

Nanopartikelmodifizierte Biosensoren

Michael Kibler, Anna Marie Micus, Thomas Kirner
 Department Hamm 1, Hochschule Hamm-Lippstadt/D,
 Kontakt: michael.kibler@hshl.de

Zusammenfassung

Für Sensoren in Mikroflusssystemen sind aufgrund der speziellen Flussbedingungen angepasste Elektroden notwendig. Bedingt durch den laminaren Fluss gehen die Flussgeschwindigkeiten an der Oberfläche solcher Systeme gegen Null. Damit erfolgt in den Randschichten der Transport des Analyten allein durch die Diffusion. Um konvektive Strömungen zu nutzen kann durch die Modifikation der Elektrodenoberfläche eine Messung in größerem Abstand zur Oberfläche erfolgen. Dazu wurden Gold-Mikroelektroden mit Goldnanopartikeln (AuNP) modifiziert. Die Kopplung der Nanopartikel erfolgte über Linkermoleküle in einer SAM-Schicht (self assembled monolayer) an die Elektrodenoberfläche. Die modifizierten Elektroden wurden für SECM (scanning electrochemical microscope) Messungen eingesetzt. Die Ergebnisse wurden mit den nichtmodifizierten Elektroden verglichen. Erste Messungen zeigen starke Veränderungen in der aktiven Elektrodenoberfläche.

Schlüsselwörter: Elektrochemie, Mikroelektroden, Goldnanopartikel, SECM.

Einleitung

Biosensoren auf Mikrochipbasis finden ein breites analytisches Anwendungsspektrum [1]. Die Detektion geringer Mengen Analyt an sensorischen Oberflächen ist dabei oft diffusionsbeschränkt. Eine schnelle Detektion benötigt Transportprozesse, die für einen ausreichenden Zufluss an Analyt zur Oberfläche sorgen. Dies kann über die Einbettung der Biosensoren in eine Mikroflussumgebung erreicht werden [2]. An der Oberfläche der Sensoren gehen die Flussgeschwindigkeiten, bedingt durch den laminaren Fluss in Mikroflusssystemen, gegen Null [3]. Um mehr Analyt erfassen zu können und damit die Sensitivität zu erhöhen, kann die Erfassung des Analyten durch mit Spacer versehenen Nanopartikeln in größerem Abstand zur Sensoroberfläche erfolgen. Werden metallische Nanopartikel verwendet, können elektrochemische Messmethoden, wie die zyklische Voltammetrie (CV) und Amperometrie (AMP), im Mikrochip angewandt werden.

In dieser Arbeit wurden Gold-Mikroelektroden hergestellt und mit einer SAM-Schicht, welche Linkermoleküle beinhaltet, modifiziert. Die Oberflächen der Elektroden wurden in jedem Prozessschritt zyklometrisch charakterisiert. Die modifizierten Elektroden wurden zur Überprüfung der Sensitivität als elektrochemische Sonden im SECM zur

Detektion von HeLa (Henrietta Lacks) Zellen eingesetzt.

Methoden und Materialien

Herstellung der Mikroelektroden

Ein Golddraht mit einem Durchmesser von 12,7 μm (Alfa Aesar/UK) wurde in eine Borosilicatglaskapillare (Außen- \O : 1,20 \pm 0,05 mm; Innen- \O : 0,696 \pm 0,05 mm, Hilgenberg/D) eingeschmolzen. Zur Erfassung der elektrischen Signale wurden die Golddrähte mit 2K Silberleitkleber (ITW Chemtronics/USA) mit Kupferdrähten (Reichelt/D) verbunden. Die Freilegung der Golddrahtoberfläche in der Elektrodenspitze erfolgte durch Schleifen und Polieren.

Herstellung der Goldnanopartikel

Die AuNP wurden nach einem modifizierten Protokoll von Brust *et al.* hergestellt [4]. Dazu wurden 760 μL HAuCl_4 ($c=5\text{mmol}$) in 75 mL Methanol gelöst. Anschließend wurden 1,5 mL Essigsäure und 13 μL 6-Mercapto-1-hexanol dazugegeben. Des Weiteren wurden 0,227 g Natriumborhydrid abgewogen und in 25 mL deionisiertes Wasser gelöst und in 1 mL Portionen vorsichtig dem Gemisch hinzugegeben. Diese Mischung wurde 30 min

lang gerührt. Nach dem Rührvorgang lag eine braune Flüssigkeit vor. Dies ist laut Literatur [4] ein Zeichen dafür, dass sich Goldnanopartikel mit einer Größe von ca. 2 nm gebildet haben. Anschließend wird das Gemisch mit einem Rotationsverdampfer eingedunstet. Der Rückstand wurde in 25 mL Diethylether aufgenommen.

Modifizierung der Elektroden und Kopplung der Nanopartikel

Die Goldmikroelektroden wurden in 0,5 M Schwefelsäure gereinigt und in 5 μM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ in 0,1 M KCl mittels Zyklovoltammographie (von -0,6 bis 0,6 V vs. Ag/AgCl, Vorschub: 50 mV/s) vermessen. Anschließend wurden die Elektroden für 48 h in ein 1:5 Gemisch aus 11-Mercaptoundecansäure (11-MUA) und 1-Decanthiol (Alfa Aesar/UK) eingetaucht. Nach dieser Reaktion wurde die Oberfläche erneut (Parameter, wie oben) vermessen.

Die mit SAM modifizierten Elektroden wurden in ein Gemisch aus 3 mL Ethylsigmurester, 1 mL konz. Schwefelsäure und 100 μL AuNP Lösung eingetaucht und unter Rühren bei 50°C 5 h lang inkubiert.

Anschließend erfolgte erneut eine Charakterisierung der Elektroden mittels CV.

Die Verbrauchskemikalien wurden, wenn nichts anderes angegeben, von Carl Roth/D und Sigma Aldrich/USA in der jeweils reinsten Qualitätsstufe bezogen.

SECM

Zum Test der Elektroden wurden diese als Arbeitselektroden in einem SECM (Sensolytics/D) verwendet. Der prinzipielle Messaufbau ist in Abb. 1 dargestellt. Dazu wurde ein Metrohm Bipotentostat eingesetzt.

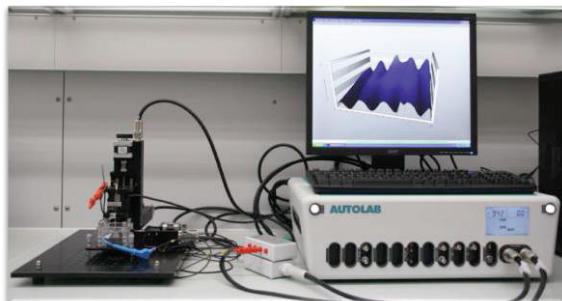


Abb. 1: Aufbau von SECM: 3 Elektrodenanordnung AE: modifizierte Gold-Mikroelektrode, RE: Ag/AgCl Elektrode, GE: Pt-Elektrode. Arbeitsabstand zur Oberfläche betrug ca. 10 μm .

Mit diesem Messaufbau wurden HeLa Zellen auf einem Glasobjektträger detektiert. Das

Messraster betrug 300 μm^2 , wobei der X-Vorschub 7 μm und der Y-Vorschub 13 μm betrug.

Ergebnisse

Charakterisierung der Elektroden

Die CVs zur Charakterisierung der einzelnen Prozessschritte zeigen deutliche Unterschiede in der redoxaktiven Fläche (Abb. 2). Eine unbeschichtete Elektrode zeigt eine maximale Spannungsdifferenz von ca. 5 nA (Abb. 2 links). Nach dem aufbringen einer SAM Schicht verringert sich die Differenz deutlich auf ca. 0,7 nA (Abb. 2 mitte). Dass keine vollständige Abdeckung der Elektrode und keine Absenkung des Stromes stattfindet, wird in der Literatur mit den Randeffekten des SAMs begründet. [5] Nach der Kopplung der AuNP ist eine deutliche Signalsteigerung auf ca. 140 nA erkennbar (Abb. 2 rechts). Trotz des großen Stroms ähnelt das CV in der Form dem einer Mikroelektrode. Mit der Cottrell Gleichung [6]:

$$i(t) = \frac{nFAD_o^{1/2}c_o^*}{\pi^{1/2}t^{1/2}}$$

wurde unter Annahme einer kreisförmigen Fläche die redoxaktive Oberfläche bei der unbeschichteten Elektrode von ca. 36,3 μm^2 , mit SAM Schicht von ca. 0,022 μm^2 und mit AuNP von ca. 28628 μm^2 ermittelt. Dabei sind in der Cottrell Gleichung n die Anzahl der übertragenen Elektronen, F die Faraday Konstante, D der Diffusionskoeffizient von $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ mit $7,6 \cdot 10^{-5}$ Mol/cm² [7] und c die Konzentration der oxidierten Redoxspezies.

Charakterisierung der Zellen mit SECM

Die Messung der HeLa Zellen erfolgte in 5 μM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ in 0,1 M KCl. Die Elektrode wurde auf -0,1 V vs. Ag/AgCl polarisiert. Wie in Abb. 3 zu sehen, konnten mit der unbeschichteten Elektrode keine Zellen detektiert werden (Abb. 3 links). Mit der mit AuNP modifizierten Elektrode sind die Zellen zu sehen (Abb. 3 rechts). Die Mitte der Abb. 3 zeigt die lichtmikroskopischen Aufnahmen des abgerasterten Bereichs (100x Vergrößerung, roter Kasten).

Diskussion

Die unbeschichtete Elektrode zeigt im Vergleich zum theoretischen Wert der Oberfläche von $A = 126,77 \mu\text{m}^2$ eine Abweichung um ca. 70 %. Durch verbesserte Reinigungsschritte konnte die Oberfläche anderer Elektroden (nicht gezeigt) dem theoretischen Wert auf fast 100 %

angenähert werden. Durch das Aufbringen der SAM Schicht wird die redoxaktive Fläche stark reduziert. Dass dennoch Wert von $0,022 \mu\text{m}^2$ gemessen wurde, wird auf Fehlstellen im SAM und andere Randeffekte zurückgeführt [5]. Nach der Modifikation mit den Goldnanopartikeln vergrößert sich die Oberfläche um ca. 780fache im Vergleich zum Ausgangswert. Die sehr geringe Hysterese in der Kurve (Abb. 2 rechts) deutet auf eine Ultramikroelektrode hin. [8, 9] Die vergrößerte Oberfläche zeigt sich auch in der erhöhten Sensitivität bei der Messung der HeLa Zellen. Wir vermuten, dass hier die Ströme der einzelnen Nanopartikel summiert werden. In diesem Fall müsste vermutlich die Cottrell Gleichung zur Berechnung der Redoxaktiven

Fläche modifiziert werden. [10] Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Modifikation mit AuNP eine deutliche Vergrößerung der redoxaktiven Fläche und damit eine Erhöhung der Sensitivität der Elektrode erreicht wurde.

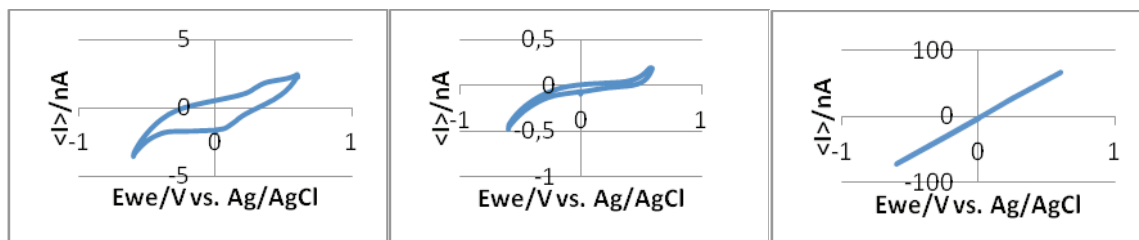


Abb. 2: Zyklovoltammogramme der Gold-Mikroelektrode. Links nicht modifiziert nach der elektrochemischen Reinigung, Mitte nach dem SAM Aufbau und Rechts nach der Kopplung der AuNP.

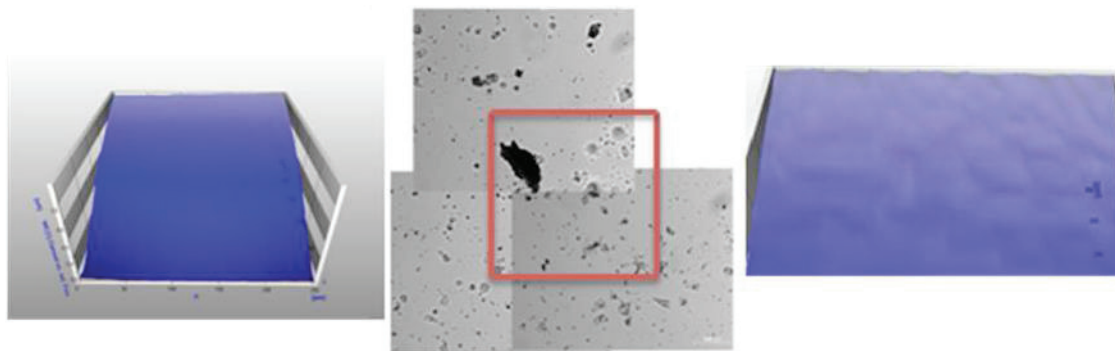


Abb. 3: Links: SECM Aufnahme des mit HeLa Zellen beschichteten Objektträgers, Mitte: lichtmikroskopische Aufnahme des mit HeLa Zellen beschichteten Objektträgers (roter Kasten: Scanbereich im SECM) und Rechts: Ausschnitt aus der SECM Aufnahme des mit HeLa Zellen beschichteten Objektträgers.

[1] Nyholm, L.: *Electrochemical techniques for lab-on-a-chip applications*. In: *Analyst* 130 (2005), Nr. 5, S. 599-605.
 [2] Girault, H. H.: *Analytical and Physical electrochemistry*. EPFL Press, 2004.
 [3] Bard, J. A.; Mirkin, M.V. (Hrsg): *Scanning Electrochemical Microscopy*, 2nd Edition, CRC Press Taylor & Francis Group, 2012.
 [4] Brust, M.; Fink, J.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Kiely, C.: Synthesis and Reactions of functionalized Gold Nanoparticles. In: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 16 (1995), Nr. 8, S. 1655-1656.
 [5] Li, Y.; Cox, J. T.; Zhang, B.: Electrochemical Responses and Electrocatalysis on Single Au Nanoparticles. In: *J. Am. Chem. Soc.* 132, (2010), Nr. 9, S. 3047-3054.

[6] Bard, A. J.; Faulkner, L., R.: *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, 2001.
 [7] Vogt, O.: *Charakterisierung gesputterter Dünnschichtelektroden auf Kunststoffoberflächen zum Einsatz in miniaturisierten Analysemethoden*, Universität Dortmund, 2004.
 [8] Buchberger, W., „Elektrochemische Analyseverfahren“, Spektrum Akad. Verl. 1998.
 [9] Zoski, C., G. (Hrsg): *Handbook of Electrochemistry*, Elsevier, 2007.
 [10] Xiao, X.; Fan, F.-R. F.; Zhou, J.; Bard, A., J.: *Current Transients in Single Nanoparticle Collision Events*. In *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008), Nr. 49, S. 16669-16677.