den entsprechenden Farben dargestellt. Zur besseren Übersicht wurde Q_{dl} bereits abgezogen und nur Q_{ads} dargestellt. Rechts: Anzahl der immobilisierten Aptamere pro cm^2 in Abhängigkeit von dem Verhältnis von $1 \mu M$ PAA zu verschiedenen Konzentrationen des Füllthiols MCH - Mittelwert und Standardabweichung von jeweils 3 verschiedenen Elektroden und als Vergleich der Mittelwert und die Standardabweichung von sechs mit MCH beschichteten Elektroden; Werte sind in Tabelle 4.1 angegeben.

den mindestens 3 Elektroden entsprechend der Ko-Immobilisierung über Nacht beschichtet und anschließend vermessen. Als Referenz dienten 6 Elektroden, die mit einer MCH-Monoschicht beschichtet wurden. In Abbildung 4.21 sind links die Chronocoulometrieurven für das Verhältnis von PAA zu MCH von 1:10 als Beispiel gezeigt. Zur besseren Übersicht wurde der Mittelwert der Ladung der Doppelschicht Q_{dl} bereits abgezogen.

Die Interpolation des linearen Abschnitts der Kurve ergibt einen Schnittpunkt mit der y -Achse. Dieser Wert entspricht der zusätzlichen Ladung Q_{ads} an der Oberfläche verursacht durch die adsorbierten RuHex-Ionen und wird in der integrierten Cottrell-Gleichung definiert durch [253]:

$$Q_{ads} = nFA\Gamma_0 \tag{4.6}$$

mit n der Anzahl der übertragenden Elektronen ($= 1$), F der Faradaykonstanten und A der Elektrodenfläche, wobei hier die elektrochemisch aktive Fläche gemeint ist sowie Γ_0 die Dichte der adsorbierten RuHex-Ionen in mol/cm^2 .

Die Anzahl der immobilisierten Aptamere Γ_{Apt} kann aus der Anzahl der

Tabelle 4.1: Anzahl immobilisierter Aptamermoleküle in Abhängigkeit von der Konzentration des Füllthiols MCH bestimmt mit der Chronocoulometrie in 40 mM Tris-Puffer und 200 μM RuHex.

	$c(\text{PAA})$ / μM	$c(\text{MCH})$ / μM	$\frac{c(\text{PAA})}{c(\text{Thiol})}$	Γ_{apt} /Moleküle pro cm^2	Stdabw
1:1	1	1	0,50	$1,62 \cdot 10^{12}$	$1,48 \cdot 10^{11}$
1:4	1	4	0,20	$2,41 \cdot 10^{12}$	$3,89 \cdot 10^{11}$
1:10	1	10	0,09	$1,57 \cdot 10^{12}$	$6,63 \cdot 10^{11}$
1:100	1	100	0,01	$1,80 \cdot 10^{12}$	$2,09 \cdot 10^{11}$
0:1	0	1	0,00	$3,33 \cdot 10^{11}$	$2,79 \cdot 10^{11}$

adsorbierten RuHex-Ionen Γ_0 mit folgender Gleichung bestimmt werden [253]:

$$\Gamma_{\text{Apt}} = \frac{Q_{\text{ads}} N_A}{nFA} \frac{z}{m} \quad (4.7)$$

mit z als Ladung des adsorbierten Ions, m der Anzahl der Phosphatgruppen im Aptamer und N_A der Avogadrokonstanten.

In Abbildung 4.21 rechts ist die bestimmte Anzahl der immobilisierten Aptamermoleküle Γ_{Apt} pro cm^2 in Abhängigkeit von dem Verhältnis von Aptamer PAA zu Füllthiol MCH dargestellt. Im Gegensatz zu Keighley et al. konnte hier keine eindeutige Tendenz festgestellt werden, sondern eher ein Schwanken um einen Wert, wobei die Abweichungen zwischen den einzelnen Elektroden durchaus erheblich sind. Die großen Standardabweichungen konnten auch schon bei Keighley et al. beobachtet werden [258]. Die Standardabweichung ist beim Verhältnis 1:1 am kleinsten, aber die höchste Immobilisierungsdichte von $2,41 \cdot 10^{12}$ Aptamere pro cm^2 konnte mit dem Verhältnis 1:4 erreicht werden (siehe Tabelle 4.1). Angenommen, die Aptamere sind gleichmäßig über die Oberfläche verteilt, beträgt der mittlere Abstand zwischen zwei Aptameren 6,44 nm bei dem Verhältnis 1:4. Da der Durchmesser eines globulären rekombinanten Protein A etwa 5 nm beträgt, sollte genügend Platz für die Anbindung vorhanden sein. Daher wurde das Verhältnis 1:4 gewählt und für alle weiteren Versuche verwendet.

Verifikation der Immobilisierung mit der Impedanzspektroskopie

Die Immobilisierung des Aptamers PAA mit der Ko-Immobilisierungsmethode konnte erfolgreich mit der QCM und der Chronocoulometrie verifiziert werden. Die Ko-Immobilisierung von $1 \mu\text{M}$ PAA mit $4 \mu\text{M}$ MCH wird im folgenden Abschnitt mit der Impedanzspektroskopie betrachtet. Die Kurven sind als Nyquist-Plot (Abschnitt 2.4) in Abbildung 4.22 dargestellt, zusammen mit der Kurve einer blanken Goldelektrode und einer mit MCH beschichteten Elektrode als Vergleich. Es sind Messungen von drei mit Aptamer (PAA/MCH) beschichteten Elektroden dargestellt. Diese stammen aus einer Charge, d.h. in einem Batch zur gleichen Zeit in dem gleichen Behälter mit der gleichen Lösung beschichtete Elektroden und zeigen eine geringe Standardabweichung von 106 Ohm. Jedoch ist die Variation von an unterschiedlichen Tagen beschichteten Elektroden sowie bei der Wiederverwendung von gereinigten Elektroden deutlich größer.

Die Kurven zeigen einen halbkreisförmigen Verlauf, was typisch für faradaysche Impedanzen ist, d.h. in Messzellen mit Ladungstransfer. Der Redox-

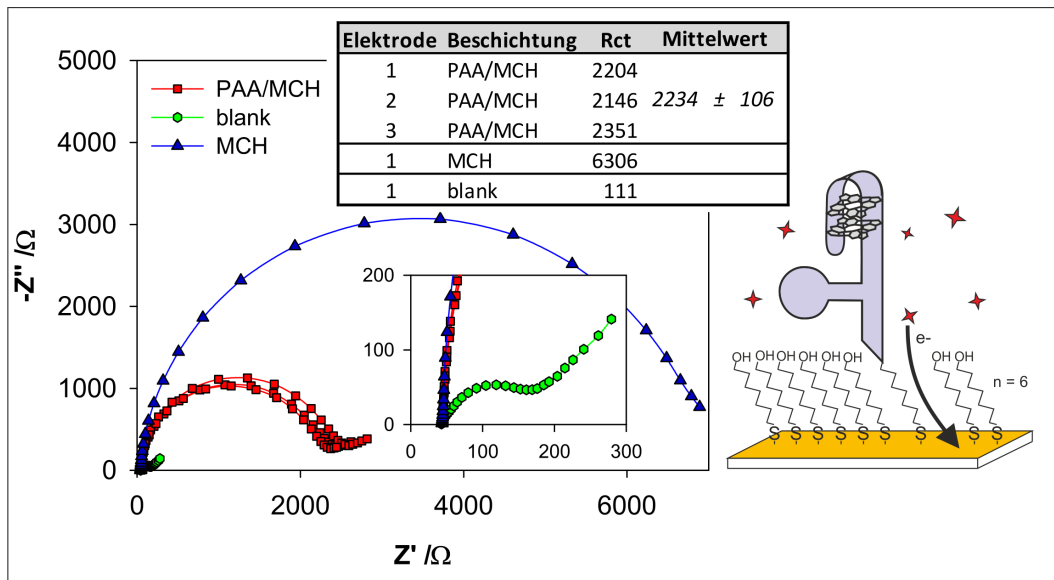


Abbildung 4.22: Nyquist-Diagramm der Impedanzmessung einer blanken (grüne Kreise), einer mit MCH beschichteten (blaue Dreiecke) und einer mit PAA beschichteten Goldelektrode (rote Quadrate) in BB + 2mM $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Das Schema für die Immobilisierung der Aptamere ist rechts dargestellt und die Transferwiderstände sind in der Tabelle zusammengefasst. Die Kurve der blanken Elektrode ist in einem Ausschnitt vergrößert dargestellt.

mediator $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ ermöglicht den Ladungstransfer zwischen Elektrode und Lösung bei niedrigen Spannungen. Die Kurve der blanken Goldelektrode (grüne Hexagone) zeigt zudem eine typische Warburg-Gerade bei niedrigen Frequenzen, die einen Winkel von 45° aufweist und die Diffusion der Ladungsträger zur Elektrode beschreibt (Abschnitt 2.4). Der Durchmesser des Halbkreises gibt den Ladungstransferwiderstand R_{ct} wieder. Durch das Fitten der Kurven mit dem entsprechenden Ersatzschaltbild (siehe Unterabschnitt 3.3.9), dem modifizierten Randles-Schaltbild, wurden konkrete Werte für R_{ct} erhalten, die in der Tabelle in Abbildung 4.22 zusammengefasst sind. Durch die Beschichtung der Elektrode mit MCH steigt der Ladungstransfer deutlich von 111 Ohm auf 6306 Ohm an, da $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ durch die Beschichtung nur noch bedingt nah genug an die Elektrode gelangt, um Elektronen auszutauschen. Die mit Aptamer beschichteten Elektroden weisen einen R_{ct} von 2234 ± 106 Ohm auf und liegen somit zwischen den Werten für die blanken und die MCH beschichteten Elektrode. Vermutlich stören die Aptamere die Ausbildung einer geordneten SAM und verursachen Defektstellen. Damit liegt die Vermutung nahe, dass der Ladungstransfer hauptsächlich in der Nähe der Aptamere stattfindet. Anhand der aufgenommenen Impedanzdaten kann der Belegungsgrad θ_{ct} bestimmt werden. Eine gute Abschätzung wird durch das Verhältnis der Elektronentransferwiderstände R_{ct}^{blank} der blanken und R_{ct}^{mod} der beschichteten Elektrode erhalten [262]:

$$\theta_{ct} = 1 - \frac{R_{ct}^{blank}}{R_{ct}^{mod}} \quad (4.8)$$

Daraus ergibt sich ein Belegungsgrad von 95 % für die PAA-beschichteten Elektroden, während die MCH beschichteten Elektroden einen Belegungsgrad von 98 % aufweisen. Die Annahme, dass die Aptamere Defektstellen in die MCH-Monoschicht induzieren und der größte Anteil des Ladungstransfers über die Stellen stattfindet, an denen Aptamere immobilisiert sind, entspricht dem Mikroelektrodenarray-Modell von Finklea et al. [263]. Dabei wird vorausgesetzt, dass der Belegungsgrad größer 90 % ist, was für die PAA/MCH-Elektrode gezeigt werden konnte.

Basierend auf den Vorarbeiten von Amatore et al. [264] und Gueshi et al. [265] beschreiben Finklea et al. einen Ansatz zur **Bestimmung der Größe der Defekte** aus dem Realteil der Impedanz einer beschichteten Elektrode.

Die Defekte werden dabei scheibenförmig modelliert, bestehend aus einer kreisförmigen aktiven Region mit dem Radius R_a und einer umgebenen inaktiven Region mit dem Radius R_0 . Finklea et al. betrachteten den Real- und Imaginärteil der Impedanz für die Grenzfälle, wo die Frequenz f signifikant größer oder kleiner ist als q , der Punkt, an dem die beiden Bereiche ineinander übergehen [263]:

$$f \gg q$$

$$Z'_t = \frac{R_{ct}}{1 - \theta} + \frac{A_w}{\sqrt{\omega}} + \frac{A_w}{(1 - \theta)\sqrt{\omega}} \quad (4.9)$$

$$Z''_t = \frac{A_w}{\sqrt{\omega}} + \frac{A_w}{(1 - \theta)\sqrt{\omega}} \quad (4.10)$$

$$f \ll q$$

$$Z'_t = \frac{R_{ct}}{1 - \theta} + \frac{A_w}{\sqrt{\omega}} + \frac{A_w R_a \sqrt{\frac{0,72}{D}}}{1 - \theta} \quad (4.11)$$

$$Z''_t = \frac{A_w}{\sqrt{\omega}} \quad (4.12)$$

In Abbildung 4.23 sind die Real- und Imaginärteile der in Abbildung 4.22 dargestellten Impedanzspektren für blanke, MCH- und mit PAA- beschichtete Elektroden gegenüber $1/\sqrt{\omega}$ dargestellt. Die Kurven wurden hinsichtlich des unkompenzierten Widerstandes R_u korrigiert (siehe Abschnitt 4.3.2).

Laut der Gleichung 4.12 entspricht der Anstieg des imaginären Teils der Impedanz einer blanken Elektrode bei sehr kleinen Frequenzen ($f \ll q$) dem Warburgkoeffizienten A_w . Die Kurven der blanken Elektrode (grün) sind in der rechten Grafik vergrößert dargestellt und es konnte ein A_w von $252,62 \text{ Ohm s}^{-1/2}$ bestimmt werden. Der durch Fitten der Kurve erhaltene Warburgkoeffizient beträgt $250 \text{ Ohm s}^{-1/2}$ und stimmt somit sehr gut überein.

Weiterhin kann aus dem Anstieg der Kurven des Realteils der Impedanz im mittleren Frequenzbereich ($f \gg q$), d.h. von 10 bis 1000 Hz und dem bestimmten Warburgkoeffizienten der Belegungsgrad θ entsprechend der Gleichung 4.10 bestimmt werden. Damit ergibt sich für die PAA/MCH-beschichtete Elektrode ein Belegungsgrad von 99,19% und für die MCH Elektrode ein Wert von

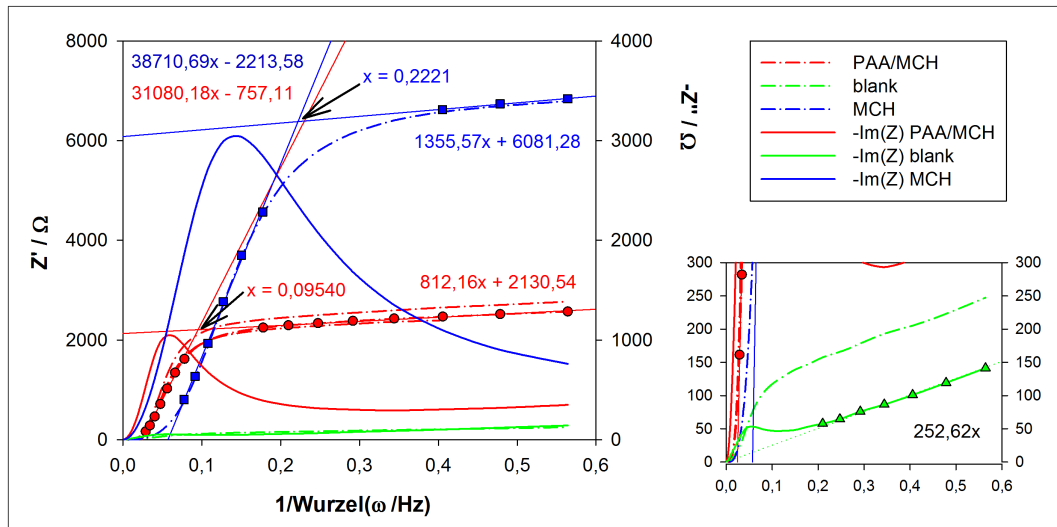


Abbildung 4.23: Bestimmung des Belegungsgrades θ nach Finklea et al. [263] - Darstellung der Real- (Z') und Imaginärteile (Z'') der Impedanzkurven aus Abbildung 4.22 gegenüber $1/\sqrt{\omega}$. Aptamer-modifizierte Elektroden (rot), mit MCH beschichtete Elektroden (blau) und blanke Elektroden (grün). Die Symbole markieren die linearen Bereiche, die zur Bestimmung der Regressionsgleichungen verwendet wurden. Die Pfeile markieren den Schnittpunkt S der Regressionsgeraden und den dazugehörigen x-Wert $1/\sqrt{\omega_S}$. Die Kurven für die blanke Elektrode sind rechts vergrößert dargestellt.

99,35 %. Die Warburgkoeffizienten A_w der beschichteten Elektroden unterscheiden sich jedoch von dem Wert der blanken Elektrode. Verwendet man die durch das Fitten der Kurven erhaltenen Warburgkoeffizienten von $664 \text{ Ohm s}^{-1/2}$ und $868 \text{ Ohm s}^{-1/2}$ für die Aptamer und MCH beschichteten Elektroden, so werden Belegungsgrade von 97,82 % und 97,71 % erhalten. In beiden Fällen sind die Differenzen zwischen den beiden sehr gering, was auf sehr wenige oder kleine Defekte, verursacht durch das Aptamer, hinweist.

Tokuda et al. [266] untersuchten teilweise bedeckte Elektroden und entdeckten, dass die Kreisfrequenz ω_S im Schnittpunkt S der interpolierten Geraden bei hohen und kleinen Frequenzen des Realteils der Impedanz mit der Größe der Mikroelektroden R_a zusammenhängt. Finklea et al. hat diesen Zusammenhang aufgegriffen und folgende Gleichung entwickelt:

$$\omega_S = \frac{D}{0,72 R_a^2} \quad (4.13)$$

mit der Diffusionskonstante D für $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ von $6,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ [267]

Für die mit Aptamer und MCH beschichteten Elektroden ergeben sich damit Werte für R_a von $2,87 \mu\text{m}$ und $6,67 \mu\text{m}$. Dies würde bedeuten, dass die aktiven Regionen bei der mit Aptamer beschichteten Elektrode etwa halb so groß sind wie bei der MCH beschichteten Elektrode. Aus dem Quadrat des Verhältnisses der Radien des aktiven R_a und des inaktiven R_0 Bereiches der Mikroelektrode ergibt sich die Belegung θ der Elektrode wie folgt:

$$\theta = 1 - \frac{R_a^2}{R_0^2} \quad (4.14)$$

Daraus ergeben sich für die mit Aptamer und MCH beschichteten Elektroden entsprechend Werte für R_0 von $19,40 \mu\text{m}$ und von $44,06 \mu\text{m}$. D.h. die Defektstellen sind zwar bei der mit MCH beschichteten Elektrode größer, aber auch weiter voneinander entfernt. Weiterhin lässt sich aus den Zahlen bestimmen, dass bei der mit Aptamer beschichteten Elektrode etwa 4 mal mehr Defektstellen vorhanden sind als bei der MCH Elektrode.

Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass die Defektstellen auf den beschichteten Elektroden in der Größenordnung von μm liegen. Kim and Bard [268] untersuchten Goldoberflächen beschichtet mit selbstorganisierende Monoschicht (SAM) mit dem Rastertunnelmikroskop und konnten Durchmesser der Defekte von 1-5 nm messen. Um Werte für R_0 und R_a im nm-Bereich aus den Gleichungen nach Finklea et al. zu erhalten, sind jedoch sehr hohe Frequenzen nötig ($>36 \text{ MHz}$). Die Untersuchung, wie aus der Impedanz die Größe der Regionen bestimmt werden kann, an denen Ladungstransfer stattfindet, geht über das Ziel dieser Arbeit hinaus und sollte in weiterführenden Arbeiten betrachtet werden.

Verifikation der Bindungsfähigkeit des immobilisierten Aptamers

Nachdem die Immobilisierung optimiert wurde, sollte nachgewiesen werden, dass das auf diese Weise immobilisierte Aptamer PAA seine Bindungsfähigkeit zu Protein A beibehalten hat. Dazu wurde die Quarzkristallmikrowaage (QCM) verwendet und ein mit dem Aptamer PAA modifizierter Goldchip (Ko-Immobilisierung 1:4 mit MCH) mit verschiedenen Protein A Konzentrationen inkubiert und die resultierende Masseänderung aufgenommen wurde (siehe Abbildung 4.24).

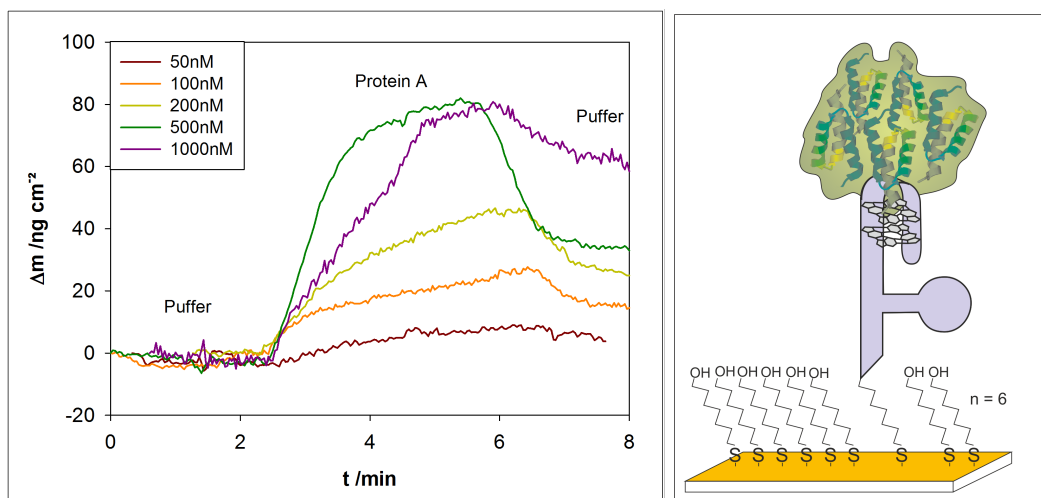


Abbildung 4.24: Links: QCM-Messung – Inkubation von PAA modifizierten Goldelektroden mit rekombinanten Protein A in verschiedenen Konzentrationen. Rechts: Schemata der Anbindung

Es ist deutlich zu erkennen, wie die Masse mit steigender Protein A Konzentration zunimmt. Dies zeigt, dass Protein A an das immobilisierte Aptamer bindet.

4.3 Charakterisierung

In diesem Abschnitt wird das Messsystem charakterisiert und optimiert. Dafür wurden als erstes die Elektroden einzeln, dann die Durchflussmesskammer mit den eingebauten Elektroden charakterisiert und letztendlich das Gesamtsystem bezüglich der für die Messung wichtigen Parameter betrachtet und optimiert.

4.3.1 Charakterisierung der Elektroden

In einem Impedanzmesssystem sind die Elektroden das wichtigste und die Qualität der Messung hängt wesentlich von der Qualität und Funktionalität der Elektroden ab. Die hohe Qualität und Funktionalität der verwendeten Elektroden wird in diesem Abschnitt gezeigt.

Referenzelektrode

Eine Referenzelektrode zeichnet sich dadurch aus, dass sie ein über die Zeit konstantes definiertes Potential hat. Nur wenn das Potential an der Referenzelektrode konstant ist, kann auch die Spannung an der Arbeitselektrode konstant gehalten werden. Diese Voraussetzung wurde für die in dieser Arbeit verwendete Silber-/Silberchlorid- (Ag/AgCl-) Referenzelektrode (LF-1b, Innovative Instruments) geprüft, indem das zu erwartende Potential berechnet und anschließend gemessen wurde. Dazu wurde diese gegen eine Wasserstoffelektrode (NHE, Hydroflex[®] von Gaskatel) gemessen. Die NHE wurde in eine 1 M HCl und die LF-1b in eine 3 M KCl getaucht und beide wurden über eine Salzbrücke mit gesättigter KNO₃ (= 3,13 M) verbunden.

Das Potential einer Halbzelle kann mit der Nernst-Gleichung berechnet werden (siehe Gleichung 2.9 in Abschnitt 2.4). Das in dieser Arbeit verwendete Messsystem mit der Referenzelektrode LF-1b weicht von den Standardbedingungen ab. So ist die Konzentration des Füll elektrolyten der LF-1b 3,4 M KCl und die Messtemperatur beträgt 21°C. Unter Einbezug der veränderten Bedingungen ergibt sich laut Gleichung 2.11 ein Potential $E_{\text{Ag/AgCl}}$ von 199,67 mV.

Das Potential der gesamten Zelle setzt sich aus den Halbzellenpotentialen und der Summe aller “liquid junction”-Potentiale zusammen:

$$E_{\text{Zelle}} = E_{\text{Kathode}} - E_{\text{Anode}} + E_{lj} \quad (4.15)$$

Das “liquid junction”-Potential ist der Potentialabfall am Übergang einer Lösung in eine andere, wie z.B. an der Fritte der Referenzelektrode. Das bedeutet, in dieser Messzelle setzt sich das Potential aus den Halbzellenpotentialen der Ag/AgCl-Referenzelektrode und der Wasserstoffelektrode ($E_{\text{H}_2\text{Ref}} = 0$) sowie den drei “liquid junction”-Potentialen an den Übergängen 3,4 M KCl || 3 M KCl || 3,13 M KNO₃ || 1 M HCl zusammen. Unter der Annahme, dass

die Aktivität der Ionen deren Konzentration entspricht, lässt sich das “liquid junction”-Potential mit der Henderson-Gleichung abschätzen [269, 270]:

$$E_{lj} = \frac{\sum |z_{kat}| \mu_{kat} [c_{kat}(sol2) - c_{kat}(sol1)] - \sum |z_{an}| \mu_{an} [c_{an}(sol2) - c_{an}(sol1)]}{\sum z_{kat}^2 \mu_{kat} [c_{kat}(sol2) - c_{kat}(sol1)] + \sum z_{an}^2 \mu_{an} [c_{an}(sol2) - c_{an}(sol1)]} \frac{RT}{F} \ln \frac{\sum z_{kat}^2 \mu_{kat} c_{kat}(sol1) + \sum z_{an}^2 \mu_{an} c_{an}(sol1)}{\sum z_{kat}^2 \mu_{kat} c_{kat}(sol2) + \sum z_{an}^2 \mu_{an} c_{an}(sol2)} \quad (4.16)$$

Mit z = Ladung des betrachteten Ions, μ = Mobilität des betrachteten Ions, c = Konzentration

Damit wurden mit den in [271] angegebenen Mobilitäten folgende “liquid junction”-Potentiale für das betrachtete System bestimmt:

$$E_{lj1}(3,4 MKCl || 3 MKCl) = +0,059 mV \quad (4.17)$$

$$E_{lj2}(3 MKCl || 3,13 MKNO_3) = -0,964 mV \quad (4.18)$$

$$E_{lj3}(3,13 MKNO_3 || 1 MHCl) = +15,385 mV \quad (4.19)$$

$$E_{lj} = E_{lj1} + E_{lj2} + E_{lj3} = +14,48 mV \quad (4.20)$$

$$E_{Zelle} = 199,67 mV - 0 mV + 14,48 mV = +214,15 mV \quad (4.21)$$

In der Literatur [272] wird ein Wert von 207,92 mV (gemessen gegen eine NHE bei 21°C mit $c(KCl) = 3,5 M$, inklusive “liquid junction”-Potential) angegeben. Die Abweichung zum berechneten Wert von 214,15 mV ist zum einen durch die Konzentration des Füllelektrolyten von 3,4 M KCl (statt 3,5 M) und zum anderen durch Ungenauigkeiten bei der Berechnung des “liquid junction”-Potentials zu erklären, da mit Konzentrationen statt mit Aktivitäten gerechnet wurde. Zudem wurde die Mobilität der Ionen in der Salzbrücke mit der in Lösung gleichgesetzt und es wurden weitere auftretende Effekte, wie sie z.B. in [273] beschrieben werden, nicht betrachtet.

Die Messung des Potentials der Referenzelektrode versus eine Wasserstoffelektrode ist in Abbildung 4.25 zu sehen. Das Potential startet bei 211,7 mV und sinkt langsam etwas ab. Über die ganze Zeit von 25 Minuten ergibt sich ein Wert von $210,21 \pm 0,41 mV$. Um die Einstellungsphase am Anfang zu verkürzen, wird die Elektrode immer in dem Messpuffer vorequilibriert. Das gemessene Potential (210,21 mV) stimmt gut mit dem rechnerisch bestimmten

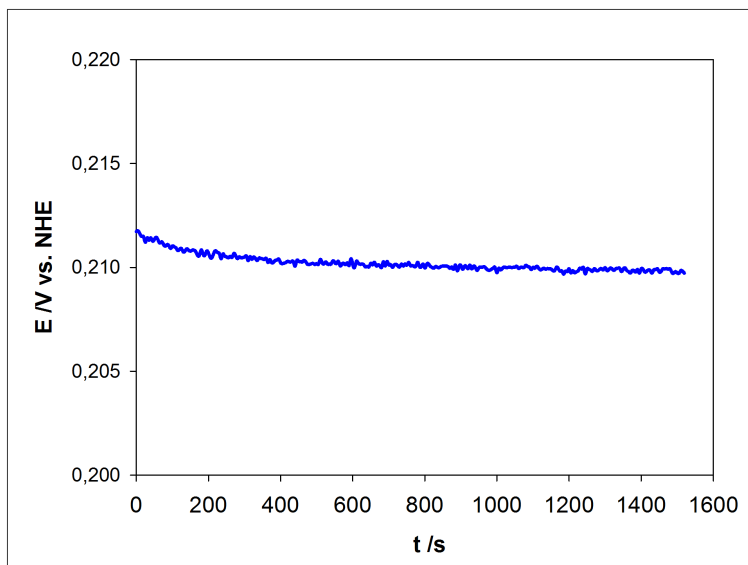


Abbildung 4.25: Potentialmessung (OCV) der Ag/AgCl-Referenzelektrode LF-1b gegen eine Wasserstoffelektrode (NHE) - das Potential entspricht dem erwarteten Potential und zeigt einen konstanten Verlauf.

Potential (214,25 mV) überein, was die einwandfreie Funktionalität der Referenzelektrode demonstriert.

Wie in der Einleitung beschrieben, darf der Widerstand der Referenzelektrode nicht zu groß sein, da sonst das System zum Oszillieren gebracht wird. Um den Widerstand der Referenzelektrode LF-1b (Unterabschnitt 3.2.2) inklusive Lötstelle und Kabel zu bestimmen, wurde die Referenzelektrode als Arbeitselektrode verwendet und gegen eine Platingenelektrode und eine Standard Ag/AgCl-Referenzelektrode (Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Sensortechnik Meinsberg, Waldheim, Deutschland) im Frequenzbereich von 100-5000 Hz vermessen. Das Gleichspannungspotential wurde dem Nullstrom-Potential angepasst und lag bei 23 mV. Die Amplitude der Wechselspannung betrug 7 mV ($V_{\text{rms}} = 4,95$ mV). Da bei dieser Messung nur nA fließen, wird die Referenzelektrode dabei nicht beschädigt. In Abbildung 4.26 sind der Betrag der Impedanz $|Z|$ und die Phase ϕ über den Logarithmus der Frequenz dargestellt.

Die Impedanz der Referenzelektrode liegt unter 10 kOhm, wenn die Messung in 3 M KCl durchgeführt wird und steigt auf 14 kOhm, wenn der Messpuffer BB ohne Redoxmediator verwendet wird. Auf eine Messung mit Redoxmediator ($\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) wurde verzichtet, da unbekannt ist, ob dieser eventuell mit

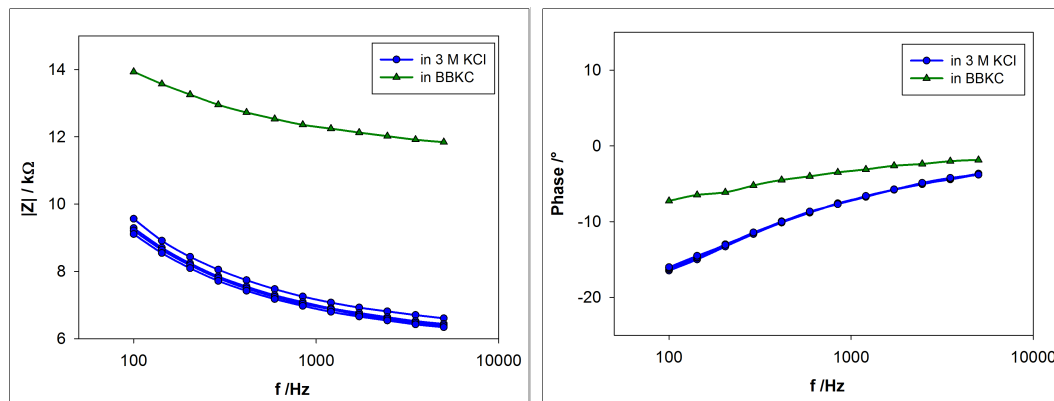


Abbildung 4.26: Bodeplot der Impedanzmessung der Ag/AgCl-Referenzelektrode LF-1b bei DC=23 mV und einer AC-Amplitude von 7 mV.

der Fritte reagiert, wenn daran eine Spannung anliegt. Zudem ist zu erwarten, dass die Impedanz in Anwesenheit des Redoxmediators sinkt. Somit liegt die Impedanz der Referenzelektrode LF-1b unter den geforderten 20 kOhm und sollte somit problemlos einsetzbar sein.

Jedoch zeigten erste Messungen mit der neuen Referenzelektrode Störungen bei hohen Frequenzen (siehe Abbildung 4.27), die sich durch eine Phase $<-90^\circ$ und $>90^\circ$ auszeichneten, was auf eine Oszillation hindeutet. Die Störungen traten bei allen Bandbreiten auf, sowohl bei Messungen in hochohmigen Puffer als auch niederohmigen Lösungen. Gemessen wurde mit einer blanken Goldelektrode als Arbeitselektrode und der Strommessbereich wurde automatisch vom Gerät eingestellt. Da dieser Effekt nicht bei der Messung im 2-Elektrodenmodus, d.h. Arbeitselektrode versus Gegenelektrode auftrat, musste die Referenzelektrode die Oszillation verursachen.

Der Impedanzanalysator hat am Eingang einen sehr großen Eingangswiderstand (1 TOhm). Zusammen mit dem Widerstand der Referenzelektrode und der kleinen Kontaktfläche zur Lösung mit $r < 1$ mm, sowie der neuartigen Fritte, die zwar leitfähig, aber nicht durchlässig ist, verursacht die Messzelle eine Phasenverschiebung in der Feedback-Schleife des Verstärkers, was diesen zum Oszillieren bringt. Um dies zu verhindern, wurde eine Kapazität zur Überbrückung der hohen Frequenzen eingefügt. Dazu wurde ein Platindraht an eine Kapazität gelötet und diese wiederum mit dem Anschluss der Referenzelektrode zusammengeführt. Die Platinelektrode steht in direktem Kontakt mit der Lösung in der Messkammer. Die Kapazität ist über eine Steckverbindung va-

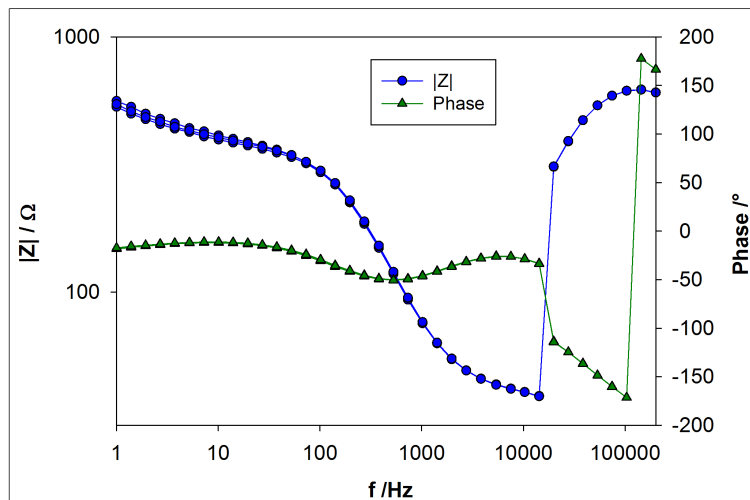


Abbildung 4.27: Störung bei hohen Frequenzen durch Referenzelektrode - Bodeplot der Impedanzmessung einer blanken Goldelektrode im 3-Elektrodenmodus mit der Referenzelektrode LF-1b. Der hohe Widerstand der Referenzelektrode bringt den Impedanzanalysator zum oszillieren und verursacht die dargestellten Störungen. Es sind 3 Wiederholungsmessungen dargestellt; Amplitude=7 mV ($V_{\text{rms}}=4,95$ mV), 7 Messpunkte pro Dekade, $E_{\text{we}}=160$ mV, in BB + 2 mM $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, Bandbreite 7.

riabel austauschbar. Im Folgenden wurden verschiedene Kapazitäten getestet, um die optimale Kapazität zu finden (siehe Abbildung 4.28).

Eine Kapazität von 1 nF ist ausreichend, um die Störungen zu kompensieren, aber die Messkurve zeigt eine starke Abweichung von den anderen Kurven mit höheren Kapazitäten. Die Impedanzkurven mit Überbrückungskapazitäten ≥ 47 nF liegen direkt aufeinander. Da im Allgemeinen die Impedanz der Referenzelektrode mit dem Alter eher zunimmt, wurde eine Überbrückungskapazität von $1 \mu\text{F}$ für alle folgenden Versuche gewählt. Die Störungen wurden nicht wieder beobachtet.

Arbeitselektrode

Für die elektrochemische Betrachtung der Arbeitselektrode muss deren Fläche bekannt sein, wobei dessen **elektrochemisch aktive Fläche** relevant ist. Die elektrochemisch aktive Fläche A_{true} einer Elektrode unterscheidet sich von der geometrischen, schon allein aufgrund der mikroskopischen Rauigkeit der Oberfläche. Die geometrische Fläche kann einfach aus den Maßen berechnet werden. Für die verwendete ovale Fluidikkammer berechnet sich eine geome-

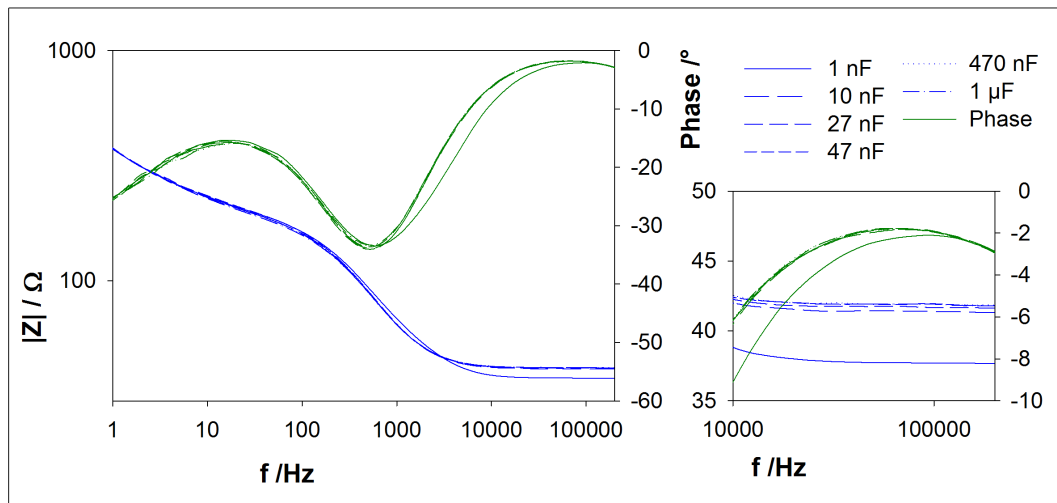


Abbildung 4.28: Beseitigung der Störung durch einen Bypass - Bodeplot der Impedanzmessungen einer blanken Goldelektrode im 3-Elektrodenmodus mit der Referenzelektrode LF-1b und einem Bypass mit verschiedenen Überbrückungskapazitäten von 1 nF bis 1 μ F. Amplitude=7 mV ($V_{\text{rms}}=4,95$ mV), 7 Messpunkte pro Dekade, $E_{\text{we}}=140$ mV, in BB + 2 mM $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, Bandbreite 7.

trische Fläche A_{geo} der goldenen Arbeitselektrode von 0,246 cm^2 .

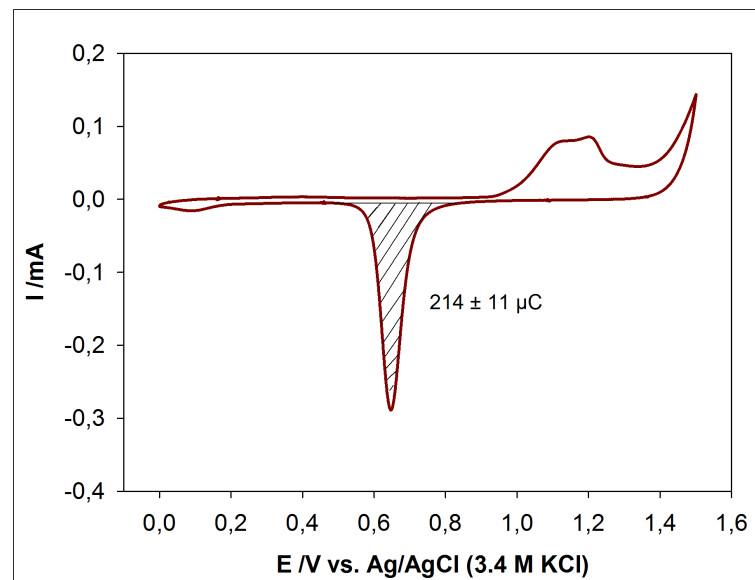


Abbildung 4.29: Bestimmung der elektrochemisch aktiven Fläche A_{true} über die Reduktion einer Monolage Oberflächenoxid auf der blanken Goldelektrode - Zyklovoltammogramm (CV) in 50 mM Schwefelsäure (H_2SO_4) von 0 V bis 1,5 V bei 100 mV/s, dargestellt ist der dritte Zyklus; schraffiert ist die Fläche des Reduktionspeak aus der die Ladung Q_{red} resultiert

Die elektrochemisch aktive Fläche kann über die Bildung einer Oxidschicht und dessen Reduktion durch ein Zyklovoltammogramm bestimmt werden. Dazu wurde von der blanken Goldelektrode in 50 mM Schwefelsäure (H_2SO_4) ein Zyklovoltammogramm mit den Umkehrpotentialen von 0 V und 1,5 V bei 100 mV/s aufgenommen (siehe Abbildung 4.29).

Von sechs verschiedenen Elektroden wurden jeweils drei Zyklen aufgenommen und der Mittelwert aus allen Werten gebildet. Der Reduktionspeak befindet sich bei 600-800 mV und entspricht dem Oberflächenoxid, das eine Monolage bildet. Die gemessene verbrauchte Ladung für die Reduktion dieser Monolage beträgt $214 \pm 11 \mu\text{C}$ und laut Oesch und Janata [274] werden für eine Monolage Oberflächenoxid $482 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ benötigt. Aus dem Verhältnis lässt sich die elektrochemisch aktive Fläche der Goldelektrode A_{true} von $0,444 \text{ cm}^2$ berechnen. Dieser Wert wiederum entspricht einer Rauigkeit der Elektrode von 1,8.

Um mehr über die Gleichmäßigkeit der Rauigkeit und deren Änderung bei der Immobilisierung der Aptamere zu erfahren, wurde die Elektrode mit dem **Rasterkraftmikroskop (AFM)** untersucht (siehe Abbildung 4.30). Die Messungen wurden im “contact mode” durchgeführt. Die durchschnittliche Rauigkeit einer blanken Goldelektrode gemessen mit dieser Methode beträgt $320,1 \pm 38,7 \text{ pm}$ und liegt im Bereich der Literaturangaben von 200-600 pm [275]. Weiterhin wurden mit MCH und mit Aptamer beschichtete Goldelektroden vermessen. Die mit MCH beschichteten Elektroden weisen eine höhere Rauigkeit auf als blanke Elektroden, $426,2 \pm 23,2 \text{ pm}$ (siehe Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Ergebnisse der AFM-Untersuchungen.

	Average Roughness R_a /pm	RMS Roughness R_q /pm	Peak-to-Valley P_t /nm
blank	$320,1 \pm 38,7$	$418,9 \pm 56,4$	$2,6 \pm 0,5$
MCH	$426,2 \pm 23,2$	$528,2 \pm 25,6$	$2,5 \pm 0,2$
PAA	$635,4 \pm 80,1$	$998,4 \pm 206,3$	$9,4 \pm 2,9$

Dies kann auch durch die Anlagerung von Salzionen verursacht sein, denn im Gegensatz zu der blanken Goldelektrode wurden die beschichteten in Puffer im Kühlschrank bis zur Messung aufbewahrt und in Puffer vermessen, um die Beschädigung der Beschichtung zu verhindern. Die mit dem Protein A-

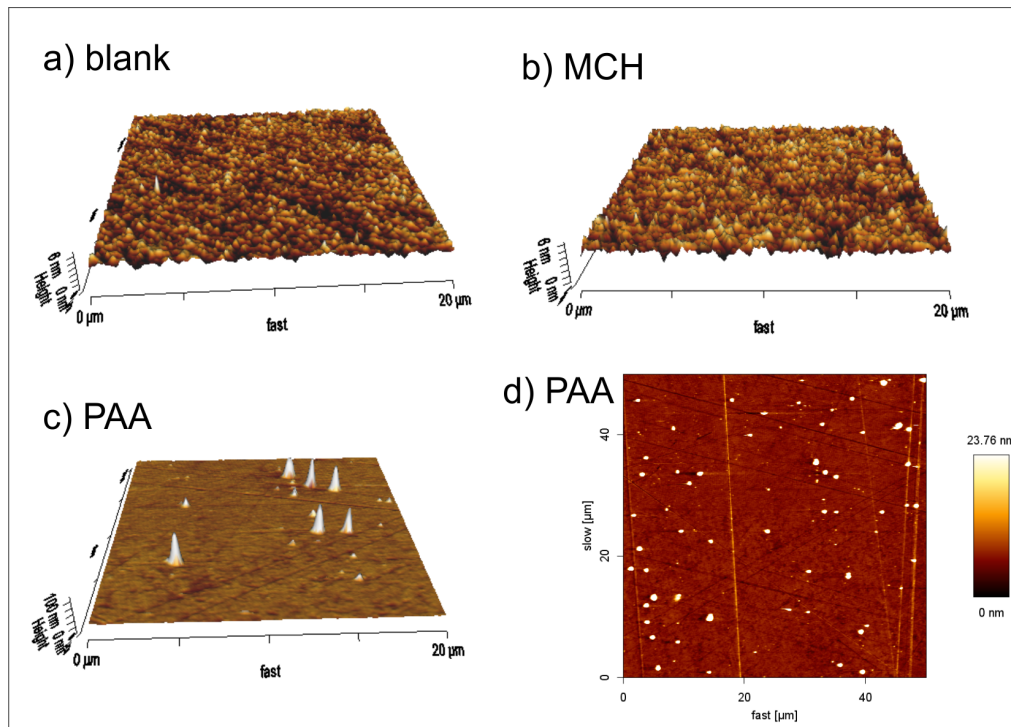


Abbildung 4.30: Messungen mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM): Darstellung der Höhenbilder des “retrace” eines ausgewählten Bereiches von $20 \times 20 \mu\text{m}^2$. Die Farbskalen sind relativ, d.h. schwarz entspricht 0 nm und weiß dem höchsten gemessenen Wert. Es sind die Bilder für eine blanken (a), eine mit Merkptohexanol (MCH, b) beschichtete Goldelektrode und eine mit Aptamer (PAA) modifizierte Elektrode in 3D-Ansicht (c) und Draufsicht (d) dargestellt.

bindenden Aptamer PAA modifizierte Goldelektrode weist eine signifikant höhere Rauigkeit von $635,4 \pm 80,1 \text{ pm}$ auf. In Abbildung 4.30 c und d sind einzelne sehr große Strukturen zu sehen, die bis zu 70 nm hoch sind. Dabei handelt es sich vermutlich um Verunreinigungen auf der Oberfläche. Die in höherer Zahl vorhandenen kleineren Peaks mit “Peak-to-Valley”-Werten von durchschnittlich $9,4 \pm 2,9 \text{ nm}$ könnten die immobilisierten Aptamere in kompakter Faltung darstellen. Das weist darauf hin, dass die Aptamere nicht geclustert vorliegen, sondern homogen über die Oberfläche verteilt sind.

Die **Stromdichte** der Elektroden gibt an, welche Elektrode limitierend wirkt und somit die Impedanz stark beeinflusst. Wie im Theorieteil beschrieben, darf die Gegenelektrode nicht limitierend auf den Strom wirken. Dies wird zumeist damit erreicht, dass die Gegenelektrode signifikant größer ist als die Arbeitselektrode. In miniaturisierten Systemen ist es jedoch schwierig, große

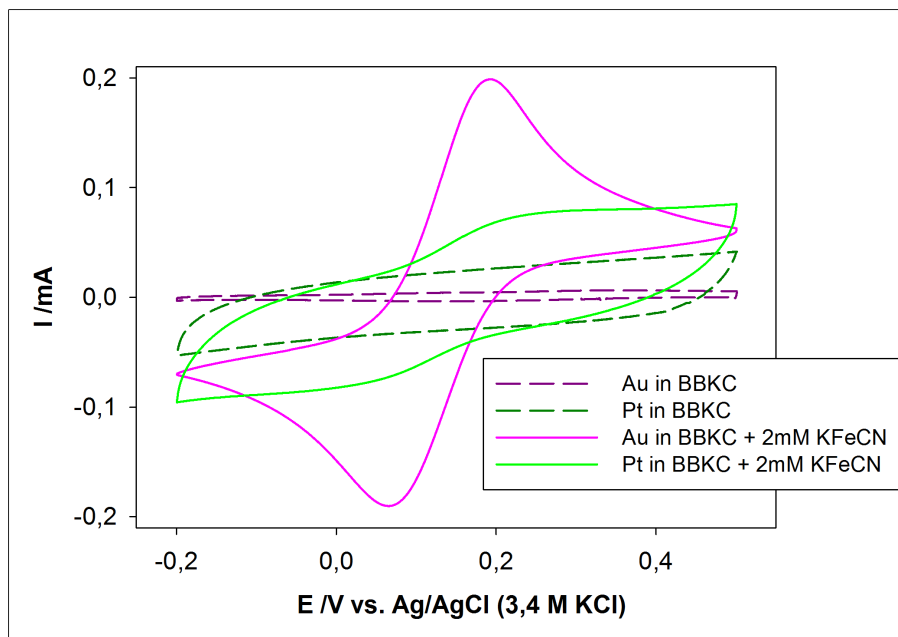


Abbildung 4.31: Zyklovoltammogramme blanker Gold- und Platinelektroden zur Bestimmung der Stromdichte in Ab- (gestrichelt) und Anwesenheit (durchgezogen) des Redoxmediators $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$

Elektroden unterzubringen. Daher wurde hier die Oberfläche der Gegenelektrode durch Platinierung erhöht. D.h. durch elektrochemisch aufgebracht Platin wurde die Rauigkeit und Porosität erhöht, was die elektrochemisch aktive Fläche vergrößert ohne die geometrische Fläche zu vergrößern. Ob die Modifizierung erfolgreich war, wurde mithilfe der Zyklovoltammetrie untersucht und die Ergebnisse werden in diesem Abschnitt beschrieben.

Um Informationen über das Verhalten der Gegenelektrode im Vergleich zur Arbeitselektrode zu erhalten, wurden Zyklovoltammogramme blanker Elektroden im 3-Elektrodenmodus mit jeweils der Goldelektrode bzw. der Platinelektrode als Arbeitselektrode aufgenommen. Die Zyklovoltammogramme in Ab- und Anwesenheit des Redoxmediators $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ sind in Abbildung 4.31 dargestellt.

Aus den Deckschichtdiagrammen, d.h. den Zyklovoltammogrammen in Abwesenheit des Redoxmediators $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ (gestrichelte Linien), kann man erkennen, dass der Verschiebungsstrom der Platinelektrode mit $55 \mu A/V$ deutlich größer ist als der Verschiebungsstrom der Goldelektrode mit $11 \mu A/V$. Weiterhin kann die differentielle Kapazität C'_{dl} der Doppelschicht berechnet

werden, die durch die Abhängigkeit der Ladung Q_D vom angelegten Potential E definiert ist:

$$Q_D = \frac{1}{\nu} \int_{E_1}^{E_2} I(E) dE \quad (4.22)$$

$$C'_{dl} = \frac{dQ_D}{dE} \quad (4.23)$$

Die Ladung Q_D wurde im Bereich von -0,05 bis 0,05 V bestimmt, da dort keine faradayschen Reaktionen stattfinden und ein reiner Verschiebungsstrom vorherrscht. Für eine Goldelektrode, die schon länger der Atmosphäre ausgesetzt war, konnte eine Kapazität von $12,45 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ bestimmt werden, während für eine frisch gereinigte Goldelektrode ein Wert von $99,63 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ bestimmt werden konnte. Swietlow et al. [276] beschrieben, dass die Kapazität einer frisch aufbereiteten Goldelektrode $25 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ beträgt und innerhalb von 20 Minuten auf $15 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ absinkt. Die Doppelschichtkapazität C_{dl} der Platinelektrode beträgt $2,02 \text{mF}/\text{cm}^2$. Dies zeigt, dass die Platinelektrode eine hohe Porosität aufweist und ist vergleichbar mit Werten aus der Literatur (Boretius et al. mit $3,44 \text{mF}/\text{cm}^2$ [277]).

Die Zyklovoltammogramme in Anwesenheit des Redoxmediator $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ zeigen Peaks, verursacht durch die Oxidation und Reduktion des $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Bei der Goldelektrode sind die Peaks der Redoxreaktion gut zu erkennen, wobei nach einem exponentiellen Anstieg schnell die Diffusionslimitierung einsetzt und die Kurve abflacht, während bei der Platinelektrode die Peaks der Redoxreaktion zwar deutlich kleiner sind, der Strom jedoch nach dem exponentiellen Anstieg linear bleibt und somit keine Diffusionslimitierung auftritt. Die Austauschstromdichte I_0 kann unter Verwendung der Butler-Volmer-Gleichung aus den Zyklovoltammogrammen berechnet werden:

$$I = I_0 \left[e^{\frac{\alpha_{an} z F}{RT} (E - E_0)} - e^{-\frac{\alpha_{kat} z F}{RT} (E - E_0)} \right] \quad (4.24)$$

mit der Stromdichte I , dem Elektrodenpotential E , dem Gleichgewichtspotential E_0 , der Temperatur T , der Faradaykonstante F , der universellen Gaskonstante R , den Ladungstransferkoeffizienten α_{an} und α_{kat} und der Anzahl der übertragenen Elektronen z .

Dafür wird die Überspannung E_n bestimmt aus $E - E_0$ und gegenüber dem Logarithmus des Stroms aufgetragen. Diese Darstellung wird auch Tafelplot

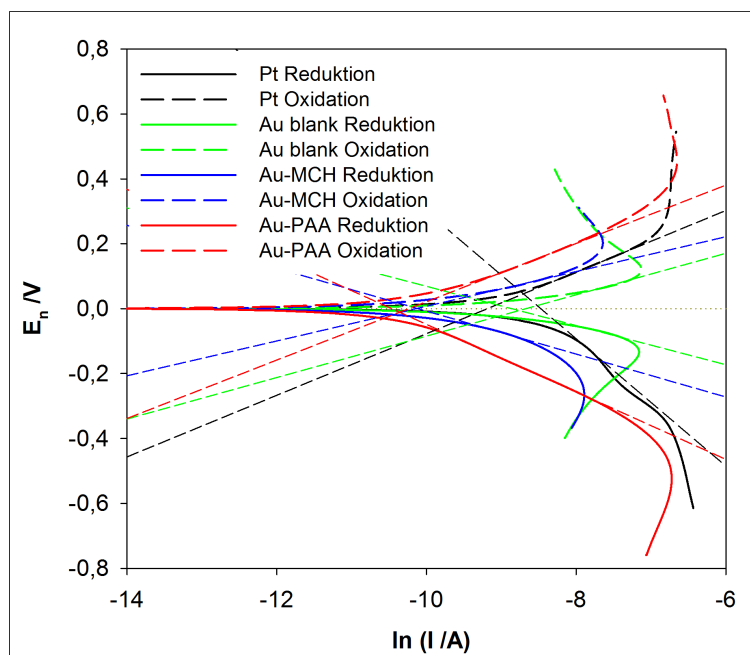


Abbildung 4.32: Tafelplot blanker Platinelektroden sowie blanker und beschichteter Goldelektroden zur Bestimmung der Austauschstromdichten in BB mit 2 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ - Kurven stammen aus den CVs in Abbildung 4.31; gestrichelte Linien = linearer Fit; $E_n = E - E_0$.

genannt. Der Tafelplot blanker und beschichteter Elektroden ist in Abbildung 4.32 gezeigt.

Elektrochemische Reaktionen sind immer vom Elektrodenpotential abhängig. Die Butler-Volmer-Gleichung beschreibt die exponentielle Abhängigkeit des Stroms von der Spannung. Wenn die Überspannung E_n weit genug vom Gleichgewichtspotential E_0 entfernt ist, findet ein Ladungstransfer statt, bis alle an der Oberfläche verfügbaren Moleküle umgesetzt wurden und die Limitierung durch den Massentransport einsetzt. Die Kurven der blanken Platinelektrode (schwarz) und der mit PAA modifizierten Goldelektrode (rot) zeigen diese drei Bereiche: Gleichgewicht, Ladungstransfer, Massentransfer. Abgesehen von der Platinelektrode (schwarz) zeigen alle Kurven einen Abfall des Stroms aufgrund der Limitierung durch den Massentransport. Dies ist besonders stark bei der blanken Goldelektrode zu beobachten (grün). Vermutlich liegt dies daran, dass blankes Gold mit $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ reagiert und Präzipitate bildet, die die Oberfläche blockieren [278, 279]. Durch die große Fläche der Platinelektrode können ausreichend Moleküle an die Elektrode diffundieren und es kann ein

Tabelle 4.3: Austauschstromdichten I_0 der blanken und beschichteten Elektroden bestimmt anhand der Tafel-Plots in Abbildung 4.32

	Oxidation		Reduktion		I_0 / $\mu\text{A cm}^{-2}$
	$I_0(\text{Ox})$ / $\mu\text{A cm}^{-2}$	α_{ox}	$I_0(\text{Red})$ / $\mu\text{A cm}^{-2}$	α_{red}	
Pt blank	102,40	0,267	209,01	-0,129	155,70
Au blank	171,22	0,397	141,22	-0,419	156,22
Au MCH	39,62	0,473	77,86	-0,383	40,43
Au PAA	35,87	0,282	28,45	-0,244	32,16

kontinuierlicher Ladungstransfer beobachtet werden. Der lineare Bereich wird für die Bestimmung der Austauschstromdichte I_0 verwendet. Lineare Bereiche können nur bei der Platinelektrode und der PAA modifizierten Goldelektrode eindeutig identifiziert werden. Bei den anderen Kurven geht der Transfer limitierte Bereich nahtlos in den diffusionslimitierten über und eine Bestimmung der Austauschstromdichte ist nur schätzungsweise möglich.

Die berechneten Werte sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Die Austauschstromdichte I_0 der blanken Gold- und Platinelektrode betragen jeweils ungefähr $150 \mu\text{A cm}^{-2}$, während der Austauschstrom der beschichteten Elektroden deutlich geringer ist und für Aptamer modifizierte Elektroden $32 \mu\text{A cm}^{-2}$ beträgt. Somit ist die Austauschstromdichte der Platinelektrode mindestens 5 fach höher als für die Messung an Aptamer modifizierten Elektroden benötigt wird. Dies ist für die geplanten Versuche ausreichend. Es konnte hiermit gezeigt werden, dass die Messung nicht durch die Platinelektrode limitiert wird.

4.3.2 Charakterisierung des Messsystems

Nachdem die Funktionalität der Elektroden einzeln geprüft und die Voraussetzungen erfüllt wurden, soll nun das Zusammenspiel aller Elektroden und der Messkammer charakterisiert werden. Eine Art, die Impedanzmessung auf Richtigkeit zu prüfen, ist der Vergleich der Bestimmung der Leitfähigkeit einer Lösung aus der Impedanz mit der Messung an einem externen Konduktometer. Dafür muss die Zellkonstante der Messkammer bestimmt werden. Die Zellkonstante kann wiederum mit dem Kohlrausch'schen Gesetz validiert wer-

den. Eine andere Methode, die Güte der Impedanzmessungen zu prüfen, sind die Kramers-Kronig-Beziehungen. Beide Methoden wurden zur Validierung der Güte der Impedanzmessung verwendet. Weiterhin wurde der unkompensierte Widerstand berechnet und die Stabilität der Messung über einen langen Zeitraum getestet.

Zellkonstante

Der Leitwert G einer Lösung ist der Kehrwert des Widerstandes und somit abhängig von dem spezifischen Widerstand und der Zellkonstanten. Die Zellkonstante k ist eine spezifische Konstante für elektrolytische Messzellen und ist abhängig von den geometrischen Dimensionen der Messkammer, d.h. von dem Abstand und der Fläche der Elektroden. Mit bekannter Zellkonstante kann die Leitfähigkeit κ einer Lösung aus dem Betrag $|Z|$ und der Phase ϕ der Impedanz entsprechend der folgenden Gleichung bestimmt werden:

$$G_p = \frac{1}{Z \sqrt{\tan^2 \phi + 1}} \quad (4.25)$$

$$k = \frac{\kappa}{G_p} \quad (4.26)$$

$$\kappa = \frac{k}{Z \sqrt{\tan^2 \phi + 1}} \quad (4.27)$$

Dieses Prinzip wird von Konduktometern genutzt, die die Leitfähigkeit in 4-Elektroden-Messzellen bei einer bestimmten Frequenz bestimmen. Die Frequenz wird dabei entsprechend der Leitfähigkeit der Lösung angepasst, um in einem stabilen Bereich zu bleiben. Die Bestimmung der Zellkonstanten k aus den geometrischen Faktoren ist nur schätzungsweise möglich, da die Feldlinien an den Rändern der Elektroden streuen. In der verwendeten Messkammer wurde ein Platindraht über einer planaren Goldoberfläche verwendet, daher ist die Formel d/A nur zur Abschätzung der Zellkonstante geeignet. Der Abstand d der Elektroden zueinander beträgt 3 mm und die elektrochemisch aktive Fläche A der Goldelektrode beträgt $0,444 \text{ cm}^2$. Das ergibt eine Zellkonstante k von $0,68 \text{ cm}^{-1}$. Bei Konduktometern wird die Zellkonstante durch Kalibration mit einer Eichlösung mit bekannter Leitfähigkeit bestimmt. Diese Eichung wurde mit der in dieser Arbeit verwendeten Messkammer durchgeführt, um

Tabelle 4.4: Bestimmung der Zellkonstante des Messsystems

c /mM	\sqrt{c} / \sqrt{mM}	κ (WTW) / $\mu\text{S cm}^{-1}$	G / μS	k / cm^{-1}	κ (DUT) / $\mu\text{S cm}^{-1}$	λ_m / $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$
2	1,41	276	480	0,58	275	137,63
3	1,73	387	711	0,54	408	136,15
4	2,00	513	960	0,53	552	137,90
5	2,24	635	1096	0,58	630	126,04
6	2,45	758	1274	0,60	733	122,11
7	2,65	946	1588	0,60	914	130,53
8	2,83	1069	1829	0,58	1052	131,55
9	3,00	1150	1956	0,59	1126	125,06
10	3,16	1317	2239	0,59	1288	128,84
MW				0,58		

die Zellkonstante k auf experimentellen Weg zu bestimmen und mit der abgeschätzten geometrischen zu vergleichen. Dazu wurden mit der Messkammer die Impedanzspektren von 1 Hz bis 200 kHz von KCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen (von 1-10 mM) gemessen und mit Gleichung 4.26 der Median des Leitwertes G berechnet. Die gleichen Lösungen wurden mit dem Konduktometer vermessen und aus dem Quotient der Leitfähigkeit κ und dem Leitwert G wurde die Zellkonstante k bestimmt. Die Werte sind in Tabelle 4.4 dargestellt.

Die so bestimmte Zellkonstante k beträgt $0,58 \text{ cm}^{-1}$ und ist somit etwas kleiner als die aus den geometrischen Werten abgeschätzte Zellkonstante. Zur Validierung der Zellkonstanten und Bestimmung des gültigen Frequenzbereiches wurde das Kohlrausch'sche Quadratwurzelgesetz verwendet:

$$\lambda_m = \lambda_0 - k\sqrt{c} = \frac{\kappa}{c} \quad (4.28)$$

Das Kohlrausch'sche Quadratwurzelgesetz beschreibt die Abhängigkeit der molaren Leitfähigkeit eines starken Salzes von dessen Konzentration in verdünnten Lösungen. Die molare Grenzleitfähigkeit ($c \rightarrow 0$) ist eine charakteristische Konstante für jedes Ion eines starken Salzes. Die molare Grenzleitfähigkeit für KCl setzt sich aus den Äquivalentleitfähigkeiten der Ionen K^+ und

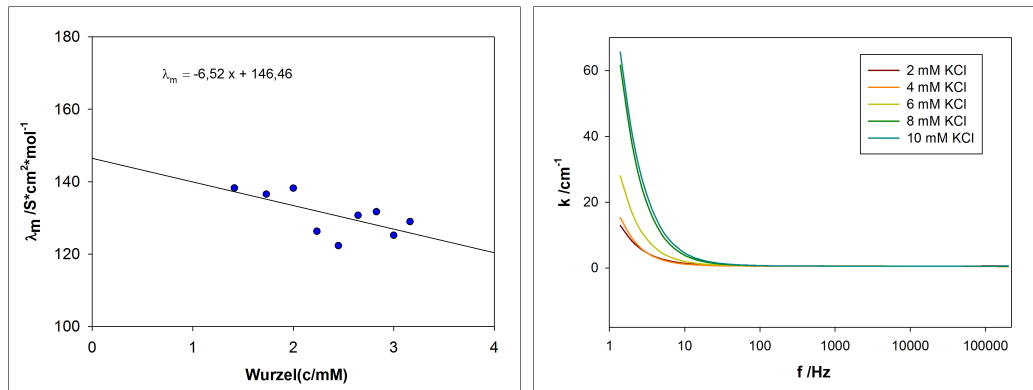


Abbildung 4.33: Validierung der Zellkonstanten - links: Bestimmung der molaren Grenzleitfähigkeit λ_0 von KCl; rechts: Frequenzabhängigkeit der Zellkonstanten k

Cl^- zusammen und beträgt $149,72 \text{ S cm}^2/\text{mol}$ bei 21°C . Die Gültigkeit der Zellkonstante kann somit über die Bestimmung der molaren Grenzleitfähigkeit λ_0 geprüft werden. Dazu wird aus dem Leitwert G mit der Zellkonstanten k die Leitfähigkeit κ (DUT) und daraus wiederum mit der Konzentration c die molare Leitfähigkeit λ_m berechnet (siehe Tabelle 4.4). Die molare Leitfähigkeit λ_m wird gegen die Wurzel der Konzentration aufgetragen und die Interpolation mit der y-Achse ergibt die molare Grenzleitfähigkeit λ_0 (siehe Abbildung 4.33).

Die so bestimmte Grenzleitfähigkeit λ_0 beträgt $146,46 \text{ S cm}^2/\text{mol}$ und entspricht annähernd dem Erwartungswert von $149,72 \text{ S cm}^2/\text{mol}$. Dies zeigt, dass die Leitfähigkeit mit der Messkammer und der Zellkonstanten gut bestimmt werden kann. Schaut man etwas genauer in die Frequenzabhängigkeit der Zellkonstanten (siehe Abbildung 4.33), so erkennt man, dass k bei kleinen Frequenzen abweicht und nur im Frequenzbereich von etwa 100 Hz bis 100 kHz konstant ist. Bei niedrigen Frequenzen zeigt sich ein kapazitiver Einfluss durch die Bildung der Doppelschicht und der Diffusionslimitierung. Je konzentrierter die Lösung, desto weiter verschiebt sich der konstante Bereich zu höheren Frequenzen, daher muss die Frequenz zur Messung der Leitfähigkeit einer Lösung in Konduktometern der Lösungskonzentration angepasst werden und variiert von 85 bis 1000 Hz. Für unser Messsystem lässt sich schlussfolgern, dass die Impedanzmessung kaum parasitäre Effekte aufweist, da der konstante Bereich sehr breit ist und die molare Grenzleitfähigkeit dem Erwartungswert entspricht. Inwiefern die Bedingungen Linearität, Kausalität und Stationarität für unser System gegeben sind, soll nun mit den Kramers-Kronig-Beziehungen

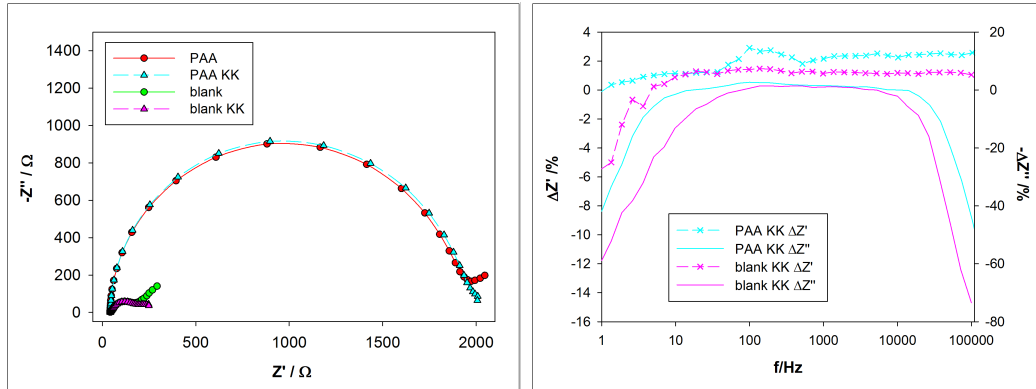


Abbildung 4.34: Anwendung der Kramers-Kronig-Beziehung (KK) auf die Impedanzmessung an einer blanken und einer mit dem Protein A-bindenden Aptamer PAA modifizierten Goldelektrode in BB mit 2 mM $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ - links: Nyquist-Plot der gemessenen (rote, grüne Kreise) und der mit KK bestimmten (cyane, pinke Dreiecke) Impedanzspektren; rechts: Mithilfe von KK bestimmte Abweichungen vom idealen Verhalten dargestellt als Fehler in Prozent.

betrachtet werden.

Kramers-Kronig-Beziehung

Die Güte der Impedanzmessung kann mit der Kramers-Kronig-Beziehung untersucht werden. Mit der Kramers-Kronig-Transformation wird der Realteil der Impedanz aus dem Imaginärteil der Impedanz unter kausalen, linearen und stationären Bedingungen bestimmt (siehe Unterabschnitt 2.4.5). Die Abweichung der bestimmten Werte zu den gemessenen zeigt die Abweichung vom idealen Verhalten. In Abbildung 4.34 sind die Untersuchungen mit den Kramers-Kronig-Beziehungen an einer blanken und einer mit Aptamer beschichteten Elektrode gezeigt.

Im Nyquistdiagramm sind die Abweichungen bei kleinen Frequenzen deutlich zu sehen. Die Kramers-Kronig-Beziehungen (KK) setzen voraus, dass die Impedanz für $f \rightarrow 0$ und $f \rightarrow \infty$ jeweils einen konstanten Wert annimmt. Bei Experimenten mit faradayschen Messzellen tritt i. A. bei kleinen Frequenzen eine Warburgimpedanz auf, verursacht durch die Verarmung der Redoxmoleküle an der Oberfläche und der Diffusion von Molekülen von und zur Oberfläche. Die Warburgimpedanz kann im Grunde durch Parallelschaltung einer Kapazität und eines frequenzabhängigen Widerstandes beschrieben werden. Sie bewirkt, dass entgegen der KK-Annahme Real- und Imaginärteil der Impedanz für $f \rightarrow 0$

linear ansteigen. Solch ein Verhalten wird in den Kramers-Kronig-Beziehungen nicht betrachtet und verursacht dadurch einen großen Fehler. Die Bildung einer Doppelschicht und die Diffusionslimitierung sind für elektrochemische Versuche nicht wegzudenken, bewirken jedoch eine Veränderung des Systems während der Messung, was der Bedingung der Stationarität widerspricht. Da diese Änderung jedoch reversibel und reproduzierbar ist, hat dies keinen Einfluss auf die Untersuchung des Systems mit der Impedanzspektroskopie. Es sollte jedoch beachtet werden, dass zwischen den Messungen der einzelnen Frequenzen sowie zwischen Wiederholungsmessungen, dem elektrochemischen System genügend Zeit gegeben wird, wieder in den Gleichgewichtszustand zurückzukehren. In dieser Arbeit wurde bei der sequentiellen Messung der einzelnen Frequenzen jeweils ein Zehntel der Periode zwischen zwei Frequenzen gewartet. Für $f \rightarrow \infty$ strebt der Realteil der Impedanz einen konstanten Wert an und zwar den Lösungswiderstand. Dies entspricht dem Kramers-Kronig-Kriterium und der Fehler liegt daher maximal bei 2%. Der Imaginärteil strebt für $f \rightarrow \infty$ gegen 0, da in dem betrachteten System nur kapazitive Elemente enthalten sind, die bei großen Frequenzen kurzgeschlossen werden. Allerdings ergeben kleine Abweichungen bei kleinen Werten einen großen Fehler und so beträgt die Abweichung des Imaginärteils der mit Aptamer beschichteten Elektrode bei 103 kHz 0,89 Ohm bei einem Absolutwert von 1,08 Ohm, was einem Fehler von 80% entspricht, obwohl die Abweichung in Realität sehr klein ist. Im gesamten Frequenzbereich von 1 Hz bis 200 kHz liegt der Fehler des Realteils unter $\pm 3\%$ und somit im akzeptablen Schwankungsbereich. Die Abweichung des Imaginärteils liegt im Frequenzbereich von 5 Hz bis 20 kHz innerhalb $\pm 5\%$. Da in dieser Arbeit vor allem der Ladungstransferwiderstand betrachtet werden soll, der hauptsächlich im Realteil der Impedanz auftritt, konnte mit der Betrachtung der Kramers-Kronig-Beziehungen gezeigt werden, dass die Impedanzmessung eine hohe Güte aufweist und somit für die geplanten Untersuchungen geeignet ist.

Bestimmung von R_{sol} und R_u

Durch die unvermeidbare Distanz zwischen Referenzelektrode und Arbeitselektrode existiert abhängig von der Leitfähigkeit der Lösung ein unkompensierter Widerstand R_u , der die Messung beeinflusst und vor allem bei hochohmigen

Lösungen zu signifikanten Störungen führen kann [280, 281, 282, 283]. In dieser Arbeit wird zwar größtenteils mit niederohmigen Lösungen gearbeitet, aber vor allem für die Bestimmung der Konstanten mit der Zyklovoltammetrie, wie für das Modell in Abschnitt 4.5 notwendig, ist die Prüfung des unkompensierten Widerstandes unabdingbar. Daher wird in diesem Abschnitt sowohl der Lösungswiderstand als auch der unkompensierte Widerstand bestimmt.

Der in dieser Arbeit verwendete für das Aptamer spezifische Bindungspuffer BB wurde mit dem Konduktometer gemessen und beträgt durchschnittlich eine Leitfähigkeit von 14,21 mS/cm (siehe Tabelle 4.5). Es konnte beobachtet werden, dass die Zugabe von 2 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ keinen sichtbaren Effekt auf die Leitfähigkeit hat. Hingegen zeigten die Temperatur und der pH-Wert einen deutlichen Einfluss auf die Leitfähigkeit.

Der Kehrwert des Leitwertes G ist der Widerstand R , d.h. der Lösungswiderstand R_{sol} ist der Quotient aus Zellkonstante k und Leitfähigkeit κ :

$$R_{sol} = \frac{k}{\kappa} \quad (4.29)$$

Tabelle 4.5: Leitfähigkeit des Bindungspuffer BB an verschiedenen Tagen gemessen mit dem WTW Konduktometer LF3000

Lösung	Leitfähigkeit /mS cm ⁻¹	pH	T /°C
BB	13,66	-	20
	13,39	7,64	20
	14,29	-	20
	13,34	-	-
	14,24	-	20
	13,83	7,64	22
	15,39	-	-
	15,43	-	-
	14,10	6,95	20
	14,09	-	-
	14,58	-	-
Mittelwert	14,21 ± 0,7		

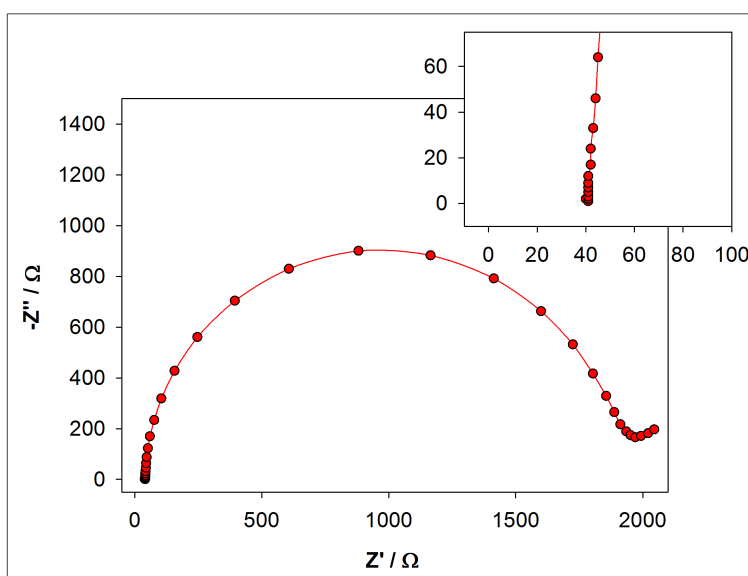


Abbildung 4.35: Nyquist-Plot des Impedanzspektrums einer mit dem Protein A-bindenden Aptamer PAA und MCH im Verhältnis 1 zu 4 modifizierten Goldelektrode in BB + 2 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ von 1 Hz bis 200 kHz mit einer Amplitude von 10 mV ($V_{rms} = 7,07$ mV) - vergrößerte Darstellung als Inset zeigt die Werte bei hohen Frequenzen, die dem Lösungswiderstand R_{sol} von 41 Ω zustreben.

Mit der experimentell bestimmten Zellkonstante k von $0,58 \text{ cm}^{-1}$ (siehe Tabelle 4.4) wurde R_{sol} berechnet. Je nach Charge schwankt R_{sol} von 37,59 bis 43,48 Ω . Damit ergibt sich ein mittlerer Lösungswiderstand von $40,82 \pm 1,97 \Omega$.

In Abbildung 4.35 ist der Nyquist-Plot einer mit Aptamer beschichteten Elektrode zu sehen. Bei hohen Frequenzen ($\sim 100 \text{ kHz}$) wird die Doppelschichtkapazität kurzgeschlossen und die Impedanz entspricht dem Lösungswiderstand R_{sol} . Mit dem Fitten der Kurve mit dem modifizierten Randles-Schaltkreis kann R_{sol} ebenfalls bestimmt werden und beträgt $40,96 \pm 0,27 \Omega$. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem am Konduktometer bestimmten Wert von $40,82 \pm 1,97 \Omega$ überein und zeigt, dass die Impedanzmessung bei kleinen Frequenzen nicht durch unerwünschte Effekte wie Polarisation, Kontamination, Feldeffekte sowie Widerstände von Kabeln beeinflusst wird.

Um den unkompensierten Widerstand R_u zu bestimmen, wurde die Methode von Sluyters [284] verwendet. Dazu wurde der Realteil gegen den Imaginärteil multipliziert mit der Kreisfrequenz ω aufgetragen (siehe Abbildung 4.36).

In dieser Darstellung erscheint der durch die faradaysche Reaktion kontrollierte Bereich linear. Die Interpolation dieser Geraden ergibt einen Schnitt-

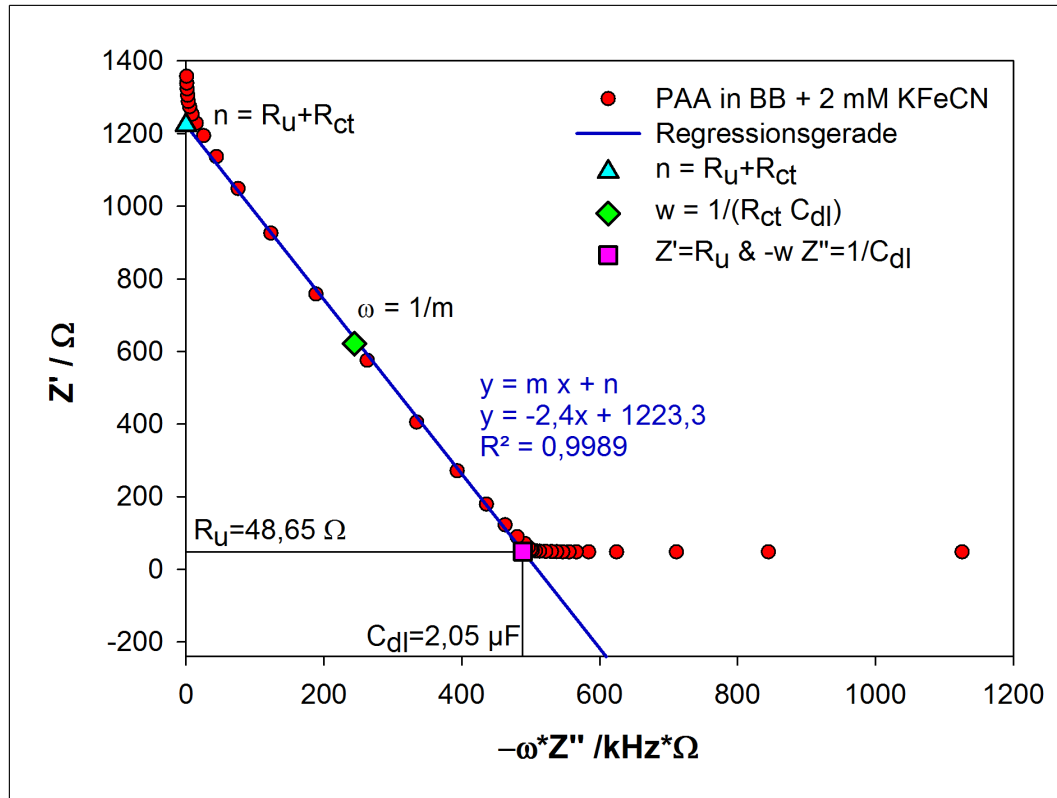


Abbildung 4.36: Bestimmung des unkompenzierten Widerstands R_u nach Sluyters [284] - die roten Kreise zeigen die Messdatenpunkte, die blaue Linie die Regression durch den linear dargestellten Abschnitt mit der Steigung $m = C_{dl} R_{ct}$, die grüne Raute markiert den Punkt bei der Frequenz $1/m$, das cyane Dreieck ist der Schnittpunkt n der Regressionsgeraden mit der y-Achse und das pinke Quadrat markiert den Punkt, der von $1/m$ genauso weit entfernt ist wie n und mit dem R_u und die Doppelschichtkapazität C_{dl} bestimmt werden können; $\omega = 2 \pi f$.

punkt n mit der y-Achse (blaues Dreieck), dessen Wert der Summe aus Ladungstransferwiderstand R_{ct} und unkompenzierten Widerstand R_u entspricht ($n = R_{ct} + R_u$). Die Steigung m der Geraden entspricht dem Produkt aus R_{ct} und der Doppelschichtkapazität C_{dl} ($m = C_{dl} R_{ct}$). Laut Sluyters ist die Frequenz $1/m$ genauso weit von n ($\omega = 0$) entfernt wie vom Punkt $\omega = \infty$. Am Punkt $\omega = \infty$ ist der Anteil des Stroms der durch den Ladungstransferwiderstand R_{ct} fließt vernachlässigbar und die Doppelschichtkapazität C_{dl} kurzgeschlossen, wodurch sich das Ersatzschaltbild zu einer Reihenschaltung aus R_u und C_{dl} reduziert. Daher kann in diesem Fall am Punkt $\omega = \infty$ an der x-Achse $1/C_{dl}$ und an der y-Achse R_u abgelesen werden. Für die mit Aptamer beschichtete Goldelektrode ergibt sich nach Sluyters Methode ein unkompenzierter Wi-

derstand R_u von $48,65 \Omega$. Der Wert ist gegenüber den Fit-Werten für R_{sol} von $38-44 \Omega$ leicht erhöht, was zum einen der Ungenauigkeit dieser Methode zuzuordnen ist und zum anderen dadurch, dass moderne Potentiostaten, wie auch der hier verwendete, R_u automatisch kompensieren. Der erhöhte Wert weist darauf hin, dass ein kleiner Rest unkompensiert bleibt, welcher demnach bei $\sim 4-8 \Omega$ liegt. Dieser unkompensierte Rest ist so gering, dass er keinen signifikanten Einfluss auf die Messung hat und nicht kompensiert werden muss. Vor allem da eine Überkompensation ebenfalls zu unerwünschtem Verhalten des Potentiostaten führen kann [285]. Im Allgemeinen gilt, dass bei der Messung von μA ein unkompensierter Widerstand von unter 100Ω keine signifikanten Störungen verursacht. Die mit der Sluyters Methode bestimmte Doppelschichtkapazität C_{dl} beträgt $4,61 \mu F/cm^2$ und liegt im zu erwartenden Bereich von $1-5 \mu F/cm^2$ für beschichtete Goldelektroden [276, 262, 286].

Stabilität

Um die Stabilität der Impedanzmessung zu untersuchen, wurden Langzeitmessungen mit modifizierten Elektroden in Puffer durchgeführt. Dazu wurden die Goldelektroden mit Protein A-bindenden Aptamer (PAA) und dem Füllthiol MCH im Verhältnis 1:4 beschichtet. Diese wurden in die Messkammer eingebaut und mit Messpuffer (BB + $2 \text{ mM } K_{3/4}[Fe(CN)_6]$) gespült. Alle 5 min wurde eine Impedanzmessung mit drei Zyklen durchgeführt (siehe Dreiecke in Abbildung 4.37). Im Frequenzbereich von 1 Hz bis 1 MHz gilt: Je höher die Frequenz, desto stabiler ist das Signal. Daher sind in Abbildung 4.37 der Betrag $|Z|$ und die Phase der Impedanz bei 1 Hz dargestellt. Die erste Messung weicht stark von den folgenden ab. Dies liegt daran, dass beim Anlegen des Feldes eine Ausrichtung der Dipole stattfindet. Um diesen Effekt bei den folgenden Messungen zu verhindern, wurde die Elektrode 30 s vorgespannt bevor die Messung startete. Weiterhin sieht man einen sehr schwachen Anstieg am Anfang der Messung, der mit zunehmender Zeit immer kleiner wird. Zur Untersuchung des Einflusses der Anzahl der Messungen und des Spülens auf die Stabilität der Impedanzmessung wurde eine zweite Messung mit einer zweiten beschichteten Elektrode durchgeführt (siehe Kreise in Abbildung 4.37). Hierbei wurde über einen Zeitraum von 80 min jede Minute eine Impedanzmessung mit drei Zyklen aufgenommen und an zwei Punkten die Messkammer

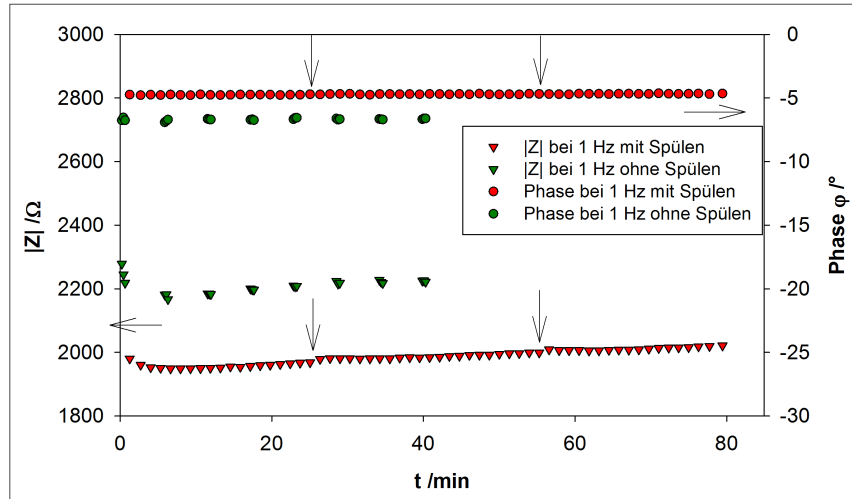


Abbildung 4.37: Langzeitmessung von mit Aptamer beschichteten Goldelektroden zur Untersuchung der Stabilität der Messung - Pfeile markieren, wann gespült wurde.

mit frischem Messpuffer gespült (siehe Pfeile in Abbildung 4.37). Zur besseren Übersicht wurde nur jede fünfte Messung dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Anzahl der Messungen keinen signifikanten Einfluss auf die Stabilität hat. Das Spülen mit frischem Messpuffer hingegen zeigt einen kurzen Anstieg des Impedanzbetrages, der jedoch schnell wieder auf den ursprünglichen Wert herabsinkt. Der Anstieg wird durch die Strömung verursacht, die das Feld in der Messkammer beeinflusst und den Stromfluss behindert. Nach dem Stoppen der Pumpe braucht das System einige Sekunden, um ins Gleichgewicht zu gelangen. Dies ist ebenso an der Einstellung des Ruhepotentials zu sehen. Aus diesem Grund wurde bei allen folgenden Messungen zwischen Pumpstopp und Messung 30 s gewartet. Wie in Abbildung 4.37 zu sehen, bleibt die Phase während der ganzen Messung konstant bei $-6,67^\circ \pm 0,09^\circ$ (grüne Kreise) bzw. $-4,71^\circ \pm 0,04^\circ$ (rote Kreise).

Durchschnittlich beträgt die Drift des Impedanzbetrages etwa $10 \Omega \text{ cm}^2 \text{ h}^{-1}$. Die Fitergebnisse zeigen, dass sich die Drift größtenteils auf den Transferwiderstand niederschlägt. Der Lösungswiderstand driftet um $-4 \text{ m}\Omega$ per Minute, die Doppelschichtkapazität um -5 fF pro Minute und die Warburgimpedanz um $-1,4 \text{ m}\Omega \text{ s}^{-1/2}$ pro Minute. Der Ladungstransferwiderstand driftet mit etwa $0,4 \Omega$ pro Minute. Eine Drift lässt sich in elektrochemischen Systemen nicht vermeiden, aber die hier beobachtete Drift ist so gering, dass sie innerhalb der kurzen Messzeit von max. 1 min keinen signifikanten Einfluss auf die Messergebnisse

hat.

4.3.3 Optimierung der Parameter

Es gibt verschiedene Parameter, die bei der Impedanzmessung eingestellt werden können und die auf das Messergebnis erheblichen Einfluss haben. Zu diesen Parameter zählen unter anderem das DC-Potential, Wartezeiten zwischen den Frequenzen, Vorspannung, Zyklenanzahl, aber auch die Konzentration des Redoxmediators Kaliumhexacyanoferrat ($\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$).

Konzentration des Redoxmediators

In der Literatur werden Konzentrationen von 0,5 bis 50 mM $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ verwendet, meist ohne Begründung. Um den Einfluss der Konzentration des Redoxmediators auf die Impedanzmessung zu untersuchen, wurden Impedanzmessungen mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt (siehe Abbildung 4.38). Die Konzentration des Redoxmediators beeinflusst sowohl den Betrag als auch die Phase der Impedanz und das bei kleinen Frequenzen unterhalb 1 kHz stärker als bei Frequenzen über 1 kHz. Der minimale Phasenwinkel steigt von -80° auf -60° mit zunehmender Konzentration des Kaliumhexacyanoferrats ($\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) und wird in Richtung höherer Frequenzen verschoben. Der Betrag der Impedanz $|Z|$ steigt exponentiell mit abnehmenden $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Im Nyquistplot (siehe Abbildung 4.39) ist gut zu erkennen, dass nur in Anwesenheit von $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ der Ladungstransferwiderstand so stark sinkt, dass er bestimmbar ist und die typische Halbkreisform des Impedanzspektrums erhalten wird. Der Durchmesser des Halbkreises steigt mit sinkender $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -Konzentration. Zudem wird die Kurve flacher, d.h. das α des Konstantphasenelementes (CPE) wird kleiner, es sinkt von 0,9805 auf 0,9750. Noch geringere Konzentrationen von $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ würden dazu führen, dass mit einer Impedanzmessung bis 1 Hz nicht der ganze Halbkreis aufgenommen werden kann und somit die Bestimmung des Transferwiderstandes und der Warburgimpedanz großen Schwankungen unterliegt. Interessanterweise nimmt das χ^2 , ein Maß für die Güte des Kurvenfits, mit zunehmender $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -Konzentration ab, d.h. die Güte des Kurvenfits steigt. Die Fitwerte zeigen, dass die Konzentration von $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ einen Einfluss auf alle Elemente

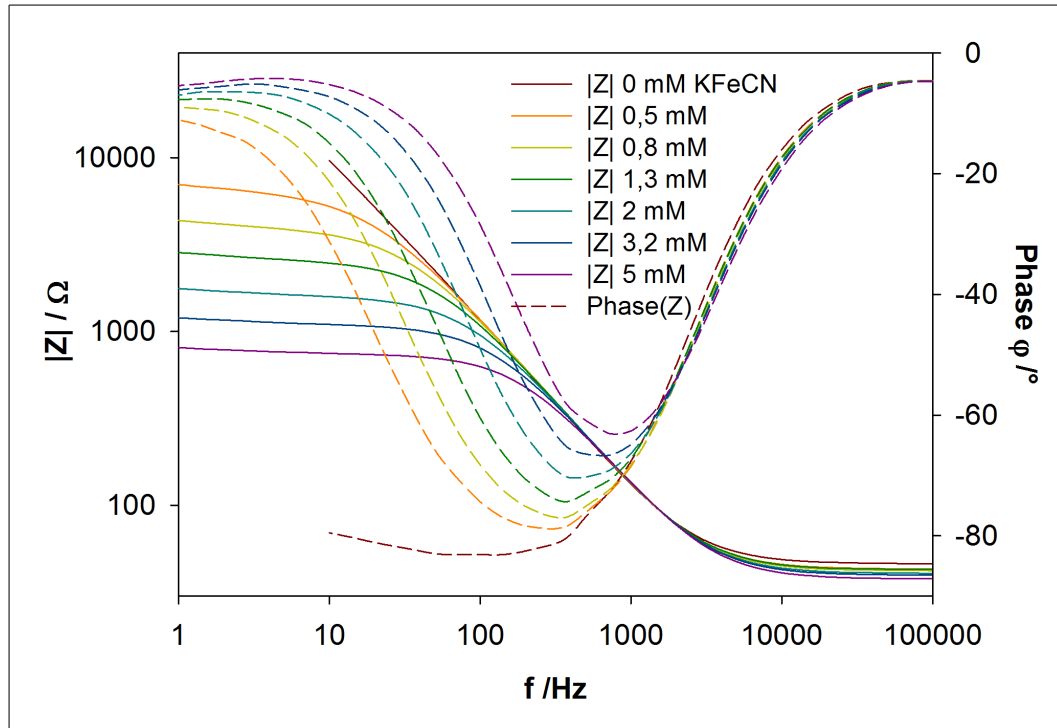


Abbildung 4.38: Bodeplot einer mit Aptamer beschichteten Goldelektrode in Bindungspuffer (BB) mit verschiedenen Konzentrationen an Kaliumhexacyanoferrat (II/III äquivalent).

des Ersatzschaltkreises hat. Der Lösungswiderstand sinkt mit steigender Konzentration von 43Ω auf 38Ω , die Kapazität sinkt von $1,76 \mu\text{F}$ auf $1,63 \mu\text{F}$. Am stärksten betroffen sind der Transferwiderstand R_{ct} und die Warburgimpedanz A_w , wie man in Abbildung 4.39 sehen kann. Diese fallen exponentiell mit der $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -Konzentration ab.

Bogomolova et al. [287] zeigten, dass die zuvor beschriebene Drift in elektrochemischen Systemen mit zunehmender $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -Konzentration steigt und somit zur Senkung der Drift kleinere Konzentrationen (1-2 mM) verwendet werden sollten. Bei sehr kleinen Konzentrationen von $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($< 1 \text{ mM}$) ist bei geringen Änderungen der Konzentration (z.B. durch Pipettierfehler) mit hohen Abweichungen des Ladungstransferwiderstandes zu rechnen, was reproduzierbare Messungen unmöglich macht. Weiterhin ist bei der Anbindung von Protein A mit einem Anstieg des Ladungstransferwiderstandes zu rechnen. Um sicher zu stellen, dass auch bei hohen Protein A-Konzentrationen der gesamte Halbkreis aufgenommen werden kann bei Messungen bis 1 Hz (um die Messzeit konstant niedrig zu halten), wurde 2 mM $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ als Konzentration für

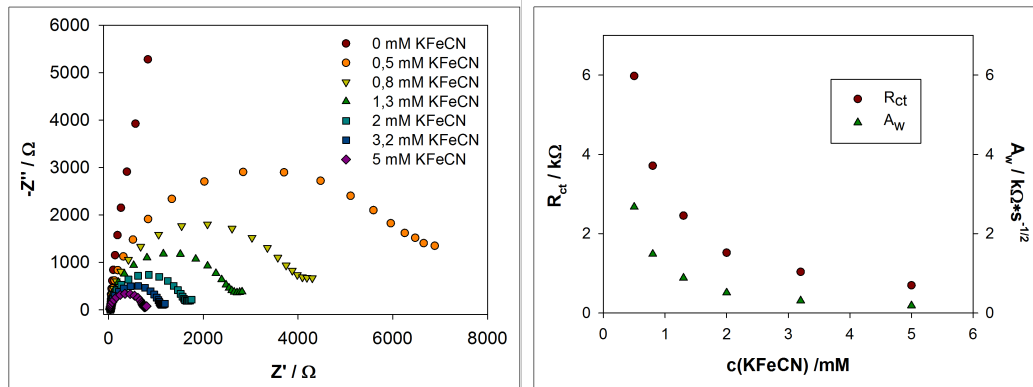


Abbildung 4.39: links: Nyquistplot der mit Aptamer beschichteten Goldelektrode in Bindungspuffer (BB) mit verschiedenen Konzentrationen an Kaliumhexacyanoferrat (II/III äquivalent); rechts: Abhängigkeit des Ladungstransferwiderstandes R_{ct} und der Warburgimpedanz A_w von der Konzentration des Redoxmediators $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

alle Experimente gewählt.

Amplitude

Durch das Linearitätskriterium (siehe auch Unterabschnitt 2.4.5) sollte sich die Impedanz bei Änderungen der Amplitude nicht verändern. Bei elektrochemischen Systemen ist diese Linearität quasi nur für kleine Amplituden gegeben. Um zu überprüfen, ob die Linearität in dem entwickelten System eingehalten wird, wurden Messungen bei verschiedenen Amplituden durchgeführt. In Abbildung 4.40 ist der Nyquistplot einer mit Aptamer beschichteten Goldelektrode in Messpuffer bei drei verschiedenen Amplituden gezeigt. Die Kurven für 10 mV und 19 mV liegen gut aufeinander, wobei der Graph für 28 mV Amplitudenspannung schon kleine Abweichungen zeigt. Dies beweist die Erfüllung des Linearitätskriteriums für Amplituden <30 mV. Für alle Messungen wurde eine Amplitude von 10 mV ($= 7,07 V_{\text{rms}}$) verwendet.

Gleichspannung DC

Das Prinzip der Impedanzmessung basiert darauf, das System, welches sich im Gleichgewicht befindet, durch das Anlegen kleiner Spannungen aus dem Gleichgewicht zu bringen und die Reaktion darauf in Abhängigkeit von der Frequenz der Störung zu betrachten. Das bedeutet, dass die Gleichspannung (das DC-Potential), der das Wechselspannungssignal überlagert wird, dem Gleich-

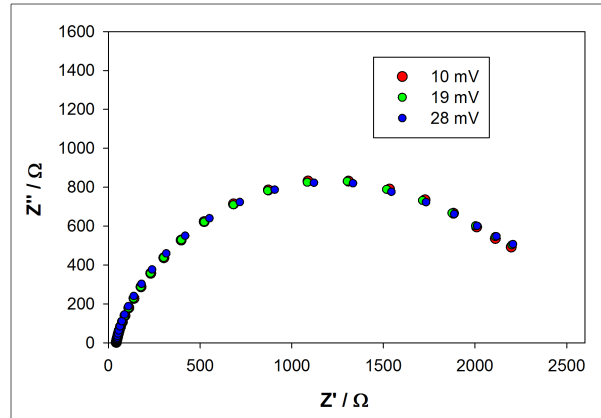


Abbildung 4.40: Nyquist-Plot einer mit PAA beschichteten Elektrode bei drei verschiedenen Spannungsamplituden V_a

gewichtspotential der Zelle entsprechen muss. Das Gleichgewichtspotential ist das Potential der Zelle, wenn sich diese im elektrochemischen Gleichgewicht befindet. Das elektrochemische Gleichgewicht wird durch alle Redoxreaktionen in der Zelle beschrieben. Im vorliegenden Fall ist es nur eine und zwar die Reduktion und Oxidation von Kaliumhexacyanoferrat:



Das Standardpotential dieser Reaktion beträgt 370,4 mV [288]. Das Halbzellenpotential unter vom Standard abweichenden Bedingungen kann mit der Nernstgleichung (siehe Gleichung 2.9 in Abschnitt 2.4) berechnet werden. Da davon ausgegangen wird, dass äquivalente Konzentrationen von $[Fe(CN)_6]^{3-}$ und $[Fe(CN)_6]^{4-}$ vorliegen, bleibt das Halbzellenpotential gleich 370,4 mV. Bezogen auf die verwendete Ag/AgCl-Referenzelektrode (214,15 mV) würde demnach das Zellenpotential E 156,25 mV betragen.

Kolthoff et al. und O'Reilly et al. [289, 290] zeigten, dass das formale Potential (= das gegen eine Standardreferenzelektrode gemessene Halbzellenpotential) bei Hexacyanoferrat von der Ionenstärke, dem pH-Wert, der Temperatur sowie Art und Zusammensetzung des Puffers abhängt, da diese die Aktivität der Redoxmoleküle und die Komplexbildung sowie Ionenpaarung verändern [95]. Vermutlich hat die Beschichtung der Goldelektrode ebenfalls einen Einfluss auf das Gleichgewichtspotential. Das erschwert die Berechnung des tatsächlichen Zellenpotentials. Die Ionenstärke I kann mit folgender Gleichung

annähernd bestimmt werden:

$$I = 0,5 \sum_{i=0}^{i=n} (c_i z_i^2) \quad (4.31)$$

mit c der Konzentration und z der Ladung des Ions i .

Die so berechnete Ionenstärke des Messpuffers (BB + 2 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$, äquivalent, d.h. 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ und 1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$) beträgt 0,194 M. Laut Kolthoff und Tomsicek beträgt das normale Potential (Ionenstärke = 0) der Redoxreaktion von Hexacyanoferrat 0,356 V bei 25°C. Das Potential steigt mit zunehmender Ionenstärke, folgt jedoch nicht der Debye-Hückel-Theorie. Anhand der experimentellen Daten von Kolthoff und Tomsicek liegt das Potential einer Salzlösung mit einer Ionenstärke von 0,194 M deutlich über 410 mV (statt dem Standardpotential von 370,4 mV). Demnach würde das Zellenpotential E unseres Messsystems mit der Ag/AgCl-Referenzelektrode über 198,55 mV liegen.

Unter Verwendung einer Referenzelektrode kann das formale Potential gemessen werden. In unserem Fall entspricht es dem Nullstrompotential (auch Ruhepotential und im englischen open-circuit-potential, kurz OCV, genannt), d.h. der Punkt, an dem kein Nettostrom fließt. In diesem Punkt befindet sich die Zelle im elektrochemischen Gleichgewicht, vorausgesetzt es gibt eines. Das Nullstrompotential wurde mit dem Impedanzanalysator bestimmt. Es stellt sich in Anwesenheit von Hexacyanoferrat sehr schnell ein und bleibt dann konstant (siehe Abbildung 4.41). Das Nullstrompotential variiert von Elektrode zu Elektrode im Bereich von 130 bis 160 mV, mit einem Mittelwert von 143 mV. Es zeigt keinen Einfluss durch die Amplitude im Bereich von 7-28 mV und auch keinen Drift.

Der gemessene Wert ist deutlich niedriger als der mit den Halbzellenpotentialen abgeschätzte Wert von 156,25 mV und stimmt auch nicht mit den Literaturwerten überein (169,25 mV für 2 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ in Wasser [290] oder 198,55 mV für 10 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ in 20 mM Tris [289]). Literaturwerte für beschichtete Elektroden unter gleichen Pufferbedingungen konnten nicht gefunden werden. Das gemessene Nullstrompotential entspricht dem formalen Potential bei aufgenommenen Zyklovoltammogrammen. Da kein eindeutiger Wert bestimmt werden konnte, wurde das Nullstrompotential für jede Elek-

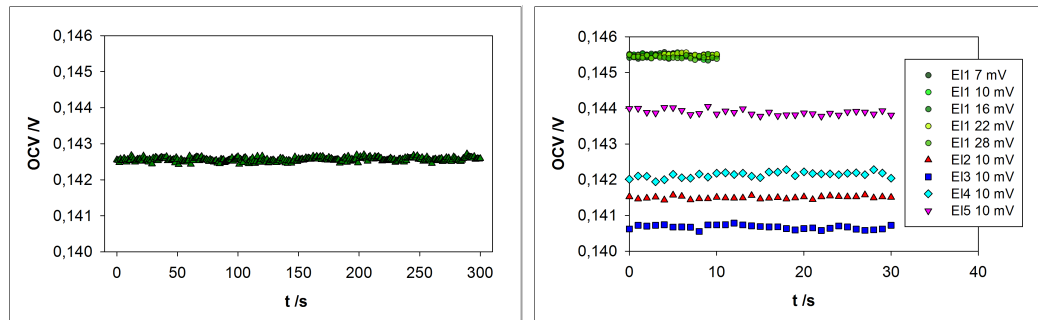


Abbildung 4.41: Nullstrompotentiale OCV der mit Aptamer beschichteten Goldelektroden in der Durchflussmesskammer in Bindungspuffer BB und 2 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ gegen die Ag/AgCl-Referenzelektrode gemessen - links: Langzeitmessung zur Prüfung der Stabilität des Gleichgewichtes; rechts: Nullstrompotentiale OCV verschiedener Arbeitselektroden und Einfluss der Amplitude V_a einer vorangegangenen Impedanzmessung auf das Gleichgewicht und die Nullstromspannung OCV.

trode vor der Messung bestimmt und als Gleichspannung (DC) für die Impedanzmessungen verwendet. Damit konnte sichergestellt werden, dass sich das Messsystem im Gleichgewicht befand.

4.4 Detektion von Protein A und *S. aureus*

In dieser Arbeit wurde ein Biosensor entwickelt, der *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) mithilfe von spezifischen Aptameren und der hochsensitiven Impedanzspektroskopie detektiert. Nachdem das Aptamer erfolgreich an die Gold-elektrode immobilisiert und die Messkammer für die Impedanzmessung optimiert wurde, wird in diesem Abschnitt die Detektion des Analyten untersucht. Das Prinzip des Biosensors basiert darauf, dass durch die Anbindung des Analyten der Transfer der Elektronen von Elektrode zu Redoxmediator in Lösung inhibiert wird, wodurch die Impedanz ansteigt (siehe Abbildung 4.42).

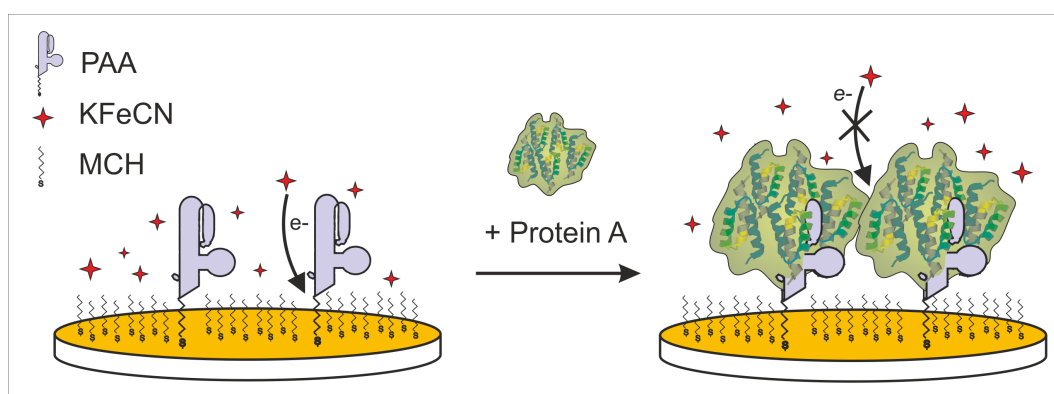


Abbildung 4.42: Prinzip der Detektion von Protein A mit der elektrochemischen Impedanzspektroskopie. Der Ladungstransfer zwischen Hexacyanoferrat ($K_{3/4}[Fe(CN)_6]$) in der Lösung und der Elektrode wird durch die Anbindung von Protein A an die immobilisierten Aptamere (PAA) gehemmt, wodurch die Impedanz ansteigt. MCH = Merkaptohexanol, ein Füllthiol zur Vermeidung unspezifischer Interaktionen mit der Elektrode.

Ob die Impedanz bei der Anbindung steigt, hängt von mehreren Faktoren der beiden Bindungspartner ab, wie z.B. von der Oberflächenladung des Protein A, des Aptamers und der Elektrodenoberfläche sowie von der Ladung des Redoxmediators, welche in diesem Fall negativ ist (Hexacyanoferrat ($[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$)). Weiterhin ist die Faltung des Aptamers für die Zugänglichkeit der Bindungsstelle wichtig, aber auch die Faltung des Protein A kann Hinweise auf sterische Hinderungen geben. Um die Einflüsse zu berücksichtigen, wurde zuerst eine theoretische Betrachtung der Bindung von Protein A und Aptamer durchgeführt (beschrieben in Unterabschnitt 4.4.1). Auf der Oberfläche von *S. aureus* gibt es viele verschiedene Moleküle, die potentielle Anbindungsstellen bieten, von denen jedoch die meisten unspezifisch sind. Um die spe-

zifische Bindung von *S. aureus* über das Protein A zu gewährleisten, wurden Bindungsversuche mit rekombinantem Protein A durchgeführt (beschrieben in Unterabschnitt 4.4.2) und anschließend die Detektion von lebenden *S. aureus* betrachtet (beschrieben in Unterabschnitt 4.4.3).

4.4.1 Theoretische Betrachtung der Anbindung

Für die Entwicklung eines Sensors und vor allem für das Design der Oberfläche ist es notwendig, die Bindung zwischen Analyt und Erkennungselement näher zu verstehen. Ist bekannt, wie sich das zu immobilisierende Element faltet und wo die Bindungsstelle liegt, kann man es dementsprechend gerichtet mit Linkern immobilisieren, sodass das Aptamer genügend Platz zur Faltung hat und die Bindungsstelle frei zugänglich ist. Mithilfe der Bioinformatik kann man Strukturen und Bindungen aufgrund von experimentellen Daten vorhersagen. Dies wird zum Beispiel bei der Entwicklung neuer Medikamente genutzt. Es ist zwar bekannt, wie hoch die Bindungsaffinität des Protein A zu dem Aptamer ist, aber nicht wie sie aneinander binden. Daher wurden in dieser Arbeit die 2D- und 3D-Strukturen des Protein A und des Aptamers betrachtet und Schlüsse für mögliche Bindungsszenarien gezogen. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt.

2D und 3D Struktur des Aptamers

In dieser Arbeit wurde die verkürzte Variante des Protein A-bindenden Aptamers verwendet [198]:

PA#2/8[S1-58]: 5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT AGC AAC
ATG AGG GGG ATA GAG GGG GTG GGT TCT CTC GGC T-3'

Dieses wird im Folgenden als PAA bezeichnet. "mfold" ist ein Programm zur Vorhersage der Hybridisierung und somit zur Faltung von ssDNS- und RNS-Sequenzen (siehe Abschnitt 2.3.1 auf S. 45) und wurde zur Bestimmung der 2D-Struktur des Protein A-Aptamers verwendet. In Abbildung 4.43 ist das Ergebnis für PAA (PA#2/8[S1-58]) dargestellt. Die freie Energie ΔG dieser Faltung beträgt -4,53 kcal/mol. Die Schmelztemperatur dieser Struktur basierend auf einem "two-state"-Model (d.h. es werden die zwei Zustände linear

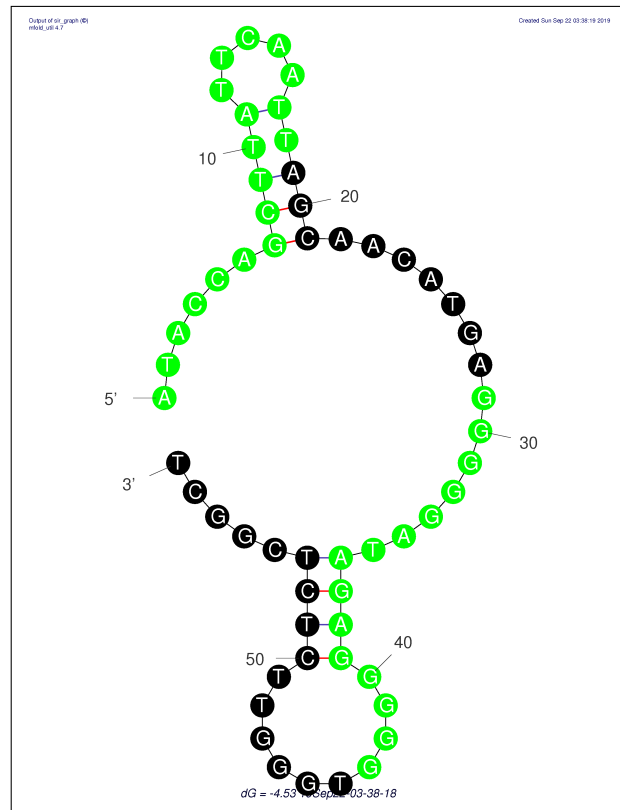


Abbildung 4.43: Vorhersage der Faltung des Aptamers PAA - mit “mfold” bestimmt unter folgenden Versuchsbedingungen: 21°C, $[Na^+/K^+] = 0,105\text{ M}$, $[Mg^{2+}/Ca^{2+}] = 0,011\text{ M}$, Oligo-Korrektur - grün markiert ist der 5'-Primer und die Sequenz, die zur Bildung eines Quadruplexes beiträgt.

und gefaltet angenommen, ohne Übergangszustände) liegt bei 43,4°C mit einem Standardfehler von 2-4°C. Erhöht man die Temperatur für die Faltung von 21°C auf 30°C oder 37°C bleibt die Struktur gleich, nur die Wasserstoffbrücken zwischen Base 11 und 17 bilden sich nicht und die Schleife ist somit etwas größer.

Die Vorhersage von “mfold” lässt vermuten, dass das Aptamer zwei Schleifen ausbildet. Allerdings wird in “mfold” die Bildung von Quadruplexen (siehe Abschnitt 2.3.1 auf S.47) nicht betrachtet. Das PAA weist jedoch guaninreiche Regionen auf, was auf die Bildung eines Quadruplexes hindeutet. Es konnte kein Programm zur Vorhersage der 2D-Struktur mit Betrachtung von Quadruplexen gefunden werden. Aber das Programm “QGRS-Mapper” analysiert, welche Konfiguration der Guaninbasen in der Sequenz am wahrscheinlichsten für die Bildung eines intramolekularen Quadruplex sind [181]. In Tabelle 4.6

Tabelle 4.6: Quadruplexvorhersagen des QGRS Mapper [181] - nur die Overlaps mit dem höchsten G-Score von 19 und der Quadruplex aus nur den ersten beiden guaninreichen Regionen sind dargestellt; blau = Primersequenz.

Position	Länge	Überlappende QGRS	G-Score
30	27	GGGG ATAGA GGGGG TGGGTTCTCTC GG	19
31	26	GGG ATAGA GGGGG TGGGTTCTCTCGG	19
32	25	GG ATAGA GGGGG TGGGTTCTCTCGG	19
29	15	GGGGG ATAGA GGGGG	17
Anzahl von Poly-A-Signalen			0
Sequenzlänge			58 nt
Anzahl QGRS			1
Anzahl überlappender QGRS			121
Komplette Sequenz			
ATACC AGCTT ATTCA ATTAG CAACA TGAGG GGGAT AGAGG GGGTG GGTTT TCTCG GCT			

Suchparameter: max. Länge QGRS: 30 | Min. G-Größe: 2 | Schleifengröße: 0-36

sind die Ergebnisse mit den höchsten G-Score dargestellt.

Die Verteilung des intramolekularen Quadruplex auf alle 4 guaninreichen Regionen ist wahrscheinlicher (G-Score = 19) als ein Quadruplex aus den 2 x 5 Guaninen (G-Score = 17). Das liegt daran, dass das Programm QGRS Schleifen gleicher Länge bevorzugt. Gleichermaßen sind aber auch kürzere Schleifen bevorzugt. Natürlich vorkommende Quadruplexstrukturen, die analysiert wurden, bestehen aus 2 oder 3 Quartetten und weisen Schleifen mit 2, 3 oder 4 Basen auf. Das heißt, die hier betrachteten Quadruplexe enthalten in allen Fällen ungewöhnlich große Schleifen mit 5, 6 oder 7 Basen.

Wie in Unterabschnitt 2.3.4 beschrieben konnte Stoltenburg et al. die Bildung eines Quadruplexes mittels CD-Spektroskopie-Untersuchungen nachweisen [203]. Zudem zeigten Experimente mit ELONA (Enzyme-Linked Oligo-Nucleotide Assay), dass die verkürzten Varianten des Aptamers, PA#2/8[S1-43] und PA#2/8[S1-50], nicht an immobilisiertes rekombinantes Protein A binden. Jedoch zeigte das PA#2/8[S1-43] in vorherigen Untersuchungen hervorragende Bindungseigenschaften zu Protein A-modifizierten Magnetnanopartikel und in der MST (Microscale Thermophoresis) zeigte es gute Bindungseigenschaften sowohl zu rekombinantem als auch zu nativem Protein A [198]. Diese

Diskrepanz lässt sich vielleicht mit der Bildung von Dimeren bzw. Multimeren erklären. In der MST ist das Protein A frei zugänglich und kann von beiden Seiten mit Multimer-aptameren gebunden werden. Auf den Magnetnanopartikeln ist aufgrund der gekrümmten Oberfläche der Partikel ebenfalls mehr Platz vorhanden als bei den auf dem Mikrotiterboden immobilisierten Protein A.

Ein intramolekularer Quadruplex des PA#2/8[S1-58] besteht höchstwahrscheinlich aus zwei Quartetten gebildet von den Guaninen aller 4 guaninreichen Regionen, wie in Tabelle 4.6 dargestellt mit einem G-Score von 19. Falls das Aptamer jedoch bimolekulare oder multimolekulare Quadruplexe bilden sollte, sind weitaus mehr Varianten möglich. Weiterhin deuten die CD-Spektroskopie-Daten darauf hin, dass es sich vermutlich um einen parallelen oder gemischten intramolekularen Quadruplex handelt (vergleiche Abbildung 2.15 in Abschnitt 2.3.1). Wenn das Aptamer einen Quadruplex bildet, so ist die zweite Schleife in Abbildung 4.43 nicht möglich. Die erste Schleife bleibt unberührt und ist vermutlich für die Bindung des Protein A essentiell [198].

Anhand dieser Informationen wurde eine mögliche Struktur des Aptamers entworfen und ist in Abbildung 4.44 dargestellt. Diese Struktur ist rein hypothetisch, aber gibt einen Eindruck, wie die Sensoroberfläche aussehen könnte.

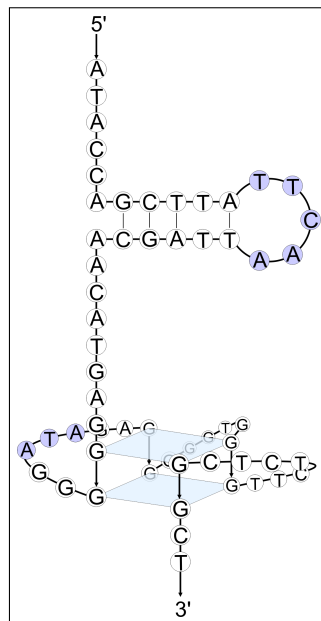


Abbildung 4.44: Rein hypothetische Struktur des PAA mit parallelen intramolekularen Quadruplex; Quartette sind hellblau gefärbt und die lila markierten Basen sind am wahrscheinlichsten an der Bindung zu Protein A beteiligt.

Der parallele monomere Quadruplex kommt auch beim humanen Telomer vor und dient dabei zur Stabilisierung der Schleifen mit der Sequenz "TTA", die wiederum eine Bindungsfunktion haben. Das deutet daraufhin, dass eventuell auch beim PAA die Schleifen an das Protein A binden. Das würde heißen, dass es 4 für die Bindung interessante Sequenzen gibt. Es ist jedoch fraglich, ob der 2er-Quadruplex ausreichend stabilisierend auf die großen Schleifen wirkt. Es erscheint wahrscheinlicher, dass sich ein Dimer mit einem 5er-Quadruplex bildet, um die Schleife mit den 5 Basen "ATAGA" zu stabilisieren. Dann wären vor allem 2 Regionen für die Bindung interessant, "TTCAA" und "ATAGA", und diese liegen recht weit auseinander, was darauf hin deutet, dass sie unterschiedliche Bereiche des Protein A binden. Im folgenden Abschnitt wird die Struktur des Protein A untersucht.

2D und 3D Struktur des Protein A

Protein A (Unterabschnitt 2.1.1) ist ein Oberflächenprotein von *S. aureus* und Analyt des hier verwendeten Protein A-bindenden Aptamers zur Detektion von *S. aureus*. Um Informationen über die Bindung von Protein A an das Aptamer zu gewinnen, wird im Folgenden die Struktur des Protein A genauer betrachtet.

Die komplette Sequenz des Protein A besteht aus 508 Aminosäuren (AS) (uniprot- ID: [P38507](#)). In Abbildung 4.45 ist die Sequenz im FASTA-Format dargestellt. Die spezifischen Bereiche wurden entsprechend markiert und werden im Folgenden näher erläutert.

Am N-Terminus sitzt ein etwa 36 AS langes Signal-Peptid (hellgrün hinterlegt), das signalisiert, dass dies ein extrazelluläres Protein ist und sekretiert werden soll. Das Peptid wird dabei abgespalten. Anschließend folgen fünf etwa 54 AS lange Domänen (E, D, A, B, C) mit helikalen Strukturen (orange hinterlegt). Diese Domänen sind an der Bindung zum Antikörper IgG beteiligt (lila Buchstaben). Nach den 5 Domänen folgt eine Reihe von 2-10 Wiederholungen der kurzen Sequenz "KPGKEDXX" (blaue und grüne Buchstaben), auch als "Octapeptid-Repeat" bekannt, welches in einigen bakteriellen Proteinen vorkommt, doch dessen Funktion bisher unklar ist. Eventuell fungieren sie als Linker zwischen dem Peptidoglykan und dem umgebenden Medium durch die Polysaccharidkapsel (siehe auch Abbildung 2.2). Am C-Terminus befindet

KAPITEL 4. ERGEBNISSE

10	20	30	40	50	
MKKKNIYSIR	KLGVGIASVT	LGTLISGGV	TPAANAQHD	EAQQNAFYQV	Oranger Hintergrund
60	70	80	90	100	=Helixstruktur
LNMPNLNADQ	RNGFIQSLKD	DPSQSANVLG	EAQKLNDSQA	PKADAQQNKF	
110	120	130	140	150	Hellgrün hinterlegt
NKDQQSAFYE	ILNMPNLNEE	QRNGFIQSLK	DDPSQSTNVL	GEAKKLNESQ	= Signal-Peptid
160	170	180	190	200	
APKADNNFNK	EQQNAFYEIL	NMPNLNEEQR	NGFIQSLKDD	PSQSANLLAE	Lila
210	220	230	240	250	= IgG-Bindungsdomäne
AKKLNESQAP	KADNKFNKEQ	QNAFYEILHL	PNLNEEQRNG	FIQSLKDDPS	
260	270	280	290	300	
QSANLLAEAK	KLNDQAPKA	DNKFNKEQQN	AFYEILHLPN	LTEEQRNGFI	Braun
310	320	330	340	350	= LysM Motif
QSLKDDPSVS	KEILAEAKKL	NDAQPKED	NNKPGKEDGN	KPGKEDGNKP	
360	370	380	390	400	
GKEDNKKPGK	EDGNKPGKED	NKKPGKEDGN	KPGKEDGNKP	GKEDGNKPGK	Blau/Grün
410	420	430	440	450	= Repeats
EDGNKPGKED	GNGVHVVKPG	DTVNDIAKAN	GTTADKIAAD	NKLADKNMIK	
460	470	480	490	500	
PGQELVVDDK	QPANHADANK	AQALPETGEE	NPFIGTTVFG	GLSLALGAAL	Orange
510					= LPXTG Motif
LAGRRREL					

Abbildung 4.45: Die Sequenz des Protein A im FASTA-Format mit Hervorhebung spezifischer Regionen.

sich das LysM Motif (braune Buchstaben), welches aus einer beta-alpha-alpha-beta-Struktur besteht und an das Polypeptidglykan der Zelle bindet, während das kurze “LPXTG” Motif (orange Buchstaben) für die Spaltung am Threonin verantwortlich ist. Das fertige an der Außenmembran gebundene Protein A ist nur 441 AS lang. Eine Strukturuntersuchung des kompletten Protein A konnte nicht gefunden werden. Nur von den Domänen E, C und B gibt es Kristallstrukturanalysen (1EDI.pdb, 4NPE.pdb, 2JWD.pdb).

Beim Vergleich der Sequenzen der fünf Domänen (lila Buchstaben) sind konservierte Bereiche zu erkennen (siehe Tabelle 4.7, grau hinterlegt). Die Kristallstrukturanalysen der drei Domänen zeigen die gleiche Sekundärstruktur aus 3 α -Helices. Die Domäne E (AS 37-92; 4NPE.pdb) ist in Abbildung 4.46 dargestellt. Diese Sekundärstruktur wiederholt sich in gleicher Weise in den vier übrigen Domänen.

Tabelle 4.7: Die konservierten Bereiche der fünf homologen Domänen des Protein A

E:	PAANA	AQHDE	AQQNA	FYQVL	NMPNL	NADQR	NGFIQ	SLKDD	PSQSA	NVLGE	AQKLN	DSQAP	K
D:	ADAQQ	NKFNK	DQQA	FYEIL	NMPNL	NEEQR	NGFIQ	SLKDD	PSQST	NVLGE	AKKLN	ESQAP	K
A:	AD	NNFNK	EQQNA	FYEIL	NMPNL	NEEQR	NGFIQ	SLKDD	PSQSA	NLLAE	AKKLN	ESQAP	K
B:	AD	NKFNK	EQQNA	FYEIL	HLPNL	NEEQR	NGFIQ	SLKDD	PSQSA	NLLAE	AKKLN	DAQAP	K
C:	AD	NKFNK	EQQNA	FYEIL	HLPNL	TEEQR	NGFIQ	SLKDD	PSVSK	EILAE	AKKLN	DAQAP	K

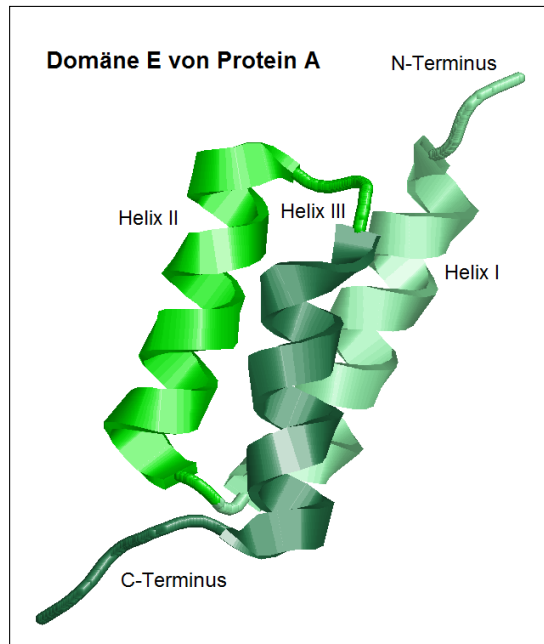


Abbildung 4.46: Sekundäre Struktur der Domäne E des Protein A - bestehend aus drei α -Helices, erstellt mit RasMol Version 2.7.5 aus dem pdb-Eintrag 4NPE

Graille et al. [24] haben die Interaktion von Protein A mit dem Immunglobulin G (IgG) untersucht. Stoltenburg et al. [198] konnten zeigen, dass das Aptamer und Immunglobulin G (IgG) um die Bindung am immobilisierten Protein A konkurrieren (siehe auch Unterabschnitt 2.3.4). Die Versuche mit auf porösem Silizium immobilisierten Aptameren zeigten jedoch, dass IgG an den Protein A-Aptamer-Komplex bindet und somit zur Signalverstärkung genutzt werden konnte [291]. Vermutlich sind an der Bindung zu IgG und zum Aptamer die gleichen Bindungsstellen am Protein A beteiligt, aber durch die homologen Domänen gibt es davon fünf, wodurch nur eine bedingte Konkurrenz existiert. Die Untersuchungen von Graille et al. geben uns Hinweise auf die Bindungsstellen des Aptamers.

Graille et al. haben herausgefunden, welche Aminosäuren an der Bindung des IgG und welche an der Dimerisierung von Domänen beteiligt sind (siehe Abbildung 4.47). Sie fanden heraus, dass Protein A mit Helix I und Helix II am Fc-Teil des IgG und mit Helix II und Helix III am Fab-Teil des IgG bindet. Weiterhin konnten sie zeigen, dass die Bindung beider Teile nicht kompetitiv ist, d.h. Protein A, ein Fab-Fragment und ein Fc-Fragment könnten einen Sandwich bilden ohne sterische Hinderungen an der Domäne. Während

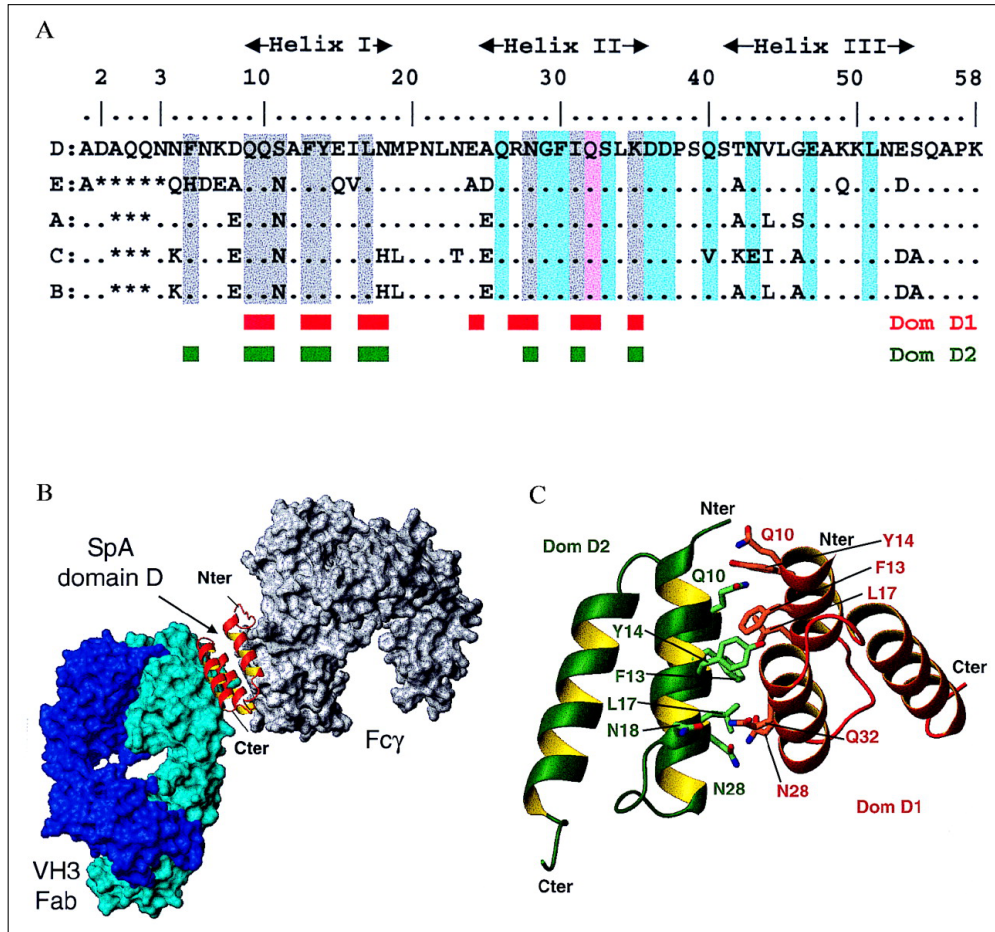


Abbildung 4.47: Interaktion von IgG mit der Domäne D des Protein A und Interaktion zweier D-Domänen miteinander - (A) AS-Sequenzen der fünf Protein A Domänen. Cyan = an der Interaktion mit dem Fab-Fragment beteiligt. Grau = an der Interaktion mit dem Fc-Fragment beteiligt. Mit Ausnahme von Gln-32 (pink) gibt es keine Überlappung der beiden Interaktionen. Die grünen und roten Boxen markieren die AS, die an der Interaktion zweier Domänen miteinander beteiligt sind. Die Interaktion ist asymmetrisch. (B) Interaktion eines VH3 Fab-Fragmentes und eines Fc-Fragmentes mit der Domäne D des Protein A (rotes Band). Dieses Model ist eine Überlagerung zweier einzelner Untersuchungen. (C) Interaktion zwischen zwei D-Domänen, wobei die interagierenden Aminosäuren hervorgehoben sind. Reproduziert aus [24] mit Erlaubnis von PNAS, © (2000) National Academy of Sciences.

die Fab-Bindungsstelle polare Eigenschaften aufweist, ist die Fc-Bindungsstelle größtenteils hydrophob. An der Dimerisierung zweier Domänen sind ebenfalls die Helices I und II beteiligt. Graille et al. vermuten, dass die Dimerisierung zur Interaktion von benachbarten Protein A-Molekülen auf der Zelloberfläche dient, um die Valenz der Bindung zu erhöhen. Während bei der Dimerisierung zwei Wasserstoffbrücken beteiligt sind, bindet das Fc-Fragment über 4 Wasserstoffbrücken, was vermuten lässt, dass die letztere Bindung bevorzugt wird. Daher könnte es sein, dass die Bindung der fünf Domänen untereinander zum Schutz der Bindungsstelle dient, bis diese in die Nähe von Immunoglobulinen kommt. Diese Untersuchungen zeigen, dass Bereiche in den fünf Domänen vom Aptamer gebunden werden. Es bleibt jedoch unklar, ob das Aptamer mit der Bindungsstelle für das Fab- oder das Fc-Fragment konkurriert.

Der “Protein Feature View” des pdb-Eintrages für Protein A (pdb-Eintrag: [P38507](#)) zeigt an, welche Regionen der Sequenz geordnet und ungeordnet vorliegen. Dies wird vorhergesagt mit JRonn [292], einer Software zur Ermittlung der Regionen im Protein, die keine definierte dreidimensionale Struktur im natürlichen Zustand ausbilden. Das Ergebnis besagt, dass die sich wiederholende Sequenz “AFYXXLXX” die einzige geordnete Region in den fünf Domänen des Protein A ist. Dies weist darauf hin, dass diese Region besonders wichtig für das Protein A ist und eine reproduzierbare Struktur ausbildet. Dieser Bereich befindet sich in der Helix I der Domänen und ist an der Bindung zum Fc-Teil des IgG als auch an der Bindung zu einer homologen Domäne beteiligt, aber bindet nicht an die Fab-Region des IgG.

Alonso und Daggett [293] untersuchten die Entfaltung der Helices der Domänen B und E des Protein A und stellte fest, dass die Helix III die stabilste der drei Helices ist und die Helices I und II ohne Helix III nicht gebildet werden. Das heißt, Helix III bildet eine Art Gerüst für die flexibleren Helices I und II. Zudem scheint die Flexibilität der Helices I und II dafür verantwortlich zu sein, dass Protein A verschiedene Bereiche des IgG binden kann. Dies lässt vermuten, dass Helix III nicht an Bindungen beteiligt ist.

Da es keine Strukturanalysen des gesamten Proteins gibt, ist es nicht möglich, genauere Aussagen über verfügbare Bindungsstellen zu treffen. Auch die Verwendung von Software zur Vorhersage der 3D-Struktur führte zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen.

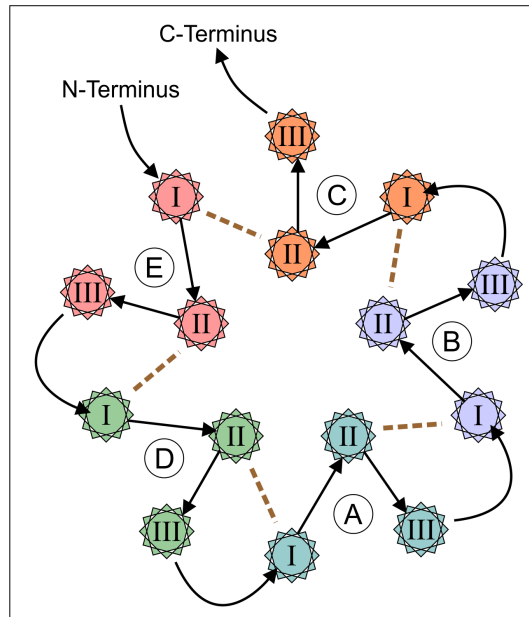


Abbildung 4.48: Hypothetische 3D-Struktur der fünf homologen Domänen des Protein A; die fünf Domänen (E, D, A, B, C) sind in verschiedenen Farben dargestellt, jeweils mit den drei Helices I, II und III; schwarze Pfeile markieren den Verlauf des Proteinstrangs; braune gestrichelte Linie markiert die Interaktion zwischen zwei Domänen.

Allgemein sind die bekannten 3D-Strukturen von Teilen des Protein A sehr geordnet und weisen oft Symmetrien auf. Aus der Beobachtung von Graille et al., dass zwei Domänen über die Helices I und II binden können, lässt vermuten das die Helix I einer Domäne mit der Helix II einer anderen Domäne interagiert und dadurch eine kettenförmige Struktur entsteht, die sich zu einem Ring zusammenschließen. In Abbildung 4.48 ist diese rein hypothetische Struktur beispielhaft dargestellt. Eine mögliche Vorstellung wäre, dass die Helices I und II geschützt ins innere der Proteinstruktur zeigen, bis die Bindung des IgGs die Verbindung der Domänen aufbricht und somit die Helices I und II nach außen präsentiert werden und nun an das IgG binden können, um dieses unschädlich zu machen.

Zusammenfassend lässt sich wenig über die Bindungsstellen am Protein A sagen. Aufgrund der vermeintlichen Konkurrenz von IgG und Aptamer um die Bindungsstellen am Protein A liegen diese höchstwahrscheinlich in den Helices I und II. Im folgenden Abschnitt wird betrachtet, inwiefern die Schleifen des Aptamers mit den Helices interagieren könnten.

Mögliche Interaktionen zwischen Aptamer und Protein A

Luscombe et al. haben die Bindungen von Proteinen und DNS untersucht [184] (siehe auch Unterabschnitt 2.3.2). Aus deren Ergebnissen wurde eine Liste mit bevorzugten Interaktionen zusammengestellt (siehe Tabelle 2.3 in Unterabschnitt 2.3.2). Die als am wahrscheinlichsten an der Bindung beteiligten Abschnitte des Aptamers, "TTCAA" und "ATAGA", wurden mit der Tabelle abgeglichen und nach dementsprechenden Bindungspartnern für die Basen in der Sequenz des Protein A gesucht. Tatsächlich ließen sich zwei auffallend passende Bereiche finden (siehe Tabelle 4.8) und zwar die Sequenz "QRNGFIQ" in Helix II und die Sequenz "NKFNK" im Linker zwischen den Domänen.

Tabelle 4.8: Sequenzabschnitte des Aptamers und Aminosäure (AS)-Sequenzabschnitte des Protein A, die über Wasserstoffbrücken (OH) und Van-der-Waals-Kräfte (vdW) interagieren könnten

DNS-Sequenz	Bevorzugte AS	AS-Sequenz	Bindungsart
T	R K Q F T	Q (E)	vdW
T	R K Q F T	K (N)	OH
C	D E F	F	vdW
A	R N Q F P	K/N	OH
A	R N Q F P	N	OH
A	R N Q F P	Q (I)	OH/vdW
T	R K Q F T	F (G)	vdW
A	R N Q F P	N	OH
G	R K	R	OH/vdW
A	R N Q F P	Q	OH/vdW

Es ist bekannt, dass Haarnadelschleifen bei DNS-Sequenzen das Phosphatrückgrat nach außen präsentieren und dieses über elektrostatische Wechselwirkungen die Annäherung von Protein und DNS ermöglicht. Bei der hypothetischen Struktur in Abbildung 4.48 ist der Linker zwischen Helix I der einen Domäne und Helix III der anderen Domäne abwechselnd nach oben und unten ausgerichtet, so dass dieser ideal zum Andocken geeignet ist, da er praktisch von allen Richtungen erreichbar ist. Die Sequenz des Linkers scheint sich hervorragend für die Bindung an DNS zu eignen und spielt eventuell beim Ein-

dringen von *S. aureus* in Zellen eine bisher ungeahnte Rolle. Als zweiten Schritt könnte die Helix II einer Domäne des Protein A an die Schleife “ATAGA” des Quadruplex des Aptamers binden, wodurch eine festere Bindung erreicht wird. Die Bindung besteht abwechselnd aus Wasserstoffbrücken (OH) und Van-der-Waals-Wechselwirkungen (vdW). Es könnte auch sein, dass die Schleife ebenfalls an den Linker zwischen den Domänen bindet. Das würde allerdings nicht die zu beobachtende Konkurrenz zwischen IgG und Protein A erklären. Bei den anderen Schleifen des Quadruplexes konnten keine eindeutigen Sequenzen gefunden werden, weshalb diese vermutlich eine untergeordnete Rolle spielen. Im Falle der Bildung des Quadruplexes als Dimer aus zwei Aptameren, würden die anderen Schleifen nicht entstehen und die “ATAGA”-Schleife wäre deutlich stabiler, da sich fünf Quartette ausbilden.

Das beschriebene Bindungsszenario wurde anhand der vorliegenden Informationen erstellt und ist daher rein hypothetisch. Die Summe der Informationen ist zu gering, um eindeutige Schlussfolgerungen der Bindung von Aptamer PAA und Protein A zu ziehen. Es müssten Experimente mit synthetisch hergestellten Sequenzen, den bestimmte Regionen fehlen, durchgeführt werden, um Gewissheit über relevante Bindungsstellen zu erlangen. Dies liegt jedoch außerhalb des Rahmens dieser Dissertation.

Zudem basieren die Untersuchungen von Luscombe et al. hauptsächlich auf Interaktionen zu doppelsträngiger DNS (dsDNS), wodurch die hohe Beteiligung des Phosphatrückgrates zu erklären ist, da die Basen bereits über Wasserstoffbrücken gebunden sind. In ssDNS sind die Basen frei und könnten Wasserstoffbrücken zu Aminosäuren bilden. Es wäre sinnvoll, die Untersuchungen von Luscombe für ssDNS und Quadruplexe zu wiederholen, vorausgesetzt es existieren ausreichend Datensätze.

4.4.2 Detektion von Protein A mit der EIS

Die Bindung von Protein A an das immobilisierte Aptamer konnte bereits mit der QCM verifiziert werden (siehe Abschnitt 4.2.3). Auch bei Untersuchungen der mit Aptamer PAA beschichteten Goldelektrode mit der Zyklovoltammetrie konnte ein Stromabfall nach Inkubation mit nur 70 nM Protein A (PA) beobachtet werden (siehe Abbildung 4.49 links). Durch die Anbindung von Protein A ist der Peakstrom um $0,5 \mu\text{A}$ gesunken, was die Theorie der Hinderung des

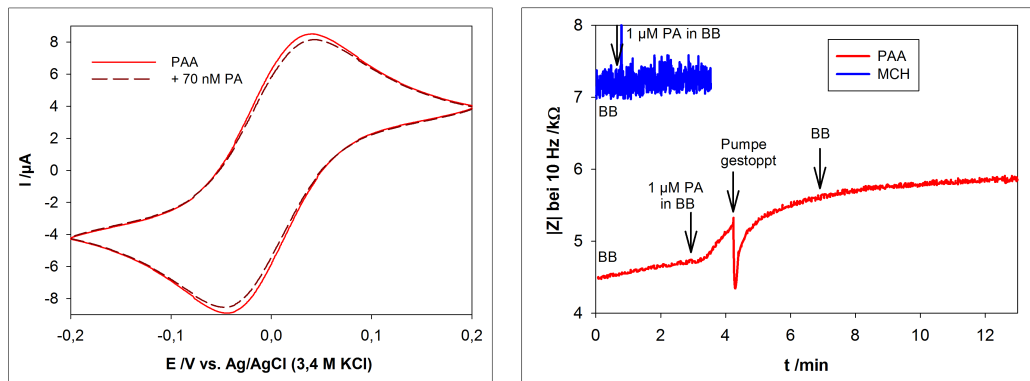


Abbildung 4.49: Links: Zyklovoltammogramme einer mit Protein A-bindenden Aptamer beschichteten Goldelektrode vor und nach der Inkubation mit 70 nM Protein A; gemessen in Bindungspuffer BB + 2 mM $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ bei 100 mV/s. Rechts: Impedanzmessung bei 10 Hz zur Aufnahme des zeitlichen Verlaufs der Anbindung von Protein A an das immobilisierte Aptamer PAA (rot) im Vergleich zu einer mit Merkptohexanol (MCH) beschichteten Goldelektrode (blau); gemessen in BB bei $V_a = 10$ mV.

Elektronentransfers bestärkt.

Um den kinetischen Verlauf der Bindung zu betrachten, wurden zunächst Impedanzmessungen bei einer Frequenz durchgeführt. Es wurde die Frequenz 10 Hz gewählt, da bei dieser Frequenz die Impedanz größtenteils vom Ladungstransfer beeinflusst wird. Das Aptamer wurde im Bindungspuffer BB selektiert und daher wurden die ersten Untersuchungen in BB ohne Redoxmediator durchgeführt (siehe Abbildung 4.49 rechts). Der Betrag der Impedanz $|Z|$ war mit etwa 5 $\text{k}\Omega$ vergleichsweise groß aufgrund des hochohmigen Puffers und das Signal rauschte stark mit Abweichungen von bis zu $\pm 50 \Omega$. In den ersten drei Minuten war auf der mit Aptamer beschichteten Elektrode eine starke Drift zu erkennen, während das Signal der mit Merkptohexanol beschichteten Elektrode konstant blieb. Nach der Zugabe von Protein A war bei der mit Aptamer beschichteten Elektrode sofort ein signifikanter Anstieg zu erkennen, während bei der mit MCH modifizierten Elektrode keine Änderung zu beobachten war. Um der Probe Zeit zum Inkubieren zu geben, wurde die Pumpe gestoppt, was leider zu einem Messartefakt in Form eines Sprunges führte. Obwohl die genaue Ursache des Artefakts unklar ist, wurde es der hochohmigen Messumgebung in Kombination mit der Pumpe zugesprochen. Nach drei Minuten Inkubationszeit wurde mit Bindungspuffer gewaschen, wobei das Signal auf seinem erhöhten Niveau blieb. Dies zeigt, dass das Protein A fest an die Aptamere auf der

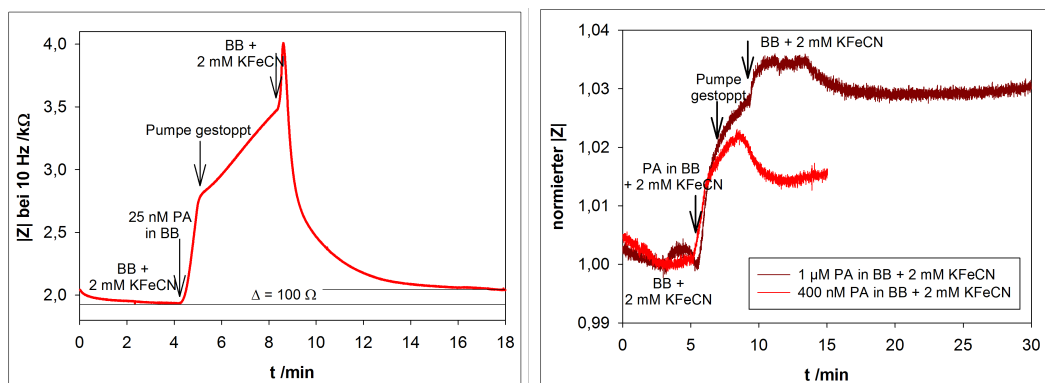


Abbildung 4.50: Impedanzmessung bei 10 Hz zur Aufnahme des zeitlichen Verlaufs der Anbindung von Protein A in BB (links) und in BB + 2 mM $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (rechts) an das immobilisierte Aptamer PAA, gemessen in BB + 2 mM $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ bei $V_a = 10 \text{ mV}$.

Elektrode gebunden wurde. Die Änderung des Impedanzbetrages beträgt etwa $1 \text{ k}\Omega$.

Für die Bestimmung des Ladungstransfers ist die Zugabe von Redoxmediator nötig, der die Impedanz von $5 \text{ k}\Omega$ auf etwa $2 \text{ k}\Omega$ herabsenkt. Die Messung des zeitlichen Verlaufs der Anbindung des Protein A, wenn dabei ein Wechsel von BB mit Redoxmediator zu BB ohne Redoxmediator einhergeht, erweist sich als unmöglich (siehe Abbildung 4.50 links), da die Effekte des Pufferwechsels die Anbindung überlagern. Beim Lösungswechsel dauert es abhängig von der Pumpgeschwindigkeit bis zu 8 Minuten bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Dies ist auch der nicht optimalen Form der Durchflussmesskammer zuzuschreiben. Für die geringe Protein A-Konzentration von 25 nM konnte hier eine Änderung des Impedanzbetrages von 100Ω beobachtet werden.

Um diesen Einfluss des Pufferwechsels zu vermeiden, wurde das Protein A in Bindungspuffer mit Redoxmediator gelöst und zum immobilisierten Aptamer gegeben (siehe Abbildung 4.50 rechts). Hierbei konnte der kinetische Verlauf der Anbindung des Protein A gut beobachtet werden. Auch hier wurde die Pumpe zwischendurch gestoppt, um das Protein A für eine Minute inkubieren zu lassen, wobei keine Messartefakte auftraten. Im Gegensatz zur Messung in Bindungspuffer ohne Redoxmediator, kann hier auch die Verdrängung von unspezifisch gebundenen Molekülen durch das Waschen beobachtet werden, zu sehen durch den Abfall des Impedanzbetrages beim Waschen mit BB + 2 mM $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Allerdings sind die Signaländerungen bei dieser Messung

deutlich geringer und liegen bei Absolutwerten von 40 und 60 Ω . Aus diesem Grund wurde das Protein A in BB ohne Redoxmediator gelassen und nur vor und nach der Inkubation eine Impedanzmessung durchgeführt. Dadurch konnten höhere Signale erreicht werden. In allen Fällen wurde die Probe mit dem Protein A nur eine Minute durch die Messkammer gepumpt, da angestrebt wurde, das benötigte Probenvolumen zu minimieren. Da das Plateau noch lang nicht erreicht ist, wurde das Probenvolumen von 1,5 ml auf 6 ml angehoben.

Parameter

In Abbildung 4.51 sind die Impedanzspektren verschiedener Protein A- Konzentrationen zu sehen. Die Impedanzspektren zeigen den zu erwartenden Verlauf in Form eines Halbkreises, der in eine Gerade übergeht. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Durchmesser des Halbkreises mit steigender Protein A- Konzentration wächst. Um den zu beobachtenden Anstieg der Impedanz einem oder mehreren Ereignissen auf der Elektrodenoberfläche zuordnen zu können, wurde ein Ersatzschaltbild entwickelt (siehe Unterabschnitt 3.3.9). Das Ersatzschaltbild ist in Abbildung 4.51 dargestellt und spiegelt alle relevanten Vorgänge an der Elektrodenoberfläche wider.

Der Widerstand der Lösung R_{sol} und der Widerstand beim Transfer von Elektronen zwischen Elektrode und Ladungsträgern in der Lösung R_{ct} sind durch Widerstände dargestellt. Die Kapazität der sich aus Ionen bildenden Doppelschicht an der Elektrodenoberfläche C_{dl} wird in Form eines Konstantphasenelementes (CPE) aufgrund der Polykristallinität der Elektrodenoberfläche repräsentiert. Und die Diffusion der Ladungsträger in der Lösung zur Elektrode (Ionen und Redoxmediator), die aufgrund derer Ladung und Hydrathülle gehemmt wird und einen trägen Prozess darstellt, wird durch ein Warburgelement W dargestellt, was einem Konstantphasenelement (CPE) mit der Phase von 45° entspricht.

Die Ergebnisse der Kurvenanpassung mit diesem Ersatzschaltbild (siehe Abbildung 4.51) sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst. Beim hier verwendeten Fitalgorithmus "Downhill Simplex" (siehe Unterabschnitt 3.3.9) wird χ^2 minimiert. In unserem Fall setzt sich χ^2 aus der Summe der Abweichungsquadrate simulierter und gemessener Datenpunkte aller Frequenzen f (1 bis n) für den jeweiligen Parameter *par* gewichtet nach dem Betrag der Impedanz $|Z|$

Tabelle 4.9: Ergebnisse der Kurvenfits in Abbildung 4.51 - SD = Standardabweichung, χ^2 = Fehler des Fits = Güte des Fits normalisiert auf die Anzahl der Datenpunkte.

c(Protein A) /nM	R_{sol} / Ω	SD	C_{eff} / μF	SD	n	R_{ct} / Ωcm^2	SD	A_w / $\Omega s^{-1/2}$	SD	χ^2
7	44,4	0,2	0,443	0,004	0,946	505,3	0,5	5769	2	0,0122
24	46,2	0,1	0,469	0,021	0,940	593,3	0,5	5847	2	0,0124
70	45,4	0,1	0,436	0,003	0,946	627,9	0,5	5861	2	0,0120
240	46,1	0,1	0,419	0,004	0,947	647,3	0,5	5834	2	0,0105
700	45,3	0,1	0,435	0,005	0,946	657,2	0,5	5811	2	0,0118

zusammen:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{|Z_{gemessen}(f_i) - Z_{simuliert}(f_i, par)|^2}{|Z|^2}$$

Durch die Gewichtung wird mehr Bedeutung auf die Messpunkte mit hohen Impedanzen, d.h. bei kleinen Frequenzen gelegt. Die Datenpunkte bei kleinen Frequenzen sind für die zuverlässige Bestimmung des Ladungstransferwiderstandes R_{ct} relevant. Je kleiner χ^2 , desto besser der Fit und somit wird χ^2 auch zur Angabe der Güte eines Fits verwendet. Das gewichtete χ^2 ist in Tabelle 4.9

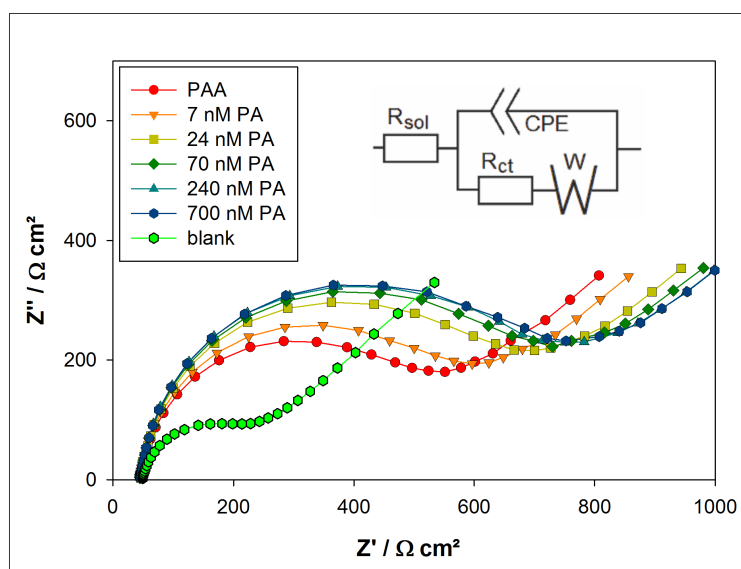


Abbildung 4.51: Nyquist-Plot der Impedanzspektren von mit PAA und MCH im molaren Verhältnis 1:4 beschichteten Goldelektroden vor und nach der Inkubation mit Protein A in verschiedenen Konzentrationen von 7-700 nM, gemessen in BB + 2 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$. Linien repräsentieren den Fit mit dem gezeigten Ersatzschaltbild.

angegeben und der relative Fehler, d.h. χ^2 geteilt durch die Anzahl der Messpunkte N liegt bei $\sim 16 \Omega$. Die visuelle Beurteilung als auch χ^2 sprechen für eine hohe Güte des Fits und somit dafür, dass das gewählte Ersatzschaltbild sehr gut die gemessenen Daten widerspiegelt.

Das CPE und das Warburgelement W gehören nicht zu den idealen Bauelementen. Sie sind frequenzabhängig, aber mit einer konstanten Phase, d.h. die Phase ist frequenzunabhängig. Das CPE hat die Einheit $F s^{n-1}$ und die Phase beträgt $n 90^\circ$, wobei n einen Wert zwischen 0 und 1 annehmen kann, aber typischerweise zwischen 0,5 und 1 liegt. Für $n=1$ entspricht das CPE einer Kapazität C und der Sonderfall $n=0,5$ wird durch das Warburgelement W beschrieben. Im Nyquistplot erscheint ein CPE als Gerade mit dem Winkel $n 90^\circ$ zur x-Achse. Eine Parallelschaltung aus CPE und Widerstand erscheint im Nyquistplot wie ein gedrungener Halbkreis, dessen Mittelpunkt unterhalb der x-Achse liegt. Diese gedrungenen Halbkreise werden oft in realen elektrochemischen Systemen beobachtet und den auftretenden Inhomogenitäten und spezifischen Verteilungen einer physischen Komponente zugeschrieben. Die Impedanz des CPE ist:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Q(j\omega)^n}$$

mit der imaginären Zahl j und der Kreisfrequenz $\omega = 2\pi f$. Der Parameter Q ist ebenfalls frequenzunabhängig und hat die Einheit Farad. Hirschorn et al. [294] haben untersucht, wie die effektive Kapazität C_{eff} aus dem CPE berechnet werden kann und dafür eine Verteilung der Zeitkonstanten auf der Oberfläche vorgeschlagen (siehe Abbildung 4.52).

Für unseren Fall einer Goldelektrode beschichtet mit einer gemischten SAM aus Aptamer PAA und MCH ist die Verteilung von verschiedenen Zeitkonstanten entlang der Oberfläche in Anwesenheit eines ohmschen Widerstandes repräsentativ. Eine SAM ist selten komplett homogen, sondern besteht meist aus Patches von Molekülen mit gleicher Ausrichtung, die an sogenannten Defektstellen aufeinander treffen (siehe Abbildung 4.52). Die Mitte solcher Patches weist andere Zeitkonstanten auf als die Ränder des Patches. Genauso sind die Zeitkonstanten in der Nähe von Aptameren anders. Nach Hirschorn et al. kann bei dieser Oberflächenverteilung die effektive Kapazität C_{eff} aus dem Parameter Q mit folgender Gleichung bestimmt werden [294]:

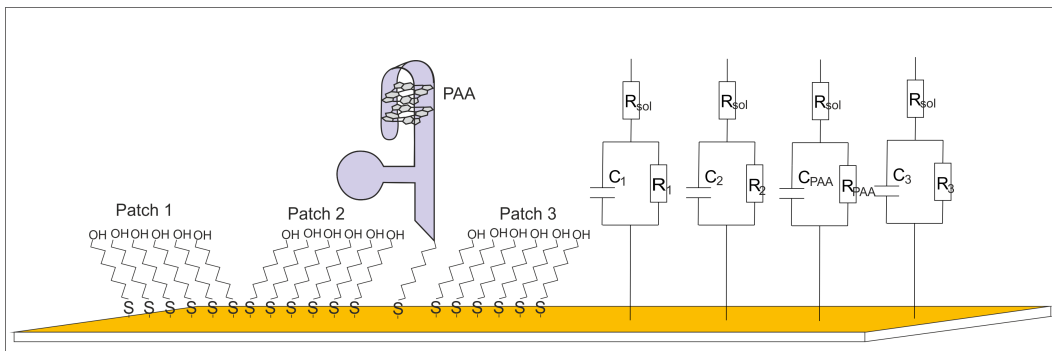


Abbildung 4.52: Schema der Goldelektrodenoberfläche mit der gemischten SAM aus PAA und MCH-Patches mit Defektstellen an den Übergängen zur Erklärung der Verwendung eines CPE, repräsentiert durch die Verteilung von verschiedenen Zeitkonstanten mit ohmschen Widerstand R_{sol} entlang der Oberfläche.

$$C_{eff} = Q^{\frac{1}{n}} \left(\frac{R_{sol} R_{ct}}{R_{sol} + R_{ct}} \right)^{\frac{1-n}{n}}$$

Die so bestimmte effektive Kapazität ist in Tabelle 4.9 angegeben. Auf die elektrochemisch aktive Fläche bezogen, beträgt C_{eff} $0,991 \pm 0,041 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und liegt im Bereich der Literaturwerte von $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ bis $5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ für mit SAM beschichtete Elektroden [262]. Demgegenüber beträgt der Wert der Kapazität bestimmt nach der Sluyters Methode $4,61 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Die Abweichung der Werte ist zum einen der Ungenauigkeit der Sluyters Methode zuzuordnen. Zum anderen wurden für die Untersuchung der Anbindung von Protein A neue Goldelektroden verwendet, während für die Charakterisierung der Messkammer zumeist gereinigte wiederverwendete Goldelektroden genutzt wurden.

Die prozentuale Änderung der einzelnen Elemente des Ersatzschaltbildes in Abhängigkeit von der Protein A-Konzentration ist in Abbildung 4.53 zu sehen. Zudem wurde eine Spearman Korrelationsanalyse aller Parameter mit der Protein A-Konzentration durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 4.10 dargestellt sind. Der Ladungstransferwiderstand R_{ct} zeigt einen signifikanten Anstieg positiv korrelierend zur Protein A-Konzentration ($r = 1,000$; $p = 0,003$), was die Hemmung des Ladungstransfers als Ursache für den Impedanzanstieg bestätigt (Hypothese II). Auch die Kapazität zeigt eine Korrelation zur Analytkonzentration, allerdings mit einem negativen Korrelationskoeffizienten ($r = -0,943$; $p = 0,017$), d.h. mit steigender Analytkonzentration sinkt die effektive Kapazität. Dies wird vermutlich durch die Neutralisierung der negativen La-

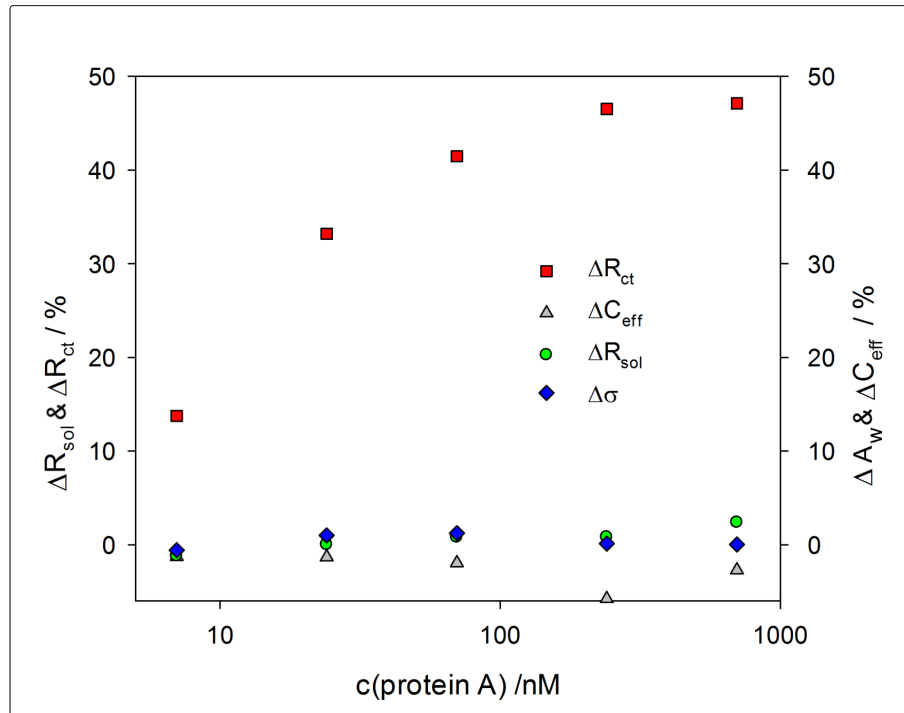


Abbildung 4.53: Prozentuale Änderung der Fit-Parameter in Abhängigkeit von der Protein A-Konzentration; C_{eff} ist die effektive Kapazität berechnet aus dem CPE unter der Annahme einer Verteilung der Zeitkonstanten auf der Oberfläche [294]; A_w ist der Warburgkoeffizient der Warburgimpedanz Z_w (siehe Unterabschnitt 2.4.6)

derung der Aptamere durch den gebundenen Analyten verursacht. Da die Impedanz proportional zu $1/C$ ist, trägt die abnehmende Kapazität ebenfalls zum Anstieg der Impedanz bei. Hingegen zeigen Lösungsmittelwiderstand (R_{sol}) und Warburgkoeffizient (A_w) keine signifikante Korrelation ($p > 0,025$).

Tabelle 4.10: Ergebnisse der Spearman Korrelationsanalyse

	R_{sol}	R_{ct}	C_{eff}	A_w
Korrelationskoeffizient r	0,883	1,000	-0,943	0,429
p Wert	0,033	0,003	0,017	0,419

Der Ladungstransferwiderstand R_{ct} wird für die folgenden Untersuchungen verwendet. Im Gegensatz zum Impedanzbetrag $|Z|$ ist R_{ct} spezifischer und kann helfen unerwünschte Effekte mit Einfluss auf die Impedanz zu filtern und somit ebenfalls das Rauschen des Signals zu vermindern. Dies wird vor allem für Messungen in komplexen Medien von Bedeutung sein.

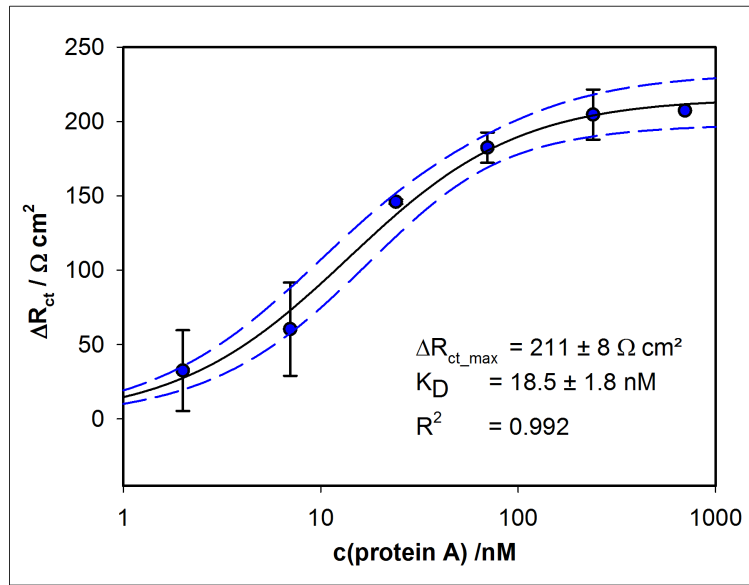


Abbildung 4.54: Bindungskurve für die Detektion von rekombinanten Protein A durch den entwickelten impedimetrischen Aptasensor. Jede Konzentration wurde mit drei unterschiedlichen beschichteten Elektroden bestimmt. ΔR_{ct} = Änderung des Ladungstransferwiderstandes, bestimmt durch den Fit der Impedanzspektren. Schwarze durchgezogene Linie zeigt den Fit der Bindungskurve mit dem Bindungsmodell (siehe Gleichung 3.20 in Abschnitt 3.3.9); Blau gestrichelte Linie repräsentiert das 90% Konfidenzintervall.

Um eine Bindungskurve aufzunehmen, wurden jeweils drei frisch beschichtete Goldelektroden mit verschiedenen Protein A-Konzentrationen in Bindungspuffer BB inkubiert und anschließend vermessen. Die genaue Beschreibung der Messprozedur befindet sich in Abschnitt 3.3.6. Die Bindungskurve ist in Abbildung 4.54 dargestellt. Bereits eine Konzentration von 3 nM ist detektierbar, der dynamische Bereich reicht über eine Dekade und der lineare Bereich reicht von etwa 7 bis 24 nM mit einer Sensitivität von 5 Ohm cm² pro nM. Der R_{ct} wird in Ω cm² angegeben, damit er mit anderen Sensoren vergleichbar ist. Der Absolutwert wird dafür mit der elektrochemisch aktiven Fläche A_{true} multipliziert (0,444 cm²). Die Bindungskurve wurde mit dem Bindungsmodell (siehe Abschnitt 3.3.9) gefittet:

$$\Delta R_{ct} = \frac{\Delta R_{ct_{max}} [PA]}{K_D + [PA]} \quad (4.32)$$

mit $[PA]$ der Protein A-Konzentration und K_D der scheinbaren Dissoziationskonstanten.

Der Fit ist als schwarze Linie in Abbildung 4.54 dargestellt ($R^2 = 0,992$). Durch den Fit können mehr Informationen aus der Bindungskurve gewonnen werden.

Tabelle 4.11: Dissoziationskonstanten K_d des Aptamers PAA mit Protein A bestimmt mit verschiedenen Messmethoden. MST = Microscale Thermophorese, SPR = Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie, ELONA = Enzym-gekoppelter Oligonukleotid-Assay, EIS = elektrochemische Impedanzspektroskopie, RIFTS = reflective interferometric fourier transform spectroscopy.

Method	Aptamer	Label	Protein A	K_D /nM	Referenz
MST	frei	5'-Fluorophor	frei	$94,7 \pm 64,6$	[198]
MST	frei	5'-Fluorophor	frei	$115,6 \pm 26,9$	diese Arbeit
MST	frei	3'-Fluorophor	frei	$110,8 \pm 42,3$	diese Arbeit
MST	frei	3'-Fluorophor	frei	$22,4 \pm 5,8$	diese Arbeit
SPR	frei	5'-Fluorophor	immobilisiert	$1920,0 \pm 250,0$	[198]
SPR	immobilisiert	3'-Biotin	frei	$287,0 \pm 16,2$	[198]
ELONA	frei	5'-Biotin	immobilisiert	$23,7 \pm 2,0$	[203]
ELONA	frei	3'-Biotin	immobilisiert	$11,3 \pm 1,4$	[203]
EIS	immobilisiert	3'-Thiol	frei	$18,5 \pm 1,8$	diese Arbeit
RIFTS	immobilisiert	3'-Amino	frei	$13980,0 \pm 1540,0$	[291]

Die scheinbare Dissoziationskonstante K_D gibt Auskunft über die Affinität der Bindung zwischen Aptamer und Protein A. Je kleiner die K_D , desto höher die Affinität der Bindungspartner. Die K_D entspricht bei Bindungsreaktionen mit unabhängigen Bindungsstellen der Konzentration, bei der die Hälfte der Moleküle gebunden vorliegen. Da die K_D von äußeren Bedingungen wie der Temperatur, der Konzentration und dem Druck abhängt, ist sie nicht für den Vergleich von verschiedenen Methoden und Ansätzen geeignet. Dazu müssten thermodynamische Daten herangezogen werden, die jedoch oftmals nicht bestimmt werden können. In Tabelle 4.11 sind die K_D s für PAA bestimmt mit verschiedenen Methoden und Ansätzen dargestellt. Die Werte variieren von 11,3 nM bis 14 μ M und es lässt sich keine Tendenz hinsichtlich der Markierung bei Verwendung der gleichen Messmethode erkennen. Es ist jedoch eindeutig, dass mit allen Methoden das Protein A gebunden werden konnte und die K_D meist im nM-Bereich liegt und somit eine spezifische und hochaffine Anbindung vorliegt, die vergleichbar mit der Bindung von Antikörper und Antigen ist ($K_d = 10^{-6}$ M bis 10^{-11} M [295]).

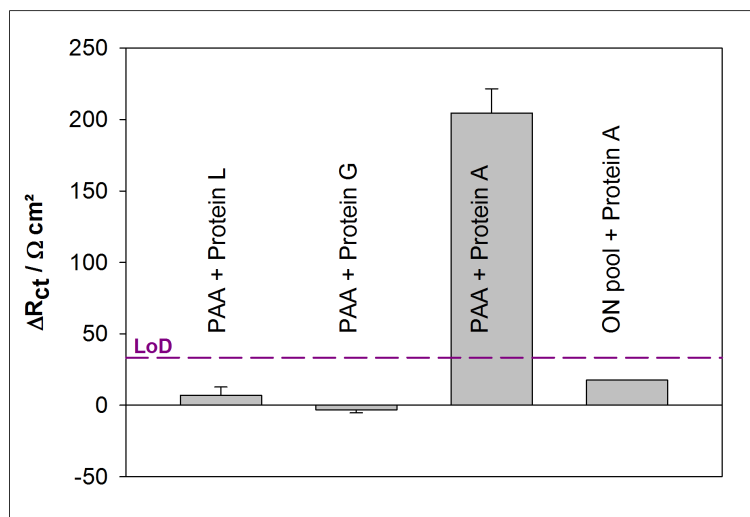


Abbildung 4.55: Untersuchung der unspezifischen Bindungen durch Inkubation von mit PAA beschichteten Goldelektroden mit $1 \mu\text{M}$ Protein G und Protein L und der Inkubation von mit Oligonukleotid-Pool beschichteten Goldelektrode mit $1 \mu\text{M}$ Protein A. Lila gestrichelte Linie markiert die Detektionsgrenze.

Wiederholte Messungen von beschichteten Goldelektroden in $\text{BB} + 2 \text{ mM } \text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ zeigten eine Standardabweichung s des R_{ct} von $11,1 \Omega \text{ cm}^2$. Das Detektionslimit (die LoD) entspricht der Konzentration, dessen Signal $3s$ beträgt und wurde mit dem Bindungsmodell auf $2,99 \pm 0,73 \text{ nM}$ bestimmt. Das bedeutet, dass bereits 4 nM rekombinantes Protein A in Puffer (BB) zuverlässig bestimmt werden können. Der Sensor ist aufgrund des kleinen linearen Messbereiches und der hohen Standardabweichung eher für qualitative Aussagen geeignet. Die Standardabweichung und das Konfidenzintervall können durch das Messen von 100 statt drei Stichproben verkleinert werden. Durch Optimierung des Oberflächendesigns des Sensors kann der Messbereich erweitert werden.

Um zu verifizieren, dass die beobachteten Signale tatsächlich spezifisch sind, wurden beschichtete Elektroden mit den ebenfalls IgG-bindenden Molekülen Protein G und Protein L inkubiert und gemessen. Wie in Abbildung 4.55 zu sehen, konnte keine Anbindung detektiert werden, da die Signale deutlich unter der Detektionsgrenze liegen. Protein G und L werden von Streptokokken exprimiert und binden ebenfalls an Immunglobuline. Die Sequenzen enthalten ebenfalls sich wiederholende homologe Domänen mit DNS-bindenden Aminosäuren (Q, Y, F, N, K, P, ...), aber die sekundäre Struktur besteht aus nur

einer Helix und β -Faltblättern. Obwohl in der Sequenz des Protein G sogar die Abfolge “QKF” zu finden ist, weisen beide Proteine nicht den für Protein A typischen Linker mit der Sequenz “NKFNK” auf.

Um ebenfalls eine rein auf elektrostatischen Interaktionen basierende Bindung von Protein A und Aptamer auszuschließen, wurden Goldelektroden mit einem Oligonukleotid-Pool von zufälligen Sequenzen gleicher Länge beschichtet (gleiche Methode wie bei PAA, siehe Unterabschnitt 3.3.3) und mit $1 \mu\text{M}$ Protein A inkubiert und gemessen. Die bestimmte Änderung des Ladungstransferwiderstandes beträgt $14,8 \pm 0,1 \Omega \text{ cm}^2$, was beweist, dass die Bindung sequenzspezifisch ist.

4.4.3 Detektion von *S. aureus* mit der EIS

Nachdem gezeigt wurde, dass rekombinantes Protein A spezifisch gebunden und detektiert werden kann, wurden Experimente mit vitalen *S. aureus* durchgeführt. Dazu wurde der gesamte Messaufbau sterilisiert bzw. desinfiziert und in ein S2-Labor überführt. Die Bakterien wurden in Kolbenkulturen in Tryptic soy broth (TSB) bei 37°C herangezogen und nach der Erreichung einer hohen Dichte ausgezählt und entsprechend in BB verdünnt. Die detaillierte Beschreibung der Probenaufbereitung und Puffer befindet sich in Kapitel 3. Die Bakterien sind zumeist mit einer Polysaccharidkapsel umgeben, die die Zugänglichkeit vieler Oberflächenproteine einschränkt. Der impedimetrische Biosensor wurde mit Konzentrationen von 1 bis 10^9 koloniebildende Einheiten (KbE) pro ml inkubiert. Die Messprozedur ist in Abschnitt 3.3.6 beschrieben. In Abbildung 4.56 sind die Impedanzspektren der Messungen dargestellt, die wiederum mit dem Ersatzschaltbild gefittet wurden (siehe Tabelle 4.12).

Interessanterweise ist der Kurvenverlauf anders als bei den Messungen mit Protein A. Während die Impedanz im Umkehrpunkt zwischen Halbkreis und Gerade mit steigender Protein A-Konzentration sowohl einen zunehmenden Real- als auch Imaginärteil zeigte, scheint mit steigender *S. aureus*-Konzentration nur der Realteil zuzunehmen. Die Güte der Fits ist sogar noch besser als bei den Impedanzspektren mit Protein A, zu sehen an den kleineren Werten für χ^2 in Tabelle 4.12.

Bei der Betrachtung der Änderung der einzelnen Parameter des Fits (siehe Abbildung 4.57), lässt sich wieder erkennen, dass der Ladungstransferwider-

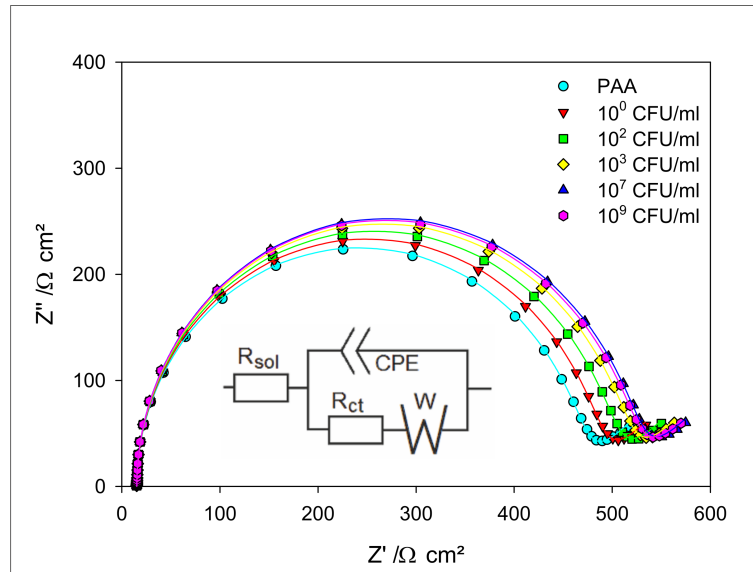


Abbildung 4.56: Nyquist-Plot der Impedanzspektren von Goldelektroden beschichtet mit PAA und MCH im molaren Verhältnis 1:4 vor und nach der Inkubation mit *S. aureus* in Konzentrationen von 1- 10^9 KBE/ml, gemessen in BB + 2 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$. Linien repräsentieren den Fit mit dem gezeigten Ersatzschaltbild.

stand R_{ct} der einzige Parameter ist, der signifikant mit wachsender *S. aureus*-Konzentration steigt, mit einer maximalen Änderung von 12%. Der Warburgkoeffizient A_w steigt um etwa 4% an und R_{sol} und C_{eff} zeigen eine Änderung von weniger als 2%. Das zeigt wiederum, dass die Bindung den Elektronentransfer beeinflusst und somit die Hypothese II der Dissertation bestätigt wird. In Abbildung 4.58 links ist die Bindungskurve des Aptasensors anhand der Änderung des extrahierten Ladungstransferwiderstandes ΔR_{ct} zu sehen. Jede Konzentration wurde dreifach bestimmt mit in einem Batch beschichteten Goldelektroden. Die Standardabweichung dieser drei Messungen ist als Fehlerbalken dargestellt. Eine verdünnte Probe mit 10 Bakterien pro ml ergab eine Änderung von R_{ct} von 35Ω und 10^5 KBE/ml führten bereits zur Sättigung des Sensors mit einer maximalen Änderung von R_{ct} von etwa 100Ω .

Die Bindungskurve wurde dem Bindungsmodell (Gleichung 3.20) durch Kurvenregression angepasst. Der Fit ergab eine scheinbare Dissoziationskonstante (K_D) von 111 ± 96 KBE/ml. Die Standardabweichung s der Messungen an beschichteten Elektroden in BB + 2 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ beträgt $4,88 \Omega \text{ cm}^2$, womit eine untere Nachweisgrenze (LoD) von 10 KBE/ml bestimmt werden konnte. Zum Test der Funktionalität des Sensors wurde eine Probe mit un-

Tabelle 4.12: Ergebnisse der Kurvenfits in Abbildung 4.56 - SD = Standardabweichung, χ^2 = Fehler des Fits = Güte des Fits normalisiert auf die Anzahl der Datenpunkte.

$c(S. aureus)$ /KbE ml ⁻¹	R_{sol} / Ω	SD	C_{eff} / μF	SD	n	R_{ct} / Ωcm^2	SD	A_w / $\Omega s^{-1/2}$	SD	χ^2
10 ¹	33,3	0,1	1,199	0,02	0,998	538,3	0,3	310	3	0,0084
10 ²	33,3	0,1	1,199	0,02	0,999	541,7	0,3	311	3	0,0092
10 ³	33,6	0,1	1,203	0,02	1,000	552,1	0,3	312	3	0,0088
10 ⁴	33,8	0,1	1,200	0,02	0,999	554,8	0,3	315	3	0,0086
10 ⁵	33,8	0,1	1,201	0,02	0,999	561,5	0,3	312	3	0,0098
10 ⁸	33,6	0,1	1,201	0,02	0,999	574,5	0,3	312	3	0,0098
10 ¹⁰	33,6	0,1	1,202	0,02	0,999	577,1	0,3	317	3	0,0094

bekannter Konzentration vermessen (siehe grünes Kreuz in Abbildung 4.58 links), für die mit der approximierten Gleichung für das Bindungsmodell eine Konzentration von 5721 ± 2813 KbE/ml bestimmt wurde. Die Auszählung der Probe unter dem Mikroskop ergab 4150 KbE/ml, d.h. eine Approximierung der Konzentration ist möglich, aber der Aptasensor weist eine sehr geringe Auflösung auf.

Um die Spezifität des Aptasensors zu testen, wurde dieser mit *Staphylococcus epidermidis* und *Escherichia coli* inkubiert und gemessen. Diese Bakterien bilden kein Protein A, weisen sonst aber viele Gemeinsamkeiten der Bakterienoberfläche auf. Wie in Abbildung 4.58 rechts zu sehen, war das Signal deutlich geringer. Dass die Bindung von *S. aureus* sequenzspezifisch ist, sieht man anhand des deutlich geringeren Signals auf den mit Oligonukleotid-Pool beschichteten Goldelektroden. Die Ergebnisse sind mit denen von Stoltenburg et al. konform, die ebenfalls keine Interaktion von Protein A-defizienten Bakterien detektieren konnten [203].

Trotz allem sind die bei der Anbindung von *S. aureus* detektierten Signale sehr gering, vor allem da aufgrund der Größe des Analyten höhere Impedanzen als bei Protein A erwartet wurden. Um zu untersuchen, ob die geringen Änderungen der Impedanz nur Artefakte des verdünnten Mediums TSB sind, wurden Messungen mit Proben durchgeführt, die vor der Verdünnung drei mal zentrifugiert und in BB gewaschen wurden. Erstaunlicherweise ergab die Messung deutlich höhere Signale wie in Abbildung 4.59 zu sehen. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Die Anwesenheit von leitfähigen Substraten

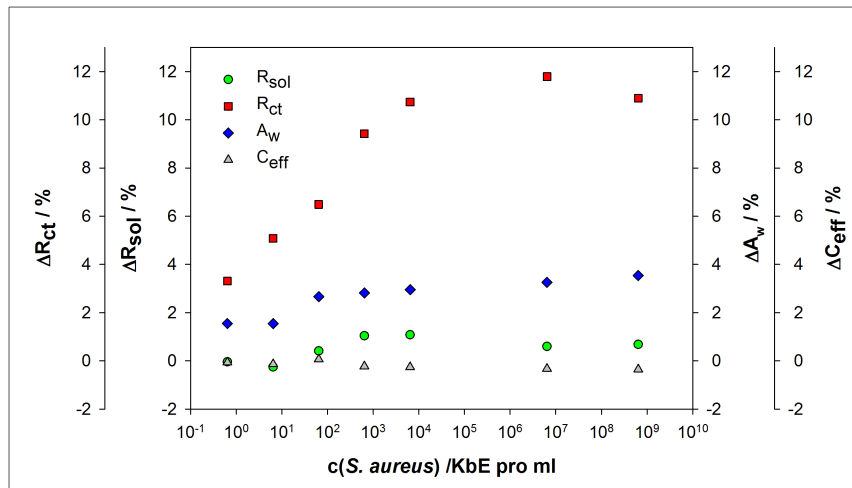


Abbildung 4.57: Prozentuale Änderung der Fit-Parameter in Abhängigkeit von der *S. aureus*-Konzentration; C_{eff} ist die effektive Kapazität berechnet aus dem CPE unter der Annahme einer Verteilung der Zeitkonstanten auf der Oberfläche [294]; A_w ist der Warburgkoeffizient der Warburgimpedanz Z_W (siehe Unterabschnitt 2.4.6)

oder Metaboliten in verdünntem TSB könnte die Impedanz reduzieren. Oder die bevorzugte Bindung von toten Bakterien könnte die geringere Impedanzänderung verursachen. Es ist bekannt, dass ein Teil der Protein A-Moleküle an der Oberfläche von *S. aureus* freigesetzt werden [18, 19]. Vielleicht wurden freie Protein A-Moleküle oder gar Fragmente gebunden statt der Bakterien.

Um zu überprüfen, ob Bakterien an die Oberfläche binden, wurden die gemessenen Elektroden ausgebaut, gewaschen und mit SYTO eingefärbt, womit die lebenden Zellen markiert werden. Die Elektroden wurden dann unter einem Aufsicht-Fluoreszenzmikroskop betrachtet. In Abbildung 4.60 ist ein Beispiel für eine Elektrode gezeigt, die mit 10^7 Zellen pro ml inkubiert wurde. Es sind vereinzelt gebundene Bakterien zu erkennen, die vital erscheinen. Es konnten mehr Bakterien am Rand der Detektionsfläche als in der Mitte gesehen werden, wobei dieses Bild die Mitte zeigt. Vermutlich wird die Mitte besser durchströmt als die Randbereiche. D.h. die Durchflusskammer und auch die Durchflussgeschwindigkeit sollten optimiert werden. Weiterhin sind ebenfalls einige dunkle Flecken auf der Fläche zu erkennen, die entweder Dreck oder tote *S. aureus* darstellen könnten. Als Vergleich wurden ebenfalls mit MCH beschichtete Elektroden mit *S. aureus* inkubiert und anschließend angefärbt. Es sind einige Zellen weit verteilt und einzeln vorliegend auf der Fläche zu

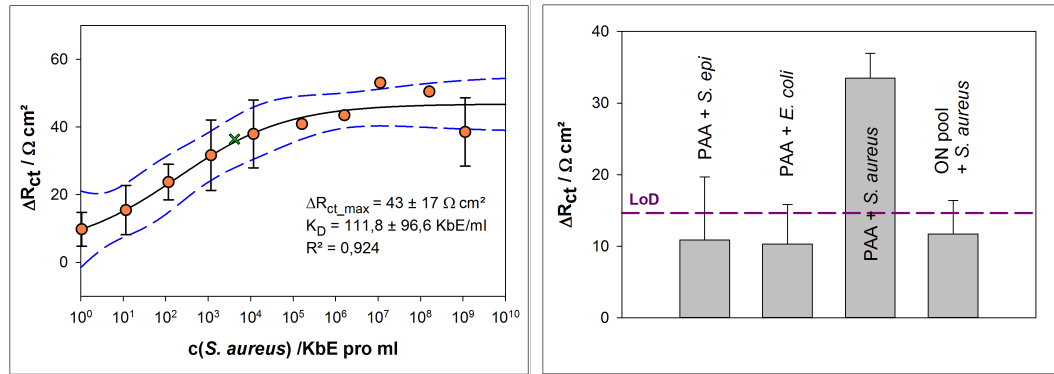


Abbildung 4.58: Links: Bindungskurve für die Detektion von *S. aureus* durch den entwickelten impedimetrischen Aptasensor. Jede Konzentration wurde mit drei unterschiedlichen beschichteten Elektroden bestimmt. ΔR_{ct} = Änderung des Ladungstransferwiderstandes, bestimmt durch den Fit der Impedanzspektren. Schwarze durchgezogene Linie zeigt den Fit der Bindungskurve mit dem Bindungsmodell; Blau gestrichelte Linie repräsentiert das 90% Konfidenzintervall. Grünes Kreuz markiert den Messwert einer Probe mit unbekannter Konzentration. Rechts: Untersuchung der unspezifischen Bindungen durch Inkubation der mit PAA modifizierten Goldelektroden mit 10^8 KbE/ml *E. coli* und *S. epidermidis* und der Inkubation von Oligonukleotid-Pool modifizierten Goldelektroden mit 10^8 KbE/ml *S. aureus*. Lila gestrichelte Linie markiert die Detektionsgrenze.

finden, aber signifikant weniger als auf der mit PAA modifizierten Oberfläche. Die Proben mit *S. aureus* wurden vor der Aufgabe immer sorgfältig mit der Pipette bearbeitet, um die *S. aureus* Zellen zu vereinzeln. Interessanterweise konnte bei den mit MCH beschichteten Elektroden keine Gruppen gefunden werden, jedoch bei den mit PAA beschichteten fast immer. Es könnte daran liegen, dass Bindung zum Aptamer stärker ist und somit auch Cluster von *S. aureus* festgehalten werden können. Es könnte aber auch ein Hinweis darauf sein, dass die Aptamere in Gruppen (Multimeren) auf der Oberfläche verteilt sind.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *S. aureus* mit dem Sensor gebunden und detektiert werden kann. Stoltenburg et al. führten Experimente mit abgetöteten Bakterien durch. Die hier beschriebenen Versuche beweisen, dass auch lebende Bakterien vom Aptamer PAA über das Protein A erkannt und gebunden werden und somit dieses Aptamer für die Detektion von vitalen *S. aureus* geeignet ist.

Im folgenden Kapitel wird ein Model zur Beschreibung der Impedanzänderung anhand des Ersatzschaltbildes aufgestellt und betrachtet, ob die durch

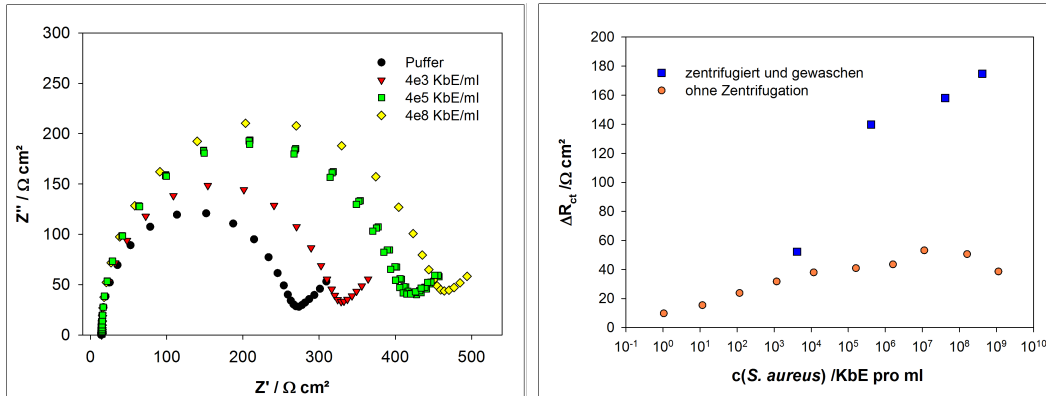


Abbildung 4.59: Messungen mit gewaschenen zentrifugierten Bakteriensuspensionen - links: Nyquist-Plot der Impedanzspektren von Goldelektroden beschichtet mit PAA und MCH im molaren Verhältnis 1:4 vor und nach der Inkubation mit gewaschenen *S. aureus* in Konzentrationen von 10^3 - 10^8 KbE/ml, gemessen in BB + 2 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$. Rechts: Vergleich der extrahierten R_{ct} Werte der Messungen mit zentrifugierten Proben zu der Bindungskurve aus Abbildung 4.58.

die Bindung okkupierte Fläche und damit einhergehende Verdrängung des Redoxmediators ausschlaggebend für die Impedanzänderung ist.

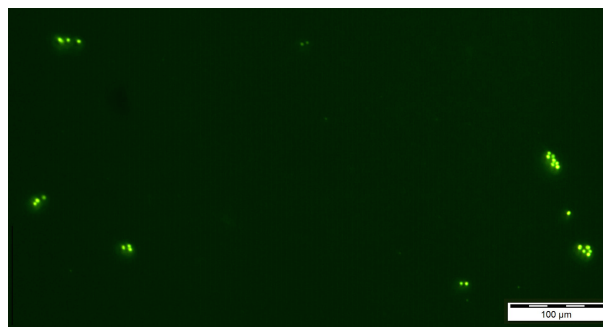


Abbildung 4.60: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Elektrode modifiziert mit PAA und inkubiert mit 10^7 Zellen *S. aureus* pro ml. Gewaschene Elektroden wurden mit SYTO eingefärbt und im Fluoreszenzmikroskop bei 488 nm unter 40facher Vergrößerung betrachtet.

4.5 Modell

In diesem Kapitel wird ein Modell für die Impedanzänderung aufgrund der Anbindung von Protein A an das immobilisierte Aptamer PAA basierend auf dem modifizierten Randles Ersatzschaltbild (siehe Unterabschnitt 3.3.9) entwickelt und auf seine Gültigkeit geprüft. Dafür wird als Hypothese angesetzt, dass sich durch die Anbindung von Protein A die verfügbare Fläche der Elektrode für die faradaysche Reaktion des Redoxsystems Hexacyanoferrat verringert. Das Modell wurde in MATLAB R2015a umgesetzt.

4.5.1 Herleitung der einzelnen Elemente

Das modifizierte Randles Ersatzschaltbild besteht aus vier Elementen: der Lösungsmittelwiderstand (R_{sol}), der Ladungstransferwiderstand (R_{ct}), die Warburg-Impedanz (W) und das Konstantphasenelement (CPE). In den folgenden Abschnitten wird die Gleichung für die Bestimmung der Impedanz für jedes Element hergeleitet.

Der Lösungsmittelwiderstand (R_{sol})

Der Lösungsmittelwiderstand R_{sol} verhält sich wie ein ohmscher Widerstand. Demnach ist die Impedanz von R_{sol} :

$$Z_{sol} = R_{sol} \quad (4.33)$$

R_{sol} kann aus der Leitfähigkeit der Lösung κ und der Zellkonstante k der Messkammer errechnet werden. Im Abschnitt 4.3.2 wurden bereits die Zellkonstante k der Messkammer mithilfe der Impedanz und κ mit einem Konduktometer bestimmt. Daraus ergibt sich für R_{sol} und somit Z_{sol} ein Wert von:

$$Z_{sol} = R_{sol} = \frac{k}{\kappa} = \frac{0,58 \text{ cm}^{-1}}{14,21 \text{ mS cm}^{-1}} = 40,82 \Omega \quad (4.34)$$

Dass dieser Wert gut mit den gemessenen Werten übereinstimmt, wurde ebenfalls im Abschnitt 4.3.2 gezeigt.

Der Ladungstransferwiderstand R_{ct} und die Warburgimpedanz Z_w

In der vorliegenden Arbeit wird die Redoxreaktion des Mediators Hexacyanoferrat ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/3-}$) verwendet, um die Anbindung des Analyten Protein A oder *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) an auf der Elektrodenoberfläche immobilisierte Aptamere (PAA) zu detektieren. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/3-}$ tauscht dabei mit der Elektrode ein Elektron aus, entsprechend:



Der Strom bei dieser Reaktion kann mit der kinetischen Schreibweise der Butler-Volmer-Gleichung beschrieben werden ([95], Seite 96):

$$i = zFAk_0 \left[c_{ox} e^{-\frac{\alpha z F}{RT}(E-E_0)} - c_{red} e^{\frac{(1-\alpha)zF}{RT}(E-E_0)} \right] \quad (4.36)$$

mit z = Anzahl der übertragenen Elektronen, F = Faradaykonstante, A = Fläche, k_0 = heterogene Elektronentransferkonstante, c_{ox}/c_{red} = Konzentration der oxidierten/reduzierten Mediatoren, α = Ladungstransferkoeffizient für die Redoxreaktion, R = universelle Gaskonstante, T = Temperatur, $E-E_0$ = Überspannung.

Wenn eine kleine Wechselspannung angelegt wird, fluktuiert der Strom und die Konzentrationen um einen Gleichgewichtswert periodisch mit der Zeit [296]:

$$\Delta i = \varphi_i e^{j\omega t} \Delta c_{ox} \quad (4.37)$$

mit der Kreisfrequenz $\omega = 2\pi f$, der imaginären Zahl $j = \sqrt{-1}$ und der Phase φ_i des Stromes.

Da wir an den Wechselspannungskomponenten interessiert sind, kann der Strom als Funktion der Spannung E und der Konzentration des Redoxmediators betrachtet werden und wie von Lasia ([296] ab Seite 167) beschrieben als unendliche Taylor Reihe dargestellt werden:

$$\begin{aligned} \Delta i = & \left(\frac{\delta i}{\delta E} \right) \Delta E + \left(\frac{\delta i}{\delta c_{ox}} \right) \Delta c_{ox} + \left(\frac{\delta i}{\delta c_{red}} \right) \Delta c_{red} \\ & + \frac{1}{2} \left(\frac{\delta^2 i}{\delta^2 E} \right) \Delta E^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{\delta^2 i}{\delta^2 c_{ox}} \right) \Delta c_{ox}^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{\delta^2 i}{\delta^2 c_{red}} \right) \Delta c_{red}^2 + \dots \end{aligned} \quad (4.38)$$

Aufgrund der Linearität der U-I-Kennlinie (siehe Unterabschnitt 2.4.5) und der Linearität bei kleinen Konzentrationen genügt es, nur die linearen Terme zur weiteren Berechnung heranzuziehen. Mit Gleichung 4.36 erhält man schließlich folgende Gleichung:

$$\begin{aligned} \Delta i = & -\frac{z^2 F^2 A k_0}{RT} [\alpha c_{ox}(0) e^{-\frac{\alpha z F}{RT}(E-E_0)} + (1-\alpha) c_{red}(0) e^{\frac{(1-\alpha) z F}{RT}(E-E_0)}] \Delta E \\ & + z F k_0 e^{-\frac{\alpha z F}{RT}(E-E_0)} \Delta c_{ox} - z F k_0 e^{\frac{(1-\alpha) z F}{RT}(E-E_0)} \Delta c_{red} \end{aligned} \quad (4.39)$$

Bei einer faradayschen Reaktion an einer Elektrode in einer ungerührten Lösung hängen Ladungstransfer und Diffusion unmittelbar zusammen. Das Redoxsystem $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ weist einen sehr schnellen Ladungstransfer auf, weshalb die Reaktion schnell in den diffusionslimitierten Bereich übergeht. Die Diffusion bezeichnet die Bewegung von Molekülen entlang eines Konzentrationsgradienten und wird durch die Fickschen Gesetze beschrieben [296]. Das erste Ficksche Gesetz beschreibt die Bildung eines Konzentrationsgradienten $\frac{\delta c}{\delta x}$ proportional zur Teilchenstromdichte J :

$$\frac{\delta c}{\delta x} = -\frac{J}{D} \quad (4.40)$$

mit D dem Diffusionskoeffizienten des Redoxmoleküls.

Während das zweite Ficksche Gesetz die Änderung des Konzentrationsprofils mit der Zeit in Abhängigkeit vom Abstand x darstellt:

$$\frac{\delta c}{\delta t} = -D \frac{\delta^2 c}{\delta^2 x} \quad (4.41)$$

Für Wechselspannungen mit kleiner Amplitude ($< 20 \text{ mV}_{\text{rms}}$) fluktuiert die Konzentration c mit der Frequenz des Stromes:

$$\frac{\delta \Delta c_{ox}}{\delta t} = j\omega \underline{c_{ox}} e^{j\omega t} = D_{ox} \frac{\delta^2 \underline{c_{ox}}}{\delta^2 x} e^{j\omega t} \quad (4.42)$$

Komplexe Größen sind unterstrichen dargestellt.

Für semi-infinite Diffusion löst sich die Gleichung zu:

$$\underline{c_{ox}}(0) = -\frac{i}{zF\sqrt{j\omega D_{ox}}} \quad (4.43)$$

Eingesetzt in Gleichung 4.39 ergibt sich entsprechend der Form $Z(j\omega) = \frac{\underline{u}(j\omega)}{\underline{i}(j\omega)}$ (siehe auch Gleichung 2.4) eine Formel, die zur Berechnung der faradayschen Impedanz Z_f herangezogen werden kann [296]:

$$\underline{i} = -\frac{z^2 F^2 A k_0}{RT} [\alpha c_{ox}(0) e^{-\frac{\alpha z F}{RT}(E-E_0)} + (1-\alpha) c_{red}(0) e^{\frac{(1-\alpha) z F}{RT}(E-E_0)}] \underline{E} - \frac{\underline{i} k_0 e^{\frac{\alpha z F}{RT}(E-E_0)}}{\sqrt{j\omega D_{ox}}} - \frac{\underline{i} k_0 e^{\frac{(1-\alpha) z F}{RT}(E-E_0)}}{\sqrt{j\omega D_{red}}} \quad (4.44)$$

$$Z_f = \frac{RT}{z^2 F^2 A k_0} \frac{1 + \frac{k_0 e^{-\frac{\alpha z F}{RT}(E-E_0)}}{\sqrt{j\omega D_{ox}}} + \frac{k_0 e^{\frac{(1-\alpha) z F}{RT}(E-E_0)}}{\sqrt{j\omega D_{red}}}}{\alpha e^{-\frac{\alpha z F}{RT}(E-E_0)} c_{ox}(0) + (1-\alpha) e^{\frac{(1-\alpha) z F}{RT}(E-E_0)} c_{red}(0)} \quad (4.45)$$

Anhand dieser Gleichung ist gut zu erkennen, dass die faradaysche Impedanz Z_f aus drei Teilen besteht. Der erste Term beschreibt den Ladungstransferwiderstand, während die anderen beiden Terme der Diffusion zuzuordnen sind. Unter der Voraussetzung, dass die Reaktion reversibel ist, können die Konzentrationen mit der Nernstgleichung beschrieben werden (siehe auch Gleichung 2.9):

$$\frac{c_{ox}(0)}{c_{red}(0)} = e^{\frac{z F}{RT}(E-E_0)} \quad (4.46)$$

Somit kann die Impedanz Z_{Rct} für den Ladungstransfer R_{ct} und die Impedanz Z_W der Warburgdiffusion W folgendermaßen wiedergegeben werden [296]:

$$Z_f = Z_{Rct} + Z_{W_{ox}} + Z_{W_{red}} \quad (4.47)$$

$$Z_{Rct} = R_{ct} = \frac{RT}{z^2 F^2 A k_0} \frac{1}{\alpha_{ox} c_{ox}^{(1-\alpha_{ox})} c_{red}^{\alpha_{ox}} + \alpha_{red} c_{red}^{(1-\alpha_{red})} c_{ox}^{\alpha_{red}}} \quad (4.48)$$

$$A_w = \frac{RT}{z^2 F^2 A \sqrt{2}} \left(\frac{1}{c_{ox} \sqrt{D_{ox}}} + \frac{1}{c_{red} \sqrt{D_{red}}} \right) \quad (4.49)$$

$$Z_W = \frac{A_w}{\sqrt{\omega}} - j \frac{A_w}{\sqrt{\omega}} \quad (4.50)$$

$$Z_W = (1-j) \frac{RT}{z^2 F^2 A \sqrt{2\omega}} \left(\frac{1}{c_{ox} \sqrt{D_{ox}}} + \frac{1}{c_{red} \sqrt{D_{red}}} \right) \quad (4.51)$$

Diese Gleichungen wurden für die faradaysche Impedanz im Modell verwendet. Sie enthalten einige Parameter, die für den entwickelten impedimetrischen Aptasensor erst noch bestimmt werden müssen. Dazu zählen die heterogene

Elektronentransferkonstante k_0 , die Ladungstransferkonstanten ($\alpha_{\text{ox/red}}$) und die Diffusionskonstanten D_{ox} und D_{red} von $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$. Wie diese bestimmt wurden, wird in Unterabschnitt 4.5.3 beschrieben.

Das Konstantphasenelement (CPE)

Alle Untersuchungen werden mit einem Grundelektrolyten durchgeführt und zwar dem Bindungspuffer BB. Dieser enthält die für die Faltung des Aptamers notwendigen Ionen, erhöht die allgemeine Leitfähigkeit und reduziert somit den Einfluss des unkompensierten Widerstandes und minimiert Migrationsströme. Allerdings bilden die Ionen des Grundelektrolyten eine Doppelschicht an der Elektrodenoberfläche wie in Unterabschnitt 2.4.6 beschrieben. Diese Doppelschicht kann durch eine Kapazität beschrieben werden. Hierbei wurde jedoch ein CPE eingesetzt, da die Elektrodenoberfläche letztendlich abwechselnde Bereiche aufweist und zwar Abschnitte mit einer MCH SAM und dazwischen einzelne Aptamere oder kleine Gruppen von Aptameren. Dies wird hierin als parallele Verteilung von Zeitkonstanten angesehen wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben und somit folgt für die Impedanz Z_{CPE} der Doppelschicht [294]:

$$Z_{\text{CPE}} = \frac{1}{Q(j\omega)^n} \quad (4.52)$$

$$Q = C_{\text{dl}}^n \left(\frac{R_{\text{sol}} R_{\text{ct}}}{R_{\text{sol}} + R_{\text{ct}}} \right)^{n-1} \quad (4.53)$$

$$Z_{\text{CPE}} = \left(\frac{R_{\text{sol}} R_{\text{ct}}}{R_{\text{sol}} + R_{\text{ct}}} \right)^{1-n} (C_{\text{dl}} j\omega)^{-n} \quad (4.54)$$

Die Doppelschichtkapazität C_{dl} wurde mit der Gleichung für einen Plattenkondensator bestimmt. Genau genommen haben wir einen zylindrischen Leiter über einer begrenzten ebenen Fläche, aber der Plattenkondensator sollte für die Annäherung genügen.

$$C_{\text{dl}} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r A}{d} \quad (4.55)$$

Nun sind alle einzelnen Elemente hergeleitet worden und können zu einer Impedanz des Gesamtmesssystems zusammengesetzt werden. Dies wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

4.5.2 Bestimmung der Impedanz

Die Impedanz Z_{Ran} des modifizierten Randles Ersatzschaltbildes ergibt sich aus den einzelnen Elementen wie folgt:

$$Z_{Ran} = Z_{sol} + \frac{1}{\frac{1}{Z_{CPE}} + \frac{1}{Z_f}} \quad (4.56)$$

$$Z_{Ran} = Z_{sol} + \frac{1}{\frac{1}{Z_{CPE}} + \frac{1}{Z_{Rct} + Z_W}} \quad (4.57)$$

Durch das Einsetzen der entsprechend hergeleiteten Gleichungen für die einzelnen Elemente (Gleichung 4.34, Gleichung 4.48, Gleichung 4.51, Gleichung 4.54) ergibt sich folgende Gesamtimpedanz Z_{Ran} für das modifizierte Randles Ersatzschaltbild:

$$Z_{Ran} = R_{sol} + \frac{1}{Q(j\omega)^n + \frac{1}{R_{ct} + (1-j)A_w\omega^{-0,5}}}$$

$$Z_{Ran} = \frac{k}{\kappa} + \frac{1}{\left(\frac{kRT}{kz^2F^2Ak_0[\alpha_{ox}c_{ox}^{1-\alpha_{ox}}\alpha_{red}c_{red}^{\alpha_{ox}} + \alpha_{red}c_{red}^{1-\alpha_{red}}\alpha_{ox}c_{ox}^{\alpha_{red}}] + RT\kappa} \right)^{n-1} \left(\frac{\varepsilon_0\varepsilon_r A}{d} j\omega \right)^n + \frac{1}{\frac{RT}{z^2F^2Ak_0[\alpha_{ox}c_{ox}^{1-\alpha_{ox}}\alpha_{red}c_{red}^{\alpha_{ox}} + \alpha_{red}c_{red}^{1-\alpha_{red}}\alpha_{ox}c_{ox}^{\alpha_{red}}]} + \frac{(1-j)RT}{z^2F^2A\sqrt{2\omega}} \left(\frac{1}{c_{ox}\sqrt{D_{ox}}} + \frac{1}{c_{red}\sqrt{D_{red}}} \right)}}$$
(4.58)

Es ist zu erkennen, dass in allen Elementen außer dem Lösungsmittelwiderstand R_{sol} die Fläche A (lila markiert) enthalten ist und Einfluss auf die Größe der Impedanz des Elementes hat. Ziel der Untersuchung mit dem Modell ist, die für den Ladungstransfer verfügbare Fläche A zu reduzieren und die dadurch verursachten Änderungen der Impedanz mit denen durch die Anbindung von Protein A zu vergleichen. Wenn die Detektion des Analyten auf der Hinderung des Elektronentransfers zwischen Redoxmediator und Elektrode basiert (Hypothese II), dann müssten die Änderungen der Impedanz im Modell mit denen der Messung übereinstimmen.

Alle außer den rot markierten Größen sind anhand der vorhandenen Informationen bestimmbar. Wie die rot markierten Parameter (der Ladungstransferkoeffizient α , die heterogene Elektronentransferkonstante k_0 , die Diffusionskonstanten D_{ox} und D_{red} sowie der Parameter n des CPE) bestimmt wurden, wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

4.5.3 Bestimmung der Parameter

In der im letzten Abschnitt hergeleiteten Gleichung zur Berechnung der Impedanz Z_{Ran} eines modifizierten Randles-Ersatzschaltbildes sind viele Parameter enthalten. Die heterogene Elektronentransferkonstante k_0 und die Diffusionskonstanten $D_{\text{ox/red}}$ nehmen jedoch eine besondere Stellung ein, da diese von der Art und Konzentration der Substanzen im Elektrolyten sowie von der Beschichtung der Arbeitselektrode abhängig sind. Eine mathematische Berechnung dieser Konstanten ist durch die Komplexität der Messlösung im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Es sind Literaturwerte vorhanden, allerdings nicht für diesen speziellen Anwendungsfall. Daher wurden diese experimentell bestimmt und mit den Werten aus der Literatur verglichen. Zur experimentellen Bestimmung wurden die Zyklovoltammetrie und die Chronocoulometrie herangezogen, da dafür die gleiche Messzelle wie für die Impedanzmessungen verwendet werden konnte und somit die Bedingungen gleich sind. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen beschrieben.

Die Diffusionskonstanten

Die Diffusionskonstante D ist eine Stoffkonstante und beschreibt die Bewegung von Teilchen aufgrund der Brownschen Molekularbewegung. Sie wird beschrieben durch die Einstein-Smoluchowski-Gleichung als Mittelwert des Quadrats der Teilchenverschiebung x^2 pro Zeiteinheit [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$]:

$$D = \frac{\langle x^2 \rangle}{2t} \quad (4.59)$$

In unserem Fall taucht die Diffusionskonstante D im Warburgelement auf und bezieht sich somit auf die Diffusion des Redoxmediators $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ im Elektrolyten in Anwesenheit eines schwachen Wechselfeldes (Amplitude = 10 mV). Ausführliche Untersuchungen zur Diffusion von $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ an blanken Platinelektroden sind bereits in der Literatur vorhanden. Zum Beispiel bestimmten Konopka et al. [297] $D_{\text{ox/red}}$ für 0,6 bis 6 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ in 0,1 und 1 M KCl an Platinelektroden. Für 0,1 M KCl als Elektrolyt konnten sie Werte für $D_{\text{ox}} = 7,20 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ und für $D_{\text{red}} = 6,66 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ errechnen. Bortels et al. [298] korrigierten die bestimmten Diffusionskonstanten durch den Einfluss der Migration und erhielten Werte von $D_{\text{ox}} = 5,87 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$

und $D_{\text{red}} = 7,23 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ für 5 mM Kaliumhexacyanoferrat ($\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) in 0,2 M KCl. Angell et al. [299] bestimmten die Diffusionskonstanten von $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ in 0,5 M K_2SO_4 an Platinelektroden und erhielten $D_{\text{ox}} = 8,0 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ und $D_{\text{red}} = 8,9 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Moldenhauer et al. [300] verwendeten die elektrochemische Laufzeitmessung, um die Diffusionskonstante von 5 mM Hexacyanoferrat in 0,1 M KCl an goldenen interdigitalen Elektroden zu bestimmen und erhielten $D_{\text{ox}} = 7,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Perenlei et al. [301] bestimmten den Diffusionskoeffizienten von 0,1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ in 0,1 M Na_2HPO_4 an einer Glaskohlenstoffelektrode modifiziert mit mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhren und Titanoxid und erhielten einen Wert von $1,52 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Anhand der ausgewählten Literaturwerte lässt sich erkennen, dass die Diffusionskonstanten für $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ in KCl ähnlich sind, jedoch bei der Verwendung von anderen Elektrolyten abweichen. In dieser Arbeit diente der Bindungspuffer BB des Aptamers als Elektrolyt, dessen Zusammensetzung in Tabelle 3.3 gelistet ist. Den größten Anteil macht NaCl aus mit 100 mM von einer Gesamtionenkonzentration von 140 mM. Die Ionenstärke des BB beträgt 0,194 M (siehe Gleichung 4.31). Leider konnten keine Diffusionskonstanten von $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ in NaCl in der Literatur gefunden werden. Daher wurde die Diffusionskonstante experimentell bestimmt.

Die Diffusion von $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ kann mit der Chronocoulometrie (CC) unter definierten Bedingungen untersucht werden. Bei der Chronocoulometrie (siehe Unterabschnitt 3.3.5) wird ein Potentialsprung angelegt und der resultierende Strom gemessen. Durch Integration erhält man die Ladung Q (siehe Gleichung 3.6), dessen Darstellung in Abhängigkeit von der Wurzel der Zeit t als Anson Plot bezeichnet wird. Im Anson Plot zeigt die Kurve einen Abschnitt mit linearem Anstieg, der durch den ersten Teil der Gleichung 3.6 beschrieben wird (= Gleichung 4.60). Sofern die Fläche A und die Konzentration c bekannt sind, kann aus dem Anstieg des linearen Abschnitts die Diffusionskonstante D bestimmt werden:

$$Q = \frac{2nFAc_0\sqrt{D_0}}{\sqrt{\pi}}\sqrt{t} \quad (4.60)$$

$$m = \frac{2nFAc_0\sqrt{D_0}}{\sqrt{\pi}} \quad (4.61)$$

$$D_0 = \left(\frac{m\sqrt{\pi}}{2nFAc_0}\right)^2 \quad (4.62)$$

mit n = Anzahl der übertragenen Elektronen, F = Faradaykonstante, A = Fläche, c_0 = Konzentration des Redoxmediators.

Die elektrochemisch aktive Fläche A wurde bereits mit der Zyklovoltammetrie bestimmt und beträgt $0,444 \text{ cm}^2$ (siehe Abschnitt 4.3.1). Die Anzahl der übertragenen Elektronen n ist 1 und die Konzentration des Redoxmediators beträgt 2 mM . Mit diesen Parametern wurde die Diffusionskonstante D für $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ in Bindungspuffer BB bestimmt. Zur Untersuchung, ob die immobilisierten Aptamere einen Einfluss auf die Diffusion von $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ haben, wurde die Diffusionskonstante nicht nur an blanken Elektroden, sondern auch von mit Aptamer beschichteten Goldelektroden bestimmt (detaillierte experimentelle Beschreibung unter Abschnitt 3.3.5).

Der Anson Plot für verschieden beschichtete Goldelektroden ist in Abbildung 4.61 dargestellt. Die Kurve der CC-Messung einer beschichteten Goldelektrode in BB mit $2 \text{ mM K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (rote Kurven) verläuft anders als die Messung in Tris mit RuHex (vergleiche Abschnitt 4.2.3). Es ist kein sprunghafter Anstieg der Ladung am Anfang der Kurve zu sehen, was darauf hinweist, dass $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ nicht an die Aptamere adsorbiert. Dies war zu erwarten, da die $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ genau wie die Phosphatgruppen des Aptamers negativ geladen sind. Weiterhin wird mit der Zeit immer mehr Ladung umgesetzt, was bedeutet, dass der Transfer anfangs limitiert ist. Dies könnte durch die erschwerte Diffusion der $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ in die Defektstellen der MCH-Monoschicht erklärt werden. Sobald Ionen eindiffundiert sind, vermitteln diese den Elektronentransfer und die Reaktion geht in die Diffusionslimitierung der $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ zur Oberfläche über, die durch den linearen Abschnitt repräsentiert wird. Die Steigung des linearen Kurvenabschnitts beträgt $73,32 \mu\text{C s}^{-1/2}$, woraus sich eine Diffusionskonstante D_{ox} von $6,09 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ bestimmen lässt. D_{red} beträgt demnach $6,00 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Die erhaltenen Werte sind eine Größenordnung kleiner als die Werte aus der Literatur für $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ in KCl. Für eine beschich-

tete Elektrode, die weniger Aptamere auf der Oberfläche enthält (dunkelrote Kurve), steigen die Diffusionskonstanten auf $D_{\text{ox}} = 4,53 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ und $D_{\text{red}} = 4,58 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Und für die blanke Goldelektrode (grüne Kurve) lassen sich Diffusionskonstanten vergleichbar mit den Literaturwerten bestimmen ($D_{\text{ox}} = 6,45 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ und $D_{\text{red}} = 5,53 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). Dies bedeutet, dass sich die immobilisierten Aptamere negativ auf die Mobilität der $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ auswirken. Über die selbstorganisierte Schicht (SAM) aus MCH-Molekülen ist kein Elektronentransfer möglich. Die $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ diffundieren zu den Defekten in der SAM, die durch die Aptamere eingebracht wurden. Dabei werden die negativ geladenen $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ -Ionen vom negativ geladenen Aptamer abgestoßen, was deren Diffusion behindert. Je weniger Aptamere auf der Oberfläche, desto weniger wird die Diffusion behindert.

Die Werte der blanken Goldelektrode stimmen sehr gut mit den Literaturwerten überein. Zusätzlich wurden die Diffusionskonstanten mit dem in der

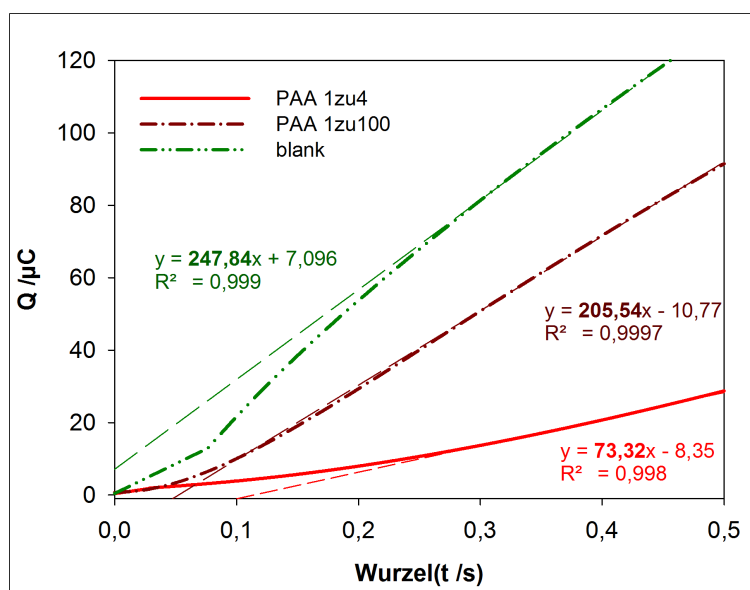


Abbildung 4.61: Anson Plot der CC-Messungen von Aptamer modifizierten Goldelektroden - mit dem Anstieg der Anzahl immobilisierter Aptamere (blank < 1zu100 < 1zu4) geht eine Reduktion der Steilheit der linearen Abschnitte einher, die auf eine Reduktion der Diffusion hinweist. Dargestellt sind die Ladungs-Zeit-Kurven der Oxidation. Zum Vergleich ist ebenfalls die Messung einer blanken Elektrode dargestellt. Die Regression des linearen Bereichs der Kurven ist als gestrichelte Gerade dargestellt. Die Regressionsgleichungen sind angegeben. Aus dem Anstieg (fett gedruckt) der Regressionsgeraden wurde die Diffusionskonstante bestimmt (vergleiche Tabelle 4.13).

Tabelle 4.13: Diffusionskonstanten D für $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ in verschiedenen Elektrolyten

Elektrode	Beschichtung	Medium	$D_{ox} / \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$	$D_{red} / \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$	Referenz
Pt	keine	0,1 M KCl	$7,20 \cdot 10^{-6}$	$6,66 \cdot 10^{-6}$	[297]
Pt	keine	0,2 M KCl	$5,87 \cdot 10^{-6}$	$7,23 \cdot 10^{-6}$	[298]
Pt	keine	0,5 M K_2SO_4	$8,0 \cdot 10^{-6}$	$8,9 \cdot 10^{-6}$	[299]
Au IDE	keine	0,1 M KCl	$7,3 \cdot 10^{-6}$	-	[300]
GCE	MWCNT/TiO ₂	0,1 M Na_2HPO_4	-	$1,52 \cdot 10^{-5}$	[301]
Au	PAA 1:4	0,14 M BB	$6,09 \cdot 10^{-7}$	$6,00 \cdot 10^{-7}$	diese Arbeit (CC)
Au	PAA 1:100	0,14 M BB	$4,53 \cdot 10^{-6}$	$4,58 \cdot 10^{-6}$	diese Arbeit (CC)
Au	keine	0,14 M BB	$6,45 \cdot 10^{-6}$	$5,53 \cdot 10^{-6}$	diese Arbeit (CC)
Au	PAA 1:4	0,14 M BB	$6,30 \cdot 10^{-6}$	$6,80 \cdot 10^{-6}$	diese Arbeit (CV-Fit)

EC-Lab-Software enthaltenen CV-Fit-Funktion aus den Zyklovoltammogrammen bestimmt und folgende Werte erhalten: $D_{ox} = 6,30 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ und $D_{red} = 6,80 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Auch diese liegen in der zu erwartenden Größenordnung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.13 zusammengefasst. Die mit der CC bestimmten Werte für die mit Aptamer (1zu4) beschichteten Elektrode wurden für das Modell verwendet.

Heterogene Elektronentransferkonstante und Ladungstransferkoeffizienten

In dem in dieser Arbeit betrachteten Biosensor wird ein Elektron zwischen einer chemischen Substanz in Lösung ($[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$) und einer Festkörper-Elektrode übertragen. Dabei spricht man von einem heterogenen Elektronentransfer. Die heterogene Elektronentransferkonstante k_0 beschreibt die Geschwindigkeit, mit der das Elektron übertragen wird in cm s^{-1} . Die Ladungstransferkoeffizienten $\alpha(\text{red/ox})$ beschreiben dabei, wie groß der Einfluss einer Potentialänderung dE auf die Stromdichte j und somit auf die Geschwindigkeit des Elektronentransfers ist [302]:

$$\alpha(\text{ox/red}) = -\frac{RT}{nF} \frac{d \ln j(\text{ox/red})}{dE} \quad (4.63)$$

In der Literatur finden sich zahlreiche Werte für k_0 von $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ mit Werten von 0,03 bis $0,5 \text{ cm s}^{-1}$ [225, 303, 304, 305, 306]. Diese wurden an blanken Elektroden bestimmt. Inwiefern sich die Beschichtung der Elektrode mit einer selbstorganisierenden Monoschicht (SAM) auf k_0 auswirkt, wurde von Ganesh et al. [307] untersucht. Sie zeigten, dass die scheinbare Elektronen-

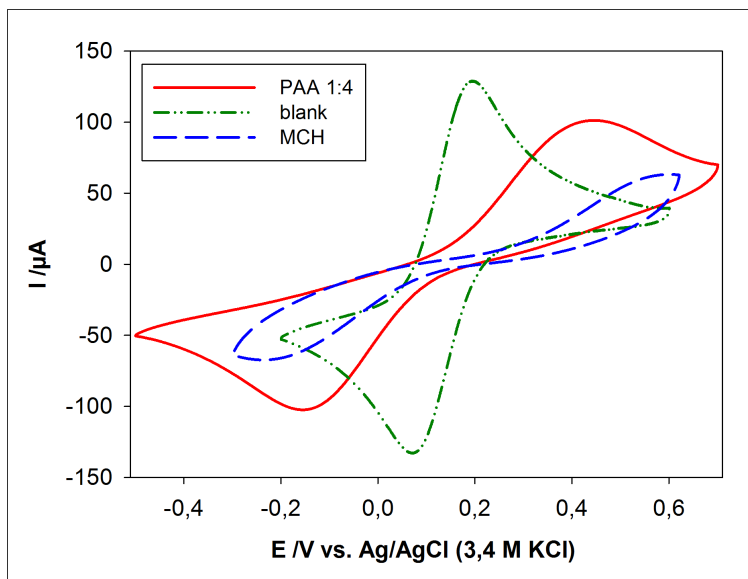


Abbildung 4.62: Zyklovoltammogramme einer blanken, einer mit dem Thiol MCH und einer mit dem Aptamer PAA beschichteten Goldelektrode bei 100 mV s^{-1} in $\text{BB} + 2 \text{ mM K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

transferkonstante k_{app} an beschichteten Elektroden mit $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ etwa drei Größenordnungen kleiner ist als die blanker Elektroden. Sie vermuten, die Ursache für diese Beobachtung liegt in der Ausbildung von Mikroelektroden durch die in der SAM vorhandenen Defekte und berechneten einen über die Belegungsdichte korrigierten Wert für k_0 von $0,48 \text{ cm s}^{-1}$. Die Ladungstransferkoeffizienten $\alpha(\text{ox/red})$ werden in der Literatur für $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ im Bereich von 0,3-0,7 angegeben, meist aber als 0,5. Um die heterogene Elektronentransferkonstante und die Ladungstransferkoeffizienten für das in dieser Arbeit entwickelte System (mit Aptamer beschichtete Goldelektroden in einem 3-Elektroden-System in einer Durchflusskammer) zu bestimmen, wurde die Zyklovoltammetrie verwendet. In Abbildung 4.62 sind die Zyklovoltammogramme für blanken (grüne Punkt-Strich-Kurve), nur mit dem Alkanthiol Merkaptohexanol (MCH) beschichtete (blau gestrichelt) und mit Aptamer:MCH 1:4 beschichtete Goldelektroden (rote Linie) gemessen in $\text{BB} + 2 \text{ mM K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ zu sehen.

Das Zyklovoltammogramm (CV) der blanken Goldelektrode zeigt ein für $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ typisches quasi-reversibles Verhalten mit eindeutig definierten Oxidations- und Reduktionspeaks, während das CV der Elektrode mit der MCH-SAM nur Ansätze von Peaks offenbart und die isolierende Wirkung der

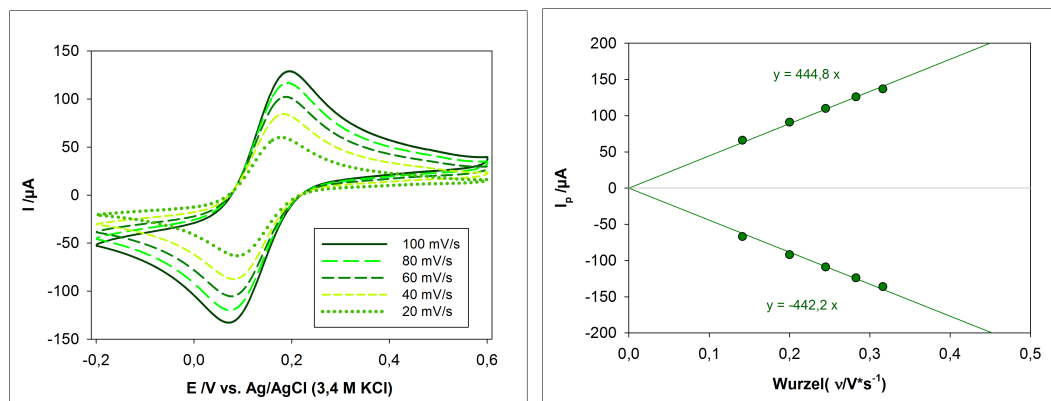


Abbildung 4.63: Analyse von blanken Goldelektroden - Links: Zyklovoltammogramme einer blanken Goldelektrode in BB + 2 mM $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ bei verschiedenen Scanraten - Rechts: Randles-Sevcik-Plot der Peakströme versus der Wurzel der Scanrate

SAM darstellt. Die mit Aptamer modifizierte Elektrode liegt dazwischen und zeigt weder ein komplett isolierendes noch ein typisch reversibles Verhalten. Im Folgenden werden die drei Fälle einzeln genauer betrachtet und untersucht.

Blanke Goldelektrode

In Abbildung 4.63 links sind die Zyklovoltammogramme bei verschiedenen Scanraten ν gezeigt. Der Abstand zwischen den beiden Peakpotentialen beträgt 105 mV bei einer Scanrate von 100 mV s^{-1} und 87 mV bei 20 mV s^{-1} . Obwohl ideale reversible Systeme bei denen ein Elektron übertragen wird, eine Peakseparation von 59 mV aufweisen, werden für das Hexacyanoferratsystem meist höhere Werte beobachtet. Dies liegt vermutlich an der Interaktion von Hexacyanoferrat mit edlen Metallen. Die halbe Peakbreite liegt bei 63 mV (20 mV s^{-1}) bis 67 mV (100 mV s^{-1}) ebenfalls leicht über dem zu erwartenden Wert von etwa 57 mV. Abweichungen werden ebenfalls durch den leicht höheren pH-Wert von 7,6 und der geringen Ionenstärke des Elektrolyten verursacht ($<1 \text{ M}$).

Ein weiteren bedeutenden Einfluss spielt der unkompensierte Widerstand R_u der Messzelle. Feldberg [308] untersuchte den Einfluss von R_u auf die Separation und Form der Peaks. Die Form der darin simulierten Kurven weichen stark von den hier beobachteten ab. Zudem wird bei den hierin durchgeführten Messungen der ohmsche Spannungsabfall vom Potentiostaten in einer Feed-

backschleife kompensiert. Der trotz Kompensation durch den Abstand der Referenzelektrode von der Arbeitselektrode verursachte unkompenzierte Widerstand R_u wurde in Abschnitt 4.3.2 bestimmt und beträgt etwa 4-8 Ω und ist somit hier nicht ausschlaggebend.

Wie für reversible Systeme typisch, ist bei dem betrachteten System das Verhältnis der Peakströme ($I_{\text{red}}/I_{\text{ox}}$) gleich eins und der Peakstrom proportional zur Wurzel der Scanrate (siehe Abbildung 4.63 rechts). Anhand der Methode von Laviron für Peakseparationen <200 mV [254] lässt sich für blanken Goldelektroden eine heterogene Elektronentransferkonstante (k_0) von 0,03 cm s^{-1} und die Ladungstransferkoeffizienten $\alpha(\text{ox}) = 0,45$ und $\alpha(\text{red}) = 0,55$ bestimmen. Diese Werte stimmen mit denen in der Literatur überein.

Goldelektrode mit MCH-SAM

Das CV der mit einer SAM aus Merkptohexanol (MCH) beschichteten Elektrode hingegen zeigt sehr flache breite Peaks, die nur ansatzweise zu erkennen sind. Die Elektrode wird durch die SAM isoliert und es findet kein Elektronentransfer statt, außer an Defekten in der SAM. Es können auch Tunneleffekte auftreten, vor allem da diese SAM nicht so dick ist (<1 nm). Die Isolierung bewirkt, dass die scheinbare Elektronentransferkonstante k_{app} sehr klein ist und somit ein scheinbar irreversibles Verhalten beobachtet wird. Da die Peaks nicht klar definiert sind, ist hier keine Auswertung möglich. Das Fitten der Spektren mit der CV-Fit Funktion von EC-Labs ergab für die scheinbare heterogene Elektronentransferkonstante (k_{app}) einen Wert von $1 \cdot 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$.

Mit Aptamer modifizierte Goldelektrode

Das CV für die mit Aptamer beschichtete Elektrode liegt deutlich zwischen den beiden anderen, was die Hypothese untermauert, dass die Aptamere Defekte in der SAM induzieren und darüber ein Elektronentransfer möglich ist. In Abbildung 4.64 links sind die Zyklovoltammogramme bei verschiedenen Scanraten ν gezeigt.

Die Peakseparation ΔE_p steigt von 434 mV bei 50 mV s^{-1} auf 817 mV bei 1 V s^{-1} und die halbe Peakbreite ($E_p - E_{p/2}$) steigt von 123 mV bei 50 mV s^{-1}

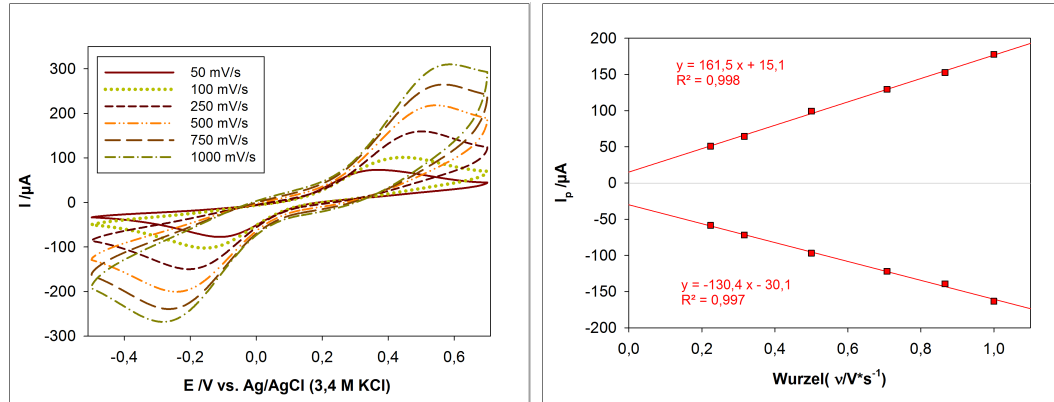


Abbildung 4.64: Analyse von mit Aptamer beschichteten Goldelektroden - Links: Zykelvoltammogramme einer mit PAA und MCH im Verhältnis 1:4 beschichteten Goldelektrode in BB + 2 mM $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ bei verschiedenen Scanraten - Rechts: Randles-Sevcik-Plot [= Darstellung der Peakströme versus Wurzel der Scanrate]

auf 163 mV bei 1 V s^{-1} . Das Verhältnis der Peakströme $I_{\text{red}}/I_{\text{ox}}$ sinkt von 1,15 bei 50 mV s^{-1} auf 0,92 bei 1 V s^{-1} . Der Peakstrom I_p verhält sich proportional zur Wurzel der Scanrate ν , verläuft jedoch nicht durch den Ursprung (siehe Abbildung 4.64 rechts). Dies wird vermutlich durch die aufgrund der Aptamere gebundene Ladung an der Oberfläche verursacht.

Die große Peakseparation lässt zunächst ein quasi-reversibles oder irreversibles Verhalten vermuten [309]. Jedoch verhält sich der Peakstrom proportional zur Wurzel der Scanrate (siehe Abbildung 4.64 rechts), was dem quasi-reversiblen Verhalten widerspricht. Für den irreversiblen Fall müsste sich laut Velasco et al. [310] die halbe Peakbreite proportional zur Scanrate verhalten. Da dies nicht der Fall ist, wird auch ein irreversibles Verhalten ausgeschlossen.

Daher wird angenommen, dass es sich hierbei um ein reversibles Verhalten mit gehemmten Ladungstransfer handelt. Laviron [254] hat den reversiblen Elektronentransfer für hohe Peakseparationen ($\Delta E_p > 200 \text{ mV}$) betrachtet und eine numerische Lösung gefunden. Dementsprechend ergibt die Auftragung der Peakpotentiale E_p gegenüber dem Logarithmus der Scanrate ν zwei Geraden, aus dessen Anstieg m die Ladungstransferkoeffizienten $\alpha(\text{ox/red})$ bestimmt werden können (siehe Abbildung 4.65):

$$m_{\text{ox}} = \frac{2,3RT}{\alpha_{\text{ox}}nF} \quad m_{\text{red}} = -\frac{2,3RT}{\alpha_{\text{red}}nF} \quad (4.64)$$

Die Darstellung der Peakseparation ΔE_p gegenüber dem Logarithmus der

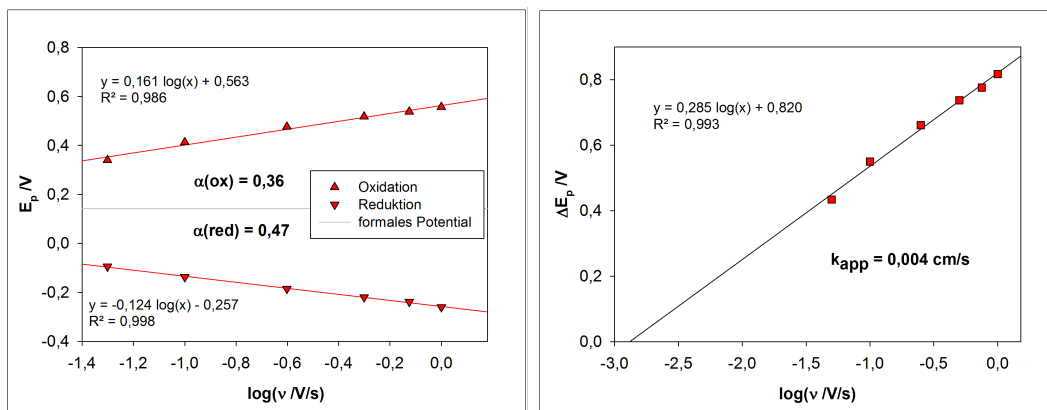


Abbildung 4.65: Bestimmung der heterogenen Elektronentransferkonstanten k_{app} und der Ladungstransferkoeffizienten $\alpha(\text{ox/red})$ - Links: Peakpotentiale E_p für die Oxidation (Dreieck mit Spitze oben) und die Reduktion (Dreieck mit Spitze unten) als Funktion des Logarithmus der Scanrate ν

Scanrate ν ergibt ebenfalls eine Gerade. Die Regression der Geraden zum Schnittpunkt mit der x-Achse ergibt die Scanrate, bei der die Peakseparation = 0 ist. Unter dieser Bedingung kann mit der folgenden Gleichung k_{app} bestimmt werden:

$$\log k_{\text{app}} = \alpha_{\text{ox}} \log \alpha_{\text{red}} + \alpha_{\text{red}} \log \alpha_{\text{ox}} - \log \frac{RT}{nF\nu} - \frac{\alpha_{\text{ox}} \alpha_{\text{red}} nF \Delta E_p}{2,3RT} \quad (4.65)$$

Anhand der Laviron-Methode konnten eine k_{app} von $0,00412 \text{ cm s}^{-1}$ und die Ladungstransferkoeffizienten $\alpha(\text{ox}) = 0,36$ und $\alpha(\text{red}) = 0,47$ bestimmt werden. Man beachte, dass hier die Summe der Ladungstransferkoeffizienten $\alpha(\text{ox})$ und $\alpha(\text{red}) < 1$ ist und diese nicht symmetrisch sind ($\neq 0,5$), wobei die Reduktion stark bevorzugt wird. Eine leichte Asymmetrie konnte bereits beim Tafelplot beobachtet werden (siehe Abbildung 4.32).

Eine Übersicht apparenter heterogener Elektronentransferkonstanten k_{app} für $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ an verschiedenen Elektroden ist in Tabelle 4.14 dargestellt. Die bestimmte k_{app} ist mit $4,12 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ um etwa zwei Größenordnungen kleiner als die bei blanken Goldelektroden ($0,14 \text{ cm s}^{-1}$) und stimmt mit der Beobachtung von Ganesh et al. [307] für beschichtete Elektroden überein ($1,21 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$). Eventuell lässt sich die Reduktion der k_{app} allein durch die Verringerung der für den Ladungstransfer verfügbaren Fläche erklären. Demnach würde man die modifizierte Elektrode als Array von Mikroelektroden betrachten, bei

der jeder Defekt eine Mikroelektrode darstellt. Um dies zu verifizieren, müsste allerdings die Größe der Defekte bestimmt werden. Weiterhin ist ungewiss, welchen Gesetzen die Übertragung der Elektronen durch den Defekt in der MCH-Schicht folgt, da diese eventuell in mehreren Schritten stattfindet. Dies zu ergründen, liegt außerhalb des Umfangs dieser Arbeit. Zudem beeinflusst laut der Marcus-Theorie bei Redoxreaktionen ohne Bindungsbildung oder -bruch die Lösungsmittelpolarisation maßgeblich die Reaktionsgeschwindigkeit. Die Aptamere erzeugen eine lokale Polarisation der Lösung und können somit die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen. Daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass k_0 deutlich kleiner ist verglichen mit blanken Elektroden. Für die Erstellung des Modells genügt die Bestimmung der k_{app} .

Koeffizient des Konstantphasenelementes

Der Koeffizient n des CPE kann einen Wert zwischen 0 und 1 annehmen, wobei 1 einem idealen Kondensator und 0,5 der Warburgimpedanz entsprechen. Da hier keine rechnerische Bestimmung möglich ist, wurde auf Erfahrungswerte aus dem Fitten der Impedanzmessungen von beschichteten Elektroden zurückgegriffen. Erfahrungsgemäß liegt n bei 0,95 für Aptamer-beschichtete Elektroden. Für das Modell wurde daher der Wert von 0,95 verwendet.

4.5.4 Simulierte Kurven & Vergleich mit den Messdaten

Mithilfe der hergeleiteten Gleichungen basierend auf dem modifizierten Randles Ersatzschaltbild und den bestimmten Parametern wurde in MATLAB die

Tabelle 4.14: Apparente heterogene Elektronentransferkonstanten k_{app} für $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ an verschiedenen Elektroden - UMA = Ultramikroelektrodenarray

Elektrode	Beschichtung	Medium	$c([\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-})$	$\alpha_{\text{ox/red}}$	$k_{\text{app}} / \text{cm s}^{-1}$	Referenz
Karbonfaser	keine	0,2 M CF_3COONa	1 mM	k.A.	$0,06 \pm 0,05$	[225]
Glaskohlenstoff	keine	1 M KCl	1 mM	k.A.	0,005 und 0,5	[303]
Platin	keine	1,8 M NaCl	1 bis 20 mM	0,5 bis 0,6	0,024 bis 0,25	[304]
Platin	keine	1 M KCl	10 mM	0,46/0,5	0,24	[305]
Iridium UMA	keine	1 M KNO_3	6/1/0,6 mM	0,58	0,035 bis 0,087	[306]
Gold	keine				0,48	
	C5-SAM	1 M NaF	10 mM	k.A.	$1,21 \cdot 10^{-3}$	[307]
	C8-SAM				$0,40 \cdot 10^{-4}$	
C10-SAM	$0,38 \cdot 10^{-4}$					
Gold	keine	BB	2 mM	0,45/0,55	0,14	diese Arbeit
	Aptamer + C6-SAM			0,36/0,47	$4,12 \cdot 10^{-3}$	

Impedanz berechnet. Alle dafür verwendeten festen Parameter sind zur Übersicht in Tabelle 4.15 aufgelistet. Die Frequenz f wurde im Modell von 1 Hz bis 100 kHz in logarithmischen Abständen moduliert.

Tabelle 4.15: Auflistung der Parameter wie sie für das Modell verwendet wurden

Parameter	Wert	Einheit	Parameter	Wert	Einheit
k	0,58 ^a	cm ⁻¹	ϵ_0	$8,854187817 \cdot 10^{-12}$	F m ⁻¹
κ	0,01421 ^a	S cm ⁻¹	$\epsilon_r(\text{SAM})$	2,6 ^c	
R	8,3144598	J (mol ⁻¹ K ⁻¹)	$\epsilon_r(\text{H}_2\text{O})$	81	
T	310,15	K	d(SAM)	$7,8 \cdot 10^{-10}$	m
z	1		n	0,95 ^b	
F	96485,33289	C mol ⁻¹	D_{ox}	$6,00 \cdot 10^{-11}$ ^b	m ² s ⁻¹
k_0	$4,12 \cdot 10^{-5}$ ^b	m s ⁻¹	D_{red}	$6,09 \cdot 10^{-11}$ ^b	m ² s ⁻¹
α_{ox}	0,362 ^b		c(Elektrolyt)	138	mol m ⁻³
α_{red}	0,472 ^b		ω	$2\pi f$	Hz
$C_{ox}=C_{red}$	1	mol m ⁻³	j	$\sqrt{-1}$	

^a siehe Abschnitt 4.3.2

^b siehe Unterabschnitt 4.5.3

^c aus Porter et al. [311]

Die elektrochemisch aktive Fläche A_{true} wurde bereits in Abschnitt 4.3.1 mithilfe der Zyklovoltammetrie bestimmt und beträgt etwa 0,444 cm². Mit dieser Fläche für alle Elemente des Ersatzschaltbildes berechnet sich die Impedanz für unbeschichtete Elektroden. Hierbei kann der Ladungstransfer ungehindert auf der ganzen Fläche stattfinden. Bei einer beschichteten Elektrode ist die Stromdichte deutlich geringer, da der Ladungstransfer nur an den Stellen stattfinden kann, wo Defekte in der selbstorganisierende Monoschicht (SAM) vorhanden sind. Wir gehen davon aus, dass diese Defekte durch die Aptamere entstehen und somit lässt sich die Anzahl der Effekte aus der Anzahl der immobilisierten Aptamere gewinnen. Die Anzahl der immobilisierten Aptamere wurde mit der Quarzkristallmikrowaage (QCM) und der Chronocoulometrie (CC) bestimmt und liegt zwischen 10¹² bis 10¹³ Aptameren pro cm². Mit der durch die CC bestimmten Anzahl an Aptameren für 1:4 PAA:MCH ($2,41 \cdot 10^{12}$ Moleküle pro cm² (siehe Abschnitt 4.2.3) und der Annahme, dass ein Aptamer eine quadratische Fläche mit einer Kantenlänge von 2,5 nm einnimmt (Durchmesser von Quadruplexen = 2,5 nm [312]), beträgt die elektrochemisch aktive Fläche der Aptamere A_{PAA} 0,067 cm² [= $(2,5^2 \cdot 2,41 \cdot 10^{12} \cdot 0,444)$ nm²]. Das heißt, die

Fläche für den Ladungstransfer wird im Vergleich zu blanken Goldelektroden auf etwa 15% reduziert. Die Fläche A_{PAA} , oder auch Defektfläche genannt, wurde zur Bestimmung des Ladungstransferwiderstand (R_{ct}) verwendet.

Die Doppelschicht bildet sich auf der ganzen Oberfläche, daher wurde für die Bestimmung der Doppelschichtkapazität (C_{dl}) A_{true} verwendet. Die Diffusion der Ladungsträger zu den Defekten erfolgt radial und somit auf der ganzen Fläche abzüglich der Fläche A_{PAA} , die durch die Aptamere eingenommen wird. Diese Fläche wurde als A_{MCH} bezeichnet und zur Bestimmung des Warburgkoeffizienten A_w verwendet.

Mit diesen Verhältnissen ergibt sich eine Impedanz, die einer mit Aptamer modifizierten Elektrode entspricht (siehe Tabelle 4.16 und Abbildung 4.66 links, durchgezogene Linie). Alle Werte stimmen in etwa mit den gemessenen überein, außer dem Warburgkoeffizienten, der signifikant von dem gemessenen abweicht. Woher diese Abweichung stammt, ist ungeklärt. Bei der Untersuchung von Aptamer beschichteten Goldelektroden wurde zumeist ein Warburgkoeffizient im Bereich von $300 \Omega s^{-1/2}$ bis $1 \text{ k}\Omega s^{-1/2}$ gemessen. Auch der R_{ct} variiert von Elektrode zu Elektrode, liegt aber zumeist in dem Bereich $500 \Omega \text{ cm}^2$ bis $1 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$. Diese Abweichungen werden vermutlich durch die unterschiedliche Dichte, Verteilung und Faltung der Aptamere verursacht.

Tabelle 4.16: Vergleich simulierter und gemessener Werte von mit Aptamer beschichteten Goldelektroden

Beschichtung	Werte	R_{sol} / Ω	C_{dl} / μF	Q / $\mu\text{F s}^{n-1}$	A_w / $\Omega s^{-1/2}$	R_{ct} / $\Omega \text{ cm}^2$
$A_{\text{PAA}} = 0,067 \text{ cm}^2$	Simuliert	40,82	1,310	2,147	1336	535
PAA	Gemessen	40,96	1,581	2,041	5725	440

Bei der Anbindung von Protein A wird die verfügbare Fläche für den Ladungstransfer reduziert. Es wird angenommen, dass wenn ein Protein A an ein Aptamer bindet, dann diese Defektstelle blockiert ist und dort kein Ladungstransfer mehr stattfindet. Um dies zu modellieren, wurde die verfügbare Fläche für den Ladungstransfer mit steigender Protein A-Konzentration reduziert von $6,69 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2$ zu $4,69 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2$. Die entsprechenden Kurven für die Impedanzen sind in Abbildung 4.66 links in dunkelrot dargestellt. Rechts daneben sind die gemessenen Kurven für verschiedene Protein A-Konzentrationen gezeigt.

Wie man sehen kann, stimmt der Kurvenverlauf überein. Dies beweist, dass die Anbindung von Protein A an immobilisierte Aptamere gemessen mit der elektrochemischen Impedanzspektroskopie durch die Reduktion der für den Ladungstransfer verfügbaren Fläche repräsentiert werden kann. Im Folgenden wird die Vorgehensweise zur Erstellung der simulierten Impedanzspektren näher erläutert.

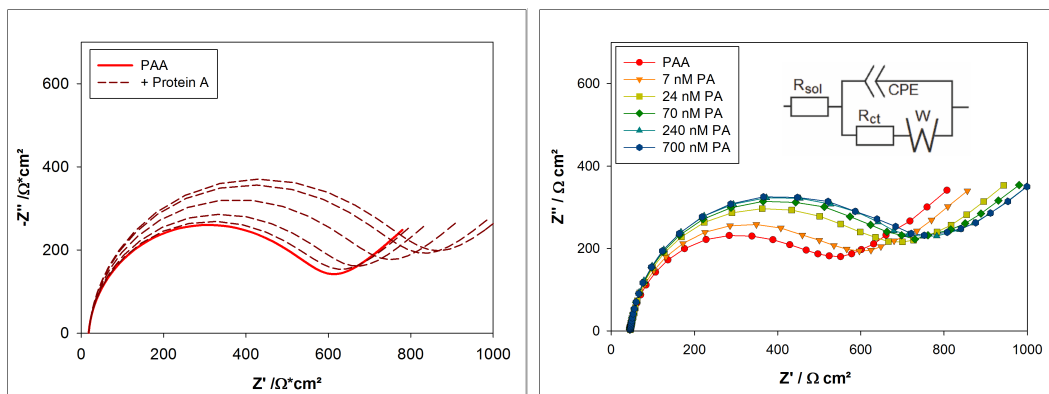


Abbildung 4.66: Simulierte Impedanzspektren (links) und gemessene Impedanzspektren (rechts) - Simulation basiert entsprechend der Hypothese II auf der Reduktion der verfügbaren Fläche für den Ladungstransfer repräsentativ für die Anbindung des Analyten Protein A

Um zu bestimmen, wie sich die für den Ladungstransfer verfügbare Fläche verkleinert, muss zuerst das Verhältnis von gebundenen Protein A zu gelösten Protein A bestimmt werden. Dies ist mithilfe der bestimmten Dissoziationskonstanten (K_D) möglich, die bei 18,5 nM liegt. Bei einer Gesamtzahl von etwa $1,07 \cdot 10^{12}$ Bindungsstellen ($2,41 \cdot 10^{12} \cdot 0,444$) sind am Punkt der K_D die Hälfte, also $5,35 \cdot 10^{11}$ Bindungsstellen besetzt, wobei $1,11 \cdot 10^{12}$ Moleküle in der Messkammer (18,5 nM und 100 μ l) vorhanden sind. Das heißt 48% der Moleküle in der Messkammer liegen gebunden vor. Mithilfe dieser Zahl können wir bestimmen, bei welcher Konzentration wie viele der Bindungsstellen besetzt sind und daraus wiederum wieviel Fläche für den Ladungstransfer noch zur Verfügung steht. In Tabelle 4.17 sind diese und die dazu simulierten Werte für R_{ct} dargestellt. Wie bereits aus den gemessenen Impedanzspektren (siehe Abbildung 4.66 rechts) zu erkennen, sind die Bindungsstellen bereits ab einer Konzentration von 70 nM abgesättigt.

Obwohl die Kurvenverläufe mit dem Modell simuliert werden können, ist hier deutlich ein Schwachpunkt des Modells zu erkennen. Während die gemess-

Tabelle 4.17: Berechnung der verfügbaren Fläche für den Ladungstransfer A_{faraday} anhand der besetzten Bindungsstellen bei 48% gebundenen Molekülen in $100 \mu\text{l}$ und der daraus simulierte R_{ct} sowie zum Vergleich der gemessenen R_{ct}

c(Protein A) /nM	besetzte Bindungsstellen	A_{faraday} /m²	R_{ct} simuliert /$\Omega \text{ cm}^2$	R_{ct} gemessen¹ /$\Omega \text{ cm}^2$
0	0	$6,69 \cdot 10^{-6}$	535	440
1	$2,89 \cdot 10^{10}$	$6,51 \cdot 10^{-6}$	550	
2	$5,78 \cdot 10^{10}$	$6,33 \cdot 10^{-6}$	566	465
3,2	$9,15 \cdot 10^{10}$	$6,12 \cdot 10^{-6}$	585	
7	$2,02 \cdot 10^{11}$	$5,43 \cdot 10^{-6}$	659	505
10	$2,90 \cdot 10^{11}$	$4,88 \cdot 10^{-6}$	733	
11	$3,20 \cdot 10^{11}$	$4,69 \cdot 10^{-6}$	763	
24	$6,94 \cdot 10^{11}$	$2,36 \cdot 10^{-6}$	1523	593
70	$2,02 \cdot 10^{12}$	0	-	628
240	$6,94 \cdot 10^{12}$	0	-	647
700	$2,02 \cdot 10^{13}$	0	-	657

¹ Bestimmt durch Fitten der Impedanzspektren (siehe Unterabschnitt 3.3.9)

senen Werte eine Sättigung zeigen, steigen die simulierten Werte exponentiell an, da die für den Ladungstransfer verfügbare Fläche gegen null läuft. Aber die gemessenen Werte zeigen, dass auch wenn alle Bindungsstellen voll besetzt sind, weiterhin ein Ladungstransfer stattfindet. Dieser Ladungstransfer kann nicht allein über die MCH-Monoschicht laufen, da der beobachtete Ladungstransfer größer ist als der an nur mit MCH beschichteten Goldelektroden gemessene. Somit scheint trotz gebundenen Protein A weiterhin ein Ladungstransfer über die Defektstelle am Aptamer stattzufinden, aber in reduzierter Form.

Obwohl die Kurvenverläufe ähnlich den gemessenen sind, zeigten die simulierten Werte für die Warburgimpedanz große Abweichungen von den gemessenen. Das zeigt, dass die beobachtete Impedanz nicht mit der Warburgimpedanz erklärt werden kann und eventuell anderen Diffusionsarten zugeordnet werden sollte, wie z.B. der limitierten linearen Diffusion oder der Bisquert Diffusion.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich mit den bestimmten Parametern für mit Aptamer beschichtete Goldelektroden und dem modifizierten Randles-Modell repräsentative Impedanzkurven simulieren lassen und die Re-

duktion der für den Ladungstransfer verfügbaren Fläche A_{faraday} zu einem Anstieg des R_{ct} führt. Aber das Modell zeigt ebenfalls starke Abweichungen, die vor allem dem fehlenden Effekt der Sättigung zuzuschreiben sind. Ein Modell mit zwei parallelen Faraday-Impedanzen, mit einem konstanten Ladungstransfer zuzüglich dem abnehmenden Ladungstransfer sowie eine andere Diffusion anstatt der Warburg könnten hilfreiche Ansätze für die Weiterführung der Arbeit sein.

Kapitel 5

Diskussion und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Entwicklung eines impedimetrischen Aptasensors zur Detektion von *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Es wurde eine Messkammer entworfen, eine Immobilisierungsmethode etabliert und das gesamte Messsystem charakterisiert. Sowohl das rekombinante Protein A als auch lebende *S. aureus* konnten erfolgreich mit der elektrochemischen Impedanzspektroskopie (EIS) in Puffer detektiert werden, was bestätigt, dass die Bindung von *S. aureus* an das Aptamer mit der EIS detektiert werden kann (Hypothese I). Um zu prüfen, ob die Detektion auf der Hinderung des Ladungstransfers basiert (Hypothese II), wurde ein Modell zur Berechnung der Impedanz erstellt. Mit dem Modell konnte bewiesen werden, dass die Reduktion der für den Ladungstransfer verfügbaren Fläche zu Impedanzspektren führt, die vergleichbar mit den gemessenen sind. Somit konnte die Behinderung des Ladungstransfers durch die Anbindung des Analyten als Grund für die Zunahme der Impedanz identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde ein impedimetrischer Aptasensor entwickelt, der eine hohe Sensitivität, eine hohe Selektivität sowie eine kurze Messzeit aufweist. Vor allem die kurze Messzeit bietet einen deutlichen Vorteil gegenüber anderen in der Literatur beschriebenen Sensoren (siehe Tabelle 5.1). Eine Validierung des Sensors mit Realproben steht noch aus. Aufgrund der einfachen Modifizierung der Elektrode, können diese kostengünstig für <1 Euro pro Elektrode hergestellt werden. Das System ist leicht auf andere Aptamer-Analyt-Paare übertragbar und eignet sich somit als Grundlage für die Entwicklung kostengünstiger portabler Point-of-Need-Geräte.

Tabelle 5.1: Vergleich verschiedener Detektionsmethoden für *S. aureus*. PCR = Polymerase-Kettenreaktion, SA = *S. aureus* aptamer

Detektionsprinzip	Erkennungselement	Messzeit	LoD /KbE ml ⁻¹	Referenz
PCR	ssDNA	2 h	10	[313]
EIS	anti- <i>S. aureus</i> - Antikörper	nicht angegeben	10	[245]
Resonante Lichtstreuung	SA 17 & SA 61	1,5 h	1	[190]
EIS	SA 43 [189]	1 h	10	[248]
Fluoreszenz	SA 31 [189]	2 h	93	[216]
EIS	PA2#8[S1-58] [198]	10 min	10	diese Arbeit

5.1 Messkammer

Um das Ziel der Dissertation zu erreichen wurde eine spezielle Messkammer entwickelt, die ein 3-Elektrodensystem in einer Durchflusskammer für ein Volumen von etwa 100 μl vereint. Als Arbeitselektrode wurden Gold-beschichtete Glasträger verwendet, die sich als sehr robust und wiederverwendbar herausstellten. Für Einwelektroden kann auf die günstigeren CD-Elektroden zurückgegriffen werden.

Durch das Platinieren eines Platindrahtes konnte eine Gegenelektrode mit hoher Stromdichte ($156 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) erhalten werden. Als Referenzelektrode wurde die LF-1 aufgrund ihres Durchmessers von nur einem mm verwendet. Die Klebung der Gegenelektrode und Referenzelektrode in Hohlschrauben, um den Austausch der Elektroden für notwendige Reinigung, Regenerierung oder Aufbewahrung zu ermöglichen, erwies sich als sehr praktisch. Der Austausch der Arbeitselektrode hingegen bedarf einer Optimierung.

Die ovale Form der Durchflusskammer und die Verwendung von Polyetheretherketon (PEEK) ermöglichten Luftblasen-freies Befüllen und Durchströmen, wobei dies erleichtert wurde, wenn die Kammer senkrecht aufgestellt wurde. Daher sollte beim nächsten Entwurf der nicht verwendete Teil der parallelen Messkammer für die Konstruktion eines Standfußes und eines Mechanismus zum leichteren Austausch der Arbeitselektrode genutzt werden. Zur weiteren Optimierung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses sollte versucht werden, die Höhe der Probenkammer zu minimieren. Die Experimente zum Lösungs-

austausch zeigten, dass bei einer Pumpgeschwindigkeit von etwa 2 ml/min der komplette Austausch etwa eine Minute dauert. Das heißt, dass trotz des geringen Probenkammervolumens von 100 μl mindestens 2 ml Probe benötigt werden. Eventuell kann dies durch schmalere Messkammern und unter Verwendung von Strömungs-Simulationen optimiert werden.

Der Messaufbau im Labor nimmt noch relativ viel Platz ein, vor allem da die Messkammer in einer temperierten und abschirmenden Box gehalten wurde. Mithilfe eines miniaturisierten Potentiostaten, einer miniaturisierten Pumpe kann der Aufbau komplett in die Box verlagert werden. Die zusätzliche Integration eines Temperatursensors würde die rechnerische Kompensation des Einflusses der Temperatur auf die Impedanz ermöglichen und somit die Temperaturbox redundant machen.

5.2 Immobilisierung

Die Analyse des Aptamers mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ergab dass die thiolierten Aptamere zwei Banden ausbilden. Die zweite Bande deutet auf die Bildung von Dimeren hin, vermutlich durch die Bildung von Disulfidbrücken, wodurch jeweils zwei Aptamere miteinander verbunden sind. Vor der Immobilisierung sollten diese durch Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) gespalten werden, um eine bessere Verteilung der Aptamere auf der Oberfläche zu ermöglichen.

Die Untersuchung mit der Microscale Thermophoresis (MST), bei der die Moleküle frei beweglich in Lösung vorliegen, ergab, dass die Bindungsaffinität des thiolierten Aptamers zu rekombinanten Protein A der des biotinylierten Aptamers entspricht und durch die Anwesenheit des Redoxsystems Kaliumhexacyanoferrat ($\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) nicht beeinträchtigt wird.

Die Aptamere wurden als selbstorganisierende Monoschicht (SAM) auf einer Goldelektrode mit Füllthiolen ko-immobilisiert [258], um eine möglichst hohe Dichte zu erhalten. Untersuchungen mit der Quarzkristallmikrowaage (QCM) zeigten, dass Alkanthiole mit Hydroxy-Endgruppen (-OH) am besten als Füllthiole für die Ko-Immobilisierung geeignet sind, da sie die geringste unspezifische Bindung von Protein A zeigten. Zudem konnte bestimmt werden, dass 10^{13} Aptamere pro cm^2 immobilisiert wurden und die Bindungsfähigkeit zu

Protein A erhalten bleibt. Zur Optimierung der Immobilisierungsdichte wurden Experimente mit der Chronocoulometrie (CC) durchgeführt und deuten darauf hin, dass die Konzentration des Füllthiols Merkaptohexanol (MCH) (1 bis 100 μM) keinen signifikanten Einfluss auf die Immobilisierungsdichte hat und eine Belegungsdichte von $2,4 \cdot 10^{12} \pm 3,9 \cdot 10^{11}$ Aptameren pro cm^2 beim Verhältnis Aptamer zu MCH von 1:4 beobachtet werden konnte. Die mit der CC bestimmte Immobilisierungsdichte beträgt nur ein Viertel von der mit der Quarzkristallmikrowaage (QCM) bestimmten Dichte. Bei der QCM kommt es aufgrund der Anlagerung von Wasser und Ionen sowie durch die Veränderung der Viskosität und Dichte zu einer Überbestimmung der immobilisierten Aptamere, während es bei der CC zu einer Unterbestimmung kommt aufgrund der Möglichkeit, dass nicht jede Phosphatgruppe ein Hexaamin-Rutheniumchlorid (RuHex)-Ion adsorbiert. Daher liegt die tatsächliche Immobilisierungsdichte zwischen den beiden bestimmten Werten.

Auch mit der EIS konnte die Immobilisierung der Aptamere durch eine steigende Impedanz nachgewiesen werden. Durch das Fitten der Spektren konnte ein Ladungstransferwiderstand (R_{ct}) von etwa 2200Ω für die modifizierten Goldelektroden bestimmt werden. Dieser Wert ist signifikant höher als der R_{ct} von blanken Elektroden (111Ω) und signifikant kleiner als der Wert für nur mit MCH beschichteten Goldelektroden (6300Ω). Dies weist darauf hin, dass die Aptamere Defekte in der SAM induzieren und einen Ladungstransfer ermöglichen.

Untersuchungen zur Bestimmung der Größe der Defekte, an denen Ladungstransfer stattfindet, führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Während Defekte in der Größenordnung von nm zu erwarten sind, wurden mit der Gleichung von Finklea et al. [263] Defekte im μm -Maßstab bestimmt. Vermutlich liegt dies darin begründet, dass das Impedanzspektrum nur bis 200 kHz aufgenommen wurde, während rechnerisch Frequenzen im oberen MHz- bis GHz-Bereich notwendig sind. Dies könnte mit entsprechender Messtechnik wiederholt werden. Allerdings bleibt ungewiss, ob die für Mikroelektroden entwickelten Gleichungen für Defekte durch Aptamere verwendet werden kann. Nichtsdestotrotz konnte mit der Methode nachgewiesen werden, dass bei der mit Aptamer modifizierten Elektrode deutlich mehr Defekte vorhanden sind als bei der mit MCH beschichteten Goldelektrode.

5.3 Messsystem

Bei der Charakterisierung des gesamten Messsystems stellte sich heraus, dass die hochohmige Fritte der Referenzelektrode LF-1 den Impedanzanalysator zum Oszillieren brachte. Dies konnte mit einer Bypass-Kapazität von $1\ \mu\text{F}$ behoben werden.

Die elektrochemisch aktive Fläche der Arbeitselektrode wurde mit der Zyklovoltammetrie (CV) bestimmt und beträgt $0,444\ \text{cm}^2$ und ist somit 1,8-fach größer als die geometrische Fläche von $0,246\ \text{cm}^2$. Untersuchungen mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) ergaben, dass die Rauigkeit der Elektrode mit der Beschichtung zunimmt und der Peak-to-Valley-Wert ist bei mit Protein A-bindendes Aptamer (PAA) beschichteten Elektroden mit $9,4 \pm 2,9\ \text{nm}$ signifikant größer als bei mit MCH beschichteten Elektroden mit $2,5 \pm 0,2\ \text{nm}$. In folgenden Arbeiten sind weitere Untersuchungen der Oberfläche mit dem AFM empfohlen. Diese sollten in destilliertem Wasser durchgeführt werden, um die Ablagerung von Salzen und Ionen zu verhindern.

Als Gegenelektrode wurde ein Platindraht verwendet. Um trotz der geringen geometrischen Größe eine ausreichend hohe Stromdichte zu ermöglichen, wurde der Platindraht platinieren. Untersuchungen mit der Zyklovoltammetrie (CV) ergaben, dass die Austauschstromdichte I_0 der Platinelektrode mit $156\ \mu\text{A}/\text{cm}^2$ etwa so groß ist wie die der blanken Goldelektrode und 5-mal größer verglichen mit einer Aptamer-modifizierten Elektrode. Damit sollte gewährleistet sein, dass die Impedanz nicht durch Limitierungen an der Gegenelektrode beeinflusst wird.

Durch den Vergleich der Leitfähigkeit einer KCl-Lösung gemessen mit einem Konduktometer mit bekannter Zellkonstante und der Leitfähigkeit bestimmt aus der gemessenen Impedanz mit dem entwickelten Messsystem konnte die Zellkonstante für die Messkammer bestimmt werden ($0,58\ \text{cm}^{-1}$). Daraus wiederum wurde die molare Grenzleitfähigkeit λ_0 von KCl bestimmt, die mit $146,5\ \text{S cm}^2\ \text{mol}^{-1}$ annähernd dem Erwartungswert von $150,3\ \text{S cm}^2\ \text{mol}^{-1}$ entspricht und somit zeigt, dass die Messung der Impedanz zuverlässig ist und kein signifikanter Effekt von parasitären Einflüssen auftritt.

Validierungen mit den Kramers-Kronig-Beziehungen zeigten, dass der Realteil der Impedanz von mit PAA beschichteten Elektroden einen maximalen

Fehler von 3% im Frequenzbereich 1 Hz bis 100 kHz aufweist. Der Imaginärteil zeigt Abweichungen von maximal 5% im Frequenzbereich 5 Hz bis 20 kHz und erreicht bei 1 Hz einen Fehler von 40%, der darin begründet liegt, dass durch die Limitierung der Diffusion die Warburg-Impedanz ins Unendliche steigt, während die KK-Beziehungen ein Streben gegen einen festen Wert voraussetzen. Weiterhin erreicht der Imaginärteil der Impedanz bei 100 kHz ebenfalls einen Fehler von 40%, der darin begründet liegt, dass der Wert des Imaginärteils gegen Null sinkt und somit kleinste Abweichungen hohe Fehler verursachen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Impedanzmesssystem eine hohe Güte aufweist und der Ladungstransferwiderstand R_{ct} mit hoher Genauigkeit bestimmt werden kann.

Der Lösungsmittelwiderstand (R_{sol}) des Messpuffers BB beträgt $41 \pm 2 \Omega$ und der nach der Methode von Sluyters bestimmte unkompenzierte Widerstand beträgt 49Ω . Da der verwendete Impedanzanalysator den Lösungswiderstand kompensiert, bleibt nur ein unkompenzierter Rest von etwa 8Ω , der keine signifikanten Störungen der Messung verursacht. Eine Überkompensation könnte ebenfalls zu unerwünschtem Verhalten führen.

Untersuchungen der Stabilität der Impedanzmessung ergaben einen leichten Drift von $10 \Omega \text{ cm}^2 \text{ h}^{-1}$ sowie eine Beeinflussung durch das Pumpen der Flüssigkeit durch die Messkammer, weshalb erst gemessen wurde, sobald die Lösung zur Ruhe gekommen ist.

Zur Optimierung wurden Impedanzspektren verschiedener Konzentrationen des Redoxmediators $K_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ aufgenommen und ein exponentieller Abfall von R_{ct} und Warburgkoeffizient (A_w) mit steigender Konzentration von $K_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ beobachtet. Eine Konzentration von 2 mM wurde als Kompromiss zwischen geringem Messfehler und hoher Signaländerung gewählt.

Das Linearitätskriterium konnte für kleine Amplituden ($< 30 \text{ mV}$) bestätigt werden, wobei eine Amplitude von 10 mV für alle Versuche verwendet wurde.

Das Nullstrompotential variiert von Elektrode zu Elektrode, liegt im Mittel bei etwa 143 mV und zeigt keine Änderung bei der Variation der Amplitude im Bereich 7-28 mV. Der experimentell bestimmte Wert (143 mV) liegt signifikant unterhalb der rechnerisch bestimmten (156,25 mV) oder in der Literatur zu findenden Werte (169,25 mV). Diese Beobachtungen deuten auf einen Einfluss der Oberflächenmodifizierung auf das Nullstrompotential hin. Um sicherzustellen,

dass sich das Messsystem bei der verwendeten DC-Spannung im Gleichgewicht befindet, wurde das Nullstrompotential vor jeder Messung bestimmt und die DC-Spannung auf den bestimmten Wert gesetzt.

Zusammenfassend wurde das Messsystem sehr ausführlich charakterisiert, wobei die hohe Güte der Impedanzmessungen bewiesen und alle Störeffekte beseitigt bzw. minimiert und somit das Messsystem optimiert werden konnte.

5.4 Detektion der Analyten

Alle verfügbaren Informationen über die Struktur des Aptamers und die Struktur des Protein A wurden zusammengetragen und analysiert. Der 5'-Primer des Aptamers trägt vermutlich zur Bindung von Protein A bei, indem sich dort eine Schleife bildet, wodurch das Phosphatrückgrat nach außen präsentiert wird und mit Aminosäuren interagieren kann. Weiterhin bildet das Aptamer einen Quadruplex, der vermutlich zur Stabilisierung der Struktur und vor allem der am Quadruplex entstehenden Schleife(n) dient.

Das Protein A besteht aus fünf homologen Domänen A-E, deren Sekundärstruktur drei Helices ausbildet. Graille et al. [24] konnten zeigen, dass diese Helices sowohl an IgG als auch sich gegenseitig binden. Verdrängungsversuche von Stoltenburg et al. [198] zeigten, dass IgG und Aptamer um die gleichen Bindungsstellen am Protein A konkurrieren. Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass die Bindung der Domänen untereinander mit Unterstützung der Helix III die Struktur des Protein A festigt, während Helix I und II an der Bindung zum Aptamer beteiligt sind.

Weiterhin konnte mithilfe der Untersuchungen der Interaktionen zwischen DNS und Proteinen von Luscombe et al. [184], die Sequenz der einen Schleife des Quadruplexes "AGATA" einer Sequenz in Helix II des Protein A "QRNG-FIQ" zugeordnet werden, wo eine Bindung stattfinden könnte. Auch die konservierte sich wiederholende Sequenz des Linkers ("NKFNK") zwischen den Domänen erscheint für eine Interaktion mit DNS prädestiniert. Jedoch müssten diese rein hypothetischen Vermutungen mit Experimenten hinterlegt werden, was jedoch außerhalb des Rahmens dieser Dissertation liegt.

Die Anbindung von Protein A an die mit Aptamer modifizierten Goldelektroden konnte mit der QCM, der CV und der EIS nachgewiesen werden. Die

Messungen mit der QCM sowie Einzelfrequenzmessungen bei 10 Hz ermöglichten die Aufnahme des zeitlichen Verlaufs der Anbindung, in der die typischen Bereiche für Assoziation und Dissoziation zu erkennen sind. Die Impedanzänderung bei 25 nM Protein A in BB betrug 100Ω , während die Impedanzänderung bei 400 nM Protein A in BB + 2 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ nur 40Ω betrug. Um das Signal zu optimieren, wurde die Inkubation immer in BB ohne Redoxmediator durchgeführt.

Wie zu erwarten, steigt die Impedanz mit zunehmender Konzentration des rekombinanten Protein A in Puffer. Die Kurven konnten mit hoher Güte mit dem modifizierten Randles-Schaltbild gefittet werden, wodurch sich deutlich zeigte, dass allein der R_{ct} signifikant mit der Protein A Konzentration anstieg, hingegen die anderen Parameter nur kleine Abweichungen zeigten (siehe Abbildung 4.53). Es wurde eine Kalibrierkurve für R_{ct} mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinanten Protein A in BB aufgenommen und mit dem One-site-Binding-Modell gefittet. Es konnte ein Detektionslimit von 7 nM, ein linearer Bereich von 7 bis 24 nM mit einer Sensitivität von $5 \Omega \text{ cm}^2 \text{ nM}^{-1}$ und eine scheinbare Dissoziationskonstante (K_D) von 18,5 nM bestimmt werden. Der lineare Bereich kann vermutlich durch Optimierung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses erweitert werden.

Der Sensor weist ebenfalls eine hohe Selektivität auf wie Experimente mit den strukturähnlichen Proteinen G und L zeigten, bei denen kein signifikanter Anstieg des R_{ct} detektiert werden konnte. Versuche mit immobilisiertem Aptamer-Pool, d.h. zufälligen Oligonukleotidsequenzen bewiesen, dass die Anbindung von Protein A nicht auf unspezifischen elektrostatischen Interaktionen mit DNS basiert, da kein signifikanter Anstieg des Signals beobachtet werden konnte.

Das Messsystem wurde entsprechend den Vorschriften des Infektionsschutzgesetzes umgebaut und in ein S2-Labor verlagert, um dort die Anbindung von lebenden *S. aureus* zu untersuchen. Die Bakterien wurden in Tryptic soy broth (TSB) herangezogen und in BB verdünnt und dann über den Sensor gegeben und für fünf Minuten inkubiert. Auch hier konnte ein Anstieg der Impedanz mit steigender Konzentration detektiert werden, der hauptsächlich auf die Änderung des R_{ct} zurückzuführen ist, obwohl hier auch eine Änderung von R_{sol} und A_w von 1% und 4% zu beobachten war. Es wurde ebenfalls

eine Kalibrationskurve aufgenommen und mit dem One-site-Binding-Modell gefittet. Das Detektionslimit beträgt 10 koloniebildende Einheiten (KbE)/ml, der lineare Bereich reicht von 10 KbE/ml bis 10^4 KbE/ml mit einer Sensitivität von $10\ \Omega$ pro Dekade und die K_D beträgt 112 KbE/ml. Inkubation mit *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) und *Escherichia coli* (*E. coli*) sowie einer mit Oligonukleotid-Pool modifizierten Oberfläche mit *S. aureus* zeigten deutlich geringere Signale und belegen die hohe Selektivität des Sensors.

Obwohl größere Signale erwartet wurden, sind die Änderungen von R_{ct} geringer als bei den Versuchen mit rekombinanten Protein A. Wurde die Probe zentrifugiert und der Überstand verworfen, so konnten deutlich größere Signale detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass Moleküle im Überstand den Impedanzanstieg kompensieren z.B. durch das Einbringen hoher Ladungen. Es könnte auch sein, dass der Überstand Fragmente von Protein A enthält, die bevorzugt an die Aptamere binden. Was diese Bestandteile des Überstandes sind, die die Abnahme der Impedanz verursachen und der dahinter liegende Mechanismus sollte in weiterführenden Arbeiten ergründet werden. Die Probe zu zentrifugieren, bevor diese auf den Sensor aufgetragen wird, ist ein simpler Probenvorbereitungsschritt und stellt kein Hindernis für die Anwendung als Point-of-Need-Gerät dar.

Um zu prüfen, ob tatsächlich Bakterien auf der Oberfläche gebunden wurden, wurde die Elektrode aus der Kammer entfernt und der Zellkern mit einem Fluoreszenzfarbstoff eingefärbt und schließlich unterm Mikroskop betrachtet. Es sind deutlich gebundene traubenförmige *S. aureus* zu erkennen. Dadurch konnte die Hypothese I bewiesen werden: Die Bindung von *S. aureus* an immobilisierte Aptamere (PAA) kann mit der Impedanzspektroskopie detektiert werden.

5.5 Modell

Das Modell wurde auf Grundlage des modifizierten Randles-Ersatzschaltbildes entwickelt und stellt die Verbindung zwischen der Impedanz Z und der für den Ladungstransfer verfügbaren Fläche A her. Die spezifischen Parameter für mit PAA modifizierte Goldelektroden wurden mittels der CV und der CC bestimmt, darunter die heterogene Elektronentransferkonstante k_0 und

die Ladungstransferkoeffizienten $\alpha(\text{ox/red})$ sowie die Diffusionskonstanten D_{ox} und D_{red} . Die Diffusionskonstanten der mit PAA modifizierten Goldelektroden ($6 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) sind eine Dekade kleiner als die blanker Elektroden ($6 \cdot 10^{-6}$ bis $9 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$). Bei einer geringeren Dichte an immobilisierten Aptameren (PAA 1:100) konnten höhere Diffusionskonstanten gemessen werden ($4,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$). Dies deutet auf einen Einfluss der Aptamere auf die Diffusion des Redoxmediators Hexacyanoferrat ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$) hin. Da das Aptamer und der Redoxmediator negativ geladen sind, stoßen sie sich gegenseitig ab und je mehr Aptamere auf der Oberfläche immobilisiert wurden, desto größer ist der Bereich der Abstoßung.

Für die PAA modifizierte Elektrode wurden Ladungstransferkoeffizienten $\alpha(\text{ox})$ von 0,36 und $\alpha(\text{red})$ von 0,47 sowie eine scheinbare heterogene Elektronentransferkonstante (k_{app}) von $4 \cdot 10^{-3} \text{ cm/s}$ bestimmt. Die Ladungstransferkoeffizienten weichen signifikant vom Wert 0,5 ab und ergeben in der Summe nicht 1. Beides weist auf ein ausgeprägtes unsymmetrisches Verhalten hin, wobei die Reduktion der Oxidation bevorzugt wird. Die k_{app} ist etwa 2-3 Größenordnungen kleiner als die in der Literatur angegebene heterogene Elektronentransferkonstante (k_0) für blanke Elektroden (0,03 bis $0,5 \text{ cm s}^{-1}$) und stimmt mit der Beobachtung von Ganesh et al. [307] für beschichtete Elektroden überein ($1,21 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$). Die Reduktion der k_{app} liegt vermutlich in der Ausbildung von Mikroelektroden durch die Aptamere begründet, wobei es sich scheinbar um einen Ladungstransfer handelt, der anders abläuft als für blanke Elektroden bekannt. Die Untersuchungen mit der CV deuten auf eine Tendenz zu irreversiblen Verhalten hin. Eventuell läuft der Transfer über einen Vermittler ab, wie zum Beispiel ein in der Defektstelle gefangener Redoxmediator oder über das Aptamer.

Mit den bestimmten Parametern wurden mit dem Modell Impedanzkurven simuliert. Als Gesamtfläche A_{true} wurde die mit der CV bestimmte elektrochemisch aktive Fläche von $0,444 \text{ cm}^2$ herangezogen und für die Berechnung der Impedanz des Konstantphasenelement (CPE) verwendet, da sich dieses über der ganzen Fläche ausbildet. Der gehemmte Ladungstransfer findet nur an den Defekten verursacht durch die Aptamere statt, daher wurde hierfür die Fläche der Aptamere bestimmt ($A_{\text{faraday}} = 0,067 \text{ cm}^2$). Diese A_{faraday} wurde als Ausgangsfläche für die Bestimmung von R_{ct} eingesetzt. Es wird davon ausge-

gangen, dass Diffusion nur dort stattfindet, wo keine Aptamere sind. Demnach wurde zur Bestimmung der Warburgimpedanz die Differenz der Defektfläche durch die Aptamere A_{faraday} von der Gesamtfläche A_{true} verwendet, die als A_{MCH} bezeichnet wird.

Anhand dieser Flächenverhältnisse konnten Impedanzkurven simuliert werden, die einen ähnlichen Kurvenverlauf zu den gemessenen zeigen und deren Werte mit den Fitergebnissen weitestgehend übereinstimmen, abgesehen von der Warburgimpedanz, die signifikante Abweichungen zeigte. Durch die Reduktion der für den Ladungstransfer verfügbaren Fläche A_{faraday} von $6,69 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2$ zu $4,69 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2$ konnte ein Anstieg des R_{ct} simuliert werden. Während die simulierten R_{ct} -Werte exponentiell ansteigen, zeigen die Fitergebnisse einen sigmoiden Kurvenverlauf mit einer Sättigung. Diese Sättigung kann mit dem Modell nicht simuliert werden, vor allem, da trotz der Sättigung aller Bindungsstellen weiterhin ein relativ großer Ladungstransfer stattfindet. D.h. möglicherweise ist trotz der Bindung eines Protein A ein Ladungstransfer über die Defektstelle am Aptamer möglich. Die Oberfläche des Protein A ist teilweise positiv geladen und könnte die Abstoßung der Redoxmoleküle durch das Aptamer teilweise aufheben.

Zusammenfassend konnten basierend auf der Änderung eines einzigen Parameters, und zwar der Fläche für den Ladungstransfer A_{faraday} , Impedanzkurven simuliert werden, die den Kurvenverläufen der gemessenen Impedanzen entsprechen. Dies zeigt, dass die Hinderung des Elektronentransfers durch die Reduktion der dafür zur Verfügung stehenden Fläche die Detektion der Analyten mittels der Impedanzspektroskopie ermöglicht und somit die Hypothese II bestätigt.

5.6 Ausblick

In diesem Abschnitt werden Hinweise für weiterführende Arbeiten gegeben. Der in dieser Arbeit entwickelte Sensor soll als Grundlage für die Entwicklung von Geräten für die Vor-Ort-Analyse im Bereich der Lebensmittelanalytik, Veterinär- oder medizinischen Diagnostik dienen. Hinsichtlich dieses Ziels werden folgende Optimierungen empfohlen.

Das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis der Messkammer sollte optimiert wer-

den, um den dynamischen Bereich zu erhöhen. Dafür sollte die Höhe der Messkammer reduziert werden, wobei die Breite und Länge vergrößert werden können. Simulationen des Durchflusses zur Optimierung der Durchmischung und somit Reduktion der notwendigen Probenvolumina sind zu empfehlen. Zudem sollten Versuche mit längeren Spül- sowie Inkubationszeiten durchgeführt werden, um die optimalen Zeiten für höhere Sensitivitäten bestimmen zu können. Außerdem sollte der Mechanismus zum Wechsel der Arbeitselektrode optimiert werden. Nach den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnten mikroskopische Ablagerungen an der Fritte der Referenzelektrode beobachtet werden. Daher sollte die Referenzelektrode über ein Diaphragma von der Messlösung getrennt werden, damit Reaktionen zwischen $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, den Substanzen der biologischen Probe und der Fritte ausgeschlossen werden können. Die Verwendung von Indium- Zinn- Oxid (ITO) als Arbeitselektrode (WE) oder Gegenelektrode (CE) könnte evaluiert werden, um Sichtfenster und Elektrode zu vereinen und somit die geometrische Anordnung der Elektroden in der Messkammer zu optimieren.

Die Immobilisierung des Aptamers über ein C9-Alkanthiol könnte getestet werden, um den trotz der Sättigung der Bindungsstellen stattfindenden Ladungstransfer zu reduzieren und somit das Signal zu vergrößern, da dieses ein exponentielles Verhalten zeigt. Die Immobilisierungsdichte könnte durch die Erhöhung der Kationen-Konzentration im Immobilisierungspuffer erhöht werden. Allerdings muss geprüft werden, wie sich die erhöhte Konzentration der Kationen auf die Faltung des Aptamers und der Bindungsaffinität zu Protein A auswirkt. Im Allgemeinen wird empfohlen, für weitere Charakterisierungen der Bindungsaffinität das native Protein A anstatt des rekombinanten zu verwenden.

Zur Evaluierung des Mechanismus des Ladungstransfer an den Defektstellen sollte zunächst die Größe der Defektstellen bestimmt werden. Dies würde eine bessere Bestimmung der für den Ladungstransfer verfügbaren Fläche und der tatsächlichen k_0 ermöglichen.

Für den Einsatz dieses Sensors in Realproben muss beachtet werden, dass *S. aureus* eine DNase produziert, die sogenannte Thermonuklease, die DNS und RNS spaltet [10]. Der Einsatz von PNS-basierter Aptamere, bzw. Aptamere mit modifizierten Basen würden den Sensor langzeitstabiler machen.

Literaturverzeichnis

- [1] ABRAHAM, E. P. ; CHAIN, E.: An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. In: *Nature* 146 (1940), Dezember, 837. <http://dx.doi.org/10.1038/146837a0>
- [2] VENTOLA, C. L.: The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. In: *Pharmacy and Therapeutics* 40 (2015), April, Nr. 4, S. 277–283
- [3] BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT & PAUL-EHRLICH-GESELLSCHAFT FÜR CHEMOTHERAPIE E.V.: GERMAP 2012 - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. In: *Antiinfectives Intelligence* (2014). https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/05_Tierarzneimittel/germap2012.pdf
- [4] FESSLER, Andrea T. ; KADLEC, Kristina ; HASSEL, Melanie ; HAUSCHILD, Tomasz ; EIDAM, Christopher ; EHRLICH, Ralf ; MONECKE, Stefan ; SCHWARZ, Stefan: Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Food and Food Products of Poultry Origin in Germany. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011), Oct, Nr. 20, 7151-7157. [doi:10.1128/AEM.00561-11](https://doi.org/10.1128/AEM.00561-11)
- [5] DASCHNER, Franz: Hygiene: Hysterie in Deutschland. In: *Deutsches Ärzteblatt International* 109 (2012), Nr. 25, A 1314. <http://www.aerzteblatt.de/int/article.asp?id=127066>
- [6] GASTMEIER, P. ; BRUNKHORST, F. ; SCHRAPPE, M. ; KERN, W. ; GEFFERS, C.: Wie viele nosokomiale Infektionen sind vermeidbar? In: *Dtsch. Med. Wochenschr.* 135 (2010), Nr. 03, S. 91–93. – ISSN 0012–0472
- [7] VOS, Margreet C. ; BEHRENDT, Myra D. ; MELLES, Damian C. ; MOLLEMA, Femke P. N. ; GROOT, Woutrinus de ; PARLEVLIE, Gerard ; OTT, Alewijn ; HORST-KREFT, Deborah ; BELKUM, Alex van ; VERBRUGH, Henri A.: 5 Years of Experience Implementing a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Search and Destroy Policy at the Largest University Medical Center in the Netherlands. In: *Infection Control & Hospital Epidemiology* 30 (2009), Nr. 10, 977-984. <http://dx.doi.org/10.1086/605921>
- [8] KÖCK, R. ; BECKER, K. ; COOKSON, B. ; GEMERT-PIJNEN, J. E. ; HARBARTH, S. ; KLUYTMANS, J. ; MIELKE, M. ; PETERS, G. ; SKOV, R. L. ; STRUELENS, M. J. ;

- TACCONELLI, E. ; WITTE, W. ; FRIEDRICH, A. W.: Systematic literature analysis and review of targeted preventive measures to limit healthcare-associated infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Eurosurveillance* 19 (2014), Nr. 29. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.29.20860>
- [9] EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL/ EUROPEAN MEDICINES AGENCY - JOINT TECHNICAL REPORT: The bacterial challenge: time to react. Version: 2009. <http://dx.doi.org/10.2900/2518>. 2009. – Forschungsbericht
- [10] BENNETT, Reginald W. ; MONDAY, Steven R. ; MARIANNE D. MILIOTIS, Jeffrey W. B. (Hrsg.): *International Handbook of Foodborne Pathogens - Part I, Chapter 4 - Staphylococcus aureus*. Marcel Dekker, Inc., 2003 (Food Science and Technology)
- [11] LIU, Chia-I ; LIU, George Y. ; SONG, Yongcheng ; YIN, Fenglin ; HENSLER, Mary E. ; JENG, Wen-Yin ; NIZET, Victor ; WANG, Andrew H-J ; OLDFIELD, Eric: A Cholesterol Biosynthesis Inhibitor Blocks *Staphylococcus aureus* Virulence. In: *Science* (2008), March, Nr. 319, 1391-1394. [doi:10.1126/science.1153018](https://doi.org/10.1126/science.1153018)
- [12] NEMEGHAIRE, Stéphanie ; ARGUDÍN, M. A. ; HAESEBROUCK, Freddy ; BUTAYE, Patrick: Epidemiology and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage isolates from bovines. In: *BMC Veterinary Research* 10 (2014). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4103977/>
- [13] RASOOLY, Avraham: Biosensors for the Analysis of Food- and Waterborne Pathogens and Their Toxins. In: *Journal of AOAC International* 89 (2006), Nr. 3, S. 873–883
- [14] HAUCK, Christof R. ; AGERER, Franziska ; MUENZNER, Petra ; SCHMITTER, Tim: Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection. In: *European Journal of Cell Biology* 85 (2006), Nr. 3, 235 - 242. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2005.08.002>
- [15] JAN-ROBLERO, Janet ; GARCÍA-GÓMEZ, Elizabeth ; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, Sandra ; CANCINO-DIAZ, Mario E. ; CANCINO-DIAZ, Juan C.: Surface Proteins of *Staphylococcus aureus*. Version: 2017. <https://doi.org/10.5772/65976>. In: ENANY, Shymaa (Hrsg.): *The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus*. Rijeka : InTech, 2017, Kapitel 10
- [16] FORSGREN, Arne: Significance of Protein A Production by *Staphylococci*. In: *Infection and Immunity* 2 (1970), November, Nr. 5, 672–673. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC416067/>
- [17] GODING, James W.: Use of *staphylococcal* protein A as an immunological reagent. In: *Journal of Immunological Methods* 20 (1978), 241 - 253. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(78\)90259-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(78)90259-4)
- [18] BECKER, Samuel ; FRANKEL, Matthew B. ; SCHNEEWIND, Olaf ; MISSIAKAS, Dominique: Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. In:

- Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (2014), Nr. 4, 1574–1579.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1317181111>
- [19] O'HALLORAN, Dara P. ; WYNNE, Kieran ; GEOGHEGAN, Joan A.: Protein A Is Released into the *Staphylococcus aureus* Culture Supernatant with an Unprocessed Sorting Signal. In: *Infection and Immunity* 83 (2015), Nr. 4, 1598-1609. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.03122-14>
- [20] HARTLEIB, Jörg ; KÖHLER, Nicola ; DICKINSON, Richard B. ; CHHATWAL, Gursharan S. ; SIXMA, Jan J. ; HARTFORD, Orla M. ; FOSTER, Timothy J. ; PETERS, Georg ; KEHREL, Beate E. ; HERRMANN, Mathias: Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. In: *Blood* 96 (2000), Nr. 6, 2149–2156. <http://www.bloodjournal.org/content/96/6/2149>
- [21] O'SEAGHDHA, Maghnus ; SCHOOTEN, Carina J. v. ; KERRIGAN, Steven W. ; EMSLEY, Jonas ; SILVERMAN, Gregg J. ; COX, Dermot ; LENTING, Peter J. ; FOSTER, Timothy J.: *Staphylococcus aureus* protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. In: *FEBS Journal* 273 (2006), 11, Nr. 21, 4831–4841. <http://https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05482.x>
- [22] FORSGREN, A. ; GHETIE, R. ; LINDMARK, R. ; SJÖQUIST, J.: Protein A and its exploitation. In: EASMON, C. S. F. (Hrsg.) ; ADLAM, C. (Hrsg.): *Staphylococci and Staphylococcal Infections: The organism in vivo and in vitro* Bd. 2. Academic Press, 1983. – ISBN 9780122281013
- [23] KING, Brian F. ; WILKINSON, Brian J.: Binding of human immunoglobulin G to protein A in encapsulated *Staphylococcus aureus*. In: *Infection and Immunity* 33 (1981), September, Nr. 3, 666–672. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC350759/>
- [24] GRAILLE, Marc ; STURA, Enrico A. ; CORPER, Adam L. ; SUTTON, Brian J. ; TAUSSIG, Michael J. ; CHARBONNIER, Jean-Baptiste ; SILVERMAN, Gregg J.: Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (2000), Nr. 10, 5399–5404. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5399>
- [25] FALUGI, Fabiana ; KIM, Hwan K. ; MISSIAKAS, Dominique M. ; SCHNEEWIND, Olaf: Role of Protein A in the Evasion of Host Adaptive Immune Responses by *Staphylococcus aureus*. In: *mBio* 4 (2013), Juli, Nr. 5. <https://doi.org/10.1128/mBio.00575-13>
- [26] DEDENT, Andrea C. ; MCADOW, Molly ; SCHNEEWIND, Olaf: Distribution of Protein A on the Surface of *Staphylococcus aureus*. In: *Journal of Bacteriology* 189 (2007), Nr. 12, 4473-4484. <https://doi.org/10.1016/10.1128/JB.00227-07>
- [27] SJÖDAHL, Jörgen: Structural Studies on the Four Repetitive Fc-Binding Regions in Protein A from *Staphylococcus aureus*. In: *European Journal of Biochemistry* 78 (1977), Nr. 2, 471-490. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11760.x>

- [28] KAHL, Barbara C. ; MELLMANN, Alexander ; DEIWICK, Susanne ; PETERS, Georg ; HARMSSEN, Dag: Variation of the Polymorphic Region X of the Protein A Gene during Persistent Airway Infection of Cystic Fibrosis Patients Reflects Two Independent Mechanisms of Genetic Change in *Staphylococcus aureus*. In: *Journal of Clinical Microbiology* 43 (2005), Nr. 1, 502-505. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.502-505.2005>
- [29] TONG, Steven Y. C. ; DAVIS, Joshua S. ; EICHENBERGER, Emily ; HOLLAND, Thomas L. ; FOWLER, Vance G.: *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. In: *Clinical Microbiology Reviews* 28 (2015), Mai, Nr. 3, S. 603–661. – ISSN 1098–6618
- [30] ARGUDÍN, María Á. ; MENDOZA, María C. ; RODICIO, María R.: Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. In: *toxins* (2010), Nr. 2, 1751–1773. <https://doi.org/10.3390/toxins2071751>
- [31] PINCHUK, Irina V. ; BESWICK, Ellen J. ; REYES, Victor E.: *Staphylococcal* Enterotoxins. In: *Toxins* 2 (2010), Nr. 8, 2177–2197. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins2082177>
- [32] NIA, Yacine ; MUTEL, Isabelle ; ASSERE, Adrien ; LOMBARD, Bertrand ; AUVRAY, Frederic ; HENNEKINNE, Jacques-Antoine: Review Over a 3-Year Period of European Union Proficiency Tests for Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Food Matrices. In: *Toxins* 8 (2016), April, Nr. 4, 107–122. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848633/>. – ISSN 2072–6651
- [33] EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) AND ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. In: *EFSA Journal* 14 (2016), Nr. 12, 231 pp. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634>
- [34] KIRK, Martyn D. ; PIRES, Sara M. ; BLACK, Robert E. ; CAIPO, Marisa ; CRUMP, John A. ; DEVLEESSCHAUWER, Brecht ; DÖPFER, Dörte ; FAZIL, Aamir ; FISCHER-WALKER, Christa L. ; HALD, Tine ; HALL, Aron J. ; KEDDY, Karen H. ; LAKE, Robin J. ; LANATA, Claudio F. ; TORGERSON, Paul R. ; HAVELAAR, Arie H. ; ANGULO, Frederick J.: World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. In: *PLoS Medicine* 12 (2015), November, Nr. 12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4668831/>. – ISSN 1549–1676
- [35] ÇETIN, E. T. ; ANG, Ö.: *Staphylococci* Resistant to Methicillin („Celbenin“). In: *British Medical Journal* (1962), S. 51–52
- [36] KRESKEN, M. ; HAFNER, D. ; SCHMITZ, F.-J. ; WICHELHAUS, T. A.: *Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und*

- im mitteleuropäischen Raum. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft Empfindlichkeitsprüfungen & Resistenz der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus dem Jahre 2001. Antiinfectives Intelligence, 2003 <http://www.p-e-g.org/econtext/resistenzdaten>
- [37] WATERS, Andrew E. ; CONTENTE-CUOMO, Tania ; BUCHHAGEN, Jordan ; LIU, Cindy M. ; WATSON, Lindsey ; PEARCE, Kimberly ; FOSTER, Jeffrey T. ; BOWERS, Jolene ; DRIEBE, Elizabeth M. ; ENGELHALER, David M. ; KEIM, Paul S. ; PRICE, Lance B.: Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* in US Meat and Poultry. In: *Clinical Infectious Diseases* 52 (2011), Nr. 10, 1227-1230. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir181>
- [38] ROBERT KOCH-INSTITUT: *RKI-Ratgeber - Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA*. Webseite. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Staphylokokken_MRSA.html. Version: Mai 2016
- [39] VERBAND FORSCHENDER ARZNEIMITTELHERSTELLER E.V.: *Neue Antibiotika: Den Vorsprung gegenüber resistenten Bakterien wahren*. Webseite. <https://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/woran-wir-forschen/neue-antibiotika-den-vorsprung-wahren.html>. Version: April 2018
- [40] SUTHERLAND, R. ; ROLINSON, G. N.: Characteristics of Methicillin-resistant *Staphylococci*. In: *Journal of Bacteriology* 87 (1964), Nr. 4, 887-899. <http://jb.asm.org/content/87/4/887.abstract>
- [41] DAVIES, Julian ; DAVIES, Dorothy: Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74 (2010), Nr. 3, 417-433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- [42] GREMA, H. A. ; GEIDAM, Y. A. ; GADZAMA, G. B. ; AMEH, J. A. ; SULEIMAN, A.: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A review. In: *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 3 (2015), Nr. 2, 79-98. <http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.2.79.98>
- [43] DEVRIESE, L. A. ; VAN DAMME, L. R. ; FAMEREE, L.: Methicillin (Cloxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* strains Isolated from Bovine Mastitis Cases. In: *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B* 19 (1972), Nr. 7, 598-605. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0450.1972.tb00439.x>
- [44] YANG, Feng ; WANG, Qi ; WANG, Xu rong ; WANG, Ling ; LI, Xin pu ; LUO, Jin yin ; ZHANG, Shi dong ; LI, Hong sheng: Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Northwest China. In: *Journal of Integrative Agriculture* 15 (2016), Nr. 12, 2842 - 2847. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61368-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61368-0)
- [45] WEESE, J.S. ; CALDWELL, F. ; WILLEY, B.M. ; KREISWIRTH, B.N. ; MCGEER, A. ; ROUSSEAU, J. ; LOW, D.E.: An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

- skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital. In: *Veterinary Microbiology* 114 (2006), Nr. 1, 160 - 164. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.054>
- [46] VOSS, Andreas ; LOEFFEN, Frans ; BAKKER, Judith ; KLAASSEN, Corne ; WULF, Mireille: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pig Farming. 11 (2005), Nr. 12, 1965–1966. <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/11/12/05-0428>
- [47] DUQUETTE, R. A. ; NUTTALL, T. J.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? In: *Journal of Small Animal Practice* 45 (2004), Nr. 12, 591–597. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-5827.2004.tb00180.x>
- [48] HUIJSDENS, Xander W. ; DIJKE, Beatrix J. ; SPALBURG, Emile ; SANTEN-VERHEUVEL, Marga G. ; HECK, Max E. ; PLUISTER, Gerlinde N. ; VOSS, Andreas ; WANNET, Wim J. ; NEELING, Albert J.: Community-acquired MRSA and pig-farming. In: *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 5 (2006), Nr. 1, 26–30. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-5-26>
- [49] MONECKE, Stefan ; GAVIER-WIDÉN, Dolores ; HOTZEL, Helmut ; PETERS, Martin ; GUENTHER, Sebastian ; LAZARIS, Alexandros ; LONCARIC, Igor ; MÜLLER, Elke ; REISSIG, Annett ; RUPPELT-LORZ, Antje ; SHORE, Anna C. ; WALTER, Birgit ; COLEMAN, David C. ; EHRLICH, Ralf: Diversity of *Staphylococcus aureus* Isolates in European Wildlife. In: *PLoS ONE* 11 (2016), Dezember, Nr. 12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5161505/>
- [50] PATERSON, G. K. ; LARSEN, A. R. ; ROBB, A. ; EDWARDS, G. E. ; PENNYCOTT, T. W. ; FOSTER, G. ; MOT, D. ; HERMANS, K. ; BAERT, K. ; PEACOCK, S. J. ; PARKHILL, J. ; ZADOKS, R. N. ; HOLMES, M. A.: The newly described mecA homologue, mecALGA251, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (2012), Nr. 12, 2809–2813. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks329>
- [51] BROENS, Els M. ; GRAAT, Elisabeth A. ; WOLF, Peter J. Van D. ; GIESSEN, Arjen W. Van D. ; JONG, Mart C.M. D.: Transmission of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among pigs during transportation from farm to abattoir. In: *The Veterinary Journal* 189 (2011), Nr. 3, 302 - 305. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.08.003>
- [52] LEE, Yong J. ; JUNG, Byeong S. ; KIM, Kee-Tae ; PAIK, Hyun-Dong: Predictive model for the growth kinetics of *Staphylococcus aureus* in raw pork developed using Integrated Pathogen Modeling Program (IPMP) 2013. In: *Meat Science* 107 (2015), 20 - 25. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.04.006>
- [53] HE, Wenqiang ; LIU, Yuqing ; QI, Jing ; CHEN, Hongbin ; ZHAO, Chunjiang ; ZHANG, Feifei ; LI, Henan ; WANG, Hui: Food-Animal Related *Staphylococcus aureus* Multidrug-Resistant ST9 Strains with Toxin Genes. In: *Foodborne Pathogens and Disease* 10 (2013), Nr. 9, 782–788. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1452>

- [54] WULF, Mireille ; NES, Arie van ; EIKELENBOOM-BOSKAMP, Andrea ; VRIES, Janneke de ; MELCHERS, Willem ; KLAASSEN, Corné H. ; VOSS, Andreas: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Veterinary Doctors and Students, the Netherlands. In: *Emerging Infectious Diseases* 12 (2006), December, Nr. 12, 1939–1941. <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/12/12/06-0355>
- [55] EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING: *EUCAST*. Webseite. <http://www.eucast.org/>. Version: October 2017
- [56] NATIONALES ANTIBIOTIKA- SENSITIVITÄTSTEST- KOMITEE: *NAK*. <http://www.nak-deutschland.org/>. Version: 2018
- [57] INFEKTIONSSCHUTZGESETZ (IFSG): *Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen*. <https://www.gesetze-im-internet.de/ifsg/>. Version: 2001
- [58] HYGMEDVO: GESETZ- UND VERORDNUNGSBLATT IN NORDRHEIN-WESTFALEN: *Verordnung über die Hygiene und Infektionsprävention in medizinischen Einrichtungen (HygMedVO)*. https://recht.nrw.de/lmi/owa/br_vbl_detail_text?anw_nr=6&vd_id=13246&vd_back=N143&sg=1&menu=1. Version: 2012
- [59] VAN TRIJP, M. J. C. A. ; MELLES, D. C. ; HENDRIKS, W. D. H. ; PARLEVLIET, G. A. ; GOMMANS, M. ; OTT, A.: Successful Control of Widespread Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization and Infection in a Large Teaching Hospital in The Netherlands. In: *Infection Control and Hospital Epidemiology* 28 (2007), Nr. 8, 970–975. <http://www.jstor.org/stable/10.1086/519210>
- [60] KNIPPENBERG-GORDEBEKE, Gertie van: Screen and clean to beat MRSA: success story from The Netherlands. In: *Healthcare infection* 15 (2010), Nr. 1, 3 - 9. <https://doi.org/10.1071/HI10002>
- [61] HAKING, Dennis: Infection Prevention Networks and the Role of the Boundaryless Hospital. Version: 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-662-49012-9_16. In: ALBACH, Horst (Hrsg.) ; MEFFERT, Heribert (Hrsg.) ; PINKWART, Andreas (Hrsg.) ; REICHWALD, Ralf (Hrsg.) ; EIFF, Wilfried von (Hrsg.): *Boundaryless Hospital*. Berlin, Heidelberg : Springer, Berlin, Heidelberg, 2016, 277–291
- [62] WISE, Richard ; HART, Tony ; CARS, Otto ; STREULENS, Marc ; HELMUTH, Reinen ; HUOVINEN, Pentti ; SPRENGER, Marc: Antimicrobial resistance: Is a major threat to public health. In: *British Medical Journal* 317 (1998), Nr. 7159, 609–610. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1113826/>
- [63] SPEKSNIJDER, D. C. ; MEVIUS, D. J. ; BRUSCHKE, C. J. M. ; WAGENAAR, J. A.: Reduction of Veterinary Antimicrobial Use in the Netherlands. The Dutch Success Model. In: *Zoonoses and Public Health* 62 (2015), Nr. s1, 79–87. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/zph.12167>

- [64] BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT & PAUL-EHRlich-GESELLSCHAFT FÜR CHEMOTHERAPIE E.V.: GERMAP 2015 - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. In: *Antiinfectives Intelligence* (2016). https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/05_Tierarzneimittel/germap2015.pdf
- [65] SARTELLI, Massimo ; 161WEITEREAUTOREN: The Global Alliance for Infections in Surgery: defining a model for antimicrobial stewardship—results from an international cross-sectional survey. In: *World Journal of Emergency Surgery* 12 (2017), Nr. 1, 34. <https://doi.org/10.1186/s13017-017-0145-2>
- [66] CESARE, Andrea D. ; ECKERT, Ester M. ; D'URSO, Silvia ; BERTONI, Roberto ; GILLAN, David C. ; WATTIEZ, Ruddy ; CORNO, Gianluca: Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. In: *Water Research* 94 (2016), 208 - 214. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.049>
- [67] TEHRANI, Amir H. ; GILBRIDE, Kimberley A.: A closer look at the antibiotic-resistant bacterial community found in urban wastewater treatment systems. In: *Microbiology-Open* (2018). <https://doi.org/10.1002/mbo3.589>
- [68] LOOD, Rolf ; ERTÜRK, Gizem ; MATTIASSON, Bo: Revisiting Antibiotic Resistance Spreading in Wastewater Treatment Plants - Bacteriophages as a Much Neglected Potential Transmission Vehicle. In: *Frontiers in Microbiology* 8 (2017), November, 2298–2305. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02298>
- [69] BAIRD, Rosamund M. ; LEE, W.H.: Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. In: *International Journal of Food Microbiology* 26 (1995), Nr. 1, 15 - 24. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)E0028-P](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)E0028-P)
- [70] VIÇOSA, Gabriela N. ; MORAES, Paula M. ; YAMAZI, Anderson K. ; NERO, Luís A.: Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. In: *Food Microbiology* 27 (2010), Nr. 4, 447 - 452. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.12.007>
- [71] MORRIS, K. ; WILSON, C. ; WILCOX, M. H.: Evaluation of chromogenic meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* media: sensitivity versus turn-around time. In: *Journal of Hospital Infection* 81 (2012), Nr. 1, 20 - 24. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.02.003>
- [72] BRENNAN, G. I. ; HERRA, C. ; COLEMAN, D. C. ; O'CONNELL, B. ; SHORE, A. C.: Evaluation of commercial chromogenic media for the detection of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Journal of Hospital Infection* 92 (2016), Nr. 3, 287 - 292. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.10.019>

- [73] PUMIPUNTU, Natapol ; KULPEANPRASIT, Suphang ; SANTAJIT, Sirijan ; TUNYONG, Witawat ; KONG-NGOEN, Thida ; HINTHONG, Woranich ; INDRAWATTANA, Nitya: Screening method for *Staphylococcus aureus* identification in subclinical bovine mastitis from dairy farms. In: *Veterinary World* 10 (2017), Nr. 7, 721-726. <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2017.721-726>
- [74] XU, Zhenbo ; HOU, Yuchao ; PETERS, Brian M. ; CHEN, Dingqiang ; LI, Bing ; LI, Lin ; SHIRTLIFF, Mark E.: Chromogenic media for MRSA diagnostics. In: *Molecular Biology Reports* 43 (2016), Nov, Nr. 11, 1205–1212. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4062-3>
- [75] YAZDANKHAH, Siamak P. ; HELLEMANN, Anne-Lill ; RØNNINGEN, Knut ; OLSEN, Egil: Rapid and sensitive detection of *Staphylococcus* species in milk by ELISA based on monodisperse magnetic particles. In: *Veterinary Microbiology* 62 (1998), Nr. 1, 17 - 26. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00193-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00193-X)
- [76] BROWN, Derek F. J. ; EDWARDS, David I. ; HAWKEY, Peter M. ; HAWKEY ; MORRISON, Donald ; RIDGWAY, Geoffrey L. ; TOWNER, Kevin J. ; WREN, Michael W. D.: Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2005), Nr. 56, 1000–1018. <https://doi.org/10.1093/jac/dki372>
- [77] HOFFMAN, Wayne L. ; RUGGLES, Ann O. ; TABARYA, Daniel: Chicken anti-protein A prevents *Staphylococcus aureus* protein A from binding to human and rabbit IgG in immunoassays and eliminates most false positive results. In: *Journal of Immunological Methods* 198 (1996), Nr. 1, 67 - 77. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00152-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00152-4)
- [78] YAMADA, Keiko ; WANCHUN, Jin ; OHKURA, Teruko ; MURAI, Atsushi ; HAYAKAWA, Reina ; KINOSHITA, Keiji ; MIZUTANI, Makoto ; OKAMOTO, Akira ; NAMIKAWA, Takao ; OHTA, Michio: Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Using a Specific Anti-PBP2a Chicken IgY Antibody. In: *Japanese Journal of Infectious Diseases* 66 (2013), Nr. 2, 103-108. <https://doi.org/10.7883/yoken.66.103>
- [79] WU, Shijia ; DUAN, Nuo ; GU, Huajie ; HAO, Liling ; YE, Hua ; GONG, Wenhui ; WANG, Zhouping: A Review of the Methods for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. In: *Toxins* 8 (2016), Nr. 7, 176–196. <https://doi.org/10.3390/toxins8070176>
- [80] BENNETT, Reginald W.: *Staphylococcal* Enterotoxin and Its Rapid Identification in Foods by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-Based Methodology. In: *Journal of Food Protection* 68 (2005), Nr. 6, 1264-1270. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.6.1264>
- [81] CARROLL, Karen C.: Rapid Diagnostics for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Molecular Diagnosis & Therapy* 12 (2008), Nr. 1, 15–24. <https://doi.org/10.1007/BF03256265>

- [82] HIRVONEN, Jari J.: The use of molecular methods for the detection and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Biomarkers in Medicine* 8 (2014), Nr. 9, 1115-1125. <https://doi.org/10.2217/bmm.14.60>
- [83] LIU, Junyan ; CHEN, Dingqiang ; PETERS, Brian M. ; LI, Lin ; LI, Bing ; XU, Zhenbo ; SHIRLIFF, Mark E.: *Staphylococcal* chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Microbial Pathogenesis* 101 (2016), 56 - 67. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.10.028>
- [84] KALI, Arunava ; STEPHEN, Selvaraj ; UMADEVI, Sivaraman: Laboratory evaluation of phenotypic detection methods of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Bio-medical Journal* 37 (2014), Nr. 6, 411-414. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.132907>
- [85] KRIEGESKORTE, André ; IDELEVICH, Evgeny A. ; SCHLATTMANN, Andreas ; LAYER, Franziska ; STROMMENGER, Birgit ; DENIS, Olivier ; PATERSON, Gavin K. ; HOLMES, Mark A. ; WERNER, Guido ; BECKER, Karsten: Comparison of Different Phenotypic Approaches To Screen and Detect *mecC*-Harboring Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Journal of Clinical Microbiology* 56 (2018), Nr. 1. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00826-17>
- [86] REGNIER, Fred E. ; LAW, John H.: Insect pheromones. In: *Journal of Lipid Research* 9 (1968), Nr. 5, 541-551. <http://www.jlr.org/content/9/5/541.abstract>
- [87] SASAKI, Satoshi ; NAGATA, Ryohei ; HOCK, Bertold ; KARUBE, Isao: Novel surface plasmon resonance sensor chip functionalized with organic silica compounds for antibody attachment. In: *Analytica Chimica Acta* 368 (1998), 71 - 76. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00200-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00200-1)
- [88] RESEARCH AND MARKETS: *Biosensors - A Global Market Overview*. Bericht. <https://www.researchandmarkets.com/reports/4412645/biosensors-a-global-market-overview>. Version: October 2017
- [89] HALL, Elizabeth A. H. ; EDLER, B. (Hrsg.): *Biosensoren*. Springer-Verlag, 1995 <http://dx.doi.org/10.1002/aheh.19960240213>
- [90] DZYADEVYCH, S.V. ; ARKHYPOVA, V.N. ; SOLDATKIN, A.P. ; EL'SKAYA, A.V. ; MARTELET, C. ; JAFFREZIC-RENAULT, N.: Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. In: *IRBM* 29 (2008), Nr. 2, 171 - 180. <https://doi.org/10.1016/j.rbmret.2007.11.007>
- [91] BAHADÍR, Elif B. ; SEZGINTÜRK, Mustafa K.: Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and bioterror/biowarfare analyses. In: *Analytical Biochemistry* 478 (2015), 107 - 120. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.011>
- [92] MEHROTRA, Parikha: Biosensors and their applications - A review. In: *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* 6 (2015), Dezember, Nr. 2, 153-159. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4862100/>

- [93] VELASCO-GARCIA, Maria N. ; MOTTRAM, Toby: Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. In: *Biosystems Engineering* 84 (2003), Nr. 1, 1 - 12. [https://doi.org/10.1016/S1537-5110\(02\)00236-2](https://doi.org/10.1016/S1537-5110(02)00236-2)
- [94] MALHOTRA, Bansi D. ; ALI, Md. A.: Chapter 10 - Conclusions and Future Developments in Biosensors. Version: 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44923-6.00010-8>. In: *Nanomaterials for Biosensors*. William Andrew Publishing, 2018 (Micro and Nano Technologies)
- [95] BARD, Allen J. ; FAULKNER, Larry R.: *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Wiley, 2000. – ISBN 9780471043720
- [96] CLARK, Leland C. ; LYONS, Champ: Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 102 (1962), Nr. 1, 29–45. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>
- [97] BARSOUKOV, Evgenij ; MACDONALD, J. R.: *Impedance Spectroscopy*. Wiley-Blackwell, 2005 <https://doi.org/10.1002/0471716243>
- [98] LAVRICH, David J. ; WETTERER, Sean M. ; BERNASEK, Steven L. ; SCOLES, Giacinto: Physisorption and Chemisorption of Alkanethiols and Alkyl Sulfides on Au(111). In: *The Journal of Physical Chemistry B* 102 (1998), Nr. 18, 3456-3465. <https://doi.org/10.1021/jp980047v>
- [99] SCHREIBER, Frank: Self-assembled monolayers: from simple model systems to bio-functionalized interfaces. In: *Journal of Physics: Condensed Matter* 16 (2004), Nr. 28, R881–R900. <https://doi.org/10.1088%2F0953-8984%2F16%2F28%2FR01>
- [100] VERICAT, C. ; VELA, M. E. ; SALVAREZZA, R. C.: Self-assembled monolayers of alkanethiols on Au(111): surface structures, defects and dynamics. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 7 (2005), Nr. 18, 3258–3268. <https://doi.org/10.1039/B505903H>
- [101] DEBONO, Reno F. ; LOUCKS, Glenn D. ; MANNA, Deborah D. ; KRULL, Ulrich J.: Self-assembly of short and long-chain n-alkyl thiols onto gold surfaces: A real-time study using surface plasmon resonance techniques. In: *Canadian Journal of Chemistry* 74 (1996), Nr. 5, 677-688. <https://doi.org/10.1139/v96-073>
- [102] DE RENZI, Valentina ; DI FELICE, Rosa ; MARCHETTO, Diego ; BIAGI, Roberto ; DEL PENNINO, Umberto ; SELONI, Annabella: Ordered (3 x 4) High-Density Phase of Methylthiolate on Au(111). In: *The Journal of Physical Chemistry B* 108 (2004), Nr. 1, 16-20. <https://doi.org/10.1021/jp0365054>
- [103] BAIN, Colin D. ; TROUGHTON, E. B. ; TAO, Yu T. ; EVALL, Joseph ; WHITESIDES, George M. ; NUZZO, Ralph G.: Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. In: *Journal of the American Chemical Society* 111 (1989), Nr. 1, 321-335. <https://doi.org/10.1021/ja00183a049>

- [104] BOUBOUR, E. ; LENNOX, R. B.: Insulating Properties of Self-Assembled Monolayers Monitored by Impedance Spectroscopy. In: *Langmuir* 16 (2000), Nr. 9, 4222-4228. <https://doi.org/10.1021/la991328c>
- [105] TRIXLER, Frank: Quantum Tunnelling to the Origin and Evolution of Life. In: *Current organic chemistry* 17 (2013), Nr. 16, 1758–1770. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24039543>
- [106] LIU, Biao ; BARD, Allen J. ; MIRKIN, Michael V. ; CREAGER, Stephen E.: Electron Transfer at Self-Assembled Monolayers Measured by Scanning Electrochemical Microscopy. In: *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004), Nr. 5, 1485-1492. <https://doi.org/10.1021/ja038611p>
- [107] XU, Jie ; LI, Hulin ; ZHANG, Yin: Relationship between electronic tunneling coefficient and electrode potential investigated by using self-assembled alkanethiol monolayers on gold electrodes. In: *The Journal of Physical Chemistry* 97 (1993), Nr. 44, 11497-11500. <https://doi.org/10.1021/j100146a025>
- [108] LIU, Yingshuai ; YU, Jie: Oriented immobilization of proteins on solid supports for use in biosensors and biochips: a review. In: *Microchimica Acta* 183 (2016), Nr. 1, 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1623-4>
- [109] RUBAB, Momna ; SHAHBAZ, Hafiz M. ; OLAIMAT, Amin N. ; OH, Deog-Hwan: Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. In: *Biosensors and Bioelectronics* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.01.023>
- [110] TEMPLIER, Vincent ; ROUX, Agnès ; ROUPIOZ, Yoann ; LIVACHE, Thierry: Ligands for label-free detection of whole bacteria on biosensors: A review. In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 79 (2016), 71 - 79. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.015>. – Past , Present and Future challenges of Biosensors and Bioanalytical tools in Analytical Chemistry: a tribute to Prof. Marco Mascini
- [111] AHMED, Asif ; RUSHWORTH, Jo V. ; HIRST, Natalie A. ; MILLNER, Paul A.: Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection. In: *Clinical Microbiology Reviews* 27 (2014), Nr. 3, 631-646. <https://doi.org/10.1128/CMR.00120-13>
- [112] SINGH, Amit ; POSHTIBAN, Somayyeh ; EVOY, Stephane: Recent Advances in Bacteriophage Based Biosensors for Food-Borne Pathogen Detection. In: *Sensors* 13 (2013), 1763–1786. <https://doi.org/10.3390/s130201763>
- [113] YOO, Seung M. ; LEE, Sang Y.: Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms. In: *Trends in Biotechnology* 34 (2016), Nr. 1, 7–25. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.09.012>
- [114] TOKEL, Onur ; YILDIZ, Umit H. ; INCI, Fatih ; DURMUS, Naside G. ; EKIZ, Okan O. ; TURKER, Burak ; CETIN, Can ; RAO, Shruthi ; SRIDHAR, Kaushik ; NATARAJAN, Nalini ; SHAFIEE, Hadi ; DANA, Aykutlu ; DEMIRCI, Utkan: Portable Microfluidic

- Integrated Plasmonic Platform for Pathogen Detection. In: *Scientific Reports* 5 (2015), 9152–9161. <https://doi.org/10.1038/srep09152>
- [115] VERDOODT, Niels ; BASSO, Caroline R. ; ROSSI, Bruna F. ; PEDROSA, Valber A.: Development of a rapid and sensitive immunosensor for the detection of bacteria. In: *Food Chemistry* 221 (2017), 1792 - 1796. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.102>
- [116] WANG, Yuling ; RAVINDRANATH, Sandeep ; IRUDAYARAJ, Joseph: Separation and detection of multiple pathogens in a food matrix by magnetic SERS nanoprobe. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399 (2011), Nr. 3, 1271–1278. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4453-6>
- [117] ALAMER, Saleh ; CHINNAPPAN, Raja ; ZOUROB, Mohammed: Development of Rapid Immuno-based Nanosensors for the Detection of Pathogenic Bacteria in Poultry Processing Plants. In: *Procedia Technology* 27 (2017), 23 - 26. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2017.04.012>
- [118] ABDELHAMID, Hani N. ; WU, Hui-Fen: Selective biosensing of *Staphylococcus aureus* using chitosan quantum dots. In: *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 188 (2018), 50 - 56. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.06.047>
- [119] GHALI, Hala ; CHIBLI, Hicham ; NADEAU, L. J. ; BIANUCCI, Pablo ; PETER, Yves-Alain: Real-Time Detection of *Staphylococcus Aureus* Using Whispering Gallery Mode Optical Microdisks. In: *biosensors* 6 (2016), Nr. 20. <https://doi.org/10.3390/bios6020020>
- [120] SHI, Jingyu ; CHAN, Chunyu ; PANG, Yukting ; YE, Weiwei ; TIAN, Feng ; LYU, Jing ; ZHANG, Yu ; YANG, Mo: A fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensor based on graphene quantum dots (GQDs) and gold nanoparticles (AuNPs) for the detection of *mecA* gene sequence of *Staphylococcus aureus*. In: *Biosensors and Bioelectronics* 67 (2015), 595 - 600. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.059>
- [121] JENISON, Robert ; JAECKEL, Heidi ; KLONOSKI, Joshua ; LATORRA, David ; WIENS, Jacinta: Rapid amplification/detection of nucleic acid targets utilizing a HDA/thin film biosensor. In: *Analyst* 139 (2014), 3763-3769. <https://doi.org/10.1039/C4AN00418C>
- [122] BYEON, Haeng M. ; VODYANOY, Vitaly J. ; OH, Jun-Hyun ; KWON, Joong-Ho ; PARK, Mi-Kyung: Lytic Phage-Based Magnetoelastic Biosensors for On-site Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* on Spinach Leaves. In: *Journal of The Electrochemical Society* 162 (2015), Nr. 8, B230-B235. <https://doi.org/10.1149/2.0681508jes>
- [123] MAJUMDAR, Tania ; CHAKRABORTY, Runu ; RAYCHAUDHURI, Utpal: Development of PEI-GA modified antibody based sensor for the detection of *S. aureus* in food samples.

- In: *Food Bioscience* 4 (2013), 38 - 45. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.08.002>
- [124] ÁVILA, Berta Esteban-Fernández de ; PEDRERO, María ; CAMPUZANO, Susana ; ESCAMILLA-GÓMEZ, Vanessa ; PINGARRÓN, José M.: Sensitive and rapid amperometric magnetoimmunosensor for the determination of *Staphylococcus aureus*. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (2012), Nr. 4, 917–925. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5738-8>
- [125] WATANABE, Kazuya ; KUWATA, Noriaki ; SAKAMOTO, Hiroaki ; AMANO, Yoshihisa ; SATOMURA, Takenori ; SUYE, Shin ichiro: A smart DNA sensing system for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using modified nanoparticle probes. In: *Biosensors and Bioelectronics* 67 (2015), 419 - 423. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.075>
- [126] XU, Li ; LIANG, Wen ; WEN, Yanli ; WANG, Lele ; YANG, Xue ; REN, Shuzhen ; JIA, Nengqin ; ZUO, Xiaolei ; LIU, Gang: An ultrasensitive electrochemical biosensor for the detection of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Biosensors and Bioelectronics* 99 (2018), 424 - 430. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.014>
- [127] PURWIDYANTRI, Agnes ; CHEN, Ching-Hsiang ; HWANG, Bing-Joe ; LUO, Ji-Dung ; CHIOU, Chiu-Chian ; TIAN, Ya-Chung ; LIN, Chan-Yu ; CHENG, Chi-Hui ; LAI, Chao-Sung: Spin-coated Au-nanohole arrays engineered by nanosphere lithography for a *Staphylococcus aureus* 16S rRNA electrochemical sensor. In: *Biosensors and Bioelectronics* 77 (2016), 1086 - 1094. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.094>
- [128] CHEN, Juhong ; JIANG, Ziwen ; ACKERMAN, Jonathan D. ; YAZDANI, Mahdieh ; HOU, Singyuk ; NUGEN, Sam R. ; ROTELLO, Vincent M.: Electrochemical nanoparticle-enzyme sensors for screening bacterial contamination in drinking water. In: *Analyst* 140 (2015), 4991-4996. <https://doi.org/10.1039/C5AN00637F>
- [129] BHARDWAJ, Neha ; BHARDWAJ, Sanjeev K. ; MEHTA, Jyotsana ; KIM, Ki-Hyun ; DEEP, Akash: MOF-Bacteriophage Biosensor for Highly Sensitive and Specific Detection of *Staphylococcus aureus*. In: *ACS Applied Materials & Interfaces* 9 (2017), Nr. 39, 33589-33598. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b07818>
- [130] O'FLAHERTY, S. ; ROSS, R. P. ; MEANEY, W. ; FITZGERALD, G. F. ; ELBREKI, M. F. ; COFFEY, A.: Potential of the Polyvalent Anti-*Staphylococcus* Bacteriophage K for Control of Antibiotic-Resistant *Staphylococci* from Hospitals. In: *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2005), Nr. 4, 1836-1842. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1836-1842.2005>
- [131] FILATOVA, Lyubov Y. ; BECKER, Stephen C. ; DONOVAN, David M. ; GLADILIN, Alexander K. ; KLYACHKO, Natalia L.: LysK, the enzyme lysing *Staphylococcus aureus*

- cells: Specific kinetic features and approaches towards stabilization. In: *Biochimie* 92 (2010), Nr. 5, 507 - 513. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.01.026>
- [132] CHIBLI, Hicham ; GHALI, Hala ; PARK, Soonhyang ; PETER, Yves-Alain ; NADEAU, Jay L.: Immobilized phage proteins for specific detection of *staphylococci*. In: *Analyst* 139 (2014), 179-186. <https://doi.org/10.1039/C3AN01608K>
- [133] SIN, Mandy L. ; MACH, Kathleen E. ; WONG, Pak K. ; LIAO, Joseph C.: Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. In: *Expert Review of Molecular Diagnostics* 14 (2014), Nr. 2, 225-244. <https://doi.org/10.1586/14737159.2014.888313>
- [134] KARUNAKARAN, Chandran ; RAJKUMAR, Raju ; BHARGAVA, Kalpana: Chapter 1 - Introduction to Biosensors. Version: 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>. In: *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 2015
- [135] BERGMAIR, Bernhard ; HUBER, Thomas ; BRUCKNER, Florian ; VOGLER, Christoph ; SUESS, Dieter: Removal of earth's magnetic field effect on magnetoelastic resonance sensors by an antisymmetric bias field. In: *Sensors and Actuators A: Physical* 183 (2012), 11 - 15. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2012.05.013>
- [136] DUFFY, G. F. ; MOORE, E. J.: Electrochemical Immunosensors for Food Analysis: A Review of Recent Developments. In: *Analytical Letters* 50 (2017), Nr. 1, 1-32. <https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1167900>
- [137] KASSEM, Issmat I. ; ESSEILI, Malak A. ; SIGLER, Von: Occurrence of *mecA* in Non-*staphylococcal* Pathogens in Surface Waters. In: *Journal of Clinical Microbiology* 46 (2008), Nr. 11, 3868-3869. <https://doi.org/10.1128/JCM.01035-08>
- [138] WANG, Joseph: *Analytical Electrochemistry*. 3rd. Wiley, 2006. – ISBN 9780471790297
- [139] HOJA, Jerzy ; LENTKA, Grzegorz: A Family of New Generation Miniaturized Impedance Analyzers for Technical Object Diagnostics. In: *Metrology and Measurement Systems* 20 (2013), Nr. 1. <https://doi.org/10.2478/mms-2013-0004>
- [140] STREHLITZ, Beate ; NIKOLAUS, Nadia ; STOLTENBURG, Regina: Protein Detection with Aptamer Biosensors. In: *Sensors* 8 (2008), Nr. 7, S. 4296–4307. – ISSN 1424–8220
- [141] STOLTENBURG, Regina ; REINEMANN, Christine ; STREHLITZ, Beate: SELEX - A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. In: *Biomolecular Engineering* 24 (2007), Nr. 4, 381 - 403. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.06.001>
- [142] TANG, Zhiwen ; SHANGGUAN, Dihua ; WANG, Kemin ; SHI, Hui ; SEFAH, Kwame ; MALLIKRATCHY, Prabodhika ; CHEN, Hui W. ; LI, Ying ; TAN, Weihong: Selection of Aptamers for Molecular Recognition and Characterization of Cancer Cells. In: *Analytical Chemistry* 79 (2007), Nr. 13, 4900-4907. <https://doi.org/10.1021/ac070189y>

- [143] NITSCHKE, Andreas ; KURTH, Andreas ; DUNKHORST, Anna ; PÄNKE, Oliver ; SIELAFF, Hendrik ; JUNGE, Wolfgang ; MUTH, Doreen ; SCHELLER, Frieder ; STÖCKLEIN, Walter ; DAHMEN, Claudia ; PAULI, Georg ; KAGE, Andreas: One-step selection of Vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX. In: *BMC Biotechnology* 7 (2007), Nr. 1, 48. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-48>
- [144] DENG, Bin ; LIN, Yanwen ; WANG, Chuan ; LI, Feng ; WANG, Zhixin ; ZHANG, Hongquan ; LI, Xing-Fang ; LE, X. C.: Aptamer binding assays for proteins: The thrombin example - A review. In: *Analytica Chimica Acta* 837 (2014), 1 - 15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.055>
- [145] YLERA, Francisco ; LURZ, Rudi ; ERDMANN, Volker A. ; FÜRSTE, Jens P.: Selection of RNA Aptamers to the Alzheimer's Disease Amyloid Peptide. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290 (2002), Nr. 5, 1583 - 1588. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6354>
- [146] VIANINI, Elena ; PALUMBO, Manlio ; GATTO, Barbara: In vitro selection of DNA aptamers that bind L-tyrosinamide. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9 (2001), Nr. 10, 2543 - 2548. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00054-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00054-2)
- [147] KAWAKAMI, Junji ; IMANAKA, Hirofumi ; YOKOTA, Yukie ; SUGIMOTO, Naoki: In vitro selection of aptamers that act with Zn²⁺. In: *Journal of Inorganic Biochemistry* 82 (2000), Nr. 1, 197 - 206. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(00\)00158-6](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(00)00158-6)
- [148] TUERK, C. ; GOLD, L.: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. In: *Science* 249 (1990), Nr. 4968, S. 505–10. – ISSN 0036–8075
- [149] GOLD, Larry: SELEX: How It Happened and Where It will Go. In: *Journal of Molecular Evolution* 81 (2015), Nr. 5, 140–143. <https://doi.org/10.1007/s00239-015-9705-9>
- [150] STOLTENBURG, R. ; REINEMANN, C. ; STREHLITZ, B.: FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 383 (2005), Nr. 1, 83-91. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3388-9>
- [151] DARMOSTUK, Mariia ; RIMPELOVA, Silvie ; GBELCOVA, Helena ; RUMIL, Tomas: Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. In: *Biotechnology Advances* 33 (2015), Nr. 6, Part 2, 1141 - 1161. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.008>
- [152] ZHUO, Zhenjian ; YU, Yuanyuan ; WANG, Maolin ; LI, Jie ; ZHANG, Zongkang ; LIU, Jin ; WU, Xiaohao ; LU, Aiping ; ZHANG, Ge ; ZHANG, Baoting: Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. In: *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2017), Nr. 10, 2142–2161. <https://doi.org/10.3390/ijms18102142>

- [153] REVERDATTO, Sergey ; BURZ, David S. ; SHEKHTMAN, Alexander: Peptide Aptamers: Development and Applications. In: *Current Topics in Medicinal Chemistry* 15 (2015), Nr. 12, 1082–1101. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150413153143>
- [154] WITTUNG, Pernilla ; NIELSEN, Peter E. ; BUCHARDT, Ole ; EGHOLM, Michael ; NORDÉN, Bengt: DNA-like double helix formed by peptide nucleic acid. In: *Nature* 368 (1994), 561–563. <http://dx.doi.org/10.1038/368561a0>
- [155] LEE, Eun J. ; LIM, Hyun K. ; CHO, Yea S. ; HAH, Sang S.: Peptide nucleic acids are an additional class of aptamers. In: *RSC Advances* 3 (2013), 5828–5831. <http://dx.doi.org/10.1039/C3RA40553B>
- [156] MASCINI, Marco ; PALCHETTI, Ilaria ; TOMBELLI, Sara: Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Fundamentals and Bioanalytical Aspects. In: *Angewandte Chemie International Edition* 51 (2012), 2, Nr. 6, 1316–1332. <http://doi.org/10.1002/anie.201006630>
- [157] SONG, Kyung-Mi ; LEE, Seonghwan ; BAN, Changill: Aptamers and Their Biological Applications. In: *Sensors* 12 (2012), 612–631. <https://doi.org/10.3390/s120100612>
- [158] BRODY, Edward N. ; GOLD, Larry: Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. In: *Reviews in Molecular Biotechnology* 74 (2000), Nr. 1, 5 - 13. [https://doi.org/10.1016/S1389-0352\(99\)00004-5](https://doi.org/10.1016/S1389-0352(99)00004-5)
- [159] STEIN, Cy A. ; CASTANOTTO, Daniela: FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. In: *Molecular Therapy* 25 (2017), Nr. 5, 1069 - 1075. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.023>
- [160] TRAUSCH, Jeremiah J. ; SHANK-RETZLAFF, Mary ; VERCH, Thorsten: Replacing antibodies with modified DNA aptamers in vaccine potency assays. In: *Vaccine* 35 (2017), Nr. 41, 5495 - 5502. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.04.003>
- [161] CHEN, Ke ; LIU, Bo ; YU, Bo ; ZHONG, Wen ; LU, Yi ; ZHANG, Jiani ; LIAO, Jie ; LIU, Jun ; PU, Ying ; QIU, Liping ; ZHANG, Liqin ; LIU, Huixia ; TAN, Weihong: Advances in the development of aptamer drug conjugates for targeted drug delivery. In: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 9 (2017), Nr. 3, e1438. <https://doi.org/10.1002/wnan.1438>
- [162] WANG, Andrew Z. ; FAROKHZAD, Omid C.: Current Progress of Aptamer-Based Molecular Imaging. In: *Journal of Nuclear Medicine* 55 (2014), Nr. 3, 353–356. <https://doi.org/10.2967/jnumed.113.126144>
- [163] WATSON, J. D. ; CRICK, F. H. C.: The structure of DNA. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 18 (1953), 123–131. <https://doi.org/10.1101/SQB.1953.018.01.020>

- [164] SESSLER, Jonathan L. ; LAWRENCE, Candace M. ; JAYAWICKRAMARAJAH, Janarthanan: Molecular recognition via base-pairing. In: *Chemical Society Reviews* 36 (2007), 314-325. <http://dx.doi.org/10.1039/B604119C>
- [165] TAKEZAWA, Yusuke ; SHIONOYA, Mitsuhiro: Metal-Mediated DNA Base Pairing: Alternatives to Hydrogen-Bonded Watson-Crick Base Pairs. In: *Accounts of Chemical Research* 45 (2012), Nr. 12, 2066-2076. <https://doi.org/10.1021/ar200313h>
- [166] BLYTHE, Amanda J. ; FOX, Archa H. ; BOND, Charles S.: The ins and outs of lncRNA structure: How, why and what comes next? In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1859 (2016), Nr. 1, 46 - 58. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.08.009>
- [167] SANTA LUCIA, John ; HICKS, Donald: The Thermodynamics of DNA Structural Motifs. In: *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 33 (2004), Nr. 1, 415-440. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141800>
- [168] ZUKER, Michael ; STIEGLER, Patrick: Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. In: *Nucleic Acids Research* 9 (1981), Nr. 1, S. 133-148
- [169] MARKHAM, Nicholas R. ; ZUKER, Michael: UNAFold. Version: 2008. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-429-6_1. In: KEITH, Jonathan M. (Hrsg.): *Bioinformatics, Volume II: Structure, Function and Applications* Bd. 453. Humana Press, 2008, 3-31
- [170] ZUKER, Michael: Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. In: *Nucleic Acids Research* 31 (2003), Nr. 13, 3406-3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>
- [171] PEYRET, N.: *Prediction of Nucleic Acid Hybridization: Parameters and Algorithms*, Wayne State University, Dissertation, 2000
- [172] GONG, Sha ; WANG, Yanli ; WANG, Zhen ; ZHANG, Wenbing: Computational Methods for Modeling Aptamers and Designing Riboswitches. In: *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2017), 11, 2442. <https://doi.org/10.3390/ijms18112442>
- [173] JEDDI, Iman ; SAIZ, Leonor: Three-dimensional modeling of single stranded DNA hairpins for aptamer-based biosensors. In: *Scientific Reports* 7 (2017), Nr. 1, 1178. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01348-5>
- [174] GELLERT, Martin ; LIPSETT, Marie N. ; DAVIES, David R.: Helix formation by guanylic acid. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 48 (1962), Nr. 12, S. 2013-2018. – PMID: 13947099
- [175] DAVIS, Jeffery T.: G-Quartets 40 Years Later: From 5'-GMP to Molecular Biology and Supramolecular Chemistry. In: *Angewandte Chemie International Edition* 43 (2004), Nr. 6, 668-698. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200300589>

- [176] YAKU, Hidenobu ; FUJIMOTO, Takeshi ; MURASHIMA, Takashi ; MIYOSHI, Daisuke ; SUGIMOTO, Naoki: Phthalocyanines: a new class of G-quadruplex-ligands with many potential applications. In: *Chem. Commun.* 48 (2012), 6203-6216. <http://dx.doi.org/10.1039/C2CC31037F>
- [177] HENDERSON, Eric ; HARDIN, Charles C. ; WALK, Steven K. ; TINOCO, Ignacio ; BLACKBURN, Elizabeth H.: Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs. In: *Cell* 51 (1987), Nr. 6, 899 - 908. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90577-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90577-0)
- [178] HÄNSEL-HERTSCH, Robert ; DI ANTONIO, Marco ; BALASUBRAMANIAN, Shankar: DNA G-quadruplexes in the human genome: detection, functions and therapeutic potential. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (2017), 279-284. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.3>
- [179] PARKINSON, Gary N. ; LEE, Michael P. H. ; NEIDLE, Stephen: Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. In: *Nature* 417 (2002), 876-880. <http://dx.doi.org/10.1038/nature755>
- [180] HORVATH, Martin P. ; SCHULTZ, Steve C.: DNA G-quartets in a 1.86 Å resolution structure of an *Oxytricha nova* telomeric protein-DNA complex. In: *Journal of Molecular Biology* 310 (2001), Nr. 2, 367 - 377. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4766>
- [181] KIKIN, Oleg ; D'ANTONIO, Lawrence ; BAGGA, Paramjeet S.: QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. In: *Nucleic Acids Research* 34 (2006), W676-W682. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl253>
- [182] LARGY, Eric ; MERGNY, Jean-Louis ; GABELICA, Valérie: Role of Alkali Metal Ions in G-Quadruplex Nucleic Acid Structure and Stability. Version: 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-21756-7_7. In: *Metal Ions in Life Sciences* Bd. 16. 2016, 203-258
- [183] GELINAS, Amy D. ; DAVIES, Douglas R. ; JANJIC, Nebojsa: Embracing proteins: structural themes in aptamer-protein complexes. In: *Current Opinion in Structural Biology* 36 (2016), 122 - 132. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.01.009>
- [184] LUSCOMBE, Nicholas M. ; LASKOWSKI, Roman A. ; THORNTON, Janet M.: Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. In: *Nucleic Acids Research* 29 (2001), Nr. 13, S. 2860-2874
- [185] PADMANABHAN, K. ; TULINSKY, A.: An Ambiguous Structure of a DNA 15-mer Thrombin Complex. In: *Acta Crystallographica Section D* 52 (1996), Mar, Nr. 2, 272-282. <https://doi.org/10.1107/S0907444995013977>
- [186] LONG, Stephen B. ; LONG, Meredith B. ; WHITE, Rebekah R. ; SULLENGER, Bruce A.: Crystal structure of an RNA aptamer bound to thrombin. In: *RNA* 14 (2008), 2504-2512. <https://doi.org/10.1261/rna.1239308>

- [187] HONG, Ka L. ; SOOTER, Letha J.: Single-Stranded DNA Aptamers against Pathogens and Toxins: Identification and Biosensing Applications. In: *BioMed Research International* (2015). <http://dx.doi.org/10.1155/2015/419318>
- [188] GUO, Ke-Tai ; PAUL, Angela ; SCHICHOR, Christian ; ZIEMER, Gerhard ; WENDEL, Hans P.: CELL-SELEX: Novel Perspectives of Aptamer-Based Therapeutics. In: *International Journal of Molecular Sciences* 9 (2008), 668–678. <https://doi.org/10.3390/ijms9040668>
- [189] CAO, Xiaoxiao ; LI, Shaohua ; CHEN, Liucun ; DING, Hongmei ; XU, Hua ; HUANG, Yanping ; LI, Jie ; LIU, Nongle ; CAO, Weihong ; ZHU, Yanjun ; SHEN, Beifen ; SHAO, Ningsheng: Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of *Staphylococcus aureus*. In: *Nucleic Acids Research* 37 (2009), Nr. 14, 4621-4628. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp489>
- [190] CHANG, Yi-Chung ; YANG, Chia-Ying ; SUN, Ruei-Lin ; CHENG, Yi-Feng ; KAO, Wei-Chen ; YANG, Pan-Chyr: Rapid single cell detection of *Staphylococcus aureus* by aptamer-conjugated gold nanoparticles. In: *Scientific Reports* 3 (2013), Nr. 1863. <http://dx.doi.org/10.1038/srep01863>
- [191] TUREK, Diane ; VAN SIMAEYS, Dimitri ; JOHNSON, Judith ; OC SOY, Ismail ; TAN, Weihong: Molecular recognition of live methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cells using DNA aptamers. In: *World Journal of Translational Medicine* 2 (2013), Nr. 3, 67–74. <https://doi.org/10.5528/wjtm.v2.i3.67>
- [192] MOON, Jihea ; KIM, Giyoung ; PARK, Saet B. ; LIM, Jongguk ; MO, Changyeun: Comparison of Whole-Cell SELEX Methods for the Identification of *Staphylococcus Aureus*-Specific DNA Aptamers. In: *Sensors* 15 (2015), Nr. 4, 8884–8897. <https://doi.org/10.3390/s150408884>
- [193] RAMLAL, Shylaja ; MONDAL, Bhairab ; LAVU, Padma S. ; BHAVANASHRI, N. ; KINGSTON, Joseph: Capture and detection of *Staphylococcus aureus* with dual labeled aptamers to cell surface components. In: *International Journal of Food Microbiology* 265 (2018), 74 - 83. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.002>
- [194] LYU, Yifan ; CHEN, Guang ; SHANGGUAN, Dihua ; ZHANG, Liqin ; WAN, Shuo ; WU, Yuan ; ZHANG, Hui ; DUAN, Lian ; LIU, Chao ; YOU, Mingxu ; WANG, Jie ; TAN, Weihong: Generating Cell Targeting Aptamers for Nanotheranostics Using Cell-SELEX. In: *Theranostics* 6 (2016), Nr. 9, 1440–1452. <https://doi.org/10.7150/thno.15666>
- [195] MAENG, Jin-Soo ; KIM, Namsoo ; KIM, Chong-Tai ; RYUL HAN, Seung ; LEE, Young J. ; LEE, Seong-Wook ; LEE, Myung-Hyun ; CHO, Yong-Jin: Rapid Detection of Food Pathogens Using RNA Aptamers-Immobilized Slide. In: *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 12 (2012), 5138-5142. <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.6369>

- [196] FRIEDMAN, Adam D. ; KIM, Dongwook ; LIU, Rihe: Highly Stable Aptamers Selected from a 2'-Fully Modified fGmH RNA Library for Targeting Biomaterials. In: *Biomaterials* 36 (2015), 110–123. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.08.046>
- [197] BAUMSTUMMLER, A. ; LEHMANN, D. ; JANJIC, N. ; OCHSNER, U. A.: Specific capture and detection of *Staphylococcus aureus* with high-affinity modified aptamers to cell surface components. In: *Letters in Applied Microbiology* 59 (2014), Nr. 4, 422-431. <https://doi.org/10.1111/lam.12295>
- [198] STOLTENBURG, Regina ; SCHUBERT, Thomas ; STREHLITZ, Beate: *In vitro* Selection and Interaction Studies of a DNA Aptamer Targeting Protein A. In: *PLOS ONE* 10 (2015), Nr. 7, 1-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134403>
- [199] KASTRITIS, Panagiotis L. ; BONVIN, Alexandre M.: On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact. In: *Journal of the royal society Interface* 10 (2013). <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2012.0835>
- [200] JING, Meng ; BOWSER, Michael T.: Methods for measuring aptamer-protein equilibria: A review. In: *Analytica Chimica Acta* 686 (2011), Nr. 1, 9 - 18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.10.032>
- [201] VUIGNIER, Karine ; SCHAPPLER, Julie ; VEUTHEY, Jean-Luc ; CARRUPT, Pierre-Alain ; MARTEL, Sophie: Drug-protein binding: a critical review of analytical tools. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010), Nr. 1, 53–66. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3737-1>
- [202] HIANIK, Tibor ; OSTATNÁ, Veronika ; SONLAJTNEROVA, Michaela ; GRMAN, Igor: Influence of ionic strength, pH and aptamer configuration for binding affinity to thrombin. In: *Bioelectrochemistry* 70 (2007), Nr. 1, 127 - 133. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2006.03.012>
- [203] STOLTENBURG, Regina ; KRAFČÍKOVÁ, Petra ; VÍGLASKÝ, Viktor ; STREHLITZ, Beate: G-quadruplex aptamer targeting Protein A and its capability to detect *Staphylococcus aureus* demonstrated by ELONA. In: *Scientific Reports* 6 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep33812>
- [204] WALTER, J.-G. ; STAHL, F.: Aptamere in der Biosensorik. In: *Chemie Ingenieur Technik* 80 (2008), Nr. 6, 771-781. <https://doi.org/10.1002/cite.200800053>
- [205] SONG, Shiping ; WANG, Lihua ; LI, Jiang ; FAN, Chunhai ; ZHAO, Jianlong: Aptamer-based biosensors. In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27 (2008), Nr. 2, 108 - 117. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.12.004>
- [206] PFEIFFER, Franziska ; MAYER, Günter: Selection and Biosensor Application of Aptamers for Small Molecules. In: *Frontiers in Chemistry* 4 (2016), 25. <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00025>

- [207] LÖNNE, Maren ; ZHU, Guohong ; STAHL, Frank ; WALTER, Johanna-Gabriela: Aptamer-Modified Nanoparticles as Biosensors. Version: 2013. https://doi.org/10.1007/10_2013_231. In: GU, Man B. (Hrsg.) ; KIM, Hak-Sung (Hrsg.): *Biosensors Based on Aptamers and Enzymes* Bd. 140. Springer Berlin Heidelberg, 2013
- [208] KIM, Yeon S. ; RASTON, Nurul Hanun A. ; GU, Man B.: Aptamer-based nanobiosensors. In: *Biosensors and Bioelectronics* 76 (2016), 2 - 19. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.040>
- [209] XU, Yuanhong ; YANG, Xiurong ; WANG, Erkang: Review: Aptamers in microfluidic chips. In: *Analytica Chimica Acta* 683 (2010), Nr. 1, 12 - 20. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.10.007>
- [210] GOPINATH, Subash C. ; LAKSHMIPRIYA, Thangavel ; CHEN, Yeng ; PHANG, Wai-Mei ; HASHIM, Uda: Aptamer-based "point-of-care testing". In: *Biotechnology Advances* 34 (2016), Nr. 3, 198 - 208. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.02.003>
- [211] CHENG, Alan K. ; SEN, Dipankar ; YU, Hua-Zhong: Design and testing of aptamer-based electrochemical biosensors for proteins and small molecules. In: *Bioelectrochemistry* 77 (2009), Nr. 1, 1 - 12. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.04.007>
- [212] JARCZEWSKA, Marta ; GORSKI, Lukasz ; MALINOWSKA, Elżbieta: Electrochemical aptamer-based biosensors as potential tools for clinical diagnostics. In: *Analytical Methods* 8 (2016), 3861-3877. <https://doi.org/10.1039/c6ay00499g>
- [213] MISHRA, Geetesh ; SHARMA, Vinay ; MISHRA, Rupesh: Electrochemical Aptasensors for Food and Environmental Safeguarding: A Review. In: *Biosensors* 8(2) (2018). <https://doi.org/10.3390/bios8020028>
- [214] SHAHDORDIZADEH, Mahin ; TAGHDISI, Seyed M. ; ANSARI, Najmeh ; LANGROODI, Fatemeh A. ; ABNOUS, Khalil ; RAMEZANI, Mohammad: Aptamer based biosensors for detection of *Staphylococcus aureus*. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 241 (2017), 619 - 635. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.10.088>
- [215] ZUO, Peng ; LI, Xiujun ; DOMINGUEZ, Delfina ; YE, Bang-Ce: A PDMS/paper/glass hybrid microfluidic biochip integrated with aptamer-functionalized graphene oxide nano-biosensors for one-step multiplexed pathogen detection. In: *Lab Chip* 13(19) (2013), 3921-3928. <https://doi.org/10.1039/c3lc50654a>
- [216] SHANGGUAN, Jingfang ; LI, Yuhong ; HE, Dinggeng ; HE, Xiaoxiao ; WANG, Kemin ; ZOU, Zhen ; SHI, Hui: A combination of positive dielectrophoresis driven on-line enrichment and aptamer-fluorescent silica nanoparticle label for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus*. In: *The Analyst* 140(13) (2015). <https://doi.org/10.1039/c5an00535c>
- [217] ZHANG, Hui ; MA, Xiaoyuan ; LIU, Ying ; DUAN, Nuo ; WU, Shijia ; WANG, Zhouping ; XU, Baocai: Gold nanoparticles enhanced SERS aptasensor for the simultaneous

- detection of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. In: *Biosensors and Bioelectronics* 74 (2015), 872 - 877. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.033>
- [218] BORSA, Baris A. ; TUNA, Bilge G. ; HERNANDEZ, Frank J. ; HERNANDEZ, Luiza I. ; BAYRAMOGLU, Gulay ; ARICA, M. Y. ; OZALP, V. C.: *Staphylococcus aureus* detection in blood samples by silica nanoparticle-oligonucleotides conjugates. In: *Biosensors and Bioelectronics* 86 (2016), 27 - 32. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.023>
- [219] RAHMAN, Md Ramim T. ; LOU, Zaixiang ; WANG, Hongxin ; AI, Lianzhong: Aptamer Immobilized Magnetoelastic Sensor for the Determination of *Staphylococcus aureus*. In: *Analytical Letters* 48 (2015), Nr. 15, 2414-2422. <https://doi.org/10.1080/00032719.2015.1036278>
- [220] HERNÁNDEZ, Rafael ; VALLÉS, Cristina ; BENITO, Ana M. ; MASER, Wolfgang K. ; RIUS, F. X. ; RIU, Jordi: Graphene-based potentiometric biosensor for the immediate detection of living bacteria. In: *Biosensors and Bioelectronics* 54 (2014), 553 - 557. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.11.053>
- [221] NEUMANN, Elsa: Ueber die Polarisationscapacität umkehrbarer Elektroden. In: *Annalen der Physik* 303 (1899), Nr. 3, 500–534. <http://dx.doi.org/10.1002/andp.18993030303>
- [222] SCHILLER, Karl A.: *Optimierung der dynamischen Transferfunktionsanalyse für die Impedanzspektroskopie und die intensitätsmodulierte Photospektroskopie zur Anwendung an instationären und verteilten elektrochemischen Systemen*, Technische Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg, Dissertation, 2012
- [223] CHENG, Ka Y. ; KARTHIKEYAN, Rengasamy ; WONG, Jonathan W.: Chapter 4.2 - Microbial Electrochemical Remediation of Organic Contaminants: Possibilities and Perspective. Version: 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64052-9.00025-X>. In: MOHAN, S. V. (Hrsg.) ; VARJANI, Sunita (Hrsg.) ; PANDEY, Ashok (Hrsg.): *Microbial Electrochemical Technology*. Elsevier, 2019 (Biomass, Biofuels and Biochemicals), 613 - 640
- [224] WANG, Ping ; JIA, Hongfei: Chapter 20 - Power-Generation from Biorenewable Resources: Biocatalysis in Biofuel Cells. Version: 2007. <https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50021-9>. In: YANG, Shang-Tian (Hrsg.): *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. Elsevier, 2007, 507 - 525
- [225] OYAMA, Noboru ; OHSAKA, Takeo ; YAMAMOTO, Nobushige ; MATSUI, Junichiro ; HATOZAKI, Osamu: Determination of the heterogeneous electron-transfer rate constants for the redox couples $\text{Mo}(\text{CN})_8^{4-/3-}$, $\text{W}(\text{CN})_8^{4-/3-}$, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$, $\text{Os}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ and $\text{IrCl}_6^{3-/2-}$ using fast sweep cyclic voltammetry at carbon fibre electrodes. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 265 (1989), Nr. 1, 297 - 304. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(89\)80198-6](https://doi.org/10.1016/0022-0728(89)80198-6)

- [226] WARBURG, E.: Über das Verhalten sogenannter unpolarisierbarer Elektroden gegen Wechselstrom. In: *Annalen der Physik* 303 (1899), Nr. 3, 493–499. <http://dx.doi.org/10.1002/andp.18993030302>
- [227] RANDLES, J. E. B.: Kinetics of rapid electrode reactions. In: *Discuss. Faraday Soc.* 1 (1947), 11-19. <http://dx.doi.org/10.1039/DF9470100011>
- [228] SARKISSIAN, E.: *The Levenberg-Marquardt Algorithm for Solving the Nonlinear Least Squares Problem: Theory, Implementation and Application*. California State University, Los Angeles, 2001
- [229] DELLIS, J-L. ; CARPENTIER, J-L.: Nelder and Mead algorithm in impedance spectra fitting. In: *Solid State Ionics* 62 (1993), Nr. 1, 119 - 123. [https://doi.org/10.1016/0167-2738\(93\)90259-6](https://doi.org/10.1016/0167-2738(93)90259-6)
- [230] SOCHER, S. ; JEHL, C. ; POTTHOFF, U.: Improving the Functional Safety of Automotive Batteries Using in-situ Impedance Spectroscopy. In: *Transportation Research Procedia* 14 (2016), 3661 - 3666. <https://doi.org/10.1016/j.trpro.2016.05.437>
- [231] DANG, D. N. ; PERAUDEAU, B. ; COHENDOZ, S. ; MALLARINO, S. ; FEAUGAS, X. ; TOUZAIN, S.: Effect of mechanical stresses on epoxy coating ageing approached by Electrochemical Impedance Spectroscopy measurements. In: *Electrochimica Acta* 124 (2014), 80 - 89. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.08.111>
- [232] KUANG, F. ; JINNA, J. ; ZOU, C. ; SHI, T. ; WANG, Y. ; ZHANG, S. ; XU, H.: Electrochemical methods for corrosion monitoring: A survey of recent patents. In: *Corros. Sci.* 2 (2010), S. 35–39
- [233] PERINI, N. ; PRADO, A.R. ; SAD, C.M.S. ; CASTRO, E.V.R. ; FREITAS, M.B.J.G.: Electrochemical impedance spectroscopy for in situ petroleum analysis and water-in-oil emulsion characterization. In: *Fuel* 91 (2012), Nr. 1, 224 - 228. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.06.057>
- [234] GROSSI, M. ; LAZZARINI, R. ; LANZONI, M. ; RICCÒ, B.: A novel technique to control ice cream freezing by electrical characteristics analysis. In: *Journal of Food Engineering* 106 (2011), Nr. 4, 347 - 354. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.035>
- [235] GUERMAZI, M. ; KANOUN, O. ; DERBEL, N.: Investigation of Long Time Beef and Veal Meat Behavior by Bioimpedance Spectroscopy for Meat Monitoring. In: *IEEE Sensors Journal* 14 (2014), Nr. 10, 3624-3630. <http://dx.doi.org/10.1109/JSEN.2014.2328858>
- [236] GROSSI, M. ; LECCE, G. D. ; TOSCHI, T. G. ; RICCÒ, B.: Fast and Accurate Determination of Olive Oil Acidity by Electrochemical Impedance Spectroscopy. In: *IEEE Sensors Journal* 14 (2014), Nr. 9, 2947-2954. <http://dx.doi.org/10.1109/JSEN.2014.2321323>

- [237] TENGVALL, Marja ; RD, Lars E. ; MALMROS, Vibeke ; BOSAEUS, Niklas ; LISSNER, Lauren ; BOSAEUS, Ingvar: Body composition in the elderly: Reference values and bioelectrical impedance spectroscopy to predict total body skeletal muscle mass. In: *Clinical Nutrition* 28 (2009), Nr. 1, 52 - 58. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2008.10.005>
- [238] HAERI, Zahra ; SHOKOUFI, Majid ; JENAB, M. ; JANZEN, R. ; GOLNARAGHI, F.: Electrical impedance spectroscopy for breast cancer diagnosis: Clinical study. In: *Integrative Cancer Science and Therapeutics* 3 (2016). <https://doi.org/10.15761/ICST.1000212>
- [239] SVENSSON, Brenda J. ; DYLKE, Elizabeth S. ; WARD, Leigh C. ; KILBREATH, Sharon L.: Electrode Equivalence for Use in Bioimpedance Spectroscopy Assessment of Lymphedema. In: *Lymphatic Research and Biology* 0 (2018), Nr. 0. <https://doi.org/10.1089/lrb.2018.0002>
- [240] BAHADÍR, Elif B. ; SEZGINTÜRK, Mustafa K.: A review on impedimetric biosensors. In: *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 44 (2016), Nr. 1, 248-262. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.942456>
- [241] WANG, Yixian ; YE, Zunzhong ; YING, Yibin: New Trends in Impedimetric Biosensors for the Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria. In: *Sensors* 12 (2012), Nr. 3, 3449–3471. <https://doi.org/10.3390/s120303449>
- [242] LIU, Xiaobo ; MARRAKCHI, Mouna ; XU, Dawei ; DONG, He ; ANDREESCU, Silvana: Biosensors based on modularly designed synthetic peptides for recognition, detection and live/dead differentiation of pathogenic bacteria. In: *Biosensors and Bioelectronics* 80 (2016), 9 - 16. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.041>
- [243] TAN, Fei ; LEUNG, Polly H. ; LIU, Zong bin ; ZHANG, Yu ; XIAO, Lidan ; YE, Weiwei ; ZHANG, Xin ; YI, Li ; YANG, Mo: A PDMS microfluidic impedance immunosensor for *E. coli O157:H7* and *Staphylococcus aureus* detection via antibody-immobilized nanoporous membrane. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 159 (2011), Nr. 1, 328 - 335. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2011.06.074>
- [244] BRAIEK, Mohamed ; ROKBANI, Karima B. ; CHROUDA, Amani ; MRABET, Béchir ; BAKHROUF, Amina ; MAAREF, Abderrazak ; JAFFREZIC-RENAULT, Nicole: An Electrochemical Immunosensor for Detection of *Staphylococcus aureus* Bacteria Based on Immobilization of Antibodies on Self-Assembled Monolayers-Functionalized Gold Electrode. In: *Biosensors* 2 (2012), Nr. 4, 417–426. <https://doi.org/10.3390/bios2040417>
- [245] BEKIR, Karima ; BARHOUMI, Houcine ; BRAIEK, Mohamed ; CHROUDA, Amani ; ZINE, Nadia ; ABID, Nabil ; MAAREF, Abdelrazek ; BAKHROUF, Amina ; OUADA, Hafedh B. ; JAFFREZIC-RENAULT, Nicole ; MANSOUR, Hedi B.: Electrochemical impedance immunosensor for rapid detection of stressed pathogenic *Staphylococcus aureus* bacteria.

- In: *Environmental Science and Pollution Research* 22 (2015), Nr. 20, 15796-15803. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-4761-7>
- [246] WU, Yi ; CHAI, H: Development of an Electrochemical Biosensor for Rapid Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria. In: *International Journal of Electrochemical Science* 12 (2017), 4291-4300. <http://dx.doi.org/10.20964/2017.05.09>
- [247] XIONG, Xiaohui ; SHI, Xinpings ; LIU, Yuanjian ; LU, Lixia ; YOU, Jingjing: An aptamer-based electrochemical biosensor for simple and sensitive detection of *staphylococcal* enterotoxin B in milk. In: *Analytical Methods* 10 (2018), Nr. 3, 365–370. <http://dx.doi.org/10.1039/C7AY02452E>
- [248] JIA, Fei ; DUAN, Nuo ; WU, Shijia ; MA, Xiaoyuan ; XIA, Yu ; WANG, Zhouping ; WEI, Xinlin: Impedimetric aptasensor for *Staphylococcus aureus* based on nanocomposite prepared from reduced graphene oxide and gold nanoparticles. In: *Microchimica Acta* 181 (2014), Nr. 9, 967-974. <http://dx.doi.org/10.1007/s00604-014-1195-8>
- [249] SAUERBREY, Günter: Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. In: *Zeitschrift für Physik* 155 (1959), Nr. 2, 206-222. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01337937>
- [250] KANAZAWA, K. K. ; GORDON, J. G.: Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. In: *Analytical Chemistry* 57 (1985), Nr. 8, 1770-1771. <http://dx.doi.org/10.1021/ac00285a062>
- [251] RODAHL, Michael ; HÖÖK, Fredrik ; KROZER, Anatol ; BRZEZINSKI, Peter ; KASEMO, Bengt: Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments. In: *Review of Scientific Instruments* 66 (1995), Nr. 7, 3924-3930. <https://doi.org/10.1063/1.1145396>
- [252] COTTRELL, F. G.: Der Reststrom bei galvanischer Polarisation, betrachtet als ein Diffusionsproblem. In: *Zeitschrift fuer physikalische Chemie* XLII (1903), 385. <https://www.degruyter.com/view/j/zpch.1903.42.issue-1/zpch-1903-4229/zpch-1903-4229.xml>
- [253] STEEL, Adam B. ; HERNE, Tonya M. ; TARLOV, Michael J.: Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold. In: *Analytical Chemistry* 70 (1998), Nr. 22, 4670-4677. <http://dx.doi.org/10.1021/ac980037q>
- [254] LAVIRON, E.: General Expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusion electrochemical systems. In: *J. Electroanal. Chem.* 101 (1979), S. 19–28
- [255] BRUG, G. J. ; VAN DEN EEDEN, A. L. G. ; SLUYTERS-REHBACH, M. ; SLUYTERS, J. H.: The analysis of electrode impedances complicated by the presence of a constant phase element. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 176 (1984), Nr. 1, 275 - 295. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(84\)80324-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(84)80324-1)

- [256] NELDER, J. A. ; MEAD, R.: A Simplex Method for Function Minimization. In: *The Computer Journal* 7 (1965), 01, Nr. 4, 308-313. <https://doi.org/10.1093/comjnl/7.4.308>
- [257] ANGNES, Lúcio ; RICHTER, Eduardo M. ; AUGELLI, Márcio A. ; KUME, Gustavo H.: Gold Electrodes from Recordable CDs. In: *Analytical Chemistry* 72 (2000), Nr. 21, 5503-5506. <http://dx.doi.org/10.1021/ac000437p>
- [258] KEIGHLEY, Simon D. ; LI, Peng ; ESTRELA, Pedro ; MIGLIORATO, Piero: Optimization of DNA immobilization on gold electrodes for label-free detection by electrochemical impedance spectroscopy. In: *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2008), Nr. 8, 1291-1297. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2007.11.012>
- [259] GUADALUPE, Ana R. ; ABRUNA, Hector D.: Electroanalysis with chemically modified electrodes. In: *Analytical Chemistry* 57 (1985), Nr. 1, 142-149. <https://doi.org/10.1021/ac00279a036>
- [260] AMBIA-GARRIDO, J. ; VAINRUB, A. ; PETTITT, B. M.: A model for Structure and Thermodynamics of ssDNA and dsDNA Near a Surface: a Coarse Grained Approach. In: *Computer physics communications* 181 (2010), Nr. 12, 2001-2007. <https://doi.org/10.1016/j.cpc.2010.08.029>
- [261] LIMON-PETERSEN, Juan G. ; HAN, Jeongmin T. ; REES, Neil V. ; DICKINSON, Edmund J. F. ; STREETER, Ian ; COMPTON, Richard G.: Quantitative Voltammetry in Weakly Supported Media. Chronoamperometric Studies on Diverse One Electron Redox Couples Containing Various Charged Species: Dissecting Diffusional and Migrational Contributions and Assessing the Breakdown of Electroneutrality. In: *The Journal of Physical Chemistry C* 114 (2010), Nr. 5, 2227-2236. <https://doi.org/10.1021/jp9097149>
- [262] JANEK, Richard P. ; FAWCETT, W. R. ; ULMAN, Abraham: Impedance Spectroscopy of Self-Assembled Monolayers on Au(111): Sodium Ferrocyanide Charge Transfer at Modified Electrodes. In: *Langmuir* 14 (1998), Nr. 11, 3011-3018. <http://dx.doi.org/10.1021/la970980+>
- [263] FINKLEA, Harry O. ; SNIDER, Daniel A. ; FEDYK, John ; SABATANI, Eyal ; GAFNI, Yael ; RUBINSTEIN, Israel: Characterization of octadecanethiol-coated gold electrodes as microarray electrodes by cyclic voltammetry and ac impedance spectroscopy. In: *Langmuir* 9 (1993), Nr. 12, 3660-3667. <http://dx.doi.org/10.1021/la00036a050>
- [264] AMATORE, C. ; SAVÉANT, J. M. ; TESSIER, D.: Charge transfer at partially blocked surfaces: A model for the case of microscopic active and inactive sites. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 147 (1983), Nr. 1, 39 - 51. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(83\)80055-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(83)80055-2)
- [265] GUESHI, Tatsuro ; TOKUDA, Koichi ; MATSUDA, Hiroaki: Voltammetry at partially covered electrodes: Part II. Linear potential sweep and cyclic voltammetry. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 101 (1979), Nr. 1, 29 - 38. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(79\)80076-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(79)80076-5)

- [266] TOKUDA, Koichi ; GUESHI, Tatsuro ; MATSUDA, Hiroaki: Voltammetry at partially covered electrodes: Part III. Faradaic impedance measurements at model electrodes. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 102 (1979), Nr. 1, 41 - 48. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(79\)80027-3](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(79)80027-3)
- [267] MENOLASINA, Sabino: Electrochemical studies of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ on goldultra-microelectrodes varying the concentrations of KF as supporting electrolyte. In: *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia* vol.28 (2005), Aug. 2005, Nr. no.2, S. 10. – ISSN 0254–0770
- [268] KIM, Yeon-Taik ; BARD, Allen J.: Imaging and etching of self-assembled n-octadecanethiol layers on gold with the scanning tunneling microscope. In: *Langmuir* 8 (1992). <https://doi.org/10.1021/la00040a015>
- [269] MORF, Werner E.: Calculation of liquid-junction potentials and membrane potentials on the basis of the Planck theory. In: *Anal. Chem.* 49 (1977), Nr. 6, 810–813. <https://doi.org/10.1021/ac50014a035>
- [270] HENDERSON, P.: Zur Thermodynamik der Flüssigkeitsketten. In: *Zeitschrift fuer Physikalische Chemie (Muenchen, Germany)* 59 (1908), Nr. 118, 325–345. <https://www.degruyter.com/view/j/zpch.1908.63.issue-1/zpch-1908-6320/zpch-1908-6320.xml>. – ISSN 09429352
- [271] VANÝSEK, Petr: Ionic conductivity and diffusion at infinite dilution. In: LIDE, David R. (Hrsg.): *CRC handbook of chemistry and physics* Bd. 83. CRC Press, 2000, S. 76–78
- [272] SAWYER, Donald T. ; SOBKOWIAK, Andrzej ; ROBERTS, Julian L.: *Electrochemistry for chemists*. Bd. 2. Wiley, 1995. ISSN 0471594687
- [273] BARRY, Peter ; M. DIAMOND, Jared: Junction Potentials, Electrode Standard Potentials and other problems in interpreting electrical properties of membranes. In: *The Journal of membrane biology* 3 (1970), 93-122. <https://doi.org/10.1007/BF01868010>
- [274] OESCH, Urs ; JANATA, Jirí: Electrochemical study of gold electrodes with anodic oxide films I. Formation and reduction behaviour of anodic oxides on gold. In: *Electrochimica Acta* 28 (1983), Nr. 9, 1237-1246. [http://dx.doi.org/10.1016/0013-4686\(83\)85011-7](http://dx.doi.org/10.1016/0013-4686(83)85011-7)
- [275] CHAI, Liraz ; KLEIN, Jacob: Large Area, Molecularly Smooth (0.2 nm rms) Gold Films for Surface Forces and Other Studies. In: *Langmuir* 23 (2007), Nr. 14, 7777–7783. <https://doi.org/10.1021/la063738o>
- [276] SWIETLOW, Aleksander ; SKOOG, Mikael ; JOHANSSON, Gillis: Double-layer capacitance measurements of self-assembled layers on gold electrodes. In: *Electroanalysis* 4 (1992), Nr. 10, 921-928. <http://dx.doi.org/10.1002/elan.1140041002>

- [277] BORETIUS, Tim ; JURZINSKY, Tilman ; KÖHLER, Christian ; KERZENMACHER, Sven ; HILLEBRECHT, Harald ; STIEGLITZ, Thomas: High-porous platinum electrodes for functional electrical stimulation. In: *Conference proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. (2011), 5404-7. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2011.6091336>
- [278] LAZAR, J. ; SCHNELTING, C. ; SLAVCHEVA, E. ; SCHNAKENBERG, U.: Hampering of the Stability of Gold Electrodes by Ferri-/Ferrocyanide Redox Couple Electrolytes during Electrochemical Impedance Spectroscopy. In: *Anal Chem* 88 (2016), Nr. 1, 682-7. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02367>
- [279] VOGT, Stephan ; SU, Qiang ; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, Cristina ; NÖLL, Gilbert: Critical View on Electrochemical Impedance Spectroscopy Using the Ferri/Ferrocyanide Redox Couple at Gold Electrodes. In: *Analytical Chemistry* 88 (2016), Nr. 8, 4383-4390. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04814>
- [280] OLDHAM, Keith B. ; STEVENS, Nicholas P. C.: Uncompensated Resistance. 2. The Effect of Reference Electrode Nonideality. In: *Analytical Chemistry* 72 (2000), Nr. 17, 3981-3988. <http://dx.doi.org/10.1021/ac000154x>
- [281] MYLAND, Jan C. ; OLDHAM, Keith B.: Uncompensated Resistance. 1. The Effect of Cell Geometry. In: *Analytical Chemistry* 72 (2000), Nr. 17, 3972-3980. <http://dx.doi.org/10.1021/ac0001535>
- [282] ÅBERG, Svante: Measurement of uncompensated resistance and double layer capacitance during the course of a dynamic measurement: correction for IR drop and charging currents in arbitrary voltammetric techniques. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 419 (1996), Nr. 1, 99 - 103. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(96\)04860-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(96)04860-7)
- [283] HICKLING, A.: Studies in electrode polarisation. Part IV. - The automatic control of the potential of a working electrode. In: *Trans. Faraday Soc.* 38 (1942), 27-33. <http://dx.doi.org/10.1039/TF9423800027>
- [284] SLUYTERS, J. H.: On the impedance of galvanic cells: I. Theory. In: *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 79 (1960), Nr. 10, 1092-1100. <http://dx.doi.org/10.1002/recl.19600791013>
- [285] BRITZ, Dieter: Effects Due to Uncompensated Resistance and Capacitance. Version: 2005. https://doi.org/10.1007/978-3-540-31524-7_11. In: *Digital Simulation in Electrochemistry: Third Completely Revised and Extended Edition With Supplementary Electronic Material*. Springer Berlin Heidelberg, 2005, 193-199
- [286] FINKLEA, Harry O.: Self-Assembled Monolayers on Electrodes. Version: 2006. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5315>. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd., 2006

- [287] BOGOMOLOVA, A. ; KOMAROVA, E. ; REBER, K. ; GERASIMOV, T. ; YAVUZ, O. ; BHATT, S. ; ALDISSI, M.: Challenges of electrochemical impedance spectroscopy in protein biosensing. In: *Anal Chem* 81 (2009), Nr. 10, 3944-9. <https://doi.org/10.1021/ac9002358>
- [288] ROCK, Peter A.: The Standard Oxidation Potential of the Ferrocyanide-Ferricyanide Electrode at 25°C and the Entropy of Ferrocyanide Ion. In: *The Journal of Physical Chemistry* 70 (1966), Nr. 2, 576-580. <http://dx.doi.org/10.1021/j100874a042>
- [289] O'REILLY, James E.: Oxidation-reduction potential of the ferro-ferricyanide system in buffer solutions. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 292 (1973), Nr. 3, 509-515. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2728\(73\)90001-7](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2728(73)90001-7)
- [290] KOLTHOFF, I. M. ; TOMSICEK, William J.: The Oxidation Potential of the System Potassium Ferrocyanide/Potassium Ferricyanide at Various Ionic Strengths. In: *The Journal of Physical Chemistry* 39 (1934), Nr. 7, 945-954. <http://dx.doi.org/10.1021/j150367a004>
- [291] URMANN, Katharina ; REICH, Peggy ; WALTER, Johanna-Gabriela ; BECKMANN, Dieter ; SEGAL, Ester ; SCHEPER, Thomas: Rapid and label-free detection of protein A by aptamer-tethered porous silicon nanostructures. In: *Journal of Biotechnology* 257 (2017), 171 - 177. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.01.005>
- [292] YANG, Z. R. ; THOMSON, R. ; MCNEIL, P. ; ESMOUF, R. M.: RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. In: *Bioinformatics* 21 (2005), Nr. 16, 3369-76. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti534>
- [293] ALONSO, Darwin O. V. ; DAGGETT, Valerie: *Staphylococcal* protein A: Unfolding pathways, unfolded states, and differences between the B and E domains. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (1999), Nr. 1, 133-138. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC26628/>
- [294] HIRSCHORN, Bryan ; ORAZEM, Mark E. ; TRIBOLLET, Bernard ; VIVIER, Vincent ; FRATEUR, Isabelle ; MUSIANI, Marco: Determination of effective capacitance and film thickness from constant-phase-element parameters. In: *Electrochimica Acta* 55 (2010), Nr. 21, 6218-6227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2009.10.065>
- [295] DÜBEL, S. ; BREITLING, F. ; FRENZEL, A. ; JOSTOCK, T. ; MARSCHALL, A. L. J. ; SCHIRRMANN, T. ; HUST, M.: *Rekombinante Antikörper*. 2. Spektrum Akademischer Verlag, 2019 <https://doi.org/10.1007/978-3-662-50276-1>
- [296] LASIA, Andrzej: Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications. Version: 2002. https://doi.org/10.1007/0-306-46916-2_2. In: CONWAY, B. E. (Hrsg.) ; BOCKRIS, J. O. (Hrsg.) ; WHITE, Ralph E. (Hrsg.): *Modern Aspects of Electrochemistry*. Boston, MA : Springer US, 2002, Kapitel 2, 143-248

- [297] KONOPKA, S. J. ; MCDUFFIE, Bruce.: Diffusion coefficients of ferri- and ferrocyanide ions in aqueous media, using twin-electrode thin-layer electrochemistry. In: *Anal. Chem.* 42 (1970), Nr. 14, 1741–1746. <https://doi.org/10.1021/ac50160a042>
- [298] BORTELS, L. ; VAN DEN BOSSCHE, B. ; DECONINCK, J. ; VANDEPUTTE, S. ; HUBIN, A.: Analytical solution for the steady-state diffusion and migration involving multiple reaction ions - Application to the identification of Butler-Volmer kinetic parameters for the ferri-/ferrocyanide redox couple. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 429 (1997), 139-155. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728\(96\)05014-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728(96)05014-0)
- [299] ANGELL, D. H. ; DICKINSON, T.: The kinetics of the ferrous/ferric and ferro-/ferricyanide reactions at platinum and gold electrodes. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 35 (1972), Nr. 1, 55-72. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728\(72\)80294-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0728(72)80294-8)
- [300] MOLDENHAUER, Jonathan ; MEIER, Madeline ; PAUL, David W.: Rapid and Direct Determination of Diffusion Coefficients Using Microelectrode Arrays. In: *Journal of The Electrochemical Society* 163 (2016), Nr. 8, H672-H678. <http://dx.doi.org/10.1149/2.0561608jes>
- [301] PERENLEI, G. ; TEE, T. W. ; YUSOF, N. A. ; KHENG, G. J.: Voltammetric Detection of Potassium Ferricyanide Mediated by Multi-walled Carbon Nanotube/Titanium Dioxide Composite Modified Glassy Carbon Electrode. In: *International Journal of Electrochemical Science* 6 (2011), Nr. 2, S. 520–531
- [302] GUIDELLI, Rolando ; COMPTON, Richard G. ; FELIU, Juan M. ; GILEADI, Eliezer ; LIPKOWSKI, Jacek ; SCHMICKLER, Wolfgang ; TRASATTI, Sergio: Definition of the transfer coefficient in electrochemistry (IUPAC Recommendations 2014). In: *Pure and Applied Chemistry* 86 (2014), Nr. 2, 259–262. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-5025>
- [303] RICE, Ronald J. ; PONTIKOS, Nicholas M. ; MCCREERY, Richard L.: Quantitative correlations of heterogeneous electron-transfer kinetics with surface properties of glassy carbon electrodes. In: *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990), Nr. 12, 4617–4622. <https://doi.org/10.1021/ja00168a001>
- [304] WINKLER, Krzysztof: The kinetics of electron transfer in $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ redox system on platinum standard-size and ultramicroelectrodes. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 388 (1995), 151-159. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0728\(94\)03847-V](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0728(94)03847-V)
- [305] DAUM, Peter H. ; ENKE, Christie G.: Electrochemical kinetics of the ferri-ferrocyanide couple on platinum. In: *Analytical Chemistry* 41 (1969), Nr. 4, 653-656. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60273a007>
- [306] FEENEY, Rosemary ; KOUNAVES, Samuel P.: Determination of heterogeneous electron transfer rate constants at microfabricated iridium electrodes. In: *Electrochemistry Communications* 1 (1999), Nr. 10, 453 - 458. [https://doi.org/10.1016/S1388-2481\(99\)00091-0](https://doi.org/10.1016/S1388-2481(99)00091-0)

- [307] GANESH, V. ; PAL, S. K. ; KUMAR, S. ; LAKSHMINARAYANAN, V.: Self-assembled monolayers (SAMs) of alkoxy cyanobiphenyl thiols on gold - A study of electron transfer reaction using cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 296 (2006), Nr. 1, 195 - 203. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.08.051>
- [308] FELDBERG, Stephen W.: Effect of uncompensated resistance on the cyclic voltammetric response of an electrochemically reversible surface-attached redox couple: Uniform current and potential across the electrode surface. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 624 (2008), Nr. 1, 45 - 51. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2008.07.020>
- [309] REICH, Peggy ; BECKMANN, Dieter: Characterization of the HS-C6-Aptamer/Mercaptohexanol Monolayer on Gold Electrodes. In: *Procedia Engineering* 168 (2016), 392 - 395. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.11.175>. - Proceedings of the 30th anniversary Eurosensors Conference - Eurosensors 2016, 4-7. September 2016, Budapest, Hungary
- [310] VELASCO, Jaime G.: Determination of standard rate constants for electrochemical irreversible processes from linear sweep voltammograms. In: *Electroanalysis* 9 (1997), Nr. 11, 880-882. <http://dx.doi.org/10.1002/elan.1140091116>
- [311] PORTER, Marc D. ; BRIGHT, Thomas B. ; ALLARA, David L. ; CHIDSEY, Christopher E. D.: Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. In: *Journal of the American Chemical Society* 109 (1987), Nr. 12, 3559-3568. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00246a011>
- [312] MERGNY, Jean-Louis ; GROS, Julien ; DE CIAN, Anne ; BOURDONCLE, Anne ; ROSU, Frédéric ; SACCA, Barbara ; GUITTAT, Lionel ; AMRANE, Samir ; MILLS, Martin ; ALBERTI, Patrizia ; TAKASUGI, Masashi ; LACROIX, Laurent: Energetics, Kinetics and Dynamics of Quadruplex Folding. Version: 2006. <http://dx.doi.org/10.1039/9781847555298-00031>. In: NEIDLE, Stephen (Hrsg.) ; BALASUBRAMANIAN, Shankar (Hrsg.): *Quadruplex Nucleic Acids*. The Royal Society of Chemistry, 2006, Kapitel 2, 59
- [313] BANADA, Padmapriya P. ; CHAKRAVORTY, Soumitesh ; SHAH, Darshini ; BURDAY, Michele ; MAZZELLA, Fermina M. ; ALLAND, David: Highly Sensitive Detection of *Staphylococcus aureus* Directly from Patient Blood. In: *PLOS ONE* 7 (2012), Nr. 2, e31126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031126>

Anhang

MATLAB Modell zur Simulation der Impedanz eines modifizierten Randles-Ersatzschaltbildes in Abhängigkeit von der für den Ladungstransfer verfügbaren Fläche

```
1 % Version 6
2
3 % Simulation der Impedanz eines Randles-Ersatzschaltbildes in
   Abhängigkeit von der Fläche
4 close All
5 clear
6 clc
7
8 % Konstanten
9 eps0=8.8541878e-12; % in F/m
10 epsR=2.6;          % für Alkyl-SAM aus Porter 1987
11 dicke=7.8e-10;    % in m = Dicke der SAM
12 R=8.3144598;      % in J/(mol*K) = Gaskonstante
13 F=96485.33289;   % in C/mol = Faradaykonstante
14 z=1;              % Valenz des Redoxpaares
15 Cred=1;           % in mol/m3 = Konzentration KFe(II)CN
16 Cox=1;            % in mol/m3 = Konzentration KFe(III)CN
17 Dred=6.00e-11;    % in m2/s = Diffusionskonstante
18 Dox=6.09e-11;     % bestimmt mit CV
19 kappa=0.01421;    % in S/cm
20 T=310.15;         % in Kelvin
21 k0=4.12e-5;       % in m/s bestimmt mit CV
22 aox=0.362;        % Ladungstransferkoeffizienten
23 ared=0.472;       % bestimmt mit CV
24 a=0.95; % Koeffizient des CPE (geschätzt aus Messwerten)
25
26 % Variablen
27 f=logspace(0,5,42); % in Hz = Frequenzbereich von 1Hz bis 100kHz
```

```

28 APAA=6.69e-6; % in m2 = Fläche der Elektrode, die mit Aptamer
    besetzt ist
29 APA=[1.81e-7,3.61e-7,5.72e-7,1.26e-6,1.81e-6,2.0e-6]; % Fläche,
    die die gebundenen Protein A-Moleküle blockieren
30 Afaraday=APAA-APA; % für den Ladungstransfer verfügbare Fläche
31 Atrue=4.44e-5; % in m2 = elektrochemisch aktive Fläche der
    Arbeitselektrode
32 AMCH=Atrue-APAA-APA; % für die Diffusion verfügbare Fläche
33 w=2*pi*f; % Kreisfrequenz
34
35 % Gleichungen
36 %% Lösungsmittelwiderstand Rsol
37 k=0.58;
38 Rsol=k./kappa;
39 Z1=Rsol;
40
41 %% Transferwiderstand Rct
42 RctPAA=R*T./(z^2*F^2*Afaraday.*k0)*1/((aox*Cox^(1-aox)*Cred^aox+
    ared*Cred^(1-ared)*Cox^ared));
43 Z3a=RctPAA';
44 Z3=Z3a*ones(1,length(f));
45
46 %% Warburgimpedanz W
47 s1PAA=R*T./(AMCH.*z^2*F^2*sqrt(2))*(1/(Cred*sqrt(Dred))+1/(Cox*
    sqrt(Dox)));
48 Z4a1=(1-1i)*s1PAA';
49 Z4a2=1./sqrt(w);
50 Z4=Z4a1*Z4a2;
51
52 %% Konstantphasenelement CPE
53 CdlMCH=eps0*epsR*Atrue./dicke;
54 QdlPAA=(CdlMCH.^a)/((Rsol.*RctPAA./(Rsol+RctPAA)).^(1-a));
55 Z2=1./(QdlPAA'*((1i*w).^a));
56
57 %% Impedanz des modifizierten Randles Ersatzschaltbild Rsol+CPE/(
    Rct+W)-->Z=ZRsol+1/(1/ZCPE+1/(ZW+ZRct))
58 %% Z1=ZRsol, Z2=ZCPE, Z3=ZRct, Z4=ZW
59 Zges=Z1+(1./((1./Z2)+(1./(Z4+Z3))));
60
61 % Darstellung

```



```

62 %% Berechnungen der Beträge, Phase, Real- und Imaginärteile der
    Impedanz für die Darstellung
63 absIm=abs(Zges);
64 Phase=angle(Zges)*180/pi();
65 ReZ=real(Zges)*0.444;
66 ImZ=imag(Zges)*-0.444;
67
68 %% Graphen
69 figure(1);
70 subplot(2,3,1);
71 loglog(f,absIm);
72 title('Z');
73 xlabel('f /Hz');
74 ylabel('Z /Ohm');
75
76 subplot(2,3,2);
77 loglog(f,Phase);
78 title('Phi');
79 xlabel('f /Hz');
80 ylabel('Phi /°');
81
82 subplot(2,3,3);
83 plot(ReZ',ImZ');
84 title('Nyquist');
85 xlabel('Re(Z)');
86 ylabel('Im(Z)');

```

PUBLIKATIONEN

1. Peggy Reich, John-Alexander Preuß, Nicole Bahner, Janina Bahnemann, „Impedimetric Aptamer-Based Biosensor: Principles and Techniques“, In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 2020, Springer, Berlin, Heidelberg, https://doi.org/10.1007/10_2019_113 [70% - Planung und Verfassen des Manuskriptes]
2. John-Alexander Preuß, Peggy Reich, Nicole Bahner, Janina Bahnemann, „Impedimetric Aptamer-Based Biosensor: Principles and Techniques“, In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 2020, Springer, Berlin, Heidelberg, https://doi.org/10.1007/10_2020_125 [30% - Planung des Kapitels und Verfassen des Unterkapitels 4]
3. Peggy Reich, Regina Stoltenburg, Beate Strehlitz, Dieter Frense, Dieter Beckmann, “Development of an impedimetric Aptasensor for the detection of *Staphylococcus aureus*”, *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 2484, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18112484> [85% - Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente sowie Schreiben des Manuskriptes]
4. Nicole Bahner, Peggy Reich, Dieter Frense, Marcus Menger, Katharina Schieke, Dieter Beckmann, “An aptamer-based biosensor for detection of doxorubicin by electrochemical impedance spectroscopy”, *Anal. Bioanal. Chem.* 2017, <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0786-8> [20% - Mitwirkung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente]
5. Katharina Urmann, Peggy Reich, Johanna Walter, Dieter Beckmann, Ester Segal, Thomas Scheper, “Rapid and label-free detection of protein A by aptamer-tethered porous silicon nanostructures”, *Journal of Biotechnology*, Volume 257, 2017, Pages 171-177, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.01.005> [20% - Mitwirkung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente sowie beim Schreiben des Manuskriptes]
6. Peggy Reich, Dieter Beckmann, “Characterization of the HS-C6-Aptamer/Mercaptohexanol Monolayer on Gold Electrodes”, In *Procedia Engineering*, Volume 168, 2016, Pages 392-395, <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.11.175> [90% - Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente sowie Schreiben des Manuskriptes]
7. Dieter Frense, Soyong Kang, Katharina Schieke, Peggy Reich, Andreas Barthel, Uwe Pliquett, Thomas Nacke, Brian Cahill, Dieter Beckmann, “Label-free impedimetric biosensor for thrombin using the thrombin-binding aptamer as receptor”, *Journal of Physics: Conference Series*, Volume 434, XV ICEBI, 2013. [1% - Korrekturlesen]
8. Peggy Reich, “Functional characterization of prostate tumour cell lines”, VDM Verlag, 2011. [80% - Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, Schreiben des Manuskriptes]

9. Peggy Reich, Marcus Frohme, Matthias Nees; "Implementation of a siRNA screen for prostate tumour cell lines using living cell arrays", Scientific Article, TH Wildau, 2008 [weblink](#) [80% - Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, Schreiben des Manuskriptes]

KONFERENZ-VORTRÄGE

1. Peggy Reich, Dieter Beckmann, "Characterization of the HS-C6-Aptamer/Mercaptohexanol Monolayer on Gold Electrodes", 30th Eurosensors Conference, EUROSENSORS 2016

POSTERPRÄSENTATIONEN

1. P. Reich, A. Rudolph, A. Barthel, D. Frense, D. Beckmann, „Investigations of electrodes for label-free impedimetric biosensors“, COST Workshop, Leipzig, 2013
2. P. Reich, A. Rudolph, A. Barthel, D. Frense, B. Strehnitz, R. Stoltenburg, C. Reinemann, D. Beckmann, „Aptamers as receptors in labelfree impedimetric biosensors“, 11. Dresdner Sensor-Symposium, Dresden, 2013
3. P. Reich, D. Frense, A. Barthel, B. Strehnitz, R. Stoltenburg, D. Beckmann, „Reproduzierbarkeit der Immobilisierung von Aptameren auf Goldelektroden zur Detektion von Protein A“, 9. Deutsches Biosensor Symposium, München, 2015
4. P. Reich, D. Frense, B. Strehnitz, R. Stoltenburg, D. Beckmann, „Vergleich von Immobilisierungsmethoden für ein Protein A-bindendes Aptamer“, 12. Dresdner Sensor Symposium, Dresden, 2015
5. P. Reich, D. Martin, D. Frense, B. Strehnitz, R. Stoltenburg, D. Beckmann, „Development and characterization of an impedimetric protein A aptasensor“, XXIX Eurosensors, Freiburg, 2015
6. P. Reich, D. Beckmann, „Binding of Staphylococcus aureus to aptamer-modified gold electrodes measured by impedance spectroscopy“, 1th European & 10th German BioSensor Symposium, Potsdam, 2017

Curriculum Vitae

Peggy Reich

Date of birth 17/04/1984 in Berlin
Nationality German
Family status Single



Education

- Since 06/2015 **PhD student**
Institut für Technische Chemie (TCI), Leibniz Universität Hannover (LUH), Germany & Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik (iba) in Heilbad Heiligenstadt, Germany
First assessor: Prof. Thomas Scheper (LUH), second assessor: Prof. Uwe Pliquet (iba), subject: "Development of an impedimetric aptasensor for the detection of *Staphylococcus aureus*"
- 09/2006 - 08/2008 **Master of Science**
TH Wildau University of applied sciences (Berlin, Germany)
Master thesis: "Optimization of living cell arrays for functional characterization of prostate tumor cell lines" (VTT Finland)
excellent (1.4)
- 09/2003 - 08/2006 **Bachelor of Science**
TH Wildau, University of applied sciences (Berlin, Germany)
Bachelor thesis: "Characterization of an analytical system for Rhodopsine using impedance" (HU Berlin)
Good (1.6)
- 2001 - 06/2003 **Abitur**
Wilhelm-von-Siemens-Gymnasium (Berlin, Germany)
Good (2.4)
- 1997 - 2001 Linus-Pauling-Gymnasium (Berlin, Germany)
1990 - 1996 8. Grundschule (Berlin, Oberschöneweide, Germany)

Work experiences

- Since 08/2018 **Biosystems Engineer**
Institut für Mikroelektronik- und Mechatronik- Systeme gemeinnützige GmbH (IMMS GmbH), Erfurt, Germany
Project acquisition and project management
- 02/2013 - 09/2017 **Research assistant**
Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik (iba), Heilbad Heiligenstadt, Germany

-
- Electrochemical measurement techniques, aptamers, microbiology, self-assembled monolayers, quartz crystal microbalance, supervision of student training, mentoring of master students, assisting in lectures, microfluidics, data analysis in python
- 06/2011 - 08/2012 **Innovation assistant**
Aokin AG, Berlin, Germany
Mycotoxine detection, fluorescence polarization, production of reference materials, organization of proficiency tests, administration, customer service
- 11/2008 - 06/2009 **Scientist**
VTT Technical Research Center of Finland in Turku, Finland
“Functional analysis of prostate tumor cell lines” – cell culture, fluorescence microscopy, microarray, western blot, genomic profiling and analysis, Perl
- 09/2008 - 10/2008 **Technical assistant**
Laboratory of molecular biology, University of applied sciences (TH Wildau), Germany
Installation of a fluorescence microscope, creation of SOPs
- 10/2006 - 07/2007 **Tutor**
University of applied sciences (TH Wildau), Germany
Coaching of undergraduates in bioanalytics and biosensors
- Experiences abroad**
- 06/2016 - 07/2017 Exchange research project
Technion in Haifa, Israel
Immobilizing aptamers on porous silicon for the detection of protein A using reflective interferometric fourier transform spectroscopy (RIFTS) (supervisor: Prof. Ester Segal)
- 01/2010 - 12/2010 Language study travel in South America
- 09/2009 - 12/2009 Postgraduate Studies
Universidad Simón Bolívar (USB University), Caracas, Venezuela
Cellular Immunology
- 12/2007 - 06/2008 Research for Master thesis
VTT Technical Research Center of Finland in Turku, Finland
“Optimization of living cell arrays for functional characterization of prostate tumor cell lines”
- 08/2007 - 12/2007 Student exchange
Åbo Akademi (University), Turku, Finland
Nanobiotechnology, Chemical sensors, molecular modeling, special laboratory project in analytical chemistry: “Electric synthesis and characterization of bilayers with C60 and conducting Polyazulene films on electrodes”