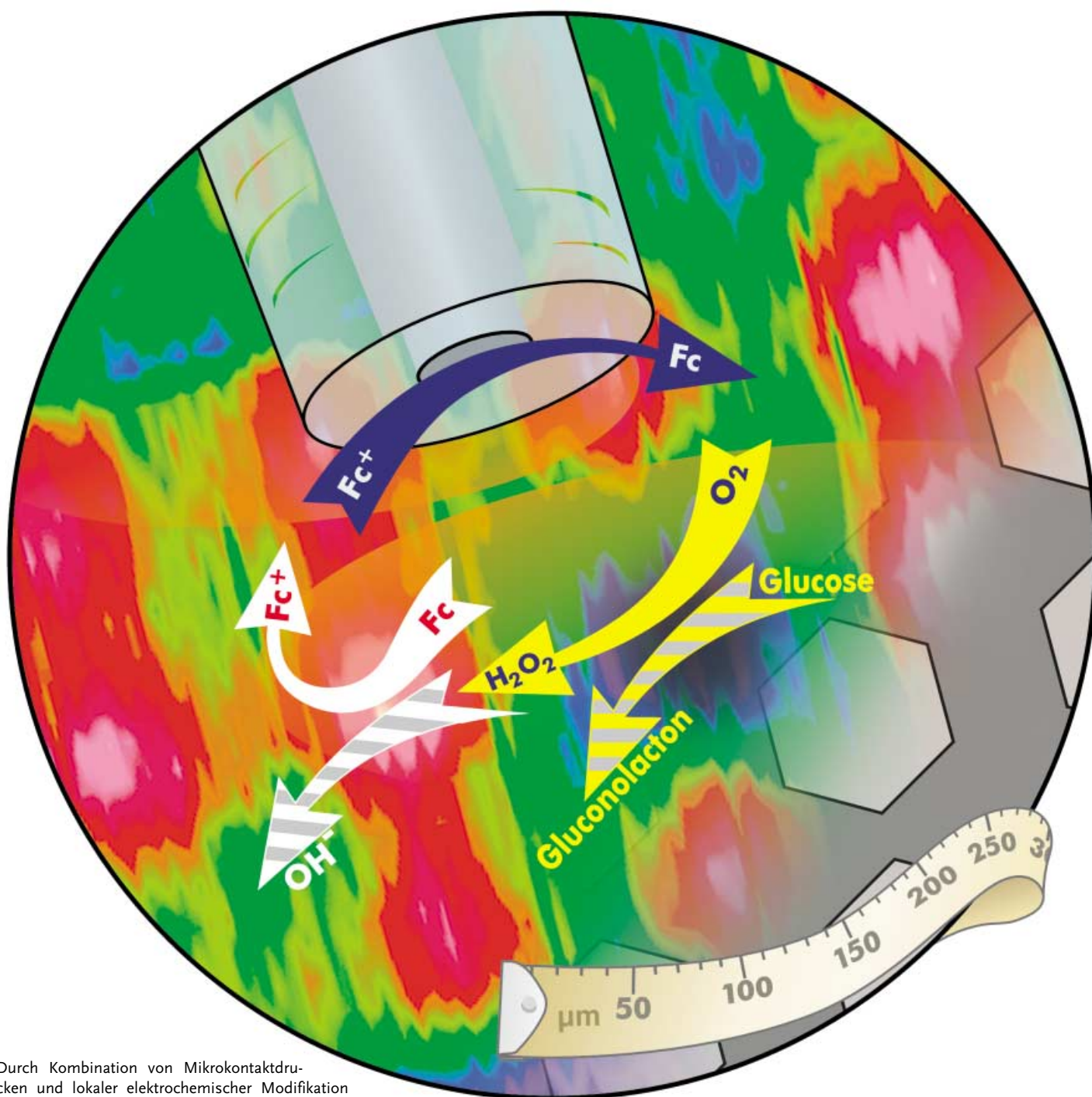


# Zuschriften



Durch Kombination von Mikrokontaktdru-  
cken und lokaler elektrochemischer Modifikation  
gelang der Aufbau von gemusterten Enzymschichten aus Glucose-  
Oxidase und Meerrettich-Peroxidase. Der Umsatz an solchen Struktu-  
ren hängt von der Position innerhalb des Musters ab und kann mit dem  
elektrochemischen Rastermikroskop gemessen werden. Einzelheiten  
dazu erfahren Sie in der Zuschrift von G. Wittstock und T. Wilhelm auf  
den folgenden Seiten.

## Analyse von Wechselwirkungen in gemusterten Multienzymschichten mit elektrochemischer Rastermikroskopie\*\*

Thomas Wilhelm und Gunther Wittstock\*

Mikrostrukturierte biochemisch aktive Schichten sind Schlüsselkomponenten in einer Reihe neuer und künftiger Anwendungen. Hierzu zählen biochemische Sensoren, Sensor-Arrays und Chip-basierte Testsysteme. Während diese Systeme als DNA-Chips bereits kommerziell vertrieben werden, erweist sich die Implementierung ähnlicher hoch integrierter Systeme unter Verwendung von Proteinen als schwieriger, weil Proteine im Allgemeinen wesentlich instabiler sind und bei Kontakt mit festen Oberflächen (insbesondere mit Metallen) denaturieren können. Die größere funktionale Vielfalt von Proteinen lässt ein breiteres Anwendungsspektrum als im Falle von DNA-Chips erwarten. Bei der Immobilisierung von Enzymen an Mikrostrukturen, etwa als Array aus Enzymsensoren oder als Enzymmarkierungen in Affinitätssensoren, treten neuartige Probleme auf. Durch die katalytische Aktivität der Enzyme wird eine fortlaufende Umsetzung aufrechterhalten, die in der angrenzenden Lösungsphase zur Ausbildung von Diffusionsschichten der Enzymsubstrate und der Produkte führt. An Mikrostrukturen mit geringem gegenseitigen Abstand kann es zu einer Überlappung dieser Diffusionsschichten kommen. Hinsichtlich möglicher Anwendungen kann dies z.B. zu unerwünschten Querempfindlichkeiten in Arrays aus Enzymmikrosensoren führen, wenn unterschiedliche Sensoren auf der Detektion eines gemeinsamen Produktes (z.B.  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch unterschiedliche Oxidasen) beruhen.<sup>[1]</sup> Während diese Effekte für mikrostrukturierte Transducerarrays von zentraler Bedeutung sind, können einige Effekte auch für makroskopische Sensoren oder reaktive Grenzflächen vorteilhaft genutzt werden. So können mikrokompartimentalisierte makroskopische Oberflächen speziell optimierte Regionen für die Immobilisierung von Enzymen sowie nicht bedeckte Bereiche für einen schnellen Elektronentransfer enthalten, z.B. um die Ansprechzeiten von Sensoren zu minimieren.<sup>[2]</sup> Vorstellbar sind auch speziell funktionalisierte Regionen zur Verankerung von unterschiedlichen Enzymen, die über gemeinsame Reaktanten im Sinne einer Cofaktorregenerierung miteinander wechselwirken oder Produkte einer enzymatischen Reaktion

in einem katalytischen Verstärkungskreislauf<sup>[3]</sup> in ein verstärktes Signal umwandeln, jedoch unterschiedliche Anforderungen an ihre lokale Umgebung stellen.

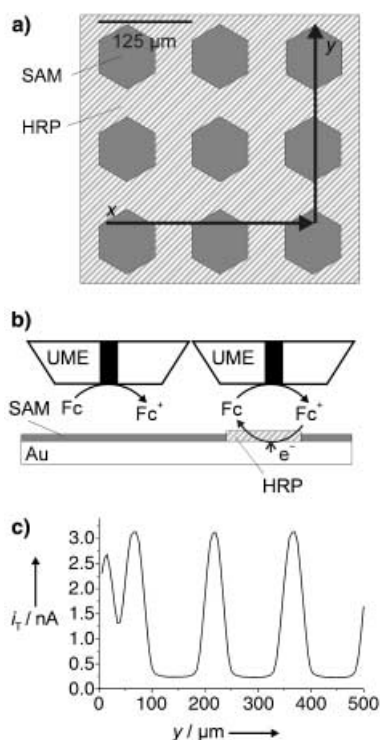
Bisher ließen sich derartige Effekte zwar konzeptionell diskutieren, aber nur in Einzelfällen experimentell umsetzen. Ihre Charakterisierung beruhte überwiegend auf integralen Messungen, d.h. auf Signalen von einer makroskopischen, in sich mikrostrukturierten Oberfläche. Mit der Entwicklung der elektrochemischen Rastermikroskopie (SECM, scanning electrochemical microscopy) hat sich eine Methode etabliert, die eine Kartierung lokaler Reaktivitäten an Fest-flüssig-Grenzflächen ermöglicht.<sup>[4]</sup> Neben der Abbildung elektrochemischer Reaktivitäten hat sie sich insbesondere auch bei der lokalen Untersuchung von Aktivitäten immobilisierter Enzyme bewährt.<sup>[5]</sup> Wir zeigen hier, wie die Technik auch zur Untersuchung der Aktivitäten *unterschiedlicher* Enzyme innerhalb *komplexer* Muster einschließlich ihrer gegenseitigen Wechselwirkungen einsetzbar ist.

Ausgedehnte Enzymschichten mit definierter Geometrie mit Periodizitäten im Mikrometerbereich sind inzwischen über eine Vielzahl von Strukturierungstechniken zugänglich.<sup>[6]</sup> Eine besondere Herausforderung ist die Immobilisierung unterschiedlicher Proteine in mikroskopischen Anordnungen, da hier mehrfache Modifizierungsschritte auszuführen sind, in denen die Aktivität der zuvor aufgetragenen Komponenten nicht beeinträchtigt werden darf. Zu diesem Zweck kam bisher eine Reihe sequenzieller Verfahren auch unter Nutzung von Rastersondenmethoden zum Einsatz.<sup>[7]</sup>

In unseren Untersuchungen haben wir die gute Reproduzierbarkeit lithographischer Strategien zur schnellen Erzeugung periodischer Mikrostrukturen mit der Flexibilität eines daran anschließenden sequenziellen Verfahrens kombiniert, um sehr variable Prototypen zu erzeugen. Die untersuchten Modellsysteme entstanden durch eine Kombination von Mikrokontaktdruck (MCP, microcontact printing) und lokaler elektrochemischer Desorption, gefolgt von Chemisorption funktionalisierter Thiole oder Disulfide. Die verwendeten Enzyme Meerrettich-Peroxidase (HRP, horseradish peroxidase) und Glucose-Oxidase (GOx) wurden so gewählt, dass ihre Umsätze über gemeinsame Produkte und Substrate miteinander gekoppelt und die Umsetzungen an jedem einzelnen Enzym gut mit SECM untersucht werden können. Zunächst wurde eine polykristalline Goldoberfläche durch MCP mit  $\omega$ -Mercaptohexadecansäure so bedruckt,<sup>[8]</sup> dass sich eine periodische Anordnung sechseckiger Regionen einer selbstorganisierten Monoschicht (SAM, self-assembled monolayer) bildete (Abbildung 1 a). Nach Chemisorption von Cystaminiumdihydrochlorid an den zunächst nicht bedruckten Regionen wurde HRP an der aminofunktionalisierten Oberfläche gebunden.<sup>[9]</sup> Danach wurde die Ultramikroelektrode (UME) des SEC-Mikroskops durch horizontale Linienscans im Feedback-Modus (Abbildung 1 b) bezüglich des Musters positioniert (Abbildung 1 c). Die Monoschichten aus  $\omega$ -Mercaptohexadecansäure sind so dicht gepackt, dass der verwendete Redoxmediator Hydroxymethylferrocen (Fc) oder die oxidierte Form ( $\text{Fc}^+$ ) keinen Elektronentransfer mit der Goldoberfläche vermitteln kann. Daher macht sich die gehinderte Diffusion von Fc zur UME bemerkbar, und der diffusionsbegrenzte Strom nimmt gegenüber der Volumen-

[\*] Prof. Dr. G. Wittstock, Dr. T. Wilhelm  
Fachbereich Chemie und  
Institut für Chemie und Biologie des Meeres  
Carl von Ossietzky-Universität Oldenburg  
26111 Oldenburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 441-798-3486  
E-mail: gunther.wittstock@uni-oldenburg.de

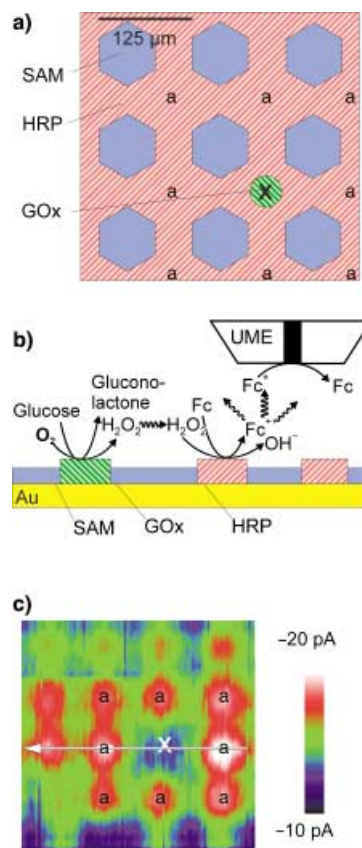
[\*\*] Die Arbeiten wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert (Wi1617/1-3). T.W. war Stipendiat und Kollegiat des von der DFG geförderten Graduiertenkollegs 152 „Physikalische Chemie der Grenzflächen“ an der Universität Leipzig. Den Vortitel gestaltete Oleg Skylar, Universität Oldenburg.



**Abbildung 1.** a) Schematische Darstellung der gestempelten Oberfläche. b) Schematische Darstellung des SECM-Feedback-Experiments zur Positionierung der UME zur lokalen elektrochemischen Desorption. c) SECM-Linienscan entlang der in Abbildung 1 a eingezeichneten Linie (y).

phase ab. Die HRP-Schichten sind dagegen für niedermolekulare Verbindungen permeabel, sodass  $\text{Fc}^+$  die Goldoberfläche erreichen kann und durch das Recycling des Redoxmediators an der Goldoberfläche ein erhöhter Strom an der UME resultiert (Abbildung 1 c,  $y = 65, 215, 365 \mu\text{m}$ ).

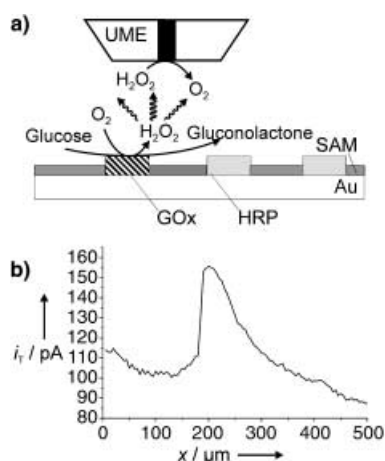
Nach Positionierung der UME im Zentrum einer HRP-modifizierten Region wurde durch lokale elektrochemische Desorption der HRP-Schicht ein exakt begrenzter kleiner Bereich der Goldoberfläche freigelegt.<sup>[7b]</sup> Die gesamte Probe wurde dann mit einer Lösung von GOx mit eingefügter endständiger Thiolgruppe benetzt.<sup>[8]</sup> Nach Bindung des modifizierten Enzyms entsteht das in Abbildung 2 a dargestellte Muster. In einer Lösung, die gelösten  $\text{O}_2$ , Glucose und Fc enthält, kann nun der Umsatz an dieser gemusterten Multienzymschicht im Generator-Kollektor-Modus (GC-Modus) verfolgt werden. Die GOx bildet unter Verbrauch von Glucose und  $\text{O}_2$  Gluconolacton und  $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist wiederum ein Substrat für HRP, von der es unter Nutzung von Fc als Elektronendonator zu Wasser reduziert wird. Dabei entsteht aus Fc das entsprechende Ferrociniumderivat  $\text{Fc}^+$ .  $\text{Fc}^+$  kann an der UME bei einem Potential  $E_T = 0 \text{ mV}$  reduziert werden (Abbildung 2 b). Bei diesem Potential werden die anderen Lösungsbestandteile nicht umgesetzt. Hohe Ströme für die Reduktion von  $\text{Fc}^+$  korrelieren daher mit einem lokalen hohen Umsatz der HRP. Die zweidimensionale SECM-GC-Messung zeigt die Abhängigkeit des Umsatzes an der HRP-Schicht von der Entfernung zur Region mit immobilisierter GOx, deren Zentrum sich an



**Abbildung 2.** a) Schema der gemusterten Oberflächen nach der elektrochemischen Desorption und der Anbindung von GOx. b) Schematische Darstellung des SECM-GC-Experiments. c) Experimentelle Ergebnisse in Gegenwart von  $\text{O}_2$ , Glucose und Fc; der Abbildungsrahmen umfaßt  $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ .

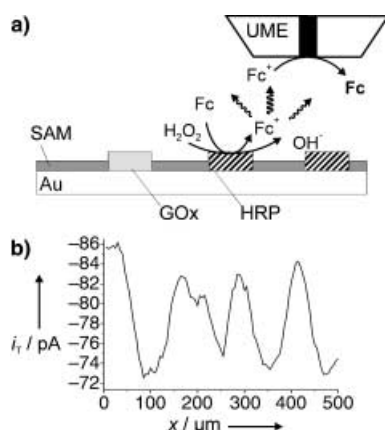
der mit „x“ markierten Stelle befindet (Abbildung 2 c). Die acht HRP-Regionen in unmittelbarer Nachbarschaft („a“) weisen einen hohen Umsatz auf. Senkrecht zur Scanrichtung der UME (eingezeichneter Pfeil) tritt außerhalb dieser Regionen ein kaum noch messbarer Umsatz der HRP auf. Die HRP-modifizierten Schichten können die diffusive Ausbreitung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  effektiv unterdrücken. Parallel zur eingezeichneten Linie wird ein Umsatz auch außerhalb der mit „a“ markierten Regionen beobachtet, wahrscheinlich weil die rasternde UME einen Teil der Lösung in diese Richtung mitschleppt.

Mit dem GC-Modus der SECM sind aber noch weitergehende Informationen über die Oberfläche zugänglich. So kann nach Wechsel der Lösungszusammensetzung auch die Aktivität der beiden immobilisierten Enzyme separat erfasst werden. In einer Lösung, die Glucose und  $\text{O}_2$ , aber kein Fc enthält, kann mit der UME die lokale Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Oxidation bei  $E_T = 750 \text{ mV}$  gemessen werden (Abbildung 3 a). Ein Scan entlang der in Abbildung 2 c enthaltenen Linie zeigt bei  $x = 220 \mu\text{m}$  die erhöhte Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und damit die Position der immobilisierten GOx an (Abbildung 3 b). Setzt man der Volumenphase der Lösung andererseits  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Fc, aber keine Glucose zu, wird ausschließlich HRP umgesetzt, und zwar unabhängig von der Lage bezüg-



**Abbildung 3.** a) Schematische Darstellung des SECM-GC-Experiments zur Aufzeichnung der Aktivität von GOx. b) SECM-Linienscan entlang der Linie in Abbildung 2c unter Detektion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Lösung von Glucose und O<sub>2</sub>.

lich der GOx-Region. Der Umsatz kann durch Reduktion des lokal gebildeten Fc<sup>+</sup> bei  $E_T = 0$  mV erfasst werden (Abbildung 4a). Ein entsprechender Scan entlang der Linie in Abbildung 2c zeigt die periodische Abfolge der Regionen mit



**Abbildung 4.** a) Schematische Darstellung des SECM-GC-Experiments zur Aufzeichnung der Aktivität von HRP. b) SECM-Linienscan entlang der Linie in Abbildung 2c unter Detektion von Fc<sup>+</sup> in einer Lösung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Fc.

HRP durch die Maxima der Reduktionsströme bei  $x = 20, 170, 300$  und  $420 \mu\text{m}$  an. Die Höhen der Maxima sind ähnlich, was belegt, dass tatsächlich die HRP auf der gesamten Oberfläche katalytisch aktiv ist und in Abbildung 2c der Umsatz auf wenige Regionen in unmittelbarer Nähe der GOx-Region beschränkt bleibt, da die Ausbreitung des an der GOx gebildeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unterdrückt wird.

Die gezeigte Methode der Strukturierung von Oberflächen ist auf weitere Systeme anwendbar und eröffnet in Kombination mit SECM einen neuen experimentellen Zugang zum Studium der Wechselwirkungen an enzymatisch aktiven Mikrostrukturen. Dabei können unterschiedliche Reaktionen einzeln oder gekoppelt mit SECM visualisiert werden.

## Experimentelles

Das in einer Dreielektrodenanordnung verwendete SEC-Mikroskop ist an anderer Stelle beschrieben.<sup>[8]</sup> Alle Potentialangaben beziehen sich auf die gesättigte Kalomelektrode (SCE). Die verwendete Pt-UME hatte einen Durchmesser von  $25 \mu\text{m}$ . Der PDMS-Stempel druckte Sechsecke mit einer Kantenlänge von  $43 \mu\text{m}$  und einer Periodizität von  $125 \mu\text{m}$  in x-Richtung und  $150 \mu\text{m}$  in y-Richtung. Mit diesem Stempel wurde wie zuvor beschrieben<sup>[8]</sup> HS-C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>COOH aus einer 1 mM Lösung gedruckt. Nach mehreren Spülschritten wurde Cystaminiumdihydrochlorid chemisorbiert und HRP an die aminierten Oberflächenbereiche gebunden.

Die UME des SEC-Mikroskops wurde zunächst unter Reduktion von O<sub>2</sub> und Nutzung der Strom-Abstands-Kurven<sup>[10]</sup> für die gehinderte Diffusion im Abstand von  $10 \mu\text{m}$  über der Probe positioniert. Zur lateralen Positionierung der UME über einzelnen Elementen der gestempelten Struktur wurde in einer Lösung von 2 mM Fc und 0.1 M KCl in Phosphatpuffer (PP, pH 7) bei  $E_T = 400$  mV gearbeitet. Zur elektrochemischen Desorption wurde die UME und die makroskopische Goldunterlage für 38 s direkt an eine Rechteckspannung (2 V Spitze-Spitze, 5 kHz) angeschlossen.<sup>[7b]</sup> Zur Anbindung der GOx wurde die Elektrolytlösung durch eine Lösung von  $1.5 \text{ mg mL}^{-1}$  SATA-GOx-Konjugat (SATA = S-Acetylthioglycolsäure-N-hydroxysuccinimidylester) in 0.1 M PP (pH 7) ersetzt (30 min). Nach Spülen mit 0.2-proz. Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaureat (Tween20) in PP sowie fünfmaligem Spülen mit PP wurde die Zelle mit einer Lösung von 2 mM Fc, 50 mM Glucose und 0.1 M KCl in PP befüllt, die UME auf  $40 \mu\text{m}$  an die Probe angenähert und anschließend bei  $E_T = 0$  mV (Reduktion von Fc<sup>+</sup>) eine Abbildung im GC-Modus aufgezeichnet. Danach wurde die Elektrolytlösung durch jeweils fünfmaliges Entleeren und Befüllen ausgetauscht. Bei  $E_T = 750$  mV (Oxidation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in 50 mM Glucose und 0.1 M KCl in PP wurde im GC-Modus die lokale Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch GOx und bei  $E_T = 0$  mV (Reduktion von Fc<sup>+</sup>) in 2 mM Fc, 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 0.1 M KCl in PP die lokale Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch HRP aufgezeichnet.

Eingegangen am 19. November 2002 [Z50578]

**Stichwörter:** Dünne Filme · Elektrochemische Rastermikroskopie · Enzyme · Musterbildung · Selbstorganisation

- [1] G. A. Urban, G. Jobst in *Frontiers in Biosensorics, Vol. II* (Hrsg.: F. W. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz), Birkhäuser, Basel, **1997**, S. 161–171.
- [2] W. B. Nowall, N. Dontha, W. Kuhr, *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 1237–1244.
- [3] C. G. Bauer, A. V. Eremenko, E. Ehrentreich-Förster, F. F. Bier, A. Markower, H. B. Halsall, W. R. Heineman, F. W. Scheller, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2453–2458.
- [4] *Scanning Electrochemical Microscopy* (Hrsg.: A. J. Bard, M. V. Mirkin), Marcel Dekker, New York, **2001**.
- [5] a) G. Wittstock, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, *370*, 303–315; b) H. Shiku, T. Matsue in *Sensor Updates, Vol. 6* (Hrsg.: H. Balthes, W. Göpel, J. Hesse, M. Esashi, H. Fujita, N. Miura, T. Moriizumi), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 231–240.
- [6] a) S. Sukeerthi, A. Q. Contractor, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2231–2236; b) C. Kurzawa, A. Hengstenberg, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 355–361; c) D. J. Pritchard, H. Morgan, J. M. Cooper, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 84–86; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 91–93; d) N. Dontha, W. B. Nowall, W. Kuhr, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2619–2625; e) D. T. Chiu, N. L. Jeon, S. Huang, R. S. Kane, C. J. Wargo, I. S. Choi, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 2408–2413; f) M. N. Yousaf, B. T. Houseman, M. Mrksich, *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA* **2001**, 98, 5992–5996; g) R. D. Egeland, F. Marken, E. M. Southern, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 1590–1596; h) E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, A. Bitsch, B. Michel, H. Biebuyck, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 500–508.
- [7] a) G. Wittstock, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 5059–5066; b) T. Wilhelm, G. Wittstock, *Electrochim. Acta* **2001**, 47, 275–281; c) I. Turyan, T. Matsue, D. Mandler, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3431–3435; d) S. Xu, G.-Y. Liu, *Langmuir* **1997**, 13, 127–129; e) J. K. Schroer, R. M. Crooks, *Langmuir* **1997**, 13, 2323–2332; f) J. R. Kenseth, J. A. Harnisch, V. W. Jones, M. D. Porter, *Langmuir* **2001**, 17, 4105–4112; g) R. D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. Hong, C. A. Mirkin, *Science* **1999**, 283, 661–663; h) S. Gaspar, M. Mosbach, L. Wallmann, T. Laurell, E. Csoeregi, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4254–4261; i) C. A. Wijayawardhana, G. Wittstock, H. B. Halsall, W. R. Heineman, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 333–338.
- [8] T. Wilhelm, G. Wittstock, *Langmuir* **2002**, 18, 9485–9493.
- [9] Es bildet sich ein an die Oberfläche gebundenes und in sich vernetztes Gel mit einer Dicke von 60 nm.<sup>[8]</sup>
- [10] J. L. Amphlett, G. Denuault, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 9946–9951.