

Reinhard Renneberg

Biosensoren – Eine Übersicht

Biosensoren sind Messfühler, die Biomoleküle (Enzyme, Antikörper, Nukleinsäuren) in engem räumlichen Kontakt mit technischen Sensoren (zumeist Elektroden oder Chips) kombinieren. Bei der Bioanalyse findet stets eine Reaktion zwischen einem biochemischen Reagens (dem Erkennungselement) und einer zu bestimmenden Substanz (dem Analyten) statt. Die Entstehung des Reaktionsprodukts wird zumeist mit verschiedenen Techniken angezeigt. Neben den genannten molekularen biochemischen Erkennungselementen werden auch Membranrezeptoren, Organellen, sowie komplette Zellen verwendet.

Biomimetische Erkennungselemente ahmen zunehmend die Funktionen von biochemischen „Bindungselementen“ und auch von Biokatalysatoren nach. Diese künstlichen Systeme werden in Synthesemaschinen aus monomeren Bausteinen erzeugt. Dabei werden Nukleotide zur Erzeugung von Aptameren (aptus = passfähig) oder polymerisierbare Monomere zur Bildung von molekularen „Imprints“ (molekular geprägte Polymere, MIPS) verwendet.

Auch in der Analytik, wie zuvor schon in der Biotechnologie, werden trägerfixierte (immobilisierte) Biomakromoleküle genutzt. Diese technologische Entwicklung führt zu integrierten Konfigurationen, d.h. zu

- *Teststreifen,*
- *Biosensoren,*
- *Biochips.*

1. Teststreifen

Ein erster Teststreifen (*dipstick*) in der Analytik war *Lackmuspapier*, das als pH-Indikator für Säuren und Basen diente. Seit Beginn der sechziger Jahre des 20. Jahrhunderts werden Teststreifen auch für diagnostische Zwecke verwendet. Oft wird dafür die Bezeichnung „Trocken-Chemie“ als Oberbegriff zur Unterscheidung von konventionellen analytisch-diagnostischen Verfahren („Nass-Chemie“) verwendet.

Eine der wichtigsten medizinischen Indikationen für die Verwendung solcher Teststreifen ist die Überwachung der Zuckerkrankheit (*Diabetes mellitus*) [1]. Etwa 8 % der deutschen Bevölkerung und 4 % der Chinesen sind an Diabetes erkrankt bzw. als Diabetiker erkannt. Im Verlauf der weiteren dynamischen Entwicklung Chinas nimmt die Anzahl der Diabetiker jedoch rasant zu; die Anzahl unentdeckter Diabetiker liegt in der Größenordnung mehrerer Millionen.

Diabetes mellitus (lateinisch für „honigsüßer Durchfluss“) ist eine durch einen permanent erhöhten Blutzuckerspiegel charakterisierte Stoffwechselerkrankung. Enthält Blut zu viel Glucose, kön-

nen die Nieren den Zucker nicht mehr herausfiltern, und die Glucose wird vermehrt über den Urin abgegeben.

Ursache des Diabetes ist ein Mangel bzw. eine gestörte Wirksamkeit des Hormons Insulin, das in der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) gebildet wird. Insulin senkt den Blutzuckerspiegel, indem es die lebensnotwendige Glucose in die Zellen schleust. Der normale Blutzuckerspiegel liegt zwischen 60 und 110 mg/dl und steigt auch nach einer Nahrungsaufnahme nicht über 140 mg/dl an. Bei Diabetikern liegt dieser Wert bereits im nüchternen Zustand bei mehr als 126 mg/dl und erreicht nach der Nahrungsaufnahme Werte von 200 mg/dL und darüber [2].

Beim Typ-1-Diabetes fehlt Insulin aufgrund einer Zerstörung der Insulin produzierenden Zellen (β -Zellen) in der Bauchspeicheldrüse. Über 95 % der Diabetiker sind allerdings an Typ-2-Diabetes erkrankt, auch „Altersdiabetes“ genannt. Bei dieser Form ist Insulin zwar vorhanden, kommt aber nicht hinreichend zur Wirkung, und der Körper ist nicht mehr in der Lage, diesen Verlust durch eine Insulin-Mehrproduktion auszugleichen. Daher wird zum Ausgleich gentechnisch erzeugtes Insulin injiziert.

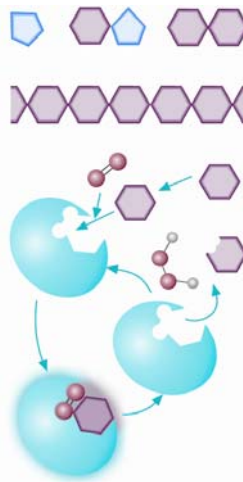


Abb. 1: Selektive biokatalytische Umwandlung von β -D-Glucose mit Sauerstoff durch Glucose-Oxidase [1]

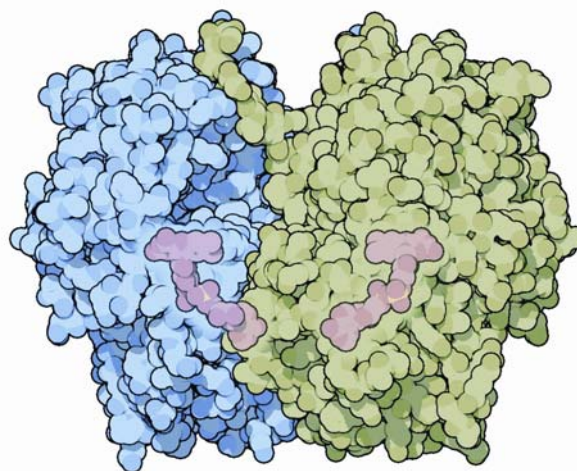


Abb. 2: Glucose-Oxidase (GOD), ein Schlüsselenzym der Biosensorik, ist ein Dimeres und trägt Flavinadeninindinucleotid (FAD) als prosthetische Gruppe (in der Abbildung violett) [1].

In den letzten Jahren ist weltweit ein dramatischer, nahezu epidemieartiger Anstieg der Diabetes-Neuerkrankungen zu beobachten. Derzeit wird angenommen, dass in Industriestaaten 7-8 % der Bevölkerung von Diabetes betroffen sind.

Der Erfolg des einfachen Nachweises von Glucose im Urin 1964 mit einem Teststreifen führte dazu, enzymatische und chemische Teststreifen auch für weitere Analyten zu konzipieren. So für die Untersuchung von Blut, Plasma und Serum. Da bei der visuellen Auswertung der Teststreifen subjektiv bedingte Schwankungen nicht zu vermeiden sind, wurden zur Objektivierung der Messergebnisse zunehmend elektronische Auswertegeräte entwickelt.

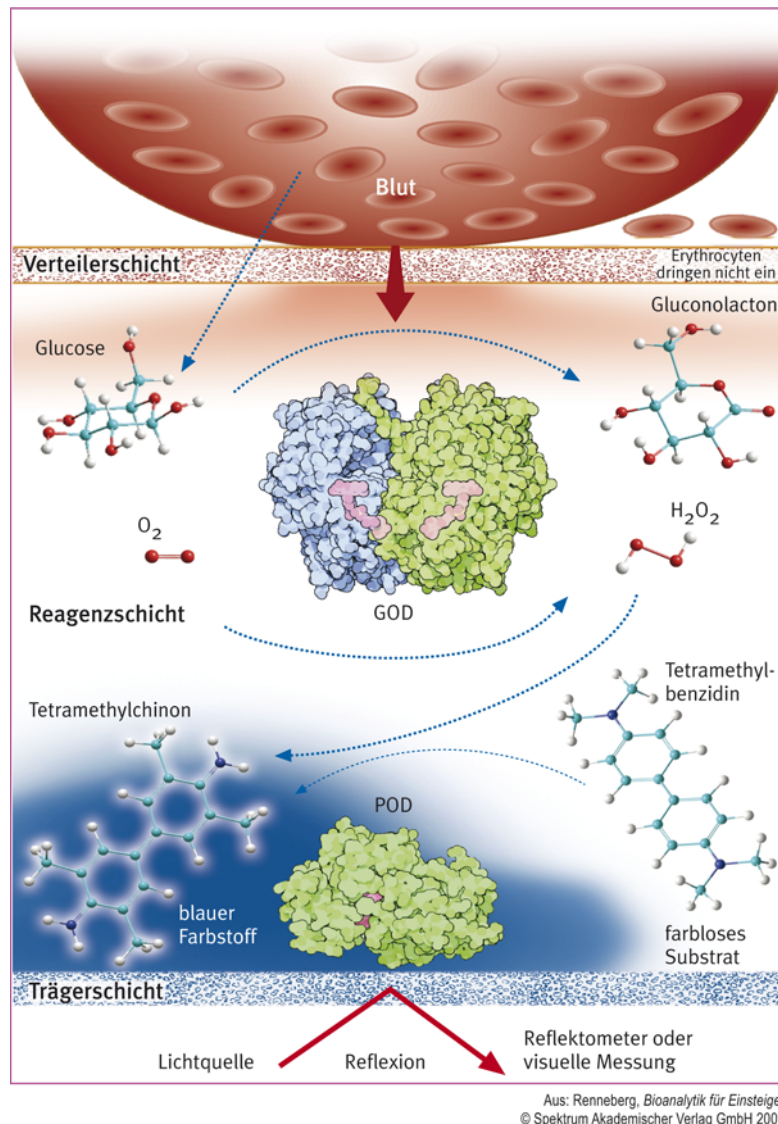


Abb. 3: Prinzip eines Glucose-Teststreifens

Zur Herstellung von Mehrschicht-Teststreifen wurden Technologien aus der Farbphotographie angewandt. Die Verwendung der Mikroprozessortechnologie trug zudem bedeutend zur Vereinfachung der Bedienung und Überwachung der Auswertegeräte bei. Die verwendeten enzymatischen Methoden sind in vielen Fällen bekannte Verfahren aus der Nass-Chemie: Das in der Probe enthaltene Wasser löst die Reagenzien auf, und die Umsetzung des Analyten im Teststreifen erzeugt das Messsignal – z.B. die Bildung eines Farbstoffes oder eines elektrodenaktives Produktes.

Im allgemeinen genügen wenige Mikroliter Blut, und die Messergebnisse liegen innerhalb weniger Minuten vor.

Unterschiedliche Typen von Immuntests, vor allem mit Enzym-Label oder kolloidalem Gold, sind für „*lateral flow*“ Immuno-Teststreifen angepasst worden. Die Tests gestatten sowohl die Bestimmung von Makromolekülen (z.B. Proteinen) als auch von Haptenen (Pestizide, Arzneimittel). Ein bekanntes Beispiel ist der Schwangerschaftstest, bei dem das Protein Human-Choriogonadotropin (hCG) bestimmt wird. Der gegenwärtig schnellste, in unserer Arbeitsgruppe der HUKST zusammen mit Prof. Jan Glatz/Maastricht, entwickelte Herzinfarkttest der Welt, misst dagegen den Herzinfarktmarker Fettsäure-Bindungsprotein (FABP) [3].

2. Biosensoren

2.1 Konzept

Die Biosensorik basiert auf der direkten räumlichen Kombination von immobilisierten biochemischen Erkennungselementen mit physikochemischen Signalwandlern zur Quantifizierung von Analyten in komplexen Medien [4].

Anfang der sechziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts positionierten die Biosensor-Pioniere Leland Clark jr., Gary Rechnitz, Frieder W. Scheller und George Guilbault die zu einer Substratumsetzung erforderlichen Enzyme direkt auf Messfühler.

Clark und Lyons verwendeten 1962 als Messfühler eine Sauerstoffelektrode. Zum Schutz vor Störsubstanzen war die Elektrode mit einer Membran bedeckt. Zuvor wurde die Enzymlösung mit einer halbdurchlässigen Folie eingeschlossen. Diese direkte Integration von Enzym und Messfühler erlaubt die Wiederverwendung der Enzyme. Clark bezeichnete diese Anordnung als *Enzymelektrode* und meldete 1962 das erste Patent zu diesem Prinzip an. Karl Cammann verwendete dafür 1977 als erster den Begriff *Biosensor*. Enzymelektroden sind eine Untergruppe der Biosensoren. Gegenwärtig liegt allein der Weltmarkt für die Nutzung von Enzymelektroden zur Bestimmung von Glucose im Blut bei etwa 10 Milliarden US-Dollar pro Jahr.

In der Folgezeit wurden neben Enzymen auch intakte Zellen (Zellsensoren, mikrobielle Sensoren), Antikörper (Immunsensoren) und Nukleinsäuren in Sensoren integriert und mit neuen Transduktoren erfolgreich eingesetzt. Ab Mitte der 1970er Jahre entwickelte sich an der Nahtstelle zur Analytischen Chemie die Biosensorik als ein eigenständiger Zweig der Biotechnologie.

2.2 Aufbau und Funktion von Biosensoren

Nach der Definition der *International Union for Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) sind Biosensoren durch die direkte räumliche Kopplung einer immobilisierten biologischen Erkennungssubstanz (Enzyme, Antikörper, Nukleinsäuren, Aptamere) mit einem Signalwandler (Transduktor) charakterisiert. Diese Integration von biochemischem Erkennungselement und Transduktor vereinfacht das analytische Werkzeug erheblich. Damit wird die kontinuierliche Messung des Analyten prinzipiell möglich.

In Biosensoren laufen nacheinander folgende Prozesse ab:

1. Erkennung der zu messenden Substanz durch die biologische Erkennungssubstanz,
2. Umwandlung der physikochemischen Veränderung, die bei der Wechselwirkung mit dem Analyten entsteht, in ein elektrisches Signal,
3. Elektronische Signalverstärkung und digitale Anzeige.

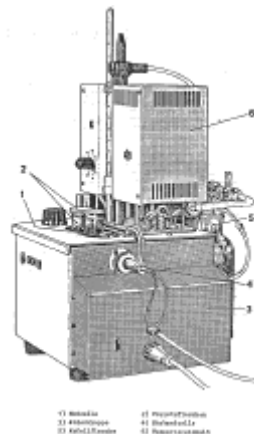


Abb. 4a und 4b: Wiederverwendbarer Glucosebiosensor – Prototyp (1972) und moderne Weiterentwicklung

Das Schema eines Biosensors (Abbildung 5) zeigt die räumliche Integration von biologischer Erkennung und Signalwandlung.

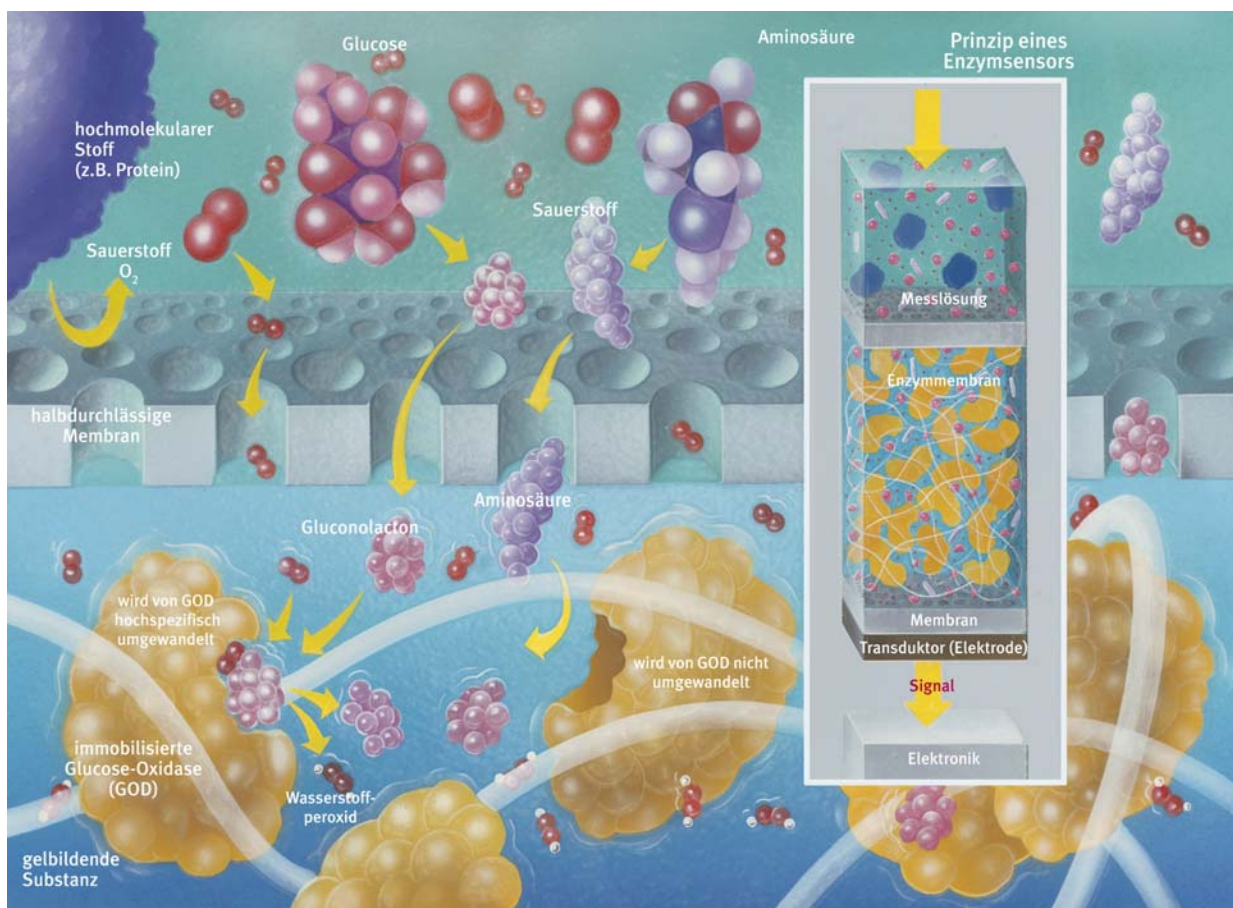


Abb. 5: Enzymmembran eines wieder verwendbaren Glucosesensors

GOD wird in Purethan-Gel eingeschlossen und mit einer semipermeablen Membran geschützt und vor einer amperometrischen Elektrode (Potential +600 MV versus Ag/AgCl) fixiert. Aus einem Gemisch in der Probe (links) diffundieren nur niedermolekulare Substanzen und Sauerstoff (in der Abbildung rot) durch die Poren der Dialysemembran

(Bildmitte) in das Gel (hellblau). Hochmolekulare Analyten, Proteasen oder Mikroben (oben links) können die Membran nicht durchdringen.

Die GOD setzt nur die β -D-Glucose unter Sauerstoffverbrauch und Bildung von Gluconolacton und H_2O_2 um. Die immobilisierte GOD kann aus der Membran nicht ausgewaschen werden. Das entstehende Produkt H_2O_2 ist ein elektrodenaktiver Stoff, d.h. seine Konzentration kann mit Hilfe der Elektrode ermittelt werden.

Die Konzentration der Glucose ist der H_2O_2 -Konzentration und diese der Stromstärke proportional. Für eine Glucosebestimmung wird der Biosensor in die zu prüfende Lösung getaucht. Anhand des gebildeten Wasserstoffperoxids lässt sich die enthaltene Glucosemenge schnell bestimmen.

Nach der Messung wird die Enzymmembran mit Lösungen gespült, die keine durch GOD umsetzbare Substanzen enthalten. Dadurch wäscht man die vorher eindiffundierten Substanzen und die Produkte der GOD-Reaktion aus. Der Biosensor ist somit regeneriert und erneut messbereit. Mit ein und derselben Enzymmembran kann man schnell, mit hoher Präzision und preiswert 10.000 bis 20.000 Messungen durchführen.

Das Insert zeigt das Gesamtschema der Signalverarbeitung.

In Analogie zur Affinitätschromatographie wurden so genannte *Affinitätssensoren* entwickelt. Dabei werden Antikörper, Nukleinsäuren, zuckerbindende Proteine (Lektine) oder Hormon-Rezeptoren in immobilisierter Form für die molekulare Erkennung von Antigenen, komplementären Nukleinsäuren, Antigenen, Glycoproteinen oder Hormonen benutzt.

Die bei der Komplexbildung eintretende physikochemische Veränderung – z.B. die Veränderung der Schichtdicke, des Brechungsindex, der Lichtabsorption, der Masse oder der Ladungsverteilung – kann mit optoelektronischen Sensoren, amperometrischen und potentiometrischen Elektroden, Piezosensoren oder Feldeffekt-Transistoren direkt angezeigt werden. In Analogie zu den Bindungsassays mit Antikörpern oder Nukleinsäuren werden häufig Marker-Enzyme oder Fluoreszenzfarbstoffe zur Signalerzeugung eingesetzt.

Biosensoren, die auf der molekularen Erkennung von Substraten durch Biokatalysatoren und der chemischen Umsetzung basieren, erhielten die Bezeichnung *katalytischer Sensor*. Hierbei wird der Ausgangszustand durch die Umsetzung des Analyten regeneriert. Eine kontinuierliche Messung ist dabei prinzipiell möglich, weil die Geschwindigkeit der Enzymreaktion proportional zur Analytkonzentration folgt. Neben Substraten können auch Cosubstrate, wie NAD(P)H oder Aktivatoren, insbesondere aber Inhibitoren (z.B. von Acetylcholinesterasen durch Phosphoorganica) mit Enzymsensoren bestimmt werden.

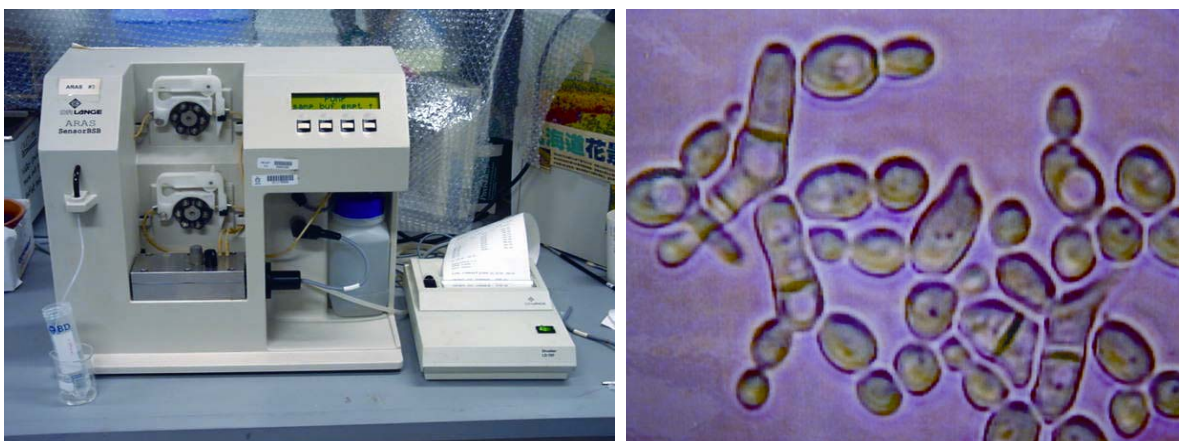


Abb. 6a und 6b: Mikrobielles Biosensorsystem und verwendete *Arxula*-Hefen [1]

Ein Jahrzehnt nach der Erfindung der Enzymelektrode wurden auch intakte lebende Zellen zur Erkennung und Umsetzung des Analyten in einem der Enzymelektrode analogen Sensor verwendet.

Mikrobielle Sensoren, die lebende Bakterien- oder Hefezellen verwenden, werden gegenwärtig vor allem im Abwasser-Monitoring eingesetzt.

2.3 Generationen von Enzymelektroden

Chemische Signale werden zwischen Kompartimenten der biologischen Zelle, meist durch Rezeptoren übertragen. In Enzymsensoren vermitteln dagegen niedermolekulare diffusible Reaktionspartner das chemische Signal von der Enzymschicht zur Elektrode (*1. Generation*). Für Oxidasen wird der Verbrauch von Sauerstoff und die Bildung von Wasserstoffperoxid, der Umsatz des Co-substrates NAD(P)H bei Dehydrogenasen und der Verbrauch von Wasserstoffperoxid bei Peroxidasen mit amperometrischen Elektroden angezeigt. Die Änderung des pH-Wertes bei der Substratumsetzung durch Hydrolasen wird mit potentiometrischen Elektroden erfasst.

Bei verschiedenen Oxidasen kann der Sauerstoff durch niedermolekulare künstliche Redoxüberträger – sogenannte Mediatoren – ersetzt werden. Damit erfolgt die Messung unabhängig von der Gegenwart von Sauerstoff und Störeinflüsse (durch an der Elektrode oxidierbare Probenbestandteile) werden vermieden.

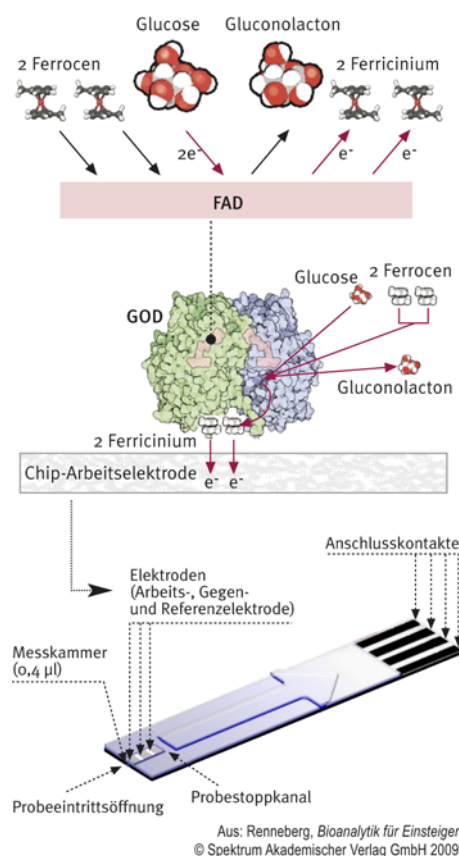


Abb. 7: Einweg-Biosensor für Glucose

Im aktiven Zentrum der am Chip adsorbierten GOD bindet sich β -D-Glucose am Flavinadeninucleotid (FAD) und gibt 2 Elektronen an das FAD ab. Zwei niedermolekulare Mediator-Moleküle wirken dann an Stelle des molekularen Sauerstoffs als Elektronenakzeptoren am reduzierten FAD. Sie diffundieren aus dem aktiven Zentrum heraus und zur Chip-Oberfläche. Dort werden sie oxidiert, d.h. geben ihre Elektronen bei etwa +50 mV vs Ag/AgCl ab. Die Stromstärke ist proportional zu den transferierten Elektronen und diese zur Glucose-Konzentration. Die GOD-Chips sind vorkalibriert. Im Prinzip wird ein Elektronenfluss von der Glucose zum Chip aufgebaut, eine Art Biochip.

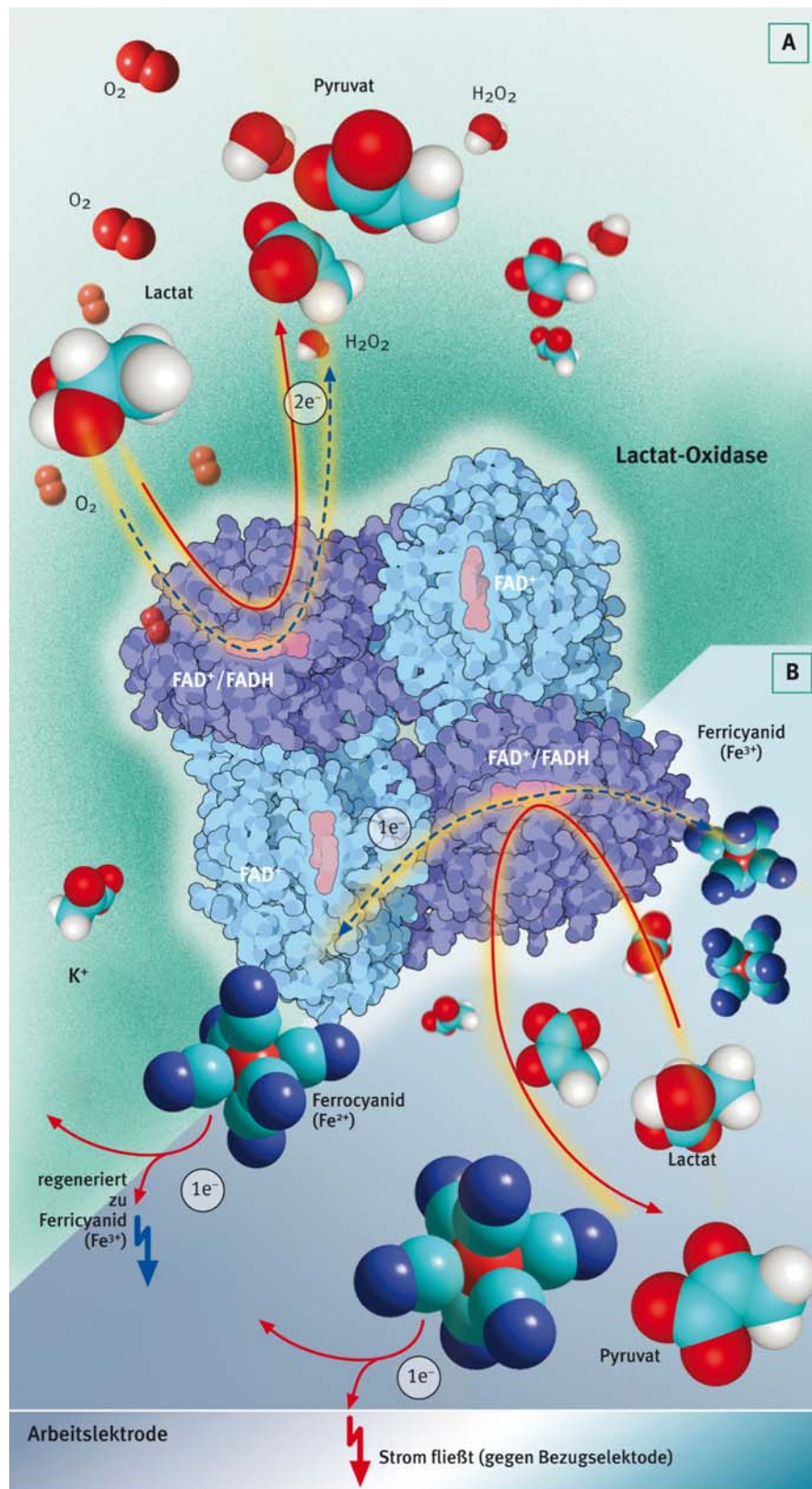


Abb. 8: Zur Bestimmung der Lactatwerte von Sportlern eingesetzte Lactatsensoren verwenden statt Glucose-Oxidase Lactat-Oxidase. (Erläuterungen s. Folgeseite)

Die Lactat-Oxidase setzt mit Hilfe seiner redoxaktiven Zentren (FAD⁺/FADH) unter Sauerstoffverbrauch das Lactat zu Pyruvat um. Sauerstoff ist der natürliche Elektronenakzeptor der Lactat-Oxidase, der die Elektronen aus der Oxidation des Lactats übernimmt und dadurch zu Wasserstoffperoxid reduziert wird.

Da Sauerstoff jedoch nur in geringer Konzentration löslich ist, würde er die Reaktion begrenzen, weil Lactat in viel höherer Konzentration im Vollblut vorliegt. Deshalb wird für Einmal-Laktatsensoren ein künstlicher Elektronenakzeptor verwendet, der in einer Überschusskonzentration vorgelegt wird.

Die Lactat-Oxidase oxidiert das Lactat zu Pyruvat und überträgt die frei werdenden Elektronen aus der Oxidationsreaktion auf das Ferricyanid (Fe³⁺), das dabei zu Ferrocyanid (Fe²⁺) reduziert wird. Durch Abgabe eines Elektrons an die Arbeitselektrode des Sensorchips erfolgt die Regeneration des Ferrocyanids zu Ferricyanid, das nun für eine weitere Reaktion zur Verfügung steht. Infolge der Elektronenübertragung wird ein Stromfluss verursacht, der proportional zur Lactatkonzentration ist.

Eine Integration des Mediators in den Sensor – z.B. in eine Kohlepaste oder als Redoxpolymer auf der Elektrodenoberfläche – führt zur reagenzfreien Messung (2. *Generation*). Bei der 3. *Generation* von Enzyelektroden erzeugt der mediator-freie Elektronentransfer zwischen dem Enzym (das den Analyten umsetzt) und einer Redoxelektrode ein direktes Signal.

2.4 Zellsensoren

Zehn Jahre (1977) nach der ersten Enzyelektrode konstruierten Isao Karube und Shuichi Suzuki in Japan die erste Zellelektrode [4]. Neben Bakterien wurden auch Hefen und später Säugerzellen (z.B. Krebszellen und Neuronen) erprobt. Aufgrund ihrer Stabilität haben sich Mikrobenzellen durchgesetzt. Anstelle einzelner Enzymen, wie beim Glucose- und Lactatsensor, verwendet man komplexe Enzymsysteme, also intakte Zellen. Dabei wird deren Respiration ausgewertet. Der Messwert erfasst den Einfluss der Bestandteile der Messprobe auf die Zellatmung und erlaubt damit Rückschlüsse auf sogenannte Gruppenparameter, d.h.

- den Nährstoffgehalt von Fermentationsmedien,
- die Belastung von Abwasser mit abbaubaren Substanzen,
- die mutagene Wirkung von Chemikalien,
- die kanzerostatische Wirkung bei Verwendung von Krebszellen.

Zellsensoren erlauben somit die Quantifizierung von biologischen Wirkungen, was mit chemischen Methoden nicht möglich ist.

Werden Abwässer in Seen, Flüsse und das Meer eingeleitet, verringert sich die Konzentration des gelösten Sauerstoffs im Wasser dramatisch: Aerobe Bakterien und Pilze benötigen ihn für den Abbau der eingeleiteten organischen Substanzen. Kläranlagen, Biofabriken zur Erzeugung sauberen Wassers, verlangen deshalb zusätzlichen Eintrag von Sauerstoff. Daher wird (wie im Aquarium) dem verunreinigten Wasser Luftsauerstoff zugesetzt.

Mit dem 1896 in England erstmals verwendeten Verfahren „Biochemischer Sauerstoffbedarf (BSB)“ (BOD, *biochemical oxygen demand*) lässt sich die organische Belastung von Wasser bestimmen. Der BSB₅-Wert dient der Abschätzung des biologisch leicht abbaubaren Anteils der gesamten organischen Wasserinhaltsstoffe; er ergibt sich aus dem Sauerstoffbedarf heterotropher Mikroorganismen. Die beim Abbau bei 20 °C durch die Mikroben dem Wasser entzogene Sauerstoffmenge wird auf eine bestimmte Anzahl von Tagen bezogen, im Fall des BSB₅ auf fünf Tage.

Der BSB₅-Wert ist für die Vergleichbarkeit von Abwässern wichtig; danach richten sich auch die Abwassergebühren. Der Wert sagt aber nichts über die Belastung mit nicht-abbaubaren Verbindungen aus. Der Nachteil der BSB-Bestimmung liegt in der lang dauernden Testzeit. Fünf Tage Messdauer gestatten keine sinnvolle Nutzung des Tests zum Monitoring und zur Steuerung der

Abwasseranlagen. Mikrobielle Biosensoren messen dagegen den BSB von Abwässern in nur fünf Minuten.

Lebende, auf Sensoren immobilisierte Mikroben – meist Hefen wie *Trichosporon cutaneum* und *Arxula adenivorans* – können direkt die organische Belastung im Abwasser messen. Die halophile Hefe *Arxula* eignete sich bestens für Abwassersensoren: In küstennahen tropischen Ländern – auch im subtropischen Hongkong mit Süßwassermangel – werden nämlich Toiletten aus Mangel an Süßwasser mit Meerwasser gespült. Abwasser hat hier also einen hohen Salzgehalt, der viele Mikroben inaktiviert – nicht jedoch die halophile *Arxula*.

Der BSB-Test benötigt für eine Messung fünf Tage, der mikrobielle Biosensor dagegen nur fünf Minuten. Die lebenden Hefezellen werden dazu in einem polymeren Gel immobilisiert (wie beim Glucosesensor) und auf eine Sauerstoffelektrode montiert. Der Sensor misst die Respirationsrate (Sauerstoffverbrauch) der „ausgehungerten“ Zellen. Wird eine Abwasserprobe, die keine verwertbaren Substanzen enthält, zugefügt, nehmen die Hefen auch keinen zusätzlichen Sauerstoff auf. Sie sind sozusagen im *Stand-by-Modus*. Sobald jedoch eine Probe mit Kohlenhydraten, Aminosäuren oder Fettsäuren zugegeben wird, werden die Zellen aktiv, nehmen diese auf und „veratmen“ sie. Die Sauerstoff-Verbrauchsrate steigt proportional zur „Futtermenge“. Kalibriert werden die mikrobiellen Sensoren mit einem Standard aus Glucose und der Aminosäure L-Glutamat.

Mikrobielle Sensoren sind ideal für das Monitoring von Abwasseranlagen. Sie zeigen an, wie hoch belastet das einkommende Wasser ist und regeln die Luftpumpen für das Belebtschlammbecken. So kann erheblich Energie gespart werden. Ein Biosensor am Ausfluss der Kläranlage zeigt an, ob und wie erfolgreich das Wasser tatsächlich gereinigt wurde.

2.5 Immunosensoren

Neben Immuno-Teststreifen und ELISAs wurden auch *Biosensoren auf Antikörperbasis* entwickelt. Immunosensoren detektieren die Erkennung und Bindung von Antigenen an Antikörper [5]. Wie bei allen Biosensoren sind die Erkennungselemente (Antikörper oder Antigene/Haptene) auf der Oberfläche von Transduktoren immobilisiert. Man unterscheidet dabei marker-freie *direkte Immunosensoren*, die die Wechselwirkung von Antikörper und Antigen direkt messbar machen (z.B. Masseänderungen mit SPR oder Piezokristallen) von *indirekten*. Indirekte Immunosensoren benutzen zusätzliche Marker (Enzyme, Fluorophore), um die erfolgte Wechselwirkung anzuzeigen. In der Praxis dienen fast ausnahmslos optische Transducer als Basis.

Mittlerweile sind die Geräte zur Erkennung von Antigen-Antikörper-Bindungen hoch entwickelt und im Laufe ihrer Weiterentwicklung zudem noch sehr viel leichter zu bedienen und zuverlässiger geworden. So wog beispielsweise der erste faseroptische Biosensor (*fiber optic biosensor*) über 70 kg, die Flüssigkeiten wurden von Hand aufgebracht und die Proben pro Durchgang nur auf jeweils eine Substanz untersucht. Heute sind vollautomatische faseroptische Biosensoren verfügbar, die simultan acht verschiedene Substanzen untersuchen und zusammen mit einem Luftkeimsammler auf dem Rücken getragen werden können. Eine andere Version dieses Systems wird als zehn Pfund schwere Zuladung an einem sehr kleinen unbemannten Flugzeug befestigt und kann im Flug Bakterien identifizieren.

Die meisten dieser Immunosensoren wenden folgendes Prinzip an: Fänger-Antikörper werden mittels Avidin und Biotin an eine Glasoberfläche gebunden. Dies kann entweder eine Faseroptik sein oder ein einfacher Objektträger aus Glas. Man leitet einen Laserstrahl durch das Glas auf die Oberfläche mit den Antikörpern. Ist das Glas mit einer Flüssigkeit bedeckt, gelten zwei verschie-

dene Brechungsindices. Trifft der Lichtstrahl die Oberfläche in einem kleineren als dem kritischen Winkel, kommt es zu einer Totalreflexion (TIR, *total internal reflection*) des Lichtstrahls (Abbildung 9). Die Totalreflexion erzeugt eine evaneszente Welle auf der Glasoberfläche. Diese dringt 100 nm in die flüssige Lösung ein – das ist exakt der aktive Wirkbereich von Antikörpern.

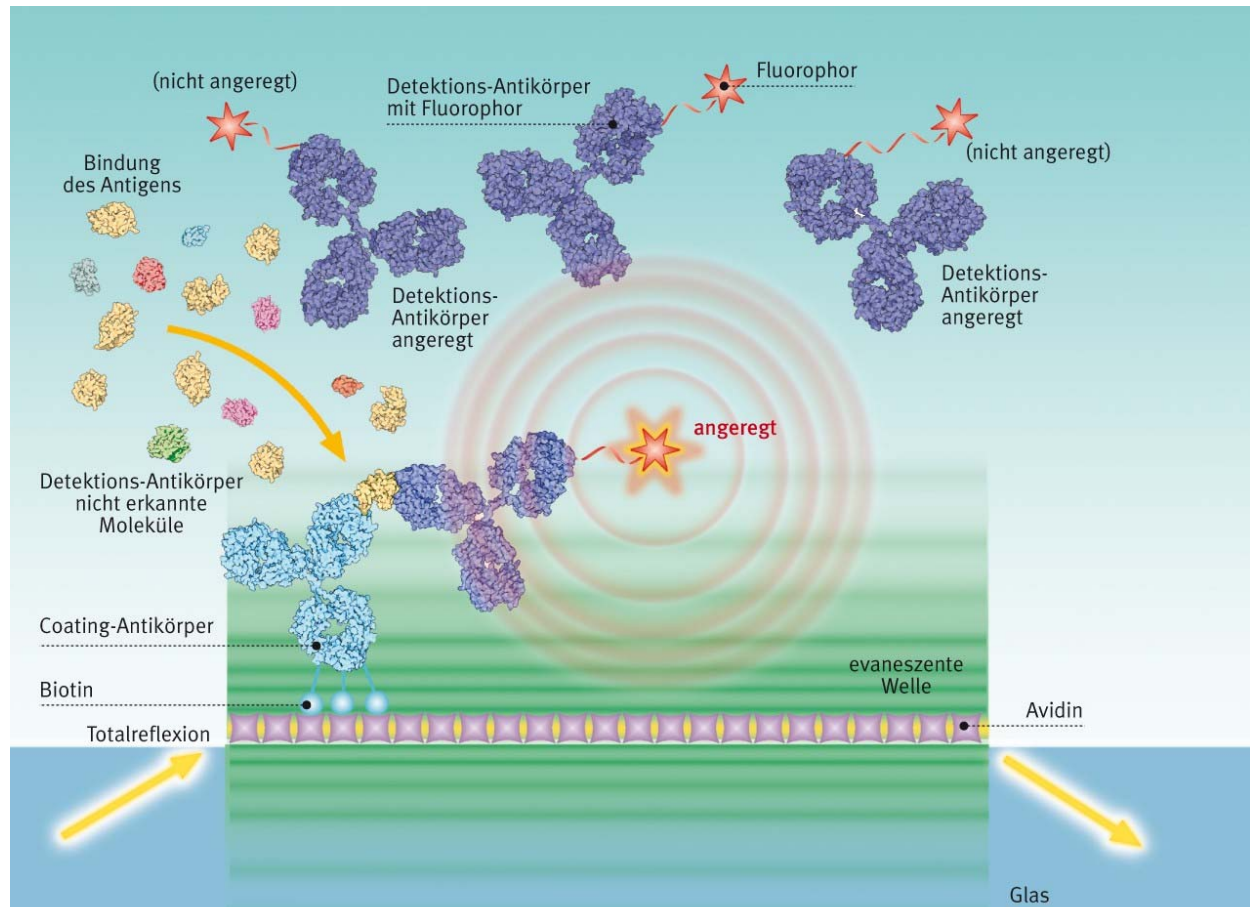


Abb. 9: Prinzip eines Immunosensors, der den Effekt evaneszenter Wellen nutzt, um Marker anzuregen, die an Detektions-Antikörper gebunden sind. [1]

Zwei verschiedene Antikörper werden zur Detektion eingesetzt. Nachdem der Fänger-Antikörper (auch *Coating*-Antikörper genannt, weil er die Oberfläche bedeckt) das Antigen gebunden hat, bindet ein zweiter Antikörper (mit einem Fluoreszenzmarker markiert) an das bereits gebundene Antigen und bildet so ein Sandwich. Es ist die gleiche Situation wie beim ELISA-Test, bei dem aber Enzyme als Marker verwendet werden.

Solch ein Sandwich-Konstrukt hat eine Höhe von etwa 30-50 nm. Der Fluoreszenzmarker befindet sich mithin im Bereich der Energie der evaneszenten Welle. Die Welle regt den Fluoreszenzmarker an, der daraufhin Licht emittiert. Dies zeigt an, dass das Antigen gebunden ist und „erkannt“ wurde. Nicht gebundene Detektor-Antikörper werden nicht angeregt, weil sie außerhalb der Reichweite der Welle liegen. Anschließend wird das Fluoreszenzsignal gefiltert und verstärkt. Diese Immunosensoren sind ausreichend sensitiv im ppb-Bereich (*parts per billion*). Das entspricht etwa der Menge eines Esslöffels Kochsalz in einem Schwimmbecken olympischer Größe.

Neuartige, auf Antikörpern basierende Biosensoren sind höchst sensitiv und haben sich zur Erkennung und Überwachung von Pestiziden in der Landwirtschaft, Toxinen und Pathogenen in homo-

genisierten Nahrungsmitteln, Krankheitsmarkern in klinischen Flüssigkeiten und biologischen Kampfstoffen in Luft und Wasser etabliert.

3. Von der Enzymelektrode für Glucose zum elektronischen DNA-Biochip

Die Entwicklung der Biosensorik ist durch folgende Tendenzen charakterisiert:

- Diversifizierung der biologischen Erkennungselemente und Signalwandler,
- Erhöhung der Integration,
- Miniaturisierung,
- Entwicklung von Arrays.

Die biochemische Erkennung des Analyten war und ist der Kern des Meßvorgangs, und die räumliche Integration mit der Signalerzeugung führte zur Entwicklung von Biosensoren und Biochips. Auch die Entwicklung der „Auslesemethoden“ (Transduktoren) hat die Biosensorik nachhaltig beeinflusst. Die aus der Sauerstoffelektrode von L. Clark entwickelte Glucoseelektrode und pH-anzeigende Sensoren haben die Biosensorik initiiert.

Nach dem „elektrochemischen Start“ mit Enzymelektroden wurde in Analogie zur traditionellen Photometrie versucht, die biochemische Erkennungsreaktion optisch auszulesen. Durchbrüche wurden aber erst mit der Verfügbarkeit stabiler Fluoreszenzfarbstoffe erzielt und zwar bei Immunosensoren und DNA-Chips. So dominiert bei den DNA-Sensoren – und vor allem bei den Nucleinsäure-Arrays – der Einsatz von Fluorophor-markierten Bindungspartnern.

Bei den Immunosensoren haben mit der Einführung des BIAcore (auf Basis Oberflächenplasmonresonanz durch die Firma Pharmacia „markierungsfreie“ (*label free*) Assays an Bedeutung gewonnen. Das gilt für optische Methoden wie die reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS), aber auch für piezoelektrische Schwingquarze (QCM). Alternativ zu den Biosensoren erleben auch die Immunoassays eine stürmische Entwicklung. Dabei dominieren Testformate in Mikro- und später Nanotiterplatten mit photometrischer Auslese.

Die Entwicklung von Nucleinsäure-Arrays auf festen (Chip-)Trägern erfolgte dann ab 1990 unter entscheidender Beteiligung von Mark Schena und Stephen Fodor. Durch die US-Firma Affymetrix wurde diese DNA-Chip-Technologie entscheidend vorgebracht, und es wurden Chips mit bis zu 1,2 Mio unterschiedlichen Spots angeboten. Diese DNA-Arrays verwendeten für die Signalauslesung Fluoreszenzreader.

4. Entwicklungstrends

Die wesentlichen Vorteile der Biosensoren liegt in der Wiederverwendung des Messfühlers und der Möglichkeit der Miniaturisierung. Das ermöglicht ein kontinuierliches Messregime und für die Messungen einzelner Proben wird eine Vereinfachung der Analyse und die Senkung der Reagenzkosten erreicht. Das grosse Potential der Biosensoren liegt bei der *online*-Konzentrationsmessung, z.B. *in vivo* mit implantierten Sensoren. Allerdings sind mehrere Probleme für einen Langzeiteinsatz noch nicht gelöst.

Nach dem Durchbruch der elektrochemischen Glucosebiosensoren gegenüber den optisch bzw. visuell auszuwertenden Teststreifen wurden „voll elektronische“ DNA-(Hybridisierungs-)Chips entwickelt. Bei diesen stehen (im Gegensatz zu den optischen DNA-Chips) Erkennungselement

und Transduktor in direktem räumlichen Kontakt. Sie stellen hoch parallele Biosensor-Arrays dar. Bisher benutzen diese Biochips Markerenzyme zur Erzeugung eines elektrochemisch aktiven Produkts. Gleichzeitig erfolgt die Entwicklung zur elektrochemischen Anzeige mittels Redoxlabel, wobei auf die Zugabe von Reagenzien verzichtet werden kann.

Die aktuellen Entwicklungen zur Sequenzierung einzelner DNA-Moleküle (*next generation sequencing*) im Rahmen von „1.000 Dollar-Genom Projekten“ benutzen ebenfalls Prinzipien der Biosensorik. Das Erkennungselement ist eine Nanopore bzw. sind einzelne DNA-Polymerase-Moleküle. Sie sind auf der Oberfläche des Transduktors direkt fixiert. Die Auslese jedes einzelnen Nukleotides erfolgt über den elektrischen Widerstand.

5. Anwendungen von Biosensoren und Markt

Biosensoren haben sich auf Gebieten durchsetzen können, in denen die Integration von molekularer Erkennung und Signalwandlern gegenüber anderen Analysekonfigurationen zu Vorteilen geführt hat. Das gilt bisher für die *dezentrale Blutglucosemessung*. Hier führt das reagenzlose Messregime zu einer einfachen und exakten Analysedurchführung. Darüber hinaus erlaubt die Miniaturisierung des Sensors eine Verringerung des erforderlichen Probevolumens, was bei der Blutglucosemessung eine weitgehend schmerzfreie Probenentnahme ermöglicht. In klinischen Labors werden dagegen wiederverwendbare Glucosesensoren benutzt, die etwa 10.000 Messungen mit einer Enzymmembran gestatten.

Die Affinitätsbiosensoren sind die zweite Erfolgsgeschichte. Die biospezifische Interaktionsanalyse als wichtige Methode der Pharmaentwicklung erlaubt durch die „*Online-Messung*“ die Bestimmung kinetischer Daten und geht damit über das Potential anderer Methoden hinaus. Die schwedische Firma BIAcore, die aus der Firma Pharmacia hervorging, brachte in den achtziger Jahren das erste automatische Gerät für die „biospezifische Wechselwirkungsanalyse“ auf den Markt.

Bei der aus der Kombination von Molekularbiologie und Mikroelektronik entstandenen Nukleinsäurechips ist die US-Firma Affymetrix eindeutiger Marktführer. Die aktuellen Entwicklungen zur Sequenzierung einzelner DNA-Moleküle basieren auf Prinzipien der Biosensorik und zeigen das enorme wirtschaftliche Potential der Nanobiotechnologie.

Mit den Biosensoren wurde ein erster wichtiger Schritt zur Integration von Biomolekülen und elektronischen Sensoren in eine bionische Zukunft getan.

Literatur

- [1] R. Renneberg: Bioanalytik für Einsteiger. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2009
- [2] <http://de.wikipedia.org/wiki/Blutzucker> und <http://de.wikipedia.org/wiki/Blutzuckerbestimmungsmethode>
- [3] R. Renneberg, J.F.C. Glatz. Das fabelhafte FABP. Labor&more Nr. 1, 2013, 16-21
- [4] R. Renneberg, F. Lisdat (Hrsg.): Biosensing for the 21st century. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Band 109. Springer Heidelberg, 2008
- [5] F. Lottspeich, J.W. Engels (Hrsg.): Bioanalytik, Kap. 18: Biosensorik (R. Renneberg, F.W. Scheller), 3. Auflage. Springer Spektrum Heidelberg, 2012

[31.05.13]

Anschrift des Autors:

Prof. Dr. Reinhard Renneberg
The Hong Kong University of Science and Technology
Dept. Chemistry
Clear Water Bay
Kowloon, Hong Kong
chrenneb@ust.hk