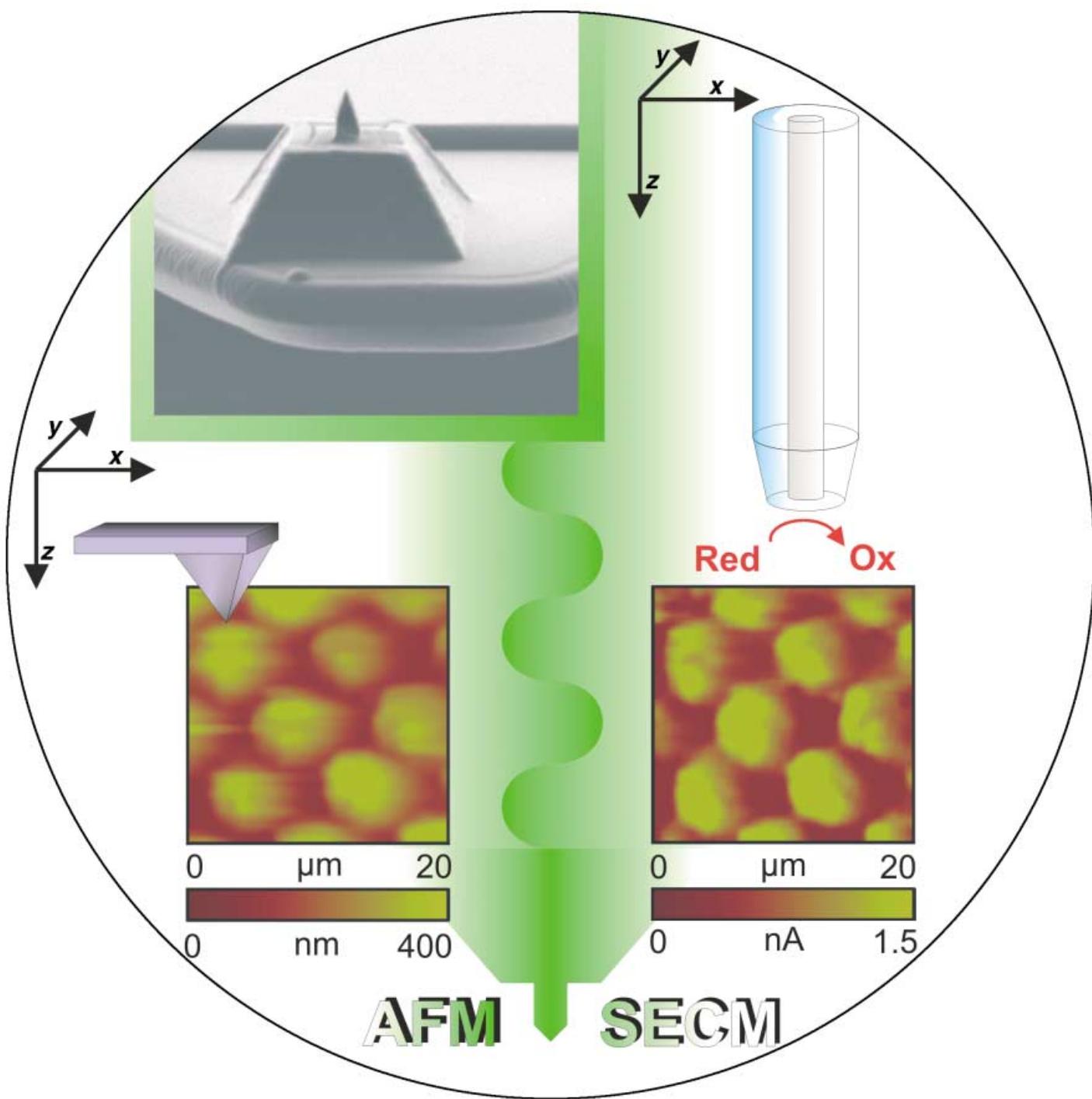


Zuschriften



Oberflächentopographie und Enzymaktivität von weichen, bioaktiven Proben können durch ein neuartiges Verfahren simultan untersucht werden. Mehr zu dieser Technik, einer Kombination aus Rasterkraftmikroskopie und Rastersondenmikroskopie, erfahren Sie in der Zuschrift von C. Kranz et al. auf den folgenden Seiten.

Untersuchung lokaler Reaktivität

Simultane topographische und elektrochemische Abbildung von Enzymaktivität mit integrierten AFM-SECM-Rasternahfeldsonden im AFM-Tapping-Modus**

Angelika Kueng, Christine Kranz,* Alois Lugstein, Emmerich Bertagnoli und Boris Mizaikoff

Seit ihrer Einführung 1986^[1] hat sich die Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM) zu einer Routinemethode zur Untersuchung biologischer Proben entwickelt. Zur Abbildung weicher Probenoberflächen bioaktiver Spezies wird AFM vor allem im Tapping-Modus betrieben.^[2] Wegen der deutlich verringerten Kontaktzeit der Spitze mit der Probenoberfläche im Tapping-Modus werden Reibungskräfte minimiert und einer Zerstörung der Probe vorgebeugt.^[3] Die Untersuchung biologischer Proben mit AFM umfasst unter anderem die Abbildung struktureller^[4] und mechanischer^[5] Eigenschaften individueller Proteine unter physiologischen Bedingungen sowie die Echtzeitmessung von Protein-Protein-Wechselwirkungen.^[6] Die direkte Abbildung von Enzymaktivität gelang in Studien an adsorbierten Proteinen auf Glimmeroberflächen durch Messung der Höhenauslenkung des Cantilevers (Abtastfeder)^[7] oder durch Aufnahme von Kraft-Abstands-Kurven.^[8] Trotz hoher inhärenter Sensitivität sind solche Anwendungen für gewöhnlich auf atomar flache, synthetische Proben beschränkt. Bis heute gelang mit keiner dieser Methoden die selektive Detektion des molekularen Produkts einer enzymatischen Substratumsetzung.

Die Kombination komplementärer Techniken in der Rastersondenmikroskopie (scanning probe microscopy, SPM) ermöglicht neben der topographischen Abbildung die simultane Untersuchung physikalischer und chemischer Eigenschaften der Probenoberfläche. Da viele biochemisch relevante Prozesse auf elektrochemischen Reaktionen beruhen, besteht besonderes Interesse an analytischen Methoden, die lateral aufgelöste Information über gekoppelte Oxidations-/Reduktionsprozesse liefern. Die Kombination von AFM mit elektrochemischer Rastersondenmikroskopie (scanning electrochemical microscopy, SECM) ermöglicht

erstmals die simultane ortskorrelierte Erfassung der (elektro)chemischen Oberflächenaktivität während der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung.

Die SECM bietet die einzigartige Möglichkeit, *in situ* Informationen über eine Vielzahl von (elektro)chemischen Prozessen an Flüssig-fest- und Flüssig-flüssig-Phasengrenzen zu erhalten.^[9] Die Erzeugung des bildgebenden Signals in SECM beruht auf der oberflächeninduzierten Änderung des Faraday-Stroms an einer Ultramikroelektrode (UME). Durch Anlegen eines entsprechenden Potentials an die UME wird durch hemisphärische Diffusion einer redoxaktiven Spezies zur UME und deren Umsetzung ein Faraday-Strom erzeugt. Der Strom wird durch die Oberflächeneigenschaften der Probe beeinflusst, wenn die UME im Nahfeld über die Probenoberfläche gerastert wird.^[10] SECM wurde bereits erfolgreich zur Untersuchung von biologischen Proben, z.B. zur lokализierten Abbildung von Enzymaktivität^[11] oder zur räumlich aufgelösten Detektion von freigesetzten Neurotransmittern,^[12] angewendet. Ein entscheidender Nachteil gegenüber AFM und SPM ist jedoch die eingeschränkte laterale Auflösung aufgrund der signalabhängigen Positionierung der UME im konventionellen Betriebsmodus, bei dem die UME in konstanter Höhe über die Probenoberfläche gerastert wird.^[13] Eine Verbesserung der lateralen Auflösung von SECM setzt daher eine stromunabhängige Positionierung der Elektrode im Nahfeld voraus. Insbesonders erfordert die Anwendung von Nanoelektroden die genaue Kontrolle des Abstandes zwischen Elektrode und Probenoberfläche.

Eine besonders attraktive Strategie – neben der Entwicklung eines auf Scherkräften beruhenden Modus, der Elektroden in gleichbleibendem Abstand über die Probenoberfläche rastert^[14] – ist die Kombination von AFM mit SECM. Komplementäre elektrochemische und topographische Information wird dabei mit hoher lateraler Auflösung in einer diskreten zeit- und ortskorrelierten Messung erfasst.^[15] AFM-Spitzen mit integrierten UMEs erweitern die analytische Kapazität der Rasternahfeldmikroskopie maßgeblich. Eine elegante und vielseitige Methode zur Kombination von SECM mit AFM beruht auf dem Einsatz von Mikrofertigungssprozessen zur Integration von Submikro- oder Nanoelektroden in AFM-Spitzen.^[16] Die Integration einer elektroaktiven Fläche in einem genau definierten Abstand von der Spitze der AFM-Sonde gewährleistet den konstanten Abstand der Elektrode von der Probenoberfläche unabhängig von deren Topographie. Dies ermöglicht die simultane elektrochemische Datenerfassung im AFM-Kontaktmodus und AFM-Tapping-Modus.^[17]

Wir beschreiben hier erstmals den Einsatz difunktionaler Sonden mit integrierten Elektroden (Abbildung 1) zur simultanen Abbildung der topographischen und elektrochemischen Eigenschaften einer biologisch aktiven Probe im AFM-Tapping-Modus. Eine periodische Mikrostruktur wurde als Modellsystem eingesetzt. Die Poren dieser Struktur wurden mit einem weichen Polymer gefüllt, in dessen Matrix die Oxidoreduktase Glucose-Oxidase (GOD) eingeschlossen wurde. Mithilfe der difunktionalen Rastersonden kann während der Erfassung der Topographie die lokale Enzymaktivität abgebildet werden.

[*] Dr. C. Kranz, Dr. A. Kueng, Prof. B. Mizaikoff
School of Chemistry and Biochemistry
Georgia Institute of Technology
Atlanta, GA 30332-0400 (USA)
Fax: (+1) 404-894-7452
E-mail: christine.kranz@chemistry.gatech.edu

Dr. A. Lugstein, Prof. E. Bertagnoli
Institut für Festkörperelektronik
Technische Universität Wien
Floragasse 7, 1040 Wien (Österreich)

[**] Diese Arbeit wurde von der NSF (Projekt 0216368 im Programm „Biocomplexity in the Environment“), der Max Kade Foundation und dem österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekte P14122-CHE und J2230) unterstützt. Die hier beschriebene Technik ist Gegenstand der PCT-Patentanmeldungen WO2001094877A1 und WO2001094926A1.

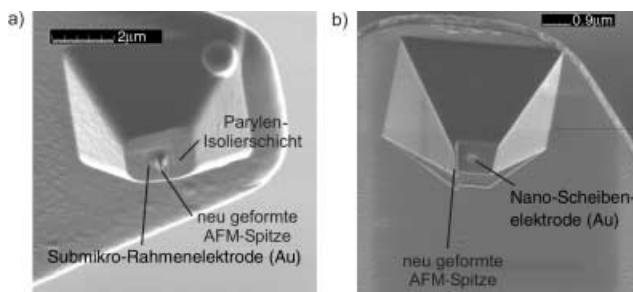


Abbildung 1. Focused-Ion-Beam(FIB)-Abbildungen a) einer integrierten Submikro-Rahmenelektrode mit einer Kantenlänge von 770 nm und einer Spitzenhöhe von 700 nm und b) einer integrierten Scheibenelektrode mit einem Durchmesser von 300 nm.

Die integrierten AFM-SECM-Rastersonden werden aus herkömmlichen Si_3N_4 -Cantilevern mit pyramidalen Spitzen gefertigt. Die Cantilever werden mit Gold beschichtet (100 nm Dicke) und danach mit einer 700 nm dicken Schicht eines Xylylenpolymers (Parylen C) durch Gasphasenabscheidung (chemical vapor polymerization, CVP) isoliert. Eine elektroaktive Fläche mit definierter Geometrie und Größe, die von der ursprünglichen Rasterkraftspitze zurückversetzt ist, wurde in mehreren Fertigungsschritten mithilfe eines fokussierten Galliumionenstrahls (focused ion beam, FIB) reproduzierbar hergestellt. Nach Freilegen der elektroaktiven Fläche wird die ursprüngliche AFM-Spitze mit einem fokussierten Ionenstrahl entsprechend dem Elektrodendurchmesser gekürzt, um den optimalen Arbeitsabstand zwischen der integrierten Elektrode und der Probenoberfläche herzustellen. Diese Technik ermöglicht die Nachbearbeitung der AFM-Spitze, um ein hohes Aspektverhältnis und eine entsprechend gute Qualität der AFM-Abbildung zu gewährleisten (Abbildung 1). Mit diesem Verfahren können unterschiedlichste Elektrodengeometrien wie die Rahmenelektrode (Abbildung 1a) und die Scheibenelektrode (Abbildung 1b) realisiert werden. Eine ausführliche Beschreibung des Fertigungsprozesses und der Elektrodencharakterisierung wurde bereits veröffentlicht.^[16,17]

Um die Leistungsfähigkeit und Auflösung der AFM-SECM-Rastersonden zu prüfen, wurden unterschiedliche Proben im AFM-Kontaktmodus und SECM-Rückkopplungsmodus (feedback mode) untersucht.^[16,17] Wie bereits in früheren Studien gezeigt wurde, ähnelt die Qualität der topographischen Abbildung mit integrierten Sonden der mit nichtmodifizierten Si_3N_4 -AFM-Cantilevern.^[18]

Zur Abbildung der Enzymaktivität im AFM-Tapping-Modus wurde eine nichtleitende periodische Mikrostruktur eingesetzt, deren Poren mit einer enzymhaltigen Polymermatrix gefüllt wurden (Abbildung 2). Die Mikrostruktur besteht aus einem goldbeschichteten Siliciumwafer, auf den eine 450 nm dicke Siliciumnitridschicht mit einer periodischen Porenstruktur aufgebracht wurde (Quantifoil). Glucose-Oxidase wurde in den leitfähigen Poren durch elektrochemisch induzierte Abscheidung einer Polymersuspension immobilisiert.^[19] Die simultane topographische und elektrochemische Abbildung der Enzymaktivität wurde mit der in Abbildung 1a dargestellten integrierten Submikro-Rahmenelektrode ausgeführt. Die Anwendung von difunktionalen

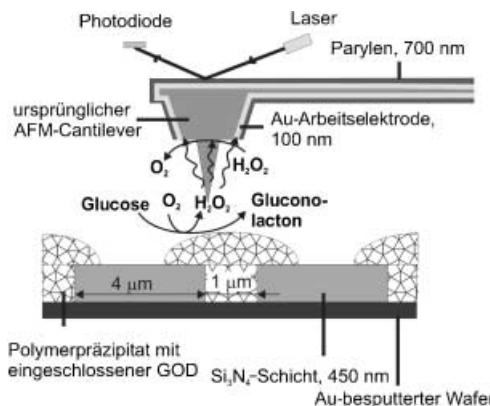


Abbildung 2. Schema der simultanen AFM-SECM-Messung. Dargestellt sind Reaktionen, die an der Oberfläche und an der integrierten Elektrode während der Messungen im Generator-Kollektor-Modus ablaufen.

Spitzen im AFM-Tapping-Modus ist eine Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Abbildung von weichen, biologischen Probenoberflächen oder Polymeren und wurde erst kürzlich beschrieben.^[20] Es konnte gezeigt werden, dass elektrochemische Abbildungen, die simultan im Tapping-Modus aufgenommen wurden, eine ähnliche Stromsignalhöhe und laterale Auflösung wie Abbildungen der gleichen Probe im Kontaktmodus aufweisen.

Zur ortsaufgelösten elektrochemischen Detektion der Glucose-Oxidase-Aktivität wurde der SECM-Generator-Kollektor-Modus^[21] angewendet. In Gegenwart des Substrates Glucose wird H_2O_2 lokal als Nebenprodukt der enzymatischen Reaktion gebildet (Abbildung 2). GOD katalysiert die Umsetzung von Glucose zu Gluconolacton. H_2O_2 wird unmittelbar an der integrierten Elektrode detektiert, deren Potential bei 750 mV (gegen Ag/AgCl-Quasireferenzelektrode) konstant gehalten wird. Abbildung 2 zeigt das schematische Messprinzip und die beteiligten Reaktionen.

Abbildung 3 zeigt mithilfe difunktionaler AFM-SECM-Spitzen im Tapping-Modus simultan aufgenommene Abbildungen der Topographie/Höhe (a, d), des Amplitudensignals des Cantilevers (b, e) und des elektrochemischen Signals/Faraday-Stroms (c, f) in glucosefreier Lösung (a–c) und in Gegenwart von Glucose (d–f). Abbildungen der Amplitude (Abbildung 3b and e) unterdrücken kleine Höhenvariationen und heben die Kanten topographischer Merkmale durch erhöhten Kontrast hervor.

In glucosefreier Lösung findet keine enzymatische Umsetzung statt, und der Strom, der an der Elektrode während des Abrasters der enzymhaltigen Polymerstrukturen im AFM-Tapping-Modus gemessen wird, ist vernachlässigbar klein. Die enzymhaltigen Strukturen können daher elektrochemisch nicht abgebildet werden (Abbildung 3c). In Gegenwart von Glucose steigt der an der Submikroelektrode gemessene Strom aufgrund der lokalen Erzeugung von H_2O_2 an den GOD-haltigen Polymerstrukturen (Abbildung 3f). Die Periodizität der Polymerstruktur in der elektrochemischen Enzymaktivitätsabbildung stimmt mit der simultan gemessenen topographischen Struktur überein.

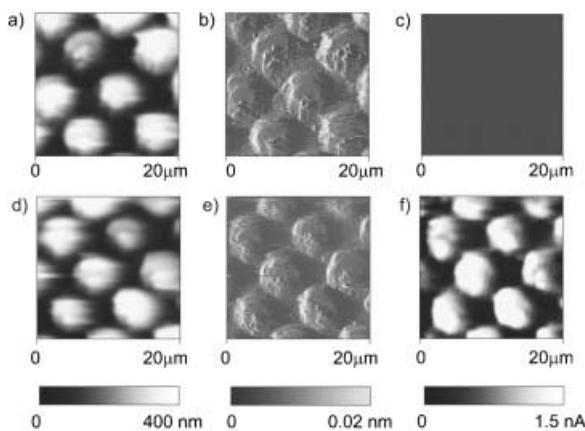


Abbildung 3. Simultane Messungen im AFM-Tapping-Modus: Höhen- und Stromabbildungen periodischer Polymerstrukturen und der Glucose-Oxidase-Aktivität mit einer freien Betriebsamplitude von 5 V und einer Betriebsfrequenz von 32.4 kHz; Höhenabbildungen (a und d), zugehöriger Amplitudenmodus (b und e) und simultan gemessener Faraday-Strom (c und f), aufgenommen in luftgesättigtem Phosphatpuffer (0.1 mol L^{-1} , pH 7.4) in glucosefreier Lösung (a–c) und in Gegenwart von Glucose (d–f; 50 mmol L^{-1}). An die Spitze wurde ein Potential von 0.75 V (gegen Ag/AgCl-Quasireferenzelektrode) angelegt. Kantenlänge der Elektrode 770 nm, Spitzenhöhe 700 nm, Scanschwindigkeit 3 Hz.

Die Ergebnisse demonstrieren erstmals die Anwendbarkeit integrierter AFM-SECM-Rasternahfeldmikroskopie zur Abbildung weicher, bioaktiver Proben mit enzymatischer Redoxaktivität im Tapping-Modus. Die Untersuchung komplexer biologischer Systeme und molekularbiologischer Wechselwirkungen, z.B. von Signalprozessen an Zelloberflächen, erfordert die simultane Erfassung mehrerer Parameter und deren räumliche und zeitliche Korrelation. Die Entwicklung difunktionaler AFM-SECM-Rastersonden ist ein bedeutender methodischer Fortschritt in der Rasternahfeldmikroskopie und ein erster Schritt hin zu verfeinerten analytischen Messtechniken zur Untersuchung komplexer Bioprozesse im Nanometerbereich. Mit der beschriebenen Mikrofertigungstechnik können integrierte Rahmen- und Ringelektroden mit Kantenlängen und Durchmessern von bis zu 300 nm und integrierte Scheibenelektroden mit Durchmessern von unter 100 nm realisiert werden. Diese Elektrodenabmessungen entsprechen bereits biologisch relevanten Dimensionen, wodurch eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten für biologische Substrate und zur Untersuchung relevanter Bioprozesse zugänglich wird.

Experimentelles

Probenvorbereitung für die Abbildung der Enzymaktivität (Abbildung 2): Eine wässrige Lösung von Glucose-Oxidase (5 mg mL^{-1}) und Canguard-PolymerSuspension ($70 \mu\text{L mL}^{-1}$) wurde vor Gebrauch mindestens 30 min bei 4°C aufbewahrt. Zur Polymerisation wurde ein Potentialpulsprofil (2200 mV für 0.2 s, 800 mV für 1 s, Ruheperiode (0 mV) für 5 s; gegen Ag/AgCl-Quasireferenzelektrode) in zwölf Zyklen angelegt, wodurch die Abscheidung eines enzymhaltigen Polymerfilms in den Poren der Probe initialisiert wurde. Die Probe wurde mit Wasser und Phosphatpuffer (0.1 mol L^{-1} , pH 7.4)

gespült und vor den AFM-SECM-Messungen mindestens 12 h bei 4°C aufbewahrt.^[19]

Alle Messungen wurden mit einem Nanoscope-III-AFM-Gerät (Digital Instruments, Santa Barbara) in einer Tapping-Modus-Flüssigkeitszelle mit Zugängen für eine Pt-Gegenelektrode und eine Ag/AgCl-Quasireferenzelektrode ausgeführt. Das Ausgangssignal des Bipotentiostaten (CH-Instruments, Austin) wurde in den zusätzlichen AD-Kanal des AFM-Geräts eingelesen. Eine detaillierte Beschreibung der Versuchsanordnung wurde bereits veröffentlicht.^[16–18] Der an der integrierten Elektrode gemessene Strom wird simultan zu den topographischen Messungen aufgezeichnet.

Eingegangen am 5. Februar 2003 [Z51111]

Stichwörter: Analytische Methoden · Elektrochemie · Enzyme · Rastersondenverfahren · Tapping-Modus

- [1] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930–933.
- [2] P. K. Hansma, J. P. Cleveland, M. Radmacher, D. A. Walters, P. E. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie, H. G. Hansma, C. B. Prater, J. Massie, L. Fukunaga, J. Gurley, V. Elings, *Appl. Phys. Lett.* **1994**, *64*, 1738–1740.
- [3] C. A. J. Putman, K. O. van der Werf, B. G. De Groot, N. F. Van Hulst, J. Greve, *Appl. Phys. Lett.* **1994**, *64*, 2454–2456; C. Le Grimellec, M.-C. Giocondi, R. Pujol, E. Lesniewska, *Single Mol.* **2000**, *1*, 105–107.
- [4] D. J. Muller, A. Engel, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 1347–1351.
- [5] F. Oesterhelt, D. Oesterhelt, M. Pfeiffer, A. Engel, H. E. Gaub, D. J. Müller, *Science* **2000**, *288*, 143–146; M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, H. E. Gaub, *Science* **1997**, *276*, 1109–1112.
- [6] M. B. Viani, L. I. Pietrasanta, J. B. Thompson, A. Chand, I. C. Gebeshuber, J. H. Kindt, M. Richter, H. G. Hansma, P. K. Hansma, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 644–647.
- [7] M. Radmacher, M. Fritz, H. G. Hansma, P. K. Hansma, *Science* **1994**, *265*, 1577–1579.
- [8] Z. Yingge, Z. Delu, B. Chunli, W. Chen, *Life Sci.* **1999**, *65*, PL253–PL260.
- [9] M. V. Mirkin, B. R. Horrocks, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *406*, 119–146.
- [10] J. Kwak, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1221–1227.
- [11] D. T. Pierce, A. J. Bard, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3598–3604.
- [12] A. Hengstenberg, A. Blöchl, I. D. Dietzel, W. Schuhmann, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 942–946; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 905–908.
- [13] A. J. Bard, F. R. F. Fan, M. V. Mirkin in *Electroanalytical Chemistry*, Vol. 18 (Hrsg.: A. J. Bard), Marcel Dekker, New York, **1994**, S. 268–293.
- [14] A. Hengstenberg, C. Kranz, W. Schuhmann, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1548–1554.
- [15] C. E. Gardner, J. V. Macpherson, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 576A–584A; J. V. Macpherson, P. R. Unwin, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 550, zit. Lit.
- [16] C. Kranz, G. Friedbacher, B. Mizaikoff, A. Lugstein, J. Smoliner, E. Bertagnolli, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2491–2500.
- [17] A. Lugstein, E. Bertagnolli, C. Kranz, A. Kueng, B. Mizaikoff, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *81*, 349–351.
- [18] C. Kranz, B. Mizaikoff, A. Lugstein, E. Bertagnolli, *ACS Symp. Ser.* **2002**, *811*, 320–336.
- [19] C. Kurzawa, A. Hengstenberg, W. Schuhmann, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 355–361.
- [20] A. Kueng, C. Kranz, B. Mizaikoff, A. Lugstein, E. Bertagnolli, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *82*, 1592–1594.
- [21] G. Wittstock, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, *370*, 303–315.