

Bioelektrokatalyse und Magnete

Magnetische Kontrolle elektrokatalytischer und bioelektrokatalytischer Prozesse

Itamar Willner* und Eugenii Katz

Stichwörter:

Biosensoren · Elektrochemie · Magnetische Teilchen · Nanotechnik

Die Bioelektronik ist ein sehr dynamisches interdisziplinäres Forschungsgebiet, das große Bedeutung für die Entwicklung von Biosensoren, Biobrennstoffzellen, Computern, die auf Biomaterialien basieren, und bioelektronischen Funktionseinheiten hat. Mit der magnetisch gesteuerten molekularen und Bioelektronik ist nun ein neues Thema hinzugereten, das sich mit dem Einfluss eines äußeren Magnetfelds auf elektrokatalytische und bioelektrokatalytische Prozesse funktionalisierter magnetischer Teilchen an Elektroden befasst. Hier beschreiben wir die Fortschritte, die bei der Entwicklung magnetisch schaltbarer elektrokatalytischer und bioelektrokatalytischer Transformationen gemacht wurden, und diskutieren den Einfluss der Rotation der magnetischen Teilchen auf diese Prozesse. Darauf hinaus wird die Bedeutung dieser Ergebnisse für die Entwicklung von Biosensoren, amplifizierenden Immun- und DNA-Sensoren erläutert.

Einleitung

Die Bioelektronik ist ein sehr dynamisches Forschungsgebiet, das die Entwicklung von Biosensoren, beispielsweise Enzym-basierten Sensoren,^[1] Immun-^[2] und DNA-Sensoren,^[3] den Bau von Elementen für Biobrennstoffzellen,^[4] die Herstellung bioelektronischer^[5] und mechanischer Funktionseinheiten,^[6] die Konstruktion elektronischer Schaltkreise^[7] und die Nutzung von Biomaterialien für Computerkomponenten^[8] umfasst.

Die Möglichkeit, Signale durch molekulare^[9] und biomolekulare Redoxvorgänge^[10] auszulösen, stimulierte Arbeiten zur Entwicklung informationsverarbeitender Funktionseinheiten, logischer Bauelemente und molekularer Maschinen. So wurden chemische Stimuli wie pH-Änderungen dazu genutzt, Redoxvorgänge zu aktivieren,^[11] und es wurde vorgeschlagen, das photochemische Auslösen schaltbarer Redoxvorgänge als Methode zur elektronischen Fortleitung

gespeicherter photischer Information zu nutzen.^[12] Auch photochemische Isomerisierungen supramolekularer Assoziate, die mit dem mechanischen Schalten molekularer Komponenten zwischen zwei diskreten Zuständen einhergehen, wurden als Mittel zur Datenspeicherung und -verarbeitung erörtert^[13] und über erste Versuche, einen molekularen Computer herzustellen, ist berichtet worden.^[14] Die photochemische Aktivierung der Redoxfunktion von Enzymen ist gelungen, und Systeme aus Biomaterialien, die gespeicherte photische Informationen elektronisch weiterleiten können, wurden detailliert untersucht.^[15] So wurde berichtet, dass sich bei Redoxproteinen mit photoisomerisierbaren Einheiten^[15a] und bei Apoproteinen, die mit photoisomerisierbaren Cofaktoren rekonstituiert sind,^[15b,c] die biokatalytischen Protein-funktionen zwischen den Zuständen „An“ und „Aus“ schalten lassen. Auch wurden photoisomerisierbare Grenzflächen als „Kommando-Oberflächen“ genutzt, um eine Kommunikation zwischen Redoxprotein und Elektrodenmaterial sicherzustellen oder um eine „An-aus“-Stimulierung bei Elektronentransfer-Enzymkaskaden zu erreichen.^[16]

Im Folgenden geben wir einen Überblick über die wissenschaftlichen Fortschritte, die bei der Steuerung und beim Schalten elektrokatalytischer und bioelektrokatalytischer Prozesse durch einen externen Magneten erzielt werden sind. Weiterhin erörtern wir mögliche Anwendungen derartiger Systeme bei der Entwicklung von Biosensoren und bei der Herstellung neuer optobioelektronischer Systeme. Wir betonen dabei die Nutzung rotierender Magnetfelder zur Verbesserung elektrokatalytischer und bioelektrokatalytischer

[*] Prof. I. Willner, Dr. E. Katz
Institute of Chemistry
The Hebrew University of Jerusalem
Jerusalem 91904 (Israel)
Fax: (+972) 2-6527-715
E-mail: willnea@vms.huji.ac.il

scher Transformationen, um neue Konzepte für amplifizierende Biosensoren und für die Beschleunigung von Bioerkennungsprozessen herauszustellen. Viel Energie wurde in die Entwicklung von Biosensoren mit magnetischen Teilchen gesteckt, und kreative Verfahren zur Beschichtung magnetischer Partikel mit Biomaterialien wie Antigenen/Antikörpern^[17] oder Nucleinsäuren^[18] für Immun- bzw. DNA-Sensoren wurden entwickelt. Bei diesen Systemen werden die magnetischen Teilchen als Matrix zur Bildung, Isolierung und physikalischen Trennung der Bioerkennungskomplexe aus komplizierten biologischen Gemischen mithilfe eines externen Magneten genutzt. Anders ausgedrückt ermöglicht die Anziehung zwischen einem externen Magneten und den funktionalisierten magnetischen Partikeln deren Reinigung durch einfaches Waschen und gestattet daher das Anreichern der biologischen Erkennungspaare. Während es in bisherigen Veröffentlichungen um die Verwendung von magnetischen Partikeln als Vehikel zur physikalischen Translokation der an sie gebundenen Biomaterialien ging,^[17–19] stellen wir hier neuere Arbeiten vor, in denen elektrochemische Transformationen mithilfe funktionalisierter magnetischer Partikel durchgeführt werden, die wiederum durch ein äußeres Magnetfeld an das Elektrodenmaterial gebunden sind.

Herstellung und Reaktionen funktionalisierter magnetischer Partikel

Magnetit-Partikel^[20] (Fe_3O_4 , Sättigungsmagnetisierung ca. 65 emug⁻¹, mittlerer Durchmesser ca. 1 μm) wurden mit einem Aminopropylsiloxanfilm überzogen. An diese Partikel wurden kovalent unterschiedliche redoxaktive Moleküle geknüpft: 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon (**1**), *N*-Ferrocenyl-methyl-6-aminohexansäure (Fc, **2**), *N*-Carboxyundecyl-*N'*-methyl-4,4'-bipyridinium (**3**), das Pyrrolochinolinchinon **4** (PQQ) und Mikroperoxidase-11 (MP-11, **5**) (Schema 1A und B).^[21]

Das Schalten der elektrochemischen Aktivität dieser funktionalisierten Partikel mit einem externen Magneten ist in Schema 2 A dargestellt. Durch die Anziehungskraft des externen Magneten werden die magnetischen Partikel an die Elektrodenoberfläche geführt, wodurch der elektrische Kontakt zwischen den Redoxeinheiten R und der Elektrode hergestellt wird und die Redoxeigenschaften der Komponen-

ten aktiviert werden. Positioniert man den Magneten über der elektrochemischen Zelle, werden die magnetischen Partikel wieder von der Elektrode abgezogen, und ihre elektrochemische Aktivität wird ausgeschaltet.

In Abbildung 1 sind die Ergebnisse der reversiblen, Magnetfeld-induzierten Kontaktherstellung und -unterbrechung für magnetische Partikel zusammengefasst, die mit dem Aminonaphthochinon **6** ($E^\circ = -0.39 \text{ V}$ vs. SCE bei pH 7.0) bzw. dem Ferrocenderivat **2** ($E^\circ = 0.32 \text{ V}$ vs. SCE) funktionalisiert waren. Die elektrochemische Aktivierung der auf die magnetischen Partikel aufgebrachten Redoxeinheiten ermöglicht die sekundäre, magnetisch gesteuerte schaltbare Aktivierung/Desaktivierung elektrokatalytischer Prozesse. So wirkt das Pyrrolochinolinchinon PQQ (**4**, $E^\circ = -0.16 \text{ V}$ vs. SCE bei pH 8.0) als Elektrokatalysator bei der Oxidation von 1,4-Dihydro- β -nicotinamid-adenin-dinukleotid (NADH).^[22] Entsprechend ließ sich bei Verwendung PQQ-funktionalisierter Partikel (mittlere Oberflächenbeladung 7.5×10^3 PQQ-Moleküle pro Partikel) die elektrokatalytische Oxidation von NADH mit einem externen Magneten steuern.^[21b] Abbildung 2 A zeigt die zyklisch schaltbare Aktivierung/Desaktivierung der elektrokatalytischen Oxidation von NADH durch PQQ-funktionalisierte Partikel über deren Anziehung an die und Ablösung von der Elektrode unter dem Einfluss eines externen Magneten. In ähnlicher Weise wurden mit MP-11 (**5**) funktionalisierte Partikel zur magnetisch gesteuerten, elektrokatalytischen Reduktion von Wasserstoffperoxid herangezogen.^[21b]

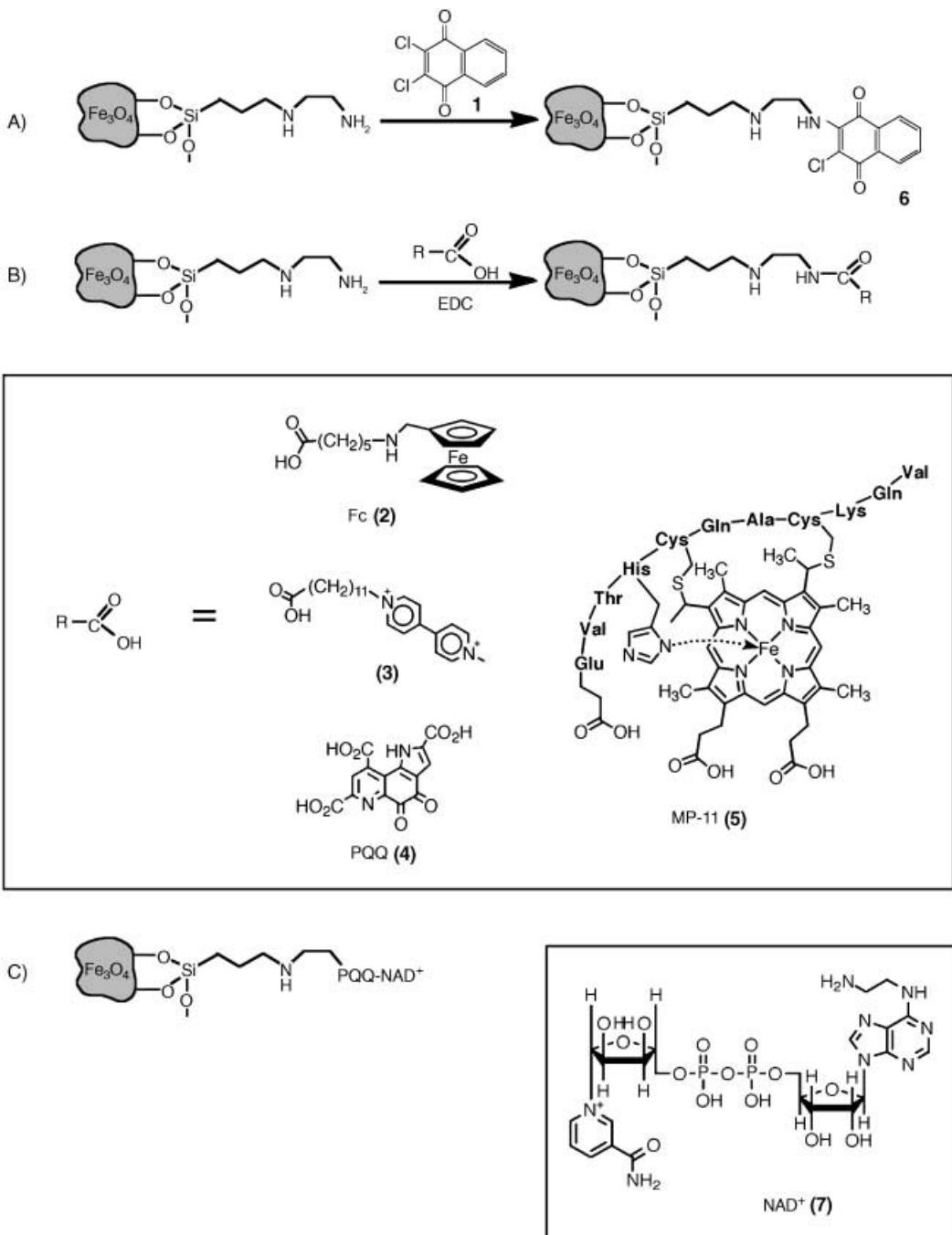
Elektronenrelaiseinheiten fungieren als Elektronentransfer-Vermittler, die sowohl mit dem Redoxenzym als auch mit dem Elektrodenmaterial elektrisch kommunizieren. Mit einem Ferrocen-Redoxrelais beispielsweise lässt sich ein elektrischer Kontakt zu oxidierenden Redoxenzymen wie Glucose-Oxidase (GOx) und mit einem Bipyridinium-Redoxrelais einer zu reduzierenden Biokatalysatoren wie Nitrat-Reduktase herstellen.^[23] Daher ermöglicht die Aktivierung der Redoxfunktion eines Redoxrelais-funktionalisierten magnetischen Partikels auch die Aktivierung/Desaktivierung bioelektrokatalytischer Transformationen mithilfe eines externen Magneten.^[21] In Schema 2 B ist die magnetisch schaltbare Aktivierung von Redoxenzymen in Gegenwart Elektronenrelais-funktionalisierter magnetischer Partikel skizziert. Ein Beispiel für die praktische Umsetzung dieses Schemas ist die bioelektrokatalytische Oxidation von Gluco-



Itamar Willner wurde 1947 geboren und erhielt 1978 von der Hebrew Universität in Jerusalem den PhD in Chemie. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei M. Calvin an der University of California, Berkeley, von 1978 bis 1981 trat er 1981 eine Stelle am Institut für Chemie der Hebrew Universität an und wurde dort 1986 zum Professor ernannt. Er gehört den Herausgebergruppen (Editorial Boards) mehrerer Fachzeitschriften an und erhielt den Kolthoff Award, den Max Planck Research Award for International Cooperation, den Israel Chemical Society Award (2001) und den Israel Prize in Chemistry (2002). Er ist Mitglied der Israel Academy of Sciences.



Eugenii Katz wurde 1952 in Moskau geboren. Er erhielt seinen PhD 1983 vom Frumkin Institut für Elektrochemie, Moskau, und war bis 1991 als wissenschaftlicher Mitarbeiter (Research Associate) am Institut für Photosynthese in Puschtschino, Russland, tätig. 1991 folgte ein Postdoc-Aufenthalt bei I. Willner an der Hebrew Universität und 1993 ein Forschungsaufenthalt als Humboldt-Stipendiat bei H.-L. Schmidt an der Technischen Universität München. 1994 trat er als wissenschaftlicher Mitarbeiter (Senior Research Associate) in die Arbeitsgruppe von I. Willner ein.

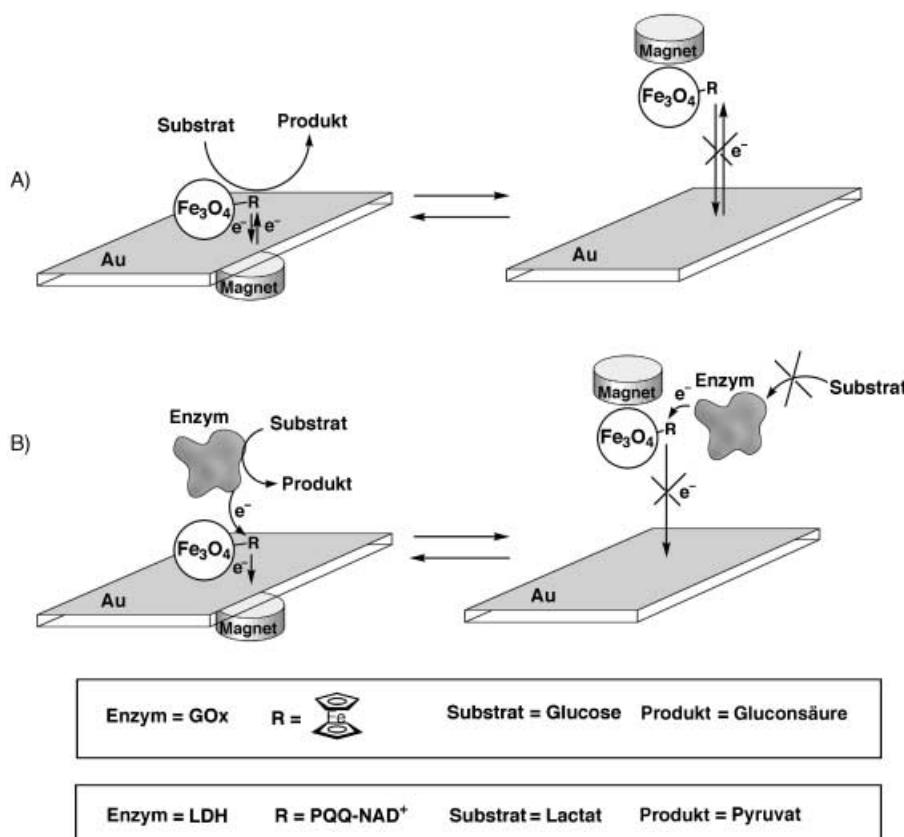


Schema 1. Synthese Relais-funktionalisierter magnetischer Teilchen durch kovalentes Anbinden von redoxaktiven Einheiten an magnetische Partikel, die mit einem [N-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyl]siloxan-Film beschichtet sind: A) Anbinden von 2,3-Dichlor-1,4-naphthoquinon (1) zur Herstellung magnetischer Partikel, die mit dem Aminonaphthoquinon **6** funktionaliert sind. B) Carbodiimid-Kupplung von Carbonsäurederivaten mit Elektronenrelais-Eigenschaften an die Aminogruppen der Siloxanschicht (EDC = 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimid-hydrochlorid). C) Mit der PQQ-NAD⁺-Dyade funktionalierte magnetische Partikel zur elektrochemischen Aktivierung von NAD⁺-abhängigen Enzymen.

se durch GOx, die durch mit dem Ferrocenderivat **Fc (2)** funktionisierte magnetische Teilchen vermittelt wird. Die Fc-funktionalisierten Teilchen werden durch die Magnetanziehung an die Elektrode gebracht, an der die Ferroceneinheiten zu Ferrocenylkationen oxidiert werden. Diese wiederum oxidieren das Redoxzentrum der GOx und aktivieren die bioelektrokatalytische Glucose-Oxidation. Werden die magnetischen Teilchen durch den Magneten wieder von der

Elektrodenoberfläche abgezogen, wird der elektrische Austausch zwischen Elektrode und Ferroceneinheiten unterbrochen und die sekundäre bioelektrokatalytische Glucose-Oxidation blockiert.

In Abbildung 2B sind die Ergebnisse von Versuchen zur magnetischen Aktivierung der bioelektrokatalytischen Oxidation von Glucose dargestellt. Wenn die funktionalisierten magnetischen Teilchen durch den externen Magneten an die



Schema 2. Mit einem externen Magneten gesteuerte elektrokatalytische und bioelektrokatalytische Reaktionen funktionalisierter magnetischer Partikel. A) An- und Abschalten der elektrokatalytischen Reaktion der Redoxrelaisgruppen R, die kovalent an die magnetischen Partikel gebunden sind, sowie das entsprechende Schalten der durch die Redoxgruppen geleisteten elektrokatalytischen Funktion. B) An- und Abschalten der bioelektrokatalytischen Oxidation entweder von Glucose in Gegenwart von GOx und Fc-funktionalisierten magnetischen Partikeln oder von Lactat in Gegenwart von LDH und PQQ-NAD⁺-funktionalisierten magnetischen Partikeln.

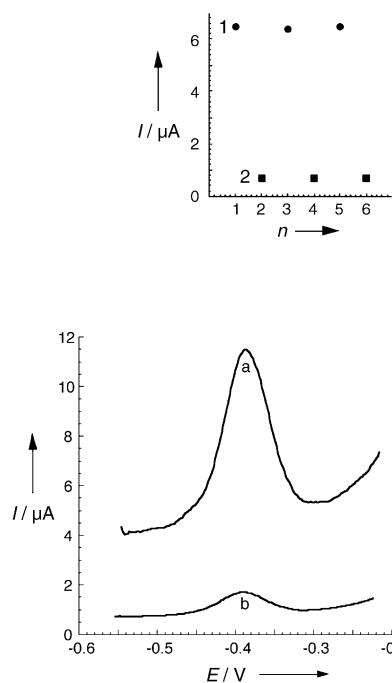
Elektrode gezogen werden, setzt ein Anodenstrom ein, und das Abziehen der magnetischen Teilchen von der Elektrode führt entsprechend zur Blockierung der bioelektrokatalytischen Oxidation. Durch das reversible Hinziehen der magnetischen Teilchen zur Elektrode und Abziehen von ihr lässt sich eine zyklische „An“, „Aus“-Aktivierung und -Desaktivierung des bioelektrokatalytischen Prozesses erreichen. Ein ähnliches Verfahren wurde bei der magnetisch schaltbaren bioelektrokatalytischen Reduktion von Nitrat zu Nitrit verwendet, bei der Nitrat-Reduktase als Biokatalysator und mit dem Bipyridinium **3** funktionalisierte magnetische Teilchen ($E^0 = -0.57 \text{ V}$ vs. SCE) als Redoxvermittler eingesetzt wurden.^[21b] Wurden die Bipyridinium-funktionalisierten magnetischen Teilchen vom externen Magneten an die Elektrode gezogen und ein Potential von $E = -0.7 \text{ V}$ angelegt, verlief die durch das Bipyridinium-Radikalkation vermittelte bioelektrokatalytische Reduktion von Nitrat zu Nitrit mit einer Reaktionsgeschwindigkeit von $6.5 \times 10^{-3} \text{ mm min}^{-1}$. Das Abziehen der Teilchen von der Elektrode (durch Positionierung des Magneten über der elektrochemischen Zelle) bewirkte wieder das Blockieren des bioelektrokatalytischen Prozesses. Durch Positionierung des externen Magneten einmal unter

der Elektrode und einmal über der elektrochemischen Zelle ließ sich die elektrokatalytische Reduktion von Nitrat somit reversibel an- und abschalten.

Funktionalisierte magnetische Teilchen wurden auch bei der zyklischen Aktivierung/Desaktivierung von NAD⁺-abhängigen Enzymen mithilfe externer Magnete eingesetzt. So wurde berichtet,^[24] dass eine Monoschicht aus kovalent verknüpftem PQQ und NAD⁺ an einer Elektrode als aktive Grenzfläche zur Aktivierung NAD⁺-abhängiger Enzyme wie der Lactat-Dehydrogenase (LDH) eingesetzt werden kann. Die biokatalytische Oxidation des Substrats liefert NADH, das von PQQ zu NAD⁺ oxidiert wird. Das entstehende PQQH₂ wird zu PQQ oxidiert und ermöglicht so die elektrochemisch gesteuerte biokatalytische Oxidation eines Substrats wie Lactat. Es wurden daher PQQ-funktionalisierte magnetische Teilchen mit *N*⁶-(2-Aminoethyl)-β-nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD⁺, **7**) versetzt, um PQQ-NAD⁺-modifizierte Partikel zu erzeugen (Schema 1C).^[25] Anschließend konnten die bioelektrokatalytischen Funktionen des NAD⁺-abhängigen Enzyms LDH mit einem externen Magneten gesteuert werden (Schema 2B). Das durch den Magneten ausgelöste Anlagern der

PQQ-NAD⁺-funktionalisierten Partikel an die Elektrode in Gegenwart von LDH aktivierte die bioelektrokatalytische Oxidation von Lactat zu Pyruvat. An die biokatalytische Reduktion des NAD⁺-Cofaktors durch das Lactat schloss sich die Oxidation des entstandenen NADH durch den Elektrokatalysator PQQ an. Durch Anlegen eines zur Oxidation des so erzeugten PQQH₂ geeigneten Potentials ($E = 0.05 \text{ V}$ vs. SCE) ließ sich der Elektrokatalysator regenerieren. Auf diese Art gelang die kontinuierliche bioelektrokatalytische Oxidation von Lactat zu Pyruvat in Gegenwart von LDH. Der elektrokatalytische Anodenstrom des Systems nahm mit zunehmender Lactatkonzentration zu und erreichte bei einer Stromdichte von $i_{\max} = 1.8 \mu\text{A cm}^{-2}$ und einer Lactatkonzentration von 50 mM ein Plateau. Die genauere Analyse der elektrokatalytischen Oxidation von Lactat zu Pyruvat durch LDH mithilfe der Steady-State-Elektrolyse ergab, dass Pyruvat mit einer Geschwindigkeit von 0.13 mM min^{-1} gebildet wird. Das Abziehen der Teilchen von der Elektrode (durch Positionierung des Magneten über der elektrochemischen Zelle) bewirkte den Abbruch der bioelektrokatalytischen Lactat-Oxidation. Durch Positionierung des externen Magneten einmal unter der Elektrode und einmal über der

A)



B)

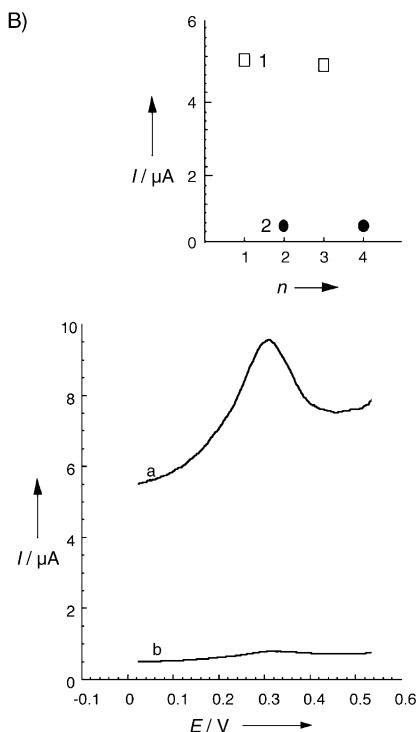


Abbildung 1. Die Elektrochemie Relais-funktionalisierter magnetischer Partikel, die sich mithilfe eines externen Magneten reversibel an- und abschalten lässt. A) Für Partikel, die mit dem Amnonaphthochinon **6** funktionaliert sind, B) für Partikel, die mit dem Ferrocen **2** funktionaliert sind. Unten: Differentialpulsvoltammogramme aufgenommen a) während die Partikel magnetisch an die Elektrodenoberfläche herangezogen wurden, b) während sie magnetisch von ihr abgezogen wurden. Oben: Reversible Veränderungen der Peakstromstärke im Differentialpulsvoltammogramm als Folge des magnetischen An- (1) und Abschaltens (2) der Redoxwirkung der funktionalisierten Partikel; n = Zahl der Schritte. Die Daten wurden mit funktionalisierten magnetischen Partikeln (10 mg) in 0.1 M Phosphatpuffer bei pH 7.0 unter Argon erhalten. Die Differentialpulsvoltammogramme wurden bei einer Potentialvorschubgeschwindigkeit von 20 mV s^{-1} mit einer Pulsstärke von 5 mV aufgenommen.

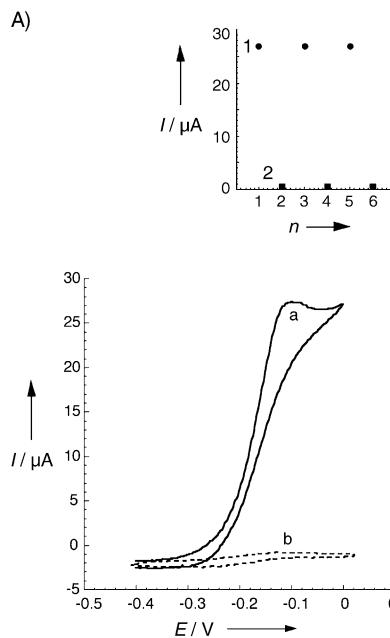
elektrochemischen Zelle ließ sich auch diese Reaktion reversibel an- und abschalten.

Duale Biosensoren

Die Möglichkeit, bioelektrokatalytische Transformationen durch einen externen Magneten zu steuern, wurde dazu genutzt, selektive duale Biosensoren zu konzipieren.^[26] Der spezifische und simultane quantitative Nachweis von zwei Substraten mit ähnlichen Redoxpotentialen ist eine große Herausforderung in der Bioelektronik. In Schema 3 ist das Konzept eines dualen Sensors für Lactat und Glucose in Gegenwart der beiden oxidierenden Enzyme LDH und GOx dargestellt, bei dem PQQ-

NAD⁺-funktionalisierte magnetische Partikel und ein externer Magnet zum Einsatz kommen. Die Elektrode wurde durch eine Monoschicht aus dem Ferrocen **2** modifiziert, und die PQQ-NAD⁺-funktionalisierten Partikel, die Enzyme LDH und GOx sowie die beiden Substrate Lactat und Glucose wurden in das System eingebracht. Wird ein Potential von $E > 0.32 \text{ V}$ (vs. SCE) an die Elektrode angelegt und werden die magnetischen Partikel von der Elektrode ferngehalten (Schema 3 A), setzt die Ferrocen-vermittelte bioelektrokatalytische Oxidation von Glucose ein (Abbildung 3 A unten, Kurve b), wogegen die bioelektrokatalytische Oxidation von Lactat blockiert ist (Abbildung 3 A, oben, Kurve 2). Wird die Position des Magneten so verändert, dass sich die PQQ-NAD⁺-funktionalisierten Partikel an der Elektrode anreichern, und anschließend ein Elektrodenpotential von $-0.13 \text{ V} < E < 0.32 \text{ V}$ (vs. SCE) angewendet, kann in Gegenwart des NAD⁺-abhängigen Enzyms LDH die PQQ-NAD⁺-vermittelte Oxidation von Lactat ablaufen (Schema 3 B). Da die Ferroceneinheiten in diesem Potentialbereich nicht oxidiert werden, ist die bioelektrokatalytische Glucose-Oxidation unterdrückt. Kurve b im unteren Teil von Abbildung 3 B zeigt den elektrokatalytischen Anodenstrom der biokatalytischen

A)



B)

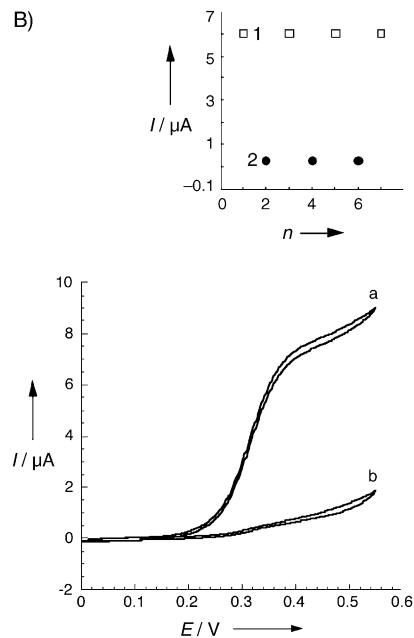
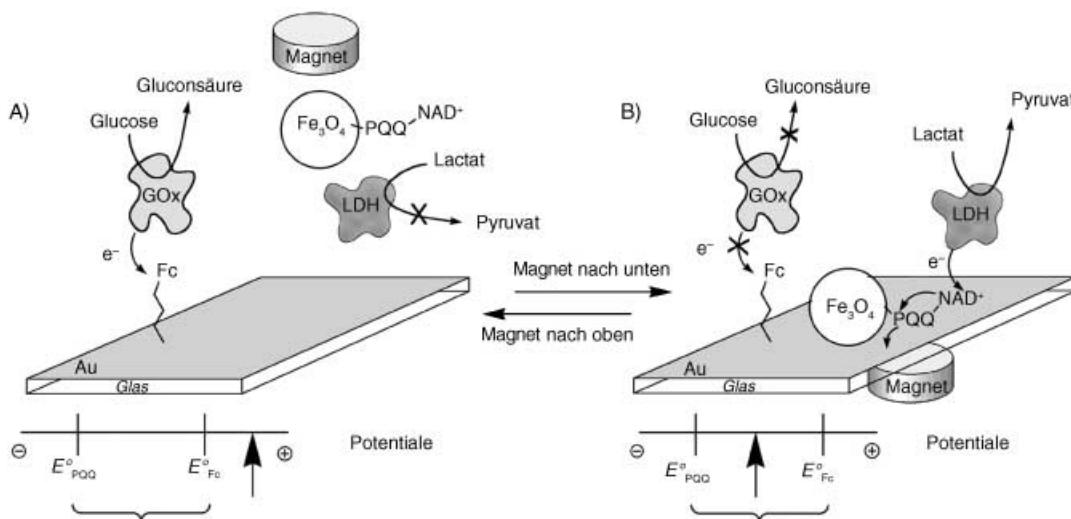


Abbildung 2. Magnetisch schaltbare bioelektrokatalytische Umwandlungen: A) durch PQQ-funktionalisierte Partikel (10 mg) vermittelte Oxidation von NADH (50 mM) in Gegenwart von CaCl_2 (10 mM); B) durch Fc-funktionalisierte Partikel (10 mg) vermittelte Oxidation von Glucose (10 mM) in Gegenwart von GOx (1 mg mL^{-1}). Unten: Cyclovoltammogramme a) während die Partikel magnetisch an die Elektrodenoberfläche herangezogen wurden, b) während sie magnetisch von ihr abgezogen wurden. Oben: elektrokatalytische Stromstärken 1) während die Partikel magnetisch an die Elektrodenoberfläche herangezogen wurden, 2) während sie magnetisch von ihr abgezogen wurden. Für experimentelle Einzelheiten siehe Lit. [21b].



Schema 3. Magnetisch gesteuerter dualer Nachweis von Glucose (A) und Lactat (B) in Gegenwart von GOx, LDH, PQQ-NAD⁺-funktionalisierten magnetischen Partikeln und einer mit einer Monoschicht aus Ferroceneinheiten modifizierten Au-Elektrode.

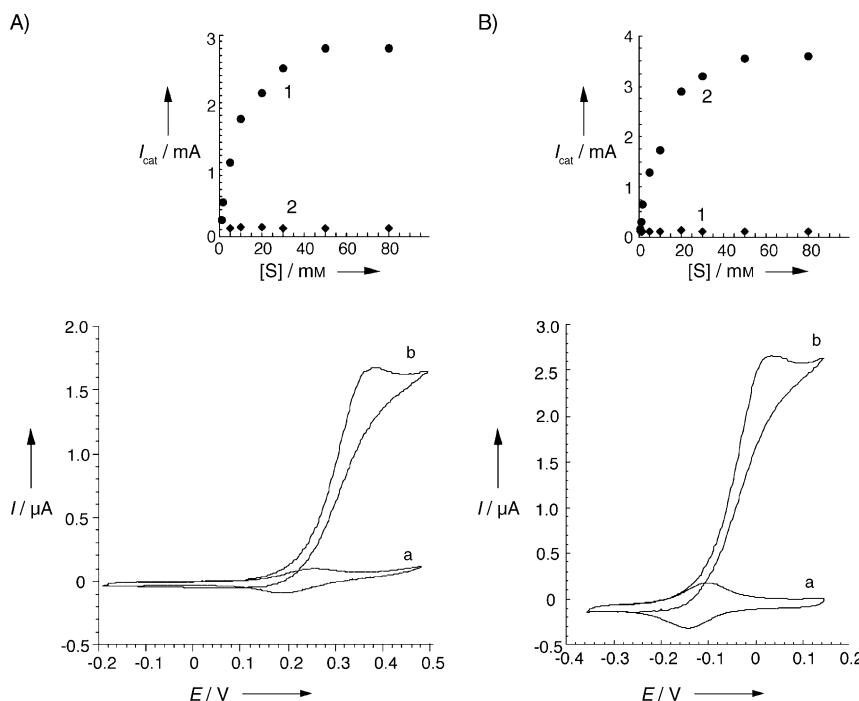


Abbildung 3. Magnetisch gesteuerter dualer Nachweis von Glucose und Lactat in Gegenwart PQQ-NAD⁺-funktionalisierter magnetischer Partikel (20 mg) durch Cyclovoltammetrie an einer mit einer Ferrocen-Monoschicht funktionierten Goldelektrode in 0.1 M Tris-HCl (unter Argon, pH 7.0, CaCl_2 (10 mM); Potentialvorschubgeschwindigkeit: 5 mV s^{-1}). In (A) sind die magnetischen Partikel einen externen Magneten von der Elektrode abgezogen, in (B) zu ihr hingezogen. Unten: Kurven a: in Gegenwart von GOx (1 mg mL^{-1}) und LDH (2 mg mL^{-1}); Kurven b: in Gegenwart von GOx (1 mg mL^{-1}), LDH (2 mg mL^{-1}), Glucose (50 mM) und Lactat (20 mM). Oben: Kalibrierung der amperometrischen Messungen mit dem Magneten in der oberen (A) bzw. unteren (B) Position und einem angelegten Potential von $E = 0.50 \text{ V}$ (vs. SCE) für verschiedene Glucose- (Kurven 1) bzw. Lactatkonzentrationen (Kurven 2).

schen Lactat-Oxidation, und Kurve 1 im oberen Teil von Abbildung 3B belegt das Ausbleiben eines elektrischen Anspredens des Systems auf Glucose. Der spezifische Nachweis von Lactat wird daher dadurch erreicht, dass das angelegte

Elektrodenpotential limitiert wird. Man muss jedoch berücksichtigen, dass der spezifische Nachweis von Glucose nur möglich ist, wenn die magnetischen Teilchen durch den externen Magneten von der Elektrode ferngehalten werden, da beide bioelektrokatalytischen Transformationen im erweiterten Potentialbereich ablaufen können.

DNA-Sensoren

Auch beim elektronischen Nachweis von DNA wurden magnetische Partikel zur Abtrennung und Anreicherung der zu untersuchenden DNA eingesetzt.^[27] Zu diesem Zweck wurden Avidin-modifizierte magnetische Partikel hergestellt und mit einer biotinylierten DNA-Sonde funktionaliert. Nach der Hybridisierung wurde die DNA mithilfe des externen Magneten von der Analysenprobe abgetrennt. Die Freisetzung der Hybrid-DNA unter basischen Bedingungen und das anschließende chronopotentiometrische Stripping der freigesetzten Guanineinheiten ermöglichen eine quantitative DNA-Bestimmung. Auf diese Weise wurde die DNA-Sequenz des Brustkrebs-Gens *brca1* analysiert. Die reversible, magnetisch gesteuerte DNA-Oxidation wurde mithilfe von Nucleinsäure-modifizierten magnetischen Partikeln möglich.^[28] Avidin-modifizierte magnetische Partikel wurden mit einer biotinylierten Nucleinsäure-Sonde funktionaliert und anschließend mit der komplementären DNA hybridisiert. Zwei Kohle-

re-modifizierten magnetischen Partikeln möglich.^[28] Avidin-modifizierte magnetische Partikel wurden mit einer biotinylierten Nucleinsäure-Sonde funktionaliert und anschließend mit der komplementären DNA hybridisiert. Zwei Kohle-

paste-Elektroden wurden auf einer Oberfläche orientiert und als Arbeitselektroden verwendet. Die räumliche Anlagerung der funktionalisierten magnetischen Partikel an der rechten (r) oder an der linken Elektrode (l) ermöglichte die magnetisch gesteuerte DNA-Oxidation in chronopotentiometrischen Experimenten (Potentialpuls 0.6 V–1.2 V, Abbildung 4).

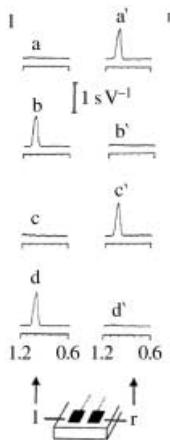


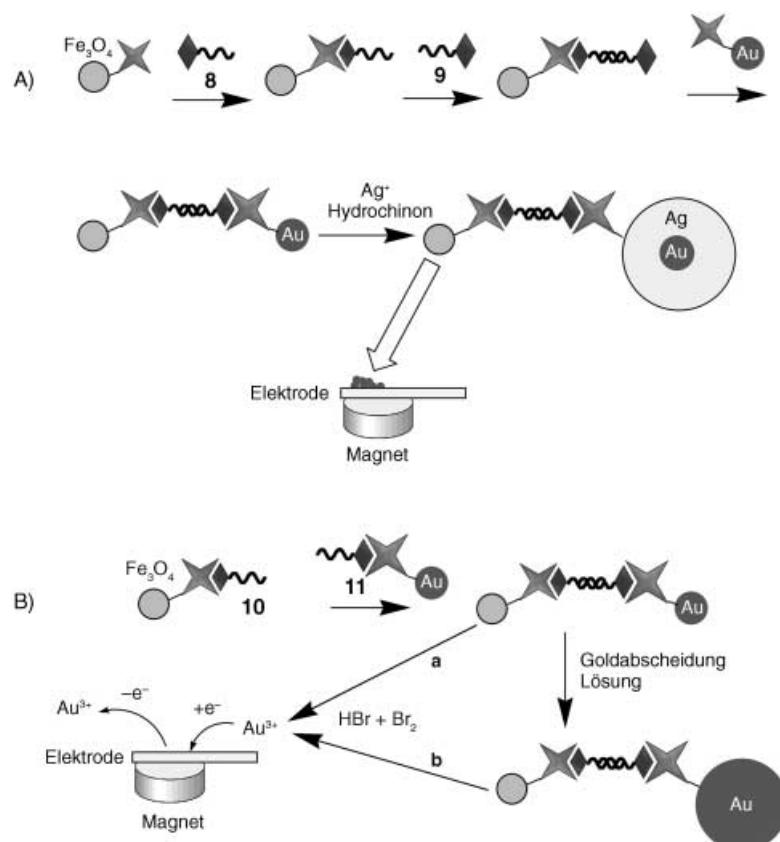
Abbildung 4. Inverschronopotentiometrie (Potentiometric Stripping Analysis, PSA) von mit DNA-Oligomeren funktionalisierten magnetischen Partikeln (100 µg) an einem Aufbau mit zwei Kohleplast-Elektroden. Die Signalintensität in sV^{-1} ist jeweils gegen die Spannung E in V aufgetragen. Die Potentiogramme a–d wurden an der linken (l), die Potentiogramme a'–d' an der rechten Elektrode (r) gemessen; bei a, b', c und d' war kein Magnet vorhanden, bei a', b, c' und d dagegen schon (aus Lit. [28]).

Wang et al. stellten ein interessantes elektrochemisches Verfahren zur magnetisch gesteuerten amplifizierenden DNA-Bestimmung vor, bei dem Nucleinsäure-modifizierte Metall-[^{29,30}] und Halbleiter-Nanopartikel^[31] zum Binden der DNA dienen. In diesem Verfahren werden die Nucleinsäure-funktionalisierten Nanopartikel an der Sensorgrenzfläche durch elektrochemisches Stripping oder chemisch in Lösung gebracht und dort elektrochemisch analysiert. Darüber hinaus könnten die Metall-Nanopartikel der Sensorgrenzfläche als Nukleationskeime für die Ablagerung anderer Metalle dienen. Mittelbar würde durch die Akkumulation von Metall und das Entstehen einer größeren Menge gelöster, elektrochemisch analysierbarer Produkte das DNA-Detektionssignal amplifiziert.

In Schema 4A ist die amplifizierende DNA-Bestimmung mithilfe von Nucleinsäure-funktionalisierten magnetischen Kugelchen und Au-Nanopartikeln als Nukleationskeimen zur Ablagerung von Silber dargestellt.^[29] Eine mit Biotin markierte Nucleinsäure (**8** in Schema 4A) wurde an Avidinfunktionalisierten magnetischen Partikeln immobilisiert und mit der komplementären biotinylierten Nucleinsäure **9** hybridisiert. Dieses Hybrid-Ensemble wurde dann mit einem Konjugat aus Au-Nanopartikeln und Avidin zur Reaktion gebracht. Mit einem externen Magneten wurden die Partikel und damit das Hybrid-Ensemble magnetisch von der zu analysierenden Probe und den Reaktionspartnern getrennt. Die Konjugatpartikel

wurden in Gegenwart von Hydrochinon mit Silberionen behandelt, was zur Abscheidung von metallischem Silber auf den Au-Nanopartikeln führte. Dieses Verfahren ist eine Amplifikationsmethode, da die Akkumulation von Silber auf den Au-Nanopartikeln durch einen einzigen DNA-Erkennungsvorgang ausgelöst wird. Der Strom, der beim Potential-Stripping des akkumulierten metallischen Silbers auftritt, liefert das elektrische Signal zur Analyse der zu bestimmenden DNA.

Ein verwandtes System zur elektrochemischen DNA-Bestimmung nutzt Au-Nanopartikel als elektroaktive und katalytisch wirksame DNA-Marker (Schema 4B).^[30a] Der biotinylierte Nucleinsäure-Primer **10** wird über eine Avidin-Brücke an die magnetischen Kugelchen gebunden. Nach der Hybridisierung mit der an die Au-Partikel angebrachten Nucleinsäure **11** folgt die chemische Auflösung der Nanopartikel in einer HBr/Br₂-Lösung. Die so erzeugten Au³⁺-Ionen werden an der Elektrode reduziert, und das entstandene metallische Gold wird durch elektrochemisches Stripping bestimmt (Weg a in Schema 4B). Durch eine zwischen geschobene Goldabscheidung auf den Nanopartikeln ist eine weitere Amplifikation möglich (Weg b). Der dadurch erreichte höhere Goldgehalt führt zu einem größeren chronopotentiometrischen Signal. In Abbildung 5 sind die Potentiogramme wiedergegeben, die nach Analyse der Nucleinsäuren an 5 nm großen Au-Nanopartikeln und nachfolgendem Strip-



Schema 4. Elektrochemische DNA-Analyse nach Anlagerung von DNA-Molekülen an magnetische Partikel und nachfolgender Assoziation mit Au-Nanopartikeln. Für Einzelheiten siehe Text.

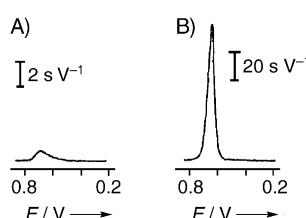


Abbildung 5. Effekt der Goldanreicherung beim Stripping-Verfahren zur Analyse der DNA 11 ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). PSA-Signal der Au-Nanopartikel vor (A) und nach 10 min in der Goldanreicherungslösung (B). Hybridisierungszeit: 25 min; Menge der magnetischen Kugelchen: 90 μg ; Zahl der mit Avidin überzogenen 5 nm großen Goldpartikel: 7.6×10^{10} ; Zeit für die Gold-Oxidation: 5 min (aus Lit. [30a]).

ping des an der Elektrode abgeschiedenen Goldes (Weg a) bzw. nach einer zehnminütigen Goldabscheidung an den Au-Nanopartikeln erhalten wurden (Weg b).

In ähnlicher Weise wurden Nucleinsäure-modifizierte CdS-Halbleiter-Nanopartikel als Marker zur Bestimmung von DNA-Hybridisierungereignissen eingesetzt.^[31] Nach Auflösung des CdS (durch 1 M HNO₃) werden die Cd²⁺-Ionen elektrochemisch zu Cd⁰ reduziert, das sich an der Elektrode abscheidet. Der Cd⁰-Stripping-Prozess (Bildung von Cd²⁺) liefert das elektrische Signal für die DNA-Bestimmung. Abbildung 6 zeigt die Chronopotentiogramme, die bei der Analyse komplementärer Ziel-DNA unterschiedlicher Konzentration mithilfe dieser modifizierten CdS-Partikel erhalten wurden.

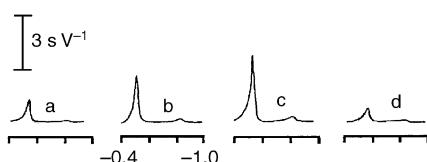


Abbildung 6. PSA-Signale als Funktion der Spannung E in V zum Nachweis von DNA für unterschiedliche DNA-Konzentrationen (aus Lit. [31]). Die DNA wurde an magnetische Partikel gebunden und mit CdS-Nanopartikeln markiert: a) 0.2, b) 0.4, c) 0.6 mg L^{-1} DNA, d) Kontrollversuch mit nichtkomplementärer DNA (0.6 mg L^{-1}). Menge der magnetischen Partikel: 20 μg ; Konzentration der DNA-funktionalisierten CdS-Nanopartikel: 0.01 mg mL^{-1} ; Hybridisierungszeit: 10 min; Akkumulationspotential: -0.9 V ; Akkumulationszeit: 2 min; Stripping-Stromstärke: 1 μA .

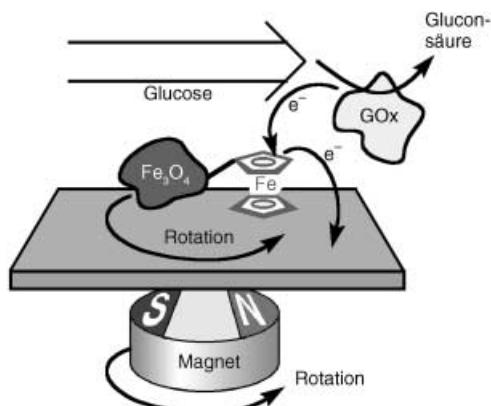
Bei den in Schema 4 skizzierten Verfahren dienen die magnetischen Partikel zum einen als Träger für die Metall- oder Halbleiter-Nanopartikel und zum anderen als Mittel zur Anreicherung der zu analysierenden DNA. Eine interessante Weiterentwicklung dieser Systeme besteht darin, eine Kombination aus verschiedenen Metall- oder Halbleiter-Nanopartikeln mit unterschiedlichen Nucleinsäuren zu verwenden, um so eine DNA-Bibliothek über die Bindung an unterschiedliche magnetische Partikel simultan analysieren zu können. Bei einem solchen Verfahren könnten die unterschiedlichen Potentiale, die zum Stripping der einzelnen Metalle nötig sind, als elektrochemische Indikatoren für die Art der untersuchten DNA dienen.

Elektrochemisch getriebene Chemilumineszenzsysteme

Die magnetische Steuerung elektrokatalytischer Transformationen an Elektroden wurde auch zur Herstellung eines magnetisch gesteuerten, elektrochemisch getriebenen Chemilumineszenzsystems herangezogen.^[32] Dabei wurden mit dem Aminonaphthochinon **6** funktionalisierte magnetische Partikel als aktive Komponenten zum Schalten des elektrochemilumineszenten Prozesses eingesetzt. Beim Kontakt der Partikel mit dem Elektrodenmaterial wird das Chinon zum Hydrochinon reduziert, das wiederum die Reduktion von O₂ zu H₂O₂ katalysiert.^[33] Das Enzym Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) katalysiert die chemilumineszente Reaktion zwischen Luminol (3-Aminophthalhydrazid, **12**) und H₂O₂, bei der Licht der Wellenlänge $\lambda = 425 \text{ nm}$ emittiert wird (siehe Schema 6).^[34] Werden die magnetischen Partikel von der Elektrode abgezogen, wird der Lichtemittierende Prozess unterdrückt, da die Chinoneinheiten dann nicht mehr mit der Elektrode in Kontakt sind. Bei diesem Aufbau handelt es sich um ein magnetisch schaltbares optoelektronisches System, bei dem das elektrochemisch erzeugte Licht an- und ausgeschaltet werden kann. Elektrochemilumineszente Systeme werden häufig als optische Signalgeber bei Bioerkennungsprozessen eingesetzt.^[35] Man kann sich daher vorstellen, dass magnetisch steuerbare Lichtemissionsprozesse mit biologischen Nachweisverfahren gekoppelt werden können (siehe unten).

Signalverstärkung durch Rotation der magnetischen Partikel

Ein wichtiger Fortschritt bei der magnetischen Steuerung elektrokatalytischer und bioelektrokatalytischer Transformationen wurde dadurch erzielt, dass die magnetisch an das Elektrodenmaterial gebundenen Partikel durch einen externen rotierenden Magneten in Rotation versetzt werden.^[36] Eine solche Rotation lässt die redoxfunktionalisierten magnetischen Teilchen zu rotierenden Mikroelektroden werden. Als Folge davon werden redoxaktivierte, durch die funktionalisierten magnetischen Partikel vermittelte elektrokatalytische oder bioelektrokatalytische Prozesse nun nicht mehr durch die Diffusion des Substrats an die Mikroelektrode, sondern durch Konvektion kontrolliert. Man sollte daher für den durch die Partikel gesteuerten elektrochemischen Prozess stärkere amperometrische Signale erwarten, und der resultierende Strom sollte zur Rotationsgeschwindigkeit der Partikel proportional sein. In Schema 5 ist die amplifizierende amperometrische Analyse von Glucose mithilfe rotierender Ferrocen-funktionalisierter magnetischer Partikel an einer Elektrode dargestellt. Die rotierenden magnetischen Teilchen sind mit einem Elektronentransfer-Vermittler funktionalisiert, und die Reaktion zwischen GOx und Glucose verläuft konvektionskontrolliert. Der gemessene elektrokatalytische Strom sollte daher zur Quadratwurzel der Rotationsgeschwindigkeit proportional sein ($I_{\text{cat}} \propto \omega^{1/2}$). In Abbildung 7A sind die bioelektrokatalytischen Stromstärken, die bei unterschiedlicher Rotation des externen Magneten



Schema 5. Bioelektrokatalytische Oxidation von Glucose in Gegenwart von GOx und Ferrocen-funktionalisierten magnetischen Partikeln, die durch die von einem externen Magneten angetriebene Rotation der Partikel verstärkt wird.

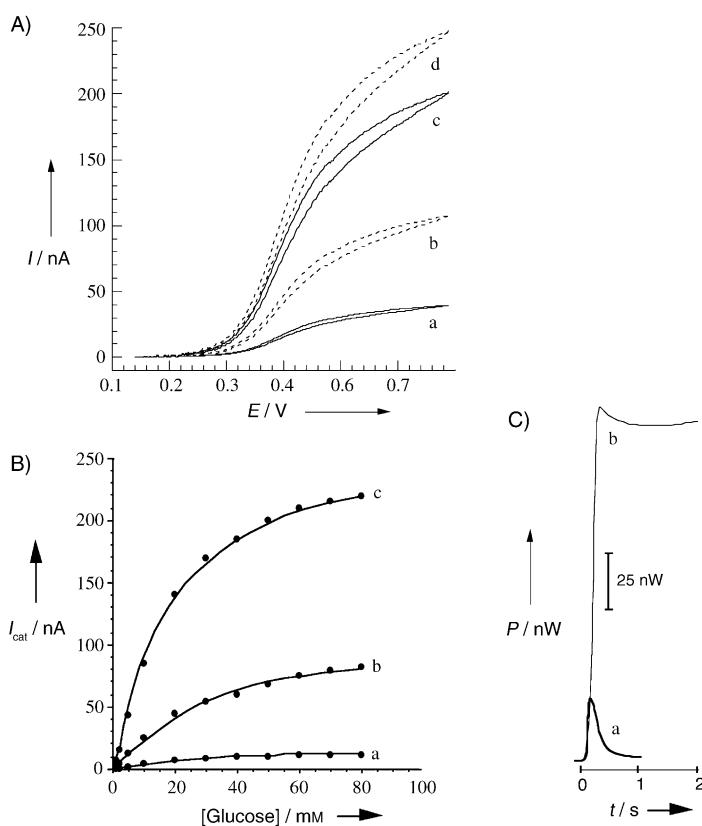


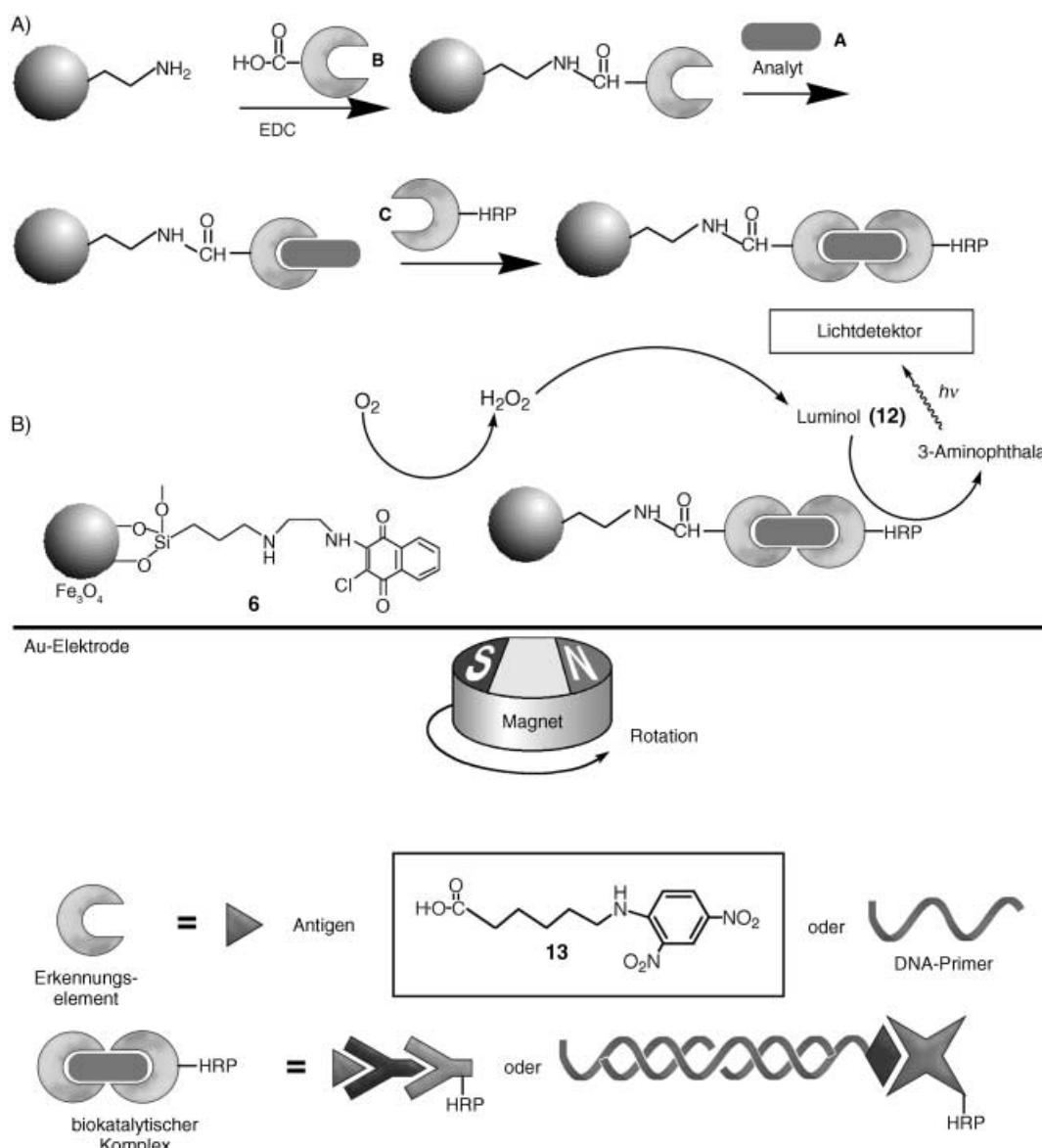
Abbildung 7. Amplifikation des Nachweissignals durch das Rotieren der magnetischen Partikel. A) Cyclovoltammogramme an einer Goldelektrode mit magnetisch angezogenen, Ferrocen-funktionalisierten magnetischen Partikeln (6 mg) in Gegenwart von GOx (1×10^{-5} M) und Glucose (50 mM) bei Rotationsgeschwindigkeiten des Magneten von a) 0, b) 10, c) 100 und d) 400 Upm. Potentialvorschubgeschwindigkeit: 5 mVs⁻¹. B) Kalibrierung der amperometrischen Bestimmung von Glucose ($E = 0.5$ V vs. SCE) bei Rotation des Magneten mit a) 0, b) 100 und c) 400 Upm. Die Daten wurden in einem 0.1 M Phosphatpuffer bei pH 7.0 aufgenommen. C) Elektrochemilumineszenzintensitäten, die durch die Rotation functionalisierter magnetischer Partikel bei einem Elektrodenpotential von $E = -0.5$ V (vs. SCE) verstärkt werden: a) 0 und b) 400 Upm. Die Messungen wurden an Luft mit einem System aus Aminonaphthochinon-funktionalisierten Partikeln (10 mg), HRP (1 mg mL⁻¹) und Luminol (1×10^{-6} M) in einem 0.1 M Phosphatpuffer bei pH 7.0 durchgeführt.

gemessen wurden, wiedergegeben. Man erkennt deutlich, dass das amperometrische Signal mit zunehmender Rotationsgeschwindigkeit ansteigt. Abbildung 7B zeigt die Analyse von Glucose in unterschiedlichen Konzentrationen durch Partikel mit zwei verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten im Vergleich zu Messungen mit nichtrotierenden Partikeln. Durch die Rotation der Partikel wird das amperometrische Signal dieses bioelektrokatalytischen Prozesses bis zum 15fachen verstärkt. Ähnliche Effekte wurden bei der elektrokatalytischen Oxidation von NADH durch rotierende, PQQ-funktionalisierte, elektrokatalytisch wirksame magnetische Partikel beobachtet. Auch die Rotation der durch das Aminonaphthochinon **6** functionalisierten Partikel führt in Gegenwart von HRP und Luminol zu einer höheren elektrochemisch erzeugten Chemilumineszenz (Abbildung 7C). Das durch elektrokatalytische Transformationen hervorgerufene, an den rotierenden redoxfunctionalisierten magnetischen Teilchen entstehende amperometrische Signal lässt sich mithilfe der konventionellen Theorie für rotierende ScheibenElektroden analysieren.^[37] Werden die experimentell bei unterschiedlicher Rotationsgeschwindigkeit erhaltenen Stromstärken mithilfe der Levich-Theorie analysiert, lässt sich die Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers an der Grenzfläche abschätzen.

Die durch den Einsatz rotierender magnetischer Partikel verbesserte Elektro- oder Bioelektrokatalyse lässt sich auch zur Intensitätssteigerung beim Nachweis von Biomolekülen verwenden. Dies ist in Schema 6A für einen Analyten **A** gezeigt, wenn magnetische Partikel eingesetzt werden, die mit dem zu **A** komplementären Rest **B** functionalisiert sind. Durch Binden von **C**, dem an HRP geknüpften, zweiten Erkennungselement von **A**, erhält man die „Sandwichstruktur“ zur Analyse von **A**.

Der externe Magnet ermöglicht in einer Mischung aus magnetischen Teilchen, die entweder mit dem Aminonaphthochinon **6** functionalisiert oder Träger der Komponenten **B/A/C-HRP** sind, durch Heranführen der Partikel an die Elektrode den amplifizierenden Nachweis des Analyten durch elektrochemisch erzeugte Chemilumineszenz. Durch die Elektroreduktion der Aminonaphthochinoneinheiten wird die elektrokatalytische Reduktion von O₂ zu H₂O₂ initiiert, die in Gegenwart von Luminol und HRP zur biokatalytischen Lichtemission führt (Schema 6B). Werden die magnetischen Teilchen in Rotation versetzt, wechselwirken O₂ und Luminol mit den beiden Arten functionalisierter magnetischer Partikel durch Konvektion, was eine verstärkte Chemilumineszenz zur Folge hat.

Die zum Nachweis genutzten Affinitätswechselwirkungen an den magnetischen Teilchen können Antigen-Antikörper- oder Nucleinsäure-DNA-Bindungsprozesse oder beliebige andere intermolekulare Wirt-Gast-Wechselwirkungen sein. Tatsächlich sind bereits mit Bioerkennungskomplexen functionalisierte magnetische Partikel für Nachweissysteme, in denen die elektrisch generierte Chemilumineszenz für die Transduktion genutzt wird, eingesetzt und erfolgreich kommerzialisiert worden.^[38] Die ORIGEN-Methode basiert auf der Bildung von Bioerkennungskomplexen an funktionierten magnetischen Partikeln, die mit [Ru(bpy)₃]²⁺ (bpy = Bipyridin) als Elektrochemilumineszenz erzeugender



Schema 6. Amplifizierende Detektion von auf Bioaffinität beruhenden Erkennungsprozessen mithilfe mehrfach markierter magnetischer Partikel:
A) Synthese der funktionalisierten magnetischen Partikel für den Bioerkennungssassay. B) Amplifizierender Bioerkennungssassay durch Rotation der funktionalisierten magnetischen Partikel.

Komponente markiert sind. Das elektrochemisch erzeugte $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ oxidiert Triphenylamin unter Bildung von angeregtem $*[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, das Licht emittiert und so den Bioerkennungsprozess in ein detektierbares Signal überführt.

Neben den neuen, hier diskutierten Signalverstärkungsmethoden zur Analyse von Antigen-Antikörper-Komplexen und von DNA soll auch die Bedeutung der Rotation magnetischer Partikel für die Intensitätssteigerung beim Nachweis von Biomolekülen Erwähnung finden. So konnten mit rotierenden funktionalisierten magnetischen Partikeln immunologische Wechselwirkungen amplifiziert nachgewiesen werden, und es gelang die ultraschallempfindliche Bestimmung von DNA.^[39]

Das in Schema 6 skizzierte Verfahren kann beispielsweise zur Analyse des Dinitrophenyl-Antikörpers (DNP-Ab) ein-

gesetzt werden. Magnetische Partikel, die mit dem Dinitrophenyl-Antigen **13** als Erkennungsmerkmal funktionalisieren, werden als Sensor-Partikel verwendet, und magnetische Partikel, die mit dem Aminonaphthochinon **6** markiert sind, dienen als elektrokatalytische Teilchen zur Erzeugung von H_2O_2 (Schema 6B). In Gegenwart des DNP-Ab wird der Antigen-Antikörper-Komplex auf den Sensor-Partikeln gebildet und so die sekundäre Anlagerung des Avidin-HRP-Konjugats ermöglicht. Die elektrokatalytische Reduktion von O_2 durch die Aminonaphthochinon-funktionalisierten Partikel liefert H_2O_2 , das, in Gegenwart von Luminol und dem HRP-Konjugat, zur Chemilumineszenz des Systems führt (Schema 6B). Bei rotierenden Partikeln wird die elektrokatalytische Reduktion von O_2 und die nachfolgende HRP-Luminol-induzierte Chemilumineszenz durch die Konvektion

der Substrate an die Teilchen kontrolliert, die sich an der Elektrode befinden. Demzufolge kann man eine verstärkte Chemilumineszenz erwarten.

Abbildung 8 A zeigt eine Auftragung der Intensität des emittierten Lichts als Funktion der Zeit bei verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten der Partikel in einem den DNP-Ab (50 ng mL^{-1}) analysierenden System. In Abbildung 8 B sind die Intensitäten des emittierten Lichts in Abhängigkeit von der DNP-Ab-Konzentration dargestellt. Wenn die Rotationsgeschwindigkeit zunimmt, wird die Empfindlichkeit des Detektionssystems erhöht, und bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 400 Upm liegt die Nachweisgrenze für den DNP-Ab bei ca. 1 ng mL^{-1} . Das Verfahren wurde auch zur DNA-Bestimmung genutzt.^[39] Die Ziel-DNA wurde zunächst mit einer komplementären Nucleinsäure auf magnetischen Partikeln hybridisiert. Eine zweite Hybridisierung erfolgte mit einer biotinylierten, zu einem zweiten Segment der Ziel-DNA komplementären Nucleinsäure, sodass ein aus drei Komponenten bestehender Nucleinsäure-DNA-Komplex entstand. Die Anlagerung des Avidin-HRP-Konjugats an diesen Komplex und die Herstellung eines Kontakts zu den Aminonaphthochinon-funktionalisierten Partikeln führten, nach elektrochemischer Reduktion der Chinoneinheiten, zur Lichthemission (Schema 6B). Wurden die magnetischen Partikel rotiert, wurde die Chemilumineszenz verstärkt.

Eine Modifizierung dieses Verfahrens zur amplifizierenden Detektion viraler DNA mithilfe funktionalisierter magnetischer Partikel ist in Schema 7 für die Analyse der DNA des Phagen M13 (7229 Basen) dargestellt.^[40] Der 27 Basen lange DNA-Primer **14**, der komplementär zu einem Segment der Phagen-DNA ist, wird an die magnetischen Partikel

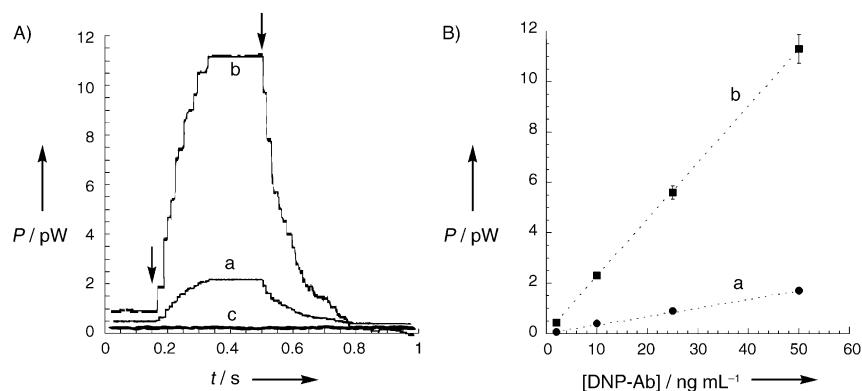
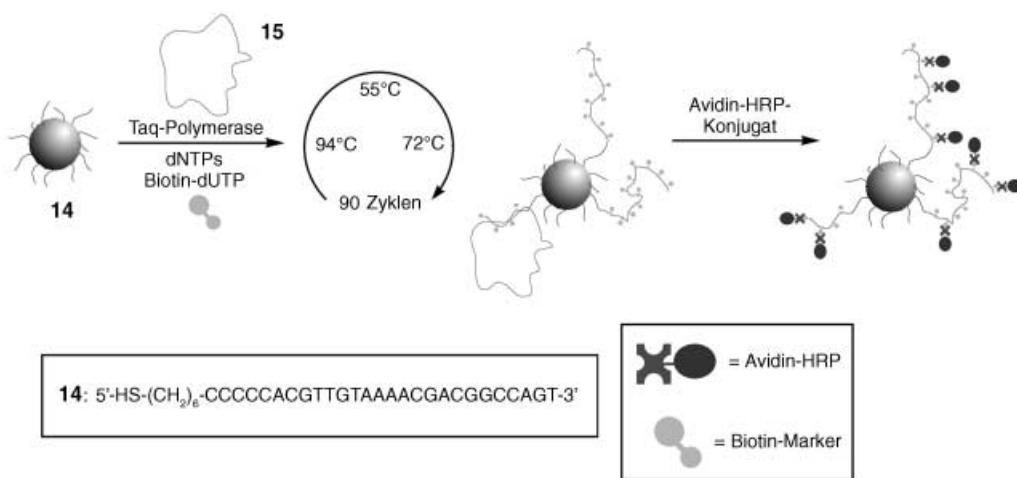


Abbildung 8. A) Chemilumineszenzintensitäten bei der Analyse des DNP-Ab (50 ng mL^{-1}), wenn die funktionalisierten magnetischen Partikel mit a) 0 und b) 400 Upm rotieren; c) Kontrollversuch ohne den DNP-Ab bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 400 Upm. B) Maxima der Chemilumineszenzintensität für verschiedene DNP-Ab-Konzentrationen und für Rotationsgeschwindigkeiten von a) 0 und b) 400 Upm. Bei allen Experimenten wurden die Chemilumineszenzsignale durch einen Potentialsprung an der Elektrode von 0 zu -0.5 V (vs. SCE) und zurück erzeugt. Die Pfeile in (A) kennzeichnen die Zeiten, zu denen das Potential nach -0.5 bzw. 0.0 V verändert wurde. Die Messungen wurden an Luft an einem System aus funktionalisierten magnetischen Partikeln (10 mg), HRP (1 mg mL^{-1}) und Luminol ($1 \times 10^{-6} \text{ M}$) in einem 0.1 M Phosphatpuffer bei pH 7.0 durchgeführt.

gebunden. An die Hybridisierung von **14** mit der Phagen-DNA **15** schließt sich ein Polymerisationsprozess in Gegenwart der dNTPs (Desoxynucleosidtriphosphate) und von Biotin-markiertem dUTP an. Durch diese Replikation werden Biotin-Marker in die Nucleinsäuren an den magnetischen Partikeln eingeführt. Im Anschluss an die Replikation werden mehrere thermische Zyklen durchgeführt, in denen die DNA des Phagen M13 dissoziert, mit einem weiteren Primer auf dem Partikel hybridisiert und erneut unter Einbau von Biotin-Markern repliziert wird. Die so hergestellten Partikel werden mit dem Avidin-HRP-Biokonjugat versetzt, die funktionalisierten magnetischen Teilchen mithilfe eines externen Magneten an der Elektrodenoberfläche gebündelt und dort mit den Aminonaphthochinon-funktionalisierten Partikeln vermischt. Die elektrokatalytische Reduktion von



Schema 7. Markierung replizierter Nucleinsäuren auf magnetischen Partikeln mit Biotin durch thermische Zyklen. Ziel ist die amplifizierende Detektion viraler DNA mithilfe mehrfach markierter rotierender magnetischer Partikel.

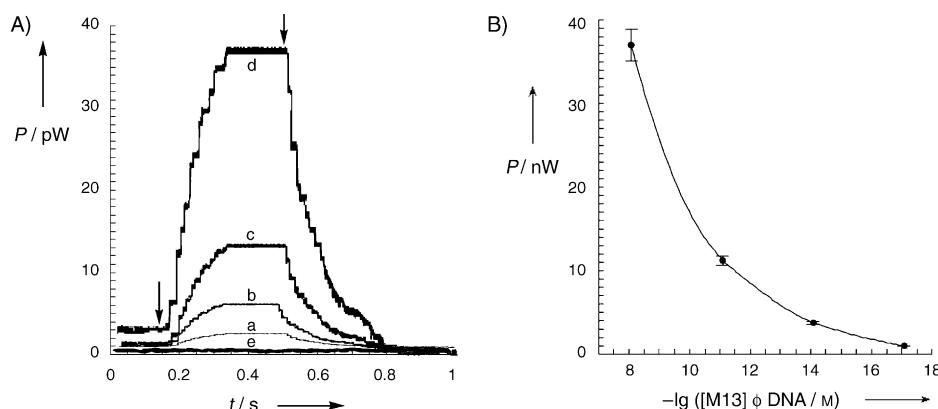


Abbildung 9. A) Intensität der Chemilumineszenz, die bei der Analyse der DNA des Phagen M13 ($8 \times 10^{-9} \text{ M}$) bei Rotationsgeschwindigkeiten von a) 0, b) 60, c) 400 und d) 2000 Upm erzeugt wurde; e) Chemilumineszenzsignal ohne Phagen-DNA bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 2000 Upm. B) Kalibrierung der Chemilumineszenzintensität für verschiedene Konzentrationen der Phagen-DNA bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 2000 Upm. Für Einzelheiten siehe Legende zu Abbildung 8.

O_2 durch die Chinoneinheiten liefert H_2O_2 , das in Gegenwart von Luminol und HRP zur Chemilumineszenz führt, die wiederum durch die Rotation der magnetischen Partikel verstärkt werden kann. Abbildung 9A zeigt die Intensität des emittierten Lichts bei der Analyse der DNA des Phagen M13 für verschiedene Rotationsgeschwindigkeiten der Partikel. Mithilfe dieses Verfahrens ließ sich die Ziel-DNA bis zu einer Nachweigrenze von $8 \times 10^{-18} \text{ M}$ (Abbildung 9B) bestimmen. Die Chemilumineszenzintensität korreliert linear mit der Quadratwurzel der Rotationsgeschwindigkeit ($\omega^{1/2}$), was damit in Einklang ist, dass die Lumineszenzintensität durch die Konvektion der Substrate an die rotierenden magnetischen Partikel kontrolliert wird. Ein ähnliches Verfahren wurde beim Nachweis von Einzelbasenfehlpaarungen in DNA angewendet.^[40]

In all den Systemen, in denen die Detektion des Bioerkennungsvorgangs durch die Rotation der magnetischen Partikel verstärkt wird, wird der Verstärkungseffekt dadurch erreicht, dass das Erzeugen der Chemilumineszenz durch die Konvektion der Substrate an das Elektrodenmaterial kontrolliert wird. Da die Chemilumineszenz nur dann auftritt, wenn sich die Biokomponenten in räumlicher Nähe zum Elektrodenmaterial befinden, kann sie durch einfaches Mischen oder Rühren des Mediums nicht ausgelöst werden. Eine Signalverstärkung lässt sich jedoch möglicherweise erreichen, indem die Biokomponenten an einer rotierenden Scheibenelektrode verankert werden. Die Vorteile der rotierenden magnetischen Partikel gegenüber einer rotierenden Scheibenelektrode sind offensichtlich. Als Beispiele sind die große Oberfläche der als Mikroelektroden wirkenden Partikel sowie die Möglichkeit einer raschen Regeneration des Sensorsystems durch den Austausch der funktionalisierten magnetischen Partikel mithilfe eines externen Magneten zu nennen.

Schlussbemerkungen und Ausblick

Wir haben hier das erst vor kurzem entstandene Forschungsgebiet der Steuerung elektrokatalytischer und bio-

elektrokatalytischer Transformationen mithilfe von Magneten vorgestellt. Dieses Verfahren könnte verwendet werden, um die Zusammensetzung von Bioreaktoren zu beeinflussen. So könnten funktionalisierte magnetische Partikel beispielsweise mit einer Sensorvorrichtung gekuppelt werden und mithilfe magnetisch schaltbarer elektrokatalytischer oder bioelektrokatalytischer Transformationen ließe sich der Abbau von Inhibitoren oder störenden Komponenten regulieren. Weitere in der Zukunft realisierbare Anwendungen von magnetisch schaltbaren bioelektrokatalytischen Prozessen liegen im Bereich des spezifischen und simultanen quantitativen Nachweises von zwei Substanzen (duale Biosensoren)^[26] und der Erzeugung von Mikromustern auf Oberflächen.^[41]

Die Nutzung funktionalisierter magnetischer Partikel und insbesondere ihre extern steuerbare Rotation stellen eine neues Konzept bei der Entwicklung bioelektrokatalytischer Systeme dar.^[39,40] Das Heranziehen funktionalisierter magnetischer Partikel an Oberflächen kann zur Anreicherung und Abtrennung von Komponenten des jeweiligen analytischen Verfahrens genutzt werden. Die Lokalisierung redoxfunktionalisierter magnetischer Partikel an Elektroden ermöglicht die Umwandlung des Bioerkennungsvorgangs in ein elektronisches Signal. Durch die Rotation der magnetischen Partikel auf der Elektrodenoberfläche sollten sich Bioerkennungsprozesse an den Partikeln oder die aus ihnen hervorgegangenen elektronischen Signale verstärken lassen. Diese Eigenschaften der magnetischen Partikel könnten entweder einzeln oder nacheinander genutzt werden, um die Leistung bioelektrochemischer Sensoren zu steigern. Die Kombination aus verbesserter Hybridisierung und verstärkter elektronischer oder optoelektronischer (chemilumineszenz) Detektion von DNA oder DNA-Protein-Wechselwirkungen an rotierenden magnetischen Partikeln scheint eine leistungsstarke Technik für die Genanalyse der Zukunft zu sein. Eine weitere künftige Anwendung dieses Konzepts könnte in der gezielten Aktivierung therapeutisch wirksamer Verbindungen mithilfe leitender magnetischer Stäbchen und funktionalisierter magnetischer Partikel liegen. Darüber hinaus kann man sich magnetische Partikel, die mit immobilisierten heterogenen Katalysatoren funktionalisiert sind, als integrierte

te elektrokatalytische Systeme vorstellen, die mithilfe eines externen Magneten gesteuert werden können. Die Rotation solcher magnetischer Partikel auf Elektrodenmaterialien könnte zu einer amplifizierenden, elektrochemisch induzierten heterogenen Katalyse führen. Zum jetzigen Zeitpunkt stecken die Anwendungen für magnetisch schaltbare elektrokatalytische und bioelektrokatalytische Systeme noch in den Kinderschuhen. Die jüngst erzielten Fortschritte lassen jedoch auf faszinierende Forschungsmöglichkeiten für Chemiker, Biologen und Materialwissenschaftler schließen.

Unsere Arbeiten wurden zum Teil von der Israel Science Foundation und der U.S.–Israel Binational Science Foundation (BSF) unterstützt.

Eingegangen am 17. Oktober 2002,
veränderte Fassung am 11. März 2002 [M1602]
Übersetzt von Dr. Rüdiger Faust, Kassel

- [1] a) F. A. Armstrong, G. S. Wilson, *Electrochim. Acta* **2000**, *45*, 2623–2645; b) I. Willner, E. Katz, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1230–1269; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1180–1218; c) I. Willner, E. Katz, B. Willner, *Electroanalysis* **1997**, *13*, 965–977; d) L. Habermüller, M. Mosbach, W. Schuhmann, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 560–568; e) A. Heller, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 128–134.
- [2] a) A. Warsinke, A. Benkert, F. W. Scheller, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 622–634; b) R.-I. Stefan, J. F. van Staden, H. Y. Aboul-Enein, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 659–668.
- [3] a) J. Wang, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1681–1685; b) I. Willner, E. Katz, B. Willner in *Electroanalytical Methods of Biological Materials* (Eds.: A. Brajter-Toth, J. Q. Chambers), Marcel Dekker, New York, **2002**, pp. 43–107; c) I. Willner, B. Willner, *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, 222–230.
- [4] a) E. Katz, I. Willner, A. B. Kotlyar, *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *479*, 64–68; b) T. Chen, S. C. Barton, G. Binyamin, Z. Q. Gao, Y. C. Zhang, H. H. Kim, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8630–8631; c) E. Katz, A. F. Bückmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10752–10753.
- [5] a) A. B. Kharitonov, M. Zayats, A. Lichtenstein, E. Katz, I. Willner, *Sens. Actuators B* **2000**, *70*, 222–231; b) M. Zayats, A. B. Kharitonov, E. Katz, A. F. Bückmann, I. Willner, *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 671–680; c) A. B. Kharitonov, J. Wasserman, E. Katz, I. Willner, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 4205–4213; d) K. Mitsubayashi, Y. Hashimoto, *Sens. Actuators B* **2002**, *83*, 35–40; e) J. Min, H. G. Choi, J. W. Choi, W. H. Lee, *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol. Sect. A* **1999**, *327*, 263–266.
- [6] a) A. M. Moulin, S. J. O'Shea, M. E. Welland, *Ultramicroscopy* **2000**, *82*, 23–31; b) J. Fritz, M. K. Baller, H. P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H. J. Guntherodt, C. Gerber, J. K. Gimzewski, *Science* **2000**, *288*, 316–318.
- [7] a) E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature* **1998**, *391*, 775–778; b) F. Patolsky, Y. Weizmann, O. Lioubashevski, I. Willner, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2429–2433; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2323–2327.
- [8] a) A. G. Frutos, L. M. Smith, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10277–10282; b) D. Normile, *Science* **2002**, *295*, 951.
- [9] a) A. N. Shipway, I. Willner, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 421–432; b) R. Ballardini, V. Balzani, A. Credi, M. T. Gandolfi, M. Venturi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 445–455; c) V. Amendola, L. Fabbri, C. Mangano, P. Pallavicini, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 488–493.
- [10] a) I. Willner, S. Rubin, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 419–439; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 367–385; b) I. Willner, *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 347–356.
- [11] R. A. Bissel, E. Cordova, A. E. Kaifer, J. F. Stoddart, *Nature* **1994**, *369*, 133–137.
- [12] a) G. M. Tsivgoulis, J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1399–1406; b) Z.-F. Liu, K. Morigaki, K. Hashimoto, A. Fujishima, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 134–137; c) A. Doron, M. Portnoy, M. Lion-Dagan, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8937–8944.
- [13] a) A. R. Pease, J. O. Jeppesen, J. F. Stoddart, Y. Luo, C. P. Collier, J. R. Heath, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 433–444; b) I. Willner, V. Pardo-Yissar, E. Katz, K. T. Ranjit, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *497*, 172–177.
- [14] C. P. Collier, G. Mattersteig, E. W. Wong, Y. Luo, K. Beverly, J. Sampaio, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, J. R. Heath, *Science* **2000**, *289*, 1172–1175.
- [15] a) M. Lion-Dagan, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7913–7914; b) I. Willner, R. Blonder, E. Katz, A. Stocker, A. F. Bückmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5310–5311; c) R. Blonder, E. Katz, I. Willner, V. Wray, A. F. Bückmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11747–11757.
- [16] a) E. Katz, B. Willner, I. Willner, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 703–719; b) I. Willner, M. Lion-Dagan, S. Marx-Tibbon, E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6581–6592; c) M. Lion-Dagan, E. Katz, I. Willner, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2741–2742; d) I. Willner, A. Doron, E. Katz, S. Levi, A. J. Frank, *Langmuir* **1996**, *12*, 946–954.
- [17] a) J. Lange, R. Kotitz, A. Haller, L. Trahms, W. Semmler, W. Weitsches, *J. Magn. Magn. Mater.* **2002**, *252*, 381–383; b) V. Kourilov, M. Steinitz, *Anal. Biochem.* **2002**, *311*, 166–170; c) R. Sato, H. Takeyama, T. Tanaka, T. Matsunaga, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2001**, *91*, 109–116; d) K. Nishi, S. Nishimura, M. Higashihara, N. Ikeya, H. Ohta, T. Tsuji, M. Nishimura, S. Ohnishi, H. Higashi, *J. Immunol. Methods* **2000**, *240*, 39–46; e) Y. Namba, M. Usami, O. Suzuki, *Anal. Sci.* **1999**, *15*, 1087–1093; f) M. V. Kiselev, A. K. Gladilin, N. S. Melik-Nubarov, P. G. Sveshnikov, P. Miethe, A. V. Levashov, *Anal. Biochem.* **1999**, *269*, 393–398; g) H. Yu, *Anal. Chim. Acta* **1998**, *376*, 77–81; h) J. G. Bruno, H. Yu, J. P. Kilian, A. A. Moore, *J. Mol. Recogn.* **1996**, *9*, 474–479.
- [18] a) J. G. Bruno, J. L. Kiel, *Biotechniques* **2002**, *32*, 178–182; b) A. Perrin, T. Martin, A. Theret, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 678–683; c) M. L. Smit, B. A. J. Giesendorf, S. G. Heil, J. A. M. Vet, F. J. M. Trijbels, H. J. Blom, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2000**, *32*, 121–125; d) J. G. Bruno, J. L. Kiel, *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 457–464.
- [19] a) T. Matsunaga, H. Takeyama, *Supramol. Sci.* **1998**, *5*, 391–394; b) E. E. Carpenter, *J. Magn. Magn. Mater.* **2001**, *225*, 17–20; c) G. A. Robinson, H. A. O. Hill, R. D. Philo, J. M. Gear, S. J. Rattle, G. C. Forrest, *Clin. Chem.* **1985**, *31*, 1449–1452.
- [20] L. Shen, P. E. Laibinis, T. A. Hatton, *Langmuir* **1999**, *15*, 447–453.
- [21] R. Hirsch, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12053–12054; b) E. Katz, L. Sheeney-Haj-Ichia, I. Willner, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4138–4148.
- [22] a) E. Katz, T. Lötzbeyer, D. D. Schlereth, W. Schuhmann, H.-L. Schmidt, *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *373*, 189–200; b) I. Willner, A. Riklin, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1535–1539.
- [23] P. N. Bartlett, P. Tebbutt, R. G. Whitaker, *Prog. React. Kinet.* **1991**, *16*, 55–155.
- [24] A. Bardea, E. Katz, A. F. Bückmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9114–9119.
- [25] A. F. Bückmann, V. Wray, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1992**, *15*, 303–310.

- [26] E. Katz, L. Sheeney-Haj-Ichia, A. F. Bückmann, I. Willner, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1399–1402; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1343–1346.
- [27] J. Wang, A.-N. Kawde, A. Erdem, M. Salazar, *Analyst* **2001**, *126*, 2020–2024.
- [28] J. Wang, A.-N. Kawde, *Electrochim. Commun.* **2002**, *4*, 349–352.
- [29] J. Wang, D. Xu, R. Polksky, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4208–4209.
- [30] a) J. Wang, D. Xu, A.-N. Kawde, R. Polksky, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5576–5581; b) J. Wang, R. Polksky, D. Xu, *Langmuir* **2001**, *17*, 5739–5741.
- [31] J. Wang, G. Liu, R. Polksky, A. Merkoci, *Electrochim. Commun.* **2002**, *4*, 722–726.
- [32] L. Sheeney-Haj-Ichia, E. Katz, J. Wasserman, I. Willner, *Chem. Commun.* **2002**, 158–159.
- [33] G. S. Calabrese, R. W. Buchanan, M. S. Wrighton, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5594–5600.
- [34] K. A. Fahnrich, M. Pravda, G. G. Guilbault, *Talanta* **2001**, *54*, 531–559.
- [35] a) M. Aizawa, *Anal. Chim. Acta* **1991**, *250*, 249–256; b) M. Tanaka, S. Kamiya, A. Shibue, K. Namba, Y. Ikariyama, M. Aizawa, *Sens. Actuators B* **1993**, *13*, 184–187.
- [36] E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10290–10291.
- [37] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, **1980**.
- [38] <http://www.igen.com/home.htm>.
- [39] Y. Weizmann, F. Patolsky, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3452–3454.
- [40] F. Patolsky, Y. Weizmann, E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2474–2478; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2372–2376.
- [41] E. Katz, I. Willner, *Electrochim. Commun.* **2002**, *4*, 201–204.